

T/CSMT

团体标准

T/CSMT-00*—20xx

益生菌活菌计数及代谢活力检测 拉曼光谱法

Detection of viable counts and metabolic activity of probiotics

Raman spectroscopy method

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国计量测试学会 发布

目 次

1 范围.....	4
2 规范性引用文件	4
3 术语和定义.....	4
4 缩略语	4
5 检测原理	5
6 试剂和材料.....	5
7 仪器设备	6
8 检测要求和方法	6
附录 A.....	11

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由青岛星赛生物科技有限公司提出。

本文件由中国计量测试学会归口。

本文件起草单位：青岛星赛生物科技有限公司、中国计量科学研究院、中国科学院青岛生物能源与过程研究所、中粮营养健康研究院有限公司。

本文件主要起草人：周玘、朱鹏飞、王晶、傅博强、张佳、徐腾、丁子元、郑晓卫、孙玉婷。

益生菌活菌计数及代谢活力检测 拉曼光谱法

1 范围

本文件规定了益生菌产品活菌计数及代谢活力的术语和定义、描述了益生菌活菌计数方法和代谢活力的拉曼光谱检测方法。

本文件适用于含益生菌产品的活菌计数及代谢活力检测。包括添加的植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、副干酪乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、格氏乳杆菌、卷曲乳杆菌、乳双歧杆菌、长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和嗜热链球菌等一种或多种菌种。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文本必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

T/CIFST 009-2022 食品用益生菌通则。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

益生菌 probiotics

一类当摄入足够量时，可对生物体（人和动物）健康有益的活的菌类微生物。

[T/CIFST 009-2022, 3.1]

3.2

活菌密度 viable probiotic density

被测样品单位质量或体积内可增殖（可培养）的益生菌活菌总数。

3.3

代谢活力 metabolic activity

活细胞原位代谢活动的强度。为细胞原位代谢状态的一项指标。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CDR: 碳-氘键峰值占比（C-D ratios）;

DNA: 脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）;

MRS 培养基: 乳酸细菌培养基（Man Rogosa Sharpe Medium）;

MAL: 代谢活力水平（Metabolic Activity Level）;

MAL-HI: 代谢活力异质性指数（Metabolic Activity Level Heterogeneity Index）;

PDMS: 聚二甲基硅氧烷（Polydimethylsiloxane）。

5 检测原理

利用重水（D₂O）同位素标记时，具有代谢活力的细胞会同化氘（D）并代替氢（H）进行合成代谢，使得细菌的脂类、蛋白质、DNA 等生物物质被氘化，所产生新的 C-D 键可被拉曼光谱灵敏检测到，并且碳-氘（C-D）峰强度可反映细胞的代谢活力。基于细胞的代谢活力来进行活菌计数，即具有代谢活力的细胞为活细胞。CDR 为 C-D 键的峰值光谱强度除以 C-D 键和 C-H 键的峰值光谱强度之和，以量化 C-H 键中 D 的替代程度，即碳-氘键峰值占比；所述 C-D 键的光谱强度是指在拉曼位移波数范围（2040-2300）cm⁻¹ 范围内的拉曼光谱强度；C-H 键的光谱强度是指在拉曼位移波数范围（2800-3100）cm⁻¹ 范围内的拉曼光谱强度。

6 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

6.1 基础试剂

生理盐水 (0.85% NaCl, 无菌), 重水 (D₂O) (纯度 99.9%), 三级水 [GB/T 6682, 4.3]。

6.2 培养基

按照菌种类型配制, 或选用相应商品化培养基。

MRS 培养基粉末。

6.3 芯片

氟化钙 (CaF₂) 芯片 (26 mm×76 mm), 用于人工检测。

微流控计数芯片, 带有高度为 100 μm 的腔室。用于自动化检测的细菌计数。

微流控洗脱芯片, 芯片由带有微结构的 PDMS 层与石英玻璃层组成, 其中 PDMS 层的主要功能结构包括: >1000 个约 0.3 nL 的微腔室, 以及与其相连接的微通道。该芯片用于益生菌悬液的洗脱 (主要指去除悬液中的培养基、D₂O 等物质), 及用于拉曼检测的样品干燥制片 (主要指将洗脱后的益生菌单细胞干燥于石英玻璃基底表面, 用于后续拉曼成像)。用于自动化检测的样品洗脱和检测。

7 仪器设备

7.1 显微拉曼光谱仪: 光谱分辨率不低于 5 cm⁻¹, 拉曼位移波数范围至少包含 400 cm⁻¹-3200 cm⁻¹。需配备 50 倍物镜、100 倍物镜。

7.2 恒温培养箱: 温控范围包含 36 °C, 波动<±1 °C;

7.3 振荡重悬器: 转速覆盖 1000-2800 r/min;

7.4 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 g;

7.5 离心机: 最大转速不低于 5000 r/min, 有 2-8 °C 制冷功能;

7.6 显微镜: 数值孔径 (50 倍物镜为 0.5、100 倍物镜为 0.9), 视场数 26.5;

7.7 真空进样装置 (适用于自动化检测法): 真空度 50 mbar;

7.8 注射泵 (适用于自动化检测法): 流速范围包含 2 μL/min;

8 检测要求和方法

8.1 检测要求

8.1.1 应选择同一批次三个独立包装的样品进行益生菌活菌计数及代谢活力检测, 样品应按包装标识要求的贮存条件进行贮存。

8.1.2 益生菌活菌计数及代谢活力检测应在 5 小时内完成。

8.2 检测步骤

8.2.1 样品前处理

1 制备样品孵育液: 按照培养基产品说明书称取适量的 MRS 培养基粉末, 加入相应量的 D₂O 充分振荡, 待完全溶解后, 再用 0.22 μm 的针头过滤器过滤除菌, 避光保存待用。

2 固体样品: 准确称取 1 g 益生菌产品 (要求益生菌总菌数 ≥ 10⁸ 个/g) 溶于 0.85% 无菌生理盐水中, 至终体积为 10 mL, 振荡 (3-5) min, 制成样品匀液;

液体样品: 将液体样品充分摇匀后用无菌枪头吸取 1 mL (要求益生菌总菌数 ≥ 10⁸ 个/mL) 置于 0.85% 无菌生理盐水中, 至终体积为 10 mL, 振荡 (3-5) min, 700 r/min 离心 5 min 取上清液, 制成样品匀液;

3 将 10 μL 样品匀液滴在血球计数板上进行样品浓度初步确认。

4 若样品匀液浓度在 10⁸ 个/mL 数量级范围, 则为适宜浓度样品, 可跳至步骤⑤;

T/xx 001—2023

若样品匀液浓度 $\geq 10^9$ 个/mL，吸取样品匀液1 mL至装有9 mL无菌生理盐水的试管中，制备1 : 10样品匀液。按照此法依次制备10倍递增样品匀液，直至出现 10^8 个/mL数量级范围的样品匀液作为适宜浓度样品。每次递增稀释一次，需更换无菌吸管或吸头；

若样品匀液浓度 $< 10^8$ 个/mL，应参考浓缩倍数取一份或多份样品匀液，通过离心进行富集（5000 r/min，4°C离心5 min，去上清液，吸取2 mL无菌生理盐水重悬菌体），保证得到的样品匀液浓度在 10^8 个/mL数量级范围；

5 分别取2份1 mL的适宜浓度样品，1份为待测样品，1份为背景样品。将待测样品和背景样品5000 r/min离心5 min，丢弃上清液；

6 吸取1 mL 100% D2O MRS孵育液重悬待测样品菌体，厌氧孵育3 h；背景样品无需添加D2O MRS孵育液和厌氧孵育，直接进行下一步骤；

7 用灭菌三级水洗涤（5000 r/min，4°C离心5 min，去上清液，吸取1 mL灭菌三级水重悬，5000 r/min离心5 min。重复三次），吸取适量三级水（0.1-1）mL重悬洗涤后的菌体，检测待用；

8 取1 μ L菌悬液滴在CaF₂芯片上，风干10 min，待样品干后进行检测；

9 另取步骤④中适宜浓度样品10 μ L滴在血球计数板上待进行总菌计数。

8.2.2 样品检测

通过显微镜 50 倍镜下对血球计数板上的菌悬液进行总菌计数，得到样品菌悬液的总菌数 N 。

通过显微拉曼光谱仪 100 倍物镜下分别采集待测样品和背景样品的单细胞拉曼光谱（去除异常光谱后，拉曼光谱数量 > 200 条），激光功率为（40-100）mw，曝光时间为（1-3）s，并采集背景拉曼光谱扣除背景信号干扰。

8.2.3 数据处理

1 使用RStudio或Python软件去除异常光谱，包括信噪比差、基线不平以及C-D和C-H区域有尖峰的拉曼光谱；

2 使用RStudio或Python软件计算拉曼光谱的CDR；

3 将待测样品和背景样品CDR由高到低进行排序；

4 背景样品选取第2.5百分位数的数据定义为 $CDR_{\text{背景}}$ ，计算第2.5百分数所在位置 k 的公式为： $k = 2.5(n-1)/100$ ，其中 n 为数据数量。如果 k 为整数，则第2.5百分位数就是数据中第 k 个数；如果 k 不是整数，则第2.5百分位数为数据中第 $k+1$ 个数；

5 计算待测样品MAL值： $MAL = CDR_{\text{样品}} - CDR_{\text{背景}}$ 。

8.2.4 结果计算

活菌密度的计算公式为： $C = N \times d \times f$

式中：

C —样品的活菌密度（个/g（mL））；

N —菌悬液的总菌密度（个/g（mL））；

d —活菌率；

f —稀释/浓缩倍数；

其中活菌率计算公式为： $d = \frac{c}{n} \times 100\%$

式中：

d —活菌率；

n —采集视野中的总菌数；

c —采集视野中的活菌数；

其中，菌的死活情况根据 MAL 判定，公式为： $MAL = CDR_{\text{样品}} - CDR_{\text{背景}}$ ， $MAL > 0$ ，认为是活菌， $MAL < 0$ ，认为是死菌。

式中：

MAL —细胞代谢活力水平。

益生菌活菌数计算结果以同一批次三个不同样品的益生菌活菌数平均值计算。

8.3 自动化检测步骤

8.3.1 细菌计数

- 1□ 样品孵育液、适宜浓度样品匀液制备方法见8.2.1；
- 2□ 移液枪取待测样品匀液10 μL ，注入微流控计数芯片进样口；
- 3 将芯片放置于自动化显微拉曼光谱仪50倍物镜视野下，进行自动计数。

8.3.2 样品洗脱制片

- 1□ 分别取2份0.1 mL适宜浓度样品匀液，1份为待测样品，1份为背景样品，进行5000 r/min离心5 min，弃上清液；
- 2□ 将待测样品用0.1 mL 100% D_2O MRS培养基孵育液重悬菌体，厌氧孵育3 h；背景样品无需添加 D_2O MRS培养基孵育液和厌氧孵育，直接进行下一步骤；
- 3□ 分别取待测样品和背景样品5 μL 加入微流控洗脱芯片的待测样品和背景样品点样口，之后将芯片放入真空进样装置，抽真空2分钟，保证样品填充至芯片微腔室中；
- 4□ 将连通有纯水相的导管连接芯片进样口，将连通有注射泵一端的导管连接芯片出口，注射泵调节至抽取模式，速度2 $\mu\text{L}/\text{min}$ （同时处理多块芯片时可按比例增加），抽取10分钟；
- 5 将芯片进样口处的导管由纯水相切换至乙醇相，继续开启注射泵抽取2分钟；
- 6□ 揭下芯片上层PDMS结构，进行检测。

8.3.3 样品检测

使用自动化显微拉曼光谱仪配套的检测软件，通过显微拉曼光谱仪的自动化分别采集待测样品和背景样品的单细胞拉曼光谱（去除异常光谱后，拉曼光谱数量 >200 条），激光功率为40-100 mw，曝光时间为（1-3）s，并采集背景拉曼光谱扣除背景信号干扰。

8.3.4 数据处理和结果计算

使用自动化显微拉曼光谱仪配套的分析软件，打开待测和背景样品采集的所有的单细胞拉曼光谱数据，点击运行程序，得到活菌数和 MAL 以及生成相对应的图片。

8.4 益生菌产品评价方法

8.4.1 益生菌产品的菌原位活力评价

T/xx 001—2023

以 MAL 值作为评价益生菌产品的原位活力的指标， $MAL = CDR_{\text{样品}} - CDR_{\text{背景}}$ ，MAL 值越高，则活力越高。

将采集的待测样品和背景样品的单细胞拉曼光谱，计算 CDR 值和 MAL 值。将背景样品的 CDR 值由高到低进行排序，选取第 2.5 百分位数的数据定义为 $CDR_{\text{背景}}$ ；用 $CDR_{\text{样品}} - CDR_{\text{背景}}$ 得到每个细胞的 MAL 值，并计算平均值。

$$\text{代谢活力计算公式: } \overline{MAL} = \frac{\sum M}{n}$$

式中：

$\sum M$ —采集所有单细胞代谢活力之和；

n —单细胞个数；

8.4.2 益生菌产品的菌代谢活力异质性评价

基于 MAL 值完成 MAL-HI (Metabolic Activity Level Heterogeneity Index) 值的计算；通过计算采集的单细胞的 MAL 值的方差，取其平均值得到 MAL-HI 值，MAL-HI 值越高，益生菌产品中的细胞异质性越高，表明益生菌产品中的细胞代谢活性分布不均匀；MAL-HI 值越低，益生菌产品中的细胞异质性越低，表明益生菌产品中的细胞代谢活性分布均匀。

$$\text{细胞异质性计算公式: } HI = \sqrt{\frac{(M_i - \overline{MAL})^2}{n}}$$

式中：

M_i —每个细胞 MAL 的值；

\overline{MAL} —MAL 的平均值；

n —单细胞个数。

附录 A

(资料性) 检测方法的典型图谱示例

A.1 样本

以市售的畜牧业用固体益生菌产品 A 和人用胶囊益生菌产品 B 为例进行实验。以上两种产品均为同一批次三个独立包装的样品。

A.2 样品前处理

1□制备样品孵育液：按照产品说明书称取0.5224 g MRS培养基粉末，加入10 mL D₂O，充分震荡1-2 min，用0.22 μm的针头过滤器过滤除菌，避光保存待用。

2□产品A和B分别称取0.1 g，补加 0.85%无菌生理盐水中至终体积为1 mL，振荡3-5 min，制成1：10样品匀液；

3□吸取1：10样品匀液0.1 mL至装有0.9 mL无菌生理盐水的试管中，制备1：100样品匀液。按照此法依次制备10倍递增样品匀液；

4□产品A和B分别分别取2份0.1 mL适宜浓度样品，1份为待测样品，1份为背景样品，5000 r/min离心5 min，丢弃上清液；

5□将待测样品用0.1 mL 100% D₂O MRS孵育液重悬菌体，厌氧孵育3 h；背景样品无需添加D₂O MRS孵育液和厌氧孵育，直接进行下一步骤；

6□用灭菌三级水洗涤（5000 r/min离心5 min，去上清液，加1 mL灭菌三级水重悬，5000 r/min离心5 min，重复三次），用0.1 mL三级水重悬；

7□取1μL菌悬液滴在氟化钙（CaF₂）芯片上，风干10 min，待样品干后进行检测。

A.3 样品检测

A.3.1 仪器检测条件

益生菌活菌计数及代谢活力检测拉曼光谱法仪器检测参考条件见表 A.1。

表 A.1 益生菌活菌计数及代谢活力检测拉曼光谱法仪器检测参考条件

激光功率 mw	曝光时间 s	针孔 μm	光栅 mm
90	2	125	600

A.3.2 样品拉曼光谱

待测样品和背景样品拉曼光谱见图 A.2。

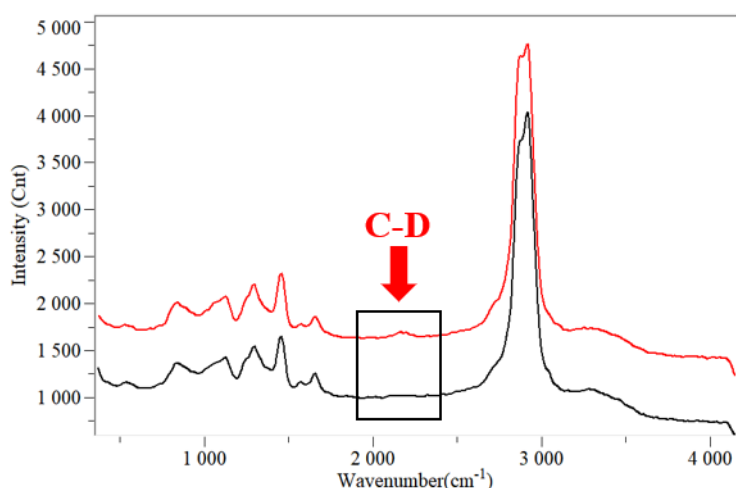


图 A.2 待测样品和背景样品平均拉曼光谱

A.4 数据处理

1□使用RStudio或Python软件打开CDR脚本，在testpath<'#opts\$test_data#的单引号中输入待测和背景样品的文件夹路径，全选后点击Run运行脚本（例如：testpath<'H:\YL\20230810-YL'#opts\$test_data#）；

2□在SNR_Result文件夹中打开CD_ratio TXT格式文件，选择待测和背景样品所有的细胞的CDR 值复制到excel表格中,并按大小进行排序；

3□将背景样品的CDR值由高到低进行排序，选取第2.5百分位数的数据定义为CDR_{背景}，样品A的CDR_{背景}=0.23，样品B的CDR_{背景}=0.21。

A.5 结果计算

样品 A 和样品 B 益生菌活菌计数及代谢活力检测拉曼光谱法计算结果见表 A.3。

表 A.3 样品 A 和样品 B 拉曼光谱法和传统方法计算结果

样品	样品平行	总细胞数	活细胞数	活菌率 (%)	血球板计数-总菌数 (个/g)	拉曼光谱法-活菌数 (个/g)	拉曼光谱法-活菌数均值 (个/g)	平板计数法-活菌数 (CFU/g)	平板计数法-活菌数均值 (CFU/g)	p 值
A	平行 1	70	6	8.57	8.30×10^9	7.11×10^8	$7.00 \pm 1.23 \times 10^8$	6.50×10^8	$5.90 \pm 1.53 \times 10^8$	0.47
	平行 2	70	4	5.71	9.85×10^9	8.44×10^8		7.40×10^8		
	平行 3	74	5	6.76	6.35×10^9	5.44×10^8		3.80×10^8		
B	平行 1	77	21	27.27	1.30×10^9	3.55×10^8	$3.00 \pm 0.43 \times 10^8$	1.65×10^8	$3.26 \pm 1.22 \times 10^8$	0.79
	平行 2	69	16	23.19	1.08×10^9	2.50×10^8		3.53×10^8		
	平行 3	70	16	22.86	1.29×10^9	2.94×10^8		4.61×10^8		

A.6 益生菌代谢活力评价结果

按照 8.4 中益生菌代谢活力评价方法所述，根据代谢活力和细胞异质性计算公式计算产品 A 和产品 B 的代谢活力和细胞异质性，结果见表 A.4 与图 A.5。

表 A.4 样品 A 和样品 B 代谢活力和细胞异质性计算结果

样品	样品平行	代谢活力	代谢活力均值	细胞异质性	细胞异质性均值
A	平行 1	-9.56×10^{-3}	-9.60×10^{-3}	9.02×10^{-3}	4.53×10^{-3}
	平行 2	-1.02×10^{-2}		6.20×10^{-3}	
	平行 3	-9.05×10^{-3}		5.68×10^{-2}	
B	平行 1	-1.80×10^{-3}	-2.45×10^{-3}	7.96×10^{-3}	8.53×10^{-3}
	平行 2	-2.44×10^{-3}		7.65×10^{-3}	
	平行 3	-3.10×10^{-3}		9.99×10^{-3}	

图 A.5 产品 A 和产品 B 代谢活力和细胞异质性示意图

