

# 拉曼光谱与 MCR 算法分析酵母菌株间细胞乙醇发酵代谢差异

欧海声<sup>1,2</sup>, 张鹏飞<sup>3</sup>, 王晓春<sup>2</sup>, 陈英<sup>2</sup>, 刘军贤<sup>1\*</sup>, 王桂文<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>广西师范大学物理与技术学院, 广西 桂林 541004;

<sup>2</sup>广西科学院生物科学与技术研究中心, 广西 南宁 530007;

<sup>3</sup>天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072

**摘要** 应用拉曼镊子采集了 3 个酵母菌株在乙醇发酵不同时段单细胞光谱, 并利用多元曲线分辨-交替最小二乘 (MCR-ALS) 方法对光谱数据进行挖掘, 以提取与特定生物分子相关的光谱曲线, 了解不同酵母菌株的乙醇发酵代谢差异与适应机制。结果发现: 工业菌株 Bp1 的发酵性能最好, 实验室菌株 INVSc1 次之, 而 W303a 菌株最差; MCR-ALS 可从 3 个菌株中分别解析得到 5 个、5 个和 3 个代表不同类型的生物大分子光谱曲线; Bp1 菌株会增加麦角甾醇的含量和三酰基甘油的积累, 以赋予细胞更高的乙醇耐受性; 同时, 不同生物大分子在 Bp1 细胞间的含量相对均一, 而 INVSc1 和 W303a 菌株的胞间异质性比较大, 显示出细胞异质性对菌株的发酵性能和发酵效率有重要的影响。拉曼光谱结合 MCR-ALS, 可以作为一个简单而强大的工具, 用于快速分析酵母细胞在发酵过程中的代谢变化, 进一步了解酵母细胞的抗逆机制。

**关键词** 生物光学; 拉曼光谱; 多元曲线分辨-交替最小二乘法; 乙醇发酵; 异质性; 单细胞分析

中图分类号 O657.37

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1507406

## 1 引言

进入 21 世纪, 应对气候变化、发展可再生能源已成为全球共识, 越来越多的国家加快了开发生物能源的步伐。生物燃料乙醇以其具有的可再生、环境友好、技术成熟、使用方便、易于推广等优势, 成为替代汽油等石化燃料的理想产品。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*) 是用于生物乙醇发酵的主要微生物<sup>[1-3]</sup>。然而, 乙醇虽然是发酵的最终产品, 但同时也是限制酵母发酵并最终导致乙醇停止生产的主要因素<sup>[4-7]</sup>。为了提高乙醇产量, 降低生产成本, 国内外学者已实施了大量的研究来构建耐乙醇的酵母菌株<sup>[2,3,8]</sup>。然而, 这些研究通常仅限于筛选和获得具有耐受性的突变体, 没有对其在发酵过程中的表型变化进行深入研究。事实上, 很有必要了解乙醇对酵母的影响, 以及耐乙醇的酵母应对乙醇压力的机理<sup>[8]</sup>。

在现有的方法中, 气相色谱-质谱法 (GC-MS) 和液相色谱-质谱法 (LC-MS) 已被用于分析酿酒酵母在乙醇胁迫下的表型, 这是因为它们能同时评估大量代谢物<sup>[6,8-11]</sup>。然而, 这些方法需要在分析前提取生物大分子, 这就不可避免地破坏了细胞, 使其无法用

于下游分析。此外, 采用基于质谱的测量方法, 不仅耗时耗力, 而且通常得到的是整个群体的平均信息, 导致单个细胞间的表型差异被掩盖<sup>[10-11]</sup>。众所周知, 在逆境条件下, 群体中的微生物细胞可能会表现出异质性, 即单个细胞的反应是不同的<sup>[12-13]</sup>。因此, 发展基于单细胞技术的表型分析策略, 对于进一步了解酵母细胞的抗逆机制具有重要意义。

拉曼光谱是一种基于拉曼散射的振动光谱技术, 可以在单细胞水平上获取生物样品的分子组成和化学结构信息<sup>[14-15]</sup>。由于无需标记, 只需制备极少的样品或无需制备样品, 也不会受到水的光谱干扰, 拉曼光谱在单细胞研究和生物医学领域有着广泛的应用<sup>[14-19]</sup>。激光镊子拉曼光谱 (LTRS) 也称为拉曼镊子, 是激光镊子与显微拉曼的结合, 融合了无接触光学操控和拉曼分析的优势, 可以捕获悬浮在水溶液中的单个微生物细胞, 并进行快速无损的实时检测。与传统的拉曼技术相比, 该技术不需要在分析前对样品进行干燥或固定等预处理, 因此更适用于单细胞分析<sup>[15,20]</sup>。目前, 拉曼镊子技术已被广泛应用于微生物细胞、红细胞以及肿瘤细胞的研究<sup>[15,21-22]</sup>。尽管拉曼镊子技术显示出巨大的应用前景, 但是生物系统的拉曼光谱通常是

收稿日期: 2022-02-09; 修回日期: 2022-03-14; 录用日期: 2022-03-30

基金项目: 国家自然科学基金 (30760010, 32060777)、广西自然科学基金 (2013GXNSFAA019043, 2020GXNSFAA259021)

通信作者: \*wguiwen@gxas.cn; \*\*jxliu@mail.gxun.edu.cn

由多种生物分子产生的光谱与底物和自体产生的背景光谱组成的复合光谱,因此对单细胞拉曼光谱的数据分析依然是一项具有挑战性的任务<sup>[23-24]</sup>。

为了从复杂的拉曼光谱数据中提取潜在的生物学信息,已开发了多种将整个光谱考虑在内的化学计量学方法<sup>[25-26]</sup>。其中,多元曲线分辨-交替最小二乘(MCR-ALS)方法是一种强大的多元统计算法,适用于探索性分析。MCR-ALS方法可以在没有任何先验信息的条件下,从多组分混合物的光谱数据中提取出与单个组分相关的光谱曲线<sup>[27-31]</sup>。因此,本文探索性地应用MCR-ALS来分析不同酵母菌株在乙醇发酵过程中的单细胞拉曼光谱数据集,以期从携带大量生化信息的光谱数据集中提取出与特定生物分子相关的光谱强度变化信息,这将有利于进一步了解酿酒酵母的抗逆机制。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 1) 实验菌株

酿酒酵母的菌株 Bp1 由广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心筛选、保藏;INVSc1 和 W303a 均是实验室常用的实验菌株,其中 W303a 菌株由中国科学院微生物研究所戴欣研究员惠赠。

#### 2) 培养基

平板和种子培养基(YEPD):葡萄糖 20 g,酵母提取物 10 g,蛋白胨 20 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值为 6.0。发酵培养基:葡萄糖 300 g,蛋白胨 5.0 g,CaCl<sub>2</sub> 0.06 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.06 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值为 4.5。

### 2.2 方法

#### 1) 培养、取样与生物量测定

挑取单个活化的酵母菌落,接入含有 50 mL YEPD 的 150 mL 锥形瓶中,在 30 °C、220 r/min 条件下过夜培养,并作为种子液。以 5% 的接种量转接到含 150 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 32 °C、100 r/min 条件下培养。从接种时起,在第 0~18 h 内每 3 h 取样一次,在第 24~72 h 内每 6 h 取样一次,每次均取样 2 mL。

应用比浊法测定酵母细胞的生长量。发酵液经 5 倍稀释,用普析通用 TU-1901 紫外-可见分光光度计测定 600 nm 处的光密度值( $D_{600}$ )。

#### 2) 实验系统与光谱收集

将波长为 780 nm、功率为 18 mW 的半导体激光器出射激光导入倒置生物显微镜(TE2000U,尼康,日本),经油浸物镜(数值孔径 NA 为 1.30,100×)聚焦后形成单光束光势阱,用于俘获细胞;该光束同时用于激发被俘获细胞的拉曼散射。将样品放置在厚度为 100 μm 的石英玻璃样品槽中,拉曼信号经物镜收集并聚焦进入 LS785 光谱仪(Acton,美国)的输入狭缝,由

耦合到光谱仪的 CCD(PIXIS 400BR,普林斯顿仪器公司,美国)采集。系统的分辨率为 6 cm<sup>-1</sup>,并用聚苯乙烯小球(直径为 2.0 μm)校正系统。取 150 μL 发酵液,并置于样品槽内,用盖玻片密封。酵母细胞光谱收集过程如下:使用 100 倍油浸物镜观察酵母细胞,并利用激光镊子随机俘获单个细胞;设置积分时间为 30 s,收集俘获细胞的拉曼光谱,并在细胞附近以相同条件收集没有俘获细胞的拉曼光谱作为背景光谱。每个样品收集 40~50 个俘获细胞的拉曼光谱和 5 个未俘获细胞的背景光谱。发酵液光谱收集过程如下:以同样的实验条件收集发酵液的光谱,以纯水为背景收集背景光谱。

### 2.3 数据处理与 MCR 分析

利用自编的 MATLAB 程序读取 WinSpec/32 光谱文件进行数据预处理,将样品细胞光谱减去背景光谱、采用 17 点 Savitzky Golay 法平滑并用 ALS 算法进行基线校正<sup>[32]</sup>,预处理效果如图 1 所示。

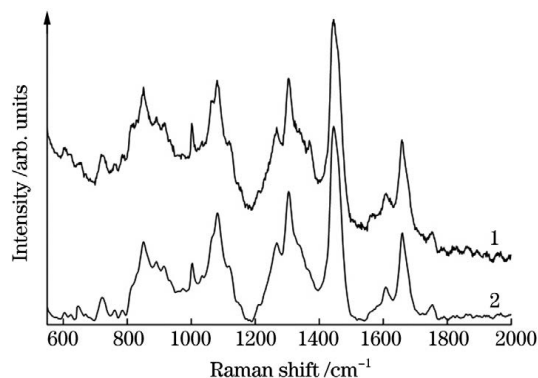


图 1 单个酵母细胞原始拉曼光谱(曲线 1)与预处理后的光谱(曲线 2)

Fig. 1 Original Raman spectrum (curve 1) and preprocessed spectrum (curve 2) of single yeast cell

MCR-ALS 是一种用于分辨未知混合物中多个组分响应的化学计量学方法<sup>[33]</sup>。在多组分朗伯-比尔定律有效的前提下,MCR 通过双线性模型可以将混合物的光谱数据矩阵  $D(n \times m)$  分解为与光谱强度相对应的  $C(n \times r)$  矩阵和与纯光谱相对应的  $S^T(r \times m)$  矩阵<sup>[34]</sup>。这个双线性模型可表示为

$$D = CS^T + E, \quad (1)$$

式中: $E(n \times m)$  为模型不拟合的残差矩阵。

使用 MCR-ALS 方法分析未知混合物组分的步骤如下:首先,确定混合系统中纯组分的数量。根据与化学物质相关的奇异值大于与实验误差和噪声相关的奇异值的特点,可通过奇异值分解(SVD)确定纯组分的数量。其次,确定数据矩阵中存在的纯组分的光谱。由于此信息并非在所有的情况下可用,因此可以通过诸如渐进因子分析(EFA)<sup>[35]</sup>或使用基于纯变量的 SIMPLISMA 算法来估算  $C$  和  $S^T$ <sup>[36]</sup>。然后,在约束条件下通过交替最小二乘(ALS)法对光谱强度的初始估计值进行迭代优化。在每次迭代中更新光谱矩阵( $S^T$ )

和光谱强度矩阵(C)的结果<sup>[37]</sup>。最后,使用拟合误差( $\eta_{\text{Lof}}$ )和解释方差( $R^2$ )参数来评估 MCR 模型的质量。

$$\eta_{\text{Lof}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (g_{ij} - \hat{g}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J g_{ij}^2}} \times 100\%, \quad (2)$$

$$R^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J [g_{ij}^2 - (g_{ij} - \hat{g}_{ij})^2]}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J g_{ij}^2}} \times 100\%, \quad (3)$$

式中: $g_{ij}$  为  $i$  行  $j$  列的原始矩阵元素; $\hat{g}_{ij}$  为由 MCR 模型恢复的矩阵元素。虽然  $\eta_{\text{Lof}}$  和  $R^2$  解释内容相同,但  $\eta_{\text{Lof}}$  对拟合差异更为敏感。

在本研究中,首先将不同时间段的多个细胞的拉曼光谱组成列增矩阵<sup>[28]</sup>,然后使用 EFA 方法,对组分的光谱强度曲线进行初步估计。为了减小分辨结果的模糊程度,对光谱强度使用了非负性约束。

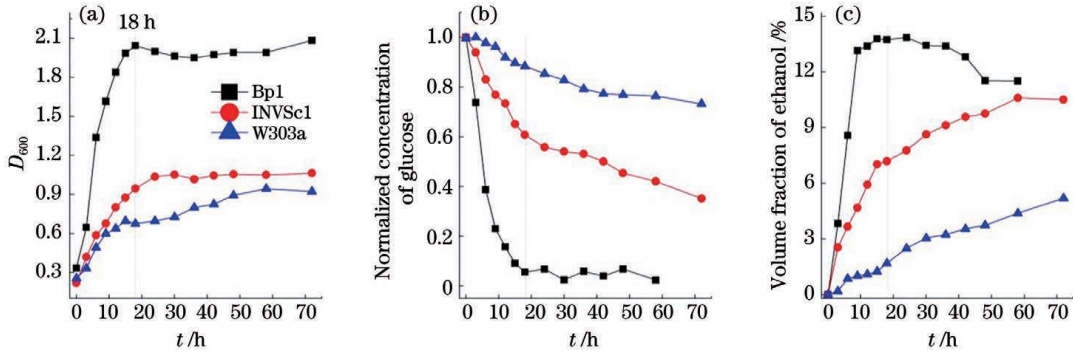


图 2 3 个酵母菌株的乙醇发酵进程。(a)生长曲线;(b)葡萄糖消耗量;(c)乙醇的体积分数

Fig. 2 Ethanol fermentation of *S. cerevisiae* strains Bp1, INVSc1, and W303a. (a) Growth curves; (b) consumption of glucose; (c) volume fraction of ethanol

### 3.2 单细胞平均拉曼光谱

图 3 所示为 3 个菌株在第 6,12,24,36,58 h 等时

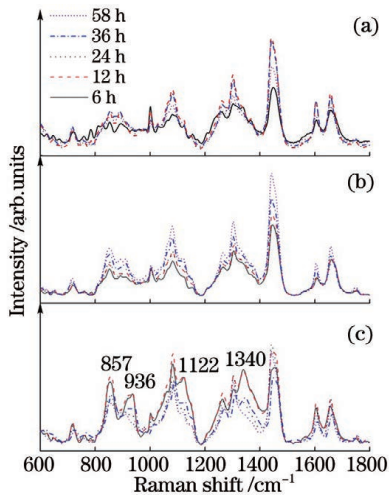


图 3 6,12,24,36,58 h 时的单个酵母细胞的平均拉曼光谱。

(a)Bp1 菌株;(b)INVSc1 菌株;(c)W303a 菌株

Fig. 3 Averaged Raman spectra of single yeast cells at 6, 12, 24, 36, 58 h. (a) Bp1 strain; (b) INVSc1 strain; (c) W303a strain

在 MATLAB 工具箱 MCR-ALS GUI 2.0 上运行 MCR-ALS 算法<sup>[36]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 发酵概况

图 2 所示为 3 个菌株发酵过程的生长曲线和葡萄糖消耗以及乙醇生产的状况。Bp-1 菌株在种子液接入发酵培养基后几乎没有出现迟滞期,随即进入快速增长的对数生长期,持续到第 18 h,随后生长逐渐进入稳定期;葡萄糖的快速消耗也在 18 h 后进入尾声,而乙醇生成与生长几乎同步,在第 24 h 左右达到峰值。INVSc1 菌株和 W303a 菌株的种子液接入发酵培养基后生长较慢,生物量较低,与此对应的是,葡萄糖消耗量和乙醇生成速率与 Bp-1 菌株相比差距很大,特别是 W303a 菌株。由此可见,Bp-1 菌株面对乙醇发酵环境具有较好的适应性,展示出更高的胁迫耐受性和发酵性能。

刻的单细胞平均拉曼光谱。Bp1 菌株和 INVSc1 菌株在发酵初期的平均光谱信号强度相对较弱,而中后期随着乙醇产物含量的升高而逐渐增强;W303a 菌株则相反,在发酵前期拉曼光谱强度较强,随着发酵时间增长而逐渐减弱,而且前期的较强峰分别出现在 857, 936,1122,1340  $\text{cm}^{-1}$  等位置。

### 3.3 单细胞光谱数据的 MCR 分解

图 3 所示的平均光谱只是粗略地显示不同的菌株在乙醇发酵过程的差异,为了解酵母菌株背后的抗逆机制,应用 MCR-ALS 算法分别对 Bp1、INVSc1、W303a 这 3 个菌株发酵过程的拉曼光谱数据进行数据挖掘,其结果如图 4~6 所示。所构建的 3 个 MCR 模型的拟合误差分别为 4.6355%、4.3730%、9.0414%,解释方差 ( $R^2$ ) 分别为 99.7851%、99.8088%、99.1825%,这些数据表明 MCR 模型具有较高的拟合质量。

图 4(a)所示为从 Bp-1 菌株的光谱数据中分离出的 5 条光谱。曲线 1 既包含由磷脂酰胆碱贡献的 719  $\text{cm}^{-1}$  峰,以及 1082, 1266, 1302, 1445, 1656,

1750  $\text{cm}^{-1}$  等脂类特征峰,又包含源自蛋白质的苯丙氨酸(1001  $\text{cm}^{-1}$ )、酪氨酸(849  $\text{cm}^{-1}$ )和色氨酸(873  $\text{cm}^{-1}$ )等特征峰,因此将组分 1 指认为脂蛋白质<sup>[38]</sup>。曲线 2 和曲线 1 类似,同样包含脂类物质的特征峰,而 714  $\text{cm}^{-1}$  和 1602  $\text{cm}^{-1}$  (麦角甾醇,是真菌细胞膜的重要成分)处的峰值表明,磷脂在该组分中具有显著的贡献,因此将组分 2 指认为磷脂物质<sup>[39-40]</sup>。曲线 3 在 1302  $\text{cm}^{-1}$  和 1440  $\text{cm}^{-1}$  处的一 $\text{CH}_2$  变形带、1082  $\text{cm}^{-1}$  和 1656  $\text{cm}^{-1}$  处的脂类 C—C 键拉伸,以及 1750  $\text{cm}^{-1}$  处的酯类带,与已有报道的三酰基甘油(TAG)的光谱极为相似<sup>[41-42]</sup>,因此组分 3 属于三酰基甘油类物质。曲线 4 包含了 851, 908, 1101, 1126, 1340, 1368, 1462  $\text{cm}^{-1}$  等峰,是糖类物质的典型特征峰,与多糖物质(糖原)的光谱基本相同,因此将组分 4 指认为多糖物质<sup>[43-45]</sup>。曲线 5 具有 1230~1280  $\text{cm}^{-1}$  附近的酰胺 III 带以及 1645~1680  $\text{cm}^{-1}$  处的酰胺 I 带,以及源自蛋白质 CH 变性振动峰(1340  $\text{cm}^{-1}$ )和苯

丙氨酸环呼吸模式(1001  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>[16]</sup>,显示其主要成分为蛋白质<sup>[46]</sup>,此外还包含核酸物质的 723, 782, 1095, 1575  $\text{cm}^{-1}$  峰,因此组分 5 应是核酸与蛋白质的混合物。

图 4(b)~(f)显示了由上述分析得到的每类组分在发酵过程中的光谱强度变化趋势。组分 1 在发酵初始时含量较高,3 h 后随着乙醇的生成有所下降,而后逐渐升高,在 36 h 的发酵后期基本达到了最大值[图 4(b)]。磷脂物质和甘油三酯类在细胞内含量的变化与乙醇含量的变化类似,在 0~6 h 内含量比较稳定,随着乙醇含量的增加在 12~18 h 达到峰值,后期随着乙醇含量稳定而有所降低[图 4(c)、(d)]。多糖类物质在酵母细胞内的含量相对较低,且在整个发酵过程变化不明显[图 4(e)]。核酸与蛋白质是细胞生长的基础,在发酵初期胞内含量较高、胞间异质性较大,而随着细胞生长进入稳定期、乙醇含量达到最高值后(18 h),核酸与蛋白质的含量趋于稳定且细胞间差异减小。

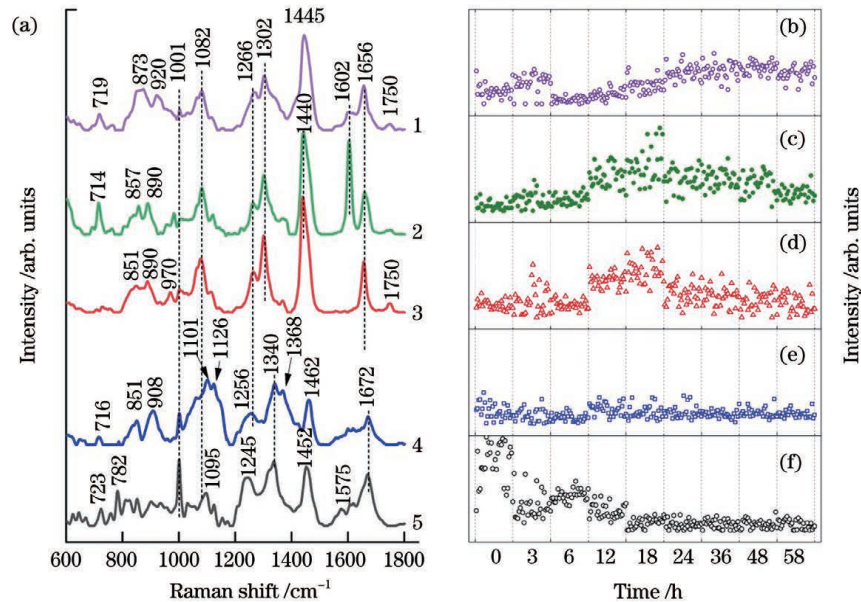


图 4 菌株 Bp1 的 MCR-ALS 解析结果。(a)从 MCR-ALS 得到的 5 条光谱曲线;(b)~(f)对应的单个细胞在不同时间点的相对体积分数

Fig. 4 Resolution results of MCR-ALS of *S. cerevisiae* strain Bp1. (a) Recovered curves from single-cell Raman spectra; (b)~(f) relative volume fractions of individual cells corresponding to curves 1~5 in Fig. 4(a) respectively at different time points

INVSc1 菌株生长较 Bp1 慢、葡萄糖利用率不高,但最终的乙醇产量比较高(图 2)。与 Bp1 菌株类似,从 INVSc1 菌株的光谱数据矩阵得到 5 条光谱[图 5(a)],其中 INVSc1 菌株的曲线 1 与 Bp1 菌株的曲线 1 类似,包含了 1082  $\text{cm}^{-1}$  和 1302  $\text{cm}^{-1}$  等脂类特征峰,并具有由磷脂基头贡献的 717  $\text{cm}^{-1}$  峰以及由麦角甾醇贡献的 1602  $\text{cm}^{-1}$  峰,而且源自蛋白质的苯丙氨酸(1001  $\text{cm}^{-1}$ )、酪氨酸(857  $\text{cm}^{-1}$ )等特征峰也包含在其中,因此,组分 1 属于含脂蛋白,其在细胞中的含量随着乙醇发酵过程的持续缓慢增加。INVSc1 菌株的曲线 2 与 Bp1 菌株的曲线 3 基本相同,因此组

分 2 属于 TAG 类物质,其含量在发酵过程基本稳定不变,但胞间异质性很大。INVSc1 菌株的曲线 3 与 Bp1 菌株的曲线 1 基本相同,但值得注意的是,由蛋白质贡献的弱苯丙氨酸峰不再包含在其中,因此将组分 3 归为磷脂物质;INVSc1 菌株的曲线 4 与 Bp1 菌株的曲线 4 类似,因此组分 4 为多糖物质,这类物质和磷脂一样,随着乙醇发酵过程的持续缓慢增加,其细胞间差异同时增大。INVSc1 菌株的曲线 5 是典型的蛋白质曲线,1672  $\text{cm}^{-1}$  峰表明该蛋白的二级结构以  $\beta$ -折叠为主,其含量在发酵初期缓慢升高,9 h 后缓慢下降,胞间异质性不大。

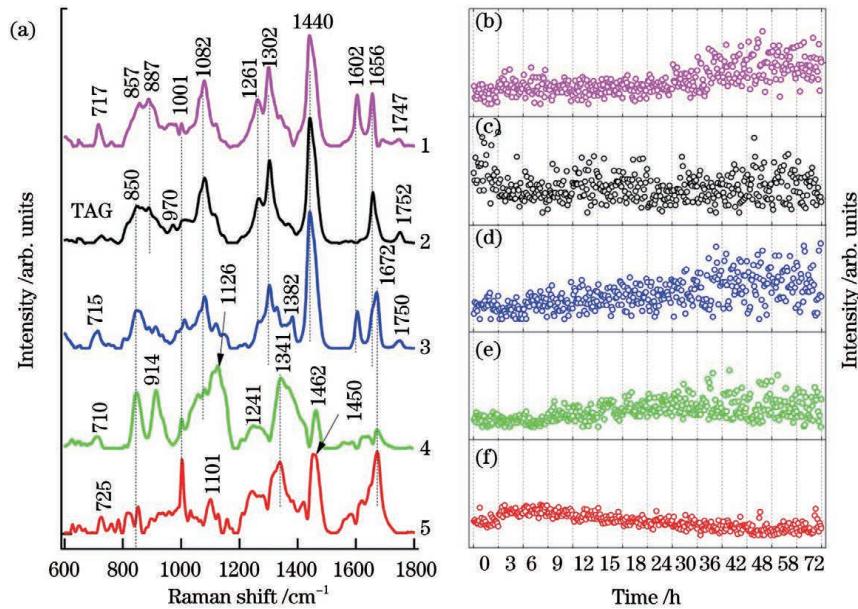


图 5 菌株 INVSc1 的 MCR-ALS 解析结果。(a) 从 MCR-ALS 得到的 5 条光谱;(b)~(f) 对应的单个细胞在不同时间点的相对体积分数

Fig. 5 Resolution results of MCR-ALS of INVSc1 strain. (a) Recovered curves from single-cell Raman spectra; (b)–(f) relative volume fractions of individual cells corresponding to curves 1–5 in Fig. 5(a) respectively at different time points

图 6 所示为从 W303a 菌株的数据矩阵分离出的 3 条光谱曲线及其对应的光谱强度曲线。W303a 菌株的曲线 1 包含了 723, 863, 893, 1082, 1266, 1302, 1445, 1656, 1753  $\text{cm}^{-1}$  等脂类特征峰, 与 INVSc1 菌株的曲线 1 基本相同, 因此组分 1 为脂类物质<sup>[39-40]</sup>; 该物质的含量在 0~24 h 内基本稳定, 而在 36~48 h 内略有增加[图 6(b)]。W303a 菌株的曲线 2 具有 857, 938, 1126, 1346, 1463  $\text{cm}^{-1}$  等糖类物质的典型特征峰, 其曲线与多糖物质糖原基本相同, 因此将组分 2

指认为糖原<sup>[43-45,47]</sup>。该糖原在细胞间的含量差异也很大, 在 6~12 h 发酵初期含量较高, 在 48 h 后恢复到初始状态且胞间异质性减小[图 6(c)]。W303a 菌株的曲线 3 既含有类似曲线 1 的 1302, 1440, 1745  $\text{cm}^{-1}$  等脂类物质特征峰, 也含有 1001  $\text{cm}^{-1}$  和 1670  $\text{cm}^{-1}$  等蛋白质峰, 与 INVSc1 菌株的曲线 3 基本相同, 该组分是脂类和蛋白质的复合物, 该物质在 0 h 时含量很高, 进入发酵过程后含量显著降低并基本不变。W303a 菌株细胞间的这几类物质含量在发酵过程均

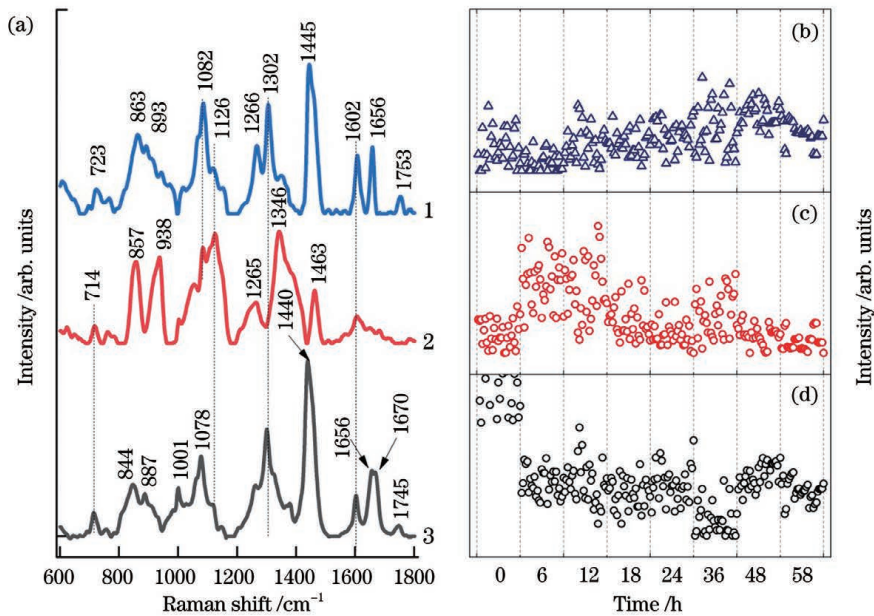


图 6 菌株 W303a 的 MCR-ALS 解析结果。(a) 从 MCR-ALS 得到的 3 条光谱曲线;(b)~(d) 对应的单个细胞在不同时间点的相对体积分数

Fig. 6 Resolution results of MCR-ALS of W303a strain. (a) Recovered curves from single-cell Raman spectra; (b)–(d) relative volume fractions of individual cells corresponding to curves 1–3 in Fig. 6(a) respectively at different time points

有较大的差异。

## 4 讨 论

采用 MCR-ALS 方法分析了不同酵母菌株在乙醇发酵过程中的单细胞拉曼光谱数据集。从 3 个菌株的光谱矩阵中分别解析出 5 个或 3 个不同类型物质的光谱曲线,且主要是与脂类相关的物质(磷脂物质、甘油三酯及脂蛋白)、多糖或者蛋白质。蛋白质类物质含量通常是在发酵初期较高,随着乙醇生成后逐渐降低;多糖物质含量在工业菌株 Bp1 中没有明显变化,在乙醇发酵能力较弱的 INVSc1 和 W303a 菌株中却有较为明显的涨落。发酵速度最慢、乙醇产量最低的 W303a 菌株在发酵过程中,与脂类相关的物质的含量没有明显增加,而在产乙醇能力较高的 INVSc1 菌株和 Bp1 菌株中,与脂类相关的物质的含量均随着乙醇含量的增加而升高,显示出脂类物质在酵母细胞抵抗乙醇毒性方面具有突出的作用。乙醇含量较高时,会破坏细胞膜的完整性,破坏或改变膜的通透性,破坏蛋白质构象,影响糖和氨基酸等的吸收,引起包括氨基酸和离子在内的各种细胞内成分的渗漏等<sup>[48]</sup>。为了应对乙醇胁迫,细胞可能会改变或重铸其细胞膜的结构,以保持细胞膜的完整性;还可能会合成一些热激蛋白(Hsps)和保护剂,以防止蛋白质变性和减轻乙醇毒性对细胞内部的损伤<sup>[1,48]</sup>。

Bp1 菌株和 INVSc1 菌株在发酵后期具有较高的磷脂含量,显示出酵母细胞为了适应不断积累的乙醇,会增加麦角甾醇的含量。较高的麦角甾醇水平可以促进细胞的代谢活性,并能增加膜的硬度,从而形成有效的膜屏障,阻止外源乙醇的渗入<sup>[7]</sup>。而三酰基甘油的积累可以增加细胞膜的流动性,使内源乙醇更易流出<sup>[49]</sup>。由此推测,在 Bp1 菌株中,为了减轻乙醇毒性对细胞的损伤,酵母细胞可能会增加三酰基甘油的合成量以增加细胞膜的流动性,从而使内源乙醇更易流出;酵母细胞也会增加麦角甾醇的合成量,以维持细胞膜的完整性。因此,Bp1 株比其余两个菌株具有更强的胁迫耐受性和更优的发酵性能。

面对同样的胁迫环境,乙醇发酵性能较好的 Bp1 菌株中,不同生物大分子在细胞间的含量都相对均一(图 4),而另两个乙醇耐受性较弱的菌株细胞间异质性很大(图 5、图 6),由此说明在乙醇发酵过程中细胞异质性对菌株的发酵性能和发酵效率有重要的影响。

## 5 结 论

乙醇耐受性不同的酵母菌株在发酵过程中的代谢变化通常是不同的,为了解它们在发酵过程中对乙醇耐受背后的分子机制,有必要发展简单、经济的方法,用于快速分析酵母细胞的代谢变化。本研究应用拉曼光谱结合 MCR-ALS,在没有任何先验信息的条件下,

可以在单细胞水平上,快速获取酵母细胞中主要的生物大分子成分(磷脂、蛋白质、多糖、甘油三酯等)在发酵过程中的浓度变化信息,发现脂类物质和细胞的异质性对菌株的发酵性能和发酵效率有重要的影响。单细胞拉曼光谱结合 MCR-ALS 是探究酵母细胞的抗逆性机制、了解细胞异质性的优秀分析手段,具有较好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Auesukaree C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124(2): 133-142.
- [2] Burphan T, Tatip S, Limcharoensuk T, et al. Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13069.
- [3] Wu R Z, Chen D, Cao S W, et al. Enhanced ethanol production from sugarcane molasses by industrially engineered *Saccharomyces cerevisiae* via replacement of the PHO<sub>4</sub> gene [J]. *RSC Advances*, 2020, 10(4): 2267-2276.
- [4] Dong S J, Yi C F, Li H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 69: 196-203.
- [5] Elbakush A E, Güven D. Evaluation of ethanol tolerance in relation to intracellular storage compounds of *Saccharomyces cerevisiae* using FT-IR spectroscopy [J]. *Process Biochemistry*, 2021, 101: 266-273.
- [6] Li R Y, Miao Y J, Yuan S K, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* Sc<sub>131</sub> [J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 203: 103377.
- [7] Wang Y F, Zhang S X, Liu H Q, et al. Changes and roles of membrane compositions in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(12): 1417-1426.
- [8] Kim S, Kim J, Song J H, et al. Elucidation of ethanol tolerance mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* by global metabolite profiling [J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(9): 1221-1229.
- [9] Crutchfield C A, Lu W Y, Melamud E, et al. Mass spectrometry-based metabolomics of yeast [M] // *Methods in enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 2010: 393-426.
- [10] Farrés M, Piña B, Tauler R. Chemometric evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* metabolic profiles using LC-MS [J]. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, 2015, 11(1): 210-224.
- [11] Ming M, Wang X Y, Lian L L, et al. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Molecular Omics*, 2019, 15(3): 216-221.
- [12] Carlquist M, Fernandes R L, Helmark S, et al. Physiological heterogeneities in microbial populations and implications for physical stress tolerance [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 94.
- [13] Lau W Y, Chun K H, Chan W T. Correlation of single-cell ICP-MS intensity distributions for the study of heterogeneous cellular responses to environmental stresses [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2017, 32(4): 807-815.
- [14] He Y H, Wang X X, Ma B, et al. Ramanome technology platform for label-free screening and sorting of microbial cell factories at single-cell resolution [J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107388.
- [15] Qiu S F, Li M M, Liu J, et al. Study on the chemodrug-induced

- effect in nasopharyngeal carcinoma cells using laser tweezer Raman spectroscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(4): 1819-1833.
- [16] Iwasaki K, Kaneko A, Tanaka Y, et al. Visualizing wax ester fermentation in single *Euglena gracilis* cells by Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 128.
- [17] 王其, 曾万聃, 夏志平, 等. 基于随机森林算法的食源性致病菌拉曼光谱识别[J]. *中国激光*, 2021, 48(3): 0311002.  
Wang Q, Zeng W D, Xia Z P, et al. Recognition of food-borne pathogenic bacteria by Raman spectroscopy based on random forest algorithm[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(3): 0311002.
- [18] Tanniche I, Collakova E, Denbow C, et al. Characterizing metabolic stress-induced phenotypes of *synechocystis* PCC6803 with Raman spectroscopy[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8535.
- [19] 李阳曦, 胡成全, 马飞龙, 等. 智能化精准光学诊疗技术研究进展[J]. *中国激光*, 2021, 48(15): 1507002.  
Li Y X, Hu C Q, Ma L F, et al. Research progress in intelligent and precise optical diagnosis and treatment technology[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(15): 1507002.
- [20] Chen Y, Wang Z Q, Huang Y, et al. Label-free detection of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells via laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(2): 500-513.
- [21] Lin D, Zheng Z C, Wang Q W, et al. Label-free optical sensor based on red blood cells laser tweezers Raman spectroscopy analysis for ABO blood typing[J]. *Optics Express*, 2016, 24(21): 24750-24759.
- [22] Navas-Moreno M, Chan J W. Laser tweezers Raman microspectroscopy of single cells and biological particles[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1745: 219-257.
- [23] Georg Schulze H, Konorov S O, Piret J M, et al. Empirical factors affecting the quality of non-negative matrix factorization of mammalian cell Raman spectra[J]. *Applied Spectroscopy*, 2017, 71(12): 2681-2691.
- [24] Horii S, Ando M, Samuel A Z, et al. Detection of penicillin G produced by *penicillium chrysogenum* with Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution-alternating least-squares methods[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(11): 3223-3229.
- [25] Noothalapati H, Iwasaki K, Yamamoto T. Biological and medical applications of multivariate curve resolution assisted Raman spectroscopy[J]. *Analytical Sciences: the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 2017, 33(1): 15-22.
- [26] 季明强, 朱启兵, 黄敏, 等. 利用已知混合物拉曼光谱改善混合物成分识别精度的方法[J]. *中国激光*, 2020, 47(11): 1111001.  
Ji M Q, Zhu Q B, Huang M, et al. Method for improving identification accuracy of components in mixtures using Raman spectra of known mixtures[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(11): 1111001.
- [27] Ferreira G R, Soares F L F, Carneiro R L, et al. Evaluation of conversion during the synthesis of aluminum (III) methacrylate-based copolymers using Raman spectroscopy and multivariate curve resolution[J]. *Microchemical Journal*, 2015, 123: 62-69.
- [28] López-Pastor M, Domínguez-Vidal A, Ayora-Cañada M J, et al. Enzyme kinetics assay in ionic liquid-based reaction media by means of Raman spectroscopy and multivariate curve resolution[J]. *Microchemical Journal*, 2007, 87(2): 93-98.
- [29] Parastar H. Multivariate curve resolution methods for qualitative and quantitative analysis in analytical chemistry[J]. *Data Handling in Science and Technology*, 2015, 29: 293-345.
- [30] Soares F L F, Carneiro R L. In-line monitoring of cocrystallization process and quantification of carbamazepine-nicotinamide cocrystal using Raman spectroscopy and chemometric tools[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 180: 1-8.
- [31] Wu H L, Yin X L, Gu H W, et al. Chemometrics in bioanalytical chemistry [M] // *Encyclopedia of analytical chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2016: 1-38.
- [32] Roger J M, Boulet J C, Zeaiter M, et al. Pre-processing methods [M] // *Comprehensive chemometrics*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 1-75.
- [33] Jaumot J, Gargallo R, de Juan A N, et al. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005, 76(1): 101-110.
- [34] Ruckebusch C, Blanchet L. Multivariate curve resolution: a review of advanced and tailored applications and challenges[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 765: 28-36.
- [35] Maeder M, de Juan A. Two-way data analysis: evolving factor analysis [M] // *Comprehensive chemometrics*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 95-106.
- [36] Jaumot J, de Juan A N, Tauler R. MCR-ALS GUI 2.0: new features and applications [J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2015, 140: 1-12.
- [37] Martí-Aluja I, Ruisánchez I, Larrechi M S. Quantitative analysis of the effect of zidovudine, efavirenz, and ritonavir on insulin aggregation by multivariate curve resolution alternating least squares of infrared spectra[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 760: 16-24.
- [38] Hekmatara M, Heidari Baladehi M, Ji Y T, et al. D<sub>2</sub>O-probed Raman microspectroscopy distinguishes the metabolic dynamics of macromolecules in organellar anticancer drug response[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2125-2134.
- [39] Huang Y S, Nakatsuka T, Hamaguchi H O. Behaviors of the "Raman spectroscopic signature of life" in single living fission yeast cells under different nutrient, stress, and atmospheric conditions[J]. *Applied Spectroscopy*, 2007, 61(12): 1290-1294.
- [40] Matsuda A, Sakaguchi N, Shigeto S. Can cells maintain their bioactivity in ionic liquids? A novel single-cell assessment by Raman microspectroscopy[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2019, 50(6): 768-777.
- [41] Czamara K, Majzner K, Pacia M Z, et al. Raman spectroscopy of lipids: a review[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015, 46(1): 4-20.
- [42] Wang T T, Ji Y T, Wang Y, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 58.
- [43] Huang C K, Ando M, Hamaguchi H O, et al. Disentangling dynamic changes of multiple cellular components during the yeast cell cycle by *in vivo* multivariate Raman imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(13): 5661-5668.
- [44] Noothalapati H, Sasaki T, Kaino T, et al. Label-free chemical imaging of fungal spore walls by Raman microscopy and multivariate curve resolution analysis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27789.
- [45] Talari A C S, Movasaghi Z, Rehman S, et al. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2015, 50(1): 46-111.
- [46] Shipp D W, Sinjab F, Nottingher I. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2017, 9(2): 315.
- [47] Deng X C, Ali-Adeeb R, Andrews J L, et al. Monitor ionizing radiation-induced cellular responses with Raman spectroscopy, non-negative matrix factorization, and non-negative least squares [J]. *Applied Spectroscopy*, 2020, 74(6): 701-711.
- [48] Lairón-Peris M, Routledge S J, Linney J A, et al. Lipid composition analysis reveals mechanisms of ethanol tolerance in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e0044021.

[49] Puig-Castellví F, Bedia C, Alfonso I, et al. Deciphering the underlying metabolomic and lipidomic patterns linked to thermal

acclimation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Proteome Research, 2018, 17(6): 2034-2044.

## Insights into Cellular Metabolic Differences among Yeast Strains in Ethanol Fermentation by Raman Spectroscopy and Multivariate Curve Resolution Algorithm

Ou Haisheng<sup>1,2</sup>, Zhang Pengfei<sup>3</sup>, Wang Xiaochun<sup>2</sup>, Chen Ying<sup>2</sup>, Liu Junxian<sup>1\*</sup>, Wang Guiwen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Physics Science and Technology, Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi, China;

<sup>2</sup> Biophysical and Environmental Sciences Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China;

<sup>3</sup> School of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

### Abstract

**Objective** Bioethanol is an important renewable and clean energy source. Much effort has been put into selecting and constructing ethanol-tolerant yeast strains to improve ethanol yields. However, previous studies have often been limited to screening and obtaining tolerant mutants, with a little in-depth investigation of the phenotypic changes during fermentation. Most studies have been conducted at the population level, which masks intercellular heterogeneity. Microbial cells in a population may exhibit heterogeneity, i.e., individual cells respond differently, under stress conditions. Therefore, developing a phenotypic analysis strategy based on single-cell techniques is imperative for better understanding the stress resistance mechanisms of yeast cells. In this study, Raman tweezers are used to collect single-cell spectra of different yeast strains at different times of ethanol fermentation. Data mining technique using the multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) method is performed to extract spectra and spectral intensity profiles associated with specific biomolecules and gain insights into the metabolic fermentation processes and adaptation mechanisms of yeast cells.

**Methods** Three *Saccharomyces cerevisiae* strains, Bp1, INVSc1, and W303a, are used. After activation in a solid YEPD medium, the yeast strains are transferred to a liquid YEPD medium and incubated overnight at 30 °C and 220 r/min. Then, they transfer to a fermentation medium (i.e., 300 g of glucose, 5.0 g of peptone, 0.06 g of CaCl<sub>2</sub>, 0.06 g of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1000 mL of distilled water, and pH 4.5) at 5% inoculum for ethanol fermentation. The optical density at 600 nm ( $D_{600}$ ) of the culture is measured to estimate the growth of yeast cells. The content of glucose and ethanol in the fermentation broth are determined using Raman spectroscopy.

The Raman tweezers are used to acquire the Raman spectra of individual yeast cells. The laser tweezers randomly capture individual cells. The Raman signals of the cells are collected with an acquisition time of 30 s. A self-programmed MATLAB program is used to preprocess the data. The raw spectra are subtracted from the background spectra and then smoothed using the 17-point Savitzky Golay method and baseline corrected using the alternating least squares (ALS) algorithm. MCR-ALS, a chemometric method for resolving the individual, pure components within an unknown mixture, is run using the MATLAB toolbox MCR-ALS GUI 2.0. First, multiple single-cell Raman spectra from different periods are formed into column-increasing matrices. Then, the spectral intensity profiles of the components are initially estimated using evolving factor analysis. To reduce the ambiguity of the resolution results, non-negativity constraints are used for the concentrations and spectra.

**Results and Discussions** The Bp1 strain shows the best fermentation performance, followed by the INVSc1 strain and the worst by the W303a strain. Five or three different biomacromolecules' spectra and spectral intensity profiles are resolved for each strain, mainly lipid-related substances (phospholipids, triglycerides, and lipoproteins), polysaccharides, or proteins. The content of lipids in W303a strain does not increase significantly during the fermentation. In contrast, INVSc1 and Bp1 strains, which have a higher ethanol production capacity, increase with ethanol volume fraction, showing the prominent role of lipids in the resistance of yeast cells to ethanol toxicity.

The Bp1 and INVSc1 strains have high phospholipid content in the late fermentation stage, showing that yeast cells increase ergosterol content to adapt to the accumulating ethanol. It is hypothesized that in strains with high ethanol-producing capacity, yeast cells may increase the synthesis of triacylglycerol, consequently increasing the fluidity of the cell membrane to mitigate the damage by ethanol, thus making the endogenous ethanol flow out more easily. In addition, the cells will also increase the synthesis of ergosterol to maintain the integrity of the cell membrane and therefore have



greater stress tolerance and better fermentation performance.

The content of major biomacromolecules is relatively homogeneous between cells in the Bp1 strain under the same fermentation conditions (Fig. 3). Simultaneously, cellular heterogeneity is high in the less ethanol-tolerant strains, INVSc1 and W303a (Figs. 4 and 5). This indicates that cell heterogeneity affects the strains' ethanol fermentation performance and fermentation efficiency.

**Conclusions** We apply single-cell Raman spectroscopy combined with MCR-ALS to rapidly obtain information on the variations in the spectral intensity of major biomacromolecules (i. e., phospholipids, proteins, polysaccharides, and triglycerides) in yeast cells during ethanol fermentation at the single-cell level without any *a priori* information. We find that lipids (i. e., phospholipids, triglycerides, and lipoproteins) and cell heterogeneity have an imperative role in the strain's fermentation performance and efficiency. Therefore, the method is consistently outstanding in exploring resistance mechanisms in yeast cells and has wide application prospects.

**Key words** bio-optics; Raman spectroscopy; multivariate curve resolution–alternating least square method; ethanol fermentation; heterogeneity; single-cell analysis