

浓醪乙醇发酵的单细胞拉曼光谱表征

李自达^{1,2} 赖钧灼³ 廖 威¹ 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 应用激光镊子拉曼光谱技术收集 500 L 发酵罐中木薯淀粉浓醪乙醇发酵过程底物、产物及酵母单细胞的拉曼光谱,以期从单细胞水平为乙醇发酵提供新的认识。结果显示:1)拉曼光谱可以实时监测浓醪乙醇发酵过程底物与产物的变化;2)酵母细胞胞内物质的变化存在类似于产物变化的前发酵期、主发酵期和后发酵期 3 个阶段,但出现的时间要比产物变化晚约 4 h;3)为适应浓醪发酵环境,酵母细胞的生理状态和胞内物质在不断地进行调整,随着环境乙醇浓度的升高,酵母细胞在胞内累积蛋白质和脂类物质,蛋白质二级结构逐渐变为以无规则卷曲为主;4)发酵后期,酵母细胞在胞内累积大量的嘌呤类物质,但细胞间含量存在异质性。上述结果表明,单细胞拉曼光谱技术提供了一种研究微生物发酵的新方法,可从新的角度获知乙醇发酵过程酵母细胞内外的变化信息。

关键词 光谱学;乙醇发酵;拉曼光谱;木薯淀粉;单细胞分析

中图分类号 O657.37 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.0317001

Raman Spectroscopic Profile of Ethanol Fermentation in High Gravity Cassava Starch Brewing

Li Zida^{1,2} Lai Junzhuo³ Liao Wei¹ Liu Junxian² Wang Guiwen¹

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

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

³ College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract Raman spectroscopy is used to characterize the process of ethanol fermentation and look into the *Saccharomyces cerevisiae* cells at single-cell level. The ethanol fermentation using high-concentration cassava starch as feedstock is processed in a 500 L fermentor and the Raman spectra of substrate, product and individual yeast cell are acquired by using laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS). Major results are as follows: 1) Raman spectroscopy can monitor the dynamic changes of substrate and product during the ethanol fermentation; 2) the changes of intracellular components of yeast cells exhibit three stages, i. e., primary fermentation, main fermentation and later fermentation, which are similar to those of products, but there is a delay of about 4 h; 3) yeast cells amend its physiological state and intracellular compounds to adapt to the high osmotic stress at the initial stage and the high ethanol concentration at the later stage of fermentation. Random coiling dominates the secondary structure of yeast protein as the ethanol concentration increases; 4) purine is synthesized and accumulated in yeast cells at the later stage, but the amounts of individual cells are greatly heterogeneous. This work provides beneficial reference on the ethanol fermentation from a new perspective. LTRS shows the potential to open a new frontier of microbial fermentation.

Key words spectroscopy; ethanol fermentation; Raman spectroscopy; cassava starch; single-cell analysis

OCIS codes 170.5660; 170.1530; 170.1420; 300.6450; 300.6390

收稿日期: 2011-07-25; **收到修改稿日期**: 2011-10-10

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

作者简介: 李自达(1985—),男,硕士研究生,主要从事分子振动光谱在生物医学中的应用方面的研究。

E-mail: lizida23@163.com

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

1 引 言

随着化石能源的日渐枯竭,生物乙醇作为可能的替代能源成为了研究热点。目前我国的乙醇发酵生产主要以玉米等粮食作物为原材料,成本高,对国家的粮食安全构成影响,而南方地区盛产的木薯,淀粉含量高,且耐旱易种,价格低廉,采用木薯淀粉为底物发酵生产燃料乙醇,是非粮生物质能源的重点发展方向,具有广阔的前景^[1]。酵母是木薯淀粉浓醪发酵生产中最常用的微生物,采用常规的分析方法^[2,3]或者红外光谱^[4,5]监测,只能获得发酵过程中酵母的细胞外和细胞群体的生理和生化信息,很难得到单个活酵母细胞的内部重要物质变化信息。

激光镊子拉曼光谱技术是拉曼光谱技术与光学镊子技术结合的光谱分析技术,具有快速、无损伤和操作简易等特点,可以在接近自然生理状态下获知细胞内外的信息,已经发展成为可以实时研究活细胞动力学过程的光谱技术^[6~8];同时,这种技术在从单细胞水平获知细胞的生化组成和变化,或判别细胞的类型和细胞生理变化的研究上也取得了长足进展^[9~11]。在实时监测酵母发酵和胞内物质合成方面,也开展了相关的研究^[12~14]。

本文应用激光镊子拉曼光谱技术,探索收集 500 L 发酵罐木薯淀粉浓醪发酵乙醇过程中酵母细胞生物大分子及发酵底物和代谢产物的拉曼光谱,分别追踪它们的特征峰的变化过程,并与气相色谱法(GC)和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法检测结果比较,进而了解细胞内外生化信息的变化。分析了同一时刻的细胞平均光谱,不同时刻细胞间的差异光谱与物质的特征峰信号强度,不同阶段细胞间的特征峰强度的直方统计图及光谱主成分。采用这些方法分析酵母细胞在发酵过程各重要生长阶段的拉曼光谱数据,旨在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,以新的角度为乙醇发酵提供可参考的信息。

2 材料与方 法

2.1 菌株与材料

酿酒酵母菌株 GXAS-11 由广西科学院国家非粮生物质能源工程研究中心分离、保藏,是一株高温乙醇发酵菌株。木薯淀粉:淀粉含量 70%左右,产地广西。耐高温淀粉酶:Liquozyme Supra,标准酶活力为 90 KNU/g;糖化酶:Dextrozyme DX,标准酶活力为 500 AGU/mL;两种酶均购自诺维信公司,KNU 和 AGU 均为诺维信公司的专有酶活力单位。

光镊拉曼光谱实验系统如文献^[6]所述,主要由倒

置显微镜(TE2000U, Nikon, 日本),光谱仪(SpectraPro2300i, Acton, 美国)和 CCD(Spec10, Princeton Instruments, 美国)组成,激光波长为 780 nm,功率为 15 mW。

其他仪器设备包括:气相色谱仪(6890N, Agilent, 美国),高速离心机(Universal 32R, Hettich, 德国),500 L 全自动控制发酵罐(BIOF-6000, 上海高机生物工程有限公司)。

2.2 乙醇发酵与检测

木薯淀粉与蒸馏水以一定料水比混合使木薯粉的质量分数为 35%,加入 0.13 KNU/g 底物液化酶,迅速加热到 90 °C~95 °C,液化 60 min,冷却,pH 值调至 4.5,降温到 37 °C,加入糖化酶量为 1.21 AGU/g 底物,同时接入 10%种子液于 500 L 发酵罐中进行发酵。在 0,4,6 h 取样,从 8 h 开始每隔 4 h 取样(其中 20 h 改为 18 h 取样),发酵 48 h 后停止取样。每次取样 50 mL,分别用于 GC 法检测^[14]、DNS 比色法检测^[15]和拉曼光谱分析。

2.3 光谱数据收集

取 200 μ L 的发酵液,置于石英片样品槽内,加盖玻片密封,30 s 收集发酵液的拉曼光谱,在相同条件下收集无菌水的拉曼光谱作为背景光谱。为减少培养液的干扰,对酵母细胞用 50 mmol/L Tris 缓冲液稀释,取 200 μ L 含待测酵母细胞缓冲液,100 倍油浸物镜寻找酵母细胞,激光镊子随机俘获并囚禁单个酵母细胞,操控提升至石英片上方 10 μ m,15 mW 激光激发,信号积分时间为 30 s,收集目标细胞的拉曼光谱,得到含有背景信息的酵母细胞拉曼光谱,以相同条件在细胞附近收集发酵液背景的背景拉曼光谱。每个样品各收集 100 个以上酵母细胞的拉曼光谱,5 个背景光谱。

2.4 数据处理

自编 Visual Basic 应用程序读取 WinSpec32(光谱仪自带)光谱文件数据进行相关预处理,将样品细胞光谱减去背景溶液的平均光谱、采用 17 点 Savitzky-Golay 法平滑^[16]和多项式拟合基线校正^[17];预处理后的各样品细胞光谱导入 Unscrambler 应用软件进行主成分分析(PCA);拉曼光谱信号强度可由信号谱带积分计算得到,采用 Origin 8.0 软件进行信号强度直方统计。

3 结果与分析

3.1 发酵过程中乙醇、糖类和胞内物质的变化

木薯淀粉浓醪发酵过程中,发酵液所含的主要

物质为糖类和乙醇。图 1(a) 是不同时期发酵液的平均拉曼光谱, 主要的拉曼信号 844, 915, 1064, 1127, 1366 cm^{-1} 等峰来自糖类物质, 880, 1046, 1086, 1454 cm^{-1} 峰来自乙醇; C—C—O 面外伸缩引起的 1127 cm^{-1} 的信号峰及 C—C—O 引起的 880 cm^{-1} 信号峰为糖类和乙醇的典型特征峰。从图 1(b) 中可以看到发酵底物糖类物质和乙醇产物信号峰的此消彼长。分别将其特征信号强度的变化曲线与 GC 法检测乙醇、DNS 比色法检测糖类物质得到的检测结果对比[见图 1(b)], 它们的变化曲线基本吻合, 说明可用拉曼光谱特征信号强度来定量

表征浓醪发酵底物和发酵产物的含量。由于采用边糖化边发酵的发酵方法, 发酵液中前 6 h 糖类物质浓度在增加, 此阶段消耗的糖类物质主要用于菌体细胞的生长, 并没有开始大量转化为乙醇, 其浓度变化并不明显; 随着发酵的进行, 酵母细胞进入快速生长期, 从约 6 h 开始, 糖类物质开始迅速消耗, 乙醇浓度快速增长, 乙醇发酵开始进入快速发酵的阶段。随着糖类物质的消耗和乙醇浓度的升高, 在第 28 h 左右糖类物质含量明显达到较低值时, 乙醇发酵进入了后发酵阶段。

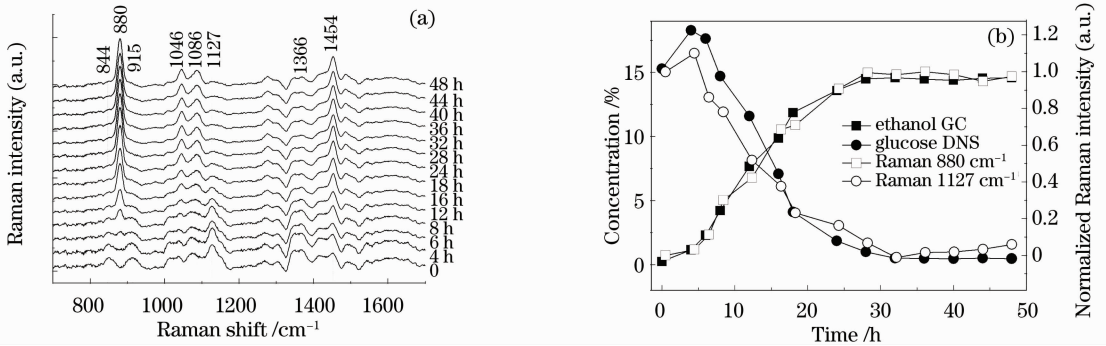


图 1 (a) 发酵液的平均拉曼光谱; (b) 乙醇、葡萄糖的特征峰变化曲线与 GC、DNS 检测的变化曲线对比

Fig. 1 (a) Averaged Raman spectra of fermentation broth at different time; (b) concentrations of ethanol and glucose of fermentation broth determined by GC or DNS, and the intensities of Raman bands at 880 cm^{-1} (from ethanol) and 1127 cm^{-1} (from glucose)

从图 1(b) 的产物和底物变化可以看到木薯淀粉浓醪发酵过程存在 3 个阶段, 0~4 h 是前发酵期, 6~24 h 是主发酵期, 28 h 后开始进入后发酵期。这是宏观上根据产物与底物变化划分的, 在细胞内部物质的微观变化需要通过单细胞拉曼光谱来分析。

图 2(a) 是发酵过程不同时刻的酵母细胞平均拉曼光谱, 显示酵母细胞的拉曼光谱随着发酵进程在逐渐变化。28 h 前, 酵母细胞的拉曼光谱比较简单, 1004, 1266, 1440, 1654 cm^{-1} 是主要的峰, 但从 32 h 开始, 不仅原有的主要信号峰增强了, 还出现了大量新的峰。表 1 列出了主要特征峰可能对应的物质归属^[9,10,18,19]。为了得到更细致的变化信息, 分析了各时段与前一时段的差异光谱[见图 2(b)]: 1) 曲线 a 显示的是刚接入种子液时与进入快速生长时(8 h)的差异光谱, 表明种子细胞含有较多的胞内物质, 而快速生长的细胞胞内物质含量低(此时通常胞内有一个很大的液泡); 2) 在 8~18 h 逐渐增加的是蛋白质(对应 1445, 1662 cm^{-1} 峰, 曲线 b); 3) 18~28 h 之间, 富含苯丙氨酸(1004 cm^{-1}) 和二级

结构为无规则卷曲的蛋白质(1670 cm^{-1}) 含量在增加, 但脂类物质并没有明显增加; 开始出现一些新的信号峰响应, 其中以 1340, 1480 cm^{-1} 最为明显, 两者均来自腺嘌呤, 而 782, 1082, 1094 cm^{-1} 等 RNA、DNA 峰并没有以相应的强度增加, 说明此时开始在胞内大量累积的是腺嘌呤物质; 4) 28 h 后, 进入乙醇产生缓慢的后发酵期, 腺嘌呤物质峰的增加最显著, 但是脂类物质(1063, 1266, 1297, 1440, 1654 cm^{-1} 等) 也有明显增加, 蛋白质物质的峰也有所增强; 随后的发酵过程酵母细胞胞内物质变化不显著; 5) 蛋白质结构发生了改变: 随着发酵的进行, 1654 cm^{-1} 峰强度在向 1662, 1670 cm^{-1} 转变。1654 cm^{-1} 归属蛋白质酰胺 I 中 α 螺旋, 1662~1670 cm^{-1} 归属蛋白质酰胺 I 中无规则卷曲, 说明胞内蛋白质二级结构由以有序的 α 螺旋为主逐步转向以无规则卷曲为主。在 250 mL 三角瓶乙醇发酵和 10 L 小型发酵罐中也观察到相同的现象, 但这种现象都出现在用高浓度发酵底物进行乙醇发酵时, 在低浓度葡萄糖乙醇发酵中这种现象并不明显。

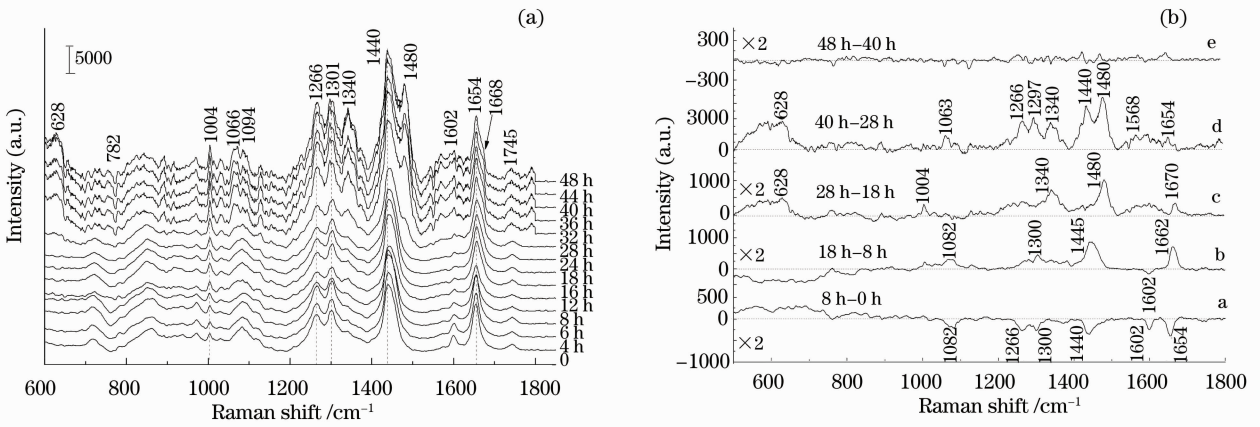


图 2 (a) 发酵过程不同阶段的细胞平均拉曼光谱; (b) 部分差异光谱。为方便对比, 除曲线 d 外, 其他曲线的强度值均乘以系数 2 放大

Fig. 2 (a) Averaged Raman spectra of yeast cells at different stages of fermentation; (b) their difference spectra. Except for curve d, intensity values of all the other curves are doubled for display

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
723	Adenine
782	RNA (U, C, T ring breathing)
1004	Phenylalanine
1063	C-C stretch of lipids
1082	C-C stretch of lipids and proteins, DNA: BK
1094	O-P-O ⁻ of DNA
1266	Amide III, =C-H bend of lipids
1297~1304	CH ₂ twist of lipids
1340	Adenine
1440~1450	CH deformation of lipids and proteins
1480	Guanine and adenine
1560~1575	Guanine and adenine
1602	Tyrosine and phenylalanine
1654	Amide I, α-helix, cis-C=C stretch of lipids
1662~1670	Amide I, random coiling
1745	C=O stretch of lipids

通过计算光谱中各特征拉曼光谱的信号强度, 得到酵母细胞物质变化的更详细信息(图中没有给出)。结果显示: 1) 表征 RNA 的 782 cm⁻¹ 信号峰的强度, 在 4 h 时有所降低, 之后随着淀粉糖化的完成和酵母细胞适应新的培养环境而有所增加, 随后又有所降低, 这一涨落现象持续到 28 h; 28 h 后开始不断增强, 在 36 h 时达到最大值。表征 DNA 的 1094 cm⁻¹ 与 782 cm⁻¹ 的情况类似, 有所不同的是 1094 cm⁻¹ 在 12 h 时就开始稳定并开始呈现增长趋势。2) 表征蛋白质和脂类的 1301, 1440, 1654 cm⁻¹ 在开始阶段稍下降后增加, 在 12 h 时达到最低, 在 16~

28 h 有一个相对稳定的阶段, 但在 28 h 后开始增加, 直到 36 h 到达另一个稳定期。可见, 酵母细胞的拉曼光谱在细胞刚进入发酵罐时, 总体表现为胞内蛋白质和脂类物质含量的减小, 之后才大量表达蛋白质和脂类物质, 反映了酵母细胞为了适应营养环境的变化, 自身能量物质的消耗与重构的过程。

3.2 不同发酵阶段细胞间的差异

上述分析均是基于大量细胞的平均信息, 掩盖了细胞间的差异。为了监测发酵过程中酵母在细胞水平上发生的变化, 比较分析了不同发酵时期的 0, 6, 12, 24, 32, 44 h 的主要拉曼光谱峰信号强度的分

布。图 3 是表征酵母细胞的 RNA (782 cm^{-1}), DNA (1094 cm^{-1}), 脂类物质 (1301 cm^{-1}), 蛋白质和脂类物质 (1440 cm^{-1}), 嘌呤类物质 (1480 cm^{-1}) 和蛋白质 (1654 cm^{-1}) 的拉曼信号峰的直方统计图, 用于统计选定信号峰在各强度区间段里的个数, 它显示出拉曼峰的信号强度在细胞间的分布, 图中曲线是利用原始数据的平均值和标准差生成的正态分布曲线拟合。从图中可以看到: 1) 细胞的蛋白质和脂类物质 ($1301, 1440, 1654\text{ cm}^{-1}$) 在发酵的前、中期, 细胞间的分布都比较集中, 细胞间差异不大; 在发酵后期 (32、44 h), 这两类物质的含量显著增加了, 而且细胞间的差异也增大了; 12 h 是个特别的时间点, 这两类物质在细胞中的总量明显是整个发酵过程中最少的。2) 核酸类物质, 在发酵前、中期, 782 cm^{-1} 与 1094 cm^{-1} 的信号峰强度呈离散分布,

但进入发酵后期后, 含量增加且在细胞间的分布接近正态分布。3) 嘌呤物质 (1480 cm^{-1}) 在乙醇发酵的前期、中期胞内含量很少, 各细胞间的含量差别不大, 但是在发酵的后期迅速增加, 细胞间的含量差异也很大, 且呈两极分化, 含量较少的细胞占多数, 含量很高的细胞占少数, 说明酵母细胞对嘌呤类物质的累积有多态性, 细胞间不均一。出现上述结果可能是由于酵母细胞在接入发酵罐后生长速度不一致, 细胞处于不同的状态; 而在发酵后期, 由于底物基本消耗完毕而乙醇浓度很高, 酵母细胞进入了相对稳定的状态, 很多物质在胞内积累, 这时细胞的同步化较高, 细胞间的差异较小, 因而源自蛋白质、脂类和核酸的各信号峰强度数据分布都比较集中。但嘌呤类物质的积累是个例外, 细胞间含量极不均一。

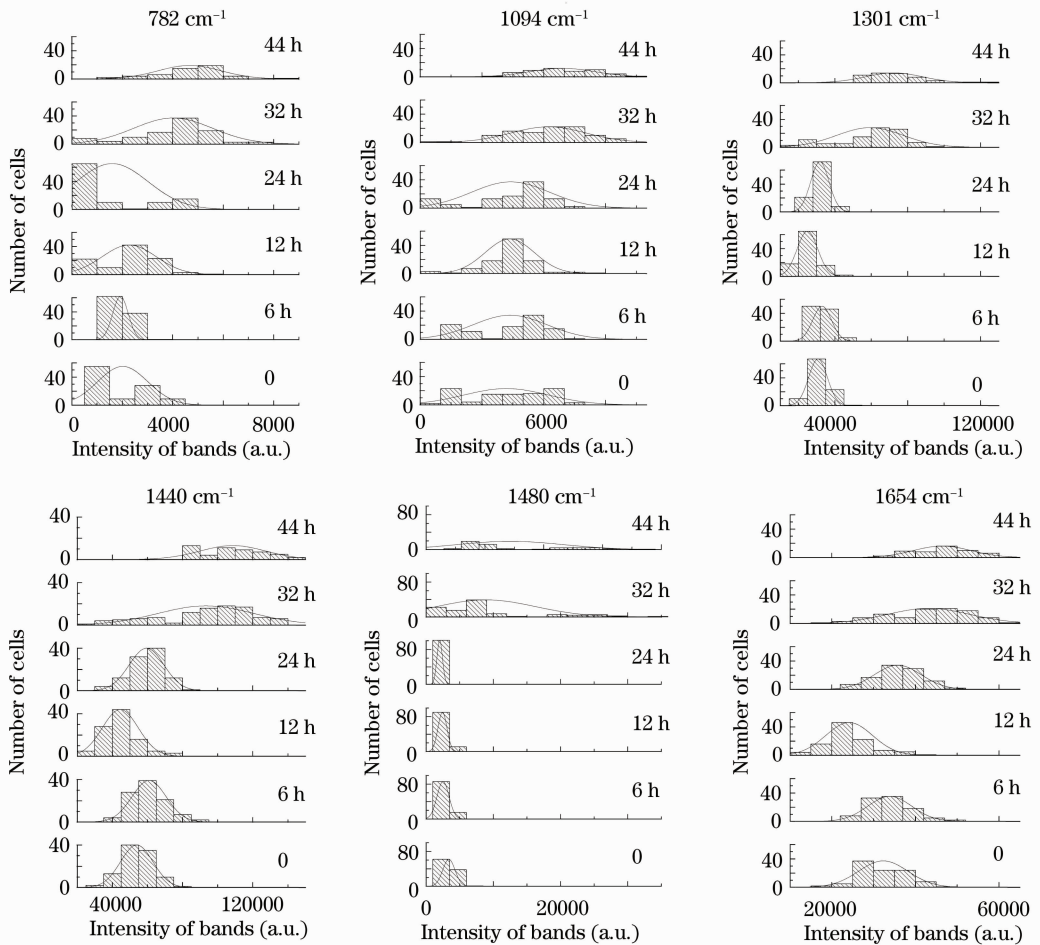


图 3 不同发酵阶段酵母细胞间 $782, 1094, 1301, 1440, 1480, 1654\text{ cm}^{-1}$ 信号峰强度的直方统计图

Fig. 3 Histograms of Raman intensities of bands at $782, 1094, 1301, 1440, 1480$ and 1654 cm^{-1} at different stages of ethanol fermentation

3.3 不同发酵阶段细胞光谱的主成分分析

PCA 是一种较为成熟的多元统计监测方法, 应

用这一方法可以将拉曼光谱显式变量按照方差最大原则转化为数量较少的隐式变量, 使光谱数据降维,

然后再从新的隐式变量中提取光谱中主要的信息及特征。这样既保留了光谱数据的信息特征,又消除了变量间的关联,同时还减少了部分系统噪声干扰^[5]。从每个时刻的样品中随机抽取 20 个酵母细胞,选用 $600\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ 物质指纹峰比较集中的区域,进行主成分分析,结果显示第一主成分 PC1 (65%) 和第二主成分 PC2 (15%) 之和为 80%, 可认为获取了光谱数据的最主要信息,所以选定主成分数至 PC2。经 PCA 计算得到得分矩阵和载荷矩阵,得分矩阵描述细胞之间的特征信息,波数变量之间的信息则由载荷矩阵描述。从酵母细胞的拉曼光谱 PCA 的得分矩阵数值图[图 4(a)]中可以看到,细胞的数据点明显分布在三个区域:发酵前期(0~8 h)的细胞数据点集中落入图中的第三象限,发酵中期(16~28 h)则落入第二象限,其他两个象限则被发酵后期(36~48 h)的细胞数据点占据;12 h 和 32 h

的数据点则分别处于两个发酵期之间。值得注意的是,发酵后期(正值)与前两个发酵期(负值)的主要差异为 PC1 数值,而发酵前期(负值)与发酵中期(正值)细胞的区分则主要体现在 PC2 数值上。分析酵母细胞的 PCA 载荷矩阵[图 4(b), (c)]可以得知造成这种分布的原因:在 PC2 中,拉曼信号 1065, 1300, 1440, 1666 cm^{-1} 等谱带的载荷值为正值,而 712, 813, 1602 cm^{-1} 等谱带则为负值,说明由前发酵期到主发酵期,前者的信号强度增强了,而后者的信号强度减弱了;对应的从 PC1 可以看到,在由主发酵期进入后发酵期后,758, 1340, 1480, 1567 cm^{-1} 等嘌呤物质峰的信号增强,而 1094, 1447, 1654 cm^{-1} 等谱带的信号则在减弱。上述结果与图 2、图 3 的结果吻合。PCA 各细胞数据点的分布反映了细胞在发酵过程中胞内物质的变化情况。

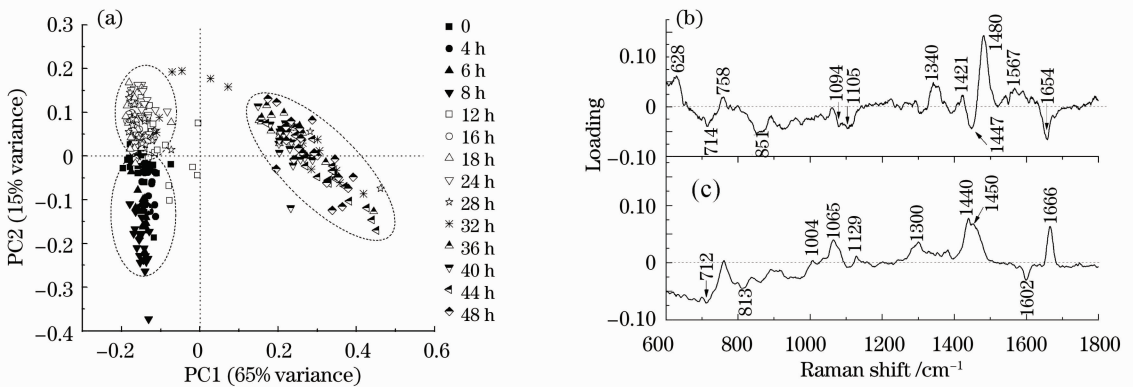


图 4 不同发酵阶段细胞光谱主成分分析。(a)得分矩阵数值图;(b)第一主成分载荷分析图;(c)第二主成分载荷分析图

Fig. 4 Principal component analysis of different stages of fermentation. (a) Scores of PCA; (b) loading of PC1;

(c) loading of PC2

4 讨 论

酵母细胞是乙醇发酵的主体,每个细胞就是一个微型的反应器,乙醇产率直接受酵母细胞状态的影响。本文结合拉曼光谱,监测发酵液中底物和产物的变化,同时还从单细胞水平上对乙醇发酵过程中酵母胞内物质的变化进行跟踪,以核酸、脂类和蛋白质等物质对应的拉曼光谱特征峰为代表,分析了 500 L 发酵罐中木薯淀粉浓醪发酵乙醇的生产过程。结果表明,追踪发酵液光谱中乙醇和葡萄糖的特征峰 880 cm^{-1} 和 1127 cm^{-1} 谱带的变化,与 GC 和 DNS 比色法检测结果比较,显示拉曼光谱可以快速确定发酵液的乙醇和糖类含量。细胞生长、产物与底物变化显示乙醇发酵过程存在三个明显的阶

段:发酵前期、发酵中期和发酵后期。图 4 的结果显示,在乙醇发酵中,酵母细胞的生理状态和胞内物质变化也存在三个对应的阶段,依次为 0~8 h, 12~28 h, 32~48 h; 12 h 是进入第二阶段的过渡, 32 h 是进入第三阶段的过渡。对比图 1(b)的底物、产物变化过程,胞内物质变化要晚大约 4 h。这可能反映了细胞对发酵环境的适应过程。

为适应浓醪发酵前期的高渗环境和后期高毒环境,酵母细胞的生理状态和胞内物质在不停地适应调整。蛋白质和脂类物质在发酵的前、中期,细胞间的分布都比较集中,细胞间差异不大在发酵后期,这两类物质的含量显著增加了,但是细胞间的差异也增大了。核酸类物质,在发酵前、中期信号峰强度呈离散分布,但进入发酵后期,含量增加且在细胞间的

分布接近正态分布。酵母细胞在发酵后期大量累积嘌呤类物质且呈多态性,细胞间不均一。蛋白质二级结构 α 螺旋特征峰 1654 cm^{-1} 峰强度在向无规则卷曲峰 $1662,1670\text{ cm}^{-1}$ 转变,显示发酵初期胞内蛋白的二级结构中以有序的 α 螺旋为主,随着乙醇浓度的升高,酵母细胞蛋白质以无规则卷曲为主。

显微拉曼光谱技术作为光学手段,具有实时、便捷、无损伤等优点,可以对微生物细胞进行判别分析,也可以在单细胞水平上对复杂的微生物生长过程进行动态研究^[20]。本文应用单细胞拉曼光谱技术实时监测酵母发酵过程中培养基和单个细胞中发生的变化,有效地跟踪葡萄糖、乙醇等物质的变化,以及胞内核酸、脂类及蛋白质等生物大分子的变化。这展示了光镊拉曼光谱技术实时监测发酵过程中物质变化的能力和从单个细胞水平上研究发酵过程的潜能。

5 结 论

应用单细胞拉曼光谱既可以实时有效地跟踪木薯浓醪乙醇发酵过程底物、产物的变化,也可以分析发酵过程酵母细胞胞内主要物质变化及细胞间的差异,在单细胞水平上充分获取发酵过程的动态信息,进而可能实现对木薯淀粉浓醪发酵过程的实时全面监测,为优化发酵参数提供重要的参考信息。

致谢 感谢广西科学院非粮生物质能源国家工程研究中心申乃坤的实验协助。

参 考 文 献

- O. J. Sánchez, C. A. Cardona. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks [J]. *Bioresour. Technol.*, 2008, **9**(13): 5270~5295
- K. C. Schuster. Monitoring the physiological status in bioprocesses on the cellular level [J]. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2000, **66**: 185~208
- Zhang Kechang. Technology of Alcohol and Liquor [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998
章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- M. Blanco, A. C. Peinado, J. Mas. Analytical monitoring of alcoholic fermentation using NIR spectroscopy [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **88**(4): 536~542
- S. Sivakesava, J. Irudayraj, A. Demirci. Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy[J]. *J. Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, **26**(4): 185~190
- 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
- D. Chen, L. Shelenkova, Y. Q. Li *et al.*. Laser tweezers Raman spectroscopy potential for studies of complex dynamic cellular processes: single cell bacterial lysis[J]. *Anal. Chem.*, 2009, **81**(9): 3227~3238
- G. P. Singh, C. M. Creely, G. Volpe *et al.*. Real-time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy [J]. *Anal. Chem.*, 2005, **77**(8): 2564~2568
- G. P. Singh, G. Volpe, C. M. Creely *et al.*. The lag phase and G₁ phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy[J]. *Raman Spectroscopy*, 2006, **37**(8): 858~864
- 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]. *Advances in Applied Microbiology*, 2010, **70**: 153~186
- L. X. Peng, G. W. Wang, W. Liao *et al.*. Intracellular ethanol accumulation in yeast cells during aerobic fermentation: a Raman spectroscopic exploration[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 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 using laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, **314**(1): 42~48
- H. L. Li, X. S. Chai, Y. L. Deng *et al.*. Rapid determination of ethanol in fermentation liquor by full evaporation headspace gas chromatography[J]. *J. Chromatography A*, 2009, **1216**(1): 169~172
- S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey *et al.*. Stability of glucose oxidase activity of aspergillus niger spores produced by solid-state fermentation and their role as biocatalysts in bioconversion reaction [J]. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, **46**(2): 190~194
- Du Yiping, Pan Tiejing, Zhang Yulan. The Application of Chemometrics [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008. 133~170
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. 133~170
- Feng Xinwei, Zhu Zhongliang, Shen Mengjie *et al.*. The method of baseline drift correction of Raman spectrum based on polynomial fitting [J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2009, **26**(6): 759~762
冯昕韡,朱仲良,沈梦洁等. 基于多项式拟合的拉曼光谱基线漂移校正方法[J]. 计算机与应用化学, 2009, **26**(6): 759~762
- 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
- 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