

果胶甲酯酶抑制剂的异源表达及其在果酒降甲醇中的应用

闫统帅¹, 周浩洋², 王泽翔¹, 何娇娇¹, 梁思宇³, 周世水^{1*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)
(3. 石湾酒厂集团股份有限公司, 广东佛山 528031)

摘要: 该文从猕猴桃中克隆出果胶甲酯酶抑制剂 (Pectin Methylesterase Inhibitor, PMEI) 基因, 经 EcoRI/XbaI 双酶切后连接到表达载体 pPICzaA 上, 电转化到毕赤酵母 GS115 筛选出阳性菌株 GS115/pPICzaA-PMEI, 并将重组酵母表达的 PMEI 浓缩纯化后应用于果酒发酵。研究结果表明: 重组毕赤酵母表达菌株 GS115/pPICzaA-PMEI 成功构建, PMEI 的发酵表达量为 35.38 mg/L。将 PMEI 应用到果酒发酵中, 桔子酒甲醇降低 47.54%, 含量由 189.75 mg/L 降低到 99.55 mg/L; 苹果酒甲醇降低 21.52%, 含量由 118.15 mg/L 降低到 91.20 mg/L; 葡萄酒甲醇变化不显著, 含量均低于 20.00 mg/L, 表明 PMEI 对果胶丰富且内源性果胶酶强的桔子具有明显的降甲醇效果。桔子酒发酵工艺优化的 PMEI 最低抑制质量浓度 8.84 mg/L, 最适温度 18 °C, 此时桔子酒中的甲醇降低 66.40% 到 89.10 mg/L。这为低甲醇果酒的发酵提供了新的技术路线。

关键词: 果胶甲酯酶抑制剂; 毕赤酵母; 甲醇; 果酒

文章编号: 1673-9078(2024)02-66-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.1571

Heterologous Expression of Pectin Methylesterase Inhibitor and its Application in Reducing Methanol in Fruit Wine

YAN Tongshuai¹, ZHOU Haoyang², WANG Zexiang¹, HE Jiaojiao¹, LIANG Siyu³, ZHOU Shishui^{1*}

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)
(3. Guangdong Shiwang Winery Group Co. Ltd., Foshan 528031, China)

Abstract: The pectin methylesterase inhibitor (PMEI) gene, cloned from the kiwi fruit, was linked to the expression vector pPICzaA through double digestion using EcoRI/XbaI. It was then transferred into *Pichia pastoris* GS115 by electro-transformation to obtain the positive strain GS115/pPICzaA-PMEI. After the PMEI expressed by GS115/pPICzaA-PMEI was concentrated and purified, it was applied in fruit wine fermentation. The results show that the recombinant *P. pastoris* expression strain GS115/pPICzaA-PMEI was successfully constructed, and the PMEI expression level was 35.38 mg/L. When PMEI was applied in fruit wine

引文格式:

闫统帅,周浩洋,王泽翔,等.果胶甲酯酶抑制剂的异源表达及其在果酒降甲醇中的应用[J].现代食品科技,2024,40(2):66-71.

YAN Tongshuai, ZHOU Haoyang, WANG Zexiang, et al. Heterologous expression of pectin methylesterase inhibitor and its application in reducing methanol in fruit wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 66-71.

收稿日期: 2022-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51878291)

作者简介: 闫统帅 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酵母遗传改造与酿酒, E-mail: 1398039561@qq.com

通讯作者: 周世水 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程与酿酒, E-mail: hgzhouss@scut.edu.cn

fermentation, the methanol in orange wine decreased by 47.54% from 189.75~99.55 mg/L. Similarly, the methanol content of apple wine dropped by 21.52% from 118.15~91.20 mg/L, whereas the methanol content of grape wine did not change significantly and remained below 20.00 mg/L. These results indicate that PME1 has a significant methanol reduction effect on oranges that are rich in pectin and endogenous pectinase. The minimum inhibitory concentration of PME1 for optimal orange wine fermentation was 8.84 mg/L and optimum temperature was 18 °C. Under these conditions, the methanol content of orange wine reduced by 66.40%, to 89.10 mg/L. These findings provide a novel technique for producing low-methanol fruit wine by applying PME1.

Key words: pectin methylesterase inhibitor; *Pichia pastoris*; methanol; fruit wine

果酒是水果发酵成的低酒精度饮料酒, 很好的保留了水果中的营养成分, 但是在果酒发酵过程中不可避免的生成甲醇^[1]。由于甲醇为视神经毒物, 可造成暂时或永久视力障碍^[2], 同时甲醇还会在人体缓慢代谢成毒性更大的甲醛和甲酸, 人误食 5 g 以上甲醇就会严重中毒甚至死亡^[3], 因此降低果酒中甲醇具有重要的研究意义。

果酒发酵中的甲醇主要来自水果果胶的水解^[4,5], 在内源果胶甲酯酶的作用下果胶被分解成果胶酸和甲醇^[6,7]。目前研究常采用高温热处理钝化果胶酶^[8-10]和清汁发酵^[11]来降低果酒中的甲醇, 两种处理方式都会使果酒的果香和口感品质降低, 而添加果胶甲酯酶抑制剂 (Pectin Methylesterase Inhibitor, PME1) 有望解决这一难题。Wu 等^[12]在爱玉果中提取出一种 PME1, 可有效降低杨桃果酒发酵中的甲醇, Wang 等^[13]进一步表征其为复合的单宁类似物, Hou 等^[14]发现葡萄中添加没食子酸或香豆酸也可以降低甲醇并增加酒中保健成分。此外, 来源于绿茶中的儿茶素和植物组织的根皮苷对果胶甲酯酶也具有抑制活性^[15,16], 从而具有降低果酒中甲醇的潜力, 但也存在含量低、提取复杂的难题。有报道来源于猕猴桃的 PME1 可以抑制果胶水解^[17], 从而维持果汁的浊态^[18], 且能在毕赤酵母中进行异源表达^[19], 若将其应用于果酒发酵则有望降低果酒中的甲醇。

本研究将从猕猴桃中克隆出的 PME1 基因, 利用双酶切连接到表达载体 pPICZαA 上, 电转化到毕赤酵母 GS115 中获得 PME1 异源表达的工程菌株 GS115/pPICZαA-PME1, 并将表达纯化后的 PME1 应用到果酒发酵来降低果酒中的甲醇, 这为低甲醇果酒的发酵提供了新的技术路线。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

毕赤酵母表达菌株 GS115, 质粒 pPICZαA 均为

本实验室保存, 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自金沙生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

ApexHF HS DNA 聚合酶预混液、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、GL DNA Marker 5000, 湖南艾科瑞生物科技有限公司; EcoRI、XbaI、T4 DNA 连接酶、BMGY 培养基、BMMY 培养基, 购自上海生物工程有限公司, 博来霉素 (Zeocin)、1xPBS 缓冲液, 北京普博欣生物科技有限责任公司; 乙酸丁酯、丙酮 (均色谱纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 22 种白酒标准品, 滕州中科普仪器有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

T100 聚合酶链式反应基因扩增仪, 大龙兴创实验仪器股份公司; Tanon EPS 300 电泳仪, 上海天能科技有限公司; Gel Doc2000 凝胶成像分析系统、411BR 电转化仪, 美国 Bio-Rad 公司; 5804R 高速台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; GC8100 气相色谱仪, 滕州中科普仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建及鉴定

根据 GeneBank 中的猕猴桃 PME1 基因序列, 利用软件 Primer 5.0 进行引物特异性设计, 并在其两端加入酶切位点 EcoRI 和 XbaI, 所设计的引物如表 1 所示, 由上海生工有限公司合成。重组质粒 pPICZαA-PME1 的构建如图 1 所示, 以反转录出的猕猴桃的 cDNA 为模板, 利用引物对 PME1-F 和 PME1-R 扩增大小为 480 bp 的目的基因, 将获取的目的基因与表达质粒 pPICZαA 进行双酶切连接, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α, 用引物 PME1-A/D 进行菌落 PCR 筛选, 并提质粒进行酶切验证^[20]。

表1 本实验所用的引物

Table 1 Primer sequences used in this study

引物	序列 5'→3'	酶切位点
PMEI-F	CGGAATTCATGGAAAACCATTTGA TTAGCG	EcoRI
PMEI-R	GCTCTAGAGATTTTGTATCCAGGC AAAAGA	XbaI
PMEI-A	GCTGCTCCAGTCAACACT	
PMEI-D	CTGAGGAACAGTCATGTC	

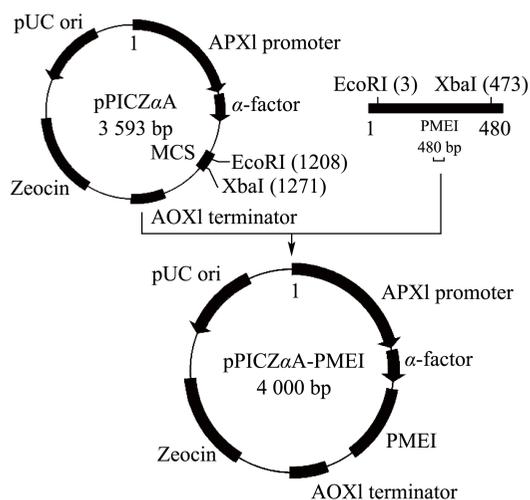


图1 构建重组质粒 pPICZαA-PMEI 示意图

Fig.1 Construction of recombinant pPICZαA-PMEI

1.2.2 重组毕赤酵母的构建及验证

将线性化的表达质粒 pPICZαA-PMEI 电转化到毕赤酵母 GS115 中, 涂布于含有 100 μg/mL Zeocin 抗性的 YPD 平板上, 30 °C 避光培养 2~3 d, 挑取抗性平板上的阳性菌落, 用引物 PMEI-F/R 进行菌落 PCR 验证。

1.2.3 重组毕赤酵母诱导表达 PMEI

参照梅晓宏等^[21]的发酵条件对重组毕赤酵母进行诱导表达, 挑取重组毕赤酵母菌于 25 mL BMGY 培养基中 28 °C、200 r/min 培养到 OD_{600 nm}=3.0~6.0。4 °C, 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 50 mL BMMY 培养基重悬菌体并转入 250 mL 三角瓶中继续培养, 每 24 h 补加 0.5 mL 甲醇, 诱导表达 120 h 后离心收集上清。

1.2.4 PMEI 的鉴定与浓缩纯化

将取少量表达上清用甲醇氯仿进行 10 倍浓缩抽提后进行 SDS 聚丙烯凝胶电泳, 观察蛋白条带是否符合预期。用 φ=80% 的硫酸铵将上清中的蛋白质进行沉淀, 用 1 倍体积 PBS 缓冲液重悬沉淀, 并用 34 nm 14 000 u 的透析袋 4 °C 过夜透析脱盐, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 并估算重组毕赤酵母

菌的表达量, 然后 -80 °C 冻存备用。

1.2.5 PMEI 在果酒发酵中的应用探究

将桔子、苹果、葡萄打浆, 分别取 80 mL 到 100 mL 的烧杯中, 加入 1% (V/V) PMEI, 对照组加入 1% (V/V) PBS 缓冲液, 接种 0.1% (m/V) 的果酒酵母, 24 °C 发酵 4 d 后用纱布过滤出酒液, 静置 12 h 后取样品测定甲醇和杂醇油含量, 并测定酒精度、还原糖和总酸。

1.2.6 PMEI 在桔子酒发酵中的最小抑制浓度

将桔子浆汁和过滤后桔汁按 80 mL 每份分装到 100 mL 的烧杯中, 实验组分别添加 0、0.25%、5%、0.75% 和 1% (V/V) 的初步纯化过的 PMEI, 对照组则添加对应量的 PBS 缓冲液, 全部接种 0.1% (m/V) 的果酒酵母于 30 °C 进行发酵, 发酵结束后用纱布过滤并测定其甲醇含量。

1.2.7 PMEI 在桔子酒发酵中的最适温度

将桔子浆汁按 80 mL 每份分装到 100 mL 的烧杯中, 按体积比添加 0.5% (V/V) 的初步纯化过的 PMEI, 对照组则对应添加 0.5% (V/V) 的 PBS 缓冲液, 将桔子捣碎并接种 0.1% (m/V) 的果酒酵母, 分别置于 18、21、24、27 和 30 °C 发酵, 发酵结束后过滤上清测定甲醇含量。

1.2.8 测定方法

甲醇、杂醇油和酒精度: 采用气相色谱法测定^[22,23]; 还原糖: DNS 测定法^[24]; 总酸: 采用电位滴定法测定^[25]。

1.2.9 数据分析

采用 SPSS 28.0 进行数据统计分析, 结果用“平均值 ± 标准差”表示, 由 Graphpad 8.02 对数据进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 pPICZαA-PMEI 表达载体的构建

在 Zeocin 平板上生长的转化子的菌落 PCR 如图 2a 所示, 条带 784 bp 的为连载成功的表达载体, 条带 377 bp 的为空载体, 随机挑选含有目的基因的阳性克隆进行质粒提取, 利用 EcoRI 和 XbaI 进行双酶切验证, 酶切结果如图 2b 所示, 电泳显示三个条带, 分别为未酶切完全的重组质粒 pPICZαA-PMEI, 双酶切形成的 pPICZαA 和 PMEI, 条带大小分别为 4 000、3 530、470 bp。

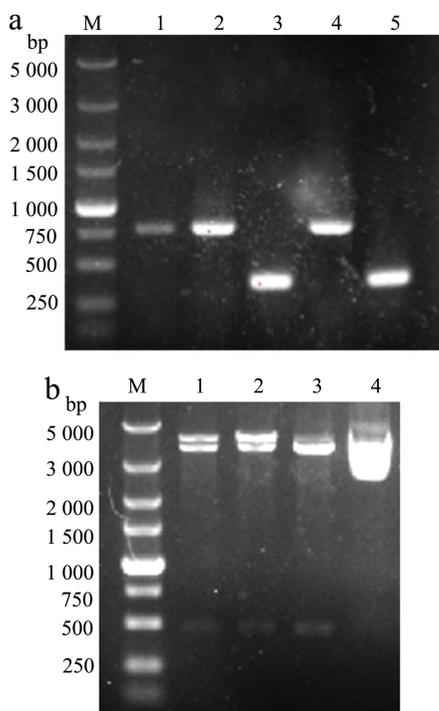


图2 pPICZαA-PMEI 表达载体的构建

Fig.2 Construction of pPICZαA-PMEI expression vectors

注: (a) 重组质粒菌落 PCR 验证; (b) 重组质粒双酶切验证。

2.2 重组菌株GS115/pPICZαA-PMEI的筛选

取电转化后涂布在 Zeocin 抗性平板上长势良好的酵母进行菌落 PCR 验证, 所挑选的 5 个转化子均能扩增 480 bp 的目的基因, 这表明 PME1 基因已成功整合到毕赤酵母 GS115 的染色体上。

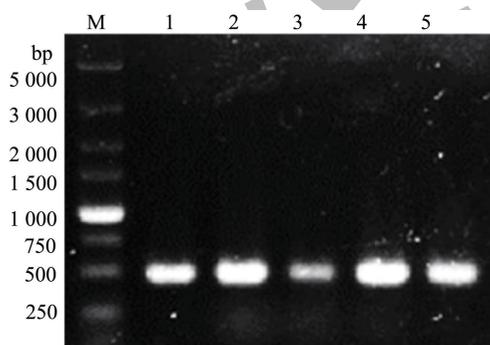


图3 重组毕赤酵母菌落 PCR 验证

Fig.3 Colony PCR verification of recombinant *Pichia pastoris*

2.3 PME1的表达与纯化

pPICZαA 因无法筛选高拷贝菌株而表达量较少, 故对表达上清采用 10 倍浓缩处理。蛋白质电泳如图 4 所示, 上清中没有太多的杂蛋白, 预测目的蛋白为 19.8 ku, 这与以往 PME1 在毕赤酵母中表达的条带相近^[19,26], 与大肠杆菌中表达的条带相差较大^[27], 在

目的蛋白条带下方有一条杂带, 推测可能是去糖基化修饰的原始条带 (17 ku)^[28]。将 50 mL 表达上清用硫酸铵沉淀、透析后得到 10 mL 纯化的 PME1, 测定其蛋白质量浓度为 176.88 mg/L, 因此菌株表达 PME1 的量约 35.38 mg/L, 这与曹等用 GAP 启动子构建的组成型表达菌株表达量相近 (66 mg/L)^[26], 但远低于 Mei 等^[19]构建的高拷贝表达菌株的表达量 (200 mg/L)。

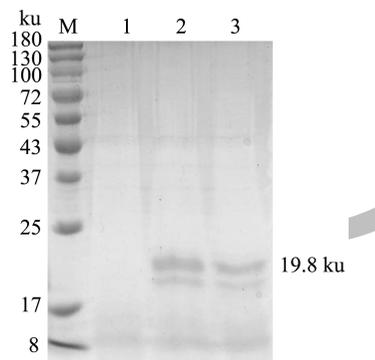


图4 毕赤酵母表达上清蛋白质电泳

Fig.4 SDS-PAGE of expresses supernatant by *Pichia pastoris*

注: M: 180 ku Marker; 泳道 1: 空载体表达上清; 泳道 2-3: 重组毕赤酵母表达上清。

2.4 PME1在果酒发酵中的应用探究

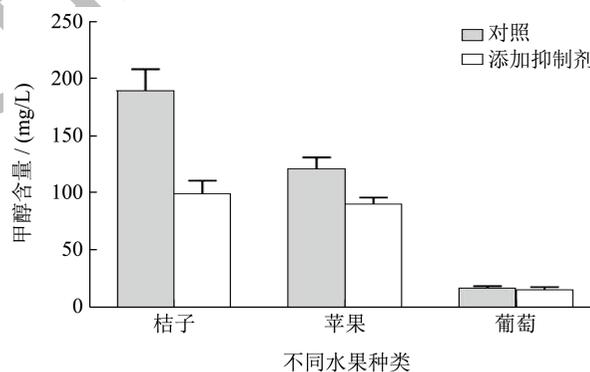


图5 PME1 对三种水果发酵甲醇含量的影响

Fig.5 Effect of PME1 on methanol content in three fruits fermentation

将 1% (V/V) 的 PME1 分别添加到桔子、苹果和葡萄的果浆中发酵, 发酵结束后气相测定甲醇含量如图 5 所示。由图 5 可知 PME1 在桔子酒发酵中降低甲醇效果最显著, 甲醇含量由 189.75 mg/L 降低到 99.55 mg/L, 降低 47.54% ($P > 0.05$)。苹果酒中甲醇含量由 118.15 mg/L 降低到 91.20 mg/L, 降低 25.12% ($P > 0.05$)。葡萄酒中甲醇含量由 17.60 mg/L 来到 15.90 mg/L, 甲醇变化不显著 ($P < 0.05$)。PME1 对果酒发酵其他成分影响如表 2。从表 2 可知添加抑制剂对果酒的酒精度和还原糖影响小, 而总酸

都有下降。在果酒酒精度较低时,抑制剂使果酒中的杂醇油显著增加,酒精度较高时杂醇油则变化不显著。

发酵果酒中的甲醇含量主要与水果中果胶含量和内源性果胶甲酯酶有关^[3],水果中甲酯化的果胶在发酵过程中由果胶甲酯酶分解形成果胶酸和甲醇,而 PMEI 能和果胶甲酯酶形成 1:1 非共价可逆复合物从而抑制其活性^[29],因此导致发酵果酒中甲醇含量降低和酸度降低,而抑制剂的添加由于引入了外源氨基氮,在糖代谢途径弱而氨基酸代谢途径

强时显著增加杂醇油的含量^[30]。由于各种水果甲酯化的果胶含量以及自身果胶甲酯酶特性不同, PMEI 对不同水果发酵中甲醇的降低存在较大差异,葡萄中的果胶酶活性较弱,自然条件下发酵甲醇含量较低, PMEI 的抑制效果不显著,而桔子中果胶含量丰富,内源性果胶甲酯酶活性也较强,梅等的研究也表明 PMEI 与来源于桔子的果胶甲酯酶的结合能力较强^[31],因此 PMEI 在桔子酒发酵中降低甲醇的效果最佳。

表 2 PMEI对果酒发酵中其它指标的影响

Table 2 The effect of PMEI on other indicators in fruit wine fermentation

组别	酒精度/(%, vol)	还原糖/(g/L)	总酸度/(g/L)	杂醇油/(mg/L)
对照桔子酒	6.48 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.06 ^a	4.75 ± 0.14 ^a	233.32 ± 36.34 ^a
加 PMEI 桔子酒	6.76 ± 0.21 ^a	0.46 ± 0.03 ^a	4.13 ± 0.11 ^b	256.30 ± 35.50 ^b
对照苹果酒	3.98 ± 0.01 ^a	0.44 ± 0.09 ^a	5.38 ± 0.09 ^a	182.86 ± 4.10 ^a
加 PMEI 苹果酒	4.00 ± 0.04 ^a	0.45 ± 0.00 ^a	3.75 ± 0.27 ^b	222.63 ± 6.51 ^b
对照葡萄酒	10.42 ± 0.18 ^a	0.55 ± 0.02 ^a	8.88 ± 0.06 ^a	210.08 ± 9.73 ^a
加 PMEI 葡萄酒	10.74 ± 0.16 ^a	0.57 ± 0.00 ^a	8.50 ± 0.03 ^b	216.01 ± 6.28 ^a

注:同组中不同的小写字母表示具有显著差异($P < 0.05$)。

2.5 PMEI在桔子酒发酵中的最低抑制浓度

通过测定不同添加量的 PMEI 确定其在桔子酒发酵中的最小抑制质量浓度,结果如图 6 所示。结果显示,两种发酵条件下桔子酒中的甲醇有较大的差异,由于桔子酒中的果胶主要存在于果渣中,因此桔子浆发酵的桔子酒甲醇含量偏高。此条件下添加 0.5% (V/V) 的 PMEI 可使桔子酒中甲醇降低 53.27%,由 120.90 mg/L 降低到 56.50 mg/L,因此确定 PMEI 在桔子酒发酵中最适质量浓度 8.84 mg/L。桔子汁发酵的桔子酒甲醇含量都低于 30 mg/L, PMEI 添加量也在 0.5% (V/V) 时甲醇含量最低,此时甲醇含量由 26.90 mg/L 降低到 19.80 mg/L,降低 26.39%。

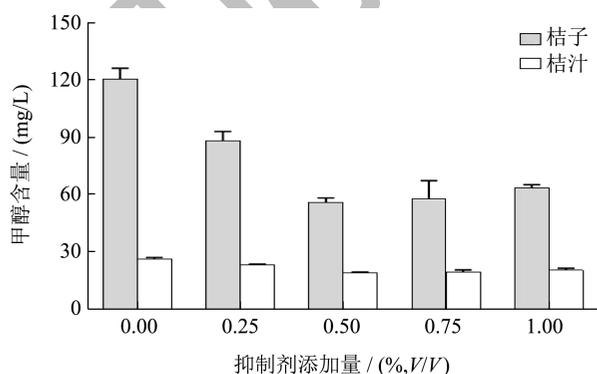


图 6 不同 PMEI 添加量对桔子酒中甲醇含量的影响

Fig.6 Effects of different PMEI addition on methanol content in orange wine

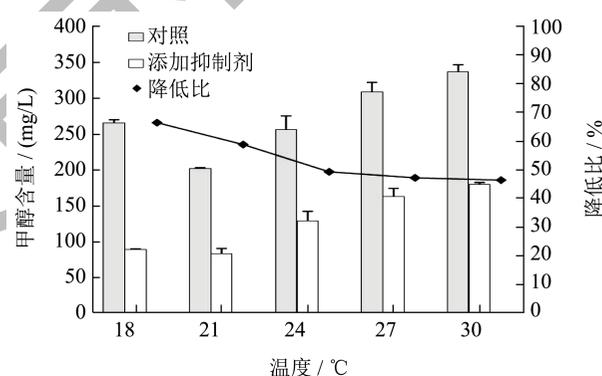


图 7 不同温度条件下 PMEI 对桔子酒中甲醇含量的影响

Fig.7 Effect of PMEI on methanol content in orange wine under different temperature conditions

2.6 PMEI在桔子酒发酵中的最适温度

测定不同温度条件下桔子酒中的甲醇浓度,结果如图 7 所示。不添加 PMEI 时发酵桔子酒中甲醇含量随着温度的降低而降低,原因是内源性果胶酶活性随温度降低^[32],但是较低发酵温度又不利于降低甲醇,这是因为低温导致发酵时间延长而使甲醇含量上升。当添加 PMEI 时,发酵桔子酒中甲醇含量都显著下降,甲醇降低比随温度降低而升高,在 18 °C 时甲醇降低比达 66.40%,甲醇含量由 265.15 mg/L 降低到 89.10 mg/L。但在发酵温度 21 °C 时,甲醇含量最低为 83.30 mg/L,与 18 °C 发酵甲醇含量相接近,此时甲醇降低比为 58.78%。由

于 PME1 在低温时对果胶甲酯酶抑制能力较强,且低温发酵有利于果酒果香的保留,因此确定添加 PME1 发酵桔子酒的最适温度为 18 ℃。

3 结论

本研究成功构建了 PME1 基因异源表达的毕赤酵母工程菌株 GS115/pPICzαA-PME1,将发酵表达的 PME1 进行浓缩纯化后用于果酒发酵。研究表明,添加 PME1 发酵的桔子酒中甲醇降低 47.54%,苹果酒中甲醇降低 21.52%,而葡萄酒中甲醇变化不显著,同时添加 PME1 还对果酒酸度有一定的降低作用。添加 PME1 的桔子酒发酵工艺优化的 PME1 最低浓度为 8.84 mg/L,最适温度 18 ℃,此时桔子酒中甲醇降低比最高为 66.40%。这为发酵果酒降甲醇提供了新的技术思路。

参考文献

- [1] OHIMAIN E I. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension [J]. Springerplus, 2016, 5(1): 1607.
- [2] 于清琴,张颖超,王咏梅,等.葡萄酒及果露酒中的甲醇及降低措施[J].中外葡萄与葡萄酒,2019,4:64-67.
- [3] 张香,秦丹,曾璐,等.发酵型果酒中甲醇和杂醇油的研究进展[J].中国酿造,2020,39(8):17-21.
- [4] REVILLA I, GONZÁLEZ-SANJOSÉ M L. Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes [J]. Food Chemistry, 1998, 63(3): 307-312.
- [5] CABAROGLU T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing [J]. Food Control, 2005, 16(2): 177-181.
- [6] FRENKEL C, PETERS J S, TIEMAN D M, et al. Pectin methyltransferase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(8): 4293-4295.
- [7] FEDERICO Z, GIOVANNA L, ANDREA C, et al. Detection of pectinmethyltransferase activity in presence of methanol during grape pomace storage [J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 59-65.
- [8] HANG Y D, WOODAMS E E. Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard cider and eau-de-vie methanol content [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1396-1398.
- [9] 姚万欣.固态发酵法生产梨酒中甲醇的生成控制研究[D].泰安:山东农业大学,2016.
- [10] 李桂林,彭昕,李泽涵,等.降低和田红枣白兰地中甲醇含量的发酵前处理工艺优化[J].现代食品科技,2021,37(7):74-82.
- [11] 刘文.桃酒中甲醇形成机理及其影响因素[D].济南:齐鲁工业大学,2019.
- [12] WU J S, WU M C, JIANG C M, et al. Pectinesterase inhibitor from jelly-fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes reduces methanol content in carambola wine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(24): 9506-9511.
- [13] WANG S T, FENG Y J, LAI Y J, et al. Complex tannins isolated from jelly fig achenes affect pectin gelation through non-specific inhibitory effect on pectin methyltransferase [J]. Molecules, 2019, 24(8): 1601.
- [14] HOU C Y, LIN Y S, WANG Y T, et al. Addition of phenolic acids on the reduction of methanol content in wine [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(5): C432-C437.
- [15] 刘杰超,王雪晖,焦中高,等.果胶甲酯酶抑制剂及其在果酒酿造中的应用.中国,202110211383 [P]. 2022-10-14.
- [16] LEWIS K C, SELZER T, SHAHAR C, et al. Inhibition of pectin methyl transferase activity by green tea catechins [J]. Phytochemistry, 2008, 69(14): 2586-2592.
- [17] BALESTRIERI C, CASTALDO D, GIOVANE A, et al. A glycoprotein inhibitor of pectin methyltransferase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*) [J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 193(1): 183-187.
- [18] BAZARAA W A, AMMAR A S, AQLAN A M. Effects of kiwi's pectin methyltransferase inhibitor, nanomilling and pasteurization on orange juice quality [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(12): 6367-6379.
- [19] MEI X, HAO Y, ZHU H, et al. Cloning of pectin methyltransferase inhibitor from kiwi fruit and its high expression in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5): 1001-1005.
- [20] 王瑞明,李忠奎,王腾飞,等.海藻糖合酶基因在毕赤酵母中的表达[J].现代食品科技,2013,29(11):2575-2579.
- [21] 梅晓宏,高红岩,罗云波.不同发酵条件对重组猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂表达量的影响[J].食品科技,2007, (5):37-40.
- [22] 阮云飞.顶空内标气相色谱法快速测定水果露酒中乙醇浓度[J].粮食科技与经济,2020,45(11):95-96.
- [23] 吴轩德,李洲,周世水.白酒酿造中酿酒酵母与巴氏醋杆菌相互作用的研究[J].现代食品科技,2017,33(12):61-67.
- [24] 刘忠义,欧昌荣,汤海青,等.3,5-二硝基水杨酸法测定葡萄酒中总糖含量的条件优化[J].核农学报,2013,27(11): 1717-1723.
- [25] 李艳霞,宣亚文,秦珠红,等.自动电位滴定法测定红葡萄酒总酸度[J].周口师范学院学报,2007,2:73-74.
- [26] 曹东艳,韩诗雯,陈董鑫,等.用GAP启动子在毕赤酵母中组成型表达重组猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂[J].食品安全质量检测学报,2014,5(3):964-969.
- [27] HAO Y, HUANG X, MEI X, et al. Expression, purification and characterization of pectin methyltransferase inhibitor from kiwi fruit in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 60(2): 221-224.
- [28] CAMARDELLA L, CARRATORE V, CIARDIELLO M A, et al. Kiwi protein inhibitor of pectin methyltransferase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges [J]. European journal of biochemistry/FEBS, 2000, 267(14): 4561-4565.
- [29] 梅晓宏,陈燕卉,高红岩,等.果胶甲酯酶抑制剂的研究进展[J].食品科技,2008,6:64-68.
- [30] 陈文颖,周世水,闫统帅,等.*THI3/BAT2*基因缺失酿酒酵母菌构建及其在黄酒酿造中的应用[J].现代食品科技, 2022,38(11):55-62.
- [31] 梅晓宏,高红岩,罗云波.重组猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂的抑制活性研究[J].食品科技,2007,4:134-137.
- [32] 董文娟,杜金华,付元真.降低山楂酒中甲醇含量的研究[J].酿酒,2015,42(2):40-45.