

基于 96 孔板与拉曼光谱的发酵乙醇高通量快速检测

李自达^{1 2} 申乃坤¹ 赖钧灼³ 秦艳¹ 刘军贤² 王桂文^{* 1}

¹(广西科学院, 南宁 530007) ²(广西师范大学物理科学与技术学院, 桂林 541004)

³(广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530005)

摘 要 发酵液中乙醇含量是实验室研究和工业生产的必检项目。应用拉曼光谱在倒置显微镜上建立一种用 96 孔板高通量快速检测发酵液乙醇含量的新方法, 通过最小二乘法拟合标准乙醇溶液与内标物的拉曼信号比值, 得到回归方程, 根据回归方程计算乙醇溶液和发酵液中的乙醇含量, 与气相色谱法的检测结果进行对比。用本方法检测了菌株筛选、三角瓶发酵和 500 L 发酵罐发酵过程的乙醇含量。 t -检验表明, 与气相色谱法结果吻合较好($p=0.05$)。本方法只需要 10~15 s 的拉曼光谱收集时间, 应用自编程序实时读取检测值, 准确度高; 结合 96 孔板可以实现大量样品的实时快速检测。

关键词 拉曼光谱; 乙醇; 发酵液

1 引言

随着化石能源的逐步枯竭, 乙醇作为可替代能源成为研究开发热点。在实验室研究和工业生产中, 发酵液中乙醇含量是必检项目。传统的密度瓶法和酒精计法需要将样品溶液蒸馏后再测定, 样品用量大且操作繁琐。气相色谱法^[1]、分光光度法^[2]、荧光法^[3]、红外光谱法^[4~7]和高效液相色谱法^[8]等均可对乙醇进行定量检测, 但难以实现大量样品的实时快速检测, 无法满足乙醇发酵生产过程或菌株筛选过程对乙醇含量实时高通量快速检测的需要。此外, 工业发酵通常是用农副产品淀粉质原料, 浓醪发酵, 杂质多, 发酵液糖质浓度高, 对乙醇检测干扰大。为此, 本研究应用拉曼光谱结合 96 孔板, 以淀粉质原料为发酵基质, 建立实时快速高通量检测发酵液乙醇浓度的新手段。激光拉曼光谱法是一种新的无损检测技术, 可用于乙醇溶液的定性与定量分析^[7, 9]。在实际测定中拉曼信号的强度会受到来自仪器和样品的诸多因素的影响。通过内标法可以很好地消除这些因素的影响^[10]。

为了减小仪器设备误差和发酵液中其它物质的干扰, 本实验将内标法适当改进, 通过 VB 程序对光谱数据进行处理, 用最小二乘法拟合标准曲线方程, 即时读出发酵液中的乙醇浓度。本方法分析速度快, 样品使用量少, 重复性好, 适于大量样品的快速检测。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

拉曼光谱实验系统与文献 [11] 类似。波长为 780 nm, 功率 15 mW 的激光束, 导入倒置显微镜 (TE2000U, Nikon 公司) 透过物镜 (NA: 0.45 20×) 从 96 孔板 (广州 Jet Biofil 公司) 底面聚焦在样品溶液中, 激发拉曼散射光。滤除弹性散射光后, 拉曼散射光聚焦进光谱仪的入射狭缝。SpectraPro2300i 光谱仪 (Acton 公司) 的衍射光栅参数是闪耀波长 650 nm, 600 线/mm。光谱仪耦合到 Spec-40 电荷耦合器件 CCD (Princeton Instruments 公司) 上, CCD 用液氮冷却到 -120 °C。6890N 气相色谱仪 (美国 Agilent 公司), Universal 32R 高速离心机 (德国 Hettich 公司); 500 L 全自动控制发酵罐 (上海高机生物工程有限公司)。

无水乙醇 ($\geq 99.7\%$), 乙腈、葡萄糖、 MgSO_4 、 NaNO_2 、 NaClO_4 等均为分析纯。木薯淀粉: 淀粉含量约 70%, 产地广西; 耐高温淀粉酶: Liquezyme Supra (诺维信公司, 标准酶活力为 90 kNU/g); 糖化酶: Dextrozyme DX (诺维信公司, 标准酶活力为 500 AGU/mL), KNU 和 AGU 均为诺维信的专有酶活力单位。

2009-12-30 收稿; 2010-05-07 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30760010), 广西科学基金 (Nos. 0832022Z, 0991079, 0731013) 资助项目

* E-mail: wguiwen@gxas.cn

2.2 乙醇发酵液样品

500 mL 三角瓶发酵: 从 YEPD 固体培养基上挑取单菌落, 接入含有 50 mL YEPD 液体培养基的 150 mL 锥形瓶中, 在 28 °C, 150 r/min 培养过夜, 再以 10% 的接种量, 转接到发酵培养基(葡萄糖 150 g, CaCl₂ 0.06 g, MgSO₄ 0.06 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 4.5) 中, 在 32 °C, 100 r/min 培养, 先每隔 1 h 取样, 9 h 之后隔一定时间取样, 发酵 30 h 后停止取样。

发酵罐发酵: 木薯淀粉与自来水以一定料水比混合使木薯粉浓度为 35%, 加入 0.13 kNU/g 底物液化酶, 迅速加热到 90~95 °C, 液化 60 min, 冷却, 调 pH, 降温到 37 °C, 加入糖化酶量为 1.21 AGU/g 底物, 同时接入 10% 种子液进行发酵。前 8 h 每隔 2 h 取样, 以后每隔 4 h 取样, 发酵 48 h 后停止取样。

菌株筛选发酵: 在含 100 mL 木薯淀粉糖化液的三角瓶中接入不同酵母菌株, 37 °C 培养 72 h, 取样。

上述发酵液以 5000 r/min 离心 6 min, 吸取上清液供气相色谱和拉曼光谱检测。

2.3 实验方法

2.3.1 拉曼光谱收集 在 96 孔板中依次注入待测样品溶液, 其中分别注入 150 μL 10% (w/V) NaNO₂, MgSO₄, NaClO₄ 溶液, 乙醇溶液、葡萄糖溶液; 在乙醇溶液和发酵液中则分别注入 120 μL 和 30 μL 的 10% (w/V) NaClO₄ 溶液。96 孔板置于倒置显微镜的载物台上, 调整位置使得激光束通过待测样品溶液圆孔中心, 聚焦高度为 2 mm, 积分时间为 15 s, 收集拉曼光谱。每个样品重复检测 5 次。

2.3.2 气相色谱 将待测样品溶液与 10% (V/V) 乙腈溶液等量充分混合进行气相色谱检测, 检测条件为: 柱温: 100 °C; 检测器温度: 325 °C; 进样器温度: 250 °C; 载气: 高纯氮, 流速 28.7 mL/min; 氢气: 40 mL/min; 空气: 450 mL/min; 尾气气: 30.0 mL/min; 进样量: 0.2 μL。重复检测 3 次。

2.3.3 数据处理 运用 VB 程序进行数据处理: (1) 读入用于建立模型的 1%, 5%, 10%, 15% 和 20% 浓度的乙醇标准溶液的拉曼光谱数据, 扣除纯水背景数据后, 采用 17 点 Savitzky-Golay 法平滑; (2) 分别计算乙醇特征峰 880 cm⁻¹ 与内标峰的峰面积, 取其比值 $I_{\text{Ethanol}}/I_{\text{ClO}_4^-}$ 即为信号强度; (3) 取各信号强度的平均值, 用最小二乘法拟合乙醇溶液标准曲线方程, 即建立预测模型; (4) 读入样品溶液的拉曼光谱数据, 将 (1) 和 (2) 处理得出的信号强度代入标准曲线方程, 即得该样品中乙醇的测定值。

3 结果与讨论

3.1 乙醇溶液拉曼光谱

在 10% 乙醇溶液的拉曼光谱(图 1) 中, 1454 cm⁻¹ 附近的拉曼峰是由于 CH₃ 不对称变形所产生, C—C—O 反相伸缩振动产生了 1000~1100 cm⁻¹ 附近拉曼特征双峰; C—C—O 同相伸缩振动产生了 880 cm⁻¹ 拉曼特征峰^[21]。乙醇发酵液由于含有高浓度的糖类物质, 经高温灭菌后往往会产生糖的衍生物, 这些衍生物产生的荧光, 会提升拉曼光谱的基线。此外, 实验室常用的发酵培养基如 YEPD、麦芽汁培养基的成分也会产生荧光。由含 8% 乙醇的 YEPD 培养基的拉曼光谱(图 1) 可见, YEPD 培养基有比较明显的荧光, 但未对乙醇的特征峰 (880 cm⁻¹) 的响应产生影响。

3.2 内标物与定量峰的选择

在利用拉曼光谱技术对溶液的定量检测过程中, 通过加入适当的内标, 可以消除不同浓度样品所引起的折射指数差异以及溶剂中的背景噪音等对拉曼光谱响应峰的干扰^[23]。考察了常用的内标物 NO₂⁻, SO₄²⁻ 和 ClO₄⁻ 的拉曼光谱(图 1)。NO₂⁻ 有 820 和 1330 cm⁻¹ 两个响应峰, 不够独立明晰, 且其信号不够强烈。SO₄²⁻ (980 cm⁻¹) 和 ClO₄⁻ (930 cm⁻¹) 均只有一个清晰而强烈的拉曼信号峰, 但 SO₄²⁻ 的 980 cm⁻¹ 峰与 96 孔板材料聚苯乙烯固有的 1001 cm⁻¹ 比

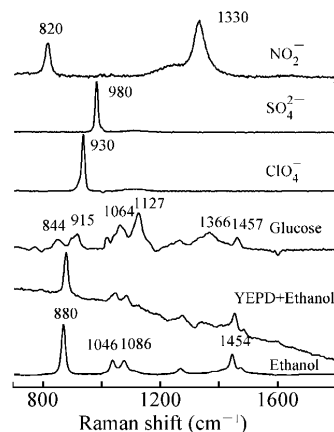


图 1 乙醇溶液、含乙醇的 YEPD 培养基、葡萄糖溶液及几种内标物的拉曼光谱

Fig. 1 Raman spectra of ethanol, YEPD medium with ethanol, glucose and internal standards NO₂⁻, SO₄²⁻ and ClO₄⁻

较接近,会造成信号的互相干扰影响信噪比。而 ClO_4^- 只有一个清晰的强拉曼特征峰(930 cm^{-1}),且乙醇溶液和葡萄糖液没有对应的响应峰, ClO_4^- 是内标物的比较理想的选择。

3.3 信号强度比值与浓度的关系

含有等量 ClO_4^- 的不同浓度乙醇拉曼光谱见图 2a。随着乙醇浓度的增加,用于定量乙醇特征峰(880 cm^{-1})的强度明显增强,而内标物 ClO_4^- 的特征峰(930 cm^{-1})的信号强度基本相同。将乙醇信号强度与 ClO_4^- 的信号强度的比值($I_{\text{Ethanol}}/I_{\text{ClO}_4^-}$)与乙醇浓度值用 Origin Pro 8.0 软件拟合得到标准曲线见图 2b。可以看到乙醇浓度与 $I_{\text{Ethanol}}/I_{\text{ClO}_4^-}$ 比值间有很好的线性关系, $R^2=0.9995$ 。

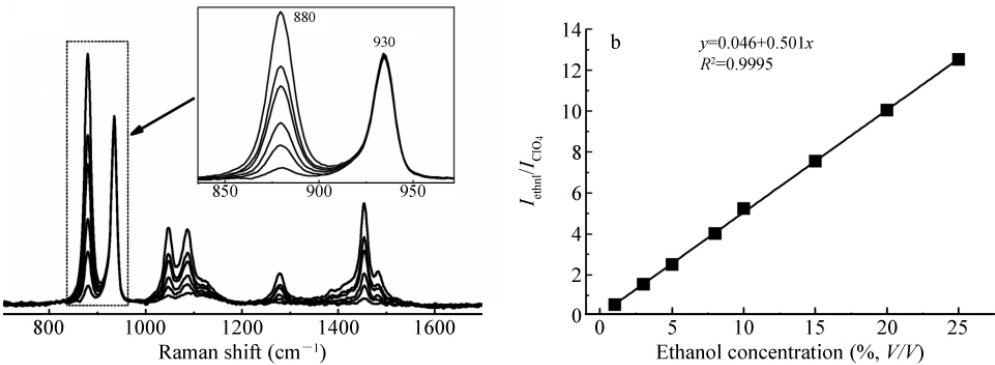


图 2 含相同浓度内标物 ClO_4^- 的不同浓度乙醇拉曼光谱(a)及基于比值 $I_{\text{Ethanol}}/I_{\text{ClO}_4^-}$ 的标准曲线(b)

Fig. 2 (a) Raman spectra in different concentration of ethanol with the same concentration of ClO_4^- ;
(b) The standard curve of $I_{\text{Ethanol}}/I_{\text{ClO}_4^-}$

3.4 可行性与可靠性分析

将拉曼光谱法测得的平均值与对应的标准值和 GC 检测的平均值分别进行显著性检验,结果见表 1。在拉曼光谱平均值与标准值之间的检验中,在置信度为 95% 条件下,检验值 $t_{0.05, 4} = 2.776$,显然,均大于表中各 t 值,表明拉曼光谱平均值与标准含量之间没有显著差异。与 GC 平均值之间的检验,先用 F 检验法检验两组数据的方差有无显著性差异, $F_{0.05, 5-1, 3-1} = 19.2$,显然大于各 F 值,即方差无显著性差异;然后进行 t 检验,显然各 t 值均小于 $t_{0.05, 5+3-2} = 2.447$,表明两组平均值之间不存在显著性差异,属于同一整体,即拉曼检测结果与 GC 检测结果有很好的关联性,可见本方法能满足实验室检测的要求。

表 1 标准乙醇含量(% , V/V) 检测结果显著性检验分析

Table 1 The t-test of the results from Raman spectroscopy and gas chromatography on ethanol solution

标准乙醇浓度 Standard ethanol concentration	Raman 检测值与标准值的检验 The test of Raman detection and true value		Raman 检测值与 GC 检测值的检验 The test of Raman detection and the GC value		
	Raman (Mean ± SD)	t 值 t -Test	GC (Mean ± SD)	F 值 F Value	t 值 t -Test
1.0	0.950 ± 0.059	1.883	0.994 ± 0.023	3.674	1.439
3.0	3.13 ± 0.16	1.815	2.92 ± 0.12	8.377	2.065
5.0	5.062 ± 0.089	1.568	4.95 ± 0.14	7.616	1.498
8.0	7.91 ± 0.32	0.598	8.06 ± 0.23	7.075	1.508
10.0	9.95 ± 0.21	0.547	9.97 ± 0.27	5.968	0.532
15.0	15.17 ± 0.44	0.857	15.01 ± 0.35	8.057	1.995
20.0	19.73 ± 0.33	1.826	20.02 ± 0.35	6.121	1.851
25.0	24.78 ± 0.25	1.996	24.93 ± 0.31	0.665	1.633

3.5 发酵液检测

为检验本方法对发酵乙醇检测的可行性,分别检测了 500 L 中试发酵罐、500 mL 三角瓶发酵及 250 mL 菌株筛选过程的发酵液。500 L 发酵罐中试发酵为浓醪发酵,糖度高,杂质多,其发酵液拉曼光谱见图 3a,不同阶段发酵液荧光背景(基线)强度差异很大。可见,以样品的光谱吸光度为依据的定量分析方法,如 PCA^[4],PLS^[9,14]等方法建立的预测模型将很难实现快速准确预测乙醇浓度。本研究结合内标法,计算各自特征峰的峰面积,在减去基线的同时消除了荧光背景差异的影响。由于信号强度比值

与浓度呈良好的线性关系,利用最小二乘法建立的一元校正模型,更适用于对各个阶段、不同条件下发酵液的检测。图 3b 是上述 3 种发酵液的乙醇含量检测结果。表 2 是 500 L 发酵罐乙醇发酵的检测结果及其 t 检验。结果表明,在 0.05 显著性水平上,两种检测方法的数据之间无显著性差异,属于同一个总体,即从整体来看,在各种发酵液的检测中,拉曼光谱法与气相色谱法的检测结果具有很好的关联性。

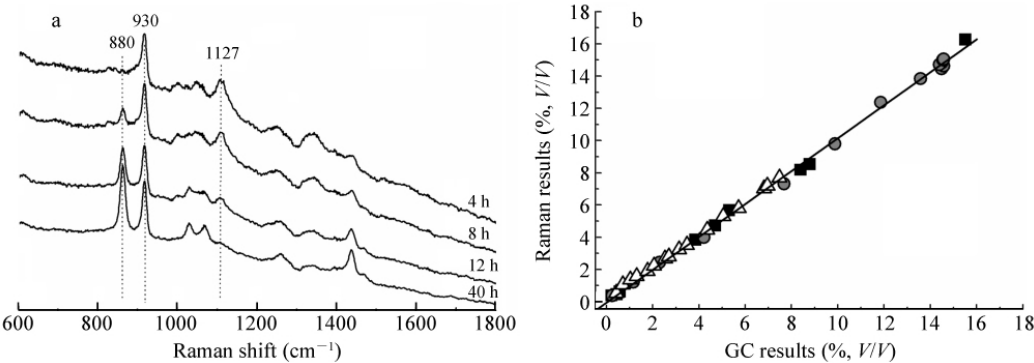


图 3 (a) 不同时期发酵液的拉曼光谱; (b) 500 L 发酵罐(●)、500 mL 三角瓶乙醇发酵过程(△)及菌株筛选过程(■)乙醇检测结果

Fig. 3 (a) Raman spectra of fermented broth during fermentation and (b) ethanol content obtained from GC measurements and Raman spectra for 500 L fermentor (●), 500 mL flask (△) and the screening process of difference strains (■)

表 2 500 L 发酵罐发酵过程乙醇含量(%, V/V) 检测结果及 t 检验

Table 2 The t -test of the results from Raman spectroscopy and gas chromatography on the ethanol fermentation in 500 L fermentor

发酵时间 Fermentation time (h)	拉曼光谱检测 Raman results (Mean ± SD)	气相色谱检测 GC results (Mean ± SD)	F 值 F Value ($F < 19.2$)	t 值 t -Test ($t < 2.447$)
0	0.378 ± 0.093	0.241 ± 0.001	7.717	0.505
4	1.215 ± 0.002	1.16 ± 0.001	2.759	1.335
6	2.442 ± 0.028	2.293 ± 0.007	4.058	0.962
8	3.997 ± 0.007	4.21 ± 0.004	1.589	2.175
12	7.307 ± 0.009	7.673 ± 0.003	2.480	2.395
16	9.79 ± 0.04	9.873 ± 0.014	2.892	0.445
20	12.37 ± 0.10	1.857 ± 0.019	5.279	1.812
24	13.847 ± 0.10	3.583 ± 0.013	0.726	1.882
28	14.455 ± 0.091	4.493 ± 0.026	3.461	0.137
32	14.635 ± 0.020	4.577 ± 0.014	1.482	0.409
36	14.815 ± 0.019	4.48 ± 0.022	0.837	2.227
40	14.719 ± 0.030	4.387 ± 0.004	8.117	2.141
44	15.008 ± 0.005	4.540 ± 0.001	3.628	2.333
48	15.056 ± 0.006	4.580 ± 0.005	1.209	1.898

3.6 分析方法的评估

加入内标物质是拉曼光谱定量检测的常用方法。文献 [15] 提到的培养基内天然的水峰 (3200 cm^{-1}) 超出了部分实验系统的检测波长范围,而培养基成分 SO_4^{2-} (980 cm^{-1})^[10] 在乙醇发酵培养基中含量低,拉曼信号并不明显。本实验所建立的技术方法采用倒置显微镜,是考虑到乙醇属于易挥发物质,在检测过程需要在 96 孔板上盖上顶盖以防挥发,但这样会影响光的通过,也影响了物镜的聚焦;96 孔板的底板则不同,材质均匀、光透过率高以便于光学检测;其次,拉曼光谱信号受激光通路的光程影响,通过倒置显微镜在 96 孔板的底部收集拉曼信号能保证所有的样品聚焦高度一致,不受液面高度影响。同时,使用 20 倍物镜,加大聚焦中心的检测容积,使检测信号增大,获得较高的信噪比。

本方法只需要 10 s 即可获得很强的拉曼光谱信号,但为减少误差,将检测时积分时间增加到 15 s。结合使用 96 孔板,大大缩短了换样时间,提高了检测速度。与气相色谱法等方法相比,拉曼光谱法检测时间更短,更适于实验室菌株筛选或者工业生产中大量发酵液样品的快速检测。

References

- 1 Li H , Chai X S , Deng Y , Zhan H , Fu S. *J. Chromatogr. A* , **2009** , 1216(1) : 169 ~ 172
- 2 de Oliveira M F , Sczak A A , Okumura L L , Stradiotto N R. *Brasil Energy Fuels* , **2009** , 23(10) : 4852 ~ 4859
- 3 QIN Jian-Jun(覃建军) , LIU Chang-Xian(柳畅先) , CHA Dong-Mei(蔡东梅) . *Journal of Analytical Science(分析科学学报)* , **2008** , 24(2) : 224 ~ 226
- 4 SHI Yue-Hua(史月华) , LU Yong(陆勇) , ZHANG Rong(张荣) , XU Zhu-De(徐铸德) . *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)* , **2001** , 29(10) : 1213 ~ 1215
- 5 LI Yan-Ping(李燕萍) , XU Hong-Xian(许宏贤) , QIAN Ying(钱莹) , DUAN Gang(段钢) . *Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)* , **2008** , 34(7) : 136 ~ 140
- 6 ZENG Xin-An(曾新安) , ZHANG Ben-Shan(张本山) , GENG Yu-Huan(耿予欢) . *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)* , **2002** , 22(1) : 29 ~ 32
- 7 YUAN Wen-Jie(袁文杰) , KONG Liang(孔亮) , ZI Li-Han(孜力汗) , BAI Feng-Wu(白凤武) . *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)* , **2009** , 37(6) : 850 ~ 854
- 8 Zhao R Y , Bean S R , Ioerger B P , Boyle D L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , **2008** , 56(3) : 946 ~ 953
- 9 Silveira J L , Moreira L M , Conceicao V G B , Casalechi H L , Munoz I S , da Silva F F , Silva M A S R , de Souza R A , Pacheco M T T. *Spectroscopy* , **2009** , 23(9) : 217 ~ 226
- 10 Shih C J , Smith E A. *Anal. Chim. Acta* , **2009** , 653(2) : 200 ~ 206
- 11 WANG Gui-Wen(王桂文) , YAO Hui-Lu(姚辉璐) , PENG Li-Xin(彭立新) , HE Bi-Juan(何碧娟) , LI Yong-Qing(黎永青) . *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)* , **2007** , 35(9) : 1351 ~ 1354
- 12 Ye Q , Xu Q F , Yu Y G , Qu R H , Fang Z J. *Optics Communications* , **2009** , 282(18) : 3785 ~ 3788
- 13 Picard A , Daniel I , Montagnac G , Oger P. *Extremophiles* , **2007** , 11(3) : 445 ~ 452
- 14 Abreu A A , Danko A S , Costa J C , Ferreira E C , Alves M M. *International Journal of Hydrogen Energy* , **2009** , 34(2) : 1744 ~ 1751
- 15 LIU Wen-Han(刘文涵) , YANG Wei(杨未) , WU Xiao-Qiong(吴小琼) , LIN Zhen-Xing(林振兴) . *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)* , **2007** , 35(3) : 416 ~ 418

Determination of Ethanol in Fermentation Broth Using 96-well Plate and Raman Spectroscopy

LI Zi-Da^{1 2} , SHEN Nai-Kun¹ , LAI Jun-Zhuo³ , QIN Yan¹ , LIU Jun-Xian² , WANG Gui-Wen^{* 1}

¹(Guangxi Academy of Sciences , Guangxi , Nanning 530007)

²(College of Physics Science and Technology , Guangxi Normal University , Guilin 541004)

³(College of Life Science and Technology , Guangxi University , Nanning 530005)

Abstract A method based on 96-well plate , Raman spectroscopy and inverted microscopy has been developed to determine the ethanol content of fermentation broth quantitatively. A regression equation derived from the Raman intensity ratios of standard ethanol solutions and the internal standard was used to quantify the ethanol concentration. The fermentation liquors from 500 L fermentor , 500 mL flask and the process of strain screening for ethanol fermentation were measured. The results obtained with this method were compared to those from gas chromatography. A Student's t-test has shown that , at the 0.05 level of significance , the ethanol quantification of fermented liquor using Raman spectroscopy has an accuracy equivalent to that of gas chromatography. The results show that this method takes only about 10 – 15 s to collect Raman spectra and the results can be read out simultaneously. This method is fast , real-time and high-throughput for monitoring the ethanol content of fermentation broth for the ethanol industry and strain screening.

Keywords Raman spectroscopy; Ethanol; Fermentation broth

(Received 30 December 2009; accepted 7 May 2010)