

# 界面发酵红曲霉的图像解析\*

赵树欣\*\* 陈 云 汤卫华 于德敏 贾士儒

(天津科技大学生化工程研究室 天津 300222)

**摘要:** 利用计算机视觉技术研究了红曲霉界面发酵过程中菌体形态变化与菌体生长的关系。在界面培养中通过检测前期菌落面积, 后期隆起部分的表征体积——基于颜色变化的生长点分布, 可以有效表示菌体生长状况。基于此建立了含有相应形态参数的动力学模型, 该模型与常规动力学模型具有相似的表达形式。

**关键词:** 形态, 界面发酵, 图像处理, 动力学模型

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0065-06

## Morphological Analysis of *Monascus* on Surface Fermentation

ZHAO Shu-Xin\*\* CHEN Yu TANG Wei-Huan YU De-Min JIA Shi-Ru

(Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

**Abstract:** The article involved in the morphology and the growth of *Monascus* on surface fermentation. The colony area of former period, and phenetic volume the distribution of growth on the basis of color of latter period reflect the mycelia activity. The kinetics model of morphological varies was established, which agree with the normal kinetics model.

**Key words:** Morphology, Surface fermentation, Image analysis, Kinetics model

固态发酵在我国具有悠久的历史, 其在传统食品的生产过程中起了重要的作用。但令人遗憾的是固体发酵技术远不如深层发酵技术发展得快<sup>[1]</sup>。一般认为微生物的形态变化与其生长、繁殖和代谢产物的生成能力关系甚密<sup>[2-5]</sup>, 在固态发酵中菌体形态变化对代谢产物生成的影响并未引起人们的关注, 这可能是由于固态发酵过程的复杂性所致。为便于固态发酵过程的研究, 我们曾设计了一种界面培养装置来模拟固态发酵<sup>[6]</sup>, 采用这种方法同样有利于固态发酵中微生物形态变化的研究。

关于微生物形态的观测, 一般是通过显微镜直接观察, 随着计算机技术的进步, 利用计算机视觉技术量化微生物菌体的形态特征已成为可能<sup>[7-9]</sup>。数字图像技术为记录和分析这些信息提供了有效的方法。通过对摄得的生长过程中不同阶段的菌落图像进行处理, 可以获得菌体形态信息。为此, 本文借助计算机可视化技术, 基于已建立的界面膜培养系统, 建立相应的界面发酵中菌体形态变化的观测方法, 通过分析界面膜上红曲霉的生长与菌体形态的对应关系, 建立了含有形态参数的动力学模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

红曲霉 (*Monascus*) TQ-57 (天津科技大学现代酿造研究室)。

\* 天津市自然科学基金资助项目 (No.013609911); 教育部与地方共建项目 (No.CJDF03)

\*\* 联系人 Tel: 022-60272605, E-mail: shrjia@public.tpt.tj.cn

收稿日期: 2003-08-21, 修回日期: 2004-03-17

## 1.2 界面培养基

麦芽汁(糖度 12°Brx)加 2%琼脂,倒平板( $\phi 90$  cm),铺膜(celluloid)。

## 1.3 界面培养

用取液器将孢子悬浮液接种到界面培养基上,每个平皿接种量为 50  $\mu$ L,利用如下不同条件培养:(1)恒温恒湿:温度 32℃ 相对湿度 72%;(2)恒温非恒湿:温度 32℃ 不控制相对湿度;(3)变温非恒湿:培养前 7 d 温度 32℃,后期为 25℃,不控制相对湿度;(4)变温恒湿:培养前 7 d 温度 32℃,后期为 25℃,相对湿度 72%。

## 1.4 菌体分析方法

干重法。

# 2 图像采集与图像分析

## 2.1 图像采集

从接种孢子开始,每 24 h 取样观察,将菌与膜面一起从培养基上剥下,置于强度稳定的光源之下,采用 Nikon 数码相机(COOLPIX990)进行拍摄。为保证拍摄位置的稳定,设有定位装置。图像分辨率 2,048  $\times$  1,536。图像的存贮采用 JPEG 格式。

## 2.2 图像预处理

界面膜培养过程中,菌落面积的变化在一定程度上反映了菌体的生长状况。因此,在培养前期可以菌落面积作为形态特征值;培养后期菌株的性能主要取决于菌落隆起部分的结构特征,由于隆起部分的图像存在的噪声较少,所以将菌落的隆起部分抽提出来,对其颜色值进行量化处理作为形态特征值。由于 JPEG 存贮模式为 RGB 颜色模型,为此,首先采用加权平均法,将彩色图像转化为灰度图像。然后对灰度图像进行预处理,包括平滑祛噪,对比度增强,边缘锐化,采用参数固定的算法,以保证各次拍摄的图像之间的可比性。

## 2.3 图像分割

图像分割的目的是把图像分成性质不同的区域。常用灰度级门限化方法,选取一个适当的阈值,进行二值化处理就可以把对象从背景中分离出来。纹理分割也是图像解析的重要方法之一,在检出菌落隆起部分时,将菌落的灰度特性连同菌落的分形特征一起考虑,取得一个描述菌落的综合指标。

## 2.4 图像中期处理

**2.4.1 菌落面积的计算:**由于平皿大小固定,在图像处理中选择平皿作为参照物。用像素统计法计算出平皿的像素点数  $S$ ,再与平皿的实际面积  $A$  比较,可以得出图像标尺,即单位像素所对应的面积:

$$a = \frac{A}{S} \quad (\text{cm}^2/\text{像素})$$

用像素统计法计算出菌落的像素点数  $m$ ,通过标尺可得出菌落的真实面积为:

$$\text{area} = m \times a \quad (\text{cm}^2)。$$

**2.4.2 表征体积  $V$  的计算:**以隆起部分的灰度作为菌落生长的反映。灰度极大值  $B$  减去隆起部分的每一点的灰度值  $X$ ,得到灰度差值  $b$ ,实验表明,可以用  $b$  值反映菌落的垂直生长情况,可以看作是菌落表面的每个点相对于零时刻的生长质量,从而得到集团生长的点分布。定义隆起部分的“表征体积”参数  $V$  为:

$$V = \int b = \sum_{\phi} b_i = \sum_{\phi} (B-X)$$

所以，图像处理过程可分为 (1) 对原始图像的预处理 (pre-processing)，其主要包括噪声消除，边界增强，对比度增强；(2) 分割 (segmentation) 指分离出目标菌落 (从背景、无关的杂质中分离)；(3) 中期处理 (intermediate processing) 是特征参数的选择及参数 (尺寸、形状、几何参数) 的测量；(4) 特征提取 (feature extraction) 是在上述处理基础上，提取菌落形态特征值；(5) 通过分析，进而得到结果。

3 结果与讨论

3.1 图像处理结果与讨论

界面上红曲霉的生长由孢子萌发开始，经历微菌落的扩张期、减速期和衰退期。从菌落形态角度看，红曲霉的生长过程可以菌体长满平皿为界，分为前期和后期。从图 1 和图 2 中可以看出，前期形态特征曲线与菌体生长曲线存在基本一致的对应关系。菌体量的增加与菌落面积的增加基本保持一定的比例。这说明菌体量的增加与形态变化有对应关系。丝状真菌的生长是通过顶端延伸的，活性的增加主要在顶端，宏观表现为菌落不断扩张。所以前期菌落面积的变化是菌体活性的表现。

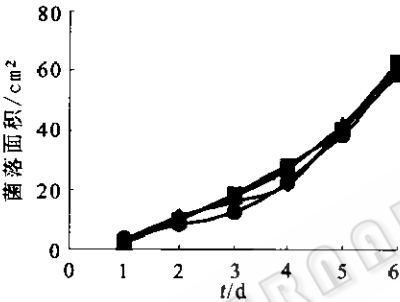


图 1 红曲霉前期菌落形态特征曲线

◆ 恒温非恒湿, ● 变温非恒湿,  
■ 恒温恒湿, ▲ 变温恒湿

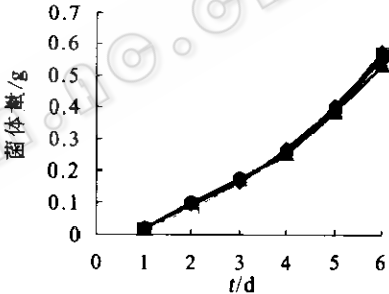


图 2 红曲霉前期生长曲线

■ 恒温恒湿, ◆ 恒温非恒湿,  
▲ 变温恒湿, ● 变温非恒湿

后期以表征体积  $V$  来表示菌落形态特征，从图 3 和图 4 可见，后期形态特征曲线与生长曲线有相似性。长满平皿后，菌落主要以垂直方式生长，此时营养的获取比平铺时阻力加大，且直立生长时菌体伸展空间变小，所以菌体活性的增加速度变慢，生长也变慢。由于凸起部位的灰度相对凹陷部位灰度要小，菌体垂直生长时，表征体积  $V$  在逐渐增大。随着营养的不断消耗，生长引起的环境变化限制了菌体活性的增加。进一步，由于营养的限制及可能出现的产物抑制，使得菌体生长停止。随后，由于代谢产物的产生及菌体的衰亡，隆起部位的颜色深，表征体积下降。所以，在培养后期以表征体积  $V$  来反映菌体活性是可行的。从菌体量的变化曲线可以看出，菌体量达到最大值的时间为第 10 d，晚于特征体积达到最大值的时间。这表明实际观察的最大值早于实际测定的最大值。

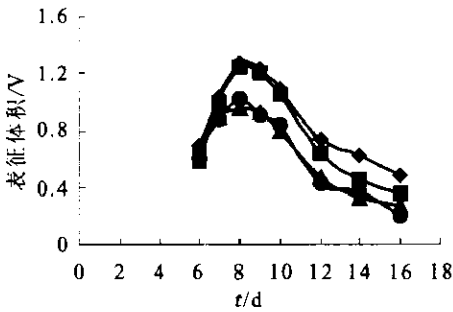


图 3 红曲霉后期菌落形态特征曲线

◆ 恒温非恒湿, ■ 恒温恒湿,  
▲ 变温恒湿, ● 变温非恒湿

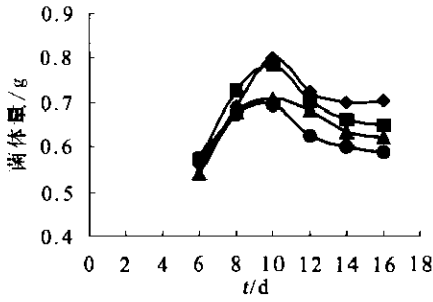


图 4 红曲霉后期生长曲线

■ 恒温恒湿, ● 变温非恒湿,  
▲ 变温恒湿, ◆ 恒温非恒湿

3.2 形态变化动力学模型

结合形态处理过程, 可将界面上菌体的生长分为 3 个时期, 分别考察不同阶段形态的变化规律。(1) 快速增长期: 菌落长满平皿以前, 假定菌体生长不受营养状况和物性参数的影响, 即菌体的延伸速率是一定。由于菌丝体不仅沿着径向方向生长, 而且以一定的角度向上生长, 因此, 需引入一校正系数, 那么菌落面积的延伸速率为:

$$\frac{ds}{dt} = \theta \mu' t^{\varphi}$$

式中  $\theta$  为常数,  $\mu'$  为速率常数,  $\varphi$  为校正系数, 其取值为  $[0, 1]$ , 当  $\varphi$  为 1 时, 表示菌体沿径向生长, 而  $\varphi$  为 0 时表示菌体沿法向生长。则菌落面积  $s$  为:

$$S = \theta \mu' t^{\varphi+1} \quad (0 < t < t_1, 0 \leq \varphi \leq 1)$$

式中  $t_1$  为快速增长期末的累计时间 (菌落长满平皿前所需时间)。由于此时的菌落面积  $s$  为变量, 表征了菌体活性变化趋势。因此, 以其表征菌体的形态特征是可行的。

(2) 减速期: 菌体长满平皿后, 开始垂直生长, 仍以顶端的延长和分叉方式生长, 由于营养物质传递受阻以及空间阻碍, 使得菌体生长活性部分增加的速率减小。为此, 定义  $\sigma'$  表示菌体活性按照递减的规律变化,  $\beta'$  为  $\sigma'$  递减的速率常数, 则  $\sigma'$  随时间的变化可表示为:

$$\sigma' = \frac{\beta'}{t^{\gamma}} \quad (t_1 < t < t_2, 0 \leq \gamma \leq 1)$$

式中:  $t_2$  为至减速期末的累计时间,  $\gamma$  为  $\sigma'$  随时间下降幅度指数。  $\gamma = 0$ , 表示  $\sigma'$  减小的速率没有变化;  $\gamma = 1$ , 表示  $\sigma'$  急剧递减。减速期为快速增长期到衰退期的过渡期, 暂取  $\gamma = 1/2$ 。以表征体积  $V$  来反映菌体活性, 则衰退因子递减速率即为形态特征  $V$  递减速率。则减速期的形态递变率为:

$$\frac{dV}{dt} = \sigma' = \frac{\beta'}{t^{1/2}}$$

(3) 衰减期: 菌体活性下降反映到菌体图像上, 为表征体积下降。活性的衰老是从顶端开始的, 这样就使得菌体活性成指数规律递减。因此, 其形态递变率为:

$$\frac{dV}{dt} = -\mu_c V \quad (t_2 < t)$$

式中,  $\mu_c$  为表征体积的比递减速率, 表征菌体向衰老递变的程度。

以恒温恒湿条件下的为例, 根据图像处理, 得出形态动力学方程的模拟结果如图 5

和图6。

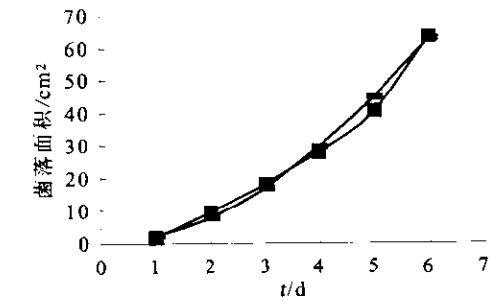


图5 恒温恒湿前期红曲霉形态曲线拟合  
— 模型估计, ■ 实验值

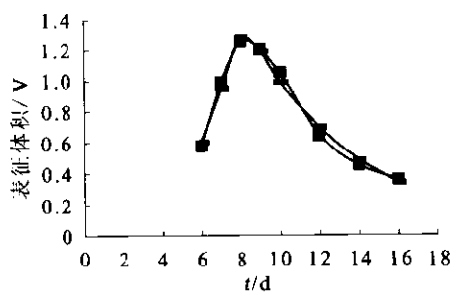


图6 恒温恒湿后期红曲霉形态曲线拟合  
— 模型估计, ■ 实验值

3.3 形态模型与常规模型比较

见表1。

表1 生长动力学模型的描述

阶段	快速期		减速期		衰退期
常规生长模型 [10]	$X_T = e^{A_0 t^{A_1}}$		$X_T = 2\beta t^{1/2} + k_2$		$X_T = k_3 X_m^{-\alpha t}$
形态生长模型	$X_T = f_1 s + B_1$	$X_T = f_2 V + B_2 = f_2$	$X_T = f_3 V + B_3 = f_3$	$X_T = f_4 V + B_4 =$	
	$= f_1 e^{A_0 f_1 t^{A_1 f_1}} + B_1$	$(2\beta' t^{1/2} + k_f) + B_2$	$(2\beta' t^{1/2} + k_f) + B_3$	$f_4 e^{k_f \mu_c t} + B_4$	

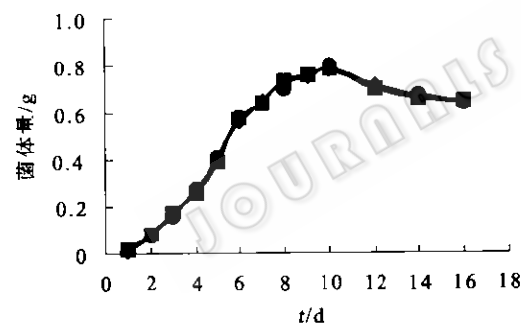


图7 两种动力学模型比较  
■ 含形态生长模型, ■ 实验值, ● 常规生长模型

将形态动力学模型与菌体生长相关联, 得出形态参数描述的生长动力学模型。其与不含形态参数的常规生长动力学模型对比, 两种模型的表现形式有所差别(表1)。形态参数表征的是菌体活性, 虽然由于试验条件的限制, 无法准确测定菌体活性量, 但采用形态参数描述菌体的生长过程与常规的生长模型具有一致的变化规律(图7)。这说明用形态特征值来描述菌体的生长是可行的。另外, 当采用 $\phi 150\text{ mm}$ 的大平皿进行相同实验时, 获得了相似的动力学模型方程。

4 结论

将计算机视觉技术应用于界面培养是可行的。由于常规的固态发酵动力学模型中缺乏实时监测数据, 通过形态参数来描述菌体生长动力学可以实时监测, 利用观测到的菌体形态参数, 以了解菌体的生长状况, 这有可能为固态发酵提供了一种在线监测的新途径。

附: 符号说明:  $A$ : 平皿的实际面积,  $A_0: \frac{1}{n} (\ln \mu - \ln \frac{1}{n})$ ,  $A_{\alpha}: \ln \mu'$ ,  $A_1: \frac{1}{n}$ ,  $A_{1f}: \varphi + 1$ ,  $\alpha$ : 图像标尺,  $B$ : 灰度最大值,  $B_1, B_2, B_3, B_4, f_1, f_2, f_3, f_4, k_f$ : 均为拟合常数,  $b$ : 灰度差值,  $k_2, k_3$ : 常数,  $m$ : 菌落的像素点数,  $n$ : 级数,  $S$ : 平皿的像素点数,  $s$ : 菌落面积,  $t_0$ : 快速增长期末的累计时间,  $t_2$ : 减速期末的累计时间,  $V$ : 表征体积,  $X$ : 每一像素点的灰度值,  $X_m$ : 减速期末的生

物量,  $\alpha$ : 常数,  $\beta$ :  $\sigma$  随时间而减小的速率常数,  $\beta'$ :  $\sigma'$  随时间减小的速率常数,  $\mu$ : 生长速率常数,  $\mu'$ : 速率常数,  $\sigma$ : 衰退因子,  $\sigma$ : 菌体活性变化速率递减规律,  $\varphi$ : 校正系数,  $\mu_e$ : 表征体积的比递减速率,  $\theta$ : 常数,  $\gamma$ :  $\sigma'$  随时间下降幅度指数

### 参考文献

- [1] 徐福建, 陈洪章, 李佐虎. 生物工程进展, 2002, 22 (1): 44 ~ 48.
- [2] Park E-Y, Koire Y, Higashiyama K, *et al.* J Biosci and Bioeng, 1999, 88: 61 ~ 67.
- [3] 张嗣良, 叶 勤, 王永红, 等. 华东化工学院学报, 1993, 19 (5): 577 ~ 582.
- [4] Gerrit S, Marika H S, Ben J J L, *et al.* Appl Envir Micro, 1992, 58: 3709 ~ 3714.
- [5] 赵树欣, 欧宏宇. 食品与发酵工业, 2002, 28 (8): 73 ~ 77.
- [6] 赵树欣, 陈 云, 许春英, 等. 食品与发酵工业, 2003, 29 (5): 11 ~ 14.
- [7] Wilkinson M H F, Schut F. Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications, Ltd by Nedi-Tech Publicaions, 1998. 199 ~ 224.
- [8] Vicente A, Meinders J M, Teixeira J A. Biotechnol and Bioeng, 1996, 51: 673 ~ 678.
- [9] Treskatis S K, Orgeldinger V. Biotechnol and Bioeng, 1997, 53: 191 ~ 201.
- [10] 赵树欣, 汤卫华, 陈 云, 等. 天津科技大学学报, 2003 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>