

文章编号:1004-4213(2011)05-0722-6

分选特殊产物微生物的喇曼光谱法

李自达^{1,2}, 陶站华¹, 孟令晶^{1,2}, 陈姗姗¹, 刘军贤², 王桂文¹

(1 广西科学院 生物物理实验室, 南宁 530007)

(2 广西师范大学 物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004)

摘要:以微生物油脂和类胡萝卜素为目标产物,通过对比目标产物与普通酵母的喇曼光谱,选择喇曼光谱的 $1\ 440\ \text{cm}^{-1}$ 谱带与 $1\ 602\ \text{cm}^{-1}$ 谱带的信号强度比值 I_{1440}/I_{1602} 作为油脂的特征标记,选择 I_{1157}/I_{1654} 或者 I_{1520}/I_{1654} 作为类胡萝卜素的标记,采用 $780\ \text{nm}$ 的激光俘获、收集酵母细胞的喇曼光谱,编写 VB 计算机程序,实时在线识别,通过光镊的操控,筛选产类胡萝卜素酵母和油脂酵母.经细胞培养和喇曼光谱检测验证了筛选结果.为筛选有经济价值的微生物提供了一种简单快捷的创新方法.

关键词:喇曼光谱;目标产物;酵母;菌株筛选

中图分类号:Q632

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20114005.0722

0 引言

细胞分选技术已经给细胞生物学带来革命性的变化,其中最有效的分选细胞族群的工具是流式细胞仪^[1],在分选前都需要对细胞进行辨别,例如根据细胞的大小、形状或者荧光显色.然而不同类型的细胞常常有着非常类似的大小和形状,同时有些微生物细胞既没有自发荧光也不能被荧光染色剂染色,且染色剂对微生物细胞的活性和生理也会造成不可预知的影响.对于某些合成具有经济价值产物的微生物细胞的筛选,其目的是筛选出目标菌株后,进行扩大培养,因此,细胞筛选必须是对细胞无损伤、无外加污染的过程,传统的流式细胞仪由于条件的限制,并不能完全满足这些要求.

喇曼散射光谱来源于激光信号与物质分子的化学键振动的相互作用.喇曼光谱技术能够获取细胞内部的结构信息,而不需要做任何外部标记.细胞的喇曼光谱包含着包括核酸、蛋白质、糖类和脂类物质等生物大分子的丰富信息^[2],是反映细胞的类型和营养状况的重要因素^[3].激光镊子喇曼光谱技术采用一束近红外单色激光作为光源,通过显微镜的高倍物镜聚焦,来收集一个小区域的喇曼光谱信号^[4].同时,这束激光还能产生一个光学势阱来俘获并操控细胞^[5].因此,这一技术能够俘获并通过喇曼光谱信息识别微生物细胞,而不需要对细胞做任何预处理^[6],并能够在一定的空间范围内移动细胞.

微生物油脂和类胡萝卜素是部分微生物细胞在胞内合成的非水溶性物质.微生物油脂的构成和植物油脂相似,可作为植物油脂的替代品制取生物柴油^[7],而类胡萝卜素广泛存在于微生物、植物和藻类光合组织中,可用于预防疾病和食品添加剂和着色剂^[8],均具有较高的经济价值和良好的开发前景.喇曼光谱技术具有无损、快速和灵敏高等优势,已经被广泛应用于油脂和类胡萝卜素研究^[9-12],但还没有应用于分选产特殊产物微生物的报道.

为了能在无损伤,无外加污染的条件下筛选出高产油脂和高产类胡萝卜素微生物细胞,本文尝试利用激光镊子喇曼光谱技术的实时光谱采集与便捷的光学操控等特点,从混合细胞群体中识别并筛选出目标酵母细胞.首先,分别收集目标产物油脂和类胡萝卜素的喇曼光谱,从中抽取特征喇曼光谱信息,并以此作为含目标产物酵母细胞的标记.然后,采用 $780\ \text{nm}$ 的激光俘获、收集未知酵母细胞的喇曼光谱,通过编写 VB 计算机程序,在线实时识别,并采用光镊操控分别筛选出产类胡萝卜素酵母和产油脂酵母,最后,通过细胞培养和喇曼光谱检测验证筛选结果.为筛选有经济价值的微生物探索一种简单快速的创新方法.

1 材料与方法

1.1 培养基与菌株培养

YEPD 培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母粉 10,蛋

基金项目:广西自然科学基金(No. 0991079, No. 0832022Z)和广西科学院基本科研业务费(No. 09YJ17WL01)资助

第一作者:李自达(1985年—),男,在读硕士研究生,主要研究方向为拉曼光谱在生物医学中的应用. Email: lizida23@163.com

通讯作者:王桂文(1969年—),男,副研究员,主要研究方向为生物物理和微生物应用. Email: wguiwen@gxas.cn

收稿日期:2010-11-24; **修回日期:**2011-02-17

白肱 10, pH 5.8~6.0, 固体培养基加入 15 g 琼脂粉. 121℃, 蒸汽灭菌 15 min.

本文所用的菌株有油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) AS 2. 1390, 红酵母 (*Rhodotorula glutinis*), 普通的啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 6# 和 AS 2. 400, 其中 AS 2. 1390、AS 2. 400 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 红酵母来自广西大学生命科学学院, 6# 啤酒酵母由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. 分别将各酵母细胞在 YEPD 固体平板培养基上于 28℃ 活化 36 h, 取单菌落接入 YEPD 液体培养基于 28℃, 180 rpm 培养 24 h, 然后以 10% 接种量接入 50 mL 限氮培养基中, 于 28℃, 180 rpm 培养 72 h. 分别在 24 h, 48 h 和 72 h 时取样 1 mL, 放 4℃ 冰箱备用.

1.2 实验系统

实验所用的激光镊子喇曼光谱实验系统见图 1, 图中各元件分别为: 陷波滤波器 (HNF), 双色镜 (DM), 激光器 (Laser), 反射镜 (M), 电子耦合元件 (CCD), 电脑 (PC), 其他光学元件和实验参量如文献 [13] 所述. 由于酵母细胞的体积相对较大, 为了充分收集单细胞的整体信息, 显微镜选用 40× 油浸物镜 (N. A. 1. 30). 单孔样品槽, 由一个厚 3 mm, 中心有一个直径为 6 mm 的孔的玻璃板构成, 底部用 0.1 mm 厚的石英盖玻片密封. 筛选用的样品槽为双孔样品槽 (见图 1 右上角部件), 由一个厚 3 mm 玻璃板构成, 其中两个孔 (A, B) 的直径均为 6 mm, 两孔间有一个带隔栅 P 的微小通道使其相互连通; 各孔底部用 0.1 mm 厚的盖玻片密封.

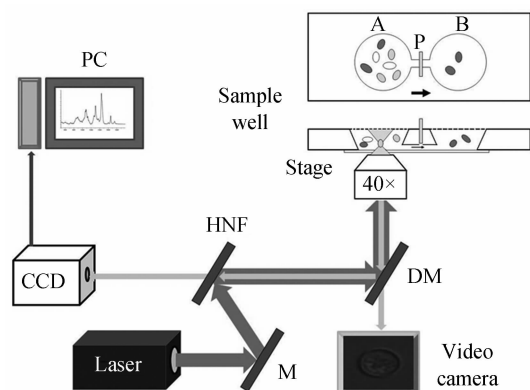


图 1 实验系统
Fig. 1 Experimental system

1.3 实验方法

分别将植物油脂 (橄榄油, 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司)、 β 胡萝卜素 (纯品, 购自 Sigma-Aldrich 公司) 氯仿溶液注入玻璃样品槽中, 置于倒置显微镜载物台上, 调整位置使得激光束通过待测样品溶液圆孔的中心, 聚焦高度为 10 μm , 激光束在

会聚点的功率约 15 mW, 积分时间为 15 s, 每个样品收集 10 次, 取平均光谱. 将酵母细胞用生理盐水稀释后, 置于单孔样品槽中, 调整激光镊子俘获酵母细胞, 并将细胞控制在盖玻片上方约 10 μm 处, 积分时间 30 s, 收集酵母细胞的喇曼光谱, 每个样品收集 100 个酵母细胞的喇曼光谱. 考虑到酵母细胞处于溶液中, 直接收集细胞的喇曼光谱, 不可避免将携带有溶液的信息, 因此应尽量减除. 将激光束聚焦至载玻片上方相同高度, 在相同参量下, 激发收集溶液 (无细胞处) 喇曼光谱, 将溶液光谱设为背景光谱.

激光镊子喇曼光谱实验系统收集的酵母细胞信号中, 通常都带有一定的仪器本身的系统噪音干扰和基线漂移现象, 因此, 得到光谱数据后, 还应进行滤波和基线校正等预处理. 本实验选用较为常用的 17 点 S-G 平滑滤波 [14]. 并将多项式拟合的方法进行适当的改进后, 对基线漂移进行校正 [15]. 经预处理后, 得到只含酵母细胞内部物质结构信息的喇曼光谱, 分别与油脂和类胡萝卜素的喇曼光谱进行分析对比, 抽取能够表征对应产物的特征信息来标记目标酵母, 即根据细胞光谱中是否含有对应的特征信息, 来判断细胞中是否含有油脂或者类胡萝卜素. 通过自编 VB 计算机应用程序, 实时在线进行光谱数据处理, 并将标记数据化, 进而建立酵母细胞的识别模式. 然后根据识别模式的判别结果, 进行细胞筛选, 将筛选出的细胞进行细胞培养和喇曼光谱验证.

2 结果与分析

2.1 目标产物喇曼光谱标记的选定

图 2 是目标产物和酵母细胞的喇曼光谱, a 是 β 胡萝卜素氯仿溶液的喇曼光谱, 在 1 520 cm^{-1} 处有强度最大的特征光谱信号峰, 对应的主要是 C=C 伸缩振动, 这是多烯链最重要的特征之一; 而在 1 150 $^{-1}$ ~1 200 cm^{-1} 处很强的特征谱带, 是由于 C—C 伸缩振动产生; 在 1 004 cm^{-1} 处较强的特征谱带, 则源于甲基与碳链之间的摇摆振动 [16]. 图 2 中植物油的喇曼光谱, 主要的喇曼信号峰均源自脂肪酸基团的响应, 1 744 cm^{-1} 信号峰源自脂链中的 C=O 键, 1 654 cm^{-1} 的谱带是由于不饱和脂肪链的顺式链接-CH=CH-中的 C=C 键, 最强的喇曼光谱信号峰 1 440 cm^{-1} 则归因于 CH 的弯曲模式, 包括剪式-CH₂ 和变形烃链中的-CH₃ [17]. 1 303 cm^{-1} 被指认为同相的 CH₂ 的弯曲模式, 谱带 1 266 cm^{-1} 则被指认为顺式链接-CH=CH-中的 C=C-H 的弯曲面, 而 1 082 cm^{-1} 则归因于全反式链的偏转结构 [18]. 875 cm^{-1} 和 976 cm^{-1} 来源于 C—C—O 对称伸缩振动 [19]. 可以看到图 2 中的普通酵母细胞的喇

曼光谱,由于脂类物质也是细胞的主要成分,油脂类的响应峰在酵母细胞的喇曼光谱中基本都出现,但其强度都不大,其中 $1440, 1654 \text{ cm}^{-1}$ 也包含有蛋白质相关基团的喇曼信号;而最能代表类胡萝卜素的 1157 cm^{-1} 和 1520 cm^{-1} 谱带基本没有出现,这一特点说明普通酵母细胞内含有一定量的脂类物质,而不含或者只含有极为少量的类胡萝卜素.因此,普通酵母细胞中并不是本来就含有大量的油脂和类胡萝卜素,只有那些具有合成能力的酵母细胞在适当的培养条件下才能大量合成,可考虑分别采用 1440 cm^{-1} 谱带和 $1157 \text{ cm}^{-1}, 1520 \text{ cm}^{-1}$ 谱带来识别油脂和类胡萝卜素.

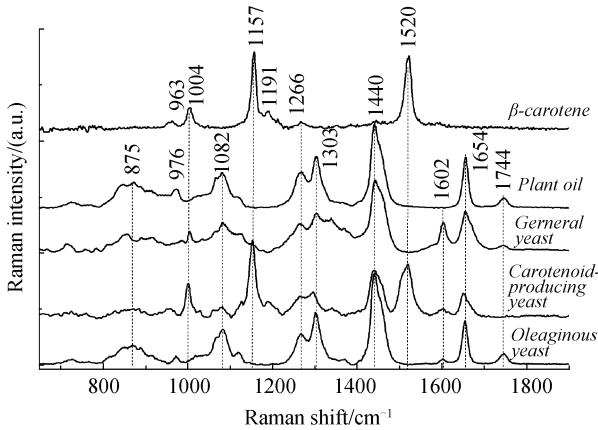


图2 单个细胞的喇曼光谱
Fig. 2 Raman spectra of single-cell

2.2 目标细胞判定阈值的确定

为了进一步确定识别的参量,分别随机抽取培养了相同时间的油脂酵母(AS 2.1390)和红酵母(*R. glutinis*)50个细胞的喇曼光谱.其平均光谱见图2中的产类胡萝卜素酵母谱线和油酯酵母线.各主要喇曼光谱信号峰基本反映了各酵母细胞的胞内物质组成.与图2可知,油脂酵母和红酵母分别与油脂和类胡萝卜素有着基本相同的喇曼光谱信号峰响应.除了这些光谱信号峰外还有一些其它物质的信号响应谱带,但是分别因为油脂和类胡萝卜素的响

应峰信号强度大,而衬托出胞内其它物质的喇曼信号不明显,说明这两种酵母细胞内分别含有大量的油脂和类胡萝卜素.普通酵母6#和AS 2.400的细胞喇曼光谱中,其他物质与脂类物质的喇曼光谱信号响应在图中有着相对均等的表达,例如蛋白质的 1654 cm^{-1} (酰胺 I, C=C 伸展振动)、 1340 cm^{-1} (CH_2 变形)、 1266 cm^{-1} (酰胺 III) 以及与 1440 cm^{-1} 重叠在一起的 1446 cm^{-1} (CH 弯曲)^[18];以及苯丙氨酸环呼吸峰的 1004 cm^{-1} ^[17]、来自酪氨酸和苯丙氨酸(C=C 键振动模)的 1602 cm^{-1} 谱带和可能来源于葡萄糖的 $848 \sim 891 \text{ cm}^{-1}$ ^[19],而类胡萝卜素的特征峰则没有出现,说明这两种酵母细胞中并没有类胡萝卜素和大量的脂类物质生成.

喇曼光谱的一段谱带或整个光谱都可以作为微生物单细胞的固定生物标记或标签^[20].从图2中可以看到,酵母细胞的喇曼光谱中包含着细胞内部丰富的生物大分子结构信息,而根据这些信息能够对各酵母细胞进行归类和识别.比较红酵母与其他酵母细胞的喇曼光谱,可以看到,由于红酵母内部含有丰富的类胡萝卜素,光谱中含有其它细胞所没有的特征峰 1157 cm^{-1} 和 1520 cm^{-1} 谱带,而 1654 cm^{-1} 谱带的强度则与其他酵母比较接近.再比较油脂酵母与其他酵母的喇曼光谱,油脂酵母的喇曼光谱中各脂肪酸的响应峰强度明显比其他酵母高.而 1602 cm^{-1} 谱带表征的是酪氨酸和苯丙氨酸(C=C 键振动模),其强度在细胞间相对比较稳定.因此,为了得到一个稳定可靠的目标细胞判定阈值,分别计算各酵母 24 h、48 h 和 72 h 时喇曼光谱特征谱带的信号强度比值 I_{1157}/I_{1654} 、 I_{1520}/I_{1654} 和 I_{1440}/I_{1602} ,结果见图3.培养 48 h 后,红酵母的 I_{1157}/I_{1654} 、 I_{1520}/I_{1654} 平均值 >10 ,而其它菌株的几乎为零,红酵母的比值极其显著地高于其它酵母细胞,只要 I_{1157}/I_{1654} 或者 I_{1520}/I_{1654} 比值大于 0.5 即可判断其胞内合成类胡萝卜素.考虑到部分微生物细胞也会

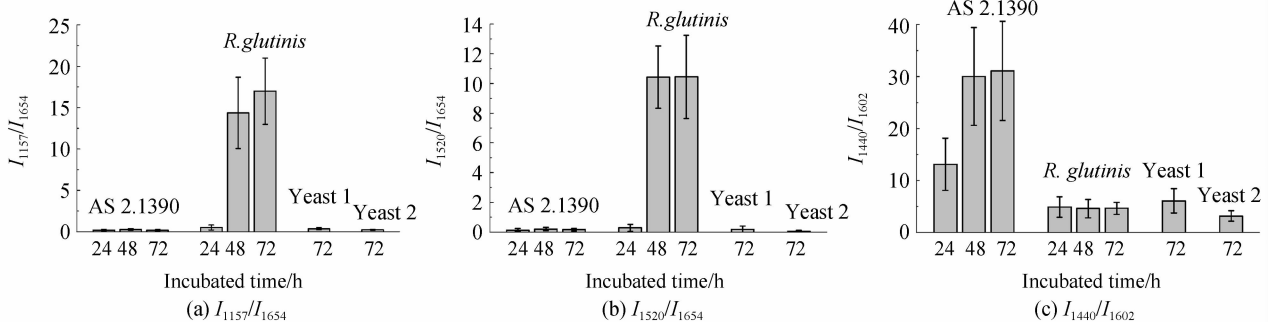


图3 AS2.1390 油脂酵母、*R. glutinis* 红酵母、Yeast1 和 Yeast2 普通酵母的单细胞喇曼光谱特征峰强度比柱状统计图
Fig. 3 Histogram of I_{1157}/I_{1654} , I_{1520}/I_{1654} and I_{1440}/I_{1602} from Raman spectra yeast cells of AS2.1390 oleaginous yeast, *R. glutinis* red yeast, Yeast1 and Yeast2 general yeasts

合成少量类胡萝卜素^[21],本文把分选判别的阈值定义为 I_{1157}/I_{1654} 或 $I_{1520}/I_{1654} > 5$. 在实际分选中,胞内类胡萝卜素含量越高, I_{1157}/I_{1654} 或 I_{1520}/I_{1654} 比值越大,因而这两个比值也可以作为筛选高产类胡萝卜素菌株的指标. 同样,油脂酵母在培养了 48 h 后,其 I_{1440}/I_{1602} 值大于 30,而其它细胞的不到 7.0,显著低于产油细胞的. 考虑到一般细胞胞内的脂类物质含

量比较稳定,只要把判别阈值定义为 10 即可分选到油脂细胞,而且 I_{1440}/I_{1602} 值越大,油脂含量越高.

2.4 细胞筛选与细胞培养、喇曼光谱检验

样品槽置于倒置显微镜载物台上,将无菌水注入无菌样品槽,控制至刚好注满,将少量待分选的酵母细胞样品缓慢注入样品槽左孔中,并分别加盖玻片密封以防止样品受空气扰动,如图 4(A1),待至液

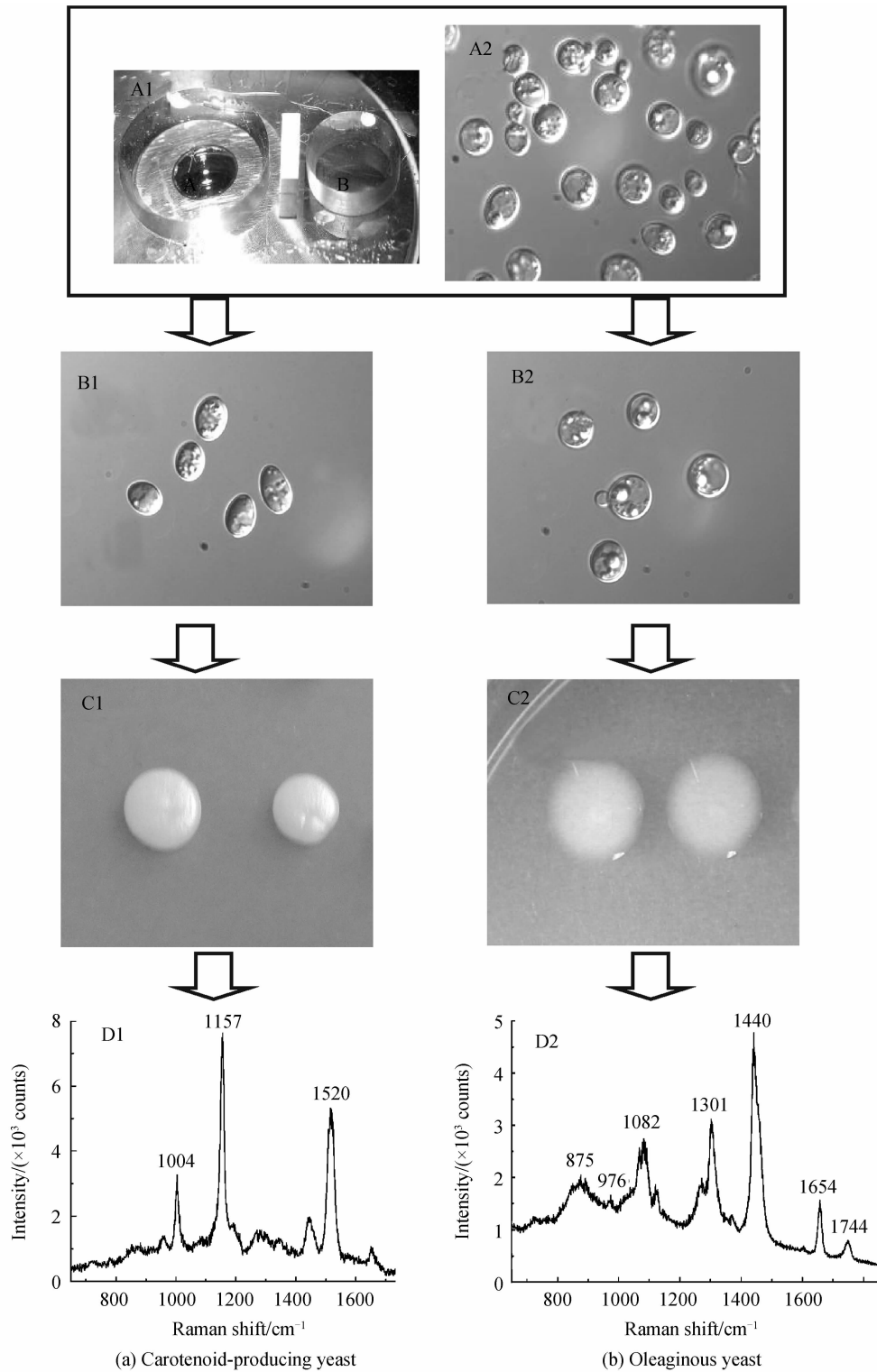


图 4 细胞分选与验证过程
Fig. 4 The sorting and verification of carotenoid-producing yeast and oleaginous yeast cells

体的流动基本停止,此时,酵母细胞只做比较缓慢的随机布朗运动.在40倍光学显微镜下的酵母细胞(图4(A2)),很难直接将目标细胞从细胞群中区分出来,但是,通过选定喇曼光谱特征标记却可以很好的完成辨别.采用780 nm的激光镊子俘获未知酵母细胞,激发收集其喇曼光谱后,启动模式识别程序进行判别.若根据目标产物标记,判定该细胞内没有上述目标产物,则释放,俘获下一个细胞.若判为目标酵母细胞,通过光镊将其移至右边的孔中后,释放细胞,关闭隔栅P,用吸管小心吸出来,即可实现单个细胞的分离.如果需要分离更多细胞,将激光镊子移回左孔位置,调整俘获下一个细胞,如此重复筛选出一定数量的含有目标产物的酵母细胞.图4直观地展示了整个分选过程.图中B1为分离出的判定为产类胡萝卜素的酵母细胞,B2为产油脂酵母细胞,可以看到在光学显微镜下,各细胞的形态具有较好的一致性.可以根据实验的需要筛选单个细胞或者多个细胞.为了验证筛选结果,关闭隔栅P,将筛选出的细胞分别从样品槽中用移液器吸出后,分别接入YEPD固体培养基中培养48 h.结果见图4,C1为筛选出的产类胡萝卜素酵母,经培养后菌落呈现明显的红色,这是酵母细胞在胞内大量合成类胡萝卜素的结果;而筛选出的产油酵母,经菌落培养后呈透明凝胶状(图4(C2)),这是酵母细胞合成大量油脂的结果.为了进一步验证筛选结果,分别挑取少量细胞悬浮在水中,光镊俘获并喇曼光谱检测,结果如图4D,图中酵母细胞的喇曼光谱(D1,D2)都含有强烈的类胡萝卜素的 $1\ 157\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 520\ \text{cm}^{-1}$ 或者油脂的 $1\ 301\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 440\ \text{cm}^{-1}$ 等特征性喇曼光谱信号峰.这就意味着,本方法不仅能够正确的识别并筛选出产目标产物的酵母细胞,而且经激光镊子俘获没有导致细胞的死亡,也没有使细胞失去活性,经培养后能够正常繁殖,代谢出相应的产物.

3 结论

应用喇曼光镊系统,建立目标产物的喇曼光谱的特征信息峰及判别阈值,通过自编程序在线实时判别俘获细胞是否含有目标产物,借助光镊将细胞移动到收集小孔槽中,从而完成细胞的分选与收集.酵母细胞由于重力的原因,全部下沉至厚为3 mm的玻璃板底部大约需要20 min,而因为布朗运动的扩散,在60 s内细胞能够移动的最大距离为 $20\ \mu\text{m}^{[20]}$,而孔间的微通道距离为 $500\ \mu\text{m}$,因此,在没有激光操控的情况下,基本上没有细胞能够从样品槽的一个孔到达另一个孔,这保证了本实验筛选方法的可行性.本方法在俘获一个酵母细胞后,收集

其喇曼光谱只需要15 s,运行计算程序即可得到辨别结果.同时,本方法还可以通过判别阈值的调整来筛选高产菌株.这一过程对酵母细胞的损害比较小,且不会引入其他污染物质,是实验室筛选单细胞的理想方法,并为实现计算机控制的在线筛选单细胞提供了新思路,在与微流控技术结合后,将有望实现批量快速地自动筛选更多微生物单细胞.

参考文献

- [1] DAVEY H, KELL D B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations; the importance of single-cell analyses[J]. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(4): 641-696.
- [2] HUANG W E, GRIFFITHS R I, THOMPSON I P, *et al.* Raman microscopic analysis of single microbial Cells[J]. *Anal Chem*, 2004, **76**(15): 4452-4458.
- [3] HUANG W E, STOECKER K, GRIFFITHS R I, *et al.* Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(8): 1878-1889.
- [4] HUANG W E, BAILEY M J, THOMPSON I P, *et al.* Single-cell raman spectral profiles of *pseudomonas fluorescens* SBW25 reflects in vitro and in planta metabolic history[J]. *Microbial Ecology*, 2007, **53**(3): 414-425.
- [5] SANDERSON J M, WARD A D. Analysis of liposomal membrane composition using Raman tweezers[J]. *Chemical Communications*, 2004, **7**(9): 1120-1121.
- [6] XIE C A, CHEN D, LI Y Q. Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers[J]. *Optics Letters*, 2005, **30**(14): 1800-1802.
- [7] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae beats bio-ethanol[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, **26**(3): 126-131.
- [8] YANG Zhou-ping, HUANG Qian-ming, REN Jun, *et al.* Screening of *Rhodotorula* producing carotenoid and optimizing its fermentation conditions [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2009, **27**(3): 327-332.
杨洲平,黄乾明,任君,等.高产类胡萝卜素红酵母的筛选及发酵条件的优化[J]. *四川农业大学学报*. 2009, **27**(3): 327-332.
- [9] BEATTIE J R, BELL S E, MOSS B W. A critical evaluation of Raman spectroscopy for the analysis of lipids: fatty acid methyl esters[J]. *Lipids*, 2004, **39**(5): 407-419.
- [10] WU H, VOLPONI J V, OLIVER A E, *et al.* In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, doi: 10.1073/pnas.1009043108.
- [11] SANDT C, SMITH-PALMER T, PINK J *et al.* A confocal Raman microscopy study of the distribution of a carotene-containing yeast in a living *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. *Applied spectroscopy*, 2008, **62**(9): 975-983.
- [12] TAO Z, WANG G, XU X, *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.
- [13] LI Yan, MENG Ling-jing, LIU Jun-xian, *et al.* Study on the gelatinization process of single rice starch particle by using laser tweezers Raman spectroscopy system [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(7): 1324-1329.
李艳,孟令晶,刘军贤,等.拉曼光谱法测定单个大米淀粉微粒糊化过程的实时研究[J]. *光子学报*, 2010, **39**(7): 1324-1329.
- [14] DU Yi-ping, PAN Tie-ying, ZHANG Yu-lan. Chemometrics

- application[M]. 1st ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 63-71.
- 杜一平,潘铁英,张玉兰. 化学计量学应用[M]. 1版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 63-71.
- [15] FENG Xin-wei, ZHU Zhong-liang, SHEN Meng-jie, *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.
- [16] RITSUKO F, CHEN Chun-hai, TADASHI M, *et al.* HNMR, electronic-absorption and resonance-Raman spectra of isomeric okenone as compared with those of isomeric β -carotene, canthaxanthin, β -apo-8'-carotenal and spheroidene [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 1998, **54**(5): 727-743.
- [17] SINGH G P, VOLPE G, CREELY C M, *et al.* The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, **37**(8): 858-864.
- [18] HUANG Y S, KARASHIMA T, YAMAMOTO M, *et al.* Molecular-Level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fyeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(30): 10009-10019.
- [19] WANG Gui-wen, YAO Hui-lu, PENG Li-xin, *et al.* Real-time Raman spectrum of a phenomenon in the activation process of single yeast cell cultured in glucose solution [J]. *Microbiology Chinese*, 2007, **34**(6): 1109-1113.
- 王桂文,姚辉璐,彭立新,等. 一种酵母细胞生长现象的实时单细胞拉曼光谱观察[J]. 微生物学通报, 2007, **34**(6): 1109-1113.
- [20] HUANG W E, WARD A D, WHITELEY A S. Raman tweezers sorting of single microbial cells [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, **1**(1): 44-49.
- [21] MAROVA I, CAMECKA M, HALIENOVA A, *et al.* Production of carotenoid-/ergosterol- supplemented biomass by red yeast *Rhodotorula glutinis* grown under external stress [J]. *Food Technol Biotechnd*, 2010, **48**(1): 56-61.

Sorting Economic Microorganisms by Using Optical Manipulation and Raman Microspectroscopy

LI Zi-da^{1,2}, TAO Zhan-hua¹, MENG Ling-jing^{1,2}, CHEN Shan-shan¹, LIU Jun-xian², WANG Gui-wen¹

(1 *Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China*)

(2 *College of Physics Sciences and Technology, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China*)

Abstract: A novel technique of sorting yeast cell based on Raman characteristics of target products synthesized by microorganisms was developed by using Raman microspectroscopy coupled with optical manipulation. To sort oleaginous yeast and carotenoid-producing yeast, the plant oil and β -carotene were chosen as the target products and their Raman characteristics, the intensity ratios of $1\ 440\ \text{cm}^{-1}$ and $1\ 602\ \text{cm}^{-1}$ band (i. e. I_{1440}/I_{1602}) for oil, and I_{1157}/I_{1654} or I_{1520}/I_{1654} for carotenoid, were extracted and marked as target cells. Single yeast cell was captured and manipulated by using a 780 nm laser, and the Raman spectra of trapping cell was acquired simultaneously. A real-time computer distinguishing program was used to assist the sorting. The distinguished cells were then extracted and validated by following culture and Raman detection. This work provides a new method for screening microorganisms synthesize products with economic value.

Key words: Raman spectroscopy; Products; Yeast; Strains sorting