

柚子酒酶法脱苦工艺优化及香气成分分析

江飞凤¹, 胡鹏刚¹, 田大江², 谭晓辉³, 潘雪梅¹, 闫锦¹

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳 550025) (2. 贵州茅台酒股份有限公司, 贵州仁怀 564500) (3. 荔波昌辉食业有限公司, 贵州荔波 558400)

摘要: 利用柚苷酶对柚子发酵酒进行脱苦技术处理, 同时应用顶空固相微萃取(HS-SPME)和气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析脱苦前后柚子酒体中的挥发性香气成分情况, 并结合感官分析判定脱苦效果。结果表明, 最佳脱苦工艺条件为: 酶解温度 50 °C、酶解时间 60 min、柚苷酶添加量 2.0 g/L 和酒液 pH 值为 4.0。脱苦后柚子酒中柚皮苷含量从 165.69 mg/L 下降到 76.76 mg/L、柠檬苦素含量从 17.08 mg/L 下降到 9.87 mg/L, 脱除率分别为 53.67%、42.19%。未经脱苦处理的柚子酒中分离鉴定出酯类、醇类、酸类、醛酮类和烯烃类等 69 种香气成分, 脱苦处理后挥发性香气成分减少了壬酸甲酯和肉豆蔻酸, 但生成了顺-9-十六碳烯酸乙酯、正己酸乙酯以及正丙醇三种新的香气成分, 这三种香气成分共同协同, 提升了酒体的风味。该研究表明采用柚苷酶对柚子酒进行脱苦效果较好, 且保留了柚子酒酒体的本质特征, 为柚子酒的制备工艺提供技术参考和研发地方特色柚子酒奠定理论基础。

关键词: 柚子酒; 脱苦; 柚皮苷; 柠檬苦素; 香气成分

文章编号: 1673-9078(2021)08-275-285

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.1207

Optimization of Enzymatic Process for Removing Bitterness and Analysis of Aroma Components in Pomelo Wine

JIANG Fei-feng¹, HU Peng-gang¹, TIAN Tai-jiang², TAN Xiao-hui³, PAN Xue-mei¹, YAN Jing¹

(1. Guizhou Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmaceutical, College of Brewing and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)(2. Guizhou Moutai Liquor Co. Ltd., Renhuai 564500, China)
(3. Libo Chang Hui Food Co. Ltd., Libo 558400, China)

Abstract: At the same time, headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to analyze the volatile aroma components in the grapefruit body before and after the bitter removal, and the bitter removal effect was determined by sensory analysis. The results showed that the optimum debittering conditions were as follows: enzymolysis temperature 50 °C, enzymolysis time 60 min, naringinase dosage 2.0 g / L and liquor pH 4.0. The content of naringin in grapefruit wine decreased from 165.69 mg/L to 76.76 mg/L, and the content of limonin decreased from 17.08 mg/L to 9.87 mg/L, with the removal rates of 53.67% and 42.19% respectively. Without debittering process, 69 kinds of aroma components were isolated and identified from pomelo wine, including esters, alcohols, acids, aldehyde, ketone and olefin etc.; after debittering process, the volatile aroma components reduced pelargonic acid methyl ester and nutmeg acid, but generated Ethyl cis-9-Hexadecanoate, ethyl caproate and normal propyl alcohol, the three kinds of aroma components improve the flavor of wine. The results showed that naringinase had a good debittering effect on grapefruit wine, and retained the essential characteristics of grapefruit wine body, which provided technical reference for the preparation of grapefruit wine and laid a theoretical foundation for the development of grapefruit wine with local characteristics.

Key words: pomelo wine; take off the bitter; naringin; limonin; the aroma components

引文格式:

江飞凤,胡鹏刚,田大江,等.柚子酒酶法脱苦工艺优化及香气成分分析[J].现代食品科技,2021,37(8):275-285

JIANG Fei-feng, HU Peng-gang, TIAN Tai-jiang, et al. Optimization of enzymatic process for removing bitterness and analysis of aroma components in pomelo wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 275-285

收稿日期: 2020-07-02

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2017]4414)

作者简介: 江飞凤(1993-),女,硕士研究生,研究方向:食品加工与安全

通讯作者: 胡鹏刚(1964-),男,教授,研究方向:酿酒工程

柚子(Pomelo)是芸香科植物,原产于东南亚的柑橘类水果,被认为是膳食纤维和抗氧化材料的良好来源,具有“天然水果罐头”的美称^[1,2]。柚子的营养成分丰富,富含糖类、维生素、矿物质、类黄酮,具有

健脾、润肺、补血、清肠、利便等功效,其果肉中含有类似胰岛素成分的铬和生物活性物质生物苷,具有降低血液黏稠度,减少血栓形成,对脑血栓、脑卒中等脑血管疾病有较好的预防作用和防止心脏血管破裂等药用价值^[3-6]。酿造的柚子酒营养价值高,含有17种氨基酸、维生素和矿物质等有益微量元素,具有饮用滋补双重作用^[7,8],其果香优雅怡人、酒香浓郁、口感纯正、清香舒适。此外,据研究报道柚子皮中含有多种生理活性成分^[9],如黄酮、多糖、香精油、类柠檬苦素、膳食纤维等^[10],提取的活性成分可用于制药产品及保健食品的开发^[11]。

目前,对于柚子深加工开发技术较少,基本只当做鲜果供食用,其柚皮一般也作为垃圾处理,不但对环境造成了很大程度的污染还导致资源的严重浪费^[5]。柚子的利用存在着一些技术上的难题,其中的难题之一有柚子经加工过程中苦味物质难以去除,严重影响柚子酒的质量和价值。而柚子中的苦主要来自于以柚皮苷、新橙皮苷等为代表的黄烷酮糖苷类化合物,以及柠檬苦素和诺米林为代表的高度氧化的四环三萜类次生代谢产物柠檬苦素类似物所造成^[12]。在柚子酒酿造过程中,对果实剥皮去籽处理,可有效控制原料本身具有的苦味物质。但它们在储存一段时间后会产生产延迟苦味^[13],除此,对柚子果肉进行的预处理以及柚子酒发酵和陈酿过程中形成的苦味物质是复杂且不易控制的,不仅含有原料本身带来的苦味,还有产苦味杂菌等微生物生长而产生的苦味。据研究,柚皮苷酶能够水解柚皮苷、新橙皮苷等糖苷,这些特性使该酶成为柑橘类脱苦商业化应用的理想候选酶^[14]。

目前国内外均未见关于柚子酒的脱苦工艺研究,选择对柚子酒进行脱苦研究原因是酒厂生产的柚子低度果酒存在苦涩味道的问题,为了解决产品问题,开展了柚子酒脱苦研究。为进一步得到不具苦涩味的柚子酒,本实验对柚子酒酶法脱苦工艺进行研究探讨,并对脱苦前后柚子酒风味成分进行分析探讨。首先,为准确探究柚子酒酿造过程中苦味物质含量的变化,本文从柚子酒发酵到陈酿过程进行了跟踪分析,测定苦味物质含量的变化情况,采用柚皮苷酶法脱苦技术优化其酿造工艺,降低柚子酒中苦味物质含量,同时应用顶空-固相微萃取(headspace-solid phase microextraction, HS-SPME)和气相色谱-质谱联用(GC-MS)等技术对其挥发性香气成分进行研究,感官评价以及香气成分热图差异分析来评价柚皮苷酶脱苦方法对酒体的影响,判断柚皮苷酶对柚子酒脱苦方法的可行性。实验解决了柚子酒中严重苦味这一问题,并为柚子酒脱苦工艺技术提供了一定的理论支持,改善

了柚子酒的品质,为柚子酒产业经济效益做出了一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柚皮苷酶:青岛优顺发生物科技有限公司。

酒样:贵州荔波柚子酒,2019年贵州荔波昌辉实业生产。

试剂:氢氧化钠,天津市永大化学试剂有限公司;硫酸,重庆川江化学试剂厂;硫酸镁、二甲氨基苯甲醛,国药集团化学试剂有限公司;三氯甲烷,西陇化工股份有限公司;二甘醇,西陇科学股份有限公司;柚皮苷标准品、柠檬苦素标准品、乙腈,阿拉丁;以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

723-可见分光光度计,天津冠泽科技有限公司;YM-060ST 超声清洗机,深圳市方奥微电子有限公司;离心机、HP6890/5975C 气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司;2 cm-50/30 μm DVB/CAR/PDMS StableFlex 萃取纤维头,美国 Supelco 公司;Agilent 19091F-433 HP-FFAP 弹性石英毛细管柱,美国 J&W Scientific 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 柚皮苷酶脱苦单因素试验

试验研究柚皮苷酶添加量(0.5、1、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 g/L)、酶解温度(30、40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$)、酶解时间(15、30、45、60、75、90、105 min)、pH(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0)对柚子酒中苦味物质去除率的影响。重复3次平行试验,取其平均值。固定单因素条件为柚皮苷酶用量2 g/L、酶解温度50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间60 min、pH 3.5。

1.3.2 柚子酒中苦味物质提取及质量浓度测定

柠檬苦素类似物提取及标准曲线绘制参照毕静莹^[15]的方法做了微调,以吸光度对柠檬苦素的质量浓度绘制曲线得 $y=8.02x$, $R^2=0.9992$,并用来测定柚子酒中柠檬苦素类似物的质量浓度。柚皮苷提取:移取5 mL 柚子酒,添加无水乙醇5 mL,摇匀,4000 r/min 离心10 min,取上清液1 mL,添加7 mL的50%乙醇成为样液,备测。标准曲线绘制参考徐慧珏^[12]的方法进行检测,以吸光度对柚皮苷质量浓度作图得 $y=0.0049x+0.0151$, $R^2=0.997$ 。

1.3.3 脱除率的计算

$$\text{脱除率} / \% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \%$$

式中： C_0 为脱苦处理前柚子酒中柚皮苷含量 (mg/L)、柠檬苦素类似物含量 (mg/mL)； C_1 为脱苦处理后柚子酒中柚皮苷含量 (mg/L)、柠檬苦素类似物含量 (mg/mL)。

1.3.4 总糖含量测定

为判断柚子酒发酵的进程及是否完全结束，对实验组样品进行总糖测定分析。按照 GB/T 15038-2006 《葡萄酒、果酒通用分析方法》^[16] 中的斐林试剂直接滴定法测定总糖含量。

1.3.5 正交优化试验设计

单因素试验的基础上进行正交试验，以柚苷酶酶解温度 (A)、酶解时间 (B)、酶添加量 (C) 和 pH (D) 四因素作为影响因素，以柚子酒中柚皮苷脱除率 (Y1)、柠檬苦素脱除率 (Y2) 作为评价指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交设计确定柚子酒脱苦最佳工艺参数。正交试验因素与水平详见表 1 所示。

表 1 试验自变量因素与水平

Table 1 Experimental independent variable factors and levels

水平	因素			
	A 酶解 温度/℃	B 酶解 时间/min	C 酶添 加量/(g/L)	D pH
1	50	45	1.5	3.0
2	60	60	2.0	3.5
3	70	75	2.5	4.0

1.3.6 柚子酒的感官鉴定

柚子酒的感官鉴定分析对于判定酒的品质和风味至关重要，感官评分结果由 1 名国家专业品酒评审委员和 4 名从事酒行业的专业工作人员进行品评打分。评定分数范围为 0~5，0 分为未品尝和未闻到香气，5 分为尝到的苦味最强和闻到的香气最强，在 20 ± 1 °C 的温度条件下进行感官评定^[17]，取所得均值作感官评分平面雷达图。

1.3.7 香气成分的提取

精密量取混匀样品 3 mL，精密加入混标（环己酮 1.54 μg/mL，壬酸甲酯 0.83 μg/mL）2 μL，置于固相微萃取仪采样瓶中，插入装有 2 cm-50/30 μm DVB/CAR/PDMS StableFlex 纤维头的手动进样器，在 60 °C 的平板加热条件下顶空萃取 60 min 后，移出萃取头并立即插入气相色谱仪进样口（温度 250 °C）中，热解析 1 min 进样。

1.3.8 色谱-质谱联用仪检测

色谱条件：初始温度 40 °C（保留 2 min），以 3 °C/min 升温至 181 °C，再以 5 °C/min 升温至 220 °C，保持 8 min，运行时间：64.8 min；汽化室温度 250 °C；

载气为高纯 He（99.999%）；柱前压 6.91 psi，载气流量 1.0 mL/min，分流，溶剂延迟时间为 1 min。

质谱条件：离子源为 EI 源；离子源温度 230 °C；四极杆温度 150 °C；电子能量 70 eV；发射电流 34.6 μA；倍增器电压 1717 V；接口温度 280 °C；质量范围 29~500 u。

1.3.9 数据统计与分析

指标均重复测定 3 次并取平均值，利用 Origin 2018 软件作图；应用正交设计助手 II 软件进行数据统计，并进行差异显著性 ($p < 0.05$) 及方差分析；GC-MS 技术对挥发性成分定性：对总离子流色谱图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对 Wiley275 和 Nist 2014 标准质谱图确定挥发性成分的种类，经内标法进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 柚子酒在酿造与陈酿过程中柠檬苦素类

似物含量的变化规律

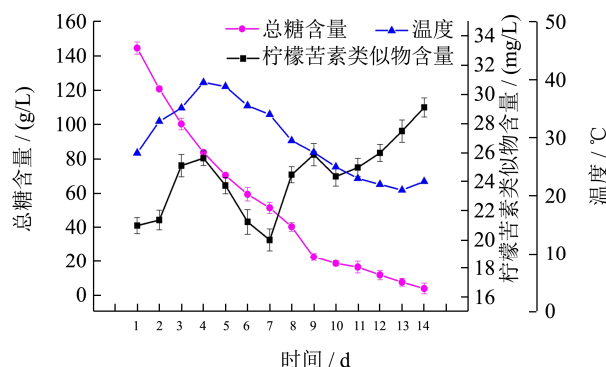


图 1 柚子酒发酵过程中温度、总糖和柠檬苦素类似物含量的变化

Fig.1 Changes of temperature, total sugar and limonin analogues during the fermentation of pomelo wine

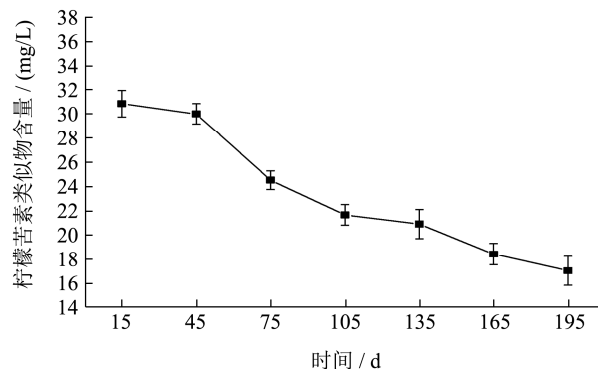


图 2 柚子酒陈酿过程中柠檬苦素类似物含量的变化

Fig.2 Changes of limonin analogue content in pomelo wine during aging

在柚子酒中人们对柠檬苦素类似物的苦味阈值较为敏感,跟踪检测柠檬苦素类似物更具有代表性。图1显示柚子酒酿造过程中柠檬苦素类似物、总糖含量和温度的变化情况。随着发酵进行,总糖含量一直呈下降趋势;温度先上升,到第4 d达到发酵旺盛阶段,后下降且趋于平稳;而柠檬苦素类似物含量呈波动性变化,1~4 d呈上升趋势,第4 d达到最高值,由于柚汁中无苦味的柠檬苦素 A-环内酯(Limonin A-ring lactone)被柠檬苦素 D-环内酯水解酶转化为具有苦味的柠檬苦素类似物导致。随后下降明显,第7 d降到最低值,而后又出现上升趋势,14 d发酵结束时达到最高值,可见发酵过程中生成的某些物质能促使柠檬苦素类似物的分解和转化,且是一个动态平衡过程。

发酵结束后,将柚子酒贮藏于常温下,经过15 d、45 d、75 d、105 d、135 d、165 d、195 d陈酿后,取样进行柠檬苦素类似物含量的检测。如图2所示,随着陈酿时间的延长,柠檬苦素类似物含量呈下降趋势,可能是酒体中的某些物质将柠檬苦素类似物吸附、下胶沉淀或是转化为其他物质,但经过长达半年以上的陈酿时间,其含量为17.08 mg/L比最初含量降低了44.71%,但此时柠檬苦素类似物的含量还远高于阈值6 mg/L^[18]。可见,长时间的陈酿对于柚子酒中苦味的降低虽起到很大的作用,但是他需要很长的时间陈酿,因此从节约经济、缩短陈酿时间、利润最大化等方面来考虑,将柚子酒进行脱苦就非常有意义。

2.2 柚苷酶脱苦处理单因素试验结果

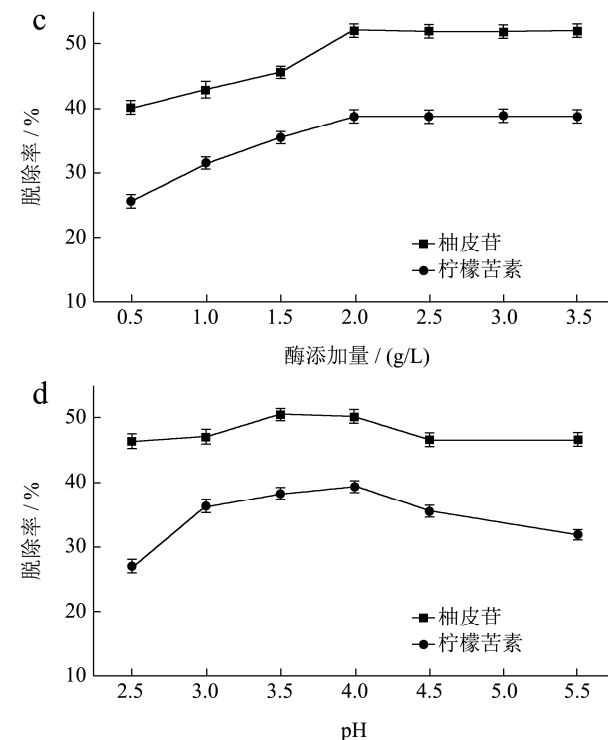
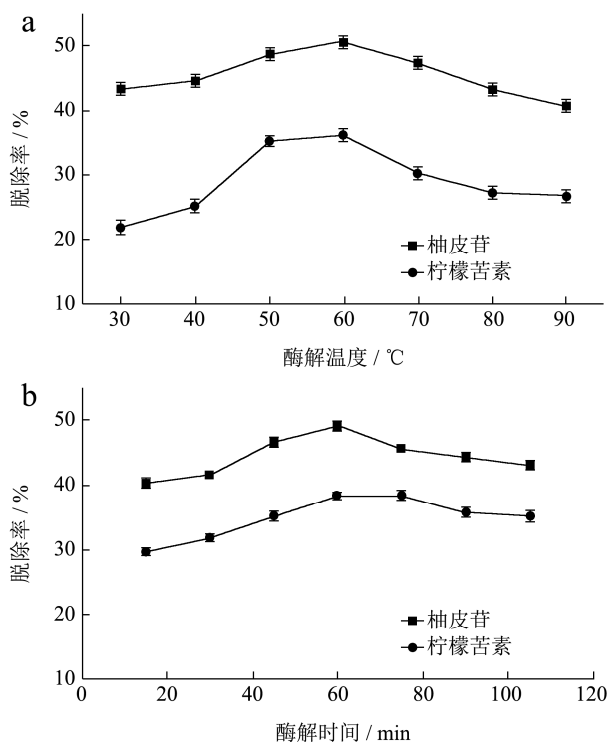


图3 酶解温度(a)、酶解时间(b)、酶添加量(c)、pH值(d)对柚酒的脱苦率

Fig.3 Removal rate of pomelo wine by enzymatic hydrolysis temperature (a), enzymatic hydrolysis time (b), amount of enzyme added (c) and pH value (d)

由图3a可知,在酶解温度30~60 °C范围内,柚皮苷、柠檬苦素脱除率随着温度的升高而增大,当酶解温度为60 °C时,柚皮苷含量从未经任何处理的165.69 mg/L下降到81.92 mg/L、柠檬苦素含量从17.08 mg/L下降到10.91 mg/L,脱除率达到最大值分别为50.56%、36.12%。而后出现随着酶解温度的升高,柚皮苷和柠檬苦素脱除率呈下降趋势,原因是温度升高酶蛋白结构发生变性而导致柚苷酶活性降低或消失,从而脱苦能力降低。因此,选择酶解温度为60 °C,这与刘伟^[19]酸橙汁进行脱苦选择的温度一致。

由图3b可知,酶解时间在15~60 min范围内,柚皮苷脱除率随着时间的延长而增大,在酶解时间为60 min时,柚皮苷脱除率达到最大值49.06%,随后呈下降趋势。当酶解时间为75 min时,柠檬苦素脱除率达到最大值38.52%,仅比酶解时间为60 min时柠檬苦素脱除率高0.21%。延长酶解时间,脱苦率降低,可能是在酶解时间增加的水浴过程中柚子酒中还未溶解的柚皮苷继续溶解,使得测得的柚皮苷含量增加,从而导致脱苦率降低。因此,从节省能源,缩短生产周期考虑,选择酶解时间为60 min。

由图3c可知,在柚苷酶添加量0.5~2.0 g/L范围内,随着酶添加量的增大而增大,当酶添加量为2.0 g/L

时, 柚皮苷和柠檬苦素脱除率达到最大值, 分别为 51.98%、38.59%, 随后趋于平衡状态, 这与贺红宇^[20]柠檬汁脱苦试验结果柚皮苷脱除率 20.83%存在较大差距, 但与梁泽建^[21]试验结果 50.30%又保持相近, 可能是由于试验原材料不同而出现了分歧, 还需进一步的试验验证。试验过程中可发现, 过多的酶蛋白不能完全溶于酒体中, 对酒体品质有一定程度的影响。因此, 试验酶添加量选择 2.0 g/L 为宜。

由图 3d 可知, pH 的变化对柚皮苷脱除率的影响较不明显。pH 在 2.5~4.0 范围内, 柠檬苦素脱除率随

着 pH 的增大而增大, 当 pH 为 4.0 时, 柠檬苦素含量从未经任何处理的 17.08 mg/L 下降到 10.38 mg/L、柚皮苷含量从 165.69 mg/L 下降到 82.63 mg/L, 脱除率达到最大值分别为 39.26%、50.13%。柚皮苷脱除率与梁泽建的橙汁酶法脱除率 50.30%相近, 且都随 pH 值的升高而降低, 这是因为柚苷酶的最适 pH 区间在 3.5~5, pH 为 4.0 时能最大发挥柚苷酶的活性, 使之最大限度地作用于柚皮苷, 增加酶与底物的反应速度。

2.3 正交优化试验结果

表 2 柚苷酶脱苦工艺优化正交试验结果与分析

Table 2 Orthogonal test results and analysis of naringinase extraction process optimization

序号	因素				柚皮苷 脱除率/%	柠檬苦素 脱除率/%
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	45.53	35.08
2	1	2	2	2	53.26	40.59
3	1	3	3	3	52.68	38.96
4	2	1	2	3	46.85	37.67
5	2	2	3	1	48.95	39.88
6	2	3	1	2	45.67	35.68
7	3	1	3	2	47.89	37.00
8	3	2	1	3	45.30	36.85
9	3	3	2	1	51.27	38.75

	K1	50.490	46.757	45.500	48.583	
柚皮苷	K2	47.157	49.170	50.460	48.940	
	K3	48.153	49.873	49.840	48.277	

	R	3.333	3.116	4.960	0.663	

	K1	38.210	36.583	35.870	37.903	
柠檬	K2	37.743	39.107	39.003	37.757	
苦素	K3	37.533	37.797	38.613	37.827	
	R	0.677	2.524	3.133	0.590	

在单因素试验基础上, 采用正交助手软件, 通过 $L_9(3^4)$ 试验设计, 柚子酒脱苦工艺优化试验结果与分析见表 2, 方差分析见表 3、表 4 所示。

由表 2 可知, 以柚皮苷脱除率作为评价指标, 根据极差大小四个因素对柚子酒脱苦影响的大小顺序为: C (酶添加量) > A (酶解温度) > B (酶解时间) > D (pH 值), 柚子酒中柚皮苷脱除率的最佳工艺组合为 $A_1B_3C_2D_2$ 。以柠檬苦素脱除率作为评价指标, 由极差大小四个因素对柚子酒脱苦效果的顺序为: C (酶添加量) > B (酶解时间) > A (酶解温度) > D (pH 值), 柚子酒中柠檬苦素脱除率的最佳工艺组合为 $A_1B_2C_2D_1$ 。由表 3、4 可知, 酶解温度、酶解时间和酶添加量三个因素对柚子酒中柚皮苷和柠檬苦素脱除率影响显著 ($p < 0.05$)。考虑到节约经济, 更好保证柚

子果酒中原有的品质和最大保留原酒中舒适苦涩的口感特点, 本试验选择对柚子酒进行脱苦的最佳工艺条件为: 酶解温度 50 °C, 酶解时间 60 min, 酶添加量 2 g/L, pH 值的大小影响不显著, 因此选择 pH 值为 4。在此条件下进行验证试验, 三次重复试验得出柚子酒中柠檬苦素和柚皮苷脱除率平均值分别为 53.67%、42.19%, 高于表 2 中的 9 项试验结果, 与贺红宇^[20]对柠檬汁中柚皮苷脱除率达 23.00%以上、毕静莹^[15]对柑橘酒进行琼脂脱苦, 柠檬苦素脱除率达到 36.24%相比均显示了较好的脱除效果。脱去了柚子酒中近一半的苦味, 易于人体接受, 故优化后的脱苦工艺条件实验结果 $A_1B_2C_2D_3$ 。

在贺红宇^[20]等研究柚皮苷酶法对柠檬汁脱苦实验中, 根据正交试验和方差分析结果可见, 比较各列

的极差的值，可以发现，通过统计分析和显著性测验结果表明，因素显著，即在试验所设定的三个因素中，对柠檬汁脱苦率影响最大的因素是酶添加量，其次是酶解时间，酶解温度对梓檬汁脱苦率的影响最小。得出实验的最优水平为柚皮苷酶用量 2 g/L、酶解温度 50 ℃、作用时间 60 min。说明酶添加量、酶解时间、酶解温度对柚皮苷酶法脱苦实验显著性较为明显。

已有研究表明，柠檬苦素在柑橘类果酒中陈酿两年以上的还远高于阈值。除此，柚子酒中总黄酮（柚皮苷为代表）需要陈酿三年后含量才会逐渐降低降到阈值以下^[22]，而此脱苦工艺可很大程度的缩短柚子酒陈酿周期，提高经济效益。

表 3 以柚皮苷脱除率作为评价指标正交试验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance of orthogonal test results with the removal rate of naringin as the evaluation index

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F0.05 临界值	显著性
A	17.564	2	26.572	19.000	*
B	16.032	2	24.254	19.000	*
C	43.822	2	66.297	19.000	*
D	0.661	2	1.000	19.000	
误差	0.66	2			

表 4 以柠檬苦素脱除率作为评价指标正交试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance of orthogonal test results with the removal rate of limonin as the evaluation index

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F0.05 临界值	显著性
A	0.720	2	22.500	19.000	*
B	9.555	2	298.594	19.000	*
C	17.496	2	546.750	19.000	*
D	0.032	2	1.000	19.000	
误差	0.03	2			

注：“*”表示对结果影响显著 ($p < 0.05$)。

2.4 感官鉴定结果分析

柚子酒脱苦前后感官评分平面雷达图分析结果见图 4。

由图 4 可知，平面雷达图能更直观的呈现出柚子酒经柚苷酶脱苦处理后与原酒品质质量的差异。脱苦处理后柚子酒中难以接受的苦味已得到很大程度的改善，苦涩味适宜，其闻香以清香感最为明显，饮后有甜感，这使得柚子酒酒体更加醇和、果香浓郁、诸味协调。试验中并没有将苦味除尽而是有所保留，既能让柠檬苦素类似物具有的抗癌、抗 HIV^[23]，抗氧化、调节细胞色素^[15]等高度活性物质存在于酒体中，还能

很好的保留柚子果酒本身轻微苦涩口感这一特征。与进行脱苦处理的柚子酒相比，未进行脱苦的柚子酒虽然保留了柚子酒原有的清香感，但他较强的苦涩味还是不易消费者接受，总体感官评分低于酶法脱苦处理的柚子酒。

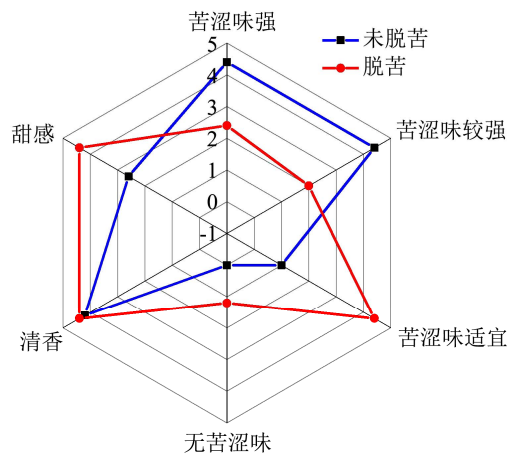


图 4 柚子酒脱苦前后感官评分雷达图

Fig.4 Radar map of sensory score before and after removing the bitterness of pomelo wine

2.5 酒体挥发性成分定性定量分析

根据前述方法对酒样中的挥发性风味成分进行测定分析，图 5 为柚子酒脱苦及未脱苦处理的 GC-MS 图谱。

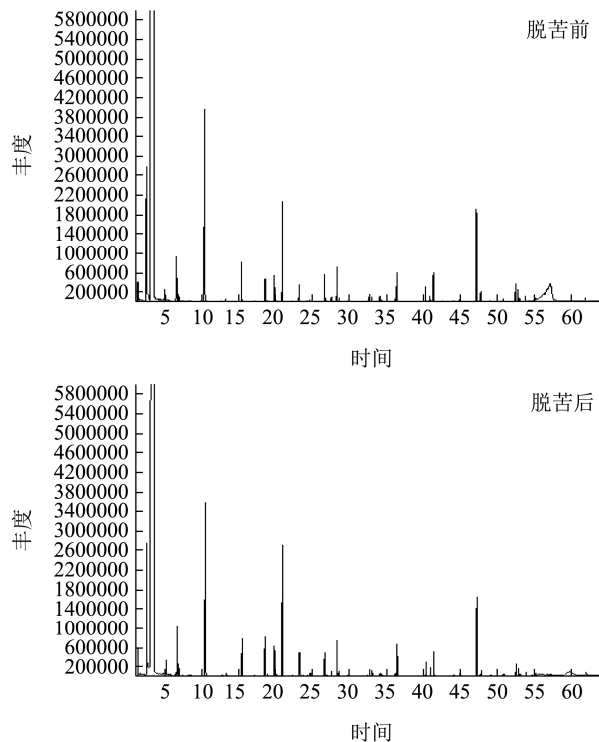


图 5 柚子酒中挥发性风味化合物的总离子色谱图

Fig.5 Total ion chromatogram of volatile flavor compounds in pomelo wine

表5 柚子酒中主要挥发性风味成分检出结果

Table 5 Results of main volatile flavor components in pomelo wine

序号	保留时间/min	化合物名称	分子式	浓度/($\mu\text{g/L}$)	
				脱苦前	脱苦后
1	3.594	乙醇	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	2043.279	2338.898
2	6.732	异丁醇	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	33.835	37.482
3	8.645	正丁醇	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	0.381	0.552
4	10.449	2-甲基丁醇	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$	46.379	47.424
5	10.548	异戊醇	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$	102.605	153.665
6	15.709	正己醇	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}$	0.002	0.002
7	16.916	反式-3-己烯-1-醇	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$	0.002	0.004
8	22.257	2-壬基醇	$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}$	0.004	0.005
9	23.234	2,3-丁二醇	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$	0.094	0.102
10	23.374	芳樟醇	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	0.006	0.007
11	23.731	辛醇	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	0.003	0.003
12	28.804	α -松油醇	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	0.001	0.001
13	29.845	2-十一醇	$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}$	0.004	0.006
14	36.448	苯乙醇	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	0.129	0.177
15	40.738	橙花叔醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	0.003	0.007
16	50.68	1-十六烷醇	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}$	0.005	0.004
17	5.071	正丙醇	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	-	7.343
18	2.539	乙酸乙酯	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	54.984	70.578
19	4.394	异丁酸乙酯	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$	0.550	0.766
20	4.861	乙酸异丁酯	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$	0.396	0.383
21	6.944	乙酸异戊酯	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2$	3.550	4.128
22	10.491	正己酸乙酯	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$	-	4.163
23	15.478	乳酸乙酯	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$	0.147	0.195
24	18.557	辛酸乙酯	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$	0.144	0.113
25	21.247	壬酸甲酯	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$	0.002	-
26	22.648	壬酸乙酯	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$	0.002	0.001
27	23.489	乙酸芳樟酯	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	0.002	0.002
28	24.149	乳酸异戊酯	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_3$	0.002	0.004
29	26.248	糠酸乙酯	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$	0.001	0.002
30	26.349	γ -丁内酯	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$	0.001	0.002
31	26.64	癸酸乙酯	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	0.098	0.159
32	27.372	辛酸异戊酯	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$	0.001	0.001
33	27.572	苯甲酸乙酯	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$	0.019	0.023
34	28.339	丁二酸二乙酯	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$	0.119	0.166
35	32.059	苯乙酸乙酯	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	0.002	0.002
36	33.071	乙酸苯乙酯	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	0.023	0.030
37	34.145	月桂酸乙酯	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	0.014	0.031
38	40.941	十四酸乙酯	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	0.031	0.031
39	44.115	十五酸乙酯	$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	0.007	0.008
40	46.052	棕榈酸甲酯	$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	0.003	0.003

转下页

接上页					
41	47.226	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0.340	0.568
42	47.854	顺-9-十六碳烯酸乙酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-	0.023
43	50.891	琥珀酸单乙酯	C ₆ H ₁₀ O ₄	0.009	0.014
44	52.536	十八酸乙酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	0.041	0.080
45	52.907	油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	0.025	0.055
46	53.906	亚油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	0.010	0.023
47	19.827	乙酸	C ₂ H ₄ O ₂	0.187	0.224
48	24.335	异丁酸	C ₄ H ₈ O ₂	0.005	0.007
49	28.122	2-甲基丁酸	C ₅ H ₁₀ O ₂	0.003	0.004
50	34.385	己酸	C ₆ H ₁₂ O ₂	0.011	0.018
51	41.408	辛酸	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.092	0.139
52	47.834	正癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.028	0.041
53	53.158	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.002	0.003
54	57.198	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.005	-
55	62.002	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.015	0.027
56	17.14	十四烷	C ₁₄ H ₃₀	0.004	0.004
57	40.345	4-乙基-2-甲氧基苯酚	C ₉ H ₁₂ O ₂	0.052	0.072
58	44.96	4-乙基苯酚	C ₈ H ₁₀ O	0.011	0.014
59	40.345	4-乙基-2-甲氧基苯酚	C ₉ H ₁₂ O ₂	0.052	0.072
60	49.112	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	0.004	0.007
61	42.446	柏木脑	C ₁₅ H ₂₆ O	0.001	0.002
62	11.295	苯乙烯	C ₈ H ₈	0.297	0.002
63	1.642	乙醛	C ₂ H ₄ O	0.278	1.060
64	20.239	糠醛	C ₅ H ₄ O ₂	0.005	0.007
65	22.161	苯甲醛	C ₇ H ₆ O	0.002	0.003
66	32.723	3,5-二甲基苯甲醛	C ₉ H ₁₀ O	0.027	0.049
67	7.42	3-戊烯-2-酮	C ₅ H ₈ O	0.239	0.545
68	13.357	3-羟基-2-丁酮	C ₄ H ₈ O ₂	0.015	0.018
69	27.009	苯乙酮	C ₈ H ₈ O	0.004	0.005

从柚子酒脱苦及未脱苦处理中共检测鉴定出 69 种主要风味化合物, 其中主要包括醇类 16 种、酯类 30 种、酸类 9 种、酚类 4 种、萜烯类 2 种、醛酮类 7 种、烷烃类 1 种。

根据检出的主要挥发性风味成分含量作热图, 可直观地显示脱苦处理与未脱苦处理的柚子酒挥发性风味化合物含量的差异及变化情况, 来判定对柚子酒进行脱苦处理的效果。由表 5、图 6 可知, 柚子酒脱苦处理前后主要挥发性风味成分种类基本没有变化, 其含量除了辛酸乙酯、苯乙烯有轻微降低, 其余风味成分含量均有小幅度的上升, 这与 Yadav, Mukesh^[24]研究得出的柚苷酶除了具有去除苦味外, 还可用于提高酒的香气有着相同之处。这使得脱苦处理后的柚子酒有着更佳浓郁的果香及纯正的口感, 更加受人喜爱。

由热力图可看出酯类是柚子酒中种类及含量最多

的挥发性风味成分, 醇类次之。酯类是构成花香和果香的主体, 在各种酒品香气组成中占有重要地位^[25], 其生成途径主要由微生物在酿造过程中经酰基辅酶 A 和醇乙酰转移酶的共同作用下代谢而成以及在脂肪酶催化作用下由酸与醇反应而生成^[26]。经脱苦处理后, 酯类物质含量均有上升, 如青草香的乳酸乙酯、菠萝香的辛酸乙酯、较为明显的是具有水果香的乙酸乙酯由原来的 54.984 μg/L 增长到 70.578 μg/L 等。这使得柚子酒酒体的果香与甜香更加浓郁, 可作为酒体的特征香气成分, 这些物质也均是清香型白酒的主体香气特征成分^[27]。对人体较好的物质还有亚油酸乙酯, 其含量也在增大, 在人体内可以水解产生人体必需脂肪酸—亚油酸, 具有重要的活性功能^[28]。除此, 还生成了两种新的物质, 具有榴莲味的顺-9-十六碳烯酸乙酯^[29]和正己酸乙酯, 其中正己酸乙酯不但具有苹果的香

气, 还具有抗肥胖作用^[30]。

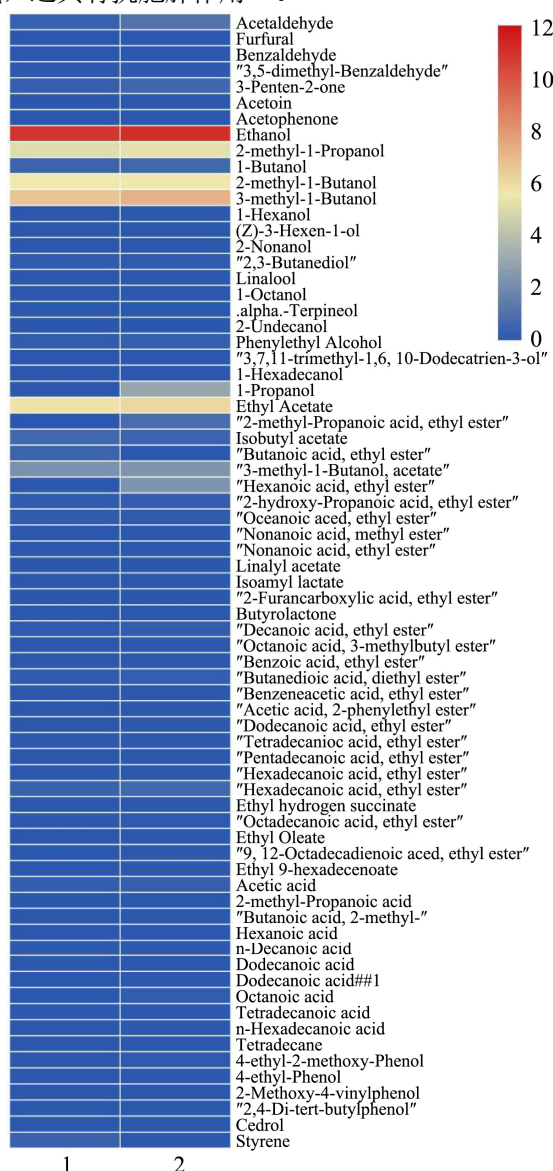


图6 柚子酒脱苦前及脱苦后挥发性风味化合物热图

Fig.6 Heat map of volatile flavor compounds before and after the removal of bitterness from pomelo wine

研究表明, 酒体中醇类含量越高, 则香气和醇甜就越突出, 醇类化合物主要通过酵母发酵代谢、蛋白质分解等生成^[31]。在醇类化合物中, 除乙醇外, 含量最高的是异戊醇, 其次是 2-甲基丁醇、异丁醇。其中, 经脱苦处理变化较大的是异戊醇由 102.605 μg/L 增长到 153.665 μg/L。除此, 经脱苦处理还生成了新的物质正丙醇, 其是碳数大于 3 的高级醇, 适宜浓度的高级醇可以赋予白酒特殊的香气, 使酒体丰满柔和、圆润醇厚^[27,32]。

3 结论

本试验以柚子酒为研究对象, 主要对其酒中的苦物质进行柚苷酶脱苦处理, 正交优化最佳工艺为:

酶解温度 60℃、酶解时间 60 min、柚苷酶添加量 2.0 g/L 和 pH 值为 4.0, 柚皮苷含量从未经任何处理的 165.69 mg/L 下降到 76.76 mg/L、柠檬苦素含量从 17.08 mg/L 下降到 9.87 mg/L, 脱除率达到最大值分别为 53.67%、42.19%。挥发性香气成分经 GC-MS 技术定性, 内标法定量进行分析, 同时进行感官品评。结果显示, 柚子酒中共检测鉴定出 69 种主要风味化合物, 其中主要包括醇类 16 种、酯类 30 种、酸类 9 种、酚类 4 种、萜烯类 2 种、醛酮类 7 种、烷烃类 1 种, 对柚子酒进行柚苷酶脱苦处理并没有对酒体带来不好的影响, 反而生成了顺-9-十六碳烯酸乙酯、正己酸乙酯和正丙醇这三种新的物质, 共同提升了酒体的香气。试验结果表明, 柚子酒经柚苷酶脱苦处理方法可行, 不仅改善了苦味, 还提升了酒体的品质, 为消费者提供了新的选择。但本研究还存在一些不足, 需要进一步研究和解决: 柚子酒发酵过程中, 当苦味物质含量较低时未找到方法让其保持较低状态; 发酵过程中柠檬苦素类似物的含量处于动态平衡过程, 其如何分解与转化没有进行机理研究。这些可作为课题组后续研究的重点。

参考文献

[1] 赵玲燕, 谭晓辉, 龙运忠, 等. 复合澄清剂处理柚子发酵酒的澄清效果研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(3): 115-119
ZHAO Ling-yan, TAN Xiao-hui, LONG Yun-zhong, et al. Clarification effect of fermented grapefruit wine with compound clarifiers [J]. Chinese Brewery, 2020, 39(3): 115-119

[2] SHI N, Narciso J O, GOU X, et al. Manipulation of antioxidant and glycaemic properties of extruded rice based breakfast cereal products using pomelo fruit by-product material [J]. Quality Assurance & Safety of Crops & Foods, 2017, 9(4): 489-495

[3] 王标诗, 吴艺华, 杜建中, 等. 沙田柚活性成分的提取及其生理功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(10): 129-132
WANG Biao-shi, WU Yi-hua, DU Jian-zhong, et al. Development of extraction and physiological activities of active substance from citrus grandis osbec [J]. Food Research and Development, 2014, 35(10): 129-132

[4] 李敏杰, 熊亚. 柚子酒发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(4): 198-202
LI Min-jie, XIONG Ya. Optimization of fermentation technology of pomelo wine [J]. Chinese Brewery, 2019, 38(4): 198-202

- [5] XU T S Y, LUO Q L, LIU Z P, et al. Inquiry of water-soluble polysaccharide extraction conditions from grapefruit skin [J]. *Engineering*, 2011, 3(11): 1090-1094
- [6] 李宇,胡玉娇.功能性柚子果酒工艺研究[J].*酿酒科技*,2014, 1:74-77
LI Yu, HU Yu-jiao. Study on the production of functional pomelo fruit wine [J]. *Brewery Technology*, 2014, 1: 74-77
- [7] DU M Y, YOU Y M, ZHAO X J, et al. Effects of aging time on the antioxidant activity of pomelo wine [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(4): 1459-1465
- [8] 艾合麦提·艾尔肯,古丽柯子·艾尔肯,潘丽梅,等.柚子复合保健酒的研制[J].*中国酿造*,2013,32(7):137-140
AIERKEN Ai-hemaiti, AIERKEN Gu-likezi, PAN Li-mei, et al. Development of the composite health wine of pomelo [J]. *Chinese Brewery*, 2013, 32(7): 137-140
- [9] 刘媛洁,张良,胡欢平,等.酶法协同超声波辅助酸法提取柚子皮中果胶工艺条件优化[J].*食品工业科技*,2020,41(4): 114-119
LIU Yuan-jie, ZHANG Liang, HU Huan-pin, et al. Optimization on technology conditions of extracted pectin from shaddock peel by enzymatic method com [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(4): 114-119
- [10] 邓婷婷,刘素纯,贺建华.柚皮提取物有效成分的研究概况[J].*中国食物与营养*,2008,6:16-19
DENG Ting-ting, LIU Su-chun, HE Jian-hua. Study on the active components of pomelo peel extract [J]. *Food and Nutrition in China*, 2008, 6: 16-19
- [11] 李梦熹,关荣发,芮昶,等.柚子皮中抗过敏活性粗提物提取工艺的研究[J].*食品研究与开发*,2012,33(1):58-61
LI Meng-xi, GUAN Rong-fa, RUI Chang, et al. Research on the extraction technology of crude anti-allergic component in grapefruit peel [J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(1): 58-61
- [12] 徐慧珏.两株乳酸菌对沙田柚汁的脱苦研究[D].华南理工大学,2014
XU Hui-yu. Study on the Debiting of shatin juice by two lactic acid bacteria [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [13] Raitore M, Dea S, Mccollum G, et al. Development of delayed bitterness and effect of harvest date in stored juice from two complex citrus hybrids [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2016, 96(2): 422-429
- [14] Zhu Yac Jia, H d Xi, Ma Li, et al. Characterization of a naringinase from *Aspergillus oryzae* 11250 and its application in the debitterization of orange juice [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 62: 114-121
- [15] 毕静莹.柑橘酒苦味物质及其控制技术研究[D].西北农林科技大学,2019
BI Jing-ying. Study on bitter matter and control technology of citrus wine [D]. Shaanxi Province:Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2019
- [16] GB/T 15038-2006,葡萄酒、果酒通用分析方法[S]
GB/T 15038-2006, General Analysis Method of Wine and Fruit Wine [S]
- [17] 马宇,黄永光.清酱香型白酒挥发性风味组分及香气特征[J].*食品科学*,2019,40(20):241-248
MA Yu, HUANG Yong-guang. Volatile components and aroma characteristics of fen-maotai-flavored liquor [J]. *Food Science*, 2019, 40(20): 241-248
- [18] 李一兵,龚桂芝,彭祝春,等.不同甜橙品种果汁中柠檬苦素含量的变化[J].*食品与发酵工业*,2017,43(2):201-205
LI Yi-bing, GONG Gui-zhi, PENG Zhu-chun, et al. The analysis of limonin content change in orange juice made from different cultivars of *Citrus sinensis* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(2): 201-205
- [19] 刘伟,单杨,李高阳,等.酸橙汁苦味去除工艺优化[J].*中国食品学报*,2015,15(12):134-142
LIU Wei, SHAN Yang, LI Gao-yang, et al. Optimization of the debittering technology of sour orange juice by enzyme [J]. *Chinese Food Journal*, 2015, 15(12): 134-142
- [20] 贺红宇.三种脱苦方法对柠檬汁脱苦效果的研究[D].成都:四川农业大学,2013
HE Hong-yu. Study on the effect of three kinds of methods of lemon juice debittering [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013.
- [21] 梁泽建.柑桔汁脱苦技术的研究[D].成都:四川农业大学,2007
LIANG Ze-jian. The study of the debittering technology in citrus juice [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2007
- [22] DO M, YOU Y, ZHAO X J. Effects of aging time on the antioxidant activity of pomelo wine [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(4): 1459-1465
- [23] Lucia B, Fabio M, Miriam L, et al. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells [J]. *Planta Medic*, 2003, 69(10): 910-913
- [24] Yadav M, Sehwat N, Sharma A K, et al. Naringinase: microbial sources, production and applications in food processing industry [J]. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences*, 2018, 8(1): 717-720

- [25] 李洋,李娜娜,王艳君,等.基于 GC-MS 的贵人香葡萄与蒸馏酒香气成分分析[J].中国酿造,2020,39(2):189-194
LI Yang, LI Na-na, WANG Yan-jun, et al. Analysis of aroma components of *Italian Riesling* wine and distilled spirit based on GC-MS [J]. Chinese Brewery, 2020, 39(2): 189-194
- [26] 郭学武,范恩帝,马冰涛,等.中国白酒中微量成分研究进展[J].食品科学,2020,41(11):267-276
GUO Xue-wu, FAN En-di, MA Bing-tao, et al. Recent progress in micro components of Chinese Baijiu [J]. Food Science, 2020, 41(11): 267-276
- [27] GAO W, FAN W, XU Y. Characterization of the key odorants in light aroma type chinese liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies [J]. Agric Food Chem, 2014, 62(25): 5796-5804
- [28] Lukic I, Milicevic B, Banovic M, et al. Secondary aroma compounds in fresh grape marc distillates as a result of variety and corresponding production technology [J]. Food Technol Biot, 2011, 49(2): 214
- [29] 刘玉峰,王志萍,胡延喜,等.泰国甲仑榴莲的果肉及内果皮挥发油成分的 GC-MS 分析[J].辽宁大学学报(自然科学版),2017,44(1):41-44
LIU Yu-feng, WNAG Zhi-ping, HU Yan-xi, et al. Analysis of Essential Oil in Pulp and Peel of Thailand Jialun Durian by GC/MS [J]. Journal of Liaoning University (Natural Science Edition), 2017, 44(1): 41-44
- [30] Yuko H, Yoshiyuki F, Yoshiko M, et al. Effects of ethyl hexanoate on activities of sympathetic nerves innervating the brown and white adipose tissues, body temperature, and plasma fatty acids [J]. Neuroscience Letters, 2020, 737(15): 135319
- [31] FAN W, SHEN H, XU Y. Quantification of volatile compounds in Chinese soy sauce aroma type liquor by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(7): 1187-1198
- [32] 孙尤兰,黄永光,朱春晓,等.清酱香型白酒特征风味化合物的研究[J].食品科学,2020,41(24):199-208
SUN You-lan, HUANG Yong-guang, ZHU Chun-xiao, et al. Study on Characteristic Compounds of Light and Soy sauce aroma type liquors [J]. Food Science, 2020, 41(24): 199-208

(上接第 294 页)

- [27] Pirez-Schirmer Macarena, Rossotti Martín, Badagian Natalia, et al. Comparison of three antihapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(12): 6800-6806
- [28] Delgadillo R F, Mueser T C, Zaleta-Rivera K, et al. Detailed characterization of the solution kinetics and thermodynamics of biotin, biocytin and HABA binding to avidin and streptavidin [J]. PloS One, 2019, 14(2): e204194
- [29] Oyama H, Tanaka E, Kawanaka T, et al. Anti-idiotypic scFv-enzyme fusion proteins: a clonable analyte-mimicking probe for standardized immunoassays targeting small biomarkers [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(23): 11553-11559
- [30] Sun Z, Lv J, Liu X, et al. Development of a nanobody-AviTag fusion protein and its application in a streptavidin-biotin-amplified enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A in cereal [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(17): 10628-10634
- [31] Ashraf S S, Benson R E, Payne E S, et al. A novel multi-affinity tag system to produce high levels of soluble and biotinylated proteins in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2004, 33(2): 238-245
- [32] Cho Y A, Seok J, Lee H, et al. Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of immunoassays for fenitrothion [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 522(2): 215-222
- [33] Watanabe E, Kanzaki Y, Tokumoto H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a polyclonal antibody for the detection of the insecticide fenitrothion. evaluation of antiserum and application to the analysis of water samples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(1): 53-58
- [34] Hua X, Wang L, Li G, et al. Multi-analyte enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus pesticides and neonicotinoid insecticides using a bispecific monoclonal antibody [J]. Analytical Methods, 2013, 5(6): 1556