



引用格式:杨雪鹏,周留柱,马科,等. 维生素吡咯喹啉醌对水芹种子萌发的生理效应[J]. 轻工学报,2019,34(4):1-7.

中图分类号:Q569;TS255.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.001

文章编号:2096-1553(2019)04-0001-07

# 维生素吡咯喹啉醌对水芹种子萌发的生理效应

## Physiological effects of vitamin pyrroloquinoline quinone on the germination of cress seeds

杨雪鹏,周留柱,马科,崔君竹,叶建斌

YANG Xuepeng, ZHOU Liuzhu, MA Ke, CUI Junzhu, YE Jianbin

郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001

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

### 关键词:

吡咯喹啉醌;水芹;种子萌发;生理效应

### Key words:

pyrroloquinoline quinone; cress; seed germination; physiological effect

**摘要:**研究了不同质量浓度(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的吡咯喹啉醌(PQQ)对水芹种子萌发过程的影响,结果表明:在PQQ的作用下,水芹种子的发芽率、发芽势、发芽指数和呼吸强度均随着PQQ质量浓度的增加而提高,其中质量浓度为16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PQQ浸种效果最佳,PQQ具有促进水芹种子萌发的生理效应;PQQ的作用对水芹种子中淀粉酶活力影响不大,对脂肪酶和过氧化物酶活力有着明显的增强作用。

收稿日期:2019-02-14

基金项目:国家自然科学基金项目(21476217);河南省自然科学基金项目(162300410324);河南省高校创新人才项目(16HASTTT013)

作者简介:杨雪鹏(1973—),男,河南省商丘市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为生物催化与转化。

**Abstract:** The effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) at different mass concentrations (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the germination process of cress seeds were studied. The results showed that the germination rate, the germination potential, the germination index and the respiration rate of cress seeds increased with PQQ's concentration. The PQQ had the best seed soaking effect when the concentration was 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The PQQ could promote the germination of cress seeds. The PQQ had little effect on the amylase activity in cress seeds, and it had a significant enhancement effect on lipase and peroxidase enzyme activities.

## 0 引言

1960年代,一种新型维生素吡咯喹啉醌PQQ(pyrroloquinoline quinone)被科学家发现,它广泛存在于水果、蔬菜、谷物等食品中,是许多细菌中甲醇脱氢酶、葡萄糖脱氢酶GDH(glucose dehydrogenase)、甘油脱氢酶等的辅酶,能够参与呼吸链电子传递<sup>[1-2]</sup>。但是,只有部分革兰氏阴性菌能够自身合成PQQ,而人类与动植物主要从外界获取该维生素<sup>[3-4]</sup>。

研究表明,PQQ可以缩短植物生长停滞期,促进植物细胞新陈代谢和生长<sup>[5]</sup>。张鹏等<sup>[6]</sup>研究发现,在小麦植株生理代谢调节过程中,PQQ可增加叶绿素含量,使光合速率增加,并提高硝酸还原酶和谷氨转氨酶活性,从而减少穗部小花败育,提高小麦结实率。匡炜等<sup>[7]</sup>的研究表明,PQQ能有效提高湘早籼45号水稻的每穗实粒数和结实率,减少每穗空粒数,对水稻增产有促进作用。另外,PQQ作为GDH的氧化还原辅因子,可将葡萄糖转化为葡萄糖酸,溶解不溶性磷酸盐到土壤中,促进植物吸收生长<sup>[8]</sup>。PQQ还可以促进玫瑰红苹果和红富士苹果花粉萌发和花粉管生长,但浓度过高则会减弱效果,甚至产生抑制效应,且红富士苹果较玫瑰红苹果更为敏感,当PQQ浓度高于1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时即产生明显的抑制效应<sup>[9]</sup>。

总之,PQQ能促进某些植物生长,但其对水芹种子的萌发过程是否有影响尚不明确。本文拟以水芹种子为原料,研究不同质量浓度的PQQ对水芹种子萌发的影响,并进一步研究

PQQ的作用对种子萌发过程中关键酶(淀粉酶、脂肪酶和过氧化物酶)活性的影响,以明晰PQQ对水芹种子萌发的生理效应和作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验材料:水芹种子,购于郑州市种子分公司;吡咯喹啉醌(色谱纯),由瀚香生物科技公司提供。

实验试剂:3,5-二硝基水杨酸、甲苯、乙醇,天津市致远化学试剂有限公司产;愈创木酚,北京索莱宝科技有限公司产;橄榄油、乙醚,生工生物工程上海股份有限公司产;百里香酚酞,广东光华化学厂有限公司产。以上试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

HH-S型数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗器械有限公司产;SHP-250型恒温光照培养箱,上海鸿都电子科技有限公司产;2300型UV-分光光度计,尤尼克(上海)有限公司产;Sartorius PB-10型pH酸度计,上海市实验仪器总厂产。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 水芹种子萌发** 取大小均匀的水芹种子,将其分为5组,每组20粒。用质量分数1%的NaClO浸种20 min,蒸馏水洗净,再用不同质量浓度的PQQ(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )室温浸种48 h,用3 mL不同质量浓度的PQQ溶液浸润滤纸,并将种子点播吸附在滤纸上,置于恒温培养箱中于25  $^{\circ}\text{C}$ 下光照培

养. 其间补加相应质量浓度的 PQQ 以保持滤纸的湿润<sup>[10]</sup>. 实验持续 5 d, 每 d 记录正常发芽种子数. 按以下公式计算水芹种子的各种活力指标.

$$\text{发芽率} = \frac{\text{种子发芽数}}{\text{供实验种子数}} \times 100\%$$

$$\text{发芽势} = \frac{\text{第 5 d 种子发芽数}}{\text{供实验种子数}} \times 100\%$$

$$\text{发芽指数} = \sum \frac{\text{某日发芽数}}{\text{发芽日数}}$$

**1.3.2 呼吸强度测定** 呼吸强度, 是植物体新陈代谢强弱的一个重要指标, 它是指单位面积或单位质量的植物体, 在单位时间内所吸收的  $O_2$  或释放的  $CO_2$  量或损失的干重. 用饱和碱液吸收一定量的植物材料在单位时间内放出的  $CO_2$ , 再用标准酸液滴定, 即能测得植物的呼吸强度.

参照李海霞等<sup>[11]</sup>的方法, 用上述不同质量浓度的 PQQ 对种子进行浸种处理, 实验持续 5 d, 每 d 对呼吸速率进行测定, 然后按以下公式计算呼吸强度.

$$\text{呼吸强度} = \frac{V_1 - V_0}{W \times T}$$

其中,  $V_0$  为空白滴定用去的草酸量/mL,  $V_1$  为样品滴定用去的草酸量/mL,  $W$  为样品鲜重/g,  $T$  为测定时间/h.

### 1.3.3 酶活力测定

**1.3.3.1 淀粉酶活力测定** 参照张志鹏<sup>[12]</sup>的方法, 采用 3,5-二硝基水杨酸还原法, 每 12 h 对不同质量浓度 PQQ 浸种处理的水芹种子中淀粉酶活性进行测定, 实验持续 3 d. 酶活力定义为每 g 样品在单位时间内生成还原糖(麦芽糖)的量.

麦芽糖标准曲线的制作: 分别配制 0 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL 和 1.0 mg/mL 的麦芽糖标准溶液, 吸取标准溶液 1.0 mL 于刻度试管中, 加 3.0 mL 二硝基水杨酸(DNS)试剂, 摇匀, 沸水浴 10 min

后经流水冷却, 加蒸馏水定容至 15 mL, 在 520 nm 的波长下比色测定吸光度值, 并建立通过吸光度值求麦芽糖质量浓度的回归方程.

淀粉酶液制备: 称取 1 g 经不同质量浓度 PQQ 溶液作用的水芹种子于研钵中, 加入 5 mL 蒸馏水, 研磨匀浆后倒入离心管中, 再用 10 mL 蒸馏水分次将残渣洗入离心管. 在室温下静置 20 min 制备提取液, 每隔 5 min 搅动 1 次, 使其充分提取. 在 4 °C 条件下 3000 r/min 低温离心 10 min, 取上清液加蒸馏水定容至 100 mL 后摇匀, 即为淀粉酶原液, 用于  $\alpha$ -淀粉酶活力测定. 取淀粉酶原液 10 mL, 用蒸馏水定容至 50 mL 后摇匀, 即为淀粉酶稀释液, 用于淀粉酶活力的测定.

**1.3.3.2 脂肪酶活力测定** 脂肪酶可以分解种子中贮藏的营养物质, 为种子萌发的异养阶段提供能量<sup>[13]</sup>. 参照 GB/T 5523—2008<sup>[14]</sup>, 称取 2 g 水芹种子于研钵中, 加入 1.0 mL 橄榄油, 混匀, 加入 5.0 mL pH=7.5 的磷酸缓冲液, 研磨后转入 100 mL 锥形瓶中, 用 5.0 mL 蒸馏水洗净研钵, 洗液全部转入锥形瓶中, 加 3 滴甲苯, 置于 30 °C 恒温箱内, 保温 24 h 后取出. 加入  $V(\text{乙醇}) : V(\text{乙醚}) = 4 : 1$  的混合液 50 mL, 静置 5 min, 加入 0.5 mL 质量分数为 1% 的百里香酚酞乙醇溶液指示剂, 用 0.2 mol/L 氢氧化钠乙醇溶液滴定至终点(浅蓝色), 记录用去碱液的体积( $V_2$ ). 另外称取 2 g 相应质量浓度试样做对照试验, 除不用 30 °C 保温 24 h 外, 其余操作同上, 记下用去的碱液体积( $V_3$ ). 每 12 h 对不同质量浓度 PQQ 作用的水芹种子进行脂肪酶活性测定, 实验持续 3 d.

$$\text{脂肪酶活力} = \frac{[(V_2 - V_3) \times N] \times 1000}{[W_1 \times (1 - M)]}$$

其中,  $V_2$  为试样滴定用去的碱液体积/mL,  $V_3$  为对照试验用去的碱液体积/mL,  $N$  为实际碱液质量浓度/(mol · L<sup>-1</sup>),  $W_1$  为试样质量/g,  $M$

为试样水分质量分数/%。

**1.3.3.3 过氧化物酶活力测定** 过氧化物酶是以过氧化氢为电子受体催化底物氧化的酶,与呼吸作用、光合作用、生长素的氧化等都有关系<sup>[15]</sup>。分别取0.5 g经不同质量浓度PQQ作用的水芹种子于研钵中,加入液氮后充分研磨,再加入3.0 mL磷酸缓冲液,预冷5 min,7000 r/min离心15 min,上清液为粗酶提取液,提取后低温保存待用。

酶活力测定的反应体系为:0.05 mol/L磷酸缓冲液 2.9 mL; 2%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mL; 0.05 mol/L愈创木酚 1.0 mL; 酶液0.1 mL。用加热煮沸5 min的酶液作为对照。反应体系加入酶液后,立即于34 ℃水浴保温30 s,在470 nm波长处进行比色,开始记录数据,然后每0.5 min记录一次吸光度值,共测2 min。

以每min A<sub>470</sub>的变化值0.01为一个相对酶活单位U,计算植物组织内过氧化物酶活力的大小。每12 h对经不同质量浓度PQQ作用的水芹种子进行过氧化物酶活力测定,实验持续3 d。

$$\text{过氧化物酶活力} = \frac{V_t \times \Delta A_{470}}{W_2 \times V_s \times 0.01 \times t}$$

其中,V<sub>t</sub>为酶液的总体积/mL,ΔA<sub>470</sub>为吸光度的变化值,t为间隔时间/min,V<sub>s</sub>为测定时取用的酶液体积/mL,W<sub>2</sub>为粒种子的质量/g。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同质量浓度的PQQ对水芹种子萌发的影响

水芹种子萌发实验结果如图1所示。由图1可知,以胚根突破种皮1 mm作为种子发芽标准(图1a)),萌发初期(即培养期的前96 h)组间差异不明显,水芹种子基本不发芽或者刚刚露白(图1b))。图2为中后期水芹种子萌发情况。由图2可知,在4种质量浓度范围内,PQQ质量浓度越高,对种子萌发的促进作用越明显。在质量浓度为16 μg/mL的PQQ作用下,种子

萌发到120 h时的发芽率为43.4%,对照组发芽率为33%;至192 h时的发芽率提升至85%,对照组发芽率为42.6%。在其他3种质量浓度的PQQ作用下的水芹种子的发芽率均高于对照组,低于在质量浓度为16 μg/mL的PQQ作用下的发芽率。由此可见PQQ能有效促进水芹种子的萌发。

在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的发芽指数、发芽率和发芽势如图3和图4所示。由图3和图4可知,水芹种子在萌发的第8 d,对照组的发芽率为56.7%,在质量浓度为8 μg/mL的PQQ作用下的种子发芽率为70%;在质量浓度为16 μg/mL的PQQ作用下的种子发芽率最高,为86.7%。以萌发第5 d计算发芽势,在质量浓度为0~16 μg/mL的PQQ作用下,种子的发芽势从33.3%提高到43.3%。这

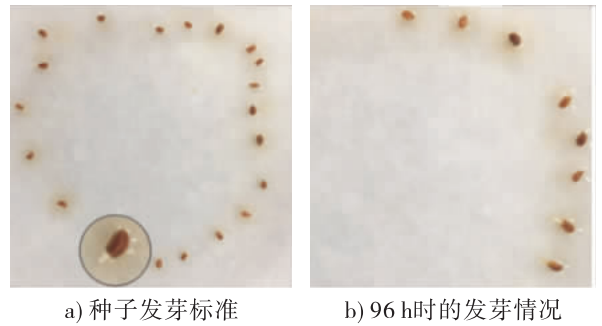


图1 水芹种子萌发实验结果  
Fig. 1 Germination experiment results of cress seeds

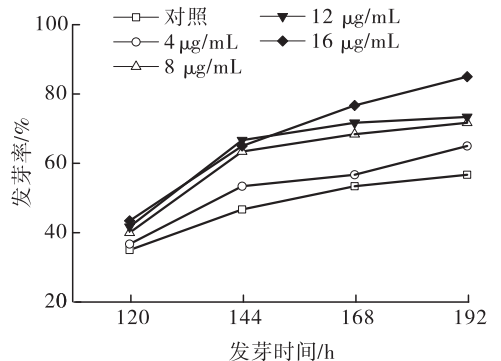


图2 中后期水芹种子萌发情况  
Fig. 2 Germination of cress seeds in the middle and late stages

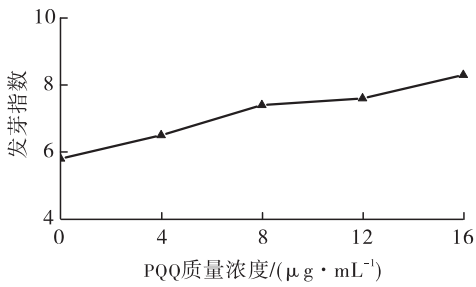


图3 在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的发芽指数

Fig. 3 Germination index of cress seeds under the treatment of different concentrations of PQQ

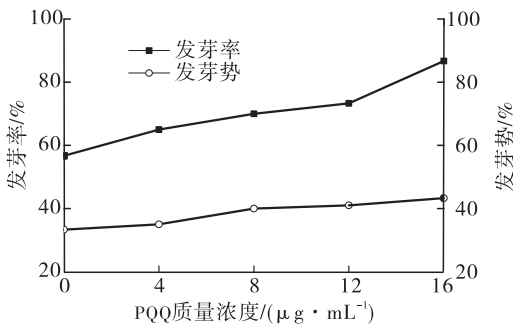


图4 在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的发芽率、发芽势

Fig. 4 Germination rate and germination potential of cress seeds under the treatment of different concentrations of PQQ

表明随着PQQ质量浓度的提高,水芹种子发芽势逐渐增大,种子活力提高,发芽率随之提高.

### 2.2 不同质量浓度的PQQ对水芹种子呼吸强度的影响

在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的呼吸强度如图5所示.由图5可知,在不同质量浓度的PQQ作用下的水芹种子呼吸强度变化趋势基本一致,表明浸种过程中水芹种子的生理变化正常.在不同质量浓度的PQQ作用下的水芹种子,其萌发过程中呼吸强度始终高于对照组,其中经质量浓度为16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PQQ作用的种子呼吸强度在各个时间段均最高.在水芹种子萌发120 h后,经质量浓度为0~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PQQ

作用的种子呼吸强度由0.347  $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 提升到0.400  $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 2.3 不同质量浓度的PQQ对水芹种子关键酶活性的影响

#### 2.3.1 不同质量浓度的PQQ对水芹种子淀粉酶活力的影响

通过测定不同质量浓度的麦芽糖溶液在520 nm波长下的吸光度值,建立的回归方程为 $y = 0.834 1x + 0.020 4$ ,相关系数 $R^2 = 0.999$ .所得麦芽糖标准曲线见图6.

在不同质量浓度的PQQ作用下的水芹种子淀粉酶活力如图7所示.由图7可知,水芹种子经过不同质量浓度的PQQ作用后,其淀粉酶活力变化不大且无明显差异,不同质量浓度在不同时期

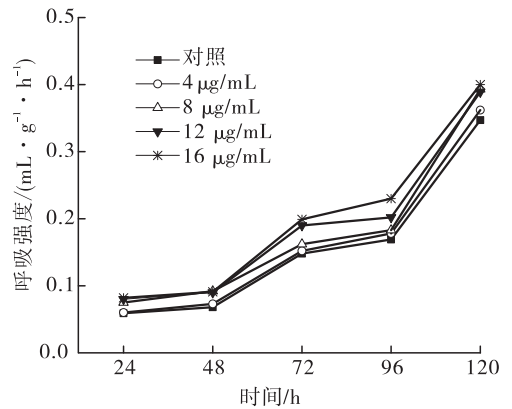


图5 在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的呼吸强度

Fig. 5 Respiration rate of cress seeds under the treatment of different concentrations of PQQ

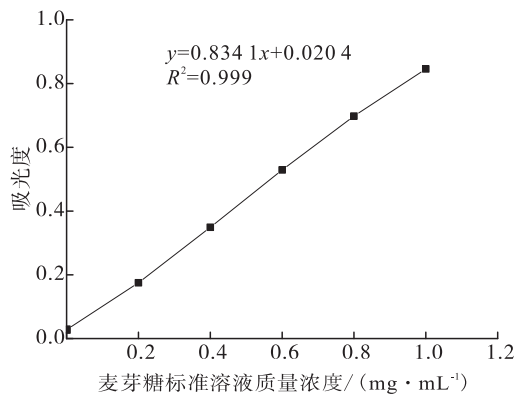


图6 麦芽糖标准曲线

Fig. 6 Standard curve of maltose

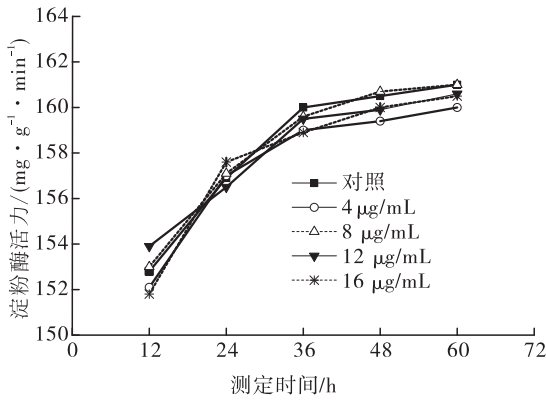


图7 在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的淀粉酶活力

Fig.7 Amylase activity of cress seeds under the treatment of different concentrations of PQQ

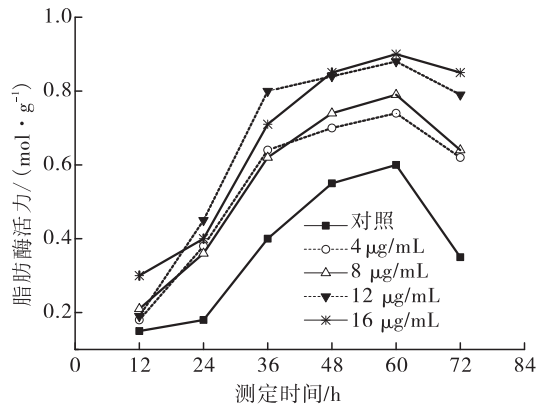


图8 在不同质量浓度的PQQ作用下水芹种子的脂肪酶活力

Fig.8 Lipase activity of cress seeds under the treatment of different concentrations of PQQ

的测定结果也无显著差异, 淀粉酶活力在 152.1 ~ 161.0  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  之间, 表明 PQQ 对水芹种子淀粉酶活力影响不大.

### 2.3.2 不同质量浓度的 PQQ 对水芹种子脂肪酶活力的影响

在不同质量浓度的 PQQ 作用下水芹种子脂肪酶活力如图 8 所示. 由图 8 可知, 经不同质量浓度的 PQQ 的作用, 水芹种子随着萌发进程的推进, 脂肪酶活力与对照组有较大的差异, 且随着 PQQ 质量浓度的增加, 促进作用更加明显. 经质量浓度为 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PQQ 作用的水芹种子, 在种子萌发的第 36 h, 其脂肪酶活力为 0.71 mol/g, 对照组脂肪酶活力为 0.4 mol/g; 在第 60 h, 其脂肪酶活力为 0.9 mol/g, 对照组脂肪酶活力为 0.6 mol/g; 在第 72 h, 其脂肪酶活力为 0.85 mol/g, 对照组脂肪酶活力为 0.35 mol/g. 在质量浓度 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PQQ 作用下脂肪酶活力变化与在质量浓度 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PQQ 作用下的趋势相同, 且均低于在质量浓度 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PQQ 作用下的种子脂肪酶活力. 不同质量浓度的 PQQ 作用下的种子酶活力比对照组均有明显提升, 表明 PQQ 能促进水芹种子脂肪酶活力的增强.

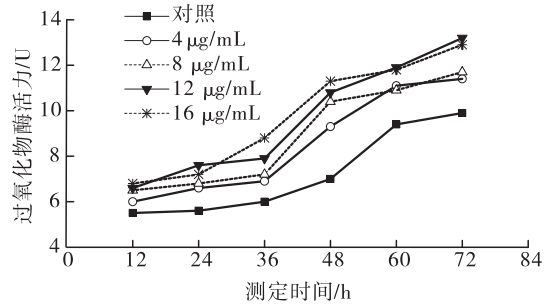


图9 在不同质量浓度PQQ作用下水芹种子的过氧化物酶活力

Fig.9 Peroxidase activity of cress seeds under the treatment of different concentrations of PQQ

### 2.3.3 不同质量浓度的 PQQ 对水芹种子过氧化物酶活力的影响

在不同质量浓度的 PQQ 作用下水芹种子过氧化物酶活力如图 9 所示. 由图 9 可知, 经过不同质量浓度的 PQQ 作用后, 水芹种子的过氧化物酶活力均有所提高. 经质量浓度为 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PQQ 作用的水芹种子, 在种子萌发的第 24 h, 其过氧化物酶活力为 7.2 U, 而对照组过氧化物酶活力为 5.2 U; 在 24 ~ 48 h 过程中, 其过氧化物酶活力迅速变大, 至 48 h 时, 其过氧化物酶活力为 11.3 U, 而对照组过氧化物酶活力为 4.4 U; 48 h 后酶活力提升减缓, 经其他质量浓度的 PQQ 处理的种子

过氧化物酶活力变化趋势也基本相同.其原因可能是PQQ能够参与呼吸链电子传递,由此促进了过氧化物酶活力的提高,进而加快了水芹种子萌发.

### 3 结论

本文研究了4种质量浓度(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的PQQ对水芹种子萌发过程中发芽率、发芽势、发芽指数、呼吸强度和关键酶(淀粉酶、脂肪酶和过氧化物酶)活力的影响.结果表明,PQQ可以促进水芹种子萌发,种子发芽率、发芽势、发芽指数和呼吸强度均随着PQQ质量浓度的增加而提高,其中,质量浓度为16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PQQ浸种效果最佳;PQQ对水芹种子中淀粉酶活力影响不大,对脂肪酶和过氧化物酶活力有着明显的增强作用,表明PQQ促进水芹种子萌发的机制可能是通过增强水芹种子萌发过程中脂肪酶和过氧化物酶活力而实现的.

该研究初步探索了PQQ对水芹种子萌发的生理效应,证实了PQQ的作用可以促进水芹种子的萌发,接下来仍需就PQQ提高水芹种子关键酶活力的影响途径作进一步研究,以期为开发PQQ成为生物复合肥中的功能组分提供理论参考.

### 参考文献:

- [1] 章芸,杨修亮,司振军,等.海洋甲基营养菌产吡咯喹啉醌(PQQ)的发酵条件优化及产物分离[J].食品科技,2015,40(8):2.
- [2] 李红月,曾伟主,周景文.高产吡咯喹啉醌扭脱甲基杆菌的高通量选育[J].生物工程学报,2018,34(5):794.
- [3] 彭乔木,周璐璐,熊力,等.嗜甲基细菌 *Serratia Marcescens* NH8 的筛选及其PQQ基因的克隆[J].吉首大学学报(自然科学版),2018,39(1):59.
- [4] 冷春玲,宋洁.吡咯喹啉醌生物学功能研究进展[J].辽东学院学报(自然科学版),2014,21(2):103.
- [5] 刘卫群,杨铁钊,李文,等.吡咯喹啉醌对烟草幼苗中IAA和玉米素加玉米素核苷及核酸含量的影响(简报)[J].植物生理学通讯,1998,34(4):259.
- [6] 张鹏,孙慧玲,孙静娴,等.吡咯喹啉醌(PQQ)营养作用研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(10):1987.
- [7] 匡炜,刘洋,李强,等.PQQ对水稻产量及主要农艺性状的影响[J].湖南农业科学,2017,44(12):40.
- [8] HAN S H, KIM C H, LEE J H, et al. Inactivation of PQQ genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2010, 282 (1): 140.
- [9] 卫秀英,李秀菊,朱坤华.吡咯喹啉醌对苹果花粉萌发和花粉管生长的影响(简报)[J].植物生理学通讯,2000,36(4):320.
- [10] 李良俊,王建锋,印荔,等.水芹新品种及配套优质高产栽培技术[J].长江蔬菜,2013,14(18):179.
- [11] 李海霞,徐久玮,蔡明历,等.小篮子法测定植物种子呼吸速率的方法改进[J].生物学杂志,2015,32(1):100.
- [12] 张志鹏.水芹种子萌发的因素及其休眠生理研究[D].合肥:安徽农业大学,2007.
- [13] 唐靓,张岭,李林子,等.吡咯喹啉醌研究新进展[J].食品科学,2015,36(19):287.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.粮油检验 粮食、油料的脂肪酶活动度的测定:GB/T 5523—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [15] 杨璐,熊向华,汪建华,等.吡咯喹啉醌研究进展[J].生物技术通讯,2009,20(6):874.



引用格式:徐清萍,王语迟,纵伟,等.高活性乳酸菌发酵型番茄酱生产工艺研究[J].轻工学报,2019,34(4):8-14.

中图分类号:TS255.53 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.002

文章编号:2096-1553(2019)04-0008-07

# 高活性乳酸菌发酵型番茄酱生产工艺研究

## Study on the production process of high-activity lactic acid bacteria fermented tomato sauce

徐清萍<sup>1,2</sup>,王语迟<sup>1</sup>,纵伟<sup>1,2</sup>,赵光远<sup>1,2</sup>

XU Qingping<sup>1,2</sup>,WANG Yuchi<sup>1</sup>,ZONG Wei<sup>1,2</sup>,ZHAO Guangyuan<sup>1,2</sup>

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 食品生产与安全河南省协同创新中心,河南 郑州 450001

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

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

### 关键词:

发酵型番茄酱;  
乳酸菌;活菌数;  
生产工艺

### Key words:

fermented tomato sauce;  
lactic acid bacteria;  
viable bacteria count;  
production process

**摘要:**采用正交试验设计方法,以乳酸菌活菌数为指标,考察了乳酸链球菌接种量、嗜酸乳杆菌接种量、菊芋添加量、甜味剂添加量、盐添加量和发酵温度6个因素对乳酸菌发酵型番茄酱生产过程中乳酸菌活菌数变化的影响,优化了高活性乳酸菌发酵型番茄酱的生产工艺。结果表明:采用乳酸链球菌和嗜酸乳杆菌复合发酵,有利于提高发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数;适当添加菊芋有利于乳酸菌的增殖,而甜味剂和盐的使用对乳酸菌增殖影响较小;发酵温度在30℃以上时有利于乳酸菌的增殖。高活性乳酸菌发酵型番茄的适宜生产工艺条件为乳酸链球菌接种量1.0%~2.0%,嗜酸乳杆菌接种量2.0%,菊芋添加量15%~20%,发酵温度30℃。该条件下制得的高活性乳酸菌发酵型番茄酱(乳酸菌活菌数保持在10<sup>9</sup> CFU/mL)的最佳保存期为30 d。

收稿日期:2018-11-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31501539);河南省创新型科技团队(C20150024);河南省高校科技创新团队(16IRTSTHN010);郑州轻工业大学大学生科技活动项目

作者简介:徐清萍(1975—),女,山西省太原市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为果蔬加工与安全控制,生物物质发酵与提取。



**Abstract:** The orthogonal experimental design method was used, the live bacteria count of lactic acid bacteria was taken as an indicator to investigate the effects of *Streptococcus lactis* inoculation amount, *Lactobacillus acidophilus* inoculation amount, jerusalem artichoke addition, sweetener addition, salt addition and fermentation temperature on the changes of live bacteria count in the production of lactic acid bacteria fermented tomato sauce. The production process of high-activity lactic acid bacteria fermented tomato sauce was optimized. The results showed that the combined fermentation of *Streptococcus lactis* and *Lactobacillus acidophilus* was beneficial to increase the live bacteria count of lactic acid bacteria in fermented tomato sauce. Appropriate addition of jerusalem artichoke was beneficial to the proliferation of lactic acid bacteria, and the use of sweeteners and salts had little effect on the proliferation of lactic acid bacteria; When the fermentation temperature was above 30 °C, it was beneficial to the proliferation of lactic acid bacteria. The suitable production conditions for high-activity lactic acid bacteria fermented tomato sauce were *Streptococcus lactis* inoculation amount 1.0% ~ 2.0%, *Lactobacillus acidophilus* inoculation amount 2.0%, jerusalem artichoke addition 15% ~ 20%, fermentation temperature 30 °C. The optimum storage period of the highly active lactic acid bacteria fermented tomato sauce (the live bacteria count of lactic acid bacteria kept at 10<sup>9</sup> CFU/mL) prepared under these conditions was 30 days.

## 0 引言

番茄广泛栽培于我国南北各地,具有丰富的营养和特殊的风味,可以生食、煮食等。在食品工业中,番茄主要用于生产番茄酱<sup>[1]</sup>。选择成熟红番茄,经破碎、打浆、去除皮籽、浓缩、装罐、杀菌等工序即可生产出番茄酱<sup>[2]</sup>。目前番茄酱产量非常大,据相关新闻报道<sup>[3]</sup>,2017年全国种植番茄面积约100万亩,番茄酱加工企业共有182家,其中2017年开机生产企业100家,45%的加工企业全年未开工,产能过剩的问题已十分突出,因此,开发新型的番茄深加工产品是解决这一问题的有效途径。

番茄中含有葡萄糖、果糖、柠檬酸、多酚、黄酮、维生素、钙、镁等<sup>[4]</sup>,有利于益生菌的生长<sup>[5-6]</sup>。益生菌能在人类和动物肠道内定殖、生长,并具有抑菌、抗癌、提高免疫力和预防腹泻等作用<sup>[7]</sup>。采用益生菌发酵番茄酱能够综合益生菌发酵产品和番茄酱产品的优点,使得经混合发酵制备的番茄果酱<sup>[8]</sup>、番茄饮料<sup>[9-10]</sup>等有望成为具有广阔市场前景的新型产品。目前尚未见关于采用乳酸菌发酵制备发酵型番茄酱的相关研究报道。采用发酵法可以减少番茄酱传

统方法制作过程中对番茄原料的加热次数,降低高温对番茄中维生素等的破坏,从而有效提高番茄酱的营养价值<sup>[11]</sup>。鉴于此,本文拟选用具有益生功能的乳酸菌(乳酸链球菌、嗜酸乳杆菌),结合其他生产工艺因素(菊芋添加量、甜味剂添加量、盐添加量和发酵温度),采用正交试验设计方法,以乳酸菌活菌数为指标,考察乳酸菌在番茄酱发酵生产过程中的变化规律,并优化发酵型番茄酱的生产工艺,以期制备高活性乳酸菌发酵型番茄酱,进而为新型番茄深加工产品的工业化生产提供一定的理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 原料** 番茄、菊芋、豆芽,市售,新鲜无霉烂变质;葡萄糖,分析纯,市售;MRS肉汤培养基,购自杭州百思生物技术有限公司。

嗜酸乳杆菌和乳酸链球菌,为实验室分离保存菌种。

**1.1.2 培养基** 乳酸菌液体培养基:番茄质量浓度为2 g/L,菊芋质量浓度为1 g/L,豆芽质量浓度为2 g/L,葡萄糖质量浓度为2 g/L,蒸馏水。

### 1.2 仪器设备

LX-C35L型高压灭菌锅,合肥华泰医疗

设备有限公司产; SW - CJ - 2FD 型洁净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产; SHP - 250 型智能生化培养箱, 上海鸿都电子科技有限公司产; YP20001 型电子天平, 上海光正医疗仪器有限公司产。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 乳酸菌种液的制备** 将乳酸链球菌、嗜酸乳杆菌分别接入 MRS 肉汤培养基进行活化, 然后分别转入乳酸菌液体培养基中培养, 培养至两株乳酸菌活菌数均达  $10^8$  CFU/mL 以上, 即可作为乳酸菌种液备用。

**1.3.2 发酵型番茄酱的制备** 将新鲜菊芋清洗干净, 蒸熟。将新鲜番茄洗净, 热烫去皮, 加入甜味剂和盐, 与菊芋按一定质量比混合后, 打浆, 巴氏杀菌法灭菌 15 ~ 20 min, 接入乳酸菌种液, 混匀, 装入真空包装袋, 抽真空, 封口, 发酵。

### 1.3.3 乳酸菌发酵型番茄酱工艺条件的确定

乳酸菌接种量主要影响菌种的生长繁殖速度, 但接种量过大则会影响成品番茄酱的体态。甜味剂和盐主要影响成品的感官口感, 甜味剂的使用按照我国《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》(GB 2760—2014)<sup>[13]</sup> 选择其限量标准范围, 而盐的使用以生产低盐番茄酱为目标。选择乳酸链球菌接种量、嗜酸乳杆菌接种量、菊芋添加量、甜味剂添加量、盐添加量和发酵温度 6 个因素, 其中, 番茄和菊芋总质量为 100 g, 将番茄和菊芋分别按质量比 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20 混合(即菊芋添加量分别为 5%, 10%, 15% 和 20%), 其他原料添加量按在番茄和菊芋总质量中的占比计算。以乳酸链球菌接种量 0 ~ 2%, 嗜酸乳杆菌接种量 0 ~ 2%, 每 100 g 番茄酱中甜味剂添加量 0 ~ 0.025 g, 盐添加量 0 ~ 7.5 g 的条件进行发酵, 采用  $L_{25}(5^6)$  正交试验研究乳酸链球菌接种量、嗜酸乳杆菌接种量、菊芋添加量、甜味剂添加量、盐添加量和发酵温度对番茄酱发酵过程中

乳酸菌活菌数的影响, 番茄酱发酵试验正交设计表见表 1。其中正交设计对应的 25 个系列试验条件见表 2。分别于 8 h (0.33 d), 1 d, 2 d, 6 d, 14 d, 21 d, 30 d, 61 d, 92 d 定期取样, 测定发酵型番茄酱中的乳酸菌活菌数。

**1.3.4 乳酸菌活菌计数方法** 乳酸菌活菌计数采用平板活菌计数法, 参照《食品微生物学检验 乳酸菌检验》(GB 4789.35—2016)<sup>[12]</sup> 方法进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸菌种液培养时间优选

将两株乳酸菌分别接入液体培养基培养, 每隔 2 h 无菌取样, 测定乳酸菌活菌数。结果表明, 乳酸菌活菌数在 6 h 达到  $10^8$  CFU/mL, 此后不再发生明显变化。因此, 本实验选择培养 6 h 后的乳酸菌进行接种。

### 2.2 番茄酱发酵生产过程中乳酸菌活菌数的变化

发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数随时间变化曲线如图 1 所示。由图 1 可知, 各系列发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数在 0 ~ 6 d 内均以不同比例呈上升趋势, 活菌数在 14 d 时达到最大值, 为  $1.52 \times 10^9$  CFU/mL; 6 ~ 30 d 发酵型番茄酱中活菌数比较稳定; 30 d 后活菌数开始减少, 61 d 后番茄酱中活菌数急剧下降, 92 d 时活菌数最低。发酵初期属于乳酸菌增殖期, 活菌数会

表 1 番茄酱发酵试验正交设计表

Table 1 Orthogonal design table for tomato sauce fermentation

水平	乳酸链球菌接种量 / %	嗜酸乳杆菌接种量 / %	菊芋添加量 / %	100 g 番茄酱甜味剂添加量 / g	100 g 番茄酱盐添加量 / g	发酵温度 / °C
1	0	0	0	0	0	20
2	0.5	0.5	5	0.010	0.5	25
3	1.0	1.0	10	0.015	2.5	30
4	1.5	1.5	15	0.020	5.0	35
5	2.0	2.0	20	0.025	7.5	40

表2 正交设计对应的25个系列试验条件

Table 2 25 series of test conditions corresponding to orthogonal design

系列	乳酸链球菌 接种量/%	嗜酸乳杆菌 接种量/%	菊芋 添加量/%	100 g 番茄酱 甜味剂添加量/g	100 g 番茄酱 盐添加量/g	发酵温度 /°C
1	0	0	0	0	0	20
2	0	0.5	5	0.010	0.5	25
3	0	1.0	10	0.015	2.5	30
4	0	1.5	15	0.020	5.0	35
5	0	2.0	20	0.025	7.5	40
6	0.5	0	5	0.015	5.0	40
7	0.5	0.5	10	0.020	7.5	20
8	0.5	1.0	15	0.025	0	25
9	0.5	1.5	20	0	0.5	30
10	0.5	2.0	0	0.010	2.5	35
11	1.0	0	10	0.025	0.5	35
12	1.0	0.5	15	0	2.5	40
13	1.0	1.0	20	0.010	5.0	20
14	1.0	1.5	0	0.015	7.5	25
15	1.0	2.0	5	0.020	0	30
16	1.5	0	15	0.010	7.5	30
17	1.5	0.5	20	0.015	0	35
18	1.5	1.0	0	0.020	0.5	40
19	1.5	1.5	5	0.025	2.5	20
20	1.5	2.0	10	0	5.0	25
21	2.0	0	20	0.020	2.5	25
22	2.0	0.5	0	0.025	5.0	30
23	2.0	1.0	5	0	7.5	35
24	2.0	1.5	10	0.010	0	40
25	2.0	2.0	15	0.015	0.5	20

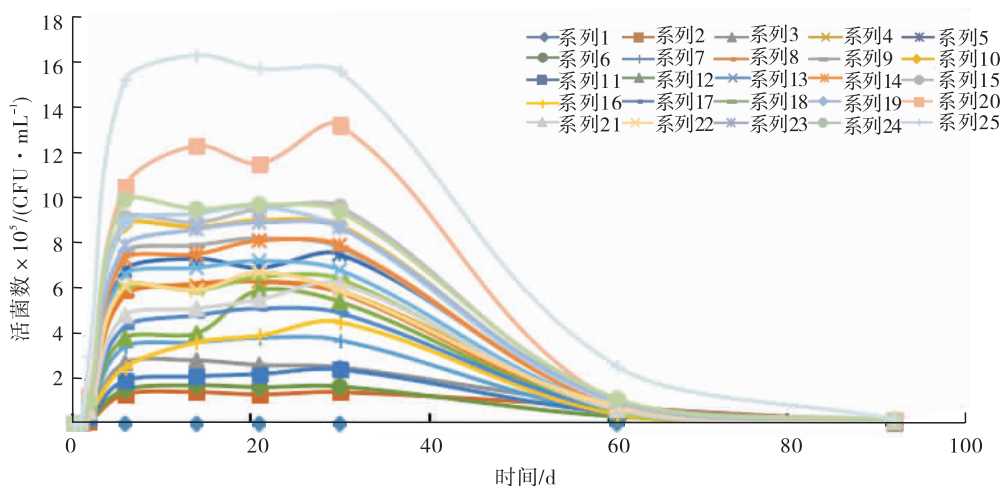


图1 发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数随时间的变化曲线

Fig. 1 The variation of the number of live bacteria of lactic acid bacteria in fermented tomato sauce over time

随时间的延长而迅速增加. 当活菌数增加到  $10^8$  CFU/mL 后, 其数值在较长时间内维持稳定, 表明番茄酱的构成成分有利于乳酸菌的存

活. 此外, 番茄、菊芋中含有葡萄糖、蛋白质等适合微生物生长的碳源和氮源, 番茄中含有的丰富维生素 C、番茄红素可作为番茄酱良好的

抗氧化剂<sup>[14]</sup>,同时菊芋中含有的菊糖也能提高乳酸菌的存活率<sup>[15]</sup>.

### 2.3 乳酸菌发酵型番茄酱生产工艺的优化

由图1可知,发酵8 h时,番茄酱中的乳酸菌即进入对数增长期,各系列间活菌数已存在较大差异,故以发酵8 h (0.33 d)的数据为例,对番茄酱中乳酸菌活菌数进行直观分析和方差分析,结果见表3和表4.

表3为发酵8 h时番茄酱中乳酸菌活菌数直观分析结果.由表3中的*R*值可知,各因素对乳酸菌活菌数的影响由大到小顺序依次为:嗜酸乳杆菌接种量 > 乳酸链球菌接种量 > 菊芋添

加量 > 发酵温度 > 盐添加量 > 甜味剂添加量,最优番茄酱发酵方案为乳酸链球菌接种量1.5%,嗜酸乳杆菌接种量2.0%,菊芋添加量20%,每100 g番茄酱中甜味剂添加量0.010 g,盐添加量2.5 g,发酵温度30 ℃.

发酵8 h时番茄酱中乳酸菌活菌数的方差分析见表4.由表4可知,嗜酸乳杆菌接种量与乳酸链球菌接种量对发酵番茄酱中乳酸菌活菌数具有显著性影响.

### 2.4 番茄酱优化生产工艺的验证

为了确定乳酸菌发酵型番茄酱的最终优化生产工艺,采取与发酵8 h同样的分析方法,对

表3 发酵8 h时番茄酱中乳酸菌活菌数直观分析结果  
Table 3 The viable counts in fermented tomato sauce at 8 h

系列	因素						活菌数 × 10 <sup>5</sup> / (CFU · mL <sup>-1</sup> )
	乳酸链球菌接种量/%	嗜酸乳杆菌接种量/%	菊芋添加量/%	100 g 番茄酱甜味剂添加量/g	100 g 番茄酱盐添加量/g	发酵温度/℃	
1	0	0	0	0	0	20	0.002
2	0	0.5	5	0.010	0.5	25	0.64
3	0	1.0	10	0.015	2.5	30	0.78
4	0	1.5	15	0.020	5.0	35	1.05
5	0	2.0	20	0.025	7.5	40	1.95
6	0.5	0	5	0.015	5.0	40	0.69
7	0.5	0.5	10	0.020	7.5	20	0.89
8	0.5	1.0	15	0.025	0	25	1.56
9	0.5	1.5	20	0	0.5	30	2.53
10	0.5	2.0	0	0.010	2.5	35	3.01
11	1.0	0	10	0.025	0.5	35	0.98
12	1.0	0.5	15	0	2.5	40	1.99
13	1.0	1.0	20	0.010	5.0	20	2.46
14	1.0	1.5	0	0.015	7.5	25	2.90
15	1.0	2.0	5	0.020	0	30	3.05
16	1.5	0	15	0.010	7.5	30	1.73
17	1.5	0.5	20	0.015	0	35	2.37
18	1.5	1.0	0	0.020	0.5	40	2.54
19	1.5	1.5	5	0.025	2.5	20	2.89
20	1.5	2.0	10	0	5.0	25	3.21
21	2.0	0	20	0.020	2.5	25	1.95
22	2.0	0.5	0	0.025	5.0	30	2.01
23	2.0	1.0	5	0	7.5	35	2.57
24	2.0	1.5	10	0.010	0	40	2.68
25	2.0	2.0	15	0.015	0.5	20	3.07
<i>K</i> <sub>1</sub>	0.884	1.070	2.092	2.060	1.932	1.862	0.884
<i>K</i> <sub>2</sub>	1.736	1.580	1.968	2.104	1.952	1.762	1.736
<i>K</i> <sub>3</sub>	2.276	1.982	1.708	1.962	2.124	2.218	2.276
<i>K</i> <sub>4</sub>	2.548	2.410	1.880	1.896	1.884	1.996	2.548
<i>K</i> <sub>5</sub>	2.456	2.858	2.252	1.878	2.008	1.970	2.456
<i>R</i>	1.664	1.788	0.544	0.226	0.240	0.456	1.664

发酵 48 h, 6 d, 14 d 的番茄酱中乳酸菌活菌数进行直观分析和方差分析(表格略)。结果表明,嗜酸乳杆菌接种量和乳酸链球菌接种量对发酵型番茄酱乳酸菌活菌数具有显著性影响,其中嗜酸乳杆菌接种量的影响更大,尤其在储藏过程中,嗜酸乳杆菌对乳酸菌活菌数的影响要高于乳酸链球菌。这可能是因为随着发酵时间的延长,原料中的糖转化为乳酸等成分,发酵型番茄酱呈酸性环境,嗜酸乳杆菌因对低 pH 环境耐受力强,故其活菌数也较大<sup>[16]</sup>。与没有进行人工接种的对照组(系列 1)相比,接种乳酸菌后番茄酱中的活菌数明显增加。这表明两株乳酸菌接种量是影响发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数的主要因素,且适当提高接种量有利于提高番茄酱中的乳酸菌活菌数。对不同发酵时间段乳酸菌活菌数的变化分析,当嗜酸乳杆菌接种量为 2.0%,乳酸链球菌接种量为 1.0% ~ 2.0% 时,番茄酱中的乳酸菌活菌数较高。

菊芋的添加量对发酵型番茄酱中的乳酸菌活菌数也有一定影响,表明与菊芋进行适当比例的搭配有利于提高番茄酱中的乳酸菌活菌数。对不同发酵时间段菊芋对乳酸菌活菌数的影响变化分析可知,菊芋的添加量为 15% ~ 20% 时比较适宜。

表 4 发酵 8 h 时番茄酱中乳酸菌活菌数的方差分析表( $\alpha = 0.05$ )

Table 4 Variance analysis of viable counts of fermented tomato sauce at 8 h( $\alpha = 0.05$ )

差异源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
乳酸链球菌接种量	9.483	4	47.894	6.390	*
嗜酸乳杆菌接种量	9.716	4	49.071	6.390	*
菊芋添加量	0.854	4	4.313	6.390	
甜味剂添加量	0.198	4	1.000	6.390	
盐添加量	0.169	4	0.854	6.390	
发酵温度	0.601	4	3.035	6.390	
误差	0.200	4			

甜味剂和盐主要用于改善番茄酱的口感风味,与其他因素相比,对发酵型番茄酱中的乳酸菌活菌数影响较小。通常盐含量较高时,高浓度的盐对微生物的生长有一定的抑制作用,但从不同发酵时间段取样分析结果来看,甜味剂和盐的添加对发酵型番茄酱中的乳酸菌活菌数影响不大,且对发酵过程中发酵型番茄酱中乳酸菌的增殖影响也不大。从发酵温度对发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数变化的影响来看,发酵温度在 30 °C 以上时有利于乳酸菌的增殖。

另外,从不同发酵时间段番茄酱中乳酸菌活菌数变化来看,番茄酱在 6 ~ 30 d 中能保持较高的乳酸菌活菌数,可达  $10^9$  CFU/mL。此后,随着发酵生产时间的延长,乳酸菌活菌数会逐渐下降,2 个月时降至  $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL,3 个月时降为  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL。由此可知,欲制备获得高活性乳酸菌发酵型番茄酱(乳酸菌活菌数保持在  $10^9$  CFU/mL),其最佳保存期为 30 d。

### 3 结论

本文主要采用嗜酸乳杆菌和乳酸链球菌两种常见益生乳酸菌混合发酵番茄酱,通过对不同发酵时间段番茄酱中乳酸菌活菌数变化规律的研究筛选出高活性乳酸菌发酵型番茄酱的生产工艺,得到如下结论:采用嗜酸乳杆菌和乳酸链球菌复合发酵,有利于提高发酵型番茄酱中乳酸菌活菌数;适当添加菊芋有利于乳酸菌的增殖,而甜味剂和盐的使用对乳酸菌增殖影响较小;发酵温度在 30 °C 以上时有利于乳酸菌的增殖;高活性乳酸菌发酵型番茄酱的适宜生产工艺条件为嗜酸乳杆菌接种量 2.0%,乳酸链球菌接种量 1.0% ~ 2.0%,菊芋添加量 15% ~ 20%,发酵温度 30 °C。该条件下制得的高活性乳酸菌发酵型番茄酱(乳酸菌活菌数保持在  $10^9$  CFU/mL)的最佳保存期为 30 d。

乳酸菌发酵型番茄酱在较长时间内能保持

乳酸菌活性,但除乳酸菌活菌数外,番茄酱的风味亦是影响产品的主要因素.后期还需要通过进一步对生产工艺的优化,调整各种香辛料、甜味剂、盐等的添加比例,以获得风味更好的高活性乳酸菌发酵型番茄酱.

### 参考文献:

- [1] 倪静安,邹莺,黄萍,等.番茄红素与番茄酱[J].郑州轻工业学院学报,1993,8(3):30.
- [2] 徐清萍.酱类制品生产技术[M].北京:化学工业出版社,2009.
- [3] 赵美佳,邹通,汤泽君,等.番茄营养成分以及国内外加工现状[J].食品研究与开发,2016,37(10):215.
- [4] 刘静.高效液相色谱法测定番茄中糖酸的研究[J].农业科技与装备,2009(4):87.
- [5] 王春耀.双歧杆菌培养基的优化以及双歧番茄醋的实验室研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [6] 万红兵,田洪涛,马乐辉,等.保加利亚乳杆菌番茄复合汁增菌培养基的优选研究[J].中国乳品工业,2006(8):14.
- [7] PRADO F C, PARADA J L, PANDEY A, et al. Trends in non-dairy probiotic beverages [J]. Food Research International, 2008, 41(2):111.
- [8] 李宇,刘晓燕,白文明,等.茎瘤芥叶番茄发酵果酱的研制[J].食品工业,2016,37(11):135.
- [9] 徐安书,田春美,刘炜.龙眼混合果蔬汁乳酸菌饮料的生产工艺[J].食品与发酵工业,2012,38(6):128.
- [10] 潘明,刘慧杰,郭脉玺,等.乳酸菌发酵芥菜-番茄复合蔬菜汁的动力学研究[J].食品科学,2009,30(23):281.
- [11] 宋苏华.发酵果蔬饮料益生乳酸菌的强化筛选及其发酵工艺技术研究[D].南昌:南昌大学,2012.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验:GB 4789.35—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.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,2015.
- [14] 王春耀,张德纯,朱辉,等.双歧杆菌番茄培养基的初步研究[J].中国微生态学杂志,2011,23(11):991.
- [15] SAVEDBOEORN W, NIYOMRAT S, NAKNOVN J, et al. Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract[J]. Agriculture and Natural Resources, 2017, 51(6):463.
- [16] 袁峥.嗜酸乳杆菌耐酸机理研究[D].郑州:河南科技学院,2013.



引用格式:郭晨,汪晓鸽,孔少华,等. 双菌株联合发酵提高鹰嘴豆纳豆激酶活力的研究[J]. 轻工学报,2019,34(4):15-20.

中图分类号:TS214.9 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.003

文章编号:2096-1553(2019)04-0015-06

# 双菌株联合发酵 提高鹰嘴豆纳豆激酶活力的研究

## Study of improving chickpeanattokinase activity through fermentation by two compound strains

郭晨,汪晓鸽,孔少华,尚紫博,樊一,吕成状,黄裔翔,  
张俊杰

GUO Chen, WANG Xiaoge, KONG Shaohua, SHANG Zibo, FAN Yi,  
LYU Chengzhuang, HUANG Yixiang, ZHANG Junjie

郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001

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

### 关键词:

双菌发酵;鹰嘴豆;  
纳豆芽孢杆菌;  
纳豆激酶

### Key words:

two strains fermentation;  
chickpea; *Bacillus subtilisnatto*; nattokinase

**摘要:**以鹰嘴豆为原料,选取两株不同来源的纳豆芽孢杆菌 F-2-4 和 S-15,分别通过单接种和混合接种的方式,制备鹰嘴豆纳豆,并测定其纳豆激酶活力,结果表明:通过混合接种方式制备的鹰嘴豆纳豆的纳豆激酶活力明显高于单接种方式,当 F-2-4 与 S-15 接种体积比为 1:1,且接种量为 4% 时,鹰嘴豆纳豆的纳豆激酶活力达到最高值 6 287.16 UI/g.

收稿日期:2019-03-04

基金项目:国家自然科学基金项目(3100008)

作者简介:郭晨(1993—),男,山西省长治市人,郑州轻工业大学硕士研究生,主要研究方向为食品微生物发酵.

通信作者:张俊杰(1984—),男,河南省汝州市人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为微生物分类与分子生态学.

**Abstract:** With chickpea as material, two *Bacillus subtilis* strains (F-2-4 and S-15) isolated from different sources were selected and were inoculated into chickpea to prepare chickpea natto products by single-inoculation and co-inoculation, then nattokinase activity of chickpea natto was determined. Results showed that nattokinase activity was improved significantly by co-inoculation. When the inoculative volume ratio of F-2-4 and S-15 was 1 : 1, and inoculation amount was 4%, the nattokinase activity of chickpea natto reached the maximum 6 287. 16 UI/g.

## 0 引言

传统纳豆是以大豆为原料,接种纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)后,在一定条件下通过发酵而制成的一种豆类食品<sup>[1]</sup>。成熟的纳豆呈深黄色,有光泽,口感松软,表面黏液明显,用筷子挑起可以拉起很长的黏液丝状物质,口感微甜,有淡淡氨臭味<sup>[2]</sup>。纳豆营养价值很高,具有抗血栓、降血压、抗肿瘤等多种生理功能,长期食用可预防或治疗多种亚健康疾病<sup>[3]</sup>。纳豆激酶是一种具有强大溶栓活性的丝氨酸蛋白酶<sup>[4]</sup>,与临床一线溶栓药物(尿激酶和链激酶)相比,纳豆激酶具有安全性好、成本低、半衰期长、可口服等优点,因此作为溶栓药物或保健食品备受关注<sup>[5]</sup>。

尽管纳豆是一种成本低、营养价值高的健康食品,但因其具有特殊氨臭味,不易被广大消费者接受<sup>[6]</sup>。鹰嘴豆是仅次于大豆的世界第二大种植豆类<sup>[7]</sup>,所含氨基酸种类齐全,且包含了人体必需的8种氨基酸<sup>[8]</sup>。金爽等<sup>[9]</sup>研究发现,鹰嘴豆经纳豆芽孢杆菌发酵后,具有比传统纳豆氨臭味轻、拉丝现象少、口感好、纳豆激酶活性高等优点。因此,用鹰嘴豆发酵制作纳豆具有广阔的开发前景。

纳豆芽孢杆菌是可应用于食品的安全益生菌,具有改善人体肠道菌群,助消化,增强肌体免疫力等功能<sup>[10]</sup>。将纳豆芽孢杆菌接种到鹰嘴豆上进行发酵,可制成富含纳豆激酶的鹰嘴豆纳豆。纳豆激酶活力是评价纳豆品质和营养价值的重要指标,其评价方法很多,主要包括纤维

蛋白平板法、纤维蛋白块溶解时间法、四肽底物法、酶联免疫吸附法、血清板法和Folin-酚法等<sup>[11]</sup>。其中,Folin-酚法简单易行、成本低,可以同时测定多个样品,且采用此法测得的纳豆激酶活力与纤溶活力之间存在一定的相关性<sup>[12]</sup>。

张俊杰等<sup>[13]</sup>分别从市购纳豆和土壤中分离出纳豆芽孢杆菌,用其发酵制备鹰嘴豆纳豆,并采用Folin-酚法测定了鹰嘴豆纳豆的纳豆激酶活力。高瑞雄等<sup>[10]</sup>用分离自市购纳豆中的纳豆芽孢杆菌菌株发酵得到的纳豆中,纳豆激酶活力更高;从土壤中分离出的纳豆芽孢杆菌菌株,在发酵鹰嘴豆纳豆产纳豆激酶方面也有着接近于市购纳豆中分离出的纳豆芽孢杆菌菌株的优良性能。此外,接种方式和接种量对纳豆芽孢杆菌的生长状态具有重要影响,进而影响其发酵过程<sup>[14]</sup>。王瑞珍等<sup>[15]</sup>用纳豆芽孢杆菌与戴尔凯氏有孢圆酵母混合接种发酵核桃粕,纳豆激酶活力提高了70.42%。孙军德等<sup>[16]</sup>采用沼泽红假单胞菌和纳豆芽孢杆菌混合固态发酵淀粉豆,纳豆激酶活力提高了53.74%。张超凤等<sup>[17]</sup>在运用响应面法优化纳豆激酶液态发酵条件时发现,随着纳豆芽孢杆菌接种量的增加,纳豆激酶活力也在提高,当纳豆芽孢杆菌接种量为2%时,纳豆激酶活力最高,而当纳豆芽孢杆菌接种量超过2%时,纳豆激酶活力急剧下降。基于此,本研究拟以鹰嘴豆为原料,从分离自市购纳豆和土壤的纳豆芽孢杆菌中各挑选一株高产纳豆激酶菌株,同时设置不同的接种量梯度,并分别采用单接种和混合接种两种方式制备鹰嘴豆纳豆,以纳豆激酶活力为响应指



标,研究最佳接种量和接种体积比,以期制得具有高纳豆激酶活力的鹰嘴豆纳豆。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 原料** 鹰嘴豆,购自云南文山自治州丘北县;纳豆芽孢杆菌菌株 F-2-4 和 S-15,分别分离自市购纳豆和土壤,现保存于郑州轻工业大学 423 实验室菌库(WYCCWF)。

**1.1.2 主要培养基与试剂** LB 固体培养基和胰蛋白胨(生化试剂),北京奥博星生物技术有限责任公司产;Folin - 酚试剂(分析纯),北京索莱宝科技有限公司产;酵母浸粉(生化试剂),北京双旋微生物培养基制造厂产;L - 酪氨酸(分析纯),合肥博美生物科技责任有限公司产;HCl, NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$  等化学试剂(分析纯),天津市永大化学试剂有限公司产。

**1.1.3 主要仪器与设备** DH - 600A 型电热恒温培养箱、101 型电热鼓风干燥箱,北京中兴伟业仪器有限公司产;SW - CJ - 2D 型超净工作台,苏州净化设备有限公司产;DMEX30 型生物显微镜,宁波舜宇仪器有限公司产;BCD - 221T MBA 型冰箱,青岛海尔股份有限公司产;FORMA - 86C 型超低温冰箱,郑州金友宁仪器有限公司产;ZWY - 100H 型摇床,上海智城分析仪器制造有限公司产;AE224 型分析天平,北京赛多利斯天平有限公司产;TGL - 16G 型离心机,上海安亭科学仪器厂产;SC - 15 型恒温水浴锅和 SCIENTZ - 10N 型真空冷冻干燥机,宁波新芝生物科技有限公司产;T6 型紫外可见光分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株的活化** 从  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中取出筛选保存的供试纳豆芽孢杆菌菌株 F-2-4 和 S-15

甘油管,待甘油管在室温下融化后,在超净工作台内吸取  $100\text{ }\mu\text{L}$  菌液,采用划线平板法均匀涂在 LB 平板上,于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  条件下倒置培养。待菌落长出后,挑取单菌落接种于  $50\text{ mL}$  液体培养基中,于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  条件下振荡培养  $24\text{ h}$ ,备用。

**1.2.2 鹰嘴豆纳豆的制备** 鹰嘴豆纳豆的制备工艺流程为:原料预处理→蒸煮→接种→发酵→后熟。具体制作步骤如下。

1) 原料预处理:挑选颗粒饱满、大小均匀的鹰嘴豆,清水淋洗去除鹰嘴豆中的杂质,于室温下清水浸泡  $24\text{ h}$ 。

2) 蒸煮:将浸泡后的鹰嘴豆在  $0.13\text{ MPa}$  压力下蒸煮  $20\text{ min}$ 。

3) 接种:于无菌条件下按设定的接种量和接种体积比接种纳豆芽孢杆菌。接种后轻轻晃动三角瓶,使鹰嘴豆与菌液充分接触。

4) 发酵:于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  恒温恒湿培养箱中发酵培养  $24\text{ h}$ 。

5) 后熟:发酵结束后,置于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  条件下后熟  $24\text{ h}$ <sup>[13]</sup>,即得鹰嘴豆纳豆。

**1.2.3 单接种实验** 将 F-2-4 和 S-15 两株菌的菌液分别以  $V(\text{单菌株}):m(\text{鹰嘴豆})=2\%$ ,  $4\%$ ,  $6\%$ ,  $8\%$ ,  $10\%$  的接种量接种到灭菌蒸熟的鹰嘴豆中,采用 1.2.2 中的发酵条件制备鹰嘴豆纳豆,然后测定各样品纳豆激酶活力。

**1.2.4 混合接种实验** 将 F-2-4 和 S-15 两株菌的菌液分别以  $1:3$ ,  $1:2$ ,  $1:1$ ,  $2:1$ ,  $3:1$  的体积比混合后,以  $V(\text{混合菌株}):m(\text{鹰嘴豆})=2\%$ ,  $4\%$ ,  $6\%$ ,  $8\%$ ,  $10\%$  的接种量分别接种到灭菌蒸熟的鹰嘴豆中,采用 1.2.2 中的发酵条件制备鹰嘴豆纳豆,同时测定各样品纳豆激酶活力。

**1.2.5 纳豆激酶粗酶液的制备** 将发酵好的新鲜纳豆送入预冷室冷冻至  $-35\text{ }^\circ\text{C}$  ~  $-40\text{ }^\circ\text{C}$ , 然后进行冷冻干燥,最后用粉碎机粉碎即得含纳豆激酶的纳豆样品粉末。在每  $\text{g}$  纳豆样品粉末

中加入 5 mL 质量分数为 0.9% 的生理盐水,于 4 °C 条件下浸提 4 h, 再于 4 °C 条件下 4500 r/min 离心 20 min, 所得上清液即为纳豆激酶粗酶液<sup>[17]</sup>.

**1.2.6 酪氨酸标准曲线的绘制** 按照表 1 所示 Folin - 酚法试剂表依次加入 Tyr 标准溶液、蒸馏水和试剂 A, 混匀, 室温放置 10 min, 再加入试剂 B, 立即混匀, 室温放置 30 min, 以 0# 管作为空白对照调 0, 于 680 nm 波长处测定其他各管 OD 值, 然后以酪氨酸 (Tyr) 标准溶液质量浓度 / (μg · mL<sup>-1</sup>) 为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制酪氨酸标准曲线.

表 1 Folin - 酚法试剂表

Table 1 List of agents used for

Folin-phenol method				mL
试管编号	Tyr 标准溶液	蒸馏水	试剂 A	试剂 B
0#	0	0.500	2.500	0.250
1#	0.025	0.475	2.500	0.250
2#	0.050	0.450	2.500	0.250
3#	0.075	0.425	2.500	0.250
4#	0.100	0.400	2.500	0.250
5#	0.150	0.350	2.500	0.250
6#	0.200	0.300	2.500	0.250

**1.2.7 纳豆激酶粗酶液 OD 值的测定** 参考标准 SB/T 10317—1999<sup>[18]</sup> 的方法, 在 1.5 mL 离心管中加入 300 μL 纳豆激酶粗酶液, 再加入 300 μL 质量分数为 1% 的酪蛋白溶液, 混匀, 40 °C 水浴加热 10 min, 再加入 300 μL 质量分数为 10% 的三氯乙酸溶液终止反应. 于室温条件下 4500 r/min 离心 10 min. 取上清滤液 20 μL, 用上述 Folin - 酚法测定 680 nm 波长处的纳豆激酶粗酶液 OD 值.

**1.2.8 纳豆激酶活力计算方法**

在 40 °C 条件下, 每 g 样品每 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸, 即被定义为 1 个蛋白酶活力单位. 样品纳豆激酶活力计算公式如下.

$$\text{样品纳豆激酶活力} = \frac{A}{10M \times 45N}$$

式中: A 为由样品测得的 OD 值, 带入标准曲线得相应的酪氨酸质量/μg; 10 表示反应时间 10 min; M 为样品质量/g; 45 表示从 900 μL 反应液中取出 20 μL 进行测定, 即 45 倍; N 为酶液稀释的倍数.

**1.3 数据处理**

使用 Origin 9.1 进行数据处理.

**2 结果与分析**

**2.1 酪氨酸标准曲线的绘制与分析**

图 1 为用 Folin - 酚法绘制的酪氨酸标准曲线, 得到的标准曲线回归方程为  $y = 0.0565x + 0.003$ , 相关系数  $R^2 = 0.9991$ , 表明两者之间线性关系良好, 能够用于样品纳豆激酶活力的测定.

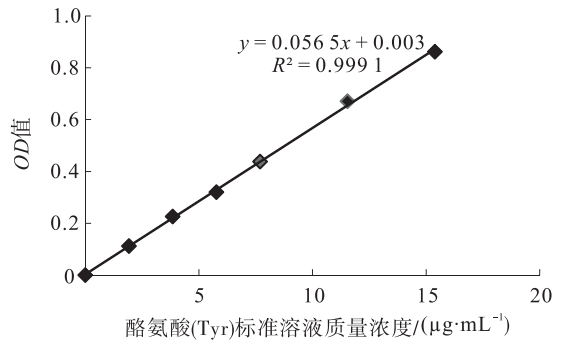


图 1 用 Folin - 酚法绘制的酪氨酸标准曲线

Fig. 1 The Tyrosine standard curve of Folin-phenol method

**2.2 单接种对纳豆激酶活力的影响**

图 2 为单接种对纳豆激酶活力的影响结果. 从图 2 可以看出, 采用单一菌株发酵制备的鹰嘴豆纳豆的纳豆激酶活力较低, 均在 3000 UI/g 以下, 且纳豆激酶活力均呈现出随着接种量的增加先升高后降低的趋势. 其中, F-2-4 菌株在接种量为 4% 时纳豆激酶活力最高, 达 2 827.09 UI/g, 显著高于 S-15 菌株的 1 443.99 UI/g; 而 S-15 菌株在接种量为 6% 时纳豆激酶活力最高, 为 2 017.78 UI/g, 与接种

F-2-4 菌株的 2 032.79 UI/g 无显著差异. 这可能是因为随着接种量增加, 纳豆芽孢杆菌在发酵过程中产生的大量代谢产物抑制了其自身生长, 从而使发酵后期的纳豆激酶活力有所降低.

### 2.3 混合接种对纳豆激酶活力的影响

图 3 为混合接种对纳豆激酶活力的影响结果. 从图 3 可以看出, 经混合接种发酵后, 纳豆激酶活力显著提升, 均高于 5000 UI/g, 显著高于单接种时的纳豆激酶活力. 当 F-2-4 菌株与 S-15 菌株的接种体积比为 1 : 3, 1 : 2 和 3 : 1 时, 在接种量为 6% 时达到最大值, 分别为 6 157.16 UI/g, 5 793.12 UI/g 和 5 906.88 UI/g; 且当 F-2-4 菌株与 S-15 菌株的接种体积比为 1 : 3 时, 纳豆激酶活力随着接种量的增加呈现出先增加后减少的趋势, 而当 F-2-4 菌株与 S-15 菌株的接种体积比为 1 : 2 和 3 : 1 时, 纳豆激酶活力在接种量为 6% 时达到最高值后随着接种量的增加呈现出一定的波动. 当 F-2-4 菌株与 S-15 菌株的接种体积比为 1 : 1 和 2 : 1 时, 在接种量为 4% 时达到最大值, 分别为 6 287.16 UI/g 和 5 626.78 UI/g. 而在相同的接种量下, 纳豆激酶活力均在两菌株接种体积比为 1 : 1 时达到最高. 当接种体积比为 1 : 1, 接

种量为 4% 时, 纳豆激酶活力为所有接种组合中的最高值, 为 6 287.16 UI/g. 因此, 确定当菌株 F-2-4 与 S-15 的混合接种体积比为 1 : 1, 接种量为 4% 时, 为两菌株混合接种的最优接种参数.

## 3 结论

本研究采用两株分离自市售纳豆和土壤的纳豆芽孢杆菌 F-2-4 和 S-15, 分别采用单接种和混合接种两种方式发酵鹰嘴豆, 制备鹰嘴豆纳豆. 结果表明, 与单接种相比, F-2-4 菌株和 S-15 菌株混合接种后, 鹰嘴豆纳豆的纳豆激酶活力从不到 3000 UI/g 增加到 5000 UI/g 以上,

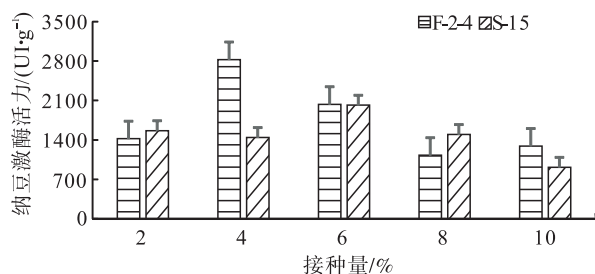


图 2 单接种对纳豆激酶活力的影响

Fig. 2 Effect of single-inoculation on the activity of nattokinase

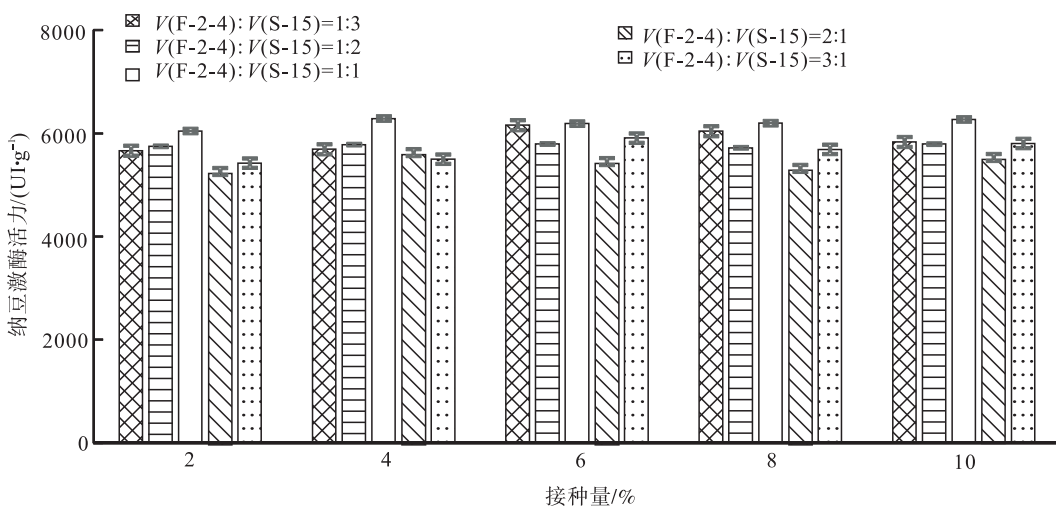


图 3 混合接种对纳豆激酶活力的影响

Fig. 3 Effect of co-inoculation on the activity of nattokinase

有了显著的提升.当两菌株接种体积比为1:1,接种量为4%时,鹰嘴豆纳豆中纳豆激酶活力最高,达6 287.16 U/g.这说明在混合接种条件下,两菌协同生长可以更好地促进纳豆激酶的产生.

该研究的结果已证明混合接种相较于单接种对提高纳豆激酶活力有着明显的优势,而影响鹰嘴豆纳豆的纳豆激酶活力的因素还有很多,比如发酵时间、发酵温度等.接下来拟进一步研究混合接种其他因素对鹰嘴豆纳豆感官品质的影响,以便为鹰嘴豆纳豆的开发和推广提供参考.

#### 参考文献:

- [1] 赵倩楠.四种豆子纳豆发酵工艺条件的研究及产品开发[D].西安:陕西科技大学,2014.
- [2] 祁红兵,宋军霞.黄豆不同处理形态发酵纳豆的品质比较[J].大豆科学,2018,37(5):126.
- [3] 黄婷,刘良忠,曹宇翔,等.纳豆固态发酵工艺优化[J].中国酿造,2016,35(1):141.
- [4] 吴燕,梁向峰,刘会洲,等.纳豆激酶分批补料发酵的研究[J].食品与发酵工业,2018,44(1):126.
- [5] 李淑英,赵仲麟,聂莹,等.纳豆激酶研究进展[J].中国农业科技导报,2013,15(4):139.
- [6] 王琳,高辰哲,刘丹怡,等.响应面法优化红豆纳豆的发酵工艺[J].中国酿造,2018,37(1):190.
- [7] ZHANG J J, YANG X, GUO C, et al. *Mesorhizobium muleiense* and *Mesorhizobium* gsp. nov. are symbionts of *Cicer arietinum* L. in alkaline soils of Gansu, Northwest China[J]. Plant and Soil, 2017, 410(1/2):103.
- [8] ARCHAK S, TYAGI R K, HARER P N, et al. Characterization of chickpea germplasm conserved in the Indian National Genebank and development of acoreset using qualitative and quantitative trait data [J]. The Crop Journal, 2016, 4(5):417.
- [9] 金爽,谭金燕,白秀云,等.固载纳豆菌发酵鹰嘴豆产品的感官评价[J].粮油食品科技, 2016, 24(4):86.
- [10] 高瑞雄,闫巧珍,邢颖,等.冷榨核桃粕固态发酵制备纳豆激酶[J].中国食品学报,2018,18(3):103.
- [11] 杨明俊,杨晓彤,冯慧琴,等.两种纳豆激酶活性测定方法对比及相关性分析[J].食品研究与开发,2008,29(2):137.
- [12] 朱宇刚.一株高产纳豆激酶的纳豆枯草芽孢杆菌的研究[D].合肥:安徽农业大学,2011.
- [13] 张俊杰,郭晨,刘毅飞,等.鹰嘴豆纳豆优良发酵菌株的筛选与鉴定[J].中国酿造,2018,37(7):88.
- [14] 赵红霞,刘超.高产纳豆菌液体发酵条件研究[J].食品研究与开发,2011,32(1):109.
- [15] 王瑞珍,蔡天娇,徐亚飞,等.双菌株联合固态发酵冷榨核桃粕提高产品纳豆激酶活性的研究[J].食品工业科技,2017(16):118.
- [16] 孙军德,陈思,杨璐,等.双菌株混合发酵纳豆的条件优化[J].沈阳农业大学学报,2016,47(1):35.
- [17] 张超凤,严美婷,杜霞,等.响应面优化纳豆激酶液态发酵条件[J].中国生物制品学杂志, 2017(6):658.
- [18] 古亚楠.纳豆激酶发酵工艺条件优化及其在消化液中的活性研究[D].郑州:河南工业大学,2012.
- [19] 上海市酿造科学研究所.蛋白酶活力测定法:SB/T 10317—1999[S].上海:国家国内贸易局,1999.



引用格式:胡晓龙,王康丽,牛广杰,等. 基于高通量测序技术的中温大曲中微生物群落多样性解析[J]. 轻工学报,2019,34(4):21-29.

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.004

文章编号:2096-1553(2019)04-0021-09

# 基于高通量测序技术的 中温大曲中微生物群落多样性解析

## Analysis of microbial community diversity in medium temperature Daqu based on high-throughput sequencing technology

胡晓龙<sup>1</sup>,王康丽<sup>1</sup>,牛广杰<sup>2</sup>,乔亚娟<sup>1</sup>,张玉<sup>1</sup>,何培新<sup>1</sup>  
HU Xiaolong<sup>1</sup>,WANG Kangli<sup>1</sup>,NIU Guangjie<sup>2</sup>,QIAO Yajuan<sup>1</sup>,ZHANG Yu<sup>1</sup>,  
HE Peixin<sup>1</sup>

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院/食品生产与安全河南省协同创新中心,河南 郑州 450001;
  2. 河南省寿酒集团有限公司,河南 新乡 453000
1. *School of Food and Bioengineering/Collaborative Innovation Center of Production and Safety, He'nan Province, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;*  
2. *He'nan Shoujiu Group Co., Ltd., Xinxiang 453000, China*

### 关键词:

白酒;中温大曲;  
微生物群落;  
高通量测序技术

### Key words:

Chinese liquor; medium  
temperature Daqu;  
microbial community;  
high-throughput  
sequencing technology

**摘要:**采用高通量测序技术对河南省某酒企中温大曲曲皮和曲心两个部位的真菌群落和细菌群落的多样性及其组成进行了研究. 结果表明:1) 中温大曲曲皮样品中真菌群落多样性和丰度均高于曲心样品;子囊菌门是大曲曲皮和曲心样品中的唯一优势菌门;大曲样品中共检测到15种真菌,其中扣囊复膜孢酵母、雪黄散囊菌和毕赤酵母 sp1 为曲皮和曲心样品中的优势真菌,扣囊复膜孢酵母在曲皮和曲心样品中的含量基本一致,而雪黄散囊菌和毕赤酵母 sp1 在曲皮和曲心样品中的含量差异较大. 2) 中温大曲曲心样品中细菌群落多样性高于曲皮样品,但其丰度低于曲皮样品;在大曲样品中共检测到28个属,其中肠杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、布氏杆菌属、肠球菌属和欧文氏菌属为大曲样品中的优势细菌属,除布氏杆菌属外,其他优势细菌属在曲皮和曲心样品中的含量差异较大.

收稿日期:2019-04-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31801535);河南省重大科技专项项目(181100211400);中国轻工业浓型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目(2018JJ017);郑州轻工业学院博士科研启动基金项目(2016BSJJ018);河南省自然科学基金项目(182300410070)

作者简介:胡晓龙(1984—),男,河南省开封市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为白酒酿造.

通信作者:何培新(1970—),男,河南省商丘市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为发酵工程.

**Abstract:** The diversity and structure of fungal and bacterial communities in Qupi and Quxin of medium temperature Daqu from one wine corporation located in He'nan were analyzed based on the high-throughput sequencing technology. The results showed that: 1) The diversity and abundance of fungal community in Qupi were higher than those in Quxin samples, and *Ascomycetes* was the only dominant fungi detected both in Qupi and Quxin. A total of 15 species of fungi was detected in Daqu, of which *Saccharomycopsis fibuligera*, *Eurotium niveoglaucum*, *Pichia* sp1 were the dominant fungi in Qupi and Quxin samples. Among them, the content of *Saccharomycopsis fibuligera* in Qupi was similar to that in Quxin, however, the contents of *Eurotium niveoglaucum* and *Pichia* sp1 in Qupi and Quxin samples were quite different. 2) The diversity of bacterial community in Quxin of medium temperature Daqu was higher than that of Qupi, but its abundance was lower than that of Qupi. A total of 28 genera was detected in the Qupi and Quxin samples, of which *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Brucella*, *Enterococcus* and *Erwinia* were dominant bacteria of Daqu samples. Except for *Brucella*, the content of other dominant bacteria had a large difference in Qupi and Quxin.

## 0 引言

曲作为一种糖化剂、发酵剂、产香剂和原料,在制酒、制醋、制酱油等传统酿造行业的应用已有几千年的历史。其中,大曲主要用于白酒固态发酵<sup>[1]</sup>,其品质的优劣在很大程度上决定了白酒的品质和风格。大曲主要是以大麦、小麦、豌豆等单一或多种谷物为原料,经破碎、加水混合再压成块状曲醅<sup>[2]</sup>,经自然或人工接种并在适宜的温度和湿度条件下进行固态发酵,经成型、控温、贮存等十几个环节而制成块曲或砖曲。制曲过程中,纯种或环境中的微生物在适宜的条件下经过长时间的富集和培养,可在曲醅表面和内部形成有益的酿酒微生物群系<sup>[3]</sup>。大曲微生物菌群复杂,主要集中在酵母菌、霉菌和细菌三类菌中,三者酿酒过程中的糖化、产香、产酒方面可以协同作用,但各自侧重不同<sup>[4]</sup>:酵母菌有酒化和酯化的作用;霉菌助产一些生物酶,如红曲霉和米根霉产酯化酶,黑曲霉助产淀粉酶、蛋白酶和糖化酶<sup>[5-6]</sup>;细菌助产一些呈香物质,如吡嗪类化合物、愈创木酚、苯甲醛、乳酸、芳香族化合物等多种香气成分。此外,大曲中还有少量的放线菌,其功能虽然尚不明确,但其可以产生蛋白酶,使蛋白质分解成氨基酸,进而与淀粉分解生成的糖反应会产生醛、

酮、吡嗪类化合物等香味物质。

目前,关于大曲群落信息研究的报道很多<sup>[7-8]</sup>,其所采用的方法包括传统可培养方法<sup>[9]</sup>、传统分子生态学方法(16s rDNA 克隆文库法<sup>[10]</sup>、PCR-DGGE<sup>[11]</sup>,扩增核糖体 DNA 限制性分析<sup>[12]</sup>和 PLFA<sup>[13]</sup>等)和高通量测序技术<sup>[14]</sup>。尤其是高通量测序技术的应用,使得大曲中痕量微生物和不可培养微生物得以被发现,极大地丰富了人们对大曲中微生物群落多样性的认识。目前对产自四川、贵州等地区的大曲微生物的研究较多,但对产自河南地区的大曲微生物群落的研究相对较少,且对产自河南地区的大曲曲皮和曲心微生物群落差异尚不明晰。基于此,本文拟采用高通量测序技术研究河南地区中温大曲曲皮和曲心两个部位的微生物群落多样性及其组成,以期拓展对河南地区中高温大曲中微生物种类的研究,在一定程度上丰富对我国不同地区中温大曲微生物多样性的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 样品采集** 中温大曲样品,取自河南某知名酒厂,取曲块表面厚度约为 1 cm 的大曲作为曲皮样品,粉碎后备用;在曲块中心,取长、宽、厚均为 5 cm 的正方体作为曲心样品,粉碎

后备用。

**1.1.2 主要试剂** 2 × Taq PCR MasterMix, 上海天根生物公司产;引物 ITS1/ITS4 和 515F/806R, 氯化钠、苯酚、氯仿, 生工生物上海股份有限公司产;无水乙醇, 上海联硕生物技术有限公司产;Triton X-100, 上海碧云天生物技术有限公司产;SDS, 美国 Amresco 公司产;Tris, 北京索莱宝科技有限公司产;EDTA, 上海国药集团化学试剂有限公司产;醋酸铵, 天津市科密欧化学试剂有限公司产。以上试剂均为分析纯。

**1.1.3 主要仪器** MP200A 型精密电子天平, 上海良丰仪器仪表有限公司产;TG16-WS 型台式高速离心机, 安徽中佳科学仪器有限公司产;DKY-II 型恒温调速回转式摇床, 倍辉北京产品部产;ZDX-35B 型灭菌锅, 上海三申医疗器械厂产;SW-CJ-1F 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司产;JY92-III 型 PCR 仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司产;DYY-8C 型琼脂糖电泳仪, 北京市六一仪器厂产。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 基因组提取

**1.2.1.1 样品预处理** 分别称取 7 g 大曲曲皮和曲心样品, 用 20 mL 灭菌后的 0.1 mol/L PBS 缓冲液悬浮, 加入 3—5 颗玻璃珠, 漩涡振荡 5 min 后在 300 r/min 转速下离心 5 min, 取上清液, 沉淀用 PBS 缓冲液重复洗涤 3 次, 离心后合并上清液。将上清液于 9000 r/min 转速下离心 3 min, 弃去上清液, 收集细胞沉淀。再用 5 mL PBS 缓冲液重复洗涤 3 次, 每次于 9000 r/min 转速下离心 3 min, 收集细胞沉淀。最后将细胞沉淀用 1.5 mL PBS 缓冲液重新悬浮, 该悬浮液用于基因组提取。

**1.2.1.2 DNA 的提取** 上述悬浮液中 DNA 的提取参照 H. Y. Wang 等<sup>[15]</sup>的方法。

**1.2.2 PCR 扩增与高通量测序** 采用原核微生物 16S rRNA 基因序列 V4 可变区设计的通

用引物 515F/806R<sup>[16]</sup> 和真核生物通用引物 ITS1/ITS4 分别对上述基因组进行 PCR 扩增, 两种引物的 PCR 扩增和高通量测序方法分别参照胡晓龙<sup>[17]</sup>和朱文优<sup>[18]</sup>的方法进行。

### 1.2.3 数据处理

**1.2.3.1 序列质量控制** 采用 Cutadapt (v1.9.1), Vsearch(1.9.6), Qiime(1.9.1) 分析软件对所测原始序列进行质量控制: 首先, 将每对双向测序的序列进行比对, 根据比对的末端重叠区进行拼接, 拼接时保证至少有 20 bp 的重叠区, 去除拼接结果中含有 N 的序列; 接着, 去除引物和接头序列, 去除两端质量值低于 20 bp 的碱基, 去除长度小于 200 bp 的序列; 最后, 将上面拼接过滤后的序列与数据库进行比对, 去除其中的嵌合体序列, 得到最终的有效数据。

**1.2.3.2 操作分类单元 (OTU) 分析** 采用 Qiime's uclust 程序将相似度为 97% 的有效序列归为一个 OTU, 并确定每个 OTU 的代表序列<sup>[17]</sup>。将获得的每个 OTU 的代表序列与 Ribosomal Database Project (RDP) 在线数据库进行比对, 选取置信度为 80% 的阈值对上述序列进行分类, 进而确定每个 OTU 的分类水平, 即门、纲、目、科、属、种水平。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大曲样品中真菌群落多样性及其组成分析

**2.1.1 大曲真菌群落多样性** 大曲真菌群落稀疏曲线如图 1 所示。由图 1 可知, 当测序深度超过 10 000 序列时, 曲皮和曲心样品中真菌群落 Observed OTU 数目基本不再增加, 稀疏曲线趋于平缓。由于本实验所测序列深度远高于 10 000 条, 因此, 本文所选取样品有效测序数量能够较全面地反映待测大曲样品的真菌群落多样性信息。

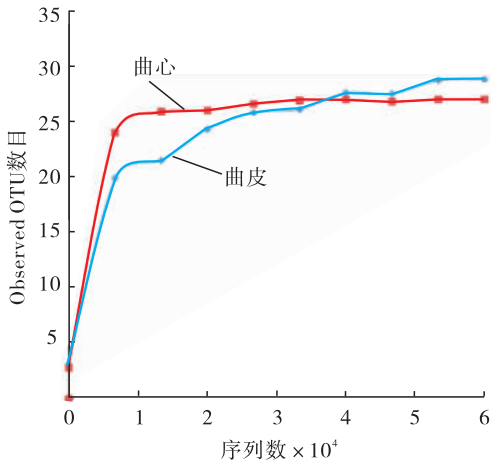


图 1 大曲真菌群落稀疏曲线

Fig. 1 The rarefaction curve of fungal community of Daqu

大曲真菌群落多样性指数见表 1. 由表 1 可知, 经过 Illumina Miseq 高通量测序和序列质量控制, 曲皮和曲心样品中真菌菌群中所得有效序列分别为 66 850 条和 70 954 条. 曲皮样品中真菌群落的 Shannon 和 Chao1 指数均略高于曲心样品, 表明曲皮样品中真菌群落多样性和丰度高于曲心样品. 这可能是由于在制曲和存放过程中曲皮和空气或地面直接接触, 氧气充足, 而曲心温度高于曲皮且氧含量低于曲皮, 进而导致曲皮真菌群落多样性和丰度高于曲心, 这与李燕荣等<sup>[19]</sup>的研究结果一致.

**2.1.2 大曲真菌群落组成** 大曲曲皮和曲心样品中真菌群落组成如图 2 所示. 由图 2 可知, 代表性 OTU 序列的物种注释结果表明, 除“门”

表 1 大曲真菌群落多样性指数

Table 1 The diversity indices of fungal community of Daqu

微生物	取样位置	Chao1	Shannon	Simpson	Reads No.	AvgLen /bp	Goods_coverage
真菌	曲皮	30	1.473	0.514	66 850	322	0.970
	曲心	27	1.352	0.490	70 954	317	0.970
细菌	曲皮	50	1.744	0.484	42 590	459	1.000
	曲心	38	2.030	0.635	50 323	462	1.000

水平外, 大曲曲皮和曲心样品在不同分类水平上存在一定的差异.

在“门”水平(图 2a), 子囊菌门(*Ascomycota*)是曲皮和曲心样品中的唯一优势(相对含量  $\geq 1\%$ )菌门, 相对含量均大于 99%, 同时也是四川和安徽等地区中温大曲中的优势真菌菌门<sup>[18,20]</sup>.

在“纲”水平(图 2b), 酵母纲(*Saccharomycetes*)和散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)为大曲样品中的优势真菌, 且其中酵母纲的相对含量远高于散囊菌纲的相对含量; 较之于曲心, 曲皮样品中酵母纲相对含量较高, 散囊菌纲相对含量较低.

在“目”水平(图 2c), 酵母菌目(*Saccharomycetales*)和散囊菌目(*Eurotiales*)为大曲样品中的优势微生物, 同时也含有少量的毛霉目(*Mucorales*).

在“科”水平(图 2d), 共检测到 9 个科, 其中复膜孢酵母科(*Saccharomycopsidaceae*)、发菌科(*Trichocomaceae*)、毕赤酵母科(*Pichiaceae*)和酵母科(*Saccharomycetaceae*)为大曲样品中的优势菌科, 其在曲皮和曲心样品中的平均相对含量分别为 65.3%, 27.2%, 3.5% 和 2.2%. 较之于曲心样品, 曲皮中毕赤酵母科(6.3%)和酵母科(4.1%)的相对含量较高; 复膜孢酵母科在曲皮(65.4%)和曲心(65.2%)中的相对含量差别不大; 发菌科(23.3%)的相对含量较低.

在“属”水平(图 2e), 共检测到 14 个属, 其中复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)、散囊菌属(*Eurotium*)、毕赤酵母属(*Pichia*)和酵母属(*Saccharomyces*)为大曲样品中的 4 个优势菌属, 其在曲皮和曲心样品中的平均相对含量分别为 65.3%, 26.3%, 3.5% 和 2.2%. 尽管复膜孢酵母属和毕赤酵母属是不同地域中温大曲样品共有的优势微生物, 但不同地域中温大曲样



品整体的优势微生物组成存在明显的差异,如安徽某酒厂中温大曲中有 7 种优势真菌,四川某酒厂中温大曲中则有 10 多种优势真菌<sup>[18,20]</sup>,这主要是由于地理环境、水源、气候、工艺等的

不同所造成的微生物群落的区域差异.此外,复膜孢酵母属在曲皮样品(65.4%)中和曲心样品(65.2%)中的相对含量基本相同;而散囊菌属在曲皮样品(23.2%)中的相对含量低于曲

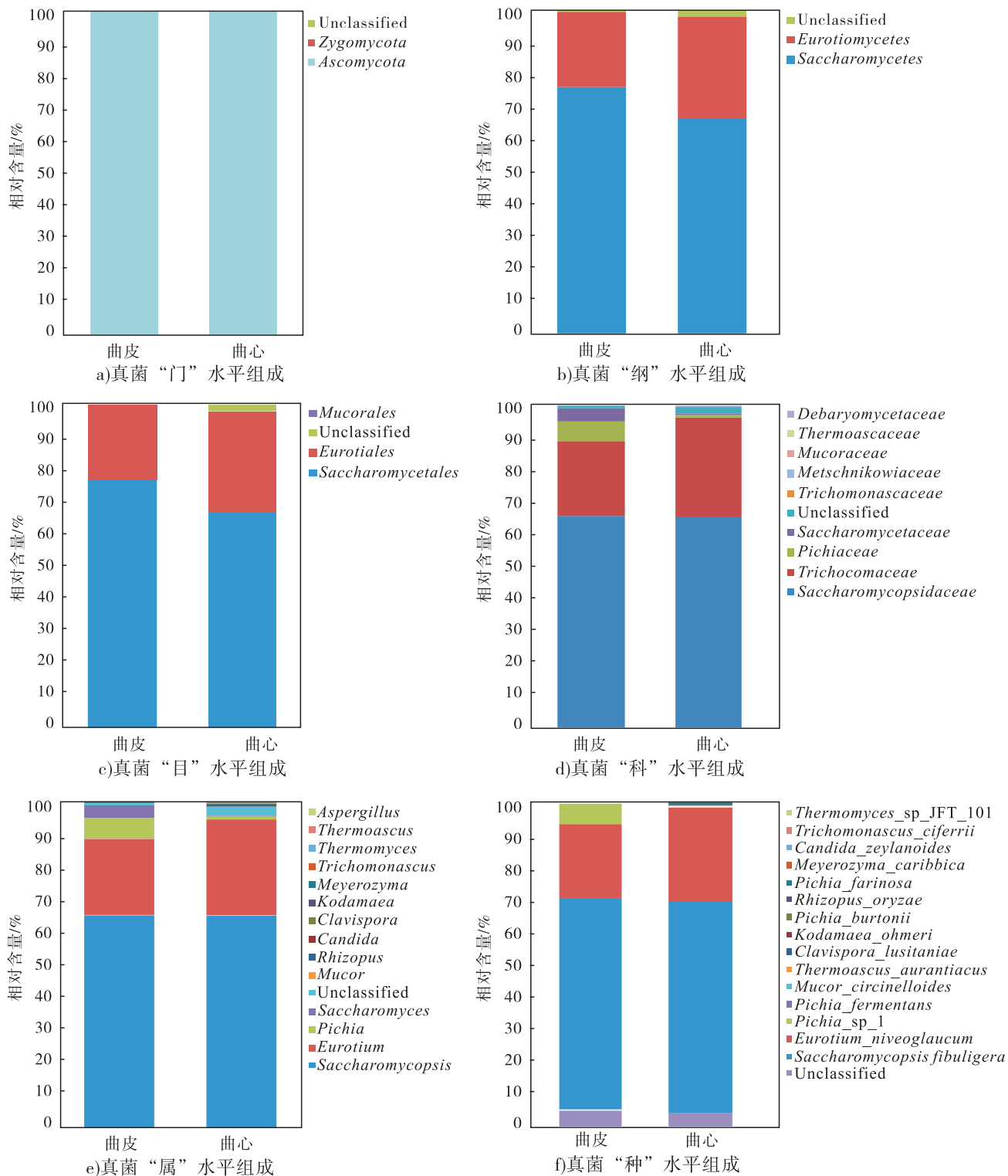


图2 大曲曲皮和曲心样品中真菌群落组成

Fig. 2 The fungal community composition on Qupi and Quxin of Daqu samples

心样品(29.3%);毕赤酵母属和酵母属在曲皮样品(6.3%和4.1%)中的相对含量均远高于曲心样品(0.8%和0.3%)。

在“种”水平(图2f),共检测到15个种,其中扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)、雪黄散囊菌(*Eurotium niveoglaucum*)和毕赤酵母 sp1(*Pichia* sp1)为曲皮和曲心样品中的优势真菌,其在曲皮和曲心样品中的平均相对含量分别为65.3%,26.1%和3.4%。在优势真菌组成上,曲皮和曲心样品中扣囊复膜孢酵母含量基本一致,分别为65.4%和65.2%;雪黄散囊菌在曲皮样品(23.0%)中的含量低于曲心样品(29.2%);毕赤酵母 sp1 在曲皮样品(6.1%)中含量远高于曲心样品(0.7%)。

## 2.2 大曲样品中细菌群落多样性及其组成分析

### 2.2.1 大曲细菌群落多样性

经过 Illumina Miseq 高通量测序和序列质量控制,曲皮和曲心样品中细菌菌群中所得有效序列分别为42 590条和50 323条,其平均长度大小分别为459 bp和462 bp。通过图3所示大曲细菌群落稀疏曲线可以看出,测序深度大于10 000条时,稀疏曲线趋于平缓,由于本实验所测序列深度远高于10 000条,因此,本文所选取样品有效测序数量能够充分反映待测大曲样品的细菌群落多样性信息。

由表1可知,曲心样品中细菌群落的 Shannon 指数高于曲皮样品,表明曲心样品中细菌群落多样性高于曲皮样品。但是,曲皮样品中细菌群落 Chaol 指数高于曲心样品,表明曲皮样品中细菌群落丰度略高于曲心样品,这一研究结果与李登勇等<sup>[21]</sup>发现的高温大曲细菌群落分布规律相近。

### 2.2.2 大曲细菌群落组成

大曲曲皮和曲心样品中细菌群落组成如图4所示。由图4可知,曲皮和曲心部位细菌群落组成在门、纲、目、科、

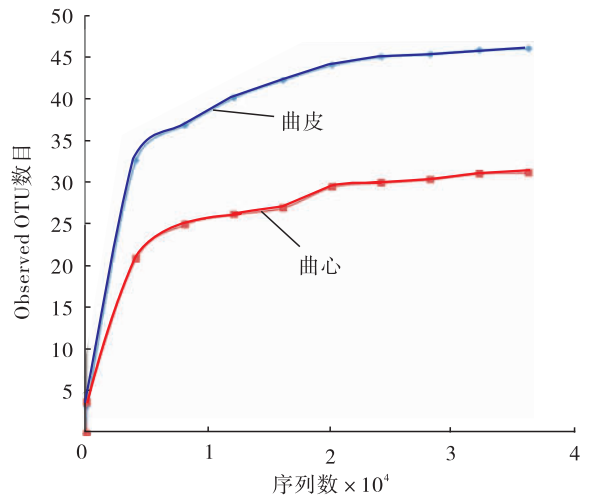


图3 大曲细菌群落稀疏曲线

Fig. 3 The rarefaction curve of bacterial community in Daqu

属、种水平上均存在一定的差异。

在“门”水平(图4a),共检测到5个门。其中变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为曲皮和曲心样品中的优势菌门,其在曲皮和曲心样品中的平均含量分别为79.6%和17.1%。较之于曲心样品,曲皮中的变形菌门相对含量较高,厚壁菌门相对含量较低,而酸杆菌门仅在曲皮样品中可以检测到。

在“纲”水平(图4b),共检测到10个纲,其中 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)和 $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)为大曲样品中的优势菌纲。较之于曲心样品,曲皮中的 $\gamma$ -变形菌纲相对含量较高,而芽孢杆菌纲相对含量(9.9%)明显低于曲心(24.2%)。此外,*Deltaproteobacteria*, *Holophagae*, *vadinHA17*和鞘脂杆菌纲(*Sphingobacteriia*)4种纲仅在曲皮样品中可以检测到。

在“目”水平(图4c),共检测到12个目,其中肠杆菌目(*Enterobacteriales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)和根瘤菌目(*Rhizobiales*)为大曲样品中的优势菌目。肠杆菌目在曲皮样品中的相对含量(82.7%)高于在曲心样品中的相

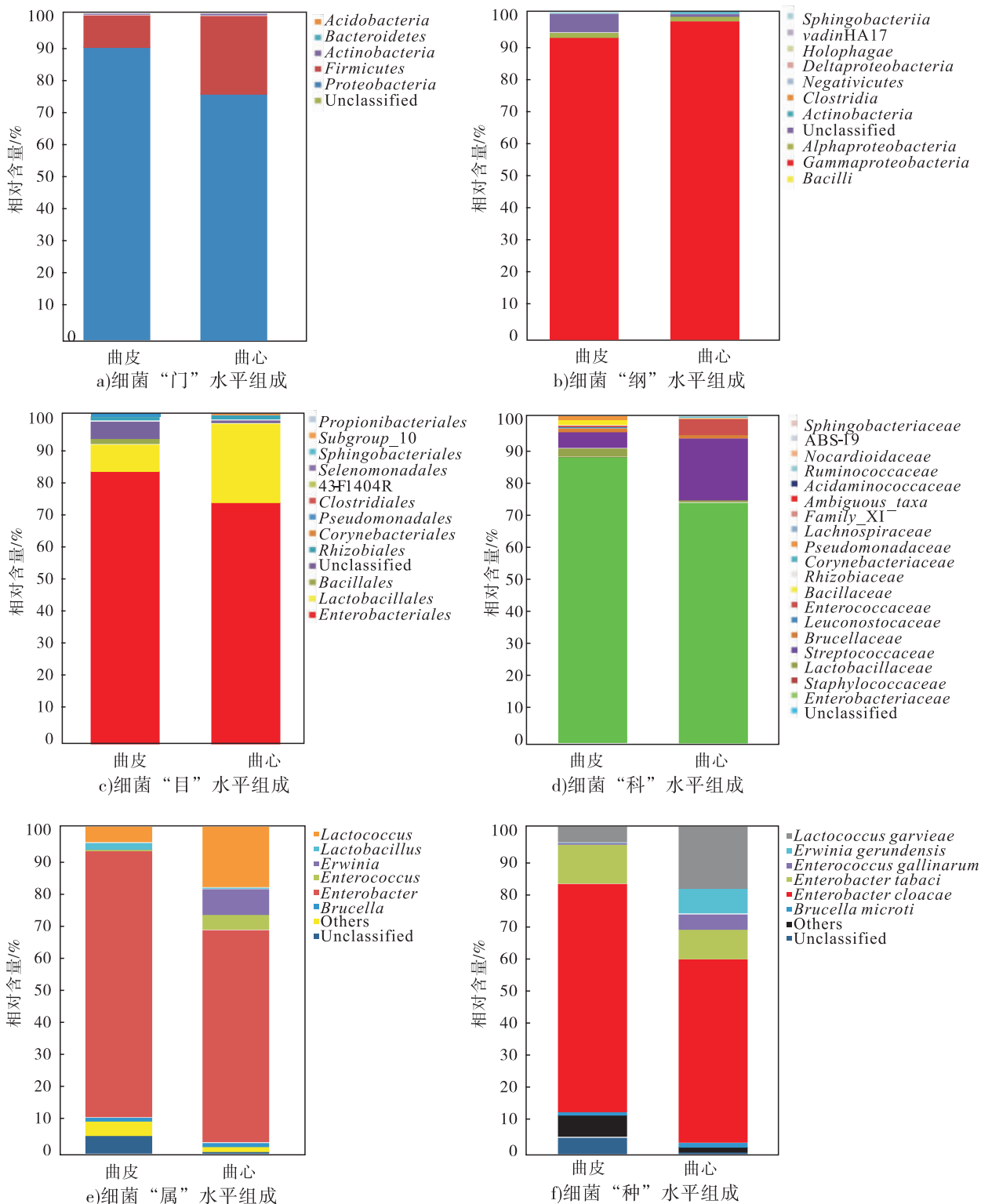


图4 大曲曲皮和曲心样品中细菌群落组成

Fig. 4 The bacterial community composition in Qupi and Quxin of Daqu samples

对含量(73.2%);乳酸杆菌目在曲皮中的相对含量(8.2%)远低于在曲心样品中的相对含量(24%);根瘤菌目在曲皮中的相对含量

(1.3%)和在曲心中的相对含量(1.4%)基本相同。

在“科”水平(图4d),共检测到19个科,

其中肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、链球菌科 (*Streptococcaceae*)、肠球菌科 (*Enterococcaceae*)、乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 和布鲁氏菌科 (*Brucellaceae*) 为大曲样品中的优势菌科。曲皮样品中肠杆菌科的相对含量 (82.7%) 和乳杆菌科的相对含量 (2.5%) 均高于其在曲心样品中的含量 (分别为 73.2% 和 0.6%)；而曲皮样品中链球菌科的相对含量 (4.9%) 和肠球菌科的相对含量 (0.4%) 明显低于其在曲心样品中的相对含量 (分别为 18.6% 和 4.7%)。

在“属”水平上 (图 4e)，共检测到 28 个属，其中肠杆菌属 (*Enterobacter*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、布氏杆菌属 (*Brucella*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 和欧文氏菌属 (*Erwinia*) 为大曲样品中的优势菌属，其含量分别占曲皮和曲心细菌含量的 90.0% 和 97.8%，且肠杆菌属含量明显高于其他优势菌属。肠杆菌属和肠球菌属也是四川和贵州某些高温大曲中的优势微生物，其主要代谢产物包括乳酸等，有助于香气物质乳酸乙酯的形成，并有效抑制杂菌的生长<sup>[21]</sup>。上述优势细菌中除布氏杆菌属外，其余 5 个优势细菌属在曲皮和曲心样品中含量差异较大。

在“种”水平 (图 4f)，共检测到 38 个种，其中布鲁氏菌 (*Brucella microti*)、肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、烟性肠杆菌 (*Enterobacter tabaci*)、鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*)、*Erwinia gerundensis* 和格氏乳球菌 (*Lactococcus garvieae*) 为大曲样品中的优势细菌，其在曲皮和曲心样品中平均含量分别为 1.2%、62.8%、10.4%、2.5%、4.0% 和 11.7%。在优势细菌组成上，肠杆菌和烟性肠杆菌曲皮含量高于曲心样品；鹌鸡肠球菌、*Erwinia gerundensis* 和格氏乳球菌在曲皮样品中的含量远低于曲心样品；布鲁氏菌在曲皮和曲心样品含量基本一致。

### 3 结论

本研究采用高通量测序技术对河南某酒企中温大曲样品中的真菌群落和细菌群落多样性及其组成进行了解析，主要结论如下：

1) 中温大曲曲皮样品中真菌群落多样性和丰度均高于曲心样品；子囊菌门是大曲曲皮和曲心样品中的唯一优势菌门，其在曲皮和曲心样品中的相对含量均大于 99%；大曲样品中共检测到 15 种真菌，其中扣囊复膜孢酵母、雪黄散囊菌、毕赤酵母 sp1 为曲皮和曲心样品中的优势真菌，扣囊复膜孢酵母在曲皮和曲心样品中的含量基本一致，分别为 65.4% 和 65.2%，而雪黄散囊菌和毕赤酵母 sp1 在曲皮和曲心样品中的含量差异较大。

2) 中温大曲曲心样品中细菌群落多样性高于曲皮样品，但其丰度低于曲皮样品；在曲皮和曲心样品中共检测到 28 个属，其中肠杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、布氏杆菌属、肠球菌属和欧文氏菌属为大曲样品中的 6 个优势细菌属，除布氏杆菌属外，其他优势细菌属在曲皮和曲心样品中的含量差异较大。

该结果在一定程度上丰富了对我国不同地区中温大曲微生物群落多样性的认识，同时为今后科学设计或选用多种培养方法定向分离大曲功能微生物，以及在实际生产过程中合理配比曲皮和曲心样品提供了一定的理论依据。

### 参考文献：

- [1] 刘超. 地衣芽孢杆菌产酱香的发酵工艺与转座子突变体库的构建[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2013.
- [2] 潘明, 侯华, 王世宽, 等. 浓香型大曲中细菌的分类统计分析[J]. 酿酒科技, 2012(11): 28.
- [3] 王彩虹. 基于克隆文库法研究不同香型大曲微生物群落结构[D]. 成都: 四川理工学院, 2014.

- [4] 申孟林,张超,王玉霞,等. 白酒大曲微生物酶系研究进展[J]. 中国酿造,2018,37(4):7.
- [5] 李幼筠,周邈. 科学利用微生物推动中国酱油工艺大变革[J]. 中国酿造,2011,30(1):1.
- [6] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011.
- [7] WANG C L, SHI D J, GONG G L. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 24(10):2183.
- [8] 杨代永,范光先,汪地强,等. 高温大曲中的微生物研究[J]. 酿酒科技,2007(5):37.
- [9] 侯小歌,杜小波,李学思,等. 中温大曲中乳酸菌的分离鉴定及产酸特性[J]. 酿酒科技,2010(9):17.
- [10] 张会敏,束莹,周庆伍,等. 利用非培养技术研究古井贡酒大曲中的细菌群落结构[J]. 现代食品科技,2014,30(4):44.
- [11] 高亦豹,王海燕,徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. 微生物学通报,2010,37(7):999.
- [12] LI H. Bacterial diversity in the central black component of Maotai Daqu and its flavor analysis[J]. Ann Microbiol, 2014, 64(4):1659.
- [13] 赵金松,郑佳,沈才洪,等. 基于磷脂脂肪酸分析技术的大曲微生物群落结构多样性研究[J]. 食品工业科技,2017(1):154.
- [14] 沈毅,程伟,邓小波,等. 酱香高温大曲、酒醅和窖泥的真菌多样性分析[J]. 酿酒科技,2019(3):17.
- [15] WANG H Y, ZHANG X J, ZHAO L P, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(6):603.
- [16] CAVALEIRO A J, SOUSA D Z, ALVES M M. Methane production from oleate: assessing the bioaugmentation potential of *Syntrophomonas zehnderi*[J]. Water Res, 2010, 44:4940.
- [17] 胡晓龙. 浓香型白酒窖泥中梭菌群落多样性与窖泥质量关联性研究[D]. 无锡:江南大学,2015.
- [18] 朱文优. 大曲中赭曲霉毒素 A 及其产生微生物的分布特征研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [19] 李燕荣,杨勇,张龙云,等. 中高温大曲发酵过程微生物消长规律探析[J]. 酿酒科技,2019(5):89.
- [20] 李静心,王艳丽,何宏魁,等. 基于高通量测序技术解析高温大曲和中高温大曲的真菌群落结构[J]. 食品与发酵工业,2018,44(12):56.
- [21] 李登勇,黄钧,丁晓菲,等. 酱香大曲间微生物群落结构时空特征的表征[J]. 食品工业科技,2018,39(23):145.



引用格式:张俊杰,尚益民,郭晨,等. 我国豆科绿肥根瘤菌资源研究现状[J]. 轻工学报, 2019,34(4):30-36.

中图分类号:Q939.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.005

文章编号:2096-1553(2019)04-0030-07

# 我国豆科绿肥根瘤菌资源研究现状

## Current status of research on rhizobium resources of leguminous green manure in China

张俊杰<sup>1</sup>,尚益民<sup>1</sup>,郭晨<sup>1</sup>,彭姗姗<sup>1</sup>,陈文峰<sup>2</sup>

ZHANG Junjie<sup>1</sup>,SHANG Yimin<sup>1</sup>,GUO Chen<sup>1</sup>,PENG Shanshan<sup>1</sup>,CHEN Wenfeng<sup>2</sup>

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 中国农业大学 根瘤菌研究中心,北京 100193

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

2. Rhizobium Research Center, China Agricultural University, Beijing 100193, China

### 关键词:

豆科绿肥;紫云英;  
三叶草;箭筈豌豆;  
根瘤菌

### Key words:

leguminous green  
manure; *Astragalus  
sinicus*; *Trifolium repens*;  
*Vicia sativa*; rhizobia

**摘要:**对紫云英、三叶草和箭筈豌豆3种主要豆科绿肥作物的特性及其共生根瘤菌多样性进行综述指出,这3种豆科绿肥作物均具有较强的固氮能力,可提高肥力,改善土壤结构;与其共生的根瘤菌具有较强的多样性,针对不同地区接种匹配的高效根瘤菌菌株,可达到较为理想的增产固氮效果.今后应加强适宜不同地区的根瘤菌菌种选育,添加甘油、海藻糖等保护剂制作不同剂型的根瘤菌菌剂,并对其大田生产运用开展研究,以更好发挥绿肥在现代绿色农业发展中的作用.

收稿日期:2019-06-03

基金项目:国家人社部留学回国人员科技活动项目(豫留学函【2016】1号);中国农科院作物科学研究所项目;河南省农科院植物营养与资源环境研究所项目

作者简介:张俊杰(1984—),男,河南省汝州市人,郑州轻工业大学副教授,博士后,主要研究方向为细菌分类与分子生态学.

通讯作者:陈文峰(1972—),男,河南省义马市人,中国农业大学副教授,博士,主要研究方向为根瘤菌和豆科植物互作.

**Abstract:** The characteristics and the diversity of rhizobia symbiosis on the three main leguminous green manure crops (*Astragalus sinicus*, *Trifolium repens* and *Vicia sativa*) were summarized. It was pointed out that the three kinds of leguminous green manure crops had strong ability of nitrogen fixation, could improve the fertility and soil structure. The symbiosis of rhizobia had a strong diversity, inoculating matched strains of highly effective rhizobia in different regions could achieve an ideal effect of increasing yield and fixing nitrogen. In the future, the selection and breeding of rhizobia strains suitable for different regions should be strengthened, protective agents such as glycerin and trehalose should be added, rhizobia agents with different dosage forms should be prepared, and research on their field production and application should be carried out, so as to better play the role of green fertilizer in the development of modern green agriculture.

## 0 引言

绿肥是指直接或经堆沤后施入土壤作为肥料使用的栽培或野生绿色植物体<sup>[1]</sup>,作为生态农业的重要组成部分,其栽培利用历史悠久,曾对我国农业生产起到举足轻重的作用<sup>[2-3]</sup>.绿肥能够吸碳固氮,促进养分良性循环,有效培肥改土等<sup>[4-8]</sup>,具有节能、减排、增效等特点,有助于环境友好型农业生产方式的建立<sup>[9]</sup>.绿肥对于现代农业的作用主要表现为:增加耕层土壤养分,改善土壤理化性状;作为开垦荒地的先锋作物,为后作创造良好的生长条件,使得开垦初期即可得到增产增收;覆盖地面,固沙护坡,防止水土流失,改善生态环境,等等<sup>[10]</sup>.按植物学分类,可将绿肥分为豆科绿肥和非豆科绿肥.豆科绿肥有紫云英、三叶草、箭筈豌豆、毛叶苕子等72种,非豆科绿肥有黑麦草、满江红、莲子草等26种<sup>[1,11]</sup>.此外,研究表明<sup>[12]</sup>,豆科绿肥的肥料价值和饲料价值均高于非豆科绿肥.豆科绿肥具有生物固氮作用,不仅可以提高土地的生产力,改良土壤,而且翻压绿肥并利用其根茬可有效改善土壤养分供应情况,使下茬作物产量明显提高<sup>[13]</sup>.但是豆科植物需要与相应的根瘤菌互作以形成共生匹配关系,才能发挥共生固氮体系的优势<sup>[14]</sup>.根瘤菌与豆科植物共生关系的建立,是细菌、植物和环境三方相互作用的结果,而不只是细菌与植物间的相互对话<sup>[15]</sup>,且其共生关系因区域地理环境的差异而

具有多样性.因此,不同地区应选择适宜的豆科绿肥作物,并接种与之相匹配的高效根瘤菌菌株,这样才能使其发挥更大的生物固氮作用,为现代农业提供更大的价值.目前关于豆科绿肥根瘤菌的遗传多样性及其生物地理学分布的研究已有许多,但是豆科绿肥的种类众多,不同地区的土壤特性也有明显的差异,因此需要系统地对比豆科绿肥根瘤菌的遗传多样性和生物地理学分布规律展开研究,以便为不同地区的豆科绿肥种植提供技术指导.

本文拟对紫云英、三叶草、箭筈豌豆3种主要豆科绿肥作物的特性及其共生根瘤菌多样性进行综述,以期为不同地区选育合适的豆科绿肥作物、接种匹配的高效根瘤菌菌株提供参考.

## 1 主要豆科绿肥作物特性

### 1.1 紫云英

紫云英(*Astragalus sinicus*),又名红花草、翘摇、草子等,属于豆科黄芪属作物,一般在秋季套播于稻田,是我国南方稻田主要的冬季绿肥<sup>[16-17]</sup>.紫云英含有较高的营养成分,约含氮0.48%(质量分数,下同),五氧化二磷0.11%,氧化钾0.24%,即100kg鲜草相当于尿素2.08kg,过磷酸钙0.92kg,氯化钾0.24kg,此外还含有大量的有机质,是农业生产中不可多得的有机肥源<sup>[18]</sup>.通过紫云英还田可以增加稻田土壤养分,改善稻田的物理、化学和生物学性状,提高水稻产量<sup>[19-22]</sup>.紫云英还可以固定空

气中的氮,从而减少氮肥的施用和氮素的流失<sup>[23-24]</sup>,减少稻田温室气体 N<sub>2</sub>O 和 CH<sub>4</sub> 的排放,改善稻田的生态环境<sup>[25-26]</sup>.此外,紫云英作为牧草和蔬菜,也可以生产一种营养价值很高的花蜜<sup>[27]</sup>.我国紫云英的种植历史悠久,且种质资源丰富,按开花和成熟期来分,其品种可分为特早熟种、早熟种、中熟种和迟熟种<sup>[28]</sup>.紫云英作为一种豆科绿肥,和与其匹配的根瘤菌结合进行共生固氮,在结瘤良好的情况下,固氮量可占植株总氮量的 80%<sup>[29]</sup>,按紫云英氮积累量为 140 kg/hm<sup>2</sup> 计算,来自生物固氮的氮积累量约为 110 kg/hm<sup>2</sup>,可节约大量的能源和工业投入<sup>[27]</sup>.磷肥可促进结瘤,达到以磷增氮的效果.不同稻区的试验表明<sup>[30-32]</sup>,种植翻压紫云英可以减少无机化肥的施用量,紫云英翻压 15 000 ~ 30 000 kg/hm<sup>2</sup>,减施化肥 20% ~ 40%,仍能保证水稻不减产.

## 1.2 三叶草

三叶草 (*Trifolium repens*),又名车轴草,豆科一年生或多年生草本植物,是一类优质牧草和优良豆科绿肥,至今已有上千年的种植历史.目前国内种植的三叶草品种主要是白三叶草、红三叶草和绛三叶<sup>[33-34]</sup>,其中白三叶草是本属植物中具有推广前途的一个种群<sup>[35]</sup>.三叶草不仅可以作为牧草,还可以在果园间种,有效地改善果园土壤的生态环境和果树的生产状况.三叶草作为绿肥,具有较强的固氮能力,可提高土壤肥力,保持土壤温度,并且可作为防风固沙的好材料<sup>[34]</sup>.此外,现代医学研究也证明,三叶草属植物具有调节激素平衡、抗癌、抗肿瘤、降血压、抗菌、消炎、抗自由基和防治骨质疏松等多方面的药理作用<sup>[36]</sup>.

## 1.3 箭筈豌豆

箭筈豌豆 (*Vicia sativa*),又名大巢菜,豆科野豌豆属,一年生或越年生豆科草本植物<sup>[37]</sup>.箭筈豌豆原产于欧洲南部和亚洲西部,目前在国内外新疆、青海、江苏、台湾等 29 个省(自治

区)均有种植<sup>[38]</sup>.箭筈豌豆生育期较短,土壤和气候适应性较强,具有固氮、改善土壤结构等功能,营养价值和经济效益较高,是农业生产中使用十分普遍的一种绿肥种质资源<sup>[39-40]</sup>.箭筈豌豆可以通过生物固氮的作用来抑制土壤的退化,并减少化肥的使用量,是各种作物的良好前作.箭筈豌豆的大量根部残留物和脱落的叶片可以增加土壤的腐殖质,显著增加土壤有机质含量,起到改良土壤结构和提升土壤肥力的作用<sup>[41-42]</sup>.Z. Berzsenyi 等<sup>[43]</sup>研究发现,在有箭筈豌豆参与的轮作系统的农田中,土壤中的有机质含量较麦类作物连作模式的土地提高了近 20%.

总之,紫云英、三叶草和箭筈豌豆这 3 种豆科绿肥作物具有较强的固氮能力,可提高土壤肥力,改善土壤结构,利用其共生固氮体系来减少化肥的使用量,具有较高的营养价值和经济价值,符合现代绿色农业的要求,可以大面积推广种植.

## 2 主要豆科绿肥作物共生根瘤菌多样性

### 2.1 紫云英根瘤菌

根瘤菌并不是土壤的常住微生物区系,种植紫云英的关键在于接种有效的根瘤菌.无论是初次种植紫云英还是多年种植紫云英的地区,都可以通过接种优良根瘤菌菌种显著增加鲜草产量和质量<sup>[44]</sup>.陈华癸在 1940 年代首次从紫云英根瘤中分离发现根瘤菌,因其具有高度的宿主专一性,定名为紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*)<sup>[45]</sup>.C. L. Chan 等<sup>[46]</sup>研究了从中国南京和日本 Otaki 等地采集的 11 个菌株,将其归于 *Bradyrhizobium*.1991 年,陈文新采用数值分类法,将紫云英根瘤菌重新命名为“华癸根瘤菌” (*R. huakuii*),以纪念已去世的陈华癸院士.1997 年陈文新又将其并入 *Mesorhizobium* 属,称为“华癸中慢生根瘤菌” (*Mesorhizobium huakuii*)<sup>[47]</sup>.2001 年, J. L. Gao 等<sup>[48]</sup>对 95 株紫



云英根瘤菌多样性进行了系统分析,发现这些菌株分别归为 *Mesorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* 和 *Sinorhizobium* 属. 2004年,在上述研究的基础上, J. L. Gao 等<sup>[49]</sup>报道了两个紫云英根瘤菌的新种 *M. septentrionale* 和 *M. Temperatum*. 2010年,张晓霞等<sup>[45]</sup>对分离自广西玉林、广东梅县、安徽宿州等地共13个紫云英菌株进行鉴定发现,这些菌株属于 *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* 和 *Stenotrophomonas* 3个属. 2012年,管凤贞等<sup>[50]</sup>从采自福建各地的紫云英根瘤中分离出具有一般根瘤菌特征的菌株18株,经过分子生物学鉴定,这些菌株分别属于 *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* 和 *Rhizobium*. 2013年, W. T. Zheng 等<sup>[51]</sup>研究了中国东南部4个省份的232株紫云英根瘤菌,发现有5株来自江西省的紫云英根瘤菌为新种群,并将其命名为 *M. qingshengii*. 2015年,李艳梅等<sup>[52]</sup>在四川地区结瘤大豆土壤中再次种植紫云英,并分离得到14株根瘤菌,经过鉴定,这些菌株属于 *Rhizobium*. 2018年, J. J. Zhang 等<sup>[53]</sup>对分离自河南省信阳地区酸性土壤中的257株紫云英根瘤菌分析发现,所有菌株均为 *Mesorhizobium*, 且 *M. jarvisii* 为主导种群.

总之,紫云英根瘤菌具有多样性,其中 *M. huakuii* 分布最为广泛. 针对不同的区域,选用不同的紫云英根瘤菌制作豆科绿肥菌剂,有望达到较为理想的增产固氮效果.

## 2.2 三叶草根瘤菌

2002年,刘晓云等<sup>[54]</sup>用16S rDNA PCR-RFLP分析和表型特征数值分类方法研究了来自江西、湖北等5省的三叶草根瘤菌,并将其归为快生根瘤菌属、中华根瘤菌属、中慢生根瘤菌属和慢生根瘤菌属. 2004年,齐春梅<sup>[55]</sup>用分子生物学方法将四川和重庆地区的三叶草根瘤菌鉴定为 *Sinorhizobium* 和 *Rhizobium*. 2008年,吕飞等<sup>[56]</sup>对50株分离自新疆和陕西地区的三叶草根瘤菌进行系统研究,发现所有供试菌株产

生了5种16S rDNA基因型,归属于根瘤菌属,土壤杆菌属和叶杆菌属3个系统发育分支. 2010年,刘晓云等<sup>[57]</sup>从云南、湖北、河北等6个地区分离得到120株三叶草根瘤菌菌株,并采用SDS-PAGE分子标记法将其分为6个类群. 2014年,潘明洪等<sup>[58]</sup>对四川部分地区的69株野生白三叶草根瘤菌进行系统研究,发现所有供试菌株均归为根瘤菌属和土壤杆菌属,且大部分菌株属于根瘤菌属并与豌豆根瘤菌三叶草生物型 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) ATCC 14480T的亲缘关系较近. 同年,李艳梅等<sup>[52]</sup>发现四川地区结瘤大豆根基土壤中的三叶草根瘤菌为 *Rhizobium*. 2016年,张俊杰等<sup>[33,35,59]</sup>从中国东部和北部碱性土壤中分离得到83株白三叶草根瘤菌,经分子生物学鉴定,这些供试菌株归属为 *R. leguminosarum* 和 *R. anhuiense*, 且 *R. anhuiense* 为主要种群. 2017年,韦兴迪等<sup>[60]</sup>调查了贵州部分地区野生白三叶草根瘤菌资源,在分离的全部根瘤菌株中,共鉴定出6个属20个种,其中 *Rhizobium* 的分布频率高达81.31%,是所调查地区的绝对优势属. 同年, C. T. Huang 等<sup>[61]</sup>分离了台湾北部与三叶草等7个宿主豆科植物所共生的根瘤菌,并将其中的三叶草根瘤菌鉴定为 *Rhizobium*.

总之,三叶草根瘤菌也具有多样性,且目前根瘤菌属在国内分布最为广泛. 通过前人对三叶草根瘤菌资源的调查研究,可以筛选出一些针对于不同地区共生效果好的菌株,从而提高三叶草的质量和产量.

## 2.3 箭筈豌豆根瘤菌

目前国内对于箭筈豌豆根瘤菌资源的研究相对缺乏,大部分业内学者的研究重点是箭筈豌豆的种质资源及其栽培与管理技术<sup>[40,62,63]</sup>,对于根瘤菌来说,大部分还是选用与豌豆属共生的根瘤菌接种至箭筈豌豆来提高固氮效果. 王雪翠等<sup>[37]</sup>为获得抗逆性强的根瘤菌菌株,在青海主产区采集样本,经分离、鉴定得到61株

箭筈豌豆根瘤菌,并筛选出5株对宿主结瘤生长促进作用较强的根瘤菌,但是并没有对这些菌株进行分子鉴定,只是做了抗逆性分析.付萍<sup>[38]</sup>研究了根瘤菌对箭筈豌豆结瘤固氮的影响,发现通过接种根瘤菌可以显著促进箭筈豌豆的单株株高、根长、根瘤数、根瘤鲜重、植物全氮含量和固氮酶活性等.笔者所在实验室对山西、青海、甘肃3个省份部分地区的箭筈豌豆根瘤菌资源进行了系统研究,其结果将择机发表.

总之,国内对于箭筈豌豆根瘤菌资源的研究成果比较匮乏,业界应该加强对不同地区的箭筈豌豆根瘤菌资源的研究,特别是青海、甘肃等箭筈豌豆的主产区,接种合适的箭筈豌豆根瘤菌显得十分必要.

### 3 总结与展望

本文通过对紫云英、三叶草和箭筈豌豆这3种主要豆科绿肥作物的特性及其共生根瘤菌多样性的综述,认为:这3种豆科绿肥作物具有较强的固氮能力,可提高土壤肥力,改善土壤结构,与共生的根瘤菌具有较强的多样性,针对不同的地区接种匹配的高效根瘤菌菌株,可达到较为理想的增产固氮效果.鉴于目前对于这3种豆科绿肥作物根瘤菌资源的调查研究尚不深入,今后应深入开展对不同地区的豆科绿肥根瘤菌资源的调查,以发现更为高效的根瘤菌菌株.另外,选育适宜当地的根瘤菌菌种只是第一步,后续还需要考虑根瘤菌菌剂(固体菌剂、液体菌剂等)的制作、如何通过添加保护剂(甘油、海藻糖等)保持这些菌种的活性,以及如何将这些菌剂运用到大田中来提高田间绿肥的质量和产量等.总之,绿肥是现代农业肥料不可或缺的一部分,豆科绿肥作物的地位尤为重要,并且豆科绿肥的种类众多,远不止本文所阐述的这3种,针对目前国内对于豆科绿肥根瘤菌的研究相对比较匮乏的现状,尚需要更多的理论研究来指导大田生产,进而推动现代绿色农业的发展.

### 参考文献:

- [1] 胡霁堂.植物营养学(下)[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2003.
- [2] 杨春燕,赵双进,张孟臣.高蛋白大豆新品种冀豆15号的选育[J].河北农业科学,2005,9(2):60.
- [3] 窦菲,刘忠宽,秦文利,等.绿肥在现代农业中的作用分析[J].河北农业科学,2009,13(8):37.
- [4] 兰延,黄国勤,杨滨娟,等.稻田绿肥轮作提高土壤养分增加有机碳库[J].农业工程学报,2014,30(13):146.
- [5] 赵秋,高贤彪,宁晓光,等.华北地区春玉米-冬绿肥轮作对碳、氮蓄积和土壤养分以及微生物的影响[J].植物营养与肥料学报,2013,19(4):1005.
- [6] 李继明,黄庆海,袁天佑,等.长期施用绿肥对红壤稻田水稻产量和土壤养分的影响[J].植物营养与肥料学报,2011,17(3):563.
- [7] 周春来,王建中,扎桑,等.绿肥对土壤理化性状和作物产量影响的研究[J].西南农业学报,1988(14):80.
- [8] 王志运,詹硕仁.从土壤结构性的变化看绿肥和秸秆还田在养地中的意义[J].农业科学研究,1989(1):55.
- [9] 秦文利,刘忠宽,智健飞.绿肥在河北省现代农业发展中的作用及其高效种植技术模式[J].河北农业科学,2017,21(1):57.
- [10] 刘芳珍,何丹,邱才飞.绿肥与现代农业[J].安徽农业科学,2014,42(27):9329.
- [11] 曾莎,张炼,张玉平.绿肥生产应用现状及绿肥还田研究进展[J].湖南农业科学,2017(9):132.
- [12] 孟瑶,徐凤花,孟庆有,等.中国微生物肥料研究及应用进展[J].中国农学通报,2008,24(6):276.
- [13] 刘晓云,孙新新,刘昱,等.河北省豆科绿肥作物种质资源相关共生根瘤菌资源的研究[J].作物杂志,2015(3):29.

- [14] 陈文新. 中国根瘤菌[M]. 北京:科学出版社, 2011.
- [15] 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学,2004,37(1):81.
- [16] 夏海林,康丽春,王飞,等. 江西绿肥紫云英的研究[J]. 草业科学,2018,35(11):2711.
- [17] 林新坚,曹卫东,吴一群,等. 紫云英研究进展[J]. 草业科学,2011,28(1):135.
- [18] 符杨. 浅谈紫云英的栽培技术与耕翻压青[J]. 植物医生,2018(1):28.
- [19] 刘春增,李本银,吕玉虎,等. 紫云英还田对土壤肥力、水稻产量及其经济效益的影响[J]. 河南农业科学,2011,40(5):96.
- [20] 颜志雷,方宇,陈济琛,等. 连年翻压紫云英对稻田土壤养分和微生物学特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(5):1151.
- [21] 刘春增,刘小粉,李本银,等. 紫云英还田对水稻产量、土壤团聚性及其有机碳和全氮分布的影响[J]. 华北农学报,2012,27(6):224.
- [22] 张珺璋,曹卫东,徐昌旭,等. 种植利用紫云英对稻田土壤微生物及酶活性的影响[J]. 中国土壤与肥料,2012(1):19.
- [23] 卢萍,单玉华,杨林章,等. 绿肥轮作还田对稻田土壤溶液氮素变化及水稻产量的影响[J]. 土壤,2006,38(3):270.
- [24] 袁嫚嫚,刘勤,张少磊,等. 太湖地区稻田绿肥固氮量及绿肥还田对水稻产量和稻田土壤氮素特征的影响[J]. 土壤学报,2011,48(4):797.
- [25] 熊正琴,邢光熹,鹤田治雄,等. 冬季耕作制度对农田氧化亚氮排放的贡献[J]. 南京农业大学学报,2002,25(4):49.
- [26] KIM S Y, GUTIERREZ J, KIM P J. Considering winter cover crop selection as green manure to control methane emission during rice cultivation in paddy soil[J]. *Agric Ecosyst Environ*,2012, 161:130.
- [27] 刘春增,吕玉虎,李本银,等. 不同播期对紫云英“信紫1号”生长状况、产量及养分积累的影响[J]. 中国土壤与肥料,2018(1):127.
- [28] 李忠义,唐红琴,何铁光,等. 绿肥作物紫云英研究进展[J]. 热带农业科学,2016,36(11):27.
- [29] 林多胡,顾荣申. 中国紫云英[M]. 福州:福建科学技术出版社,2000.
- [30] 王飞,林诚,林新坚,等. 连续翻压紫云英对福建单季稻产量与化肥氮素吸收、分配及残留的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(4):896.
- [31] 王建红,曹凯,张贤. 紫云英还田配施化肥对单季晚稻养分利用和产量的影响[J]. 土壤学报,2014,51(4):888.
- [32] 万水霞,朱宏斌,唐杉,等. 紫云英与化肥配施对安徽沿江双季稻区土壤生物学特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2015,21(2):387.
- [33] 张俊杰,杨旭,陆勇,等. 汝州白三叶草根瘤菌的分离与分子鉴定[J]. 河南农业大学学报,2017,51(1):76.
- [34] 徐广. 西安地区三叶草根瘤菌生物学特性及共生固氮效应的研究[D]. 西宁:青海师范大学,2009.
- [35] 张俊杰,杨旭,刘苏萌,等. 郑州草坪白三叶草根瘤菌的分离与分子鉴定[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2016,37(6):70.
- [36] 陈学福,史高峰. 三叶草属植物研究进展[J]. 安徽农业科学,2006,34(13):3087.
- [37] 王雪翠,马晓彤,韩梅,等. 青海箭筈豌豆根瘤菌的筛选及其共生体耐盐性研究[J]. 草业学报,2016,25(8):145.
- [38] 付萍. 根瘤菌对箭筈豌豆结瘤固氮的影响[J]. 草业科学,2016,33(4):584.
- [39] 董瑞. 箭筈豌豆遗传多样性及裂荚生物学特性研究[D]. 兰州:兰州大学,2017.
- [40] 卢秉林,包兴国,张久东,等. 甘肃箭筈豌豆种质资源评价[J]. 草业科学,2015,32(8):1296.
- [41] 石凤翎,王明玖,王建光. 豆科牧草栽培[M]. 北京:中国林业出版社,2003.
- [42] 马望力. 拉萨地区春箭筈豌豆不同轮作方式的生产力评价[D]. 兰州:兰州大学,2018.
- [43] BERZSENYI Z, GYÖRFFY B, LAP D Q. Effect

- of crop rotation and fertilisation on maize and wheat yields and yield stability in a long-term experiment[J]. *European Journal of Agronomy*, 1996, 13(2):225.
- [44] 谢志坚,周春火,贺亚琴,等. 21世纪我国稻区种植紫云英的研究现状及展望[J]. *草业学报*, 2018, 27(08):185.
- [45] CHEN H K. *Microbiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1959.
- [46] CHAN C L, LUMP KIN T A, ROOT C S. Characterization of *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus sinicus* L.) using serological agglutination, intrinsic antibiotic resistance, plasmid visualization, and field performance [J]. *Plant & Soil*, 1988, 109(1):85.
- [47] CHE W X, LI G S, QI Y L, et al. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus* [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41:275.
- [48] GAO J L, TEREFWORK Z D, CHEN W X, et al. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91(2):155.
- [49] GAO J L, TURNER S L, KAN F L, et al. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6):2003.
- [50] 管凤贞,钟少杰,邱宏端,等. 紫云英根瘤菌的分离与鉴定[J]. *福建农业学报*, 2012, 27(5):524.
- [51] ZHENG W T, LI Y, WANG R, et al. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2013, 63:2002.
- [52] 李艳梅,钟宇舟,谭渊,等. 四川地区结瘤大豆根际土壤中紫云英、苜蓿和三叶草根瘤菌的多样性分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(2):234.
- [53] ZHANG J, SHANG Y, WANG E, et al. *Mesorhizobium jarvisii* sv. *astragali* as predominant microsymbiont for *Astragalus sinicus* L. in acidic soils, Xinyang, China [J]. *Plant and Soil*, 2018, 433(1/2):201.
- [54] 刘晓云,陈文新. 三叶草、猪屎豆和含羞草植物根瘤菌 16S rDNA PCR—RFLP 分析和数值分类研究[J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(3):1.
- [55] 齐春梅. 苜蓿、三叶草根瘤菌生物多样性和系统发育地位的研究 [D]. 雅安:四川农业大学, 2004.
- [56] 吕飞,蒋欣,徐佳洁,等. 新疆和陕西三叶草属根瘤菌 16S rDNA 多态性及系统发育研究 [J]. *草地学报*, 2009, 17(3):304.
- [57] 刘晓云,戴燕燕,郭振国,等. 三叶草根瘤菌 SDS-PAGE 分析及结瘤试验分子验证 [J]. *草业科学*, 2010, 27(1):79.
- [58] 潘明洪,凌瑶,景文,等. 四川白三叶根瘤菌遗传多样性及系统发育研究 [J]. *草业学报*, 2014, 23(5):143.
- [59] ZHANG J J, JING X Y, DE LAJUDIE P, et al. Association of white clover (*Trifolium repens* L.) with rhizobia of sv. *trifolii* belonging to three genomic species in alkaline soils in North and East China [J]. *Plant And Soil*, 2016, 407(1/2):417.
- [60] 韦兴迪,曾庆飞,谭玉兰,等. 贵州部分地区野生白三叶根瘤菌资源调查与区系分析 [J]. *作物杂志*, 2018(2):35.
- [61] HUANG C T, LIU C T, KAO W Y. Rhizobia symbiosis of seven leguminous species growing along Xindian riverbank of Northern Taiwan [J]. *Taiwania*, 2018, 63(1):7.
- [62] 徐加茂. 箭筈豌豆的种植与管理 [J]. *草业与畜牧*, 2012(7):28.
- [63] 陈建纲. 箭筈豌豆及其栽培利用 [J]. *农村百事通*, 2006(3):47.



引用格式: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):37-42.

中图分类号:TQ658.2;TS974 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.006

文章编号:2096-1553(2019)04-0037-06

# 高效保湿霜的制备及保湿性能研究

## Study on preparation and moisture performance of highly effective moisturizing cream

樊凯奇<sup>1</sup>, 王晓波<sup>2</sup>, 刘邦<sup>1</sup>, 杨历金<sup>1</sup>, 陈鹏<sup>1</sup>, 沈宇思<sup>1</sup>, 余述燕<sup>1</sup>,  
尹志刚<sup>1</sup>

FAN Kaiqi<sup>1</sup>, WANG Xiaobo<sup>2</sup>, LIU Bang<sup>1</sup>, YANG Lijin<sup>1</sup>, CHEN Peng<sup>1</sup>, SHEN Yusi<sup>1</sup>,  
YU Shuyan<sup>1</sup>, YIN Zhigang<sup>1</sup>

1. 郑州轻工业大学材料与化学工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 郑州轻工业大学学报编辑部, 河南 郑州 450001

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

2. Editorial Department of Journal, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

**摘要:**选择神经酰胺作为保湿剂,以165单甘脂和MONTANOV 68为复合乳化剂、S-305为助乳化剂,制备一款具有高效保湿效果的保湿霜。通过正交试验对乳化体系中乳化剂的用量和配比进行选择,并对保湿霜的稳定性和使用效果进行评价。结果表明:当复合乳化剂用量为5%,165单甘脂与MONTANOV 68的质量比为2:1,S-305的质量分数为0.6%时,所得保湿霜稳定性最好。在恒温恒湿的环境下,当神经酰胺加入量为2.5%时,保湿霜具有很好的保湿效果,在涂抹15 min后,皮肤水分增长率为74.47%,在120 min内皮肤水分增长率保持在50%以上。与两种市售产品相比,该方法所选最佳配方制得的保湿霜在吸收效果、涂展性、滋润效果、细腻感等方面均有较好的效果,其总评效果与市售产品一致。

### 关键词:

高效保湿霜;稳定性;  
保湿效果;神经酰胺

### Key words:

highly effective  
moisturizing cream;  
stability; moisturizing  
effect; ceramide

收稿日期:2019-05-21

基金项目:国家自然科学基金项目(21606211);郑州轻工业学院博士基金项目(2014BSJJ061)

作者简介:樊凯奇(1985—),男,山西省运城市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为复合型凝胶软材料及功能性化妆品原料的开发与应用。

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研究、环保染料及化妆品配方设计与安全评价。

**Abstract:** Choosing ceramide as a moisturizer, using 165 monoglyceride and MONTANOV 68 as a composite emulsifier and S-305 as a co-emulsifier, a moisturizing cream with high moisturizing effect was prepared. The amount and proportion of the emulsifier in the emulsion system were selected by orthogonal test, and the stability and using effect of the moisturizing cream were evaluated. The results showed that when the dosage of composite emulsifier was 5%, the mass ratio of 165 monoglyceride to MONTANOV 68 was 2 : 1, and the mass fraction of S-305 was 0.6%, the obtained moisturizing cream had the best stability; In the environment of constant temperature and humidity, when the amount of ceramide added was 2.5%, the moisturizing cream had a good moisturizing effect. After 15 minutes of application, the skin moisture growth rate was 74.47%, and the skin moisture growth rate remained above 50% in 120 minutes. Compared with the two products sold in the market, the moisturizing cream which made from the best formula selected by this method had a good effect in terms of absorption effect, spreadability, moisturizing effect, and delicate feeling, and the overall evaluation effect was consistent with the commercially available product.

## 0 引言

众所周知,健康肌肤呈现光亮、滋润、弹性等特性,这与皮肤的保湿系统有着密切关系.当肌肤长时间处于干燥缺水状态时,肌肤角质层就会变脆,极易导致肌肤敏感、异位性皮炎、干燥性湿疹等一系列肌肤病的发生<sup>[1-3]</sup>.无论男女老少,在寒冷干燥的冬天,肌肤都会出现不同程度的干裂,这是因为寒冷天气常常引起大气露点下降,此时水分子极易从肌肤表面蒸发,当最外层角质层水分挥发后,内层的水分就会向外扩散以补偿角质层的水分损失,最终导致皮肤干燥、皴裂<sup>[4-7]</sup>.因此,做好皮肤补水保湿这一基础程序,能够延缓皮肤衰老、恢复皮肤的屏障功能、增强肌肤弹性、减少生成皱纹和色斑、维持肌肤美观等.保湿一直是消费者关注的重点之一.对于护肤产品开发人员来说,提高产品保湿能力应成为其所有开发工作的重心和立足点.

传统的皮肤保湿方案通常是利用保湿剂的外源性来补充角质层所缺失的水分.这类保湿剂主要包括甘油、吡咯烷酮羧酸钠、水合凝胶、透明质酸及其衍生物等,它们可以快速提高皮肤最外层角质层的补水和锁水功能,收到快速保湿的功效<sup>[8-9]</sup>.然而这类物质并不能从根本上改善和修复皮肤屏障,实现长效保湿.只有真

正了解皮肤角质层的组成和皮肤屏障的形成过程,针对存在问题的“靶点”采取相关措施,使它健康表达,才能在真正意义上改善和修复皮肤屏障,收到长效保湿的功效<sup>[10]</sup>.

皮肤角质层是由角质细胞和薄层脂质组成的,而神经酰胺约占角质层脂质总质量的50%,它在人体表皮角质层中结构稳定并在保湿系统中起重要作用<sup>[11]</sup>.神经酰胺结构中包含亲水性的酰胺基团和疏水性的鞘氨醇长链脂肪酸,可通过分子间非共价键作用力构成更为紧密堆叠的脂质结构,使其具有良好的保水作用.另外,神经酰胺还能够促进丝聚合蛋白的表达水平,即当丝聚合蛋白原进入皮肤的角质层后,经过酶水解可转化为亲水性的多羧酸类物质,产生非常优良的保湿功效.拉娃拉·巴扎尔等<sup>[11-12]</sup>研究发现,神经酰胺具有促进营养物质渗透、易被皮肤吸收等特性,是一种优质的长效保湿剂,其保湿功效是透明质酸的16倍.目前,含有神经酰胺的新型高级化妆品已有相关报道<sup>[12]</sup>,如保湿口红、唇膏、眼影等,然而将神经酰胺应用于护肤类膏霜则鲜有报道,且有关神经酰胺的用量与保湿功效之间的关系仍需进一步探讨.鉴于此,本文拟设计一款含神经酰胺的高效保湿霜,并对其稳定性、保湿效果和综合使用效果进行评价,以期为该类产品保湿化妆品的开

发提供实验基础.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要试剂与仪器

主要原料:卡波姆(CP),美国 Lubrizol 公司产;黄原胶(CP),美国 CPKelco 公司产;透明质酸钠(CP),山东福瑞达医药集团公司产;甘油(AR),广州市西陆化工有限公司产;1,3-丁二醇(AR),广州市昊毅化工有限公司产;尿囊素(CP),荷兰 AKzoNobel 公司产;尼泊金甲酯(AR)、尼泊金丙酯(AR)、EDTA-2Na(AR), CLARIANT(中国)有限公司产;三乙醇胺(AR)、鲸蜡硬脂醇(CP),德国 BASF 公司产;硬脂酸(AR),马来西亚 Emery 公司产;植物甾醇类(CP),淮北悠然生物科技有限公司产;聚二甲基硅氧烷(CP),富泽化工有限公司产;棕榈酸乙基己酯(CP),益海嘉里食品工业有限公司产;乳木果油(CP),瑞典 AAK 集团产;霍霍巴油(CP),Vantage 产;165 单甘脂(CP)、MONTANOV 68(CP)、S-305(CP),法国 SEPPIC 公司产;神经酰胺(CP),德国赢创工业集团产;PE9010(CP),德国舒美有限公司产;香精,广州名花香料有限公司产.

主要设备:HL71-SGX500 封闭式高剪切乳化机,上海尚贵流体设备有限公司产;HH-S6/ZK6 电热恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司产;DHG 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司产;PX124ZH 电子分析天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司产;TDL-80-2B 台式离心机,上海安亭科学仪器厂产;XP-202 偏光显微镜,上海万衡精密仪器有限公司产.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 正交试验的设计** 在基础配方基础上,为了确定膏霜中乳化剂的种类和用量,拟将 165 单甘脂与 MONTANOV 68 按照一定的比例

进行复合,作为复合型乳化剂,将 S-305 作为助乳化剂,设计三因素三水平正交试验(见表 1),以确定保湿霜中乳化剂的种类和适宜用量.

表 1 正交试验  $L_9(3^3)$  因素水平表

Table 1 Orthogonal test  $L_9(3^3)$  factor level table

水平	因素		
	A(复合型乳化剂质量分数)/%	B(165 单甘脂与 MONTANOV 68 的质量比)	C(助乳化剂的质量分数)/%
1	3	2 : 1	0.3
2	4	2 : 2	0.6
3	5	2 : 3	0.9

**1.2.2 保湿霜的制备工艺** 根据所选原料的特点,结合乳化工艺的要求,设计了以下工艺路线:

1)将卡波 940 分散于去离子水中,搅拌分散至无颗粒,加入用甘油分散好的透明质酸钠和汉生胶,搅拌均匀后加入 A 相(水相)其他原料,升温至 80 ~ 85 °C,保温 15 min,备用;

2)将 B 相(油相)原料加热至 75 ~ 80 °C,混合均匀,保温 10 min,备用;

3)将步骤 2)中所得 B 相加入步骤 1)所得 A 相中,3000 r/min 下均质 3 min,冷却至 60 °C;加入助乳化剂 S-305 和三乙醇胺,冷却至 45 °C;加入 D 相原料(防腐剂、神经酰胺、香精等),再冷却至室温,得保湿霜;待检测.

**1.2.3 保湿霜的稳定性评价方法** 1)冷热交替实验:将样品放置在 -15 °C 的冰箱中,24 h 后放置在 45 °C 烘箱中,观察保湿霜状态,重复 5 次实验,样品未出现油水分层、渗油或变色等现象时加 1 分,最高为 5 分.

2)离心稳定性测试:将样品置于离心机中,以 3000 r/min 离心 30 min,观察保湿霜稳定性,若稳定记为 5 分,若不稳定记 0 分.

3)固含量测定:在离心实验的基础上进行测定,在距离心管上层和下层液面各 1 cm 处取 2 g(精确至 0.001 g)样品.测定固含量,比较上

下两层的差异:差异小于1%记为5分;差异在1%~2%范围内记为4分;差异在2%~3%范围内记为3分;差异在3%~4%范围内记为2分;差异在4%~5%范围内记为1分;差异大于5%记为0分.计算公式如下:

$$\text{差异} = \frac{\text{固}_上 - \text{固}_下}{\text{固}_上 + \text{固}_下} \times 100\%$$

4) 粒径情况表征:利用偏光显微镜查看保湿霜的粒径大小和均匀度,粒径小且均匀记5分;粒径小但不均匀和粒径大但均匀计3分;粒径大且不均匀记0分.

**1.2.4 保湿霜的保湿功效评价方法** 保湿霜的保湿功效评价主要通过皮肤水分测试仪进行测量,计算出皮肤水分含量增长率.具体方法为:在保湿霜中分别加入质量分数为0.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%的神经酰胺,制得样品1—样品5,分别涂抹于测试者前臂内侧(取5 cm×5 cm的区域,按2 mg/cm<sup>2</sup>进行涂抹),计算公式为

$$\varphi = \frac{MMV_t - MMV_0}{MMV_0}$$

式中, $\varphi$ 为皮肤水分含量增长率; $MMV_0$ 为涂抹前皮肤的含水量; $MMV_t$ 为涂抹后 $t$ 时段皮肤的含水量.

**1.2.5 保湿霜的使用效果评价方法** 由20名志愿者进行试用,从吸收效果、涂展性、滋润效果、细腻感、黏稠度、粘起感6个方面对保湿霜的使用效果进行评价.

## 2 结果与讨论

### 2.1 保湿霜基本配方的确定

油脂是膏霜的重要组成部分,通过前期的预实验,笔者发现,油脂可以赋予产品黏稠度,还可以影响产品的涂展性.在进行配方设计时,要选择稳定性高、匹配性能好的油脂;考虑到皮肤具有敏感性,一些对皮肤有刺激性和过敏性的油脂不应加入到配方中.本文主要选择植物

性油脂,如霍霍巴油、乳木果油等,它们来源于植物种子和果实,是天然成分,对皮肤有良好的保护作用.从稳定性和刺激性方面考虑,本文选择了一些性能优良的合成油脂进行搭配使用,如鲸蜡硬脂醇、聚二甲基硅氧烷、棕榈酸乙基己酯等.上述合成油脂化学稳定性高,使用感极佳,对皮肤有较好的亲和性,不会引起过敏和刺激,并能加速配方中其他活性成分向皮肤中渗透,是良好的润肤剂.基于此,结合相关文献<sup>[13-14]</sup>,初步拟定保湿霜基本配方,见表2.

### 2.2 正交试验结果与极差分析

表3为正交试验结果表.由表3可知,通过极差分析得出影响保湿霜稳定性的因素依次为 $A > C > B$ ,即复合乳化剂的质量分数是影响保湿霜稳定性的最显著因素,复合乳化剂的配比

表2 保湿霜基本配方表

Table 2 Basic formula of moisturizing cream

相别	编号	化学名称	质量分数/%
A 相	1	水	余量
	2	卡波姆	0.20
	3	黄原胶	0.12
	4	透明质酸钠	0.05
	5	甘油	5.00
	6	1,3-丁二醇	3.00
	7	尿囊素	0.10
	8	EDTA-2Na	0.03
B 相	9	鲸蜡硬脂醇	1.00
	10	硬脂酸	1.00
	11	165 单甘脂	1.20~3.33
	12	植物甾醇类	0.50
	13	聚二甲基硅氧烷	2.00
	14	棕榈酸乙基己酯	6.00
	15	乳木果油	2.00
C 相	16	霍霍巴油	5.00
	17	MONTANOV 68	1.00~3.00
	20	S-305	0.30~0.90
	22	三乙醇胺	0.20
	18	尼泊金甲酯	0.20
D 相	19	尼泊金丙酯	0.10
	23	PE9010	0.20
	21	神经酰胺	2.00
	24	香精	0.10



其次,助乳化剂的质量分数对乳化体系稳定性的影响最小,最优方案为  $A_3B_1C_2$ :复合乳化剂的质量分数为 5%;165 单甘脂和 MONTANOV 68 的质量比为 2 : 1;S-305 的质量分数为 0.6%.

### 2.3 保湿霜的保湿功效评价分析

使用不同样品后 120 min 内皮肤水分含量增长率变化情况如图 1 所示.

表 3 正交试验结果表

Table 3 Orthogonal test results table

试验号	因素			冷热 /分	离心 /分	固含量 /分	粒径 /分	综合评分
	A	B	C					
1	1	1	1	5	5	1	5	16
2	1	2	3	5	5	0	3	13
3	1	3	2	5	5	3	3	16
4	2	1	2	5	5	4	3	17
5	2	2	1	5	5	0	5	15
6	2	3	3	5	5	4	3	17
7	3	1	3	5	5	3	5	18
8	3	2	2	5	5	2	5	17
9	3	3	1	5	5	3	3	16
$K_1$	45	51	47					
$K_2$	49	45	50					
$K_3$	50	49	48					
R	5	2	3					
最优水平	$A_3$	$B_1$	$C_2$					

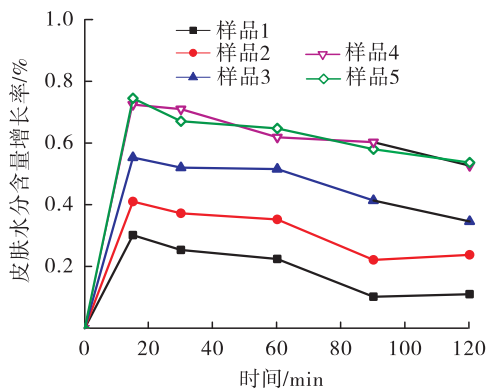


图 1 使用不同样品后的皮肤水分含量增长率变化曲线

Fig. 1 Growth rate of skin moisture content of different samples

从图 1 可以看出,皮肤涂抹样品 1 后,随着时间的延长,皮肤水分含量增长率有一定升高,这是由于样品 1 中的水和其他保湿剂(如甘油等)对皮肤也具有一定的保湿作用.而含有神经酰胺的其他样品(样品 2—样品 5)对皮肤的含水量均具有明显影响,皮肤涂抹后水分含量增长率明显提升,虽然随着涂抹时间的延长,皮肤水分含量增长率均有所下降,但仍有较好的保湿效果.当神经酰胺的加入量为 2.5% 和 3.0% (即样品 4 和样品 5)时,对皮肤的保湿效果很好,在涂抹 15 min 后,皮肤水分含量增长率分别为 72.44% 和 74.47%,在 120 min 内皮肤含水量增长率均保持在 50% 以上.这表明,随着神经酰胺加入量的增大,保湿霜的皮肤水分含量增长率逐渐增大,其保湿效果明显提高.但当神经酰胺的加入量超过 2.5% 时,皮肤水分含量增长率基本保持不变,保湿效果维持稳定,因此神经酰胺的最适宜添加量选择为 2.5%.

### 2.4 保湿霜的使用效果评价

挑选 20 名志愿者分别试用样品 4,市售产品 1 和市售产品 2 后,从吸收效果、涂展性、滋润效果、细腻感、黏稠度、粘起感 6 个方面进行反馈和评分,结果如图 2 所示.

从图 2 可以看出,与两款市售产品相比,样品 4 虽然在黏稠度和粘起感方面评价略差于市场产品,但在吸收效果、涂展性、滋润效果、细腻感 4 个方面有较好的效果,样品 4 的总评效果

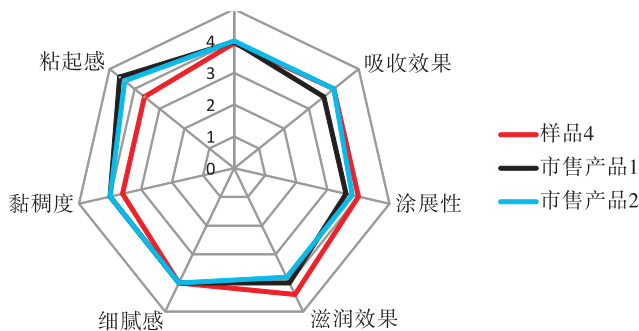


图 2 保湿霜的肤感评价图

Fig. 2 Skin texture evaluation of moisturizing cream

与市售产品一致。

### 3 结论

本文在基本配方的基础上,通过正交试验对保湿霜中乳化剂的用量和比例进行选择。在棕榈酸乙基己酯、乳木果油、霍霍巴油和聚二甲硅氧烷为主的油相体系中,复合型乳化剂 165 单甘脂和 MONTANOV 68 的用量为 5% 且质量比为 2 : 1, 助乳化剂 S-305 的质量分数为 0.6% 时,所制备的保湿霜稳定性最好。随后通过皮肤水分增长率来考察保湿霜的保湿效果,结果表明,在恒温恒湿的环境下,当神经酰胺加入量为 2.5% 时,该款保湿霜具有很好的保湿效果,在涂抹 15 min 后,皮肤水分增长率为 74.47%,在 120 min 内皮肤水分增长率保持在 50% 以上。与市售产品相比,该保湿霜在吸收效果、涂展性、滋润效果、细腻感等方面均有较好的效果,其总评效果与市售产品一致。

通过研究神经酰胺的用量与其保湿功效之间的关系,不仅确定了神经酰胺在膏霜类产品中的较优用量,而且也为新型保湿类化妆品提供了实验依据。该结果对于同类产品的研究具有重要的参考价值。

### 参考文献:

- [1] 孟潇. 高效保湿霜配方设计及其保湿性能研究[J]. 香料香精化妆品, 2015(4): 63.
- [2] 华薇, 李利. 皮肤角质层含水量的电学法测量[J]. 中国皮肤性病杂志, 2015(3): 314.
- [3] 辛淑君, 刘之力, 史月君, 等. 我国正常人皮肤表面皮脂和水分含量的研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2007, 36(3): 131.
- [4] 桂雨豪, 孟潇, 梁绮梅, 等. 几种常用保湿剂的保湿性能研究[J]. 日用化学品科学, 2017, 40(10): 22.
- [5] 徐佩佩. 乳化剂和助剂对乳化体系稳定性影响的研究[J]. 日用化妆品科学, 2014, 37(6): 22.
- [6] 任智, 陈志荣, 吕德伟. 非离子活性剂乳液稳定性 HLB 规则研究[J]. 浙江大学学报(工学版), 2001, 35(5): 471.
- [7] 严珩志, 钟掘. 乳液稳定性与其相关因素的关系[J]. 合成润滑材料, 1997, 32(4): 159.
- [8] 董银卯, 邱显荣, 刘永国, 等. 化妆品配方设计 6 步[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [9] 冉国侠. 化妆品评价方法[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2011.
- [10] CALIXTO L S, MAIA C P. Physical-mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2017, 39(5): 527.
- [11] 拉娃拉·巴扎尔. 保湿产品功效检测方法的评价[D]. 北京: 中国医学科学院皮肤病研究院, 2012.
- [12] 蒲云峰, 张伟敏, 钟耕. 神经酰胺功能和应用[J]. 粮食与油脂, 2005(7): 14.
- [13] 陈启明, 陈金芳, 李娜. 鲟鱼软骨素保湿霜的制备及保湿性评价[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(5): 67.
- [14] 郑永军, 杜国丰, 刘辰锶, 等. 海蜇胶原蛋白保湿霜的研制[J]. 山东化工, 2017(24): 15.



引用格式: 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): 43-51.

中图分类号: TQ658; TS974.1 文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.007

文章编号: 2096-1553(2019)04-0043-09

# 维生素 C 多重乳状液的制备及其稳定性研究

## Study on the preparation and stability of Vitamin C multiple emulsions

兰宏兵, 余述燕, 黄秋荣, 麻怡, 梁雯敏, 尹志刚

LAN Hongbing, YU Shuyan, HUANG Qiurong, MA Yi, LIANG Wenmin, 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

**摘要:**以液体石蜡为内乳液油相、Tween-80 为外水相乳化剂、明胶为高分子增黏剂, 采用两步乳化法制备多重乳状液并对维生素 C 进行包裹, 以离心前后多重乳状液相对体积比和放置 2 周期间维生素 C 包裹率的变化值为稳定性衡量标准, 通过单因素试验考察乳化剂种类和用量、外内相用量比、乳化温度、均质速度和高分子材料用量等因素对多重乳液稳定性的影响, 并确定其中具有显著性影响的 3 个因素. 通过正交试验确立了多重乳状液的最佳配方和制备工艺: 以 Tween-80 和 P135 分别为外内相乳化剂, Tween-80 质量分数为 2%, 外内相用量比 1.0, 乳化温度 45 °C, 均质转速 2000 r/min, 明胶用量 0.5%. 该条件下, 制得的多重乳状液相对体积比为 0.966 4, 性能稳定, 对维生素 C 的包裹率可达 98%, 具有令人满意的包裹稳定性.

### 关键词:

维生素 C; 多重乳状液; 稳定性; 包裹率

### Key words:

Vitamin C; multiple emulsions; stability; encapsulation rate

收稿日期: 2019-04-23

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

作者简介: 兰宏兵(1986—), 男, 安徽省金寨县人, 郑州轻工业大学助教, 硕士, 主要研究方向为功能性化妆品原料的开发与应用研究.

通信作者: 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的设计与开发及功能性化妆品原料的开发; 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研究、环保染料及化妆品配方设计与安全评价.

**Abstract:** Through two-step emulsification method, the multiple emulsions were firstly prepared with paraffin as internal oil phase, Tween-80 as hydrophilic emulsifier and gelatin as thickener, and then were used to encapsulate Vitamin C. The effect of various parameters on the stability of multiple emulsions was investigated by determining the volume changes after centrifugation and the encapsulation changes of Vitamin C during two weeks. These factors included the species and amount of emulsifier, the dosage ratio of two phases, emulsion temperature, homogenization speed and the dosage of polymer, three of which were most influential. The optimal formula and preparation process were obtained through orthogonal experiment, that was, Tween-80 and P135 as foreign and internal emulsifiers, respectively, the mass ratio of Tween-80 was 2%, the dosage of external phase was 1.0, and the emulsification temperature was 45 °C, homogeneous speed was 2000 r/min, gelatin dosage was 0.5%. Under this condition, the relative volume ratio of multiple emulsions was 0.966 4, the performance was stable, and the encapsulation rate of Vitamin C could reach 98%, and the multiple emulsions had a satisfactory package stability.

## 0 引言

维生素 C, 又名抗坏血酸, 是一种易溶于水的无色晶体, 广泛存在于新鲜水果和蔬菜中. 由于其分子中存在烯二醇结构, 具有很强的还原能力<sup>[1]</sup>, 同时能够有效地抑制酪氨酸酶的活性, 是人们最早用于化妆品的美白成分之一, 也是被皮肤科医生认可的安全无毒、可淡化色斑的口服型药剂<sup>[2]</sup>. 但由于其自身的不稳定性, 易受到过渡金属离子(如  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ )、热、光、pH 值、高浓度氧和高水分活度的影响发生氧化或水解反应而丧失美白活性, 加之其脂溶性差的特点, 使它在化妆品领域的应用受到极大的限制<sup>[3]</sup>. 因此, 研究人员一直在寻求理想的解决途径, 使化妆品既能保留维生素 C 的美白还原活性, 又能最大程度地提高其稳定性和配伍性.

目前, 已经报道的解决途径大致可以分为两类: 一是将维生素 C 衍生化, 生成如维生素 C 脂肪酸酯衍生物、维生素 C 磷酸酯衍生物和维生素 C 脂肪醚类化合物等<sup>[4-8]</sup>. 研究表明, 这些衍生物大部分能在一定程度上改善维生素 C 的脂溶性和稳定性, 但是其还原性和美白功效却有不同程度的降低, 并且衍生化过程需要使用大量的有机试剂, 而维生素 C 又具有多个反应位点, 因此衍生化过程通常需要繁琐的合成和

提纯工艺, 从而增加了成本投入, 也造成了一定的环境污染. 二是采用合适的材料或技术将维生素 C 进行包裹<sup>[9-13]</sup>, 使之与外部环境隔断, 由此达到提高其稳定性和配伍性的目的, 相比于将维生素 C 衍生化, 该方法具有更大的优势.

多重乳状液是 1925 年由 Seifritz 发现并提出的, 是将初级乳状液分散在另外的连续相后形成的 O/W 型和 W/O 型乳液共存的复合体系<sup>[14-16]</sup>. 多重乳液不仅规避了单一乳化体系的缺点, 还同时保留了两者的优点, 展现出令人满意的使用效果和肤感. 此外, 利用多重乳状液 3 个被膜分隔开的相区溶解不同的活性物质, 可防止它们之间相互作用, 为那些不稳定的物质和难以共存的功效成分的应用提供理想的载体, 亦可实现有效成分的缓慢释放. 因此, 多重乳状液被认为是目前最有前途的 3 种化妆品体系之一. 但由于其本身固有的复杂性, 特别是多重乳状液的稳定性问题, 包括乳化体系的稳定性和包裹效能的稳定性, 是实现其工业化应用前必须要解决的难题<sup>[17]</sup>.

本文拟以液体石蜡为内乳液油相, Tween-80 为外水相乳化剂, 明胶为高分子增黏剂, 制备多重乳状液并对维生素 C 进行包裹, 以离心前后多重乳状液的相对体积比和放置 2 周的维生素 C 的包裹率之变化值作为衡量多重乳状

液稳定性的指标,通过单因素试验和正交试验法确定维生素 C 多重乳状液的最佳配方和制备工艺,以期为多重乳状液在化妆品领域的应用提供参考,为提高维生素 C 的稳定性和配伍性提供一条可行的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

主要试剂:维生素 C(分析标准品),抗坏血酸(分析纯),明胶(分析纯),Tween-80(分析纯),Span 80(分析纯),Span 60(分析纯),Brij 72(分析纯),阿拉丁试剂有限公司产;液体石蜡,聚乙二醇(30)二聚羟基硬酯酸酯(P135),均为分析纯,天津市恒宇精细化工有限公司产。

主要仪器:JJ-1 增力电动搅拌器,金坛市医疗仪器厂产;XP400C 电脑型偏光显微镜,上海万衡精密仪器有限公司产;TDL80-2B 台式离心机,上海安亭科学仪器厂产;SGX500/750 封闭式高剪切乳化机,上海尚贵流体设备有限公司产;AL104 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 多重乳状液的制备** 采用两步乳化法制备维生素 C 多重乳状液。

W/O 型初级乳状液的制备:将一定质量分数的维生素 C 水溶液加入到含有亲油性乳化剂的液体石蜡溶液中,50 ℃ 条件下,3000 r/min 均质 3 min,得初级乳状液。

W/O/W 型多重乳状液的制备:将上述制备的初级乳状液滴加到含有亲水性乳化剂 Tween-80 的外水相中,2000 r/min 均质 3 min,即可获得多重乳状液。

**1.2.2 相对体积比的测定** 将制备的多重乳状液在 3000 r/min 条件下离心 30 min,分别记录离心前后多重乳状液体积  $V_0$  和  $V_1$ ,并计算相对体积比  $\varphi = V_1/V_0$ , $\varphi$  值越大,离心后分层越

少,表明多重乳状液越稳定。

**1.2.3 维生素 C 包裹率的测定**<sup>[18-19]</sup> 维生素 C 质量浓度测定方法的选择:维生素 C 在紫外区 265 nm 处有最大吸收峰,并且在质量浓度 0~120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内满足比尔定律,即吸光度与质量浓度呈良好的线形关系。因此本实验采用分光光度法测定各样品溶液的吸光度,并依据维生素 C 标准曲线,计算维生素 C 质量浓度。

维生素 C 标准曲线的绘制:首先配制标准溶液。准确称取维生素 C 标准品 0.102 2 g,置于洁净的三角烧瓶中,用去离子水完全溶解后,转移至 100 mL 容量瓶中,定容、摇匀后即得质量浓度为 1.022 mg/mL 的维生素 C 标准溶液;然后分别量取 0.00 mL,0.20 mL,0.40 mL,0.60 mL,0.80 mL 和 1.00 mL 标准溶液,将其置于 50 mL 容量瓶中,用去离子水定容,以去离子水作为参比,在 265 nm 波长处测定上述各质量浓度维生素 C 溶液的吸光度  $A$ ,并以吸光度对质量浓度作图,即得维生素 C 标准曲线。

维生素 C 包裹率的测定:取 10 g 多重乳液放入透析袋,浸于一定量去离子水中,在室温、避光和搅拌条件下透析 24 h,将未被包裹的维生素 C 去除。精确吸取透析液 5 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用去离子水定容,于 265 nm 处测定吸光度。

$$\text{包裹率} = (1 - 2W_1/W_2) \times 100\%$$

式中, $W_1$  为测定的透析液中维生素 C 的质量浓度, $W_2$  为多重乳状液中添加维生素 C 的质量浓度。

**1.2.4 单因素试验** 以液体石蜡为内乳液油相,在两步乳化法制备多重乳状液的过程中,考察内乳液乳化剂种类、外内相用量比、外水相乳化剂质量分数、第二步乳化温度和均质转速、高分子增黏剂用量对多重乳状液稳定性的影响,为正交试验的设计提供依据。

**1.2.5 正交试验** 以单因素试验结果为依据,

选择具有显著性影响的3个因素,设计三因素三水平正交试验,获得最佳试验方案,并通过验证试验确定多重乳状液的最佳配方和制备工艺。

## 2 结果与讨论

### 2.1 内乳液乳化剂种类的选择

固定外水相与内乳液质量比为1.0,内乳液中石蜡油用量为60% (百分数均指质量分数,下同),乳化剂用量为5%,1%维生素C水溶液用量为35%,外水相乳化剂Tween-80用量为5% (若无特别说明,单因素试验中均设置乳化温度为40℃,均质转速为3000 r/min)。分别使用不同的内乳液乳化剂,考察其对多重乳状液稳定性的影响,得到Brij 72, Span 80, Span 60, P135的相对体积比分别为0.734 4, 0.901 8, 0.878 9和0.921 1,对应的偏光显微镜图见图1。从图1可以看出,当Brij 72和Span 60为乳化剂时,形成的多重乳状液液滴之间相互聚结现象明显,Span 80为乳化剂时,形成的多重乳状液液滴尺寸大小不均匀,而当P135为乳化剂时,离心前后多重乳状液相对体积比最大,多重乳状液稳定性好,液滴尺寸较小,且没有明显的黏结现象,因此适宜的内乳液乳化剂为P135。

### 2.2 外内相用量比对多重乳状液稳定性的影响

固定内乳液中石蜡油用量为60%,外水相中1%维生素C溶液用量为35%,内乳液乳化剂P135用量为5%,外水相乳化剂Tween-80用量为5%,分别测定 $m(\text{外水相}) : m(\text{内乳液})$ 分别为0.6, 0.8, 1.0, 1.2和1.4时多重乳状液离心前后的相对体积比,分别为0.907 0, 0.924 8, 0.921 1, 0.893 7和0.838 8,对应的微观结构偏光显微镜图如图2所示。由图2可知,随着外水相占比的增加,多重乳状液的稳定性先上升后下降,外内相用量比在0.6~1.0范围内乳状液稳定性较好。这可能是由于当外水相用量小时,没有足够多的水相将内乳液油滴进

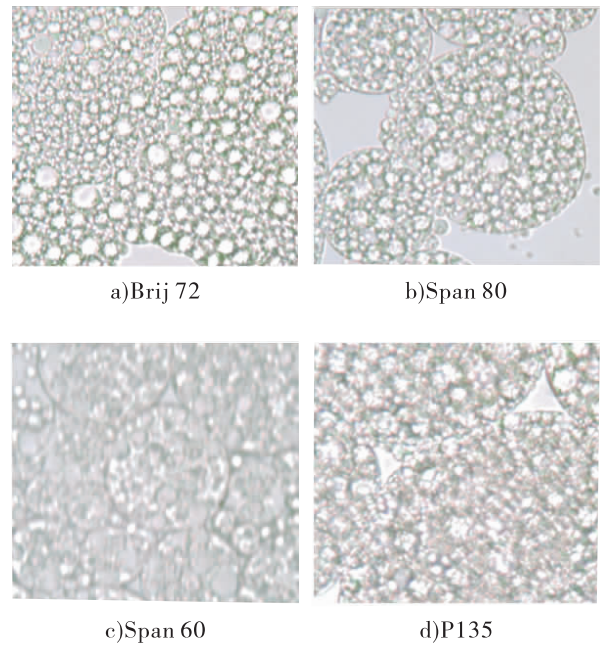


图1 不同乳化剂种类对应的多重乳状液偏光显微镜图(400倍)

Fig. 1 Polarized microscope images of multiple emulsions with different lipophilic emulsifiers (400 times)

行分散,油滴间相互接近,容易聚集破裂,但外水相过多,乳化剂乳化能力有限,导致多重乳状液黏度降低,乳状液稳定性下降。从图2可以看出,当两者比值为0.6时,没有形成明显的W/O/W结构,相比于1.0,两者比值为0.8时多重乳状液液滴界限更加明显,尺寸均匀,稳定性更为理想。因此,选择适宜的外内相用量比为0.8。

### 2.3 外水相乳化剂质量分数对多重乳状液稳定性的影响

固定内乳液中石蜡油用量为60%,外水相中1%维生素C溶液用量为35%,外水相与内乳液用量比为0.8和内乳液乳化剂P135用量为5%,考察质量分数分别为1%, 2%, 3%, 4%, 5%的Tween-80对多重乳状液稳定性的影响,得到相对体积比分别为0.723 8, 0.878 7, 0.954 0, 0.931 0, 0.924 8,对应的偏光显微镜图见图3。由图3可知,随着外水相乳化剂质量

分数的增加,多重乳状液的稳定性先显著上升后有缓慢下降的趋势.当 Tween-80 质量分数为 1% 时,乳状液稳定性较差.从图 3 中也没有观察到明显的多重乳状液包裹结构,这可能是由于乳化剂质量分数低时,乳化能力有限,不利于

W/O/W 型复相乳状液的形成.当乳化剂质量分数超过 3% 时,多重乳状液稳定性开始呈下降趋势.这可能是由于有部分的乳化剂吸附在 W/O 油滴界面上,破坏了第一相稳定性.因此,选择适宜的外水相乳化剂 Tween-80 的质量分

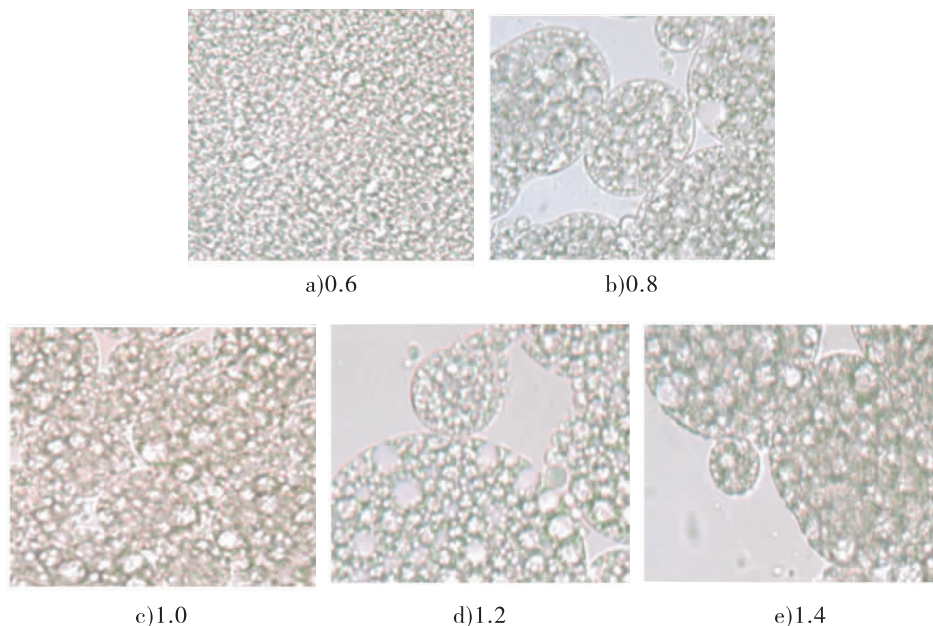


图 2 不同外内相用量比下多重乳状液的偏光显微镜图(400 倍)

Fig. 2 Polarized microscope images of multiple emulsions with different quality ratios of two phases(400 times)

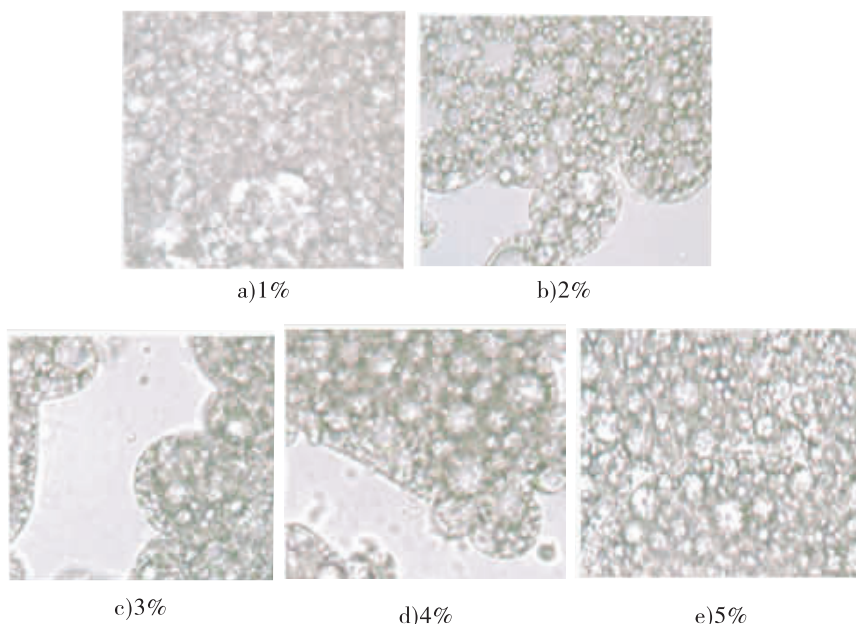


图 3 不同质量分数的外水相乳化剂下多重乳状液偏光显微镜图(400 倍)

Fig. 3 Polarized microscope images of multiple emulsions with different amounts of hydrophilic emulsifier(400 times)

数为3%.

### 2.4 第二步乳化温度和均质转速对多重乳状液稳定性的影响

在外水相与内乳液用量比为0.8,内乳液中石蜡油用量为60%,外水相中1%维生素C溶液用量为35%,内乳液乳化剂P135用量为5%和外水相乳化剂Tween-80用量为3%条件下,进一步考察第二步乳化温度和均质转速对多重乳状液稳定性的影响.首先,设定第二步乳化温度分别为35℃,45℃,55℃和65℃,得到的多重乳状液在3000 r/min条件下离心30 min,计算它们的相对体积比分别为0.914 5,0.960 0,0.937 6和0.940 8.升高第二步乳化温度,多重乳状液的稳定性有增加的趋势.当乳化温度为45℃时,乳状液稳定性最好.

在其他条件相同的情况下,改变第二步乳化时均质器转速,设置均质器转速分别为1000 r/min,1500 r/min,2000 r/min,2500 r/min和3000 r/min,测定上述转速下的相对体积比分别为0.790 8,0.912 0,0.969 7,0.954 3和

0.960 0,对应的偏光显微镜图见图4.从图4可看出,随着均质器转速的增大,多重乳状液的稳定性也随之增强,当均质器的转速达到2000 r/min时,多重乳状液的稳定性最好.结合图4可以发现,当均质转速较高时得到的多重乳液的结构大小更均匀,但是转速在2500 r/min时,有少部分W/O乳液未能被包裹住,所以2000 r/min为适宜的第二步均质转速.

### 2.5 高分子增黏剂用量对多重乳状液稳定性的影响

高分子材料通常应用在乳状液类产品中,利用其可增加乳液黏度的特性提高乳状液稳定性.在上述实验结果的基础上,即固定外水相与内乳液用量比为0.8,内乳液中石蜡油用量为60%,外水相中1%维生素C溶液用量为35%,内乳液乳化剂P135用量为5%和外水相乳化剂Tween-80用量为3%,设定乳化温度为45℃和均质转速为2000 r/min的条件下,通过在外水相中分别添加0.2%,0.5%,1.0%,1.5%和2.0%的明胶,考察其对乳状液稳定性的影响,

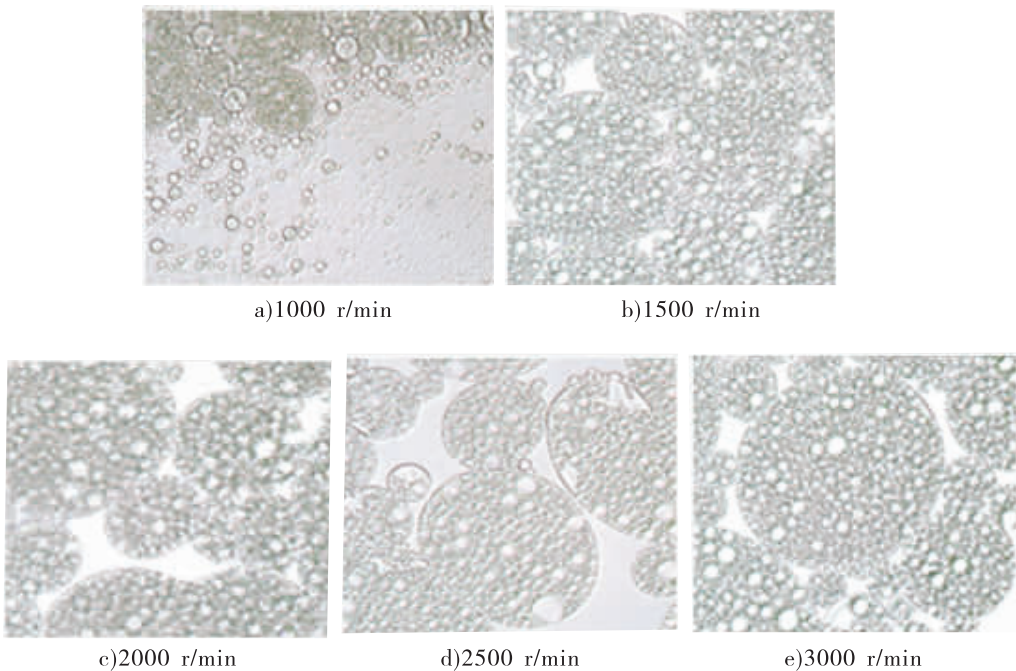


图4 不同均质转速下多重乳状液的偏光显微镜图(400倍)

Fig.4 Polarized microscope images of multiple emulsions with different homogenized speed(400 times)



结果发现:多重乳状液的稳定性随着明胶质量分数的增大而有所提高(上述 5 种明胶用量下的相对体积比分别为 0.943 3, 0.961 0, 0.959 5, 0.960 7, 0.964 3),但当明胶用量为 1.0% 时,稳定性没有明显上升反而有所降低,且多重乳状液黏度明显增加.考虑到该体系在使用方面的便捷性,实际应用中添加 0.5% 左右明胶是比较适合的.

### 2.6 正交试验确定多重乳状液最佳配方和制备工艺

通过上述单因素试验可以确定影响多重乳状液稳定性的主要因素为外内相用量比(A)、外水相乳化剂的用量(B)和乳化温度(C).采用正交试验法获得最佳的试验配比,正交试验因素水平见表 1,结果见表 2.

从表 2 可知,影响多重乳状液稳定性因素的主次顺序为:外水相乳化剂的用量 > 外内相的用量比 > 乳化温度,最佳试验方案为  $B_1 A_2 C_2$ ,即外水相乳化剂 Tween-80 的用量为 2%,外内相质量比为 1.0,乳化温度为 45℃.为了验证该结果的准确性,采用两步乳化法,对该配方进行验证试验,所得多重乳状液的相对体积比为 0.966 4,且在偏光显微镜下展现出良好的结构形态(见图 5).

### 2.7 维生素 C 的包裹率及包裹稳定性分析

通过测定不同质量浓度维生素 C 溶液的吸光度,获得维生素 C 标准工作曲线,见图 6.从图 6 可以看出,吸光度和维生素 C 质量浓度在 0~20 μg/mL 范围内具有良好的线性关系,回归方程为

$$Y = 0.065 1X + 0.029 7, R^2 = 0.999 8$$

在此基础上,依据最佳配方和制备工艺,分别使用质量分数为 1%,2%,4% 和 6% 的维生素 C 水溶液制备多重乳状液,测定并计算不同时间点 4 种多重乳状液样品的维生素 C 包裹率及其随时间的变化情况,结果如图 7 所示.由图 7

表 1 正交试验  $L_9(3^3)$  因素水平表

Table 1 Orthogonal test  $L_9(3^3)$  factor level table

水平	因素		
	A	B/%	C/℃
1	0.8	2	35
2	1.0	3	45
3	1.2	4	55

表 2 正交试验结果表

Table 2 The results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	空列	相对体积比
1	1	1	1	1	0.967 3
2	1	2	2	2	0.914 6
3	1	3	3	3	0.769 3
4	2	1	2	3	0.926 8
5	2	2	3	1	0.954 5
6	2	3	1	2	0.817 1
7	3	1	3	2	0.930 2
8	3	2	1	3	0.880 9
9	3	3	2	1	0.841 5
$K_1$	2.651 2	2.824 3	2.665 3	2.763 3	
$K_2$	2.698 4	2.750 0	2.682 9	2.661 9	
$K_3$	2.652 6	2.427 9	2.654 0	2.577 0	
$k_1$	0.883 7	0.941 4	0.888 4	0.921 1	
$k_2$	0.899 5	0.916 7	0.894 3	0.887 3	
$k_3$	0.884 2	0.809 3	0.884 7	0.859 0	
极差 R	0.015 7	0.132 1	0.009 6	0.062 1	
最优方案	$A_2$	$B_1$	$C_2$		

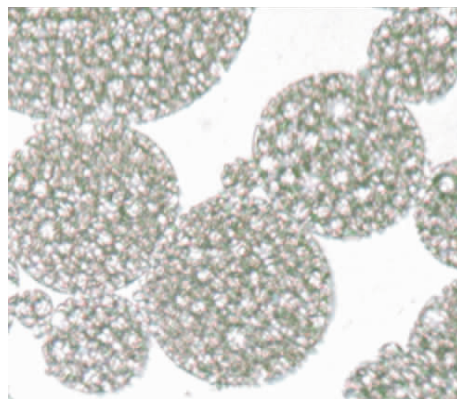


图 5 验证试验所得多重乳状液的偏光显微镜图(400 倍)

Fig. 5 Polarized microscope image of multiple emulsion under the optimal formula(400 times)

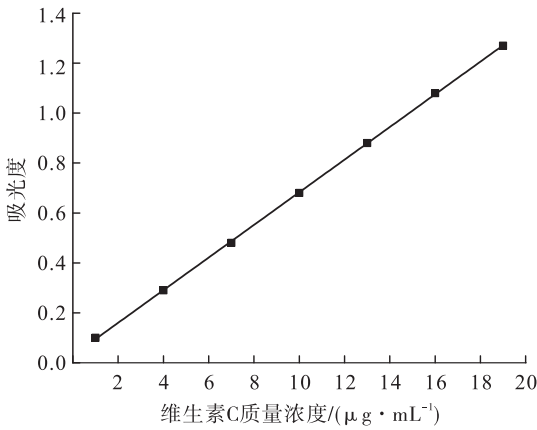


图6 维生素C标准工作曲线

Fig. 6 The standard line of Vitamin C

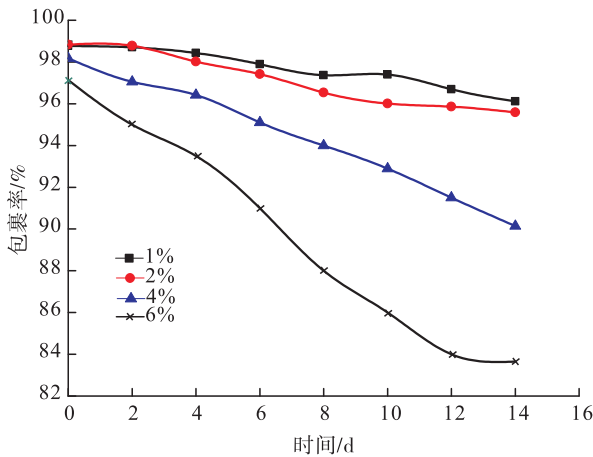


图7 不同时间点4种多重乳状液样品的维生素C包裹率及其随时间而变化的曲线

Fig. 7 Vitamin C encapsulation rate of four multi-emulsion samples at different time points and its variation with time

可以看出,在最佳配方和制备工艺下,多重乳状液中4种质量分数维生素C的包裹率没有明显的差别(分别为98.77%,98.83%,98.18%,97.59%)。而随着时间的延长,包裹率都有所下降。这可能是随着时间的延长,有部分不稳定的油滴发生破裂,包裹的内水相扩散至外水相所致。但当维生素C的质量分数为1%和2%时,包裹率下降非常缓慢,14d后包裹率还能保持在95%以上,而当维生素C的质量分数较大

时,包裹率下降比较明显,且多重乳液颜色有加深的趋势。这可能是由于浓度差增大时,内乳液中未包裹的维生素C和不稳定油滴破裂导致内水相中释放出的维生素C向外水相中扩散速度加快。

### 3 结论

本文以液体石蜡为内乳液油相,Tween-80为外水相乳化剂,明胶为高分子增黏剂,采用两步乳化法制备了多重乳状液并对维生素C进行包裹,以离心前后多重乳状液相对体积比和放置2周期间维生素C包裹率的变化值为稳定性衡量标准,通过单因素试验确定了影响多重乳状液稳定性的主要因素是外内相质量比、外水相乳比剂用量、乳化温度、均质速度和高分子材料用量,结合正交试验获得了多重乳状液的最佳配方和制备工艺:以Tween-80和P135分别为外内相乳化剂,Tween-80质量分数为2%,乳化温度为45℃,均质转速2000r/min,明胶用量0.5%,在外内相用量比为1.0的条件下,制得的多重乳状液相对体积比0.9664,性能稳定。该条件下维生素C的包裹率可达98%,具有令人满意的包裹稳定性。本文研究结果为多重乳状液的制备及其在化妆品、农药和医药等领域的应用提供了一定的理论依据。

### 参考文献:

[1] 葛颖华,钟晓明. 维生素C和维生素E抗氧化机制及其应用的研究进展[J]. 吉林医学, 2007,28(5):707.

[2] 张建友,方艳燕,吴晓琴,等. 天然活性美白化妆品研究现状及发展前景[J]. 精细化工, 2008,25(1):72.

[3] 郝志耘,夏惠娟. 维生素C稳定性实验研究[J]. 牡丹江医学院学报,1997,18(1):13.

[4] 董瑞娟. 抗氧化维生素衍生物的制备[D]. 北京:北京化工大学,2015.

- [5] 谷雪贤. 维生素 C 衍生物的制备及其在化妆品中的应用[J]. 化学试剂, 2011, 33(4): 325.
- [6] 李诚让, 朱文元. 维生素 C 衍生物研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2005, 34(7): 487.
- [7] 闫世梁, 史小利, 户言峰, 等. 维生素 C 衍生物的合成与研究[J]. 低碳世界, 2018(5): 357.
- [8] 贾博. 维生素 C 及其衍生物的制备工艺和应用[J]. 河北化工, 2011, 34(8): 25.
- [9] KARIM A A, TAN E, LOH X J. Encapsulation of Vitamin C with its protection from oxidation by poly(vinyl alcohol) [J]. Journal of Molecular and Engineering Materials, 2017, 5(4): 175.
- [10] 李思琪, 张晓庆, 吐马拉·吐尔洪, 等. 维生素 C 脂质体的制备[J]. 轻工科技, 2018, 34(4): 15.
- [11] 王婷婷. 海藻酸钠微球包封 L-抗坏血酸的制备及其在化妆品中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [12] 李芳芳, 贾红娇, 田永红, 等. 多重结构乳状液的研究进展[J]. 日用化学工业, 2014, 44(4): 222.
- [13] 王传好, 曹光群, 孙谦. W/O/W 型多重乳状液的制备及应用概述[J]. 日用化学工业, 1991(8): 23.
- [14] 曾兰兰. 多重乳液的制备及其包裹能力的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [15] 罗昌荣, 侯亚龙. 多重乳状液技术及其在香料物质缓释中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2003(Z1): 65.
- [16] 文静. 含多重结构的亲水性成分包覆载体技术及其应用[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2017.
- [17] 李光水, 邵国泉, 雍国平, 等. 提高 W/O/W 多重乳状液的稳定性研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 51.
- [18] 刘彬, 赵惠新. 维生素 C 含量测定方法综述及其比较[J]. 课程教育研究, 2018(42): 178.
- [19] 李秋菊, 王亚红, 刘秀萍. 维生素 C 的测定方法[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2005, 4(1): 89.

## 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:周菁,张毅,王韶华,等. 调理修护型洗发水的制备及其性能研究[J]. 轻工学报, 2019,34(4):52-58.

中图分类号:TS973;TQ658.3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.008

文章编号:2096-1553(2019)04-0052-07

# 调理修护型洗发水的制备及其性能研究

## Study on preparation and properties of conditioning and repair shampoo

周菁<sup>1</sup>,张毅<sup>2</sup>,王韶华<sup>3</sup>,王斌海<sup>1</sup>,王凯<sup>1</sup>,李怡殊<sup>1</sup>,汪彩虹<sup>1</sup>,  
钱恒玉<sup>1</sup>,尹志刚<sup>1</sup>

ZHOU Jing<sup>1</sup>,ZHANG Yi<sup>2</sup>,WANG Shaohua<sup>3</sup>,WANG Binhai<sup>1</sup>,WANG Kai<sup>1</sup>,  
LI YiShu<sup>1</sup>,WANG Caihong<sup>1</sup>,QIAN Hengyu<sup>1</sup>,YIN Zhigang<sup>1</sup>

1. 郑州轻工业大学 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001;

2. 广东嘉丹婷日用品有限公司,广东 肇庆 526238;

3. 埃肯有机硅(上海)有限公司,上海 201108

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

2. Guangdong Jiadanting Commodity, Zhaoqing 526238, China;

3. Elkem Silicones (Shanghai) Commodity, Shanghai 201108, China

**摘要:**将阴离子表面活性剂月桂醇聚醚硫酸酯钠(AES)分别与大分子阳离子瓜儿胶(C-14S)、阳离子聚季铵盐-10(LR400)和聚季铵盐-7(M550)进行复配,通过絮凝实验确定AES用量和阳离子种类及用量;分别对硅油乳液E6518、E6550和两者复配产物进行硅油梳理性测试,筛选硅油乳液的种类及用量.结果表明:洗发水的最佳配方为AES(17.14%,质量分数,下同),C-14S(0.2%),LR400(0.2%),硅油乳液E6518(1.5%),硅油乳液E6550(0.5%),椰油酰胺丙基甜菜碱CAB(5%),卡波SF-1(3%),防腐剂适量和去离子水(加至100%).该洗发水性能稳定,洗发后头发光滑、柔顺、易梳理,回弹力增加,可有效解决烫染发后头发枯燥、发叉等问题.

### 关键词:

絮凝实验;硅油;梳理性测试;摩擦力测试

### Key words:

flocculation experiment; silicone oil; carding test; friction force test

收稿日期:2019-05-23

基金项目:河南省高等教育教学改革研究与实践项目(2017SJGLX080)

作者简介:周菁(1987—),女,河南省郑州市人,郑州轻工业大学实验师,硕士,主要研究方向为化妆品配方设计.

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、化妆品配方设计与安全评价.

**Abstract:** The anionic surfactant Sodium laureth sulfate (AES) flocculation experiments were carried out by using Cation guar gum (C-14S), Cation Polyquaternium-10 (LR400), Polyquaternium-7 (M550), respectively, and the content of AES and cation species were determined by these flocculation results. The category of silicone oil (E6518, E6550, E6518 and E6550) was performed by carding test of hair bundles with multifunctional hair instrument (MTT175). The optimal formula of shampoo was obtained as follows: AES (17.14%), C-14S (0.2%), LR400 (0.2%), E6518 (1.5%), E6550 (0.5%), CAB (1.5%), SF (3%), and deionized water (up to 100%). Through the carding and friction force test, it was found that shampoo formula was stability, showing greater resilience and stronger hair quality after shampoo. Meanwhile, the hair dryness and fork after perm and dyeing could be also solved.

## 0 引言

浓密、乌黑、光亮的头发和美观、大方、整洁的发型,不仅是一种健康的标志,也把人衬托得容光焕发、美丽多姿.随着时代的进步,人们开始选择烫发、染发来为容貌添彩.但烫发、染发之后的发质会变差,这是由于在烫发、染发过程中,头发要经历一系列物理、化学变化,致使头发表层的鳞片遭到破坏,内部头发纤维断裂,从而导致头发角蛋白网络破坏,使头发从内至外都处于无保护状态,当暴露在环境中时,空气对流和日光照射都会使头发中的水分和营养成分流失,导致发质干枯、没有弹性,使头发失去光泽<sup>[1-3]</sup>.另外,烫发、染发剂均含有碱性成分,对头发表层的毛鳞片有很强的破坏作用,造成毛鳞片脱落、水分流失,粗糙起毛刺<sup>[4-7]</sup>.因此,针对烫、染受损发质的调理修护型洗发水的研制具有潜在的市场前景.

调理修护型洗发水的主要功能分为清洁和护理两部分:阴离子、非离子、两性表面活性剂具有清洁功效;调理修护功能由阳离子聚合物、硅油和各种添加物来实现.在洗发水配方体系中,阳离子聚合物含量相对较少,处于被阴离子表面活性剂增溶的状态.洗发过程中,洗发水被稀释,使阴离子表面活性剂与阳离子聚合物发生解离,进而使阳离子聚合物表观电荷降低,发生相分离,产生絮凝并从体系中析出<sup>[8-10]</sup>.另一方面,硅油是油性、亲肤的,具有独特的低表

面张力,能够在头皮上扩散而不产生强烈的刺激性<sup>[11]</sup>;硅油在头发上的沉积量影响着洗发水的调理效果,有絮凝作用的阳离子聚合物,能促进硅油沉积.目前,市售洗发水的众多品牌中,主要宣称其去屑、去油功效,少量洗发水具有滋养和修复功效,但缺少烫发、染发后调理修复型洗发产品<sup>[12]</sup>.鉴于此,本文拟选择阴离子表面活性剂与阳离子聚合物复配进行絮凝实验,以确定洗发水配方中阴离子表面活性剂用量和阳离子聚合物的种类与用量,通过硅油梳理性测试选择最优的硅油种类,进而确定洗发水的配方,并对其调理修护性能进行分析,以期获得一款针对烫染后受损发质具有调理修护功效的洗发水,满足人们对健康、柔韧、自然秀发的追求.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

主要试剂:月桂醇聚醚硫酸酯钠(AES),湖南丽臣实业有限公司产;瓜儿胶(C-14S),索尔维(化工)上海有限公司产;聚季铵盐-10(LR400),陶氏化学公司产;聚季铵盐-7(M550),路博润特种化工(上海)有限公司产;硅油乳液 E6518,硅油乳液 E6550,埃肯有机硅(上海)有限公司产;卡波(SF-1),路博润特种化工(上海)有限公司产;椰油酰胺丙基甜菜碱(CAB),湖南丽臣实业有限公司产.以上试剂均为分析纯.

主要仪器:JJ-1000Y 电子天平,常州瑞品

精密仪器有限公司产; MTT175 多功能头发测试仪, 英国 Diastron Limited 公司产; SHZ - D (Ⅲ) 循环水真空泵, 巩义市予华仪器有限公司产; DHG 电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司产; SIGMA300 扫描电镜, 欧波同有限公司产。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 AES 与阳离子聚合物的絮凝实验与洗发水基础配方的确定

经市场调研, 洗发水中椰油酰胺丙基甜菜碱 (CAB) 用量为 5% (若无特指, 百分数均指质量分数), 卡波用量为 3%, 硅油乳液总量为 2%, 通过絮凝实验确定阴离子表面活性剂 AES 的用量及阳离子聚合物种类和用量。商品化的 AES 含量为 70%, 当 AES 含量分别设置为 10%, 12%, 14%, 16% 时, 对应实际用量分别为 14.29%, 17.14%, 20%, 22.86%。C-14S 用量为 0.1%, 0.2%, 0.3%; LR400 用量为 0.3%, 0.6%, 0.9%; M550 用量为 1%, 2%, 3%; C-14S 与 LR400 复配, 质量比 (g : g) 分别为 0.1 : 0.2, 0.2 : 0.2, 0.1 : 0.4, 0.2 : 0.4。按照上述比例分别配制其样品。

取上述样品 10 mL, 分别配制  $V$ (样品) :  $V$ (水) 为 1 : 2 和 1 : 10 两个不同梯度的待测样品, 搅拌 20 min, 充分絮凝后抽滤, 置于恒温烘箱 (60 °C) 中干燥 1 h, 称重并计算絮凝物的质量。

在絮凝实验基础上确定洗发水基础配方, 见表 1。

### 1.2.2 梳理性测试与洗发水实验配方的确定

确定洗发水基础配方之后, 将 3 组不同种类硅油乳液和 4 组不同质量比的 C-14S 与 LR400 复配产物混合, 制备 12 组洗发水样品, 运用梳理性测试确定 12 组样品中最优的硅油种类和阳离子聚合物复配质量比。

将经脱油处理的发束进行干梳测试后, 再用水浸泡进行湿梳测试, 待测试完成后, 用由硅

油乳液制备的洗发水样品对发束进行硅油梳理性测试。具体步骤如下: 用一组洗发水样品分别洗涤 3 组发束, 首先把头发润湿, 在发束上均匀涂抹洗发水, 揉搓 1 min, 固定水速, 冲洗 2 min, 洗涤结束后, 测试湿梳摩擦力, 用吹风机将发束吹干, 测试干梳摩擦力。按上述操作方法分别进行第二次、第三次洗涤和测试, 取平均值。

在梳理性测试基础上确定洗发水实验配方, 见表 2。按照表 2 配方, 制作 100 g 洗发水样品。A 相: 称取 17.14 g AES 和 5 g CAB, 加入到烧杯中, 加入去离子水适量, 搅拌使其溶解。B 相: 称取 3 g 卡波和 6 g 去离子水, 搅拌均匀, 将 B 相缓慢加入到 A 相中; 将通过实验确定的 C 相加入到 A, B 混合相中, 搅拌均匀; 加入 D 相适量防腐剂, 搅拌均匀, 制得洗发水样品。

表 1 洗发水基础配方

Table 1 Basic formula of shampoo

项目	名称	用量/%
A 相	AES	17.14
	CAB	5
	去离子水	至 100
B 相	卡波	3
	去离子水	6
C 相	硅油乳液	2
	$m(\text{C-14S}) : m(\text{LR400}) =$ 0.1 g : 0.2 g, 0.2 g : 0.2 g, 0.1 g : 0.4 g, 0.2 g : 0.4 g	0.3 ~ 0.6
D 相	防腐剂	适量

表 2 洗发水实验配方

Table 2 Test formula of shampoo

项目	名称	用量/%
A 相	AES	17.14
	CAB	5
	去离子水	至 100
B 相	卡波	3
	去离子水	6
C 相	硅油乳液	2
	$(m(\text{E6518}) : m(\text{E6550}) = 1.5 \text{ g} : 0.5 \text{ g})$ $m(\text{C-14S}) : m(\text{LR400}) = 0.2 \text{ g} : 0.2 \text{ g}$	0.4
D 相	防腐剂	适量

**1.2.3 发束摩擦力测试与发丝形貌表征** 将发束固定在测试平台上,使其处于紧绷状态,利用头发多功能测试仪对发束进行摩擦力测试.使用扫描电镜对发丝表面的形貌进行表征.

## 2 结果与讨论

### 2.1 AES 与阳离子聚合物絮凝实验结果

AES 与阳离子聚合物复配的絮凝实验结果如图 1—图 4 所示.

从图 1 可以看出,在  $V(\text{样品}) : V(\text{水}) = 1 : 2$  的梯度下,随着 AES 和 C-14S 用量的增加,絮凝物质量增加基本呈上升趋势,且 AES 用量较低时,絮凝物质量增加趋势越明显,当 AES 用量为 14.29%,C-14S 用量为 0.3 g 时,絮凝物质量达到最大值 0.053 4 g;在  $V(\text{样品}) : V(\text{水}) = 1 : 10$  的梯度下,AES 用量

为 14.29%,17.14%,20.00%时,随着 C-14S 用量增加,絮凝物的质量基本呈上升趋势,当 AES 用量为 14.29%,C-14S 用量为 0.3 g 时,絮凝物质量达到最大值 0.075 7 g.

从图 2 可以看出,在  $V(\text{样品}) : V(\text{水}) = 1 : 2$  的梯度下,AES 用量为 20%,LR400 用量为 0.9 g 时,絮凝物质量出现了骤减;在  $V(\text{样品}) : V(\text{水}) = 1 : 10$  的梯度下,AES 用量分别为 14.29%和 20%时,随着 LR400 用量增加,絮凝物质量呈增加趋势,当 AES 用量为 14.29%,LR400 用量为 0.9 g 时,絮凝物质量达到最大值 0.013 1 g.

从图 3 可以看出,在  $V(\text{样品}) : V(\text{水}) = 1 : 2$  或  $1 : 10$  梯度时,AES 与 M550 复配进行絮凝实验,絮凝物质量与阳离子浓度的变化没有一定规律,表明絮凝实验效果不理想.

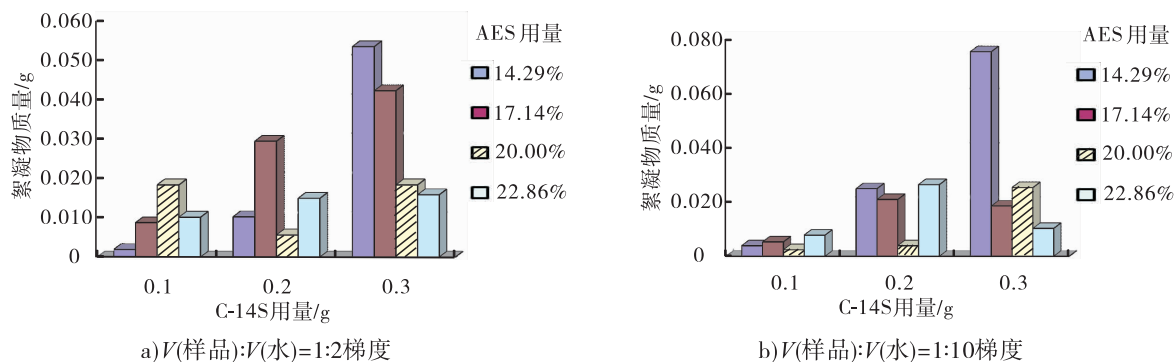


图 1 AES 复配 C-14S 体系在不同梯度下的絮凝实验结果

Fig. 1 Results of flocculation experiment of AES compound C-14S system under different gradient

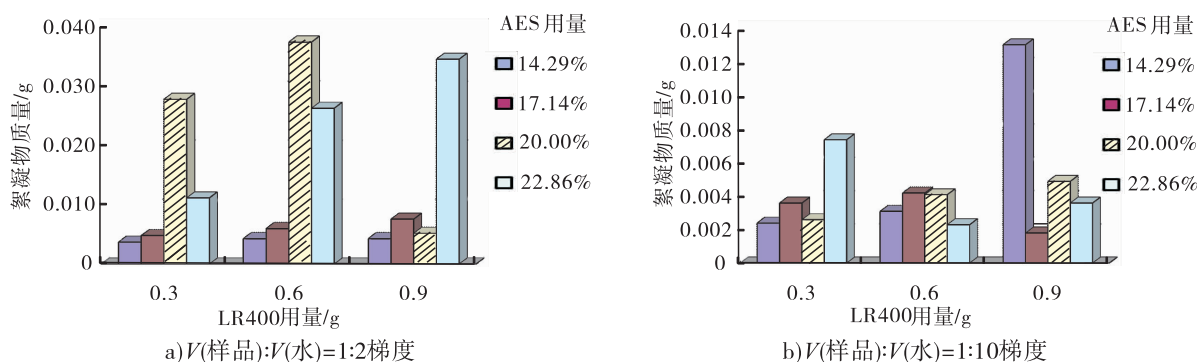


图 2 AES 复配 LR400 体系在不同梯度下的絮凝实验结果

Fig. 2 Results of flocculation experiment of AES compounded LR400 system under different gradient

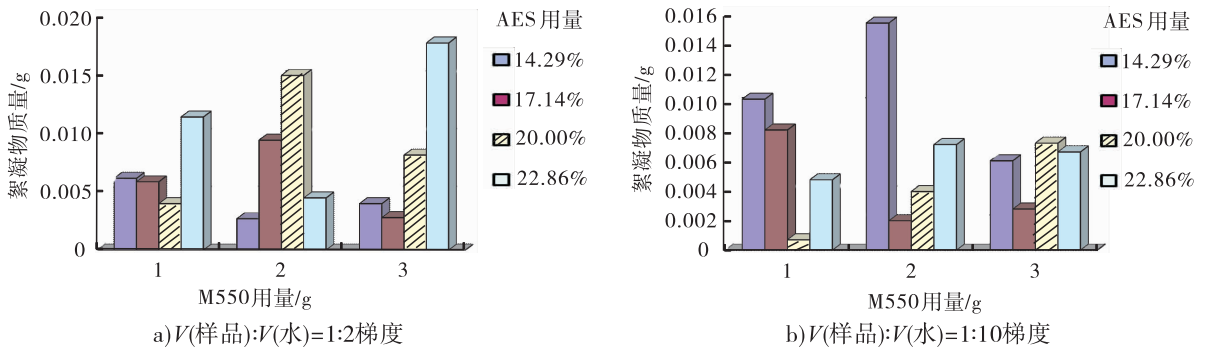


图3 AES复配M550体系在不同梯度下的絮凝实验结果

Fig. 3 Results of flocculation experiment of AES compounded M550 system under different gradient

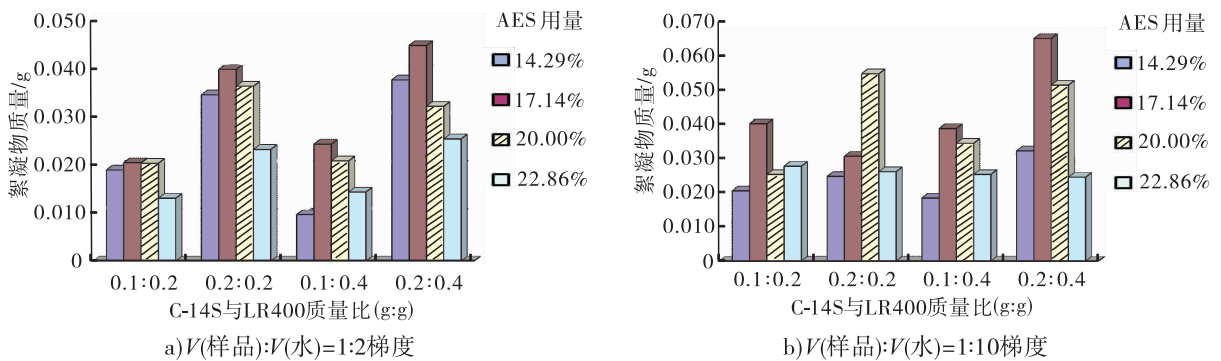


图4 AES复配C-14S和LR400体系在不同梯度下的絮凝实验结果

Fig. 4 Results of flocculation experiment of AES compounded C-14S and LR400 system under different gradient

从图4可以看出,在 $V(\text{样品}):V(\text{水}) = 1:2$ 或 $1:10$ 梯度下,随着AES和混合阳离子聚合物用量的增加,絮凝物质量变化没有固定规律,但较同等用量下单一阳离子的絮凝物质量明显增加,且AES用量为17.14%时絮凝效果最好。

因此,开发调理功效较佳的洗发水,应优先选择阳离子之间的复配,以达到更好的絮凝效果,从而促进有效成分在头发表皮的沉积,起到保护秀发的作用。

### 2.2 硅油梳理性测试结果

按照实验配方要求,将A,B两相混合后,分别加入硅油乳液E6518,E6550,两者的复配产物及4个质量比的阳离子聚合物,制备洗发水,然后进行梳理性测试,结果如图5—图7所示。

由图5可以看出,湿梳情况下,当阳离子复配质量比(g:g)为0.2:0.2和0.1:0.4时,洗前洗后梳理力差值为负数,说明洗前湿梳阻力小于洗后湿梳阻力;阳离子复配质量比(g:g)为0.1:0.2和0.2:0.4时,洗前洗后梳理力差值为正值,说明洗前湿梳阻力大于洗后湿梳阻力.在上述4组复配体系中,洗前干梳与洗后干梳差值为正,说明洗前干梳阻力大于洗后干梳阻力。

由图6可以看出,在湿梳情况下,阳离子复配质量比(g:g)为0.2:0.2,0.1:0.4和0.2:0.4时,洗前洗后梳理力差值均为负数,表明洗前湿梳阻力小于洗后湿梳阻力;在干梳情况下,阳离子复配质量比(g:g)为0.1:0.2,0.2:0.2和0.1:0.4时,洗前洗后梳理力差值为负数,表明洗前干梳阻力小于洗后干梳阻力。

由图7可以看出,在湿梳情况下,无论哪



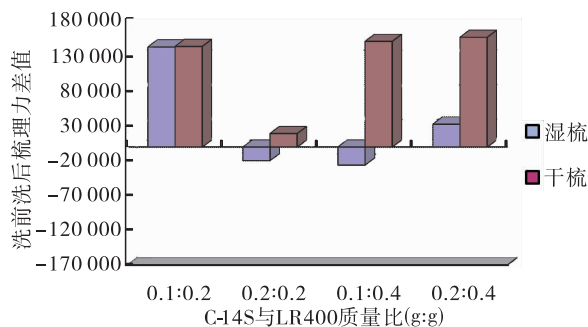


图5 硅油乳液 E6518 梳理性实验结果

Fig. 5 The results of silicone oil emulsion E6518 combability experiment

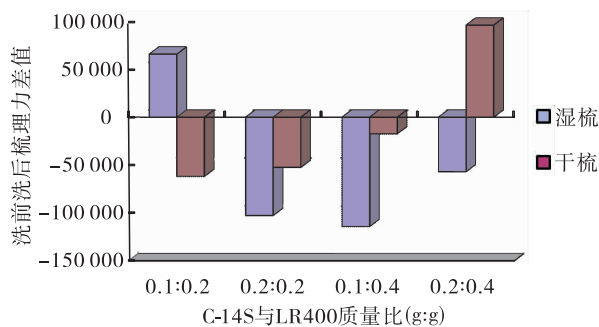


图6 硅油乳液 E6550 梳理性实验结果

Fig. 6 The results of silicone oil emulsion E6550 combability experiment

种阳离子复配比例,洗前洗后梳理力差值均为正数,表明洗前湿梳阻力要大于洗后湿梳阻力.干梳情况下,阳离子复配质量比(g:g)为0.1:0.2,0.2:0.2和0.2:0.4时,洗前洗后梳理力差值为正数,表明洗前干梳阻力大于洗后干梳阻力.这是由于两者复配时,大、小粒径硅油乳液发挥不同的作用,所表现的效果均优于单个硅油乳液,在阳离子复配质量比(g:g)为0.2:0.2时,其干梳性能优于湿梳性能,梳理性效果最好.结合C-14S和LR400复配时的絮凝实验结果,确定洗发水配方中 $m(\text{C-14S}):m(\text{LR400})=0.2\text{ g}:0.2\text{ g}$ ,硅油乳液 $m(\text{E6518}):m(\text{E6550})=1.5\text{ g}:0.5\text{ g}$ .

### 2.3 发束摩擦力测试结果

对发束进行摩擦力测试,结果如图8和图9所示.从图8和图9可以看出,洗前发束摩擦力 $106.2 \times 10^{-4}\text{ N}$ ,回梳值 $172.7 \times 10^{-4}\text{ N}$ ,洗后

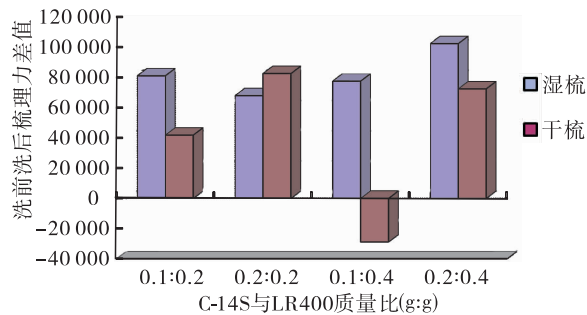


图7 硅油乳液 E6518 与 E6550 复配时梳理性实验结果

Fig. 7 Combative test results of silicone oil emulsion E6518 and E6550

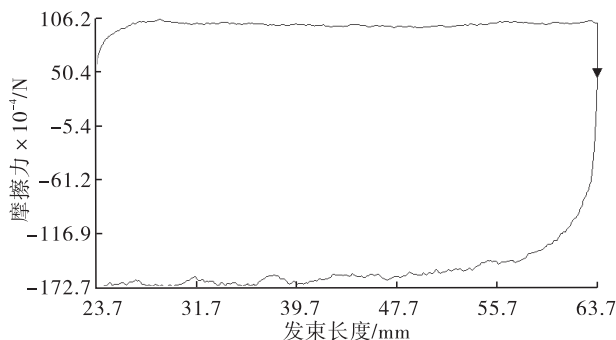


图8 洗前摩擦力测试曲线

Fig. 8 Pre-wash friction test curve

摩擦力 $85 \times 10^{-4}\text{ N}$ ,回梳值 $136.5 \times 10^{-4}\text{ N}$ ;对比洗前、洗后摩擦力测试数据得出,正常梳理时摩擦力比洗前下降约 $20 \times 10^{-4}\text{ N}$ ;回梳时下降约 $36 \times 10^{-4}\text{ N}$ .因此,经本文制备的洗发水漂洗的发束柔软、易梳理、回弹力增加.

### 2.4 发丝表面形貌分析

洗前洗后发丝的SEM图如图9所示.从图9可以看出:洗前头发表面毛鳞片张开过大,表面粗糙不平整;而洗后头发毛鳞片没有张开或张开很小,发丝表面光滑平整.

## 3 结语

本文选择AES与4种阳离子聚合物进行复配,利用絮凝实验确定洗发水配方体系中AES的用量、阳离子聚合物的种类及用量,利用硅油梳理性测试研究硅油乳液种类及用量对发

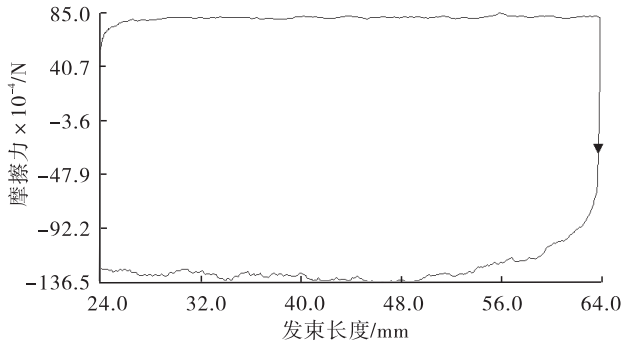


图9 洗后摩擦力测试曲线

Fig.9 Post-wash friction test curve

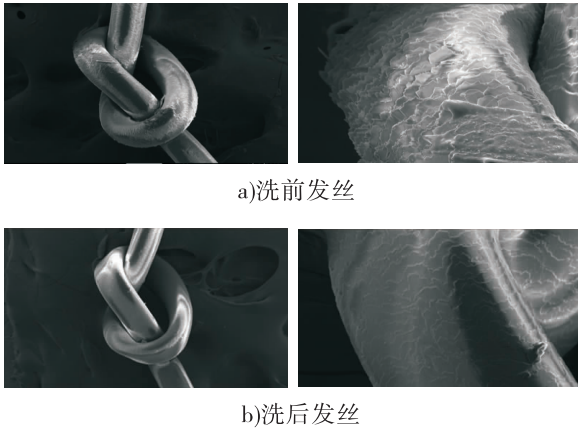


图10 洗前洗后发丝的SEM图

Fig.10 SEM images of hair before and after washing

束梳理性效果的影响由此确定最佳洗发水配方为: AES (17.14%), C-14S (0.2%), LR400 (0.2%), E6518 (1.5%), E6550 (0.5%), CAB (5%), 卡波(3%), 防腐剂(适量)和去离子水(加至100%)。经该配方洗发水样品漂洗过的发束,梳理时摩擦力比洗前下降约  $20 \times 10^{-4}$  N,回梳时下降约  $36 \times 10^{-4}$  N;洗后发束光滑、柔顺,易梳理,回弹力增加。

参考文献:

[1] KYOHEI J, NAEKO Y. A new permanent waving

process of human hair based on the water set process [J]. Journal of Fiber Science and Technology, 2017, 73(4):94.

[2] 周伟. 中国专业美发化妆品市场与技术的现状分析[J]. 日用化学品科学, 2016, 39(12):1.

[3] 冯晓. 烫发对女性头发损伤程度评价方法的研究[D]. 上海:复旦大学, 2013.

[4] JIANN B P. Does hair dye use really increase the risk of prostate cancer [J]. BMC Cancer, 2017, 17:724.

[5] 朱社敏, 谢珍, 瞿霖吉, 等. BCOP法评价染发类化妆品眼刺激性的研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(8):1000.

[6] MANU S, SURABHI S, NEHA M, et al. Biology of hair pigmentation and its role in premature canities [J]. Pigment International, 2017, 4(1):7.

[7] 刘玲玲, 闻卫兢. 染发产品的作用机制和安全性[J]. 临床皮肤科杂志, 2010, 39(12):800.

[8] 揭邃. 调理香波的絮凝性研究[J]. 中国洗涤用品工业, 2007, 1:73.

[9] 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.

[10] 李刚森, 蔡立芳, 王培义, 等. 十二烷基硫酸钠与非离子表面活性剂 AEO<sub>9</sub>/6501 复配体系表面活性及动态表面张力研究[J]. 轻工学报, 2016, 31(5):51.

[11] 马士旭. 有机硅乳液在护发品中的应用[J]. 香料香精化学品, 2002, 3:31.

[12] 陈海超. 洗发水:中国式破局[J]. 日用化学品科学, 2018, 41(8):50.



引用格式:秦浩,王洋洋,杨永超,等.基于HTCC工艺的电化学NO<sub>2</sub>气体传感器设计与测试[J].轻工学报,2019,34(4):59-63.

中图分类号:TP212 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.009

文章编号:2096-1553(2019)04-0059-05

# 基于HTCC工艺的电化学NO<sub>2</sub>气体传感器设计与测试

## Design and test of electrochemical NO<sub>2</sub> gas sensor based on HTCC technology

秦浩<sup>1,2</sup>,王洋洋<sup>1</sup>,杨永超<sup>1</sup>,刘智敏<sup>1</sup>,佟勇<sup>3</sup>,徐海鑫<sup>3</sup>

QIN Hao<sup>1,2</sup>,WANG Yangyang<sup>1</sup>,YANG Yongchao<sup>1</sup>,LIU Zhimin<sup>1</sup>,TONG Yong<sup>3</sup>,  
XU Haixin<sup>3</sup>

1. 中国电子科技集团公司第四十九研究所,黑龙江哈尔滨150001;
  2. 哈尔滨工程大学材料科学与化学工程学院,黑龙江哈尔滨150001;
  3. 陆军航空兵军事代表局驻哈尔滨军事代表室,黑龙江哈尔滨150001
1. *The 49th Research Institute, China Electronic Technology Group, Harbin 150001, China;*  
2. *College of Materials Science and Chemical Engineering, Harbin Engineering University, Harbin 150001, China;*  
3. *Military Representative Office of Army Air Force in Harbin, Harbin 150001, China*

### 关键词:

HTCC工艺;电化学  
NO<sub>2</sub>气体传感器;离子  
液体;响应特性

### Key words:

HTCC technology;  
electrochemistry NO<sub>2</sub>  
gas sensor; ionic liquid;  
response characteristic

**摘要:**采用高温共烧陶瓷(HTCC)工艺,以氧化锆陶瓷、导电金属浆料、室温离子液体为主要原料,制作了一种电化学NO<sub>2</sub>气体传感器,并对该传感器电极的电化学性能、传感器的输出和响应特性等进行了研究.结果表明:实验所用室温离子液体1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐适合作为该电化学NO<sub>2</sub>传感器的电解液,适宜的工作电压为1.2V;该传感器的检测范围为0~0.010%(体积分数)时,精度为1.5%FS;该传感器的响应时间( $\tau_{90}$ )为25s,优于传统腔室类电化学气体传感器.

收稿日期:2018-10-17

作者简介:秦浩(1983—),男,江苏省徐州市人,中国电子科技集团公司第四十九研究所高级工程师,主要研究方向为敏感材料及化学量传感器技术.

**Abstract:** An electrochemical NO<sub>2</sub> gas sensor was fabricated by using high temperature co-fired ceramic (HTCC) process with zirconia ceramics, conductive metal paste and room temperature ionic liquid as the main raw materials. The electrochemical performance of the sensor electrode and the output and response characteristics of the sensor were studied. The results showed that the room temperature ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bis-trifluoromethylsulfonyl imide salt used in the experiment was suitable as the electrolyte of the electrochemical NO<sub>2</sub> gas sensor, and the suitable working voltage was 1.2 V; when the detection range of the sensor was 0 ~ 0.010% (volume fraction), and the accuracy was 1.5% FS. The response time ( $\tau_{90}$ ) of the sensor was 25 s, which was superior to the traditional chamber electrochemical gas sensor.

## 0 引言

NO<sub>2</sub> 是导致环境污染的因素之一,对生态环境、大气环境、水体环境都会造成破坏,致使地表水酸化、臭氧层破坏、产生光化学烟雾,严重威胁人类的生存与健康<sup>[1-2]</sup>. NO<sub>2</sub> 主要来源于高温燃烧过程中废气的释放,如机动车尾气、锅炉废气的排放等<sup>[3]</sup>. 常用的 NO<sub>2</sub> 气体检测方法有光学法、质谱法、气体传感器检测等<sup>[4]</sup>. 这些检测方法普遍存在仪器体积大、测量易受环境因素干扰、功耗大、测量精度低的问题. 电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器由于具有环境适应性好、体积小、功耗低、易集成等优点,具有广阔的应用空间<sup>[5-7]</sup>. 但目前市售的 NO<sub>2</sub> 气体传感器均为腔室结构,存在体积大不易集成、响应时间长、使用寿命短、电解液易干涸的问题<sup>[8-13]</sup>.

HTCC 工艺是在生瓷带上利用激光打孔、微孔注浆、精密导体浆料印刷等工艺制出所需要的电路图形,然后叠压在一起,烧结制成三维空间电子元器件或传感器的一种元器件制作工艺. 该工艺具有制作简单、产品一致性好、体积小、易集成的优点,用于电化学气体传感器的制造具有广阔的应用前景. 目前 HTCC 工艺在传感器领域比较成熟的应用是用于制造汽车氧传感器,鲜见将该工艺用于 NO<sub>2</sub> 气体传感器制作方面的报道. 鉴于此,本文拟采用 HTCC 工艺,选取贵金属 Au 作为催化电极材料,选用多孔金浆料印刷参比电极、工作电极和辅助电极,以 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐作

为电解液材料,氧化锆陶瓷作为多孔层材料,制作电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器,并对该传感器进行电化学性能、输出特性和响应特性分析,以期解决传统腔室类电化学气体传感器存在的问题.

## 1 主要材料与仪器

主要材料: 1901 - Au 型多孔金浆料、5574 氧化锆多孔浆料,美国 ESL 公司产;室温离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐(纯度 99%),上海成捷公司产.

主要仪器: INSPECT - S50 型扫描电子显微镜,美国 FEI 公司产; Autolab 302N 型电化学工作站,瑞士万通公司产.

## 2 传感器的设计与制作

图 1 为电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的结构图. 本文设计的电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器为三电极结构,有工作电极、辅助电极和参比电极. 采用无膜式电解池结构,被测气体可直接接触到电极,在辅助电极/电解液/NO<sub>2</sub> 气体三相界面上发生电化学还原反应:

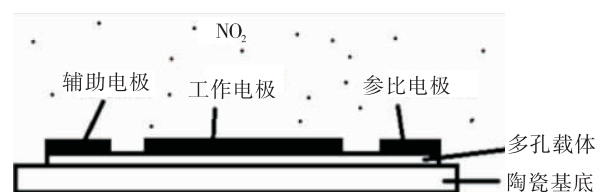
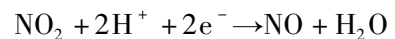
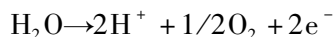


图 1 电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器结构图

Fig. 1 Structure diagram of electrochemical NO<sub>2</sub> gas sensor

同时在对电极上 H<sub>2</sub>O 失去电子发生氧化反应:



总反应为



本实验设计的传感器制作步骤如下.

1) 采用丝网印刷的方法在氧化铝生瓷片表面印刷多孔氧化锆陶瓷层,厚度为 20 μm,获得用于支撑电解液的多孔载体层(烧结固化前),并使用铂浆料印刷电极引出端.

2) 将第一步印好的多孔层、电极引出端、陶瓷基底高温共烧成型,获得多孔层结构用于固载电解液.

3) 在各电极引出端焊接引线.

4) 采用丝网印刷的方式在多孔载体层表面相应位置印刷 Au 作为工作电极、对电极和参比电极,获得完整的传感器电解池结构,其尺寸为 10 mm × 10 mm.

5) 使用移液器量取 0.4 μL 的离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐作为电解液,滴加并渗透进多孔层内. 图 2 为电解池样品的片式结构设计,其机制在于实现 NO<sub>2</sub> 传感器的微型化与易集成化.

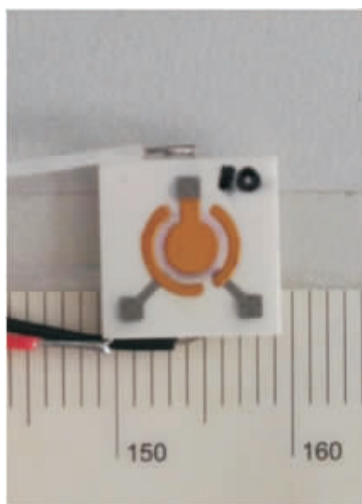


图 2 电解池样品

Fig. 2 Sample of electrolytic cell

### 3 传感器性能测试与讨论

#### 3.1 传感器性能测试方法

采用扫描电子显微镜对传感器电极表面的微观形貌进行测试:工作电压为 20 kV;利用电化学工作站对电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的输出性能进行测试:循环伏安曲线(CV)扫描电压范围为 0.2 ~ 2.5 V,扫描速率为 0.01 V/s;电流输出特性曲线扫描电压 1.2 V,采样频率 120 次/min.

#### 3.2 传感器电极表面微观形貌分析

图 3 为 Au 电极表面的 SEM 图. 由图 3 可以看出,Au 电极表面疏松多孔且无团聚,比表面积大,这使得被检测气体与催化电极的接触面积较大,能有效提高催化效率,有利于电化学反应的进行. 同时,NO<sub>2</sub> 在多孔结构 Au 电极内的扩散较快,提高了电极反应速率,缩短了响应时间.

#### 3.3 传感器电极的电化学性能分析

图 4 为 Au 电极在 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐电解液中对 NO<sub>2</sub> 气体的循环伏安曲线. 由图 4 可以看出,实验使用的电解液电化学窗口较宽,1.5 V 以内未发生明显电解,说明该离子液体电化学性能较稳定. 当工作电压为 1.2 V 左右时,NO<sub>2</sub> 在电解液系内出

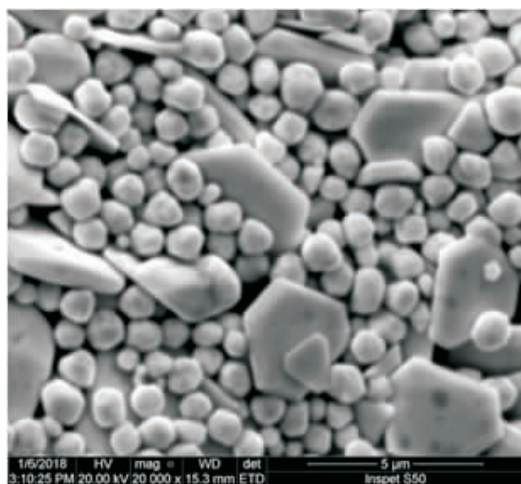


图 3 Au 电极表面的 SEM 图

Fig. 3 SEM image of Au electrode surface

现了明显的氧化峰,说明在 1.2 V 时电解池体系内发生了明显的电化学反应,即在 Au 电极的催化下 NO<sub>2</sub> 在 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐中的电解电位为 1.2 V,该离子液体适合作为电化学气体传感器的电解液,同时因室温离子液体不易干涸,可延长传感器的使用寿命. 本文设计的 NO<sub>2</sub> 传感器采用恒压供电,故选定其工作电压为 1.2 V.

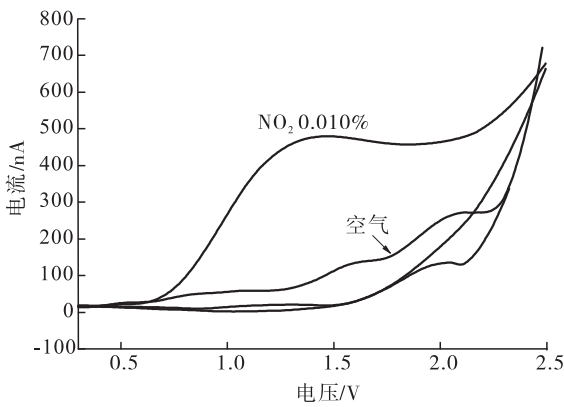


图 4 Au 电极在 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲磺酰亚胺盐电解液中  
对 NO<sub>2</sub> 的循环伏安特性曲线

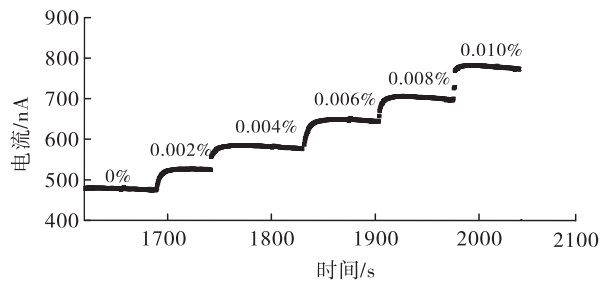
Fig. 4 Cyclic voltammetric characteristics of porous Au electrode for nitric oxide in 1-butyl-3-methylimidazolium bis-trifluoromethylsulfonamide salt

### 3.4 传感器电流输出特性分析

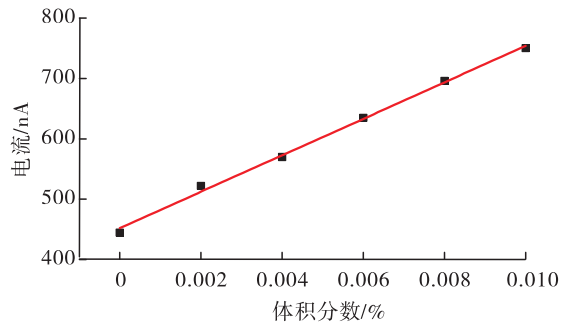
图 5 为电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的电流特性输出曲线. 由图 5 可以看出,随着 NO<sub>2</sub> 体积分数的增加,该传感器的输出电流逐渐增大. 经计算电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的工作方程为  $y = 2.99x + 471.54$ ,精度为 1.5% FS,传感器线性输出较好.

### 3.5 传感器响应特性分析

本文选取  $\tau_{90}$  为传感器的响应时间,即从通入 NO<sub>2</sub> 气体开始,到传感器输出达到上限 ( $R_g$ ) 的变化量的 90% 所用的时间. 图 6 为 NO<sub>2</sub> 体积分数为 0.010% 下电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的响



a) 时间-输出电流曲线



b) 工作直线

图 5 电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的电流输出特性曲线

Fig. 5 Current output characteristic curve of electrochemical NO<sub>2</sub> gas sensor

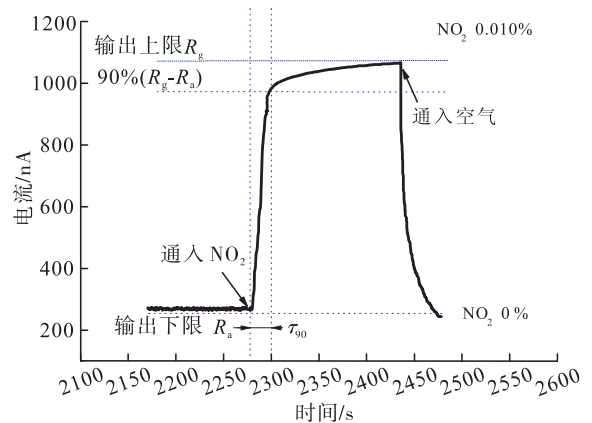


图 6 电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器响应-恢复曲线

Fig. 6 Response-recovery curve of electrochemical NO<sub>2</sub> gas sensor

应-恢复时间曲线. 由图 6 可以看出,该传感器的响应时间 ( $\tau_{90}$ ) 为 25 s, 优于传统腔室类电化学气体传感器<sup>[14]</sup>. 这是由于本文设计的电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的电解池为无膜开放式结构,被测气体可直接与 Au 电极表面接触,无传统腔室结构的电化学气体传感器气体在透气膜中

扩散的过程,从而提高了响应速度,缩短了响应时间.

## 4 结论

本文以氧化锆陶瓷、导电金属浆料、室温离子液体为主要原料,设计制做了一种基于 HTCC 工艺的电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器,通过对其电极电化学性能、输出特性和响应特性进行测试与分析发现,实验所用室温离子液体适合作为该电化学 NO<sub>2</sub> 气体传感器的电解液,同时因室温离子液体不易干涸,延长了传感器的使用寿命,传感器适宜的工作电压为 1.2 V;该传感器的检测范围为 0 ~ 0.010% (体积分数),精度为 1.5% FS;该传感器的响应时间 ( $\tau_{90}$ ) 为 25 s,优于传统腔室类电化学气体传感器.

本文设计的传感器解决了目前市售传感器使用寿命短、体积大不易集成等问题;同时,设计制作的开放式电解池结构,使该传感器具有灵敏度高、响应速度快、准确性好等优点.

## 参考文献:

- [1] 王成杨,李玉玲,丁文波,等. 基于 MEMS 工艺的 NO<sub>2</sub> 气体传感器研制[J]. 传感器与微系统,2018,37(7):81.
- [2] 王欣,赵文杰,张福君,等. 一种 AlN 基陶瓷微热板 NO<sub>2</sub> 气体传感器研究[J]. 传感技术学报,2018,31(6):866.
- [3] 李辉,高致慧,林伟豪,等. 温度对石墨烯 NO<sub>2</sub> 气体传感器的影响[J]. 传感器与微系统,2018,37(6):5.
- [4] 郑豪男,陈珍珍,施佩影,等. 基于微纳传感器的有毒有害气体检测方法研究[J]. 传感技术学报,2019,32(4):514.
- [5] 卞贺明,边超,佟建华,等. 用于氨氮检测的无透气膜安培型 NH<sub>3</sub> 微传感器及系统[J]. 纳米技术与精密工程,2012,10(2):120.
- [6] WASILEWSKI T, GEBICKI J, KAMYSZ W. Prospects of ionic liquids application in electronic and bioelectronic nose instruments [J]. Trends in Analytical Chemistry,2017,93:23.
- [7] TONIOLO R, BORTOLOMEAZZI R, SVIGELJ R, et al. Use of an electrochemical room temperature ionic liquid-based microprobe for measurements in gaseous atmospheres [J]. Sensors and Actuators B:Chemical,2017,240:239.
- [8] MOYA A, GABRIEL G, VILLA R, et al. Inkjet-printed electrochemical sensors [J]. Since Direct,2017,3(1):29.
- [9] WAN H, YIN H Y, MASON A J. Rapid measurement of room temperature ionic liquid electrochemical gas sensor using transient double potential amperometry [J]. Sensors and Actuators B:Chemical. 2017,242:658.
- [10] ZEVENBERGEN M A G, WOUTERS D, DAM V A. Electrochemical sensing of ethylene employing a thin ionic-liquid layer [J]. Analytical Chemistry,2011,83:6300.
- [11] OUDENHOVEN J F M, KNOBEN W, VAN SCHAIJK R. Electrochemical detection of ammonia using a thin ionic liquid film as the electrolyte [J]. Procedia Engineering, 2015, 120:983.
- [12] WEI D, IVASKA A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors [J]. Analytica Chimica Acta,2008,607:126.
- [13] 秦浩,王洋洋,杨永超,等. 开放式快响应电化学 NH<sub>3</sub> 传感器研制[J]. 传感器与微系统,2018,37(9):81.
- [14] 李冬梅,王荣,曹晓卫,等. 基于室温离子液体的电导型气体传感器[J]. 化学研究与应用,2009,21(6):843.



引用格式: 钮劲涛, 金宝丹, 周萍, 等.  $\text{CaO}_2$  对城市污水处理中剩余污泥厌氧发酵产酸性能与生物酶活性的影响[J]. 轻工学报, 2019, 34(4): 64 - 73.

中图分类号: X703 文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.010

文章编号: 2096-1553(2019)04-0064-10

# $\text{CaO}_2$ 对城市污水处理中剩余污泥厌氧发酵产酸性能与生物酶活性的影响

## Effects of $\text{CaO}_2$ on the anaerobic fermentation acidification performance and biological enzyme activity of waste activated sludge in municipal wastewater treatment

钮劲涛<sup>1,2</sup>, 金宝丹<sup>1</sup>, 周萍<sup>1</sup>, 牛佳慧<sup>1</sup>, 张局<sup>1</sup>, 张钟方<sup>1</sup>,  
陶泓帆<sup>1</sup>, 马志刚<sup>1</sup>, 代菁雯<sup>1</sup>, 李诺楠<sup>1</sup>  
NIU Jintao<sup>1,2</sup>, JIN Baodan<sup>1</sup>, ZHOU Ping<sup>1</sup>, NIU Jiahui<sup>1</sup>, ZHANG Ju<sup>1</sup>,  
ZHANG Zhongfang<sup>1</sup>, TAO Hongfan<sup>1</sup>, MA Zhigang<sup>1</sup>, DAI Jingwen<sup>1</sup>, LI Nuonan<sup>1</sup>

1. 河南省环境污染治理与生态修复协同创新中心 郑州轻工业大学, 河南 郑州 450001;
  2. 河南恒安环保科技有限公司, 河南 郑州 450001
1. He'nan Collaborative Innovation Center of Environmental Pollution Control and Ecological Restoration, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. He'nan Heng'an Environmental Protection Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China

### 关键词:

剩余污泥; 厌氧发酵;  
 $\text{CaO}_2$ ; 水解酸化; 短链  
脂肪酸; 生物酶活性

### Key words:

waste activated sludge;  
anaerobic fermentation;  
Calcium peroxide;  
hydrolytic acidification;  
short volatile fatty  
acids; biological  
enzyme activity

**摘要:**将  $\text{CaO}_2$  添加至城市污水处理剩余污泥厌氧发酵系统中, 研究  $\text{CaO}_2$  添加量对剩余污泥水解酸化和厌氧发酵性能的影响, 结果表明:  $\text{CaO}_2$  的添加能够促进污泥溶液化和分解, 提高污泥水解性能, 发酵系统中的蛋白质和多糖质量浓度随着  $\text{CaO}_2$  添加量的增加而增大; 适当添加  $\text{CaO}_2$  能够促进污泥厌氧发酵产酸, 且产酸过程具有延迟性, 也能促进蛋白酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和脱氢酶的活性, 但会严重抑制碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的活性; 随着  $\text{CaO}_2$  添加量的增加,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  释放量先增大后降低, 而  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  释放量则呈降低趋势. 从机理角度分析,  $\text{CaO}_2$  溶于水后生成  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  等强氧化物质, 能够有效破坏微生物细胞壁, 强化污泥水解,  $\text{OH}^-$  形成的碱性环境可抑制产甲烷菌的活性, 降低 SCFAs 的消耗,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  与发酵系统中的  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  形成鸟粪石沉淀, 有利于氮和磷物质的有效回收.

收稿日期: 2019-04-29

基金项目: 河南省自然科学基金项目(182300410140); 郑州轻工业大学众创空间孵化项目(2018ZCKJ201)

作者简介: 钮劲涛(1982—), 男, 河南省漯河市人, 河南恒安环保科技有限公司工程师, 主要研究方向为污水处理及污泥资源化应用.



**Abstract:** The different dose CaO<sub>2</sub> was added into the waste activated sludge anaerobic fermentation system which studied the effect of CaO<sub>2</sub> on the WAS anaerobic fermentation performance. The results showed that CaO<sub>2</sub> could enhance the WAS solubilization and sludge decomposition, and increase the WAS hydrolysis performance, the mass concentration of protein and polysaccharide increased with the CaO<sub>2</sub> addition. At the same time, appropriate concentration of CaO<sub>2</sub> could promote sludge anaerobic fermentation to produce acid and it was delayed, and also could promote the activity of protease,  $\alpha$ -glucosidase and dehydrogenase, but suppressed alkaline phosphatase and acid phosphatase. The release amount of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N increased first then declined with the increase of CaO<sub>2</sub> addition, but the release amount of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P declined with the increase of CaO<sub>2</sub> addition. From the analysis of mechanism perspective, CaO<sub>2</sub> dissolved in water to form strong oxidizing substances such as OH<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which could effectively destroy the microbial cell wall and strengthen the hydrolysis of sludge. The alkaline environment formed by OH<sup>-</sup> inhibited the activity of methanogens and reduced the consumption of SCFAs, a struvite precipitate was formed by the action of OH<sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> with NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P in the fermentation system, which was beneficial to the effective recovery of nitrogen and phosphorus substances.

## 0 引言

目前,活性污泥法是应用最广泛的污水处理方法,具有处理效果好、成本低等特点。然而运用活性污泥法处理城市污水会产生大量副产物——剩余污泥,其处理问题成为当前污水处理工作面临的新挑战。据统计,至2017年,我国城市污泥年产生量约为7000万吨,而且污水处理厂约60%的运行费用于污泥处理<sup>[1]</sup>。污泥中含有丰富的有机资源(如蛋白质、糖类、脂类等)和无机资源(如氮、磷等),可回收利用,但其中还含有大量的病菌、病毒等微生物,如果不能妥善处理,将造成环境污染,严重影响环境安全。

污泥厌氧发酵是目前高效且低成本的一种污泥处理技术,其处理过程分为水解、酸化和产甲烷3个阶段:污泥水解将微生物体内蛋白质和多糖释放至发酵系统,水解酶能够将蛋白质和多糖分解成氨基酸、单糖等小分子物质;酸化菌则利用水解产物生成可挥发性短链脂肪酸(SCFAs);产甲烷菌再利用SCFAs生成甲烷。污泥水解是污泥厌氧发酵的关键步骤,而产生于酸化阶段的SCFAs是污水生物处理过程的优

质碳源<sup>[2]</sup>,SCFAs中的乙酸、丙酸、异丁酸等也是重要的工业生产原料,因此污泥厌氧发酵产酸研究受到了广泛关注。研究发现,在NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>等碱性条件下,产甲烷菌活性受到抑制,水解酸化菌将污泥中大部分有机物转化为SCFAs,蛋白质,多糖等,其中Ca(OH)<sub>2</sub>型发酵系统中乙酸含量最高<sup>[3]</sup>。刘常青等<sup>[4]</sup>发现,用Ca(OH)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>等联合热水解法预处理污泥有助于有机物的溶出。由此可见,钙制品化学药剂对于污泥厌氧发酵有较好的促进作用,但是经Ca(OH)<sub>2</sub>处理的发酵污泥中仍含有大量的有机物未提取、未利用。

CaO<sub>2</sub>是一种安全、多功能的氧化剂,有“固体”双氧水之称,溶于水后能够生成·OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>等<sup>[5]</sup>,已广泛用于水产养殖业、农业、制药业和污水处理行业。近期研究发现, CaO<sub>2</sub>能够提高污泥脱水性<sup>[6]</sup>,与游离氨联合可提高污泥厌氧发酵产酸性能<sup>[7]</sup>,但是对于其作用机理研究不够深入。鉴于此,本文拟以CaO<sub>2</sub>作为剩余污泥处理药剂,研究不同添加量的CaO<sub>2</sub>对剩余污泥水解酸化性能的影响,考察其对污泥厌氧发酵系统中生物酶活性的影响,探索CaO<sub>2</sub>在污泥厌氧发酵过程中的

作用机理,以期为污水处理厂剩余污泥资源化研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 污泥来源与实验装置

本实验使用的污泥取自郑州市某城市污水处理厂的曝气池,将其用自来水清洗3次后进行浓缩,得实验用污泥,即后文称剩余污泥,其性质如表1所示。

实验反应器材质为有机玻璃,总体积为2.5 L,有效容积为2.0 L,采用磁力搅拌器进行匀速搅拌。

主要试剂:CaO<sub>2</sub>,浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,CuSO<sub>4</sub>,酒石酸钾钠,天津市大茂化学试剂厂产;吡喃葡萄糖苷、硝基-a-d-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯磷酸二钠、碘硝基四唑紫、Folin试剂,阿拉丁试剂有限公司产。以上试剂均为分析纯。

主要仪器:754紫外-可见分光光度计,FA2004电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司产;TG16-WS离心机,湘仪离心机仪器有限公司产;5B-1F(V8)COD快速检测仪,连华科技有限公司产;GC6890B气相色谱仪,安捷伦科技有限公司产;PHS-25雷磁水质测定仪,上海仪电科学仪器股份有限公司产。

### 1.2 取样方法

分别取2 L剩余污泥投加至1<sup>#</sup>-4<sup>#</sup>反应

表1 实验用污泥的性质

Table 1 Experimental sludge properties mg/L

项目	指标	数值
发酵 污泥	悬浮物污泥质量浓度(TSS)	9550 ± 145
	可挥发性污泥质量浓度(VSS)	6 080.6 ± 130
	化学需氧量(COD)值	25.0 ± 0.5
	挥发性脂肪酸(SCFAs)释放量 (以COD计)	15.76 ± 0.85
滤液	蛋白质含量(以COD计)	4.5 ± 0.5
	多糖含量(以COD计)	5.5 ± 1.3
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N释放量	2.5 ± 0.1
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - P释放量	3.0 ± 0.5

器,再向反应器中投加CaO<sub>2</sub>,控制其添加量分别为0.1 mg/mg SS(该单位指每mg悬浮污泥中添加CaO<sub>2</sub>的质量,下同),0.2 mg/mg SS,0.3 mg/mg SS,0.4 mg/mg SS.启动磁力搅拌器,隔天取样测定理化指标。

### 1.3 测定方法

化学需氧量(COD),悬浮污泥质量浓度(MLSS)和可挥发性污泥质量浓度(MLVSS)根据国标方法测定<sup>[8]</sup>;DNA质量浓度用分光光度计测定;pH值用雷磁水质测定仪测定。

在污泥发酵过程中部分有机氮和有机磷以NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N和PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P的形式释放,其释放量是表征污泥厌氧发酵效果的指标之一,根据国标方法测定<sup>[8]</sup>。

污泥在厌氧发酵过程中释放大量的蛋白质、多糖等物质,但是酸化菌不能直接利用这些物质进行产酸活动。水解菌先利用自身水解酶(如蛋白酶)和α-葡萄糖苷酶将大分子的蛋白质和多糖水解生成氨基酸、单糖等<sup>[9]</sup>,而酸化菌则利用水解产物生成SCFAs。所以,蛋白酶和α-葡萄糖苷酶,在污泥厌氧发酵过程中有重要作用。SCFAs的产量用气相色谱仪测定<sup>[10]</sup>,发酵系统中的多糖和蛋白质质量浓度采用分光光度法测定<sup>[8-9]</sup>,蛋白酶和α-葡萄糖苷酶含量采用分光光度法测定<sup>[10-11]</sup>。

剩余污泥发酵系统中含有大量的有机磷,碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)可以将其水解成无机磷(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P)并随着有机物的水解酸化而释放,ALP和ACP活性采用分光光度法测定<sup>[10-11]</sup>。

乳酸脱氢酶(LDH)是脱氢酶(DH)的一种,是催化乳酸与丙酮酸之间氧化还原反应的重要生物酶。因此,DH可以代表发酵过程中的LDH。与LDH一样,由于膜的损伤,DH也可能被释放<sup>[11-12]</sup>。因此,可利用DH研究微生物细胞膜与不同添加量CaO<sub>2</sub>的相互作用,揭示

CaO<sub>2</sub>在厌氧发酵过程中可能存在的毒性机制, DH的活性采用分光光度法测定<sup>[10-11]</sup>.

### 1.4 计算方法

污泥厌氧发酵的过程,是污泥中微生物解体、有机物释放的过程,而污泥溶液化率(SCOD)和污泥分解性率(DDCOD)可表征污泥中微生物解体程度,计算公式分别如下<sup>[13-14]</sup>:

$$SCOD = \frac{COD_s - COD_{s0}}{COD_{p0}} \times 100\% \quad (1)$$

$$DDCOD = \frac{COD_s - COD_{s0}}{COD_{NaOH} - COD_{s0}} \times 100\% \quad (2)$$

式中,  $COD_s$  为溶解性  $COD$  值/( $mg \cdot L^{-1}$ );  $COD_{s0}$  为原始溶液中溶解性  $COD$  值/( $mg \cdot L^{-1}$ );  $COD_{p0}$  为污泥原始颗粒  $COD$  值/( $mg \cdot L^{-1}$ );  $COD_{NaOH}$  为实验温度下, 1 mol/L NaOH 处理剩余污泥 24 h 后的  $COD$  值/( $mg \cdot L^{-1}$ ).

## 2 结果与讨论

### 2.1 CaO<sub>2</sub>对污泥水解性能的影响

#### 2.1.1 不同添加量的 CaO<sub>2</sub>对污泥溶解的影响

图 1 为不同添加量的 CaO<sub>2</sub>对剩余污泥厌氧

发酵系统中 pH 值、DNA 质量浓度、SCOD 值和 DDCOD 值的影响。

由图 1 可以看出, CaO<sub>2</sub>对系统中 SCOD 值和 DDCOD 值均具有显著影响, 两者均随着 CaO<sub>2</sub>添加量的增加而增大, SCOD 值由 8.84% 增至 41.37%, DDCOD 值由 11.84% 增至 55.42%。其中, 0.4 mg/mg SS 发酵系统中的 SCOD 值和 DDCOD 值是 0.1 mg/mg SS 发酵系统的 4~5 倍。该结果与 X. Li 等<sup>[15]</sup>研究的污泥碱性发酵过程中 SCOD 值的变化 (23.2% ~ 53.8%, 15 ~ 55 °C) 相似, 但是高于 Naddeo 超声破碎处理污泥中 SCOD 值的变化 (22%, 19 000 kJ/kg)<sup>[16]</sup>, 这说明 CaO<sub>2</sub>能够有效地促进污泥溶液化和分解。这是因为 CaO<sub>2</sub>溶于水后生成的 OH<sup>-</sup>能够破坏微生物细胞壁, 促进有机质释放<sup>[17]</sup>, 随着 CaO<sub>2</sub>添加量的增加, 系统内 pH 值升高至 12 (如图 1a) 所示, 直接破坏了微生物细胞壁。同时 CaO<sub>2</sub>作用发酵系统后生成大量的活性物质如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH 和 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>等, 这些活性物质能够破坏微生物细胞膜, 使细胞内容物流失<sup>[18]</sup>, 从而使剩余污泥有效溶解。在溶

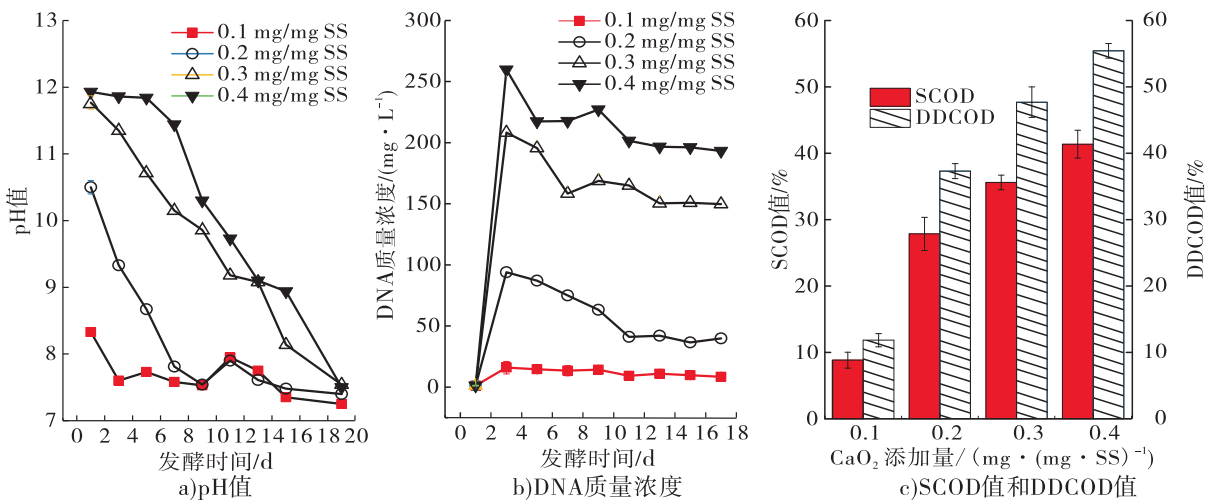


图 1 不同添加量的 CaO<sub>2</sub>对剩余污泥厌氧发酵系统中 pH 值、DNA 质量浓度、SCOD 值和 DDCOD 值的影响

Fig. 1 The effects of CaO<sub>2</sub> with different addition amounts on pH value, DNA mass concentration, SCOD value and DDCOD value in the waste activated sludge anaerobic fermentation system

解过程中, DNA 随着细胞质的溶出而释放(如图 1b)所示), DNA 质量浓度随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加而增大, 发酵末期(17 d) 其值为 8.5 ~ 193.3 mg/L.

### 2.1.2 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对可溶性蛋白质和多糖质量浓度的影响

不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵过程中蛋白质和多糖质量浓度的影响如图 2 所示.

由图 2 可以看出, 发酵过程中蛋白质和多糖质量浓度均随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加而增大, 发酵后期蛋白质质量浓度显著下降, 而多糖质量浓度相对较为稳定. 反应至第 5 ~ 6 d 时, 0.4 mg/mg SS 发酵系统中蛋白质和多糖质量浓度最大, 分别为 931.12 mg/L 和 343.62 mg/L, 是 0.1 mg/mg SS 发酵系统(150.83 mg/L 和 34.56 mg/L)的 6.17 倍和 9.94 倍, 即使发酵末期蛋白质和多糖质量浓度(514.47 mg/L 和 392.44 mg/L)下降, 仍为 0.1 mg/mg SS 发酵系统(55.03 mg/L 和 15.95 mg/L)的 9.35 倍和 24.60 倍, 说明 CaO<sub>2</sub> 能够有效提高剩余污泥的水解性能. 同时还发现, 发酵末期 0.4 mg/mg SS 发酵系统中蛋白质质量浓度是多糖质量浓度的 1.31 倍, 低于其他碱性发酵(NaOH, KOH,

Ca(OH)<sub>2</sub>)方式<sup>[3]</sup>, 但是高于单过硫酸氢钾、高铁酸钾等发酵方式<sup>[19-20]</sup>. CaO<sub>2</sub> 溶于水后形成大量的 OH<sup>-</sup>, 这些 OH<sup>-</sup> 和 CaO<sub>2</sub> 对细胞壁均有破坏作用, 使大量的蛋白质和多糖类释放至系统, 但是其水解过程中形成的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH, ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 能够氧化蛋白质, 减少系统中蛋白质的质量浓度. 由于 CaO<sub>2</sub> 氧化性低于 ·SO<sub>4</sub><sup>-</sup> (单过硫酸氢钾溶于水后的产物), 因此, 该发酵过程产生的蛋白质和多糖的比例高于单过硫酸氢钾发酵方式.

### 2.2 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对污泥酸化的影响

图 3 为不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵过程中污泥酸化的影响.

由图 3a) 可以看出, 系统中 SCFAs 的产量随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加基本呈先增大后降低的趋势, 发酵至第 5 d 时, 0.2 mg/mg SS 发酵系统中 SCFAs 产量最大(876.12 mg/L), 是 0.1 mg/mg SS 发酵系统(35.00 mg/L)的 25.03 倍; 发酵至第 9 d 时, 0.3 mg/mg SS 发酵系统中 SCFAs 的产量迅速增至最大, 但是 0.2 mg/mg SS 发酵系统中 SCFAs 产量迅速下降. 该结果表明, 当 CaO<sub>2</sub> 添加量为 0.3 mg/mg SS 时, 能够显著提高发酵系统中 SCFAs 的产量,

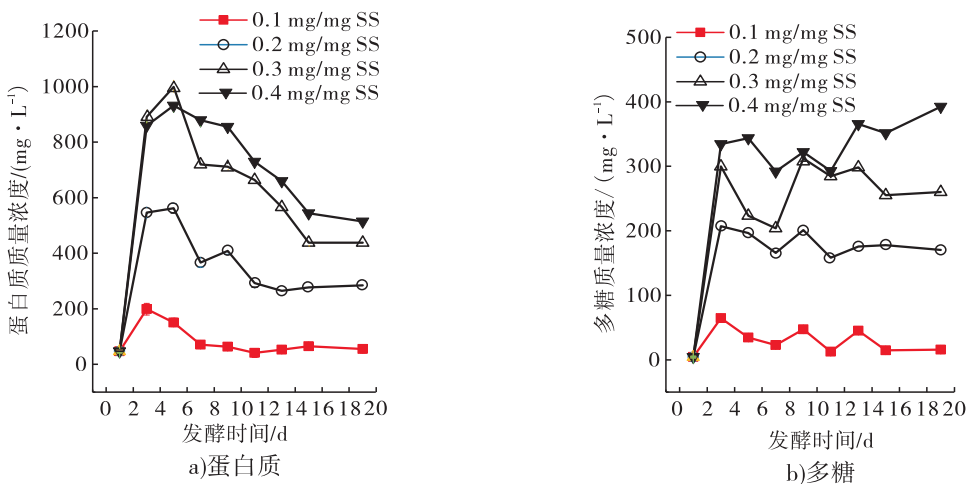


图 2 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵过程中蛋白质和多糖质量浓度的影响

Fig. 2 The effect of CaO<sub>2</sub> with different addition amounts on the mass concentration of protein and polysaccharide in the waste activated sludge anaerobic fermentation process

这是因为该发酵系统中含有丰富的蛋白质和多糖等物质,且系统 pH 值为 9 ~ 10 (见图 1a)), 该环境下较适合产酸菌的生长,但严重抑制产甲烷菌活性. 在 0.3 mg/mg SS 发酵系统中,随着发酵时间的延长,SCFAs 产量升高,其原因可能是,在发酵后期,系统内的 pH 值下降,产酸菌活性得到恢复,能够有效利用系统内丰富的蛋白质和多糖生成 SCFAs. 而发酵后期 0.2 mg/mg SS 发酵系统中 SCFAs 产量迅速降低是因为系统中 pH 值迅速下降至 7 ~ 8,导致系统中产甲烷菌活性恢复,SCFAs 被大量消耗. 由图 3b)可以看出,在 0.4 mg/mg SS 发酵系统中,蛋白质和多糖的质量浓度较其他发酵系统均升高,但当发酵系统中 pH 值增至 12,不仅抑制产甲烷菌生长,同时也影响产酸菌的活性. 邢立群等<sup>[21]</sup>也发现,发酵系统经强碱(pH = 10 ~ 12)处理后,产酸菌活性受到严重抑制,SCFAs 产量显著下降. 而且 CaO<sub>2</sub> 发酵系统中较高的 ·OH, ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 等强氧化物质对系统内微生物的生长存在抑制作用,所以, CaO<sub>2</sub> 添加量过高时不利于剩余污泥厌氧发酵产酸.

表 2 为不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌

氧发酵系统中酸成分的影响. 由表 2 可以看出,发酵系统中 SCFAs 乙酸占比差别较显著,随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加呈先增大后降低的趋势,分别为 52.85%, 66.96%, 63.94% 和 48.72%. 高于作者前期研究的 Ca(OH)<sub>2</sub> 污泥厌氧发酵系统中的乙酸占比(62.27%)<sup>[3]</sup>,但是低于单过硫酸钾氢钾污泥厌氧发酵系统中的乙酸占比(75.55%)<sup>[19-22]</sup>. 可见, CaO<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub> 与单过硫酸氢钾在污泥发酵过程中的化学性质相似,其水解过程中释放的高氧化物质会强化乙酸的积累. SCFAs 中的丙酸占比随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加而降低,分别为 7.41%, 5.09%, 5.18% 和 3.63%, 均低于 Ca(OH)<sub>2</sub> 型污泥发酵系统的丙酸占比(10% ~ 15%)<sup>[3]</sup> 和单过硫酸氢钾发酵系统的丙酸占比(3.42% ~ 11.29%)<sup>[22]</sup>. 这说明 CaO<sub>2</sub> 能够提高微生物对丙酸的利用率,进而提高发酵系统中乙酸占比. 此外,系统中可能含有大量的 *Erysipelothrix*, *Tissierella*, *Peptostreptococcaceae incertae sedis* 等产乙酸微生物<sup>[3]</sup>. 在系统中, SCFAs 中正丁酸和正戊酸的占比与丙酸相似,均随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增大而降低; 异丁酸的占比随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加先降低后升

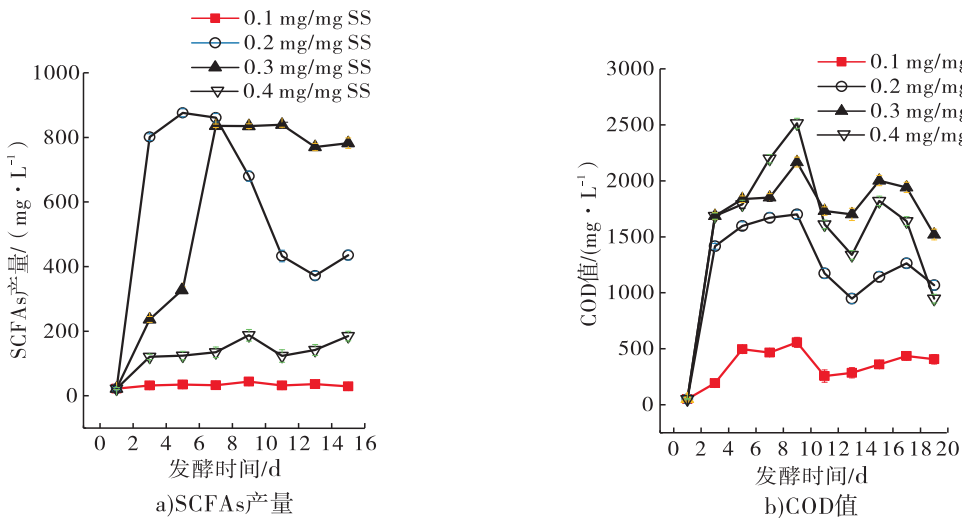


图 3 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对污泥厌氧发酵过程中污泥酸化的影响

Fig. 3 The effect of CaO<sub>2</sub> with different addition amounts on sludge acidification in the waste activated sludge anaerobic fermentation process

表2 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵系统中酸成分的影响

Table 2 Effect of CaO<sub>2</sub> with different additions on acid components in the waste activated sludge anaerobic fermentation system

CaO <sub>2</sub> 添加量/ (mg · (mg SS) <sup>-1</sup> )	酸成分占比/%					
	乙酸	丙酸	异丁酸	正丁酸	异戊酸	正戊酸
0.1	52.85	7.42	14.83	11.12	5.08	8.70
0.2	66.96	5.10	9.19	2.29	16.12	0.63
0.3	63.94	5.18	8.91	3.89	16.98	1.09
0.4	48.72	3.64	32.49	4.27	5.15	5.73

高;异戊酸的占比随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加先增加后降低. 这是因为,正丁酸和正戊酸属于直链酸,更容易被微生物利用,故二者在系统中的占比低于异丁酸和异戊酸.

### 2.3 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 释放量的影响

图4为不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵系统中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 释放量的影响.

由图4可以看出, CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥发酵系统中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 的释放量具有显著的影响. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 释放量随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的

增加先增大后降低,反应末期各系统中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 释放量分别为 211. 91 mg/L (0.1 mg/mg SS), 344. 26 mg/L (0.2 mg/mg SS), 294. 48 mg/L (0.3 mg/mg SS), 190. 78 mg/L (0.4 mg/mg SS), 在添加量较高的 CaO<sub>2</sub> 污泥厌氧发酵系统中, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 的释放量最低. 然而 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 释放量随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加而降低,反应末期各系统中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 释放量分别为 13. 37 mg/L (0.1 mg/mg SS), 11. 71 mg/L (0.2 mg/mg SS), 5. 08 mg/L (0.3 mg/mg SS), 1. 60 mg/L (0.4 mg/mg SS). 这与 SCFAs 产量变化趋势基本相同,高添加量的 CaO<sub>2</sub> 虽然强化了污泥水解,但是抑制了污泥产酸,影响了有机质中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 的释放. 同时 CaO<sub>2</sub> 发酵系统中含有大量的 Ca<sup>2+</sup> 和 OH<sup>-</sup>, 能够形成 Ca(NH<sub>4</sub>)PO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 沉淀,因此系统中的 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 释放量随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加而降低.

### 2.4 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵系统中生物酶活性的影响

图5为 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵系统中生物酶活性的影响.

由图5a)和b)可以看出,蛋白酶和α - 葡

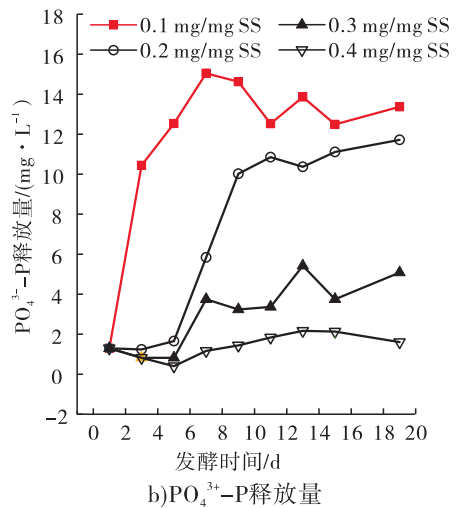
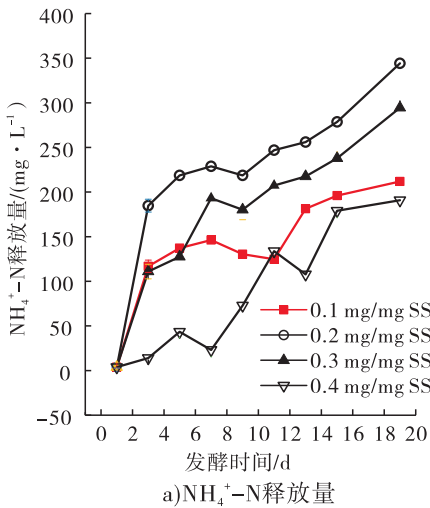


图4 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵系统中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P 释放量的影响

Fig. 4 The effect of CaO<sub>2</sub> with different addition amounts on the release amounts of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> -N and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> -P in the waste activated sludge anaerobic fermentation system

葡萄糖苷酶的活性随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加呈先升高后降低趋势,其中在 0.2 mg/mg SS 发酵系统中二者的活性最大,分别为 69.84 EU/mg VSS(该单位指每 mg 可挥发性污泥中生物酶的活性,下同)和 0.005 1 EU/mg VSS,是 0.1 mg/mg SS 发酵系统(24.81 EU/mg VSS 和 0.001 2 EU/mg VSS)中的 2.81 倍和 4.25 倍.虽然在 0.4 mg/mg SS 发酵系统中,蛋白酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性均有所降低,但是仍高于 0.1 mg/mg SS 系统,这说明适当添加 CaO<sub>2</sub> 能够提高蛋白酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性.同时发现,蛋白酶活性显著高于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,这与其在微生物细胞内的位置有关,胞外聚合物(EPS)中含有约 23% 的蛋白酶和仅为 5% 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,而大部分水解酶位于球体

层<sup>[23]</sup>,当底物和酶同时向外转移时,蛋白酶的转移快于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,从而使溶液中的蛋白酶活性远高于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性.

由图 5c)和 d)可以看出,ALP 和 ACP 的活性均随着 CaO<sub>2</sub> 添加量的增加而降低,在 0.1 mg/mg SS 系统中,二者的活性最高,分别为 0.11 EU/mg VSS,0.20 EU/mg VSS;在 0.4 mg/mg SS 系统中,二者的活性最低,分别为 0.07 EU/mg VSS 和 0.06 EU/mg VSS.这说明碱性且含有氧化物质的发酵环境严重抑制了 ALP 和 ACP 的活性.同时发现,ALP 和 ACP 的活性变化趋势与 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 释放量变化不相符,可能因为有机磷分布在活体微生物和碎屑中,如核苷酸-p,脂质-p,核酸-p,蛋白质-p,其分解需要不同种类的磷酸酶作用<sup>[24]</sup>.

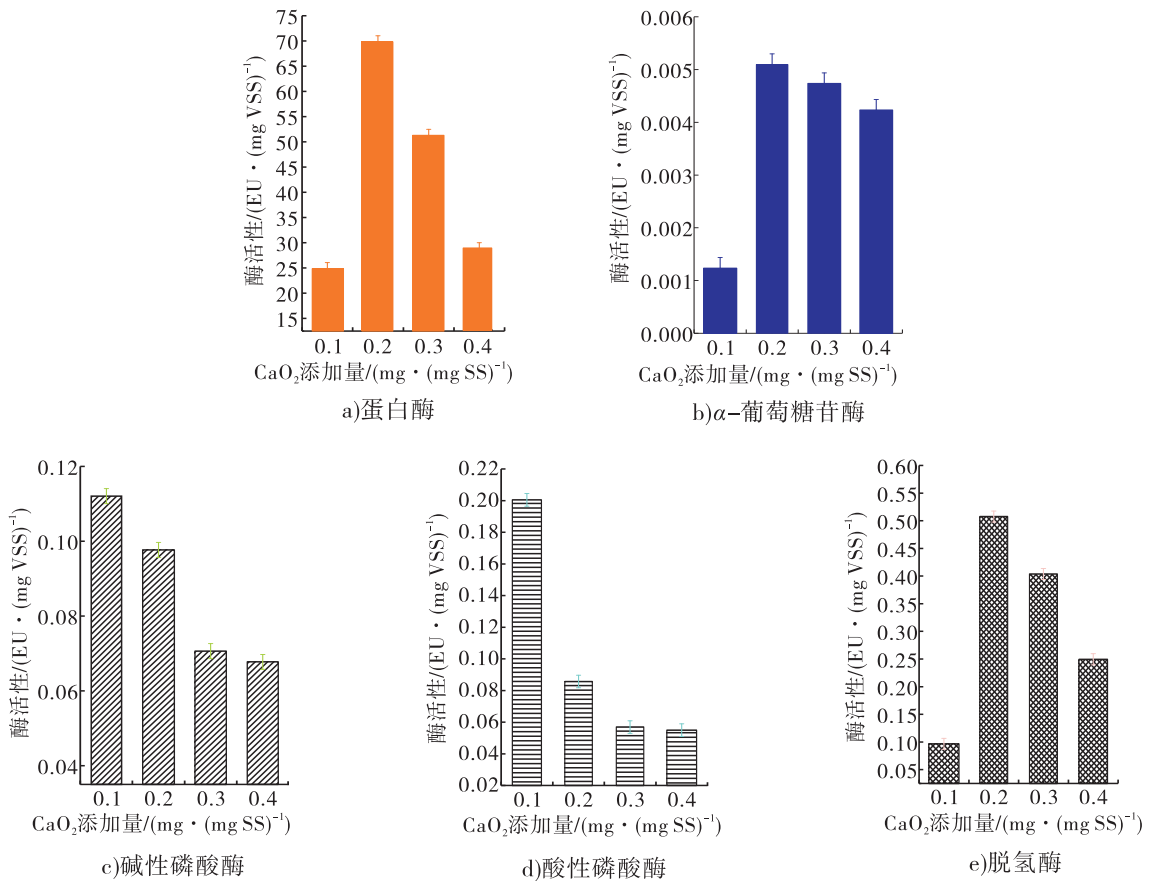


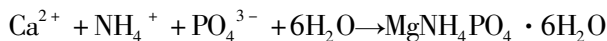
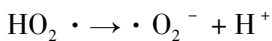
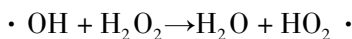
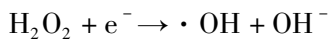
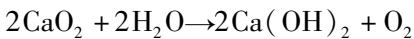
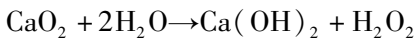
图 5 不同添加量的 CaO<sub>2</sub> 对剩余污泥厌氧发酵系统中生物酶活性的影响

Fig. 5 The effect of CaO<sub>2</sub> with different addition amounts on biological enzyme activity of the waste activated sludge anaerobic fermentation system

由图 5e) 可以看出, DH 的活性随着  $\text{CaO}_2$  添加量的增加呈先升高后降低趋势, 其活性分别为 0.01 EU/mg VSS, 0.51 EU/mg VSS, 0.40 EU/mg VSS 和 0.25 EU/mg VSS. DH 活性较高时, 发酵系统中丙酮酸会快速降解生成 SCFAs, 但是  $\text{CaO}_2$  释放的活性物质如  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  和  $\cdot\text{O}_2^-$  不仅破坏生物膜, 同时也使 DH 活性受损, 所以高添加量的  $\text{CaO}_2$  会使 DH 活性降低, 阻碍丙酮酸的快速转化.

### 2.5 $\text{CaO}_2$ 在污泥发酵系统中的作用机理分析

作为二价盐,  $\text{CaO}_2$  不仅具有较强的氧化能力, 水解后还能产生  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续水解成为  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  和  $\cdot\text{O}_2^-$ , 其反应方程式如下:



其中,  $\text{OH}^-$  的存在使发酵环境成为碱性, 较高的 pH 值不仅破坏微生物的细胞壁, 加速污泥溶解, 同时会抑制产甲烷菌的活性. 而且  $\text{CaO}_2$  溶于水后生成的  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  和  $\cdot\text{O}_2^-$  具有较高的氧化还原电位, 分别为 2.4 V ( $\cdot\text{OH}$ ), 1.77 V ( $\text{HO}_2\cdot$ ), 2.07 V ( $\text{O}_2^-$ ), 这些氧化物质破坏微生物细胞膜的通透性屏障, 使细胞内容物流失, 损伤 RNA, 干扰微生物新生代谢活动, 最后导致微生物死亡溶解. 高活性物质会氧化蛋白质, 使系统中多糖占比升高, 从而使微生物更加趋向利用多糖生成 SCFAs, 更易生成乙酸. 适当地添加  $\text{CaO}_2$  及其衍生物, 能够提高水解酶及其脱氢酶活性, 促进发酵系统中的产酸活动. 发酵系统的  $\text{Ca}^{2+}$  与  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  在碱性条件下合成鸟粪石沉淀, 可降低发酵系统中的氮负荷, 减少发酵液中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和

$\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  的释放量, 为发酵液的再利用提供保障.

### 3 结论

本文以  $\text{CaO}_2$  作为城市污水处理中剩余污泥处理药剂, 研究了不同添加量的  $\text{CaO}_2$  对剩余污泥厌氧发酵性能的影响, 并探索了  $\text{CaO}_2$  在剩余污泥厌氧发酵过程中的作用机理, 得到了如下结论:

1)  $\text{CaO}_2$  能够显著促进厌氧发酵系统中污泥的溶解和分解, 提高剩余污泥厌氧发酵水解性能, SCOD 值、DCCOD 值、可溶性蛋白质和多糖质量浓度均随着  $\text{CaO}_2$  添加量的增加而增大.

2) 适当添加  $\text{CaO}_2$  能够提高剩余污泥厌氧发酵产酸能力, 优化产酸类型, 提高乙酸占比, 最高可达 63.94%, 降低丙酸占比, 最低可达 3.63%. 0.2 mg/mg SS 和 0.3 mg/mg SS 发酵系统中最佳产酸时间分别为第 5 d 和第 9 d, 产酸过程具有延迟性.

3)  $\text{CaO}_2$  对剩余污泥发酵系统中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  的释放量具有显著的影响,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的释放量随着  $\text{CaO}_2$  添加量的增加先增大后降低,  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  的释放量随着  $\text{CaO}_2$  添加量的增加而降低.

4) 适当添加  $\text{CaO}_2$  能够促进剩余污泥发酵系统中蛋白酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和脱氢酶的活性, 其最佳添加量为 0.2 mg/mg SS, 但  $\text{CaO}_2$  中的氧化物质严重抑制碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的活性.

5)  $\text{CaO}_2$  溶于水后生成  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  等强氧化物质, 能够有效破坏微生物细胞壁, 强化污泥水解,  $\text{OH}^-$  形成的碱性环境抑制产甲烷菌活性, 降低 SCFAs 的消耗,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  与发酵系统中的  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$  形成鸟粪石沉淀, 有利于氮和磷物质的有效回收.

利用  $\text{CaO}_2$  溶于水后产生的大量活性物质



和 OH<sup>-</sup>, 可调控剩余污泥发酵系统中的 pH 值, 改变微生物的生存环境, 从而促进剩余污泥水解酸化性能, 并抑制产甲烷菌的活性, 使 SCFAs 得到优化积累和富集, 且从生物酶角度深入探讨发酵机理, 为后续进一步提高剩余污泥发酵产酸性能提供理论基础。

### 参考文献:

- [1] JIN B, WANG S, XING L, et al. The effect of salinity on waste activated sludge alkaline fermentation and kinetic analysis [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 43: 80.
- [2] CHEN Y, RANDALL A A, MCCUE T. The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid [J]. *Water Research*, 2004, 38: 27.
- [3] JIN B, WANG S, XING L, et al. Long term effect of alkali types on waste activated sludge hydrolytic acidification and microbial community at low temperature [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 587.
- [4] 刘常青, 王玉兰, 林鸿, 等. 低有机质污泥投加药剂联合低温热水解及后续厌氧发酵研究 [J]. *化工学报*, 2017, 68 (4): 1608.
- [5] LI Y, WANG J, ZHANG A, et al. Enhancing the quantity and quality of short-chain fatty acids production from waste activated sludge using CaO<sub>2</sub> as an additive [J]. *Water Research*, 2015, 83: 84.
- [6] 白润英, 陈湛, 张伟军, 等. 过氧化钙预处理对活性污泥脱水性能的影响机制 [J]. *环境科学*, 2017, 38 (3): 1151.
- [7] 帅昆. 过氧化钙联合游离氨预处理技术提高污泥厌氧发酵产短链脂肪酸的研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2018.
- [8] GREENBERG A E, CIESCREIL S, EATON A D. Standard methods for the examination of water and wastewater [J]. *Am J Public Health Nations Health*, 1966, 56 (3): 387.
- [9] GOEL R, MINO T, SATOH H, et al. Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor [J]. *Water Research*, 1998 (32): 2081.
- [10] YUAN H, CHEN Y, ZHANG H, et al. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40 (6): 2025.
- [11] BUNTHOF C, VAN S, MEIJER W, et al. Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2001, 67 (9): 4264.
- [12] LEGRAND C, BOUR J M, JACOB C, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker [J]. *Journal of Biotechnology*, 1992, 25 (3): 231.
- [13] BOUGRIER C, CARRERE H, DELGENES J. Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2005, 106 (2): 163.
- [14] MÜLLER J, PELLETIER L. Désintégration mécanique des boues activées [J]. *Leau, Industrie Les Nuisances*, 1998, 217: 61.
- [15] LI X, PENG Y, REN N, et al. Effect of temperature on short chain fatty acids (SCFAs) accumulation and microbiological transformation in sludge alkaline fermentation with Ca (OH)<sub>2</sub> adjustment [J]. *Water Research*, 2014, 61: 34.
- [16] NADDEO V, BELGIORNO V, LANDI M, et al. Effect of sonolysis on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability [J]. *Desalination*, 2009, 249 (2): 762.



引用格式:过金超,张飞航,兰东军,等. 基于 GWM 的多 AGV 路径冲突处理算法[J]. 轻工学报,2019,34(4):74-80.

中图分类号:TP242 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.011

文章编号:2096-1553(2019)04-0074-07

# 基于 GWM 的多 AGV 路径冲突处理算法

## Path conflict processing algorithm based on GWM for AGVs

过金超<sup>1</sup>, 张飞航<sup>1</sup>, 兰东军<sup>2</sup>, 曹宏<sup>2</sup>, 王普杰<sup>1</sup>

GUO Jinchao<sup>1</sup>, ZHANG Feihang<sup>1</sup>, LAN Dongjun<sup>2</sup>, CAO Hong<sup>2</sup>, WANG Pujie<sup>1</sup>

1. 郑州轻工业大学 电气信息工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 河南森源电气股份有限公司, 河南 长葛 450034

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

2. He'nan Senyuan Electric Co., Ltd., Changge 450034, China

**摘要:**针对 AGV 现有的路径规划方法无法解决对发任务、死锁问题等,提出了一种新的 AGV 路径冲突处理方法 GWM,以解决更为复杂的路径冲突问题.但 GWM 在部分冲突场景中的处理效率不高,在此基础上又提出了基于 GWM 的路径冲突处理算法 OCWG.该算法融合了等待法、重新规划法和 GWM 3 种路径处理方法,在 AGV 位置刷新的时候,检测其在安全距离内是否会与其他 AGV 发生冲突,并且能根据实时的系统状态选择合适的路径冲突处理方法,使其中一辆 AGV 行驶到空闲点进行让路.测试结果表明,OCWG 算法的总花费时间较少,也能满足包括重复任务和对发任务在内的所有需求,而且不会出现触发碰撞警告和死锁问题.

### 关键词:

自动导引车; 路径冲突处理; GWM; OCWG 算法

### Key words:

AGV; path conflict processing; GWM; OCWG algorithm

收稿日期:2019-02-27

基金项目:国家自然科学基金项目(51507157)

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:** In view of the fact that the existing path planning methods of AGV are unable to solve the problem of dispatching task and deadlock, a new path conflict processing method named GWM was proposed to solve more complex path conflict problems. However, GWM was not efficient in some conflict scenarios. On this basis, a GWM-based path conflict processing algorithm named OCWG was proposed. This algorithm combined three path processing methods: waiting method, rerouting method and GWM. When the AGV position was refreshed, it detected whether it would conflict with other AGVs in the safe distance, and chose an appropriate path conflict processing method according to the real-time system state. The test results showed that OCWG algorithm took less time and satisfied all the requirements including repetitive tasks and dispatching tasks, without triggering collision warning and deadlock problems.

## 0 引言

自动导引车 (AGV) 是指安装有自动导引系统、可沿着导引线或通过视觉导航等方式运动、具有搬运货物等功能、无人驾驶的运输小车<sup>[1-2]</sup>。近年来,AGV 在汽车工业和港口运输等领域实现跨越式发展,尤其是在电商物流行业给人们带来了方便与快捷<sup>[3-4]</sup>。由多个 AGV 组成的多 AGV 系统可以轻松地在路径足够丰富的地图上进行无冲突路径运动。然而在大多数制造车间,受到空间和场地的影响,实际路径不能像快递业那样自由铺设,因此车间环境对多 AGV 系统路径规划是一个挑战<sup>[5-6]</sup>。

在企业物流自动化生产线上,单个 AGV 的路径规划是最短路径搜索的过程,然而如果多个 AGV 同时运行在一个地图上,仍采用最短路径搜索,势必会造成路径冲突和道路阻塞<sup>[7-8]</sup>。很多学者都倾向于在路径规划阶段把路径冲突的问题考虑进去,提前预知并通过等待法解决路径冲突问题,例如时间窗法<sup>[9]</sup>、两阶段规划法<sup>[10]</sup>等。但在实际运行中,AGV 不可避免地会发生各种各样的问题,例如速度估计误差、机械故障等<sup>[11-12]</sup>。因此,在多 AGV 系统中,对路径冲突处理算法的研究是必不可少的。传统的路径冲突处理方法只有等待法和重新规划法,这两种方法针对路径足够丰富的地图可以解决多数冲突问题,但应用于车间环境下的地图有可能出现对发任务、死锁等问题。

本文拟提出基于 GWM 的路径冲突处理算法 OCWG (obstacle, conflict, waiting, giving-way),以解决车间环境下多 AGV 系统路径冲突问题,并通过实践应用来验证算法的稳定性与鲁棒性,以满足企业物流自动化的要求。

## 1 问题阐述

### 1.1 车间环境下的地图模型

车间环境下的多 AGV 路径规划之所以难度较大,主要是因为其地图模型的独特性。地图模型可分为闭环地图和开环地图。闭环地图是指地图上的每个节点至少连接两条线路,因此 AGV 不容易出现拥堵问题。网格图是典型的闭环地图(见图 1),具有丰富的路径资源,在电商物流行业被大量使用。开环地图是指不能构成闭环的地图,地图中存在许多只连接了一条线路的节点,常见的车间地图(见图 2)不能构成闭环地图或仅包含少数闭环线路,通常只有一条或两条主干道,在这样的地图上极易发生路径冲突和死锁问题。

### 1.2 路径冲突类型

多 AGV 系统中路径冲突问题可分为 6 种类型,即追及冲突、对向冲突、路口冲突、路径障碍、终点障碍和死锁问题,其示意图如图 3—图 8 所示。这 6 种类型又可归结为冲突型问题、障碍型问题和死锁问题 3 类。

追及冲突是指两辆 AGV 以相同的方向行驶,其中落后的 AGV 因为某种原因会以较快的

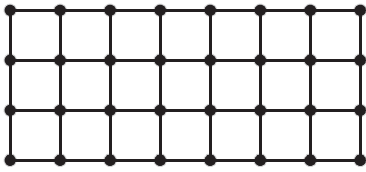


图1 闭环地图  
Fig. 1 The grid map

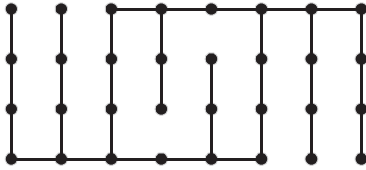


图2 车间地图  
Fig. 2 The workshop map

速度行驶,可能会追上靠前的 AGV 并发生碰撞事故,其速度差可能是由于载货重量不同而引起的. 这种情形可通过等待法解决,即后车在前一节点停车,等待前车通过后再行驶.

对向冲突是指两辆 AGV 以相反的方向行驶,若不采取相应的措施,会在一定时间内发生碰撞事故. 造成碰撞事故的原因往往是在路径规划阶段没有解决好两辆 AGV 对相同路径资源争夺的问题. 这种情形一旦发生,如果没有备用路径,会造成死锁问题.

路口冲突是指两辆 AGV 在竞争路口资源时发生冲突,其原因依然是路径规划阶段没有解决资源竞争问题. 出现这种情况,如果双方在路口节点之后的路径不是对方所在的线路,则可通过等待法解决;若双方恰好处在对方的线路上且没有备用路径可取时,会造成死锁问题.

路径障碍是指有其他 AGV 停靠在运行中的 AGV 的路径上,阻碍了 AGV 的前进. 该障碍 AGV 通常是在执行任务或发生机械故障,无法主动对运行 AGV 进行避让,这种情形下如果没有备用路径可取,只能通过等待法解决.

终点障碍是指有其他 AGV 停靠在运行 AGV 的目标节点上,阻止了运行 AGV 进入目

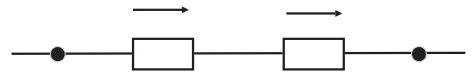


图3 追及冲突

Fig. 3 The catching-up conflict



图4 对向冲突

Fig. 4 The facing conflict

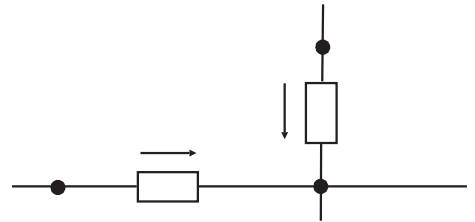


图5 路口冲突

Fig. 5 The crossing conflict

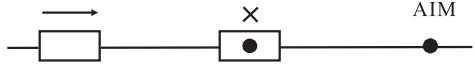


图6 路径障碍

Fig. 6 The path obstacle



图7 终点障碍

Fig. 7 The station obstacle

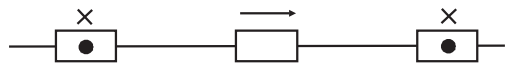


图8 死锁问题

Fig. 8 Deadlock

标节点,其原因可能是重复任务的执行时间没有错开. 这种情形只能采用等待法,等待障碍 AGV 执行完任务离开目标节点.

死锁问题是指多个 AGV 互相阻碍了对方的路径,卡死在一个区域中,无法通过常规方法解决. 这种情况常常是在上述其他问题没有解

决时产生的,也是在路径规划阶段就需要避免的问题.

## 2 GWM 方法的工作流程

车间工作中常见的是重复任务和对发任务.重复任务通常有多个 AGV 在同一路径上不断往复行驶,对发任务类似于两辆 AGV 互换位置的过程.虽然等待法和重新规划法在大多数情况下都能很好地解决此类路径冲突问题,但是在车间环境下仍然存在一些无法克服的困难.GWM 的灵感来源于驾驶员的良好习惯:当两辆汽车在一个狭窄的十字路口相遇时,其中一辆车会先退后到相对宽裕的场地给另外一辆车让行,等到可以通过时再继续行驶.GWM 是对这一传统方法的补充,可使路径冲突处理方法更加完善.GWM 方法的工作流程如图 9 所示.

GWM 通常使用优先级比较的方法来确定哪辆 AGV 让路,或者通过比较两辆 AGV 的让路成本来确定哪辆 AGV 让路.让路时,GWM 根

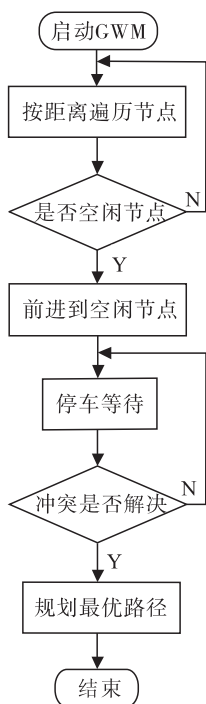


图 9 GWM 流程图

Fig. 9 GWM flow chart

据不同的情况选择合适的自由节点.广义自由节点指所有 AGV 都不会通过或占用的节点,狭义自由节点指与之冲突的 AGV 不会通过或占用的节点;选择广义自由节点不会引起连锁反应,选择狭义自由节点则效率会更高.当让路 AGV 到达自由节点时,冲突 AGV 沿着初始路径行驶,当冲突 AGV 到达合适的节点时,让路 AGV 重新搜索最优路径继续前进.由此,冲突问题得以解决.与传统的等待法和重新规划法相比,GWM 方法略显复杂,但可有效解决传统方法无法解决的难题.

图 10 模拟了 GWM 处理路径冲突的过程,其中  $N_2$  分别连接到  $N_1, N_3$  和  $N_4$ . 1<sup>#</sup>AGV 的初始节点是  $N_2$ ,目标节点是  $N_1$ ,理想路径是  $N_2-N_1$ .同时 2<sup>#</sup>AGV 的初始节点是  $N_1$ ,目标节点是  $N_4$ ,理想路径是  $N_1-N_2-N_4$ .此时,2<sup>#</sup>AGV 占据着 1<sup>#</sup>AGV 的目标节点,同时 1<sup>#</sup>AGV 阻碍了 2<sup>#</sup>AGV 的路径,所以 1<sup>#</sup>AGV 采用 GWM,先行驶到一个不在 2<sup>#</sup>AGV 路径的空闲节点,即  $N_3$ ,然后 2<sup>#</sup>AGV 沿着理想路径行驶,当 2<sup>#</sup>AGV 到达  $N_4$  并不再占据  $N_2$  时,1<sup>#</sup>AGV 再次搜索最佳路径,即  $N_3-N_2-N_1$ .

## 3 OCWG 算法设计与实现

GWM 理论上可以很好地解决多 AGV 系统

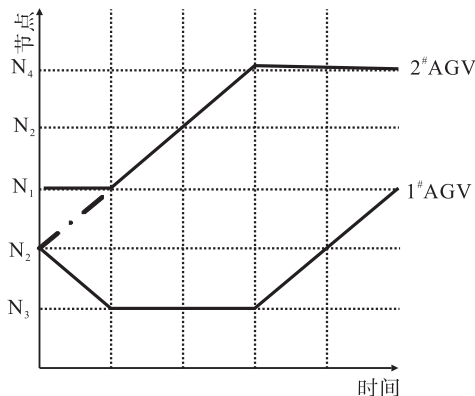


图 10 GWM 方法处理冲突

Fig. 10 Using GWM to handle conflicts

的路径冲突问题,而在实际应用中,其在部分冲突场景的处理效率不如等待法和重新规划法.因此,笔者基于GWM提出了OCWG算法.该算法融合了等待法、重新规划法和GWM 3种路径处理方法,可以基于不同情形采取相应的方法,从而解决多AGV系统中的路径冲突问题,防止碰撞事故和死锁问题的发生.

OCWG算法包括两个模块,即检测模块和处理模块.检测模块负责检测AGV是否会在安全距离内与其他AGV发生冲突,当检测到冲突时,处理模块负责不同情况的冲突处理工作.基于GWM的OCWG算法可以保证在任何情况下都能很好地处理冲突而不会发生碰撞或死锁.

首先,定义4种AGV的工作模式,即空闲模式(IM)、运行模式(RM)、等待模式(WM)和GWM模式(GM).IM表示AGV没有任务安排且在节点处停靠;RM表示AGV具有任务目标且在规划路线上正常运行;WM表示AGV具有任务目标但需要在当前节点停靠以等待解决冲突问题;GM表示AGV正在运行到空闲节点以让位给其他AGV.

所有在拓扑地图上运行的AGV遇到的冲突只有两种情形,即障碍和冲突.

障碍是指在AGV运行的路线上有另一辆AGV停放或运行,分为固定障碍和移动障碍.考虑到安全距离的限制,无论双方处于何种模式,运行AGV必须先停止前进再进行后续处理.固定障碍是指处于IM或WM的障碍AGV停靠在运行AGV的规划路线上,在障碍AGV完成其任务之前,控制系统无权移动该障碍AGV,因此,当前AGV将重新规划路线并避开障碍AGV.移动障碍是指处于RM或GM的障碍AGV行驶在运行AGV的规划路线上,对于处于RM的障碍AGV,运行AGV需要通过对比优先级来判断接下来的处理工作.若运行AGV具有更高的优先级,则切换到WM并等待障碍

AGV通过,否则进行让路判断.如果运行AGV在障碍AGV的规划路线上,则采用GWM,否则切换到WM并等待障碍AGV的通过.对于处于GM的障碍AGV,如果运行AGV处于GM模式,则先进行优先级比较,如果运行AGV处于RM,则以优先级低的结果进行后续操作.不同模式的优先级关系为 $IM > WM > GM > RM$ .

冲突是指多个AGV的规划路线具有重叠部分,并且可能在未来的时间内发生追及冲突、对向冲突或路口冲突.冲突分为准障碍和未来冲突.准障碍是指冲突AGV的下一个节点在运行AGV的规划路线上,此时运行AGV采用与遇到移动障碍时相同的处理方法.未来冲突是指运行AGV安全距离内的规划路线节点与冲突AGV的规划路线节点有重叠部分,运行AGV需要与冲突AGV进行优先级比较,如果运行AGV的优先级更高,则继续行驶,否则判断是否需要为冲突AGV让路,如果运行AGV正处于冲突AGV的规划路线上,则采用GWM,否则切换到WM并等待冲突AGV的通过.处理模块中的障碍处理流程如图11所示,冲突处理流程如图12所示.

## 4 实践验证与应用

本文的实践应用平台是SIMATIC WinCC,它是西门子经典的过程监控系统,可以在工业领域提供完整的监控和数据采集功能,并且可以作为上位机控制多AGV系统.实践应用在河南森源电气股份有限公司的车间进行.实验所用AGV是由河南森源自主研发的双向重载AGV,其控制系统展示的车间地图及控制按钮如图13所示.车间地图是一个不规则的拓扑开环地图,这为基于GWM的OCWG算法提供了充分的测试环境.

在相同任务下,时间窗法和OCWG算法完成任务所需时间的对比结果如图14所示,纵坐

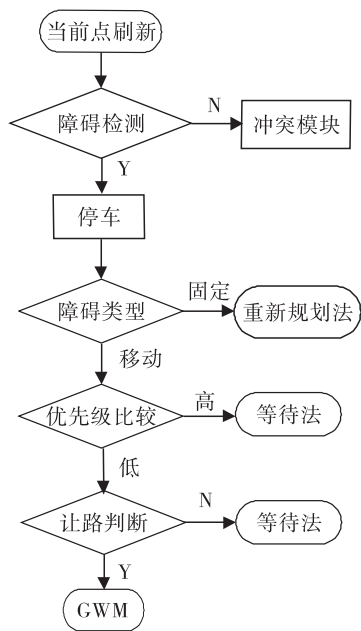


图 11 障碍处理流程图

Fig. 11 Obstacle processing flow chart

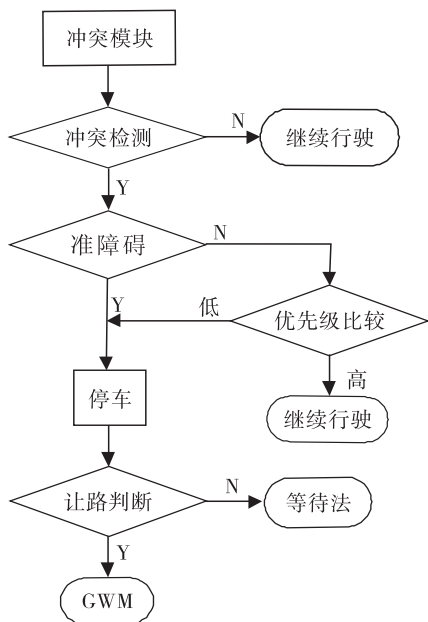


图 12 冲突处理流程图

Fig. 12 Conflict processing flow chart

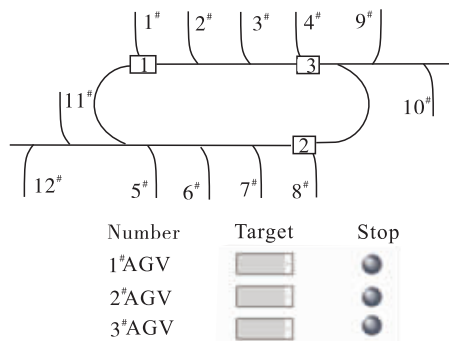


图 13 AGV 控制系统

Fig. 13 The AGV control system

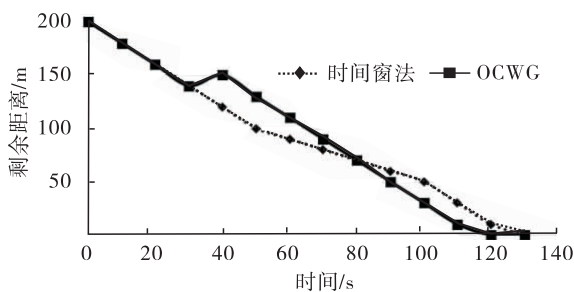


图 14 效率对比图

Fig. 14 Efficiency comparison chart

升的过程,这一过程就是在执行 GWM,系统提前预测到有冲突行为,进行了让路操作.虽然总距离有上升的过程,但 OCWG 算法为后续的 AGV 运行提供了更加顺畅的路径,所以 OCWG 算法的总花费时间比时间窗法少.另外,当任务复杂度逐渐升高时,仅仅依靠等待法的时间窗法显然不能完成任务,而基于 GWM 的 OCWG 算法依然可以确保完成任务.

在基于车间实际需求的测试过程中,OCWG 算法可以满足包括重复任务和对发任务在内的所有需求,并且从未出现碰撞警告和死锁问题,从而验证了 OCWG 算法的可行性和稳定性.

## 5 结语

本文提出了一种新的 AGV 路径冲突处理

标表示所有 AGV 到达各自目标节点的距离之和,横坐标表示花费的时间.由图 14 可以看出,时间窗法在任务中使用了等待法,其中一辆 AGV 处于停车状态,导致任务时间延长.而在 OCWG 算法执行中,发现途中有总距离不降反

方法 GWM, 与传统的等待法和重新规划法不同, GWM 可以解决更为复杂的路径冲突问题, 但对部分冲突场景的处理效率不高. 在此基础上提出了一种新的路径冲突处理算法 OCWG, 与合适的路径搜索算法配合, 可高效率地解决各种路径规划和路径冲突问题. 实际测试验证了 OCWG 算法的鲁棒性和稳定性. 后续将继续深入研究该算法可支持的 AGV 数量与地图规模的关系, 从而进一步优化算法性能.

### 参考文献:

- [1] LE-ANH T, DE KOSTER M B M. A review of design and control of automated guided vehicle systems [J]. *European Journal of Operational Research*, 2006, 171(1): 1.
- [2] 过金超, 赵海洋, 蒋正轲, 等. 双向重载智能自主导航车系统设计 [J]. *轻工学报*, 2017, 32(2): 97.
- [3] ROODBERGEN K J, VIS I F A. A survey of literature on automated storage and retrieval systems [J]. *European Journal of Operational Research*, 2009, 194(2): 343.
- [4] 过金超, 刘征, 崔光照. 基于人工免疫网络理论的移动机器人路径规划 [J]. *郑州轻工业学院学报(自然科学版)*, 2012, 27(4): 1.
- [5] FANTI M P, MANGINI A M, PEDRONCELLI G, et al. A decentralized control strategy for the coordination of AGV systems [J]. *Control Engineering Practice*, 2018, 70: 86.
- [6] SHI Y, WANG X, SUN X, et al. A two-phase strategy with micro genetic algorithm for scheduling Multiple AGVs [C] // 2016 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics (SMC). Piscataway: IEEE, 2016: 003101.
- [7] 高瑜, 过金超, 崔光照. 一种改进的多机器人路径规划自适应人工势场法 [J]. *郑州轻工业学院学报(自然科学版)*, 2013, 28(6): 77.
- [8] GHASEMZADEH H, BEHRANGI E, AZGOMI M A. Conflict-free scheduling and routing of automated guided vehicles in mesh topologies [J]. *Robotics and Autonomous Systems*, 2009, 57(6/7): 738.
- [9] 刘国栋, 曲道奎, 张雷. 多 AGV 调度系统中的两阶段动态路径规划 [J]. *机器人*, 2005, 27(3): 210.
- [10] SMOLIC-ROCAK N, BOGDAN S, KOVACIC Z, et al. Time windows based dynamic routing in multi-agvsystems [J]. *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering*, 2010, 7(1): 151.
- [11] WADHWA S, DUCQ Y, ALI M, et al. Performance analysis of a flexible manufacturing system [J]. *Global Journal of Flexible Systems Management*, 2009, 10(3): 23.
- [12] MIYAMOTO T, INOUE K. Local and random searches for dispatch and conflict-free routing problem of capacitated AGV systems [J]. *Computers & Industrial Engineering*, 2016, 91: 1.





引用格式:王震,陆金桂.改进的 ACO-BP 神经网络在锂离子电池 SOC 估算中的应用[J].轻工学报,2019,34(4):81-86.

中图分类号:TM912 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.012

文章编号:2096-1553(2019)04-0081-06

# 改进的 ACO-BP 神经网络 在锂离子电池 SOC 估算中的应用

## Application of improved ACO-BP neural network in estimation of SOC of lithium ion battery

王震,陆金桂

WANG Zhen, LU Jingui

南京工业大学 机械与动力工程学院,江苏 南京 211816

*School of Mechanical and Dynamic Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China*

**关键词:**  
电池 SOC; 蚁群优化;  
神经网络; 估算模型

**Key words:**  
SOC of battery;  
ant colony optimization;  
neural network;  
estimation model

**摘要:**针对单一 BP 神经网络模型估算锂离子电池 SOC 易陷入局部最优的问题,引入蚁群算法 ACO,并与 BP 神经网络模型相结合,提出了改进的 ACO-BP 神经网络以估算电池 SOC.采用惯性修正算法,在校正权阈值时加入惯性量,以改进 BP 神经网络;利用改进的全局信息素更新规则来改进 ACO 算法,以解决其易早熟收敛的问题.将改进的 ACO-BP 神经网络应用于 18650 锂离子动力电池 SOC 估算,结果表明,改进的 ACO-BP 神经网络估算 SOC 的相对误差差控制在  $\pm 1.957\%$  以内,MAPE 为 0.897%,精度和稳定性明显优于单一 BP 神经网络和 ACO-BP 神经网络.

收稿日期:2019-02-07

作者简介:王震(1992—),男,江苏省无锡市人,南京工业大学硕士研究生,主要研究方向为神经网络和智能优化算法.

通信作者:陆金桂(1966—),男,江苏省靖江市人,南京工业大学教授、博士生导师,主要研究方向为智能优化及智能 CAD.

**Abstract:** Aiming at the problem that SOC of lithium ion batteries is easy to fall into local optimum by single BP neural network, ant colony algorithm was introduced and combined with BP neural network model, and an improved ACO-BP neural network was proposed to estimate battery SOC. Inertia correction algorithm was used to add inertia amount when correcting the weight threshold to improve BP neural network. ACO algorithm was improved using the improved global pheromone updating rules to solve the problem of premature convergence. The improved ACO-BP neural network was applied to estimate SOC of 18650 lithium ion power battery. The results showed that the relative error of the improved ACO-BP neural network in estimating SOC could be controlled within  $\pm 1.957\%$  and the *MAPE* was  $0.897\%$ . The accuracy and stability of the improved ACO-BP neural network were obviously better than those of single BP neural network and ACO-BP neural network.

## 0 引言

动力电池 SOC(state of charge)的估算是动力电池管理系统的核心. 精确地估计动力电池 SOC,一方面可以合理地分配能量,提高动力电池的续航时间,另一方面可以避免动力电池的过充和过放,安全保护动力电池,延长动力电池的使用寿命. 如何精确地估算动力电池的 SOC 是业界当今研究的热点和难点.

目前国内外用于估算动力电池 SOC 的方法主要有安时积分法<sup>[1]</sup>、开路电压法<sup>[2]</sup>、扩展卡尔曼滤波法<sup>[3]</sup>、BP 神经网络法<sup>[4]</sup>等. 安时积分法虽然简单稳定,但是无法避免累计误差;开路电压法不能满足在线动态估算电池 SOC 的要求;扩展卡尔曼滤波法具有一阶泰勒精度<sup>[5]</sup>,但个别特征参数不稳定. BP 神经网络具有较强的自学习和非线性拟合能力,而 SOC 与测量所得的电压、电流、温度等值之间是强烈的非线性关系,所以 BP 神经网络能够较好地估算动力电池的 SOC. 张传伟等<sup>[6]</sup>提出了 BP 神经网络估算 SOC 的模型;黄妙华等<sup>[7]</sup>改进了 BP 神经网络的 SOC 估算,利用较优的训练函数和传递函数提高了 BP 神经网络估算 SOC 的普适性. 但单纯的 BP 神经网络法易陷入局部最优、收敛速度慢的情况. 王鸽等<sup>[8]</sup>将蚁群算法(ACO)与 BP 神经网络结合,加快了网络的收敛速度,在一定程度上避免了单纯 BP 算法易出现局部极小值的问题,但是标准 ACO 算法仍存在易陷入

局部最优的问题.

鉴于此,本文拟采用改进 ACO 算法优化改进后的 BP 神经网络,构建改进的 ACO-BP 神经网络,将其运用于锂电子电池的 SOC 估算,以期提高动力电池 SOC 的估算精度.

## 1 改进 ACO-BP 神经网络的构建

### 1.1 BP 神经网络的改进

BP 神经网络在训练过程中信号前向传播,误差逆向传播<sup>[9]</sup>,是通过模仿人类大脑神经网络构造、具有自适应和非线性拟合等能力的人工神经网络,其实质是通过不断修正神经网络各隐含层的各个权值和阈值,使误差达到设置的范围. 估算 SOC 的 BP 神经网络由 3 层网络结构构成,即输入层、隐含层和输出层.

为了提高 BP 神经网络估算的实时性和准确性,本文采用惯性校正算法来改进 BP 神经网络,即在校正权阈值时,在本次误差计算得到的校正量的基础上,以一定的惯性系数加上前一次权阈值的校正量,作为此次的校正量. 其计算公式为

$$\Delta W(n) = W + \alpha \Delta W(n-1) \quad (1)$$

其中, $\Delta W(n)$ 为本次最终校正量; $W$ 为误差计算得到的校正量; $\alpha \Delta W(n-1)$ 为惯性量, $\alpha$ 是取值为(0,1)的惯性系数, $\Delta W(n-1)$ 为前一次权阈值最终校正量.

相较于标准 BP 神经网络,经改进的 BP 神经网络其学习收敛速度和精度有较大的

提高<sup>[10]</sup>.

### 1.2 ACO 算法的改进

ACO 算法是一种仿生智能随机搜索算法. 蚂蚁的觅食行为是一种强化正确行为的正反馈,而优先选择信息素浓度较高的路径则是该正反馈的前提,所有待优化问题的解空间对应整个蚂蚁群体的所有路径,较优蚂蚁(即行进路径较短的蚂蚁)释放较多的信息素,一段时间以后,该路径上累积了较高浓度的信息素,在正反馈的作用下选择此条路径的蚂蚁数量相应增多,如此循环,最终在最佳路径上集中了数量最多的蚂蚁<sup>[11]</sup>,此时该最短路径即为最优解. 由于蚁群系统是通过信息素的累积将搜索行为集中到最优解附近来寻优的,当局部最优解附近已经有较高浓度信息素时,绝大多数蚂蚁会选择局部最优解的路径,在正反馈的作用下易造成早熟收敛的行为,导致最终得到的是局部最优解而不是全局最优解.

本文拟通过改进 ACO 算法的全局信息素更新规则来避免蚁群陷入局部最优解,改进的全局信息素更新规则是:通过增强蚁群目前最优解的信息素,削弱之前局部最优解信息素的方法,可以避免蚁群算法陷入局部最优解的问题,即为

$$\tau_{ij}(t+n) = (1-\rho) \times \tau_{ij}(t) + \Delta\tau_{ij} \quad (2)$$

$$\Delta\tau_{ij} = Q_k \times \frac{L_b - L_k}{L_b} \quad (3)$$

其中,  $0 \ll \rho < 1$ ;  $\Delta\tau_{ij}$  为信息素增量,  $\Delta\tau_{ij}(0) = 0$ ;  $Q_k$  为在本次循环中蚂蚁  $k$  释放的信息素总量;  $L_b$  为本次循环之前的最优解;  $L_k$  为本次循环的最优解. 若  $L_b > L_k$ , 则先执行公式(2)再将  $L_b$  的值变更为当前  $L_k$  的值,若  $L_b < L_k$ , 则执行公式(2),  $L_b$  值不变.

### 1.3 ACO-BP 神经网络的改进

设 BP 神经网络有  $K$  个权值,根据权值的取值范围将每个参数  $K_i (1 \leq i \leq K)$  的定义域平

均划分成  $L$  个区间,即每个区间的长度被  $L$  等分,从而形成一个  $K \times L$  大小的集合  $A$ . 将区间的临界值或选择区间中的随机值作为候选值. 蚂蚁在集合  $A$  中遍历. 计算蚂蚁经过的路径,分别选出最优和最差的蚂蚁,然后更新调节信息素,循环以上步骤直到达到最大循环次数,找出使得权值最合适的节点所在. 所得到的解即是较优解. 将此较优解作为 BP 神经网络算法权值的初始值. 训练 BP 神经网络,对误差进行反馈调节,调整权值,得到最优解. 算法流程图如图 1 所示,具体步骤如下.

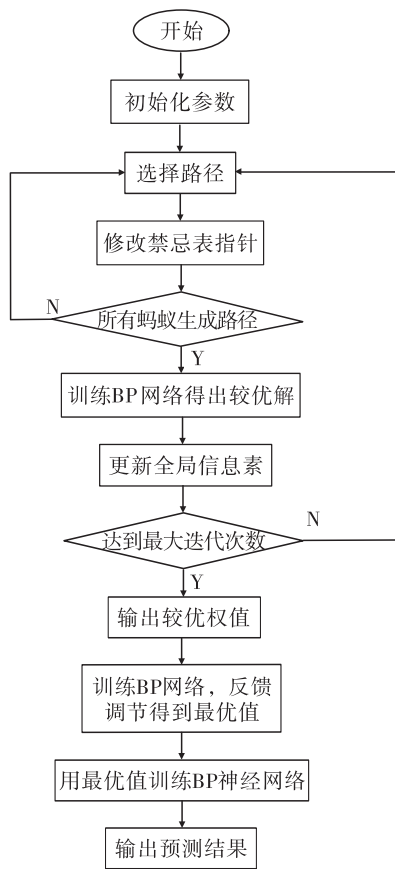


图 1 ACO-BP 算法流程图

Fig. 1 Flow chart of ACO-BP algorithm

**步骤 1 参数初始化:**将每个权值和阈值的定义域等分,设置有  $m$  个蚂蚁,信息挥发系数  $\rho$ ,信息素残留系数  $\lambda$ ,信息素强度  $Q$ ,最大迭代次数  $N_{max}$ ,BP 神经网络全局误差  $E$ ,最大学

习次数  $N$ .

**步骤 2** 权值选择:  $m$  只蚂蚁根据状态转移概率函数选择路径, 蚁群迭代一次则完成一次解的构造, 状态转移概率函数为

$$p_{ij}^k(t) = f(x) = \begin{cases} \frac{[\tau_{ij}(t)]^\alpha \times [\eta_{ij}(t)]^\beta}{\sum_{s \in allowed} [\tau_{is}(t)]^\alpha \times [\eta_{is}(t)]^\beta} & \text{若 } j \in allowed \\ 0 & \text{否则} \end{cases} \quad (4)$$

其中,  $allowed = \{0, 1, \dots, L - 1\}$ , 表示蚂蚁  $k$  下一步允许选择的元素;  $\tau_{ij}(t)$  表示  $t$  时刻路径  $(i, j)$  上的信息量;  $\eta_{ij}(t)$  为启发度函数, 表示蚂蚁  $k$  从元素  $i$  转移到元素  $j$  的期望程度.

**步骤 3** 若  $k < m$ , 则重复步骤 2, 否则执行步骤 4.

**步骤 4** 将蚁群迭代得到的解作为 BP 神经网络的初始权值对网络进行训练, 将 BP 神经网络的输出均方差最小值作为蚁群算法较优解.

**步骤 5** 一个循环结束后, 根据公式②③对残留信息进行全局更新, 并重置信息表.

**步骤 6** 若达到最大循环次数则输出较优权值, 否则跳转至步骤 2 重复以上步骤.

**步骤 7** 将蚁群迭代得到的较优解作为 BP 神经网络的初始权值进行训练, 根据输出值与实际值的误差进行反馈调节, 得到最优权值.

## 2 改进后的 ACO-BP 神经网络在电池 SOC 估算中的应用

### 2.1 输入层建模

神经网络输入参数的选择一般按照输入参数和输出参数相关性大、输入参数较易测量或提取、各输入参数之间相关性越小越好的原则进行. 影响电池 SOC 的因素很复杂, 其中电池的端电压、充放电电流和工况温度与 SOC 有极大的关系且较容易测得, 故将其作为输入. 因为有 3 个输入量, 所以输入层节点数为 3.

### 2.2 隐含层建模

多隐含层训练的复杂度高, 训练所需的时间长, 虽然估算精度高, 泛化能力强, 但是会增大过拟合的可能性. 本文选用单隐含层的神经网络实现电池 SOC 的估算.

隐含层节点数根据经验公式大致确定为

$$N = \sqrt{(m + n)} + a \quad (5)$$

$$N = \log_2 m \quad (6)$$

$$N = \sqrt{mn} \quad (7)$$

其中,  $N$  为隐含层节点数,  $m$  为输入层节点数,  $n$  为输出层节点数,  $a$  为区间  $[0, 10]$  之间的常数.

将每一个可能的隐含层节点数代入 BP 神经网络进行训练, 选取最小误差值的隐含层节点数为 5.

### 2.3 输出层建模

电池 SOC 的估计值是输出层的唯一项, 所以输出层节点数为 1.

### 2.4 确定学习速率

学习速率过大, 网络训练时间缩短, 牺牲了 BP 神经网络训练的收敛性, 如果预期提高估算精度, 则需降低学习速率, 但是易造成网络收敛速度慢, 训练时间过长<sup>[12]</sup>. 通过不断调整 BP 神经网络训练中的学习速率, 选取最适合本模型的学习速率为 0.01.

### 2.5 数据归一化处理

由于电压、电流和温度不是同一个量纲, 本文将训练样本和估算样本数据通过最大最小法进行归一化处理, 将样本数据归一化为无量纲数据<sup>[13]</sup>. 数据归一化函数形式为

$$x_k = \frac{x_k - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}} \quad (8)$$

其中,  $x_{\max}$ ,  $x_{\min}$  分别为序列中的最大数和最小数.

## 3 仿真结果与分析

本文测试对象为额定电压 3.7 V, 容量为 2.9 Ah 的 18650 动力电池单体. 分别测得该电

池在 0.5 C, 1 C, 1.5 C 的放电率下恒流放电的电压、电流和温度数据. 随机取 100 组数据作为训练样本, 15 组数据作为测试样本. 为了验证本文改进后的 ACO-BP 神经网络估算电池 SOC 的准确性, 将其与单一 BP 神经网络、ACO-BP 神经网络估算结果进行对比. 通过仿真实验, 三者的估算效果、估算数据与样本数据误差分别如图 2, 图 3 和表 1 所示.

由图 2 可以看出, 改进后的 ACO-BP 神经网络估算 SOC 的结果明显比单一 BP 神经网络和 ACO-BP 神经网络的估算结果更逼近样本数

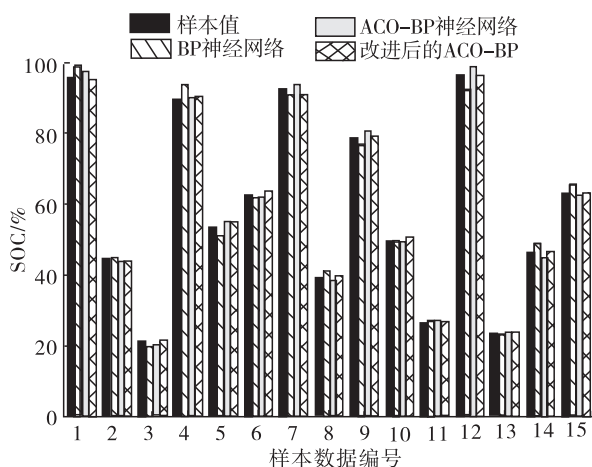


图 2 SOC 估算效果图

Fig. 2 SOC estimation effect diagram

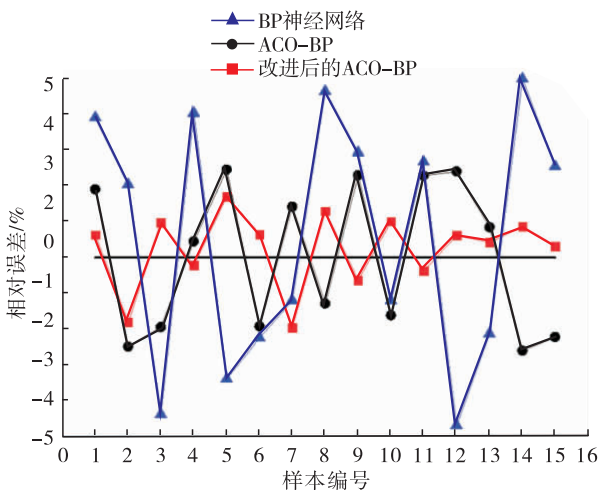


图 3 SOC 估算样本相对误差图

Fig. 3 SOC estimation sample relative error diagram

据值. 由图 3 和表 1 可以看出, 改进后的 ACO-BP 神经网络训练结果的相对误差在  $\pm 1.957\%$  以内, ACO 输出层 BP 神经网络训练结果的相对误差在  $\pm 2.597\%$  以内, 单一 BP 神经网络训练结果的相对误差在  $\pm 4.978\%$  以内. 改进后的 ACO-BP 神经网络的相对误差范围明显小于标准 ACO-BP 和单一 BP 神经网络, 表明改进后的 ACO-BP 神经网络估算电池 SOC 具有较高的精度和较高的稳定性.

为了更加直观地评价 ACO-BP 神经网络的估算能力, 本文采用平均绝对值百分比误差 (MAPE) 进行分析, 其计算公式为

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{P_{f,i} - P_{a,i}}{P_{a,i}} \right| \times 100\%$$

其中,  $N$  为估算样本总数;  $P_{f,i}$  为第  $i$  个样本 SOC 估算值;  $P_{a,i}$  为第  $i$  个样本的样本值. 由表 1 数据计算可得, 改进后的 ACO-BP 神经网络、ACO-BP 神经网络和 BP 神经网络的 MAPE 分别为 0.897%, 1.871%, 3.124%, 改进后的 ACO-BP 神经网络的估算精度明显优于单一 BP 神经网络和标准 ACO-BP 神经网络, 证明了改进后的 ACO-BP 神经网络估算动力电池 SOC 的可行性.

## 4 结语

本文利用惯性校正算法优化 BP 神经网络, 利用改进的全局信息素更新规则改进 ACO 算法, 利用改进的 ACO 算法优秀的整体寻优能力, 优化 BP 神经网络的初始权值, 在一定程度上弥补了 BP 神经网络容易陷入局部最优的缺点. 将改进后的 ACO-BP 神经网络模型用于动力电池 SOC 估算, 使得估算误差明显减小. 与单一 BP 神经网络、标准 ACO-BP 神经网络估算结果对比发现, 其在逼近能力方面明显更优, 精度更高, 故本模型有较好的准确性和合理性. 深入研究影响电池 SOC 的因素, 如循环次数、充

表1 SOC 估算结果分析表

Table 1 Analyze the results of SOC estimation

%

样本编号	样本值	BP 神经网络		ACO-BP 神经网络		改进后的 ACO-BP 神经网络	
		估算值	相对误差	估算值	相对误差	估算值	相对误差
1	95.0	98.7	3.895	96.8	1.895	95.6	0.632
2	44.3	45.2	2.031	43.2	-2.483	43.5	-1.806
3	20.6	19.7	-4.369	20.2	-1.942	20.8	0.971
4	89.5	93.1	4.022	89.9	0.447	89.3	-0.223
5	53.2	51.4	-3.383	54.5	2.444	54.1	1.692
6	62.5	61.1	-2.240	61.3	-1.920	62.9	0.640
7	92.0	90.9	-1.196	93.3	1.413	90.2	-1.957
8	38.9	40.7	4.627	38.4	-1.285	39.4	1.285
9	78.7	76.4	2.922	80.5	2.287	78.2	-0.635
10	49.7	49.1	-1.207	48.9	-1.610	50.2	1.006
11	26.3	27.0	2.662	26.9	2.281	26.2	-0.380
12	96.2	91.7	-4.678	98.5	2.391	96.8	0.624
13	23.6	23.1	-2.119	23.8	0.847	23.7	0.424
14	46.2	48.5	4.978	45.0	-2.597	46.6	0.866
15	63.1	64.7	2.536	61.7	-2.219	63.3	0.317

电倍率和内阻等,以进一步提高电池 SOC 的估算精度,将是下一步的工作重点.

### 参考文献:

- [1] 欧阳剑,李迪,柳俊城.电动汽车用动力电池荷电状态估算方法研究综述[J].机电工程技术,2016,45(1):52.
- [2] 李争,智若东,孙宏旺,等.基于开路电压预测的 SOC 估算方法[J].河北工业科技,2017,34(1):36.
- [3] 王宇航,王顺利,潘小琴,等.基于扩展卡尔曼的锂离子电池 SOC 估算研究[J].自动化与仪表,2018,33(8):76.
- [4] 赵钢,朱芳欣,窦汝振.基于 PSO-BP 的电动汽车锂离子电池 SOC 估算[J].电源技术,2018,42(9):1318.
- [5] 欧阳剑.电动汽车用锂离子动力电池 SOC 估算和 SOF 评估的研究[D].广州:华南理工大学,2016.
- [6] 张传伟,李林阳,赵东刚.基于 BP 神经网络法估算动力电池 SOC[J].电源技术,2017,41(9):1356.
- [7] 黄妙华,严永刚,朱立明.改进 BP 神经网络的磷酸铁锂电池 SOC 估算[J].武汉理工大学学报(信息与管理工程版),2014(6):790.
- [8] 王鸽,蒲蓬勃.ACO-BP 在神经网络训练中的研究与应用[J].计算机仿真,2009,26(12):136.
- [9] 赵钢,孙豪赛,罗淑贞.基于 BP 神经网络的动力电池 SOC 估算[J].电源技术,2016,40(4):818.
- [10] 李东玉,王睿,冯宜民.基于 BP 神经网络的阀控铅酸盐蓄电池劣化程度预测[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2012,27(4):12.
- [11] 孙启豪,蔡爱华.航空搜潜布阵航路优化研究[J].电光与控制,2017(4):39.
- [12] 霍健.大跨径连续梁桥悬臂施工线形控制[D].哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [13] 周美兰,王吉昌,李艳萍.优化的 BP 神经网络在预测电动汽车 SOC 上的应用[J].黑龙江大学自然科学学报,2015,32(1):129.



引用格式:吕恒志,张涛,章凯旋,等.三相四开关容错变换器调制模型预测控制策略[J].轻工学报,2019,34(4):87-95.

中图分类号:TM712 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.013

文章编号:2096-1553(2019)04-0087-09

# 三相四开关容错变换器调制模型预测控制策略

## Three-phase four-switch fault-tolerant converter modulation model predictive control strategy

吕恒志<sup>1</sup>,张涛<sup>2</sup>,章凯旋<sup>2</sup>,何帅彪<sup>2</sup>,金楠<sup>2</sup>

LYU Hengzhi<sup>1</sup>,ZHANG Tao<sup>2</sup>,ZHANG Kaixuan<sup>2</sup>,HE Shuaibiao<sup>2</sup>,JIN Nan<sup>2</sup>

1. 平顶山工业职业技术学院 机电工程学院,河南 平顶山 467000;
2. 郑州轻工业大学 电气信息工程学院,河南 郑州 450002
1. *Mechanical and Electrical Engineering, Pingdingshan Industrial College of Technology, Pingdingshan 467000, China;*
2. *College of Electric and Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China*

### 关键词:

TPFS 容错变换器;  
模型预测控制;总谐波失真

### Key words:

three-phase four-switch  
fault-tolerant converter;  
model predictive  
control;total harmonic  
distortion (THD)

**摘要:**针对传统三相四开关 TPFS 容错变换器单矢量控制电流跟踪精度不够、易导致电流总谐波失真 THD 较大的问题,提出了一种 TPFS 容错变换器在  $\alpha\beta$  静止坐标系下调制模型预测控制策略。该策略基于 TPFS 容错变换器运行机理建立了  $\alpha\beta$  静止坐标系  $a$  相故障电流预测模型,将 TPFS 容错变换器 4 个电压矢量两两组合,用调制模型预测原理计算每个电压矢量的作用时间以减少计算量,每个控制周期选择并使用两个电压矢量以减小电流纹波。仿真和实验结果验证了该策略的可行性和有效性,TPFS 容错变换器控制跟踪精度得到了改善,降低了电流谐波,保证了 TPFS 容错变换器的持续运行。

收稿日期:2018-10-24

基金项目:郑州轻工业大学研究生科技创新基金资助项目(2018034)

作者简介:吕恒志(1983—),女,河南省西平县人,平顶山工业职业技术学院讲师,主要研究方向为机械电气。

通信作者:金楠(1982—),男,河南省商丘市人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为电力电子与电力传动。

**Abstract:** Aimed at the problem that the single-vector control current tracking accuracy of three-phase four-switch (TPFS) converter was not enough, which will lead to the total harmonic distortion (THD), a TPFS fault-tolerant converter modulation model predictive control strategy was proposed in  $\alpha\beta$  stationary coordinate system. This strategy established the current prediction model under  $a$ -phase fault in  $\alpha\beta$  stationary coordinate system based on the operating mechanism of TPFS fault-tolerant converter. The four voltage vectors of TPFS fault-tolerant converter were combined with each other, and the action time of each voltage vector was calculated by the modulation model prediction principle to reduce the calculation amount. Two voltage vectors were selected and used in each control period to reduce the current ripple. Simulation and experimental results showed that the feasibility and effectiveness of the proposed strategy. The tracking accuracy of the TPFS fault-tolerant converter was improved, the current harmonics were reduced, and the TPFS fault-tolerant converter was guaranteed to continue to operate.

## 0 引言

双向交直流变换器作为双向电能转换的核心部件,一旦出现故障将会造成电源与电网的解列,对电网造成冲击.因此,为保证混合微电网稳定可靠运行,对双向交直流变换器故障容错机制及控制方法的研究具有重要意义<sup>[1-5]</sup>.为了实现变换器容错运行,通常在双向交直流变换器发生故障时,将变换器构造成三相四开关 TPFS(three-phases four-switches)容错变换器结构,这种结构是将故障与直流侧电容的中点相连,使变换器可以在出现故障的情况下安全稳定地运行<sup>[6-9]</sup>.模型预测控制是近年来发展起来的一类控制算法,它采用多步测试、滚动优化、反馈校正等控制策略,具有鲁棒性高、动态性能好等优点<sup>[10]</sup>,被广泛应用于同步电机、有源滤波器 APF(active power filter)、并网逆变器 etc. 等电力、电子领域<sup>[11]</sup>.模型预测控制具有良好的自适应性,无需使用锁相环和 PWM 调制,动态响应速度快<sup>[12-13]</sup>.文献[14]采用模型预测电流控制,对模型预测的基本原理和工作过程进行了具体分析.文献[15]提出一种模型预测控制分层控制策略,对输出电流及电容电压等进行分层控制,验证了模型预测控制策略优良的动静态性能.但文献[14-15]使用的是单矢量预测控制,电流控制精度不够,电流谐波较大.

文献[16]研究了基于多电压矢量的模型预测控制策略来控制双向 AC/DC 转换器,并且实现了令人满意的控制性能.但是其计算较为复杂,且计算量大.为了减少计算量,文献[17]提出了一种模型预测方法来控制双向交直流故障容错转换器,然而,由于每个控制周期仅使用一个电压矢量,所以电流纹波非常大.

为了减小 TPFS 容错变换器电流纹波,减小计算量,进而提高电流跟踪精度,降低电流谐波,本文拟提出一种 TPFS 容错变换器在  $\alpha\beta$  静止坐标系下调制模型预测控制策略,以期提高变换器的运行可靠性和控制性能,保证 TPFS 容错变换器持续运行,进而实现电网的安全稳定运行.

## 1 TPFS 容错变换器故障容错模型

双向交直流变换器常见的故障类型有直流母线接地短路、直流母线电容短路、功率器件触发脉冲丢失、功率器件短路、开路、桥臂短路、输出交流侧开路、相间短路和单相对地短路等.假设  $a$  相发生故障后,重新构建的 TPFS 容错变换器结构如图 1 所示,变换器通过滤波电感  $L$ ,线路电阻  $R$  与电网相连,另一端由两个电容值相等的电容器  $C_1$  和  $C_2$  作为级联结构的直流侧.在故障容错结构下,变换器成为仅有 4 个开关的器件<sup>[18-20]</sup>.



TPFS 容错变换器结构故障容错模型的开关状态  $S_i (i = b, c)$  为

$$S_i = \begin{cases} 1 & i \text{ 相上桥臂导通, 下桥臂关断} \\ 0 & i \text{ 相上桥臂关断, 下桥臂导通} \end{cases}$$

则减小电流纹波输出电压与开关状态的关系为

$$\begin{bmatrix} u_{an} \\ u_{bn} \\ u_{cn} \end{bmatrix} = \frac{U_{dc}}{3} \begin{bmatrix} 2 & -1 & -1 \\ -1 & 2 & -1 \\ -1 & -1 & 2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1/2 \\ S_b \\ S_c \end{bmatrix} \quad (1)$$

式中,  $U_{dc}$  为直流母线电压,  $u_{an}$  为 TPFS 容错变换器的  $a$  相输出电压,  $u_{bn}$  为 TPFS 容错变换器的  $b$  相输出电压,  $u_{cn}$  为 TPFS 容错变换器的  $c$  相输出电压. 定义电压空间矢量  $V$  为

$$V = \frac{2}{3} (U_a + nU_b + n^2U_c)$$

式中,  $n = e^{(2\pi/3)j}$ .

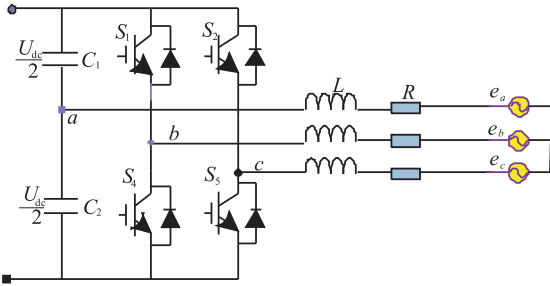


图 1 TPFS 容错变换器结构

Fig. 1 TPFS fault-tolerant converter structure

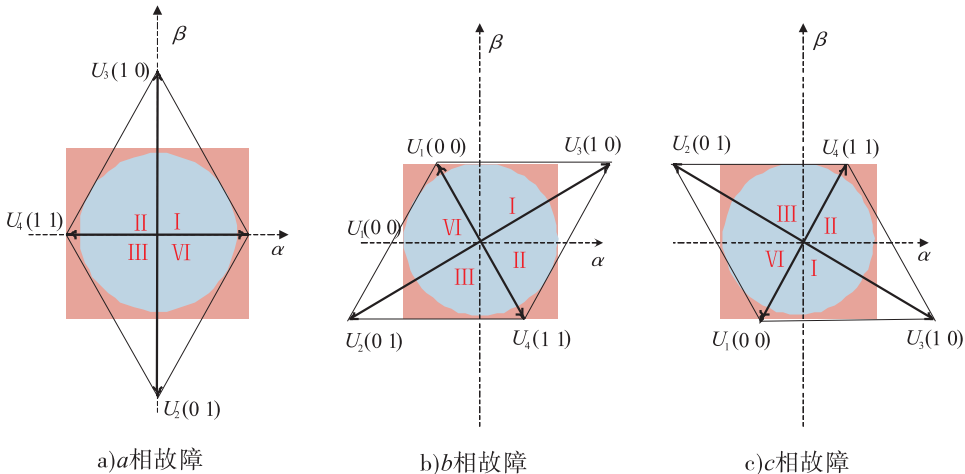


图 2 不同桥臂故障下 TPFS 容错变换器的空间电压矢量

Fig. 2 TPFS fault-tolerant converter space voltage vector under different bridge arm faults

TPFS 变换器空间电压矢量值见表 1. 不同桥臂故障下产生的空间电压矢量如图 2 所示.

## 2 TPFS 容错变换器预测模型

基于 TPFS 容错变换器结构, 以逆变模式为例, 根据基尔霍夫定律, 得到系统在三相静止坐标系下的状态方程为

$$L \frac{d}{dt} \begin{bmatrix} i_a \\ i_b \\ i_c \end{bmatrix} + R \begin{bmatrix} i_a \\ i_b \\ i_c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} u_{an} - e_a \\ u_{bn} - e_b \\ u_{cn} - e_c \end{bmatrix} \quad (2)$$

式中,  $u_{an}, u_{bn}, u_{cn}$  为三相输出电压;  $i_a, i_b, i_c$  为三相电流;  $e_a, e_b, e_c$  为三相电网电压.

对式(1)进行 Clark 变换, 得到  $\alpha\beta$  两相静止坐标下变换器输出电压与开关状态的表达式为

表 1 TPFS 容错变换器空间电压矢量值( $a$  相故障)

电压矢量 $U(S_b S_c)$	电压分量 $U_\alpha$	电压分量 $U_\beta$	电压矢量值 $V$
$U_1(00)$	$U_{dc}/3$	0	$U_{dc}/3$
$U_2(01)$	0	$-U_{dc}/\sqrt{3}$	$-U_{dc}e^{(2\pi/3)j}/\sqrt{3}$
$U_3(10)$	0	$U_{dc}/\sqrt{3}$	$U_{dc}e^{(2\pi/3)j}/\sqrt{3}$
$U_4(11)$	$-U_{dc}/\sqrt{3}$	0	$-U_{dc}/3$

$$\begin{bmatrix} u_\alpha \\ u_\beta \end{bmatrix} = \frac{\sqrt{6}U_{dc}}{9} \begin{bmatrix} 1 & -\frac{1}{2} & -\frac{1}{2} \\ 0 & \frac{\sqrt{3}}{2} & -\frac{\sqrt{3}}{2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 - S_b - S_c \\ -1/2 + 2S_b - S_c \\ -1/2 - S_b + 1 \end{bmatrix}$$

对式②进行进行坐标变换,得

$$L \frac{d}{dt} \begin{bmatrix} i_\alpha \\ i_\beta \end{bmatrix} + R \begin{bmatrix} i_\alpha \\ i_\beta \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} u_\alpha \\ u_\beta \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} e_\alpha \\ e_\beta \end{bmatrix} \quad (3)$$

对式③进行离散化,得

$$\frac{L}{T_s} \begin{bmatrix} i_\alpha(k+1) - i_\alpha(k) \\ i_\beta(k+1) - i_\beta(k) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} u_\alpha(k) \\ u_\beta(k) \end{bmatrix} - R \begin{bmatrix} i_\alpha(k) \\ i_\beta(k) \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} e_\alpha(k) \\ e_\beta(k) \end{bmatrix} \quad (4)$$

式中,  $T_s$  为采样周期. 对式④进行简化,得  $t_{k+1}$  时刻预测电流为

$$\begin{bmatrix} i_\alpha(k+1) \\ i_\beta(k+1) \end{bmatrix} = \frac{T_s}{L} \begin{bmatrix} u_\alpha(k) - e_\alpha(k) \\ u_\beta(k) - e_\beta(k) \end{bmatrix} + \left(1 - \frac{RT_s}{L}\right) \begin{bmatrix} i_\alpha(k) \\ i_\beta(k) \end{bmatrix} \quad (5)$$

式中,  $i_\alpha(k), i_\beta(k)$  为  $t_k$  时刻变换器输出电流的  $\alpha, \beta$  分量;  $u_\alpha(k), u_\beta(k)$  为  $t(k)$  时刻变换器输出电压的  $\alpha, \beta$  分量;  $e_\alpha(k), e_\beta(k)$  为  $t(k)$  时刻变换器输出电网电压的  $\alpha, \beta$  分量;  $i_\alpha(k+1), i_\beta(k+1)$  为  $t(k+1)$  时刻预测电流值的  $\alpha, \beta$  分量<sup>[21-25]</sup>.

将由式④计算得到的预测电流值  $i_\alpha(k+1), i_\beta(k+1)$  带入价值函数

$$g_i = |i_{\alpha ref} - i_{\alpha i}(k+1)| + |i_{\beta ref} - i_{\beta i}(k+1)| \quad i = 1, 2, 3, 4$$

其中,  $i_{\alpha ref}$  为输出电流参考值的  $\alpha$  分量,  $i_{\beta ref}$  为输出电流参考值的  $\beta$  分量.

最后,评估在不同电压矢量作用下  $g_i$  的大小,选择令  $g_i$  价值函数最优的电压矢量用于 TPFS 容错变换器<sup>[25-27]</sup>.

### 3 TPFS 容错变换器调制模型预测控制策略

针对传统单矢量 TPFS 容错变换器模型预测控制电流谐波含量大的缺陷,本文提出一种 TPFS 容错变换器调制模型预测控制策略.

根据参考电流计算电压,然后根据定义的新的代价函数来选择最佳电压矢量. 根据式④的参考电流可以算出对应的参考电压  $u^*$ .

$$\begin{bmatrix} u_\alpha^* \\ u_\beta^* \end{bmatrix} = \frac{L}{T_s} \begin{bmatrix} i_\alpha(k+1) - i_\alpha(k) \\ i_\beta(k+1) - i_\beta(k) \end{bmatrix} + R \begin{bmatrix} i_\alpha(k) \\ i_\beta(k) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_\alpha(k) \\ e_\beta(k) \end{bmatrix}$$

从而得出新的代价函数

$$G_i = |u_\alpha^* - u_{\alpha i}(k+1)| + |u_\beta^* - u_{\beta i}(k+1)| \quad (6)$$

由式⑥可知,不需要计算 4 次预测电流,只需要计算 1 次参考电压,因此减小了计算量.

调制模型预测控制矢量作用时间计算步骤如下.

**步骤 1** 将 TPFS 容错变换器模型的 4 个电压矢量进行组合 ( $a$  相故障下为例),分别为  $(U_1, U_2), (U_1, U_3), (U_3, U_4), (U_2, U_4)$ , 如图 3 所示.

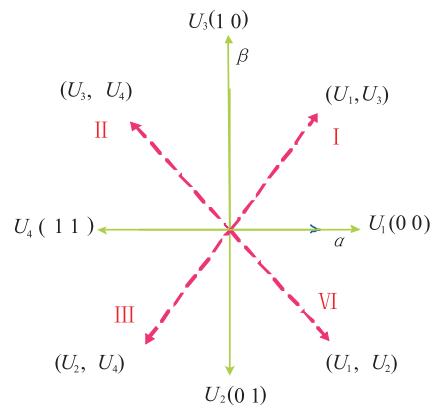


图 3  $a$  相故障下双矢量电压矢量组合  
Fig. 3 Dual vector voltage vector combination under  $a$ -phase fault

**步骤2** 根据由式⑤得到的4个电压矢量组合对应的价值函数  $g_i (i=1,2,3,4)$  和调制模型预测控制的原理,计算各电压矢量组合中每个电压矢量的作用时间. 每个电压矢量的作用时间满足

$$\begin{cases} t_{i1} = \frac{(1/g_{i1})}{(1/g_{i1}) + (1/g_{i2})} \\ t_{i2} = \frac{(1/g_{i2})}{(1/g_{i1}) + (1/g_{i2})} \end{cases}$$

式中,  $t_{i1}$  为电压矢量组合中  $g_{i1}$  的作用时间;  $t_{i2}$  为电压矢量组合中  $g_{i2}$  的作用时间;  $g_{i1}, g_{i2}$  分别为图3中电压矢量组合所对应的价值函数.

图4所示为  $a$  相故障各矢量在各扇区下的作用时间和顺序.

**步骤3** 根据伏秒平衡原则计算出新的电压矢量  $U_i$ , 其定义为

$$U_i = \frac{t_{i1}}{T_s} U_{i1} + \frac{t_{i2}}{T_s} U_{i2}$$

将计算得到的新电压矢量  $U_i (i=1,2,3,4)$  代入式⑥, 可以选择使成本函数最小化的最佳电压矢量, 并将其应用于下一个控制周期中的转换器. 因此, 实现了基于双电压矢量的模型预测控制.

**步骤4** 选出令价值函数  $G_i$  最优的电压矢量集合, 作用于 TPFS 容错变换器.

选取相邻矢量合成电压矢量, 最优电压矢量与合成电压矢量的误差矢量分析如图5所示. 其中,  $U_{13}$  为  $U_1$  和  $U_3$  的合成电压矢量,  $U^*$  为最优电压矢量. 根据每个矢量作用时间的不同, 合成电压矢量可落在  $U_1$  和  $U_3$  任意合成位置. 当选择作用时间最优时, 合成电压矢量落在  $U_{13}$  位置上, 此时误差电压矢量数值上最小. 根据矢量合成可得出最优电压矢量与合成电压矢量的误差电压矢量长度  $e_{13}$ , 以及最优电压矢量与  $U_1, U_3$  的误差电压矢量长度  $e_1, e_3$ . 由图5可知,  $e_{13} < e_1$  且  $e_{13} < e_3$ , 即双矢量的控制精度要优

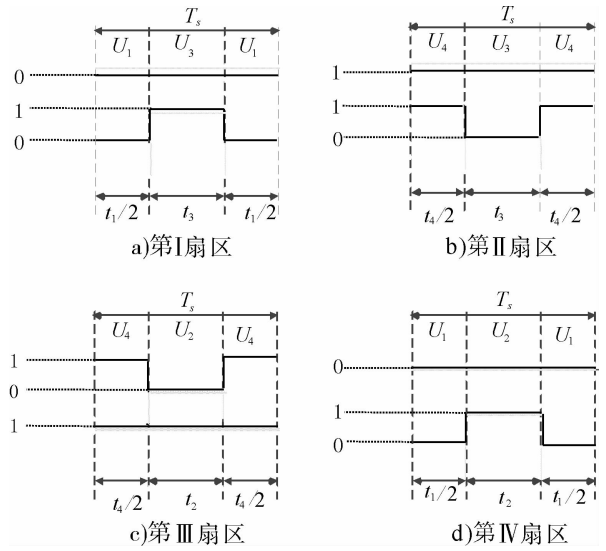


图4  $a$  相故障下各矢量

在各扇区的作用时间和顺序

Fig. 4 The action time and sequence of each vector under each sector under  $a$ -phase fault

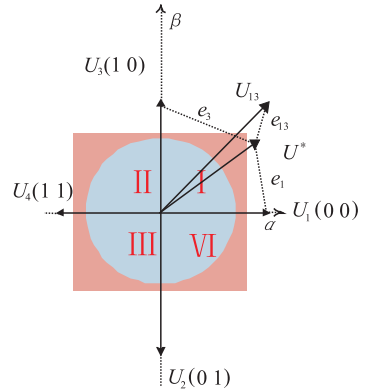


图5  $a$  相故障下误差电压矢量分析

于单矢量的控制精度.

## 4 仿真、实验结果与分析

### 4.1 仿真结果与分析

为了验证本文 TPFS 容错变换器调制模型预测控制策略性能, 将其与文献[14]中传统的单矢量 TPFS 容错变换器控制策略进行仿真对比. 仿真环境为 Matlab/Simulink, 设定  $a$  相发生故障, 仿真系统参数为  $U_{dc} = 400 \text{ V}, L = 50 \text{ mH}, e = 110 \text{ V}, T_s = 100 \text{ }\mu\text{s}, R = 0.05 \text{ }\Omega$ .

传统控制策略和本文调制模型预测控制策略的稳态仿真结果如图6所示.由图6可知,传统方案中发生桥臂故障后因为单矢量跟踪精度不够,三相电流谐波失真较大,仿真输出电流总谐波失真 THD (total harmonic distortion) 为 6.55%;而相比单矢量跟踪,运用本文策略跟踪精度得到了改善,谐波失真明显减小,仿真输出电流  $THD = 2.65\%$ .

传统控制策略和本文调制模型预测控制策略的动态仿真结果如图7所示,电流采用5—10 A的跳变.对比图7a)与图7b)可知,电流由5 A经过0.05 s后跳变为10 A,采用调制模型预测电流响应速度得到改善,且电流谐波失真明显减小.

传统控制策略和本文调制模型预测控制策略的电流纹波对比如图8所示.由图8可知,当电流参考值为5 A时,传统控制策略输出电流  $THD = 6.55\%$ ,本文调制模型预测控制策略输出电流  $THD = 2.65\%$ .由于本文采用双矢量控

制,因此电流控制跟踪精度得到改善,输出电流明显低于传统方案的 THD,且达到并网要求.

### 4.2 实验结果与分析

为进一步验证变换器的工作性能和调制模型预测控制策略的有效性,进行单矢量模型预测控制和调制模型预测控制 TPFS 双向交直流变换器稳态及动态实验,实验中  $a$  相为故障相.实验平台采用 Myway 的 APL - II 型可编程双向直流电源来作为直流侧,采用 Ametek 的可编程交流电源来模拟交流反电动势负载,实验参数均与仿真参数一致.

**4.2.1 稳态分析** 电流为5 A和10 A时,传统控制策略和本文调制模型预测控制策略的电流波形如图9所示.由图9可看出,传统控制策略的控制精度不够,电流谐波失真较大;本文控制策略三相电流相比单矢量跟踪精度得到了改善,谐波失真明显减小.

**4.2.2 动态分析** 变换器工作在逆变模式时,能量由直流侧流向电网侧,某一时刻给定电流

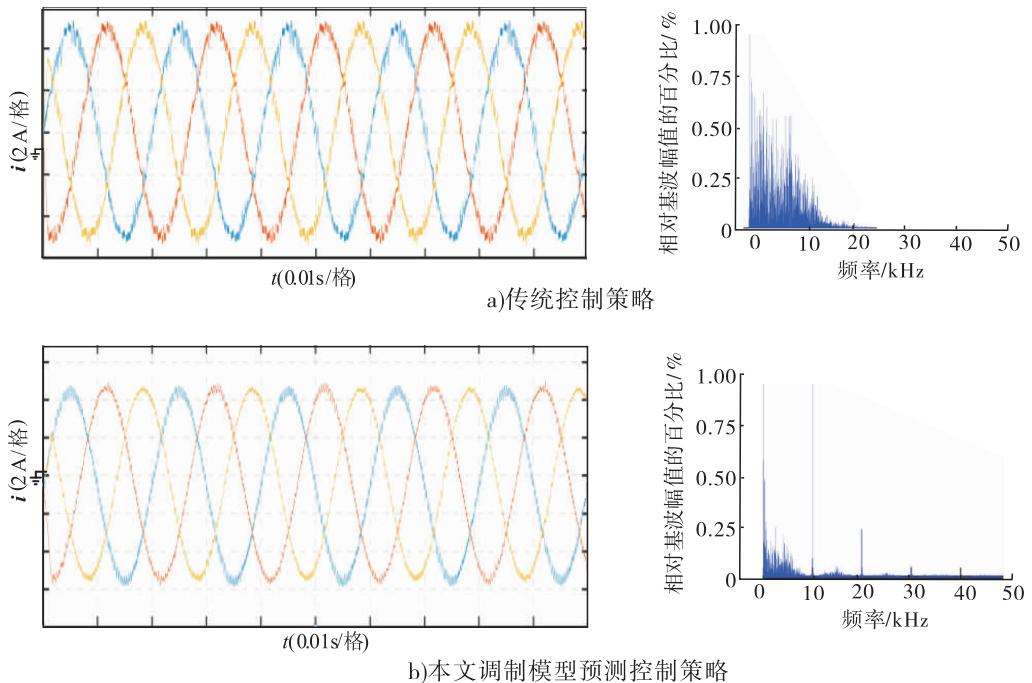


图6 两种控制策略的稳态仿真结果

Fig.6 Steady-state simulation results for two schemes

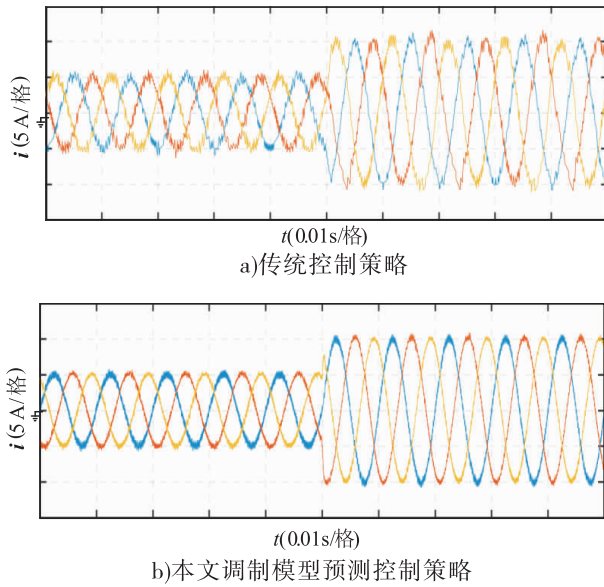


图7 两种控制策略的动态仿真结果

Fig. 7 Dynamic simulation results of two schemes

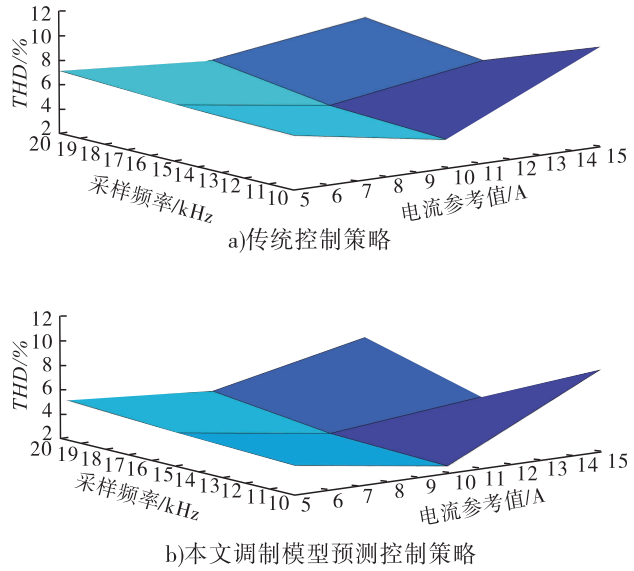


图8 两种控制策略的电流 THD 对比

Fig. 8 Current THD comparison of two schemes

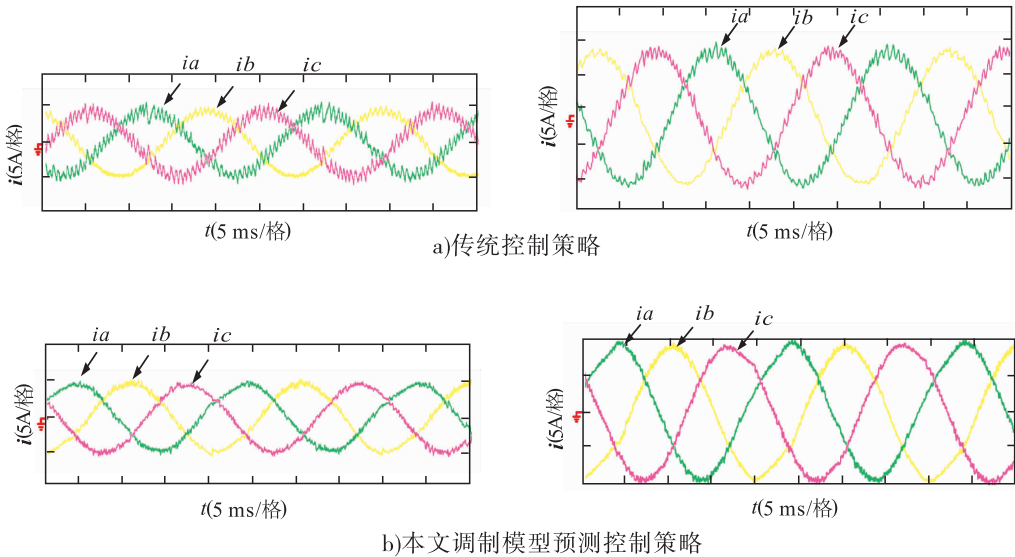


图9 两种控制策略稳态实验结果

Fig. 9 Steady-state experimental results of two schemes

由 5 A 跳变到 10 A,此时传统控制策略和本文调制模型预测的动态实验结果如图 10 所示. 由图 10 可见,传统控制策略在跳变过程中电流的动态响应较慢且电流产生了小的畸变;本文下电流很快达到给定值,动态响应速度较快,从而验证了良好的动态性能.

通过实验对比可知,TPFS 容错变换器在传

统控制方案下,单矢量跟踪精度不够,三相电流谐波失真较大,而采用本文调制模型预测控制策略能够保证变换器连续可靠运行. 实验结果验证了本文提出策略的有效性.

## 5 结语

为保证 TPFS 容错变换器持续运行,提高变换器运行可靠性和控制性能,本文提出了一

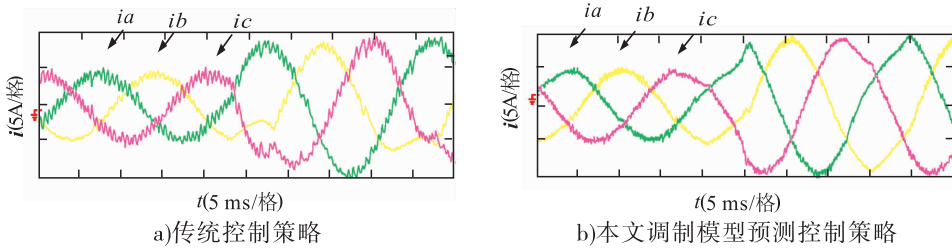


图 10 两种控制策略动态实验结果

Fig. 10 Dynamic experimental results of two schemes

种双电压矢量的模型预测控制策略. 该策略基于 TPFS 容错转换器的 4 个基本电压矢量定义 4 个电压矢量组合, 采用调制模型预测控制原理计算每个电压矢量的持续时间, 从而进行模拟研究. 理论分析和仿真、实验结果均验证了该策略的可行性和有效性, 以及具有电流 THD 较低、动态响应快的控制性能. 此外, 采用该策略增加了 TPFS 容错转换器的稳定性, 提高了电能质量, 从而降低了线路损耗, 保障了电网运行的可靠性和稳定性.

#### 参考文献:

- [1] 周小杰, 阮毅, 汪飞. 单相并网逆变器预测直接功率控制策略研究[J]. 中国电机工程学报, 2014, 34(30): 5269.
- [2] 袁庆伟, 赵荣祥. 三相四开关逆变器供电的 IPMSM 直接转矩控制系统建模与分析[J]. 电工技术学报, 2017, 32(15): 76.
- [3] 李国飞, 滕青芳, 王传鲁, 等. 应用滑模控制的四开关逆变器 PMSM 系统 FCS-MPC 策略[J]. 浙江大学学报(工学版), 2017, 51(3): 620.
- [4] 刘勇超, 葛兴来, 蒲俊楷, 等. 四开关三相逆变器全调制度范围内两种等效 PWM 算法[J]. 电工技术学报, 2017, 32(2): 206.
- [5] 张帅, 郭源博, 张晓华. 基于复合重复控制的 LCL 型三相四开关有源电力滤波器[J]. 电源学报, 2018, 16(5): 45.
- [6] 金楠, 衡龙雨, 马孝强, 等. 电容均压 TPFS 容错变换器预测功率控制[J]. 电机与控制应用, 2018, 45(5): 46.
- [7] 金楠, 张涛, 窦智峰, 等. 不平衡电网 TPFS 容错变换器预测功率控制[J]. 电机与控制应用, 2018(9): 48.
- [8] 沈虹, 郭忠南, 关红磊, 等. 单相四开关多电平光伏逆变器研究[J]. 电工技术学报, 2018, 33(8): 1775.
- [9] 雷彪, 周耀, 杨兴武. 混合型模块化多电平换流器的模型预测控制方法[J]. 电测与仪表, 2017, 54(13): 68.
- [10] 郭磊磊, 金楠, 窦智峰, 等. 一种改进的永磁同步发电机模型预测共模电压抑制方法[J]. 中国电机工程学报, 2017, 37(16): 4810.
- [11] 金楠, 郭磊磊, 窦智峰, 等. 清洁能源发电并网逆变器有限状态模型预测控制[J]. 电机与控制学报, 2018, 22(4): 89.
- [12] 郭磊磊, 金楠, 申永鹏. 一种基于优化电压矢量选择的电压源逆变器模型预测共模电压抑制方法[J]. 电工技术学报, 2018, 33(6): 1347.
- [13] 安群涛, 孙力, 赵克, 等. 四开关 SVPWM 算法及其与 SPWM 的关系[J]. 电力电子技术, 2010, 44(8): 44.
- [14] 金楠, 胡石阳, 崔光照, 等. 光伏并网逆变器有限状态模型预测电流控制[J]. 中国电机工程学报, 2015, 35(S1): 190.
- [15] 安群涛, 孙醒涛, 赵克, 等. 容错三相四开关逆

- 变器控制策略[J]. 中国电机工程学报,2010,30(3):14.
- [16] 曹晓冬,谭国俊,王从刚,等. 三相 PWM 整流器模型预测虚拟电压矢量控制[J]. 中国电机工程学报,2014,34(18):2926.
- [17] 侯世英,宋星,孙韬,等. 基于空间矢量滞环控制的新型容错三相四开关并网逆变器[J]. 电力系统保护与控制,2011,39(21):138.
- [18] 雷彪,周耀,杨兴武. 混合型模块化多电平换流器的模型预测控制方法[J]. 电测与仪表,2017,54(13):68.
- [19] WELCHKO B A, LIPO T A, JAHNS T M, et al. Fault tolerant three-phase AC motor drive topologies: a comparison of features, cost, and limitations[J]. IEEE Transactions on Power Electronics, 2004, 19(4):1108.
- [20] FUCHS F W. Some diagnosis methods for voltage source inverters in variable speed drives with induction machines a survey [C] // The 29th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society. Piscataway: IEEE, 2003: 1378.
- [21] RODRIGUEZ J, PONT J, SILVA C A, et al. Predictive current control of a voltage source inverter [J]. IEEE Transactions on Industrial Electronics, 2007, 54(1):495.
- [22] RIAR B S, GEYER T, MADAWALA U K. Model predictive direct current control of modular multilevel converters: modeling, analysis, and experimental evaluation [J]. IEEE Transactions on Power Electronics, 2015, 30(1):431.
- [23] 雷晓霖,李雪丰,王传奇,等. 新型逆变器有限集模型预测控制误差补偿策略[J]. 电力电子技术,2018,52(9):17.
- [24] 夏长亮,张天一,周湛清,等. 结合开关表的三电平逆变器永磁同步电机模型预测转矩控制[J]. 电工技术学报,2016,31(20):83.
- [25] 刘泽健,杨苹,许志荣,等. 区域自治型单相多微电网实时模型预测控制[J]. 电力自动化设备,2018,38(9):1.
- [26] 高胜利,冯文秀,申强,等. 风光互补逆变器控制方法的研究与仿真[J]. 节能技术,2012,30(5):405.
- [27] 王冕,田野,李铁民,等. 应用于储能系统的双向 DC-DC 变换器研究[J]. 电工技术学报,2013,28(8):66.



引用格式:梁诤,许勇,吕叶萍. 基于 6-SPU 并联机构的铆孔机器人静力学分析[J]. 轻工学报,2019,34(4):96-101.

中图分类号:TH122 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.014

文章编号:2096-1553(2019)04-0096-06

# 基于 6-SPU 并联机构的 铆孔机器人静力学分析

## Static analysis of a riveting robot based on 6-SPU parallel mechanism

梁诤,许勇,吕叶萍

LIANG Zheng, XU Yong, LYU Yeping

上海工程技术大学 机械工程学院,上海 201620

College of Mechanical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China

### 关键词:

铆孔机器人; 轨迹规划; 静力学分析; 变形

### Key words:

riveting robot;  
trajectory planning;  
static analysis;  
deformation

**摘要:**对基于 6-SPU 六自由度并联机构的集制孔与铆接为一体的新型步行式铆孔机器人进行静力学分析:在位置逆解建模、求解的基础上,根据机器人铆接轨迹规划,确定铆枪的正确铆孔作业位姿;针对飞机某大型薄壁圆柱面工件,应用有限元分析软件进行机器人铆孔作业仿真,获得各铆接点工位对应的动平台各向最大变形量及机构的最大等效力。仿真结果表明,机器人最大变形量最大值为  $51.847 \times 10^{-7}$  m,在飞机铆接制孔误差允许范围内,且机构最大等效力最大值为 2.698 MPa,远小于材料屈服极限,可满足铆孔作业的精度与强度需求。

收稿日期:2018-10-22

基金项目:上海市工业互联网创新发展专项资金资助项目(201822930);上海市普通高校学术学位研究生科研创新计划资助项目(E3-0903-18-01020)

作者简介:梁诤(1995—),女,山东省曹县人,上海工程技术大学硕士研究生,主要研究方向为并联机器人机构。

通信作者:许勇(1973—),男,河南省南阳市人,上海工程技术大学副教授,主要研究方向为机器人机构学。



**Abstract:** A new walking riveting robot integrating hole making and riveting based on 6-SPU six degrees of freedom parallel mechanism was analyzed statically. On the basis of inverse position modeling and solution, the correct position of riveting hole of riveting gun was determined according to robot riveting trajectory planning. For aircraft large thin-walled cylindrical workpiece, the finite element analysis software was used to simulate the robot riveting operation, and the maximum deformation of the moving platform and the maximum equivalent stress of the mechanism were obtained. The simulation results showed that the maximum deformation of the robot was  $51.847 \times 10^{-7}$  m, which was within the allowable error range of aircraft riveting hole making, and the maximum equivalent stress of the mechanism was 2.698 MPa, which was far less than the material yield limit, which could meet the requirements of precision and strength of riveting hole operation.

## 0 引言

大型复杂飞机外形薄壁壁板在航空、汽车等工业制造中有着重要作用,但是大型薄壁零件通常存在变形的困扰,特别是在加工后所产生的翘曲变形是不可忽视的技术难题.由不同的原因引起的大型曲面薄壁零件变形包括弹性变形、塑性变形、热变形和残余应力变形,其中残余应力为零件变形的主要原因.传统工艺方法已经无法满足航空航天、汽车制造等高端制造业对大型薄壁复杂曲面工件的精密、高效、柔性加工等高端需求,因此,自动化铆接机器人正日益成为智能制造的主流装备.刚度是满足机器人作业单元的重要性能指标,它随机器人的位姿而变化<sup>[1]</sup>,因此需在机构设计阶段快速预估出机构刚度是否满足作业要求,以便为机械结构的详细设计提供必要的理论依据.

机构刚度对机构末端的位姿精度非常重要,是影响机器人定位精度的重要因素.窦永磊等<sup>[2]</sup>计入所有支链构件和关节的弹性,基于全变形雅可比矩阵,构造出多种混联机器人的半解析刚度模型,通过算例揭示了整机刚度在任务空间中随位形的变化规律.W. A. Cao 等<sup>[3]</sup>提出了对过约束 SCARA 运动并联机构进行刚度建模的一种通用方法.张东胜等<sup>[4]</sup>针对基于 2RPU/UPR 机构的五自由度混联机器人,分别求解了并联、串联部分的静刚度模型,从构造系统的力旋量系和弹性变形协调条件入手,简单

且快速地建立了混联机器人的整体刚度模型,并求解了整机静刚度在任务空间中随位形变化的分布图.张俊等<sup>[5]</sup>分别采用虚拟关节法和有限元法,计入 Exechon 并联模块各关节和支链体的柔性,通过推导动平台和支链装配体间的变形协调方程,构建出系统的弹性静力学模型,由系统方程抽取出动平台刚度矩阵,据此预估了 Exechon 并联模块在典型位姿和工作全域内的刚度性能.

上述各种刚度建模方法都较为复杂,且影响机构刚度的因素较多,难以考虑全面.王南等<sup>[6]</sup>利用有限元分析方法研究了两种 3-RPS 并联机构的变形情况,并将结果与考虑约束反力所构造的刚度模型计算结果相互验证,但所建立的有限元模型未考虑不同运动副间算法的区别.李育文等<sup>[7]</sup>采用有限元方法基于 ANSYS 建立了 6-UPS 机床的有限元模型,分析了其工作空间内的刚度分布,并验证了其有限元模型的合理性,但未考虑机构处于不同位姿时的刚度变化.笔者所在研究团队提出了一种基于 6-SPU(S 表示球面副、P 表示移动驱动副、U 表示万向铰)六自由度并联机构的集制孔与铆接为一体的可移动式机器人,团队成员刘文彩等<sup>[8]</sup>分析了机构的运动学性能.在此基础上,本文拟基于位置逆解进行铆枪轨迹规划,采用有限元分析的方法,在考虑机构不同位姿及各运动副算法的基础上,对机构刚度(即变形、应力应变)进行静力学分析,以期对 6-SPU 并联机构

的优化设计提供理论依据。

### 1 基于位置逆解的铆枪轨迹规划

#### 1.1 机器人构型

针对传统工艺协调复杂、流程冗长、加工范围受限等问题,设计了一种基于 6-SPU 并联机构的铆孔机器人,其加工示意图见图 1. 该机器人足端锁紧环可与定平台上的锁紧销可靠嵌入、脱离,实现摆腿/落腿运动,机器人行至目的工位时,动平台调姿,各足支撑于定平台,固结于动平台的铆枪执行加工任务。

本文提出的 3 闭环支链 6-SPU 并联机构如图 2 所示,每条支链(步行腿)均为一个含复合

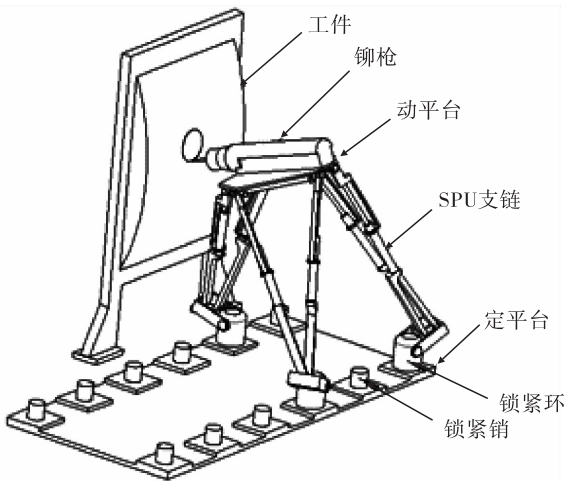


图 1 铆孔机器人加工示意图

Fig. 1 Schematic diagram of riveting robot processing

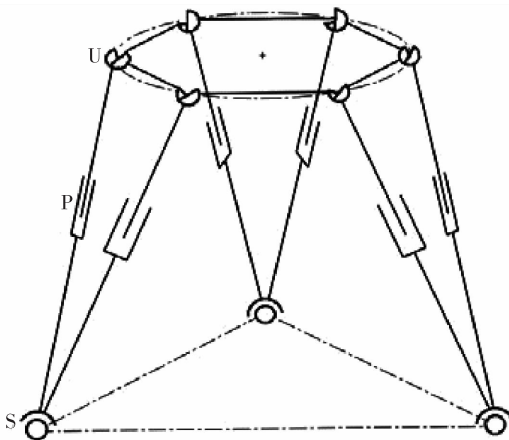


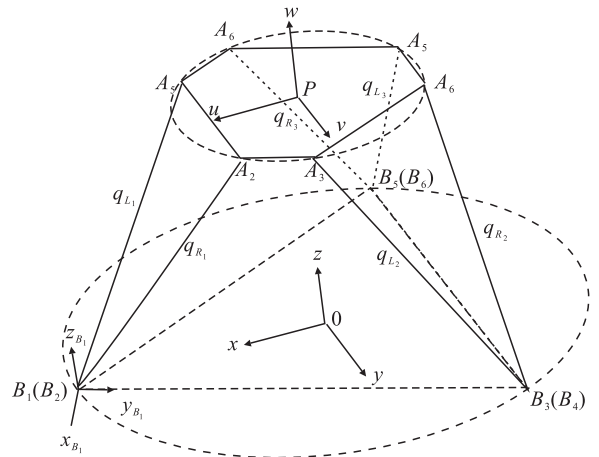
图 2 6-SPU 并联机构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of 6-SPU mechanism

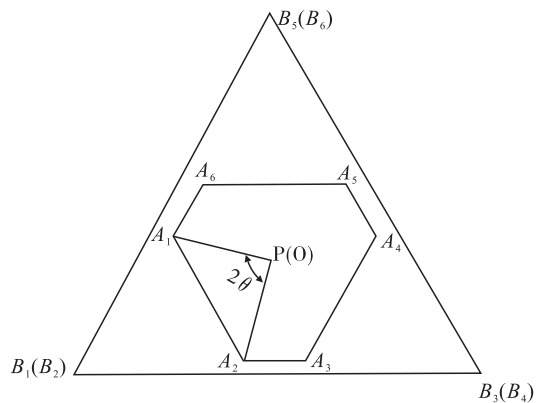
球面副 S 的 2-SPU 两自由度并联机构,可实现沿某一锁紧销队列的直线步行,且保持落足姿态恒与定平台垂直。

#### 1.2 位置逆解

机构坐标系设置及初始位形如图 3 所示. 建立定平台坐标系  $\{O - xyz\}$ : 坐标系原点  $O$  为等边三角形定平台的形心,  $x$  轴正方向由  $O$  指向复合球面副形心  $B_1(B_2)$ ,  $z$  轴正方向垂直定平台向上,  $y$  轴正方向由右手法则确定. 建立动平台坐标系  $\{P - uvw\}$ : 坐标系原点  $P$  为六边形动平台的形心,  $u$  轴正方向由  $P$  指向动平台上两万向铰形心  $A_1$  和  $A_2$  的连线中点,  $w$  轴正方向垂直动平台向上,  $v$  轴正方向由右手法则确



a) 机构坐标系设置



b) 初始位形时定、动平台布局

图 3 机构坐标系设置及初始位形

Fig. 3 Mechanism coordinate system setting and initial configurational

定.以支链一为例说明建立支链坐标系  $\{B_i - x_{B_i}, y_{B_i}, z_{B_i}\}$  ( $i=1, 2, \dots, 6$ , 下同)的方法:坐标系原点取  $B_1$ ,  $y_{B_i}$  轴正方向由  $B_1$  指向  $B_3$ ,  $z_{B_i}$  轴正方向垂直于  $B_1 B_3 B_5$  所在平面且向外,  $x_{B_i}$  轴正方向由右手法则确定.

记定平台外接圆和动平台外接圆半径分别为  $r_o$  和  $r_p$ , 动平台长边所对圆心角为  $2\theta$ . 机构初始位形为动平台、定平台平行, 且动坐标系、定坐标系各坐标轴分别平行.

由上可知, 动平台上各万向铰形心  $A_i$  在动坐标系  $\{P - uvw\}$  中的位置矢量  $A_i^P$ :

$$A_1^P = (R_p \cos\theta, -R_p \sin\theta, 0)$$

$$A_2^P = (R_p \cos\theta, R_p \sin\theta, 0)$$

$$A_3^P = (R_p \cos(2\pi/3 - \theta), R_p \sin(2\pi/3 - \theta), 0)$$

$$A_4^P = (-R_p \sin(\pi/2 - \theta), R_p \cos(2\pi/3 - \theta), 0)$$

$$A_5^P = (-R_p \sin(\pi/6 + \theta), -R_p \cos(\pi/6 + \theta), 0)$$

$$A_6^P = (R_p \sin(\theta - \pi/6), -R_p \cos(\theta - \pi/6), 0)$$

定平台内各复合球面副形心  $B_j$  ( $j=1, 2, \dots, 6$ ) 在定坐标系  $\{O - xyz\}$  中的位置矢量  $B_j^O$ :

$$B_1^O = B_2^O = (R_o, 0, 0)$$

$$B_3^O = B_4^O = (-R_o/2, \sqrt{3}R_o/2, 0)$$

$$B_5^O = B_6^O = (-R_o/2, -\sqrt{3}R_o/2, 0)$$

6-SPU 机构满足如下位置矢量方程

$$B_i^O + q_i = P^O + PA_i^O \quad (1)$$

其中,  $PA_i^O = R \cdot PA_i^P$ ,  $PA_i^P$  和  $PA_i^O$  分别为  $PA_i$  在动平台、定平台坐标系内的矢量, 动平台形心在定坐标系中位置矢量  $P^O = (x, y, z)$ ,  $q_i$  为支链内单一驱动位移矢量, 动坐标系相对于定坐标系的姿态变换矩阵  ${}^P_0R_{xyz}(\alpha, \beta, \gamma)$  为

$${}^P_0R_{xyz}(\alpha, \beta, \gamma) =$$

$$\begin{pmatrix} \cos\beta\cos\gamma & \sin\alpha\sin\beta\cos\gamma - \cos\alpha\sin\gamma & \cos\alpha\sin\beta\cos\gamma + \sin\alpha\sin\gamma \\ \cos\beta\sin\gamma & \sin\alpha\sin\beta\sin\gamma + \cos\alpha\cos\gamma & \cos\alpha\sin\beta\sin\gamma - \sin\alpha\cos\gamma \\ -\sin\beta & \sin\alpha\cos\beta & \cos\alpha\sin\beta \end{pmatrix}$$

由式(1)可得单一驱动位移矢量

$$q_i = P^O + PA_i^O - B_i^O$$

### 1.3 铆枪轨迹规划

本文以飞机某大型薄壁圆柱面工件表面铆接制孔为例, 多个铆接孔形成的空间曲线即为铆枪末端轨迹.

基于微分几何曲线论中的弗莱纳-雪列矢量<sup>[9]</sup>, 可建立铆接点坐标系. 运用 Matlab 软件计算出轨迹各点处的单位切向量  $\vec{e}_\tau$ , 单位法向量  $\vec{e}_n$  和单位次法向量  $\vec{e}_b$ . 为保证铆接制孔的加工精度, 铆接作业时铆枪的前进方向必须与工件表面铆接点坐标系的  $\vec{e}_\tau$  方向一致, 铆枪主轴方向必须与铆接点坐标系的  $\vec{e}_b$  方向一致. 铆接轨迹及铆接点处坐标轴设置如图 4 所示, 各铆接点位置坐标及对应的铆枪主轴姿态角见表 1.

## 2 6-SPU 并联机构静力学分析

### 2.1 有限元分析前处理

并联机构的刚度模型是位形的函数, 在应用有限元软件对并联机构分析时, 应针对不同位形对并联机构进行有限元分析<sup>[10]</sup>. 利用 Solidworks 软件建立机构的实体模型, 将并联机构按照实际情况装配到一起. 由表 1 通过位置逆解算得并联机构的位姿参数, 将并联机构调整到需要的位姿并导入到 Ansys Workbench 中, 在建模的过程中没有采用加权的方法. 6-SPU 并联机构在导入有限元分析软件之后, 需根据

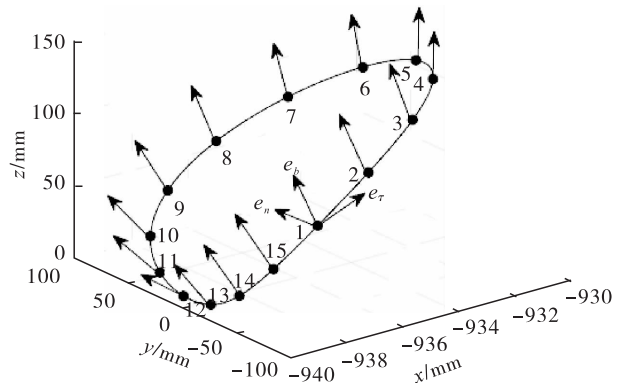


图 4 铆接轨迹及铆接点坐标轴设置

Fig. 4 Riveting path and riveting point coordinates setting

表1 铆接孔位置坐标及铆接时铆枪主轴姿态角

Table 1 Riveting hole positions and riveting gun attitude angles

序号	铆接孔位置 $(x(\eta), y(\eta), z(\eta))$ /mm	铆枪主轴姿态角 $(e_{bx}, e_{by}, e_{bz})$ /( $^{\circ}$ )
1	(-935.530, -54.830, 89.020)	(175.084, 87.318, 85.880)
2	(-933.400, -40.220, 109.180)	(174.551, 89.026, 84.643)
3	(-931.850, -18.650, 121.680)	(173.089, 89.934, 83.089)
4	(-931.500, 6.190, 124.330)	(172.610, 89.985, 82.610)
5	(-932.490, 29.440, 116.650)	(173.784, 90.372, 83.796)
6	(-934.420, 48.480, 100.000)	(175.060, 91.830, 85.413)
7	(-936.580, 58.660, 77.280)	(174.887, 93.236, 86.045)
8	(-938.300, 58.730, 52.360)	(174.817, 93.345, 86.046)
9	(-939.300, 48.640, 29.520)	(176.277, 91.782, 86.732)
10	(-939.670, 30.120, 12.760)	(178.212, 90.401, 88.258)
11	(-939.750, 6.370, 4.990)	(179.554, 89.976, 89.554)
12	(-939.730, -18.480, 7.570)	(178.981, 89.917, 88.985)
13	(-939.550, -40.130, 20.050)	(177.337, 89.065, 87.506)
14	(-938.900, -54.810, 40.250)	(175.339, 87.284, 86.215)
15	(-937.530, -60.000, 64.650)	(174.727, 86.509, 86.053)

运动副连接条件对每个零件设定接触约束,其中固定处采用 bonded 连接和 MPC 算法,移动副和转动副处采用 No separation 连接和 Pure penalty 算法,接触设定完成后,对装配体在定平台底面设定的约束为 Fixed Support. 每种并联机构的材料设定为 structural steel,弹性模量  $E = 200 \text{ GPa}$ ,密度为  $7850 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ,泊松比  $\gamma = 0.3$ ,屈服极限  $\delta = 350 \text{ MPa}$ . 机器人整体模型采用四面体单元划分网格(见图5),不考虑应力走向,单元数目为 27 968,节点数为 80 397. 设铆枪进行铆孔作业时承受沿铆枪轴线的轴向工作载荷  $F = 110 \text{ N}$ .

### 2.2 静力学分析

静力学分析可以全面、直观地评价机构的变形与应力分布情况<sup>[11]</sup>. 对机构进行静力学分析,其结果如图6和图7所示.

由图6可以看出,机构动平台在  $x, y, z$  方向最大变形量最大值分别为  $5.092 \times 10^{-7} \text{ m}$ ,  $27.586 \times 10^{-7} \text{ m}$  和  $51.847 \times 10^{-7} \text{ m}$ . 机构平台在  $z$  方向最大变形量最大,说明机构在  $z$  方向的刚度低于其他两个方向,即在  $z$  方向承载能

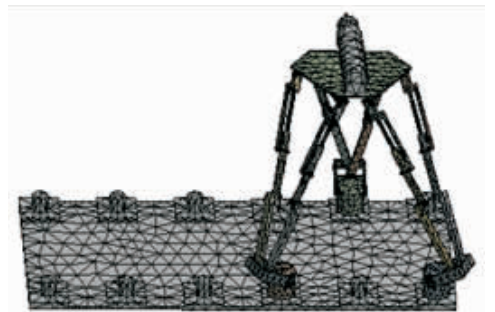


图5 机器人整体网格划分模型

Fig. 5 Integral robot mesh generation model

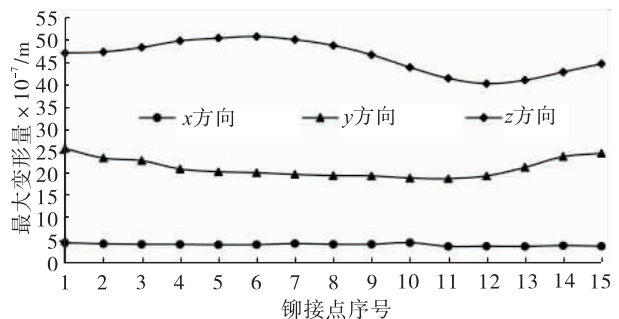


图6 动平台  $x, y, z$  方向最大变形量

Fig. 6 Maximum deformation of the moving platform in the  $x, y,$  and  $z$  directions

力较差;机构动平台在  $x$  方向的最大变形量最小,说明机构在  $x$  方向的刚度最好,即在  $x$  方向

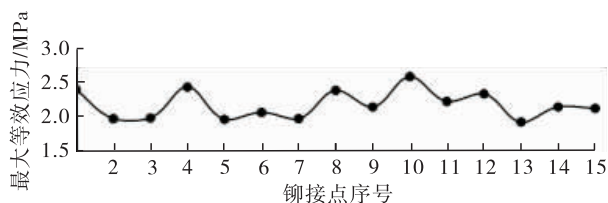


图7 机构最大等效力

Fig. 7 Maximum equivalent stresses of the mechanism

承载能力强于其他两个方向. 通过查阅相关文献可知,飞机铆接制孔误差一般应控制在  $2 \times 10^{-5}$  m 以内<sup>[8]</sup>,机构整体在  $x, y, z$  方向的最大变形量均小于该值,满足铆接加工的精度要求.

由图7可以看出,机构的最大等效力最大值为 2.698 MPa,远小于材料的屈服极限,能够满足铆接加工所需的强度要求.

分析过程中,机构在工作状态中产生的变形与等效力较大的区域主要分布在动平台和驱动杆上,其他零件处的变形和应力均较小.

### 3 结语

针对高端制造业对大型薄壁复杂曲面工件的精密、高效、柔性加工需求,本文对基于6-SPU 并联机构的新型步行式铆孔机器人进行了静力学分析. 基于建模、求解机构位置逆解,完成了机器人铆接轨迹规划,确定了铆枪末端的精确轨迹和正确的铆孔作业姿态;以 Solid-Works 为平台对6-SPU 并联机构进行三维建模,并运用有限元分析软件 ANSYS 中的 Workbench 模块对此机构的刚度进行静力学分析. 结果表明:机器人最大变形量最大值为  $51.847 \times 10^{-7}$  m,在飞机铆接制孔误差允许范围内;机构最大等效力最大值为 2.698 MPa,远小于材料屈服极限.

该结果有力证明了本文提出的机构构型、位置逆解和轨迹规划模型的合理性,有限元分析结果也表明机构满足铆接加工精度与强度要求. 该成果为自动铆接机器人的结构优化和性

能分析提供了必要的理论依据. 根据文中静力学的分析结果,对自动铆接机器人变形和应力较大区域的零部件进行进一步的结构和尺寸优化,以提高自动铆接机器人的整体性能,将是下一步的工作重点.

### 参考文献:

- [1] 汪满新,王攀峰,宋轶民,等. 4 自由度混联机器人静刚度分析[J]. 机械工程学报,2011,47(15):9.
- [2] 窦永磊,汪满新,王攀峰,等. 一种6 自由度混联机器人静刚度分析[J]. 机械工程学报,2015,51(7):38.
- [3] CAO W A, YANG D H, DING H F. A method for stiffness analysis of overconstrained parallel robotic mechanisms with Scara motion [J]. Robotics and Computer-integrated Manufacturing,2018(49):426.
- [4] 张东胜,许允斗,姚建涛,等. 2RPU/UPR + RP 五自由度混联机器人静刚度分析[J]. 中国机械工程,2018,29(6):712.
- [5] 张俊,赵艳芹. Exechon 并联模块的静刚度建模与分析[J]. 机械工程学报,2016,52(19):34.
- [6] 王南,高鹏,崔国华,等. 两种并联机构的静刚度及有限元分析[J]. 河北工程大学学报(自然科学版),2013,30(1):87.
- [7] 李育文,张华,杨建新,等. 6-UPS 并联机床静刚度的有限元分析和实验研究[J]. 中国机械工程,2004(2):20.
- [8] 刘文彩,许勇,陈佳丽,等. 基于6-SPU 并联机构的飞机壁板铆接机器人逆运动学分析[J]. 机械设计与研究,2018,34(2):76.
- [9] 应灿. 焊接机器人工作站协同运动的轨迹优化研究[D]. 广州:华南理工大学,2013.
- [10] 王友渔,黄田,CHETWYND D,等. Tricept 机械手静刚度解析建模方法[J]. 机械工程学报,2008(8):13.
- [11] 张军,何芳. 基于 ANSYS 一种转运小车关键件有限元分析[J]. 装备制造工艺,2016(10):15.



引用格式:王威,许勇,刘勇,等. 基于 Matlab 的双机器人协作空间求解及分析[J]. 轻工学报,2019,34(4):102-108.

中图分类号:TP242 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.04.015

文章编号:2096-1553(2019)04-0102-07

# 基于 Matlab 的双机器人协作空间求解及分析

## Double-robot collaborative workspace solution and analysis based on Matlab

王威,许勇,刘勇,宋伟

WANG Wei, XU Yong, LIU Yong, SONG Wei

### 关键词:

双机器人;协作空间;  
蒙特卡洛法;极值理论;  
Matlab 仿真

上海工程技术大学 机械与汽车工程学院,上海 201620

*School of Mechanical and Automotive Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China*

### Key words:

double-robot;  
collaborative workspace;  
Monte Carlo method;  
extreme value theory;  
Matlab simulation

**摘要:**以双机器人协作系统模型为研究对象,根据其 D-H 参数求出运动学正解,基于 Matlab,利用蒙特卡洛方法解出双机器人工作空间的公共区域,采用极值理论法和搜索区域法对公共区域边界曲线进行提取,可确定双机器人协作空间的界限曲面和极限位置.仿真结果表明,该方法具有易于实现、空间表达直观等优点,可应用于其他结构形式和任意自由度的双臂机器人类似问题求解.

收稿日期:2018-12-03

作者简介:王威(1994—),男,江苏省徐州市人,上海工程技术大学硕士研究生,主要研究方向为双机器人协同焊接任务规划与应用.

通信作者:许勇(1973—),男,河南省南阳市人,上海工程技术大学副教授,主要研究方向为机器人机构学.

**Abstract:** Taking the double-robot cooperation system as the research object, the kinematics positive solution was obtained according to its D-H parameter. Based on Matlab, the Monte Carlo method was used to solve the common area of the double-robot workspace, and the extreme value theory and search area method were used to the common area boundary. By extracting the curve, the boundary surface and the extreme position of the dual robot cooperation space could be determined. The simulation results showed that the method had the advantages of easy implementation and intuitive spatial expression, and could be applied to any dual-arm robots with other structural forms and arbitrary degrees of freedom to solve similar problems.

## 0 引言

目前,在工业生产制造领域中,双工业机器人协同作业得到了广泛的应用,如双机器人协同焊接、协同搬运、协同喷漆等.多机器人协同作业的工作空间问题是多机器人系统研究中的难点之一<sup>[1]</sup>.双机器人的协作空间代表了机器人的活动范围,它是双机器人工作能力的重要表现<sup>[2]</sup>.协作工作空间的研究,对机器人的机构设计、路径规划、轨迹规划、避碰研究、最佳操作位形研究等,都有相当重要的意义<sup>[3-4]</sup>.

芦俊等<sup>[5]</sup>采用数值法对双臂智能机器人的协作工作空间进行了分析研究,得出了最佳协作空间,该方法使用几何计算,数据量大、精确度低,相比计算机数据计算存在一定的误差;赵燕江等<sup>[6]</sup>提出了基于 Matlab 的机器人工作空间求解方法,该方法简单、快速、准确,可通过 Matlab 输出可视化结果,但该方法只针对单一机械臂的工作空间求解;谢生良等<sup>[7]</sup>采用蒙特卡洛法分析了双臂机器人的工作空间,并采用按列和按角度划分的方法提取协作空间的边界点,此方法提取精度高,较准确,但相对计算量较大.

当前对机器人工作空间的求解多集中在双臂机器人和单个工业机器人上,对于双机器人协作空间的研究很少<sup>[7]</sup>.鉴于此,本文拟在双臂机器人工作空间求解方法的基础上,以双机器人协作系统为参考模型,通过确定 D-H 参数和

求解运动学正解,基于 Matlab,利用蒙特卡洛法<sup>[8]</sup>对双机器人协同工作空间进行分析,按列划分边界点,并对边界点进行曲线拟合,进而求出最佳协作空间,以期为双机器人的动力学分析、协调轨迹规划、机器人本体尺度优化奠定理论基础.

## 1 双机器人运动学分析

本文以由两个六自由度工业机器人组成的双机器人协作系统为研究对象,该机器人协作系统旨在用于工业生产上协同焊接、铆钉、装配等复杂任务作业.

在 SolidWorks 2012 软件中建立双机器人协作系统的结构模型如图 1 所示.该系统模型采用主机器人 1(左)和从机器人 2(右)结构布局,两机器人距离为  $2L$ .



图 1 双机器人协作系统的结构模型  
Fig. 1 Structure model of double-robot collaborative system

### 1.1 坐标系的建立及 D-H 参数的确定

用两种坐标系描述机器人的运动学<sup>[5]</sup>:一种是单个机器人的局部坐标系,代表主机器人的坐标系为  $O_1X_1Y_1Z_1$ ,代表从机器人的坐标系

为  $O_2X_2Y_2Z_2$ ; 另一种是全局坐标系  $OXYZ$ , 主机机器人与从机器人的局部坐标系关于全局坐标系对称. 根据 D-H 坐标理论, 建立机器人的坐标系如图 2 所示, 两机器人位置距离  $2L = 3000 \text{ mm}$ , 定义世界坐标系与主机器人 1 基坐标系重合, 所得 D-H 参数见表 1. 其中, 连杆扭角  $\alpha_i$  是  $i$  杆关节轴线之间的夹角, 即是  $Z_i$  轴相对于  $Z_{i-1}$  轴的平行角度; 连杆长度  $a_i$  是  $i$  杆关节轴线的公垂线距离, 即是  $Z_i$  轴相对于  $Z_{i-1}$  轴的长度; 偏置量  $d_i$  是连杆长度  $a_i$  和  $a_{i-1}$  在  $i$  号关节轴线上截取的距离, 即是  $Z_{i-1}$  轴相对于  $Z_i$  轴的公共法线距离; 将  $a_i$  沿轴线  $i$  平移与  $a_{i-1}$  相交, 两者之间的夹角就是关节转角  $\theta_i$ , 即是  $X_i$  轴相对于  $X_{i-1}$  轴构成的角度,  $Z_{i-1}$  轴的方向为正方向.

### 1.2 运动学正解的求得

该双机器人协同系统模型由两台相同型号的 6 轴机器人组成, 在此只对单个 6 轴工业机器人进行运动学分析即可. 以主机器人 1 为研究对象, 从机身开始依次进行杆件标注, 根据 D-H 参数, 对双机器人协作系统每个关节建立 D-H 坐标系, 连杆变换矩阵和运动学正解公式<sup>[9]</sup> 分别为

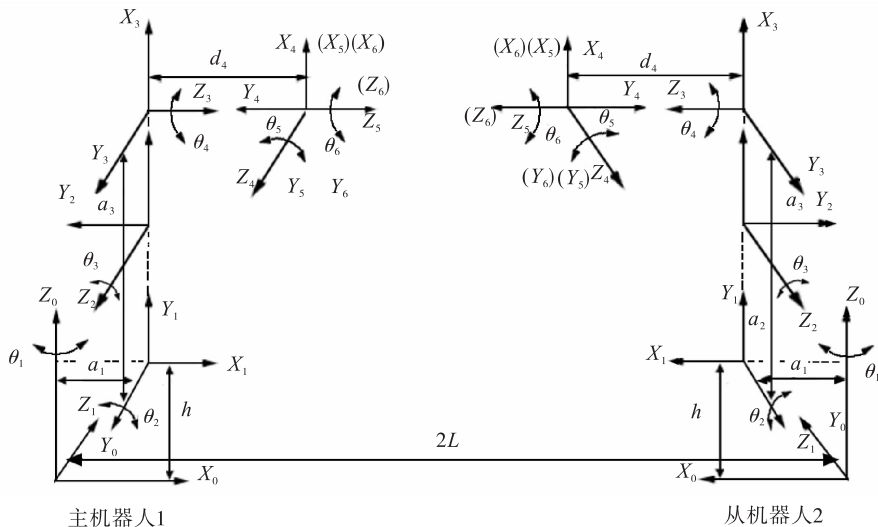


图 2 双机器人协作系统的 D-H 坐标系

Fig. 2 D-H coordinate system of double-robot collaborative system

$${}_{i-1}T_i = \begin{bmatrix} c_i & -s_i & 0 & \alpha_{i-1} \\ s_i c \alpha_{i-1} & c_i c \alpha_{i-1} & -s_i \alpha_{i-1} & -d_i s \alpha_{i-1} \\ s_i s \alpha_{i-1} & c_i s \alpha_{i-1} & c \alpha_{i-1} & d_i c \alpha_{i-1} \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (1)$$

$${}^0T_6 = {}^0T_1 T_2 T_3 T_4 T_5 T_6 T \quad (2)$$

其中,  $c_i = \cos \theta_i$ ,  $s_i = \sin \theta_i$ ,  $c \alpha_{i-1} = \cos \alpha_{i-1}$ ,  $s \alpha_{i-1} = \sin \alpha_{i-1}$ . 通过式①依次完成相邻关节间的齐次坐标转换, 可以得到所有相邻关节的齐次变换矩阵 ${}^0T_1, {}^1T_2, {}^2T_3, {}^3T_4, {}^4T_5, {}^5T_6$ , 将各个运动参数代入式②后得运动学正解

$${}^0T_6 = \begin{bmatrix} n_x & o_x & a_x & p_x \\ n_y & o_y & a_y & p_y \\ n_z & o_z & a_z & p_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

进而可以得到机器人末端在参考坐标系中相对基坐标系的位置向量

$$\begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_1 (a_2 c_3 + a_3 c_{23} - d_4 s_{23}) - a_1 s_1 \\ s_1 (a_2 c_3 + a_3 c_{23} - d_4 s_{23}) + a_1 s \\ -a_3 s_{23} - a_2 s_2 - d_4 c_{23} \end{bmatrix} \quad (3)$$

由式③可知, 在机器人各个参数已知的情下, 6 轴工业机器人前 3 个关节角决定机器人末端执行器的位置坐标, 后 3 个关节角决定



表 1 双机器人协作系统的 D-H 参数表

Table1 D-H parameters table of double-robot collaborative system

机器人关节角序号 $i$	连杆扭角 $\alpha_{i-1}/(^{\circ})$	连杆长度 $a_{i-1}/\text{mm}$	偏置量 $d_i/\text{mm}$	关节转角 $\theta_i/(^{\circ})$
1	0	0	0	(-180,180)
2	-90	255	0	(-155,45)
3	0	885	0	(-160,120)
4	-90	35	980	(-350,350)
5	90	0	0	(-140,140)
6	-90	0	0	(-345,345)

机器人末端执行器的姿态坐标,机器人的工作空间为末端执行器所能达到的空间位置,即位置坐标只与变量  $\theta_1, \theta_2, \theta_3$  有关,故只要满足式③中所有点的集合就构成了机器人的工作空间,从而得到机器人工作空间的点的集合为

$$p = \left\{ \begin{array}{l} x = f_x(\theta_1, \theta_2, \theta_3) \\ (x, y, z) \quad y = f_y(\theta_1, \theta_2, \theta_3), \\ z = f_z(\theta_1, \theta_2, \theta_3) \end{array} \quad \begin{array}{l} \theta_{\min} \leq \theta_i \leq \theta_{\max} \\ t = 1, 2, 3 \end{array} \right\} \textcircled{4}$$

## 2 双机器人协作工作空间的求解

### 2.1 数学模型方程推导

由公式④可得到单个机器人在局部坐标系下的末端轨迹工作空间,建立双机器人协作工作空间方程点的集合模型,从而求得协作工作空间的公共区域.定义主机器人 1 的工作空间集合为  $p^1$ ,从机器人 2 的工作空间集合为  $p^2$ ,根据式④将局部坐标系下的工作空间向世界坐标系下转换,得到主机器人 1 和从机器人 2 在世界坐标系下的工作空间集合,分别为

$$p^1 = \left\{ \begin{array}{l} x^1 = f_x^1(\theta_1^1, \theta_2^1, \theta_3^1) \\ (x^1, y^1, z^1) \quad y^1 = f_y^1(\theta_1^1, \theta_2^1, \theta_3^1), \\ z^1 = f_z^1(\theta_1^1, \theta_2^1, \theta_3^1) - L \end{array} \quad \begin{array}{l} \theta_{\min}^1 \leq \theta_i^1 \leq \theta_{\max}^1 \\ t = 1, 2, 3 \end{array} \right\} \textcircled{5}$$

$$p^2 =$$

$$\left\{ \begin{array}{l} x^2 = f_x^2(\theta_1^2, \theta_2^2, \theta_3^2) \\ (x^2, y^2, z^2) \quad y^2 = f_y^2(\theta_1^2, \theta_2^2, \theta_3^2), \\ z^2 = f_z^2(\theta_1^2, \theta_2^2, \theta_3^2) - L \end{array} \quad \begin{array}{l} \theta_{\min}^2 \leq \theta_i^2 \leq \theta_{\max}^2 \\ t = 1, 2, 3 \end{array} \right\} \textcircled{6}$$

联立式⑤和⑥,得到双机器人协作系统的公共区域的工作空间集合  $M = p^1 \cap p^2$ ,即

$$M = \left\{ \begin{array}{l} x = x^1 = x^2 \\ (x, y, z) \quad y = y^1 = y^2, \\ z = z^1 = z^2 \end{array} \quad \begin{array}{l} (x^1, y^2, z^3) \in p^1 \\ (x^2, y^2, z^2) \in p^2 \end{array} \right\} \textcircled{7}$$

### 2.2 工作空间求解

运用蒙特卡洛法建立空间云图,该方法可以使工作空间云图在计算机中显示,计算速度快且误差与维数无关.工作空间求解过程如图 3 所示.首先,在 Matlab 环境下,利用随机关节变量式  $\theta_i = \theta_{i_{\min}} + (\theta_{i_{\max}} - \theta_{i_{\min}}) \times \text{Rand}(N, 1)$ ,  $i = 1, 2, 3$ ,在各个关节角范围内,离散主机器人 1 和从机器人 2 的各个关节角,并且按顺序组合尽可能多的离散关节量值,确保取不同步长时所有关节角都均匀离散且所得离散值个数相同.然后根据正运动学方程求解公式③和双机器人协作空间点的交集集合式⑦求出末端执行器的空间坐标值<sup>[10]</sup>,其中重合部分为双机器人工作空间公共区域,即协作空间(见图 4).

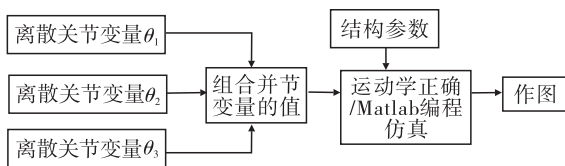


图 3 工作空间的求解过程示意图

Fig. 3 Schematic diagram of workspace solution process

工作空间的大小与机器人结构参数有关,若双机器人的工作空间刚好包裹住待加工工件实际大小,即为最佳协作空间的区域.在已知待加工工件尺寸大小的基础上,通过上述方法求解,得出机器人工作空间的大小,可为机器人的

选型提供依据,降低机器人购买成本,有效地减少不必要的损耗.

以上所求得的工作空间都是不考虑机器人本身避障情况<sup>[11]</sup>下所得到的工作空间.

### 2.3 协作工作空间边界曲线数值计算

采用极值理论和搜索区域法对协作工作空间边界曲线进行提取.假设机器人工作空间由  $N$  个平面组成,每个平面上都至少有一个在一定范围内的蒙特卡洛点,因此只要得到每个平面上点的范围,这些点在面上层层重叠组成的所有点的集合即为机器人工作空间.现对三维图中的内切图图 4c) 中的双机器人工作空间边界进行边界提取,图中重合部分即为协作工作空间.对机器人协作工作空间边界曲线提取具体步骤如下.

**步骤 1** 设  $X$  轴的最大区域为  $k = |X_{max} - X_{min}|$ ,将图 4c) 所在面沿  $X$  轴平均分为  $N$  列,设列的宽度为  $b = k/N$ , $N$  要无限大,从而确保所提取的边界曲线的精确度.

**步骤 2** 在  $N$  个列中,沿着  $Z$  轴坐标系搜索所在列的  $Z_{max}$  和  $Z_{min}$ ,然后确定它们所对应的坐标极值点.

**步骤 3** 在搜索  $Z_{max}$  和  $Z_{min}$  过程中可能出现空洞:如果在某一列发现两个相邻的点之间的差值远远大于列的宽度  $b$ ,就表明在此点有空洞出现.此时,这两个相邻的点记为边界点,依次类推,直至搜索到  $X$  轴的最大区域  $k$  点,得到每列的边界曲线点.

**步骤 4** 依次寻找最近点连接所求的所有边界点,建立边界曲线.

## 3 数值计算与分析

为验证本文双机器人协作工作空间求解方法的有效性,运用上述求解方法,基于 Matlab 求解出双机器人工作空间的空间区域和极限位置.6R 双机器人 D-H 参数见表 1,两机器人位置距离  $2L = 3000$  mm,关节  $\theta_4 - \theta_6$  对末端执行器的姿态有影响,而对执行器末端点位置没有

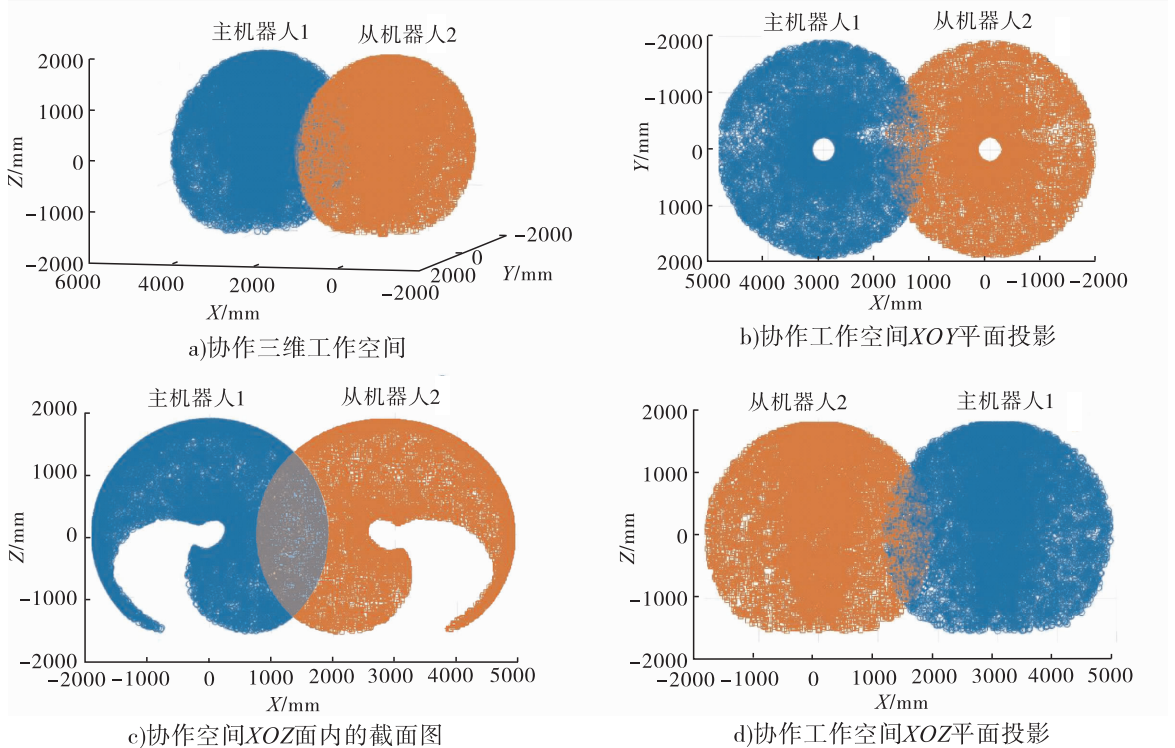


图 4 协作工作空间图

Fig. 4 Collaboration workspace diagram

影响,故未计算在内.单个机器人工作空间极限位置和关节变量参数计算结果见表 2,由此得到协作工作空间极限位置、主机器人 1 和从机器人 2 关节变量参数计算结果见表 3.连接所求的所有边界点,得到二维工作空间曲线图,如图 5 所示,其中的公共区域为双机器人能够到达的区域,即协作工作空间的边界轮廓.

由表 3 和图 5 可知,通过求得双机器人协作空间边界图,从而确定机器人工作空间边界

表 2 单个机器人工作空间极限位置和关节变量参数

Table 2 Limit position and joint variable parameters of single robot workspace

极限位置/mm	$\theta_1/\text{rad}$	$\theta_2/\text{rad}$	$\theta_3/\text{rad}$
$X_{\max} = 1\ 872.67$	0.678 6	-0.458 6	-1.566 3
$X_{\min} = -1\ 870.46$	-1.775 3	-0.084 3	-2.217 5
$Y_{\max} = 1\ 880.29$	-1.075 3	-2.405 9	0.444 0
$Y_{\min} = -1\ 880.29$	2.847 1	-2.914 2	-2.188 9
$Z_{\max} = 1\ 880.38$	0.010 9	-1.351 1	-1.258 5
$Z_{\min} = -1\ 880.38$	0.109 7	-1.648 6	0.155 7

表 3 协作工作空间极限位置、主机器人 1 和从机器人 2 关节变量参数

Table 3 Limit position of collaborative workspace, joint variable parameters of master robot 1 and slave robot 2

极限位置/mm	$\theta_1^1/\text{rad}$	$\theta_2^1/\text{rad}$	$\theta_3^1/\text{rad}$
$X_{\max} = 2\ 102.56$	1.646 6	-1.847 9	-1.847 9
$X_{\min} = 900.87$	-0.827 1	0.052 1	0.052 1
$Y_{\max} = 1\ 112.33$	1.775 8	0.400 4	0.400 4
$Y_{\min} = -1\ 112.33$	0.513 4	-2.890 6	-2.890 6
$Z_{\max} = 1\ 290.78$	0.914 7	-0.530 8	-0.530 8
$Z_{\min} = 1\ 290.78$	0.804 1	-2.542 1	-2.542 1

极限位置/mm	$\theta_1^2/\text{rad}$	$\theta_2^2/\text{rad}$	$\theta_3^2/\text{rad}$
$X_{\max} = 2\ 102.56$	1.646 6	-1.847 9	0.779 2
$X_{\min} = 900.87$	-0.827 1	0.052 1	0.052 1
$Y_{\max} = 1\ 112.33$	1.775 8	0.400 4	0.400 4
$Y_{\min} = -1\ 112.33$	0.513 4	-2.890 6	-2.890 6
$Z_{\max} = 1\ 290.78$	0.914 7	-0.530 8	-0.530 8
$Z_{\min} = 1\ 290.78$	0.804 1	-2.542 1	-2.542 1

极限位置,通过逆解公式即可求得每个极限位置所对应的各个关节角值,具有易于实现、空间表达直观等优点.该双机器人协作工作空间求解方法相比李国栋等<sup>[12]</sup>运用代数求解方法求解,可以避免求解方程数目多、计算量大、空间表达不直观等不足,并且该方法可应用于其他结构形式和任意自由度的双臂机器人类似问题求解.

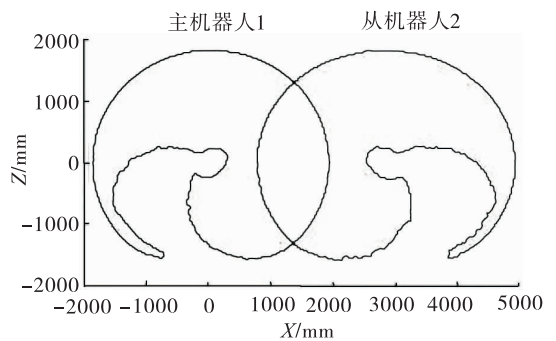


图 5 双机器人协作空间二维边界图

Fig. 5 Two-dimensional boundary diagram of double-robot collaborative workspace

#### 4 结语

本文以双机器人协作系统模型为研究对象,根据其 D-H 参数求出运动学正解,通过 Matlab 对双机器人协作运动的工作空间进行求解,并通过极值搜索域法进行协作空间边界曲线的提取与绘制,从而得到双机器人协作空间的公共区域形状和在空间内协作空间的极限位置参数.仿真结果表明,该方法具有易于实现、空间表达直观等优点,可应用于其他结构形式和任意自由度的双臂机器人类似问题求解,从而为下一步在协作工作空间内研究双机器人协同作业的路径规划、动力学分析、机器人的机构参数优化,以及协作避碰问题奠定理论基础.

#### 参考文献:

[1] 赵大兴,周小明,李九灵. 集装箱喷漆机械手工作空间分析与仿真[J]. 机械设计,2008,25

- (2):15.
- [2] 曹毅,王树新,邱燕,等. 面向灵活工作空间的显微镜外科手术机器人设计[J]. 机器人, 2005,27(3):220.
- [3] 周律,周显明,汪亮,等. 基于蒙特卡罗方法的双臂机器人工作空间分析[J]. 机械传动, 2014,38(6):85.
- [4] 李情,茅健,朱姿娜,等. 双机械手协同运动模型及其工作空间分析[J]. 制造业自动化, 2017,39(11):44.
- [5] 芦俊,池宏勋,席文明,等. 双臂机器人的协作空间数值计算方法[J]. 中国机械工程,2001, 12(SI):125.
- [6] 赵燕江,张永德,姜金刚,等. 基于 Matlab 的机器人工作空间求解方法[J]. 机械科学与技术,2009,28(12):1657.
- [7] 谢生良,刘祚时. 双臂机器人工作空间的分析与仿真[J]. 机械传动,2018,42(6):139.
- [8] GUPTA K C, ROTH B. Design considerations for manipulator workspace[J]. Journal of Mechanical Design,1982,104(4):704.
- [9] 蔡自兴. 机器人学[M]. 2版. 北京:清华大学出版社,2009.
- [10] 李瑞峰,马国庆. 基于 Matlab 防人机器人双臂运动特性分析[J]. 华中科技大学学报(自然科学版),2013,41(Z1):343.
- [11] 曹彩霞,赵明扬,朱思俊,等. 双臂机器人协调搬运运动的运动学分析[J]. 组合机床与自动化加工技术,2017(8):44.
- [12] 李国栋,陈宁新. 机器人工作空间的界限面及其位置奇异曲面的代数求解方法[J]. 机器人,1988,2(1):50.
- (上接第73页)
- [17] MOHAPATRA D, BRAR S, TYAGI R, et al. Degradation of endocrine disrupting bisphenol a during pre-treatment and biotransformation of wastewater sludge [J]. Chemical Engineering Journal,2010,163(3):273.
- [18] 俞晓锋,涂瀛,刘萍,等. 过氧化氢对白色念珠菌的超微结构及酸性磷酸酶的影响[J]. 中国消毒学杂志,1987,4(4):183.
- [19] JIN B, NIU J, DAI J, et al. New insights into the enhancement of biochemical degradation potential from waste activated sludge with low organic content by Potassium Monopersulfate treatment [J]. Bioresource Technology,2018,265:8.
- [20] LI L, HE J, XIN X, et al. Enhanced bioproduction of short-chain fatty acids from waste activated sludge by potassium ferrate pretreatment [J]. Chemical Engineering Journal,2018,332:456.
- [21] 彭永臻,邢立群,金宝丹,等. 强碱预处理和碱性强度对剩余污泥发酵的影响[J]. 北京工业大学学报,2016,42(2):277.
- [22] 金宝丹,王淑莹,邢立群,等. 单过硫酸氢钾复合盐对剩余污泥厌氧发酵的影响[J]. 东南大学学报(自然科学版),2016,46(2):434.
- [23] CADORET A, CONRAD A, BLOCK J. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges [J]. Enzyme & Microbial Technology,2002,31(1/2):179.
- [24] VAN O, GEESEY G. Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs [J]. Microbial Ecology,1999,38(3):201.