

不同初始 pH 值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析

覃赵军^{1,2} 赖钧灼³ 刘斌³ 刘军贤² 王桂文¹

¹广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007
²广西师范大学物理科学与技术学院, 广西桂林 541004
³广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004

摘要 pH 值是影响酵母乙醇发酵的重要因素。应用拉曼光谱初步分析不同初始 pH 值对乙醇发酵过程的影响。结果显示: 1) 在 3.0、4.5、6.5 三个不同初始 pH 值的培养基中, pH 4.5 下乙醇产量最高, pH 3.0 下最低。2) 在发酵的前 15 h, 不同初始 pH 值下的酵母细胞生物大分子的拉曼信号变化波动大; 后期, pH 3.0 下胞内脂类和蛋白质的拉曼信号最强, pH 6.5 最弱; 显示在低 pH 值环境下部分底物可能被转化为胞内储藏物质。3) 主成分分析显示, pH 值对酵母细胞生理状态的影响从发酵的初始阶段就开始; 1440 cm^{-1} 和 1600 cm^{-1} 峰一直是影响主成分 PC1、PC2、PC3 分值的主要特征峰; 说明 pH 环境可能影响了酵母细胞的脂类物质合成和细胞的呼吸代谢, 进而影响了底物的代谢方向和产物的合成。结果表明, 拉曼光谱和单细胞分析可以用于剖析微生物发酵过程的生理机制, 为乙醇发酵提供全新的参考信息。

关键词 光谱学; 乙醇发酵; 拉曼光谱; pH 值; 单细胞分析

中图分类号 O657.37 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201340.0215001

Raman Spectroscopic Analysis of Ethanol Fermentation at Various Initial pH Levels

Qin Zhaojun^{1,2} Lai Junzhuo³ Liu Bin³ Liu Junxian² Wang Guiwen¹

¹Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

²College of Physics Sciences & Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

³College of Life Sciences & Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract The pH level is a prominent factor affects the ethanol fermentation. Optical tweezers Raman spectroscopy is used to analyze the process of ethanol fermentation at the initial pH levels of 3.0, 4.5, 6.5. Major results from this work are as follows: 1) The pH 4.5 level get the highest ethanol production and the pH 3.0 get the lowest one. 2) Raman intensities of bio-macromolecules of yeast cells at all pH levels exhibite dramatic changes in the first 15 hours. However, at the later stage of the fermentation, the pH 3.0 level displayes strong Raman intensities of intracellular lipids and proteins while pH 6.5 level shows weak. This indicates that a portion of substrate may be transformed into intracellular storage material by yeast cells at lower pH level. 3) Principal component analysis reveals that fermentation pH influences the physiological status of yeast cells from the beginning of fermentation, and bands 1440 cm^{-1} and 1600 cm^{-1} are the prominent contributors to the component loadings in different fermentation stages. This suggests the pH level of medium may affect the synthesis of lipid and the respiratory metabolism of yeast cells, influence the metabolism consequently. The results indicate Raman spectroscopy and single-cell analysis can uncover the physiological mechanism of the microbial cell during the fermentation process and provide new and reference information for the ethanol fermentation.

Key words spectroscopy; ethanol fermentation; Raman spectroscopy; pH levels; single-cell analysis

OCIS codes 170.5660; 170.1530; 170.1420

收稿日期: 2012-08-28; **收到修改稿日期**: 2012-10-24

基金项目: 国家自然科学基金(30760010)和广西自然科学基金(2012GXNSFCA053001, 0832022Z, 0991079)资助课题。

作者简介: 覃赵军(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事拉曼光谱在生物医学中的应用等方面的研究。

E-mail: qinzhaojun10@gmail.com

导师简介: 王桂文(1969—), 男, 研究员, 主要从事生物物理与应用微生物等方面的研究。E-mail: wguiwen@gxas.cn (通信联系人)

1 引言

pH 值是影响微生物生理机能的重要的环境因素^[1]。细胞的结构、细胞膜中的脂类会随着培养液的 pH 值的变化而发生变化,已经观察到在不同的 pH 条件下细胞的大小和形状会发生显著的变化;膜功能、基质进入细胞方式,特别是所有依赖于胞外酶的反应对环境的 pH 值也是敏感的。对酵母细胞而言,在乙醇发酵过程中,不同的菌株也有其最适生长的 pH 值,同一菌株在其不同生长阶段及不同的生理生化过程中也有其各自的最适 pH 值。最适的 pH 值除了有利于菌体的生长外,还可以抑制甚至可以杀死杂菌,从而减少杂菌的污染。pH 值太高或太低都会影响酵母细胞的生理功能,从而导致酵母的代谢功能受损,影响其正常生长及对糖的有效利用,最终会影响乙醇的产量。

拉曼光谱与光镊子技术相结合的光谱分析技术,具有快速无损分析的独特优势^[2,3],可以在接近自然生理状态下获知细胞内外的信息,实时监测单个活细胞的动态过程,获知细胞的生化组成和变化,判别细胞的类型和细胞生理变化^[4~6]。在实时监测酵母发酵和胞内物质合成方面,也开展了多方面的研究^[7,8],在浓醪乙醇发酵中追踪到胞内蛋白质结构的变化^[9]。鉴于生长环境 pH 值对酵母细胞生理机制有重大影响,本文试图用拉曼光谱技术对不同起始 pH 值下的乙醇发酵过程进行分析,通过追踪酵母细胞生物大分子及发酵底物和代谢产物的特征峰拉曼光谱信息,提取细胞在发酵过程的演变信息,探索研究微生物发酵的新方法,从分子振动光谱和单细胞分析的角度剖析不同起始 pH 值影响酵母乙醇发酵的生理机制,为乙醇发酵提供全新的可参考的信息。

2 材料与实验方法

2.1 实验菌株及培养基

菌种:酿酒酵母菌株 GXAS-6 为广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心分离、保藏。种子培养基(YEPD):葡萄糖 2.0%(质量分数),酵母提取物 1.0%,蛋白胨 2.0%,pH 4.5。发酵培养基:葡萄糖 150 g,蛋白胨 5 g, CaCl₂ 0.06 g, MgSO₄·7H₂O 0.06 g, KH₂PO₄ 1.5 g, 蒸馏水 1000 mL; 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后根据实验需要用 1 mol/L HCl 或者 NaOH 调整发酵培养基的初始 pH 值为 3.0, 4.5, 6.5。

2.2 细胞培养与发酵实验

种子液:实验菌株在 YEPD 平板 28 °C 培养活化,挑取单菌落,接入含有 50 mL YEPD (pH 4.5) 的 150 mL 三角瓶中,28 °C,150 r/min 过夜培养。以 10% 的接种量,分别转接到初始 pH 值为 3.0、4.5 和 pH 6.5、含 150 mL 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中,32 °C,100 r/min 培养。从接种时起,前 9 h 每隔 1 h 取样,9 h 后在 12、15、18、23、30 h 取样。每次取样 2 mL,1 mL 用 Beckman DU800 紫外-可见分光光度计测定所取样品在 600 nm 处的光密度(OD₆₀₀)值,1 mL 用于收集拉曼光谱。做 3 次重复。

2.3 实验系统与光谱收集

实验系统:实验系统如文献[2,10]描述,波长 780 nm,强度 15 mW 的激光经滤光后导入倒置生物显微镜(TE2000U, Nikon, 日本),经油浸物镜(NA1.30,100×)聚焦,在焦点附近形成了一个单光束光势阱来俘获细胞。该束激光也同时用于激发被囚禁细胞的拉曼散射。拉曼散射从原光路返回并聚焦进入光谱仪(SpectraPro2300i, Acton, 美国)的输入狭缝,并由液氮冷却(-120 °C)的电荷耦合器件 CCD(Spec10, Princeton Instruments, 美国)所记录。系统的分辨率 6 cm⁻¹,用 2 μm 聚苯乙烯小球校正实验系统。

光谱收集:取 150 μL 发酵液,置于厚 4 mm、直径 6 mm 的圆形样品槽内,外加盖玻片密封。100 倍油浸物镜寻找酵母细胞,光镊随机俘获单个细胞,将酵母细胞提升至石英片上方 10 μm,收集目标细胞的拉曼光谱,于细胞附近以相同条件收集背景拉曼光谱。依据生物统计学对样本容量的要求和传统的经验^[9,11],每个样品收集 40 个细胞光谱,信号累积时间为 30 s,5 个背景光谱。

2.4 数据处理方法

光谱数据转换为 ASCII 格式后导入 Origin 8.1 进行背景扣除,采用 VB 语言编写的程序对数据进行多元散射校正(MSC)和 9 点 Savitzky-Golay 卷积平滑法平滑,接着用拉曼光谱基线校正工具进行基线校正,同样用自编 VB 程序计算特征峰的峰面积。选择 600~1700 cm⁻¹ 指纹区进行主成分分析(PCA),用 Origin 8.1 绘制载荷图和二维得分散点图。

对于随机误差(即噪声)的消除,采用三阶的 9 点 Savitzky-Golay 卷积平滑法,具体算法过程如下

$$x_{k, \text{smooth}} = \bar{x}_k = \frac{1}{H} \sum_{i=-w}^{+w} x_{k+i} h_i, \quad (1)$$

式中 h_i 为平滑系数, H 为归一化因子, $H = \sum_{i=-w}^{+w} h_i$, 每一测量值乘以平滑系数 h_i 的目的是尽可能减小平滑对有用信息的影响, 可用最小二乘原理, 通过多项式拟合求得。经卷积平滑法平滑之后的光谱毛刺显著减少, 提高了光谱的信噪比。之后将数据导入软件 Origin 8.1 求各个时间段的平均光谱。

3 结果与分析

3.1 不同起始 pH 值对酵母生长和乙醇发酵的影响

图 1 是不同起始 pH 值下酵母生长、底物消耗和产物生成的动态曲线。生长曲线[图 1(a)]显示, 环境 pH 值明显影响酵母细胞的生长, 前 3 h, 不同初始 pH 值的细胞生长差异不大; 但随后就表现出明显的不同, 酵母细胞在 pH 6.5 生长最好, 对数生长期长; 初始 pH 4.5 和 3.0 的培养基中, 酵母细胞的生长均慢于 pH 6.5, 且很快进入稳定期; pH 3.0 培养基中生物量最低。底物消耗曲线[图 1(b)]显示, 前 15 h, 和细胞快速生长对应, pH 6.5 培养基中消耗的葡萄糖最多, 但是纵观整个发酵过程, 各 pH 值下的葡萄糖消耗基本上相同。乙醇生成曲线显示[图 1(c)], 0~9 h 内, 乙醇生成基本相同, 但从 15 h 开始, 虽然初始 pH 4.5 的培养基中菌体生物量低于 pH 6.5 的培养基, 但是乙醇产量为三者之最, 而 pH 3.0 培养基中细胞生长和乙醇产量都是最低的。结果说明, 适合酵母生长的 pH 值未必适合乙醇发酵, 而 pH 3.0 的较酸性环境既不适合细胞生长, 也不适合乙醇发酵。值得注意的是, 三者的生物量不同, 葡萄糖消耗基本相同, 但乙醇的最终产量却明显不同。下面将通过单细胞光谱数据做进一步分析。

3.2 光谱数据处理效果分析

结合实验仪器及实验性质采用行之有效的数据处理方法显得尤为重要。Savitzky-Golay 卷积平滑法与相邻平均值法都可以提高光谱的信噪比, 但后者会将峰值抹平, 而前者能保持光谱的原始特征, 因此本文用前者来平滑数据; 多元散射校正或扩展多元散射校正是一种多变量散射校正技术^[12,13], 最初应用在近红外光谱的基线平移和漂移的校正方面, 有效提高了光谱的信噪比; Delder 等^[14,15]将扩展多元散射校正(EMSC)用在细菌的拉曼光谱中同样取得良好的效果。受此启发, 本文应用 MSC 技术对酵母细胞的拉曼光谱进行预处理, 结果显示, MSC 可以很好地校正酵母拉曼光谱的基线平移和偏移,

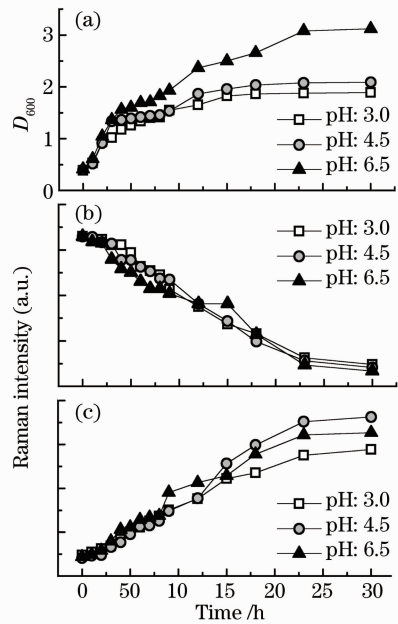


图 1 不同初始 pH 值下乙醇发酵动态。(a) 酵母细胞生长曲线; (b) 葡萄糖特征峰(1126 cm^{-1}); (c) 乙醇特征峰(880 cm^{-1})

Fig. 1 Kinetic of ethanol fermentation at different initial pH levels cultured with *S. cerevisiae* at $32 \text{ }^\circ\text{C}$, monitored by Raman spectroscopy. (a) Growth curves of yeast cells; (b) Raman intensity of band 1126 cm^{-1} from glucose; (c) Raman intensity of band 880 cm^{-1} from ethanol

提高光谱的信噪比, 为光谱的进一步分析提供更加准确的信息。图 2 为 pH 6.5 培养基中第 30 h 时细胞的原始拉曼光谱、MSC 校正后的光谱和进一步基线校正后的光谱对比。

3.3 不同初始 pH 值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析

图 3 为酵母在初始 pH 4.5 的培养基中在第 0、4、8、15、23、30 h 时菌体细胞的平均拉曼光谱图, 从图 3 中可清楚地看到 880 、 1082 、 1301 、 1334 、 1440 、 1600 、 1652 cm^{-1} 等主要特征峰的强度随着发酵进程在逐渐增强。 880 cm^{-1} 是乙醇 C—C—O 基团产生的拉曼特征峰, 1082 cm^{-1} 是脂类、核酸和乙醇等物质混合的拉曼峰, 1301 cm^{-1} 是脂类的特征峰, 1334 cm^{-1} 为 DNA, 1440 cm^{-1} 来自蛋白质以及脂类, 1600 cm^{-1} 表征蛋白质的酪氨酸和苯丙氨酸; 1652 cm^{-1} 归属蛋白质。具体谱峰归属见表 1^[8,9,16,17]。为全面反映胞内各物质的变化趋势, 各特征峰信号强度以发酵时间建立函数(图 4), 直观地显示了不同初始 pH 值的培养基中, 胞内核酸、脂类和蛋白质的变化动态: 1) pH 3.0 和 6.5 下的 RNA 波动较小, DNA 则在

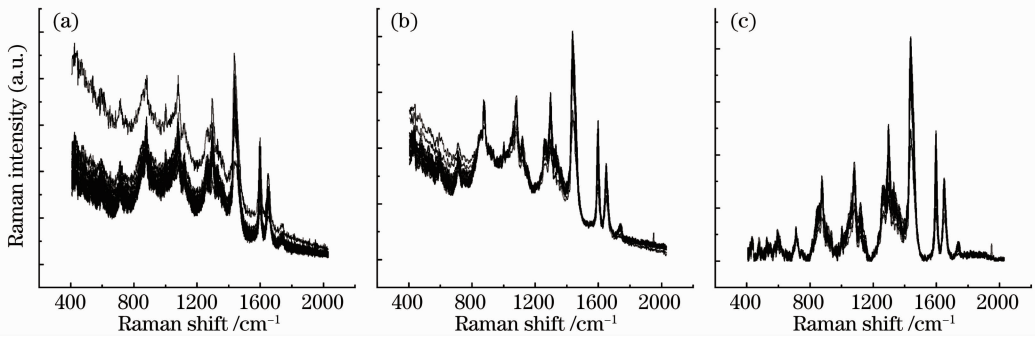


图 2 拉曼光谱数据预处理效果对比。(a)原始光谱;(b) MSC 校正后的光谱;(c)基线校正后的光谱
Fig. 2 Comparison of the Raman spectral data. (a) Original spectra; (b) spectra after MSC correction; (c) baseline correction

三种 pH 下均有不同程度的波动,但最终的含量和发酵的初始时刻接近。2) 脂类和蛋白质的变化有两个转折点,在 4 h 和 15 h 附近,对比图 1(a)可以发现,4 h 是种子液接入发酵液后的第一个快速生长的小高峰,15 h 是对数生长结束,开始进入稳定期。3) 脂类物质含量,pH 4.0 下在 4 h 时有少量增加,随后有微小的波动并逐渐少量升高,而其他 pH 值下在 4 h 前有少量降低,随后则持续增强。和 0 h

表 1 酵母细胞主要拉曼信号峰可能对应的生物大分子
Table 1 Tentative assignment of Raman bands derived from single yeast cell of ethanol fermentation

Raman shift /cm ⁻¹	Tentative assignment
710~712, 723	Adenine
780~783	RNA (U, C, T ring breathing)
850~862	Tyrosine, lipids
877~880	Ethanol
930~960	N-C _α -C stretch of protein
996~1004	Phenylalanine
1055~1069	C-C stretch of lipids
1082	C-C stretch of lipids and protein DNA: BK
1130~1145	C-N stretch of protein C-C stretch of lipids
1155~1160	Aromatic amino acids, C-C stretch Amide III
1266	=C-H bend of lipids
1297~1304	CH ₂ twist of lipids
1330~1366	Adenine
1437~1450	C-H bending and CH ₃ deformation of lipids and proteins
1480	Guanine and adenine
1560~1575	Guanine and adenine
1600	Tyrosine and phenylalanine
1648~1662	Amide I, α-helix cis-C=C stretch of lipids

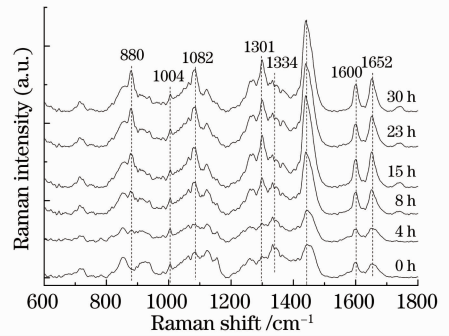


图 3 酵母细胞在初始 pH 值为 4.5 的培养基中在第 0、4、8、15、23、30 h 时菌体细胞的平均拉曼光谱图
Fig. 3 Averaged Raman spectra of yeast cells at 0, 4, 8, 15, 23, 30 h cultured with pH of 4.5

相比,pH 3.0、4.5、6.5 下在发酵结束时1301 cm⁻¹ 峰的强度分别增加了 346%、89%、136%。4) 蛋白质含量变化趋势和脂类物质类似,pH 6.5 下在 4 h 时有少量增加,随后有微小的波动并逐渐少量升高,而其他 pH 值下在 4 h 前却逐步降低,随后则持续增强。和 0 h 相比,pH 3.0、4.5、6.5 下发酵结束时 1652 cm⁻¹ 峰的强度分别增加了 124%、143%、64%。5) 在三种 pH 环境下,DNA 含量在 15 h 都降低,而脂类和蛋白质在 15 h 时出现个小高峰。

3.4 不同初始 pH 值的乙醇发酵过程拉曼光谱主成分分析

PCA 是一种简化数据集的技术,既可以达到降维的目的,又保留了对方差贡献最大的特征,是常用的光谱特征信息提取方法^[18]。载荷是 PC 分值和原始变量的相关系数,可以衡量每个变量在主成份可变性中所占的分量,而拉曼光谱可以定量反映生物大分子的含量^[16,19]。因此,通过 PCA 并分析主要 PC 的载荷与相关特征峰的相关性,可以从中获知不同发酵阶段酵母胞内主要生物大分子的合成特点。

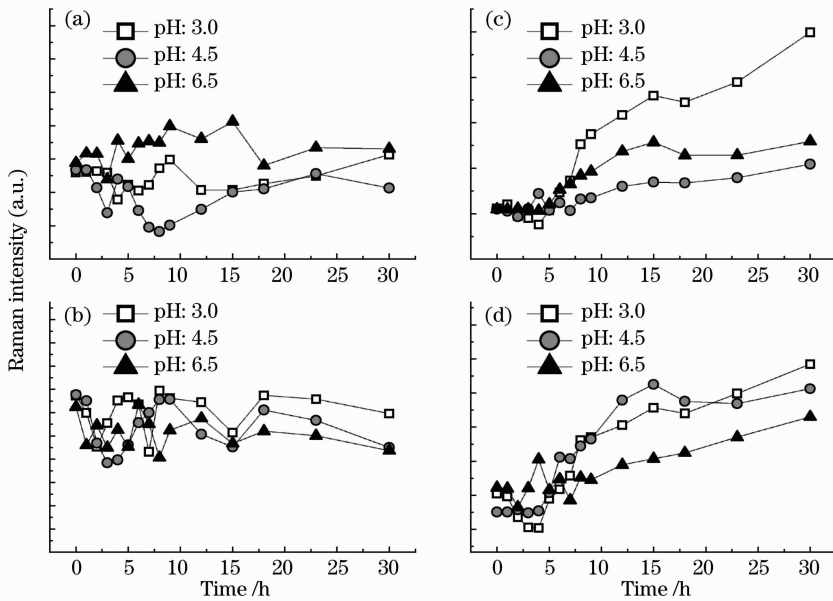


图 4 发酵过程中酵母细胞拉曼信号峰在(a) 780 cm^{-1} , (b) 1334 cm^{-1} , (c) 1301 cm^{-1} 和(d) 1652 cm^{-1} 实时动态变化曲线
 Fig. 4 Kinetics of the Raman intensities of peaks at (a) 780 cm^{-1} , (b) 1334 cm^{-1} , (c) 1301 cm^{-1} and (d) 1652 cm^{-1} from single yeast cells

根据图 1 显示的发酵进程,选择 2、8、30 h 三个不同初始 pH 值的酵母拉曼光谱,选取特征峰比较集中的 $600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 区域进行主成分分析。从 PCA 得分图(图 5)可以看到,在发酵初期的第 2 h,三种 pH 值下的细胞光谱在 PC1 和 PC3(图没有给出)上随机分布在各象限,但在 PC2 分值上,pH 3.0 和

pH 6.5 的细胞光谱明显地分布于两个区域,而 pH 4.5 下的细胞光谱则分布在两者之间;载荷分析表明[图 5(b)],影响 PC2 分值的拉曼峰主要有 723 、 1155 、 1334 、 1440 、 1600 cm^{-1} 等,这些峰源自碱基、脂类和蛋白质,说明酵母细胞的生理状态在发酵的初期就因为环境的 pH 值不同而有所改变。

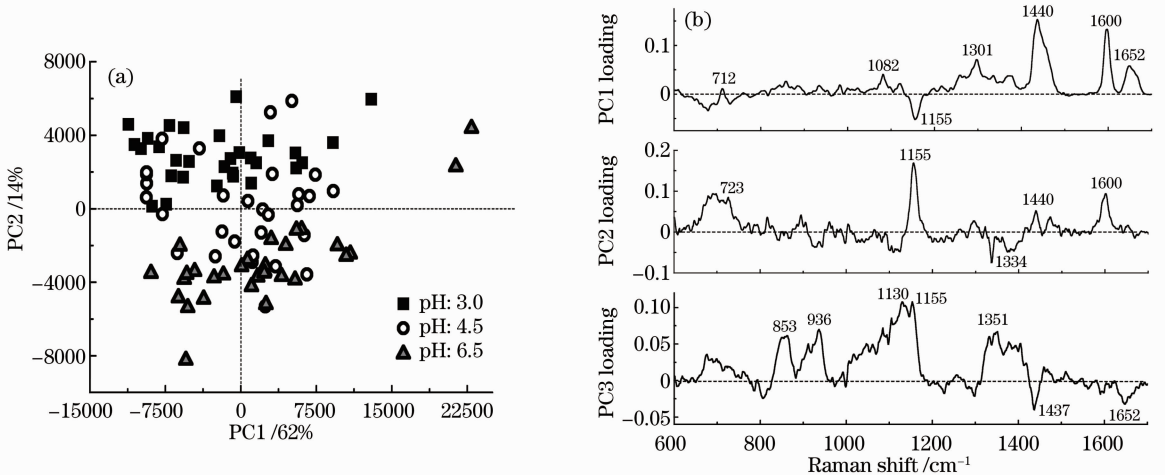


图 5 (a)发酵 2 h 时不同初始 pH 值下细胞光谱主成分分析及(b)第一、第二和第三主成分构成的载荷图
 Fig. 5 (a) PCA scores plot and (b) loadings plot of PC_1 , PC_2 and PC_3 of Raman spectra of yeast cells at 2 h cultured at various pH levels

如图 6 所示,在发酵中期 8 h 时,较高 pH 值 (pH 6.5) 下的酵母细胞生理状态和 pH 3.0、pH 4.5 的细胞在 PC1 分值明显可以区分,结合图 6(b) 可知,影响 PC1 的主要峰位主要是源自 RNA 的碱基、脂类和蛋白质的 850 、 1082 、 1266 、 1301 、 1440 、

1600 、 1652 cm^{-1} 等峰;pH 4.5 和 pH 3.0 的细胞光谱与图 3 所示酵母细胞的主要特征峰存在正相关关系,但 pH 6.5 的细胞光谱则存在负相关关系,说明 pH 4.5 和 pH 3.0 的酵母胞内的上述物质高于 pH 6.5 培养基中的酵母;而在 PC3 分值中,pH 3.0 和

pH 4.5 的细胞光谱分布于不同的区间(图没有给出),pH 6.5 的细胞光谱处于两者之间,pH 3.0 的细胞光谱与 782,996,1366,1600,1660 cm^{-1} 等峰存在正相关关系[图 6(b)],而与 880,1440 cm^{-1} 峰负

相关;但 pH 4.5 培养基中酵母细胞光谱刚好相反,说明初始 pH 3.0 培养基中的酵母胞体内 RNA 的碱基、胞内乙醇、蛋白质和脂类高于初始 pH 4.5 培养基中的酵母,而胞内乙醇含量则相反。

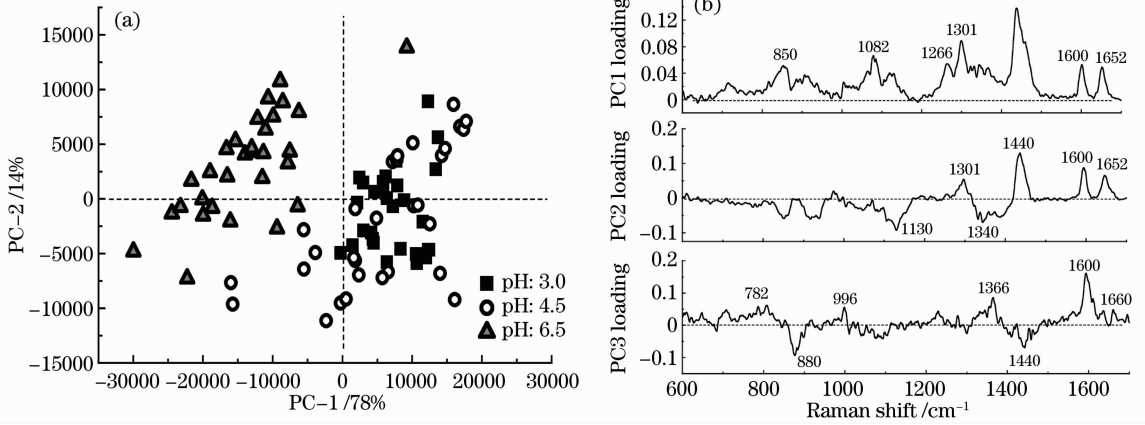


图 6 (a)发酵 8 h 不同初始 pH 值下细胞光谱主成分分析及(b)第一、第二和第三主成分构成的载荷图
Fig. 6 (a) PCA scores plot and (b) loadings plot of PC_1 , PC_2 and PC_3 of Raman spectra of yeast cells at 8 h cultured at various pH levels

同理,如图 7 所示,在发酵后期的第 30 h,和发酵中期的 8 h 类似, pH 6.5 环境下的酵母细胞光谱和 pH 3.0、pH 4.5 的在 PC1 分值明显可以区分,与 1082,1301,1440,1600,1652 cm^{-1} 等脂类、蛋白质峰存在负相关关系;而在 PC2 分值,大部分 pH 4.5 下

的酵母细胞光谱的分值比 pH 3.0、pH 6.5 的低,与 860,1140,1301,1340,1440 cm^{-1} 等峰相关。图 7 表明,发酵后期,pH 3.0 培养基中酵母细胞胞内脂类物质和蛋白质含量峰的强度均高于 pH 4.5 和 pH 6.5 的,而 pH 6.5 是最弱的。

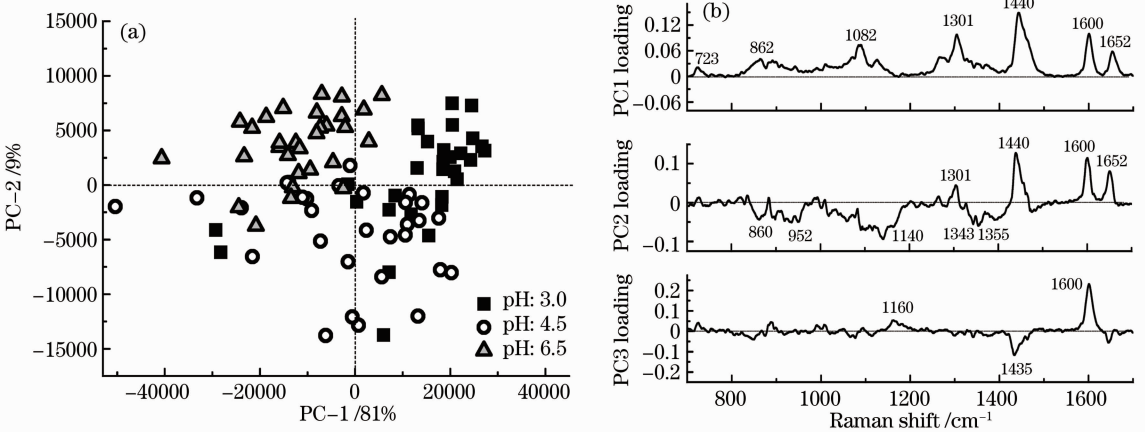


图 7 (a)发酵 30 h 不同初始 pH 值下细胞光谱主成分分析及(b)第一、第二和第三主成分构成的载荷图
Fig. 7 (a) PCA scores plot and (b) loadings plot of PC_1 , PC_2 and PC_3 of Raman spectra of yeast cells at 30 h cultured at various pH levels

上述结果表明,pH 3.0 的生长环境既不适合酵母细胞生长,也不适合乙醇发酵,在同样的营养条件下,部分碳源转化为胞内储藏物质了;pH 6.5 的生长环境适合酵母细胞的生长,细胞生长旺盛,部分碳源被用于细胞生长,胞内储藏物质少,乙醇产量也稍低;pH 4.5 是乙醇发酵的合适环境,既保证了适当

的细胞生长量,也让尽可能多的糖类物质转化为目标产物。上述结果也解释了图 1 中为何在不同 pH 环境下的酵母生物量不同,葡萄糖消耗基本相同,但乙醇的最终产量却明显不同的问题。

值得注意的是,在上述不同的发酵阶段,在影响 PC_1 、 PC_2 和 PC_3 的分值中,1440 cm^{-1} 和 1600 cm^{-1}

左右的峰在几乎所有的阶段都出现。1440 cm^{-1} 主要表征脂类物质,而 1600 cm^{-1} 源自酪氨酸和苯丙氨酸,对比同样来自这两种氨基酸的 850、1004 cm^{-1} 等峰的变化,Huang 等^[17]认为其与酵母细胞内线粒体的呼吸水平有关。这些数据说明,不同初始 pH 值乙醇发酵中,pH 环境可能影响了酵母细胞的脂类物质合成和细胞的呼吸代谢,进而影响了底物的代谢方向和产物的合成。

4 结 论

实时控制乙醇发酵的 pH 值在乙醇发酵中举足轻重,关系到乙醇的产量和质量问题。本文应用光镊拉曼光谱技术对乙醇发酵进行动态观察,从胞内主要生物大分子的分子光谱强度和变化趋势来看,pH 值太低或太高都不利于乙醇的生成,3 种不同的初始 pH 值培养基中,底物消耗基本相同,但 pH 6.5 的培养基中,酵母细胞的生长量最高,而乙醇产量并不是最高,pH 3.0 的细胞生长量最低,乙醇产量也最低。各主要特征峰的动态变化和细胞光谱主成分分析显示,pH 值对酵母细胞生理状态的影响从发酵的初始阶段就开始了,并影响底物的代谢方向和产物生成效率;发酵后期,pH 3.0 胞内物质含量最高,其次是 pH 4.5,最低的是 pH 6.5;而 pH 值对酵母细胞的影响,可能是影响了酵母细胞的脂类物质合成和细胞的呼吸代谢,进而影响了底物的代谢方向和产物的合成。从分子振动光谱和单细胞分析的角度初步分析了不同起始 pH 值下酵母乙醇发酵过程,为了解其生理机制提供全新的可参考信息。

参 考 文 献

- Zhang Xingyuan. Principle of Fermentation[M]. Beijing: Science Press, 2006. 372~376
张星元. 发酵原理[M]. 北京: 科学出版社, 2006. 372~376
- C. A. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(4): 249~251
- Zhang Yong, Ye Anpei, Wen Cheng. A micro-Raman spectroscopy combing with optical tweezers [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(2): 491~497
张勇, 叶安培, 闻丞. 一种与光镊结合的显微拉曼光谱技术[J]. 光学学报, 2010, **30**(2): 491~497
- Wang Guiwen, Peng Lixin, Shen Weidong *et al.*. Raman spectroscopic analysis of carotenoids of single human blood platelets[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0630002
王桂文, 彭立新, 申卫东等. 拉曼光谱分析人类单个血小板的类胡萝卜素[J]. 光学学报, 2011, **31**(6): 0630002
- W. E. Huang, M. Li, R. M. Jarvis *et al.*. Shining light on the microbial world: the application of Raman microspectroscopy[J].

- Adv. Appl. Microbiol.*, 2010, **70**: 153~186
- Ye Yuhuang, Chen Yang, Li Yongzeng *et al.*. Discrimination of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal cell lines based on confocal Raman microspectroscopy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2012, **39**(5): 0504003
叶宇煌, 陈阳, 李永增等. 基于拉曼光谱的鼻咽癌与正常鼻咽细胞株的分类研究[J]. 中国激光, 2012, **39**(5): 050400
- L. X. Peng, G. W. Wang, W. Liao *et al.*. Intracellular ethanol accumulation in yeast cells during aerobic fermentation: a Raman spectroscopic exploration [J]. *Let. Appl. Microbiol.*, 2010, **51**(6): 632~638
- Z. H. Tao, G. W. Wang, X. D. Xu *et al.*. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells[J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, **314**(1): 42~48
- Li Zida, Lai Junzhuo, Liao Wei *et al.*. Raman spectroscopic profile of ethanol fermentation in high gravity cassava starch brewing[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, **32**(3): 0317001
李自达, 赖钧灼, 廖威等. 浓醪乙醇发酵的单细胞拉曼光谱表征[J]. 光学学报, 2012, **32**(3): 0317001
- C. Xie, Y. Q. Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, **93**(5): 2982~2986
- Zhao Yixin, Ruan Xiaodong. Determination of sample's size in biomedicine statistics [J]. *Journal of Southwest Nationalities College (Natural Science Edition)*, 1995, **21**(1): 86~89
赵益新, 阮晓冬. 生物医学统计分析中样本容量的确定[J]. 西南民族学院学报(自然科学版), 1995, **21**(1): 86~89
- P. Geladi, D. Macdougall, H. Martens. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat [J]. *Appl. Spectrosc.*, 1985, **39**(3): 491~500
- Lu Yongjun, Qu Yanling, Song Min. Research on the correction chart of near infrared spectra by using multiple scatter correction technique [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(5): 877~880
芦永军, 曲艳玲, 宋敏. 近红外相关光谱的多元散射校正处理研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, **27**(5): 877~880
- J. Delder, K. D. Gussem, P. Vandennabeele *et al.*. Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: an explorative study on *Cupriavidus metallidurans* [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2007, **585**(2): 234~240
- J. Delder, K. D. Gussem, P. Vandennabeele *et al.*. Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: focus on a group of structurally similar biomolecules-fatty acids [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2007, **603**(2): 167~175
- G. J. Puppels, F. F. M. Mul, C. Otto *et al.*. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy [J]. *Nature*, 1990, **347**(6290): 301~303
- Y. S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto *et al.*. Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time-and space-resolved Raman spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(30): 10009~10019
- Du Yiping, Pan Tiejing, Zhang Yulan. The Application of Chemometrics [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008. 148~154
杜一平, 潘铁英, 张玉兰. 化学计量学应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008. 148~154
- N. K. Budhavaram, J. R. Barone. Quantifying amino acid and protein substitution using Raman spectroscopy [J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2011, **42**(3): 355~362