**《工业微生物菌株生长表型评价 微液滴浊度法》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国家市场监督管理总局(质检)》，项目编号“20181033-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由中国科学院青岛生物能源与过程研究所等单位共同组成。

二、目的和意义

本标准拟建立一种快速无损的活体工业微生物菌株质量评价标准方法，在不破环细胞的条件下，快速测量工业微生物细胞的生长表型，从而满足工业发酵领域对于菌株质量评价的需求。

随着发酵工程和合成生物学等技术的发展，发酵工业的生产规模和产品品种不断增加，成为现代医药、生物、食品、环境、化工、农业等领域的重要生产方式。优质的工业菌株是工业发酵生产的灵魂和命脉，尽管现代生物技术在基因工程和代谢工程领域内的长足进展，通过诱发变异、基因重组和培养能够得到高产菌株，然而发酵是一个复杂的生化过程，除了工业微生物的生产性能，还与发酵条件和菌株状态等诸多因素密切相关，具有高度的非线性、时变性和复杂性，通过优化控制使发酵过程产品生产最优（即生产能力最大、成本消耗最低、产品质量最高），仍然是发酵工业领域的瓶颈问题之一，因此对发酵过程中的微生物进行质量评价日益受到重视。

发酵过程的监控通常包括对发酵条件和菌株质量等两大方面的考察。发酵条件包括温度、pH值、压力、搅拌速度、溶解氧浓度、营养成分等物化参数，发酵罐一般都集成了这些指标的在线式监控探头；菌株质量方面，通常包括对生物质浓度、代谢产物浓度、底物浓度以及比生长速率、底物消耗速率和产物形成速率等方面的检测，目前存在三大主要问题：1）时间精度，无论在国内还是国外，在工业生产中对菌株质量的实时在线测量仪器仍处于空白，只能通过离线的方式对各种表型分别进行测定，正是由于样品处理和测量时间带来的滞后性，使得微生物发酵过程的控制比一般的工业生产难度更大；2）表型精度，由于缺乏综合表型表征手段，使得人们只能通过有限的表型检测去尽量刻画细胞状态，但这样仅能反映细胞的部分状态，而大量没有被检测的表型可能对发酵过程的影响更加深远；3）测量精度，目前对现有表型的测量均基于群体水平大量细胞的平均性状，近年来随着单细胞分析技术的发展，科学家们发现群体水平并不能反映细胞在特定环境下的真实状态，在一个细胞群体中，即使是基因组信息完全相同的不同单细胞之间，其表型也具有极其显著的差异。在高压、高浓、高密度、且营养物质不均一的发酵过程中，细胞之间的差异被累积并级联放大，这种异质性现象比自然状态下更加明显，且在罐体的不同空间表现不同，从而最终导致了发酵结果的迥异，而群体水平的平均性状掩盖了这种差异的发生/发展和变化规律，无法反映细胞的真实状态。以前的菌株生长表型测量大多依赖于宏观培养及连续浊度监测并绘制生长曲线，评价周期长，不仅不利于工业菌株的快速筛选，而且延迟了生产的投料过程。目前国内外均没有较好的方法来快速评价工业菌株的生长表型。微液滴为单细胞高通量并行培养提供了独立的培养器，高通量测定液滴中的单细胞培养后的生长表型。

三、标准制定原则

**（一）标准编制原则**

本标准以现有国内外相关标准规范为基础，与现行国家标准和行业标准相衔接，主要对采用微液滴浊度法工业微生物菌株质量的标准方法和流程进行规范，选择既利于表型测量，又能满足分析要求的条件指标，使不同企业工业微生物菌株质量评价具有统一性。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

2、标准编写内容参考我国与农产品相关的法规、标准，包括《中华人民共和国农产品质量安全法》等等。

四、标准主要技术内容

本标准规定了采用微液滴浊度法评价工业微生物菌株质量生长表型的标准方法和流程。



图1、工业菌株生长表型评价流程

（一）微生物菌株菌液制备

取活化过的表型明确的菌株及待评价菌株，以相同的浓度接种至标准培养基中；在相同的培养条件下培养至相同的生长阶段，表型明确的菌株作为对照组。并且用琼脂糖溶液稀释至6\*10^5 CFU/mL。

（二）单细胞液滴的产生

分别将稀释到6\*10^5 CFU/mL细胞的超低熔点琼脂糖溶液作为分散相，将氟碳油作为连续相。通过两台注射泵驱动，将分散相和连续相按照1:2比例分别注入微流控芯片的微通道网络中，在整个液滴发生过程中，控制温度在30 ℃到37 ℃。

（三）主要参数的选择

微生物菌液浓度的选泽：液滴包裹细胞数量X服从泊松分布，变量X的概率分布为：



其中k=0,1,2...计算所得液滴中的细胞数量期望λ=0.3时，单细胞液滴数量相对占比最高，理论上具体情况为：空液滴的数量占74.08%，单细胞液滴的数量占22.22%，包含两个细胞的液滴数量占3.3%，包含三个或三个以上细胞的液滴占0.38%。实验中产生液滴直径100 μm，经计算λ=0.3时，所需细胞液浓度为6\*10^5 CFU/mL。通过分光光度计测量OD600值，OD600达到1.8时菌液浓度约为2\*10^9 CFU/mL，稀释3000倍可达到6\*10^5 CFU/mL左右。

琼脂糖浓度的选泽：所使用的Type IX 超低熔点的琼脂糖的凝胶点为8到17 ℃(根据Sigma琼脂糖说明书)。2%的琼脂糖溶液既能保证微球的发生也不影响细菌在微球中的生长。2%低熔点琼脂糖溶液在实验室环境下渐渐凝固，使得琼脂糖微球在形成过程中水相的粘度逐渐增大，最终形成大小不均一凝胶液滴。当温度控制在30 ℃到37 ℃时，琼脂糖微球在形成过程中水相粘度较为一致，使得凝胶微球的均一度较好，且细菌的生长不受影响。在凝胶微球发生完成后，将其放于4℃冰箱冷凝20分钟，保证微球的稳定性。

芯片结构：用AutoCAD设计微流控芯片通道图形，为了保证液滴的合适尺寸（直径100 μm左右），需要对芯片通道各个参数进行规定，其中分散相的宽度为40 μm，连续相的宽度为60 μm。此设计采用夹流聚焦结构，连续相和分散相在夹流处相遇，通过对称剪切力产生液滴。运用此芯片结构进行液滴单细胞包裹和在线培养。

连续相与分散相的流速比：将分散相和连续相按照一定的流速比（根据所需液滴尺寸设定）分别注入微流控芯片的微通道网络中。液滴产生通过水相与油相两相在芯片夹流聚焦结构处通过剪切力形成单分散液滴微球，分散相和连续相在1:2左右时，液滴直径为100 μm，因此采用此条件进行液滴产生。

Image J 成像计数：Image J具有强大的数据处理能力将采集的图像运用软件进行菌斑计数，每个培养室中菌斑数可由Image J 进行计数。由公式样品浓度(CFU/mL)= 芯片中总的菌斑数/进样量。本实验中样品的进样量为50 μL，芯片中总的菌斑数为各个培养室中菌斑数之和。由Image J可计数每个培养室中的菌斑数。统计分析：获取的数据经过对数转换后使用SPSS 18.0进行统计学分析。通过d值大小反应工业菌株与标准菌株的生长表型差异，d值越大，差异越大。

（四）单细胞液滴的培养与生长表型评价

液滴发生结束后，将两芯片放入4 ℃冰箱冷凝20 min。置入盛有水的培养皿中入37 ℃恒温箱进行培养6 h。培养后的琼脂糖微球使用倒置显微镜进行成像，获取的图片保存为bmp格式。Image J 软件进行计数。根据两块芯片内微球中的面积进行生长表型的评价。获取的数据经过对数转换后使用SPSS 18.0进行统计学分析。

（五）工业菌株微生物的宏观培养验证

将目标液滴通过PEEK软管收集到EP管中，加入Pico-Break破乳试剂对液滴进行破乳。析出底层菌液加入LB培养基中放入摇床培养12 h,稀释到适宜浓度后进行涂布培养。

（六）统计分析

以工业标准菌株浊度的液滴信号为标准，与待鉴定菌株浊度做对比，由面积类算法：



求出与标准信号的差值d，其中x表示图像中微球细菌的面积，R表示微球直径，n表示微球的个数。│d│越小代表与标准信号代表的凝胶微球浊度越接近。D值为负，表明生长速率低于标准菌株，d值为正，表明生长速率高于标准菌株。由此可以得出筛选菌株与参考菌株的生长速率差异。

**五、主要工作过程**

1、组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2018年6月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组，会议研究讨论了工作小组的工作目标、任务分解、可量化的考核指标，以及通过召开调研会、行业需求征集会、专家论证会和行业用户推广会等，旨在制定服务于发酵行业发展，且可以有效推行的国家标准。

2、开展相关调研情况

为了更好地制定标准，进行了方法调研、可行性调研，以及用户需求调研等活动，从行业需求层面、科学理论层面、方法学角度，以及实际可操作性等方面，对该标准进行了多角度论证。

3、标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《工业微生物菌株生长表型评价-微液滴浊度法》标准开展了研制工作，2018年起草工作小组完成了《工业微生物菌株生长表型评价-微液滴浊度法》国家标准（草案）。并针对草案中的具体条件进行优化和扩展，并在工厂中进行应用示范。在此基础上，2018年12月征求了专家意见，起草组按照专家意见对标准内容进行了修改完善，形成了标准征求意见稿。

**六、方法验证及结果**

方法验证单位：中国科学院天津工业生物技术研究所

验证结果：采集待评价某工业大肠杆菌菌株和对照组标准大肠杆菌工程菌株的生长表型，通过统计分析d值，对样品组与对照组表型生长表型评价，结果表明工业菌株生长速率高于标准大肠杆菌（d值较大）。由此可以得出筛选菌株与参考菌株的生长速率差异。



图2、工业微生物菌株生长表型分析

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求，本标准有助于《发酵产品质量控制》等相关法律、法规、规章和强制性国家标准的实施。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

选择发酵行业龙头企业进行推行，以技术创新型企业带动全行业发展，从而进行国标的贯彻与推广。