

潘丽娜, 唐溶雪, 康文丽, 等. 物理诱变和高通量筛选在益生菌选育中的应用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 458–465. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090175

PAN Lina, TANG Rongxue, KANG Wenli, et al. Application of Physical Mutagenesis and High Throughput Screening Technology in the Selection of Probiotics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 458–465. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090175

· 专题综述 ·

物理诱变和高通量筛选在益生菌选育中的应用

潘丽娜^{1,2,3,4}, 唐溶雪^{2,3}, 康文丽^{2,3,4}, 李意思^{2,3}, 胡鹏钰^{2,3}, 汪家琦^{2,3,4}, 周洪波^{1,4,*}

(1. 中南大学资源加工与生物工程学院, 湖南长沙 410083;

2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410127;

3. 湖南澳优食品与营养研究院, 湖南长沙 410299;

4. 人体微生态制品湖南省工程研究中心, 湖南长沙 410017)

摘要:野生型菌株活性较低, 难以满足工业化需求, 通过使用物理诱变方法可改善菌种性能, 进而获得高产、优质菌株。同时需寻找快速、合适的筛选方法从突变文库中获得理想目标菌株。传统人工筛选及摇瓶培养成本高、耗时耗力, 高通量筛选技术解决了这一难题。本文探讨了传统及新型物理诱变技术原理, 对比了两类诱变技术的区别及阐述了其在益生菌选育中的应用。同时总结了各高通量筛选技术(微量滴定板筛选、荧光激活细胞分选、生物传感器的筛选、液滴微流控平台筛选及模式动物平台的筛选)的特点及其在益生菌筛选的相关应用。本文为后续降低筛选成本、提高筛选效率、获得高产理想目标菌株提供重要参考。

关键词:物理诱变, 高通量筛选, 益生菌, 应用

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)13-0458-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090175



本文网刊:

Application of Physical Mutagenesis and High Throughput Screening Technology in the Selection of Probiotics

PAN Lina^{1,2,3,4}, TANG Rongxue^{2,3}, KANG Wenli^{2,3,4}, LI Yisi^{2,3}, HU Pengyu^{2,3},
WANG Jiaqi^{2,3,4}, ZHOU Hongbo^{1,4,*}

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2. Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd., Changsha 410127, China;

3. Ausnutria Food and Nutrition Research Institute, Changsha 410299, China;

4. Hunan Engineering Research Center of Human Microecological Products, Changsha 410017, China)

Abstract: Wild-type strains hardly meet the current industrial demands due to low stability. The performance of microbial strains (high-yielding, high-quality strains) can be improved by using physical mutagenesis techniques. At the same time, high throughput screening methods and techniques can be used to quickly obtain ideal strains from the mutation library. However, traditional manual screening and shaker culture are high-cost, time-consuming, and laborious, and high-throughput screening technology can solve this problem. In this review, the applications of traditional and novel mutagenesis used for the improvement of probiotics are summarized, the principles of traditional and novel physical mutagenesis techniques are discussed, the differences between the two kinds of mutagenesis techniques are compared and their applications in the improvement of probiotics are described. At the same time, the characteristics and relevant applications of various high-throughput screening technologies (microtitration plate screening, fluorescence activated cell

收稿日期: 2022-09-19

基金项目: 湖南省创新平台与人才计划“湖南省营养健康品工程技术研究中心”项目(2019TP2066)。

作者简介: 潘丽娜(1982-), 女, 博士研究生, 研究方向: 资源与环境, E-mail: lina.pan@ausnutria.com。

* 通信作者: 周洪波(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物工程, E-mail: zhouhb@csu.edu.cn。

sorting, biosensors screening, droplet microfluidic platform screening and model animal platform screening) are summarized. This review provides important reference for reducing screening cost, improving screening efficiency and obtaining high yield ideal target strains.

Key words: physical mutagenesis; high-throughput screening; probiotics; application

世界卫生组织和联合国粮农组织提出了益生菌的定义,即当摄入足量时,益生菌为一类对宿主健康有益的活的微生物^[1]。但在食品中,益生菌仍需满足 4 个条件:一是菌株需被充分表征,包括鉴定和命名;二是必须是安全的,不能含有抗生素耐药基因或毒力因子;三是必须有至少一个符合科学标准设计的人体临床试验,来证实安全性和健康益处;四是在整个货架期内须保证菌株活性^[2]。根据 Sanders 等^[3]综述阐述,益生菌分为三大类:一是传统益生乳酸菌,分为乳杆菌、双歧杆菌、乳球菌、链球菌等;二是非乳酸菌益生菌,包括凝结芽孢杆菌、丁酸梭菌、大肠杆菌 Nissle1917 等;三是新一代益生菌,包含阿克曼氏菌、脆弱拟杆菌、柔嫩梭菌、解木聚糖拟杆菌等。

野生型菌株具有产量低、耐受性低、稳定性低、代谢产物不丰富等特点,难以满足工业化需求,需开展微生物育种技术提高野生型菌株性能,其中诱变育种是通过人工诱变手段改变微生物遗传结构和功能的基因突变技术^[4],诱变育种一般分为物理、化学、生物及复合诱变,但在益生菌菌种选育中,大多采用物理诱变技术,诱变因素主要包括紫外线(Ultraviolet, UV)、激光、 γ -射线、激光射线等。若反复使用某一诱变源,会导致菌株突变率降低,突变谱变窄,有些工业菌株甚至会产生耐受性^[5]。针对这一现状,随之出现了更多新型物理诱变技术,特别是常压室温等离子体(Atmospheric room temperature plasma, ARTP)、重离子束辐射(Heavy ion beam irradiation, HIB)和低能离子注入(Low-energy ion implantation, LEIP)等技术。

实现突变文库的精准快速筛选是获得高产量、性状优良目标菌株的关键环节,但是传统筛选方法仍依赖于人工选择和摇瓶培养,整个筛选培养步骤繁琐、效率低、成本高^[6]。同时筛选理想目标菌株并进行工业化批量生产也是一项巨大挑战,传统摇瓶培养技术难以满足实际应用需求。经研究人员不懈努力,不同益生菌诱变方法已日趋成熟,面对庞大的微生物突变体文库,如何寻求合适、高效的高通量筛选方法,特别对于工业益生菌来说,如何选择多种诱变技术构建一个多样化筛选文库以扩大筛选范围及如何通过可行的检测方法,增加可识别的目标代谢产物,进而实现高通量筛选的目的^[7]是目前需要解决的问题。因此,本文梳理总结了益生菌物理诱变相关研究,并分类综述高通量筛选方法及其在益生菌的应用现状,希望为后续相关研究者们提供参考。

1 传统物理诱变技术及应用

目前工业微生物菌种改良的传统诱变方法主要

包括紫外、激光、微波诱变等,各方法的诱变机制差异较大,应用场景也各有侧重。紫外诱变机制是形成嘧啶二聚体,使 DNA 双链结构扭曲变形,特别在复制和转录中,嘧啶二聚体难以分离,碱基配对受阻,导致微生物突变和死亡^[8]。该方法所使用设备小,操作简单、较安全且诱变率中等。其缺点是诱变原理简单,容易引起单一突变,形成的突变体类型较少^[9]。在提高产物产率方面,卢承蓉等^[10]将出发菌株乳酸片球菌 L15 进行紫外诱变,从中获得改良菌株的胞外多糖产量可达 232.34 mg/L,比出发菌株提高 56.46 mg/L。在提高菌株环境耐受力方面,饶甜甜等^[11]将嗜酸乳杆菌 FZU-LA1301 经一系列紫外诱变及高温梯度驯化后筛选出一株耐温性优良的嗜酸乳杆菌突变菌株,使该菌株的适应温度从 37 ℃ 提高至 45 ℃。

激光诱变的生物学效应主要包括热、光、电磁场、压力等综合效应,经过以上效应累积,使细胞中 DNA 分子吸收、能量聚积后再进行能量分配,进而引起生物体内蛋白变性、DNA 损伤等^[12]。激光诱变安全性仍未研究清楚,操作较为复杂,成本高,不具备商业实用性^[13]。在提高底物利用率方面,Elshagha-bee 等^[14]将出发菌株干酪乳杆菌 NRRL-B-1922 激光诱变,筛选后的突变菌株能丰富发酵乳制品风味,提高其抗氧化及蛋白水解能力。

微波诱变产生的主要是热效应和非热效应,刺激微生物体内水分、蛋白质、核酸、脂肪等极性分子成分快速振荡、摩擦,从而导致组织细胞内氢键、疏水键、范德华力发生变化,最后导致生物体内 DNA 结构发生变化^[15]。该方法操作简单,较安全,具有高诱变效率,但利用专业设备进行育种研究的报道很少,大多局限于家用微波炉育种^[16]。在提高产物产率方面,柯薇等^[17]对乳酸杆菌进行微波诱变,其目标菌株的共轭亚油酸产量比出发菌株提高 41.4%。综上所述,传统诱变技术在益生菌上的应用主要体现在提高菌株环境耐受性、提高产物产率、提高底物利用率等,详细应用如表 1 所示。

2 新型物理诱变技术及应用

在食品工业中,人们对高效诱变技术的需求逐渐增加,主要由于在菌株选育中反复使用某一种诱变源,严重影响突变率,导致突变谱变窄,因此引进了一些新型物理诱变方法,其与传统诱变方法相比有较大优势,如诱变率增加、突变谱增宽等。比如曲德辉^[18]采用 UV、ARTP、钴-60(Co^{60})对桑黄菌株进行诱变,结果显示 ARTP 诱变效果最佳,正突变率最大,优势菌株最多。传统诱变与新型诱变技术的具体差异如表 1 所示。

表 1 物理诱变技术对比

Table 1 Comparison of physics mutagenesis technology

传统物理诱变技术	安全性	操作便捷性	突变率	突变谱	对液体培养物的穿透能力	设备/系统尺寸	成本	商业可用性	参考文献
紫外诱变	低	简单	中等	限制	弱	小	低	可用	[7]
激光诱变	未知	复杂	高	未知	未知	中等	高	不可用	[13]
微波诱变	低	简单	高	宽	未知	中等	中等	可用	[16]
ARTP	高	简单	高	宽	弱	小	中等	可用	[7]
HIB	未知	复杂	高	宽	强	大	高	不可用	[19-20]
LEIP	未知	复杂	高	宽	弱	大	高	不可用	[19]

2.1 常压室温等离子体诱变

常见新型物理诱变技术有 ARTP、HIB、LEIP 诱变等,其机制和优势各不相同。其中 ARTP 诱变技术是基于放电原理,主要以高纯氦气为气体,经 ARTP 诱变处理后,转换为高能活性粒子,这些粒子进入细胞后作用于 DNA,导致 DNA 结构被破坏,引发 DNA 启动紧急修复,在修复中会使大量碱基产生错配位点,造成突变^[21]。ARTP 诱变技术在益生菌上的应用具体体现在提高产物产量上,比如提高有机酸产量。殷娜等^[22]采用 ARTP 诱变技术处理植物乳杆菌,与出发菌株相比,其目标菌株产酸能力提高 50%。此外 ARTP 诱变技术也能促进目标菌株提高 γ -氨基丁酸产量,张敏^[23]对粪肠球菌进行 7 轮 ARTP 迭代诱变,最终获得突变株产量达 7.246 g/L,较出发菌株提高了 104.7%。其次,在环境胁迫耐受性方面,通过 ARTP 诱变可有效提高嗜酸乳杆菌的酸耐受性^[24]。最后迭代 ARTP 诱变是一种提高菌株多个属性的强大策略,多重诱变可生成高产乙酸及酸耐受的突变体^[25-26]。ARTP 可有效改善菌株特性,但仍有一些理论及技术问题需要进一步探讨,其一是需要制定标准操作流程阐明不同生长阶段微生物对 ARTP 诱变的敏感性;其二是需要利用多组学技术深入研究 ARTP 致突变机理,拓宽 ARTP 诱变技术在益生菌选育中的应用。

2.2 重离子束辐射

HIB 技术能产生高线性能量传递,增加微生物细胞中 DNA 双链断裂比例,最终导致大量的 DNA 缺失或者重排^[27]。重离子束诱变技术多用于提高产物产量上,江爱莲^[28]以嗜热乳杆菌 SRZ-50 为初始菌株,筛选后优良菌株 A59 与 A69 分别比原始菌株 L-乳酸积累提高了 15.8% 和 16.2%,并且 2 株突变菌株连续 7 代产酸较稳定。麻和平等^[29]利用重离子束 $^{12}\text{C}^{6+}$ 对产细菌素植物乳杆菌 Lp1 进行辐照选育,通过双层琼脂扩散法筛选高产细菌素突变菌株。另外,在提高耐受性方面,田雪娇^[30]采取重离子束诱变与压力富集联用策略,获得高耐受菌株 G-1 和 G-10,其摇瓶发酵验证表明,在高糖和低糖浓度条件下,高耐受菌株的糖酵解途径中的关键酶活性,均高于出发菌株。最后,在增强体外抑菌性方面,蒋威等^[31]利用重离子加速器释放的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子束作为辐射诱变源,以酸斑值和抑菌圈值为指标,对鼠李糖乳杆菌

JF12-1 进行功能性诱变,筛选后得到 8 株体外抑菌性较原始野生菌株提高 15% 以上的菌株。总之,依托重离子束诱变技术,可有效改良微生物,为我国微生物菌种产业化应用提供了研究平台,但是此设备稀缺,价格昂贵,国内研究多集中于中国科学院近代物理研究所,普遍产业化仍存在瓶颈。

2.3 低能离子注入

LEIP 诱变技术作用于生物体后,能产生能量沉积、动量传递、质量沉积、电荷中和与交换,这四种生物效应联合作用,继而产生较高的突变率和更丰富的诱变图谱^[32]。目前,利用离子注入进行微生物选育时,所选用的离子大多为气体单质正离子,其中以 N^+ 最多, H^+ 、 Ar^+ 等也有应用^[33]。低能离子注入诱变技术主要有以下几方面特点,其诱变率高、可控性强、可实现 DNA 大分子转导^[34]。此技术多应用于酿酒酵母等真菌^[35],在益生菌的应用主要在提高产物产量方面,Li 等^[36]等采用 N^+ 离子注入法对干酪乳杆菌 CICC6028 进行诱变,研究发现突变株高产乳酸,比出发菌株提高了 38.8%。在益生菌选育过程中,若长期使用一种诱变方式,则会产生“疲劳效应”,甚至影响菌株的生长周期、代谢等,导致诱变效果差^[5]。因此可采用复合诱变或多重诱变形式,提高诱变效率,选育出优良菌株。新型物理诱变在益生菌上的详细应用如表 2 所示。

3 高通量筛选技术及应用

诱变仅是微生物育种的第一步,不同诱变技术能产生大量突变体,因此从突变文库中筛选商业化的优良菌株具有巨大的挑战性。传统的筛选技术往往依赖于人工分离纯化及试管培养等,费时费力、繁琐且低效。在众多科研人员的努力下,多种新型高效的高通量筛选方法应运而生,主要包括微量滴定板筛选、荧光激活细胞分选、生物传感器的筛选、液滴微流控平台筛选及模式动物平台的筛选(表 3)。

3.1 微量滴定板筛选

微量滴定板(Microtiter plate, MTP)筛选技术具有中等处理量、自动化筛选、低成本等特点,成为众多科研人士所青睐的初步筛选技术平台。对于目标菌株的筛选而言,选择紫外-可见光谱的方法较为普遍,该方法可分为直接筛选和间接筛选。其中直接筛选是基于比色法原理,主要筛选分子结构相对复杂或产特殊色泽代谢物的菌株,根据不同颜色差异及深

表 2 物理诱变在益生菌育种中的应用

Table 2 Application of physics mutagenesis in probiotics breeding			
诱变菌株	诱变方法	改善性状	参考文献
提高产物产率/产量			
乳酸片球菌L15	紫外诱变	改良菌株胞外多糖产量可达232.34 mg/L, 比出发菌株提高56.46 mg/L	[10]
乳酸菌 L--SZ303	紫外诱变	目标菌株发酵液中 γ -氨基丁酸产量14.646 g/L, 比出发菌株提高了1.271 g/L	[37]
枯草芽孢杆菌HDBF-DJ3N7	激光诱变	突变菌株纤维素酶活力提升18.40%, 其酶活力值达到了429.89 $\pm$ 5.74 IU/mL	[38]
乳酸杆菌	微波诱变	目标菌株产共轭亚油酸多达48.85 μ g/mL, 与诱变前相比提高了41.4%	[17]
植物乳杆菌	ARTP	与初始菌株相比, 目标菌株产酸能力提高了50%, 产酸量为0.015 mol/L	[22]
干酪乳杆菌	HIB	目标菌株乳酸产量较原始菌株提高41.6%~83.3%	[39]
嗜热乳酸菌	HIB	突变体高产L-(+)-乳酸, 产量为23.24 $\pm$ 0.66 g/L, 与野生型相比有显著增加	[27]
干酪乳杆菌CICC6028	LEIP	突变株高产L-(+)-乳酸, 产量为136 g/L, 比原菌株提高了38.8%	[36]
提高菌株环境耐受力			
嗜酸乳杆菌FZU-LA1301	UV	目标菌株能耐受45 $^{\circ}$ C, 比出发菌株(37 $^{\circ}$ C)提高8 $^{\circ}$ C	[11]
嗜酸乳杆菌	ARTP	突变体在pH为2、3的条件下培养3 h, 其乳酸胁迫耐受性分别提高了75.67%和25.78%, 且与亲本菌株(76.2%)相比, 具有更高的疏水性(87.2%)	[24]
鼠李糖乳杆菌JF12-1	HIB	8株改良菌株的体外抑菌性比野生菌株提高15%以上	[31]
提高底物利用率			
干酪乳杆菌NRRL-B-1922	激光诱变	突变菌株发酵乳制品后抗氧化及蛋白水解能力分别显著提高41%和14%	[40]

表 3 高通量筛选技术对比

Table 3 Comparison of high-throughput screening techniques				
类型	测定指标	筛选设备	筛选方法	检测指标
微量滴定板的筛选	吸光度值	紫外/可见光谱	直接筛选	番茄红素 ^[41] 、 β -胡萝卜素 ^[42] 、对香豆酸 ^[43]
			间接筛选	L-乳酸 ^[44]
荧光激活细胞分选	荧光强度	流式细胞仪	直接筛选	核黄素 ^[46]
			间接筛选	L-多巴 ^[48]
生物传感器的筛选	电信号强度	生物传感器	蛋白质生物传感器	黄酮类化合物 ^[51] (转录因子)
			核酸生物传感器	维生素B2 ^[54] (RNA核糖体开关)
液滴微流控平台筛选	荧光信号	液滴微流控筛选系统	表型筛选	α -淀粉酶 ^[55]
			组学筛选	多种代谢物
模式动物平台筛选	荧光强度	高内涵细胞成像系统、荧光倒置显微镜	表型筛选	生存、行为能力; 果蝇眼睛发育、斑马鱼胚胎发育 ^[59] 等表型
			益生菌体内筛选	益生菌定植

浅初步判定菌株所产代谢物的种类和产量。比如产番茄红素^[41]、 β -胡萝卜素^[42]、对香豆酸^[43]等。有些菌株产生的代谢物没有显著的吸光度特性, 难以直接检测, 可通过间接筛选方法进行检测, 比如可加入pH 指示剂来筛选目标菌株。Lü等^[44]使用三步高通量筛选方法, 包含突变菌株分析、pH 传感测定、L-乳酸氧化酶(LOD)测定, 并使用 U 型深孔微量滴定板筛选产乳酸的凝结芽孢杆菌。Jiang 等^[45]以溴甲酚紫为 pH 指示剂, 采用 24 孔 U 型底深孔微量滴定板从 HIB 突变菌库中筛选高产 L-乳酸的嗜热乳杆菌。可见采取 MTP 筛选方法, 可将菌株代谢物直接或间接与光度指标相关, 实现快速筛选突变菌的目标, 但还需进一步摸索更多高效方法应用于益生菌的筛选。

3.2 荧光激活细胞分选

与紫外/可见光谱法的高通量筛选方法相似, 荧光激活细胞分选的高通量筛选根据目标产物特性进行筛选, 主要分为直接和间接筛选方法, 细胞内含有荧光代谢物或产生可被荧光染色的物质可采取直接

筛选方法。Chen 等^[46]利用荧光激活细胞直接筛选乳酸乳球菌突变体, 其菌株主要分泌固有荧光的维生素 B₂(核黄素)。如果细胞本身缺乏荧光代谢物, 可采取间接筛选方法, 其一是可添加与代谢物产生颜色或荧光的试剂, 之后通过设置特定波长激发细胞内荧光信号, 并根据荧光的强弱来进行细胞分选。Bonomo 等^[47]利用流式细胞技术, 采取 SYBR Green II RNA 凝胶和碘化丙啶两种核酸染色, 准确评估和分选高温和酸胁迫后的酒清乳杆菌。其二是引入外源酶进行酶偶联反应产生荧光代谢物。Deloache 等^[48]引入植物的二羟基苯丙氨酸双加氧酶加入到酿酒酵母体内, 其中引入外源酶能将 L-多巴转化为带有黄色荧光的甜菜黄素, 进而筛选出高产 L-多巴的菌株。通过荧光激活细胞技术可直接或间接筛选目标代谢物, 但在筛选肠道细菌时, 却面临着不可培养的细菌菌株, 且难以区分是活细菌还是死细菌产生的目标代谢物^[49]。因此需结合荧光激活细胞分选技术、培养组技术及高通量测序技术, 构建宏基因组—培养组联用的新型方法, 精准筛选出产目标代谢物的活菌。

3.3 生物传感器的筛选

高通量筛选有时会因为目标产物和关键中间代谢物难以通过直接或间接颜色或荧光反应来检测,而微生物体内存在特定蛋白质或核酸,这些物质能够识别相应细胞内特定的代谢物,并转化为特定信号输出,利用信号强度来判定代谢物浓度,因此可采取生物传感器的荧光光谱筛选目标菌株^[50]。其一是蛋白质生物传感器,主要是转录因子、荧光蛋白生物传感器。近年来,相关研究人员侧重于研究天然转录因子,并开发了不同生物传感器,响应柚皮素等黄酮类化合物及其他物质^[51],这些转录因子有的可与基因启动子/增强子部分相结合,促使或阻断 RNA 聚合酶参与转录,使基因表达受到影响,影响细胞内小分子代谢物的浓度、荧光强度等检测信号,以达到高通量筛选目的。其二是核酸生物传感器,主要是 RNA 核糖体开关和结构切换的 DNA 生物传感器^[52-53]。核糖体开关主要包含适配子和基因调控部分,若小分子配体与适配子结合,引起 RNA 构象变化,进而影响基因调控结构域活性,并且在转录、翻译过程中导致蛋白质合成受到影响。利用以上调控机制,可设计筛选菌株响应目标代谢物的高通量筛选生物传感器。有研究采用基因工程修饰枯草芽孢杆菌 4511 为研究对象,该菌株结合大肠杆菌内部传感器细胞将起始原料纤维二糖转化为工业产物维生素 B2^[54]。在传感器细胞中产物形成需要经过一系列反应:维生素 B2 转化为黄素单核苷酸(FNM),此外通过 RNA 核糖体开关和 RNA 的自切割结合 FNM,促进合成绿色荧光蛋白(GFP),并通过 GFP 的荧光强度来筛选枯草芽孢杆菌突变体。

3.4 液滴微流控平台筛选

液滴微流控技术是一种具有高通量和高分辨率特性的筛选技术,能显著降低筛选时间和成本,可同时检测 150 万个样本量,并且该技术能快速控制微环境的动态变化,明显改善了研究人员控制微生物体系和筛选优良菌株的能力。单个细胞能被限制在液滴内,实现表型筛选及高通量组学分选能力。表型筛选技术可筛选菌株代谢物生产能力、底物利用率及代谢路径酶等。Sjostrom 等^[55]利用紫外诱变酵母菌(表达 α -淀粉酶),利用液滴微流控技术从 10^5 个突变文库中筛选出一株稳定的 α -淀粉酶高产菌株,可见该平台的筛选效率显著提高。另外,液滴微流控平台可实现高通量组学分选,包含基因组、转录组、蛋白质组、表观遗传基因组等,能快速实现单细胞培养及捕获,并可有效结合测序技术和液滴微流控,实现广泛测序应用。Abate 等^[56]采用液滴微流控平台的基因型分选系统,利用荧光标记的 DNA 探针和目标模板共同封装于液滴中,若出现探针和靶序列互补,通过信号振幅,分辨出碱基匹配和错配的情况,实现菌株基因型快速分选。基于液滴微流控筛选微生物,能实现表型筛选,并能结合组学技术进行筛选。但是

细胞的某方面分子信息难以解释复杂行为,细胞主要由多方面共同决定的,包含基因组、转录组及蛋白组等,因此需要集成多组学检测工具及生物信息学数据进行分析,为目标突变菌株绘制全面的分子谱图^[57]。最新研究采用纳米孔道测序技术应用于多组学高通量集成检测,特别在 DNA 测序、RNA 测序、DNA 修饰检测等取得了突破进展^[58]。希望未来此技术将极大促进单细胞多组学检测技术在益生菌高通量筛选方面的应用。

3.5 模式动物平台筛选

基于斑马鱼、果蝇、秀丽线虫等模式动物具有遗传适应性、低成本、大规模筛选等特点,可利用高内涵成像技术,配备大粒径的模式生物分选系统,快速捕捉整个生物或细胞图像,进行益生菌的高通量筛选,其中斑马鱼的高通量筛选平台主要包含两种筛选,一是表型结果筛选,利用斑马鱼胚胎进行荧光成像。例如,通过吖啶橙染色检测斑马鱼胚胎凋亡情况^[59]。对于益生菌的研究而言,Gallego^[60]使用荧光细菌实时监测斑马鱼胃肠道中益生菌定植情况,以评估益生菌潜在定植能力。二是基于定量水平上评估转录结果,同时也是作为 qRT-PCR 通量的一种手段。可通过微流控技术的低密度微阵列应用于斑马鱼疾病模型评估干预的有效性^[61]。

对于秀丽线虫而言,其一是通过存活表型实现高通量筛选。比如采取 SYTOX green/orange 或碘化丙啶(PI)进行筛选^[62-63]。其二是以脂肪含量为指标进行筛选,利用油红染色及尼罗红染色检测线虫体内脂肪含量和分布情况^[64-65]。其三,以绿色荧光蛋白(GFP)为筛选指标,通过构建 GFP 秀丽线虫株,实现突变体、化合物筛选^[66-67]。倪彩新等^[68]以秀丽线虫为模型,通过体外抗氧化指标和线虫寿命评估 24 株乳酸菌的抗氧化能力。

果蝇模型是一种了解宿主—肠道微生物群相互作用的理想高通量体内模型^[69]。其高通量筛选策略大多基于表型筛选,包括评估幼虫发育和成虫从蛹中孵化的生存能力或通过荧光标记物(GFP 标记蛋白)来筛选。比如可以通过流式细胞术检测果蝇胚胎中标记物的荧光,还可将胚胎放入含有底物和药物的 96 或 384 孔板中,还可通过检查眼睛的发育和粗糙程度来进行半自动化筛选^[70]。但是对于益生菌而言,采用果蝇模型进行高通量筛选技术寻找特定功能益生菌的应用较少,仅有采用果蝇模型评估益生菌定植能力的研究。Gómez 等^[71]以无菌黑腹果蝇种群为主要研究对象,用鼠李糖乳杆菌 LGG 或动物乳杆菌 BB12 培养无菌个体,评估益生菌的定植能力,结果发现动物乳杆菌 BB12 和鼠李糖乳杆菌 LGG 能够定植,但是鼠李糖乳杆菌 LGG 定植较低。斑马鱼、果蝇、线虫等模式动物筛选具有成本低、效率高等特点,对益生菌选育来说,是尚未被充分利用的宿主—微生物共生机制模型,未来将探讨如何利用细胞群成

像技术,实现单细胞多参数评估,比如在预测目标菌作用靶点方面将提供巨大的应用前景。

4 总结与展望

本文总结了传统物理诱变技术和新型物理诱变技术原理、益生菌诱变条件及诱变改善范围,并对比了传统诱变技术和新型物理诱变技术的区别。虽然物理诱变技术多样,但各有优劣。当部分诱变技术作用机理不明确时,切勿盲目实验,研究人员需要根据菌株实际特性选择合适的诱变方法。对常见诱变剂已产生抗性的菌株,难以获得理想突变菌株时,研究人员需要根据菌株的具体特性及实验室具体条件进行优化,或者采取多重诱变、复合诱变方式,提高菌株突变及改良效率。随着基因技术及新型诱变技术的结合,使高效、定点微生物诱变成为可能,诱变育种工程逐渐深入将选育更多优良菌株,推动微生物选育工作高速发展。

高通量筛选技术推动菌种进化工程,可有效改善微生物菌株环境耐受性、提高底物利用、代谢物生产等。本文总结了 5 大类高通量筛选技术,但对于益生菌突变菌株筛选而言,高通量筛选技术在实际应用中很少,高通量筛选的应用一般仅适用于特定代谢物、酶或者特定代谢途径的筛选,范围窄,普遍适用性不高。生物传感系统对于高通量筛选、微量培养及实时监测微生物培养等方面起着核心作用,随着合成生物学及基因编辑技术的发展,未来科学家们可在准确度及精度多方面开发特异性响应的小分子的生物传感器,推动微生物自动化筛选和自动化数据分析发展,构建模拟工业规模条件的高通量筛选平台。

参考文献

- [1] MARCO M L, SANDERS M E, GANZLE M, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(3): 196–208.
- [2] BINDA S, HILL C, JOHANSEN E, et al. Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020: 1662.
- [3] SANDERS M E, MERENSTEIN D J, REID G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 16(10): 605–616.
- [4] 王雅君,陈力力,廖杰琼,等.微生物物理诱变育种方法的研究进展[J]. *农产品加工(学刊)*, 2013(3): 25–31. [WANG Y J, CHEN L L, LIAO J Q, et al. Research progress on microbiological physical mutagenesis breeding methods[J]. *Agricultural Processing*, 2013(3): 25–31.]
- [5] 杨小冲,陈忠军.新型物理诱变技术在微生物育种中的应用进展[J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 242–245. [YANG X C, CHEN Z J. Application progress of new microorganism physical mutation breeding technology[J]. *Food Industry*, 2017, 38(3): 242–245.]
- [6] ALEEM B, RASHID M H, ZEB N, et al. Random mutagenesis of super Koji (*Aspergillus oryzae*): Improvement in production and thermal stability of α -amylases for maltose syrup production[J]. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 1–13.
- [7] ZENG W, GUO L, XU S, et al. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888–906.
- [8] IKEHATA H, ONO T. The mechanisms of UV mutagenesis[J]. *Journal of Radiation Research*, 2011, 52(2): 115–125.
- [9] ZHOU S, ALPER H S. Strategies for directed and adapted evolution as part of microbial strain engineering[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(2): 366–376.
- [10] 卢承蓉,叶美芝,上官文丹,等.高产胞外多糖乳酸菌的诱变育种及其益生特性[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(12): 14–20. [LU C R, YE M Z, SHANGGUAN W D, et al. Mutagenesis breeding of high-yield exopolysaccharides lactic acid bacteria and evaluation its probiotic properties[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(12): 14–20.]
- [11] 饶甜甜,郭虹雯,赵惠茹,等.紫外诱变及高温驯化联用筛选耐高温嗜酸乳杆菌[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(9): 129–135. [RAO T T, GUO H W, ZHAO H R, et al. Screening of thermotolerant *Lactobacillus acidophilus* strain by UV mutation and high temperature acclimation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(9): 129–135.]
- [12] BANIK S, BANDYOPADHYAY S, GANGULY S. Bioeffects of microwave: A brief review[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 87(2): 155–159.
- [13] 高宏正,李国强,邓素贞,等.微生物诱变育种概况及激光在微生物诱变中的应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(9): 53–56. [GAO H Z, LI G Q, DENG S Z, et al. Overview of microbial mutation breeding and the application of laser in microbial mutation[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(9): 53–56.]
- [14] ELSHAGHABEE F M F, EL-HUSSEIN A, MOHAMED M S M. Enhancement of labneh quality by laser-induced modulation of *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-1922[J]. *Fermentation*, 2022, 8(3): 132.
- [15] KUBO M T K, SIGUEMOTO E S, FUNCIA E S, et al. Non-thermal effects of microwave and ohmic processing on microbial and enzyme inactivation: A critical review[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2020, 35: 36–48.
- [16] 张志军,崔承彬,李长伟.微波诱变在药源微生物菌株选育中的应用[J]. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(6): 426–434. [ZHANG Z J, CUI C B, LI C W. Application of microwave mutagenesis in microorganism breeding for medicinal source strain improvement[J]. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2010, 37(6): 426–434.]
- [17] 柯薇,张楚.产共轭亚油酸菌株的微波诱变[J]. *现代食品*, 2020(10): 87–89, 93. [KE W, ZHANG C. Microwave mutagenesis of CLA producing strain[J]. *Modern Food*, 2020(10): 87–89, 93.]
- [18] 曲德辉.桑黄菌种的诱变对其菌丝活力和代谢产物影响的研究[D].上海:上海海洋大学,2016. [QU D H. Study on mutation breeding of *Sanghuang porus Sanghuang* and analysis with strain activities and metabolite production[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.]
- [19] YU Q, LI Y, WU B, et al. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: Advances and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1517–1531.
- [20] LEE Y, OKAYASU R. Strategies to enhance radio sensitivity to heavy ion radiation therapy[J]. *International Journal of Particle Therapy*, 2018, 5(1): 114–121.

- [21] ZHANG X, ZHANG X F, LI H P, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387–5396.
- [22] 殷娜, 严小玉, 马珊, 等. 常压室温等离子体诱变选育高产酸植物乳杆菌[J]. *中国酿造*, 2020, 39(1): 77–81. [YIN N, YAN X Y, MA S, et al. Breeding of high-yield acid *Lactobacillus plantarum* by atmospheric plasma at room temperature[J]. *China Brewing*, 2020, 39(1): 77–81.]
- [23] 张敏. γ -氨基丁酸乳酸菌诱变选育及其发酵条件优化[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2020. [ZHANG M. Mutagenesis and breeding of γ -aminobutyric acid lactobacillus and optimization of fermentation conditions[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2020.]
- [24] LIU K, FANG H, CUI F, et al. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 6363–6373.
- [25] WU B, QIN H, YANG Y, et al. Engineered *Zymomonas mobilis* tolerant to acetic acid and low pH via multiplex atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1–13.
- [26] OTTENHEIM C, NAWRATH M, WU J C. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): The latest development[J]. *Bioresour and Bioprocess*, 2018, 12(5).
- [27] HU W, LI W, CHEN J. Recent advances of microbial breeding via heavy-ion mutagenesis at IMP[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 65(4): 274–280.
- [28] 江爱莲. 基于高效的重离子束诱变技术选育高产 L-乳酸菌株的研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2019. [JIANG A L. Breeding of high-yield L-lactic acid strains based on high-efficiency heavy ion beam mutagenesis[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019.]
- [29] 麻和平, 彭章普, 张文齐, 等. 重离子束辐照选育高产细菌素植物乳杆菌[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(15): 139–143. [MA H P, PENG Z P, ZHANG W Q, et al. Study on mutation breeding of high-yield bacteriocin *Lactobacillus plantarum* by heavy ion beam irradiation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(15): 139–143.]
- [30] 田雪娇. 重离子束辐照选育高产乳酸菌株及其发酵工艺技术研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2022. [TIAN X J. Breeding of high-yield lactic acid strains by heavy ion beam irradiation and its fermentation technology[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2022.]
- [31] 蒋威, 沈文祥, 郑娟善, 等. 奶牛源鼠李糖乳杆菌的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子束诱变选育[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(17): 140–148. [JIANG W, SHEN W X, ZHENG J S, et al. Mutation breeding of *Lactobacillus rhamnosus* from dairy cow by $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ion beam[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(17): 140–148.]
- [32] GU S B, LI S C, FENG H Y, et al. A novel approach to microbial breeding-low-energy ion implantation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 201–209.
- [33] 王岁楼, 吴晓宗, 陈德经, 等. 低能离子注入对产胡萝卜素红酵母 NR06 的诱变效应研究[J]. *食品工业科技*, 2008(2): 107–110. [WANG S L, WU X Z, CHEN D J, et al. Mutagenic effect of ions implantation on the carotene-producing *Rhodotorula* NR06[J]. *Journal of Food Research*, 2008(2): 107–110.]
- [34] 周颖欣. 利用低能离子注入转化酵母技术全合成银杏内酯 B 的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2016. [ZHOU Y X. Engineering of ginkgolide B-producing yeast strain using low-energy ion implantation[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2016.]
- [35] 白巧秀, 欧科, 王婷, 等. 低能离子注入诱变酿酒酵母菌胞外代谢产物的差异性分析[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(9): 43–49. [BAI Q X, OU K, WANG T, et al. Difference analysis of the extracellular metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* mutagenized by low-energy ion implantation[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2021, 37(9): 43–49.]
- [36] LI S C, ZHU Z Y, GU S B, et al. Screening of a L-lactic acid producing strain of *Lactobacillus casei* by low-energy ion implantation[C]. *Advanced Materials Research*, 2012: 471–476.
- [37] 王冰聪. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及发酵条件的优化[D]. 长春: 长春大学, 2019. [WANG B C. Screening of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and optimization of the fermentation conditions[D]. Changchun: Changchun University, 2019.]
- [38] 孙莹, 王海曼, 宋刚, 等. 利用氦氖激光诱变提高枯草芽孢杆菌纤溶酶活力的研究[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(35): 28–36. [SUN Y, WANG H M, SONG G, et al. He-Ne laser mutagenesis increasing the fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(35): 28–36.]
- [39] 李莽莽. 重离子辐照诱变干酪乳杆菌优良菌株选育及在抗结肠癌中的应用[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020. [LI Q Q. Screening of excellent *Lactobacillus casei* strains by heavy ion mutagenesis and its application in anti-colon cancer[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020.]
- [40] 崔国艳, 陈五岭, 周美红. 激光诱变选育耐高温耐酸乳酸菌[J]. *中国酿造*, 2012, 31(10): 153–156. [CUI G Y, CHEN W L, ZHOU M H. Screening of the thermotolerant aciduric lactic acid bacteria by He-Ne laser[J]. *China Brewing*, 2012, 31(10): 153–156.]
- [41] QIANG W, LING R F, LUO W, et al. Mutation breeding of lycopene-producing strain *Blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(1): 452–460.
- [42] LI J, SHEN J, SUN Z, et al. Discovery of several novel targets that enhance β -carotene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1116.
- [43] ZHOU S, LIU P, CHEN J, et al. Characterization of mutants of a tyrosine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(24): 10443–10452.
- [44] LÜ X, SONG J, YU B, et al. High-throughput system for screening of high L-lactic acid-productivity strains in deep-well microtiter plates[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(11): 1737–1747.
- [45] JIANG A L, HU W, LI W J, et al. Enhanced production of L-lactic acid by *Lactobacillus thermophilus* SRZ50 mutant generated by high-linear energy transfer heavy ion mutagenesis[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18(9): 626–634.
- [46] CHEN J, VESTERGAARD M, JENSEN T G, et al. Finding the needle in the haystack—the use of microfluidic droplet technology to identify vitamin-secreting lactic acid bacteria[J]. *MBio*, 2017, 8(3): e00526–17.
- [47] BONOMO M G, MILELLA L, MARTELLI G, et al. Stress response assessment of *Lactobacillus sakei* strains selected as potential autochthonous starter cultures by flow cytometry and nucleic acid double-staining analyses[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(3): 786–795.
- [48] DELOACHE W C, RUSS Z N, NARCROSS L, et al. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast

- from glucose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(7): 465–471.
- [49] BELLALI S, LAGIER J C, MILLION M, et al. Running after ghosts: Are dead bacteria the dark matter of the human gut microbiota[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1897208.
- [50] MICHENER J K, THODEY K, LIANG J C, et al. Applications of genetically-encoded biosensors for the construction and control of biosynthetic pathways[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(3): 212–222.
- [51] RAMAN S, ROGERS J K, TAYLOR N D, et al. Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(50): 17803–17808.
- [52] LIM H G, JANG S, JANG S, et al. Design and optimization of genetically encoded biosensors for high-throughput screening of chemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 54: 18–25.
- [53] CHEN X, ZHANG D, SU N, et al. Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(11): 1287–1293.
- [54] MEYER A, PELLAUX R, POTOT S, et al. Optimization of a whole-cell biocatalyst by employing genetically encoded product sensors inside nanolitre reactors[J]. *Nature Chemistry*, 2015, 7(8): 673–678.
- [55] SJOSTROM S L, BAI Y, HUANG M, et al. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics[J]. *Lab on A Chip*, 2014, 14(4): 806–813.
- [56] ABATE A R, HUNG T, SPERLING R A, et al. DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics[J]. *Lab on A Chip*, 2013, 13(24): 4864–4869.
- [57] VALIHRACH L, ANDROVIC P, KUBISTA M. Platforms for single-cell collection and analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 807.
- [58] GARALDE D R, SNELL E A, JACHIMOWICZ D, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(3): 201–206.
- [59] MALICKI J, JO H, WEI X, et al. Analysis of gene function in the zebrafish retina[J]. *Methods*, 2002, 28(4): 427–438.
- [60] GALLEGO I I. Use of zebrafish to evaluate the probiotic efficacy of lactic acid bacteria[D]. Universidad Del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, 2017.
- [61] LOVE D R, PICHLER F B, DODD A, et al. Technology for high-throughput screens: the present and future using zebrafish[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(6): 564–571.
- [62] GILL M S, OLSEN A, SAMPAYO J N, et al. An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, 35(6): 558–565.
- [63] HUNT P R, OLEJNIK N, SPRANDO R L. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(9): 3280–3290.
- [64] WÄHLBY C, CONERY A L, BRAY M A, et al. High-and low-throughput scoring of fat mass and body fat distribution in *C. elegans*[J]. *Methods*, 2014, 68(3): 492–499.
- [65] PINO E C, WEBSTER C M, CARR C E, et al. Biochemical and high throughput microscopic assessment of fat mass in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2013(73): e50180.
- [66] RODA A. Discovery and development of the green fluorescent protein, GFP: The 2008 Nobel Prize[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(5): 1619–1622.
- [67] SANDERS J K, JACKSON S E. The discovery and development of the green fluorescent protein, GFP[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(10): 2821–2822.
- [68] 倪彩新, 金星, 周炜, 等. 利用线虫模型评价乳酸菌体内抗氧化能力及其与体外抗氧化参数的对比[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(3): 21–27. [NI C X, JIN X, ZHOU W, et al. Evaluation of antioxidant capacity of lactic acid bacteria *in vivo* using *Caenorhabditis elegans* and comparison with its antioxidant parameters[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(3): 21–27.]
- [69] CHASTON J M, NEWELL P D, DOUGLAS A E. Metagenome-wide association of microbial determinants of host phenotype in *Drosophila melanogaster*[J]. *MBio*, 2014, 5(5): e01631–14.
- [70] PANDEY U B, NICHOLS C D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery[J]. *Pharmacological Reviews*, 2011, 63(2): 411–436.
- [71] GÓMEZ E, MARTÍN F, NOGACKA A, et al. Impact of probiotics on development and behaviour in *Drosophila melanogaster*: A potential *in vivo* model to assess probiotics[J]. *Beneficial Microbes*, 2019, 10(2): 179–188.