

## 用氨基葡萄糖含量的测定值间接表示红曲菌固态发酵过程中生物量的研究

范海滨<sup>1</sup> 黄常毅<sup>2</sup> 许赣荣<sup>1\*</sup> 张薄博<sup>1</sup> 刘飞<sup>2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 轻工过程先进控制教育部重点实验室 自动化研究所 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】为准确快速地了解紫色红曲菌固态发酵中生物量的变化,【方法】采用理化方法测定菌体量和氨基葡萄糖含量,研究了不同培养时间、培养基组成、培养方式下菌体量与氨基葡萄糖含量的关系,建立生物量和氨基葡萄糖含量的换算关系式;构建关联该菌固态培养物近红外光谱数据与实测氨基葡萄糖含量的 PLS 模型。【结果】建立了可通过近红外光谱法测定氨基葡萄糖来快速预测固态发酵生物量的方法,其中最优选近红外模型的校正集内部交叉验证均方根误差(RMSECV)为 0.209 4,预测集相关系数( $R_p$ )和均方根误差(RMSEP)分别为 0.993 4 和 0.217 3;同时利用所建的换算关系式也大大提高了生物量计算的准确性。【结论】基于所建立的生物量和氨基葡萄糖的换算关系式,利用近红外光谱法可以快速并且较准确地测定紫色红曲菌固态发酵过程中生物量的变化。

**关键词:** 固态发酵, 红曲菌, 生物量, 氨基葡萄糖, 近红外光谱

### The study of indirect determination of biomass in solid-state fermentation of *Monascus* by the measurement of glucosamine content

FAN Hai-Bin<sup>1</sup> HUANG Chang-Yi<sup>2</sup> XU Gan-Rong<sup>1\*</sup> ZHANG Bo-Bo<sup>1</sup> LIU-Fei<sup>2</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Advanced Process Control for Light Industry, Ministry of Education, Institute of Automation, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] The objective of this paper was to provide an accurate and rapid determination method for the biomass of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation (SSF). [Methods] The biomass and glucosamine content was measured by physical and chemical methods, then the relation between biomass and glucosamine content under different cultivation time, media and culture methods was investigated and the conversion relation of biomass and glucosamine

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021302)

\*通讯作者: ✉: grxu123@126.com

收稿日期: 2013-11-01; 接受日期: 2014-01-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

content was built. Moreover, the PLS model for the relation between near infrared spectra and measured glucosamine content of medium was built. **[Results]** The rapid method for estimating biomass in SSF was built by measuring glucosamine content with NIR. The root mean square error of cross-validation of calibration set (*RMSECV*), the prediction correlation coefficient ( $R_p$ ) and root mean square error of prediction set (*RMSEP*) of the best model were 0.209 4, 0.993 4 and 0.217 3, respectively. Besides, the accuracy of biomass calculation was enhanced by the conversion correlation. **[Conclusion]** On the base of the conversion relation of biomass and glucosamine content, the biomass of *Monascus purpureus* in SSF could be determined more accurately and rapidly by use of NIR method.

**Keywords:** Solid-state fermentation, *Monascus*, Biomass, Glucosamine, NIR

固态发酵是指微生物在没有或几乎没有游离水的固态基质上的生长过程,固态基质可以是惰性基质,例如甘蔗渣,或是能提供碳源和能源的基质,例如麸皮、谷物等<sup>[1]</sup>。红曲菌因在固态发酵中能够产生色素、Monacolin K、酯化酶等而被广泛应用。

生物量是表征发酵过程中微生物生长状态的一个变量,测定生物量对于优化控制发酵过程至关重要。霉菌微生物在固态发酵过程中,由于丝状菌丝会深入到固态基质的内部,故不可能像液态发酵那样通过过滤或离心的方式直接分离<sup>[2]</sup>,因此无法直接测定其菌体量。为解决这个问题,一般采用各种间接的方法来测定生物量,常用的方法是测定细胞内的组成成分,例如氨基葡萄糖法<sup>[3]</sup>、麦角固醇法<sup>[4]</sup>、核酸法等。

氨基葡萄糖法是目前固态发酵生物量测定中较为常用的方法。dos Santos 等<sup>[5]</sup>用液态培养法得到菌体量与氨基葡萄糖含量的折算系数  $f_c=1.78$  mg/g dry mycelium,通过测定不同发酵时间固态发酵培养物中的氨基葡萄糖含量  $P$  (mg/g),按照公式  $X=P/1.78$  (g/g dry medium)计算发酵过程中的生物量。但是 Nagel 等<sup>[6]</sup>的研究结果表明,有些微生物菌体中的氨基葡萄糖含量可能与基质、培养方式和培养时间有关,此时 dos Santos 等的计算方法就无法准确地测定生物量的变化。

发酵基质中氨基葡萄糖含量的测定往往需要两步酸解、中和、Elson-Morgan 反应<sup>[7]</sup>,比色测定等步骤,很明显此种方法操作复杂且耗时长(一般大于 24 h)。近红外光谱法(NIR)有望成为一个很好

的替代分析方法。近红外光谱法方便、快捷、无损、无污染并且有很强的多变量分析能力<sup>[8]</sup>,孙耀国等<sup>[9]</sup>直接对完整茶叶进行傅里叶变换近红外(FT-NIR)光谱分析测定绿茶中氨基酸、咖啡碱和茶多酚的含量,王佳俊<sup>[10]</sup>应用 FT-NIR 光谱分析技术测定烟草中总氮、总糖和烟碱含量。

本文首先研究了不同的培养时间、培养基组成、培养方式下紫色红曲菌菌体量与氨基葡萄糖含量的关系,并提出了根据氨基葡萄糖的含量计算该菌麸皮固态发酵中生物量的方法。并尝试应用 NIR 光谱结合 PLS 法(NIR-PLS)测定该菌固态培养物中氨基葡萄糖含量,从而建立可通过 NIR 光谱测定氨基葡萄糖来预测该菌生物量变化的新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 实验仪器及药品:**浓硫酸、乙酰丙酮、氢氧化钠、蛋白胨、硝酸钠、硫酸镁、磷酸二氢钾、二氨基苯甲醛,中国国药集团化学有限公司;UV3000 型紫外-可见分光光度计,日本 Hitachi 公司;FA1004 型电子天平(精度为 0.000 1 g),上海舜宇恒平科学仪器有限公司;SPX-250B-Z 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;Thermo Antaris MX 傅里叶-近红外快速分析仪,美国赛默飞世尔仪器公司。

**1.1.2 菌种:**紫色红曲菌 *Monascus purpureus* zh, 保藏于江南大学生物工程学院教育部工业微生物重点实验室。

**1.1.3 培养基:**(1) 菌种保藏培养基:土豆葡萄糖

培养基(PDA)。

(2) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 50, 蛋白胨 15,  $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1, pH 5.5。

(3) 麸皮煮出液液态培养基(WPL 培养基): 取麸皮 100 g 沸水中煮沸 30 min, 8 层纱布过滤, 向滤液中添加葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g,  $\text{NaNO}_3$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 定容到 1 L, pH 自然。

(4) 麸皮煮出液琼脂块发酵培养基(WPA 培养基)<sup>[11]</sup>: 每 100 mL 麸皮煮出液液态发酵培养基添加 4 g 琼脂,  $1.0 \times 10^5$  高压蒸汽灭菌 20 min, 冷却后用小刀将琼脂块切割成 4 mm×4 mm×4 mm 的小块, 装入 500 mL 三角瓶中, 即为麸皮煮出液琼脂块固态发酵培养基。此培养基的优点是, 培养后将含菌体的培养物加热融化, 就可使菌丝体与琼脂液分离, 从而可用重量法测定菌丝体质量。

(5) 液态培养基(LM, g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10,  $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5, pH 5.0。

(6) 麸皮固态发酵培养基(250 mL 三角瓶): 麸皮 10 g 和营养液 5 mL, 其中营养液的浓度为(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10,  $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5, pH 5.0。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 种子液制备和发酵培养:** 用接种铲刮取 PDA 试管斜面上的紫色红曲菌孢子于 20 mL 无菌生理盐水中获得孢子悬浮液( $10^7$  孢子/mL), 将其接种到盛有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 32 °C、170 r/min 恒温振荡培养 36–48 h, 即为种子液。

将上述种子液按照 10% 的接种量接入 WPL 发酵培养基和 LM 培养基中(装液量为 100 mL/500 mL 三角瓶), 32 °C、170 r/min 恒温摇瓶培养, 按照同样的接种量接入 WPA 培养基中, 32 °C 静置培养。取 5 mL 种子液接入麸皮固态发酵培养基中 32 °C, 静置培养。

**1.2.2 紫色红曲菌纯菌体的制备:** 按照 1.2.1 节所

述的微生物的培养方法, 进行培养, 每隔一定时间取 3 个平行样, 并按照下述方法制备纯菌体。

液态发酵纯菌体的制备: 将所取发酵液用 6 层纱布过滤, 并用蒸馏水充分洗涤纱布上的滤出物后收集, 置干燥箱中烘干至恒重, 粉碎机粉碎后, 置干燥处保存备用。WPA 培养基拟固态培养纯菌体制备: 向发酵三角瓶中的固态培养物加入沸水 400 mL 沸水浴 30 min 后, 使琼脂溶化, 用 6 层纱布过滤, 并用蒸馏水充分洗涤纱布上的滤出物, 滤出物烘干后即为纯菌体。

**1.2.3 氨基葡萄糖的提取与测定<sup>[12]</sup>:** 精密称取 0.1 g 纯菌体或 0.5 g 固态发酵基质加 2 mL 60%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 25 °C 浸泡 24 h, 稀释至 1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 置于 250 mL 三角瓶中,  $9.8 \times 10^4$  Pa 高压加热 1 h, 冷却后用 1 mol/L NaOH 中和至 pH 7.0, 定容到 100 mL, 根据 Elson Morgan 法在 530 nm 测定吸光度值, 每个样品做 3 个平行样, 取其平均值作为样品的吸光度。测定菌体中氨基葡萄糖质量时, 以 2 mL 蒸馏水作为空白对照, 测定固态发酵基质中氨基葡萄糖质量时, 以未接种基质作为空白对照。

**1.2.4 光谱采集:** 利用麸皮固态发酵培养基发酵 4 批, 每批发酵 120 h, 每隔 12 h 取样一次, 每次取 3 个三角瓶, 每个样品瓶作为一个样本, 共准备 132 个样本。样本取出后, 用 50 °C 烘箱烘干至恒重并粉碎过筛, 压实后立即用 Thermo Antaris MX 傅里叶-近红外快速分析仪以漫反射的方式进行光谱采集, 扫描波数范围为 10 000–4 000  $\text{cm}^{-1}$  (3 112 个数据点), 扫描次数为 32 次, 分辨率为 8  $\text{cm}^{-1}$ 。每个样本每次采集 3 个不同部位的光谱, 并将其平均光谱作为该样本的光谱。

**1.2.5 氨基葡萄糖含量近红外定量分析模型的构建:** 利用 TQ Analyst 近红外光谱分析软件捆绑地最小偏二乘法(PLS)构建模型。将所有发酵样本光谱和氨基葡萄糖含量的实测值导入 TQ Analyst 软件中, 用 Diagnostic 菜单中的 Spectrum Outlier 剔除可能的“问题样本”, 剩余的样本采用 Kennard-

Stone (K-S)方法划分校正集和预测集,该样本划分方法能够避免人为选取的随机性和盲目性<sup>[13]</sup>。校正集样本用作构建近红外模型,预测集样本用作近红外模型的外部验证。所谓外部验证是指用另一批完全独立的、化学成分已知的预测集样品对所建模型的实际预测能力进行检验<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨基葡萄糖标准曲线的绘制

用万分之一电子天平分别准确称取 8、6、4、2 mg 氨基葡萄糖标准品稀释定容至 100 mL 得到不同浓度的标准溶液。按照 1.2.3 节所述的方法测定吸光度。以  $OD_{530}$  为 X 轴,氨基葡萄糖的质量为 Y 轴,绘制标准曲线如图 1 所示。氨基葡萄糖质量与吸光度的关系式为:  $y=9.073\ 5x-0.221\ 0$ ,  $R^2=0.996\ 3$ 。

### 2.2 同一时间点菌体中氨基葡萄糖质量和生物量线性关系的研究

用万分之一天平分别准确称取在同一时间点制备的 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g 纯菌体按照 1.2.3 节所述的方法测定氨基葡萄糖。以氨基葡萄糖含量为 X 轴,菌体量为 Y 轴,测得两者的关系如图 2 所示。

由图 2 可知,在此时间点紫色红曲菌菌体量和相应的菌体中氨基葡萄糖质量的关系式为:  $y=61.119\ 0x+1.346\ 9$ ,  $R^2=0.996\ 9$ 。

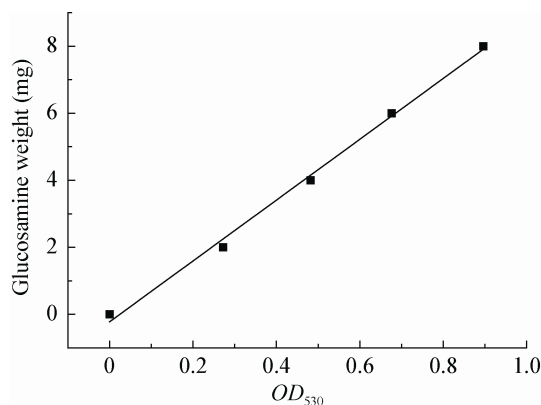


图 1 氨基葡萄糖标准曲线

Figure 1 The standard curve of glucosamine weight

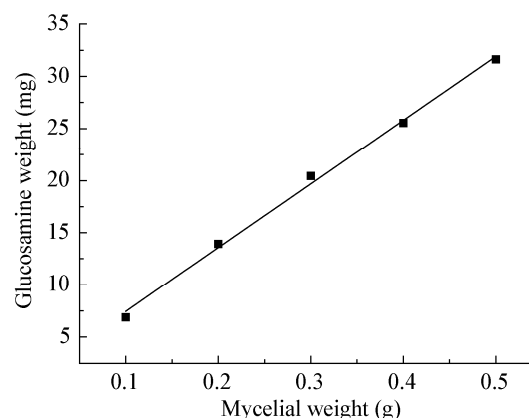


图 2 菌体量和氨基葡萄糖质量的关系

Figure 2 The relation of mycelial weight and glucosamine weight

由此可见,在某一培养时间点菌体量和菌体中氨基葡萄糖质量之间具有较好的线性关系,可以认为此时菌体中氨基葡萄糖含量是恒定的。

### 2.3 培养方式、培养基组成成分的种类、培养时间对单位质量菌体中氨基葡萄糖含量的影响

用 WPL 培养基、WPA 培养基和 LM 培养基培养紫色红曲菌时,由于发酵前期微生物处于延滞期,微生物的菌体量较小,所以只取 16 h 后制备的纯菌体按照 1.2.3 节所采用的方法测定菌体中的氨基葡萄糖的含量,结果如图 3 所示。

由图 3 可知,在 3 种培养条件下,随着培养时间的延长,单位质量菌体中氨基葡萄糖的含量逐渐变大;WPL 液态培养的菌体中氨基葡萄糖含量大

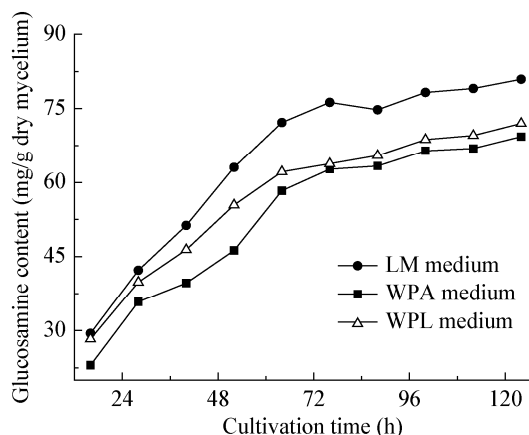


图 3 红曲菌菌体中氨基葡萄糖含量的变化

Figure 3 The changes in glucosamine content of *Monascus mycelium*

于 WPA 固态培养的菌体中氨基葡萄糖含量; 在相同的液态培养方式下 WPL 培养基培养获得的菌体的氨基葡萄糖含量要低于 LM 培养时的氨基葡萄糖含量。

dos Santos E.等<sup>[5]</sup>计算固态发酵中生物量的方法实际上是用液态发酵结束时单位质量菌体中氨基葡萄糖量代替整个固态发酵过程中单位质量菌体中的氨基葡萄糖含量, 然后结合所测培养物中氨基葡萄糖含量计算固态发酵的菌体量, 很明显这种方法是比较粗糙的, 并不一定适合所有微生物, 因为不同的培养方式、培养时间和培养基组成成分下菌体中氨基葡萄糖含量可能也是不同的。由上述实验结果知培养时间、培养基组成成分的种类和培养方式对单位质量紫色红曲菌菌体中氨基葡萄糖有比较显著的影响, 因此 dos Santos E.等的计算方法并不适合紫色红曲菌固态发酵中生物量的计算。

#### 2.4 发酵过程中氨基葡萄糖总量和总生物量的变化

利用上述 3 种培养基培养紫色红曲菌, 总生物量和氨基葡萄糖总量的变化如图 4 所示, 其中纵坐标均指一个三角瓶中总生物量和总氨基葡萄糖量。

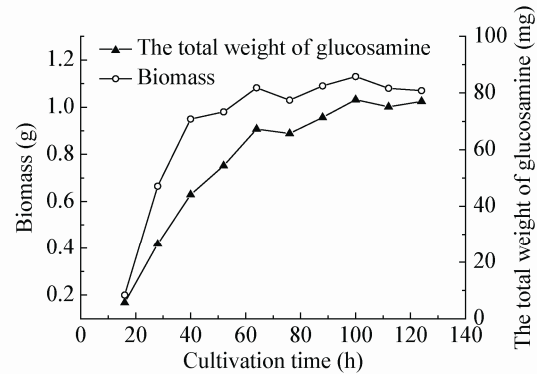
从图 4 可知, 在上述 3 种特定的培养条件下氨基葡萄糖总量和总生物量的变化趋势几乎一致, 但在不同的培养时间氨基葡萄糖总量和总生物量之比并不完全相同, 根据关系式: 氨基葡萄糖总量=单位质量菌体中氨基葡萄糖含量×生物量, 知其比值恰是此时间点时单位质量菌体中氨基葡萄糖含量, 说明对于培养方式和培养基组成恒定的发酵过程, 氨基葡萄糖含量仍可表征紫色红曲菌生物量的变化, 但若要求准确计算发酵过程中生物量变化, 不同发酵时间时菌体中氨基葡萄糖含量是关键变量。

#### 2.5 麸皮固态发酵培养基培养紫色红曲菌过程中生物量的计算方法

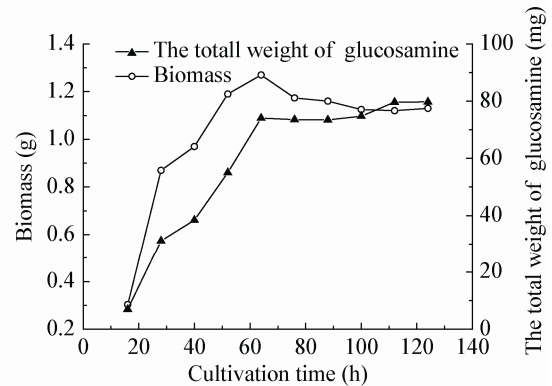
由于都是测定同一固态培养物中的氨基葡萄糖和菌体量, 且根据 2.4 节所述的发酵过程中总生物量和氨基葡萄糖总量的变化关系可知, 用麸皮固

态发酵培养基培养紫色红曲菌的过程中, 若在不同时间单位质量菌体中氨基葡萄糖含量已知, 就可以利用公式(1)较准确计算固态培养物中生物量的变化。

A



B



C

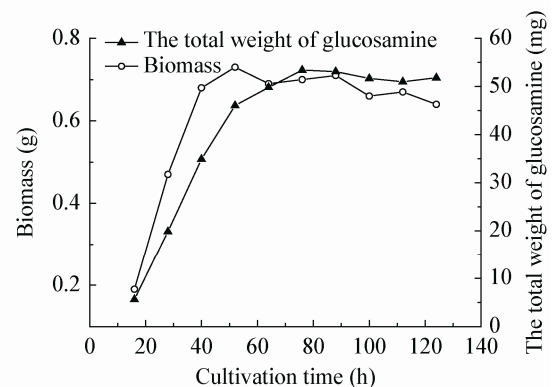


图 4 发酵过程中生物量和氨基葡萄糖总量的变化

Figure 4 The changes in biomass and total glucosamine weight in the fermentation

注: A: WPL 培养基; B: WPA 培养基; C: LM 培养基。

Note: A: WPL medium; B: WPA medium; C: LM medium.

$$\text{生物量}(\text{mg/g dry medium}) = \frac{\text{单位质量培养物中氨基葡萄糖含量}(\text{mg/g dry medium})}{\text{单位质量菌体中氨基葡萄糖含量}(\text{mg/g dry mycelium})} \times 1000 \quad (1)$$

麸皮蒸煮过程中其主要成分淀粉<sup>[15]</sup>和次要成分蛋白质会溶于沸水而变成麸皮煮出液成分之一,其中利用凯氏定氮法测得麸皮煮出液中蛋白质含量为 2.21 g/L,此外麸皮固态培养基和麸皮煮出液琼脂块培养基(MPA 培养基)中均添加相同的蛋白胨和无机盐等组分,因此可以认为这二者的培养基成分的种类相近,培养状态也都是固态,可假定同一时间点时两种培养物中紫色红曲菌菌体中氨基葡萄糖含量相同,只要测定某一时间点 MPA 培养基条件下的单位质量紫色红曲菌菌体中氨基葡萄糖的含量就可以通过式(1)较准确地计算麸皮固态发酵培养物中的生物量。

对利用 MPA 培养基培养获得的单位质量菌体中氨基葡萄糖含量( $G_x$ )对培养时间进行非线性拟合结果如图 5 和公式(2)所示。

$$G_x = \frac{70.3}{1 + e^{1.32 - 0.042T}} \quad T \geq 16 \text{ h} \quad R^2 = 0.98 \quad (2)$$

由于前 16 h 麸皮固态培养物中氨基葡萄糖含量的变化几乎为零,所以生物量变化可忽略不计,16 h 后紫色红曲菌麸皮固态发酵过程中任一培养时间的生物量可按式(3)计算。

## 2.6 近红外光谱法测定固态培养物中氨基葡萄糖的变化

利用 TQ Analyst 软件 Diagnostic 菜单中的 Spectrum Outlier 功能剔除 9 个“问题样本”后,剩余的样本采用 Kennard-Stone (K-S)方法选取 90 个样

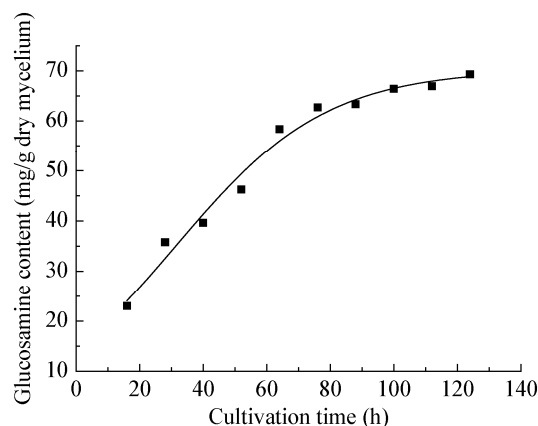


图 5 红曲菌菌体中氨基葡萄糖含量与培养时间的拟合曲线

Figure 5 The fitted curve of glucosamine content of *Monascus* as a function of cultivation time

本组成校正集,用作构建近红外模型,33 个样本组成预测集,校正集与预测集样本固态培养物中氨基葡萄糖含量变化如表 1 所示。

按照 1.2.4 节所示的方法对固态发酵样本采集近红外光谱,样品的原始光谱图如图 6 所示。

由图 6 知波数在 3 999.60–4 286.98  $\text{cm}^{-1}$  范围内的光谱有很多毛刺小峰,可能是由于无规律系统噪声引起的,所以只选取 4 286.98–10 000  $\text{cm}^{-1}$  波数区间的光谱数据做近红外定量分析模型模型。为进一步改善模型的预测效果,尝试运用多元光散射校正(MSC)、Savitzky-Golay (S-G)卷积求导法和 Savitzky-Golay (SG)滤波平滑法以及它们之间的组合对光谱进行预处理。分别利用上述预处理后的光谱

$$\text{生物量(mg/g dry medium)} = \frac{\text{单位质量培养物中氨基葡萄糖含量(mg/g dry medium)}}{\frac{70.3}{1 + e^{1.32 - 0.042T}}} \times 1\,000 \quad T \geq 16 \text{ h} \quad (3)$$

表 1 校正集与预测集氨基葡萄糖的测量结果  
Table 1 Actual values of glucosamine in the calibration and prediction sets

过程参数 Process parameters	样品集 Sample sets	样品数 No. of samples	范围 Range (mg/g dry medium)	平均值 Mean (mg/g dry medium)	标准偏差 S.D.
Glucosamine	Calibration sets	90	0.156 9–5.728 0	2.524 2	1.893 6
	Prediction sets	33	0.358 5–5.744 1	3.073 0	1.829 5



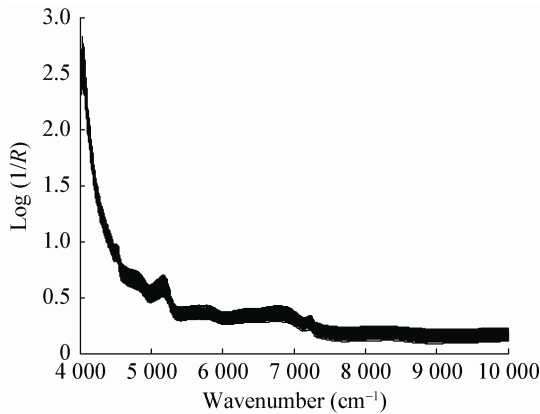


图6 样品的近红外光谱图

Figure 6 The NIR spectra of samples

和没有任何预处理的原始光谱构建近红外模型,通过结果对比发现,利用上述预处理方法并没有进一步改善模型预测效果,利用原始光谱所构建模型的预测效果最好,其中主因子数是 14,校正集内部交叉验证均方根误差( $RMSECV$ )为 0.209 4,预测集相关系数( $R_p$ )和均方根误差( $RMSEP$ )分别为 0.993 4、0.217 3,氨基葡萄糖含量的预测值和实测值的比较如图 7 所示,可见氨基葡萄糖含量的近红外预测值与参考值吻合得较好。

### 2.7 独立样本预测

为了进一步验证模型的适用性,利用麸皮固态发酵培养基发酵一批,在发酵过程中每隔一段时间取样作为固态发酵样本,并按照前面所述方法采集光谱。分别利用已建立的氨基葡萄糖模型和 1.2.3

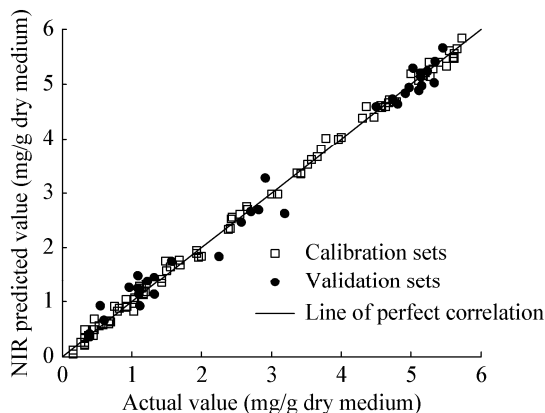


图7 氨基葡萄糖含量实测值与 NIR 预测值的对比

Figure 7 Actual values versus NIR predicted values of glucosamine content

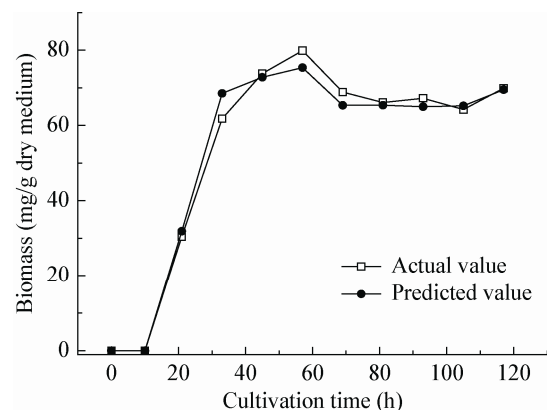
节所述方法测定样本培养物中氨基葡萄糖含量,将上述两种方法得到的氨基葡萄糖值分别代入公式(3),计算得到实测及预测的生物量,结果如图 8 所示。

由图 8 可知,利用近红外光谱法得到的紫色红曲菌固态发酵中生物量变化比较接近于常规比色的方法得到的结果,最大绝对误差为 6.747 96,最小绝对误差为 0.400 23,最大相对偏误差为 10.92%,最小相对误差 0.57%,平均相对误差为 2.264%,说明已建立的模型具有较高的预测精度,可以用于固态发酵过程中生物量的快速检测。

## 3 讨论

本文研究的紫色红曲菌固态发酵中生物量的计算方法,尚不能完全准确地测定紫色红曲菌固态发酵中的生物量,因为麸皮煮出液琼脂块培养基和麸皮固态培养基并不是完全相同,例如两种培养基含水量分别为 49%–58%和接近 100%,水活度分别是 0.970–0.981 和 0.985。此外两种培养基组成成分的含量也会不同,所以两种培养条件下得到的菌体中氨基葡萄糖含量可能也不能完全相同,至于这两个因素对菌体中氨基葡萄糖含量的影响有待进一步的研究。虽然尚有不足,但是本文的研究却为准确测定固态发酵中生物量的变化提供了研究思路。

虽然已有应用近红外光谱法测定发酵过程中相关变量的研究<sup>[16-18]</sup>,但是绝大部分研究集中于液态发酵,对于真菌固态发酵中生物量这个关键而又

图8 麸皮固态发酵培养基培养红曲菌过程中生物量的变化  
Figure 8 The variance of biomass in SSF of *Monascus* in wheat bran solid-state medium

难测变量的研究较少,尤其是对红曲菌固态发酵中生物量的研究更是鲜有报道。Li 等<sup>[19]</sup>也研究了应用近红外光谱法测定 *T. reesei* 3# 固态发酵中生物量方法,但是 Li 等的研究并没有关注 *T. reesei* 3# 菌体中氨基葡萄糖含量的稳定性,若菌体氨基葡萄糖含量也受到培养时间、培养基组成成分种类和培养方式的影响,其测定的生物量可能也会有较大的误差,这可能也是限制其近红外模型预测效果进一步改善的一个原因。本文首先重点阐述了培养基组成成分种类、培养时间和培养方式对紫色红曲菌菌体中氨基葡萄糖含量的影响情况,并提出了相应的生物量计算方法,然后提出用近红外光谱法预测培养物中氨基葡萄糖含量并按照相应的计算方法来快速测定生物量,因而本文更加系统和全面。

#### 4 结论

利用固态发酵物中氨基葡萄糖含量与菌体生物量的关系,通过近红外光谱的方法预测固态培养物中氨基葡萄糖含量,从而可以在短时间内测定固态发酵样品中的生物量。但在研究中发现紫色红曲菌菌体中氨基葡萄糖含量会受到培养时间、培养方式和培养基组成成分种类的影响,这在一定程度上会影响固态发酵生物量测定的准确性。为克服这一问题,采用相同营养成分的琼脂块培养基模拟固态培养基培养红曲菌,并对菌体中氨基葡萄糖含量与培养时间进行拟合,得到不同时间点培养物中氨基葡萄糖含量和生物量的换算关系式,采用近红外方法测定固态培养基中氨基葡萄糖,从而达到了通过近红外光谱的方法快速并且较准确预测固态培养物中菌体量的目的。整个过程操作时间不超过 5 min,节约了固态发酵过程生物量测定的时间,大大提高了效率。

#### 参 考 文 献

- [1] Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(10): 1153-1169.
- [2] 魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 60-64.
- [3] Scotti CT, Vergoignan C, Feron G, et al. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation condition[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 7(1): 1-5.
- [4] 姜绪林, 孙瑶, 杨毅, 等. 绿色木霉固态发酵纤维素酶生物量的测定及发酵培养基的初步优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(3): 101-105.
- [5] dos Santos E, Piovan T, Roberto IC, et al. Kinetics of the solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Thermoascus aurantiacus* for the production of xylanase[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(1): 13-16.
- [6] Nagel FJJI, Tramper J, Bakker MSN, et al. Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 72(2): 231-243.
- [7] 苏畅, 夏文水, 姚惠源. 氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖的测定方法[J]. 食品工业科学, 2003(6): 74-76.
- [8] Balabin RM, Safieva RZ, Lomakina EI. Comparison of linear and nonlinear calibration models based on near infrared (NIR) spectroscopy data for gasoline properties prediction[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2007, 88(2): 183-188.
- [9] 孙耀国, 林敏, 吕进, 等. 近红外光谱法测定绿茶中氨基酸、咖啡碱和茶多酚的含量[J]. 光谱实验室, 2004, 21(5): 940-943.
- [10] 王家俊. FT-NIR 光谱分析技术测定烟草中总氮、总糖和烟碱[J]. 光谱实验室, 2003, 20(2): 181-185.
- [11] Zhang BB, Lu LP, Xia Y, et al. Use of agar as carrier in solid-state fermentation for Monacolin K production by *Monascus*: a novel method for direct determination of biomass and accurate comparison with submerged fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 80(15): 10-13.
- [12] Sakurai Y, Lee TH, Shiota H. On the convenient method for glucosamine estimation in koji[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977, 41(4): 619-624.
- [13] 褚小立. 化学计量学方法与分子光谱分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 4.
- [14] 魏良明, 严衍祿, 戴景瑞. 近红外反射光谱测定玉米完整籽粒蛋白质和淀粉含量的研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 630-633.
- [15] 姚汝华. 微生物工程工艺原理[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2005: 9.
- [16] Tiwari S, Suraishkumar GK, Chandavarkar A. Robust near-infra-red spectroscopic probe for dynamic monitoring of critical nutrient ratio in microbial fermentation processes[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 71: 47-56.
- [17] Blanco M, Peinado AC, Mas J. Analytical monitoring of alcoholic fermentation using NIR spectroscopy[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88(4): 536-542.
- [18] Liang J, Zhang D, Guo X, et al. At-line near-infrared spectroscopy for monitoring concentrations in temperature-triggered glutamate fermentation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013: 1-9.
- [19] Li HQ, Chen HZ. Near-infrared spectroscopy with a fiber-optic probe for state variables determination in solid-state fermentation[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(5): 511-516.