

陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定*

王虎玄 岳田利 胡仲秋 牛晨

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为研究引起苹果浓缩汁污染腐败的高渗酵母, 采用 YPD 高渗培养基对陕西苹果汁加工厂的苹果浓缩汁中的高渗酵母进行分离纯化, 并对分离菌株的耐糖能力进行了研究。对分离菌株菌落形态、细胞形态、生理生化特征进行了分析, 并以 26S rDNA 序列构建系统发育树, 确定了 7 株分离菌的遗传学位置。进一步研究了分离株在苹果浓缩汁中的生长情况。除一株分离菌为热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 外, 其余分离株均为鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*)。鲁氏接合酵母 (*Z. rouxii*) 能够在葡萄糖质量浓度为 900 g/L 的培养基中生长, 耐糖能力明显强于热带假丝酵母 (*C. tropicalis*), 并且鲁氏接合酵母 (*Z. rouxii*) 也能够在苹果浓缩汁中生长。结果表明: 鲁氏接合酵母 (*Z. rouxii*) 会对苹果浓缩汁质量造成威胁, 需要加强控制。

关键词: 苹果浓缩汁 高渗酵母 26S rDNA 鲁氏接合酵母

中图分类号: S182 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)04-0246-06

Identification of Osmotolerant Yeast in Apple Juice Concentrate from Shaanxi Province

Wang Huxuan Yue Tianli Hu Zhongqiu Niu Chen

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

Abstract: In order to study osmotolerant yeasts which are capable of causing spoilage for apple juice concentrate, the yeasts present in apple juice concentrate collected from apple juice processing plants in Shaanxi Province were isolated and purified by using osmotic YPD media. The sugar-tolerance of different yeast isolates was assayed. The colony morphology, cell morphology and physiological characteristics were studied and the phylogenetic tree based on 26S rDNA sequence analysis was constructed to determine the genetic location of isolates. Except the isolate N18 which was identified as strain of *Candida tropicalis*, all the other isolates belonged to *Zygosaccharomyces rouxii*. All the isolated strains of *Z. rouxii* were capable of growing in 900 g/L glucose and apple juice concentrate, displaying better sugar-tolerance ability and greater harm to the quality of apple juice concentrate than isolate of *C. tropicalis* which showed sugar-tolerance of 750 g/L glucose and no visible growth in apple juice concentrate. The results suggested that strains of *Z. rouxii* might pose a threat to the quality of apple juice concentrate, and it was needed to be controlled in the production line of apple juice concentrate.

Key words: Apple juice concentrate Osmotolerant yeasts 26S rDNA *Z. rouxii*

引言

一直以来关于高渗酵母污染浓缩水果汁时有报道^[1-7], 同时由于市售的水果汁都是用浓缩水果汁调配而来, 因此其也存在着被高渗酵母污染的风险。

高渗酵母至少能够在葡萄糖质量浓度为 500 g/L 环境下生长, 该菌可使果汁发酵变质, 引起腐败, 不但破坏外观, 也会降低产品的质量, 包括营养成分的破坏、pH 值、气味的改变等, 直接影响到产品的出口, 如果是包装的果汁则可能造成胀包, 严重的会引起

爆炸,威胁消费者的身心健康,也给生产企业造成巨大的损失^[8-9]。我国目前是世界上苹果生产大国,每年浓缩苹果汁大量出口,但因高渗酵母的污染导致产品出口下降。因此,对高渗酵母的研究刻不容缓,但是国内关于对浓缩苹果汁中高渗酵母分离鉴定研究的报道还较为少见。

本文对来源于陕西省苹果汁加工厂的苹果浓缩汁中高渗酵母进行分离纯化,对纯化后菌种进行耐糖性测定,并研究其生理生化特性,结合 26S rDNA 测序将菌株鉴定到种的水平,最后研究分离株在苹果浓缩汁中的生长情况,为苹果浓缩汁加工中耐高渗酵母的控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 分离样品与培养基

1.1.1 分离样品

苹果浓缩清汁,pH 值 3.5~4,可溶性固形物含量为 $(71 \pm 1)^\circ\text{Bx}$,分别从陕西省当地某果汁生产企业收集。

1.1.2 培养基

YPD 固体培养基:20 g 葡萄糖,20 g 蛋白胨,10 g 酵母浸粉,20 g 琼脂,1 L 蒸馏水。

YPD 液体培养基:20 g 葡萄糖,20 g 蛋白胨,10 g 酵母浸粉,1 L 蒸馏水。

30% YPD 液体培养基:300 g 葡萄糖,20 g 蛋白胨,10 g 酵母浸粉,补加蒸馏水至 1 L。

1.2 主要仪器与设备

UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);JA2003 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);CX31 型显微镜(奥林巴斯公司);PTC-200 型 PCR 仪(MJ Research 公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Dolphin-doc 型凝胶成像系统(美国 Wealtec 公司)。

1.3 高渗酵母分离与纯化

用无菌吸管吸取 10 mL 苹果浓缩清汁加入到含有 90 mL 无菌 30% YPD 液体培养基的三角瓶后置于 28℃,150 r/min 摇床培养 48 h 进行菌体富集。培养结束后用无菌 30% 葡萄糖水对培养液进行梯度稀释,选取合适的梯度稀释液后各取 200 μL 于 YPD 固体培养基上进行涂布,28℃ 培养 7 d。挑选具有典型酵母菌落特征的单菌落进一步划线分离纯化。纯化后的菌落在光学显微镜下观察其形态和纯度,确认无杂菌后转接到 YPD 斜面培养基上,于 28℃ 培养 2~3 d 后置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 耐糖性的测定

将 10 mL 无菌的葡萄糖质量浓度分别为 500、550、600、650、700、750、800、850 和 900 g/L 的 YPD 液体培养基置于试管中,将静置 12 h 培养的酵母种子液用血球计数板计数,适当稀释后将 100 μL 稀释液加入到上述培养中,置于 28℃ 静置培养 15 d。培养结束后对样品进行适当稀释后,测定其在 600 nm 下的吸光度。以接种后立即测得的样品吸光度作为对照。

1.5 菌落及细胞形态观察

菌种在 YPD 培养基平板上涂布接种,28℃ 培养 3 d 后进行菌落形态观察,并拍照。选取 24 h 内培养菌株的纯培养物,制成菌悬液,在光学显微镜下观察分离株的细胞形态。

1.6 生理生化鉴定

糖发酵、碳源同化、氮源同化及其他一些试验均参照文献[10]的方法进行。

1.7 分子鉴定

1.7.1 模板制备

取 24 h 培养的分 离株纯培养物 3 mL,按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型,美国 Omega 公司生产)说明书描述的方法提取 DNA。

1.7.2 26S rDNA PCP 扩增

采用引物 NL-1: 5'-GCATATCAATAAG-CGG-AGGAAAAG-3' 及 NL-4: 5'-GGTC-CGTGTT-TCAAGACGG-3'进行 PCR 扩增^[11]。引物由北京六合华大基因有限公司合成。

PCR 扩增体系:总体积 50 μL ,包括 10 μL 模板,1 μL 上游引物,1 μL 下游引物,0.2 μL Taq DNA 聚合酶,1 μL dNTP,1.8 μL MgCl_2 ,5 μL 10 \times PCR 缓冲液,2.5 μL DMSO,27.5 μL 灭菌蒸馏水。

PCR 反应程序:94℃/3 min(预变性);94℃/1 min 变性;58℃/1 min 退火;72℃/2 min 延伸,36 个循环,72℃/5 min 延伸^[12]。

用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳确认扩增的 DNA 片段。将检测后的 PCR 扩增产物寄送至深圳华大基因研究院进行测序。

1.8 序列比对及系统发育树构建

获得的序列与 GenBank 数据库中序列进行 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对,用 CLUSTAL-X^[13] 软件进行序列比对,并用软件 MEGA4^[14] 进行系统发育树构建。

1.9 苹果浓缩汁中生长能力测定

将 10 mL 苹果浓缩汁置于试管中,在 100℃ 下灭菌 30 min。将静置 12 h 培养的酵母种子液用血球计数板计数,适当稀释后将 100 μL 稀释液加入到无

菌苹果浓缩汁中,置于 28℃ 静置培养 1 个月。培养结束后用 30% 葡萄糖液对培养液进行梯度稀释,稀释液在 YPD 固体平板上进行涂布,于 28℃ 培养 3 ~ 5 d 进行菌落计数。以接种后立即测得的样品菌落数作为对照。

2 结果

2.1 高渗酵母的分离纯化及耐糖性测定

从苹果浓缩汁中分离高渗酵母,经纯化得到 6 株分离菌株。除菌株 N18 外,其余菌株具有相似的耐糖性,均可以在葡萄糖质量浓度为 700 ~ 900 g/L 的培养基中生长并且在质量浓度为 500 ~ 700 g/L 的范围内生长速率变化不大。随着葡萄糖质量浓度的进一步提高(大于 700 g/L),糖胁迫作用才体现出来,5 株分离菌的生长速率逐渐下降。菌株 N18 在质量浓度为 500 ~ 700 g/L 的范围内其生长速率随着糖浓度的增加受到明显抑制。当葡萄糖质量浓度为 750 g/L 时,其生长完全被抑制,表现出较差的耐糖性。由于除 N18 外其余 5 株菌的耐糖性比较相似,图 1 中只列出菌株 LA 和 N18 的耐糖曲线。

2.2 菌落形态及细胞形态观察

6 株分离菌在 YPD 培养基上培养 3 d 后其菌落形态均为白色或乳白色的圆形菌落。菌落表面光滑,湿润,边缘整齐,中心突起(图 2)。显微镜下观察菌株 N18 细胞为椭圆形,出芽生殖。而其他菌株细胞为近圆形,出芽生殖(图 3)。

2.3 生理生化鉴定

6 株酵母的生理生化结果见表 1。将这些结果

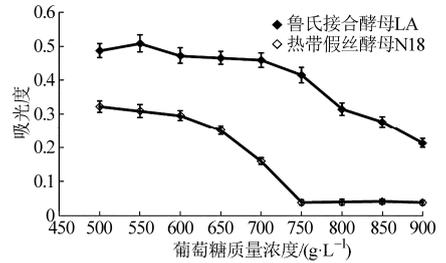


图 1 高渗酵母分离株在葡萄糖质量浓度为 500 ~ 900 g/L YPD 液体培养基中的生长状况

Fig. 1 Growth of osmotolerant isolates in YPD broth containing 500 ~ 900 g/L glucose

与文献[10]中酵母的生理生化结果进行比较,发现菌株 N18 与热带假丝酵母(*C. tropicalis*)的描述基本一致。其他菌株与鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)的描述基本一致。初步鉴定菌株 N18 为热带假丝酵母(*C. tropicalis*),其余 6 株分离株为鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)。

2.4 分子鉴定及系统进化树分析

利用 BLAST 工具与 GenBank 中的 26S rDNA 序列进行比对,比对结果如表 2 所示。运用 NJ 法(Neighbour-joining)构建系统进化树(图 4),确定了分离菌株的系统发育地位。

BLAST 及系统发育树结果表明,菌株 N18 与热带假丝酵母(*C. tropicalis*)的亲缘关系最近(100%)。其余菌株与鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)的亲缘关系最近(99%)。通过对比发现分子鉴定结果与生理生化鉴定结果一致。确定菌株 N18 是热带假丝酵母(*C. tropicalis*)。其余菌株均为鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)。

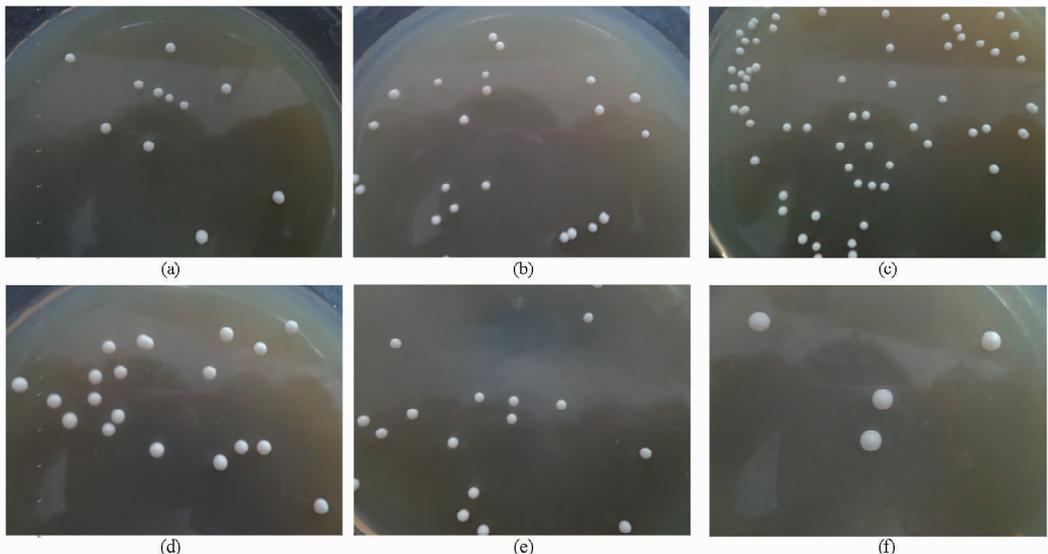


图 2 各高渗酵母分离株在 YPD 平板生长菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of each osmotolerant isolate on YPD plates

(a) 鲁氏接合酵母 LA (b) 鲁氏接合酵母 LB (c) 鲁氏接合酵母 QA
(d) 鲁氏接合酵母 QB (e) 鲁氏接合酵母 QC (f) 热带假丝酵母 N18

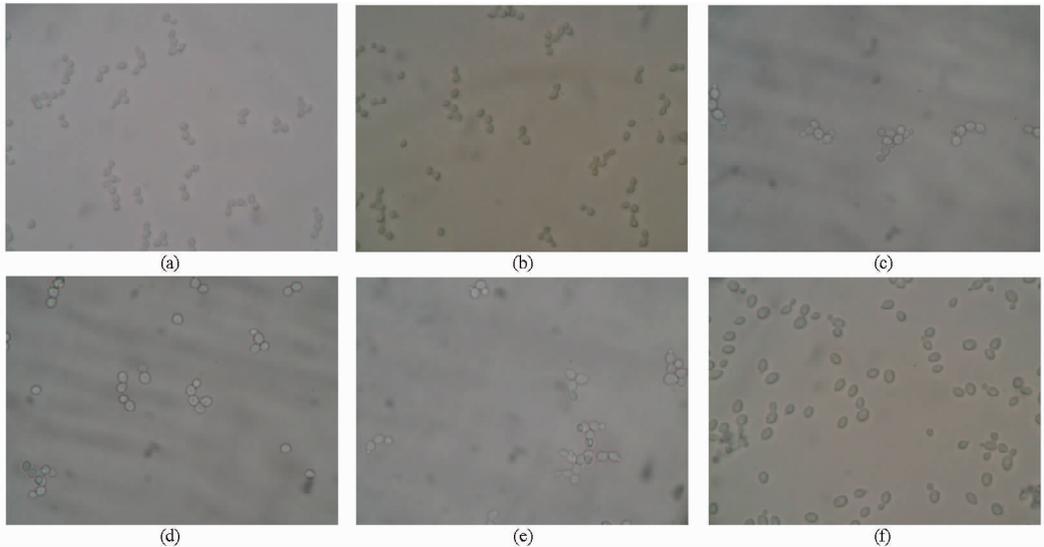


图 3 各高渗酵母分离株细胞形态

Fig.3 Cell morphology of each osmotolerant yeast isolate

(a) 鲁氏接合酵母 LA (b) 鲁氏接合酵母 LB (c) 鲁氏接合酵母 QA
 (d) 鲁氏接合酵母 QB (e) 鲁氏接合酵母 QC (f) 热带假丝酵母 N18

表 1 分离菌株的生理生化特征

Tab.1 Physiological and biochemical characteristics reaction of isolates

生理生化反应	分离菌株						生理生化反应	分离菌株								
	N18	LA	LB	QA	QB	QC		N18	LA	LB	QA	QB	QC			
糖发酵	葡萄糖	+	+	+	+	+	+	松三糖	-	-	-	-	-	-		
	D-半乳糖	+	-	-	-	-	-	甘油	+	-	-	+	+	+		
	麦芽糖	+	-	-	-	-	-	赤藓糖醇	-	-	-	-	-	-		
	蔗糖	-	+	+	+	+	+	木糖醇	+	-	-	-	-	-		
	纤维二糖	-	-	-	-	-	-	D-山梨醇	+	+	+	+	+	+		
	乳糖	-	-	-	-	-	-	D-甘露醇	+	+	+	+	+	+		
	棉籽糖	-	-	-	-	-	-	半乳糖醇	-	-	-	-	-	-		
	菊糖	-	-	-	-	-	-	肌醇	-	-	-	-	-	-		
	蜜二糖	-	-	-	-	-	-	碳氮源同化	DL-乳酸	W	-	-	-	-	-	
	可溶性淀粉	-	-	-	-	-	-		琥珀酸	+	-	-	-	-	-	
	碳氮源同化	D-半乳糖	+	+	+	+	+		+	柠檬酸	+	-	-	-	-	-
		L-山梨糖	+	+	+	+	+		+	甲醇	-	-	-	-	-	-
		D-葡萄糖胺	-	-	-	-	-		-	乙醇	+	+	+	+	+	+
D-核糖		W	-	-	-	-	-		硝酸盐	-	-	-	-	-	-	
D-木糖		+	-	-	-	-	-	乙胺	+	+	+	+	+	+		
L-阿拉伯糖		-	-	-	-	-	-	L-赖氨酸	+	+	+	+	+	+		
D-阿拉伯糖		-	-	-	-	-	-	37℃	+	+	+	+	+	+		
L-鼠李糖		-	-	-	-	-	-	45℃	-	-	-	-	-	-		
蔗糖		+	+	+	+	+	+	放线菌酮(0.1%)	+	-	-	-	-	-		
麦芽糖		+	+	+	+	+	+	放线菌酮(0.01%)	+	-	-	-	-	-		
纤维二糖		W	-	-	-	-	-	其他生理生化试验	葡萄糖(50%)	+	+	+	+	+	+	
乳糖		-	-	-	-	-	-		葡萄糖(60%)	-	+	+	+	+	+	
棉籽糖		-	-	-	-	-	-		尿素水解	-	-	-	-	-	-	
菊糖	-	-	-	-	-	-	醋酸产生		-	-	-	-	-	-		
可溶性淀粉	+	-	-	-	-	-	淀粉形成		-	-	-	-	-	-		
蜜二糖	-	-	-	-	-	-	重氮基兰 B		-	-	-	-	-	-		

注：“+”为阳性、“-”为阴性、“W”为弱阳性。

表2 分离菌株与 Genbank 参考菌株的比对结果

Tab.2 Blast results of isolates with reference strains from Genbank			
分离株	比对结果	同源率/%	参考菌株
N18	<i>C. tropicalis</i>	99.75	EU828790.1
LA	<i>Z. rouxii</i>	99.48	KC146373.1
LB	<i>Z. rouxii</i>	99.82	KC146373.1
QA	<i>Z. rouxii</i>	99.13	KC146373.1
QB	<i>Z. rouxii</i>	99.48	KC146373.1
QC	<i>Z. rouxii</i>	99.48	KC146373.1

2.5 分离株在苹果浓缩汁中生长情况

在28℃条件下,鲁氏接合酵母菌株(*Z. rouxii*)在苹果浓缩清汁中能够生长,其菌落数与接种量相比增加了3个数量级。培养结束后,其在浓缩汁表面形成一层由菌体构成的薄膜。而热带假丝酵母菌株(*C. tropicalis*)则不能够在苹果浓缩清汁中生长,其菌落数与接种量相比减少了两个数量级,表明苹果浓缩汁对其有抑制作用。培养结束后,浓缩汁表面没有薄膜形成。

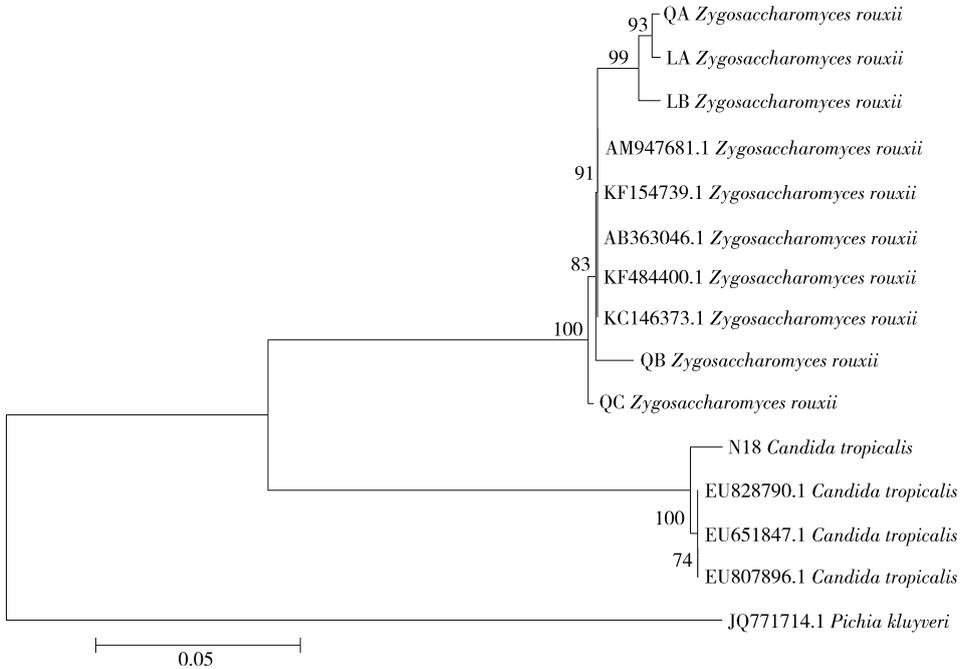


图4 浓缩苹果汁高渗酵母分离株 26S rDNA 序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of 26S rDNA sequences of osmotolerant yeasts from apple juice concentrate

3 讨论

(1)从陕西果汁加工厂苹果浓缩汁中分离得到6株高渗酵母,经过形态、生理生化及分子鉴定确定1株为热带假丝酵母(*C. tropicalis*),其余5株均为鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)。目前国内只有谢勇等及李国良做过苹果浓缩汁中高渗酵母的分离鉴定工作^[15-16]。他们各分离得到一株高渗酵母但并没有说明其种属信息。国外文献报道鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)是一种极端耐高渗酵母,能够引起各种水果浓缩汁腐败,与本文结果相一致^[6,7,17-18]。

(2)分离得到的1株热带假丝酵母(*C. tropicalis*)与其余5株鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)相比不仅耐糖性较差,而且无法在苹果浓缩汁中生存。因此推测热带假丝酵母分离株(*C. tropicalis*)并不是苹果浓缩汁的固有微生物,而是一种偶然性污染微生物,其

并不能对苹果浓缩汁构成污染腐败。

(3)目前国内关于苹果浓缩汁的微生物污染研究主要集中在嗜酸耐热菌^[19],涉及高渗酵母较少。一般来说,酵母对高温比较敏感,容易被杀死。因此,浓缩苹果汁较难被酵母污染。但是由于生产设备的某些死角灭菌不彻底,产品灌装时与生产车间空气接触以及包装材料的卫生指标较差等因素仍然能够使得高渗酵母进入到苹果浓缩汁中引起腐败。

4 结束语

对陕西当地生产的苹果浓缩汁中高渗酵母进行了分离鉴定,得到6株高渗酵母,1株为热带假丝酵母(*C. tropicalis*),其余5株均为鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)。结果表明高渗酵母在苹果浓缩汁中确有存在,对果汁质量造成威胁,需要加强控制。

参 考 文 献

- 1 Jermini M, Geiges O, Schmidt-Lorenz W. Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products [J]. Journal of Food Protection, 1987, 50: 468 - 472.
- 2 Deak T, Beuchat L. Yeasts associated with fruit juice concentrates[J]. Journal of Food Protection, 1993, 56(9): 777 - 782.
- 3 Thomas D. Yeasts as spoilage organisms in beverages[M]//Rose A, Harrison J. The yeasts. Vol. 5: yeast technology. 2nd ed. London: Academic Press, 1993: 517 - 561.
- 4 Tudor E A, Board R. Food-spoilage yeasts[M]//Rose A, Harrison J. The yeasts. Vol. 5: yeast technology. 2nd ed. London: Academic Press, 1993: 435 - 516.
- 5 Worobo R W, Splittstoesser D F. Microbiology of fruit products[M]//Barret D M, Somogyi L, Ramaswamy H. Processing fruit. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005: 161 - 284.
- 6 Combina M, Daguette C, Massera A, et al. Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(2): 192 - 197.
- 7 Rojo M, Arroyo López F, Lerena M, et al. Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions[J]. Food Microbiology, 2014, 38: 143 - 150.
- 8 Koh T Y. Studies on the 'osmophilic' yeast *Saccharomyces rouxii* and an obligate to osmophilic mutant[J]. Microbiology, 1975, 88(1): 101 - 114.
- 9 Steels H, James S, Roberts I, et al. *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(4): 520 - 527.
- 10 Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification[M]. London: Cambridge University Press, 1983.
- 11 Kurtzman C P, Robnett C J. Three new insect-associated species of the yeast genus *Candida* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(10): 965 - 973.
- 12 Baleiras-Couto M M, Gomes A S, Casal M, et al. Survey of yeast diversity during wine bottling processes using restriction analysis of 26S ribosomal DNA (rDNA)[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2012, 18(1): 39 - 42.
- 13 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL - X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876 - 4882.
- 14 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596 - 1599.
- 15 谢勇, 张建新, 余清谋. 浓缩苹果汁中耐高渗透压酵母菌的分离与培养条件优化研究[J]. 中国酿造, 2007, 26(4): 4 - 9.
Xie Yong, Zhang Jianxin, Yu Qingmou. Isolation of osmophilic yeasts from concentrated apple juice and optimization of their incubation conditions[J]. China Brewing, 2007, 26(4): 4 - 9. (in Chinese)
- 16 李国良. 浓缩苹果汁中耐高渗酵母的检测与控制技术[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
Li Guoliang. Control and detection technology of osmophilic yeast in apple juice concentrate [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)
- 17 Tokuoka K. Sugar-and salt-tolerant yeasts[J]. Journal of Applied Microbiology, 1993, 74(2): 101 - 110.
- 18 Deák T. Yeasts in specific types of foods[M]//Deák T. Handbook of food spoilage yeasts. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008: 117 - 201.
- 19 胡贻春, 岳田利, 袁亚宏, 等. 浓缩苹果汁车间空气中嗜酸耐热菌的分离鉴定研究[J]. 农产品加工·学刊, 2007(3): 11 - 13, 21.
Hu Yichun, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Research on thermoacidiphilic bacteria isolated from the air of AJC production workshop[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007(3): 11 - 13, 21. (in Chinese)

(上接第 276 页)

- 16 孙俊, 王艳, 金夏明, 等. 基于 MSCPSO 混合核 SVM 参数优化的生菜品质检测[J]. 农业机械学报, 2013, 44(9): 209 - 213.
Sun Jun, Wang Yan, Jin Xiaming, et al. Detection of lettuce quality based on parameters optimization of MSCPSO mixed kernel SVM[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(9): 209 - 213. (in Chinese)
- 17 李淼, 方德洲, 张建, 等. 一种基于支持向量机的模糊施肥预测方法研究[J]. 计算机应用与软件, 2009, 26(2): 50 - 52.
Li Miao, Fang Dezhou, Zhang Jian, et al. A new approach for fuzzy fertilization forecast based on support vector mechanism[J]. Computer Applications and Software, 2009, 26(2): 50 - 52. (in Chinese)
- 18 隋媛媛, 于海业, 张蕾, 等. 基于叶绿素荧光光谱分析的黄瓜霜霉病害预测模型[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(11): 2987 - 2990.
Sui Yuanyuan, Yu Haiye, Zhang Lei, et al. Cucumber downy mildew prediction model based on analysis of chlorophyll fluorescence spectrum[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(11): 2987 - 2990. (in Chinese)
- 19 于海业, 杨昊谕, 张蕾. 激光诱导式叶绿素荧光强度与激光强度关系[J]. 农业工程学报, 2009, 25(增刊2): 245 - 249.
Yu Haiye, Yang Haoyu, Zhang Lei. Relationship between laser-induced chlorophyll fluorescence intensity and laser power[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(Supp. 2): 245 - 249. (in Chinese)
- 20 Huang Cheng-lung, Wang Chieh-jen. A GA-based feature selection and parameters optimization for support vector machines[J]. Expert Systems with Applications-ESWA, 2006, 31(2): 231 - 240.