

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.019

陈海珊,石国良,覃香香,等. 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)去除蔗渣木聚糖酶解副产物的研究[J]. 广西植物,2014,34(3):387-392
Chen HS, Shi GL, Qin XX, et al. Study on enzymolysis of bagasse xylan by-products of *Candida tropicalis*[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3):387-392

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)去除蔗渣木聚糖酶解副产物的研究

陈海珊¹, 石国良², 覃香香¹, 周玉恒¹, 蔡爱华¹

(1. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 唐传生物科技(厦门)有限公司, 福建 厦门 361026)

摘要: 该文研究了木糖、木糖醇对木聚糖酶 Shearzyme 500 L 酶解蔗渣木聚糖的影响。通过热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)转化酶解副产物木糖,解除木糖对木聚糖酶的抑制作用,从而获得高木二糖含量的低聚木糖。结果表明:木糖是 Shearzyme 500 L 的酶活性抑制物,其抑制作用与溶液中的木糖量成正比;木糖醇对木聚糖酶无抑制作用;热带假丝酵母可将蔗渣木聚糖酶解液中的木糖转化为木糖醇而不利用低聚木糖,木二糖占总糖比例由 53.09% 升高到 62.92%,经二次酶解后,木二糖比例可达 78.90%。

关键词: 热带假丝酵母; 蔗渣木聚糖; 木聚糖酶; 木糖; 木糖醇

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)03-0387-05

Study on enzymolysis of bagasse xylan by-products of *Candida tropicalis*

CHEN Hai-Shan¹, SHI Guo-Liang², QIN Xiang-Xiang¹,
ZHOU Yu-Heng¹, CAI Ai-Hua¹

(1. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China*; 2. *Thomson Biotech (Xiamen) PTE Ltd., Xiamen 361026, China*)

Abstract: The effects of xylose, xylitol on enzymolysis of bagasse xylan by xylanase Shearzyme 500 L were studied. Xylooligosaccharide with high xylobiose content was obtained through the enzymolysis of by-product xylose by *Candida tropicalis* and relieving the inhibitory effect of xylitol on xylanase. The results were as follows: xylose was the inhibitor of Shearzyme 500 L, and its inhibitory effect was in proportion to xylose content in solution; xylitol had no inhibitory effect on xylanase; *C. tropicalis* could transform the xylose in the solution of bagasse xylan into xylitol without xylooligosaccharide, and xylobiose increased from 53.09% to 62.92% in total sugar, and reached 78.90% through the second hydrolysis.

Key words: *Candida tropicalis*; bagasse xylan; xylanase; xylose; xylitol

低聚木糖是由 2~7 个木糖通过 β -(1,4)糖苷键连接而成,是一种功能性寡聚糖(Jayapal *et al.*, 2013; Samanta *et al.*, 2013)。低聚木糖具有许多优

良的生理活性,不能被人体消化系统代谢,能被肠道微生物利用,增殖双歧杆菌和乳酸菌,酸化肠道,降低患结肠癌风险,增强机体免疫等作用(Broekaert

收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-03-13

基金项目: 广西自然科学基金(2010GXNSFA013060; 2013GXNSFBA019053); 广西科学研究与技术开发计划重点项目(桂科重 1348002-5); 广西植物研究所基本业务费(桂植业 10001, 桂植业 13007); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金(ZRJ2012-2, ZRJ2013-2)。

作者简介: 陈海珊(1970-),男,广西桂林人,副研究员,从事生物质化学等研究工作,(E-mail)chhs@gxib.cn。

et al., 2011; Grootaert *et al.*, 2007; Manisseri, 2010; Mussatto, 2007)。此外,有研究发现,低聚木糖还具有降血脂、降血糖、抗氧化等功能(Gobinath *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011)。因而在食品、医药、饲料等领域有重要的应用。

低聚木糖的生产方法主要是酶水解法,即用内切木聚糖酶水解木聚糖而得,木二糖是低聚木糖的主要活性成分,因此获得高木二糖含量是低聚木糖生产的关键。由于微生物酶制剂中可能含有少量的木糖苷酶,或者由于内切木聚糖酶将木三糖水解为木二糖和木糖,在木聚糖的酶解产物中,通常含有不同程度的木糖,这部分木糖对木聚糖酶有产物反馈抑制作用,降低了酶水解活性(石国良等, 2010);同时,作为一种非活性物质,木糖在很大程度上又降低了低聚木糖的生理活性,因而要尽可能除去(陈中平, 2006; 丁苏等, 2008)。

低聚木糖的纯化方法主要有活性炭吸附(黄海等, 2002)、膜分离(Gullon *et al.*, 2010;)和色谱分离等(John *et al.*, 1982; 张军华等, 2006)。由于木糖与低聚木糖的性质相近,采用这些方法均存在分离效率低,生产成本高等问题,而利用微生物选择性利用木糖可以非常经济地去除这一酶解副产物。Isao等(1975)筛选出能定向消耗木糖但并不消耗木二糖的酵母,可将低聚木糖中的木糖全部消耗,得到以木二糖为主要成分的产品。生物纯化法目前相关的报道不多,本研究利用热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)转化木糖为木糖醇,不仅能解除副产物对酶解反应的抑制作用,使低聚糖水解更彻底,目的物含量更高,而且副产物木糖还可转化得到木糖醇这一附加值更高的产物。这对推动低聚木糖产业的发展具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 原料 蔗渣木聚糖按文献(何成新等, 2003)的方法制备(纯度>80%)。

1.1.2 菌株和培养基 菌株:热带假丝酵母(*Candida tropicalis*),为本实验室筛选的木糖醇高产菌株。发酵培养基:可溶性固形物为20%的低聚木糖溶液,盐液浓度为NH₄H₂PO₄ 2.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, 酵母膏 5.0 g/L, CaCl₂ 0.2 g/L, 尿素 5 g/L, 糖、盐分别于121℃灭菌

20 min。

1.1.3 酶制剂 真菌木聚糖酶 Shearzyme 500 L, 购于诺维信中国投资有限公司。

1.1.4 试剂 D-木糖、木糖醇(纯度>99%), 购自美国 SIGMA 公司;木二糖、木三糖标准品购于日本和光纯药工业株式会社;其他试剂为国产分析纯。

1.1.5 仪器 T6 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Waters 510 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;THZ-22 型恒温台式振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;HH-S 数显恒温水浴锅,金坛市正基仪器有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计,上海雷磁仪器厂。

1.2 方 法

1.2.1 比较不同木糖、木糖醇添加量对蔗渣木聚糖酶水解率的影响 用 0.05 mol/L, pH5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制 2% 底物浓度的蔗渣木聚糖悬浮液,每份 50 mL,分别加入准确称取的木糖和木糖醇,使每份悬浮液中木糖、木糖醇终浓度为 0、1、5、10、15、20、25、30 g/L,酶解条件参见石国良等(2010),按 50 U/g 木聚糖底物加入木聚糖酶,于 60℃ 恒温水浴锅中,恒温反应 24 h,离心,取上清液测定还原糖和总糖含量,按照下列公式计算酶水解率,并对不同木糖、木糖醇添加量对蔗渣木聚糖酶水解率的影响进行比较。

$$\text{水解率}\% = \frac{\text{可溶性总糖含量} - \text{加入的木糖含量}}{\text{加入的木聚糖总量}} \times 100\%$$

1.2.2 酵母转化蔗渣木聚糖酶解液中的木糖 在 500 mL 三角瓶中装入 100 mL 含 20% 的蔗渣木聚糖酶解液的发酵培养基,加入 20 mL 活化 24 h 的酵母种子液,于恒温台式振荡器上 32℃, 200 rpm 振荡培养,每 12 h 取样检测木糖醇含量, HPLC 法检测发酵前后酶解液中各成分的变化情况,根据 HPLC 检测图谱,确定木糖醇在酶解液中总糖成分所占的比例。

1.2.3 酵母对蔗渣木聚糖酶解液中木二糖成分的影响 在 500 mL 的三角瓶中装入 100 mL 发酵培养基,配制可溶性固形物为 20% 的低聚木糖溶液(不含木糖),接入 15 mL 活化 24 h 的酵母种子液,于恒温台式振荡器上 32℃, 200 rpm 振荡培养 0~120 h,每间隔 24 h 取样测定还原糖和总糖含量,以 HPLC 法测定低聚木糖中木二糖含量变化。根据 HPLC 检测图谱,确定木二糖在酶解液中总糖成分所占的比例。

1.2.4 木聚糖酶解发酵液的二次酶解 取 100 mL 木聚糖酶解发酵液,用 0.05 mol/L, pH5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液稀释至可溶性固形物 3%,加入 1 mL Shearzyme 500 L 木聚糖酶液,于恒温水浴锅中 60 °C 保温进行二次酶解,酶解 24 h 后,用 HPLC 法分析溶液中低聚木糖成分的变化。

1.2.5 样品分析方法

(1) 还原糖含量测定: 0.2 mL 适当稀释的糖液(空白对照为纯水),加入 0.5 mL DNS 试剂,沸水显色 5 min,迅速冷却后定容至 5 mL,于紫外-可见分光光度计测定 520 nm 波长处吸光度。用木糖标准品按前法操作,以木糖毫克数为横坐标,以吸光度 $A_{520\text{nm}}$ 为纵坐标,并绘制标准曲线。

(2) 总糖含量测定: 15 mL 含低聚木糖溶液,加入 5 mL 0.8 mol/L H_2SO_4 配成终浓度 0.2 mol/L H_2SO_4 溶液,100 °C 水解 2 h,用 NaOH 溶液调节 pH 值到 7.0,稀释一定倍数后,按还原糖方法测定总还原糖含量。

木聚糖总糖含量 = 总还原糖含量 \times 0.9

(3) 酶解产物成分分析: 检测方法采用文献(石国良等,2010)的方法,分别取标准品于 60 °C 烘干至质量恒定,于容量瓶中用超纯水配制成质量浓度为 10.0 g/L 的标准液。木聚糖酶解液用纯水稀释至总糖含量约 10 g/L,取 10 mL 稀释液加阴、阳离子交换树脂脱盐净化,溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤得检测样品。检测条件为 Waters 510 高效液相色谱仪,410 示差折光检测器;色谱柱,BC-100 Ca^{2+} 柱;流动相:超纯水 1 mL/min,柱温 80 °C。样品检测图谱中各成分所占比例由仪器工作站计算得到。

2 结果与分析

2.1 添加木糖、木糖醇对蔗渣木聚糖酶水解的影响

产物抑制是酶促反应存在的一种普遍现象,木糖是木聚糖彻底酶解的产物,也是酶解生产低聚木糖的副产物,最有可能成为酶反应的抑制物,为了探讨木糖是否对 Shearzyme 500 L 酶解蔗渣木聚糖具有抑制作用,以不添加木糖的反应作为对照,在酶解体系中额外加入不同量的木糖。由图 1 可知,蔗渣木聚糖酶解 24 h 后,与对照相比,随着木糖添加量的增加,酶水解率也逐步下降,说明木糖对反应有抑制作用,添加的越多,抑制作用就越明显。对照组在酶解过程由于也有木糖产生,同样存在抑制作用,只

是额外添加木糖组的抑制作用更为显著。

自然界有着丰富的降解或转化木糖的微生物,本实验室筛选并获得了一株可以高效快速转化木糖为木糖醇的菌株,利用该菌株将木糖选择性转化为木糖醇,解除木糖对酶解反应的抑制,但另一方面有可能面临木糖醇抑制的问题,因此,通过添加木糖醇来研究木糖醇对酶活性的抑制作用,从图 2 可以看出,在 0~30 g/L 范围内,不同的添加量对酶解率几乎没有影响,木糖醇没有抑制 Shearzyme 500 L 酶解的作用。

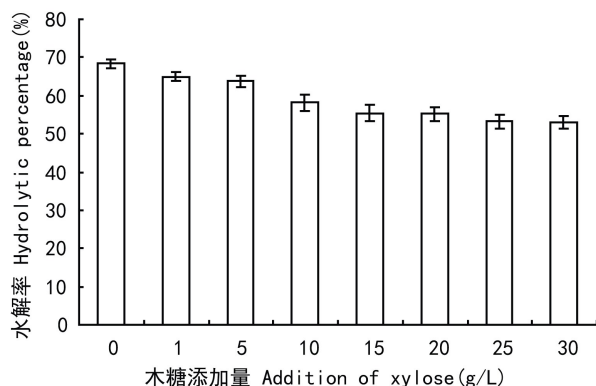


图 1 不同木糖添加量对蔗渣木聚糖酶水解的影响
Fig. 1 The effect of adding different contents of xylose on the enzymatic hydrolysis of the bagasse xylan

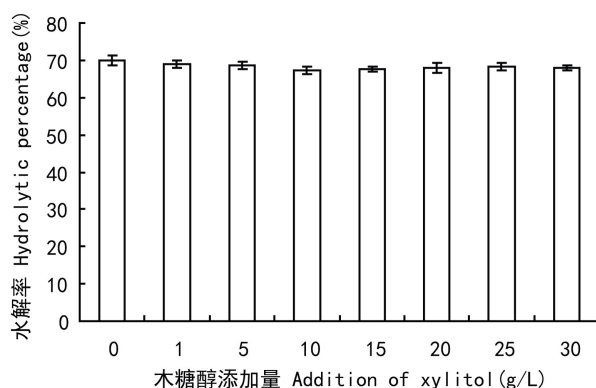


图 2 不同木糖醇添加量对蔗渣木聚糖酶水解的影响
Fig. 2 The effect of adding different contents of xylitol on the enzymatic hydrolysis of the bagasse xylan

2.2 酵母发酵对蔗渣木聚糖酶解液中木糖转化的影响

利用热带假丝酵母可将酶解液中的木糖转化为木糖醇,不仅解除了木糖对酶解的抑制,使酶促反应得以继续进行,增加目标产物木二糖的比例,而且转化为木糖醇可以同时获得两种产品,提高了资源利用率。从图 3 可以看出,木糖醇比例在 24 h 后达到

最高点,之后则不断下降,由此推断,该酵母不仅可以利用木糖,也可以利用木糖醇作为碳源生长,但木糖醇启动利用是在木糖消耗完毕之后。因此,为了最大限度地收获两种产品,避免过度发酵,应该严格控制发酵终点。从 HPLC 检测图(图 4)也可看出,木聚糖酶解产生的木糖在酵母发酵前可以检测出来,经过酵母发酵后,木糖峰消失,木糖转化为木糖醇,产生了木糖醇峰(图 5),说明酵母可有效利用糖浆中的木糖。

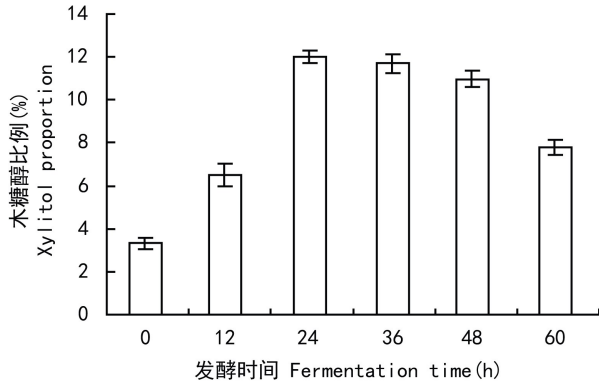


图 3 发酵过程中木糖醇比例的变化

Fig. 3 The change of the proportion of xylitol during the fermentation

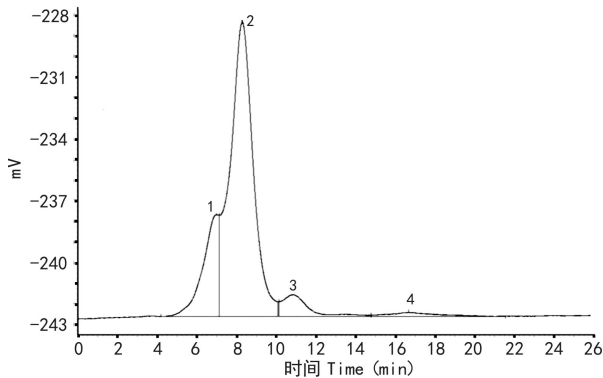


图 4 发酵前低聚木糖成分

(1-木三糖; 2-木二糖; 3-木糖; 4-其他)

Fig. 4 The composition of the xylooligosaccharides before fermentation (1- xylotriose; 2-xylobiose; 3-xylose; 4-others)

2.3 酵母发酵对酶解液中低聚木糖的影响

从图 6 可以看出,用不含有木糖的低聚木糖进行热带假丝酵母发酵,直到 120 h 溶液中的总糖和还原糖都没有变化,说明低聚木糖在酵母发酵过程中既没有发生水解现象也没有转化成非糖物质。张艳艳(2004)等也筛选到只消耗低聚木糖酶解液中的

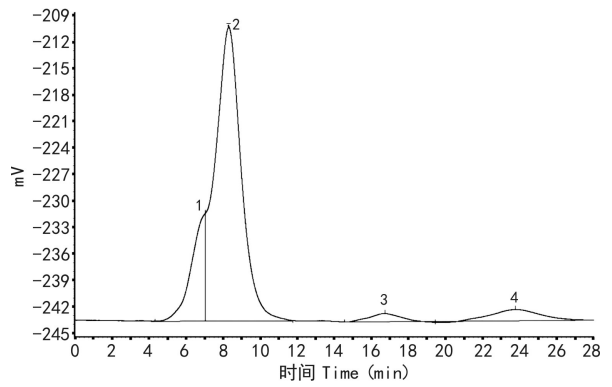


图 5 发酵后低聚木糖成分

(1-木三糖; 2-木二糖; 3-其他; 4-木糖醇)

Fig. 5 The composition of the xylooligosaccharides after the fermentation (1- xylotriose; 2-xylobiose; 3-others; 4-xylitol)

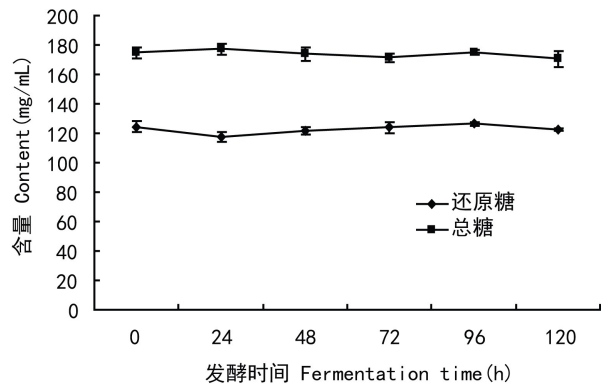


图 6 酵母发酵过程中还原糖和总糖含量的变化

Fig. 6 The change of the contents of the reducing sugar and total sugar during the fermentation by yeast

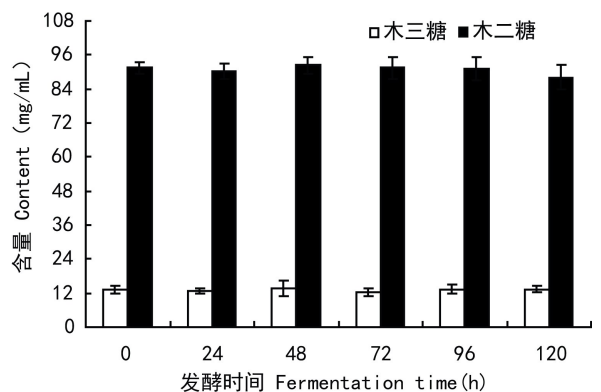


图 7 酵母发酵对木二糖、木三糖含量的影响

Fig. 7 The effect of the fermentation by yeast on the contents of xylobiose and xylotriose

木糖,而不消耗低聚糖的假丝酵母(*Candida* sp.),发酵 48 h 可除去酶解液中全部的木糖。图 7 中的发

酵液成分检测表明木二糖、木三糖的含量在 120 h 内没有变化,证明该酵母并不消耗低聚木糖。

2.4 酵母发酵对酶解液中木二糖比例的影响

发酵过程中木二糖在总糖中的比例变化如图 8 所示,随着发酵时间的延长,木二糖的比例在缓慢升高,从发酵起点的 53.09% 升到最高点的 62.92%,由于木糖转化为非糖物质木糖醇,以及木糖用于菌体生长消耗,导致木二糖在体系中所占的比例升高。

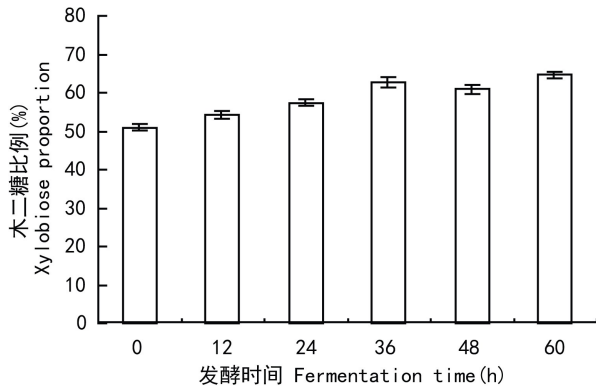


图 8 发酵过程中木二糖比例的变化
Fig. 8 The change of the proportion of xylobiose during the fermentation

2.5 木聚糖酶解酵母发酵液对低聚木糖成分的影响

将低聚木糖发酵液加入 Shearzyme 500 L 进行第二次酶解,24 h 后,木三糖的比例降为 4.55%,木二糖比例升至 78.90%。从图 9 可以看出,在去除了抑制物木糖以后的发酵液,酶解 24 h 后,木三糖持续分解,与木二糖的比例较第一次酶解时明显减少,同时又产生一部分木糖。这部分木糖同样可以采用酵母转化的方法除去,采用酶解—酵母转化—二次酶解—酵母转化循环的方法可获得高木二糖含量的低聚木糖。

3 结论

蔗渣木聚糖经 Shearzyme 500 L 木聚糖酶解后得到低聚木糖溶液,其中木二糖约占总糖的 54.77%、木三糖占 26.7%,木糖占 7%,木糖不是活性成分,但能显著抑制 Shearzyme 500 L 活性,本研究通过在溶液中添加木糖、木糖醇证明木糖可抑制 Shearzyme 500 L 的酶活性,其抑制能力随木糖添加量的增多而增强,木糖醇对 Shearzyme 500 L 无抑制作用。

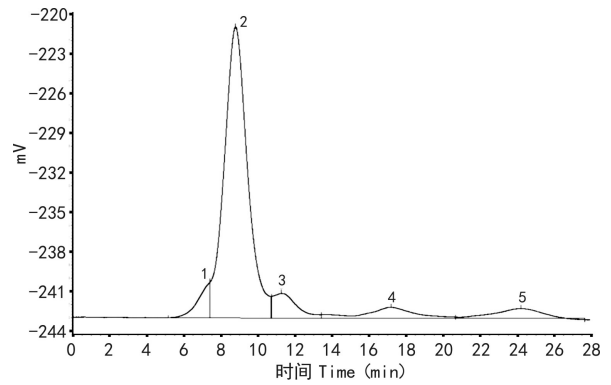


图 9 二次酶解 24 h 产物成分的变化
(1-木三糖; 2-木二糖; 3-木糖; 4-其它; 5-木糖醇)
Fig. 9 The change of the compositions of the secondary enzymolysis of 24 h
(1-xylotriose; 2-xylobiose; 3-xylose; 4-others; 5-xylytol)

热带假丝酵母可选择性利用蔗渣木聚糖酶解液中的木糖转化为木糖醇,在发酵过程中并不消耗低聚木糖。随着木糖转化为非糖物质,木二糖在总糖中的比例上升。经酵母脱木糖后的发酵液再次酶解,可有效提高木二糖在低聚木糖中的比例。二次酶解会再次生成木糖,对木聚糖酶产生抑制作用,虽然可反复使用酵母转化的方法,但如此操作无疑是繁琐且不经济的,因此,需进一步研究固定化酶与固定化细胞技术,耦合酶解与发酵过程,快速高效获得高木二糖含量的低聚木糖。

参考文献:

- Broekaert WF, Courtin CM, Verbeke K, *et al.* 2011. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **51**(2):178-194
- Chen ZP(陈中平). 2006. Research advances on substrate of enzymic preparations(酶制剂及其底物的研究进展)[J]. *Feed Res* (饲料研究), (10):58-63
- Ding S(丁苏), Shi YH(施用晖), Wang HS(王海松), *et al.* 2008. Study on scavenging activity to radicals by different Polymerization degree of xylo-oligosaccharides(不同聚合度低聚木糖体外清除自由基活性研究)[J]. *Food & Ferment Ind*(食品与发酵工业), **34**(4):56-59
- Grootaert C, Delcour JA, Courtin CM, *et al.* 2007. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine[J]. *Trends Food Sci & Technol*, **18**(2):64-71
- Gobinath D, Madhu AN, Prashant G, *et al.* 2010. Beneficial effect of xylo-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *British J Nutr*, **104**(1):40-47
- Gullon P, Munoz G, Parajo C, *et al.* 2010. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides[J]. *J Agri Food Chem*, **58**(6):3 632-3 641

- He CX(何成新), Zhang HR(张厚瑞), Zheng JZ(曾健智), *et al.* 2003. Insolubledye xylan of sugar cane bagasse and its application for measurement of xylanase activity(不溶性着色蔗渣木聚糖检测木聚糖酶活性)[J]. *Microbiology*(微生物学通报), **30**(1):45-48
- Huang H(黄海), Yang RJ(杨瑞金), Wang Z(王璋). 2002. Studies on decolorizing of Xylo-oligosaccharides(低聚木糖的脱色工艺)[J]. *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报), **21**(2):125-129
- Isao K, Tsuneo Y, Tatsuyoshi K. 1975. A new method for preparation of xylobiose, eliminating xylose from enzymatic xylan hydrolyzate by yeast[J]. *Agric Biol Chem*, **39**(7):1 355-1 362
- Jayapal N, Samanta AK, Kolte AP, *et al.* 2013. Value addition to sugarcane bagasse; Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production[J]. *Ind Crop Products*, **42**:14-24
- John M, Schmidt J, Wandrey C, *et al.* 1982. Gel chromatography of oligosaccharides up to DP 60[J]. *J Chromatogr A*, **247**(2):281-288
- Manisseri C, Gudipati M. 2010. Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides[J]. *LWT-Food Sci Technol*, **43**(3):421-430
- Mussatto SI, Mancilha IM. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review[J]. *Carbohydr polym*, **68**(3):587-597
- Samanta AK, Jayapal N, Kolte AP, *et al.* 2013. Application of Pi-geon Pea(Cajanus cajan) Stalks as Raw Material for Xylooligosaccharides Production[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, **169**(8):2 392-2 404
- Shi GL(石国良), Zhou YH(周玉恒), Zhang HR(张厚瑞), *et al.* 2010. Enzymatic hydrolysis properties of bagasse xylan by xylanase shearzyme 500 L(木聚糖酶 Shearzyme 500 L 酶解蔗渣木聚糖的特性研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **31**(24):102-106
- Wang J, Cao Y, Wang C, *et al.* 2011. Wheat bran xylooligosaccharides improve blood lipid metabolism and antioxidant status in rats fed a high-fat diet[J]. *Carbohydr Polym*, **86**(3):1 192-1 197
- Zhang JH(张军华), Yong Q(勇强), Yu SY(余世袁). 2006. Application of Gel permeation chromatography on the separation of xylooligosaccharides(凝胶过滤层析在低聚木糖分离中的应用)[J]. *J Nanjing For Univ; Nat Sci Edit*(南京林业大学学报·自然科学版), **30**(1):21-24
- Zhang YY(张艳艳), Xue WT(薛文通), Jiang ZQ(江正强), *et al.* 2004. The purification of the hydrolyzate from hydrolyzing steam-exploded corncob by streptomyces cirratus D-10(卷须链霉菌木聚糖酶水解玉米芯汽爆液及酵母发酵精制低聚木糖)[J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), **30**(4):12-16

(上接第 337 页 Continue from page 337)

- tions; a method for tracking individual pollen grains[J]. *System Bot*, **4**(2):223-229
- Schlisling RA, Turpin RA. 1971. Hummingbird dispersal of *Delphinium cardinale* pollen treated with radioactive iodine[J]. *Am J Bot*, **58**(3):401-406
- Tan XM(谭小梅), Zhou ZC(周志春), Jin GQ(金国庆), *et al.* 2011. Paternity analysis and pollen dispersal for the second generation clonal seed orchard of *Pinus massoniana*(马尾松二代无性系种子园子代父本分析及花粉散布)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), **35**(9):937-945
- Timmons AM, O' Brajen ET, Charters YM, *et al.* 1995. Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napusspp oleifera*[J]. *Euphyt*, **85**:417-423
- Wang CG(王传贵), Ke SH(柯曙华). 1997. A study on the wood structure and properties of Dabieshan soft pine(大别山五针松木材结构与材性)[J]. *J Nanjing For Univ*(南京林业大学学报), **21**(3):51-54
- Wang AH(王爱华), Wang CG(王传贵), Ke SH(柯曙华), *et al.* 2004. Wood structure and variation of *Pinus dabeshanensis* Cheng et Law(大别山五针松木材主要解剖特征及其变异研究)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), **31**(2):173-177
- Wang GY(王国义), Yin HB(尹洪斌), Wang B(王冰), *et al.* 1995. Study on the pollen density in the seed orchard of Korean Pine(红松种子园花粉密度的研究)[J]. *J Northeast For Univ*(东北林业大学学报), **23**(5):58-63
- Wen XF(温秀凤), Shen XH(沈熙环). 1990. Study on pollen dispersal of *Larix principis-rupprechtii* Mayr.(华北落叶松种子园花粉飞散的研究)[J]. *J Beijing For Univ*(北京林业大学学报), **12**(4):68-75
- Whitehead DR. 1983. Wind pollination: some ecological and evolutionary perspectives[M]//Real L(ed). *Pollination Biology*. Orlando: Academic Press, Inc.
- Zhang DM(张冬梅), Shen XH(沈熙环), He TH(何田华), *et al.* 2001. A paternity analysis of seeds from different clones in a *Pinus tabulaeformis* Carr. seed orchard(利用等位酶对油松无性系种子进行父本分析)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), **25**(2):165-173
- Zhang DM(张冬梅), Shen XH(沈熙环), Zhang HX(张华新), *et al.* 2003. Advances in gene flow and paternity analysis of forest population(林木群体基因流及父本分析的研究进展)[J]. *For Res*(林业科学研究), **16**(4):488-494
- Zu YG(祖元刚), Yu JH(于景华), Wang AM(王爱民). 2000. Study on pollination characteristics of natural population of *Pinus koraiensis*(红松天然种群风媒传粉特点的研究)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **20**(3):430-433