

纳米流式检测技术用于益生菌产品的细菌活性及 上消化道耐受性分析

薛乘风 王文婷 毛翠萍 吴丽娜 颜晓梅*

(厦门大学化学化工学院化学生物学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室,
化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

摘 要 活菌含量和上消化道耐受性是益生菌产品的两个重要指标,共同影响最终定植于人体肠道的活菌数,准确评估这两个指标对于消费者选择产品和生产者提升产品质量具有重要的指导意义。基于本研究组研发的纳米流式检测技术(Nano-flow cytometry, nFCM)在单颗粒水平对细菌进行高灵敏度、高通量分析的独特优势,本研究利用 SYTO 9 和碘化丙啶(Propidium iodide, PI)两种核酸染料共染的方法标记总菌和识别死菌,对益生菌产品的活菌含量及其经模拟胃液(Simulated gastric juice, SGJ)、肠液(Simulated intestinal juice, SIJ)或上消化道消化处理后的益生菌活性进行测定,从而实现益生菌产品的细菌活性及其上消化道耐受性的定量评估。本研究对 18 款益生菌产品(包括 16 款粉末冲剂和 2 款胶囊产品)的活菌含量及上消化道耐受性进行考察,结果表明,18 款产品的活菌含量均大于 10^{10} cells/package,平均活菌比例为 61.7%,均符合国际标准(10^7 cfu/g),但是其中有一款产品未达到其活菌含量的标注值。其次,使用 pH = 3 的 SGJ 和胆盐浓度为 0.3% (m/V) 的 SIJ 考察益生菌产品的胃液、肠液及上消化道耐受性,根据模拟消化处理后益生菌的存活率可将产品分为耐胃液型(12 款)和耐肠液型(6 款)两类,上消化道模拟消化处理后大部分产品的活菌数大于 10^8 cells/package,平均存活率为 15.6%。最后,考察了胃溶型和肠溶型胶囊对益生菌的保护作用,结果表明,肠溶型胶囊可提升益生菌的胃液耐受性,但是,所包覆的益生菌需要同时具有较强的肠液耐受性才能提升其在上消化道的存活率。

关键词 益生菌; 益生菌产品; 纳米流式检测技术; 细菌活性; 上消化道耐受性

益生菌是一类有益宿主健康的活性微生物^[1-2],随着对益生菌健康功能的研究和认识的深入,益生菌消费市场快速增长^[3],消费者对益生菌产品也有了更多的选择。摄入足够数量的活菌是益生菌产品发挥益生功效的前提^[2],通常建议每天的最低活性益生菌摄入量应达到 1×10^9 cfu^[4]。因此,活菌含量是益生菌产品的一个重要指标。微生物制剂通常需要冷链运输和储存,以保持活性。为了便于消费者保存和降低制造商的运输及储存成本,对益生菌进行冻干或喷雾干燥处理是一种有效策略,干燥处理后的益生菌可常温保存且寿命更长^[5]。但是,干燥处理也会造成益生菌的损伤和死亡^[6-7],并且脱水后的益生菌在运输和储存的过程中受环境温度、湿度和氧气等因素的影响也会在一定程度上导致死亡^[8]。因此,消费者所服用产品的实际活菌含量通常低于其出厂值。尽管相关规定要求产品在保质期内的实际活菌含量应始终大于或等于其标注的活菌含量^[1-2],但是研究表明,部分益生菌产品在保质期内的活菌含量并不能达到其标注值^[9-10]。

益生菌发挥功效的地点在肠道,通常认为,获得临床效果所需要的益生菌活菌浓度在小肠中应达到 10^6 cfu/mL,在结肠中应达到 10^8 cfu/g^[4]。但是,益生菌到达肠道前会经过胃液和肠液等消化处理,其中胃酸、胆盐及多种酶类等是人体抵御病原菌的重要屏障,对益生菌同样具有灭活作用^[11]。受配方(益生菌^[12]和益生元^[13]的选择)、干燥处理(冷冻或喷雾干燥、保护剂的选择^[14-15])和胶囊包覆^[16]或微胶囊包覆^[17]等因素的影响,不同产品的益生菌抵御胃肠道压力的能力相差很大,最终到达肠道的活菌数由初始摄入的活菌数及其上消化道耐受性共同决定。因此,上消化道耐受性是益生菌产品的另一个重要指标。

2022-09-22 收稿; 2022-10-23 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 21934004, 21627811)和国家基础科学人才培养基金项目(No. J1310024)资助。

* E-mail: xmyan@xmu.edu.cn

但是,目前监管部门并不要求生产商提供该信息,尽管部分益生菌产品会开展耐受性测试,但通常是在菌种筛选的研发阶段,测试对象并非最终产品,对消费者的产品选择缺少直接的指导意义。

因此,评估益生菌产品的活菌含量及其上消化道耐受性对消费者选择产品和生产商提升产品质量均具有重要意义。平板计数法是评估益生菌活性的“金标准”,也是目前大多数相关研究所采用的方法^[9, 11]。但是,平板计数费时费力,并且重复性差,此外,平板计数法对“活的非可培养”(Viable but no-culturable, VBNC)状态益生菌的漏检可能造成对产品中活菌含量的低估。

为了克服传统方法的不足,近些年发展了很多不依赖细菌增殖的微生物表征技术,可实现快速、准确地测定活菌浓度^[18]。其中,流式细胞术(Flow cytometry, FCM)通过在单细胞水平对细菌的膜完整性或生物酶活性等参数进行检测,实现对细菌活性的评估^[19],已被证实可用于益生菌产品总菌及活菌的计数^[20],也为研究人员和生产商对益生菌干燥和储存条件的优化提供了有力工具^[15, 21-22]。FCM也被用于益生菌上消化道耐受性的研究,但目前研究对象多为新鲜培养的益生菌^[23-25],或是某一种或少数几种益生菌产品^[26-27]。此外,部分研究只单独考察了益生菌的胃酸耐受性^[28],没有考察胆盐或完整上消化道(胃液及肠液先后消化)耐受性^[29]。因此,缺少对较多数量的益生菌产品进行胃液、肠液及上消化道耐受性的系统研究。

结合瑞利散射和鞘流单分子荧光检测技术,本研究组研发了纳米流式检测技术(Nano-flow cytometry, nFCM)^[30-32],其散射及荧光检测灵敏度较传统流式细胞仪大幅提升。结合 SYTO 9 和碘化丙啶(Propidium iodide, PI)核酸染色,发展了酸奶和益生菌饮料中益生菌浓度和存活率的快速检测方法^[33]。基于实验室搭建的 nFCM 装置和核酸标记策略,本研究对 18 款商品化益生菌产品(包括 16 款粉末冲剂和 2 款胶囊产品)的总菌和活菌含量进行检测,并系统地考察了每款产品的模拟胃液(Simulated gastric juice, SGJ, pH = 3)、模拟肠液(Simulated intestinal juice, SIJ, 胆盐浓度 0.3% (m/V))和模拟上消化道耐受性,最后对胃溶型和肠溶型胶囊分别对益生菌胃/肠液耐受性的提升作用进行了研究。本研究结果可为消费者选用益生菌产品以及生产商提升产品质量提供指导和借鉴。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

nFCM 系统^[30-33]为本研究组自行研发,滤波片选择二向色分光镜 DMLP505R(美国 Thorlabs 公司)、FF593-Di02、FF01-520/35 带通滤波片和 FF01-675/67 带通滤波片(美国 Semrock 公司)。如果不特别说明,每个样品均采集 1 min 的数据。

核酸染料 SYTO 9(美国 Molecular Probes 公司)和 PI(美国 Sigma-Aldrich 公司);胃蛋白酶(3000 U/mg, 郑州艾克姆化工有限公司);胰蛋白酶(250 U/mg, 北京索莱宝科技有限公司);牛胆盐(上海麦克林生化科技有限公司)。淀粉胶囊空壳(胃溶型,湖南尔康制药股份有限公司)、明胶胶囊空壳(胃溶型,美国 NOW 公司)和肠溶胶囊空壳(青岛益青生物科技股份有限公司),规格均为 0 号。

益生菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)、*Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*)和 *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)冻干粉购自山东威凯海思生物工程有限公司。18 款益生菌产品(包括 16 款冲剂和 2 款胶囊产品)均购自在线购物平台,各产品成分见电子版文后支持信息表 S1,所有产品在检测前均于 4 °C 储存,并且检测日期距离产品保质期至少 6 个月。为避免不必要的纠纷,16 款冲剂产品用字母 A~P 表示,两款胶囊产品用 CpA 和 CpB 表示。

1.2 实验方法

1.2.1 益生菌样品的准备

培养 LGG(见电子版文后支持信息),获得新鲜培养的活菌悬液(Freshly-grown liquid, FGL),将 FGL 在 80 °C 加热处理 10 min,获得死菌悬液(FGL-HT)。用 5 mL PBS 重悬 0.5 g 益生菌冻干粉,获得冻干益生菌(Freeze-dried powder, FDP)悬液。采用平板计数定量测定益生菌活菌浓度。

1.2.2 益生菌产品预处理

对于益生菌冲剂产品,从每包(Package, pkg)中取 0.5 g 粉末重悬于 5 mL PBS 中,涡旋 10 s 使粉末充

分溶解,用于后续平板计数和流式检测实验。对于益生菌胶囊产品,将 1 颗胶囊添加至 5 mL PBS 中,在恒温摇床中 37 °C、250 r/min 条件下孵育 10 min,至胶囊破裂,内部益生菌完全释放;然后取 1 mL 混合液,12000 r/min 离心 5 min,用 1 mL PBS 重悬后,用于后续分析测试。

1.2.3 益生菌的SGJ、SIJ及模拟上消化道消化处理

采用文献[34]的方法考察益生菌经过 SGJ、SIJ 及上消化道消化处理后的存活率。

SGJ 消化处理 将胃蛋白酶溶解于 0.2% (m/V) NaCl 溶液中,使其终浓度为 1 mg/mL,用 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 1、2、3、4、5,过 0.45 μ m 滤膜后待用,SGJ 需现用现配。取 0.5 g 冲剂产品的粉末或 1 颗胶囊加入至 5 mL SGJ 中,涡旋 10 s 使充分混匀,在恒温培养箱中 37 °C、100 r/min 孵育 3 h。模拟消化结束后,取 1 mL 悬浮液,12000 r/min 离心 5 min,用 PBS 洗涤 2 次,以停止消化反应。对于肠溶型胶囊,由于在酸性的 SGJ 溶液中无法溶解,因此需要先将 SGJ 替换为 5 mL PBS,孵育 10 min 使胶囊破裂,内部益生菌充分释放后,再离心洗涤处理。

SIJ 消化处理 将胰蛋白酶和牛胆盐溶解于磷酸盐缓冲溶液(PB, 0.05 mol/L NaH_2PO_4)中,使其终浓度分别为 1 mg/mL 和 0.15 或 0.3% (m/V)。用 1 mol/L NaOH 溶液调节至 pH = 7.4,过 0.45 μ m 滤膜,待用,SIJ 需现用现配。取 0.5 g 冲剂产品的粉末或 1 颗胶囊加入至 5 mL SIJ 中,涡旋 10 s 使充分混匀,在恒温培养箱中 37 °C、100 r/min 孵育 4 h。模拟消化结束后,离心洗涤停止消化反应,操作同上。

模拟上消化道消化处理 SGJ 消化处理结束后,加入 4.5 mL 预热至 37 °C 的 SIJ,用 1 mol/L NaOH 溶液调节至 pH = 7.4,添加适量 PB 缓冲溶液至总体积为 10 mL,在恒温培养箱中 37 °C、100 r/min 孵育 4 h。模拟消化结束后,离心洗涤停止消化反应,操作同上。

1.2.4 益生菌荧光标记和nFCM评估益生菌存活状态

将上述预处理或消化处理后的菌液稀释 10 倍,使益生菌浓度为 10^8 cell/mL 数量级。取 100 μ L 益生菌悬液,用 1 μ mol/L SYTO 9 和 14 μ g/mL PI 染料对其进行核酸染色,室温下避光孵育 10 min 后,进行 nFCM 检测。使用已知浓度的 200 nm 聚苯乙烯微球(Polystyrene beads, PS 微球,美国 Invitrogen 公司)作为外标对益生菌浓度进行定量分析。对于模拟消化处理的益生菌产品,采用 nFCM 检测 1 min 得到的活菌个数除以未消化处理的活菌个数,计算得到模拟消化处理的益生菌存活率(Survival rate, SR(%)), SR_{SGJ} 、 SR_{SIJ} 和 $\text{SR}_{\text{SGJ-SIJ}}$ 分别代表 SGJ、SIJ 和上消化道模拟消化后的益生菌存活率。

2 结果与讨论

2.1 益生菌的死/活菌检测原理

细胞膜完整性是评估细胞死/活的重要指标。本研究基于 SYTO 9 和 PI 两种核酸染料的跨膜特性进行益生菌死/活的区分。SYTO 9 是一种跨膜型核酸染料,进入益生菌后,可与核酸结合并发出绿色荧光,可用于标记总菌。PI 是一种非跨膜型核酸染料,只能通过受损的细胞膜进入细胞,与核酸结合发出红色荧光,可用于标记死菌。如图 1 所示,对预处理后的益生菌进行染色,使用 nFCM 对颗粒经过激光探测区时所发出散射(SSC)、绿色(FL1)及红色荧光(FL2)信号进行同时检测,其中,只有 SSC 信号的颗粒被认定为样品中的杂质颗粒;只有 SSC 和 FL1 信号的颗粒被认定为活菌;同时有 SSC、FL1 和 FL2 信号的颗粒被认定为死菌。通过 SSC-FL1 双参数散点图,可圈门得到益生菌群体;再通过 FL1-FL2 双参数散点图,可圈门得到活菌和死菌亚群。分别对益生菌群体及各亚群进行计数,并将已知浓度的 PS 微球作为外标,可换算得到总菌、活菌和死菌的浓度。

2.2 nFCM检测冻干益生菌的存活状态

使用 SYTO 9 和 PI 分别对 LGG 的 FGL、FGL-HT 和 FDP 悬浮液进行染色, nFCM 检测到的 3 个通道的代表性脉冲时序图和双荧光散点图如图 2A~2C(i~iii)所示。对于只有活菌的 FGL,益生菌仅能被 SYTO 9 染色,发出绿色荧光信号;而热处理后细菌膜受损,PI 也可进入益生菌内部将核酸染色,同时发出绿色和红色荧光。根据图 2A-iv 和图 2B-iv,可在双荧光散点图中画一条斜线,以区分活菌和死菌。对于 FDP 悬液,部分益生菌已经失活,并且死菌和活菌的荧光亮度均较新鲜制备的细菌偏弱(图 2C-iv),这可能是由于冻干过程 DNA 双螺旋结构被破坏^[35],影响了核酸染料的结合效率。对另外两种益生菌

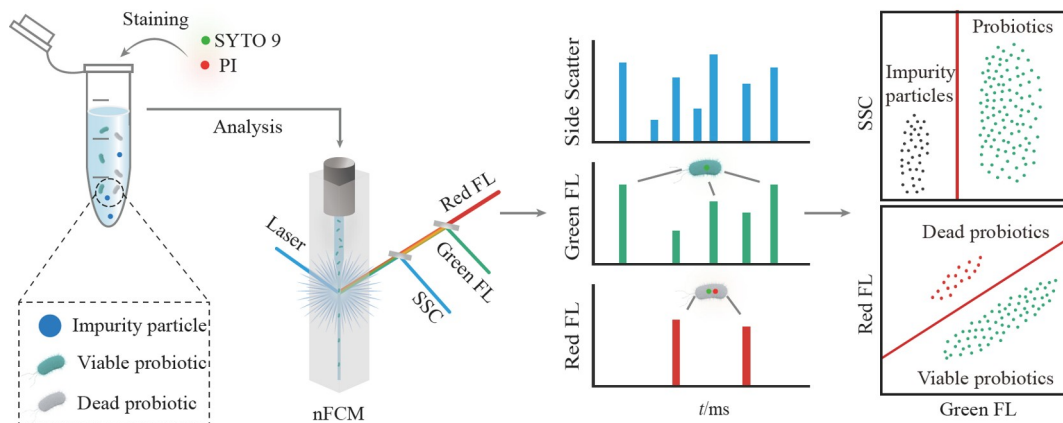


图1 纳米流式检测技术(nFCM)评估益生菌制剂细菌死/活原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of the detection principle for live/dead cell counting in probiotic products using nano-flow cytometry (nFCM)

注(Note): SSC, 侧向散射光(Side scattering); FL, 荧光(Fluorescence)

L. plantarum 和 *L. acidophilus* 的冻干粉末的检测结果显示如图 2D 和图 2E 所示,同样可有效区分益生菌的死/活,证明了该方法的普适性。nFCM 检测益生菌的同时,采用平板计数法对 FGL 进行培养和浓度计数,图 2F 显示 nFCM 定量的 FGL 浓度与平板计数的结果高度吻合,检出限低至 10^6 cells/mL 数量级。

图 2G 展示的是 nFCM 和平板计数法对 3 种冻干益生菌的检测结果,平板计数只能检测可培养的细菌,而 nFCM 可检测总菌和活菌的浓度。实验数据表明,两种方法对于 *L. acidophilus* 的活菌浓度测定结果基本一致,而 LGG 和 *L. plantarum* 的平板计数结果低于 nFCM 的检测结果。这主要是因为冻干处理会导致益生菌的细胞膜破裂、蛋白质变性和核酸结构破坏等^[35],使部分益生菌进入 VBNC 状态^[36]。但是 VBNC 状态的益生菌同样可发挥益生功能^[37],因此,相比于平板计数只能检测到可培养的益生菌,FCM 对益生菌产品活菌含量的检测更准确。由于冲剂产品溶解稀释后即可染色和检测,因此可在 15 min 内获得总菌和活菌计数结果,检测速度相较于平板计数 1~2 d 的测定速度大大提升。

胶囊是益生菌的另外一种常见产品形式。胶囊溶解后,溶液会变粘稠,直接流式上样容易造成毛细管堵塞,因此需要离心洗涤。由于此过程会在一定程度上损失益生菌,因此对胶囊产品的益生菌回收率进行了考察。在自行购买的明胶、淀粉和肠溶性胶囊中分别灌装 LGG 冻干粉,使用 nFCM 检测样品处理后的活菌和总菌浓度,并与等量粉末直接溶解的益生菌浓度比较。图 2H 显示平均回收率大于 99%,因此,胶囊产品的预处理过程对益生菌浓度的定量结果影响不大。胶囊产品可在 30 min 内完成检测。

2.3 益生菌冲剂产品的活菌浓度检测

基于上述建立的方法,对购买的 16 款益生菌冲剂产品的总菌含量、活菌含量和活菌比例进行快速定量分析。以产品 C 为例,图 3A 为其散射 SSC(i)、绿色荧光 FL1(ii)和红色荧光 FL2(iii)的代表性脉冲时序图。由于杂质颗粒无法被 SYTO 9 标记,因此可在 SSC-FL1 二维散点图中通过 FL1 设置阈值圈出益生菌(图 3B-i),并进一步作 FL2-FL1 二维散点图,以区分死/活菌(图 3B-ii)。由于产品 C 含有 *B. helveticus*、*B. bifidum* 和 *B. infantis* 3 种益生菌,因此在散点图中有可能细分亚群。但是益生菌的异质性较大,并且益生菌状态会影响其核酸染色情况,因此并不能仅通过核酸染色结果直接鉴定益生菌类型,需要结合相应抗体进行免疫荧光标记^[38]。通过外标法进行浓度定量分析,产品 C 的总菌浓度为 6.1×10^{10} cells/g,活菌浓度为 3.7×10^{10} cells/g,活菌占比为 61.2%。产品 C 每包含 1.5 g 粉末,因此其总菌和活菌含量分别为 9.1×10^{10} cells/pkg 和 5.6×10^{10} cells/pkg,产品 C 标签所标注的活菌含量为 $> 1.0 \times 10^{10}$ cfu/pkg。为确保产品的活菌含量在保质期内均符合其标注值,生产商通常会加入超量的益生菌,因此,就活菌含量而言,产品 C 与其标签是相符的。

本研究测试的 16 款益生菌冲剂产品的总菌含量、活菌含量、活菌占比以及产品标注的活菌含量如图 3C 和表 1 所示。从产品 A 到产品 P,活菌含量逐级递减,产品 A 的活菌含量最高,为 1×10^{11} cells/pkg

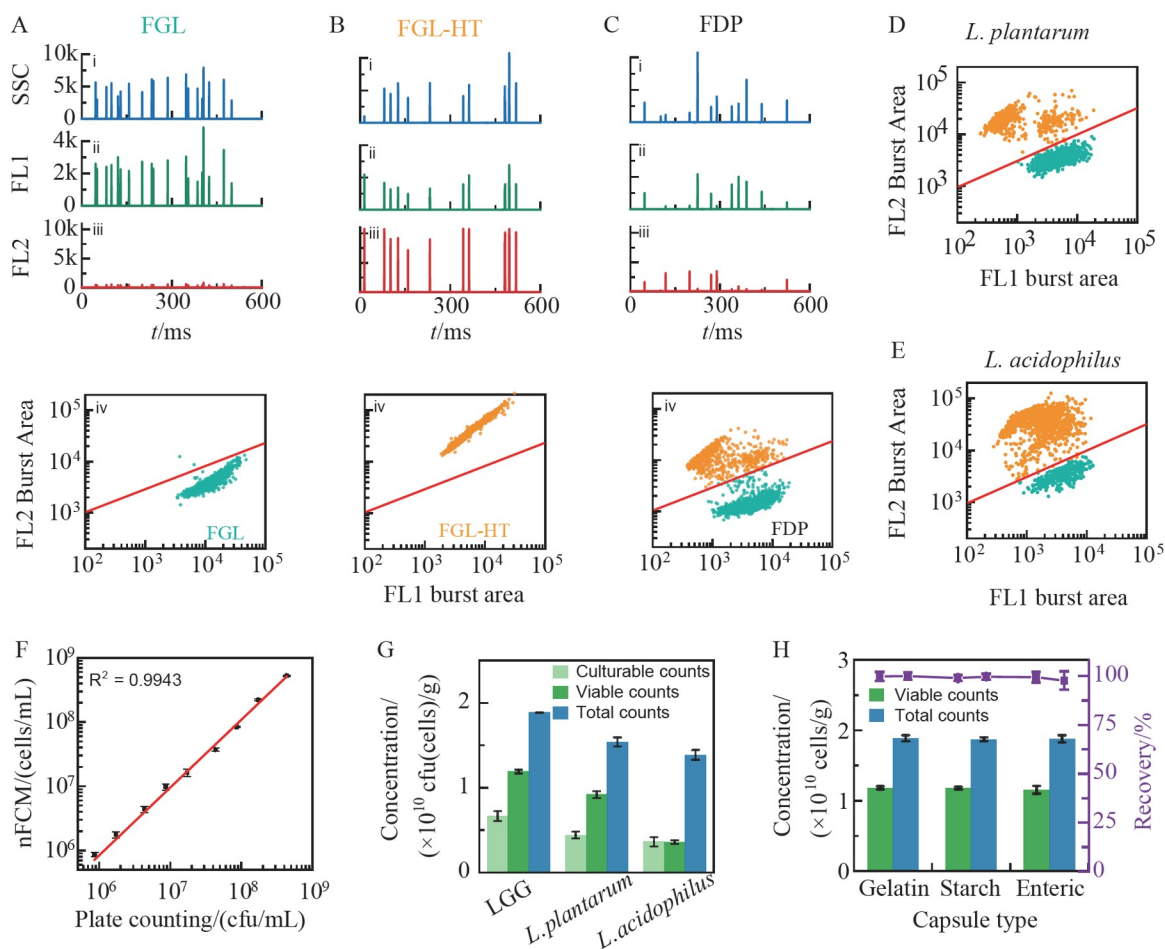


图2 nFCM 检测冻干益生菌的存活状态: (A~C) 益生菌 LGG 的 FGL(A)、FGL-HT(B)和 FDP(C)样本的散射(i)、绿色荧光(ii)和红色荧光(iii)的代表性脉冲时序图(i~iii)和双荧光散点图(iv); (D, E) *L. plantarum* (D)和 *L. acidophilus* (E)冻干粉的双荧光散点图; (F)nFCM 和平板计数法定量 LGG 的 FGL 样本活菌浓度的线性关系; (G)nFCM 和平板计数法定量检测 LGG、*L. plantarum*、*L. acidophilus* 冻干粉的益生菌浓度; (H)前处理(溶解、离心、洗涤)包裹 LGG 冻干粉的明胶胃溶型胶囊、淀粉胃溶型胶囊和肠溶型胶囊样品的益生菌回收率

Fig.2 Assessing viability of probiotics by nFCM. Samples of freshly-grown LGG (FGL), FGL upon heat treatment (FGL-HT), and freeze-dried LGG (FDP) stained by nucleic acid dye SYTO 9 and PI, and analyzed by nFCM. (A-C) Representative burst traces of side scatter (i), green fluorescence (FL) (ii), and red FL (iii), and the bivariate dot-plot of red FL burst area versus green FL burst area (iv) for the samples of FGL (A), FGL-HT (B), and FDP (C). (D, E) The bivariate dot-plot of red FL burst area versus green FL burst area for the freeze-dried *L. plantarum* (D) and *L. acidophilus* (E). (F) Relationship between the concentrations measured by nFCM and those obtained by plate counting for different concentrations of FGL. (G) The concentrations of live bacteria in freeze-dried LGG, *L. plantarum*, and *L. acidophilus* measured by plate counting and the concentrations of live and total bacteria in freeze-dried LGG, *L. plantarum* and *L. acidophilus* measured by nFCM. (H) Recovery test for analysis of the freeze-dried LGG encapsulated by gelatin, starch and enteric capsules

(图 3D), 产品 P 的活菌含量最低, 为 1.6×10^{10} cells/pkg, 小于其标注的 4×10^{10} cfu/pkg。除产品 P 外, 其余 15 款产品的活菌含量均符合其标注值, 16 款产品的活菌浓度均大于 10^9 cells/g (见电子版文后支持信息图 S1), 满足国际标准 (10^7 cfu/g)。平均活菌占比为 63.0%, 其中, 产品 M 的活菌占比最高, 达到 89.9% (图 3E)。尽管相比于酸奶和益生菌饮料等新鲜发酵的益生菌产品^[33], 干燥处理的益生菌产品的益生菌活菌率相对较低, 但是后者具有可常温运输、储存和保质期长等优点。

2.4 益生菌冲剂产品的上消化道耐受性考察

使用 SGJ (pH = 3) 和 SIJ (胆盐浓度 0.3% (m/V)) 分别对新鲜培养的 LGG 进行胃液、肠液和上消化道

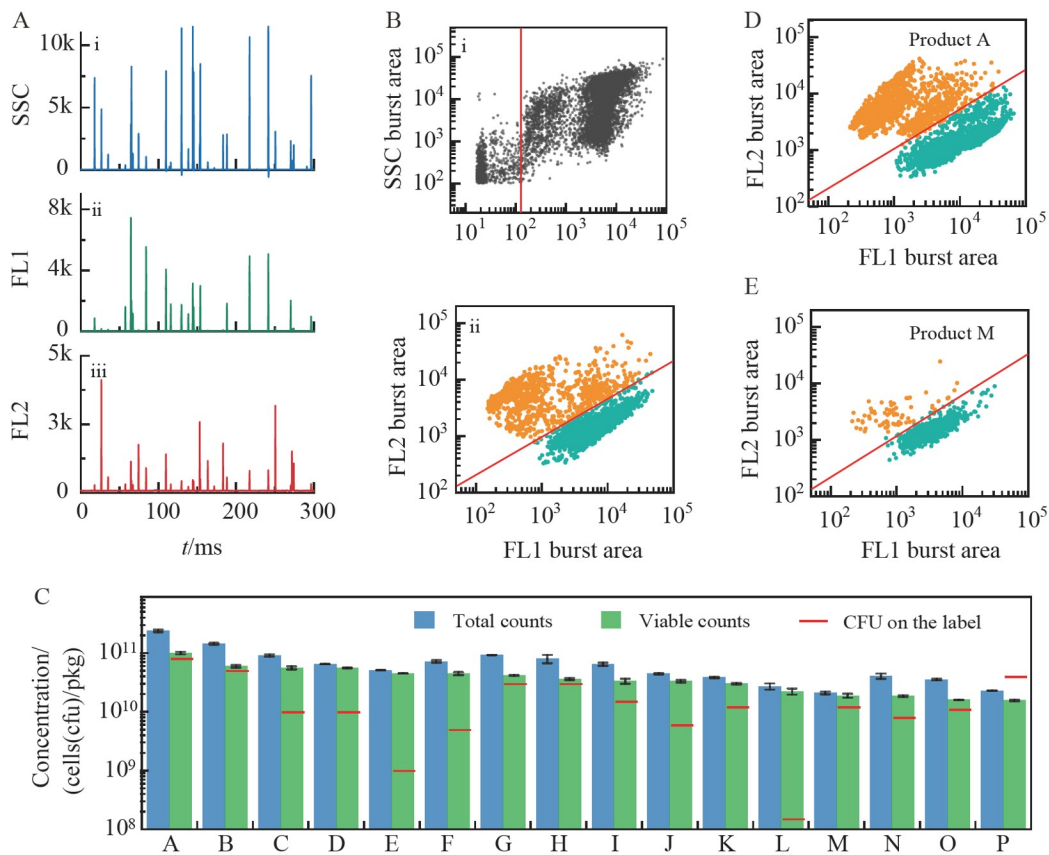


图3 16种市售益生菌冲剂产品益生菌活性表征: (A)产品C的代表性散射(i)、绿色荧光(ii)和红色荧光(iii)脉冲时序图; (B)产品C的SSC-FL1二维散点图(i)和FL2-FL1二维散点图(ii); (C)16款益生菌冲剂产品的总菌含量(蓝)、活菌含量(绿)和标签标注的活菌含量(红); (D, E)产品A(D)和产品M(E)的FL2-FL1二维散点图

Fig.3 Viability assessment of 16 kinds of commercial powdered products of probiotics: (A) Representative side scatter (i), green fluorescence (ii) and red fluorescence burst traces (iii) of product C; (B) The bivariate dot-plot of SSC burst area versus green fluorescence burst area (i) and red fluorescence burst area versus green FL burst area (ii) for product C; (C) Assessment of the total (blue) and viable (green) probiotic amounts for 16 commercial powdered products. Red line represents the viable probiotic content on the label; (D, E) The bivariate dot-plots of red fluorescence burst area versus green fluorescence burst area for product A (D) and product M (E)

的模拟消化处理, nFCM 和平板计数法的活菌浓度定量分析结果非常接近(见电子版文后支持信息图 S2), 因此, nFCM 能够对模拟消化处理后的活菌浓度进行准确定量分析。同样分别使用 pH = 3 的 SGJ 和胆盐浓度为 0.3% (m/V) 的 SIJ 对 16 款益生菌冲剂产品进行模拟消化处理, 以考察其胃液、肠液和上消化道耐受性, 各产品模拟消化后的双荧光散点图如电子版文后支持信息图 S3-S5 所示, 统计结果如图 4 和表 2 所示。图 4A 展示了 16 款冲剂产品经过 SGJ 和 SIJ 模拟消化处理的益生菌存活率, 不同品牌之间存在较大的差异。SR_{SGJ} 的分布区间为 3.3%~91.7%, 平均值为 47.9%, 其中产品 I 具有最强的胃液耐受性, 产品 P 的胃液耐受性最弱。SR_{SIJ} 的分布范围是 0.6%~99.6%, 平均值为 26.9%, 其中产品 C 具有最强的肠液耐受性, 产品 I 的肠液耐受性最弱。产品的胃液和肠液耐受性之间没有明显的相关性。

在 pH = 3 的 SGJ 和 0.3% (m/V) 胆盐浓度的 SIJ 的模拟消化条件下, 可将产品分为耐胃液型 (SR_{SGJ} > SR_{SIJ}) 和耐肠液型 (SR_{SGJ} < SR_{SIJ}) 两类, 结果如图 4B 所示。耐胃液型产品(图 4-i)有 10 种(如产品 I), 耐胆盐型产品(图 4-ii)有 6 种(如产品 C)。本研究详细考察了产品 C 和 I 在不同 pH 值的 SGJ 和不同胆盐浓度的 SIJ 分别模拟消化处理 3 h 和 4 h 的存活率, 结果表明, SGJ 的 pH 值越低, SR_{SGJ} 越小, 相同 pH 值条件下, 产品 I 的 SR_{SGJ} 均高于产品 C(图 4C)。此外, 益生菌的死亡主要发生在 SGJ 消化处理的前 10 min (见电子版文后支持信息图 S6), 因此, 一般建议饭后待胃液 pH 值有所上升后再服用益生菌产品^[39]。SIJ

消化过程中,胆盐浓度越高, SR_{SIJ} 越小,相同胆盐浓度下,产品 C 的存活率均高于产品 I(图 4D),益生菌的死亡主要发生在 SIJ 消化处理的前 30 min 内(见电子版文后支持信息图 S7)。

图 4E 展示的是实验测得的 16 款冲剂产品模拟上消化道消化的存活率 $SR_{SGJ-SIJ}$ (i)和活菌含量(ii)。 $SR_{SGJ-SIJ}$ 的分布区间为 0.2%~50.6%,平均值是 17.7%,其中产品 C 的存活率最高,产品 P 的存活率最低。模拟上消化道消化后,活菌含量除产品 P 为 2.8×10^7 cells/pkg 之外,其它产品的活菌含量均大于 10^8 cells/pkg。活菌含量和上消化道耐受性共同影响最终到达人体肠道的活菌数,综合考察 16 款冲剂产品的活菌含量和上消化道耐受性可知,活菌含量较高的产品其上消化道耐受性也相对较好,活菌含量排序前 8 位的产品中有 6 款产品的上消化道存活率高于平均水平,其中产品 A、B 和 C 同时具有较高的活菌含量和优异的上消化道耐受性,因此消化后的活菌含量在所有冲剂产品中名列前三,如只考虑活菌量,建议消费者选用这三款产品;而排序后 8 位的产品中仅有 2 款产品(产品 K 和产品 L)的上消化道耐受性达到平均水平。

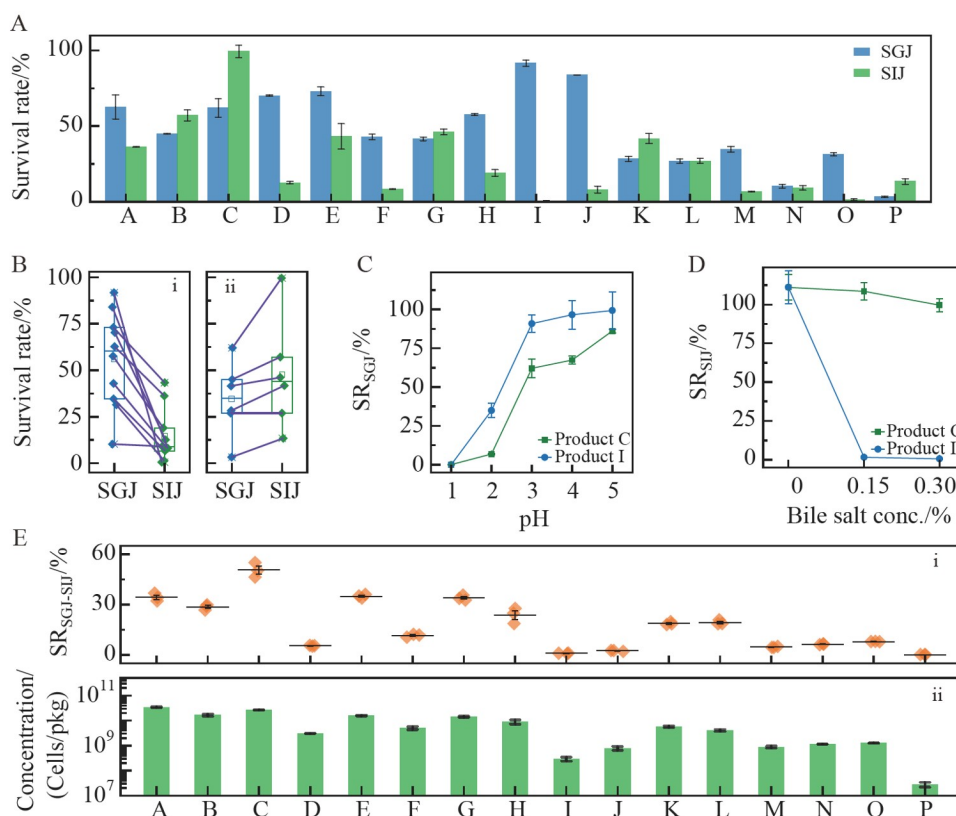


图4 16款冲剂产品的胃液、肠液及上消化道耐受性评估:(A)16款产品经过SGJ(蓝)和SIJ(绿)模拟消化处理后的存活率;(B)胃液耐受型产品(i)和肠液耐受型产品(ii);(C)不同pH值的SGJ模拟消化产品C(绿)和产品I(蓝)的存活率;(D)不同胆盐浓度的SIJ模拟消化产品C(绿)和产品I(蓝)的存活率;(E)模拟上消化道消化后的存活率(i)和活菌含量(ii)

Fig.4 Assessment of gastric juice, intestinal juice and upper gastrointestinal tract tolerance of 16 kinds of powdered products by nFCM: (A) Survival rate of 16 powdered products after SGJ (blue) and SIJ (green) digestion; (B) 10 products have stronger gastric juice tolerance (i) and 6 products have stronger intestinal juice tolerance (ii); Survival rate of product C and product I after SGJ digestion with pH = 1, 2, 3, 4, 5 (C) and after SIJ digestion with the bile salt concentration of 0, 0.15%, and 0.3% (m/V) (D); (E) Survival rate (i) and viability contents (ii) of 16 kinds of powdered products after upper gastrointestinal tract digestion

注(Note): pkg, 包(Package); SGJ, 模拟胃液(Simulated gastric juice); SIJ, 模拟肠液(Simulated intestinal juice)

益生菌产品的上消化道耐受性和益生菌的种类、益生元的选择、微胶囊包覆、冻干方法和储存条件等多个因素有关^[12-17],益生菌产品通常包含多种益生菌和益生元(见电子版文后支持信息表 S1),并且很少提供是否为微胶囊包覆处理以及包覆方法、材料、环境等条件的详细信息。因此,本研究无法将产品的上消化道耐受性结果与上述条件参数进行关联分析。但是,基于 nFCM 所建立的益生菌产品上消化

道耐受性评估方法可很好地运用于产品的生产、优化等过程的质控,耐受性评估结果对于消费者选择产品也具有重要的指导意义。

2.5 益生菌胶囊产品的上消化道耐受性考察

为了提升益生菌产品的上消化道耐受性同时考虑到服用的方便性,部分厂家会将益生菌产品制作成胶囊型产品。本研究测定了 CpA 和 CpB 两款胶囊型益生菌产品的活菌含量以及上消化道耐受性(双荧光散点图如电子版文后支持信息图 S8 所示),并考察了胃溶型和肠溶型胶囊外壳对益生菌的保护作用。两款产品的活菌含量均达到 10^{11} cells/caps 数量级,高于上述检测的 16 款冲剂产品中的绝大多数,并且均符合其标签标注的活菌含量(表 1)。使用 pH = 3 的 SGJ 和胆盐浓度为 0.3% (m/V) 的 SIJ 模拟消化处理这两款胶囊产品, CpA 的 SR_{SGJ} 为 83.6%, SR_{SIJ} 为 0.1%, $SR_{SGJ-SIJ}$ 为 0.4%(图 5A 和表 2); CpB 的 SR_{SGJ} 为 86.9%, SR_{SIJ} 为 0.2%, $SR_{SGJ-SIJ}$ 为 0.2%(图 5B 和表 2),因此,这两款产品都具有较强的胃酸耐受性。两款产品的胶囊外壳在 SGJ 处理时,均在 5 min 内开始破损, 30 min 内完全溶解(见电子版文后支持信息图 S8),因此均是胃溶型胶囊。将胶囊产品内的粉末直接用 SGJ 和 SIJ 模拟消化处理,其存活率与其胶囊形式(Original)的存活率无明显差别(图 5A 和 5B),说明其胶囊外壳对其内部的益生菌没有明显的保护作用。

表1 18款市售益生菌产品的总菌浓度、总菌含量、活菌浓度、活菌含量、活菌占比以及产品标签标注的活菌含量汇总
Table 1 The total and viable probiotic concentrations and amounts, viable rate and viability content of 18 probiotic products

产品 Product	总菌浓度 Total cell conc./ (cells/g)	总菌含量 Total cell amount/ (cells/pkg(caps))	活菌浓度 Viable cell conc./ (cells/g)	活菌含量 Viable cell amount/ (cells/pkg (caps))	活菌占比 Viable rate/ %	标签活菌含量 Expected cell amount/ (cfu/pkg (caps))
A	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{11}$	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^{11}$	$(5.0 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(1.0 \pm 0.0) \times 10^{11}$	41.9 ± 0.8	8.0×10^{10}
B	$(7.2 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(1.4 \pm 0.0) \times 10^{11}$	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(5.9 \pm 0.3) \times 10^{10}$	41.2 ± 0.7	5.0×10^{10}
C	$(6.1 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(9.1 \pm 0.4) \times 10^{10}$	$(3.7 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(5.6 \pm 0.3) \times 10^{10}$	61.2 ± 0.9	1.0×10^{10}
D	$(6.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(6.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(5.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(5.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	85.7 ± 0.4	1.0×10^{10}
E	$(5.1 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(5.1 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(4.5 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(4.5 \pm 0.0) \times 10^{10}$	87.9 ± 0.3	1.0×10^9
F	$(4.8 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(7.2 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(3.0 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(4.5 \pm 0.3) \times 10^{10}$	62.2 ± 0.9	5.0×10^9
G	$(6.1 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(9.2 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(2.8 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(4.2 \pm 0.1) \times 10^{10}$	45.1 ± 0.9	3.0×10^{10}
H	$(4.0 \pm 0.7) \times 10^{10}$	$(8.0 \pm 1.3) \times 10^{10}$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^{10}$	45.8 ± 6.8	3.0×10^{10}
I	$(6.5 \pm 0.4) \times 10^{10}$	$(6.5 \pm 0.4) \times 10^{10}$	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^{10}$	51.0 ± 2.0	1.5×10^{10}
J	$(4.4 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(4.4 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^{10}$	74.6 ± 2.1	6.0×10^9
K	$(1.5 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(3.8 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(1.2 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^{10}$	78.5 ± 1.1	1.2×10^{10}
L	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(2.7 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{10}$	83.5 ± 1.9	1.5×10^8
M	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^9$	$(9.4 \pm 0.7) \times 10^9$	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{10}$	89.9 ± 2.4	1.2×10^{10}
N	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(4.1 \pm 0.4) \times 10^{10}$	$(4.6 \pm 0.2) \times 10^9$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{10}$	45.7 ± 2.9	8.0×10^9
O	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^{10}$	45.3 ± 0.8	1.1×10^{10}
P	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(2.3 \pm 0.0) \times 10^{10}$	$(7.8 \pm 0.3) \times 10^9$	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{10}$	68.4 ± 1.8	4.0×10^{10}
CpA	—	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{11}$	—	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{11}$	62.5 ± 1.1	4.0×10^{10}
CpB	—	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{11}$	—	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{11}$	42.3 ± 4.6	3.2×10^{10}

注(Note): conc., 浓度(Concentration); caps, 胶囊(Capsule)。

本研究采用明胶胃溶型胶囊外壳和肠溶型胶囊外壳分别包覆来自产品 CpB 和产品 G 的粉末,其中产品 G 的 SR_{SGJ} 和 SR_{SIJ} 均约为 40%(图 4A)。由图 5C 可知,包覆于胃溶型胶囊中的益生菌在各消化阶段的存活率均与直接作用于其粉末的结果接近,说明胃溶型胶囊外壳难以在上消化道消化过程中对益生菌起到有效的保护作用。使用肠溶型胶囊时,SGJ 消化存活率有所提升,包裹产品 CpB 粉末的胶囊其 SR_{SGJ} 从 86.9%提升至 94.8%(图 5C-i),包裹产品 G 的胶囊其 SR_{SGJ} 从 41.6%提升至 89.2%(图 5C-ii),没有达到 100%的存活率是因为胶囊存在微缺陷,以及胶囊的体和帽之间有缝隙,SGJ 会泄露进胶囊腔体内导致部分益生菌死亡^[16]。但是,由于 CpB 在 SIJ 中的死亡率较高,尽管肠溶型胶囊对其在 SGJ 消化阶段有一定的保护作用,但 $SR_{SGJ-SIJ}$ 仅从 0.2%提升至 0.4%(图 5C-i)。产品 G 的胆盐耐受性相对较好,在 SGJ 消化阶段被肠溶型胶囊保护而留存大量活菌的基础上,最终的 $SR_{SGJ-SIJ}$ 从 34.0%提升至 53.3%(图 5C-ii)。本研

表2 18款益生菌产品经过模拟胃液、肠液和上消化道消化处理后的存活率及活菌含量
Table 2 Assessment of gastric juice, intestinal juice and upper gastrointestinal tract tolerance of 18 kinds of probiotic products

产品 Product	SGJ 消化存活率 SR _{SGJ} / %	SIJ 消化存活率 SR _{SIJ} / %	上消化道消化存活率 SR _{SGJ-SIJ} / %	上消化道消化活菌浓度 Viable cell conc/ (cells/g)	上消化道消化活菌含量 Viable cell amount/ (cells/pkg(caps))
A	62.7 ± 7.9	36.2 ± 0.2	34.4 ± 2.3	(1.7 ± 0.1)×10 ¹⁰	(3.4 ± 0.1)×10 ¹⁰
B	45.1 ± 0.2	57.1 ± 3.6	27.9 ± 1.6	(8.3 ± 0.9)×10 ⁹	(1.7 ± 0.2)×10 ¹⁰
C	62.1 ± 6.2	99.6 ± 4.2	50.6 ± 4.3	(1.8 ± 0.1) ×10 ¹⁰	(2.7 ± 0.1) ×10 ¹⁰
D	70.3 ± 0.4	12.6 ± 0.7	5.6 ± 0.1	(3.1 ± 0.0)×10 ⁹	(3.1 ± 0.0)×10 ⁹
E	73.1 ± 2.9	43.3 ± 8.5	34.9 ± 1.6	(1.6 ± 0.1)×10 ¹⁰	(1.6 ± 0.1)×10 ¹⁰
F	42.9 ± 1.8	8.5 ± 0.2	11.2 ± 0.8	(3.4 ± 0.5)×10 ⁹	(5.0 ± 0.7)×10 ⁹
G	41.6 ± 1.2	46.2 ± 1.9	34.0 ± 1.5	(9.6 ± 0.6)×10 ⁹	(1.4 ± 0.1)×10 ¹⁰
H	57.7 ± 0.7	19.0 ± 2.1	23.7 ± 4.6	(4.5 ± 0.9)×10 ⁹	(8.9 ± 1.7) ×10 ⁹
I	91.7 ± 2.2	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	(2.9 ± 0.5) ×10 ⁸	(2.9 ± 0.5) ×10 ⁸
J	83.9 ± 0.1	8.1 ± 2.2	2.4 ± 0.3	(7.8 ± 1.4)×10 ⁸	(7.8 ± 1.4)×10 ⁸
K	28.3 ± 1.6	41.8 ± 3.2	18.8 ± 0.9	(2.3 ± 0.2) ×10 ⁹	(5.7 ± 0.4) ×10 ⁹
L	26.9 ± 1.4	27.0 ± 1.6	19.4 ± 0.4	(2.7 ± 0.2) ×10 ⁹	(4.1 ± 0.4) ×10 ⁹
M	34.7 ± 1.8	6.7 ± 0.3	4.7 ± 0.3	(4.4 ± 0.5)×10 ⁸	(8.7 ± 0.9)×10 ⁸
N	10.3 ± 1.3	9.1 ± 1.5	6.3 ± 0.3	(2.9 ± 0.0) ×10 ⁸	(1.2 ± 0.0) ×10 ⁹
O	31.4 ± 1.0	1.4 ± 0.5	7.9 ± 0.0	(8.5 ± 0.2) ×10 ⁸	(1.3 ± 0.0) ×10 ⁹
P	3.3 ± 0.5	13.5 ± 1.8	0.2 ± 0.0	(1.4 ± 0.3) ×10 ⁷	(2.8 ± 0.6) ×10 ⁷
CpA	83.6 ± 7.1	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	—	(6.0 ± 3.7)×10 ⁸
CpB	86.9 ± 5.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	—	(4.8 ± 2.2)×10 ⁸

注(Notes): SGJ, 模拟胃液(Simulated gastric juice); SIJ, 模拟肠液(Simulated intestinal juice); SR_{SGJ}, SGJ模拟消化后的存活率(Survival rate after gastric digestion); SR_{SIJ}, SIJ模拟消化后的存活率(Survival rate after intestinal digestion); SR_{SGJ-SIJ}, 模拟上消化道消化后的存活率(Survival rate after upper gastrointestinal digestion); Viable cell conc, 上消化道消化活菌浓度(Viable cell concentration after simulated upper gastrointestinal tract digestion); Viable cell amount, 上消化道消化活菌含量(Viable cell amount after simulated upper gastrointestinal tract digestion)。

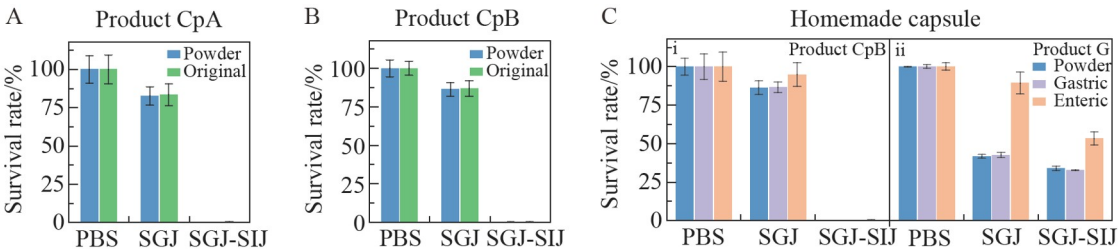


图5 胶囊产品上消化道耐受性及胃溶型胶囊和肠溶性胶囊对益生菌保护作用的考察: (A)产品 CpA (绿)及其胶囊内的粉末(蓝)在PBS、SGJ和上消化道模拟消化后的益生菌存活率; (B)产品 CpB(绿)及其胶囊内的粉末(蓝)在PBS中、SGJ和上消化道模拟消化后的益生菌存活率; (C)产品 CpB(i)和产品 G(ii)的胃溶型(紫)和肠溶型(橙)自制胶囊的上消化道模拟消化存活率

Fig.5 Assessment of the upper gastrointestinal tolerance of two capsule probiotic products and the protection effect of stomach capsules and enteric capsules on probiotics. The survival rate of product CpA (A), CpB (B), and the home-made capsules that encapsulating probiotic powder of product CpB (C-i) or product G (C-ii), after simulated upper gastrointestinal tract digestion

究结果表明,胃溶型胶囊对益生菌缺乏保护作用,肠溶型胶囊对胃液耐受性较差,但胆盐耐受性较好的产品具有更好的保护作用。

3 结论

基于 nFCM 和 SYTO 9/PI 核酸双染色,本研究建立了分辨冻干益生菌死/活的定量表征方法,并将其应用于 18 款益生菌产品(包括 16 款粉末冲剂和 2 款胶囊产品)的总菌含量、活菌含量和活菌占比的定量分析,详细考察了各产品对于胃液、肠液和上消化道的耐受性,以及胃溶型和肠溶型胶囊对益生菌的保护作用。由于本研究模拟消化的实验设计较简单,尚无法准确还原益生菌经过上消化道的真实过程,

后续可将已建立的表征方法与专业的消化模拟装置联合使用^[23, 40], 以获得更准确的益生菌产品的上消化道耐受性测试结果。此外, 随食的食物种类也会影响益生菌经过上消化道的存活率^[41], 后续可对此展开详细考察。

References

- [1] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON G R, MERENSTEIN D J, POT B, MORELLI L, CANANI R B, FLINT H J, SALMINEN S, CALDER P C, SANDERS M E. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* , 2014, 11(8): 506-514.
- [2] HOTEL A. Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2001.
- [3] Fortune Business Insights. 2020, <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/probiotics-market-100083>.
- [4] MINELLI E B, BENINI A. *Microb. Ecol. Health Dis.* , 2009, 20(4): 180-183.
- [5] BROECKX G, VANDENHEUVEL D, CLAES I J J, LEBEER S, KIEKENS F. *Int. J. Pharm.* , 2016, 505(1-2): 303-318.
- [6] GONG P, ZHANG L, HAN X, SHIGWEDHA N, SONG W, YI H, DU M, CAO C. *Drying Tech.* , 2014, 32(7): 793-800.
- [7] IACONELLI C, LEMETAIS G, KECHAOU N, CHAIN F, BERMÚDEZ-HUMARÁN L G, LANGELLA P, GERVAIS P, BENEY L. *J. Biotechnol.* , 2015, 214: 17-26.
- [8] CASSANI L, GOMEZ-ZAVAGLIA A, SIMAL-GANDARA J. *Food Res. Int.* , 2020, 129: 108852.
- [9] FUSCO V, FANELLI F, CHIEFFI D. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , 2021, 62(25): 6854-6871.
- [10] DIOSO C M, VITAL P, ARELLANO K, PARK H, TODOROV S D, JI Y, HOLZAPFEL W. *Foods*, 2020, 9(9): 1229.
- [11] WENDEL U. *Front. Microbiol.* , 2022, 12: 818468.
- [12] HUANG Y, ADAMS M C. *Int. J. Food Microbiol.* , 2004, 91(3): 253-260.
- [13] KOLIDA S, GIBSON G R. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* , 2011, 2(1): 373-393.
- [14] ARCHACKA M, BIAŁAS W, DEMBCZYŃSKI R, OLEJNIK A, SIP A, SZYMANOWSKA D, CELIŃSKA E, JANKOWSKI T, OLEJNIK A, ROGODZIŃSKA M. *Food Chem.* , 2019, 274: 733-742.
- [15] ZACARIAS M F, REINHEIMER J A, VINDEROLA G, KULOZIK U, AMBROS S. *Int. J. Dairy Technol.* , 2020, 73(3): 625-633.
- [16] CAILLARD R, LAPOINTE N. *Int. J. Pharm.* , 2017, 519(1-2): 125-127.
- [17] LIU H, CUI S W, CHEN M, LI Y, LIANG R, XU F, ZHONG F. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , 2019, 59(17): 2863-2878.
- [18] DAVIS C. J. *Microbiol. Methods*, 2014, 103: 9-17.
- [19] WILKINSON M G. *Trends Food Sci. Tech.* , 2018, 78: 1-10.
- [20] SIELATYCKA K, JUZWA W, ŚLIWA-DOMINIĄK J, KACZMARCZYK M, ŁONIEWSKI I, MARLICZ W. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* , 2021, 68: 102598.
- [21] BELLALI S, BOU KHALIL J, FONTANINI A, RAOULT D, LAGIER J C. *Microbiol. Res.* , 2020, 236: 126454.
- [22] MARTIN-DEJARDIN F, EBEL B, LEMETAIS G, NGUYEN THI MINH H, GERVAIS P, CACHON R, CHAMBIN O. *Eur. J. Pharm. Sci.* , 2013, 49(2): 166-174.
- [23] ADOUARD N, FUJIMOTO J, OKI K, AKIYAMA T, BELAÏNOUSSI Y, TISON C, MAUFOUX L, BRAZEILLES R, LESIC B, MORIEZ R, OISHI K, LEGRAIN-RASPAUD S. *J. Funct. Foods*, 2019, 59: 30-39.
- [24] LARSEN N, CAHÚ T B, ISAY SAAD S M, BLENNOW A, JESPERSEN L. *Food Microbiol.* , 2018, 74: 11-20.
- [25] CHEN S, CAO Y, FERGUSON L R, SHU Q, GARG S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2012, 95(2): 345-356.
- [26] MATOUSKOVA P, HOOVA J, RYSAVKA P, MAROVA I. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1625.
- [27] RODRIGUES V C C, SILVA L G S, SIMABUCO F M, VENEMA K, ANTUNES A E C. *J. Funct. Foods*, 2019, 55: 126-134.
- [28] AZHAR M A, MUNAIM M S A, HASAN M, WAHID Z A. *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.* , 2020, 9(3): 117-121.
- [29] ZHU W, LYU F, NAUMOVSKI N, AJLOUNI S, RANADHEERA C S. *Beverages*, 2020, 6(1): 13.
- [30] LIAN H, HE S, CHEN C, YAN X. *Annu. Rev. Anal. Chem.* , 2019, 12(1): 389-409.
- [31] YANG L, WU L, ZHU S, LONG Y, HANG W, YAN X. *Anal. Chem.* , 2010, 82(3): 1109-1116.
- [32] YANG L, ZHOU Y, ZHU S, HUANG T, WU L, YAN X. *Anal. Chem.* , 2012, 84(3): 1526-1532.
- [33] HE S, HONG X, HUANG T, ZHANG W, ZHOU Y, WU L, YAN X. *Methods Appl. Fluoresc.* , 2017, 5(2): 024002.
- [34] ANNAN N T, BORZA A D, HANSEN L T. *Food Res. Int.* , 2008, 41(2): 184-193.
- [35] VAN DE GUCHTE M, SERROR P, CHERVAUX C, SMOKVINA T, EHRLICH S D, MAGUIN E. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1/4): 187-216.
- [36] FOGLIA C, ALLESINA S, AMORUSO A, DE PRISCO A, PANE M. *J. Microbiol. Methods*, 2020, 175: 105993.
- [37] AGUILAR-TOALÁ J E, GARCIA-VARELA R, GARCIA H S, MATA-HARO V, GONZÁLEZ-CÓRDOVA A F, VALLEJO-CÓRDOBA B, HERNÁNDEZ-MENDOZA A. *Trends Food Sci. Tech.* , 2018, 75: 105-114.
- [38] CHIRON C, TOMPKINS T A, BURGUiÈRE P. *J. Appl. Microbiol.* , 2018, 124(2): 572-584.
- [39] GARDNER J D, CIOCIOLA A A, ROBINSON M. *J. Appl. Physiol.* , 2002, 92(2): 427-434.

- [40] LIU W, YE A, HAN F, HAN J. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2019, 263: 52-67.
- [41] GOMAND F, BORGES F, BURGAIN J, GUERIN J, REVOL-JUNELLES A M, GAIANI C. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2019, 10(1): 285-310.

Assessment of Viability and Upper Gastrointestinal Tolerance of Commercial Probiotic Products by Nano-flow Cytometry

XUE Cheng-Feng, WANG Wen-Ting, MAO Cui-Ping, WU Li-Na, YAN Xiao-Mei*

(Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Viable quantity and upper gastrointestinal tolerance are two important indicators of probiotic products, which together determine the number of viable bacteria that can eventually colonize in the human intestine. Accurate assessment of these two indicators is essential for guiding consumers to choose probiotic products and for manufacturers to improve product quality. Based on the unique advantages of the laboratory-developed nano-flow cytometry (nFCM) in the sensitive and rapid analysis of individual bacteria, the viable quantities of probiotic powder and upon digestion with simulated gastric juice (SGJ), simulated intestinal juice (SIJ), and simulated upper gastrointestinal tract were measured in this work. Nucleic acid stains SYTO 9 and propidium iodide (PI) were applied to label all the bacteria or dead bacteria with damaged membrane integrity, respectively. The viable quantity and upper gastrointestinal tolerance of 18 kinds of probiotic products (including 16 kinds of powdered products and 2 kinds of capsules) were evaluated. The viable quantity of these 18 products was higher than 10^{10} cell/package, with an average viable rate of 61.7%. All products met the International Standard for probiotic products (10^7 cfu/g), but one was lower than the level stated on the label. Then, SGJ at pH=3 and SIJ with bile salt concentration of 0.3% (*m/V*) were used to examine the tolerance of probiotic products to gastric juice, intestinal juice and upper gastrointestinal tract. By comparing the survival rate after SGJ and SIJ digestion, the products could be divided into two categories. One had stronger gastric juice resistance (12 products), and the other one had stronger intestinal juice resistance (6 products). For most products, over 10^8 cells/package of probiotics survived after upper gastrointestinal tract digestion, with an average survival rate of 15.6%. Finally, the protection effect of stomach capsules and enteric capsules on probiotics was investigated. The enteric capsules showed gastric protection to probiotics. However, the encapsulated probiotics needed to have strong intestinal tolerance at the same time to improve their survival rate in the upper gastrointestinal tract.

Keywords Probiotics; Commercial probiotic products; Nano-flow cytometry; Bacterial viability; Upper gastrointestinal tolerance

(Received 2022-09-22; accepted 2022-10-23)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21934004, 21627811) and the National Fund for Fostering Talents of Basic Science (No. J1310024).