

doi: 10. 3788/gzxb20164502. 0217002

单细胞喇曼光谱分析高渗环境对酵母乙醇发酵代谢的影响

覃赵军^{1,2}, 彭立新¹, 王晓春¹, 陈真英², 王桂文¹

(1 广西科学院 生物物理实验室, 南宁 530007)

(2 广西大学 行健文理学院, 南宁 530004)

摘 要:应用喇曼光谱和单细胞分析技术监测非发酵底物形成的不同高渗透压对酿酒酵母乙醇发酵的影响, 及发酵过程胞内主要生物大分子的变化动态, 以期从光谱学角度获知酵母细胞乙醇耐受的分子机制. 结果显示, 渗透压的升高明显延缓酵母细胞的生长、底物消耗和产物生成, 但在 2.0 mol/L 山梨醇下乙醇的最终产量高于对照组. 主成分分析显示, 不同渗透压主要影响酵母细胞光谱的 1 300~1 306 和 1 443 cm^{-1} 等源自脂类物质的喇曼峰, 说明渗透压影响了胞内脂类物质的合成. 主特征峰强度的动态变化显示, 高渗透压会显著影响 782、1 301、1 602 和 1 657 cm^{-1} 峰所表征物质的合成时间和强度, 进而影响细胞的代谢方向. 结果表明耐高渗菌株能适应高渗环境, 调整胞内组分含量, 实现高产发酵.

关键词:喇曼光谱; 渗透压; 乙醇; 酵母; 单细胞分析

中图分类号: O657. 37

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2016)02-0217002-8

Investigation of the Influence of Hyperosmosis on Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* Using Single-cell Raman Spectroscopy

QIN Zhao-jun^{1,2}, PENG Li-xin¹, WANG Xiao-chun¹, CHEN Zhen-ying², WANG Gui-wen¹

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

(2 Xingjian College of Science and Liberal Arts, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: To comprehend the resistance mechanism of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*, Raman spectroscopy and single-cell analysis technique were used to record the Raman spectra of individual yeast cells during ethanol fermentation under different hyperosmosis caused by non-fermentable substrate, monitor the dynamic of major intracellular bio-macromolecules. Increasing osmotic pressure significantly delayed the growth of yeast cells, substrate consumption and product formation, but the final ethanol production was not lower than control group even supplemented with 2.0 mol/L of sorbitol. Principal component analysis revealed that hyperosmosis mainly impact the peaks 1 300~1 306, 1 443 cm^{-1} and other Raman peaks derived from lipids, indicating the hyperosmosis may affect the synthesis of intracellular lipids of yeast. The intensity dynamic of Raman peaks showed that hyperosmosis impacted the synthesis period of macromolecules and the strength of peaks 782, 1 301, 1 602 and 1 657 cm^{-1} and then affected the metabolism direction of yeast cell. The results indicate that high permeability-resistant yeast strains can adapt to hypertonic environment, adjust the content of intracellular components to achieve high yield fermentation.

Key words: Raman spectroscopy; Hyperosmosis; Ethanol; Yeast; Single-cell analysis

OCIS Codes: 170.5660; 170.1530; 170.1420

基金项目: 广西自然科学基金(Nos. 2013GXNSFAA019043, 2012GXNSFCA053001)和广西高校自然科学基金(No. KY2015LX747)资助
第一作者: 覃赵军(1986-), 男, 助教, 硕士, 主要研究方向为喇曼光谱在生物医学中的应用研究和数据挖掘. Email: qinzhaojun10@gmail.com

通讯作者: 王桂文(1969-), 男, 研究员, 主要研究方向为生物物理与应用微生物等. Email: wguiwen@gxas.cn

收稿日期: 2015-08-14; 录用日期: 2015-10-30

<http://www.photon.ac.cn>

0 引言

化石能源的日益枯竭,令能源问题成为人类必须面对的严峻挑战之一.生物乙醇作为重要的清洁能源和可再生能源,被认为是化石能源的最好替代物,但影响生物乙醇进一步应用的瓶颈是过高的生产成本^[1-2].生物乙醇产业本身就是耗能型产业,需要通过技术创新,鼓励多元发展模式,开展多种原料(玉米、甘蔗、木薯、甜高粱等)来降低成本,降低消耗,提高效益.其中,采用浓醪高浓度乙醇发酵和选育耐高乙醇的发酵菌株是两种息息相关的重要攻关技术,对发酵的工艺及成本控制的影响尤为重要^[3-4].

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是目前乙醇发酵工业上应用最广泛、效果最好的发酵微生物.乙醇发酵是一个动态过程,高浓度乙醇发酵时,酵母细胞要经受各种不断变化的环境胁迫,如发酵初期高浓度葡萄糖产生的高渗透压、逐步减少的营养物质、持续升高的乙醇浓度、低 pH 及发酵副产物抑制等,这些压力胁迫可能同时或依次出现,影响到发酵进程^[4-5].其中,渗透压对酿酒酵母胞内代谢关键酶如柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶活性有重要的影响,这些酶活力的增强影响酵母在高渗、高酒精环境下的生长需要与能量代谢的平衡^[6].渗透压对酿酒酵母的生理特性也有着重要影响^[7].增强发酵微生物的环境压力抗逆性是改善、提高乙醇发酵能力的先决条件.但微生物对发酵环境中各种压力耐受性的机理十分复杂,其多重压力耐受性状的获得往往涉及大量的基因及众多相关代谢途径,酵母细胞应对适应环境变化的手段之一就是改变基因表达模式^[8].

喇曼光谱作为一种实时无损而快速的检测技术,已经应用于乙醇发酵过程的实时或者在线监测主要成分、或底物、产物的变化动态^[9-12].上述研究是群体水平上的总体分析,而即使是在很均一的微生物群体中,细胞间也存在遗传、生理、形态等多方面的遗传或非遗传的细胞间差异化能力.针对乙醇发酵的主角酵母细胞在单细胞水平上已开展了部分研究^[13-17],但在应用光谱技术研究高渗环境对乙醇发酵的影响方面,还没有报道.对高浓度乙醇发酵过程的研究发现: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的 3 个变化阶段,但出现的时间要比产物变化晚约 4 h;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做适应调整;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以无规则卷曲为主;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^[14].因此,为了认识酿酒酵母对环境压力胁迫的抗逆性和高浓度乙醇发酵性能的机制,本

文应用激光镊子喇曼光谱技术,在乙醇发酵中加入非发酵性多元醇——山梨醇,提高发酵液的渗透压,收集发酵乙醇过程中发酵底物和代谢产物及单个酵母细胞生物大分子的喇曼光谱,分别追踪它们的特征峰的变化过程,结合单细胞喇曼光谱数据分析,获知细胞在不同阶段的异质性,以期获知酵母耐性发酵的机制.结果显示,耐高渗菌株能适应高渗环境,调整胞内组分含量,实现高产发酵.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

酿酒酵母(*S. cerevisiae*)菌株 GXAS-Bp1 为广西科学院国家非粮生物质能源工程中心筛选、保藏.

1.1.2 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 6.0.

发酵培养基:葡萄糖 75 g,蛋白胨 5.0 g, CaCl_2 0.06 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g, KH_2PO_4 1.5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 4.5.根据实验需要分别添加 0、0.6、1.0 和 2.0 mol/L 的山梨醇来调整发酵培养基的渗透压.

1.2 材料与方法

1.2.1 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,30℃、220 r/min 过夜培养,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 的三角瓶中,32℃、100 r/min 培养.从接种时起,在第 0、3、6、9、12、15、18、22、25、30、36、48 和 60 h 取样,每次取样 2 mL.

应用比浊法测定酵母细胞的生长量.比浊法是建立在悬浮质点对光的散射基础上的一种间接测量微生物生长量的分析方法,在一定的浓度范围内,酵母细胞的浓度与 600 nm 处的光密度值(即 OD_{600})成正比.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 OD_{600} 值.

1.2.2 实验系统与光谱收集

喇曼系统如文献^[18-20]所述,将 780 nm、18 mW 的半导体激光导入到倒置生物显微镜(TE2000U,日本尼康),经油浸物镜(N. A. 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喇曼散射.样品放置在厚度为 100 μm 的石英玻璃样品槽中,喇曼信号经物镜收集并聚焦进入光谱仪 LS785(分辨率为 6 cm^{-1} ,光栅 600 线/mm,650 nm Blaze,美国 Acton)的输入狭缝,由耦合到光谱仪的 CCD(PIXIS 400BR,美国普林斯顿仪器公司)采集.系统的分辨率为 6 cm^{-1} ,用聚苯乙烯小球(直径 2.0 μm)校正系统.在乙醇发酵环境下,酿酒酵母细胞大小约为

2~4 μm,光镊中心光斑大小约为 2 μm,光镊俘获收集的喇曼光谱基本覆盖了整个酵母细胞的信息。

光谱收集:取 150 μL 发酵液,置于样品槽内,盖玻片密封。在 100 倍油浸物镜下观察酵母细胞,激光镊子随机俘获单个细胞,以 30 s 积分时间收集俘获细胞的喇曼光谱,在细胞附近以相同条件收集没有俘获细胞的喇曼光谱作为背景光谱。每个样品收集 40~50 个细胞的喇曼光谱,5 个背景光谱。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。

1.2.3 数据处理方法

实验采集到的光谱数据转成 ASCII 格式,进行背景扣除和响应曲线的校正,其算法为: $S_{act}(v) = (S_{acq}(v) - S_{bg}(v))/R(v)$, (其中 $S_{act}(v)$ 为样品的实际光谱, $S_{acq}(v)$ 为带背景的光谱, $S_{bg}(v)$ 为背景光谱, $R(v)$ 为实验系统的响应曲线),接着采用 Visual Basic 6.0 编写的程序对数据进行平滑去噪,其算法为 9 点 Savitzky-Golay 卷积平滑法,最后用线性拟合结合积分法求特征峰的峰面积。建立生物大分子动力学行为时,利用聚苯乙烯小球的信号强度对各个峰面积值进行校正,相关数据用软件 Matlab 和 Origin 8.1 进行处理。

2 结果分析与讨论

2.1 不同渗透压对酵母乙醇发酵过程的影响

图 1 显示了 GXAS-Bp1 菌株在 1.0 mol/L 山梨醇下发酵液的喇曼光谱和不同渗透压环境下的乙醇发酵进程。图 1(a)中,在发酵前期,发酵液的特征峰主要来自底物葡萄糖,中、后期主要来自产物乙醇(相关指认见表 1^[21-23]),其中 880 cm⁻¹ 峰和 1 126 cm⁻¹ 峰是信号较强的两个独立峰,用于监测发酵液底物消耗和产物合成。

对照组中(图 1(b)),酵母细胞在接入发酵培养基后几乎没有经过迟滞期,马上进入快速增长的对数生长期,持续到 12 h 左右,随后生长逐渐进入稳定期。葡萄糖消耗、乙醇生成和细胞生长几乎同步,在 24 h 左右达到乙醇生成的最大值。0.6 mol/L 山梨醇的渗透压环境对酵母细胞的生长没有影响,生长曲线、葡萄糖消耗和乙醇生成和对照组几乎一致(数据没有给出),说明在 7.5% 的葡萄糖发酵条件下,添加 0.6 mol/L 山梨醇对 GXAS-Bp1 菌株几乎没有影响。

在 1.0 mol/L 山梨醇的渗透压环境下,细胞生长和对照组类似,种子液接入发酵培养基后,即进入快速增长的对数生长期,持续到 12 h 左右。但其最终的 OD₆₀₀ 值仅为对照的 95% 左右,另一个不同点是在 3 h 后才开始乙醇生成,且最高浓度约为对照的 81% 左右。说明 1.0 mol/L 浓度的山梨醇对该菌株有一定的影响。

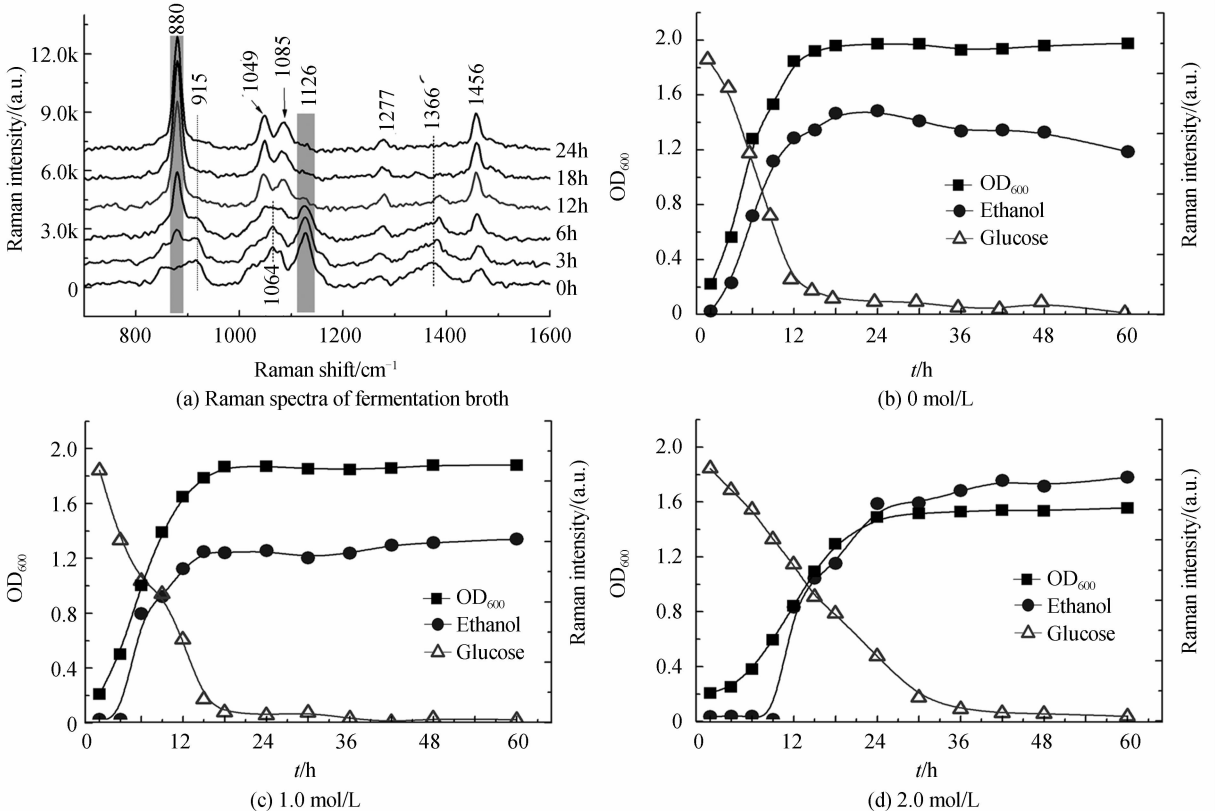


图 1 喇曼光谱监测不同渗透压下的乙醇发酵动态

Fig. 1 Dynamic of ethanol fermentation supplemented sorbitol followed by Raman spectroscopy

表 1 发酵液与酵母细胞主要喇曼信号峰指认

Table 1 Tentative assignment of Raman bands derived from fermentation broth and single yeast cell

	Raman shift/cm ⁻¹	Sources	Tentative assignment
Fermentation broth	880	C—C—O stretching (in-plane)	Ethanol
	915	C—C—O stretching (in-plane)	Glucose
	1 049	C—C—O stretching	Ethanol
	1 064	C—C—O stretching (out-of-plane)	Glucose
	1 085	C—C—O stretching	Ethanol
	1 126	C—C—O stretching (out-of-plane)	Glucose
	1 277	C—O—H bend stretching	Ethanol
	1 366	CH deformation	Glucose
	1 456	CH ₃ asymmetric deformation	Ethanol
Yeast cell	716	CN ⁺ (CH ₃) ₃ stretching	Lipids
	782	Ring breathing of base U, C and T	RNA
	853	Ring breathing	Tyrosine
	919	C—C stretching	Lipids
	1 005	Ring breathing	Phenylalanine
	1 083~1 085	C—C stretching C—N stretching	Lipids Protein
	1269	N—H and C—H bending =C—H bending	Amide III Lipids
	1 300~1 306	CH ₂ twist stretching	Lipids
	1 372	CH deformation and CH ₃ symmetric deformation	Lipids
	1 440~1 445	CH deformation	Lipids and protein
	1 602~1 605	C=C stretching	Tyrosine and phenylalanine
	1 657	C=O stretching	Amide I, α -helix
	1 742	C=O stretching	Lipids

在 2.0 mol/L 山梨醇的渗透压环境下, 细胞生长出现了明显的迟滞期, 在 6 h 左右才开始进入对数期, 在 24 h 左右进入稳定期; 乙醇生成和细胞生长对应, 在 9 h 左右才开始大量合成, 在 36 h 左右达到稳定的最大浓度, 但其最大浓度比对照高约 8% 左右. 说明 2.0 mol/L 山梨醇的渗透压环境影响酵母细胞的生长, 延缓了发酵进程, 但最终的乙醇产量高于对照.

2.2 不同渗透压下乙醇发酵过程酵母细胞的喇曼光谱

已有研究表明, 基于光镊或者共焦显微喇曼光谱技术的单细胞分析方法, 可以获取单个细胞的喇曼光谱信息, 这些分子指纹基本反映了细胞的生化组分, 特别是本研究所采用的基于光镊子俘获的喇曼技术, 没有改变细胞的微环境, 得到的是正常生理状态的酵母细胞的信息, 反映的是实时的细胞状态^[25-29]. 图 2 是发酵过程第 6、12 和 24 h 时细胞平均光谱, 主要特征峰指认见表 1. 图中显示, 发酵初期(6 h), 不同渗透压下细胞的各喇曼光谱特征峰的信号都比较弱, 而且平均光

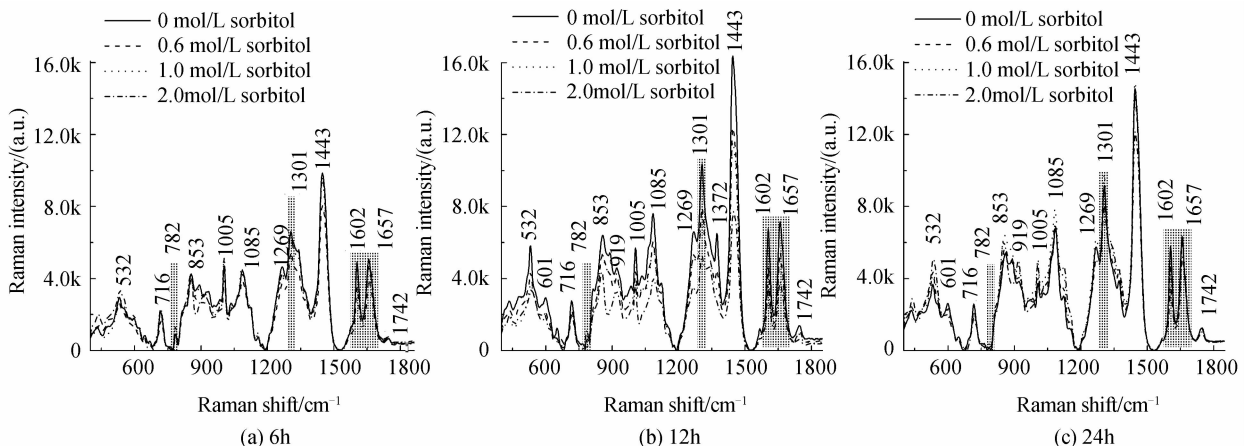


图 2 发酵过程中酵母细胞平均光谱

Fig. 2 Averaged Raman spectra of single yeast cells during ethanol fermentation, cultured with 0, 0.6, 1.0 or 2.0 mol/L of sorbitol

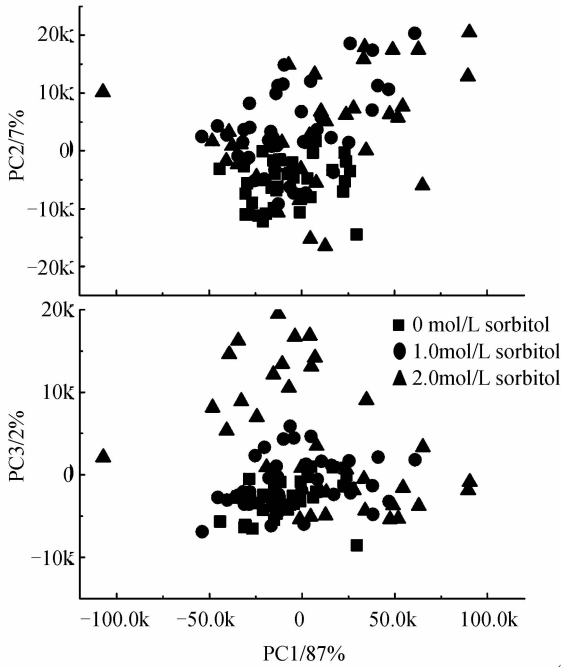
谱曲线基本相同;12 h时,对照组的细胞喇曼曲线信号最强,随着渗透压的升高而逐步减弱;24 h时,细胞光谱信号有所减弱,各平均光谱曲线又趋于接近.说明在同样的发酵条件、不同的外源渗透压下,酵母细胞的乙醇发酵进程有差异,其胞内主要生物大分子的含量也不同.

2.3 发酵过程酵母细胞喇曼光谱数据挖掘

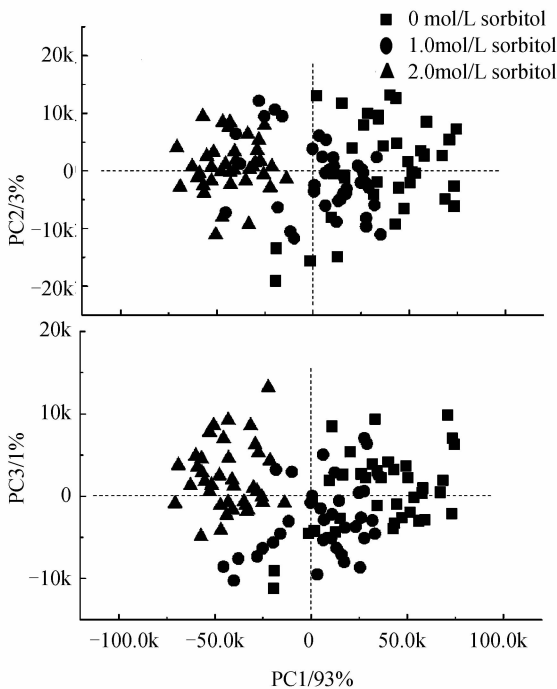
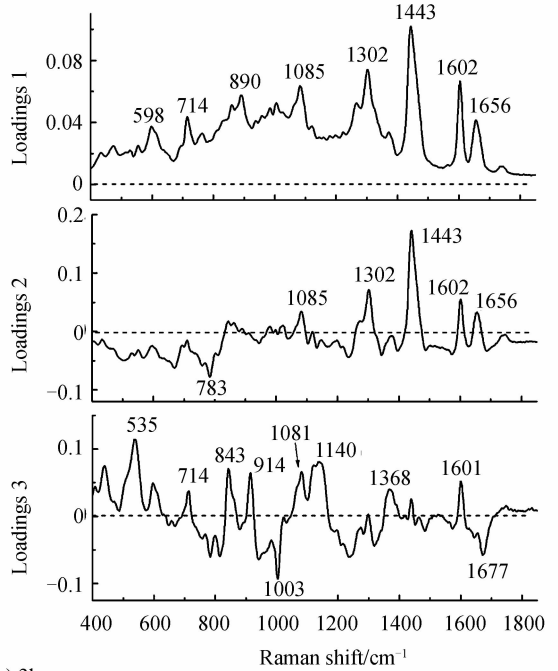
2.3.1 酵母细胞喇曼光谱主成分分析

为获得单细胞在不同渗透压下的发酵方向、代谢特点和代谢机制等信息,通过主成分分析(Principal

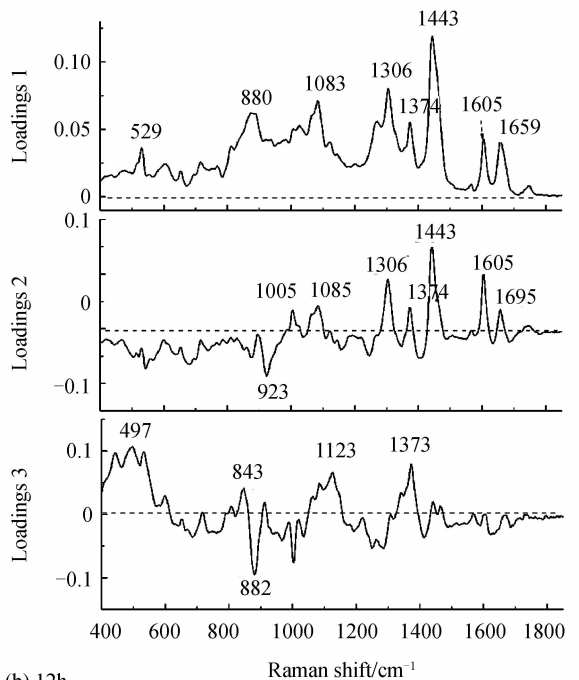
Component Analysis, PCA)对数据集进行简化、降维来提取信息.结合细胞的生长曲线、产物生成和底物消耗等信息(参见图1),选择3 h、12 h和24 h三个时刻的数据集进行主成份分析(图3).结果显示:接种后3 h,不同渗透压下的细胞光谱在各主要成分下没有明显的区分,但是对照细胞处于相对集中的区域,而1.0 mol/L和2.0 mol/L山梨醇下的细胞比较分散,细胞在不同的环境中代谢强度和方向的不一致性已开始显露,总体上特征物质强度在得分的贡献程度上是相当的,表现在载荷图中得分值的分布中心基本重合;但是高



(a) 3h



(b) 12h



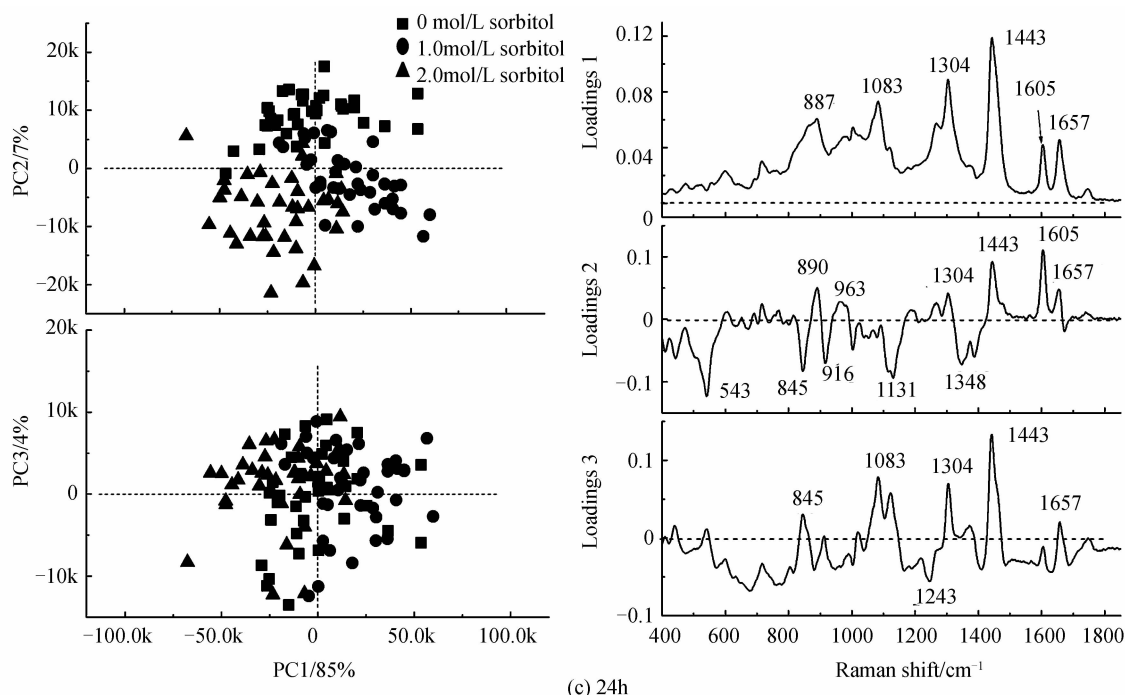


图3 不同发酵阶段细胞光谱主成份分析得分图(左)及相应的载荷图(右)

Fig. 3 PCA scatter plots (left column) and loadings of PC1, PC2 and PC3 (right column) for Raman spectra of single yeast cells cultured with 0, 1.0 or 2.0 mol/L of sorbitol

浓度的山梨醇培养基中,细胞间物质的含量和异质性较大,表现为其载荷图中分布范围比较大.说明外加渗透压从发酵的初期就对酵母细胞产生了一定的影响(图3(a)).

发酵至12 h(图3(b)),第一主成份的得分值占总方差的93%.不同渗透压下的细胞光谱在PC2、PC3方向没有显著的区别,而沿着PC1轴方向分布于三个相对集中的区域,表现酵母细胞沿着各自的代谢强度和方向进行发酵.对照0 mol/L山梨醇培养基的得分值最大,与529、880、1 083、1 306、1 443、1 605和1 659 cm^{-1} 等表征的物质呈正相关,2.0 mol/L的得分值最小,与上述各特征峰表征的物质呈负相关.由此推断,山梨醇的浓度越高,此时利用底物的速率最小,导致细胞体内529、880、1 083、1 306、1 443、1 605和1 659 cm^{-1} 等峰表征的物质含量越低,这与图1反映出的信息相同.

发酵至24 h(图3(c)),影响得分分布的峰值主要是887、1 083、1 304、1 604、1 443和1 657 cm^{-1} 等峰,体内生物大分子的含量在三种培养基中差别依然存在,0 mol/L山梨醇的细胞分布较12 h的有左移之势,而2.0 mol/L有右移之势,1.0 mol/L亦有右移的趋势但幅度最小,这显示出12 h之后,2.0 mol/L、1.0 mol/L山梨醇的在底物的利用速率增大,而0 mol/L山梨醇的则减少,中后期2.0 mol/L山梨醇下的乙醇产量增大.

图3显示,在发酵的初始阶段,高渗透压下细胞间异质性较大,随着发酵延伸,胞内物质趋于均一.第一主成分的主要影响峰多是714、880~890、1 083~1 085、1 302~1 306、1 443、1 602~1 606和1 656~1 659 cm^{-1} 等反映胞内乙醇和主要生物大分子的特征峰,特别是1 302~1 306和1 443 cm^{-1} 等源自脂类物质的喇曼峰,说明渗透压影响了胞内脂类物质的合成,而且在发酵的初期渗透压就对酵母细胞的生理状态有所改变,影响底物的消耗速率和体内物质的合成强度,进而影响了乙醇的生成速率和产量.

2.3.2 不同渗透压下细胞特征光谱的变化动态

图4是不同渗透压乙醇发酵过程中,单个酵母细胞的782、1 301、1 602、和1 657 cm^{-1} 峰(见图2灰色标识)平均强度的变化动态.总体上看,对照组细胞的脂类物质和蛋白质的含量高于高渗环境的,胞内生物大分子的变化动态与细胞的生长动态对应(参见图1).

对照组中,源自RNA的782 cm^{-1} 在酵母细胞进入新环境3 h左右有一个快速增强的过程,随后迅速下降,在15 h降至最低并一直维持在该水平;而1 301、1 602、和1 657 cm^{-1} 等峰则和782 cm^{-1} 峰相反,这三者的变化趋势类似,在0~3 h左右峰强快速下降,随后迅速增强直到12 h左右,直到到发酵后期都维持缓慢增加,其中1 301和1 657 cm^{-1} 峰在18 h左右有个降低的过程.

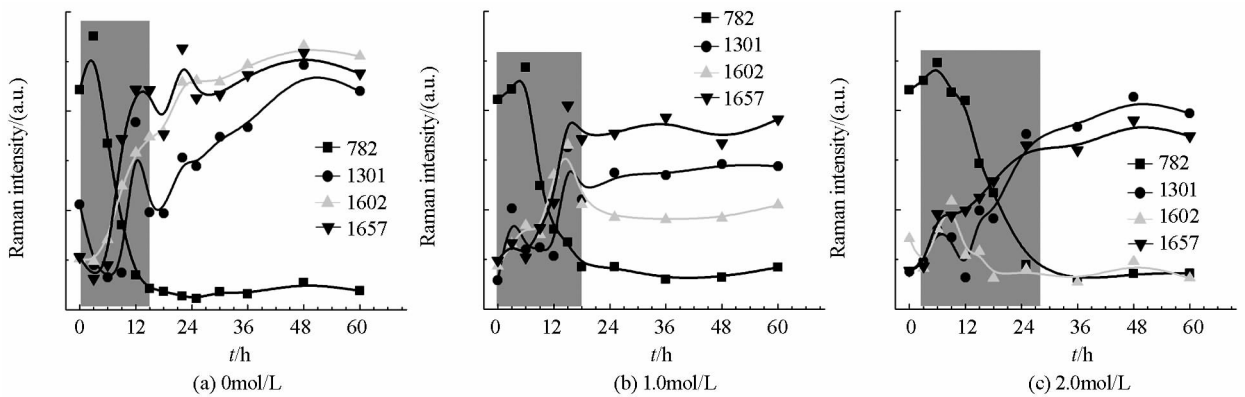


图4 发酵过程酵母细胞 782、1301、1602 和 1657 cm^{-1} 峰平均信号强度

Fig. 4 Time course of averaged intensities of Raman bands at 782, 1301, 1602 and 1657 cm^{-1} from single yeast cells

1.0 mol/L 山梨醇的渗透压中,细胞经历较长的适应期,是对照组的约两倍,782 cm^{-1} 峰最大值出现在 6 h 左右,1301、1602、和 1657 cm^{-1} 的适应期也相应的延长 3~6 h 左右,在 18 h 左右达到稳定.此外,在喇曼峰强度上,1 mol/L 山梨醇的 1301、1602 和 1657 cm^{-1} 的强度比对照组弱;达到稳定之后,对照组中 1301、1602 和 1657 cm^{-1} 这三者的强度仍然缓慢上升,而 1.0 mol/L 山梨醇中的则在 15 h 左右达到峰值,随后有所减弱,在 21 h 左右进入稳定状态;1602 cm^{-1} 峰的强度明显弱于对照。

2.0 mol/L 山梨醇中,细胞经历的适应期更长,大约为 24 h 左右;782 cm^{-1} 峰最大值出现在 6 h 左右,随后逐渐减弱,在 18 h 左右达到稳定.1602 cm^{-1} 峰的强度显著地弱于对照和 1.0 mol/L 山梨醇环境,9 h 左右有所升高,在 18 h 后即处于较低水平;1301 和 1657 cm^{-1} 峰的变化规律和对照类似,但是达到稳定的时间往后延后到 24 h 左右,强度也明显减弱。

单个细胞平均喇曼光谱的分析结果显示,高渗透压会显著影响 782、1301、1602、和 1657 cm^{-1} 峰所表征的物质的合成时间和强度,进而影响代谢方向,最终会影响乙醇的产量.和浓醪乙醇发酵不同^[14],2.0 mol/L 山梨醇的高渗环境中,酵母细胞并没有大量合成在嘌呤物质(1480 cm^{-1} 峰)。

3 结论

应用喇曼光谱和单细胞分析技术监测了不同的外源渗透压对酿酒酵母乙醇发酵的影响,追踪了发酵过程胞内主要生物大分子的变化动态和乙醇的生成情况.对照组中,生长速度、底物消耗和产物生成都很快,而随着山梨醇的浓度的升高到 1.0 mol/L 以上,酵母细胞的生长、底物消耗和产物生成明显延缓,但在 2.0 mol/L 山梨醇下乙醇的最终产量与对照相当或略高于对照.主成分分析显示,不同渗透压下影响酵母细胞光谱的第一主成分的主要是 1300~1306 和 1443 cm^{-1} 等源自脂类物质的喇曼峰,说明渗透压影响了胞

内脂类物质的合成.进一步分析胞内主要特征峰强度的变化动态,显示高渗透压会显著影响 782、1301、1602、和 1657 cm^{-1} 峰所表征的物质的合成时间和强度,进而影响的代谢方向。

对本研究所测试的菌株来说,高渗透压环境影响酵母细胞的生长,延长了发酵过程,但不影响乙醇的最终产量。

参考文献

- [1] GOLDEMBERG J. Ethanol for a sustainable energy future [J]. *Science*, 2007, **315**(5813): 808-810.
- [2] SCHUBERT C. Renewable energy: Making fuels for the future[J]. *Nature*, 2011, **474**(7352): 531-533.
- [3] PEREIRA F B, GUIMARAES P M, TEIXEIRA J A, *et al.* Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, **32**(11): 1655-1661.
- [4] PULIGUNDA P, SMOGROVICOVA D, OBULAM V S, *et al.* Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, **38**(9): 1133-1144.
- [5] PRADEEP P, REDDY O V. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: Effect of nutrients[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2010, **50**(Suppl 1): 82-87.
- [6] TANG Jia-xing, WANG Ji-hua, ZHAO Chang-xin. Effect of hyperosmosis on the activities of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2008, **2008**(5): 45-49.
汤佳鑫,王继花,赵长新.渗透压对酿酒酵母胞内代谢关键酶活性的影响[J]. *酿酒科技*, 2008, **2008**(5): 45-49.
- [7] PRATT P L, BRYCE J H, STEWART G G. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2003, **109**(3): 218-228.
- [8] GASCH A P, SPELLMAN P T, KAO C M, *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, **11**(12): 4241-4257.
- [9] SHIH C J, SMITH E A. Determination of glucose and ethanol after enzymatic hydrolysis and fermentation of biomass using Raman spectroscopy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, **653**(2): 200-206.
- [10] AVILA T C, POPPI R J, LUNARDI I, *et al.* Raman spectroscopy and chemometrics for on-line control of glucose

- fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Progress*, 2012, **28**(6): 1598-1604.
- [11] GRAY S R, PERETTI S W, LAMB H H. Real-time monitoring of high-gravity corn mash fermentation using in situ raman spectroscopy[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, **110**(6): 1654-1662.
- [12] UYSAL R S, SOYKUT E A, BOYACI I H, *et al.* Monitoring multiple components in vinegar fermentation using Raman spectroscopy[J]. *Food Chemistry*, 2013, **141**(4): 4333-4343.
- [13] PENG L, WANG G, LIAO W, *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.
- [14] LI Zi-da, LAI Jun-zhuo, 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喇曼光谱表征 [J]. *光学学报*, 2012, **32**(3): 0317001.
- [15] QIN Zhao-jun, LAI Jun-zhuo, LIU Bin, *et al.* Raman Spectroscopic Analysis of Ethanol Fermentation at Various Initial pH Levels[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2013, **40**(2): 0215001.
覃赵军, 赖钧灼, 刘斌, 等. 不同初始 pH 值的乙醇发酵过程喇曼光谱分析 [J]. *中国激光*, 2013, **40**(2): 0215001.
- [16] WANG Qiao-zhen, LU Ming-qian, LI Bing, *et al.* Apoptosis process under high concentrations of ethanol stress at a single cell level with Raman Spectroscopy [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2014, **43**(6): 630005
王巧贞, 卢明倩, 李冰, 等. 乙醇胁迫酵母凋亡过程的单细胞喇曼光谱[J]. *光子学报*, 2014, **43**(6): 630005.
- [17] QIN Zhao-jun, LAI Jun-zhou, PENG Li-xin, *et al.* Raman Spectral profiles of promoting effects of organic nitrogen sources on ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Analytic Chemistry*, 2014, **42**(10): 1471-1477.
覃赵军, 赖钧灼, 彭立新, 等. 喇曼光谱分析有机氮源促进乙醇发酵的机制 [J]. *分析化学*, 2014, **42**(10): 1471-1477.
- [18] XIE C, DINNO M A, LI Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. *Optics Letters*, 2002, **27**(4): 249-251.
- [19] CHEN Xiu-li, LIU Jun-xian, SHEN Wei-dong, *et al.* Probing into the oxygen carrying capacity of red blood cells using Raman tweezers[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(5): 907-912.
陈秀丽, 刘军贤, 申卫东, 等. 喇曼光镊分析血红细胞的携氧能力 [J]. *光子学报*, 2010, **39**(5): 907-912.
- [20] LI Zi-da, TAO Zhan-hua, MENG Ling-jing, *et al.* Sorting economic microorganisms by using optical manipulation and Raman microspectroscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(5): 722-727.
李自达, 陶站华, 孟令晶, 等. 分选特殊产物微生物的喇曼光谱新方法 [J]. *光子学报*, 2011, **40**(5): 722-727.
- [21] PUPPELS G J, DE MUL F F, OTTO C, *et al.* Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy[J]. *Nature*, 1990, **347**(6290): 301-303.
- [22] NOTINGHER I, VERRIER S, HAQUE S, *et al.* Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells[J]. *Biopolymers*, 2003, **72**(4): 230-240.
- [23] HUANG Y S, KARASHIMA T, YAMAMOTO M, *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.
- [24] 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.
- [25] XIE C A, DINNO M A, LI Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. *Optics Letters*, 2002, **27**(4): 249-251.
- [26] SINGH G P, CREELY C M, VOLPE G, *et al.* Real-time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, **77**(8): 2564-2568.
- [27] AVETISYAN A, JENSEN J B, HUSER T. Monitoring trehalose uptake and conversion by single bacteria using laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(15): 7264-7270.
- [28] CHIU Y F, HUANG C K, SHIGETO S. In vivo probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microspectroscopy[J]. *ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2013, **14**(8): 1001-1005.
- [29] CHAN J W. Recent advances in laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) for label-free analysis of single cells [J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, **6**(1): 36-48.