



中华人民共和国国家标准

GB/T 38569—2020

工业微生物菌株质量评价 拉曼光谱法

Performance evaluation of industrial microorganism strain—
Raman spectroscopy

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国科学院青岛生物能源与过程研究所、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：马波、籍月彤、何曰辉、李洵融、徐健、马爱进。



工业微生物菌株质量评价 拉曼光谱法

1 范围

本标准规定了用拉曼光谱法评价工业微生物菌株质量的方法。
本标准适用于工业发酵用细菌、真菌、微藻等相对于参考菌株的质量一致性评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

工业微生物菌株质量评价 performance evaluation of industrial microorganism strain

利用拉曼光谱法开展工业微生物菌株质量一致性评价。

3.2

参考菌株 reference strain

 发酵性能明确,用于发酵生产的经过鉴定的保存菌株。

4 原理

细胞内部化合物拉曼光谱的叠加信息可以反映该细胞的综合表型,通过比较待评价菌株与参考菌株单细胞拉曼光谱的相似性,可以判断待评价菌株是否具有与参考菌株可比较的发酵性能。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

5.1 无菌培养基

按照菌种类型配制,或选用相应商品化培养基。

5.2 载玻片

氟化钙载玻片(25 mm×75 mm)。

6 仪器设备

试验中所使用的仪器设备为:

- a) 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 $400\text{ cm}^{-1} \sim 1\ 850\text{ cm}^{-1}$;
- b) 培养箱;
- c) 摇床;
- d) 离心机。

7 测定步骤

7.1 菌株活化

根据生产工艺配制工业微生物相应的固体平板和液体培养基, 用无菌接种环分别蘸取参考菌株和待评价菌株的保种菌液, 在固体平板上划线, 根据生产工艺参数选择相应的温度等条件进行培养, 直至长出单菌落; 分别挑取 3 个参考菌株和 3 个待评价菌株单菌落, 接种至含有 5 mL 液体培养基的试管中, 根据生产工艺参数选择相应的温度和转速, 培养至对数期。

7.2 菌株培养

用微量移液器分别移取活化后的参考菌株和待评价菌株各 200 μL , 分别接种至 3 个含有 20 mL 液体培养基的容器中, 根据生产工艺参数选择相应的温度和转速, 培养至稳定期。

7.3 样品前处理

7.3.1 分别移取培养后的参考菌株和待评价菌株各 1 mL 至无菌管中。

7.3.2 选择相应的转速离心, 弃掉上清, 加入 1 mL 无菌双蒸水, 混匀菌体。

7.3.3 按照 7.3.2 重复 2 次, 移取 10 μL 菌液, 至无菌管中, 加入 990 μL 无菌双蒸水, 混匀, 移取 2 μL 稀释后的菌液, 在洁净的氟化钙载玻片上点样, 无菌环境下室温风干。

7.4 测量

7.4.1 将风干后的氟化钙载玻片置于显微拉曼光谱仪载物台上, 在透射式明场模式下选择单个细胞, 切换至光谱采集模式, 测定拉曼光谱信号。

7.4.2 每个样本随机选取至少 20 个单细胞作为样品信号。

7.4.3 在点样区内, 采集 3 个无细胞处信号, 并计算平均值, 作为背景信号。

7.5 数据处理

7.5.1 对单细胞拉曼光谱原始数据进行背景信号扣除(样品信号减去背景信号)、基线校正(>5 阶函数)和基于面积的归一化处理。

7.5.2 计算信噪比, 其中信号采用 $1\ 001\text{ cm}^{-1}$ 处的尖锐拉曼峰对应的信号强度, 舍弃信噪比小于 3 的数据, 补充数据个数, 使得待评价菌株组和参考菌株组具有相同的数据个数。

8 结果计算和分析

8.1 结果计算

8.1.1 余弦距离按式(1)计算:

$$\cos\theta(a, b) = \frac{\sum_{i=1}^n (a_i \times b_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (a_i)^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (b_i)^2}} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- θ ——单细胞 a 与单细胞 b 的拉曼光谱向量的夹角；
- $\cos\theta(a, b)$ ——单细胞 a 与单细胞 b 的拉曼光谱余弦距离；
- a_i ——单细胞 a 拉曼位移 i 对应的强度；
- b_i ——单细胞 b 拉曼位移 i 对应的强度。

计算余弦距离的平均值和标准偏差,并以细胞数为横坐标,以变异系数为纵坐标作图,若曲线达到平台,说明细胞数已足够,若曲线未达到平台,则增加单细胞拉曼光谱采集个数,直至饱和为止。

8.1.2 相似度按式(2)计算：

$$R = \frac{r_B - r_w}{[n(n-1)]/4} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- R ——待评价菌株和参考菌株的相似度；
- r_B ——待评价菌株每个细胞与参考菌株每个细胞的拉曼光谱余弦距离的平均值；
- r_w ——待评价菌株组内每个细胞之间拉曼光谱余弦距离的平均值；
- n ——待评价菌株组内单细胞个数。

计算结果以平行测定值的算术平均值表示,保留三位有效数字。

8.2 结果分析

R 值越小说明待评价菌株与参考菌株越相似,在重复性条件下获得的 3 次独立实验 R 值均小于 0.05 时,判定待评价菌株与参考菌株发酵性能一致。