

基于近红外光谱技术的醋醅中常见杆菌快速识别

石吉勇 胡雪桃 朱瑶迪 申婷婷 邹小波 徐艺伟

(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

摘要: 醋醅中微生物群落及其代谢产物是镇江香醋独特口感和风味形成的关键因素。研究醋醅微生物的快速识别方法,有利于监控醋醅微生物的群落组成及其动态变化情况,保障发酵产品品质。利用近红外光谱技术对醋醅中5种形态相似的常见杆菌进行快速检测。首先采集5种杆菌菌落的近红外光谱信息,并利用PCR方法对5种杆菌进行生物学鉴别(分别为地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、枯草芽孢杆菌和醋酸杆菌),然后利用K-最近邻法和最小二乘支持向量机法建立5种杆菌的近红外光谱识别模型,结果表明当主成分为4时,LS-SVM模型对应的校正集识别率为100%,预测集识别率为97.50%。

关键词: 醋醅; 固态发酵; 常见杆菌; 近红外光谱技术; 主成分分析; 支持向量机

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2016)02-0245-06

Rapid Identification of Common Bacilli in Vinegar Culture
Based on Near-infrared Spectroscopy

Shi Jiyong Hu Xuetao Zhu Yaodi Shen Tingting Zou Xiaobo Xu Yiwei

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Microbial flora and microorganism metabolites in vinegar culture are the key factors influencing Zhenjiang vinegar unique taste and flavor. Studying the rapid identification of microorganism is uniquely conducive to monitor community composition and dynamic changes and guarantee the quality of vinegar. Rapid identification of five similar bacilli was acquired using near-infrared spectra. Firstly, 120 spectra from five common bacilli (each common bacillus had 24 spectra) were obtained by near-infrared, and PCR was applied to identify the microorganism of five bacilli (namely *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Acetobacterium balch* and *Bacillus subtilis*). Simultaneously, KNN and LS-SVM were employed to establish identification model of five kinds of common bacilli. Results indicated that the best predictive precision of KNN model can be reached when principal component signals were four and parameter *K* was three, and precision rates of calibration set and prediction set were 86.25% and 85.00%, respectively. The precision rates of calibration set and prediction set were 100% and 97.50%, respectively, in LS-SVM model provided the principal component signals were four. There was non-linear correlation between near-infrared spectrum and characteristic of bacillus, and the prediction and precision of LS-SVM identification would be better. The research results laid the basis for rapid monitoring of microbial community and dynamic changes.

Key words: vinegar culture; solid fermentation; common bacilli; near-infrared spectroscopy; principal component analysis; support vector machine

收稿日期: 2015-06-28 修回日期: 2015-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(61301239)、江苏省杰出青年基金项目(BK20130010)、江苏省自然科学基金项目(BK20130505)、中国博士后科学基金项目(2013M540422、2014T70483)、江苏省博士后科研计划项目(1301051C)和国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2011AA100807)

作者简介: 石吉勇(1984—),男,副教授,主要从事食品、农产品快速无损检测研究,E-mail: shi_jiyong@ujs.edu.cn

引言

镇江香醋采用传统的固态发酵工艺,发酵过程中微生物产生的各类代谢产物赋予了镇江香醋独特的口感和风味^[1]。相关研究表明,醋酸菌、乳酸菌等有益微生物代谢产生的有机酸、游离氨基酸等是香醋的重要风味成分^[2-3]。此外,为了保证发酵醋醅与外界环境顺利进行传热传质,固态发酵多采用开放式的生产方式,但外源性有害微生物对发酵醋醅的入侵有可能造成成品醋发生返浑、生成沉淀等现象^[4],影响产品的质量与品牌形象。因此,对醋醅中微生物进行快速检测,有利于监控发酵过程中微生物种群结构,保障发酵产品的质量。

常用微生物检测方法有形态学鉴别法、生理生化鉴别法和分子生物学鉴别法等^[5-11]。形态鉴别法常采用肉眼观察、显微镜观察、染色等方法观察培养特征、细胞形态及染色特性等特征^[5-6],生理生化鉴别法根据微生物的生理生化特性进行检测,包括一些理化特性和血清学鉴定程序^[7-8]。以上2种方法操作过程繁琐、耗时耗力、鉴定结果准确率低,且鉴别的菌株种类有限。分子生物学鉴别法是从DNA水平上对微生物进行鉴别,尤其是聚合酶链式反应(PCR)技术和核酸测序技术的不断完善,使用于微生物鉴别的分子生物学技术得到广泛认可。但该方法操作复杂,耗时长,试剂昂贵,需要专业的技术人员^[9-11]。

近红外光谱法具有快速、无损、非接触等优势,已被广泛用于食品、农产品品质的定性、定量检测^[12]。由于微生物附着于待测样品中且个体极其微小,与待测样品相比几乎可以忽略不计,难以采用近红外光谱技术直接检测待测样品中的微生物。因此,与近红外光谱检测微生物的相关研究往往需要对菌体进行富集,如将菌体干燥并研磨成粉末^[13]、从菌体中分离特定的待测成分(细胞壁、细胞质等)^[14]、或者将菌体扩大培养得到单菌种的菌悬液^[15-16]。由于上述菌体富集的操作复杂、耗时长,

极大地限制了近红外光谱法快速、无损的检测优势。

菌落的形成是某种微生物的单一活菌株在培养基中不断自我繁殖、自我复制的过程,它是由同种的大量活菌株汇聚而成^[17]。鉴于特定种类的单一活菌株是菌落的基本组成单元,本文提出利用菌落的近红外光谱信息鉴别菌株类别的研究思路。该方法直接采集5种醋醅杆菌对应菌落的光谱信息,利用PCR方法对5种杆菌进行精确鉴别后,将近红外光谱结合KNN和LS-SVM对5种菌株建立识别模型,以期望得到一种醋醅杆菌的快速、准确鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 常见杆菌的筛选

1.1.1 醋醅样品采集

试验醋醅采自镇江市恒顺香醋股份有限公司的醋醅发酵车间,取固态发酵第8天醋醅的中层样(温度较高,微生物生长代谢旺盛)为菌株的来源。醋醅样品采集后,以冰盒低温保存。为了尽量保证醋醅中微生物种类不发生较大变化,样品取回后立即进行醋醅微生物分离纯化培养。

1.1.2 菌株分离与纯化

将10 g醋醅装入混有玻璃珠和90 mL无菌生理盐水(0.85%)的500 mL三角瓶中,115 r/min振荡20 min后静置,用无菌生理盐水以 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 梯度稀释涂布于培养基平板,每个稀释度做3个重复,利用普通培养基在37℃培养箱中培养3~5 d。挑选生长快、分布密度大的单菌落,无菌生理盐水稀释后重复培养直至单种菌株形成。并将菌株接种于保藏培养基中,37℃恒温培养48 h,4℃冰箱中保藏备用。筛选5种生长形态相似的菌株为待鉴别菌株,5种菌株培养平板如图1所示。

分离培养基:葡萄糖质量浓度0.01 g/mL,蛋白胨质量浓度0.01 g/mL,酵母粉质量浓度0.005 g/mL,NaCl质量浓度0.003 g/mL,琼脂质量浓度0.02 g/mL,pH值7.0~7.2,121℃灭菌20 min。用前加入

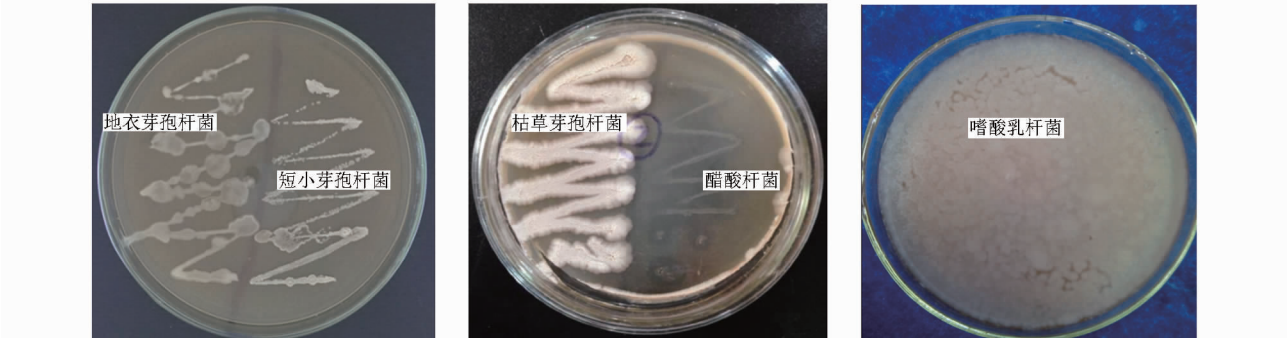


图1 5种菌株的菌落培养形态

Fig. 1 Form of five bacilli colonies

0.05 mL/mL 无水乙醇。

保藏培养基:葡萄糖质量浓度 0.01 g/mL,酵母粉质量浓度 0.01 g/mL,琼脂质量浓度 0.02 g/mL,甘油质量浓度 0.025 g/mL,121℃ 灭菌 20 min。

1.1.3 基于 PCR 技术的目标菌株鉴定

采用聚合酶链反应技术 (Polymerase chain reaction,PCR) 对筛选的菌株进行 16SrRNA 扩增测定。挑取培养 18 ~ 24 h 的单菌落用无菌 ddH₂O 制成菌悬液,10 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 100 μL ddH₂O,制得模板 DNA,采用通用引物 P0 ~ P6 (P0: 5'-GAGAGTTTGATCCTGCAG-3', P6: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 扩增菌株的 16SrRNA 基因。以 Template DNA 1 μL、Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL、10 × buffer (Mg²⁺) 2.5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL、P0 (20 μmol/L) 1.0 μL、P6 (12.5 μmol/L) 1.0 μL 和 ddH₂O 25 μL 为 PCR 反应体系;94℃ 预变性 2 min,然后 94℃ 变性 45 s、56℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 90 s,30 s 完成 30 个循环;PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检验,电压 120 V,电泳时间 20 min;利用凝胶成像系统拍摄记录电泳图谱;最后将 PCR 扩增产物送生工(上海)股份有限公司进行测序,将所测序列与数据库已知序列进行比对^[16]。筛选的 5 种菌株鉴定结果如表 1 所示。

表 1 筛选的 5 种常见杆菌
Tab.1 Five selected common bacilli

具有最高同源性的微生物	中文名	NCBI 登录号	相似性/%
<i>Bacillus licheniformis</i>	地衣芽孢杆菌	AB039328	99
<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌	EU373381	99
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	嗜酸乳杆菌	HM598684	99
<i>Acetobacterium balch</i>	醋酸杆菌	EU126660	99
<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	AB201120	99

朱其瀚等^[4,16]研究表明镇江香醋发酵过程中乳酸菌、醋酸菌和芽孢杆菌均属于醋醅中可以检出的常见菌群。刘国红等^[18-23]的研究表明 5 种杆菌细胞形态都呈杆状或短杆状,人眼难以区分,尤其是

3 种芽孢杆菌。根据芽孢杆菌经典分类法可知 3 种芽孢杆菌都能在 pH 值 5.7 的环境中生长,且产生乙酰甲基甲醇。地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌都能水解淀粉,将硝酸盐还原到亚硝酸盐,短小芽孢杆菌不水解淀粉,硝酸盐不还原到亚硝酸盐^[23]。而且 5 种杆菌都能生成乙酸^[4]。因此,无论是从生长形态还是基础的生理生化检测上都难以对 5 种杆菌进行鉴别。

1.2 菌落的近红外光谱采集

将在冰箱中保藏备用的待识别杆菌利用平板培养法进行菌落培养。为保证实验数据的重现性,分 3 批次进行菌落培养,每批次培养的条件保证一致。在每批次培养过程中,1 种杆菌培养 8 个培养皿,5 种杆菌对应 40 个培养皿;3 批次培养后可得 5 种杆菌对应的 120 个培养皿。

光谱仪为 Antarisn II 型傅里叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司),采用漫反射积分球模式采集 5 种常见杆菌菌落近红外光谱。检测器为 TE-InGaAs,光谱采集范围 4 000 ~ 10 000 cm⁻¹,光谱采集次数为 16 次,分辨率 8 cm⁻¹,波数间隔 3.856 cm⁻¹。采集时将培养皿倒置,将近红外光束直接照射在菌落上。挑选菌落比较大且比较厚的菌落进行采集,避免近红外光束照射到培养基或其他杂质。采集培养皿中 5 个单独菌落的近红外光谱并取平均值得到 1 条原始光谱,以此方式采集得到 120 个培养皿对应的 120 条光谱数据。

1.3 光谱预处理

图 2a 为每种杆菌的平均光谱图(图中 R 表示近红外光的反射强度),由图 2a 可以看出每种杆菌具有相同的趋势,而在相同的波长下又有不同的吸收度。因此,可以通过近红外反射光谱信息进行菌株的定性识别^[24]。

为了消除近红外光谱的高频随机噪声、基线漂移、样本表面粗糙和光散射等带来的不良影响,首先必须对原始光谱进行预处理。尝试使用标准正态变量变换 (SNVT)、Savitzky - Golay 多项式平滑、一阶

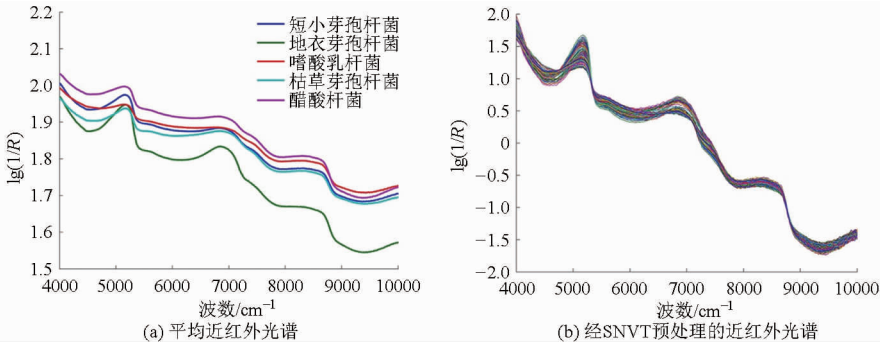


图 2 5 种杆菌的平均近红外光谱和经 SNVT 预处理的近红外光谱
Fig.2 Average spectra and spectra pretreated by SNVT of five bacilli

导数以及二阶导数^[25],经反复比较,发现使用 SNVT 的处理效果最佳。图 2b 为经过该方法预处理后的光谱。

1.4 KNN 和 LS-SVM 模式识别的基本原理

K-最近邻法 (*K*-nearest neighbors, KNN) 基本思想是如果一个样本在特征空间中的 *K* 个最相似(即特征空间中最近邻)样本中大多数属于某一个类别^[26],则该样本也属于这个类别。最小二乘支持向量机 (Least-squares support vector machine) 是在经典 SVM 的基础上改进的,能够进行线性和非线性的多元建模^[27]。

2 结果与分析

2.1 数据分析

2.1.1 主成分分析

本实验使用主成分分析对近红外光谱数据进行压缩,使少数新变量代替原变量,并尽可能多地表征原变量的数据特征而不丢失信息。经转换得到的新变量是互不相关的,消除了众多信息中共存的、相互重叠的部分。图 3 为 5 种菌的三维主成分得分图。

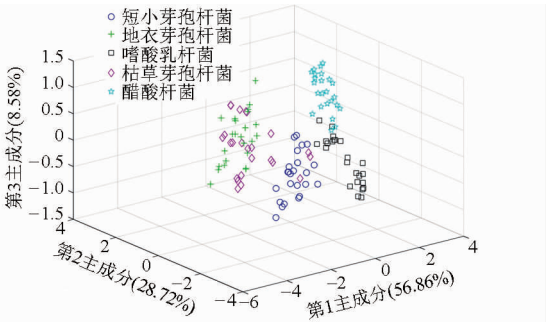


图 3 三维主成分得分图

Fig. 3 Three-dimensional projection of PCA result

短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌同属芽孢杆菌属,嗜酸乳杆菌属于乳杆菌属,都是革兰氏阳性菌。醋酸杆菌属于醋酸杆菌属,是革兰氏

阴性菌。革兰氏阳性和阴性细菌的最大区别就是细胞壁结构不同^[27]。如图 3 所示,1 种革兰氏阴性菌能够与 4 种革兰氏阳性菌良好地分开,而 3 种芽孢杆菌有些却不能被区分开,尤其是地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌交叉聚集在一起,3 个枯草芽孢杆菌样品被错分成短小芽孢杆菌,可能是因为它们的细胞结构成分及分泌物相似。嗜酸乳杆菌和醋酸杆菌有小部分聚集,可能是因为它们都能生成乙酸等物质。还有可能就是前 3 个主成分并未反映全部信息,同时样品的制备和光谱采集还需要进一步优化,且还需要进一步利用模式识别方法建立模型进行分类识别。

取前 10 个主成分(累积方差贡献率大于 90%,几乎代表了全部信息)为输入变量。本次实验共采集 120 个近红外光谱,采用随机分组的方式将全部数据分成 80 个用作训练集样本,余下的 40 个用作预测集样本。

2.1.2 基于 KNN 常见杆菌的识别

取前 10 个主成分所对应的光谱信息和 1~9 之间不同的 *K* 值通过交互验证来建立 KNN 模型,以预测集识别率作为优化结果的评判标准。如图 4b 所示,当主成分数为 4, *K* 为 3 时,最佳预测集识别率为 85.00%,此后预测集识别率基本保持不变。当参数 *K* 为 3,主成分数为 4,识别效果最优,训练集和预测集识别率分别为 86.25% 和 85.00%。

2.1.3 基于 LS-SVM 常见杆菌识别

采用交叉验证法与网格搜索法对参数进行寻优计算,寻优过程由粗选和精选 2 个步骤组成:粗选格点数 10×10,搜索步长较大;精选格点数仍为 10×10,在粗选基础上,以较小步长更加细致地搜索,以定标集交互验证均方根误差(Root mean square error of cross validation, RMSECV)最小为指标,确定最优的(γ, σ^2)组合(γ 表示正则化参数, σ 表示基于

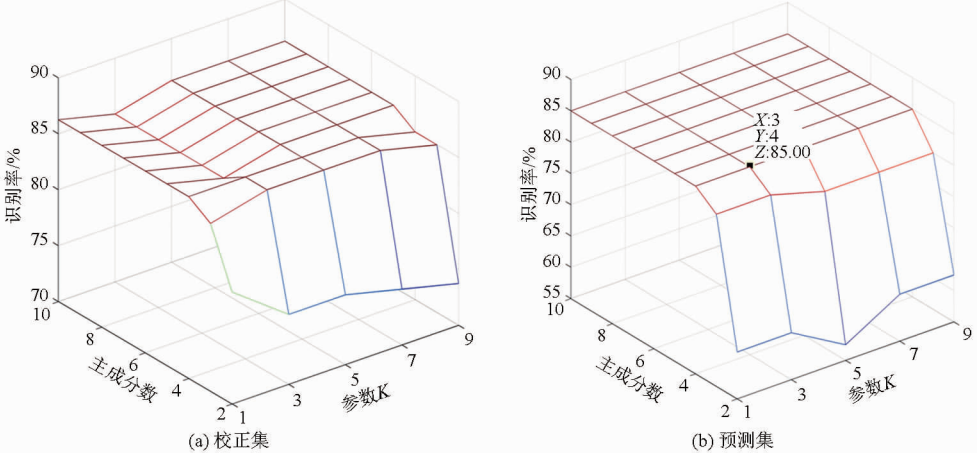


图 4 KNN 模式识别的校正集和预测集

Fig. 4 Calibration and prediction results for identification of five bacilli based on KNN

RBF 核函数的参数)。设定 $10^{-2} \sim 10^2$ 为参数的范围进行网格搜索。将前 1 个主成分到前 10 个主成分数据分别作为输入变量,在最佳主成分下寻找最优参数对。经处理得出最佳主成分数为 4,最佳参数对(γ, σ^2)为(1.997 4,1.501 2)。

如图 5 所示,LS-SVM 模型随着主成分数的增加,训练集和预测集识别率均有所增加,当主成分数为 4 时,校正集识别率为 100%,预测集识别率达到 97.50%,模型最优。说明前 4 个主成分已经包含了大部分有关于菌株的信息。可见利用近红外光谱结合 LS-SVM 法对镇江香醋中常见杆菌进行识别是可行的。

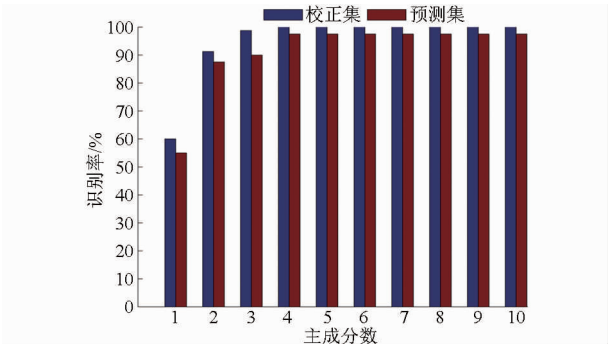


图 5 基于 LS-SVM 的各主成分的识别率
Fig.5 Identification rate of each principal component based on LS-SVM

2.2 2 种模型的对比

如表 2 所示,LS-SVM 模型识别率达 97.50%,KNN 模型识别率达 85.00%,由此可见近红外结合 LS-SVM 法识别常见杆菌的效果较 KNN 好。由于 KNN 方法主要靠周围有限、邻近的样本,而不是靠判别类域的方法来确定所属类别^[26],因此对于不同类域的菌种来说,KNN 方法较 LS-SVM 方法更为适合。例如 KNN 可以分开不同种属,如芽孢杆菌属、醋酸杆菌属及乳杆菌属。但是对于同一种属的

芽孢杆菌属,如地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,KNN 具有明显的劣势。而 LS-SVM 模式识别除了进行线性分类外,支持向量机可以使用所谓的核技巧,使输入的隐含层映射到高维特征空间中有效地进行非线性分类。以较优核函数集以及核函数参数为基础建立的模型有很好的识别效果^[14],故总体来说 LS-SVM 对菌种的识别效果较好,识别率可达到 97.50%。

表 2 基于 KNN 和 LS-SVM 模式识别的识别率
Tab.2 Identification rates based on KNN and

LS – SVM models			%
模型	识别率		
	校正集	预测集	
KNN	86.25	85.00	
LS – SVM	100	97.50	

3 结束语

利用近红外光谱技术结合化学计量学方法,实现了镇江香醋中常见杆菌的快速识别。首先采集 5 种目标菌株的近红外光谱信息,并利用 PCR 技术对 5 种目标菌株进行分子生物学鉴别,经鉴定分别为地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、枯草芽孢杆菌和醋酸杆菌。然后运用 KNN 法和 LS-SVM 法建立 5 种杆菌的快速识别模型。当主成分为 4 时,KNN 模型对应的校正集识别率为 86.25%,预测集识别率为 85.00%;LS-SVM 模型对应的校正集识别率为 100%,预测集识别率为 97.50%。可见 LS-SVM 模型对镇江香醋中常见杆菌具有很好的识别效果。结果表明近红外光谱技术可以快速、准确、无损地识别镇江香醋常见杆菌,可实现快速、准确监控镇江香醋微生物的群落组成及其动态变化,缩短检测时间,提高生产效率。

参 考 文 献

1 包启安. 传统镇江香醋生产工艺剖析[J]. 江苏调味副食品,2000(2):6-7.
2 倪峥飞. 镇江香醋固态发酵过程中酿造微生物强化及醋醅总 DNA 提取方法的初步研究[D]. 无锡:江南大学,2009.
Ni Zhengfei. Research on bioaugmentation of brewing microbes and total DNA extraction during solid-state fermentation of Zhenjiang vinegar [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009. (in Chinese)
3 苏俊霞. 镇江香醋醋醅中醋酸菌多样性及 *Gluconacetobacter intermedius* 特性的研究[D]. 无锡:江南大学,2014.
Su Junxia. Biodiversity of acetic acid bacteria in the vinegar Pei of Zhenjiang aromatic vinegar and the properties of *Gluconacetobacter intermedius*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014. (in Chinese)
4 朱其瀚. 镇江香醋发酵过程中微生物分离及其产酸特性[D]. 无锡:江南大学,2008.
Zhu Qihan. Isolation of microbes and their acid-producing characteristics in the solid-cultures of Zhenjiang vinegar [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008. (in Chinese)
5 王平,胡正嘉. 棉花 VA 菌根真菌的分离鉴定[J]. 华中农业大学学报,1989,8(1):36-44.
Wang Ping, Hu Zhengjia. The isolation and identification of VA mycorrhizal fungi on cotton [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1989, 8(1): 36-44. (in Chinese)
6 崔云,卢红梅,张义明,等. 食醋中微生物的分离与鉴定[J]. 中国酿造,2008(22):29-31.
Cui Yun, Lu Hongmei, Zhang Yiming, et al. Microbial separation and identification in the vinegar [J]. China Brewing, 2008(22): 29-31. (in Chinese)

- 7 Shobharani P, Agrawal R. Interception of quorum sensing signal molecule by furanone to enhance shelf life of fermented milk [J]. Food Control, 2010, 21(1): 61–69.
- 8 Wagar L E, Champagne C P, Buckley N D, et al. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(8): 423–430.
- 9 许伟. 镇江香醋醋酸发酵过程微生物群落及其功能分析[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
Xu Wei. Analysis of the microbial diversity and function during acetic acid fermentation process of Zhenjiang aromatic vinegar [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011. (in Chinese)
- 10 Cong Jing, Liu Xueduan, Lu Hui, et al. Analyses of the influencing factors of soil microbial functional gene diversity in tropical rainforest based on GeoChip 5.0 [J]. Genomics Data, 2015(5): 397–398.
- 11 Wu Rina, Yu Meiling, Liu Xiaoyu, et al. Changes in flavor and microbial diversity during natural fermentation of suan-cai, a traditional food made in Northeast China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 211: 23–31.
- 12 岳田利, 王军, 袁亚宏, 等. 基于 FT-NIR 的微生物快速鉴定方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(11): 2945–2949.
Yue Tianli, Wang Jun, Yuan Yahong, et al. Rapid identification of microorganisms based on Fourier transform near infrared spectroscopy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(11): 2945–2949. (in Chinese)
- 13 赵冰琳. 大肠杆菌等致病菌的近红外光谱检测方法研究[D]. 郑州: 河南科技大学, 2009.
Zhao Binglin. Research on the method of near-infrared detection of *E. coli* [D]. Zhengzhou: Henan University of Science and Technology, 2009. (in Chinese)
- 14 He H J, Sun D W, Wu D. Rapid and real-time prediction of lactic acid bacteria (LAB) in farmed salmon flesh using near-infrared (NIR) hyperspectral imaging combined with chemometric analysis [J]. Food Research International, 2014, 62: 476–483.
- 15 Feng Y Z, Downey G, Sun D W, et al. Towards improvement in classification of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and their strains in isolated systems based on chemometric analysis of visible and near-infrared spectroscopic data [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 149: 87–96.
- 16 陶京兰. 基于分子生态学技术的镇江香醋醋酸发酵过程中主要微生物变化规律研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
Tao Jinglan. Variation of the dominant microbes during acetic acid fermentation process of Zhenjiang aromatic vinegar through molecule ecology techniques [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013. (in Chinese)
- 17 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- 18 胡云广. 地衣芽孢杆菌产抗真菌物质的分离纯化[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
Hu Yunguang. The separation and purification of the antifungal substance produced by *Bacillus licheniformis* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011. (in Chinese)
- 19 史应武, 娄恺, 李春. 天山北坡甜菜内生菌分离识别及其动态变化[J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2374–2382.
Shi Yingwu, Lou Kai, Li Chun. Isolation and identification of endophytic microorganisms from sugar beet and dynamic changing in the north slope of Tianshan Mountain [J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(5): 2374–2382. (in Chinese)
- 20 余倩, 孙丽. 提高酸乳中嗜酸乳杆菌活性的研究[J]. 食品工业科技, 2011(5): 113–115.
- 21 樊萍, 钱平, 何锦凤, 等. 面包中耐辐射菌种的识别及其敏感性研究[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3): 86–92.
Fan Ping, Qian Ping, He Jinfeng, et al. Anti-irradiation bacteria identification and sensitivity study in irradiated bread [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2007, 9(3): 86–92. (in Chinese)
- 22 陈浙江. 高活性醋酸杆菌的选育和乙醇脱氢酶提取[D]. 上海: 上海师范大学, 2008.
Chen Zhejiang. Creening of high activity of *Acetobacter* and extract alcohol dehydrogenase [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2008. (in Chinese)
- 23 刘国红. 芽孢杆菌的分类鉴定及其相关属的分类系统演变研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
Liu Guohong. The studies on classification and identification of *Bacillus* and systematic evolution in the genera related with *Bacillus* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2009. (in Chinese)
- 24 Rodriguez-Saona L E, Khambaty F M, Fry F S, et al. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49(2): 574–579.
- 25 Huang M, Wang Q, Zhang M, et al. Prediction of color and moisture content for vegetable soybean during drying using hyperspectral imaging technology [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 128: 24–30.
- 26 Zou Xiaobo, Zhao Jiewen, Povey M J W, et al. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy [J]. Analytical Chimera Acta, 2010, 667(1–2): 14–32.
- 27 Lang P, Sang S C. The in situ infrared microspectroscopy of bacterial colonies on agar plates [J]. Cellular and Molecular Biology, 1998, 44(1): 231–238.
- 28 谢传奇, 方孝荣, 邵咏妮, 等. 番茄叶片早疫病近红外高光谱成像检测技术[J]. 农业机械学报, 2015, 46(3): 315–319.
Xie Chuanqi, Fang Xiaorong, Shao Yongni, et al. Detection of early blight on tomato leaves using near-infrared hyperspectral imaging technique [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(3): 315–319. (in Chinese)
- 29 迟茜, 王转卫, 杨婷婷, 等. 基于近红外高光谱成像的猕猴桃早期隐性损伤识别[J]. 农业机械学报, 2015, 46(3): 235–241.
Chi Qian, Wang Zhuanwei, Yang Tingting, et al. Recognition of early hidden bruises on kiwifruits based on near-infrared hyperspectral imaging technology [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(3): 235–241. (in Chinese)
- 30 代芬, 吴玲, 叶观艳, 等. 基于近红外漫透射光谱信息的蚕茧雌雄检测[J]. 农业机械学报, 2015, 46(12): 280–284.
Dai Fen, Wu Ling, Ye Guanyan, et al. Non-destructive detection of male and female silkworm cocoon based on transmission near infrared spectroscopy [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(12): 280–284. (in Chinese)