

光镊拉曼光谱分析酿酒活性干酵母的活化与生长

彭立新¹ 王桂文^{1*} 廖威¹ 黄庶识¹ 姚辉璐¹ 黎永青²

(1. 广西科学院生物物理实验室 广西 南宁 530003)

(2. 美国东卡罗莱纳大学物理系 Greenville NC 27858-4353 USA)

摘要: 应用光镊拉曼光谱新技术(LTRS)对酿酒活性干酵母复水活化与生长进行动态观察, 探索从分子光谱角度窥视胞内糖类、核酸、蛋白等生物大分子的变化过程, 及葡萄糖消耗和乙醇生成的动态过程。结果显示, 酿酒活性干酵母复水活化后, 第6小时和9小时, 即酵母对数生长中期及乙醇产生前期, 是调控酵母细胞生理变化的2个重要的时间点。核酸类物质在细胞活化后迅速增加, RNA在第6小时达到最大值; 而蛋白质和脂类物质从第6小时开始快速增加, 在第9小时达到最大值, 而后呈下降趋势; 胞内乙醇则是在9h开始出现, 在9h~12h期间大量生成。本研究表明LTRS可以在单细胞水平上实现对酵母生长与乙醇发酵过程中复杂过程进行快速、实时的动态观察。

关键词: 拉曼光谱, 活性干酵母, 活化, 生长

Raman Spectroscopic Investigation on the Activation and Growth of Active Dry Wine Yeast

PENG Li-Xin¹ WANG Gui-Wen^{1*} LIAO Wei¹ HUANG Shu-Shi¹
YAO Hui-Lu¹ LI Yong-Qing²

(1. Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530003, China)

(2. Department of Physic, East Carolina University, Greenville, NC 27858-4353, USA)

Abstract: The growth and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* are both complexed physiology process. Here, we used laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) as tool and reported physiological metabolism such as nucleic acid, proteins, lipid, ethanol and glucose in active dry wine yeast cells. Our results indicated significantly changes of intracellular components at 6 h during log growth phase and 9 h that point between aerobic respiration to anaerobic fermentation. RNA synthesis was rapidly triggered in cultivated media and reached the maximum at 6 h. However, mitochondria respiration and syntheses of protein and lipid were slower than metabolism of nucleic acid in initial 3 h and then reached the maximum at crucial 9 h. The ethanol was also yielded at this time accompanying increase of glucose metabolism and reached the maximum of 0.98%. However, later, the metabolism of macromolecular, expected mitochondria respirations, were deeply declining after 9 h. All results show that LTRS can be utilized to monitor the metabolism of yeast growth and fermentation in quantitative or semi-quantitative analyses. In addition, improved kinetic model of ethanol fermentation processes also can be benefited from these metabolism parameters.

Keywords: Raman spectroscopy, Active dry yeast, Activation, Growth

分子振动光谱由于具有快速、无损伤、便捷的检测特点,已应用于在线检测的研究之中^[1-3]。特别是拉曼光谱技术(Raman spectroscopy)的发展,克服了红外光谱中水分子强吸收的干扰及空间分辨率低的问题,成为生命科学及医学研究领域强有力的研究手段^[4,5]。激光镊子拉曼技术(Laser tweezers Raman spectroscopy, LTRS)是融合光学囚禁(Optical trapping)与显微拉曼光谱的单细胞分析体系。通过形成光阱,LTRS可捕获单细胞、细胞器甚至生物大分子,使之固定于激光微束中,从而消除了自身运动及布朗运动对拉曼光谱的干扰,在自然生理状态下实现对单细胞内部生物大分子如蛋白质、脂类、DNA等定性及定量的实时分析^[6-9]。

活性干酵母(Active dry yeast)在酿酒工业的使用日益广泛,应用活性干酵母制备酒母是工业生产中常用的工艺。该工艺流程主要涉及到干酵母复水活化和培养2个过程。由于活性干酵母细胞含水量低(约<6%)、细胞膜在干燥时发生部分损失,在干酵母复水过程中,其膜渗透性显著增加,部分细胞内含物如糖类、氨基酸、肽、K⁺等发生渗漏,随后蛋白活性恢复,大分子物质重新开始合成以补偿水化过程中胞内物质的流失^[10]。我们小组曾利用LTRS在单细胞水平上,对即发活性面包干酵母在复水活化后的一种特殊生长现象进行研究,实时观察了单个细胞内糖类和蛋白质的变化^[11]。该研究也提示我们,在单细胞水平上,可实现对其生长中更为复杂的代谢过程进行动态观察。为此,我们利用LTRS对酿酒活性干酵母复水后的活化、生长行为进行观察,通过收集单个酵母细胞的拉曼光谱,从分子光谱角度上描述了酵母生长及发酵过程中细胞内糖类、核酸、蛋白等各组成的变化过程。旨在探索通过增加细胞内核酸、糖类、脂类及蛋白质等变量来优化生长及发酵过程中的动力学模型,以补充建立在各底物浓度变化、产物浓度、pH值变化等物料关系的经验或半经验的非结构模型。

1 材料与amp;方法

1.1 实验系统

LTRS系统构建^[6,7]:在倒置显微镜(Nikon, TE

2000U)中引入780 nm近红外激光形成光镊俘获目标细胞,该激光同时激发拉曼散射,拉曼信号经油浸物镜(NA 1.25)收集,经原光路引入光谱仪SpectraPro2300i(Acton)。150 μm的针孔去除离轴的散射光。2个干涉陷波滤波器(HNF)滤除波长与激发波长相同的弹性散射光。光谱仪衍射光栅参数是闪耀波长650 nm,每毫米600线。光谱仪耦合到电荷耦合器件CCD(Spec-10, Princeton Instruments)上,用液氮冷却CCD到-120°C。

1.2 酵母的活化与生长

在本次研究中,以目前国内使用比较广泛的安琪酿酒活性干酵母做为研究对象。干酵母于36°C无菌水中复水15 min,转入以YEPD(2.0%葡萄糖)作为酵母培养基的三角瓶中进行混合,终浓度为OD₆₀₀ 0.01,并分装于15 mL试管中,每管5 mL。为提供低溶解氧条件,在30°C条件下,150 r/min振荡培养。从接种时刻起,定时收集试管,200 μL用于收集酵母细胞的拉曼光谱,其余部分用于酵母生长曲线检测。

1.3 拉曼光谱的采集

取200 μL均匀混合的样品液,置于厚4 mm,直径6 mm的圆形样品槽内,为减少玻璃的荧光信号对拉曼光谱的干扰,底部用100 μm厚石英玻片密封。在倒置显微镜下用100倍(N.A. 1.30)油浸物镜观察,用780 nm近红外激光器作为激发光源,光镊随机捕获单个酵母细胞,囚禁于石英盖玻片上方10 μm处,功率7 mW,信号累积时间为20 s,收集目标细胞的拉曼光谱。在同一个高度上,移开细胞15 μm,同样条件下收集背景拉曼光谱。每个样品共收集30个细胞。在酵母生长后期,由于细胞密度较大,对收集到的细胞培养液400 g离心5 min,取上清培养基对原浓度细胞进行稀释。

用无水乙醇配制系列标准浓度的乙醇溶液,加入样品检测槽,激光聚焦在石英盖玻片上方10 μm处,收集拉曼光谱信号,信号累积时间为20 s。以纯水为背景。以乙醇的特征峰881 cm⁻¹信号强度建立标准曲线,用2.0 μm聚苯乙烯小球做系统校正。

各主要拉曼光谱峰可能对应的生物大分子参考文献[12,13]读取(见表1)。

表 1 酵母细胞主要拉曼信号峰可能对应的生物大分子^[12,13]
Table 1 Tentative assignment of Raman bands derived from single yeast cell

| 拉曼位置 Raman band (cm ⁻¹) | 对应基团指认 Tentative Assignment |
|--|--|
| 721 | Adenine 腺嘌呤 |
| 782, 810 | RNA |
| 848 | Glucose 葡萄糖 |
| 881 | Ethanol 乙醇 |
| 1002 | Phenylalanine 苯丙氨酸 |
| 1082 | Lipids, nucleic acids 脂类和核酸 |
| 1094 | DNA |
| 1157 | Protein 蛋白质 |
| 1233 | Guanine, Adenine, Uracil 鸟嘌呤, 腺嘌呤, 尿嘧啶 |
| 1302, 1316 | Lipids 脂类 |
| 1336 | DNA |
| 1446 | Lipids and protein 脂类和蛋白质 |
| 1482, 1569 | Guanine and Adenine 鸟嘌呤和腺嘌呤 |
| 1602 | Tyrosine and Phenylalanine 酪氨酸和苯丙氨酸 |
| 1655 | Amide I 蛋白质(酰胺 I) |

1.4 数据处理

所有数据均以 ASCII 形式输入 Micro Origin 7.0 进行统计分析。为获得每个样品的平均光谱, 在样品内部每个细胞的拉曼光谱先减去其各自背景光谱后进行平均, 然后进行相邻五点平滑处理。

2 结果与分析

以接种时刻作为起点, 检测了 0 h~12 h 及 24 h 的菌体浓度, 并对 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h 及 24 h 的样品进行实时的拉曼光谱收集。图 1 是第 6 小时和第 9 小时时单个酵母细胞的平均拉曼光谱曲线及其差异光谱, 标示了主要的拉曼信号峰位置。表 1 列出了各主要拉曼信号峰可能对应的物质指认。图 1 直观的反映了酵母细胞胞内主要生物大分子的信息, 很多物质峰的信号强度在第 6 小时和第 9 小时时有明显的不同, 而通过信号强度的变化可以得到胞内 RNA, DNA, 蛋白质和脂类等物质变化的信息。

图 2 是酿酒活性干酵母在 YEPD(2.0 %葡萄糖) 中的生长曲线, 反映了活性干酵母的生长特点, 即复水后快速进入指数生长。为观察酵母生长在群体水平上的变化过程, 我们比较了 3 h、6 h、9 h、12 h

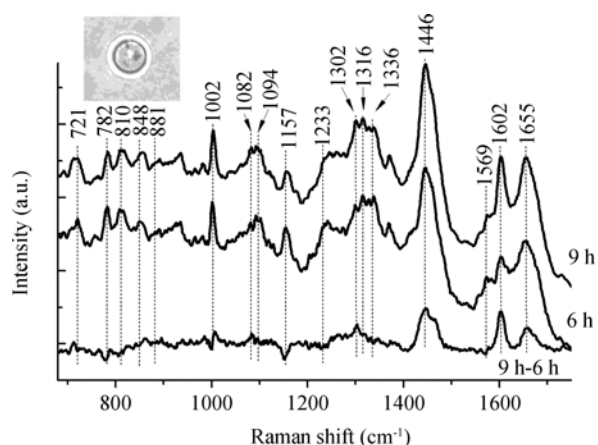


图 1 第 6 小时、第 9 小时时单个酵母细胞的平均拉曼光谱曲线及其差异光谱

Fig. 1 Averaged Raman spectra of single wine yeast cell at 6 h and 9 h cultured in YEPD medium and the difference spectrum

注: 插图为处于光阱中的单个酵母细胞。

Note: The inset was a yeast cell in trapping by laser tweezers.

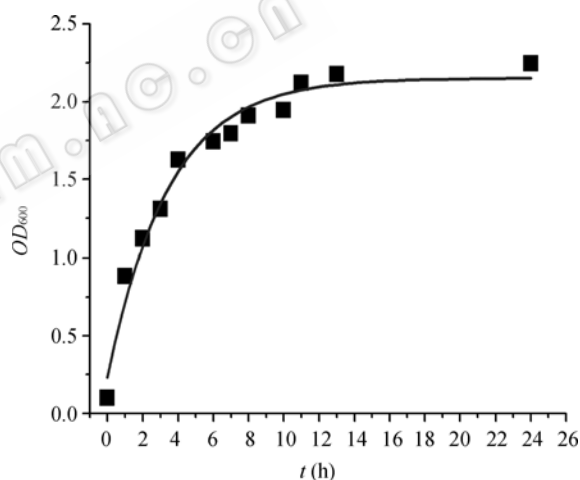


图 2 酿酒活性干酵母在 YEPD 中的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of active dry wine yeast cultured in YEPD medium

和 24 h 等时刻的平均拉曼光谱与 0 h 相减的差异光谱, 显示了酵母细胞生长的不同时刻, 胞内物质特征峰的强度变化(图 3), 其中表征 RNA、DNA、蛋白质、脂类、糖类及产物乙醇的峰位上均有明显变化(图 4)。下面我们分别对以上几种物质及细胞的生理变化过程进行详细的阐述。

1) 核酸类 酵母中核酸类物质主要包括 DNA 与 RNA, 分别可占到酵母干重的 0.31%和 3.95%^[14]。而核糖体中的 RNA 量占酵母中 RNA 总量的 95%以上, 细胞中的多数核糖体都与 mRNA 分子形成多聚核糖体, 多聚核糖体是蛋白质肽链合成的场所。因

此,与核酸类物质、尤其是与RNA相关的拉曼信号比较明显。图3中,721 cm⁻¹、782 cm⁻¹、810 cm⁻¹、1094 cm⁻¹、1233 cm⁻¹、1336 cm⁻¹、1482 cm⁻¹、1569 cm⁻¹等峰和核酸类物质有关,在0时刻,其Raman强度均呈较弱的散射峰,而接种入YEPD培养基后,该类峰强度均迅速增加,表征RNA的782 cm⁻¹、810 cm⁻¹、1233 cm⁻¹等峰,在酵母生长对数期间的第6小时达到最大值,随后呈下降趋势。而DNA峰还继续增强,在9 h时出现高峰。

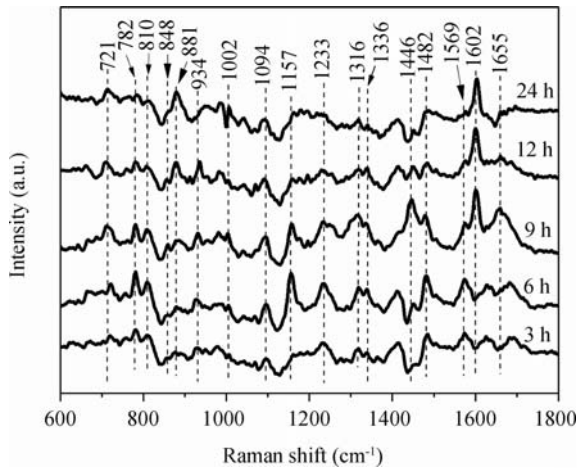


图3 酿酒活性干酵母不同生长时刻与0 h的差异光谱
Fig. 3 Averaged difference Raman spectra of single yeast cell at difference culture time subtracted the spectrum of 0 h

2) 蛋白质和脂类物质 在拉曼光谱中 1655 cm⁻¹是表征蛋白质中酰胺 I 的特征峰, 1157 cm⁻¹是蛋白质骨架峰, 1446 cm⁻¹来源于蛋白质和脂类物质的CH₂、CH₃基团。图3、图4显示,在酵母接种进入培养基的前3小时内,相对于核酸类物质的增长,蛋白质的表达量增加缓慢,而6 h后则迅速增加,并在第9小时达到最大值,而后呈下降趋势。但是1157 cm⁻¹在6 h达到最大,而后逐渐下降。

1082 cm⁻¹、1302 cm⁻¹、1316 cm⁻¹等峰表征的是脂类物质。和蛋白质的变化相似,脂类物质在生长对数期6 h内保持较低的水平,但在到第6小时与第9小时内,进入指数生长期,酵母细胞内快速积累脂类物质。而在随后的静止生长期(Stationary phase),细胞内脂类物质逐渐被消耗,最终维持在接种时起始水平。

3) 线粒体呼吸水平 Huang 等^[15]曾对裂殖酵母生长中1602 cm⁻¹的归属有过详细探讨,认为该峰与裂殖酵母细胞内线粒体的呼吸水平相关。在本研究

数据中,该峰值的变化趋势与蛋白表达量相同,先是平稳增涨,并在9 h时达到其最大值,随后虽然有所减弱,但在我们所检测的时间内(24 h)一直保持较高的代谢水平。

4) 葡萄糖代谢 848 cm⁻¹为葡萄糖的特征拉曼峰^[12],图4显示,酵母细胞胞内初始保持较高的葡萄糖含量,活化后其水平迅速减少,并在随后对数生长期均保持相同水平,直至第9小时将进入静止生长期后逐渐降低。

5) 乙醇生成 在酵母快速生长的后期,细胞生长受抑制,细胞数目的增加减缓,并伴随着881 cm⁻¹乙醇的特征峰的出现,在第9小时开始了乙醇的快速生成,到第12小时后逐步缓慢。对比生长曲线,可以看到9 h是个值得注意的时间点,一是酵母细胞从指数生长转入稳定生长期,二是细胞的蛋白质、脂类物质和胞内葡萄糖的拉曼信号开始减弱,而胞内乙醇的拉曼信号快速增强。为进一步定量溶

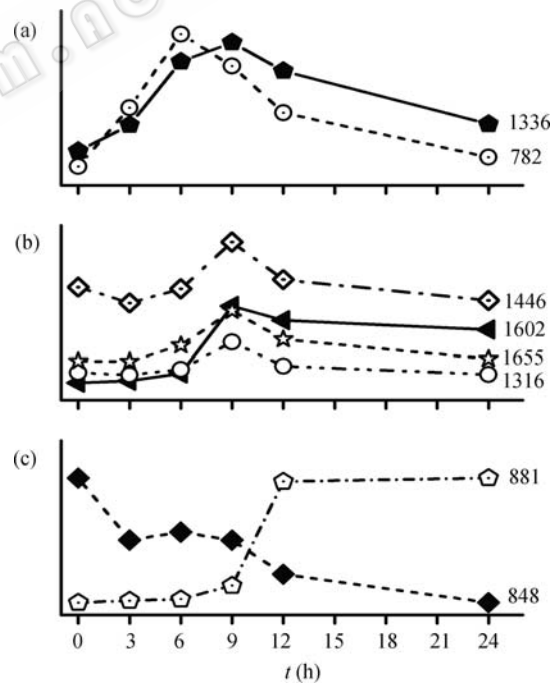


图4 酿酒活性干酵母活化与生长过程主要的拉曼信号峰随时间实时动态变化曲线

Fig. 4 The dynamic Raman intensity of major bands from yeast cell during activation and growth

注: 782: RNA; 1336: DNA; 1446: 蛋白质和脂类; 1665: 蛋白质; 1316: 脂类; 1602: 呼吸水平; 881: 乙醇; 848: 糖类。

Note: Active dry wine yeast cultured in YEPD (2.0 % (W/V) glucose) medium at 30°C. 782: RNA; 1336: DNA; 1446: protein and lipids; 1655: amide I; 1316: lipids; 1602: mitochondria respirations; 881: ethanol; 848: glucose.

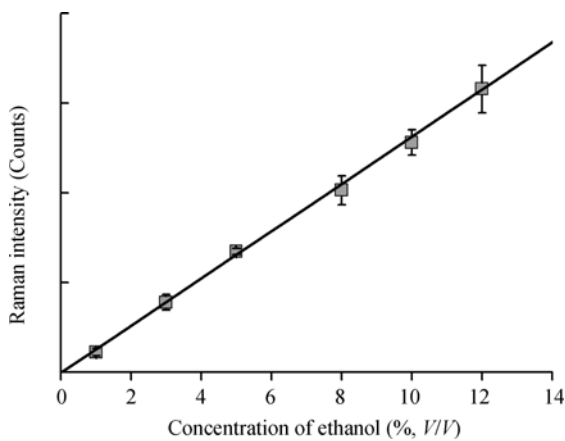


图5 乙醇浓度与 881 cm^{-1} 峰拉曼信号强度的相关性曲线
Fig. 5 Correlogram of ethanol concentrations and the intensity of band 881 cm^{-1}

液中乙醇的百分浓度, 我们测量了一系列标准乙醇百分浓度, 其浓度与其特征峰 881 cm^{-1} 的信号强度呈显著线性相关(见图 5, $R=0.996$), 其相关曲线为 $Y = -47.3 + 2627.7X$, 由此推算溶液中最终乙醇浓度为 0.98% 。

3 讨论

当干酵母进入水溶液环境后, 首先经历复水 (Rehydration)、活化过程, 这对酵母的生长及后期乙醇发酵尤为重要^[16]。细胞复水之后, 其转录能力首先恢复, 在基因组水平上的表达发生强烈变化, 涉及到核苷酸 (Nucleotide) 合成、rRNA、核糖体 (Ribosome) 及 RNA 代谢基因表达迅速上调, 而编码热休克 (Heatshock) 基因、抗氧应激 (Oxidative stress) 基因等表达下降^[16-18]。在整体上该过程表现出核酸类物质的迅速增加。从图 3 可以看到, 在前 6 小时显著增加的 782 cm^{-1} 、 810 cm^{-1} 、 1094 cm^{-1} 、 1233 cm^{-1} 、 1482 cm^{-1} 、 1569 cm^{-1} 等峰均与核酸类物质有关, 尤其是与 RNA 有关的峰变化更为明显。这说明了 mRNA 的大量合成, 为蛋白质与脂类物质的大量合成做准备。对应于生长曲线, 此时正处于对数期, 其核苷酸合成最为旺盛^[12], 特征峰达到最大值。

而蛋白质、脂类物质表达的整体变化明显慢于核酸类物质的增长, 在前 3 小时内, 总体蛋白的表达量均保持较低水平, 慢于核苷酸的增长。一方面蛋白的合成速度较慢 ($>10^3$)^[19], 而核苷酸的对外界环境应激反应迅速, Singh 等^[13]通过对进入迟滞期 (Lag phase) 单个酵母 RNA 观察, 认为在环境改变后

8 min 内会伴随 RNA 的迅速降低。本实验中, 6 h 时核酸物质的合成达到最高值, 而从此刻开始蛋白质、脂类物质随即开始大量合成, 在 9 h 达到最大。

线粒体是细胞氧化磷酸化提供能量的重要细胞器, 由于细胞色素可产生拉曼共振效应, 线粒体在单细胞光谱中具有较强的特征谱带。在生物材料中, 通常将 1002 cm^{-1} 、 1602 cm^{-1} 峰归属于蛋白质的基本成分苯丙氨酸, 但对比这 2 个峰的拉曼信号变化, 1602 cm^{-1} 在 9 h 后仍然保持较高的水平, 而 1002 cm^{-1} 及其它蛋白质峰并没有保持相应的强度, 说明在本实验中, 1602 cm^{-1} 峰的信号不仅源自氨基酸。Huang 等对酵母进行线粒体呼吸阻断剂 KCN 的处理, 观察到 1602 cm^{-1} 拉曼峰随呼吸的阻断而消失^[15]。我们小组对分离到的单个线粒体的观察, 同样表明了 1602 cm^{-1} 拉曼峰在指征线粒体呼吸的特异性, 并观察到在 Ca^{2+} 的诱导下, 线粒体因肿胀而导致细胞色素 C (Cytochrome C) 的快速释放^[20]。在本实验中, 1602 cm^{-1} 峰在 6 h 前处于较低水平, 而在蛋白质、脂类物质大量合成、乙醇开始生成前达到呼吸作用的最高峰, 并在随后的乙醇发酵过程保持较高的水平, 为细胞生长和乙醇发酵提供所需的能量。

在酵母接种的初期, 由于胞内较高葡萄糖含量, 其特征峰 848 cm^{-1} 呈现较强的信号峰。复水活化后, 在高葡萄糖诱导下, 与糖酵解功能相关的基因 (Glycolytic Gene) 如 PGK1 迅速获得上调^[15], 胞内葡萄糖的利用加强, 葡萄糖含量迅速下降, 而在随后的对数生长过程中, 细胞内始终保持一定葡萄糖水平, 直至 9 h 后细胞进入静止期, 葡萄糖消耗迅速下降。与此同时, 乙醇产物特征峰 (881 cm^{-1}) 随之出现, 并在 12 h 达到较高水平。该数据表明, 在酵母生长的后期, 由于细胞密度的增加, 群体生长放缓, 进入稳定期, 核酸、脂类物质和蛋白类物质的拉曼信号逐渐减弱, 而培养基中溶解氧的不足将促使细胞进入乙醇发酵途径, 从而进一步增加对培养基中葡萄糖的消耗, 以获得细胞生长必需得能量, 因而胞内葡萄糖浓度处于较低的水平, 而乙醇浓度则快速升高。

上述分析表明, 酿酒活性干酵母复水后生长、发酵过程中, 第 6 小时和第 9 小时是调控酵母细胞生理变化的两个重要的时间点, 表征胞内主要生物大分子的拉曼信号在这两个时刻发生重要变化。

4 小结

活性干酵母在酿酒工业的应用日益广泛,干酵母复水活化及培养是乙醇发酵关键的初始环节。本文应用光镊拉曼光谱技术(LTRS)对酿酒活性干酵母复水后活化与生长进行动态观察,从胞内主要生物大分子的分子光谱强度显示,酿酒活性干酵母复水活化后,第6小时和第9小时是调控酵母细胞生理变化的两个重要的时间点,分别对应于细胞对数生长的中后期和静止生长的开始,酵母细胞的核酸物质、蛋白质、脂类物质及胞内葡萄糖底物、乙醇产物的动态变化在这两个时刻发生重要变化。对工业生产控制酵母生长与乙醇发酵有参考意义。LTRS技术作为全新的光学手段,实时、无损的采集胞内物质的分子光谱信息,可以实现在单细胞水平上对复杂的发酵过程进行动态观察,有可能为通过增加胞内DNA、糖类、脂类及蛋白质等变量来优化发酵过程和实时在线检测提供新方法。

参考文献

- [1] Cavinato AG, Mayes MD, Ge ZH, *et al.* Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy. *Anal Chem*, 1990, **62**: 1977–1982.
- [2] Nieuwoudt HH, Pretorius IS, Bauer FF, *et al.* Rapid screening of the fermentation profiles of wine yeasts by fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods*, 2006, **67**: 248–256.
- [3] Sivakesava S, Irudayaraj J, Demirci A. Monitoring a bio-process for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, **26**: 185–190.
- [4] Lasch P, Kneipp J. *Biomedical Vibrational Spectroscopy*. Wiley-Interscience, 2008, ISBN: 9780470229453, pp.1–8.
- [5] Petry R, Schmit M, Popp J. Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences. *Chemphyschem*, 2003, **4**(1): 14–30.
- [6] Xie CA, Li YQ. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells. *Opt Lett*, 2002, **27**: 249–251.
- [7] Xie CA, Li YQ. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques. *J Appl Phys*, 2003, **93**: 2982–2986.
- [8] Xie CA, Li YQ, Tang W, *et al.* Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy. *J Appl Phys*, 2003, **94**: 6138–6142.
- [9] Xie CA, Mace M, Dinno A, *et al.* Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Anal Chem*, 2005, **77**: 4390–4397.
- [10] 莫湘筠. 酵母脱水保藏机理探讨及其在活性干酵母生产中的应用. *食品与发酵工业*, 1993, **1**: 76–80.
- [11] 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. *微生物学通报*, 2007, **34**: 1109–1113.
- [12] Stone N, Kendall C, Smith J, *et al.* Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss*, 2004, **126**: 141–157.
- [13] Singh GP, Volpe G, Creely CM, *et al.* The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *J Raman Spectrosc*, 2006, **37**: 858–864.
- [14] 陈思斌, 肖熙佩. *酵母生物化学*. 济南: 山东科学技术出版社, 1990, pp.9–10.
- [15] Huang YS, 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. *Biochemistry*, 2005, **44**: 10009–10019.
- [16] Rossignol T, Postaire O, Storai J, *et al.* Analysis of the genomic response of a wine yeast to rehydration and inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 699–712.
- [17] Singh J, Kumar D, Ramakrishnan N, *et al.* Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 8752–8763.
- [18] Novo M, Beltran G, Rozes N, *et al.* Early transcriptional response of wine yeast after rehydration: osmotic shock and metabolic activation. *FEMS Yeast Res*, 2007, **7**: 304–316.
- [19] Mettetal JT, Muzzey D, Gomez-Urbe C, *et al.* The frequency dependence of osmo-adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2008, **319**: 482–484.
- [20] Tang HY, Yao HL, Wang GW, *et al.* NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers. *Optics Express*, 2007, **15**(20): 12708–12716.