doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.02.030

陕西猕猴桃汁嗜酸耐热菌污染能力评测与多样性分析*

张江波　刘兴华　岳田利　袁亚宏

(西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西杨凌 712100)

摘要:以分离自陕西成熟猕猴桃的 6 株嗜酸耐热菌为研究对象,对这 6 株分离菌以及 4 株相应的标准菌株进行了猕猴桃汁污染能力评估,并对分离菌与标准菌株的常规生理生化指标进行了测定和对比分析。通过气质联用对不同菌株特征污染代谢产物形成能力检测、绘制热死亡曲线进行的抗热性差异检测,以及通过 API 鉴定系统进行碳源代谢谱分析和通过基因组 DNA 杂交实验复性速率测定,对嗜酸耐热菌群菌株的生物多样性进行评测。结果表明,分离菌株产污染物愈创木酚量可达 10.56 ~ 34.74 μg/L,在猕猴桃汁中 $D_{90℃}$ 值达到 27.1 ~ 34.2 min,z 值达到 12.14 ~ 13.66℃;API 实验结果表明,分离菌株与标准菌有 3 ~ 19 项糖代谢结果差异,与文献报道相应菌种不同菌株中有 7 ~ 22 项糖代谢差异;6 株分离菌与标准菌 DNA 杂交率在 74.75% ~ 104.79% 之间。实验结果表明:分离自陕西地产猕猴桃果汁的 6 株本土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)具有潜在污染猕猴桃果汁的能力,并具有一定的生物多样性。

关键词:猕猴桃　果汁　嗜酸耐热菌　API 试验　DNA 杂交

中图分类号:TS255;Q939.96　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-1298(2015)02-0198-10

Evaluation of Kiwi-fruit Juice Contaminant Capacity of Indigenous *Alicyclobacillus* and Its Biodiversity

Zhang Jiangbo　Liu Xinghua　Yue Tianli　Yuan Yahong

(*College of Food Science and Engineering*, *Northwest A&F University*, *Yangling*, *Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In order to evaluate the potential risk of *Alicyclobacillus* contamination in Shaanxi kiwi fruit production line, six strains of *Alicyclobacillus* isolated from the production line were studied. The contaminant production capacity of six strains and four corresponding standard strains was evaluated, including detection of contaminant production using GC - MS and heat resistance through drawing thermal death curves, and its biodiversity was analyzed, including analysis of carbon source spectrum by API tests and detection of its DNA hybridizations from renaturation rates. The results showed that no 2,6-dibromophenol and 2,6-dichlorophenol were detected, and the guaiacol production of six isolated strains was between 10.56 μg/L and 34.74 μg/L which was significantly higher than the common sensory detection threshold values in juices, $D_{90℃}$ values of strains were 27.1 ~ 34.2 min and the z values were 12.14 ~ 13.66℃ in kiwi fruit juice, with the heat resistance of the three strains of *A. acidoterrestris* generally being higher than the data of former reports. There were 7 ~ 22 different results of API tests between the isolated strains and the data from published articles or their corresponding standard strains. The hybridizations between the isolated strains and their corresponding standard strains were between 74.75% and 104.79%. These results suggested that the isolated strains possessed potential contaminant production capacity and biodiversity to a certain extent which needed to be controlled.

Key words: Kiwi fruit　Juice　*Alicyclobacillus*　API tests　DNA hybridization

收稿日期:2014-02-25　修回日期:2014-04-16

*"十二五"国家科技支撑计划资助项目(2012BAK17B06)

作者简介:张江波,博士生,主要从事食品微生物学研究,E-mail:Zhangjiangbo_1978@163.com

通讯作者:刘兴华,教授,博士生导师,主要从事食品安全保藏技术研究,E-mail:liuxh2830@163.com

引言

我国的猕猴桃产业除鲜果外，其他深加工产品，包括果汁、果酒、果醋、速冻鲜切片等近几年也发展迅速。果汁等水果蔬菜深加工产品由于其低 pH 值不容易受到微生物的污染。还有一些微生物甚至巴氏灭菌也很难彻底杀灭，主要包括一些厌氧的芽孢杆菌，如丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*），以及某些好气性的芽孢杆菌[1-2]。*Alicyclobacillus* 是果汁中的一类非致病性污染菌，具有嗜酸耐热的特点[3]，目前已经成为全世界范围内被食品工业尤其是果汁生产者普遍关注的问题[4-8]。

关于 *Alicyclobacillus* 的研究一直是国际上的热点[9]。脂环酸对 *Alicyclobacillus* 的抗热性有重要作用[10]。并非 *Alicyclobacillus* 属所有的种都是果汁的污染菌，目前发现的污染菌主要包括 *A. acidoterrestris*、*A. acidocaldarius*、*A. cycloheptanicus* 等 7 种。笔者通过实验证明 *A. contaminans* 也是污染菌[11]。目前尚无文献表明 *Alicyclobacillus* 具有致病性，且 *Alicyclobacillus* 的污染并不会造成果汁营养成分的明显损失。然而 *Alicyclobacillus* 污染果汁等产品后会产生令人不快的气味，有时伴有少量沉淀，这在很大程度上降低了果汁等产品的商品质量[4,12]。研究证明 *Alicyclobacillus* 污染后产生的挥发性物质主要是愈创木酚以及另外两种卤代酚，尤其是愈创木酚。由于其挥发物的质量浓度很小，是 μg/L 级的，因此虽然有人开发了基于化学方法的试剂盒[13]，目前国际上公认的最有效的检测污染物的方法还是气质联用（GC－MS）检测法。

本实验室已经对陕西省苹果生产中的嗜酸耐热菌的污染情况进行过研究[14]，而笔者也对陕西另一主栽水果猕猴桃产品全产业链的嗜酸耐热菌污染情况进行了考察[11]，共分离出嗜酸耐热菌 85 株，经鉴定其中 *Alicyclobacillus* 属 76 株，分属 4 个种，经随机引物扩增结合基于 16S rDNA 的系统发育树划分为 6 个主要类群。另有 9 株 *Bacillus*，分属 3 个种。本文主要对该 6 类群的 *Alicyclobacillus* 代表菌株的污染能力和抗热性进行评测，并通过与标准菌基因组 DNA 杂交和基于改进的 API 鉴定系统的碳源谱分析，获取其生物多样性方面的信息。

1　材料和方法

1.1　原料、菌种和培养基

1.1.1　实验原料

实验中榨汁所用的海沃德猕猴桃（*Actinidia chinensis* var. Hayward）成熟果实购买自杨凌当地农贸市场。

1.1.2　实验菌种

标准菌：*Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3923、*A. contaminans* DSM 17975、*A. herbarius* DSM 13609、*A. cycloheptanicus* DSM 4006 购自德国微生物菌种保藏中心。

分离菌：*A. acidoterrestris* 菌株 C－ZJB－12－01（分离自商品猕猴桃果酒）、C－ZJB－12－12（分离自某猕猴桃加工企业车间墙壁）、*A. contaminans* 菌株 C－ZJB－12－49（分离自陕西周至县哑柏镇昌东村果园猕猴桃）、*A. herbarius* C－ZJB－12－48（分离地同 C－ZJB－12－49）、C－ZJB－12－58（分离自陕西周至县哑柏镇昌东村果园土壤）和 *A. cycloheptanicus* 菌株 C－ZJB－12－69（分离自陕西周至县四屯乡上天屯村果园猕猴桃）。

1.1.3　实验中使用的培养基

BAM 培养基：0.25 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，0.50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.20 g $(NH_4)_2SO_4$，3.00 g KH_2PO_4，2.00 g 酵母膏，5.00 g 葡萄糖，灭菌后添加 1.00 mL 无菌微量元素贮液，蒸馏水 1 000 mL。微量元素贮液：0.66 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，0.18 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，0.16 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，0.15 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$，0.18 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$，0.10 g H_3BO_3，0.30 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$，蒸馏水 1 000 mL。通过 1 mol/L H_2SO_4 和 1 mol/L NaOH 调整至 pH 值 4.00。若配制固体培养基则需要将琼脂与培养基其他成分分消。

基础 BAM 培养基：不含葡萄糖，仅含 0.5 g/L 酵母膏及 pH 指示剂 0.03 g/L 溴酚蓝，其余同 BAM 培养基。

改进 BAM 培养基：酵母膏质量浓度 4.00 g/L，其余同 BAM 培养基。

生孢培养基：1.00 g 酵母膏，0.20 g $(NH_4)_2SO_4$，0.25 g $CaCl_2$，0.50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，1.00 g 葡萄糖，0.60 g KH_2PO_4，蒸馏水 1 000 mL。pH 值 4.00，pH 值调整方法和固体培养基制法同 BAM 培养基。

清洗缓冲液：1.00 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，8.00 g NaCl，蒸馏水 1 000 mL，pH 值 4.5。

标准磷酸盐缓冲液：0.15 mol/L NaCI，0.015 mol/L 柠檬酸三钠，pH 值 7.0。

1.2　待测菌株产污染物能力评测

参照文献[11]，通过气质联用检测法测定。分别配制 2.5、5、7.5、10 和 20 μg/L 的愈创木酚、2,6-二氯苯酚和 2,6-二溴苯酚标准液，通过固相微萃取头（50/30 mm DVB/Carboxen/PDMS；Supelco）45℃萃取 1 h，进样到气质联用仪（Thermo－Finnigan）进行分析，绘制标准曲线。色谱柱型号为 30 m ×

0.25 mm i.d. ×0.25 μm DB-Wax(Agilent)。待测菌种接种 pH 值调整至 4.2 的猕猴桃汁中 45℃静置培养 21 d 后,依相同方法测定其各自的愈创木酚、2,6-二氯苯酚和 2,6-二溴苯酚产量。色谱条件等具体参照文献[11]。

1.3 待测菌株抗热性评测

作为芽孢杆菌,*Alicyclobacillus* 芽孢的抗热性是衡量其污染能力的重要指标。抗热性实验主要参照 Silva 等的方法稍作改变进行[15]。

1.3.1 待测菌株芽孢制备

待测菌株活化后接入生孢培养基培养 5~7 d,直至显微观察 80% 以上细菌形成芽孢。用无菌水冲洗平板,收集洗液,14 000 r/min 离心 20 min 收集芽孢,无菌水洗涤,重复 3 次。收集的芽孢用 50% 的乙醇处理 30 min 以除尽营养细胞,再离心洗涤 3 次,重悬于无菌 0.85% NaCl 溶液 4℃保存。

1.3.2 待测菌株芽孢抗热性实验

待测菌株芽孢接入用 NaOH 调整过的猕猴桃汁(pH 值 4.2,可溶性固形物质量分数 12%)和 BAM 液体培养基,85、90、95℃分别热处理 200、60、20 min,每个处理相同间隔共取 5 个样(包括零时),涂 BAM 平板,45℃培养 24 h 检测残留芽孢数。根据热死亡曲线,计算各个菌株在不同温度下的 D 值,并根据不同温度下的 D 值计算相应 z 值。D 值为在某特定温度和其他条件下,杀死一个试样中所有微生物的 90% 所用的最短时间,其数值为某温度下微生物热死亡曲线图(横坐标为时间,纵坐标为残存微生物数量以 10 为底的对数)上数据拟合直线斜率的倒数。z 值是使 D 值下降至 1/10 所需要升高的温度,其数值为温度 - D 值图(横坐标为温度,纵坐标为 D 值以 10 为底的对数)上数据拟合直线斜率的倒数。z 值计算公式为[16]

$$z=(T_2-T_1)/(\lg D_1-\lg D_2) \tag{1}$$

式中 D_1、D_2——温度 - D 值曲线上任意 2 个 D 值,且满足 $D_1=10D_2$

T_1、T_2——D_1、D_2 相对应的温度,℃

1.4 待测菌株碳源谱分析

主要参照 Albuquerque 等的方法[17],采用 API 50CH(bioMérieux)试剂条进行。将待测菌株接入 BAM 培养基(菌株 DSM 4006 及 C-ZJB-12-69 接入改进 BAM 培养基)培养 24 h,离心收集菌体,清洗缓冲液 3 次,重悬于 BAM 基础培养基,调整菌体浓度至 6×10^8 个/mL(或使用麦氏比浊管,并调整至相当于 2 号管的浊度),按照 API 试剂条说明书操作小心接种于每个试剂条所有 50 个小管中。45℃培养 7 d,每天观察记录。根据小管中培养基颜色是否发生变化判断碳源利用情况,蓝紫色为阴性,表明没有利用该管碳源产酸,黄色为阳性,表明利用该管碳源产酸,颜色介于二者之间为弱阳性。七叶灵反应变黑色为阳性。

1.5 待测菌株基因组 DNA 杂交实验

按 Ley 等[18]创立的复性速率法进行,并参照文献[19]改进。主要步骤为:

(1)待测菌株基因组 DNA 制备

待测菌株培养至对数期,离心收集菌体,使用细菌基因组提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取其基因组 DNA 并以 RNA 酶(天根)降解其 RNA,溶解于 2 倍浓度的标准磷酸盐缓冲液,电泳结合 $A_{260/280/230}$(DNA 溶液在 260、280、230 nm 的吸光度的比值)检测其浓度及纯度(若合格则电泳结果无蛋白及 RNA 条带,并且 $A_{260/280/230}\approx1:0.450:0.515$,同时 $A_{260}>2.0$),通过超声波破碎机(宁波新艺生物科技股份有限公司)将 DNA 破碎成 500~750 bp 的片段,通过电泳检查合格后储存于 -18℃备用。

(2)待测菌株基因组 DNA 杂交

通过可控温的紫外分光光度计(美国 PERKINEIMET 公司)进行。条件为:95℃变性 10 min,降温至最适复性温度复性 30 min,记录 A_{260} 变化曲线,最适复性温度计算公式为[18]

$$T_{or}=0.51K+47.0 \tag{2}$$

式中 T_{or}——最适复性温度,℃

K——两株杂交菌的平均摩尔百分比

(3)考虑到微量比色杯(江苏无锡市晶禾光学仪器有限公司)在实验过程中的液体体积蒸发减少的情况,进行体积修正后拟合复性速率,并根据复性速率计算杂交率。杂交率计算公式为[18]

$$D_{HR}=\frac{4v_m-(v_a+v_b)}{2\sqrt{v_a v_b}}\times100\% \tag{3}$$

式中 D_{HR}——杂交率,%

v_m——两样品等量混合后的复性速率

v_a——样品 a 的复性速率

v_b——样品 b 的复性速率

2 结果与讨论

2.1 待测菌株产污染物能力评测结果

在 21 d 培养后,通过固相微萃取和 GC-MS 分析后,只检测到愈创木酚,没有检测到 2,6-二氯苯酚和 2,6-二溴苯酚,这与文献[11]研究结果相同,这主要是由于实验条件和参数相同,改变这些参数,例如改变培养基或换用其他色谱柱,可能会得到不同结果。菌株 C-ZJB-12-69 产愈创木酚最多,其

色谱图、保留时间 14.46 min 质谱图以及在 NIST 2002里的检索结果见图 1。从中可见，愈创木酚的 3 个特征碎片（质荷比 81、19、124）明显，检索结果与信息库中比较正比值和反比值分别达到 690 和 821。正比值未达到 800 与萃取头上杂质干扰有一定关系，如在质荷比 281 处的峰，在所有色谱图中都存在，包括空白，应为萃取头上杂质。其他菌株及标准液色谱图与 C－ZJB－12－69 类似。

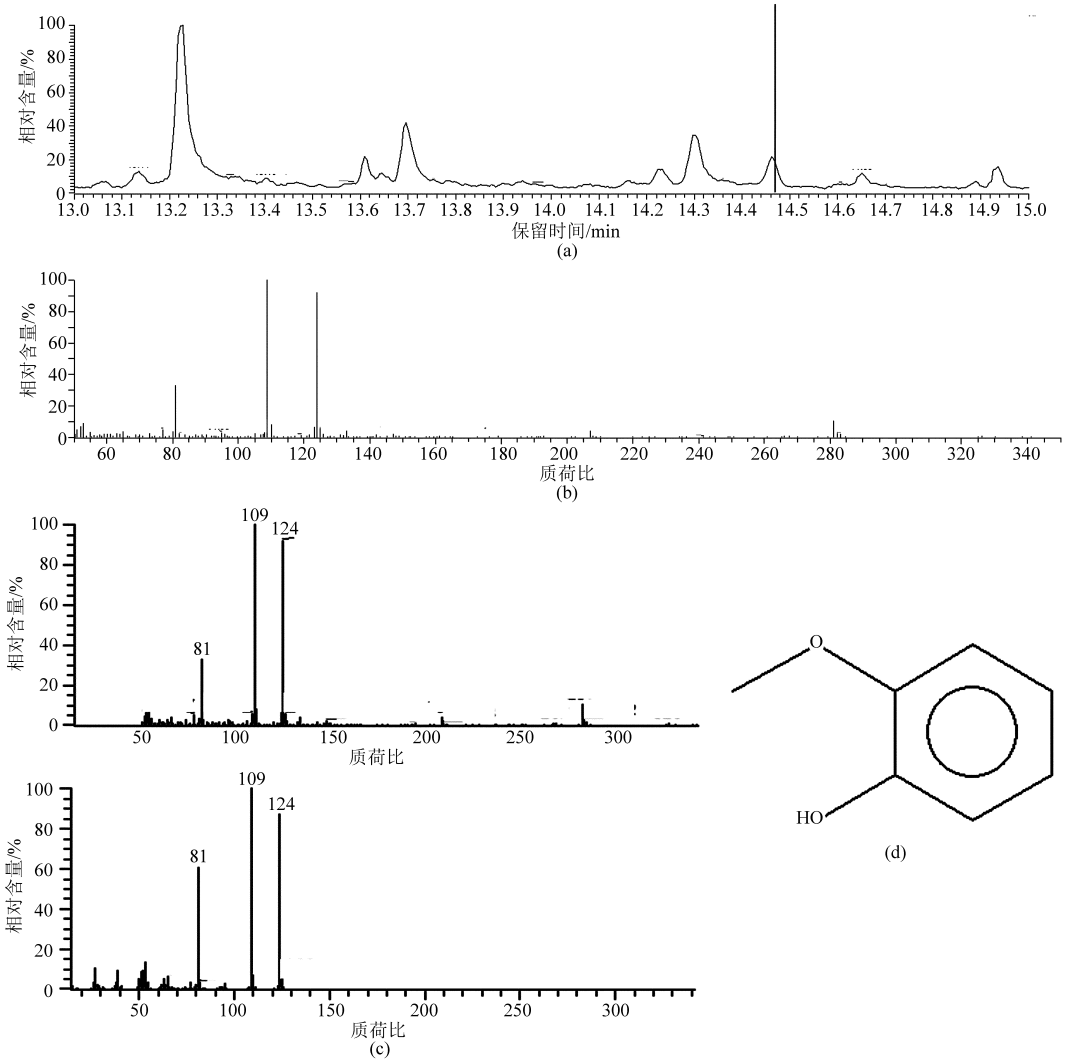

图 1　菌株 C－ZJB－12－69 产污染物的气质联用检测结果

Fig. 1　Contaminants production of strain C－ZJB－12－69 through GC－MS

（a）菌株 C－ZJB－12－69 的色谱图　（b）该色谱图 14.46 min 截取的质谱图　（c）该质谱图（上）与在 NIST 里的检索分数最高的物质的质谱图（下）的比较　（d）NIST 给出的该检索分数最高的物质的结构图

标准液和所有菌株的色谱图愈创木酚特征保留时间相对峰面积以及根据标准液拟合的标准曲线计算的愈创木酚浓度见表 1。从中可见，各个菌株的愈创木酚产量在 10.56 μg/L（C－ZJB－12－49）和 34.74 μg/L（C－ZJB－12－69）之间。*A. herbarius* 和 *A. cycloheptanicus* 的 5 株菌产量高于 *A. acidoterrestris* 和 *A. contaminans* 的 5 株菌，这与文献[11]一致，表明在这种实验条件下愈创木酚产量与菌株种类有一定关系。很多报道，如 Pettipher[20] 的研究证明苹果汁中愈创木酚的感官检测阈值在 2 μg/L左右，虽然在猕猴桃汁中的感官检测阈值还未见报道，但本次实验结果证明，陕西猕猴桃生产线中潜在的嗜酸耐热菌具有引起猕猴桃产品的污染并产生足够引起消费者不快浓度污染物的潜在风险。

2.2　待测菌株抗热性评测结果

菌株 DSM3923 芽孢的热死亡曲线见图 2，其他菌株芽孢的热死亡曲线与之类似。通过热死亡曲线计算的各个菌株芽孢在不同温度下的 *D* 值以及由 *D* 值计算的 *z* 值见表 2。从中可见，在猕猴桃汁中测得的 *D* 值和 *z* 值均高于同样条件下在 BAM 培养基中测得的数据，这与果汁成分（如可溶性固形物）对芽孢有一定保护作用有关。从文献看，嗜酸耐热菌的 *D* 值和 *z* 值在不同研究中由于实验条件（如培养基等）不同即使相同菌种也存在很大差别，如对绝大

表 1 待测菌株产愈创木酚及标准液的色谱图峰面积和相应质量浓度

Tab. 1 Peak areas and corresponding concentrations of guaiacol of tested strains and standard solution

样品		起止保留时间/min	相对峰面积	愈创木酚质量浓度/(μg·L^{-1})
愈创木酚标准溶液质量浓度/(μg·L^{-1})	2.5	14.44 ~ 14.50	68 532.9	2.50
	5.0	14.44 ~ 14.50	141 923.3	5.00
	7.5	14.44 ~ 14.50	176 064.0	7.50
	10.0	14.44 ~ 14.50	233 466.9	10.00
	20.0	14.44 ~ 14.50	477 118.2	20.00
待测菌株	DSM 3923	14.44 ~ 14.50	418 226.2	17.63
	C - ZJB - 12 - 01	14.44 ~ 14.50	458 171.8	19.36
	C - ZJB - 12 - 12	14.44 ~ 14.50	402 550.1	16.95
	DSM 17975	14.44 ~ 14.50	295 486.4	12.30
	C - ZJB - 12 - 49	14.44 ~ 14.50	255 437.7	10.56
	DSM 13609	14.44 ~ 14.50	638 795.3	27.20
	C - ZJB - 12 - 48	14.44 ~ 14.50	700 231.8	29.87
	C - ZJB - 12 - 58	14.44 ~ 14.50	665 013.4	28.34
	DSM 4006	14.44 ~ 14.50	771 335.6	32.96
	C - ZJB - 12 - 69[11]	14.44 ~ 14.50	812 313.79	34.74

多数文献研究的酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. Acidoterrestris*),在 Eiroa 等的报道中其 $D_{90℃}$ 和 z 值在橙汁中分别为 10.0 ~ 20.6 min 和 7.2 ~ 11.3℃[21];在 Silva 等的报道中其 $D_{91℃}$ 值在不同的 pH 值和可溶性固形物含量的 MEB 培养基中为 4.35 ~ 25.3 min[22];在 Ceviz 等的报道中其 $D_{90℃}$ 和 z 值在不同 pH 值和可溶性固形物含量的苹果汁、橙汁、MEB 培养基中分别为 32.8 ~ 52.9 min、10.9 ~ 16.4℃,30.9 ~ 36.5 min、9.4 ~ 11.4℃,20.7 ~ 33.0 min、9.8 ~ 12.8℃[16]。本研究中,3 株酸土菌株 $D_{90℃}$ 和 z 值在 BAM 和猕猴桃汁中分别为 24.4 ~ 32.3 min、9.41 ~ 10.45℃和 28.8 ~ 34.2 min、12.25 ~ 12.56℃。Smit 等给出 *A. acidoterrestris* 的 $D_{90℃}$ 值在不同果汁产品中为 5.95 ~ 23.10 min,z 值在不同果汁产品和不同的培养基中分别为 6.90 ~ 21.27℃和 5.90 ~ 10.00℃[23]。与之相比,在本次实验条件下 3 株酸土菌株显示出更高的抗热性。其他 3 个种的嗜酸耐热菌抗热性数据因为极少文献报道,所以无法进行比较。仅从本次实验结果看,其抗热性均与 3 株酸土菌株相似且稍低,尤其 *A. cycloheptanicus* 的两株菌,但较文献[16,21 - 22]中 *A. acidoterrestris* 的抗热性略高。

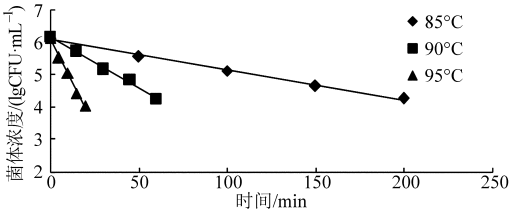

图 2 菌株 DSM 3923 芽孢热死亡曲线

Fig. 2 Thermal death curve of strain DSM 3923

2.3 待测菌株碳源谱分析结果

菌株 DSM 13609 和 DSM 3923 的 API 实验结果照片见图 3,其他菌株的结果与之类似。所有 6 株分离菌和 4 株标准菌的 API 测试结果以及来自参考

表 2 待测菌株芽孢抗热性实验结果

Tab. 2 Experimental results of heat resistance of tested strains

菌株	BAM 培养基				猕猴桃汁			
	$D_{85℃}$/min	$D_{90℃}$/min	$D_{95℃}$/min	z/℃	$D_{85℃}$/min	$D_{90℃}$/min	$D_{95℃}$/min	z/℃
DSM 3923	108.7	32.3	9.4	9.41	123.1	31.1	19.7	12.56
C - ZJB - 12 - 01	98.2	24.4	9.8	10.00	117.0	28.8	21.3	12.51
C - ZJB - 12 - 12	105.9	28.2	11.7	10.45	125.5	34.2	19.2	12.25
DSM 17975	98.6	25.7	9.6	9.89	107.8	28.5	18.7	12.14
C - ZJB - 12 - 49	100.4	26.0	10.2	10.07	111.2	30.4	20.3	13.51
DSM 13609	101.5	27.1	10.8	10.28	118.7	32.6	20.3	13.04
C - ZJB - 12 - 48	98.0	25.4	11.2	10.62	109.2	28.3	19.4	13.34
C - ZJB - 12 - 58	97.4	26.0	9.7	9.98	110.4	27.1	18.7	12.97
DSM 4006	95.7	24.8	8.8	9.64	98.6	28.3	17.9	13.50
C - ZJB - 12 - 69	94.8	23.6	8.3	9.45	98.2	28.9	18.2	13.66

文献的对照数据总结于表 3 中。从中可见，多数分离菌和所有标准菌与文献的对照数据约有 10 个反应结果不同，与文献[24]对苹果汁中分离的嗜酸耐热菌的 API 检测结果类似，显示出它们对碳源要求的差异性。对于 DSM 3923，除了实验序号 20、34、40 反应来自 Goto 等[25]和 Matsubara 等[26]的结果不同外，其余结果本次使用的 DSM 3923 共与参考数据有 12 项反应不同，其中实验序号 10、19、29、39 文献报道为阳性，本次实验为阴性；35、49 项反应文献报道为阴性，本次实验结果为阳性；实验序号 1、2、5、6、15、24 反应文献报道为阳性，本次实验结果为弱阳性。总的来看，DSM 3923 的实验结果与文献报道相吻合，文献报道为阳性而实验结果为阴性或弱阳性的情况（共 10 项反应）可能是由于长期保藏使菌株染色体某些区域受损，致使利用某些碳源的能力丧失或下降所致。也可能是菌株活化不够，某些酶系活力没有表达出来。实验序号 35、49 则可能是由于菌株基因在保藏和传代中发生了突变所致。

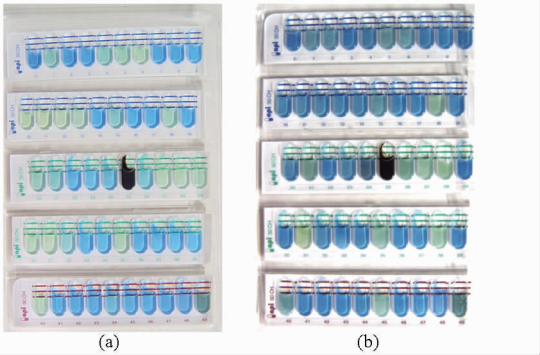

图 3　某些菌株的 API 实验结果

Fig. 3　API test result of some strains

（a）DSM 13609　（b）DSM 3923

分离菌 C－ZJB－12－01 与文献报道共有 15 项反应结果不同，分别是实验序号 10、15、19、21、24、26、27、28、29、31、38、39（文献为阳性，实验结果为阴性）；实验序号 49 文献为阴性，实验结果为弱阳性；实验序号 1、6 文献为阳性，本次实验结果为弱阳性。总的来看，菌株 C－ZJB－12－01 与文献报道结果相比，有多种糖醇或其他碳源不能利用，这体现出两者遗传结构上有一定差异，也可能与该菌株保藏中活力下降有关。另外，与本次实验的标准菌反应结果对比，也有 17 项反应不同。与之类似，另一株 *A. acidoterrestris* 分离菌 C－ZJB－12－12 与文献报道共有 14 项反应结果不同，与本次实验的标准菌共有 17 项反应结果不同。若干项弱阳性结果的存在增加了结果不同反应的总数，虽然弱阳性的判读一定程度上受主观因素和实验条件影响，但是这几株菌之间的遗传差异还是存在的，且较胡贻椿[24]的结果差异更大。与采用常规的生理生化检测进行鉴定相比[27]，API 方法还是有很大优势的。

DSM 17975 与 Goto 等[30]的报道共有 18 项反应结果不同，包括若干项文献为弱阳性的结果。C－ZJB－12－49 与 Goto 等[28]的结果有 19 项不同，与本次实验标准菌有 13 项不同。弱阳性的存在增加了不同结果的数目，不论是在文献报道结果中还是在本次实验结果中。DSM 13609 与报道结果较接近，仅有 10 项结果不同，其中还包括 4 项为弱阳性。C－ZJB－12－48 与报道有 17 项结果不同，与本次实验标准菌株有 16 项结果不同。C－ZJB－12－58 与报道有 22 项结果不同，与本次实验标准菌株有 19 项结果不同，是本次实验中与文献报道和标准菌株均差异最大的一株菌。DSM 4006 与报道仅有 6 项结果不同，是本次实验与文献报道结果最接近的菌株。C－ZJB－12－69 与报道也仅有 7 项结果不同，与本次实验标准菌株仅有 L-阿拉伯糖（实验序号 4）、L-木糖（实验序号 7）、葡萄糖酸钾（实验序号 47）3 项结果不同。

总的来看，API 实验结果显示分离菌不论与标准菌还是以前的文献报道均存在一定的差异，体现出本次分离自陕西猕猴桃生产线的嗜酸耐热菌存在一定的生物多样性，具有进一步研究的价值，例如从中寻找耐热酶，探索其嗜酸耐热及产污染物机理等。

2.4　待测菌株基因组 DNA 杂交结果

菌株 DSM 3923 与 C－ZJB－12－01 的复性实验结果见表 4，其中 A_{260} 是分光光度计自动记录的数据，修正后 A_{260} 是根据实验检测的比色杯中液体量的减少修正后的数据，在拟合线性方程计算复性速率时采用后者，见图 4（原始的复性曲线和拟合的线性方程）。其他杂交实验数据处理过程与之类似。所有分离菌与其对应标准菌的复性速率和杂交率汇总于表 5 中。从表 5 中可见，有些实验结果杂交率超过 100%，根据 Ley 等[18]和 Huss 等[19]的讨论，这是以复性速率法测杂交率可能出现的误差。有关嗜酸耐热菌杂交率还未见报道，且 NCBI 中关于 *Alicyclobacillus* 属菌种的全基因组序列也仅有酸热脂环酸芽孢杆菌（*A. acidocaldarius*）的几株菌，缺乏足够的数据进行参考和对比。但是从本次实验结果看，大多数分离菌与其相应的标准菌同源性均较高，相似度最高的是 C－ZJB－12－69，但 C－ZJB－12－58 与其标准菌 DSM 13609 相似度较低，但遗传距离还在一个种内，没有达到亚种水平（0～70%）。这一结果与 API 碳源谱实验基本吻合，证明在这批采自陕西猕猴桃生产线的嗜酸耐热菌具有一定的遗传多

表 3 待测菌株碳源谱分析结果

Tab. 3 Analysis of carbon source spectrum of tested strains

实验序号	碳源反应项目	DSM 3923		C－ZJB－12－01	C－ZJB－12－12	DSM 17975		C－ZJB－12－49	DSM 13609		C－ZJB－12－48	C－ZJB－12－58	DSM 4006		C－ZJB－12－69
0	对照	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
1	甘油	＋	w	w	＋	＋	＋	＋	＋	＋	w	＋	－	－	－
2	赤藓醇	＋	w	＋	－	－	＋	＋	－	－	－	＋	－	－	－
3	D-阿拉伯糖	－	－	－	－	－	w	－		－	w	－		－	－
4	L-阿拉伯糖		－	w	－	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	＋	w	－
5	D-核糖	＋	w	＋	＋		＋	＋		＋	w	w		＋	＋
6	D-木糖	＋	w	w	w	＋	＋	－	＋	＋	＋	w	＋	－	－
7	L-木糖	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	＋	＋	－
8	阿东醇		－	－	－		－	－	－	－	－	－	＋	－	－
9	β-甲基-D-木糖甙		－	－	－	－	－	－	－	－	w	－	－	－	－
10	D-半乳糖	＋	－	－	－	＋	＋	－	＋	＋	w	＋	－	－	－
11	D-葡萄糖		－	－	－		＋	w		＋	w	w		－	－
12	D-果糖		－	＋	－		＋	＋		＋	w	w		－	－
13	D-甘露糖		－	－	－		＋	w		＋	＋	－		－	－
14	L-山梨糖	－	－	－	＋	w	－	－	－	－	－	－	＋	－	－
15	L-鼠李糖	＋	w	－	＋	w	＋	＋	＋	w	w	－	＋	＋	＋
16	半乳糖醇		－	－	－		－	－		－	－	－		－	－
17	肌醇	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
18	D-甘露醇	＋	＋	＋	－	＋	－	－	＋	＋	＋	w	＋	＋	＋
19	D-山梨醇	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－
20	α-甲基-D-吡喃甘露糖甙	－ ＋	－	－	－	－	w	－	＋	＋	－	－	－	－	－
21	α-甲基-D-吡喃葡萄糖甙	＋	＋	－	－	－	＋	＋	＋	w	－	－	－	－	－
22	N-乙酰-葡糖胺		－	－	－		－	－		－	－	－		－	－
23	苦杏仁甙	－	－	－	－	－	w	w	＋	－	－	－	－	－	－
24	熊果甙	＋	w	－	w	＋	－	w	＋	－	w	－	－	－	－
25	七叶灵	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
26	水杨苷	＋	＋	－	－	w	w	w	＋	－	－	－	－	－	－
27	D-纤维二糖	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－
28	D-麦芽糖	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－
29	D-乳糖	＋	－	－	－	w	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
30	D-蜜二糖	－	－	－	－	－	w	＋	＋	＋	w	－	－	－	－
31	D-蔗糖	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－
32	D-海藻糖	－	－	＋	－	＋	＋	＋	＋	w	＋	w	－	－	－
33	菊糖		－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
34	D-松叁糖	－ ＋	－	－	－	－	－	w	＋	－	－	－	－	－	－
35	D-棉子糖	－	＋	－	－	－	＋	＋	＋	＋	w	－	－	－	－
36	淀粉	－	－	－		－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
37	肝糖	－	－	－		－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
38	木糖醇	＋	＋	－	＋	－	＋	w	－	－	w	＋	－	－	－
39	龙胆二糖	＋	－	－	－	w	＋	w	＋	－	－	－	－	－	－
40	D-松二糖	－ ＋	＋	－	－	－	w	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－
41	D-来苏糖	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－
42	D-塔格糖	－	－	－	－	w	－	－	－	－	－	－	＋	＋	＋
43	D-岩藻糖	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－
44	L-岩藻糖		－	－	－	－	w	w	－	w	＋	－	－	－	－
45	D-阿拉伯糖醇		＋	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－
46	L-阿拉伯糖醇		－	－	－		－	－		－	－	－		－	－
47	葡萄糖酸钾		－	－	－		－	－		－	－	－		－	＋
48	2-酮基葡糖糖酸钾		－	－	－		－	－		－	－	－		－	－
49	5-酮基葡糖糖酸钾	－	＋	w	w	－	w	w	＋	＋	w	＋	＋	＋	＋

注：“＋”为阳性，“－”为阴性，w 表示弱阳性。4 个标准菌下第 1 列数据均来自文献，DSM 3923 下第 1 列数据来自 Goto 等[25] 和 Matsubara 等[26] 的报道，其中第 20、34、40 项反应二人报道结果不同，前为 Goto 等的报道，后为 Matsubara 等的报道。另外 3 个标准菌数据均来自 Goto 等[28] 的另一篇报道。

表 4　菌株 DSM 3923 与 C－ZJB－12－01 的复性实验结果

Tab. 4　Test results of renaturation rates of DSM 3923 and C－ZJB－12－01

时间/min	体积/μL	DSM 3923		C－ZJB－12－01		混合液	
		A_{260}	修正后 A_{260}	A_{260}	修正后 A_{260}	A_{260}	修正后 A_{260}
16.000 000	260.0	1.813 810	1.571 969	1.887 69	1.635 998	1.876 01	1.625 875
16.333 333	259.7	1.810 590	1.567 367	1.886 91	1.633 435	1.879 02	1.626 605
16.666 666	259.4	1.810 970	1.565 885	1.887 65	1.632 188	1.878 45	1.624 233
17.000 000	259.1	1.813 330	1.566 113	1.890 58	1.632 831	1.873 49	1.618 071
17.333 333	258.8	1.815 050	1.565 783	1.890 25	1.630 656	1.872 76	1.615 568
17.666 666	258.5	1.817 030	1.565 674	1.889 58	1.628 188	1.876 68	1.617 073
18.000 000	258.2	1.817 690	1.564 425	1.886 75	1.623 863	1.872 69	1.611 762
18.333 333	257.9	1.813 270	1.558 808	1.888 52	1.623 498	1.874 31	1.611 282
18.666 666	257.6	1.813 750	1.557 407	1.887 46	1.620 699	1.874 81	1.609 837
19.000 000	257.3	1.814 800	1.556 493	1.883 27	1.615 218	1.874 31	1.607 533
19.333 333	257.0	1.811 550	1.551 895	1.880 31	1.610 799	1.873 97	1.605 368
19.666 666	256.7	1.810 930	1.549 552	1.879 55	1.608 268	1.873 8	1.603 348
20.000 000	256.4	1.810 530	1.547 400	1.879 17	1.606 064	1.873 6	1.601 303
20.333 333	256.1	1.811 590	1.546 494	1.878 15	1.603 314	1.873 09	1.598 994
20.666 666	255.8	1.811 680	1.544 759	1.878 45	1.601 692	1.874 17	1.598 042
21.000 000	255.5	1.810 520	1.541 960	1.877 25	1.598 791	1.873 66	1.595 734
21.333 333	255.2	1.810 680	1.540 285	1.878 06	1.597 603	1.874 71	1.594 753
21.666 666	254.9	1.811 050	1.538 789	1.876 94	1.594 773	1.874 69	1.592 862
22.000 000	254.6	1.810 490	1.536 503	1.876 46	1.592 489	1.873 26	1.589 773
22.333 333	254.3	1.811 630	1.535 658	1.874 99	1.589 367	1.871 68	1.586 561
22.666 666	254.0	1.811 890	1.534 067	1.878 84	1.590 751	1.872 72	1.585 57
23.000 000	253.7	1.812 450	1.532 729	1.874 47	1.585 177	1.872 48	1.583 494
23.333 333	253.4	1.813 180	1.531 533	1.874 34	1.583 193	1.873 56	1.582 534
23.666 666	253.1	1.812 050	1.528 766	1.874 10	1.581 116	1.872 26	1.579 563
24.000 000	252.8	1.814 760	1.529 238	1.874 30	1.579 410	1.871 97	1.577 447
24.333 333	252.5	1.814 890	1.527 532	1.874 00	1.577 283	1.872 47	1.575 996
24.666 666	252.2	1.815 570	1.526 289	1.874 87	1.576 141	1.871 62	1.573 409
25.000 000	251.9	1.817 120	1.525 775	1.877 68	1.576 625	1.870 75	1.570 806
25.333 333	251.6	1.817 350	1.524 151	1.881 21	1.577 708	1.872 09	1.570 059
25.666 666	251.3	1.816 150	1.521 328	1.878 95	1.573 934	1.872 26	1.568 33
26.000 000	251.0	1.817 120	1.520 324	1.878 05	1.571 302	1.875 04	1.568 783

注：初始反应体积为 300 μL，修正后 A_{260} 为实际 A_{260} 与反应结束体积与初始反应体积之比的乘积；混合液指两株菌的 DNA 样品各取150 μL 等量混合并摇匀后的复性实验结果。

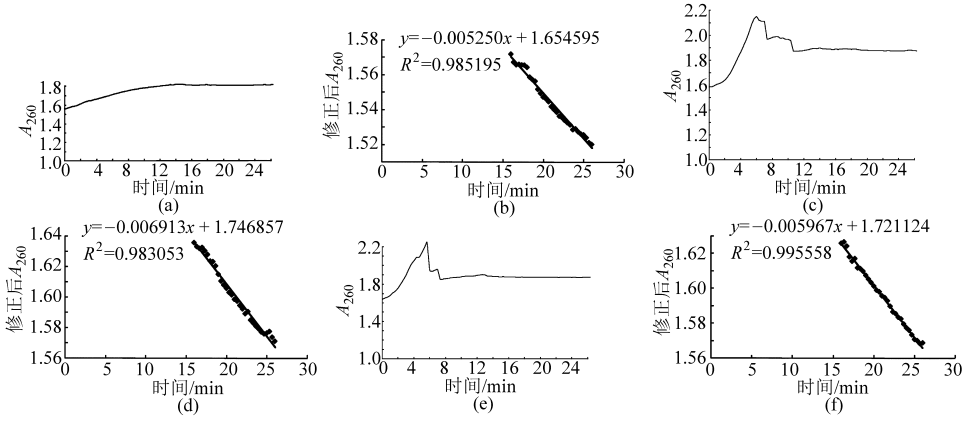

图 4　菌株 DSM 3923 与 C－ZJB－12－01 杂交实验复性曲线和拟合方程

Fig. 4　Renaturation curves and fitting equations of DSM 3923 and C－ZJB－12－01

（a）DSM 3923 复性曲线　（b）DSM 3923 复性速率拟合结果　（c）C－ZJB－12－01 复性曲线　（d）C－ZJB－12－01 复性速率拟合结果　（e）混合液复性曲线　（f）混合液复性速率拟合结果

表 5 分离菌与其对应标准菌的复性速率和杂交率

Tab. 5 Renaturation rates and hybridizations between isolates and their corresponding standard strains

组别	菌株	复性速率	杂交率/%
1	DSM 3923	0.005 2	99.33
	C-ZJB-12-01	0.006 9	
	混合液	0.006 0	
2	DSM 3923	0.004 9	101.23
	C-ZJB-12-12	0.006 7	
	混合液	0.005 8	
3	DSM 17975	0.005 8	93.20
	C-ZJB-12-49	0.004 2	
	混合液	0.004 8	
4	DSM 13609	0.007 4	100.39
	C-ZJB-12-48	0.006 2	
	混合液	0.006 8	
5	DSM 13609	0.006 7	74.75
	C-ZJB-12-58	0.005 9	
	混合液	0.005 5	
6	DSM 4006	0.004 7	104.79
	C-ZJB-12-69	0.004 1	
	混合液	0.004 5	

样性,其中某些菌株与标准菌株有较大遗传差异。

3 结论

(1)6 株分离菌经过在猕猴桃汁中 21 d 的培养,没有检测到产污染物 2,6-二氯苯酚和 2,6-二溴苯酚,但均具有产污染物愈创木酚的能力,产量在 10.56 ~ 34.74 μg/L 之间,明显高于通常意义的愈创木酚在果汁中的感官检测阈值,证明这些分离自陕西猕猴桃产品产业生产链的嗜酸耐热菌具有污染果汁产品或其他终端产品的潜在风险。

(2)6 株分离菌芽孢均具有一定的抗热性,在 BAM 培养基中的 $D_{90℃}$ 值在 23.6 ~ 32.3 min 之间,z 值在 9.41 ~ 10.62℃之间;在猕猴桃汁中 $D_{90℃}$ 值在 27.1 ~ 34.2 min 之间,z 值在 12.14 ~ 13.66℃之间。其中 3 株酸土脂环酸芽孢杆菌抗热性较文献报道高,而另外 3 个种的分离菌抗热性较之稍低,但也高于文献报道中酸土脂环酸芽孢杆菌。

(3)与各标准菌的文献报道相比,6 株分离菌的 API 实验显示 7 ~ 22 项不同结果,而与本次实验使用的标准菌相比,有 3 ~ 19 项结果不同。其中与标准菌最接近的是 C-ZJB-12-69,而与标准菌差异最大的是 C-ZJB-12-58,这与杂交率实验结果一致。6 株分离菌与标准菌 DNA 杂交率在74.75% ~ 104.79% 之间。这些结果显示分离菌株存在着一定的生物多样性,这在一方面是一种潜在的微生物资源,如寻找有应用潜力的耐热酶,而另一方面,也增加了这种污染菌的控制难度,因为有可能有新种类的污染物产生,或是对某些常用控制这种菌的化学杀菌剂出现抗性。这些都使对分离菌进行进一步研究成为非常必要的工作。

参 考 文 献

1 Silva F V M, Gibbs P. Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44(5):353-360.

2 Steyn C E, Cameron M, Witthuhn R C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment — a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(1):1-11.

3 Uchino F, Doi S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31(7): 817-822.

4 Cerny G, Hennlich W, Poralla K. Spoilage of fruit juice by *bacilli*: isolation and characterisation of the spoiling microorganism [J]. Zeitschrift feur Lebensmittel Untersuchung und Forsuchung, 1984, 179(3):224-227.

5 Wisotzkey J D, Jurtshuk P, Fox G E, et al. Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus. *Alicyclobacillus* gen. nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(2):263-269.

6 Splittstoesser D F, Churey J J, Lee C Y. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices [J]. Journal of Food Protection, 1994, 57(12):1080-1083.

7 Walls I, Chuyate R. *Alicyclobacillus*-historical perspective and preliminary characterization study [J]. Dairy Food and Environmental Sanitation, 1998, 18(8):499-503.

8 Walker M, Phillips C A. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2008, 43(2):250-260.

9 Glaeser S P, Falsen E, Martin K, et al. *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(10):3623-3627.

10 Kannenberg E, Blume A, Poralla K. Properties of ω-cyclohexane fatty acids in membranes [J]. FEBS Letters, 1984, 172(2): 331-334.

11 Zhang J B, Yue T L, Yuan Y H. *Alicyclobacillus* contamination in the production line of kiwi products in China [J]. PLOS One, 2013, 8(7):e67704.

12 蔡福带. 苹果浓缩汁生产中耐热菌的分离鉴定及控制技术研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.

13 Doerge D R, Divi R L, Churchwell M I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases [J]. Analytical Biochemistry, 1997, 250(1):10 – 17.

14 岳田利,耿玉丽,袁亚宏,等. 陕西省果库中嗜酸耐热菌的分离鉴定[J]. 农业机械学报,2013,44(7):187 – 193.
Yue T L, Geng Y L, Yuan Y H, et al. Isolation and identification of *Alicyclobacillus* from Shaanxi apple libraries [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(7): 187 – 193. (in Chinese)

15 Silva F M, Gibbs P, Vieira M C, et al. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 51(2): 95 – 103.

16 Ceviz G, Tulek Y, Con A H. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44(9): 1770 – 1777.

17 Albuquerque L, Rainey F A, Chung A P, et al. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(2): 451 – 457.

18 Ley J D, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates [J]. European Journal of Biochemistry, 1970, 12(1): 133 – 142.

19 Huss V A R, Festl H, Schleifer K H. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1983, 4(2): 184 – 192.

20 Pettipher G L, Osmundson M E, Murphy J M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 24(3): 185 – 189.

21 Eiroa M N U, Junqueira V C A, Schmidt F L. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores [J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(8): 883 – 886.

22 Silva F M, Gibbs P, Vieira M C, et al. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 51(2): 95 – 103.

23 Smit Y, Cameron M, Venter P, et al. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation—a review [J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 331 – 349.

24 胡贻椿. 浓缩苹果汁生产过程中嗜酸耐热菌的分离鉴定及超声波杀灭作用研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.

25 Goto K, Matsubara H, Mochida K, et al. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing omega-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(1): 109 – 113.

26 Matsubara H, Goto K, Matsumura T, et al. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(5): 1681 – 1685.

27 叶萌祺,袁亚宏,岳田利,等. 产香酵母分离鉴定与苹果酒发酵中的应用[J]. 农业机械学报, 2013, 44(12): 187 – 192.
Ye M Q, Yuan Y H, Yue T L, et al. Isolation and identification of aroma-producing yeasts and its application in cider fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(12): 187 – 192. (in Chinese)

28 Goto K, Mochida K, Kato Y, et al. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(6): 1276 – 1285.

(上接第 212 页)

12 Shuo Peng, Alan F, Wirtz R A. Polymeric phase change composites for thermal energy storage[J]. Polymer Engineering and Science, 2003, 93(3): 1240 – 1251.

13 高凯,阎瑞香,董爱平,等. 果蔬运输保鲜蓄冷剂的研制[J]. 保鲜与加工,2010,10(6):20 – 23.
Gao Kai, Yan Ruixiang, Dong Aiping, et al. Study on coolant of fruits and vegetables during storage and transportation[J]. Storage & Process, 2010, 10(6):20 – 23. (in Chinese)

14 潘欣. 食品相变蓄冷剂的研制[D]. 杭州:浙江大学,2005.
Pan Xin. Development of CTESM as temperature regulator in food storage[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005. (in Chinese)

15 康红梅,谢建军,刘洋. 聚丙烯酸系高吸水树脂合成和吸液性能研究[J]. 精细化工中间体,2004,34(2):56 – 58.
Kang Hongmei, Xie Jianjun, Liu Yang. Study on polymerization and absorbency of acrylic-based polymer[J]. Fine Chemical Intermediates,2004, 34(2):56 – 58. (in Chinese)

16 高斯. 保温包装中蓄冷剂的研制[D]. 无锡:江南大学,2012.
Gao Si. Research on cold storage agent for insulation packaging[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012. (in Chinese)