

《益生菌活菌计数及活性检测 拉曼光谱法》

团体标准编制说明

标准起草小组

2023年5月20日

《益生菌活菌计数及活性检测 拉曼光谱法》

标准编制说明

一、制定标准的背景介绍

2001年联合国粮食及农业组织和世界卫生组织（FAO/WHO）提出，当摄入足够数量时，对宿主产生健康益处的活性微生物称之为益生菌[1]。国际益生菌和益生元科学协会（ISAPP）2021年对发酵食品定义为：通过所需的微生物生长和食品成分的酶转化而制成的食品。其中特别指出，当发酵食品中含有确切的活益生菌时，才能标注“含有益生菌”，并认为改善食品营养、调节人体免疫和肠道菌群、含有影响肠道和机体功能的生物活性物质等，是其促进健康的潜在机制[2]。近年来，随着益生菌概念的流行，益生菌的产品线已经从饮食补充剂扩展到临床治疗[3-6]。对于益生菌，不同菌株的活细胞数是否符合标准是公众主要关心的问题。但是，由于国内益生菌行业长期缺乏产品标准规范，导致益生菌产品质量良莠不齐，许多商品的说明书上并未标注关于所含益生菌菌株的功效和产品中实际存在的活细胞数量(菌落形成单位[CFU/毫升])[7, 8]。因此，为规范愈发庞大的益生菌市场，避免益生菌产品市场规模不断扩大而出现的虚假夸大宣传等乱象，对商业益生菌产品进行包括快速活菌计数、原位活力测试在内的定性和定量评价的检测方法迫在眉睫。

然而，目前行业中广泛应用的方法有很大的局限性。对于益生菌产品的活菌计数、活性检测等质检工作存在检测周期长、成本昂贵、混合益生菌产品检测效果差等问题[9, 10]。为提高益生菌产品的质量检测能力，本标准提出了拉曼光谱检测方法，对益生菌产品的活细胞数和原位活力进行测定。该方法能够准确测定益生菌产品中的活菌数和活性指标。该方法的建立为今后丰富我国益生菌产品的质控工作打下了一个良好的基础，并为制定中国自己的益生菌标签法律法规以及检测方法提供可靠的数据保障。

二、标准制定原则和依据

我国目前对益生菌活菌计数及活性检测方法研究还处于初级阶段，有很大的局限性，有关测定方法的文献报道比较少，主要是色谱法和微生物法。

参考文献 Mondol 等人研究表明可以基于拉曼检测细胞活力，成功预测混合样品

中活菌占比，采用拉曼光谱法，经过大量的实验，建立了《益生菌活菌计数及活性检测 拉曼光谱法》[11]。

本标准的建立不仅弥补了我国益生菌行业质控方法的空白，同时对益生菌活菌计数及活性检测的标准检测方法进行了补充，很好的解决了益生菌行业长期缺乏产品标准规范，导致益生菌产品质量良莠不齐的问题。

三、起草过程

1. 2021 年 10 月，青岛生物能源与过程研究所单细胞中心承担的国家重大科学仪器研制、国家重点研发计划等项目中，计划基于单细胞拉曼技术建立益生菌产品质检方法。

2. 2022 年 3 月对方法标准申请立项，同月成立标准起草工作组，主要由青岛生物能源与过程研究所单细胞中心、中国计量科学研究院、中国食品发酵工业研究院、青岛东海药业和青岛星赛生物组成。

3. 2022 年 6 月标准起草工作小组召开第一次工作组会议并共同制定工作计划，包括分工、调研相关资料、安排试验内容，确定了起草原则、标准适用范围、试验方案以及验证方法准确性等标准所要求的试验内容。标准主要是益生菌活菌数和原位活力测定方法研究，以益生菌固体饮料等常见保健食品为主要目标。

4. 2023 年 6 月，成立“益生菌单细胞技术联盟（A-STEP）”，由青岛能源所、中国食品发酵工业研究院、热心肠研究院、星赛生物等联合发起，联盟成员单位有中国计量学会生物计量专委会、江南大学、内蒙古农业大学、伊利集团、蒙牛集团、中粮营养健康研究院有限公司、东海药业、青岛啤酒、国际香精香料公司 IFF、诺维信 OneHealth、帝斯曼康萃乐、科拓生物、锦旗生物、恒天然、华大基因等。

5. 2023 年 10 月，工作小组计划组织标准全国范围内的征求意见。总计向包括省、自治区、直辖市质量技术监督局，科研院所，益生菌产业领军企业的等 20 家以上单位征询意见。

四、标准主要条款的说明

1. 本标准分为 6 个部分：范围、规范性引用文件、术语和定义、试剂或材料、仪器设备、检验要求和方法。

2. 针对我国益生菌产品中添加各菌种的活菌数量情况，本文件适用于添加以下一种或多种菌种的益生菌产品活菌计数及代谢活力检测，包括植物乳杆菌、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、乳双歧杆菌和长双歧杆菌。

五、工作及主要内容及主要试验

本方法分样品预处理、样品重水（D₂O）孵育、自动化采集单细胞拉曼图谱三大步骤。进行了方法的准确度、方法的应用实例和方法的适用性等实验。

1. 样品预处理

分别用单一菌株益生菌产品 MPP-A 作为测试样品。依据 GB 4789.35-2016 益生菌产品样品制备流程，在无菌环境下称取益生菌产品，溶于 0.85% 的生理盐水中，充分振荡使其彻底溶解，制成 1: 10 倍样品稀释液。将制备的悬浮液进行适当稀释以备待用。孵育液制备流程为：按照产品说明书称取适量的 MRS（Man Rogosa Sharpe）培养基粉末，并取适量的 D₂O 加入培养基中进行溶解，待溶解完全后，用 0.22um 的针头过滤器过滤除菌，避光保存待用。

2. 样品 D₂O 孵育条件的确定

为使样品中的活细胞与 D₂O 结合完全，对不同浓度的 D₂O 和不同孵育时间条件进行实验，当利用 D₂O 同位素标记时，并考察孵育前后的细胞数，验证 D₂O 孵育过程可以标记样品中所有的活细胞且不会影响计数结果。

2.1 D₂O 浓度的确定

用 0%，25%，50%，75% 和 100% D₂O MRS 孵育液重悬菌体，厌氧孵育 0，1，2，2.5，3，3.5 和 4h。实验结果表明 100% D₂O MRS 孵育 3 小时后，具有代谢活性细胞与 D₂O 的结合比例不再显著增加。此外，D₂O 浓度等于或小于 75% 时，需要更长的孵育时间（4 小时）才能达到饱和，而且低浓度 D₂O 导致孵育时间延长，既降低了检测效率，又会导致细胞有繁殖从而影响计数结果（表 1）。

表 1 不同浓度 D₂O 中不同孵育时间活菌标记率

/	平均值				
	0% D ₂ O	25% D ₂ O	50% D ₂ O	75% D ₂ O	100% D ₂ O
时间					
0h	0	0	0	0	0
1h	0	0.1115	0.1657	0.217	0.2289
2h	0	0.2613	0.4487	0.5867	0.7776

2.5h	0	0.3473	0.7173	0.8123	0.8745
3h	0	0.3903	0.745	0.8873	0.9388
3.5h	0	0.3937	0.7353	0.896	0.9536
4h	0	0.4557	0.9037	0.9317	0.961

2.2 孵育时间的确定

将结果较为接近的 75%D₂O 和 100%D₂O 孵育 3 小时，分别进行平板计数，由经过统计学分析可以看出 75%的 D₂O 孵育 0 小时和 3 小时后平板计数，二者之间 P 值小于 0.05，即存在显著差异，所以 75%D₂O 孵育 3 小时会影响计数结果。当 D₂O 浓度为 100%，D₂O 孵育 0 小时和 3 小时后平板计数，二者之间 P 值大于 0.05，即不存在显著差异，后续实验均采用 100%D₂O 孵育 3h 的条件。

表 2 75%D₂O 和 100%D₂O 孵育 3 小时的平板计数结果

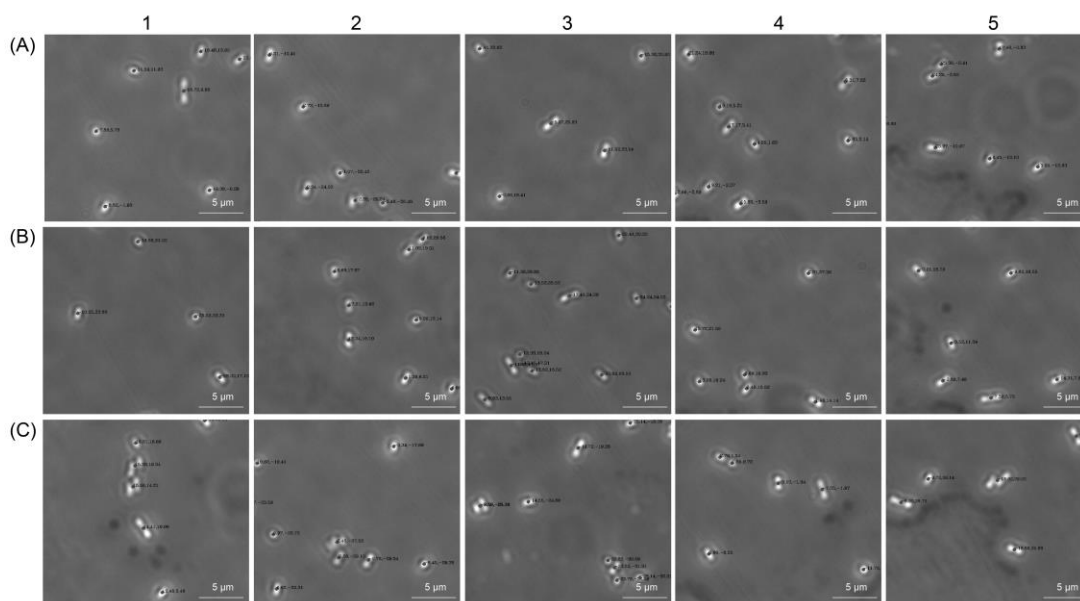
	浓度 (CFU/g)		P 值
	0 h	3 h	
75% D ₂ O	$1.27 \pm 0.10 \times 10^{10}$	$2.81 \pm 0.09 \times 10^{10}$	$p < 0.05$
100% D ₂ O	$1.26 \pm 0.03 \times 10^{10}$	$1.31 \pm 0.05 \times 10^{10}$	$p > 0.05$

3. 基于单细胞拉曼技术对益生菌产品快速计数和原位活力检测

取 3-10ul 待测样品和背景样品分别加入到微流控芯片进样口，真空进样 2min。然后取 100ul ddH₂O 滴加到进样口，利用水的扩散除去培养基和细胞表面的 D₂O，得到的样品进行拉曼检测；通过显微拉曼光谱仪自动化采集背景样品多个视野中的所有单细胞（100-200 个细胞），并采集背景拉曼光谱扣除背景信号干扰，获得的 CDR（C-D ratios）值用于拉曼光谱重水峰的归零，即为 CDR_{背景}。通过显微拉曼光谱仪自动化采集待测样品多个视野中的所有单细胞（100-200 个细胞），并采集背景拉曼光谱扣除背景信号干扰，自动化获得总菌数、活菌数、活菌率等指标。

设定 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。如果细胞的 $MAL \leq 0$ ，被认为是死细胞；如果细胞的 $MAL > 0$ ，则被认为是活细胞。

在三个平行样品的 15 个视野分别收集了 129、70、73、63、78、54、49、70、82、61、58、102、96、93 和 52 个 SCRS（Single-cell Raman spectrum）值。而 MAL > 0 的细胞分别有 87、47、34、40、49、41、30、49、61、50、43、77、66、61 和 33 个（MAL > 0 被判为活菌）。另外，通过 MAL 计算，MPP-A 的 MAL 平均值为



0.0266±0.0019。因此，基于单细胞拉曼技术，可检测出益生菌产品的“活菌率”（67.84%）和“原位活力”（各细胞 MAL 值和 MAL 平均值），该“原位活力”可以通过 MAL 值量化每个单细胞的代谢活力和产品整体活力。

图 1 自动化计数益生菌产品的显微镜视图

4. 方法的准确度实验：

分别用单一菌株益生菌产品 MPP-A 和复合型益生菌产品 CPP-A 进行准确度实验。

4.1 细胞总数准确度验证

4.1.1 MPP-A 细胞总数

细胞总数准确度采用传统方法 neubauer 血球计数板进行验证，分别对计数室的左上，右上，左下，右下和中间方格的细胞数进行统计，传统方法细胞总数的结果为 $1.84 \pm 0.17 \times 10^{10}$ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的细胞总数为 $1.99 \pm 0.28 \times 10^{10}$ CFU/g，与血球计数板结果接近（ $p > 0.05$ ）。结果见表 3。

4.1.2 CPP-A 细胞总数

细胞总数准确度采用传统方法 neubauer 血球计数板进行验证，分别对计数室的左上，右上，左下，右下和中间方格的细胞数进行统计，传统方法细胞总数的结果为 $4.13 \pm 0.03 \times 10^{11}$ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的细胞总数为

4.09±0.07×10¹¹CFU/g，与血球计数板结果接近（p>0.05）。结果见表 3。

4.2 活细胞数准确度验证

4.2.1 MPP-A 活细胞数

活细胞数准确度采用 GB 4789.35-2016 中 6.2.3 乳酸菌计数中要求的平板计数法进行验证，记录平板上的菌落数，乘以稀释因子，获得样品中的活细胞数。实验结果表明平板计数法的活菌数结果为 1.25±0.45×10¹⁰ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞的数量为 1.35±0.13×10¹⁰ CFU/g，与平板计数法结果接近（p>0.05）。结果见表 3。

4.2.2 CPP-A 活细胞数

活细胞数准确度采用 GB 4789.35-2016 中 6.2.3 乳酸菌计数中要求的平板计数法进行验证，记录平板上的菌落数，乘以稀释因子，获得样品中的活细胞数。实验结果表明平板计数法的活菌数结果为 3.84±0.02×10¹¹ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞的数量为 3.72±0.35×10¹¹ CFU/g，与平板计数法结果接近（p>0.05）。结果见表 3。

表 3 传统方法和基于单细胞拉曼技术细胞计数结果

		传统方法 (CFU/g)	拉曼方法 (CFU/g)	p 值
MPP-A	细胞总数	1.84±0.17×10 ¹⁰	1.99±0.28×10 ¹⁰	p>0.05
	活细胞数	1.25±0.45×10 ¹⁰	1.35±0.13×10 ¹⁰	p>0.05
CPP-A	细胞总数	4.13±0.03×10 ¹¹	4.09±0.07×10 ¹¹	p>0.05
	活细胞数	3.84±0.02×10 ¹¹	3.72±0.35×10 ¹¹	p>0.05

5. 单细胞拉曼技术原位活力指标应用实例

产品 X 和产品 Y 是同一种婴儿双歧杆菌菌株，分别采用没有微胶囊化包被和微胶囊化包被生产工艺进行加工。使用传统方法平板计数法分别计算产品 X 和产品 Y 的活细胞数，工艺 1 为 3.40±0.36×10⁹ CFU/g，工艺 2 为 2.51±0.06×10⁹ CFU/g。为了测试产品的稳定性，将不同工艺生产的婴儿双歧杆菌产品进行加速实验（37℃下储存 10 天），然后再次基于传统方法计算出活细胞数，工艺 1 为 3.57±0.25×10⁷ CFU/g，工艺 2 为 2.08±0.14×10⁹ CFU/g；根据加速实验前后的活细胞数计算产品 X 和产品 Y 的存活率，分别为 1.05%和 82.76%（表 3）。根据传统方法 10 天的加速实验表明，产品 Y 的存活率要高于产品 X。

表 3 平板计数法计算工艺 1 或工艺 2 生产益生菌产品的活细胞数

工艺	加速前 (CFU/g)	加速后 (CFU/g)	存活率
产品 X	$3.40 \pm 0.36 \times 10^9$	$3.57 \pm 0.25 \times 10^7$	1.05%
产品 Y	$2.51 \pm 0.06 \times 10^9$	$2.08 \pm 0.14 \times 10^9$	82.76%

使用单细胞拉曼技术对益生菌产品 X 和产品 Y 进行原位活力检测。采集两种工艺生产的益生菌产品的拉曼光谱后，得出产品 X 和产品 Y 的平均 MAL 值分别为 0.0056 ($MAL_{\text{工艺 1}} = 0.0140 - 0.0084$) 和 0.0172 ($MAL_{\text{工艺 2}} = 0.0247 - 0.0075$) (图 2)。根据单细胞拉曼技术原位活力结果表明，产品 Y 的原位活力高于产品 X，与传统方法加速实验结果一致，以上全部实验过程在 5 小时内完成，充分体现了该方法具有不依赖于培养，活力检测迅速等优势。

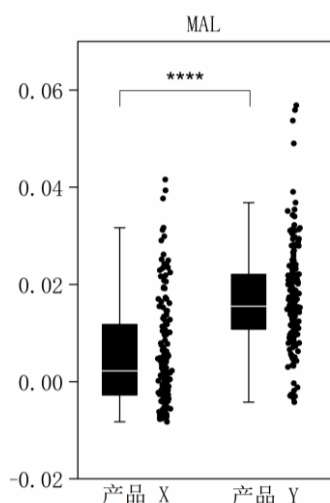


图 2 基于单细胞拉曼技术产品 X 和产品 Y 原位活力检测

6. 方法的适用性实验

以含益生菌的不同类型的产品为例进行实验，其中饮乐多为液体饮料，蒙牛酸奶为半固体饮料，Life space 胶囊益生菌产品为药品，宠儿香为畜牧业产品。活细胞数准确度采用 GB 4789.35-2016 中 6.2.3 乳酸菌计数中要求的平板计数法进行验证，记录平板上的菌落数，乘以稀释因子，获得样品中的活细胞数。实验结果表明饮乐多平板计数法的活菌数结果为 $7.50 \pm 0.15 \times 10^8$ CFU/mL，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞

的数量为 $6.42 \pm 1.40 \times 10^8$ CFU/mL，与平板计数法结果接近 ($p > 0.05$)；蒙牛酸奶平板计数法的活菌数结果为 $4.87 \pm 0.69 \times 10^8$ CFU/mL，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞的数量为 $4.46 \pm 0.48 \times 10^8$ CFU/mL，与平板计数法结果接近 ($p > 0.05$)。Life space 胶囊益生菌产品平板计数法的活菌数结果为 $1.83 \pm 1.24 \times 10^8$ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞的数量为 $2.04 \pm 1.01 \times 10^8$ CFU/g，与平板计数法结果接近 ($p > 0.05$)；宠儿香益生菌产品平板计数法的活菌数结果为 $5.90 \pm 1.53 \times 10^8$ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞的数量为 $5.75 \pm 1.01 \times 10^8$ CFU/g，与平板计数法结果接近 ($p > 0.05$)。结果见表 4。因此该方法适用于液体饮料、半固体饮料、药品和畜牧业益生菌产品的检测。

表 4 传统方法和基于单细胞拉曼技术活细胞计数结果

	传统方法 (CFU/g 或 CFU/mL)	拉曼方法 (CFU/g 或 CFU/mL)	p 值
饮乐多	$7.50 \pm 0.15 \times 10^8$	$6.42 \pm 1.40 \times 10^8$	$p > 0.05$
蒙牛酸奶	$4.87 \pm 0.69 \times 10^8$	$4.46 \pm 0.48 \times 10^8$	$p > 0.05$
Life space 药丸	$1.83 \pm 1.24 \times 10^8$	$2.04 \pm 1.01 \times 10^8$	$p > 0.05$
宠儿香	$5.90 \pm 1.53 \times 10^8$	$5.75 \pm 1.01 \times 10^8$	$p > 0.05$

7. 其他拉曼光谱仪器测试结果

以上所述检测实验结果均由星赛生物出品的自动化显微拉曼光谱仪检测得出，为测试不同仪器检测结果的准确性，用日本 HORIBA 显微拉曼光谱仪（型号 HR800）对君小宝益生菌粉进行了测试。君小宝益生菌粉平板计数法的活菌数结果为 $6.25 \pm 0.35 \times 10^8$ CFU/g，基于单细胞拉曼技术计算出的活细胞的数量为 $6.79 \pm 0.77 \times 10^8$ CFU/g，与平板计数法结果接近 ($p > 0.05$)。因此该方法适用于其他满足性能要求的显微拉曼光谱仪器进行检测。

六、实施标准建议说明

标准起草小组在本标准的制定过程中做了大量的工作，在标准的建立伊始就本着边制定边应用的原则，自 2015 年建立本标准起中科院青能所单细胞中心已经与多家益

生菌企业建立合作关系，提供显微拉曼光谱仪和检测方法进行验证，并得到了客户的广泛认同。通过客户的反馈，进一步印证了方法的可行性。

七、采用国际标准、国家标准、行业标准的程度及水平的简要说明

本标准参考国家标准 GB 4789.34、GB 4789.35 给出的规则起草。

本标准起草参考国际标准联合国粮农组织/世界卫生组织（FAO/WHO）《食品中益生菌的评价指南》（Guidelines for the evaluation of Probiotics in Food: 2002）、加拿大《益生菌在食品中的使用》（The Use of Probiotic Microorganisms in Food: 2009）、世界胃肠病学组织（WGO）《益生菌与益生元》的全球指南（Probiotics and prebiotics: 2023）。

八、与现行法律法规和标准的协调性

本标准推荐性标准，与国家标准 GB 4789.34、GB 4789.35 相协调，不与现行法律、法规和其他相关标准冲突。本标准适应了 GB 4789.34、GB 4789.35 含益生菌产品的活菌总数的要求，但现行的行业标准缺乏对益生菌代谢活力指标的评价方法。因此，本标准可为评价益生菌代谢活力提供强有力的方法支撑。

九、标准涉及的知识产权说明

本标准涉及专利为：一种基于单细胞拉曼技术的一体化益生菌质检方法（申请号：202211426753.X），专利权人为：中国科学院青岛生物能源与过程研究所，专利申请人为：中国科学院青岛生物能源与过程研究所，目前专利状态为：专利受理。专利权人将作出专利实施许可声明，同意在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该国家标准时实施其专利。

十、参考文献

1. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization)., *Probiotics in Food*. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, 2006.
2. Hill, C., et al., *Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(8): p. 506-14.
3. Maladkar, M., A. Yadav, and N. Save, *LGGTM- A promising therapy in gastro-intestinal infections*. *Indian Journal of Microbiology Research*, 2020. **7**(4): p. 302-312.
4. Radulović, Z., Jelena Miočinović, Tanja Petrović, Suzana Dimitrijević-Branković, and Viktor Nedović, *Traditional and Emerging Technologies for Autochthonous Lactic Acid Bacteria Application*. In *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, 2016.
5. Sniffen, J.C., et al., *Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide*. *PLoS One*, 2018. **13**(12): p. e0209205.
6. Floch, M.H., *Recommendations for probiotic use in humans-a 2014 update*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014. **7**(10): p. 999-1007.
7. Ullah, M., et al., *Viability and Composition Validation of Commercial Probiotic Products by Selective Culturing Combined with Next-Generation Sequencing*. *Microorganisms*, 2019. **7**(7).
8. Hathi, Z., et al., *Methodological advances and challenges in probiotic bacteria production: Ongoing strategies and future perspectives*. *Biochemical Engineering Journal*, 2021. **176**.
9. Chen, T., et al., *Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China*. *J Sci Food Agric*, 2014. **94**(1): p. 131-8.
10. Warzee, J.P., et al., *Supranational Assessment of the Quality of Probiotics: Collaborative Initiative between Independent Accredited Testing Laboratories*. *Microorganisms*, 2021. **9**(7).
11. Mondol, A.S., et al., *New perspectives for viability studies with high-content analysis Raman spectroscopy (HCA-RS)*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 12653.