研究论文

光镊拉曼光谱技术结合响应面法优化红酵母产类胡萝卜素的发酵条件

蒋玉凌[1,2]，孙美娟[3]，陈 越[1,2]，范 伟[1]，刘军贤[*1]，陶站华[*2]

（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 530007；3. 百色学院 物理与电信工程系，广西 百色 533000）

摘要：拉曼光谱具有快速、实时、无损分析的特点，在生物学领域应用广泛。作者利用光镊拉曼光谱技术（LTRS）测定红酵母细胞中类胡萝卜素。采用 Plackett-Burman 法对影响红酵母发酵的相关因素进行评价，发现葡萄糖、蛋白胨、pH 和温度对类胡萝卜素的产量影响显著。利用 Box-Behnken 设计和响应面分析法对影响类胡萝卜素产量的关键因素进行优化，获得的最优发酵条件为：葡萄糖 42.86 g/L，蛋白胨 5 g/L，酵母提取物 5 g/L，KH_2PO_4 1 g/L，$MgSO_4$。$7H_2O$ 0.5 g/L，pH 7.0，温度 28.3 ℃，优化后类胡萝卜素产量较优化前提高了 45%。

关键词：光镊拉曼光谱；响应面法；类胡萝卜素；优化；红酵母

中图分类号：Q 631　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)05—0510—07

Optimization of Fermentation Conditions for Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* Using Laser Tweezers Raman Spectroscopy Technology and Response Surface Methodology

JIANG Yuling[1,2], *SUN Meijuan*[3], *CHEN Yue*[1,2], *FAN wei*[1], *LIU Junxian*[*1], *TAO Zhanhua*[*2]

(1. College of Physics and Technology, Guangxi Normal University, Guilin 541004; 2. Lab of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Naning 537007; 3. Department of Physics and Telecommunication Engineering, Baise University, Baise 533000, China)

Abstract: Raman spectroscopy has been used widely in the field of biology in recent years due to its characteristics of fast, real-time and non-destructive analysis. In this paper, laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) was applied to detect the carotenoid content in *Rhodotorula glutinis* cells. Based on this, Plackett-Burman design was applied for evaluating effects of related factors on carotenoid production of *Rhodotorula glutinis* fermentation. Results showed that the factors including glucose, tryptone, pH and temperature presented the most major affecting on carotenoid yield. Then

收稿日期：2013-07-29

基金项目：国家自然科学基金项目（31060128）；百色学院 2013 年度校级一般项目（2013KB09）。

* **通信作者**：刘军贤（1962—），男，广西防城港人，理学博士，教授，硕士研究生导师，主要从事生物物理学方面的研究。E-mail：jxliu189@gmail.com

陶站华（1971—），男，黑龙江鹤岗人，工学博士，副研究员，主要从事生物光谱学方面的研究。E-mail：taozhanhua@163.com

Box-Benhnken Design combined with response surface methodology was employed to optimize the most important effect factors of carotenoid yield. The optimal fermentation conditions for high carotenoid production consisted of 42.86 g/L glucose,5 g/L tryptone,5 g/L yeast extract,1 g/L potassium dihydrogen phosphate,0.5 g/L Magnesium sulfate,pH 7.0 with the temperature at 28.3℃. This optimization resulted in an increase of carotenoid yield with an improvment of 45% when compared with no optimizing.

Keywords: laser tweezers Raman spectroscopy,response surface methodology,carotenoid,optimization,*Rhodotorula glutinis*

类胡萝卜素是人体必不可少的一类物质,主要包括β-胡萝卜素、番茄红素、叶黄素等[1],对感染、肿瘤、心血管疾病等严重威胁人类健康的疾患具有一定的防护和治疗作用,且由于其具有着色和保健功能,常被用作饲料添加剂和食品营养补充剂等。目前国内外生产类胡萝卜素的方式主要有三种:化学合成法、植物提取法、微生物发酵法,其中最具发展前景的是微生物发酵法。微生物生产类胡萝卜素的研究主要集中在丝状真菌三孢布拉霉和红酵母这两种菌种。采用三孢布拉霉菌生产发酵过程复杂,成本高,产业化困难,而红酵母发酵控制容易、营养要求简单、培养时间短,易于产业化,具有广阔的开发前景[2]。但是,目前红酵母类胡萝卜素发酵产量比较低,因此通过优化红酵母发酵条件提高类胡萝卜产量备受关注。响应面法(Response Surface Methodology,RSM)是一种有效的统计方法,利用合理的实验设计并获得实验数据,通过建立模型来解决受多个因素影响的最佳工艺参数,具有实验次数少、周期短、回归分析精度高等优势,已广泛用于食品、生物、化学等领域,在微生物发酵条件优化研究中也取得了良好效果[3-4]。

除了实验设计的选择可以影响到研究工作的效果之外,检测方式的选择也尤为重要。为了检测优化效果,需要一种高效、灵敏的检测手段。传统的检测类胡萝卜素的方法一般是先用有机溶剂提取胡萝卜素,然后用紫外可见分光光度法或高效液相色谱法定量,这些方法样品需求量多,工作量大,且类胡萝卜素的高度不稳定性会影响提取定量的准确性,因此,选择一种快捷、重现性好的类胡萝卜素定量检测方法很有必要。

拉曼光谱是一种分子振动光谱,可分析生物细胞内分子的结构和含量,具有快速、实时、无损分析的特点,在生物、化学、医学等领域的应用日益广泛[5-6]。而将拉曼光谱技术与激光镊子结合起来的光镊拉曼光谱技术(laser tweezers Raman spectroscopy,LTRS),融合了光阱操控和拉曼光谱快速无损的优势,可长时间俘获并固定处于溶液中的单细胞,是实时检测和分析单细胞内分子结构和含量的有效工具[7-8]。作者利用光镊拉曼光谱技术测定红酵母细胞中类胡萝卜素,采用 Plackett-Burman 法对影响红酵母发酵条件的因素进行筛选,通过 Box-Benhnken 中心组合设计及响应面分析法对影响显著的因素进行优化,确定了最适宜的发酵条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 红酵母菌株由广西大学应用微生物研究所提供。

1.1.2 培养基 YEPD 固体培养基(组分 g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母提取物 10,琼脂 20;pH 自然。种子培养基(组分 g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10,酵母提取物 10;pH 自然。优化前发酵培养基(组分 g/L):葡萄糖 40,酵母提取物 5,KH_2PO_4 1,$MgSO_4$。$7H_2O$ 0.5;pH 6.0。

1.1.3 实验装置 光镊拉曼技术系统见文献 [9-10]。一束二极管激光(780 nm,30 mW)经过滤波后被导入一台倒置生物显微镜(Nikon TE2000U),激光束经数值孔径 1.30 的 100 倍油浸物镜聚焦在焦点附近形成了一个单光束光势阱。这束激光也用来激发被囚禁细胞的拉曼散射。在收集光路里,物镜也作为收集透镜收集来自细胞的拉曼散射光。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将 YEPD 固体培养基上的红酵

母菌落接种于装有 20 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中培养 18 h，再以 10%接种体积分数接到装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中，培养 18 h 到指数生长期，最后以 5%接种体积分数转接到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，200 r/min 避光培养 80 h，种子培养阶段的温度设定为 28 ℃，发酵阶段的温度根据实验设计的水平而设定。取 4 mL 样品用于拉曼光谱和发酵液在 600 nm 处的吸光值(即 OD_{600})的测定。

1.2.2 *拉曼光谱的测定和数据处理* 将样品用生理盐水稀释至合适的倍数后，吸取 100 μL 加入石英样品池中，以 30 mW 的激光为激发光，用光镊捕获红酵母细胞，以 5 s 曝光时间采集细胞拉曼光谱，每种样品收集 50 个细胞光谱，再以相同方式采集 5 个背景光谱。光谱数据预处理利用 Matlab7.0 软件编写的程序进行，用原始光谱减去背景光谱以达到背景扣除的目的，再对相应的特征峰峰高进行读取。

1.2.3 *类胡萝卜素产生的测定* 在传统类胡萝卜素的检测方法中，单位体积红酵母发酵液的类胡萝卜素产量一般用单位质量干菌体内类胡萝卜素的含量与菌体生物量的乘积来代表。因而，在光镊拉曼光谱法中也应该有相应的参数来描述单位体积红酵母发酵液的类胡萝卜素产量。在微生物学中，常用发酵液在 600 nm 处的吸光值(即 OD_{600})来测定菌体的密度，而红酵母细胞拉曼光谱 1 520 cm^{-1} 峰高可反映单个细胞内类胡萝卜素的浓度。因此，作者将 OD_{600} 值与拉曼光谱特征峰峰高相乘用于反映单位体积红酵母发酵液的类胡萝卜素产量。

1.2.4 *Plackett-Burman(PB)实验设计* PB 设计是一种近饱和的二水平部分析因设计，可在众多的考察因素中用最少的实验次数有效地筛选出影响显著的几个因素供进一步研究。作者对 11 个影响类胡萝卜生产的因素进行筛选，每个因素的两水平分别取高水平和低水平。

1.2.5 *Box-Benhnken Design(BBD)实验设计* BBD 中心组合设计是采用合理的实验设计并通过实验获得实验数据后，利用多元二次方程拟合响应值和因素之间的函数关系，以对回归方程的分析来获得最优值的一种统计方法[11]。针对 PB 实验筛选出影响显著的因素，采用 BBD 实验设计对这些因素的取值进行优化。每个因素取高(1)、中(0)、低(-1)三个水平。使用 Design-expert 8.05 软件进行实验设计并分析实验数据，所有试验重复 3 次，结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 红酵母细胞中类胡萝卜素的拉曼光谱

图 1 为红酵母单细胞的拉曼光谱图，图谱中最强的 3 个峰 1 002、1 157、1 520 cm^{-1} 峰是类胡萝卜素的主要特征峰。图 2 为不同发酵条件下红酵母细胞的拉曼光谱图，其中 a、b、c 葡萄糖和蛋白胨质量浓度相同，培养温度和 pH 不同，d、e、f 培养温度和 pH 相同，葡萄糖和蛋白胨质量浓度不同。由图 2 可知，不同发酵条件下的红酵母中类胡萝卜素拉曼信号明显不同，1 002、1 157、1 520 cm^{-1} 三个峰的强弱均可反映不同发酵条件下细胞内类胡萝卜素的产量情况，然而 1 520 cm^{-1} 峰形尖锐，左右接近对称，且附近没有其他物质的峰干扰，更适合利用拉曼峰高进行类胡萝卜素的定量分析。本课题组曾用光镊拉曼光谱定量分析类胡萝卜素的产量，发现拉曼光谱峰高和紫外检测结果[12]以及类胡萝卜素质量浓度与其拉曼光谱 1 520 cm^{-1} 峰高[13]均呈良好的线性关系，相关系数 R^2 分别达到了 0.907 8 和 0.998 2，说明光镊拉曼光谱技术是定量检测类胡萝卜素产量的有效手段。与传统的先提取后分析的检测手段相比，光镊拉曼光谱技术无需对样品进行处理，可直接在活体环境中检测，避免了提取过程中各种因素的干扰，保证了结果的准确性和重现性，且样品需求量少，分析效率高。

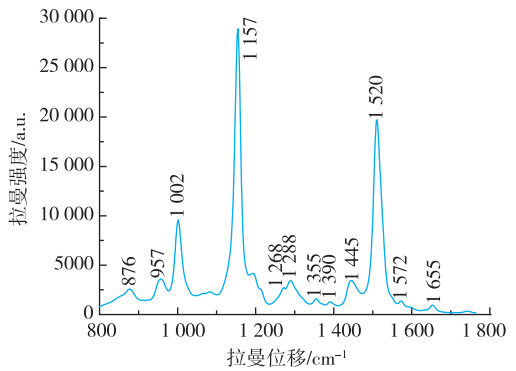


图 1 红酵母细胞拉曼光谱图

Fig. 1 Rhodotorula glutinis cells Raman spectrum

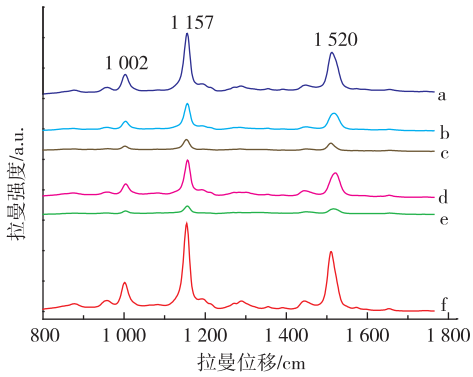


图 2　不同发酵条件下红酵母细胞的拉曼光谱图

Fig. 2　Rhodotorula glutinis cells Raman spectrum of different fermentation conditions

2.2　主要影响因素的筛选

根据红酵母生长营养需求,培养产生类胡萝卜素的条件并结合前期实验探索和相关文献,对影响类胡萝卜素生产的 11 个因素进行考察,这 11 个因素包括葡萄糖(X_1),蛋白胨(X_2),酵母提取物(X_3),KH_2PO_4(X_4),$MgSO_4$。$7H_2O$(X_5),核黄素(X_6),硫胺素(X_7),花生油(X_8),pH(X_9),温度(X_{10}),硫酸铵(X_{11}),每个因素分别取高(1)和低(−1)两水平,进行 12 次实验,并设立三个中心点实验,每个中心点实验取各因素的中水平(0),因此实际上实验总的次数为 15 次,响应值为类胡萝卜素的产量 Y(单位体积红酵母发酵液的类胡萝卜素产量= 菌体发酵液 OD_{600}× Raman Peak Height),平行试验 3 次,具体实验设计和实验结果见表 1。表 2 为 11 种因素水平范围和方差分析结果。P 值的大小可表明各考察因素和模型的显著性,P 值小于 0.05 表示各个因素或者模型有显著影响。由表 2 可知,X_1(葡萄糖)、X_2(蛋白胨)、X_5($MgSO_4·7H_2O$)、X_9(pH)、X_{10}(温度)的 P 值均小于 0.05,说明其对提高类胡萝卜素的产量有显著影响。模型的 P 值为 0.009 7<0.05,仅有 0.97%的概率不能用该模型解释,模型影响显著,因此该模型能很好地表明各因素的变化情况。

表 1　PB 设计和实验结果

Table 1　PB design and experimental result

次数	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Y
1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	3 796.7
2	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	3 418.9
3	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	843.8
4	1	−1	−1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	2 274.6
5	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1 122.0
6	1	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	923.0
7	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	908.1
8	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	1 466.9
9	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	1	584.8
10	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	3 677.3
11	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	358.1
12	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	617.2
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 859.6
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 945.3
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 989.9

表 2　PB 设计因素水平范围和方差分析结果

Table 2　Level range of factors and ANOVA result to PB design

因素	代号	低水平(−1)	高水平(1)	F 值	P 值
葡萄糖质量浓度/(g/L)	X_1	10	60	152.808 1	0.001 1
蛋白胨质量浓度/(g/L)	X_2	5	30	32.934 8	0.010 5
酵母提取物质量浓度/(g/L)	X_3	5	30	0.265 4	0.642 0
KH_2PO_4 质量浓度/(g/L)	X_4	0	16	0.272 7	0.637 6
$MgSO_4·7H_2O$ 质量浓度/(g/L)	X_5	0	2	10.662 2	0.046 9
核黄素质量浓度/(mg/L)	X_6	0	4.2	9.052 8	0.057 3
硫胺素质量浓度/(mg/L)	X_7	0	3.6	9.983 3	0.050 9
花生油质量浓度/(mg/L)	X_8	0	3.6	1.715 3	0.281 6
pH 值	X_9	4	7	58.721 5	0.004 6
温度/℃	X_{10}	20	30	23.456 5	0.016 8
硫酸铵质量浓度/(mg/L)	X_{11}	0	20	5.792 8	0.095 3
模型				27.787 8	0.009 7

2.3 BBD 设计优化主要影响因素水平

由 PB 实验的结果选取葡萄糖（X_1）、蛋白胨（X_2）、pH（X_9）、温度（X_{10}）这四个对类胡萝卜素产量的提高有显著影响的因素，根据 BBD 实验设计原理，设计四因素三水平的响应面实验对上述四个显著因素进行优化，以类胡萝卜素的产量（Y）为响应值。其他不列入优化的部分因素也进行适量添加，添加量为酵母提取物 5 g/L，KH_2PO_4 1 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L。为使拟合的相应方程具有通用性和旋转性，选择中心点实验数为 5，总实验次数为 29 次，实验设计及结果见表 3。

表 3 BBD 设计和实验结果

Table 3 BBD design and experimental result

次数	葡萄糖质量浓度/(g/L)	蛋白胨质量浓度/(g/L)	pH	温度/℃	Y
1	40	17.5	5.5	26	2 759
2	40	5	7	26	5 053
3	40	17.5	5.5	26	2 501
4	40	5	5.5	32	4 543
5	40	17.5	5.5	26	3 277
6	40	17.5	5.5	26	3 124
7	20	17.5	5.5	32	699
8	60	5	5.5	26	2 665
9	40	17.5	5.5	26	2 724
10	20	30	5.5	26	548
11	60	17.5	5.5	20	1 377
12	60	17.5	7	26	3 266
13	20	17.5	7	26	791
14	20	17.5	4	26	594
15	60	17.5	5.5	32	2 000
16	40	30	4	26	960
17	40	30	5.5	20	771
18	60	30	5.5	26	1 742
19	20	5	5.5	26	1 396
20	40	5	4	26	2 259
21	40	30	7	26	1 080
22	40	17.5	4	32	1 243
23	40	17.5	4	20	916
24	40	17.5	7	32	4 279
25	40	30	5.5	32	552
26	20	17.5	5.5	20	726
27	60	17.5	4	26	1 805
28	40	17.5	7	20	1 213
29	40	5	5.5	20	1 999

使用 Design-expert 8.05 软件对表 3 数据进行二元多项式回归分析，结果见表 4。经回归拟合后，实验因素对响应值的影响可用以下回归模型表示：

$$Y = -15\ 616.39 + 143.38X_1 + 415.58X_2 + 12.93X_9 + 742.04X_{10} - 0.075X_1X_2 + 10.53X_1X_9 + 1.35X_1X_{10} - 35.65X_2X_9 - 9.21X_2X_{10} + 76.08X_9X_{10} - 2.52X_1^2 - 18.57X_{10}^2$$

表 4 回归分析结果

Table 4 Result of regression analysis

来源	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	14	2 908 964.10	9.72	<0.000 1	显著
X_1	1	5 468 850.31	18.27	0.000 8	
X_2	1	12 529 720.09	41.85	<0.000 1	
X_9	1	5 207 419.00	17.39	0.000 9	
X_{10}	1	3 322 216.27	11.10	0.004 9	
X_1X_2	1	1 406.25	0.005	0.946 3	
X_1X_9	1	399 423.71	1.33	0.267 4	
X_1X_{10}	1	105 624.98	0.35	0.562 0	
X_2X_9	1	1 787 568.89	5.97	0.028 4	
X_2X_{10}	1	1 908 542.03	6.37	0.024 3	
X_9X_{10}	1	1 875 529.94	6.26	0.065 3	
X_1^2	1	6 580 881.11	21.98	0.000 3	
X_2^2	1	446 533.92	1.49	0.242 2	
X_9^2	1	494 114.63	1.65	0.219 8	
X_{10}^2	1	2 899 844.77	9.69	0.007 6	
失拟项	10	379 170.81	3.79	0.105 3	不显著
残差	14	299 387.60			
相关系数	R^2=0.906 7		R^2(调整)=0.813 4		
精密度	12.092				

由表 4 可知，X_1、X_2、X_9、X_{10}、X_2X_9、X_2X_{10}、X_1^2、X_{10}^2 的 P 值均小于 0.05，说明这些因素对模型影响显著，其余因素对模型不显著。模型的 P 值小于 0.000 1，可信度水平大于 99.99%，说明用回归方程描述各因素与响应值之间的关系是非常显著的；失拟项可反应实验数据和模型不相符合的情况，失拟项 P 值为 0.105 3>0.05，失拟项差异不显著，说明回归方程对实验拟合模型选择正确。模型拟合度可用相关系数来验证，此处模型的相关系数 R^2 值为 0.906 7，调整后的 R^2 为 0.813 4，表明类胡萝卜素产量的实验值和预测值之间具有良好的拟合度；精密度可反应模型的信噪比，大于 4 视为合理，实验的精密度达到了 12.092。因此拟合模型可用来预测类胡萝卜素的产量。

2.4 响应面及最佳优化条件的验证

根据上述回归方程绘制响应值 Y 随各因素变化关系的响应曲面图，由响应曲图可知葡萄糖、蛋白胨、pH 和温度这四个因素对类胡萝卜素产量的影响，见图 3~8。每个响应面分别代表着两个独立因素之间的相互作用，其余两个因素保持在编码的 0 水平。

由回归模型可以得到各因素的最优值为葡萄糖 42.86 g/L，蛋白胨 5 g/L，pH 值 7，温度 28.3℃，此时响应值最大估计值为 5 438.46。由图 3~8 可知，响应值 Y（类胡萝卜素产量）在实验区域内具有极大

值,因此可用此回归方程得到的最优值来对优化结果进行验证。优化后发酵条件为:葡萄糖 42.86 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母提取物 5 g/L,KH_2PO_4 1 g/L,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L,pH 7,温度 28.3 ℃,根据上述优化条件对模型进行三次验证试验,平均类胡萝卜素产量达 5 385.5,与预测值结果 5 438.46 非常接近,说明响应面分析结果与预测结果是符合实际的,且与优化前类胡萝卜素产量 3 707.6 相比提高了 45%。

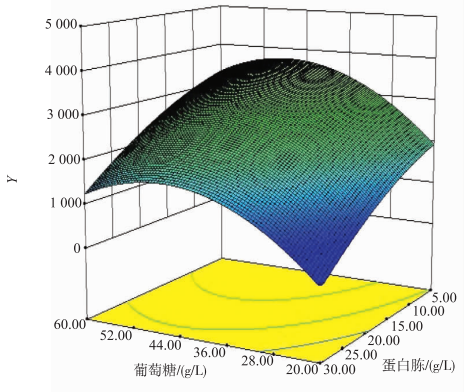


图 3 $Y=f(X_1,X_2)$响应曲面

Fig. 3 Response surface of $Y=f(X_1,X_2)$

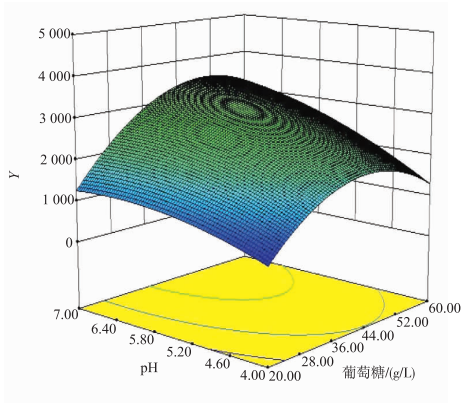


图 4 $Y=f(X_1,X_9)$响应曲面

Fig. 4 Response surface of $Y=f(X_1,X_9)$

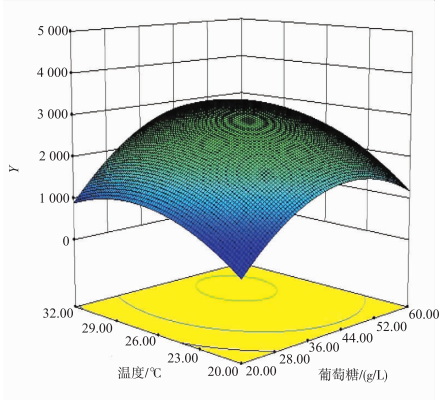


图 5 $Y=f(X_1,X_{10})$响应曲面

Fig. 5 Response surface of $Y=f(X_1,X_{10})$

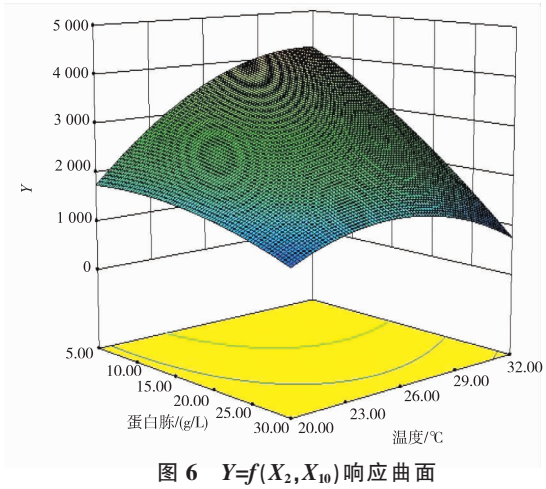


图 6 $Y=f(X_2,X_{10})$响应曲面

Fig. 6 Response surface of $Y=f(X_2,X_{10})$

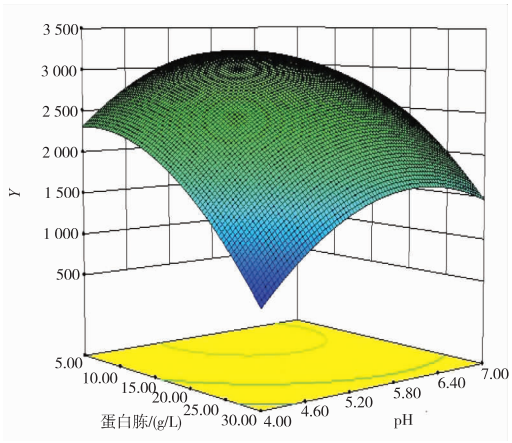


图 7 $Y=f(X_2,X_9)$响应曲面

Fig. 7 Response surface of $Y=f(X_2,X_9)$

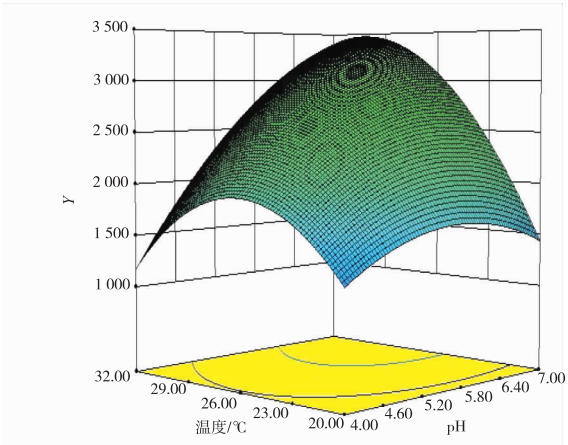


图 8 $Y=f(X_9,X_{10})$响应曲面

Fig. 8 Response surface of $Y=f(X_9,X_{10})$

3 结 语

作者采用光镊拉曼光谱结合响应面法对红酵母产类胡萝卜素的发酵条件进行了优化,首先建立

了光镊拉曼快速检测类胡萝卜素产量的方法,然后运用 Plackett-Burman 法确定葡萄糖、蛋白胨、PH、温度为影响类胡萝卜素产量的主要因素,最后采用 Box-Behnken 设计和响应面分析法确定了主要影响因素的最优发酵条件为:葡萄糖 42.86 g/L,蛋白胨 5 g/L, 酵母提取物 5 g/L,KH_2PO_4 1 g/L,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L,pH 7,温度 28.3 ℃。经培养发酵后,类胡萝卜素的最大产量为 5 385.5,与原发酵条件相比产量提高了 45%。表明利用光镊拉曼技术结合响应面法优化红酵母产类胡萝卜素的发酵条件是可行的。

参考文献:

[1] 姜建国,王飞,陈倩. 类胡萝卜素功效与生物技术[M]. 北京:化工工业出版社,2007:30-31.

[2] 王岁楼,张鑫,卫军,等. 高产类胡萝卜素红酵母的筛选及其发酵条件[J]. 食品与生物技术学报,2001,20(3):252-256.
WANG Suilou,ZHANG Xin,WEI Jun,et al. Screening of *Rhodotorula* producing carotenoids and its fermentation conditions[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**,2001,20(3):252-256.(in Chinese)

[3] 段学辉,颜淑芳,彭云召,等. 响应面法优化灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 产酶条件[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(3):464-470.
DUAN Xuehui,YAN Shufang,PENG Yunzhao,et al. Optimization of fermentation condition for cellulase-producing *Penicillium glaucum* NS 16 by response surface methodology [J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**,2010,29 (3):464-470.(in Chinese)

[4] WANG S L,SUN J S,HAN B Z,et al. Optimization of β-carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology[J]. **Food Microbiology and Safety**,2007,72(8):325-329.

[5] K Christian Schuster,Ingo Reese,Eva Urlaub. Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal raman microspectroscopy[J]. **Anal Chem**,2000,72:5529-5534.

[6] Huilu Yao,Zhanhua Tao,Min Ai,et al. Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells[J]. **Vibrational Spectroscopy**,2009,50:193-197.

[7] 王桂文,彭立新,姚辉璐,等. 基于光镊与拉曼光谱的红菇担孢子分析[J]. 激光生物学,2008,17(2):186-190.
WANG Guiwen,PENG Lixin,YAO Huilu,et al. Raman spectrum analysis of single russula spores based on optical tweezers and raman spectroscopy[J]. **ACTA Laser Biology Sinica**,2008,17(2):186-190.(in Chinese)

[8] R Liu,D S Taylor,D L Matthews,et al. Parallel analysis of individual biological cells using multifocal laser tweezers Raman spectroscopy[J]. **Applied Spectroscopy**,2010,64(11):1308-1310.

[9] Xie C,Mace J,Dinno M A,et al. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy[J]. **Anal Chem**,2005,77(14):4390-4397.

[10] Xie C,Chen D,Li Y Q. Sorting and identification of single living micro-organisms with optical Raman tweezers [J]. **Opt Lett**,2005,30(14):1800-1802.

[11] 曹小红,蔡萍,李凡,等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(4):59-65.
CAO Xiaohong,CAI Ping,LI Fan,et al. Medium optimization for lipopeptide produced by *Bacillus natto* TK-1 using response surface methodology[J]. **China Biotechnology**,2007,27(4):59-65.(in Chinese)

[12] 袁玉峰,陶站华,刘军贤,等. 拉曼镊子分析红酵母合成类胡萝卜素[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(4):1001-1005.
YUAN Yufeng,TAO Zhanhua,LIU Junxian,et al. Raman tweezers-based analysis of carotenoid synthesis in *Rhodotorula glutinis* [J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**,2011,31(4):1001-1005.(in Chinese)

[13] TAO Zhanhua,WANG Guiwen,XU Xiaodong,et al. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. **FEMS Microbiol Lett**,2010,314(2011):42-48.