特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-024

生物设施平台及其工业应用

赵国淼[1,2]，杨鑫[1,2]，张媛[1,2]，王靖[1,2]，谭剑[1,2]，魏超[1,2]，周娜娜[1,2]，李凡[1,2]，王小艳[1,2]
（[1] 中粮营养健康研究院有限公司，北京 102209；[2] 营养健康与食品安全北京市重点实验室，北京 102209）

摘要：传统菌株改造和筛选实验存在操作烦琐、耗时、易错、难以规模化等问题，生物设施平台将自动化、机器人技术、数据分析与生物研究相结合，通过导轨和机械手臂实现自动化操作，提高了实验操作的稳定性，通过缩小培养体积（微孔板或微液滴），提高了培养和筛选通量，解决了上述问题，大大提高了研发效率。本文简单介绍了自动化设施平台的发展和常见的高通量检测方法，重点介绍了中粮营养健康研究院的自动化设施平台，并结合开展的项目叙述了平台在生物燃料菌株开发、传统酿造菌株筛选、酶的定向进化和筛选等领域的应用，可以预见自动化和高通量化在菌株改造和筛选方向巨大的应用价值。实验室自动化是涉及机械工程、自动化、计算机和生命科学等学科的交叉领域，需要各方面共同努力，才能推动实验室向更高程度的自动化和智能化方向发展。

关键词：生物设施平台；自动化；高通量筛选；菌株改造；工业微生物

中图分类号：Q819　　**文献标志码：**A

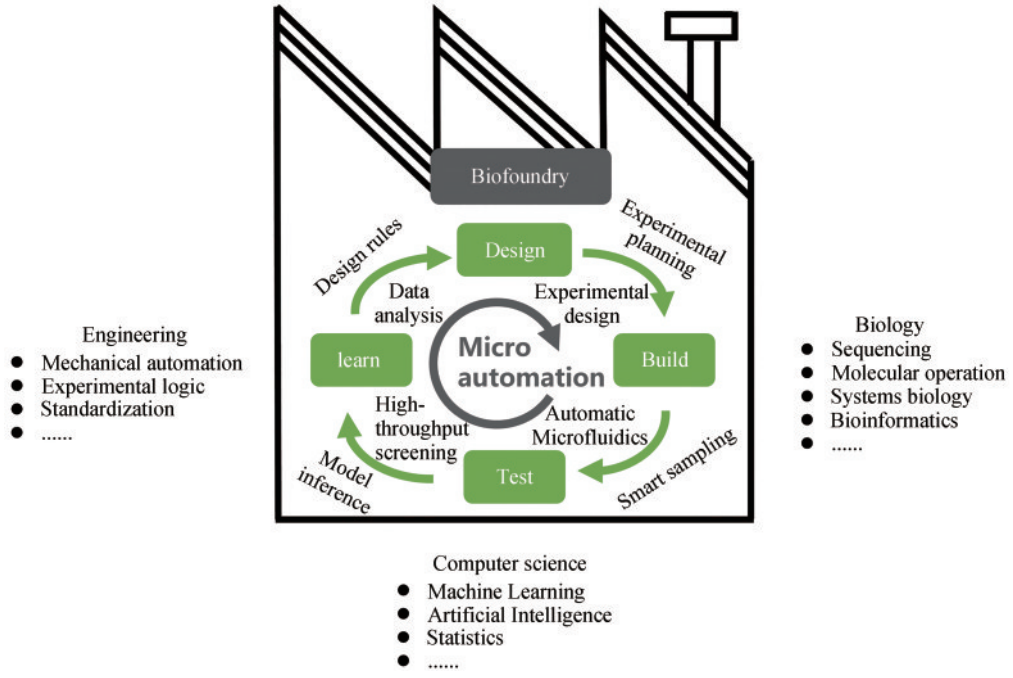
Biofoundry and its industrial application

ZHAO Guomiao[1,2]，YANG Xin[1,2]，ZHANG Yuan[1,2]，WANG Jing[1,2]，TAN Jian[1,2]，WEI Chao[1,2]，ZHOU Nana[1,2]，LI Fan[1,2]，WANG Xiaoyan[1,2]
（[1]*Nutrition & Health Research Institute*，*COFCO Corporation*，*Beijing 102209*，*China*；[2]*Beijing Key Laboratory of Nutrition*，*Health and Food Safety*，*Beijing 102209*，*China*）

Abstract: Traditional methods for strain isolation and improvement can be cumbersome, time-consuming, error-prone, and difficult to scale up, leading to inefficiencies in research and development workflows. With the integration of automation and robotics technology, biofoundry can achieve automated operations through guide rails and robotic arms, leading to improved stability and precision of experimental operations. Additionally, by utilizing smaller cultivation volumes, such as microplates or droplets, the cultivation and screening throughput can be increased, addressing the currently existing issues of traditional methods. This can greatly improve research and development efficiency, allowing for the testing and optimization of large numbers of microbial strains or genetic variants in a high-throughput manner. The biofoundry encompasses interdisciplinary fields such as mechanical engineering, automation,

收稿日期：2023-03-17 修回日期：2023-05-08
基金项目：国家重点研发计划“合成生物学”重点专项，合成生物学自动化铸造平台关键技术研发（2018YFA0902900）
引用本文：赵国淼，杨鑫，张媛，王靖，谭剑，魏超，周娜娜，李凡，王小艳. 生物设施平台及其工业应用[J]. 合成生物学，2023，4(5)：892-903
Citation：ZHAO Guomiao，YANG Xin，ZHANG Yuan，WANG Jing，TAN Jian，WEI Chao，ZHOU Nana，LI Fan，WANG Xiaoyan. Biofoundry and its industrial application[J]. Synthetic Biology Journal，2023，4(5)：892-903

computer science, and life sciences. The collaboration among these fields is crucial for the development and advancement of laboratory automation. By leveraging automation and high-throughput technologies, the field of strain isolation and improvement can benefit from increased efficiency, improved reliability, and scalability. These advancements can accelerate the progress of microbial strain engineering for various applications in biotechnology, medicine, agriculture, and energy production. This paper briefly introduces the composition and classification of the biofoundry, the high-throughput detection method, and focuses on the high-throughput screening platform built by the research team from Nutrition & Health Research Institute, COFCO. In combination with the projects carried out, it introduces the application of the high-throughput screening platform in the fields of biofuel strain development, traditional brewing strain screening, feed substitute antimicrobial screening, directed evolution and screening of enzymes, etc.



Keywords: biofoundry; automation; high-throughput screening; strain improvement; industrial microorganism

目前，工业微生物已经广泛应用于抗生素、生物能源、酶制剂、生物塑料等的生产[1-2]。由于天然微生物对工业环境耐受性差、目标产物产量低等原因，需要根据目标产物和发酵环境对天然微生物进行复杂的改造和构建，才能满足工业发酵过程目标产物的高产出要求[3-5]。早期工业微生物的改造主要通过非理性诱变育种技术获得目标产物的高产菌株，由于有益突变概率低，导致非理性诱变方法效率较低[6]。随着对基因表达和细胞调控认识的深入，发展出了利用重组DNA技术对生物体中已知的代谢途径进行有目的的设计，并对细胞内的基因网络进行调控和优化的理性设计方法[7]。与随机筛选驯化菌种或有限的理性设计不同，合成生物学将“设计-合成-测试-学习”（design-build-test-learn， DBTL）理念引入到生物学领域，对生物体进行自下而上的设计、改造，甚至从头合成具有特定功能的“人造生命”[8]。

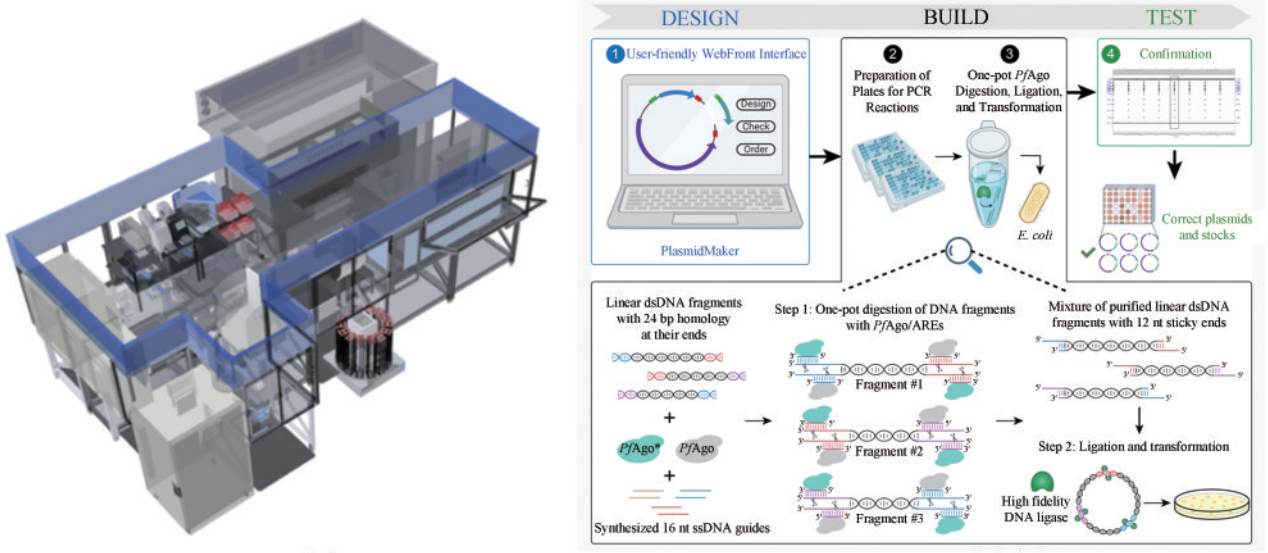
获得多样化的突变文库和实施高通量筛选是菌株改造的关键，突变库越大越多样化，筛选到具有所需表型菌株的机会就越高[9]。自动化和高通量筛选方法对于处理大型突变文库和实现高效筛选过程至关重要[10]。自动化操作可以简化和标

准化突变文库的生成和筛选过程，最大限度地减少人为错误，减少劳动密集型任务，使研究人员能够处理更大、更复杂的突变体库，如高精度、高可重复性和高效率地执行DNA操作、基因编辑和菌株培养等任务[11]。高通量筛选方法，如基于液滴的微流体或其他自动筛选方法，允许以高通量的方式平行筛选多个突变体，极大提高了筛选到具有所需特征菌株的概率[12]。生物设施平台（biofoundry）亦称为生物铸造厂，是将自动化和高通量筛选方法相结合，通过快速生成和筛选不同的突变体库来加快菌株改造进程的研究平台[13]。生物设施平台针对传统人工实验操作烦琐、耗时、易错、难以规模化等问题，提升了合成生物实验对象、方法、技术的标准化和模块化水平[14]。本文首先总结了国内外合成生物设施平台的发展，概括了高通量筛选平台的检测方法，最后从功能和实际使用场景出发，对中粮营养健康研究院生物设施平台的工作进行了总结。

1 生物设施平台

生物设施平台旨在通过自动化和高通量的设备，加速合成生物学的研究和成果转化。在过去的10年时间里，世界各地的研究机构一直在建立各自的自动化设施平台[15-16]。伊利诺伊大学的iBioFAB（Illinois Biological Foundry for Advanced Biomanufacturing）和爱丁堡大学的EGF（Edinburgh Genome Foundry）是其中自动化程度和整合度均较高、比较有代表性的自动化合成生物设施平台。iBioFAB是世界上第一个用于合成生物学应用的自动化系统（图1），该系统包含3个液体处理设备，为了实现无人值守的自动化操作，iBioFAB还包含了用于自动化标准实验室任务的仪器：离心机、条形码贴标机、试剂分配器、PCR仪、微孔板热封机、微孔板撕膜机以及多个微孔板振荡器，可以通过定制化的工作流程实现批量化操作[18]。2019年，iBioFAB融入人工智能/机器学习形成了BioAutomata，实现了DBTL的闭环全自动流程，大大提高了高产番茄红素细胞的筛选效率[19]。2022年5月，基于iBioFAB的端到端平台“PlasmidMaker”，实现了质粒构建的多功能化、自动化和高通量化[17]。

为了加强交流，推动自动化设施平台的发展，2019年5月，来自全球8个国家的16个科研单位共同发起成立了“全球合成生物设施联盟”（Global Biofoundry Alliance，GBA），旨在世界范围内开发、推广和支持非商业生物铸造厂；加强生物铸



(a) 平台布局
(a) Layout of the platform

(b) PlasmidMaker实验流程[17]
(b) PlasmidMaker overview[17]

图1 伊利诺伊大学的自动化实验室iBioFAB平台（https：//www.igb.illinois.edu/iBIOFAB）

Fig.1 Illinois Biological Foundry for Advanced Biomanufacturing (iBioFAB)

造厂之间的合作和沟通；共同应对技术、运营和其他类型挑战；提高非商业生物铸造厂的可见性、影响力和可持续性；以及探索具有全球相关性和社会影响力的重大挑战合作项目。为了实现这些目标，GBA 在联盟成员之间进行协调，促进基础设施、标准协议、最佳路径、生物部件和数据的共享。截至 2023 年 4 月，GBA 成员已达 32 个（https：//www.biofoundries.org），其中有 5 家单位来自中国，分别是中国科学院深圳先进技术研究院、中国科学院天津工业生物技术研究所、天津大学合成生物学前沿科学中心、国家蛋白质科学中心（上海）和浙江大学杭州国际科创中心。值得注意的是，国内很多设施平台尚未加入到 GBA 联盟，如武汉生物技术研究院的高通量筛选平台、华大生命科学研究院的空间多组学联合研发平台、蓝晶微生物的 Synbio OS 平台、大连化物所的能源生物技术平台等。近几年国内合成生物产业呈现爆发式增长，其中不乏打造自动化、高通量技术平台的平台型合成生物公司，如恩和生物、欣贝莱生物、态创生物、酶赛生物、惠利生物、衍进科技、元腾生物等。

基于在传统饮食健康、农产品精深加工等领域的技术基础及产业布局，中粮营养健康研究院（以下简称中粮研究院）搭建了微生物改造的自动化和高通量技术平台，主要开展传统发酵微生物的诱变及筛选、工业微生物的改造和筛选，以及酶的定向进化和筛选等方面的研究，致力于打造专业的工业微生物改造和产业转化的开放性平台。该平台以两台移液工作站为基础，通过机械手臂、导轨、传送带等将高速振荡培养箱、PCR 仪、封膜机、撕膜机、离心机、酶标仪等设备整合成一个整体（图 2）。实验室同时配有 Qpix450 高通量菌落挑取工作站、96 孔电转化仪、24 通道核酸/蛋白毛细管电泳仪、多孔板摇床等离线设备，实现了菌株的自动化改造、高通量微孔板培养、检测和筛选（图 2）。目前该平台积极参与了自动化系统在合成生物学领域的研究，实现了多种工业微生物（如大肠杆菌、乳酸菌、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌等）的自动化基因操作，克隆挑取通量达到 10^3 个/时，复杂质粒的多模块化组装通量达到 100 个/时，质粒提取通量达到 500 个/天 [20]。在服务于项目研发过程中，该平台积累了大量的自动化实验流程、高通量检测和筛选方法，大大拓展了平台的服务能力。

2　高通量检测方法

菌种进化工程成功的关键是获得多样性的突变文库和开发高通量的筛选方法。突变体库构建的方法已经非常成熟，能否开发有效的检测方法成为了菌种进化成功的瓶颈。为了达到通量和精度的平衡，检测方法往往由通量高、精度低的初筛，以及通量低、精度高的复筛进行组合，常见

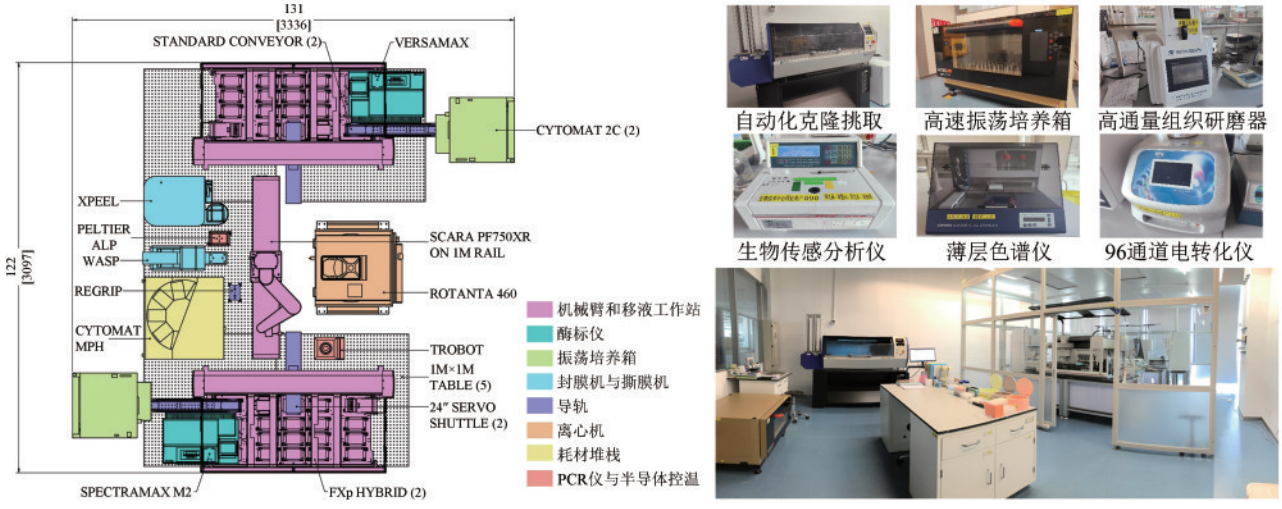


图 2　中粮营养健康研究院自动化设施平台

Fig. 2　Automated biofoundry at COFCO

的筛选方法有基于颜色或荧光的筛选、基于细胞生长的筛选和基于生物传感器的筛选[21]。基于颜色和荧光的筛选方法可以针对某些产物本身带有的色素或荧光进行筛选，如番茄红素[22]、β-胡萝卜素[23]和虾青素[24]等，是最简单也是最直观的一种筛选方法。如果产物无色或缺乏荧光性质，可以添加外源试剂或酶，将产物转化为有颜色或荧光的化学物质进行筛选[25-27]。基于生长的筛选主要利用突变体在特定环境中的耐受性[28-31]，或营养缺陷型菌株对培养环境的要求进行筛选[32-35]。基于生物传感器的筛选方法是将微生物对特定代谢物的响应转换为荧光等信号进行检测[36]，主要包括基于转录因子的生物传感器[37-39]、基于核糖体开关的生物传感器[40-42]和基于荧光共振能量转移的生物传感器[43-45]。

除此之外，根据不同的分类方法，常见的筛选方法还包括微孔板筛选（microtiter plate，MTP）、流式细胞筛选（fluorescence-activated cell sorting，FACS）和液滴微流控筛选（droplet-based microfluidics，DMF）[46]。颜色和荧光信号可以直接在微孔板中进行读数，筛选通量为10^6个/天。对于细胞内荧光，可以结合FACS根据其荧光强度将特定细胞群分离出来，筛选通量高达10^8个/时[47]（表1）。

表1 三种筛选方法对比

Table 1 Comparison of three screening methods

筛选方法	检测信号	灵敏度	通量
MTP[48]	吸光度和荧光强度	一般	10^6个/天
FACS[49]	荧光强度	高	10^8个/时
DMF[50]	荧光强度、拉曼光谱、吸光度、质谱	高	10^8个/天

DMF是近年来发展起来的一种基于微芯片的高通量检测技术[51]，筛选通量为10^8个/天。DMF利用互不相容的液相产生分散的微液滴，并对微液滴进行单独培养和检测，具有体积小、比表面积大、独立无交叉污染、可控性好、通量高等优势，在微生物改造、细胞分析和药物筛选等领域具有巨大的应用潜力[52]。根据不同液滴参数，DMF检测方法还可以分为基于吸光度的AADS（absorbance-activated droplet sorting）[53]、基于荧光的FADS（fluorescence-activated droplet sorting）[54]、基于电化学信号的ECDS（electrochemical-based droplet sorting）[55]、基于拉曼的RADS（raman-activated droplet sorting）[56]、基于细胞密度的IADS（image-activated droplet sorting）[57]、基于质谱的MADS（mass-activated droplet sorting）等[46，58]。但是由于商品化的微流控检测分选装置较少，目前相对成熟的高通量细胞（颗粒）分选方法主要是FACS[51]。

3 中粮自动化设施平台的应用

3.1 生物燃料菌株开发

以玉米为原料发酵生产燃料乙醇是调节粮食供求，处置超期超标粮食的有效手段。燃料乙醇生产过程中，作为细胞工厂的酿酒酵母菌株在发酵过程中面临高浓度底物、低pH、高温、高乙醇等多重胁迫[59]，严重影响了酿酒酵母菌株的发酵性能，需要对菌株的多重胁迫耐受性进行改造。由于工业微生物生长环境和菌体细胞代谢调控复杂，传统菌株改造方法在提升工业菌株鲁棒性的研究中收效甚微[31]。利用高耐受性菌株在多重胁迫环境中存活并生长更快，而低耐受性的细胞将死亡或表现出生长抑制的原理，可以将菌株对多重胁迫环境的耐受性与菌株生长性能耦合，通过模拟实际发酵过程中的多重胁迫环境，建立特定环境中菌株生长量与乙醇产量耦合的高通量筛选体系[60]。该系统包括基因回路设计、自适应进化、高通量筛选、发酵和数据分析。首先通过自动化平台随机组合抗胁迫调控元件并将其整合到工业酿酒酵母中，然后在高通量筛选平台上筛选37℃条件下表现较好的元件组合。通过对挑选出的元件组合进行测序获得元件组合信息，并将其随机整合到酵母基因组中，然后在高通量平台上进行工业物料条件下的筛选。对筛选得到的优势菌进行ARTP诱变，然后在高通量平台上模拟多重胁迫环境进行筛选，并最终获得优势菌株（图3）。通过多轮实验室发酵验证优势菌株的发酵性能，在获得稳定结果后拿到工厂中进行中试发酵验证。结果显示，与出发菌株相比，乙醇产量提高了7%，残糖量下降了65%。在乙醇产率、糖醇转化率、耐高温、耐高浓度乙醇方面工程菌株都优于现有的工业菌株[20]。

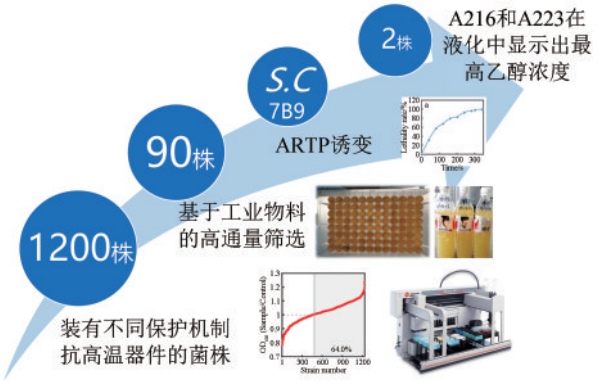


图3　工业酿酒酵母的多重胁迫耐受性改造

Fig.3　Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for multiple stress tolerance

3.2　传统酿造菌株筛选

我国传统酿酒方法是利用几种、甚至几十种微生物共同发酵，如糖化菌（主要是曲霉和根霉）将淀粉水解成糖，酒化菌（酿酒酵母等）把糖发酵成酒精，细菌（杆菌、丁酸菌、己酸菌等）产生一些芳香类物质。不同的酿造工艺，以及酿酒原料、小曲、大曲、麦曲、酒药、酒醅、窖池等富含的功能微生物共同决定了酒体风味、香型和品质。由于针对传统酿造菌株主要采用紫外诱变、ARTP 诱变和航天诱变等方法获得菌株的突变体库，我们主要用生物设施平台进行微孔板筛选方法的建立和菌株筛选（图4）。

黄酒是最古老的酒种之一，但黄酒中较高的生物胺含量常造成饮用者酒后不适，通过降低黄酒中生物胺的含量，可以有效改善饮后感。利用生物胺与显色剂 TNBS 反应，产物在 340 nm 处有明显吸收峰特征，通过酶标仪对微孔板中乳酸菌发酵产生的生物胺进行检测，实现生物胺的高通量检测[60-61]。基于此种检测方法，夏冰等[61]采集了绍兴黄酒厂的浸泡过程浆液，用碳酸钙乳酸菌选择性培养基分离乳酸菌，通过微孔板进行高通量的发酵培养，于386株乳酸菌中筛选得到一株植物乳杆菌，应用于黄酒酿造过程，生物胺含量下降了 52.47%。在黄酒酿造过程中，由酿酒酵母代谢产生的 α-酮酸可经过脱羧、脱氢生成高级醇，高级醇亦是引起饮用者头晕、头胀的物质，通过控制酿酒酵母高级醇的产量可以有效改善白酒风味。利用高级醇经浓硫酸脱水后生成不饱和烃，不饱和烃与对二甲氨基苯甲醛发生缩合反应，生成紫红色化合物，且在一定范围内高级醇的量和紫红色物质颜色的深浅程度成正比关系，可以对微孔板中酿酒酵母发酵产生的高级醇进行定量检测[62-63]。运用此筛选方法成功获得了一株酿酒酵母，在保证酒精度的同时，总高级醇的含量降低了 52.54%（未公开）。

四甲基吡嗪是影响酱香白酒风格的活性健康因子，乙偶姻是合成四甲基吡嗪的重要前体，丁子元和杨鑫等[63-64]建立了基于前体乙偶姻的 Voges-Proskauer（V-P）反应显色筛选方法，通过 ARTP 和航天诱变联合建立突变体库，筛选获得一

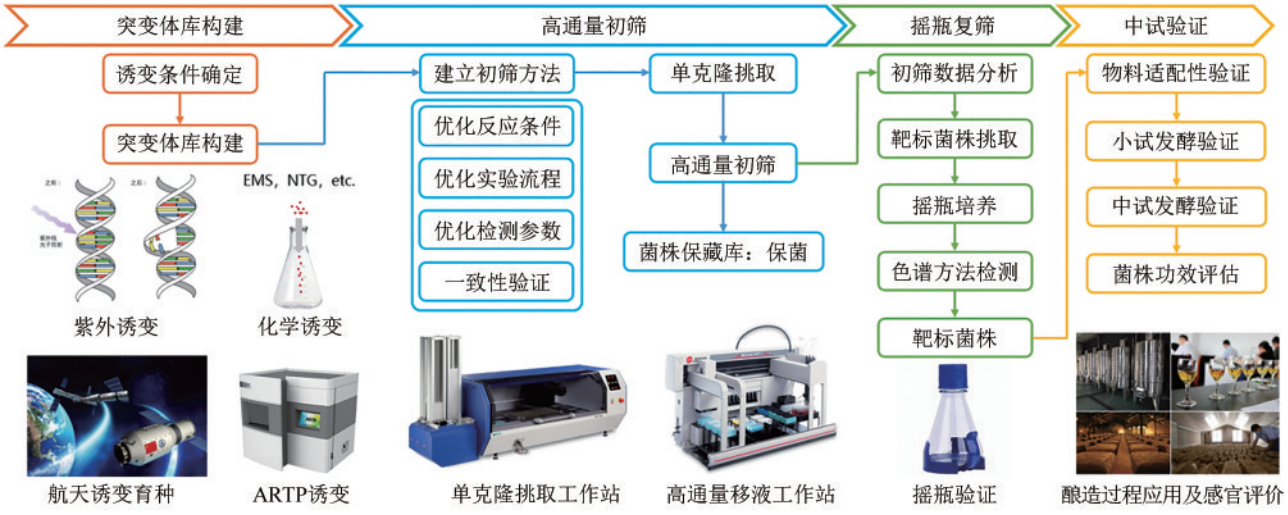


图4　高通量平台在传统菌株筛选中的应用

Fig. 4　Application of high-throughput platform in traditional strain screening

株高产四甲基吡嗪的枯草芽孢杆菌，四甲基吡嗪产量提升了78.8%。

酿酒酵母作为葡萄酒酿造过程中的关键微生物之一，直接影响着葡萄酒的风味[65]。刘沛通等[66-68]于不同葡萄酒产区采集葡萄表皮、土壤、葡萄枝等样品进行本土酿酒酵母的分离，建立了渗透压耐受、乙醇耐受、SO_2耐受、pH耐受、温度耐受性、酶活性及产H_2S能力的高通量评价方法，于329株酿酒酵母中筛选获得性能优良的BC60258和BC60268菌株，并开展了白葡萄品种“雷司令”和红葡萄品种“西拉”的中试酿造试验，发酵速率与商业酵母趋势一致，酿造的葡萄酒有机酸含量、挥发性物质、香气特征均优于商业菌株。

3.3 酶的定向进化和筛选

酶和细胞工厂是工业生物技术的核心，在各个领域发挥着不可或缺的作用。为了提高酶的性能，通常要对天然酶和细胞进行改造，以提高其催化效率、稳定性和选择性[69]。高通量筛选方法允许快速测试大量酶或细胞变体，使研究人员能够广泛探索并选择最有前景的变体进行进一步优化或应用。灵敏可靠的高通量筛选方法对酶和细胞工厂工程的成功至关重要。

甜菊糖是新一代低能量代糖，由于其在代谢方面的优良表现以及高食品安全性，在世界范围内得到广泛应用。甜菊糖是多种甜菊糖苷的混合物，所有甜菊糖苷都以甜叶醇为核心骨架，在糖基转移酶的作用下在甜叶醇的C13-羟基（R1位）和C19-羧基（R2位）位置分别连上不同个数的葡萄糖苷，形成不同的甜菊糖苷。不同的甜菊糖苷单体在甜度水平、口感和功能活性上表现不同，但由于单体之间差异极小，导致不同甜菊糖苷单体分离难度加大[70]。甜菊糖苷类化合物中甜菊苷和莱鲍迪苷A（rebaudiosidea A，RA）在甜叶菊中含量相对丰富，都具有高甜度，但口感上有后苦味，相比之下莱鲍迪苷D（rebaudiosidea D，RD）具有更好的口感特性。然而甜叶菊中RD含量低，仅占干叶重0.5%左右，从甜叶菊中分离提纯，产量低，生产成本高，无法满足市场需求。葡萄糖基转移酶EUGT11能够催化RA生成RD，但是酶的活性较低。针对这种情况，祁飞等[71]开发了一种通过易错PCR技术及高通量筛选提高葡萄糖基转移酶EUGT11酶活的方法（图5），对EUGT11基因序列进行了分析，对关键位点的基因序列进行了随机突变，然后在大肠杆菌中对突变体库进行

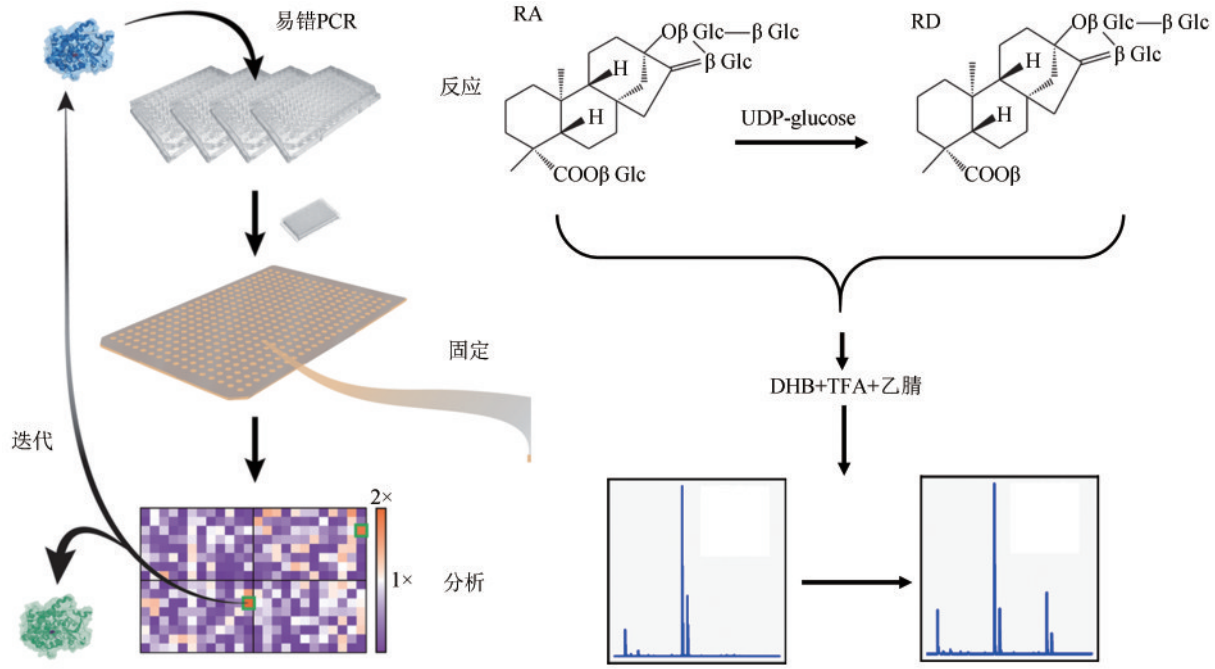


图5 生物设施平台EUGT11酶定向进化和筛选中的应用

Fig. 5 Application of the biofoundry in directed evolution and screening of EUGT11

表达，用粗酶液对 RA 和 UGDP 底物进行转化，通过二级质谱鉴定筛选方法对生成的甜菊糖苷单体进行精确鉴定，进而耦联 EUGT11 的活性。经过 14 轮的易错 PCR 和高通量筛选， EUGT11 的活性提高了 38 倍。

玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEN）和呕吐毒素（vomitoxin，DON）主要污染玉米、小麦等粮食作物，且由于分布广、毒性大、在加工过程中不易被破坏、残留时间长等问题，使 ZEN 和 DON 成为全球普遍关注的真菌毒素。目前 ZEN 和 DON 检测方法如胶体金试纸条、酶联免疫试剂盒、免疫亲和柱-高效液相色谱、液质联用法等存在检测精度、操作复杂、检测成本等问题，现有的微生物降解方法降解时间长、效率低，生物酶温度和酸碱度耐受性差，无法适用于高通量的检测。谭剑和赵国淼等[72-73]开发了基于孔板筛选的 ZEN 和 DON 降解酶的高通量筛选方法，筛选通量达到 1000 株/天（图 6）。首先通过挖掘降解酶的基因序列，构建了 ZEN 和 DON 降解酶的随机突变体库，通过在大肠杆菌中进行蛋白表达，用粗酶液对 ZEN 和 DON 底物进行降解，通过底物荧光值的下降耦联降解酶的降解效率，经过定向进化和对 12 000 株突变体的筛选，ZEN 降解酶在 50 ℃和 pH 5.0 条件下降解率达到 52%，较出发菌株提高了 2.7 倍（未发表）。通过对 1200 株突变体的筛选，使 DON 降解酶在 40 ℃和 pH 5.0 条件下的降解率提高了 1.6 倍（未发表）。

4　挑战与展望

生物自动化设施是高通量和自动化生物研发的集成平台，加速了生物技术的发展和生物产品的开发。但生物自动化设施未来的发展可能存在以下几个方面的挑战：①生物系统的复杂性，生物本质上是复杂的，具有复杂的基因调控网络、细胞代谢过程和动态的相互作用，开发高通量基因-表型关联的自动化系统仍然具有挑战性；②标准化和可重复性，确保不同生物基础平台和实验的结果一致且可重复，对于可靠的研发至关重要，协议、工作流程和数据格式的标准化是生物基础操作中的一个主要挑战；③数据管理和分析，高通量和自动化的生物学研究生成大量数据，包括组学数据、成像数据和实验原始数据，高效的数据管理、集成和分析对于理解和促进生物基础工作流程中的数据驱动决策至关重要；④跨学科合作，生物设施平台需要来自生物学、工程、自动化和数据科学等各个领域的专家之间的合作，由于语言、方法和观点的差异，弥合这些跨学科的差距和促进有效的合作可能具有挑战性；⑤成本和可扩展性：建造和维护生物基础设施通常是昂贵的，而生物基础设施的可扩展性以适应更大的项目或多个用户可能是一个挑战，实现具有成本效益和可扩展性的生物基础设施运营对于更广泛的获取和利用至关重要。

尽管存在这些挑战，但生物设施平台的发展前景还是令人兴奋的，主要包括：①加速研发，生物设施平台通过实现高通量和自动化的实验、优化和筛选，可以显著加快生物技术的研发进程，从而更快地发现和优化酶、细胞和其他生物成分；②创新和定制，生物设施平台为创新和定制提供了一个平台，使研究人员和公司能够为各种应用开发和优化独特的生物解决方案，包括医学、农

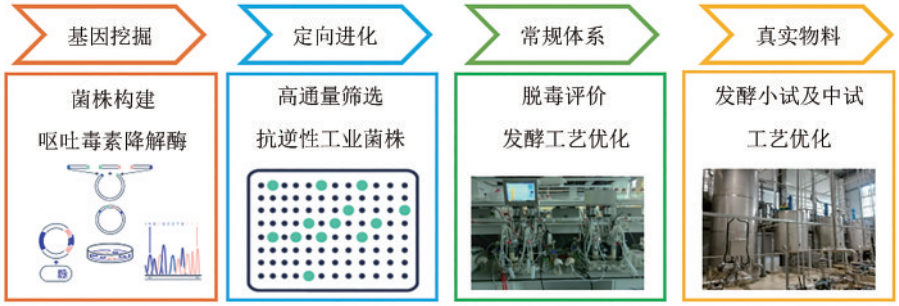


图 6　生物设施平台在真菌毒素降解酶定向进化和筛选中的应用

Fig. 6　Application of biofoundry in directed evolution and screening of mycotoxins degrading enzymes

业、环境保护和工业流程；③可再现性和标准化，生物设施平台可以通过开发和实施标准化的协议、工作流程和数据格式，从而产生更可靠和稳健的结果，进而有助于提高生物研究的可再现性与标准化；④数据驱动决策，生物设施平台可以产生大量数据，可以对这些数据进行分析，从而获得见解并为研发决策提供信息，数据驱动的方法可以帮助优化流程，提高性能，并指导未来的研究方向；⑤协作和知识共享，生物设施平台促进来自不同学科的专家之间的协作，促进知识共享、思想交流和协作解决问题，从而促进生物技术的协同进步。

总之，尽管面临挑战，但通过加速研发、创新、再现性、标准化、数据驱动决策、协作和知识共享等，生物设施平台在推进生物技术方面仍具有重大前景。自动化、数据科学和跨学科合作的持续进步有望进一步推动未来生物设施平台的开发和应用。

参 考 文 献

[1] LEE S Y, KIM H U, CHAE T U, et al. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals[J]. Nature Catalysis, 2019, 2(1): 18-33.

[2] CHEN X L, GAO C, GUO L, et al. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(1): 4-72.

[3] RUGBJERG P, SOMMER M O A. Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 869-876.

[4] WEHRS M, TANJORE D, ENG T, et al. Engineering robust production microbes for large-scale cultivation[J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(6): 524-537.

[5] LEE S Y, KIM H U. Systems strategies for developing industrial microbial strains[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33 (10): 1061-1072.

[6] ZHANG X, ZHANG X M, XU G Q, et al. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(14): 5939-5951.

[7] GU Y, XU X H, WU Y K, et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 109-121.

[8] CARBONELL P, JERVIS A J, ROBINSON C J, et al. An automated Design-Build-Test-Learn pipeline for enhanced microbial production of fine chemicals[J]. Communications Biology, 2018, 1: 66.

[9] ZENG W Z, GUO L K, XU S, et al. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(8): 888-906.

[10] QUAGLIA D, EBERT M C C J C, MUGFORD P F, et al. Enzyme engineering: a synthetic biology approach for more effective library generation and automated high-throughput screening[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171741.

[11] ZHANG Y V, ROCKWOOD A. Impact of automation on mass spectrometry[J]. Clinica Chimica Acta, 2015, 450: 298-303.

[12] LONGWELL C K, LABANIEH L, COCHRAN J R. High-throughput screening technologies for enzyme engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 196-202.

[13] RAN C, MISHRA S, TONG S, et al. Engineering biological systems using automated biofoundries[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 98-108.

[14] ZHANG J Z, CHEN Y C, FU L H, et al. Accelerating strain engineering in biofuel research via build and test automation of synthetic biology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 67: 88-98.

[15] LE FEUVRE R A, SCRUTTON N S. A living foundry for Synthetic Biological Materials: a synthetic biology roadmap to new advanced materials[J]. Synthetic & Systems Biotechnology, 2018, 3(2): 105-112.

[16] HILLSON N, CADDICK M, CAI Y Z, et al. Building a global alliance of biofoundries[J]. Nature Communications, 2019, 10: 2040.

[17] ENGHIAD B, XUE P, SINGH N, et al. PlasmidMaker is a versatile, automated, and high throughput end-to-end platform for plasmid construction[J]. Nature Communications, 2022, 13: 2697.

[18] ZHAO H M. Illinois biological foundry for advanced biomanufacturing (iBioFAB) [C/OL]. Synthetic Biology: Engineering, Evolution, and Design Conference 2015, SEED 2015, 2015, 2: 784-785[2023-03-01]. https://experts. illinois. edu/en/publications/illinois-biological-foundry-for-advanced-biomanufacturing-ibiofab.

[19] HAMEDIRAD M, CHAO R, WEISBERG S, et al. Towards a fully automated algorithm driven platform for biosystems design[J]. Nature Communications, 2019, 10: 5150.

[20] XU K, QIN L, BAI W X, et al. Multilevel defense system (MDS) relieves multiple stresses for economically boosting ethanol production of industrial *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Energy Letters, 2020, 5(2): 572-582.

[21] LIU W S, JIANG R R. Combinatorial and high-throughput

screening approaches for strain engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(5): 2093-2104.

[22] ALPER H, MIYAOKU K, STEPHANOPOULOS G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets [J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(5): 612-616.

[23] ÖZAYDIN B, BURD H, LEE T S, et al. Carotenoid-based phenotypic screen of the yeast deletion collection reveals new genes with roles in isoprenoid production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 15: 174-183.

[24] ZELCBUCH L, ANTONOVSKY N, BAR-EVEN A, et al. Spanning high-dimensional expression space using ribosome-binding site combinatorics[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(9): e98.

[25] LEE J H, LEE S H, YIM S S, et al. Quantified high-throughput screening of *Escherichia coli* producing poly(3-hydroxybutyrate) based on FACS[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(7): 1767-1779.

[26] TYO K E J, JIN Y S, ESPINOZA F A, et al. Identification of gene disruptions for increased poly-3-hydroxybutyrate accumulation in Synechocystis PCC 6803[J]. Biotechnology Progress, 2009, 25(5): 1236-1243.

[27] KLEIN-MARCUSCHAMER D, SANTOS C N S, YU H M, et al. Mutagenesis of the bacterial RNA polymerase alpha subunit for improvement of complex phenotypes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2705-2711.

[28] ALPER H, MOXLEY J, NEVOIGT E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production[J]. Science, 2006, 314(5805): 1565-1568.

[29] BASAK S, GENG H F, JIANG R R. Rewiring global regulator cAMP receptor protein (CRP) to improve *E. coli* tolerance towards low pH[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 173: 68-75.

[30] LIU H M, YAN M, LAI C G, et al. gTME for improved xylose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(2): 574-582.

[31] CHONG H Q, HUANG L, YEOW J, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP) [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57628.

[32] HENNING H, LEGGEWIE C, POHL M, et al. Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7510-7517.

[33] PFLEGER B F, PITERA D J, SMOLKE C D, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(8): 1027-1032.

[34] BOERSMA Y L, DRÖGE M J, VAN DER SLOOT A M, et al. A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of*Bacillus subtilis* lipase A[J]. ChemBioChem, 2008, 9(7): 1110-1115.

[35] BOLES E, OREB M. A growth-based screening system for hexose transporters in yeast[M/OL]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2018, 1713: 123-135[2023-03-01]. https://link. springer. com/protocol/10.1007/978-1-4939-7507-5_10.

[36] DIETRICH J A, MCKEE A E, KEASLING J D. High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection[J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79: 563-590.

[37] LATCHMAN D S. Transcription factors: an overview[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1997, 29 (12): 1305-1312.

[38] BINDER S, SCHENDZIELORZ G, STÄBLER N, et al. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level[J]. Genome Biology, 2012, 13(5): R40.

[39] MAHR R, GÄTGENS C, GÄTGENS J, et al. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of l-valine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 184-194.

[40] BASTET L, TURCOTTE P, WADE J T, et al. Maestro of regulation: riboswitches orchestrate gene expression at the levels of translation, transcription and mRNA decay[J]. RNA Biology, 2018: 15(6): 679-682.

[41] ECKDAHL T T, CAMPBELL A M, HEYER L J, et al. Programmed evolution for optimization of orthogonal metabolic output in bacteria[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0118322.

[42] DIXON N, DUNCAN J N, GEERLINGS T, et al. Reengineering orthogonally selective riboswitches[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(7): 2830-2835.

[43] WANG J L, WEI J H, SU S H, et al. Novel fluorescence resonance energy transfer optical sensors for vitamin B_{12} detection using thermally reduced carbon dots[J]. New Journal of Chemistry, 2015, 39(1): 501-507.

[44] NGUYEN T T T, HUY B T, TAWFIK S M, et al. Highly selective and sensitive optosensing of glutathione based on fluorescence resonance energy transfer of upconversion nanoparticles coated with a Rhodamine B derivative[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2020, 13(1): 2671-2679.

[45] DING Y D, LI J, ENTERINA J R, et al. Ratiometric biosensors based on dimerization-dependent fluorescent protein exchange [J]. Nature Methods, 2015, 12(3): 195-198.

[46] FU X Z, ZHANG Y Y, XU Q, et al. Recent advances on sorting methods of high-throughput droplet-based microfluidics in

enzyme directed evolution[J]. Frontiers in Chemistry, 2021, 9: 666867.

[47] ZHANG Z D, GUO Q, WANG Y T, et al. High-throughput screening of microbial strains in large-scale microfluidic droplets[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1105277.

[48] UTHARALA R, GRAB A, VAFAIZADEH V, et al. A microfluidic Braille valve platform for on-demand production, combinatorial screening and sorting of chemically distinct droplets[J]. Nature Protocols, 2022, 17(12): 2920-2965.

[49] KÖRFER G, PITZLER C, VOJCIC L, et al. *In vitro* flow cytometry-based screening platform for cellulase engineering [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26128.

[50] WANG Y T, ZHANG X X, SHANG L R, et al. Thriving microfluidic technology[J]. Science Bulletin, 2021, 66(1): 9-12.

[51] 涂然, 李世新, 李昊霓, 等. 液滴微流控技术在微生物工程菌株选育中的应用进展[J]. 合成生物学, 2023(1): 165-184.
TU R, LI S X, LI H N, et al. Advances and applications of droplet-based microfluidics in evolution and screening of engineered microbial strains[J]. Synthetic Biology Journal, 2023(1): 165-184.

[52] LEAMON J H, LINK D R, EGHOLM M, et al. Overview: methods and applications for droplet compartmentalization of biology[J]. Nature Methods, 2006, 3(7): 541-543.

[53] GIELEN F, HOURS R, EMOND S, et al. Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance-activated droplet sorting (AADS) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(47): E7383-E7389.

[54] BARET J C, MILLER O J, TALY V, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity[J]. Lab on a Chip, 2009, 9 (13): 1850-1858.

[55] GOTO H, KANAI Y, YOTSUI A, et al. Microfluidic screening system based on boron-doped diamond electrodes and dielectrophoretic sorting for directed evolution of NAD(P) -dependent oxidoreductases[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(4): 852-861.

[56] WANG X X, REN L H, SU Y T, et al. Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(22): 12569-12577.

[57] SESEN M, WHYTE G. Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 8736.

[58] HOLLAND-MORITZ D A, WISMER M K, MANN B F, et al. Mass activated droplet sorting (MADS) enables high-throughput screening of enzymatic reactions at nanoliter scale [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(11): 4470-4477.

[59] 王小艳, 秦磊, 刘辉, 等. 淀粉质燃料乙醇发酵胁迫及菌株耐受性改造[J]. 精细化工, 2019, 36(4): 568-574.
WANG X Y, QIN L, LIU H, et al. Research progress of starchy fuel ethanol fermentation and the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fine Chemicals, 2019, 36(4): 568-574.

[60] PHAN A P H, NGO T T, LENHOFF H M. Spectrophotometric assay for lysine decarylase[J]. Analytical Biochemistry, 1982, 120(1): 193-197.

[61] 夏冰, 丁子元, 郑晓卫, 等. 植物乳杆菌和菌剂及其在生物胺降解、黄酒生产中的应用: CN111254101B[P]. 2020-07-28.
XIA B, DING Z Y, ZHENG X W, et al. *Lactobacillus plantarum*, microbial inoculum and application of Lactobacillus plantarum and microbial inoculum in biogenic amine degradation and yellow rice wine production: CN11125410 1B[P]. 2020-07-28.

[62] 王德昌, 明明, 周维广. 分光光度法测定高级醇[J]. 啤酒科技, 2005(3): 37-38.
WANG D C, MING M, ZHOU W G. Spectrophotometric determination of higher alcohols[J]. Beer Science and Technology, 2005(3): 37-38.

[63] 杨鑫, 孙浩轩, 何伟, 等. 一步法制备四甲基吡嗪用反应装置: CN218077901U[P]. 2022-12-20.
YANG X, SUN H X, HE W, et al. Reaction device for preparing tetramethylpyrazine by one-step method: CN218077901U[P]. 2022-12-20.

[64] 丁子元, 杨鑫, 靳喜庆, 等. 枯草芽孢杆菌、菌剂、应用及制备四甲基吡嗪的方法: CN115386525B[P]. 2023-01-31.
DING Z Y, YANG X, JIN X Q, et al. *Bacillus subtilis*, fungicide, application and method for preparing tetramethylpyrazine: CN115386525B[P]. 2023-01-31.

[65] KONG C L, LI A H, SU J, et al. Flavor modification of dry red wine from Chinese spine grape by mixed fermentation with *Pichia fermentans* and *S. cerevisiae*[J]. LWT, 2019, 109: 83-92.

[66] 刘沛通, 丁子元, 于庆泉, 等. 优良本土酿酒酵母的酿造特性研究[J]. 中国食品学报, 2023, 23(1), 204-215.
LIU P T, DING Z Y, YU Q Q, et al. Studies on oenological characteristics of high-quality Chinese indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(1), 204-215.

[67] 刘沛通, 丁子元, 郑晓卫, 等. 酿酒酵母和菌剂以及它们在制备发酵产品特别是怀涿盆地葡萄酒酿造中的应用: CN11196160 3B[P]. 2021-01-01.
LIU P T, DING Z Y, ZHENG X W, et al. *Saccharomyces cerevisiae* and microbial agent as well as application thereof to preparation of fermented product and particularly brewing of wine in Huazhuo Basin: CN111961603B[P]. 2021-01-01.

[68] 郑晓卫, 刘沛通, 李泽福, 等. 抗逆性优良的空间育种酿酒酵

母及其应用: CN115651852B[P]. 2023-04-11.
ZHENG X W, LIU P T, LI Z F, et al. Spatial breeding *Saccharomyces cerevisiae* with excellent stress resistance and application thereof: CN115651852B[P]. 2023-04-11.

[69] 王千, 白杰, 江会锋. 合成生物学酶改造设计技术的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(12): 1493-1501.
WANG Q, BAI J, JIANG H F. Research progress on technologies of enzyme engineering and design in synthetic biology[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2021, 33(12): 1493-1501.

[70] 赵聪敏. 甜菊糖苷单体分离、甜味特性及应用研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2021.
ZHAO C M. Isolation of stevia glycoside, sweetness characteristics and application[D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2021.

[71] 祁飞, 刘瑞敏, 张真真. 一种通过易错 PCR 技术及高通量筛选提高葡萄糖基转移酶 EUGT11 酶活方法: CN113584016A[P]. 2021-11-02.
QI F, LIU R M, ZHANG Z Z. Method for improving enzyme activity of glucosyltransferase EUGT11 through error-prone PCR technology and high-throughput screening: CN113584016A[P]. 2021-11-02.

[72] 谭剑, 佟毅, 赵国淼, 等. 玉米赤霉烯酮浓度及其降解酶酶活力的测定方法以及玉米赤霉烯酮降解菌的筛选方法: CN112577930A[P]. 2021-03-30.
TAN J, TONG Y, ZHAO G M, et al. Zearalenone concentration and zearalenone degrading enzyme activity determination method and zearalenone degrading bacterium screening method: CN112577930A[P]. 2021-03-30.

[73] 赵国淼, 佟毅, 谭剑, 等. 测定呕吐毒素浓度的方法及其应用: CN114813895A[P]. 2022-07-29.
ZHAO G M, TONG Y, TAN J, et al. Method for determining vomitoxin concentration and application thereof: CN114813895A[P]. 2022-07-29.

通讯作者：王小艳（1980—），女，博士，正高级工程师。研究方向围绕淀粉质原料生物加工过程工业菌株和酶制剂的开发，主要聚焦生物燃料乙醇、生物基材料、功能糖等领域。
E-mail：wangxiaoyan@cofco.com

第一作者：赵国淼（1989—），男，博士，工程师。研究方向为工业微生物改造与高通量筛选、计算生物学与生物信息学。
E-mail：zhaoguomiao@cofco.com