

基于单细胞拉曼的益生菌产品快速鉴定、原位活菌数和活力检测、溯源技术 SCIVVS

张佳^{1,2,3,4}, 任立辉^{1,2,3,5}, 张磊^{1,2,3,6}, 公衍海^{1,2,3,4}, 徐腾^{1,2,3,4}, 王晓航^{1,2,3,4}, 郭成⁷, 翟磊⁸, 于学健⁸, 李映⁹, 朱鹏飞^{1,9}, 陈荣泽^{1,2,3,4}, 荆晓艳^{1,2,3,4}, 荆公超^{1,2,3,4}, 周世奇^{1,2,3}, 徐铭悦^{1,2,3}, 王琛^{1,2,3}, 牛长凯⁷, 葛媛媛⁸, 马波^{1,2,3,4}, 尚改双⁷, 崔云龙⁷, 姚粟⁸, 徐健^{1,2,3,4}

¹青岛生物能源与过程研究所

²山东省能源研究院

³青岛新能源山东省实验室

⁴中国中科院大学

⁵中国海洋大学

⁶中国联合网络通信股份有限公司青岛分公司

⁷东海药业有限公司

⁸中国食品发酵工业研究院

⁹青岛星赛生物科技有限公司



Jia Zhang^{1,2,3,4}, Lihui Ren^{1,2,3,5}, Lei Zhang^{1,2,3,6}, Yanhai Gong^{1,2,3,4}, Teng Xu^{1,2,3,4}, Xiaohang Wang^{1,2,3,4}, Cheng Guo⁷, Lei Zhai⁸, Xuejian Yu⁸, Ying Li⁹, Pengfei Zhu^{1,9}, Rongze Chen^{1,2,3,4}, Xiaoyan Jing^{1,2,3,4}, Gongchao Jing^{1,2,3,4}, Shiqi Zhou^{1,2,3}, Mingyue Xu^{1,2,3}, Chen Wang^{1,2,3}, Changkai Niu⁷, Yuanyuan Ge⁸, Bo Ma^{1,2,3,4}, Gaishuang Shang⁷, Yunlong Cui⁷, Su Yao⁸, Jian Xu^{1,2,3,4}. 2023. Single-cell rapid identification, in situ viability and vitality profiling, and genome-based source-tracking for probiotics products. *iMeta*. <https://doi.org/10.1002/imt2.117>



益生菌产品快速、全面、深度质检技术的意义

1、难以快检产品中各菌活菌数 (viability)

益生菌调查① | 低价益生菌充斥电商，普遍未标货架期活菌数



新京报

2021-08-12 14:46

新京报社官方帐号

关注

疫情对免疫的催化，正在加速国内益生菌市场的扩容，不仅吸引很多新品牌入局，原有益生菌品牌也趁机促销，市场价格战激烈。

为了解益生菌市场现状，新京报记者日前对线下线上渠道探访发现，百元以下价位益生菌产品成为电商平台销售主流，买赠、满减、打折等促销手段十分常见，甚至出现折后价仅六七元的益生菌粉。

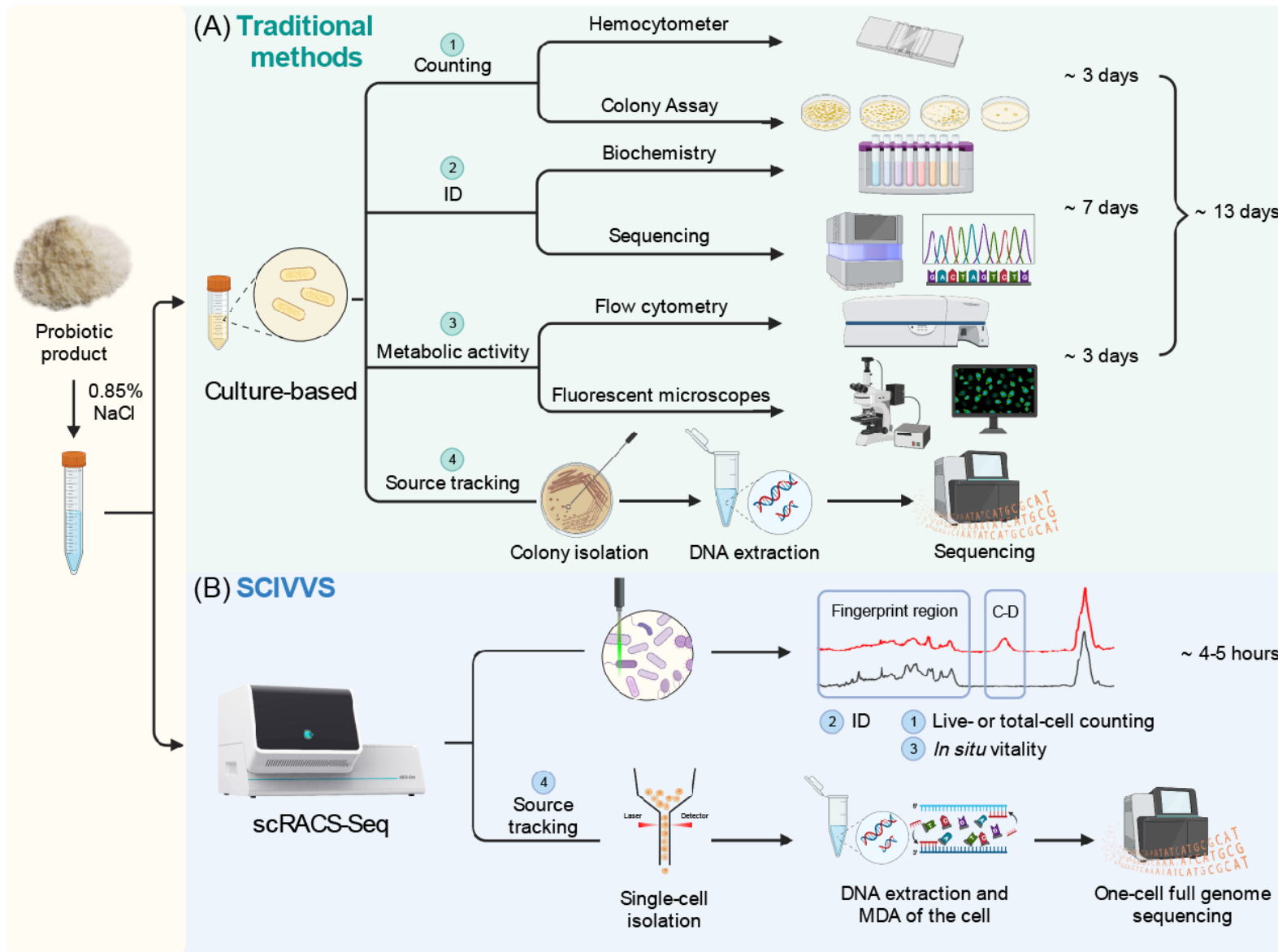
而活菌添加数量与添加的菌株种类数量，是多数商家宣传的两大卖点。值得注意的是，低价益生菌产品不标注货架期内活菌数，是一个比较普遍的现象。新京报记者随机购买并查看了9款益生菌粉产品，发现均未标注货架期内活菌数，部分产品配料表中的菌株号标注也存在缺失问题。

2、通常无法检测活力 (vitality)

2022年5月28日，中国营养保健食品协会发布团体标准T/CNHFA 006-2022《益生菌食品活菌率分级规范》：**1级标准：活菌率至少50%**



目前益生菌产品质检的总体流程，及其局限性



传统方法

单“菌落” (10^9 cells) 精度

局限性：依赖先期纯培养、耗时长、无法测量“原位活力”、难以实现复合益生菌产品的质检、不易一体化（除测序外多台仪器）

SCIVVS

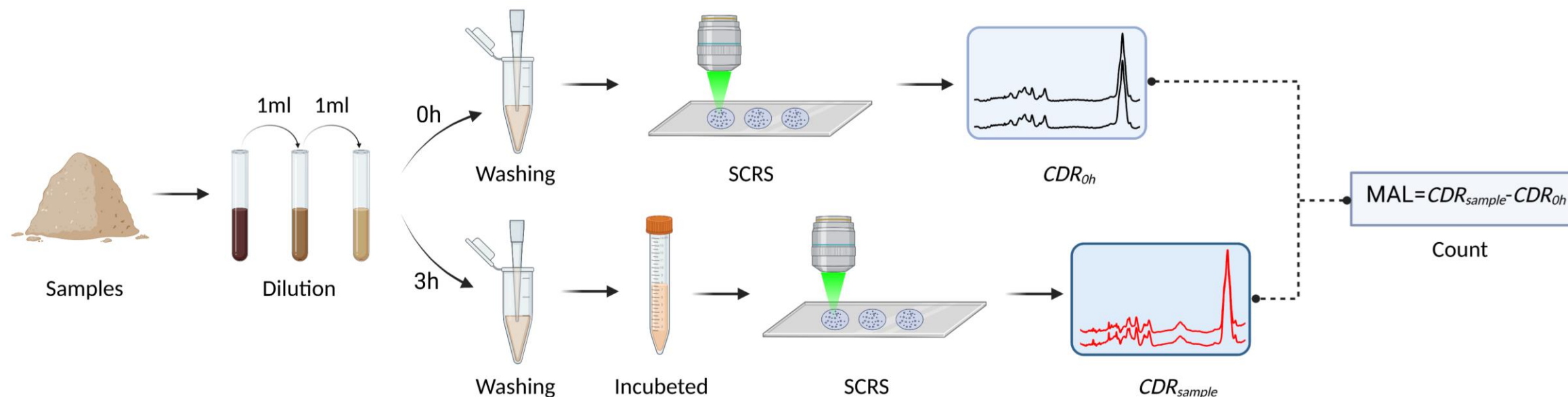
(Single-Cell Identification, Viability & Vitality tests and Source-tracking)

单“细胞”精度

优势：不依赖先期纯培养、耗时短、可实现复合益生菌产品的多指标深度质检、易于一体化（除测序外一台仪器）



益生菌产品单细胞质检技术：活菌计数、活力定量



MAL: 代谢活力水平

$$MAL = CDR_{sample} - CDR_{0h}$$

Tao, et al, Metabolic-activity based assessment of antimicrobial effects by D2O-labeled Single-Cell Raman Microspectroscopy, *Anal Chem*, 2016

MAL ≤ 0: 死细胞

MAL > 0: 活细胞

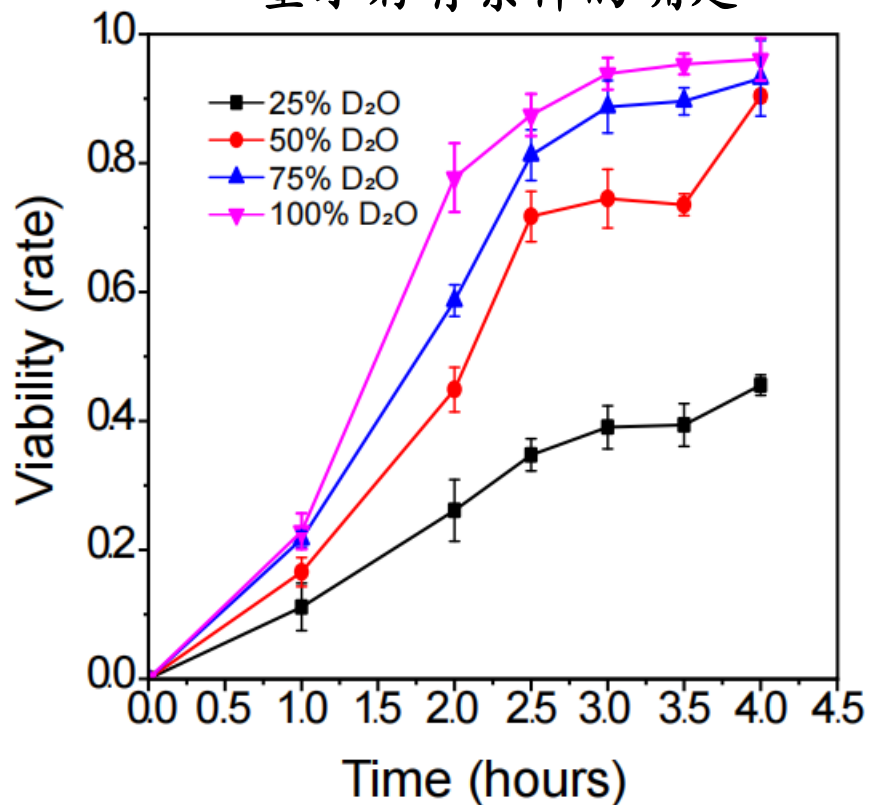
rMAL: 相对代谢活力水平

rMAL = 产品MAL / 纯菌株对数期的MAL



益生菌产品快检：活菌计数-实验条件确定

重水孵育条件的确定



75%或100%重水：3小时
细胞都可达饱和

利用75%或100%重水的平板计数结果

	Plate count (CFU/g)		P value
	0 hours	3 hours	
75% D ₂ O	$1.27 \pm 0.10 \times 10^{10}$	$2.81 \pm 0.09 \times 10^{10}$	H ₁ : $p < 0.05$
100% D ₂ O	$1.26 \pm 0.03 \times 10^{10}$	$1.31 \pm 0.05 \times 10^{10}$	H ₀ : $p > 0.05$

与培养法相比：

- 75%重水孵育，会显著影响活细胞计数
- 100%重水孵育，活细胞计数无显著差异

100%重水孵育3小时确定为样本制备的条件



SCIIVVS检测单一菌株益生菌产品的总细胞数、活细胞数和存活率

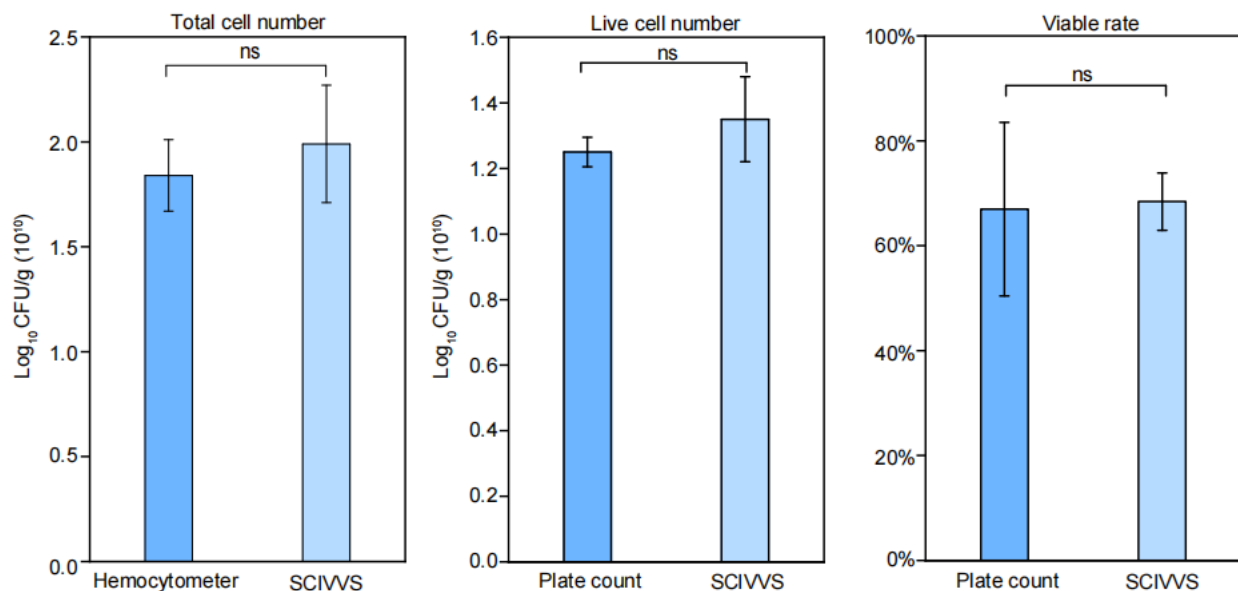
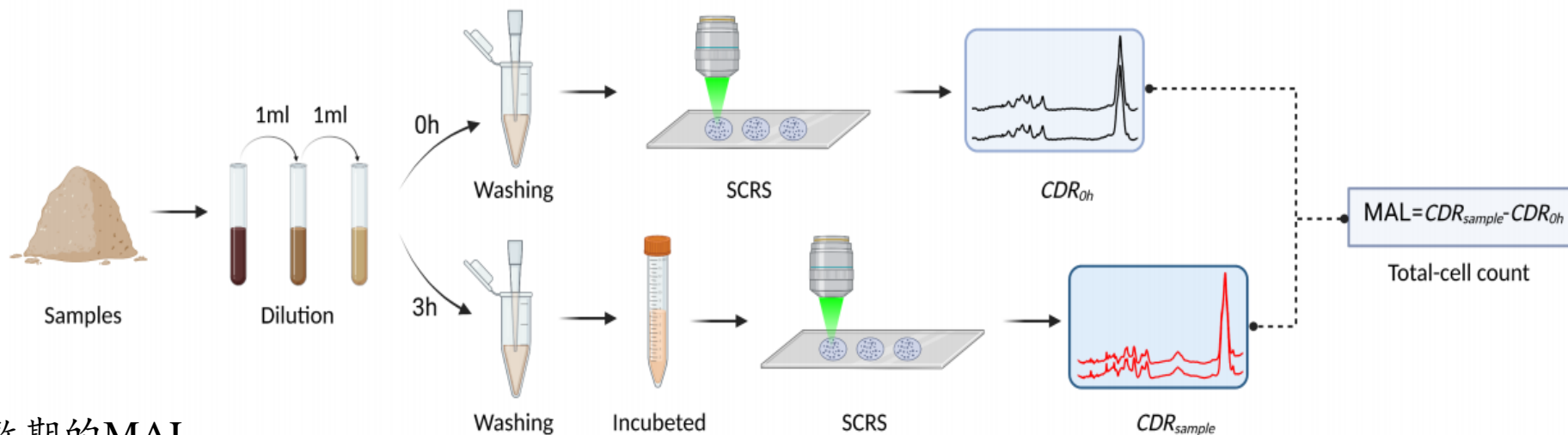
MAL: 代谢活力水平

$MAL \leq 0$: 死细胞

$MAL > 0$: 活细胞

rMAL: 相对代谢活力水平

$rMAL = \text{产品MAL} / \text{纯菌株对数期的MAL}$



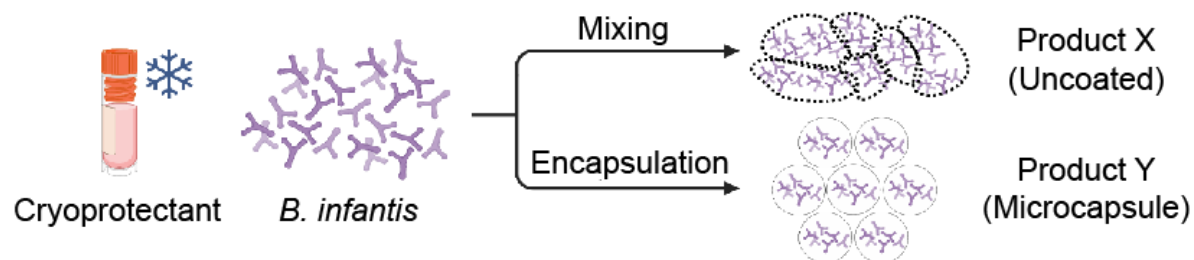
仁和单一益生菌产品 (MPP-A) 的各指标

- 基于SCIIVVS可检测益生菌产品的总菌数、总活菌数、活菌率等指标
- 且与传统方法相比较, 没有显著差异

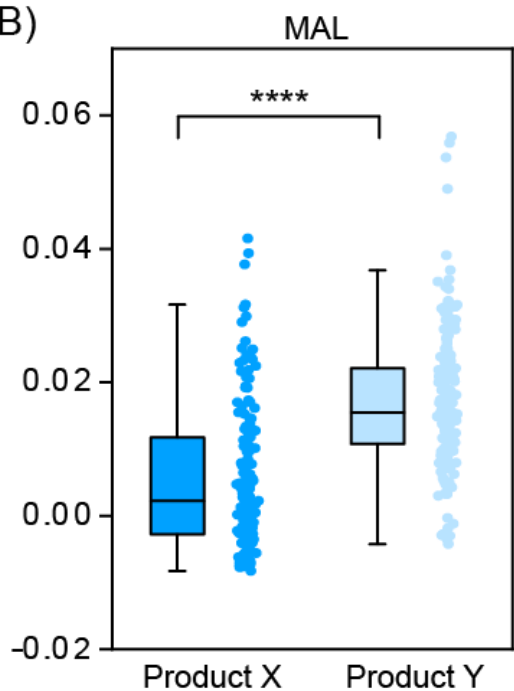


益生菌产品单细胞质检技术：活力定量

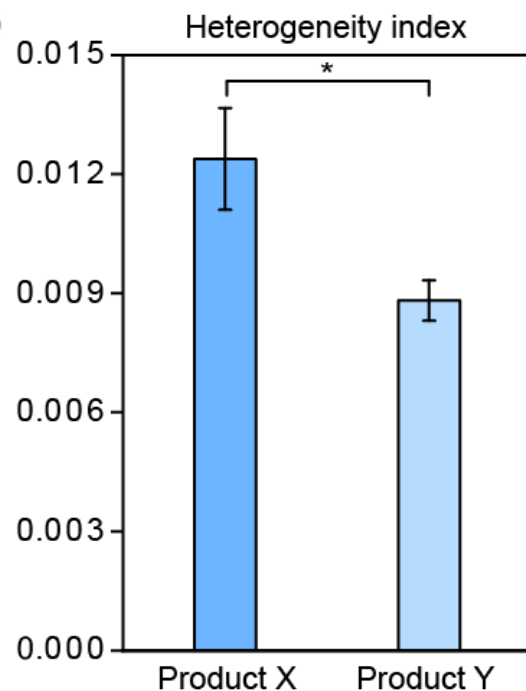
(A)



(B)



(C)

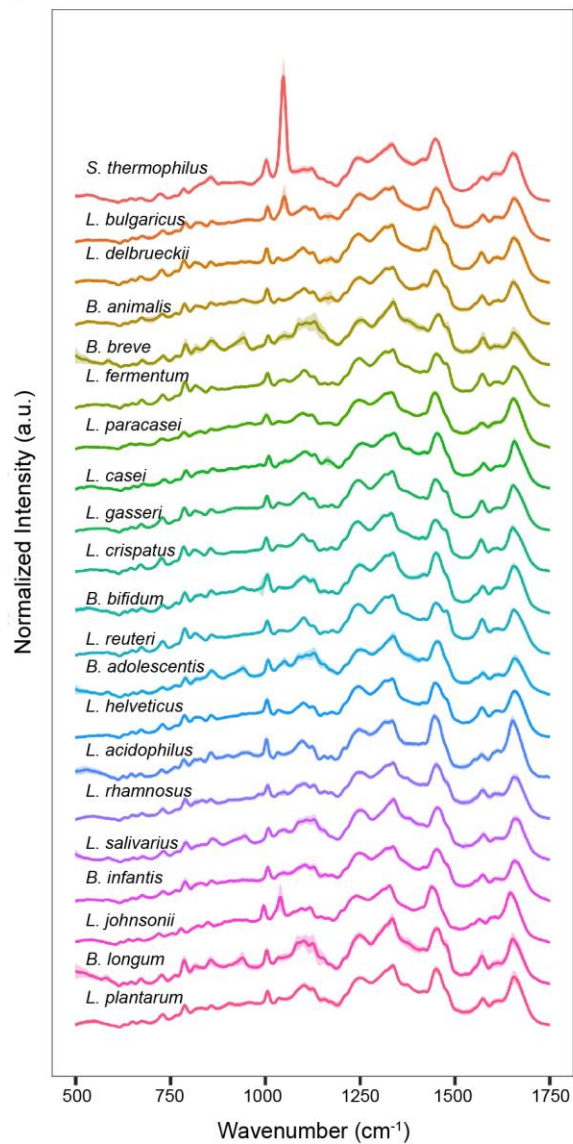


- 两种产品（不同包膜工艺）活菌计数一致，故无法评价工艺效果
- 需长达**10天**的加速实验，方可基于存活率区分两种产品
- SCIVVS在**5小时**内，通过代谢活力和活力异质性，定量区分：
 - 产品Y代谢活力更高，而且分布更均匀
 - 因此，微胶囊包膜有助于保持益生菌代谢活力

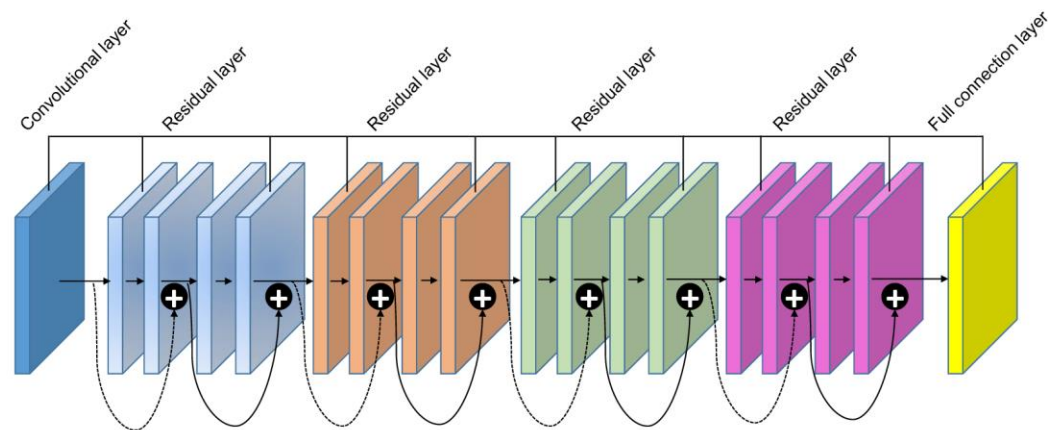


SCIIVVS-菌种鉴定

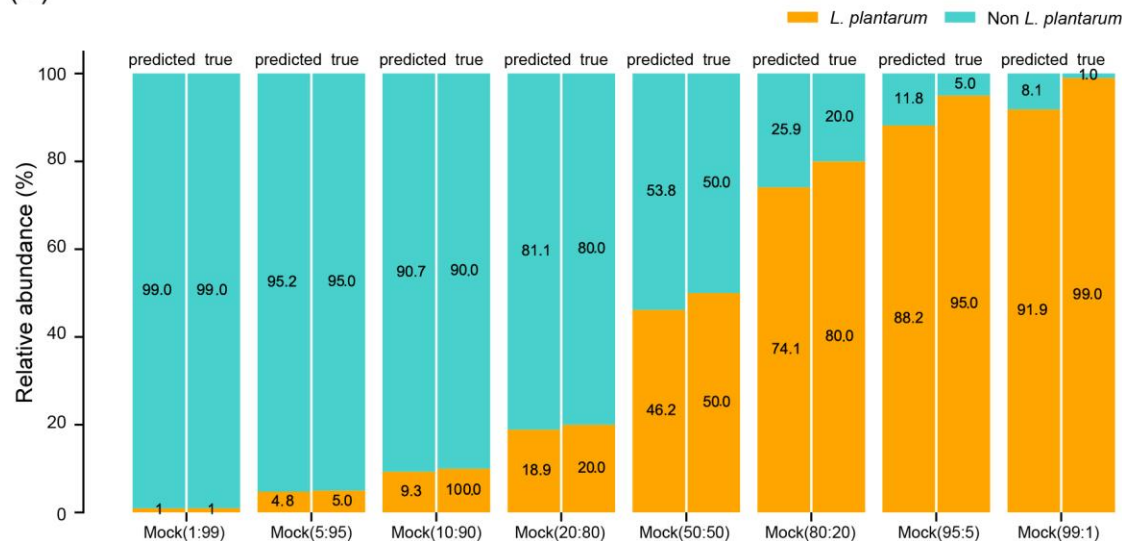
(A)



(B)



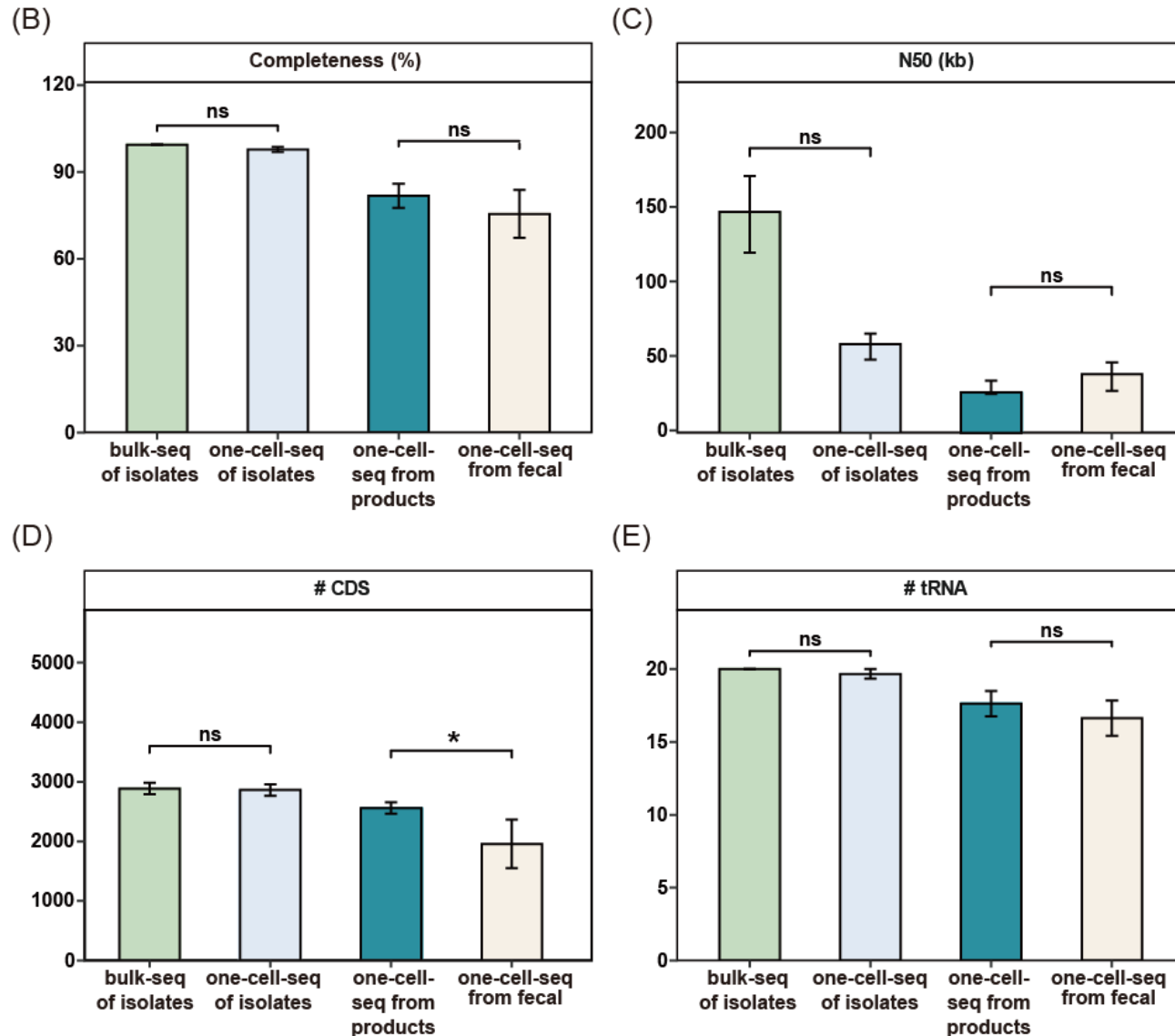
(D)



- 构建了21种法定可食用益生菌的单细胞拉曼光谱参考数据库
- 基于端到端的深度卷积神经网络 (DCNN)，提升了单细胞拉曼鉴定准确率：**93%**（直接从益生菌产品出发）
- Mock实验，模型可将植物乳杆菌299V单细胞与其他益生菌细胞区分开来（与实际结果之间的差异 < 3.5%）



SCIIVVS-单细胞全基因组溯源



益生菌纯菌株或复合产品（鼠李糖乳杆菌，植物乳杆菌，副干酪乳杆菌等）

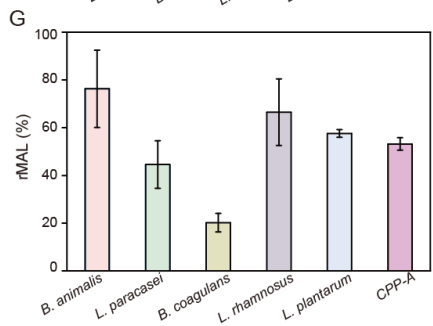
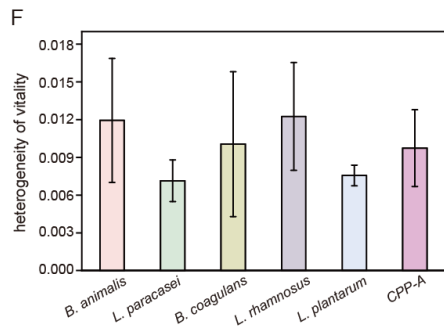
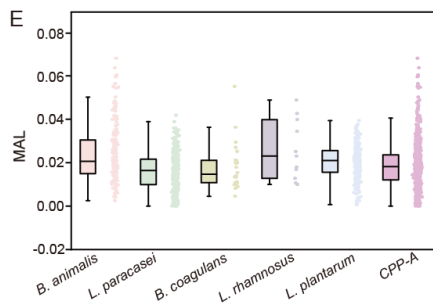
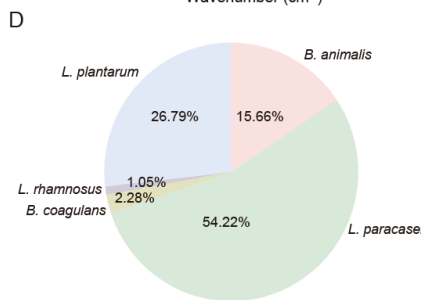
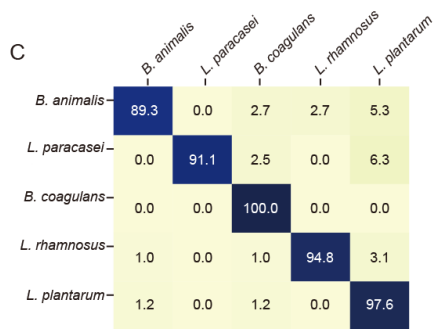
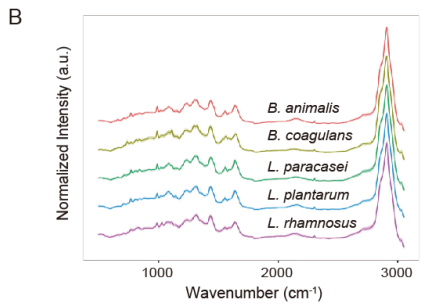
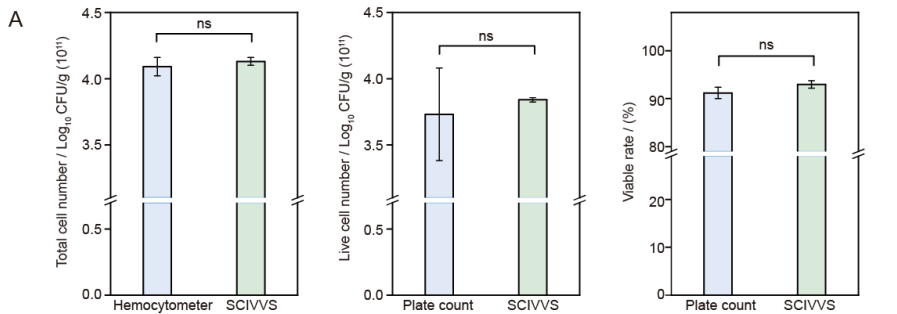
- 单个细胞的基因组完整度可达 $99.40 \pm 0.05\%$
- 所有纯菌株的单细胞测序（覆盖度 $>95\%$ ），质量与bulk相当

- 产品出发单细胞的平均覆盖度为81.79%，与fecal（SAG-gel platform）相比无显著差异

- 因此，SCIIVVS可在一个细胞分辨率下从益生菌产品中直接追踪菌株来源



SCIVVS-复合益生菌产品质检



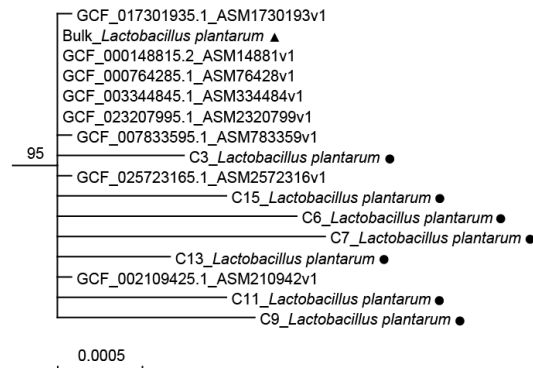
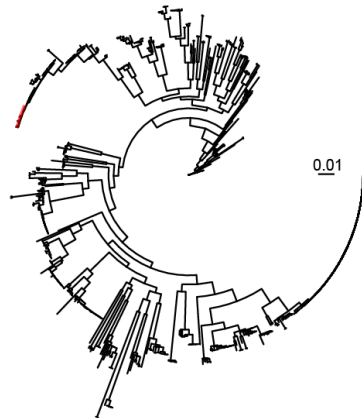
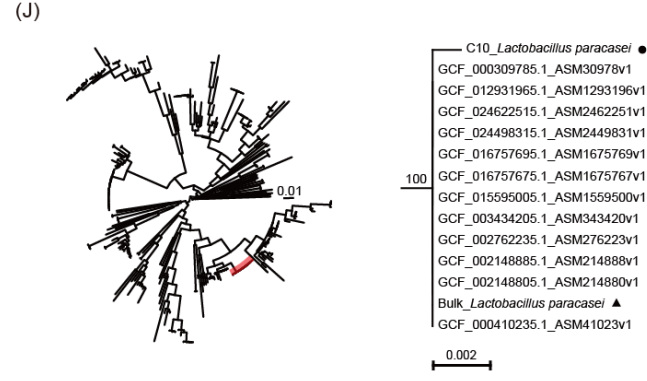
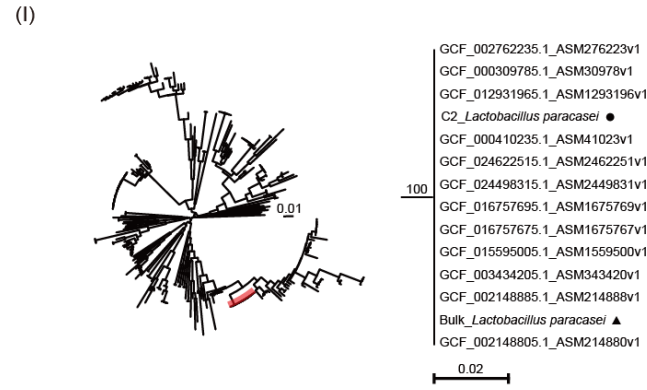
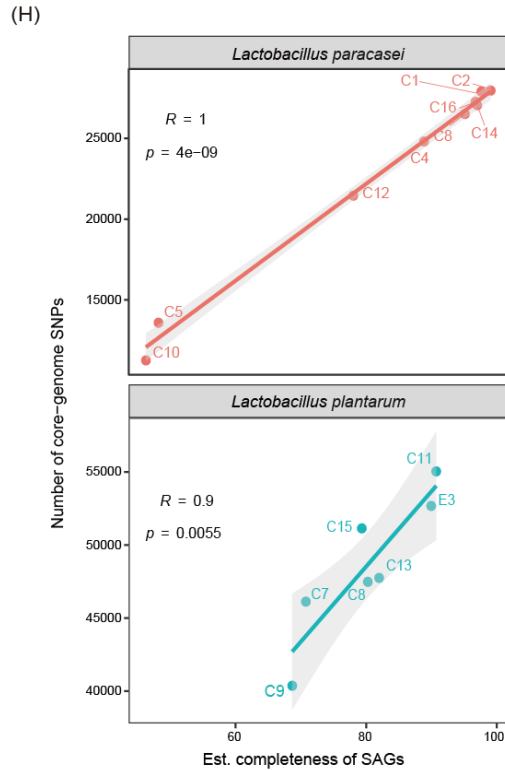
复合益生菌产品中每个菌株的活细胞计数和比例

Strains	Live cells proportion		Live cells number SCIVVS
	Actual proportion	SCIVVS	
<i>B. animalis</i>	17.08%	15.66 ± 0.01%	6.01 ± 0.05 × 10 ¹⁰ CFU/g
<i>L. paracasei</i>	54.10%	54.22 ± 0.03%	2.08 ± 0.10 × 10 ¹¹ CFU/g
<i>B. coagulans</i>	2.02%	2.28 ± 0.01%	8.76 ± 0.03 × 10 ⁹ CFU/g
<i>L. rhamnosus</i>	0.56%	1.05 ± 0.01%	4.03 ± 0.02 × 10 ⁹ CFU/g
<i>L. plantarum</i>	26.24%	26.79 ± 0.01%	1.03 ± 0.04 × 10 ¹¹ CFU/g

- 构建了5种复合益生菌的单细胞拉曼光谱参考数据库
- 基于端到端的深度卷积神经网络（DCNN），直接从益生菌产品出发，鉴定准确率 **94.93 ± 0.01%**
- CPP-A（复合益生菌产品）总菌数、总活菌数、活菌率，且与传统方法没有显著差异
- 5个菌种的比例：符合实际比例
- 获得产品中每种菌株的活细胞数、代谢活性、相对代谢活性、异质性指数等信息



SCIVVS-复合益生菌产品溯源



➤ 测序覆盖度与SNP数成正比

➤ *L. paracasei* : 覆盖度最低的单细胞 (C10; 46.28%)、覆盖度最高的单细胞 (C2; 99.07%) 都可以精准的完成溯源

➤ *L. plantarum*: 68.68%至90.72%的单细胞基因组覆盖率下, 也获得了准确的来源追踪结果

➤ 可见, SCIVVS直接从益生菌产品的单细胞水平实现溯源, 无论菌株的可培养性如何, 都足以支持溯源



“*iMeta*”由威立、肠菌分会和华人科学家出版的开放获取期刊，主编由中科院微生物所刘双江和荷兰格罗宁根大学傅静远教授共同担任。目的是发表原创研究、方法和综述以促进宏基因组学、微生物组和生物信息学发展。目标是发表前10%(IF > 15)的高影响力论文。期刊特色包括视频投稿、可重复分析、图片打磨、青年编委、前3年免出版费、50万用户的社交媒体宣传等。2022年的三月、六月、九月和十二月期已正式在线出版发行，相继被Google Scholar、PubMed(部分)、DOAJ、Scopus等数据库收录！



主页: <http://www.imeta.science>

出版社: <https://wileyonlinelibrary.com/journal/imeta>



投稿: <https://mc.manuscriptcentral.com/imeta>



office@imeta.science



宣传片



iMeta

