

网络出版时间:2013-08-26 17:57

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1757.036.html>

啤酒酵母泥中酵母多糖提取方法研究

丁宏伟¹, 张海龙¹, 丁红洁²

(1 齐鲁师范学院 生物系, 山东 济南 250013; 2 文登市第一人民医院, 山东 威海 264400)

[摘要] **【目的】**比较不同方法对啤酒酵母泥中多糖的提取效果,旨在为啤酒酵母泥的高效利用提供依据。**【方法】**采用传统热水浸提法、超声波处理技术、微波辅助提取法、冻融法和酶法从啤酒酵母泥中提取多糖,比较提取效果,并研究了其中提取效果较好的2种方法对酵母多糖提取的协同作用。**【结果】**传统热水浸提法的酵母多糖提取率为12.8 mg/g,酵母细胞破壁率为38%;采用超声波处理技术提取时,时间应控制在30 min内,酵母多糖提取率最高达17.6 mg/g,酵母细胞破壁率为54%;采用微波辅助提取法提取时,时间应不超过3.5 min,酵母多糖提取率最高达16.6 mg/g,酵母细胞破壁率达48%;采用冻融法处理啤酒酵母泥,反复冻融5次时,酵母多糖提取率最高可达13.7 mg/g,酵母细胞破壁率达42%;采用酶法处理时,当木瓜蛋白酶用量为200 IU/g、温度为50℃、时间为15 h时,酵母多糖提取率为18.0 mg/g,酵母细胞破壁率为58%;采用超声波处理技术与酶法相结合处理啤酒酵母泥时,酵母多糖提取率可达24.5 mg/g,酵母细胞破壁率达75%。**【结论】**采用超声波处理技术与酶法提取酵母泥中的多糖时,二者具有协同作用,且提取效果较好。

[关键词] 啤酒酵母泥; 酵母多糖; 酶法; 超声波处理技术

[中图分类号] TS261.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)09-0139-06

Extraction of polysaccharide from brewer yeast slurry

DING Hong-wei¹, ZHANG Hai-long¹, DING Hong-jie²

(1 Biological Department, Qilu Normal University, Jinan, Shandong 250013, China;

2 The First Renmin Hospital of Wendeng City, Weihai, Shandong 264400, China)

Abstract: **【Objective】** This study compared the extraction rates of polysaccharide from brewer yeast slurry using different methods. **【Method】** Traditional hot water extraction method, ultrasonic wave, microwave assisted treatment, freezing and thawing method and enzyme method were applied to extract polysaccharide from brewer yeast slurry and their effects were compared. The synergistic action of two best methods was investigated as well. **【Result】** The polysaccharide extraction rate of traditional hot water extraction method was 12.8 mg/g, and the cell wall broken rate was 38%. The treatment time of ultrasonic wave method was less than 30 min with extraction rate of 17.6 mg/g and the cell wall broken rate of 54%. The treatment time of microwave method was less than 3.5 min with extraction rate of 16.6 mg/g and the cell wall broken rate of 48%. When the material was treated for five times by freezing and thawing method, the highest extraction rate was 13.7 mg/g and the highest cell wall broken rate was 42%. When the material was treated by enzyme method with enzyme content of 200 IU/g and temperature of 50℃, the treatment time was about 15 h, the extraction rate was 18.0 mg/g, and the cell wall broken rate was 58%. Combined treatment of ultrasonic wave and enzyme methods reached an extraction rate of 24.5 mg/g and a cell wall

[收稿日期] 2012-11-09

[基金项目] 齐鲁师范学院院级青年教师科研基金项目(2012L1004)

[作者简介] 丁宏伟(1981—),女,山东威海人,讲师,硕士,主要从事食品中功能性成分提取研究。

E-mail: dinghongwei_2010@163.com

broken rate of 75%.【Conclusion】 Ultrasonic wave and enzyme methods had synergistic action on extraction of polysaccharide.

Key words: brewer yeast slurry; yeast polysaccharide; enzyme method; ultrasonic wave treatment technology

啤酒酵母泥是啤酒生产的副产物,其产量约占啤酒产量的 1.5%^[1]。我国是啤酒生产大国,每年会产生大量的啤酒酵母泥,除一部分用作菌种外,大部分啤酒酵母泥被作为廉价饲料或直接排放,目前我国啤酒产量约为 4 900 万 t,啤酒酵母泥排放量约为 40 万 t^[2]。啤酒酵母泥富含营养,将其直接排放,不仅会造成排水的生物耗氧量负荷,而且也会造成很大的资源浪费和环境污染^[3]。因此,啤酒酵母泥的高效利用成为了众多学者的研究重点。啤酒酵母泥中多糖含量较高^[4],是生产多糖的较好原料。大量研究表明,酵母多糖的主要成分为大分子的甘露聚糖,具有免疫活性和抑制肿瘤生长等作用^[5]。随着天然功能性成分提取研究的兴起,酵母多糖的提取、分离纯化以及高产菌株筛选等已成为国内外学者研究的热点。

由于啤酒酵母细胞具有非常坚韧的细胞壁,细胞内的营养成分难以释放,因此寻求高效且污染较小的啤酒酵母多糖提取方法成为相关研究的热点问题^[6]。国外对酵母多糖的研究主要集中在高产酵母多糖菌株的筛选^[7]、发酵条件优化以及多糖分离纯化^[8]等方面;国内对于酵母多糖的提取主要采用传统热水浸提法,该法耗时长、温度高且对酵母多糖的生物活性有一定的影响;此外,也有采用超声波技术提取酵母多糖的报道^[9],但提取方法单一,效果一般。关于不同提取酵母多糖方法比较的研究还较少,故本研究比较了传统热水浸提法、超声波处理技术、微波辅助提取法、冻融法和酶法从啤酒酵母泥中提取酵母多糖的效果,并对提取效果较好的 2 种方法是否具有协同作用进行探讨,以期对啤酒酵母泥的高效利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

啤酒酵母泥,由山东烟台啤酒厂提供;木瓜蛋白酶,广州远天酶制剂厂产品。SP-752PC 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产;CR20BZ 型高速离心机,日立公司生产;超声波清洗仪 KQ100DB (超声频率 40 kHz,超声功率 100 W),上海越众仪器设备有限公司生产;格兰仕微波炉

G80F20CSL-B8(S0) (微波频率 2 450 MHz,功率 800 W),格兰仕公司生产;TF-40-50-LA 超低温冰箱,上海田枫实业有限公司生产。

1.2 啤酒酵母泥的预处理^[10]

取 100 g 啤酒酵母泥,加 1 000 mL 蒸馏水稀释,充分搅拌均匀,用筛孔尺寸为 0.180 mm 的筛子,除去酵母泥中的可见杂质。将酵母泥悬浮液在 2 000 r/min 下离心 5 min。取沉淀,加入体积分数 5% 的酒石酸溶液 1 000 mL,搅拌均匀,静置 30 min 脱苦、脱臭后^[11],2 000 r/min 离心 5 min,即得预处理的啤酒酵母泥。

1.3 啤酒酵母泥多糖提取方法的比较

1.3.1 传统热水浸提法 将啤酒酵母泥与蒸馏水按 1:20 的体积比制成菌悬液,用盐酸调 pH 值为 5.0,50 °C 下温和搅拌自溶 24 h,再在 80 °C 下保温 15 min^[12],分别测定酵母多糖提取率和酵母细胞破壁率。

1.3.2 超声波处理技术 将啤酒酵母泥与蒸馏水按 1:20 的体积比制成菌悬液,分别用超声波清洗仪 KQ100DB 处理 15,20,25,30,35,40 min,测定酵母多糖提取率和酵母细胞破壁率。

1.3.3 微波辅助提取法^[13] 将啤酒酵母泥与蒸馏水按 1:20 的体积比制成菌悬液,将菌悬液分别用格兰仕微波炉处理 2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 min,再于 100 °C 提取 2 h,分别测定酵母多糖提取率和酵母细胞破壁率。

1.3.4 冻融法^[14] 将预处理的啤酒酵母泥置于 -20 °C 下冷冻 2 h,再置于 100 °C 水中骤然升温使其融化,如此反复 1,2,3,4,5 次,测定酵母多糖提取率和酵母细胞破壁率。

1.3.5 酶法^[15] 取经预处理的啤酒酵母泥 5 g,加蒸馏水 10 g,调整 pH 值至 6.0,以木瓜蛋白酶用量、处理温度、处理时间为主要因素,以酵母多糖提取率为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定最佳的酶处理条件,正交试验因子及水平设计见表 1。

1.3.6 协同作用试验 将上述方法中提取效果最好的 2 种方法联合使用,确定其对酵母多糖的提取是否具有协同作用。

以上处理方法中每个样品均重复 3 次,采用

Excel 2007 进行单因素试验作图;采用 SPSS 13.0 数据处理软件对 $L_9(3^4)$ 正交试验的结果进行分析。

表 1 酶法提取啤酒酵母泥多糖 $L_9(3^4)$ 正交试验的因子及水平设计

Table 1 Experimental design for extracting polysaccharide from brewer yeast slurry by enzyme method

水平 Level	因素 Factor		
	木瓜蛋白酶用量/(IU·g ⁻¹) Content of enzyme A	处理温度/℃ Temperature B	处理时间/h Treatment time C
		B	C
1	100	40	5
2	200	50	10
3	300	60	15

1.4 测定指标及方法

1.4.1 酵母多糖提取率 将经不同方法处理的酵母菌悬液,于 3 500 r/min 离心 10 min,收取上清液,即得酵母多糖提取液。采用苯酚-硫酸法测定多糖质量浓度^[16]。酵母多糖提取率(mg/g)=多糖质量浓度×一定质量啤酒酵母泥的多糖提取液体积/啤酒酵母泥质量。

1.4.2 酵母细胞破壁率^[17] 酵母细胞破壁率=(A-B)/A×100%。式中:A 为破壁前完整酵母数;B 为破壁后完整酵母数。

2 结果与分析

2.1 传统热水浸提法对啤酒酵母泥多糖的提取效果

试验前测得原酵母菌悬液中酵母多糖的提取率为 1.2 mg/g(室温 20 ℃ 条件下),采用传统热水浸提法处理后,酵母多糖提取率达 12.8 mg/g,酵母细胞破壁率为 38%。

2.2 超声波处理技术对啤酒酵母泥多糖的提取效果

从图 1 可以看出,随着超声波处理时间的延长,

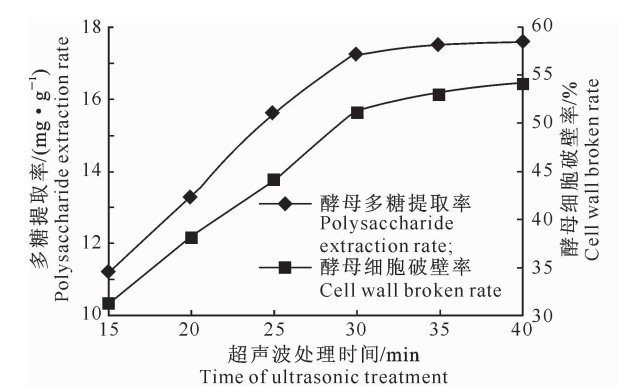


图 1 超声波处理技术中超声波处理时间对啤酒酵母泥多糖提取效果的影响

Fig. 1 Influence of treatment time on extraction of polysaccharide from brewer yeast slurry using ultrasonic wave treatment

酵母多糖提取率和细胞破壁率均逐渐增大,酵母多糖提取率最高可达到 17.6 mg/g,此时酵母细胞的破壁率达 54%。当超声波处理时间少于 30 min 时,酵母多糖提取率和细胞破壁率随时间的延长迅速增加,效果十分明显;当超声波处理多于 30 min 时,酵母多糖提取率和细胞破壁率增幅较小,曲线十分平缓。因此,从经济角度考虑,超声波处理时间以不超过 30 min 为宜。

2.3 微波辅助提取法对啤酒酵母泥多糖的提取效果

由图 2 可知,微波处理 3.5 min 以内,随着微波处理时间的延长,酵母多糖提取率增加迅速,3.5 min 时达到最大值,为 16.6 mg/g,此时酵母细胞破壁率达 48%。比传统热水浸提法的多糖提取率提高了 29.7%,可见微波辅助提取法不仅能缩短传统热水浸提的时间,而且效果更好。但是当微波处理时间大于 3.5 min 后,酵母多糖提取率迅速降低,但酵母细胞破壁率仍不断增加,说明微波处理时间过长对酵母多糖起到了破坏作用,使得酵母多糖提取率降低。因此,微波处理时间以不超过 3.5 min 为宜。

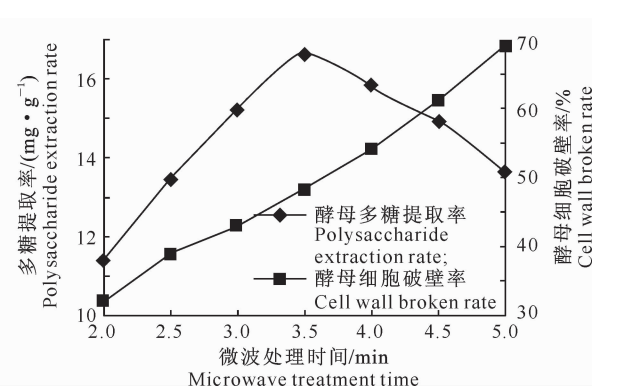


图 2 微波辅助提取法中微波处理时间对啤酒酵母泥多糖提取效果的影响

Fig. 2 Influence of treatment time on extraction of polysaccharide from brewer yeast slurry using microwave assisted treatment

2.4 冻融法对啤酒酵母泥多糖的提取效果

冻融法中冻融次数对啤酒酵母泥多糖提取效果的影响见图 3。

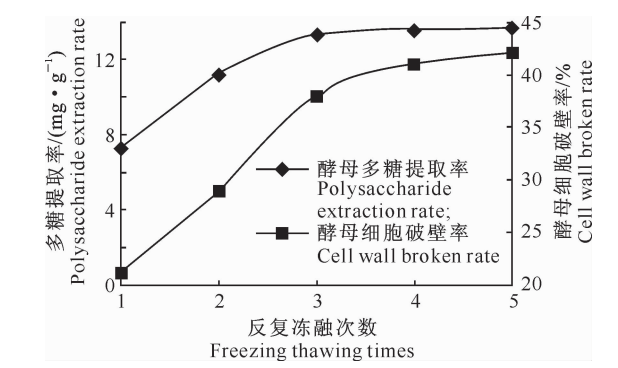


图 3 冻融法中冻融次数对啤酒酵母泥多糖提取效果的影响

Fig. 3 Influence of treatment time on extraction of polysaccharide from brewer yeast slurry using freezing thawing method

由图 3 可见,冻融次数越多,酵母多糖提取率越高,反复冻融5次时,酵母多糖提取率可达13.7

mg/g,此时细胞破壁率为 42%。但当冻融次数多于 3 次后,酵母多糖提取率和酵母细胞破壁率变化不大,而每增加 1 次冻融,所消耗的能量非常大。因此,从经济成本及最终的效果来看,冻融次数以 3 次为宜,此时多糖提取率为 13.3 mg/g。

2.5 酶法对啤酒酵母泥多糖的提取效果

由表 2 可见,木瓜蛋白酶用量对啤酒酵母泥酵母多糖提取率的影响最大,其次为处理温度,处理时间影响最小。最优的处理组合为 A₃B₂C₃,即木瓜蛋白酶用量为 300 IU/g,处理温度 50 ℃,处理 15 h 时,酵母多糖的提取率最大,对该组合进行 3 次验证试验后发现,酵母多糖提取率可达 18.3 mg/g,细胞破壁率为 59%。但此时多糖提取率仅比 A₂B₂C₃ 组合的提取率(18.0 mg/g)提高了 1.67%,而木瓜蛋白酶用量的增加会明显提高试验成本。因此,从经济成本及提取效率 2 方面考虑,认为较好的组合为 A₂B₂C₃,即以木瓜蛋白酶用量 200 IU/g、处理温度 50 ℃、处理时间 15 h 为宜。

表 2 酶法提取啤酒酵母泥多糖的 L₉(3⁴) 正交试验结果及极差分析
Table 2 Experiment results and range analysis when extracted polysaccharide from waste brewer's yeast by enzyme

试验编号 Number	木瓜蛋白酶用量 Content of enzyme A	处理温度 Temperature B	处理时间 Treatment time C	酵母多糖提取率/ (mg·g ⁻¹) Extraction rate	酵母细胞破壁率/% Cell wall broken rate
1	1	1	1	14.1	40
2	1	2	2	16.0	44
3	1	3	3	15.9	46
4	2	1	2	16.6	48
5	2	2	3	18.0	58
6	2	3	1	16.6	50
7	3	1	3	17.0	51
8	3	2	1	17.4	54
9	3	3	2	17.2	53
$\bar{y}_1$	15.3	15.9	16.0		
$\bar{y}_2$	17.0	17.1	16.6		
$\bar{y}_3$	17.2	16.5	17.0		
R	1.9	1.2	1.0		

2.6 酶法和超声波处理技术对啤酒酵母泥多糖提取的协同作用

将提取效果较好的 2 种方法即酶法和超声波处理技术联合使用,取经预处理的啤酒酵母泥 50 g,加蒸馏水 100 g,调整 pH 值 6.0,加木瓜蛋白酶 200 IU/g,50 ℃ 条件下进行超声波处理 30 min,结果表明,酵母多糖提取率为 24.5 mg/g,细胞破壁率为 75%,比单独采用酶法(18.3 mg/g)和超声波处理技术提取的酵母多糖提取率最高值(17.6 mg/g)分别提高了 33.88%和 39.20%,且比单独采用酶法明显缩短了处理时间。

3 结 论

啤酒酵母细胞壁较厚,若要充分利用啤酒酵母泥,必须解决啤酒酵母细胞的破壁问题。通过各种手段破坏酵母细胞壁,可增加多糖的提取率,但并非酵母细胞的破壁率越高,多糖的提取率就越大。因此,在选择处理方法时,不但要追求一定的破壁率,同时要注意该提取方法是否会对所提取的物质有破坏作用。

本研究分别采用不同的方法从啤酒泥中提取酵母多糖,结果显示,采用酶法处理时,在木瓜蛋白酶

用量 200 IU/g、处理温度 50 ℃、处理时间 15 h 的条件下,酵母多糖提取率为 18.0 mg/g;采用超声波处理技术处理啤酒酵母泥 30 min 时,效果最好,酵母多糖提取率可达 17.6 mg/g;采用微波处理酵母泥时,微波处理时间以 3.5 min 为佳,此时酵母多糖提取率为 16.6 mg/g;冻融 3 次时,提取效果与传统热水浸提法相当,酵母多糖提取率为 13.3 mg/g。可知不同提取方法对酵母多糖的最大提取效率由高到低依次为:酶法>超声波处理技术>微波辅助提取法>冻融法>传统热水浸提法。

本研究选取了酵母多糖提取方法中效率较高的 2 种提取方法联合使用,即当木瓜蛋白酶用量为 200 IU/g、超声波处理 30 min、处理温度为 50 ℃时,酵母多糖提取率最高,可达 24.5 mg/g,不仅可弥补单独采取酶法提取时间过长以及单独采用超声波处理技术提取率不高的缺点,而且比传统热水浸提法的多糖提取效率提高了 91.41%。

[参考文献]

[1] 衣海龙,郭玲玲,张巍,等.啤酒酵母泥的综合利用[J].酿酒,2009(6):86-87.
Yi H L,Guo L L,Zhang W,et al. Comprehensive utilization in beer yeast mud [J]. Liquor Making, 2009(6): 86-87. (in Chinese)

[2] 田春华,竹磊,朱海华,等.啤酒酵母泥中酵母多糖提取工艺研究[J].江西农业学报,2010,22(7):103-104.
Tian C H,Zhu L,Zhu H H,et al. Extraction and determination of zymosan from beer yeast cell wall [J]. Acta Agriculturae Jiangxi,2010,22(7):103-104. (in Chinese)

[3] 张俊杰.啤酒酵母泥中蛋白质的提取[J].河北理工大学学报:自然科学版,2008(1):92-95.
Zhang J J. The extraction of protein from waste beer yeast putty [J]. Journal of Hebei Polytechnic University: Natural Science Edition,2008(1):92-95. (in Chinese)

[4] Giovanna G,Valentina C,Iolanda R. Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137:303-307.

[5] Lorena D,Zenaida G,Belen A,et al. Effect of yeast mannoproteins and grape polysaccharides on the growth of wine lactic acid and acetic acid bacteria [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2010,58:7731-7739.

[6] 韩刚,江洪涛,张卫国.氮酮促进啤酒废酵母蛋白质释放的研究[J].食品科学,2005(4):127-128.
Han G,Jiang H T,Zhang W G. Study on using azone to enhance the release of protein in beer yeast drey [J]. Food Science,2005(4):127-128. (in Chinese)

[7] Ravella S R,Quinones T S,Retter A,et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like

fungus Aureobasidium pullulans [J]. Carbohydrate Polymers, 2010,82:728-732.

[8] Huang K,Gao J Y,Ma S,et al. Optimising separation process of protein and polysaccharide from spent brewer's yeast by ultrafiltration [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012,47:1259-1264.

[9] 边洪荣,朱延军,张庆波.超声提取酵母中多糖的实验方法研究[J].中国煤炭工业医学杂志,2008(8):1252-1253.
Bian H R,Zhu Y J,Zhang Q B. Study on the experimental method of using ultrasonic technology to extraction polysaccharide from yeast [J]. Chinese Journal of Coal Industry Medicine,2008(8):1252-1253. (in Chinese)

[10] 丁宏伟.超声结合紫外处理对啤酒酵母泥中蛋白释放量的研究[J].四川农业大学学报,2011(3):407-410.
Ding H W. Research on released quantity of protein from waste brewer's yeast while processed by ultrasonic wave and ultraviolet ray [J]. Journal of Sichuan Agriculture University, 2011(3):407-410. (in Chinese)

[11] 刘博群,刘静波,李海霞,等.废弃啤酒酵母泥除杂、脱苦工艺条件的筛选与其 RNA 提取技术的优化[J].食品科学,2008,29(10):404-406.
Liu B Q,Liu J B,Li H X,et al. Optimization of impurity removal, debittering and RNA extraction technology of waste beer yeast paste [J]. Food Science,2008,29(10):404-406. (in Chinese)

[12] 蔺红苹,陈春红,杨淞.3 种啤酒酵母细胞壁中 β -(1,3)-D-葡聚糖提取方法的比较[J].安徽农业科学,2010,38(17):9199-9200,9228.
Lin H P,Chen C H,Yang S. Comparison on three extraction methods of β -(1,3)-D-glucan of cell wall in the beer yeast [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2010, 38(17): 9199-9200, 9228. (in Chinese)

[13] 刘明源,张美硕,杨艺,等.6 种啤酒酵母细胞破壁处理方式的对比分析[J].现代农业科技,2012(6):340-342.
Liu M Y,Zhang M S,Yang Y,et al. Comparison on six methods of breaking yeast cells [J]. Modern Agricultural Science and Technology,2012(6):340-342. (in Chinese)

[14] 吴小刚,吴周和,吴传茂.啤酒酵母多糖提取工艺条件的研究[J].饲料工业,2006(9):27-29.
Wu X G,Wu Z H,Wu C M. Study on craft condition of beer yeast polysaccharide-extraction [J]. Feed Industry,2006(9): 27-29. (in Chinese)

[15] 王志博,潘军,张永根,等.用酶法对啤酒酵母细胞破壁优化条件的研究[J].东北农业大学学报,2008,39(3):76-79.
Wang Z B,Pan J,Zhang Y G,et al. Study on optimum enzymatic conditions of brewer yeast in cell-wall breaking [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2008,39(3):76-79. (in Chinese)

[16] 徐希柱,杜金华,高洁,等.碱-酶法提取啤酒酵母粉中 β -(1,3)-D-葡聚糖[J].食品与发酵工业,2007,33(4):145-149.
Xu X Z,Du J H,Gao J,et al. Extraction of β -(1,3)-D-glucan from beer yeast power by alkali-enzyme method [J]. Food and

Fermentation Industries,2007,33(4):145-149. (in Chinese)

[17] 郭卫芸,杜冰,袁根良,等. 反复冻融法破壁啤酒废酵母的研究[J]. 酿酒科技,2009(3):103-105.
Guo W Y,Du B,Yuan G L,et al. Investigation on the break-

age of waste beer barm cells by repeated freezing and melting[J]. Liquor-making Science & Technology,2009(3):103-105. (in Chinese)

(上接第 138 页)

[8] 姜卫兵,韩浩章,戴美松,等. 苏南地区主要落叶果树的需冷量[J]. 果树学报,2005,22(1):75-77.
Jiang W B,Han H Z,Dai M S,et al. Study on the chilling requirement of leading deciduous fruit cultivars in southern part of Jiangsu province [J]. Journal of Fruit Science,2005,22(1):75-77. (in Chinese)

[9] 李先明,秦仲麒,涂俊凡. 不同梨品种需冷量研究[J]. 河南农业科学,2011,40(7):126-129.
Li X M,Qin Z Q,Tu J F. Study on chilling requirement of different pear cultivars [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2011,40(7):126-129. (in Chinese)

[10] Weinberger J H. Chilling requirements of peach varieties [J]. Proc Amer Soc Hort Sci,1950,56:122-128.

[11] 朱更瑞,方伟超,王力荣. 观赏桃品种需冷量的研究[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(2):176-178.
Zhu G R,Fang W C,Wang L R. Chilling requirement of ornamental peach [J]. Journal of Plant Genetic Resources,2004,5(2):176-178. (in Chinese)

[12] Richardson E A,Seeley S D. A model for estimating the completion of rest for Red Haven and Elbert Peach trees [J]. Hort Science,1974,9:331-332.

[13] 蒲富慎. 果树种质资源描述符:记载项目及评价标准[M]. 北京:农业出版社,1990:64-77.
Pu F S. Fruit germplasm resources descriptors:Record items and evaluate standards [M]. Beijing: Agricultural Press,1990:64-77. (in Chinese)

[14] Arora R,Rowland L J,Tanino K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: A science comes of age [J]. Hort Science,2003,38(5):911-921.

[15] 肖啸,张吉军,张立彬,等. 几个桃新品种需冷量的研究[J]. 内蒙古农业大学学报,2007,28(3):77-79.
Xiao X,Zhang J J,Zhang L B,et al. A study on buds chilling requirements of sever of several new peach cultivars [J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University,2007,28(3):77-79. (in Chinese)

[16] Shaltout A D,Unrath C R. Rest completion prediction model for ‘Starkrimson Delicious’ apple [J]. Amer Soc Hort Sci,1983,108:958-961.

[17] Seeley S D. Modelling climatic regulation of bud dormancy [C]//Lang G A. Plant dormancy:Physiology,biochemistry and molecular biology. Wallingford,UK:CAB Intl,1996:361-376.

[18] 王海波,王孝娣,王宝亮,等. 设施葡萄常用品种的需冷量、需热量及 2 者关系研究[J]. 果树学报,2011,28(1):37-41.
Wang H B,Wang X D,Wang B L,et al. Chilling and heat requirements and relationship between them for major grape cultivars under protected culture [J]. Journal of Fruit Science,2011,28(1):37-41. (in Chinese)

[19] 沈元月,郭家选,高东升. 温度与果树设施园艺[J]. 山东农业大学学报,2000,31(2):217-220.
Shen Y Y,Guo J X,Gao D S. Temperature and fruit tree horticulture under structure [J]. Journal of Shandong Agricultural University,2000,31(2):217-220. (in Chinese)

[20] Seeley S. Hormonal transduction of environment stresses [J]. Hort Science,1990,25(11):1369-1376.