

玻碳电极的石墨烯修饰研究 及其电化学应用

杨琰宁, 谢云飞, 姚卫蓉*

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 为了提高重金属镉的测定速度, 本研究采用石墨烯(R-GO)对玻碳电极进行修饰, 并应用于食品中镉的测定。采用滴涂法将氧化石墨烯修饰到玻碳电极表面, 考察了电解质及 pH、修饰剂用量、富集时间和富集电位对镉离子检测的影响, 并优化了检测条件, 建立了测定大米制品中镉的差分脉冲伏安分析法(DPV)。结果表明镉离子的溶出峰电流与其浓度在 $4 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-5}$ g/L ($r = 0.9962$) 范围内呈良好的线性关系, 检测限为 3.0×10^{-9} g/L。使用石墨烯修饰电极对镉含量为 4.0×10^{-6} g/L 溶液平行测定 6 次的 RSD 为 8.53%。将本法应用于大米样品中镉的检测可以得到平均回收率为 96.25%~111.25%。石墨烯修饰玻碳电极体现出良好的稳定性、重现性, 在裸玻碳电极检测的基础上降低了检出限, 故本法是一种可靠、快捷、灵敏的检测方法, 为快速监测食品中的镉元素提供技术支持。

关键词: 石墨烯, 镉, 差分脉冲伏安法, 大米

Electrochemically reduced graphene modified electrode and its electrochemical application

YANG Yan-ning, XIE Yun-fei, YAO Wei-rong*

(The School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A glassy carbon electrode was modified by single-step electrodeposition of graphene(R-GO) for the rapid detection of cadmium and the electrochemical behavior on this electrode was investigated at the same time. The oxidation peak current of Cd^{2+} increased at the R-GO/GCE compared with bare GCE. A sensitive and fast analysis method(differential pulse voltammetry, DPV) of Cd^{2+} in food systems was established. Under the optimum conditions, a linear relationship existed between electrical peak current and the concentration of Cd^{2+} in the range between 4×10^{-8} g/L and 3×10^{-5} g/L, with a detection limit of 3.0×10^{-9} g/L, the RSD for cadmium (concentration = 4.0×10^{-6} g/L, $n = 6$) was 8.53%. This method has been applied to the detection of Cd^{2+} in rice with a successfully result, the average recoveries are between 96.25% ~ 111.25%. R-GO/GCE demonstrated an extraordinary satability and reproducibility, a better detection limit compared with GCE. The combination of R-GO/GCE and DPV turned out to be a solid, efficient and sensitive method and technical support for the rapid detection of cadmium in food.

Key words: graphene; cadmium; differential pulse voltammetry; rice

中图分类号: TS201.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)19-0275-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.047

重金属镉是持久性的环境污染物, 由于无法被自然降解, 故能对植物、动物和人体健康均造成严重的威胁。此外, 镉也能积累在人体的骨骼、肌肉、肾脏、大脑中, 非常微量的镉都能导致人体肾脏和呼吸系统遭到极大的破坏。我国规定镉在水体中最高允许排放浓度为 $0.1 \text{ mg/L}^{[1]}$, 而农作物由于水体或空气受到镉污染, 也成为镉的主要载体, 日前新闻报道中的“镉大米”就是最为典型的例子^[2]。

目前, 食品中镉的常用测定分析方法主要有荧光法、分光光度法、电感耦合等离子体质谱法、电热原子吸收法及 X 射线荧光法等^[3]。这些技术设备不仅价格高昂且需要十分复杂的样品前处理方法, 故不适合于快速监测, 急需发展一种新型快速的检测方法。电化学方法因其具有高灵敏性、可行性和价格便宜获得了社会上的广泛关注。差分脉冲伏安法更是电化学方法中针对镉测定的最为灵敏的方法之

收稿日期: 2014-11-05

作者简介: 杨琰宁(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品中重金属的快速检测, E-mail: 362934077@qq.com。

* 通讯作者: 姚卫蓉(1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: yaoweirongcn@jiangnan.edu.cn。

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ170003); 国家自然科学基金(21203076)。

一,因其分析检测时间短,操作简洁,设备便宜等优点,能为快速监测镉含量这方面提供极大的帮助^[4]。差分脉冲伏安法使用的传统工作电极多数是基于悬汞电极和汞膜电极开发的,这类电极具有良好的重现性和令人满意的灵敏度,然而汞是一种具有高毒性的重金属离子,其不仅会对生物健康造成危害也会对环境产生不良影响^[5]。因此,开发一种新型、无毒、无污染的电极材料势在必行。本研究利用玻碳电极进行石墨烯修饰,主要原因是石墨烯拥有比表面积大的优势,可以在电化学进程中具有更多的反应位点,进而使灵敏度显著提高^[6]。

本文旨在完全利用石墨烯的结构优点和良好的导电性^[7]以及阳极溶出伏安法的高度灵敏性^[8]。采用简便快速的电化学方法构建石墨烯修饰电极,建立一种高灵敏、快速、低成本的测定食品中镉含量的分析方法,为快速监测食品中的镉元素提供基础支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

氧化石墨烯 南京先丰纳米材料科技有限公司;冰醋酸、醋酸钠、磷酸二氢钾、无水乙醇、硝酸、高氯酸、铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾 AR,国药集团化学试剂有限公司;10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 镉 ICP 溶液 百灵威科技有限公司;超纯水 Q-M。

CHI660C 型电化学工作站 上海辰华仪器有限公司;三极系统:辅助电极——铂丝电极、参比电极——银/氯化银电极、工作电极——石墨烯/玻碳电极(R-GO/GCE) 上海辰华仪器有限公司;FE20K 精密 pH 计、AB 204-N 电子天平 Meltler-Toledo Instr Ltd;KQ-50E 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;磁力加热搅拌器 常州博远实验分析仪器厂;扫描电子显微镜(SEM) 日立-S4800;紫外吸收光谱仪 Unico UV-48.2, Unico, NJ, USA。

1.2 修饰电极的制备

修饰前,将玻碳电极依次用 0.3 μm 氧化铝粉和 0.05 μm 氧化铝粉于麂皮上抛光,然后用无水乙醇和超纯水分别超声清洗 2 min,用超纯水冲洗后,将电极用氮气吹干备用^[9]。取事先超声分散均匀的 1 mg/mL 氧化石墨烯悬浮液静置后,在红外灯下分 4 次(每次 2 μL 涂完之后烘干,再涂)将氧化石墨烯分散液滴涂于玻碳电极上(玻碳电极直径为 3 mm),且滴涂时要保证从一头蔓延过去,可得到平整的氧化石墨烯修饰膜^[10]。而后,将修饰后的电极置于 0.067 mol/L 的 PBS 缓冲液中,接上三极系统,于 -1.5 V 电位处恒电位电解还原 600 s,即可将玻碳电极上滴涂吸附的氧化石墨烯(GO)还原为石墨烯(R-GO)^[11]。

1.3 实验方法

1.3.1 大米样品消化方法及条件的选择 取大米磨粉后放入干燥器中备用,准确称取 2.0 g 上述米粉样品,分别按下述两种方法消化^[12]。

1.3.1.1 压力消解罐消解法 将称取好的大米粉倒入聚四氟乙烯内罐,加硝酸 4 mL 浸泡过夜。再加过

氧化氢(30%) 4 mL 后。放入恒温干燥箱,120 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 4 h,用 1% HNO_3 定容至 25 mL 容量瓶中备用。

1.3.1.2 湿式消解法 将称取好的大米粉置于三角烧瓶中,放 3~4 mm 玻璃珠数粒,加 10 mL 混合酸(硝酸:高氯酸 = 9:1),加盖浸泡过夜,加一小漏斗于三角烧瓶上,置于电炉上消解,直至消化液呈无色透明或略带黄色,用去离子水将消化液定容至 25 mL 容量瓶中备用。

本文采用上述两种方法对大米进行前处理后,滴入电解池中待测。

1.4 样品检测方法

石墨烯/玻碳电极先在 10 mL pH = 4.5 的 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液中,采用循环伏安法(CV)活化,记录 CV 曲线^[13]。然后滴入一定量的消化后的样品,混合均匀后,于 -1.1 V 处经电流-时间富集 300 s,静置 30 s。于 -1.0~-0.4 V 电位范围内经差分脉冲伏安法获得 DPV 曲线,测定 -0.72 V 处镉的溶出峰电流^[14]。

2 结果与讨论

2.1 石墨烯/玻碳电极的表面特性

利用扫描电镜表征石墨烯修饰电极的表面形貌,结果如图 1 所示,石墨烯修饰的电极表面完全被石墨烯膜覆盖,这种结构增加了电极的比表面积,利于电子在纳米材料上的传输,提高了材料的电化学反应活性。图 2 中可见,氧化石墨烯在 230 nm 处有紫外吸收峰,经电化学还原后成为石墨烯,其紫外吸收峰移至 260 nm 处,230 nm 处吸收峰基本消失,说明氧化石墨烯已被彻底还原。

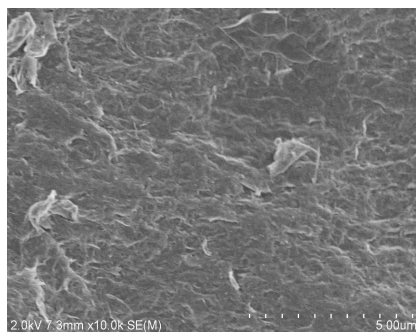


图 1 经过电化学还原的石墨烯修饰的玻碳电极的扫描电镜图

Fig.1 SEM image of R-GO/GCE

2.2 工作电极的电化学特性比较

分别以裸玻碳电极与 R-GO/GCE 作为工作电极,在 5.0×10^{-3} mol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中,采用循环伏安法考察电极的电化学特性。实验结果如图 3 所示, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在裸玻碳电极上产生一对峰形较好的氧化还原峰,在 R-GO/GCE 上, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 电对的氧化还原峰不仅对称,同时氧化还原峰的电流明显增高。原因是石墨烯导电性良好,比表面积很大,使得修饰电极的表面结构更加趋近适合电子迁移,从而有效提高检测方法的灵敏度。

2.3 电镀底液的选择

本实验采用 NaAc-HAc、PBS 两种缓冲液作为电

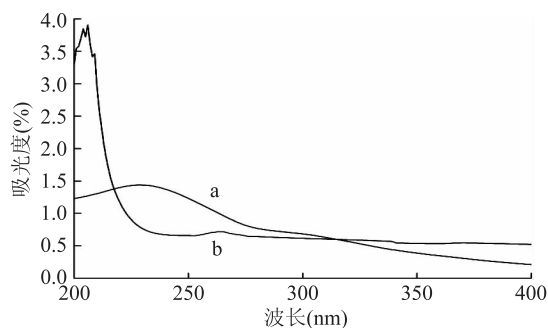
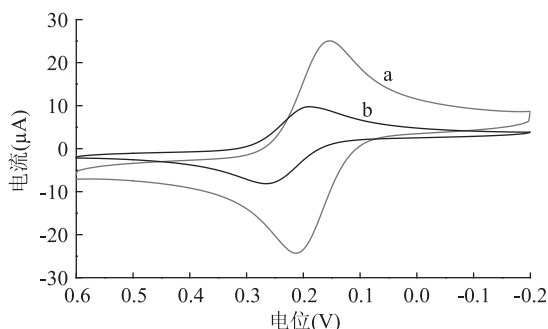


图2 石墨烯和氧化石墨烯的紫外吸收谱图

Fig.2 UV-vis absorption spectra of aqueous dispersions containing GO, R-GO

注:曲线 a 是氧化石墨烯,曲线 b 是石墨烯。

图3 R-GO/GCE 电极和 GCE 电极在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ 溶液中的循环伏安曲线Fig.3 Cyclic voltammograms curve of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ at different electrodes注:a 是石墨烯修饰电极;b 是裸玻碳电极,溶液浓度为 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

沉积底液进行研究^[15]。当滴涂氧化石墨烯浓度为 1 mg/mL 、滴涂量为 $8 \text{ } \mu\text{L}$ 时,待玻碳电极表面的氧化石墨烯彻底烘干后,用三电极系统分别在两种缓冲液中进行石墨烯电沉积还原过程。实验结果如图 4 所示,NaAc-HAc 缓冲液中的镉溶出峰的峰高明显大于 0.067 mol/L PBS 缓冲液。且通过大量镀膜对比实验后发现,当使用 NaAc-HAc 缓冲液作为电沉积底液时,在电还原过程中,玻碳电极表面产生大量气泡,无法得到平整的、致密的、导电性良好的石墨烯修饰膜,对玻碳电极增强作用欠佳;采用 0.067 mol/L PBS 缓冲液 ($\text{pH}8.2$) 进行电沉积过程,并无气泡产生,得到平整的致密的石墨烯修饰膜,通过其循环伏安曲线能看出,对玻碳电极起到明显增强作用。

2.4 富集电位与富集时间的影响

当富集电位从 -0.6 到 -1.1 V 时, Cd^{2+} 的氧化峰电流随着电位而增大;而富集电位从 $-1.1 \sim -1.4 \text{ V}$ 时, Cd^{2+} 的氧化峰电流增加趋缓。故本实验选择的富集电位为 -1.1 V 。在富集电位为 -1.1 V 下,对富集时间进行了优化,如图 5 所示,当富集时间从 0 增至 300 s 的过程中,氧化峰电流增加明显,继续延长富集时间,峰电流的增加则逐渐变缓。这是由于电极表面随着富集时间的延长一直在吸附 Cd^{2+} ,而达到 300 s 后,电极表面的 Cd^{2+} 已趋于饱和。故最后选定富集

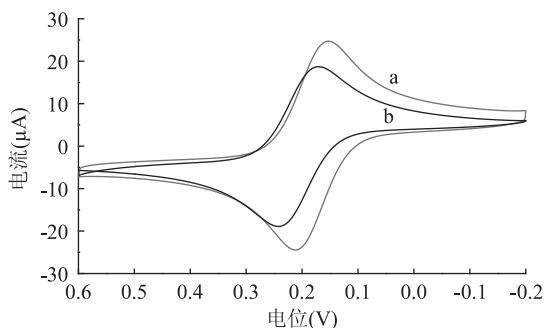
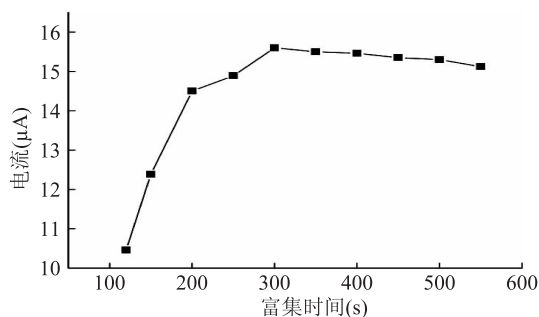
时间为 300 s 。

图4 由不同电镀底液制备的

R-GO/GCE 电极在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ 溶液中的循环伏安曲线Fig.4 CVs of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ on

R-GO/GCE with the GR films prepared in different electrodepositing buffers

注:a 是 0.067 mol/L PBS 缓冲液 ($\text{pH}8.2$); b 则是 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 ($\text{pH}4.5$), 溶液浓度为 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。图5 富集时间对 Cd^{2+} 的溶出峰电流的影响Fig.5 Effect of preconcentration times on the stripping peak currents of Cd^{2+}

2.5 电解液与 pH 的影响

本实验选用 NaAc-HAc 缓冲液、KCl 溶液、氨水-氯化铵缓冲液作为电解液,对 Cd^{2+} 标准液进行对比测定。根据 Cd^{2+} 的溶出电位 (-0.72 V 左右) 和溶出峰电流确定最佳的电解液。图 6 表明,在 NaAc-HAc 缓冲液中镉离子的溶出峰峰形较好,峰值最大,溶出电位更靠近标准溶出电位。因此本文选择 $\text{pH}4.5$ 的 0.1 mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液作为电解液。

2.6 Cd^{2+} 在石墨烯/玻碳电极上的电化学增敏行为

图 7 是 $6.0 \times 10^{-6} \text{ g/L}$ 的 Cd^{2+} 在不同两种电极上的 DPV 曲线,由图可明显看出裸玻碳电极的电流响应信号比石墨烯修饰电极的弱很多。石墨烯修饰电极在 -0.72 V 处存在着峰型尖锐,信号强的溶出峰。

2.7 线性范围与检测限

根据以上优化实验条件,采用差分脉冲伏安法对 Cd^{2+} 进行测定。根据实验结果,浓度与峰电流的相关性如图 8 所示,得到线性回归方程为: $I(\mu\text{A}) = 0.0397c + 1.584$, $R^2 = 0.9925$, $c = 10^{-8} \text{ g/L}$,由此可见, Cd^{2+} 浓度在 $4 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-5} \text{ g/L}$ 范围内呈良好的线性关系,检测限为 $3.0 \times 10^{-9} \text{ g/L}$ ($S/N = 3$)。本检测方法的检测限远低于常用国标法火焰原子吸收法

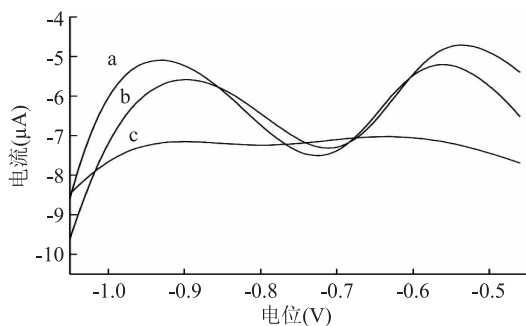
图6 Cd^{2+} 在三种电解液中的差分脉冲伏安曲线

Fig.6 Pulse Voltammetry curve of graphene modified GCE in three different buffers

注:a是0.1 mol/L的NaAc-HAc缓冲液(pH4.5);
b是0.1 mol/L的KCl溶液,
c是0.1 mol/L氨水-氯化铵缓冲液(pH8.0)。

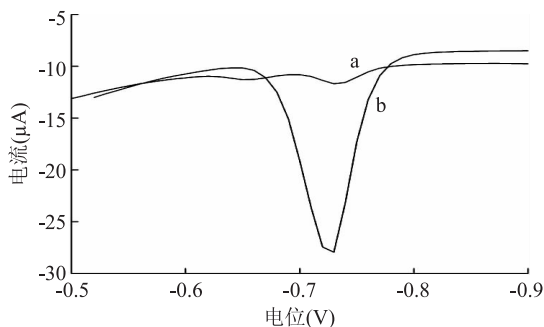


图7 石墨烯修饰电极在0.1 mol/L的NaAc-HAc缓冲液(pH4.5)中的差分脉冲伏安曲线

Fig.7 Differential Pulse Voltammetry curve of graphene modified GCE in

0.1 mol/L NaAc-HAc buffer solution (pH4.5)

注:a是采用石墨烯修饰电极检测镉的溶出电流曲线;
b是采用裸玻碳电极检测镉的溶出电流曲线。

(检测限为 1×10^{-6} g/L)^[16],但又相对便捷经济,有较好的实际应用价值。

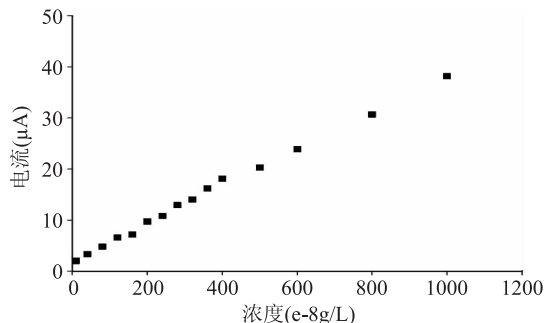
图8 不同浓度的 Cd^{2+} 的标准曲线

Fig.8 The calibration curves of Cd^{2+}

2.8 电极的精密度及稳定性

采用同一根修饰电极对 4.0×10^{-6} g/L Cd^{2+} 溶液平行测定6次,得出的相对标准偏差(RSD)为8.53%。说明该电极有良好的精密度和重现性。此外,还考察了该修饰电极的使用寿命。该电极每天测定 4.0×10^{-6} g/L Cd^{2+} 溶液1次,测完后即经活化

处理后置于空气中存放,半个月后测定其DPV电流响应值仅降至原来的96.2%,表明该修饰电极具有良好的稳定性。

表1 石墨烯修饰电极的稳定性

Table 1 The stability of R-GO/GCE

测试次数	第一次	第二次	第三次	第四次	第五次	第六次
电流响应值(μA)	13.91	15.74	15.08	16.24	17.93	16.44

2.9 实际样品的测定

大米样品按上述方法消化后使用石墨烯修饰玻碳电极测定,实验发现两种消化方法中,压力消解罐法更安全快速,而湿法消解则过于冗长拖沓、消耗强酸量大、安全隐患多且对环境的污染严重^[17]。但这两种方法消化后的测定结果几乎无太大出入,所以本文选择压力罐消解法对大米进行消解处理。

表2 大米中镉的测定结果(n=5)和回收率实验

Table 2 Analytical results of cadmium in rice samples (n=5) and recovery test

样品	测定值(mg/kg)	加标量(mg/kg)	加标测定值(mg/kg)	回收率(%)	平均回收率(%)
湖南大米	0.22	0.20	0.39	85.00	96.25
		0.40	0.65	107.50	
泰国香米	0.18	0.20	0.37	95.00	98.75
		0.40	0.59	102.50	
苏北大米	0.11	0.20	0.34	115.00	105.00
		0.40	0.49	95.00	
广西大米	0.13	0.20	0.35	110.00	101.25
		0.40	0.50	92.50	
广东大米	0.14	0.20	0.35	105.00	111.25
		0.40	0.61	117.50	

结果表明这五种市售大米样品中镉含量除了湖南大米外均符合国标限量GB2762-2012食品中污染物限量标准规定,但广西大米和泰国香米的镉含量偏高。平均回收率范围为96.25%~111.25%,符合GBT 27404-2008。

3 结论

采用恒电位沉积方法制备纳米级石墨烯修饰的玻碳电极,并通过SEM、UV-vis手段对修饰电极的形貌进行了表征,探讨了修饰剂用量、溶液pH、沉积时间等条件对实验检测结果的影响,优化最佳实验条件以提高 Cd^{2+} 测定的灵敏度。在优化的实验条件下,采用溶出伏安法对不同浓度的 Cd^{2+} 进行测定,得到的线性方程较好,灵敏度高,检测结果令人满意,实现了 Cd^{2+} 在石墨烯修饰电极的溶出测定,此方法操作简单、成本低、快速灵敏,具有良好的推广价值。

参考文献

- [1] GB8978-1996, 中华人民共和国国家标准污水综合排放标准[S].
- [2] 欧阳燕玲,陈玲,谢燕湘,等.大米中镉污染的现状分析及其危害[J].中国医药指南,2012,10(24):367-368.

- [3]陈集,饶小桐.仪器分析[M].重庆:重庆大学出版社,2002:49-103.
- [4]张祖训,汪尔康.电化学原理和方法[M].北京:科学出版社,2000:390-402.
- [5]Lu Z Z, Yang S L, Yang Q, et al. A glassy carbon electrode modified with graphene, gold nanoparticles and chitosan for ultrasensitive determination of lead (II) [J]. Microchim Acta, 2013, 180:555-562.
- [6]Li Jing, Guo Shaojun. High-sensitivity determination of lead and cadmium based on the Nafion-graphene composite film [J]. Analytical Chimica Acta, 2009, 649(2):196-201.
- [7]Stankovich S, Dikin D A, Dommett G H B, et al. Graphene-based composite materials [J]. Nature, 2006, 442:282-286.
- [8]Chen Liyun, Tang Yanhong, Wang Ke, et al. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application [J]. Electrochemistry Communications, 2011:133-137.
- [9]董绍俊,车广礼,谢远武.化学修饰电极[M].北京:科学出版社,1995:18-19.

- [10]金利通,全威,徐金瑞,等.化学修饰电极[M].上海:华东师范大学出版社,1992:253-255.
- [11]Sidorov A N, Yazadanpanah M M, Jalilian R, et al. Electrostatic deposition of graphene [J]. Nanotechnology, 2007, 18(13):135301.
- [12]GB/T5009.15-2003,食品中锡的测定[S].
- [13]Li Junhua, Kuang Daizhi, Feng Yonglan, et al. Electrochemical tyrosine sensor based on a glassy carbon electrode modified with a nanohybrid made from graphene oxide and multiwalled carbon nanotubes [J]. Microchim Acta, 2013, 180:49-58.
- [14]宋远志,刘炳华,陈美霞.污水中铅镉的溶出伏安测定法[J].环境与健康杂志,2003,20(4):242-243.
- [15]王国顺,吕荣山,施清照译著.电化学分析-溶出伏安法[M].北京:北京计量出版社,1988:56-87.
- [16]孙毓庆,胡育筑.分析化学[M].北京:科学出版社,2011:21-49.
- [17]杨学文.湿式消解和微波消解前处理法测定大米中铅元素的检测效率比较[J].中国稻米,2012,18(5):80-81.

(上接第194页)

表6 感官品评结果

Table 6 The result of sensory evaluation

实验	外观	泡沫形态	香气和口味	排序
1	清亮	洁白细腻	酒体较为柔和、略淡,有酯香味	4
2	清亮	洁白细腻	酒体柔和协调,高级醇味,无异香、无异味	2
3	清亮	洁白细腻	酒体柔和协调,醇厚,醇酯平衡	1
4	清亮	洁白细腻	酒体柔和协调,略淡、无异杂味	3

化前后 8 °P 成品酒进行感官评定,并且对实验样品从香气和口味两方面进行综合评定确定总体排序,结果如表 6 所示。

由表 6 可知,通过优化发酵工艺,啤酒柔和协调性明显提高,但由于发酵温度高于普通浓度的啤酒(主发酵温度 ≤ 10 °C),引起酒液高级醇含量增加,酒液感官品评高级醇味突出。实验过程中将主发酵温度由 10.9 °C 降至 10.5 °C 时,酒液高级醇含量降低,同时酒液感官品评酒体柔和协调、醇酯平衡,综合排序第一。

3 结论

在单因素实验与响应面实验的基础上,研究了发酵工艺对高浓啤酒醇酯比的影响及提高高浓啤酒醇酯比的最佳条件。结果表明,麦汁溶解氧对啤酒醇酯比的影响较大,接种酵母数次之,最后是接种酵母数和主发酵温度的交互作用及麦汁溶解氧和主发酵温度的交互作用。由响应面二次回归方程优化的最佳条件为,麦汁溶解氧 11.79 mg/L,接种酵母数 2.53×10^7 个/mL,主发酵温度 10.98 °C,预测啤酒醇酯比为 4.43。实际麦汁溶解氧 11.92 mg/L,接种酵母数 2.59×10^7 个/mL,主发酵温度 10.9 °C,实际测定啤酒醇酯比为 4.35,此工艺条件下啤酒醇酯比最大。扩大实验结果表明,麦汁溶解氧 11.97 mg/L,接种酵母数 2.62×10^7 个/mL,主发酵温度为 10.5 °C 时,高浓啤酒醇酯比适宜,感官品评酒体柔和协调、醇厚、醇酯平衡,适合工业化生产。

参考文献

- [1] Munoz E, Ingledew W M. Very High Gravity Brewing - Laboratory and Pilot Plant Trials [J]. American Society of Brewing Chemists, 1992(1):10-13.
- [2] Casey G P, Chen E C-H. High-Gravity Brewing: Production of High Levels of Ethanol Without Excessive Concentration of Esters and Fusel Alcohols [J]. American Society of Brewing Chemists, 1985, 43(4):179-182.
- [3] Virgin R, Jose VG, Paloma M, et al. Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolysis activities in yeast extracts [J]. Enzyme Microbial Technology, 2002(30):224-230.
- [4] Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokawa Y, et al. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate [J]. Appl Environ Microbiol, 1998(64):4076-4078.
- [5] Van Gheluwe G, Chen E, Valyi Z. Factors affecting the formation of fusel alcohols during fermentation [J]. Tech Q, 1975, 12:169-175.
- [6] Taylor G T, Kirsop BH. The origin of the medium chain length fatty acids present in beer [J]. J Inst Brew, 1997, 83:241-243.
- [7] Peddle HAB. Ester formation in brewery fermentation [J]. J Inst Brew, 1990, 96:327-331.
- [8] Zhou X, Zhao MR, Liang JP, et al. High efficiency degradation crude oil by $^{12}C^{6+}$ anovel mutant irradiated from *Dietzia* strain by heavy ion using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2013, 137:386-393.