

拉曼镊子分析红酵母合成类胡萝卜素

袁玉峰^{1,2}, 陶站华^{2*}, 刘军贤¹, 王桂文², 黎永青³

1. 广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004
2. 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003
3. 东卡罗莱纳大学物理系, 美国 东卡罗莱纳 27858 4353

摘要 利用拉曼镊子对红酵母合成类胡萝卜素进行分析, 考查氮源和碳源对类胡萝卜素产量的影响。取发酵终点细胞, 一部分用于紫外光谱法测定, 另一部分用拉曼镊子检测。原始光谱经过背景扣除、基线校正等方法预处理, 定性分析不同培养基培养细胞的平均光谱, 类胡萝卜素的拉曼信号强度有明显不同; 紫外检测结果和拉曼峰高数据有良好的相关性, 拟合参数的相关系数分别达到 0.9078 和 0.9121; 定量分析 1508 cm^{-1} 峰高表明适宜红酵母细胞生长和类胡萝卜素合成的氮源和碳源分别是酵母粉+胰蛋白胨、葡萄糖。以上结果说明, 拉曼镊子能提供红酵母胞内类胡萝卜素的含量信息, 是实时检测红酵母细胞类胡萝卜素合成和优化发酵培养基的有效工具。

关键词 类胡萝卜素; 红酵母; 拉曼光谱; 激光镊子

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)04-1001-05

引言

类胡萝卜素是含有异戊二烯结构的一类色素, 存在于动植物、真菌、藻类和细菌中, 广泛用于食品、医药以及饲料的添加剂, 此外, 作为维生素 A 的重要来源, 类胡萝卜素还具有防癌、抗癌、预防心脑血管疾病和抗机体衰老等功效。微生物发酵法是国内外生产类胡萝卜素的方法之一, 相比其他菌种, 红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 菌体无毒, 生产成本低, 生产周期短, 容易控制发酵过程, 有利于工业化生产。然而目前红酵母合成类胡萝卜素产量偏低, 提高类胡萝卜素的产量可以从选育优良性状的菌株和优化发酵条件两方面着手, 实现上述两个目标的前提条件是需要确定一个高效、灵敏、快速的检测类胡萝卜素的手段。传统的检测方法如紫外光谱法^[1]、高效液相色谱法^[2]等都需要对样品进行预处理。类胡萝卜素富含 C=C 结构, 这种结构具有高度的不稳定性, 对外界因素特别敏感, 导致类胡萝卜素容易降解, 因而预处理后的分析结果不能代表原始的含量, 而且萃取溶剂、温度过高、光照过强都可能使类胡萝卜素结构由反式转向顺式^[3], 因此, 传统的分析方法难以保证结果的准确性和重现

性。

拉曼光谱是一种分析生物细胞内分子结构和含量的有用工具, 拉曼谱峰的位置、强度和线宽可提供分子振动、转动方面的信息, 据此可以反映分子中不同的化学键和官能团。与传统生物检测技术相比, 拉曼光谱检测样品快速、无损, 不需要样品预处理, 可以实时和实地检测样品, 给出样品高专一性的光谱信息, 此外, 在适宜的激发波长和功率下, 细胞不会受到损伤^[4]。拉曼镊子是拉曼光谱与光学囚禁技术相结合的新技术, 其原理是利用高度会聚的激光束, 囚禁溶液中的细胞, 通过瞬时加大囚禁细胞的光束来激发细胞内分子的拉曼散射, 并收集该细胞的拉曼光谱。拉曼镊子在接近自然的生理状态下检测单细胞或细胞器, 避免了布朗运动或细胞本身运动的干扰, 减弱杂散光或荧光强度, 优化散射光的收集光路, 提高了信噪比, 已被广泛应用于胃癌细胞^[5]、地中海贫血细胞^[6,7]、前列腺癌细胞^[8]、酿酒酵母^[9]、大肠杆菌^[10]等单细胞的研究。目前, 国内外还未见拉曼镊子分析红酵母细胞的研究报道, 本文用拉曼镊子依次测定不同培养基发酵培养的红酵母细胞, 通过化学计量学方法对拉曼数据进行分析, 并结合紫外光谱测定方法, 分析紫外光谱数据和拉曼数据的相关性, 探索光镊拉曼光谱用于定量分析红酵母合

收稿日期: 2010-09-06, 修订日期: 2010-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060128), 广西自然科学基金项目 (桂科自 0991078) 和广西研究生教育创新基金项目 (2010106020702M44) 资助

作者简介: 袁玉峰, 1984 年生, 广西师范大学物理科学与技术学院硕士研究生 e-mail: yumianlinfeng868@126.com

* 通讯联系人 e-mail: taozhanhua@163.com, taozh@gxas.cn

成类胡萝卜素的可行性。

1 实验材料与方法

1.1 细胞培养

本实验所用的红酵母菌株由广西大学应用微生物研究所提供, 生长于平板上的菌株接种于 YEPD 液体培养基中, 培养 16 h 后以 2% 接种量转入装有 50 mL 液体发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 放置在 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 的摇床上发酵 84 h。液体发酵培养基共有 13 种, 可分为两类: 一类发酵培养基保持 2% 氮源(1% 胰蛋白胨+ 1% 酵母粉) 不变, 分别加入 4% 葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、木糖, 即配成六种碳源不同、氮源相同的培养基; 同理, 另一类培养基是保持 4% 碳源(4% 葡萄糖) 不变, 分别加入 2% 胰蛋白胨、2% 硫酸铵、2% 尿素、2% 酵母粉、1% 酵母粉+ 1% 胰蛋白胨、1% 胰蛋白胨+ 1% 硫酸铵、1% 胰蛋白胨+ 1% 尿素。

1.2 拉曼镊子系统

拉曼镊子系统如文献[11, 12] 所述, 有所不同的是本实验利用 40 倍油浸物镜聚焦形成一个单光束光势阱来捕获酵母细胞。文献[11, 12] 所用的 100 倍油浸物镜的激光光斑最大直径为 $2 \text{ }\mu\text{m}$, 面积约为 $3.14 \text{ }\mu\text{m}^2$, 然而发酵终点的红酵母细胞直径大约 $5 \text{ }\mu\text{m}$, 面积远大于 $3.14 \text{ }\mu\text{m}^2$, 入射激光如果只照射在细胞的局部区域所得结果能否真实反映整个细胞的光谱信息就值得怀疑, 而本实验所用 40 倍物镜的激光光斑直径大约 $5 \text{ }\mu\text{m}$, 这与细胞直径相近, 激光光斑基本上能照射整个细胞, 因此, 本实验所用拉曼镊子收集的拉曼光谱信息是可信的。

1.3 拉曼光谱测定与数据处理

以 20 mW 激发功率和 5 s 曝光时间采用捕获方式采集红酵母细胞的拉曼光谱, 每种样品各收集 100 个细胞的光谱, 每个细胞被 20 mW 的激光照射 5 s , 对胞内的类胡萝卜素影响很小。光谱数据预处理利用 Matlab 7.1 软件编写的程序进行, 原始光谱经过扣除背景光谱、基线校正预处理后得到单个细胞的实际光谱, 在此基础上, 一方面统计每组细胞样品的平均光谱, 定性分析不同组间光谱差异; 另一方面用 Matlab 7.1 编写程序对 1508 cm^{-1} 的峰高^[13] (峰最高点到基线的垂直距离) 作定量分析。

1.4 紫外光谱法测定类胡萝卜素含量

发酵终点细胞经过洗涤, 离心, 液氮反复冻融破壁、冷冻干燥后, 准确称量 0.100 g 干燥菌体, 充分研磨至破壁完全后, 加入 3 mL 丙酮中, 室温振荡 30 min 后, 利用超声波多次抽提至菌体完全变白, 离心后取上清液, 合并提取液。将提取液稀释到适当倍数, 在波长 475 nm 下测量类胡萝卜素的吸光度, 并计算单位质量红酵母菌体类胡萝卜素含量和每升发酵液类胡萝卜素的产量, 计算公式详见文献[14] 所述。

1.5 菌体发酵密度和生物量的测定

取一定量新鲜菌液, 稀释至适当倍数, 测定 OD_{600} , 统计菌体发酵密度。另外, 准确吸取 1 mL 发酵终点菌液, 每组取 3 个样品, 菌液经过离心, 洗涤之后, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干至恒重, 称

量, 取平均值作为菌体的生物量。

2 结果与讨论

2.1 红酵母细胞的拉曼光谱及各峰归属

图 1 为红酵母单细胞的拉曼光谱, 可以提供细胞内丰富的物质信息, 其中 1445 cm^{-1} 峰代表蛋白质、脂质、糖类 CH 变形振动, 1349 , 1379 和 1573 cm^{-1} 峰代表核酸信息; 1268 cm^{-1} 峰代表蛋白质酰胺 III 带 β 折叠; 1290 cm^{-1} 峰代表脂质 CH_2 扭曲振动。谱图中类胡萝卜素的特征峰分别是: 位于 1508 cm^{-1} 的 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动峰、位于 1152 cm^{-1} 的 $\text{C}-\text{C}$ 伸缩振动峰、位于 1002 cm^{-1} 的甲基(CH_3) 平面摇摆振动峰, 这三个类胡萝卜素的特征峰拉曼信号很强, 峰高远高于细胞内其他物质的拉曼峰, 其中 1508 cm^{-1} 的特征峰附近没有其他物质信号的干扰, 峰形尖锐, 且左右接近对称, 适宜利用峰高进行类胡萝卜素的定量分析。

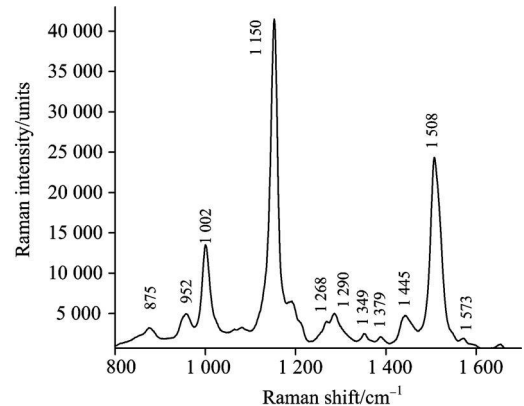


Fig 1 Raman spectra of a single *rhodotorula glutinis* cell

2.2 不同培养条件发酵的细胞平均拉曼光谱

类胡萝卜素的合成代谢与培养基中的氮源和碳源密切相关, 图 2 是不同培养基条件下红酵母细胞的平均拉曼光谱。图 2(a) 反映了不同氮源对类胡萝卜素合成的影响, 其中, 硫酸铵和尿素分别作为氮源, 前者类胡萝卜素拉曼信号强度约为后者的 2 倍, 其他几种氮源拉曼信号强度相差不多; 图 2(b) 反映了碳源对类胡萝卜素合成的影响, 分别以六种常用糖作为碳源, 类胡萝卜素的拉曼信号强度明显不同, 其中信号最强的峰高几乎是信号最弱的 4 倍, 由此可见, 碳源对类胡萝卜素的合成起着关键的作用。以上结果表明, 类胡萝卜素 3 个特征峰的强弱可以显示出不同氮源和碳源培养条件下细胞内类胡萝卜素含量的差异, 但拉曼峰高和细胞内类胡萝卜素的含量是否存在严格的定量关系, 以下的紫外光谱检测结果和拉曼峰高的相关性分析实验证实了这一假设。

2.3 紫外光谱法和拉曼检测的相关性分析

紫外光谱法是测定类胡萝卜素含量的常规方法之一, 在本研究中是称取一定质量的红酵母干菌体, 提取类胡萝卜素后测量提取液的紫外吸收值, 其结果反映单位质量红酵母细胞类胡萝卜素的含量, 而拉曼光谱则是直接检测 100 个红酵母单细胞内类胡萝卜素的拉曼峰高, 反映的是红酵母单细胞积累类胡萝卜素的平均值。图 3(a) 显示紫外检测结果和拉曼

光谱峰高的相关性, 实验数据表明, 两种光谱测定结果具有良好的相关性, 相关系数 r 达到 0.907 8, 相关性分析证明拉曼光谱是检测红酵母细胞水平类胡萝卜素含量的有效手段。然而, 利用微生物发酵法合成类胡萝卜素, 其产量除了与单个细胞合成类胡萝卜素能力有关外, 还取决于单位体积发酵液微生物细胞的发酵密度, 即生物量。在紫外光谱法中, 单位质量红酵母细胞类胡萝卜素的含量与红酵母生物量的乘积就代表每升发酵液类胡萝卜素的产量, 在拉曼光谱法中是否也能用对应的参数来反映一定体积发酵液中类胡萝卜素的产量, 微生物学中测量菌体密度的传统方法是测量发酵液在 600 nm 处的吸光度值, 即 OD_{600} , 而红酵母拉曼光谱 1 508 cm^{-1} 峰高则反映单细胞内类胡萝卜素的含量, 如果将表征单

位体积发酵液细胞数目的 OD_{600} 与表征单细胞类胡萝卜素含量的拉曼峰高相乘, 构造一个新的参数, 即 $OD_{600} \times$ Raman Peak Height(简写作 OR 值), 应该能够与紫外光谱法中的“产量”这一参数代表相同的内涵, 图 3(b) 为紫外光谱法测得的不同培养基红酵母类胡萝卜素产量与利用拉曼光谱数据构造的新参数 OR 值的相关性分析, 结果显示两个参数相关性良好, 相关系数 r 为 0.912 1, 因此, 利用拉曼光谱不但能检测单细胞水平类胡萝卜素的合成能力, 同样能够反映一定体积发酵液类胡萝卜素的总体产量。与紫外光谱法相比, 拉曼镊子能实时检测活细胞内类胡萝卜素含量, 不需要对细胞进行预处理, 克服了样品处理带来的误差, 具有无损、高效、准确等优点, 是检测细胞内类胡萝卜素的有效工具。

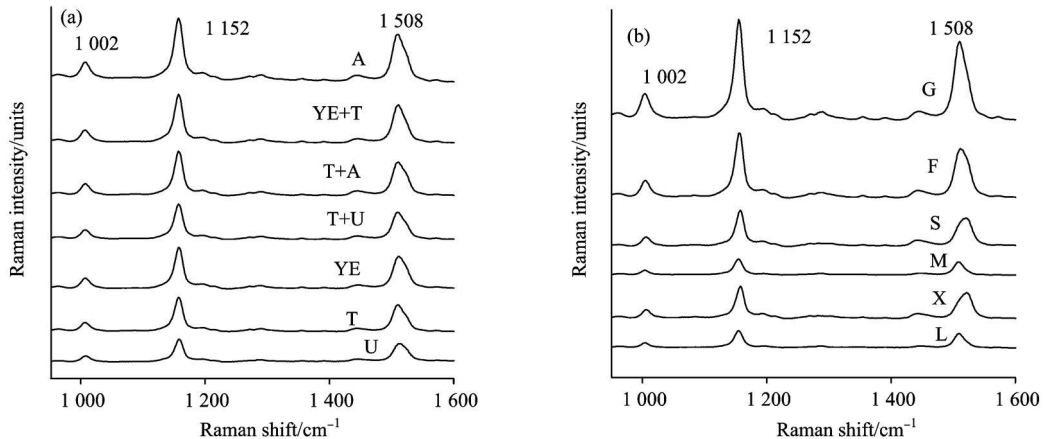


Fig 2 Averaged Raman spectra of *rhodotorula glutinis* cells cultivated in different fermentation media

(a): Nitrogen resource; (b): Carbon resource

Abbreviation: A: stands for ammonium sulfate; U: urea; T: tryptone; YE: yeast extract; G: glucose;

F: fructose; S: sucrose; M: maltose; L: lactose

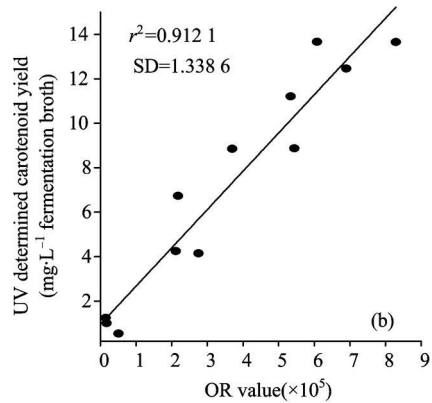
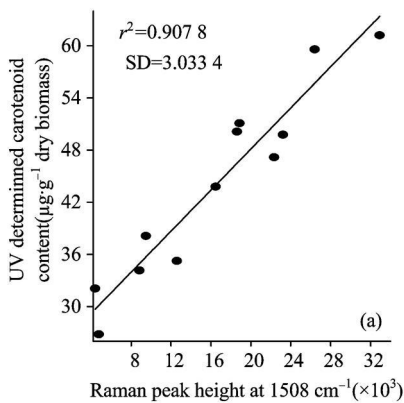


Fig 3 Correlations of carotenoid content using UV analysis vs Raman peak heights (a) and carotenoid yields vs OR values (b)

2.4 不同培养基对类胡萝卜素合成及产量的影响

为了优化培养基, 通过计算 1 508 cm^{-1} 峰高和 OR 值, 定量描述不同培养基对红酵母在细胞水平类胡萝卜素合成能力及一定体积发酵液类胡萝卜素产量的影响, 结果见图 4。

图 4(a) 显示的是不同氮源对红酵母单细胞积累类胡萝卜素的影响, 硫酸铵作单一无机氮源, 细胞内类胡萝卜素的含量最高, 酵母粉+胰蛋白胨次之, 尿素最差, 图 4(c) 则显示相同条件下一定体积发酵液类胡萝卜素的总体产量, 与

图 4(a) 结果形成鲜明对比的是, 最有利于红酵母单细胞合成类胡萝卜素的硫酸铵作为氮源, 类胡萝卜素的产量反而最低, 其原因可能是硫酸铵非常不利于红酵母细胞的增殖, 造成单位体积内细胞的数目偏少, 结果导致类胡萝卜素的总体产量最低, 相反地, 复合有机氮源酵母粉+胰蛋白胨的类胡萝卜素总体产量最高, 有关文献的实验结果也表明有机氮源要比无机氮源更容易提高类胡萝卜素的产量^[15], 因此, 酵母粉+胰蛋白胨既有利于提高红酵母单细胞合成类胡萝卜素的

能力,也有利于红酵母细胞的高密度发酵,为优选氮源。不同碳源对红酵母细胞类胡萝卜素合成及产量的影响结果见图 4(b)和 4(d),在碳源相同、碳源不同的六种培养基中,从单细胞内的类胡萝卜素的含量和单位体积发酵液类胡萝卜素的

产量这两方面考察,均以葡萄糖为最理想的碳源。综合上述结果可见,适宜红酵母细胞生长和合成类胡萝卜素的培养基配方是:1%酵母粉+1%胰蛋白胨+4%葡萄糖。

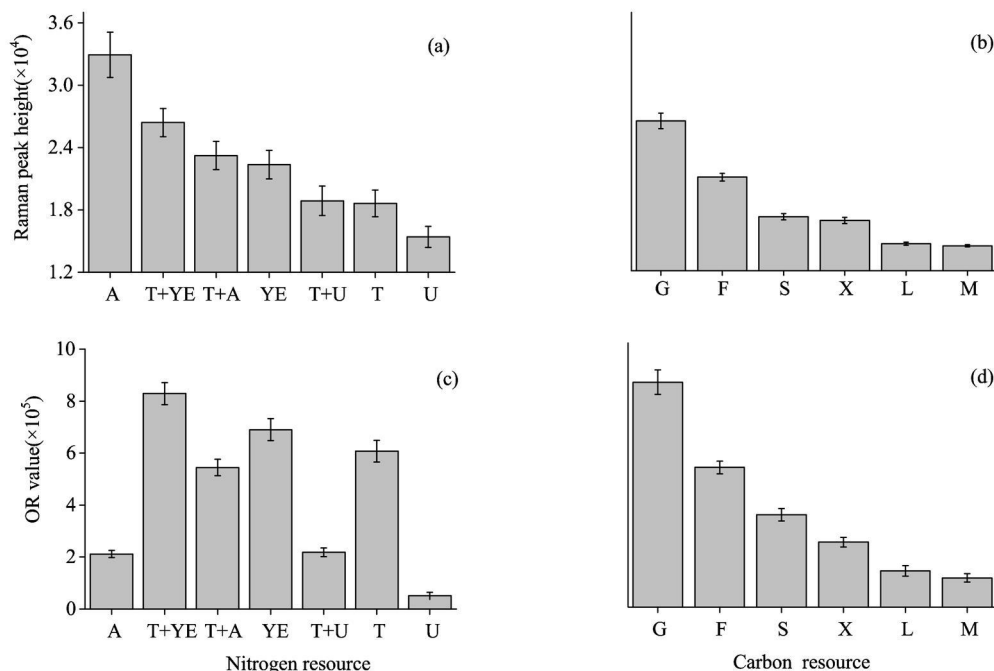


Fig 4 The effect of different fermentation media on carotenoid synthesis and yield. Raman peak heights at $1\ 508\ \text{cm}^{-1}$ of *rhodotorula glutinis* cells cultivated in different nitrogen resource (a) and carbon resource (b), OR values in different nitrogen resource (c) and carbon resource (d)

Abbreviation: A: stands for ammonium sulfate; U: urea; T: tryptone; YE: yeast extract; G: glucose;

F: fructose; S: sucrose; M: maltose; L: lactose

3 结论

利用拉曼镊子分别测定不同培养基条件下红酵母细胞的拉曼光谱,运用化学计量学的方法处理拉曼光谱数据,定性分析细胞的平均拉曼光谱,对于不同氮源、碳源的培养基,

红酵母细胞合成的类胡萝卜素的含量明显不同;线性拟合结果显示紫外光谱法所得数据和拉曼峰高数据有良好的相关性;定量分析拉曼峰高,得出酵母粉+胰蛋白胨和葡萄糖分别是适宜的氮源和碳源。拉曼镊子能够提供红酵母胞内类胡萝卜素的含量信息,是实时检测红酵母胞内类胡萝卜素的有效手段,同时也是优化发酵培养基的有用工具。

References

- [1] Spano F C. Am. Chem. Soc., 2009, 131(12): 4267.
- [2] Serino S, Gomez B T, Costagliola G. Agric. Food Chem., 2009, 57(19): 8753.
- [3] Schulz H, Baranska M, Baranski R. Biopolymers, 2005, 77(4): 213.
- [4] Puppels G J, Olminkhof J H, Segers Noltén G M, et al. Exp. Cell. Res., 1991, 195(2): 361.
- [5] Yao H L, Tao Z H, Ai M, et al. Vib. Spectrosc., 2009, 50(2): 193.
- [6] Ruscino G, De Luca A C, Pesce G, et al. Sensors., 2008, 8(12): 7818.
- [7] De Luca A C, Ruscino G, Rosanna C, et al. Opt. Express, 2008, 16(11): 7943.
- [8] Harvey T J, Hughes C, Ward A D, et al. Biophotonics, 2009, 2(1): 47.
- [9] Huang W E, Ward A D, Whiteley A S. Environ. Microbiol., 2009, 1(1): 44.
- [10] Chen D, Shelenkova L, Li Y Q, et al. Anal. Chem., 2009, 81(9): 3227.
- [11] Xie C A, Mace J, Dinno M A, et al. Anal. Chem., 2005, 77(14): 4390.
- [12] Xie C A, Chen D, Li Y Q. Opt. Lett., 2005, 30(14): 1800.
- [13] Afseth N K, Spegtnan V H, Wold J P, et al. Appl. Spectrosc., 2006, 60(12): 1360.
- [14] Hennerkens C H. Nutrition, 1997, 13(7): 697.

[15] Bhosale P B, Gadre R V. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55(4): 423.

Raman Tweezers Based Analysis of Carotenoid Synthesis in *Rhodotorula Glutinis*

YUAN Yr feng^{1,2}, TAO Zhai hua^{2*}, LIU Jurr xian¹, WANG Gui wen², LI Yong qing³

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

2. Lab of Biophysics of Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

3. Department of Physics, East Carolina University, Greenville, East Carolina 27858-4353, USA

Abstract Carotenoid synthesis in *Rhodotorula glutinis* was investigated with Raman tweezers in order to find the effect of nitrogen and carbon resource on carotenoid yield. The cells in fermentation terminus were harvested, and then divided into two parts, one for UV analysis, the other for Raman tweezers detection. Original spectra were preprocessed by carrying out background elimination and baseline correction, and the averaged spectra of cells cultivated in different fermentation medium were analyzed qualitatively. The results showed that the Raman intensity of carotenoid were obviously different. There was a high correlation between UV results and Raman peak height data, the correlation coefficients of fitted parameters were 0.9078 and 0.9121, respectively. Quantitative analysis of 1508 cm⁻¹ peak height indicated that the appropriate nitrogen and carbon resources for the growth of *Rhodotorula glutinis* cells and synthesis of carotenoid were yeast extract+ tryptone, and glucose, respectively. The above results suggest that Raman tweezers can provide information about carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells and serve as an effective tool for real time measurement of carotenoid synthesis and optimization of fermentation medium.

Keywords Carotenoids; *Rhodotorula glutinis*; Raman spectroscopy; Laser tweezers

(Received Sep. 6, 2010; accepted Dec. 8, 2010)

* Corresponding author