

木糖醇脱氢酶研究进展

陈高云¹,叶凯²,涂振东²,李勇锋¹,于孟斌¹,刘健¹,智庆文¹,刘敏¹

(1.防化指挥工程学院生物防护教研室,北京 102205;2.新疆维吾尔自治区农业科学院,新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 综述了木糖醇脱氢酶研究现状,包括木糖醇脱氢酶的提取、结构、理化性质以及辅酶改造,同时对利用生物技术进行木糖醇脱氢酶基因克隆和表达的研究概况进行了简要介绍。

关键词: 燃料乙醇; 木糖醇脱氢酶; 木糖醇脱氢酶基因; 研究现状

中图分类号:Q55;Q78;Q814

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)05-0090-04

Research Progress in Xylitol Dehydrogenase

CHEN Gaoyun¹, YE Kai², TU Zhendong², LI Yongfeng¹, YU Mengbin¹, LIU Jian¹, ZHI Qingwen¹ and LIU Min¹

(1. Dept. of Biological Defense, Institute of Chemical Defense and Commanding Engineering, Beijing, 102205;

2. Xinjiang Uigur Municipality Academy of Agricultural Sciences, Urumchi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: The research status of XDH at present including its extraction, its structure, its physiochemical properties, and its coenzyme modification was reviewed in this paper. Meanwhile, the research on the cloning and the expression of xyl2 by use of biotech was introduced briefly.

Key words: fuel ethanol; xylitol dehydrogenase (XDH); xylitol dehydrogenase gene (xyl2); present research status

燃料酒精是一种无毒、可降解、可再生的能源。当前,生产燃料乙醇的主要方法是粮食发酵。但随着近年来全球玉米、小麦等粮食价格的上涨,粮食发酵生产引发了外界对粮食生产乙醇的颇多质疑,并且国务院明确提出粮食生产乙醇和煤制油项目要停止,现有的以粮食生产乙醇的企业也要逐步转入非粮生产。这种情况下,利用可再生的植物纤维资源生产燃料酒精又一次成为了焦点。木质纤维材料中广泛存在的半纤维素是植物纤维材料的主要成分之一,如秸秆中半纤维素的含量占其干重的25%~50%^[1]。其主要分解产物是木糖,而木糖不能被普通的酒精酵母直接发酵为酒精,所以长期以来被认为是“不发酵性糖”。直到1980年,Wang等人^[2]提出木糖可被一些微生物发酵生成酒精。此后在国际上掀起了一股木糖酒精发酵菌种的研究热潮。但由于天然菌株木糖代谢生产乙醇存在许多不足,近年来,人们重点进行了利用基因工程构建高效木糖发酵菌的研究,木糖醇脱氢酶作为木糖代谢过程中的关键酶,在构建木糖代谢重组菌中占重要地位,研究木糖醇脱氢酶及其基因对构建以木质纤维素为原料发酵生产乙醇的酵母工程菌和开发利用新能源具有重要意义。

木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase, XDH, EC1.1.1.9)学名木糖醇:NAD⁺ 2-氧化还原酶。该酶是酵母菌和大多数丝状真菌中木糖代谢的关键酶之一,木糖首先

在木糖还原酶(xylose reductase, XR)的作用下转化为木糖醇,木糖醇接着在木糖醇脱氢酶的催化下生成D-木酮糖,D-木酮糖经木酮糖激酶作用磷酸化后进入戊糖磷酸循环,最后经糖酵解途径或在厌氧条件下产生乙醇,或在好氧的条件下经三羧酸循环彻底氧化^[3]。

1 木糖醇脱氢酶产生菌和性质研究

木糖醇脱氢酶来源主要集中于一些能代谢木糖的酵母和丝状真菌中,如酵母中的假丝酵母(*Candida*),毕氏酵母(*Pichia*)和管囊酵母(*Pachysofen*)3个属,真菌中的尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)及粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)。尽管酿酒酵母不能发酵和在木糖上生长,但据报道,它能以一个很低的速率代谢木糖。关于酿酒酵母中是否存在木糖醇脱氢酶活性的报道存在矛盾,Batt et al等^[4]报道,能在酿酒酵母中检测到木糖醇脱氢酶活性,而Van Zyl et al^[5]则报道未能发现。Peter Richard等^[6]为了澄清木糖醇脱氢酶是否在酿酒酵母中存在,进行了不同培养成分条件下,木糖醇脱氢酶活性测定。结果表明,当在混合糖(葡萄糖和木糖)条件下培养时,仅当细胞葡萄糖消耗完,且有木糖存在时,才可检测到此酶活性。由此推断Van Zyl et al未能发现,是由于没有在木糖存在条件下培养酵母。

不同菌株中提取的木糖醇脱氢酶其性质有一些差

基金项目 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划甜高粱秸秆转化液体燃料综合技术开发(200615120)。

收稿日期:2011-01-04

作者简介:陈高云,男,硕士,讲师,研究方向:生物化学与分子生物学。

通讯作者:刘敏,女,教授,硕士生导师,主要从事生物质能源研究。

异,但其蛋白序列和酶学性质有一定的相似性,这些酶特异性地以 NAD^+ 为辅酶,酶活多受金属离子的影响。一般认为,多数木糖醇脱氢酶属于中链脱氢酶家族,为同型聚体结构,亚基由 300~400 个氨基酸组成,其活性中心序列有较高的保守性,但也有不同报道^[2]。

Phadtare S.U.等^[7]从 *Neurospora crassa* 中分离纯化出 1 种木糖醇脱氢酶,此酶属于同型二聚体,每个亚基相对分子量 43.6 kDa,在 pH8.4 和 28 °C 条件下酶活最大,而在 pH 7 和 4 °C 条件下酶最稳定。各种金属离子对酶活性影响实验表明, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 能使酶维持活性,而 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 能抑制酶活,不含金属离子的酶几乎没有酶活力,但添加 Mg^{2+} 酶活可恢复。何圣楠等^[8] 从热带假丝酵母 (*Candida tropicalis* 1779) 中经多步纯化得到电泳纯的木糖醇脱氢酶,其最终比酶活可达 11.37 U/mg,纯化倍数达到 60.8 倍,回收率达到 10.9%。经 SDS-PAGE 电泳和 native-PAGE 电泳分析得出,木糖醇脱氢酶相对分子量约为 90 kDa,由 2 个分子质量为 45 kDa 的亚基组成。

Boer.E.等^[9]从野生的 *A.adenivorans* LS3 菌和木糖醇脱氢酶基因的重组菌 *A. adenivorans* G1211 菌中分离纯化得到木糖醇脱氢酶,两种酶显示了相似的特征:相对分子质量为 80 kDa,属于同型二聚体结构。在 pH7.5 和温度为 35 °C 条件下,酶活力最大。一定条件下,以木糖醇为底物时,测得米氏常数为 4.0 mmol/L,并表现出了很高活性。研究表明,此酶仅以 NAD^+ 为辅酶,与来自树干毕赤酵母中的木糖醇脱氢酶一样,此酶不氧化伯醇和甘油。Panagiotouden G. 等^[10] 从实验室菌株尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* F3) 中提取和纯化出 1 种木糖醇脱氢酶,它以 NAD^+ 为辅酶,为同型二聚体结构,每个亚基的相对分子质量为 48 kDa,在 pH9~10 和温度为 45 °C 条件下,酶活力大。pH6~7 和 30 °C 条件下,此酶能稳定存在 24 h。各种金属离子对酶活性影响实验表明, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活几乎没有影响,而 10 mmol/L 的 Cu^{2+} 能完全抑制酶活,10 mmol/L 的 Mn^{2+} 则能使酶活加倍。Lima L. H.A.等^[11]对热带假丝酵母 (FTI20037) 编码的木糖醇脱氢酶进行研究。序列对比显示,这个酶有典型的属于中链脱氢酶家族的乙醇脱氢酶的特征序列:[GHE]xx[G]xxxxx[G]xx[V]。此外,还含有 1 个锌离子结合活性位点(残基 Cys⁴¹、His⁶⁶、Glu⁶⁷ and Glu¹⁵⁹),以及 NAD^+ 结合位点 (Val¹⁸⁷、Asp²⁰⁷、Lys²¹²、Cys²⁵²、Lys²⁶⁷、Asn²⁷⁷ and Ser²⁹⁹)。 NAD^+ 结合结构域是一个典型的 Rossmann 卷曲,并且像其他属于中链脱氢酶家族的成员一样,保守的 Asp²⁰⁷ 残基对此酶的 NAD^+ 辅酶特异性有重要影响。

2 木糖醇脱氢酶的基因克隆和表达

2.1 在大肠杆菌中的克隆和表达

因大肠杆菌的遗传背景清楚、繁殖快、成本低、表达

量高、易于操作等特点,木糖醇脱氢酶基因(xyl2)广泛用大肠杆菌作克隆载体。Lien H.T.等^[12]以米曲霉 (*A.oryzae* P5) 总 RNA 为模板反转录 PCR 扩增木糖醇脱氢酶基因,其长度为 1214 bp,含 2 个内含子,编码 358 个氨基酸,将此基因与表达质粒 pDEST14 载体连接,然后转化到 *E. coli* BL21-AI 中进行表达,表达产物经 SDS-PAGE 测定,产生一条 36.5 kDa 的木糖醇脱氢酶蛋白带。Andreas H. 等^[13]用 RT-PCR 从 *Galactocandida mastotermitis* 中扩增出 cDNA,然后将其 PCR 克隆到表达载体 PBtacl 上,经测序验证后进行 IPTG 诱导表达,结果表明,37 °C 条件下,此酶得到活性表达,含量约占 *E. coli* 总蛋白的 8%,且随着诱导温度的降低,酶的活性逐渐降低。

2.2 在酿酒酵母中的克隆和表达

当前,许多人通过在酿酒酵母中表达木糖还原酶基因(xyl1)和木糖醇脱氢酶基因来构建能代谢木糖的基因工程菌,因此,酿酒酵母成为木糖醇脱氢酶基因最常用的真核表达载体。

汪天虹等^[14]采用双载体系统,将携带有瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的表达质粒 pAJ-4012-xdh1 转化到已带有树干毕赤酵母木糖还原酶基因的重组酿酒酵母 H475 中,构建出重组酿酒酵母 HX1。从重组子提取蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western 印迹杂交分析,结果显示转化子 HX1 在约 40 kDa 处比未转化的 H475 多一条带,推测此蛋白电泳带应为木糖醇脱氢酶带。L.H.A. Lima 等^[12] 从热带假丝酵母克隆出了木糖醇脱氢酶基因,并在酿酒酵母中得到了表达。这个基因是基因组中的 1 个单拷贝序列,它的转录受木糖的影响。其长度为 1092 bp,编码 364 个氨基酸。将基因 xyl2 开放阅读框连接到表达载体 YEpPGK 的强启动子 PGK1 下,重组表达载体 YEpXYL2-PGK 转化酿酒酵母。通过对重组子酶活检测表明,木糖醇脱氢酶得到活性表达。

Bruinenberg 和 Dellweg 等^[15]将树干毕赤酵母的 xyl1 和 xyl2 克隆到酿酒酵母中,转化子能在以木糖为唯一碳源的培养基上生长,但酒精产率比较低。潘亚平等^[16]采用 PCR 克隆得到树干毕赤酵母 xyl2,后将该基因和来自 *Candida shehatae* 的缺终止子的 xyl1 一起连接到酵母表达载体 pYES2 的强启动子 GAL 下,得到融合表达载体 pYES2-P12。然后转入酿酒酵母 YS58 中,得到酿酒酵母 YS58-12。利用构建的重组酵母进行发酵试验,结果表明,该重组酵母能在以木糖为唯一碳源的培养基上生长,但不能有效发酵木糖产生乙醇。陈叶福等^[17]通过 PCR 方法克隆得到树干毕赤酵母木糖醇脱氢酶基因,将该基因连入酵母表达载体 pYX212 的强启动子磷酸丙糖异构酶 (TPI) 启动子下,得到融合表达载体 pYX-xyl2,通过电转化方法将 pYX-xyl2 转入酿酒酵母 W303-1A 中,酶活测

定表明,在酿酒酵母中树干毕赤酵母木糖醇脱氢酶基因得到活性表达,酿酒酵母转化子粗酶液中木糖醇脱氢酶比酶活约为0.6 U/mg,约为供体菌的2.4倍。Seiya Watanabe等^[18]得到了Y-ARSdR菌株(依赖辅酶NAD⁺的XDH从*Pichia stipitis*中克隆到),乙醇的产量增加了41%。

3 木糖醇脱氢酶的辅酶改造

目前,已有许多人利用基因工程技术将木糖还原酶基因(*xyl1*)及木糖醇脱氢酶基因(*xyl2*)导入酿酒酵母,表达也没有障碍,得到可以发酵木糖产生酒精的工程菌株,但普遍存在酒精得率不高问题,这也成为木糖高效发酵的一个难点。而解决辅酶I(NAD⁺)特异性的木糖还原酶(XR)和还原辅酶(NADPH)偏爱性的XDH辅酶不能相偶联而造成的氧化还原不平衡被认为可能是这一难点的突破口^[19]。

3.1 利用基因重组进行辅酶改造

Metzger M.H等^[20]将从*Thermoanaerobium brockii*的乙醇脱氢酶基因中得到的NADP⁺识别序列引入XYL2,试图改变XDH对NAD⁺的特异性需求,突变的酶可以利用NAD⁺和NADP⁺,并且两者的表观K_m相同。在木糖基本培养基上,带有突变的*xyl2*和*xyl1*共同表达的酿酒酵母转化子能够生长。Anderlund M等^[20]将XR和XDH两种酶的基因用一小段DNA连接在一起,在酿酒酵母中成功得到具有双功能酶活性融合蛋白的活性表达,因为两者之间的距离很短,可以使木糖还原酶有更高的几率结合利用NADH作为辅酶,这种重组酵母和分别表达XR和XDH单体的菌株相比,木糖醇产生率降低11.3%,而乙醇得率升高了20.3%。

3.2 利用氨基酸定点突变进行辅酶改造

为了解决木糖代谢中的木糖还原酶和木糖醇脱氢酶辅酶因子氧化还原不平衡的问题,很多人还致力于通过氨基酸定点突变改变XDH的辅酶特异性。

文献报道^[22-23],通过序列分析定位了一个辅酶结合域,它在大多数已发现的NAD⁺依赖型的木糖醇脱氢酶中是保守的,这个结合域的一个典型的共同特征:含1个βαβ折叠,在其中心是1个甘氨酸(Gly)基序GXGXXG,以及位于这个基序特定距离的保守的天冬氨酸残基(Asp);同时位于Asp下游5个氨基酸残基处还有1个带正电荷的赖氨酸(Lys)或精氨酸(Arg)残基。Metzger等^[20]通过对此结构域的氨基酸位点突变,使构建的单突变子D207G,双突变子D207G和D210G把NAD⁺的表观K_m增加了9倍,而其酶活性则分别降低到突变前的47%和35%。

W.Seiya等^[23]研究了毕赤酵母木糖醇脱氢酶的辅酶特异性的改变。通过多位点定点突变技术对来自树干毕

赤酵母的以NAD⁺为辅酶的木糖醇脱氢酶改造成利用NADP⁺为辅酶。W.Seiya等认为,辅酶的特异性不同主要在于Asp²⁰⁷、Ile²⁰⁸、Phe²⁰⁹和Asn²¹¹4个位点氨基酸的影响,通过多个位点突变后,此酶对NADP⁺的利用的kcat/K_m值达到野生型木糖醇脱氢酶对NAD⁺利用的kcat/K_m值。结果表明,以上4个位点氨基酸尤其是Asp²⁰⁷对木糖醇脱氢酶NAD⁺特异性至关重要。Andreas等^[2]测定了来自*Gluconobacter oxydans*的XDH全酶的晶体结构图。结构显示:该酶的NAD⁺特异性主要是由含羧酸盐的Asp38决定,它与腺苷核糖的羟基相互作用。同时证明Met39与特异性也有一定的关系。将这一位置的含羧酸盐的Asp38用丝氨酸取代,用精氨酸取代Met39,构建了两突变子D38S/M39R,结果双突变子对NAD⁺显示了高度的特异性,且酶未失活。Shiqi Hong等^[25]从*Candida albicans*中克隆得到木糖醇脱氢酶基因,并在*Escherichia coli*中得到了表达,底物为木糖醇和NAD⁺时,K_M和kcat/K_M分别为37.7 μmol和53200 min/mmol,通过定点突变将以NAD⁺为辅酶的木糖醇脱氢酶改造成利用NADP⁺为辅酶,K_M和kcat/K_M(利用辅酶NADP⁺)分别为119 μmol和26200 min/mmol。

4 展望

人们对木糖醇脱氢酶已经开展了较为深入系统的研究,但有关木糖醇脱氢酶的许多结构及作用机理目前尚只是一种推测,要得到进一步的证实,还需要做更深入细致的研究。

提高木糖代谢生产酒精产量的关键技术步骤已被许多人着手研究。为了构建能代谢木糖的酿酒酵母,重点研究了通过在酿酒酵母中表达木糖还原酶基因和木糖醇脱氢酶基因以及其他相关基因,而实现构建代谢木糖的酿酒酵母工程菌。因此,今后对此酶的研究将主要集中在用木糖醇脱氢酶基因(*xyl2*)与木糖还原酶基因(*xyl1*)以及其他酵母木糖代谢基因在酿酒酵母中实现共表达,以期达到对传统酿酒酵母的木糖代谢途径的改造,构建一种性能优良的葡萄糖和木糖的共发酵菌。

参考文献:

- [1] Hahn-Hagerdal, Jeppsson, Skoog H. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast[J]. *Enzyme.Microb. Technol.*,1994,16(11):933-943.
- [2] Andreas H E,Robert A E,David K W.Structure-Guided engineering of xylitol dehydrogenase cosubstrate specificity[J].*Structure*, 2006(14):567-575.
- [3] Kern M,Haltrich D,Nidetzky B et al. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997(149):31-7.
- [4] Batt C A, Carvallo S, Easson D D et al. Direct evidence for a xy-

- lose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Bioeng., 1986(28):549-553.
- [5] Van Zyl C, Prior B A, Kilian, S G. and Brandt, E V. Role of D-Ribose as a cometabolite in D- xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*[J].Appl. Environ. Microbiol, 1993(59):1487-1494.
- [6] Richard P, Toivari M H, Penttila M. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase[J].FEBS Letters,1999,457:135-138.
- [7] Phadtare S U,Rawat U B,Rao M B. Purification and characterisation of xylitol dehydrogenase from *Neurospora crassa*[J]. FEMS Microbiology Letters ,1997(146):79-83.
- [8] 何圣楠,林影,吴晓英,等.热带假丝酵母木糖醇脱氢酶的分离纯化[J].食品与发酵工业,2006,32(7):46-49.
- [9] Boer E,Wartmann T,Schmidt S et al.Characterization of the AXDH gene and the encoded xylitol dehydrogenase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*[J]. Antonie van Leeuwenhoek,2005(87):233-243.
- [10] Panagiotou G, Kekos D, Macris B.J et al.Purification and characterisation of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from *Fusarium oxysporum*[J]. Biotechnology Letters,2002,(24):2089-2092.
- [11] Lima L H A,Pinheiro C G,Moraes L M P et al.Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning of the gene and structural analysis of the protein[J].Appl. Microbiol. Biotechnol, 2006(73):631-639.
- [12] Line H T,Noriyuki K,Keiichi K et al.Cloning and expression of a NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene (xdhA) of *Aspergillus oryzae*[J].J.Biosci Bioeng,2004,97(6):419-422.
- [13] Andreas H,Hassan M,Michael K.et al.Xylose Utilisation: Cloning and characterization of the xylitol dehydrogenase from *Galactocandida mastotermitis*[J].Biol.Chem.,1999(380):1405-1411.
- [14] 汪天虹,Merja Penttila,李波.带有木糖还原酶基因和木糖醇脱氢酶基因的重组酿酒酵母的构建[J].菌物系统,1999,8(3):311-315.
- [15] Bruinenberg P M,Scheffers W A.An enzymic analysis of NADPH production and construction in *Candida utilis*[J].J. Gen.Microbiol,1983(129):965-971.
- [16] 潘亚平,刘继开,李学风,等.代谢木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母的构建[C]//中国生物质能与可持续发展研讨论文集.2005.
- [17] 陈叶福,王正祥,方慧英,等.Pichia stipitis 木糖醇脱氢酶基因XYL2在酿酒酵母中的表达[J].无锡轻工大学学报,2003,22(2):26-29.
- [18] Seiya Watanabe, Ahmed Abu Saleh.Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase[J]. Journal of Biotechnology, 2007 (130):316-319.
- [19] 沈煜,王颖,鲍晓明,等.酿酒酵母木糖发酵酒精途径工程的研究进展[J].生物工程学报,2003,19(5):636-40.
- [20] Metzger M H,Hollenbrg C P.Amino acid substitutions in the yeast *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase coenzyme binding domain affect the coenzyme specificity[J].Eur.J.Biochem, 1995(228):50-54.
- [21] Anderlund M,Radstrom P,Hahn-Hagerdal B.Expression of bifunctional enzymes with xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* alters product formation during xylose fermentation[J].Metabolic Engineering,2001,3(3):226-35.
- [22] Wierenga R K, De Maeyer M C. H,Hol W G. J. Interaction of pyrophosphate moieties with ahelices in dinucleotide binding proteins[J]. Biochemistry ,1985(24):1346-1357.
- [23] Wierenga, RK, Terpstra P, Hol W G J. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ - fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint[J].J. Mol. Biol,1986(187):101-107.
- [24] Seiya W,Tsutomu K,Keisuke M.Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydro- genase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc[J].J.Biol. Chem, 2005,280(11):10340-9.
- [25] Shiqi Hong, Jinchuan Wu, Hua Zhao.Cloning, overexpression, purification, and site-directed mutagenesis of xylitol-2-dehydrogenase from *Candida albicans*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2010(62):40-45.

=====
(上接第 89 页)

- 2006(3):489-490.
- [9] 魏尚洲.桔梗资源的综合开发利用[J].陕西科技大学学报, 2005(5):146-148.
- [10] 苏东林,单杨,李高阳.柑橘皮里功能性物质种类及其提取工艺的研究进展 [J].现代食品科技,2007(3):90-94.
- [11] 江萍,徐贵华,刘东红,陈健初,叶兴乾.15种柑橘果皮中酚酸的含量测定 [J].食品与发酵工业,2008(6):124-128.
- [12] 元晓梅,刘贵贤,胡正芝.比色法测定柑桔饮料及桔皮制剂中总黄酮含量 [J].食品与发酵工业,1996(3):13-21.
- [13] 张玉,吴慧明,王伟,王建清,白丽萍.不同品种柑橘果皮中类黄酮含量及其采后变化[J].食品科学,2010(6):202-204.
- [14] 叶兴乾,徐贵华,方志祥,陈健初,刘东红.柑橘属类黄酮及其生理活性[J].中国食品学报,2008(5):1-7.
- [15] 李华,王华,袁春龙,王树生.葡萄酒工艺学[M].北京:科学出版社,2007:86.
- [16] 陈振林,杨惠玲,黄志强,张志.柿子发酵果酒酿造技术和营养成分分析[J].酿酒科技,2006(8):52-55.
- [17] 罗安伟,刘兴华,石慧,任亚梅.甜橙干酒澄清技术研究[J].西北农林科技大学学报,2007,35(10):179-181.