

# 常压室温等离子体诱变育种与微生物液滴培养筛选技术应用进展

唐晨旻<sup>1,2</sup>, 张劲松<sup>1</sup>, 刘艳芳<sup>1</sup>, 唐庆九<sup>1</sup>, 冯娜<sup>1</sup>, 唐传红<sup>1</sup>, 王金艳<sup>1</sup>, 谭贻<sup>1</sup>, 刘利平<sup>1</sup>, 冯杰<sup>\*1</sup>

1 上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室, 上海 201403

2 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

唐晨旻, 张劲松, 刘艳芳, 唐庆九, 冯娜, 唐传红, 王金艳, 谭贻, 刘利平, 冯杰. 常压室温等离子体诱变育种与微生物液滴培养筛选技术应用进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1177-1194

Tang Chenmin, Zhang Jingsong, Liu Yanfang, Tang Qingjiu, Feng Na, Tang Chuanhong, Wang Jinyan, Tan Yi, Liu Liping, Feng Jie. Application progress of atmospheric and room temperature plasma mutation breeding and microbial microdroplet culture screening technology[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1177-1194

**摘要:** 安全和高效的微生物突变及高通量筛选技术是微生物功能发掘、功能创制和生物产业技术创新的重要方向及重要支撑。有效的生物育种技术及高通量筛选技术成为该领域研究人员的关注点。其中, 常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)因具有活性粒子种类多、操作可控性强、基因损伤强度高、诱变速度快、操作条件温和、安全性高等特点, 已用于 100 余种微生物和动植物的诱变育种, 成为微生物的高效育种新方法。微生物液滴培养(microbial microdroplet culture, MMC)可以快速生成大量微液滴并可实现独立控制单个液滴, 每个液滴都可以作为独立的单元进行微生物培养, 具有容量小、高通量、模块化、可操作性良好并可进行在线检测等特点, 为面向微生物菌种高效选育的进化培养和筛选提供了高通量筛选平台, 因此在微生物的高通量培养方面具有独特的应用优势。本文总结了近年来常压室温等离子体诱变技术在食药真菌育种以及微生物液滴培养在微生物高通量分析分选领域的应用进展, 以期为食药真菌的育种领域提供借鉴和参考。

**关键词:** 常压室温等离子体; 微生物液滴培养; 筛选; 食药真菌; 进展

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31801919); 上海人才发展资金资助项目(2019052); 上海市农业科学院攀高计划  
Supported by: National Natural Science Foundation of China (31801919); Development Fund for Shanghai Talents (2019052); Shanghai Academy of Agricultural Sciences Climbing Project

\*Corresponding author: E-mail: sytufengjie@163.com

Received: 2021-08-04; Accepted: 2021-10-15; Published online: 2021-12-16

# Application progress of atmospheric and room temperature plasma mutation breeding and microbial microdroplet culture screening technology

TANG Chenmin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jingsong<sup>1</sup>, LIU Yanfang<sup>1</sup>, TANG Qingjiu<sup>1</sup>, FENG Na<sup>1</sup>,  
TANG Chuanhong<sup>1</sup>, WANG Jinyan<sup>1</sup>, TAN Yi<sup>1</sup>, LIU Liping<sup>1</sup>, FENG Jie<sup>\*1</sup>

1 Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs;  
National Engineering Research Center of Edible Fungi; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy  
of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

2 College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Safe and efficient microbial mutagenesis and high-throughput screening techniques are important for discovering microbial functions, endowing microbes with new functions, and developing new technology for biological industry. Thus, effective breeding and high-throughput screening techniques have attracted the interest of researchers. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP), characterized by rich reactive species, ease of operation, severe DNA damage, high efficiency, moderate operation conditions, and high safety, has been used for the mutation breeding of over 100 microorganisms, animals, and plants, particularly the efficient breeding of microorganisms. Microbial microdroplet culture (MMC) generates a large number of microdroplets in a short time, with independent control of individual droplets and each droplet as an independent micro-cultivator. Attributing to the small volume, high throughput, good controllability, and real-time monitoring, the modularized system allows high-throughput cultivation and adaptive evolution of microbes, demonstrating unique advantages in high-throughput culture of microbes. This review summarized the application of ARTP to the breeding of edible and medicinal mushrooms and MMC system to high-throughput sorting of microbes, which is expected to serve as a reference for the breeding of edible and medicinal fungi.

**Keywords:** atmospheric and room temperature plasma; microbial microdroplet culture; screening; edible and medicinal fungi; progress

高效安全是未来微生物研究的重要方向，常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术和微生物液滴培养(microbial microdroplet culture, MMC)筛选技术正好满足了这 2 个特点。尤其是对于食药真菌这类大型真菌，相较于传统的物理诱变(紫外线、X 光线、Y 射线等)及化学诱变(浸渍法、涂抹法、施入法等)，ARTP 技术因其高效的诱变性能、对遗传物质的多样性损伤及温和

安全的操作环境，目前已经广泛应用在灵芝、桑黄、猴头等食药真菌中<sup>[1-3]</sup>，诱变后的菌株能够高产某种活性物质、显著提高菌株生长速度、增大生物量以及增强抗氧化性、耐酸碱性等，有效地解决了市场对相关产品的需求。然而微生物液滴培养技术可生成多个微液滴，将微生物培养在液滴中，并且液滴间相互独立，有效减少了菌落间相互影响，因其高通量的性能构建高效的筛选平台达到快速筛选目标菌株

的目的。现总结近年来在微生物诱变筛选上应用这两项技术的案例, 以期为食药用真菌及相关领域的研究人员提供参考。

## 1 ARTP 技术在食药用真菌育种中的应用进展

### 1.1 ARTP 技术介绍

ARTP 是一种能够在正常大气压下产生高活性粒子浓度且温度在 25–40 °C 的等离子体射流。其诱变原理是利用活性能量粒子对菌株遗传物质造成损伤, 从而诱发菌株细胞启动 SOS 机制, 最终获得遗传稳定的诱变菌株。ARTP 技术因其更加高效的诱变性能、适用范围更广、对遗传物质损伤机制更多样、操作安全、环境温和等特点已被广泛应用于微生物诱变中。

### 1.2 ARTP 在食药用真菌中的应用案例

微生物高效诱变和高通量筛选是目前微生物实验研究的一个重要方向, 对未来创新实验技术、优化试验方案及生物生产等方面都有很大的促进作用。经过较多研究发现 ARTP 诱变方法比较适合使用在真菌上。因其具有种类丰富的活性粒子、实验条件较为温和安全、易于控制和诱变效率高等众多优点, 目前也有相关学者将 ARTP 用于对食药用真菌等大型真菌的诱变, 其实验结果也是比较理想的。

近年来, ARTP 诱变育种技术在食药用真菌育种中得到了成功应用, 主要应用案例包括<sup>[4-8]</sup>: (1) 在蛹虫草菌株诱变选育方面, 经过 ARTP 诱变后虫草素产量提高了 5 倍; (2) ARTP 诱变桑黄属菌株, 得到了胞内黄酮产量显著提高的诱变株, 为桑黄属菌株的选育及提高黄酮产率提供了高效可行的诱变方法; (3) ARTP 诱变的灵芝在增加多酚物质产量的同时提高了其抗氧化能力; (4) ARTP 诱变猴头菌, 获得了胞内多

糖结构及活性显著变化的诱变体, 筛选到的诱变菌株的生物活性优于出发菌株, 为猴头菌相关产品的开发提供了优质资源; (5) ARTP 诱变黑木耳得到了优良的诱变株, 其生物量及胞内胞外多糖含量都有了显著的提高; (6) ARTP 诱变的草菇其抗低温胁迫能力及生长速度都有显著提高; (7) ARTP 诱变性状不断退化的滑子菇后, 其生长速度、子实体形态及菇型更加优良。ARTP 在食药用真菌上的应用案例如表 1 所示。

#### (1) 蛹虫草菌株诱变

刘广建等通过使用 ARTP 技术诱变普通菌株 SWCor-01 高产蛹虫草蛋白, 推测结合现在高效筛选的微生物液滴培养技术能够更快速获得目标菌株, 从而更有效提高菌株的蛋白产量<sup>[9]</sup>。然而对食药用真菌进行诱变是一个比较复杂的过程, 尚未发现较为简单的方法。例如筛选营养缺陷型的菌株主要还是通过培养基上菌落生长的形态和速度以及菌株之间的拮抗进行初次筛选<sup>[9]</sup>, 归根结底主要还是通过感官来判断。因此, 在筛选菌株过程中要有较高的致死率才能保证平板上菌株群落数量较少, 从而便于直接观察。实验结果表明, 由于对某种目标菌株的筛选具有较强随机性, 理想致死率并不一定能够筛选出目标菌株, 可见传统的筛选方法存在较大限制性<sup>[9-10]</sup>。

科研人员选用了一种新的诱变方法——常压室温等离子体作为诱变源。因其具备较多优点且反应温和安全, 所以对蛹虫草菌株进行诱变。ARTP 诱变方法能够有效损伤真核生物的遗传物质, 从而有效提高了对其他蛹虫草的致死率。实验成功筛选到 2 株高蛋白诱变株 Cor27012 和 Cor15003, 分别比对照提高了 76.62% 和 40.30%, 表明 ARTP 有更好的诱变性能, 对于蛹虫草诱导效果较好, 推测其在其他食药用真菌诱变上也会有较好的应用<sup>[9-10]</sup>。

表 1 ARTP 在食药真菌上的应用案例

Table 1 Application cases of ARTP on edible and medicinal fungi

菌种名称 Species name	诱变方法 Mutation method	诱变目的 Purpose of mutagenesis	结果 Result	参考文献 References
蛹虫草 (SWCor-01) <i>Cordyceps militaris</i> (SWCor-01)	原生质体 10 $\mu$ L, 功率 120 W, 处理距离 2 mm, 气流量 10 SLM Protoplast 10 $\mu$ L, power 120 W, treatment distance 2 mm, gas flow 10 SLM	提高蛹虫草蛋白的 产量 Increasing the yield of <i>Cordyceps militaris</i> protein	筛选到 2 株高蛋白诱变株: Cor27012 与 Cor15003, 分别比对照提高 76.62%和 40.30% Two high protein mutants, Cor27012 and Cor15003, were successfully screened, which were 76.62% and 40.30% higher than the control, respectively	[9-10]
桑黄(SH1) <i>Phellinus igniarius</i> (SH1)	原生质体 20 $\mu$ L, 功率 120 W, 处理距离 2 mm, 气流量 10 SLM Protoplast 20 $\mu$ L, power 120 W, treatment distance 2 mm, gas flow 10 SLM	获取能够高产黄酮 物质的桑黄菌株 To obtain <i>Phellinus</i> strains with high flavonoid yield	筛选到 3 株较优良的诱变菌株 A67、A130 和 A157, 与出发菌株相比较, 胞内黄酮分别提高 了 86.7%、20.0%和 60.0% Three excellent mutant strains A67, A130 and A157 were screened, and compared with the original strain, the intracellular flavonoids increased by 86.7%, 20.0% and 60.0%, respectively	[11-13]
灵芝(G0157) <i>Ganoderma lucidum</i> (G0157)	原生质体 20 $\mu$ L, 功率 120 W, 距离 2 mm, 气流量 10 SLM Protoplast 20 $\mu$ L, power 120 W, treatment distance 2 mm, gas flow 10 SLM	获得高产多酚类物 质且抗氧化能力强的 优良菌株 The high yield of polyphenols and high antioxidant ability were obtained	实验获得 A14 和 A19 这 2 株抗氧化能力 最显著的诱变菌株, DPPH 自由基清除率、 FRAP 值、TEAC 值与出发菌株相比较分别提 高了 139.67%和 134.59%、203.80%和 196.48%、 147.30%和 140.15% The scavenging rate of DPPH free radical, FRAP value and TEAC value of A14 and A19 mutated strains with the most significant antioxidant capacity were increased by 139.67% and 134.59%, 203.80% and 196.48%, 147.30% and 140.15%, respectively, compared with the original strain	[14-15]
猴头菇 (0605) <i>Hericium erinaceus</i> (0605)	原生质体 20 $\mu$ L, 功率 120 W, 处理距离 2 mm, 气流量 10 SLM Protoplast 20 $\mu$ L, power 120 W, treatment distance 2 mm, gas flow 10 SLM	获得能够高产猴头 多糖的菌株 To obtain the strain with high yield of <i>Hericium</i> polysaccharide	筛选出 5 株优良的诱变菌株, 最优良的 321 菌 株对比出发菌株, 生物量提高 30.37%, 胞内 多糖提高 47.45% Five excellent mutant strains were screened. Compared with the primary strain, the biomass of strain 321 increased by 30.37% and the intracellular polysaccharide increased by 47.45%	[16]
黑木耳 (黑威半筋) <i>Auricularia auricula</i> (Hei Wei Ban Jing)	原生质体 10 $\mu$ L, 功率 100 W, 处理距离 2 mm, 气流量 10 SLM Protoplast 10 $\mu$ L, power 100 W, treatment distance 2mm, gas flow 10 SLM	提高多糖的产量 Increase the yield of polysaccharide	获得了 4 株优良的诱变株, 其中 Aa66 菌株 生物量可达 32.98 g/100 mL, 总多糖含量可达 28.67 g/L, 与出发菌株相比有显著提高 The biomass of Aa66 strain was 32.98 g/100 mL, and the total polysaccharide content was 28.67 g/L, which was significantly higher than that of the original strain	[17-18]

(待续)

(续表 1)

草菇(V23)	原生质体 20 $\mu$ L, 功率 125 W, 提高草菇的抗低温胁迫能力	筛选出 3 株抗冻能力明显提高的诱变菌株, 在 20 $^{\circ}$ C 低温环境下生长速度提高了 17%–57%, 出菇爬料速度提高了 0.8–2.4 倍, 出菇时间提前 1–2 d
<i>Volvariella volvacea</i> (V23)	处理距离 2 mm, 气流量 10 SLM Protoplast 20 $\mu$ L, power 125 W, treatment distance 2 mm, gas flow 10 SLM Improve the ability of <i>Volvariella volvacea</i> to resist low temperature stress	Three mutant strains with significantly improved freezing resistance were screened out, the growth rate of which was increased by 17%–57%, the rate of mushroom climbing was increased by 0.8–2.4 times, and the mushroom emergence time was advanced by 1–2 d at 20 $^{\circ}$ C
滑子菇 (早丰 112)	原生质体 10 $\mu$ L, 功率 120 W, 解决原本菌株退化问题	筛选出 3 株最优良的诱变株, 菇型以及子实体丛生数量明显好于出发菌株
<i>Pholiota nameko</i> (Zaofeng112)	8 SLM Protoplast 10 $\mu$ L, power 120 W, treatment distance 2 mm, gas flow 8 SLM Solve the problem of strain degradation	Three of the most excellent mutant strains were selected, and the mushroom type and the number of clusters of fruiting bodies were significantly better than the original strains

注: 单位 SLM 表示标况下(0  $^{\circ}$ C, 1 atm)升每分钟Note: The unit SLM is the standard condition (0  $^{\circ}$ C, 1 atm) liter per minute.

## (2) 桑黄诱变

目前野生桑黄数量在不断减少, 同时人工培育的桑黄生长周期较长, 无法满足药物生产需求, 因此需要通过诱变筛选出生长速度快、生物量大且产活性物质多的优良菌株。相关研究表明, 桑黄的主要活性物质是黄酮类物质, 并且桑黄液态发酵的菌丝体与子实体中的活性物质相似, 所以考虑通过液态发酵提取菌丝体中的黄酮物质。张赫男等利用 ARTP 技术诱变桑黄 SH1, 先测定其致死率后通过复筛获得了 3 株较优良的菌株 A67、A130 和 A157, 与出发菌株相比较, 胞内黄酮分别提高了 86.7%、20.0%和 60.0%<sup>[11]</sup>。将这 3 个菌株通过拮抗试验和随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析发现 3 个诱变株有遗传差异, 而且总抗氧化能力(trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)和铁离子抗氧化能力(ferric reducing ability of plasma, FRAP)实验结果表明诱变株 A67 的抗氧化性最强<sup>[11-12]</sup>。李

正鹏等运用相关技术培育出桑黄新品种“沪桑 2 号”<sup>[13]</sup>。该实验表明 ARTP 能够很好地适用于食药真菌的诱变, 因其温和的诱变环境以及对微生物遗传物质多样损伤性较小的优点, 从而考虑在其他较为匮乏的食药真菌上应用 ARTP 技术, 一定程度上扩大了桑黄的利用, 满足了桑黄药物的开发需求。

## (3) 灵芝诱变

张越野等<sup>[14]</sup>用 ARTP 技术诱变灵芝 G0157, 将诱变后的 20 个菌株发酵培养并测定分析其活性物质产量, 他们通过实验获得 A14 和 A19 这 2 株抗氧化能力最显著的诱变菌株, 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率、FRAP、TEAC 与出发菌株相比分别提高了 139.67%和 134.59%、203.80%和 196.48%、147.30%和 140.15%<sup>[14]</sup>。灵芝的抗氧化性随着其内部的多酚物质产量增加而增强, 增加灵芝抗氧化能力的同时增加了多酚物质产量, 获得了能够高产多酚物质的优

良菌株。此外,李塬等<sup>[15]</sup>运用该技术获得了能够高产灵芝多糖的新菌株。张越野等的实验表明 ARTP 技术能够有效地应用于灵芝这一大型的真菌中,并且可推测通过 ARTP 能诱变出高产其他活性物质的菌株<sup>[14]</sup>。

#### (4) 猴头菇诱变

目前,猴头多糖主要来源于栽培的子实体和发酵的菌丝体,但是随着菌株不断退化其内部多糖含量较低且不稳定<sup>[16]</sup>,导致了猴头菇品质较差。为了获得高产猴头多糖的菌株,杨珊等<sup>[16]</sup>首次采用了 ARTP 诱变方法对猴头菇 0605 进行诱变,因为其与传统的诱变方法相比诱变环境温和且安全性高。

实验筛选出 5 个性状稳定的优良菌株,其中产多糖能力最佳的 321 菌株与出发菌株相比生物量提高 30.37%、胞内多糖提高 47.45%<sup>[16]</sup>。结果表明 ARTP 技术能够有效应用于猴头菇诱变。诱变菌株的猴头多糖产量有了明显提高,同时提高了多糖的抗氧化能力,原因在于诱变过程中可能改变了多糖的合成和代谢途径<sup>[16-17]</sup>。该实验利用 ARTP 诱变出高产胞内多糖的菌株,一方面表明 ARTP 的适用性,另一方面获得了更具有食药价值的猴头菇菌株,从而满足药品及食品的生产需求。

#### (5) 黑木耳诱变

黑木耳的营养价值主要存在于内部的多糖,但是普通黑木耳中的多糖含量并不高。为提高黑木耳的营养价值即提高其多糖产量,王晨等<sup>[18]</sup>以黑威半筋为出发菌株,用 ARTP 技术对其进行诱变,筛选后获得了 4 个优良的诱变株,其中 Aa66 生产多糖能力最佳,生物量可达 32.98 g/100 mL,总多糖含量可达 28.67 g/L,与出发菌株相比有显著提高。从而证明 ARTP 技术能够应用于黑木耳这类大型食药真菌的诱变,环境温和,便于操作且诱变效果较好,

能够有效提高黑木耳多糖含量及营养价值,满足了人们的日常需求,体现了 ARTP 技术的优点,并为其在其他大型真菌上应用提供了更好的依据<sup>[18]</sup>。

#### (6) 草菇

传统草菇育种方法包括自然育种和杂交育种等,虽然方法简单容易操作,但是很难从中快速获得优良菌株,并且工作量很大,难以形成性状稳定的优良菌株。何建华等<sup>[19]</sup>利用 ARTP 技术对草菇进行诱变,以期得到抗低温胁迫能力更强的优良菌株,经过初筛、复筛及拮抗试验等,获得了 3 株抗冻能力明显提高的诱变菌株,在 20 °C 低温环境条件下与对照相比生长速度提高了 17%–57%,出菇爬料速度提高了 0.8–2.4 倍,出菇时间提前 1–2 d,抗低温胁迫能力提高了 24 h;实验结果表明 ARTP 技术不仅能够改善菌株代谢特性,还能优化其对不同环境的抵抗能力,为该技术应用于环境较差地区的食药真菌诱变种植提供了参考。

#### (7) 滑子菇

滑子菇是湖南省常德地区常见的食用菌,传统栽培的菌株早丰 112 和 C3 不断退化,抗病能力变差、生长速度减缓、菇型较差且子实体丛生数量不断减少,需要通过诱变育种使其产生优良的性状。孙艳颖<sup>[20]</sup>使用 ARTP 技术对菌株早丰 112 进行诱变,经过初筛、复筛及拮抗试验获得了 16 株较优良的诱变株;对诱变株进行培养后,根据出菇情况发现有 11 株诱变株成功出菇,但是大部分诱变株出菇数量很少且多为畸形菇;通过比较子实体培养结果,筛选出 3 株最优良的诱变株,菇型及子实体丛生数量明显好于出发菌株,有效地解决了菌株退化的问题;该实验为 ARTP 技术应用于其他食药真菌菌种退化问题提供了一个有效参考<sup>[20]</sup>。

以上案例证明, ARTP 技术在食药真菌领域的应用已经比较成熟, 不管是用于诱变菌株使其获得高产某种活性物质的特性, 还是优化其抗病性、生长速度等都有很好的效果。然而运用该技术需要测定菌株的最佳致死率, 即使 90%–95% 的致死率也只是使得菌株能够尽可能地正向诱变, 无法确保其诱变的方向, 其不确定性仍然存在, 还需要进一步研究。

## 2 MMC 技术在微生物筛选中的应用进展

### 2.1 MMC 技术介绍

#### 2.1.1 MMC 技术的起源

微型、全自动及智能是现代科学技术发展的必然趋势。随着微型机电系统技术的发展, 电子设备已经从笨重巨大的物体发展成为由许多微型集成芯片组成的小型电子设备甚至是微型设备<sup>[21]</sup>。在 20 世纪 60 年代初世界上第一台微型压力传感器诞生时, 其被用于检测汽车轮胎压力强度及医疗上的有创血压计中。

#### 2.1.2 MMC 技术的原理

微流控微生物液滴培养技术是指在至少一维微米尺度或纳米尺度的低维通道结构中, 控制流体体积从皮升到纳升进行流动、传质和传热的技术。核心内容包括 3 个方面:

(1) 在微米级甚至纳米级的微通道结构的设计和制造中, 通道表面面积与内部空间尺寸的比值较大, 通道的结构和形状对微通道壁特性有一定的影响<sup>[22]</sup>。

(2) 微纳尺度流体的驱动和控制与流动状态和传输特性有很大的不同, 相比之下, 微纳尺度流体的比表面积增大, 而表面张力是影响液固、液气界面宏观形态、尺寸和位置的主要因素之一。

(3) 微生物液滴培养器件与封装系统的集

成是微器件制造技术和集成技术发展的重要分支之一, 微生物液滴培养器件变得越来越小、越来越多样化, 往往使得微电子或微机械器件具有完整的功能系统<sup>[22-24]</sup>。

### 2.2 MMC 技术在微生物高效筛选中的应用

传统筛选微生物的方法主要是通过平板和摇瓶进行筛选, 存在筛选速度较慢、周期长、筛选出的目标菌株较少、效率低下等缺陷, 因此需要更高效快速的方法筛选菌株。微生物液滴培养技术因其高通量的特性, 能够快速对微生物进行筛选, 因而逐步应用于各种微生物的筛选中, 目前主要还是应用在细菌和部分真菌例如酵母等微生物中, 以各种微生物的生物活性及其代谢产物为指标筛选出目标菌株<sup>[25-27]</sup>。其目前尚未应用在大型食药真菌例如灵芝和猴头菇等, 主要由于大型真菌的单菌株体积较大、生长分为多个阶段、生物活性和代谢产物较为复杂等原因。然而大型食药真菌的培养条件温和且易于观察其生长情况, 因此推测微生物液滴培养技术能够应用于大型食药真菌的筛选中, 但仍需要进一步解决存在的困难<sup>[28-31]</sup>。

### 2.3 MMC 技术在微生物高通量分析分选上的应用进展

随着科学技术的不断发展, 为了满足科学实验以及人们生活生产的需要, 对微生物的筛选要求越来越高, 传统的筛菌方法有较多的弊端, 例如筛选速度慢、时间长等<sup>[31]</sup>。因此, 相关领域的学者将医药、食品领域中使用较多的微生物液滴培养技术尝试应用到微生物的筛选中。目前, 该技术主要应用在细菌及部分真菌中, 在食药真菌尤其是灵芝、猴头菇等大型真菌上的应用还很少<sup>[32-33]</sup>。

#### 2.3.1 细菌的筛选

微生物液滴培养技术在细菌筛选上的应用案例如表 2 所示。

表 2 MMC 在细菌筛选上的应用案例

Table 2 Application cases of MMC in bacterial screening

菌种名称 Species name	筛选方法 Screening methods	筛选目的 Purposes of screening	实验结果 Experimental results	参考文献 References
枯草芽孢杆菌 (来自池塘水中) <i>Bacillus subtilis</i> (from the water of pond)	结合荧光检测技术, 在含有橄榄油和罗丹明 B 的微孔芯片上接种产脂肪酶的枯草芽孢杆菌 Combined with fluorescence detection, lipase producing <i>Bacillus subtilis</i> was inoculated on microchips containing olive oil and rhodamine B	筛选可以产脂肪酶的菌株 Screening of lipase producing strains	筛选出 12 个能够产生脂肪酶的菌株, 微流控技术对于目标微生物能够高效地筛选 Twelve lipase producing strains were screened out, and microfluidic technology could effectively screen the target microbes	[34-38]
地衣芽孢杆菌 (实验室保藏菌株) <i>Bacillus licheniformis</i> (laboratory preserved strains)	利用液滴生成芯片制备单细胞液滴, 再用荧光检测方法对 $\alpha$ -淀粉酶溶液进行检测 Single cell droplet was prepared by droplet generation chip, and $\alpha$ -amylase solution was detected by fluorescence detection method	筛选可以产 $\alpha$ -淀粉酶的地衣芽孢杆菌 Screening <i>Bacillus licheniformis</i> can produce $\alpha$ -amylase	构建液滴微流控的高通量筛选方法, 筛选出 5 株 $\alpha$ -淀粉酶产量较高的诱变体, 发酵酶活最大提高 66% Five mutants with high yield of $\alpha$ -amylase were screened by a high-throughput screening method of droplet microfluidic, and the fermentation enzyme activity increased by 66%	[39-45]
金黄色葡萄球菌 (中国普通微生物菌种保藏管理中心) <i>Staphylococcus aureus</i> (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)	采用含有钙黄绿素显色剂的 LAMP 扩增体系, 用金黄色葡萄球菌的 DNA 作为模板, 在 63 °C 反应 50 min 后取出, 在 365 nm 的紫外光下观察结果 LAMP amplification system containing calcein chromogenic agent was used, <i>Staphylococcus aureus</i> DNA was used as template, and the reaction was carried out at 63 °C for 50 minutes. The results were observed under 365 nm UV light	制作一个强特异性的筛选系统, 从微生物中筛选金黄色葡萄球菌 A highly specific screening system was developed to screen <i>Staphylococcus aureus</i> from microorganisms	建立了特异性较高的针对金黄色葡萄球菌的微流控液滴检测体系 Established a highly specific microfluidic droplet detection system for <i>Staphylococcus aureus</i>	[46-48]

## (1) 枯草芽孢杆菌

在众多新技术中, 张雷成<sup>[38]</sup>设计了基于琼脂糖凝胶的微型孔列阵芯片用于高通量功能性微生物筛选。此芯片中有数量很大的微型孔室, 将一部分从池塘水中找到的菌液通过稀释以后注入到芯片上。每个微孔都会捕捉到单个微生物, 从而可以进行单克隆培养, 并且以微生物单克隆培养为筛选单元, 通过微流控芯片进行微生物筛选<sup>[38]</sup>。张雷成等使用枯草芽孢杆菌进行实验<sup>[38-39]</sup>。因为枯草芽孢杆菌可以产脂肪酶,

在芯片上的荧光性可以作为检测的表征, 研究表明此芯片可以使用荧光来检测并且筛选枯草芽孢杆菌, 从而推测出不同的芯片可以筛选不同菌株。

聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 是制作微流控芯片的一种常用材料, 在此基础上出现了一种使用多孔材料合成的方法, 可以很高效地固定微生物<sup>[40-42]</sup>。多孔材料具有很多的优点, 例如固定微生物和处理污染等。该实验<sup>[38]</sup>使用液状石蜡油作为溶剂、乳化水滴



为致孔剂, 合成了具有多孔性的 PDMS 材料, 合成的过程简单快速且能够高效固定微生物。

使用琼脂糖凝胶的微流控芯片能够有效降低实验成本, 并且在短时间内培养出微生物单克隆菌落。同时与传统筛菌方法相比, 其能够高效筛选目标微生物, 大大减少了实验时间。该实验<sup>[38]</sup>提出的一种使用低温聚合乳化物的方法, 能更简单快速地合成多孔结构, 大大简化了合成步骤, 从而有效地固定微生物。

实验<sup>[38]</sup>最后通过荧光筛选出 12 株能够产脂肪酶的菌株, 但是仍然存在一些不足, 只研究基于荧光性微生物酶的筛选远远不够, 目前使用其他功能筛选目标菌株仍需要进一步实验证明。

## (2) 地衣芽孢杆菌

地衣芽孢杆菌因其独特的生物活性可以产  $\alpha$ -淀粉酶, 在食品及工业等众多领域中的应用十分广泛。虽然对其需求量很大, 但是截至目前尚无从众多菌株中筛选可以产  $\alpha$ -淀粉酶地衣芽孢杆菌的比较高效的方法。陈宇锟等<sup>[45]</sup>运用液滴微流控技术, 利用其高通量的优点结合优化的培养方法及筛选的电压, 从地衣芽孢杆菌 BLH 的诱变体库中筛选出了 5 株目标菌株<sup>[45-47]</sup>。但是该实验未进一步分析该菌高产  $\alpha$ -淀粉酶的原理, 需要从菌株基因组中找出相对应的突变基因。同时, 在实验中发现应用微流控技术进行筛选时, 电压对筛选菌株的成活率有很大影响<sup>[45-47]</sup>。因此, 可以继续改进芯片上的微孔, 使得在较低电压的情况下也能够提高菌株的存活率。由于各种微生物的特异性, 对于部分微生物的筛选依然十分复杂困难。

## (3) 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌是一种普遍存在于人类生活环境中的有害细菌, 对人类健康有很大的危害。用于检测该菌的传统方法所需要的时间过

长, 不能满足人类对细菌检测高效性的要求。苑昊<sup>[48]</sup>使用微流控技术来筛选金黄色葡萄球菌, 在该研究中使用的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)的标准菌株。*nuc* 基因作为扩增的目的基因, 根据其特异性和筛选引物制作了一个特异性很强的芯片检测系统<sup>[48]</sup>。该系统可以有效地检测金黄色葡萄球菌样品, 将样品处理、反应及结果分析集成在一个芯片上, 大大简化了检测步骤<sup>[48-50]</sup>。通过对芯片的不断优化, 能够同时检测 4 个样品, 由于芯片中的微通道相互独立, 这样的设计就能有效减少实验中可能产生的交叉污染问题, 也能大大节省检测时间, 达到高效检测的目的。

免疫荧光法是由于对样品进行定量检测的传统方法。与之相比, 通过使用微流控技术对样本进行定量检测后所得到的结果是一致的<sup>[51]</sup>。微流控技术的优点, 例如高通量、高效检测、节约试验成本、更加安全等是传统检测手段无法相比的。未来还可以应用于其他污染性微生物的检测, 包括多种细菌和病毒; 同时还能完善自然环境中包括水体、大气等污染性微生物检测体系。然而此芯片系统还存在一定缺陷, 其只能检测分析液体样本中的微生物, 需要与抽气系统相结合以后才能检测气溶胶中的金黄色葡萄球菌。目前这种系统仍需要手动操作, 未达到全自动化的程度, 还需要进一步开发自动编程系统<sup>[51-54]</sup>。

## 2.3.2 真菌的筛选

MMC 技术在真菌筛选上的应用案例如表 3 所示。

### (1) 白色念珠菌

白色念珠菌是一种机会性致病真菌, 主要存在于人的肠道和上呼吸道等部位。白色念珠菌对药物的耐药性不断增强, 临床治疗难度也

表 3 MMC 在真菌筛选上的应用案例

Table 3 Application of MMC in fungal screening

真菌菌株 Fungal strains	实验方法 Experimental method	筛选目的 Purpose of screening	实验结果 Experimental result	参考文献 References
白色念珠菌 SC5314 <i>Candida albicans</i>	菌液、药物及显色剂都是存于水相溶液中, 芯片存于油相中, 其中水相、油相流速分别为 15、30 $\mu\text{L/h}$ , 待 2 h 后进行观察 The bacteria solution, drug and chromogenic agent were stored in aqueous solution, and the chip was stored in oil phase. The flow rates of water phase and oil phase were 15 and 30 $\mu\text{L/h}$ , respectively, and were observed after 2 h	筛选出对药物更加敏感的白色念珠菌 <i>Candida albicans</i> , which are more sensitive to the drug, were screened out	能够建立微生物液滴培养筛选平台用于抗白色念珠菌药物筛选, 而且分析速度快 The droplet microfluidic screening platform can be established for anti-candida albicans drug screening, and the analysis speed is fast	[55-59]
巴斯德毕赤酵母 GS115 <i>Pichia pastoris</i> GS115	筛选时的液滴流速在 10–15 $\mu\text{L/h}$ , 油相的流速为 200–250 $\mu\text{L/h}$ , 每分钟 250 个液滴 The flow rate of droplet is 10–15 $\mu\text{L/h}$ , the flow rate of oil phase is 200–250 $\mu\text{L/h}$ , and the speed is 250 droplets/min	筛选出能够高产木聚糖的酵母 Yeast with high xylan yield was screened	微生物液滴培养筛选方法能够每小时筛选 10 万个菌株, 而且筛选出一株最优良的 SG-m5 菌株 The droplet microfluidic screening method can screen 100 000 strains per hour. A strain of SG-m5 was selected as the best strain	[60-61]
解脂耶氏酵母 Yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	将酵母菌液稀释后形成 2 500–3 000 个液滴, 每滴酵母细胞数遵循泊松分布, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 16 h 后进行荧光检测 The yeast solution was diluted to from 2 500 to 3 000 microdroplets, and the number of yeast cells per drop followed Poisson distribution. After incubation at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 16 h, fluorescence detection was conducted	筛选出高产异源酶的酵母 The yeast with high yield of heterologous enzyme was screened out	微流控技术能在单细胞的水平上高效筛选出高产异源酶的酵母, 每小时能筛选 150 株目标菌株 Microfluidic technology can efficiently screen the high-yield yeast of heterologous enzyme at the single cell level, and can be used to compare different strains in the gene pool, and 150 target strains can be screened every hour	[62-64]
米曲霉 pyrG <i>Aspergillus oryzae</i> pyrG	将稀释菌液置于水相中, 与包裹芯片的油相进行结合, 并接入 Abil EM90 作为稳定剂且控制流速观察不同流速对于液滴的影响 The diluted bacterial solution was placed in the water phase, combined with the oil phase wrapped in the chip, and connected with Abil EM90 as a stabilizer. The influence of different flow rates on the droplets was observed	筛选出营养缺陷型的菌株 The strains with nutritional deficiency were screened out	此实验获得了较高的单细胞液滴比例, 约为 30% In this experiment, a high proportion of single cell droplets was obtained, about 30%	[65-66]

不断增大, 因此需要研发更加有效的药物进行治疗。目前最常用的技术是微量液基稀释法, 又称作 96 孔板法<sup>[55-56]</sup>。此方法虽然简单, 但是需要将真菌培养到一定浓度且等待时间较长、实验试剂消耗较大。

随着微流控技术的不断发展, 目前已使用

微生物液滴培养技术筛选白色念珠菌药物, 有研究利用氧化还原指示剂阿尔玛蓝能够在活细胞中显示荧光信号的特性, 将其与药物、白色念珠菌一起存于液滴中, 从而进行检测药物的抗真菌活性<sup>[57-58]</sup>。微生物液滴培养技术是微流控技术的一个分支, 利用流体相互不相容的特

点形成很多微型反应器。微流控芯片上有很多微型通道, 尺寸与真菌的大小接近, 可以检测出单个菌株。与传统 96 孔板相比, 微生物液滴培养芯片的高通量性使其能够在较短的时间内生产出更多的液滴并对液滴进行检测, 而且能够进行较多数量的实验, 得到的数据更加可靠, 多个通道同时进行还能有效地减少实验时间。在微型实验平台中消耗的实验试剂也非常少, 能够有效节约实验成本。在未来可能实现更多数量、不同种类的药物筛选同时进行, 将微流控技术的高通量性优点发挥出来<sup>[59]</sup>。

## (2) 巴斯德毕赤酵母

巴斯德毕赤酵母是一种能够表达千种外源蛋白并且其表达体系较为成熟的工程菌, 其因优良的表达特性被广泛应用于各领域<sup>[60]</sup>。然而其巨大的需求量如果只是靠传统基因改造的方法提高外源基因表达远远不够, 因此需要选择更加高效的筛选方法。相关的实验人员采用微流控技术, 将单个菌株捕捉在独立的微型结构中进行培养及酶表达<sup>[60-61]</sup>。其中一种筛选方法是以木聚糖酶融合荧光蛋白为基础, 通过对液滴中的荧光信号进行检测并对筛选的方法进行模拟测试<sup>[60]</sup>, 以此方法筛选巴斯德毕赤酵母可以达到每小时筛选十万株目标菌株。相较于传统的培养皿中微孔板筛选法大大降低了实验成本, 并且微流控芯片的高通量能够更加高效地筛选菌株, 节约了大量实验时间。然而对于其他目标菌株的筛选研究尚未深入, 因为不同菌株所产生的代谢产物不同, 所检测的方法也更加复杂, 因此微流控技术还不能普适于真菌的筛选<sup>[61]</sup>。

## (3) 解脂耶氏酵母

在目前的研究中, 大肠杆菌的细胞质是表达大多数酶的主要途径, 这就导致了裂解的过

程只能在检测酶活性的过程中进行<sup>[62-63]</sup>。然而待检测的酶是必须通过细胞外或者细胞表面从而与液滴中的底物混合。为了解决这个问题, 国外的科研人员利用酵母分泌的异源酶构成了一个高效的表达系统。

为了获得异源酶, 需要筛选出能够高产此种酶的酵母菌, 而传统的筛选方式效率较低, 不能满足需求。因此外国学者采用了微生物液滴培养技术对能够高产油松的酵母菌进行筛选<sup>[63]</sup>, 科研人员首先从酵母菌基因组中选择了 5 个水解基因, 构建了 5 个能够产异源酶的菌株并且成功表达, 在此基础上又设计了一个微生物液滴培养平台, 对酵母进行试验。微流控芯片将单个酵母单独培养, 再注入相关酶的底物并根据酶的活性对液滴进行分类筛选, 从而获得目标菌株, 能够每小时筛选 150 株<sup>[64]</sup>。微流控技术的高通量性有效节省了筛选菌株的时间, 使得高质量的异源酶产量提高, 满足了实验的需求<sup>[65]</sup>。

因为部分大型真菌的代谢产物更复杂且生物活性更多样, 目前在其他真菌尤其是较大的真菌的应用上还存在较大的困难。

## (4) 米曲霉菌

米曲霉通常被用作表达外源蛋白的宿主菌, 因其生长速度很快且蛋白的外分泌能力很强, 在发酵领域的使用非常广泛。其中营养缺陷型的菌株更加安全可靠, 但是此种菌株的量很少且难以获得。为了满足生产的需求, 黄文平利用微流控技术的高通量性特点对其营养缺陷型的菌株进行筛选<sup>[66]</sup>。

黄文平等选择流动聚焦型芯片产生液滴, 使用不同的非离子表面活性剂测试液滴的稳定性并定时观察<sup>[66-67]</sup>, 实验结果表明, 通过等离子诱变的方法将米曲霉 H4 进行 320 s 的诱变,

并通过微流控芯片进行筛选后得到了营养缺陷型菌株 G1, 很大程度上减少了实验试剂的消耗, 并且节约了实验时间成本。最后经过鉴定, 该菌株可以在接受互补质粒后恢复到原本的表现型<sup>[68-69]</sup>。从而可以推测, 如果在营养缺陷型的菌株中插入具有更高价值的外源基因, 就可以使其产生更多高价值蛋白。然而该实验仍然存在一定的缺陷, 实验中微流控系统还需要人工操作, 并非全自动化, 还需要进一步优化系统性能, 尽可能使其全自动化<sup>[69-72]</sup>。

### 3 展望

ARTP 技术因其活性粒子种类多、操作可控性强、基因损伤强度高、诱变速度快、操作条件温和、安全性高等特点在食药用真菌上的应用比较广泛, 在未来食药用真菌的研究中可以获得活性物质产量更高、抗氧化性更强、生物量更大的优良菌株, 使得食药用真菌能够填补其在医药、食品及化工行业中的空白。然而诱变时得知菌株的致死率才能调整好诱变的参数, 往往筛查一个新菌株的致死率需要较长的时间, 所以还需要进一步研究。本实验团队<sup>[11-16]</sup>已经运用 ARTP 技术在部分食药用真菌上有了较为成熟的实验成果, 未来将继续研究该技术在更多食药用真菌品种上的应用, 不断填补技术的应用空白。

MMC 技术目前主要应用在细菌中, 查阅相关文献后推测该技术可应用在食药用真菌上。该技术具有高通量、筛选效率高、液滴之间相互独立培养、能实时检测在 600 nm 处的吸光度值以及荧光检测、操作简单、更加安全等特点。传统筛选食药用真菌的方法主要是用摇瓶和平板筛选, 筛选工作量较大, 筛选时间较长, 效率较低, 成本较高。如果能够利用 MMC 筛选

食药用真菌, 其高效性、安全性、能够有效地降低实验成本、减少实验时间, 对于食药用真菌高效筛选是很好的方法, 能一定程度上解决传统平板筛选和摇瓶筛选耗时过长、操作过于烦琐的缺点。然而, 不同于其他真菌、细菌等微生物, 食药用真菌菌丝肉眼可见, 其体积远大于其他微生物, 而且生长一定时间后会形成球状菌丝体, 所以需要严格控制食药用真菌在 MMC 仪器中的培养时间, 防止菌丝体生长过大的同时确保其正常生长。在食药用真菌菌丝体的筛选上, 应该以微小菌丝体形成的小液滴(不一定是单细胞)作为筛选对象, 而不是以单细胞筛选作为评价标准。筛选出的有效微小菌丝体小液滴可进一步通过摇瓶培养进行验证, 可以较大程度地降低筛选的工作量。目前该技术在应用上还存在一定的瓶颈, 例如食药用真菌液的不均匀性导致液滴的吸光度存在较大的误差, 使用 MMC 仪器检测吸光度值的功能无法有效地直接反映液滴中菌株的生长情况, 可以选择其他的检测方法从参与其代谢途径的重要酶入手, 例如可以选择利用荧光染料使得胞内外代谢物产生荧光效应间接反映菌株的代谢产物情况。食药用真菌的生长速度相较于其他微生物相对较慢, 而且食药用真菌中的代谢产物与其他微生物有所区别, 结构更加复杂且主要通过化学法进行检测, 无法在 MMC 中操作, 所以寻找能使其胞内物质产生荧光效应的荧光染料也存在一定的困难, 需要进一步实验克服这些困难并检验用微生物液滴培养系统技术筛选食药用真菌的可行性。

目前, 将 ARTP 技术和 MMC 技术相结合的研究较少。本实验团队开始尝试将这 2 项技术相结合, 初步试验其效果。虽然本团队对 ARTP 技术在灵芝诱变育种上已有较为丰富的

应用经验<sup>[11-16]</sup>, 但是和 MMC 技术相结合的技术需要进一步进行分析处理。建议先利用 ARTP 技术诱变已有的菌株, 使其发生突变获得可能存在的目标菌株, 再使用 MMC 技术进行高效筛选, 随后通过例如荧光检测的方法使得液滴中食药真菌的胞内物质产生一定的荧光效应, 从而初步筛选出目标菌株, 对初步筛选的菌株进行扩大培养, 通过拮抗试验的方式复筛后用化学法检测其代谢产物, 从而对筛选的效果进行验证, 如此反复实验一定次数, 有可能获得最优良的目标菌株。通过将两项技术的优点相结合, 一方面发挥了 ARTP 对基因损伤的多样性, 可能使菌株获得更多的优良特性, 另一方面 MMC 技术高效筛选的优点一定程度上能够弥补 ARTP 诱变存在的不确定性, 从而达到更加高效地获取性状更加优良菌株的目的, 满足人们生产生活及科学实验方面的需求。

## REFERENCES

- [1] 朱瑞敏, 邱晨曦, 韩悦, 丁延芹, 杜秉海, 汪城墙. 微生物育种物理诱变技术 ARTP 的应用进展[J]. 生物技术世界, 2016, 13(4): 20-23  
Zhu RM, Qiu CX, Han Y, Ding YQ, Du BH, Wang CQ. The application progress of ARTP which is a physical mutation breeding technology of microorganism[J]. Biotech World, 2016, 13(4): 20-23 (in Chinese)
- [2] Ye LT, Ye RF, Hu FX, Wang GZ. Combination of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, genome shuffling and dimethyl sulfoxide (DMSO) feeding to improve FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis*[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(9): 1809-1820
- [3] 邢新会, 张翀, 李和平, 王立言. ARTP 技术在食用真菌育种中的应用进展[A]//中国菌物学会[C]. 西安, 2019: 306  
Xing XH, Zhang C, Li HP, Wang LY. Application progress of ARTP mutation technology in edible fungi breeding[A]//Mycological Society of China[C]. Xi'an, 2019: 306 (in Chinese)
- [4] Li J, Guo SY, Hua Q, Hu FX. Improved AP-3 production through combined ARTP mutagenesis, fermentation optimization, and subsequent genome shuffling[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(6): 1143-1154
- [5] 徐欢欢, 张红兵, 李会宣, 李磊. 常压室温等离子体技术在微生物诱变中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(4): 358-362  
Xu HH, Zhang HB, Li HX, Li L. Application progress of atmospheric and room temperature plasma technology in microbial mutagenesis[J]. Current Biotechnology, 2020, 10(4): 358-362 (in Chinese)
- [6] Cai M, Wu YZ, Qi H, He JZ, Wu ZZ, Xu HJ, Qiao MQ. Improving the level of the tyrosine biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through HTZ1 knockout and atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(1): 49-62
- [7] 付显锋, 吕晓东, 陈金良, 卢淑芳, 张利英. 香菇菌株高温栽培筛选研究[J]. 北方园艺, 2020(21): 116-122  
Fu XF, Lyu XD, Chen JL, Lu SF, Zhang LY. Study on screening of high temperature cultivation of *Lentinus edodes*[J]. Northern Horticulture, 2020(21): 116-122 (in Chinese)
- [8] 林杨, 布丽根·加冷别克, 孙建, 谭慧林, 周洁, 刘少杰, 王伟, 顾美英, 张志东. 乳酸菌的筛选及高产酸菌株的常压室温等离子体诱变选育[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 176-181  
Lin Y, Buligen-JLBK, Sun J, Tan HL, Zhou J, Liu SJ, Wang W, Gu MY, Zhang ZD. Screening of lactic acid bacteria and breeding of high acid producing strain by ARTP mutation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 176-181 (in Chinese)
- [9] 刘广建, 郑惠华, 蒋益, 张辰, 薛璟, 季宏更, 张蕾. 蛹虫草高产菌丝体蛋白菌株的 ARTP 诱变选育[J]. 食用菌, 2020, 42(5): 12-14, 18  
Liu GJ, Zheng HH, Jiang Y, Zhang C, Xue J, Ji HG, Zhang L. ARTP mutagenesis and breeding of *Cordyceps militaris* strains with high mycelium protein[J]. Edible Fungi, 2020, 42(5): 12-14, 18 (in Chinese)
- [10] 姚青蔚. 产油丝状真菌的筛选及诱变育种[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017  
Yao QW. Screening and mutation breeding of oleaginous filamentous fungi[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)
- [11] 张赫男, 汪雯翰, 曲德辉, 唐传红, 张劲松, 吴迪, 杨焱. 利用常压室温等离子体诱变技术选育高产黄酮的桑黄菌株[J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 49-55

- Zhang HN, Wang WH, Qu DH, Tang CH, Zhang JS, Wu D, Yang Y. Rational selection of *Phellinus baumii* mutants for improved intracellular flavonoids biosynthesis by atmospheric room temperature plasma mutagenesis[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2018, 25(2): 49-55 (in Chinese)
- [12] 张赫男, 曲德辉, 杨焱, 唐传红, 张劲松, 颜梦秋. 桑黄菌株的物理诱变及优势菌株的筛选[A]//中国菌物学会[C]. 福州, 2016: 258-259
- Zhang HN, Qu DH, Yang Y, Tang CH, Zhang JS, Yan MQ. Physical mutagenesis of *Phellinus baumii* mutants and screening of dominant strains[A]//Mycological Society of China[C]. Fuzhou, 2016: 258-259 (in Chinese)
- [13] 李正鹏, 陈万超, 张赫男, 张忠, 吴迪, 杨焱. 暴马桑黄新品种‘沪桑 2 号’[J]. *园艺学报*, 2021. Doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2021-0124
- Li ZP, Chen WC, Zhang HN, Zhang Z, Wu D, Yang Y. A new *Sanghuangporus baumii* cultivar ‘Husang 2’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021. Doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2021-0124 (in Chinese)
- [14] 张越野, 唐传红, 谭贻, 冯娜, 刘艳芳, 唐庆九, 张劲松. ARTP 诱变灵芝菌株筛选高抗氧化能力新菌株研究[A]//中国食品科学技术学会第十七届年会论文集[C]. 西安, 2020: 311-312
- Zhang YY, Tang CH, Tan Y, Feng N, Liu YF, Tang QJ, Zhang JS. Screening new strains with high antioxidant capacity by ARTP mutagenesis of *Ganoderma lucidum*[A]//Abstracts of the 17th annual meeting of Chinese society of food science and technology[C]. Xi'an, 2020: 311-312 (in Chinese)
- [15] 李塬, 张赫男, 谭贻, 刘艳芳, 冯杰, 张越野, 唐传红, 张劲松. 常压室温等离子体诱变选育高产多糖灵芝新菌株[J]. *食用菌学报*, 2021, 28(2): 36-41
- Li Y, Zhang HN, Tan Y, Liu YF, Feng J, Zhang YY, Tang CH, Zhang JS. Screening of a high polysaccharide content *Ganoderma lucidum* strain by ARTP[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2021, 28(2): 36-41 (in Chinese)
- [16] 杨珊, 杨焱, 李巧珍, 吴迪, 杨瑞恒, 汪文翰, 张赫男. 常压室温等离子体诱变筛选高产多糖猴头菌株的研究[J]. *上海农业学报*, 2019, 35(5): 6-11
- Yang S, Yang Y, Li QZ, Wu D, Yang RH, Wang WH, Zhang HN. Screening of high-yield polysaccharide *Hericium erinaceus* by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2019, 35(5): 6-11 (in Chinese)
- [17] Qiu L, Nie SX, Hu SJ, Wang SJ, Wang JJ, Guo K. Screening of *Beauveria bassiana* with high biocontrol potential based on ARTP mutagenesis and high-throughput FACS[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 171: 104732
- [18] 王晨, 马欣欣, 平琳琳, 王谦. ARTP 技术选育黑木耳优良发酵菌株初探[J]. *中国食用菌*, 2021, 40(3): 17-22, 26
- Wang C, Ma XX, Ping LL, Wang Q. Preliminary study on breeding excellent fermentation strains of *Auricularia auricularae* by ARTP mutation technology[J]. *Edible Fungi of China*, 2021, 40(3): 17-22, 26 (in Chinese)
- [19] 何建华, 蒋玮, 吕贝贝, 李鹏, 武国干, 王金斌, 祝子坪, 吴潇, 唐雪明. ARTP 诱变筛选草菇优良菌株及 RAPD 分析[J]. *核农学报*, 2014, 28(11): 1950-1955
- He JH, Jiang W, Lü BB, Li P, Wu GG, Wang JB, Zhu ZP, Wu X, Tang XM. Screening and RAPD analysis of *Volvariella volvacea* ARTP mutants[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(11): 1950-1955 (in Chinese)
- [20] 孙颖颖. 香菇、滑子菇新品种选育研究[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2015
- Sun YY. Studies on the breeding of new varieties of *Lentinula edodes* and *Pholiota nameko*[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2015 (in Chinese)
- [21] Zeng WZ, Guo LK, Xu S, Chen J, Zhou JW. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888-906
- [22] Wang YT, Zhang XX, Shang LR, Zhao YJ. Thriving microfluidic technology[J]. *Science Bulletin*, 2021, 66(1): 9-12
- [23] 钟明浩, 郭钟宁, 刘宇迅. 基于微流控技术的液滴微颗粒分选[J]. *微纳电子技术*, 2021, 58(4): 332-336
- Zhong MH, Guo ZN, Liu YX. Droplet micro-particle separation based on microfluidic technology[J]. *Micronanoelectronic Technology*, 2021, 58(4): 332-336 (in Chinese)
- [24] 刘卫枝. 基于微流控技术的单细胞精确操控平台的建立及其在单细胞分析中的应用[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2019
- Liu WZ. Construction of single-cell precise manipulation platform based on microfluidics and its application in single cell analysis[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2019 (in Chinese)
- [25] 闫嘉航, 赵磊, 申少斐, 马超, 王进义. 液滴微流控

- 技术在生物医学中的应用进展[J]. 分析化学, 2016, 44(4): 562-568
- Yan JH, Zhao L, Shen SF, Ma C, Wang JY. Application progress of droplet-based microfluidics in biomedicine[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(4): 562-568 (in Chinese)
- [26] McDaniel J, McDaniel S, Samiano BJ, Marrujo M, Kingsley K, Howard KM. Microbial screening reveals oral site-specific locations of the periodontal pathogen *Selenomonas noxia*[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2021, 43(1): 353-364
- [27] Fitzsimons MS, Novotny M, Lo CC, Dichosa AEK, Yee-Greenbaum JL, Snook JP, Gu W, Chertkov O, Davenport KW, McMurtry K, et al. Nearly finished genomes produced using gel microdroplet culturing reveal substantial intraspecies genomic diversity within the human microbiome[J]. Genome Research, 2013, 23(5): 878-888
- [28] Sano M, Yada R, Nomura Y, Kusakawa T, Ando H, Matsumoto K, Wada K, Tanaka T, Ohara H, Aso Y. Microbial screening based on the mizoroki—heck reaction permits exploration of hydroxyhexylitaconic-acid-producing fungi in soils[J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 648
- [29] 陈梦月, 郝秀清, 李子一, 徐文豪, 李亮. 微流控通道加工技术的研究进展[J]. 微纳电子技术, 2021, 58(3): 244-253
- Chen MY, Hao XQ, Li ZY, Xu WH, Li L. Research progress on processing technology of microfluidic channels[J]. Micronanoelectronic Technology, 2021, 58(3): 244-253 (in Chinese)
- [30] Evans GWH, Bhuiyan WT, Pang SS, Warren B, Makris K, Coleman S, Hassan SU, Niu XZ. A portable droplet microfluidic device for cortisol measurements using a competitive heterogeneous assay[J]. The Analyst, 2021, 146(14): 4535-4544
- [31] 郑杰, 王洪, 闫延鹏, 崔建国. 微流控芯片液滴生成与检测技术研究进展[J]. 应用化学, 2021, 38(1): 1-10
- Zheng J, Wang H, Yan YP, Cui JG. Research progress of droplet generation and detection technology of microfluidic chip[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2021, 38(1): 1-10 (in Chinese)
- [32] 孙薇, 陆敏, 李立, 张咏适. 微流控芯片技术应用进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2019, 42(3): 221-224
- Sun W, Lu M, Li L, Zhang YS. Application progress on microfluidic chip technology[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2019, 42(3): 221-224 (in Chinese)
- [33] 王楷宸, 孙瑞妮, 姜楠, 姜利建, 庄青叶, 李阳, 王素春, 张富友, 赵成龙, 潘子豪, 等. 微流控芯片技术在微生物检测中的应用[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(1): 87-93
- Wang KC, Sun RN, Jiang N, Jiang LJ, Zhuang QY, Li Y, Wang SC, Zhang FY, Zhao CL, Pan ZH, et al. Application of microfluidic chip technology in microbial detection[J]. China Animal Health Inspection, 2021, 38(1): 87-93 (in Chinese)
- [34] 王行政, 孙泽勇, 陈东. 微流控技术制备液滴悬浮液的研究[J]. 现代化工, 2020, 40(9): 70-74, 79
- Wang XZ, Sun ZY, Chen D. Preparation of droplet suspension by microfluidic technology[J]. Modern Chemical Industry, 2020, 40(9): 70-74, 79 (in Chinese)
- [35] 何玲宇, 王疏影, 赵飞, 龙妍婷, 陈翔. 一种新型单细胞微流控捕获芯片的制作及系统搭建[J]. 功能材料与器件学报, 2020, 26(6): 412-418
- He LY, Wang SY, Zhao F, Long YT, Chen X. Fabrication of a new single-cell microfluidic capture chip and system construction[J]. Journal of Functional Materials and Devices, 2020, 26(6): 412-418 (in Chinese)
- [36] 贾亦琛, 徐胜男, 林淑英, 王晨, 张月颖, 兰添, 宋婷婷, 陈培培, 宋波. 基于微流控技术的细菌检测技术研究[J]. 科技创新导报, 2020, 17(15): 79-80
- Jia YC, Xu SN, Lin SY, Wang C, Zhang YY, Lan T, Song TT, Chen PP, Song B. Research on bacterial detection technology based on microfluidic technology[J]. Science and Technology Innovation Herald, 2020, 17(15): 79-80 (in Chinese)
- [37] 荣楠, 李备, 唐昊冶, 林先贵, 冯有智. 微生物菌种筛选技术方法研究进展[J]. 土壤, 2021, 53(2): 236-242
- Rong N, Li B, Tang HY, Lin XG, Feng YZ. Advances in strain isolating technique and method for microorganisms[J]. Soils, 2021, 53(2): 236-242 (in Chinese)
- [38] 张雷成. 基于微流控技术的微生物筛选、固定与自组装研究[D]. 武汉: 华中科技大学博士学位论文, 2019
- Zhang LC. Microfluidic technologies for microbial screening, immobilization and self-assembly[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong University of Science and Technology, 2019 (in Chinese)
- [39] Wang J, Jian XJ, Xing XH, Zhang C, Fei Q. Empowering a methanol-dependent *Escherichia coli* via adaptive evolution using a high-throughput

- microbial microdroplet culture system[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00570
- [40] 郭肖杰, 王立言, 张翀, 邢新会. 高通量自动化微生物微液滴进行培养与筛选技术及其装备化[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 991-1003
- Guo XJ, Wang LY, Zhang C, Xing XH. Technology development and instrumentation of a high-throughput and automated microbial microdroplet culture system for microbial evolution and screening[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 991-1003
- [41] Chen J, Vestergaard M, Jensen TG, Shen J, Dufva M, Solem C, Jensen PR. Finding the needle in the haystack—the use of microfluidic droplet technology to identify vitamin-secreting lactic acid bacteria[J]. *mBio*, 2017. DOI:10.1128/mbio.00526-17
- [42] 王洁. 多孔微载体的微流控制备及其在细胞培养中的应用[D]. 南京: 东南大学博士学位论文, 2019
- Wang J. Microfluidic generation of porous microcarriers for cell research[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Southeast University, 2019 (in Chinese)
- [43] Wang Y, Li QG, Zheng P, Guo YM, Wang LX, Zhang TC, Sun JB, Ma YH. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(9): 1227-1235
- [44] Lyu X, Song JL, Yu B, Liu HL, Li C, Zhuang YP, Wang YH. 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] 陈宇锟, 黎青华, 周景文, 张国强, 李江华. 基于液滴微流控的产 $\alpha$ -淀粉酶地衣芽孢杆菌高通量筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(17): 41-46
- Chen YK, Li QH, Zhou JW, Zhang GQ, Li JH. High-throughput screening of  $\alpha$ -amylase-producing *Bacillus licheniformis* based on droplet microfluidic system[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(17): 41-46 (in Chinese)
- [46] 梁怡萧, 潘建章, 方群. 基于微流控技术的细胞水平高通量药物筛选系统的研究进展[J]. *色谱*, 2021, 39(6): 567-577
- Liang YX, Pan JZ, Fang Q. Research advances of high-throughput cell-based drug screening systems based on microfluidic technique[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(6): 567-577 (in Chinese)
- [47] Jian XJ, Guo XJ, Wang J, Tan ZL, Xing XH, Wang LY, Zhang C. Microbial microdroplet culture system (MMC): an integrated platform for automated, high-throughput microbial cultivation and adaptive evolution[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1724-1737
- [48] 苑昊. 基于微流控技术的环境中金黄色葡萄球菌的检测研究[D]. 上海: 复旦大学硕士学位论文, 2014
- Yuan H. The study of detection of *Staphylococcus aureus* in environment based on microfluidics[D]. Shanghai: Master's Thesis of Fudan University, 2014 (in Chinese)
- [49] 胡冲. 基于荧光纳米颗粒标记的芯片介电泳技术检测沙门氏菌[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2012
- Hu C. Detection of *Salmonella typhimurium* based on fluorescent nanoparticles labeling and microfluidic chip-dielectrophoresis technology[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2012 (in Chinese)
- [50] 李永新, 黎源倩, 渠凌丽, 何成艳. 微流控芯片-激光诱导荧光快速检测 4 种食源性致病菌[J]. *分析化学*, 2008, 36(12): 1667-1671
- Li YX, Li YQ, Qu LL, He CY. Microfluidic chip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for rapid analysis of four foodborne pathogenic bacteria[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(12): 1667-1671 (in Chinese)
- [51] 郑晓风, 郑晓琴, 石莉, 刘英玉, 姚刚, 张晓红. 大肠埃希菌与沙门菌纸基微流控联合检测试纸在沙门菌检测中的应用[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(9): 45-49
- Zheng XF, Zheng XQ, Shi L, Liu YY, Yao G, Zhang XH. Application of paper-based microfluidic test strips of *Escherichia coli* and *Salmonella* in detection of *Salmonella*[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(9): 45-49 (in Chinese)
- [52] 薛媛媛. 食源性致病沙门氏菌的纸基微流控芯片检测研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016
- Xue YY. Study on the detection of food-borne pathogenic *Salmonella* by the paper-based microfluidic device[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2016 (in Chinese)
- [53] 贾亦琛, 宋婷婷. 基于微流控技术的细菌快速检测技术研究[J]. *智慧健康*, 2021, 7(6): 36-38
- Jia YC, Song TT. Research on rapid detection



- technology of bacteria based on microfluidic technology[J]. Smart Healthcare, 2021, 7(6): 36-38 (in Chinese)
- [54] 范一灵, 王淑娟, 李琼琼, 胡颖, 宋明辉, 秦峰, 刘浩, 杨美成. 重组酶聚合酶扩增检测产志贺毒素大肠埃希菌的微流控芯片技术[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 297-304  
Fan YL, Wang SJ, Li QQ, Hu Y, Song MH, Qin F, Liu H, Yang MC. Rapid detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by recombinase polymerase amplification combined with centrifugal compact disc microfluidic chip[J]. Food Science, 2021, 42(10): 297-304 (in Chinese)
- [55] 李虹庆. 聚苹果酸生产菌的高通量筛选及发酵特性研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017  
Li HQ. High throughput screening of poly malic acid producing strain and investigating its fermentation characteristics[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese)
- [56] 郑振. 基于液滴微流控芯片的抗白念珠菌药物筛选平台初步构建及应用研究[D]. 上海: 第二军医大学硕士学位论文, 2017  
Zheng Z. Development and application of drug screening platform against *Candida albicans* based on droplet microfluidics[D]. Shanghai: Master's Thesis of Second Military Medical University, 2017 (in Chinese)
- [57] 郑振, 陈阳, 李武宏, 朱臻宇, 洪战英, 柴逸峰. 基于液滴微流控芯片技术的抗白念珠菌药物筛选研究[J]. 药学报, 2017, 52(12): 1884-1889  
Zheng Z, Chen Y, Li WH, Zhu ZY, Hong ZY, Chai YF. Study on droplet microfluidic chips for drug screening against *Candida albicans*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2017, 52(12): 1884-1889 (in Chinese)
- [58] 张蔚. 基于微流控芯片的大肠杆菌富集与检测性能研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2017  
Zhang W. Study on enrichment of *Escherichia coli* and detection performance in a microfluidic chip[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2017 (in Chinese)
- [59] Wen XX, Xu BL, Wang WX, Liang GT, Chen B, Yang YM, Liu DY. Rapid identification of multiple bacteria on a microfluidic chip[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(6): 791-798
- [60] 吕彤, 涂然, 袁会领, 刘浩, 王钦宏. 毕赤酵母液滴微流控高通量筛选方法的建立与应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1317-1325  
Lü T, Tu R, Yuan HL, Liu H, Wang QH. Development and application of a droplet-based microfluidic high-throughput screening of *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(7): 1317-1325 (in Chinese)
- [61] 赵莹彤, 浑婷婷, 詹悦维, 范婷文, 赵峰, 钞亚鹏, 孙艳. 基于微流控的真菌单细胞捕获和培养[J]. 微生物学通报, 2019, 46(3): 522-530  
Zhao YT, Hun TT, Zhan YW, Fan TW, Zhao F, Chao YP, Sun Y. Single cell capture and culture of fungi based on microfluidic[J]. Microbiology China, 2019, 46(3): 522-530 (in Chinese)
- [62] 郝良玉, 曲晗, 李志萍, 王习文, 王宇田, 孙瑞, 崔煜菲, 夏志平, 李乾学. 微流控技术在病原微生物检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(21): 3299-3302  
Hao LY, Qu H, Li ZP, Wang XW, Wang YT, Sun R, Cui YF, Xia ZP, Li QX. Application of pathogenic microorganisms by microfluidic technology[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2018, 15(21): 3299-3302 (in Chinese)
- [63] Beneyton T, Thomas S, Griffiths AD, Nicaud JM, Drevelle A, Rossignol T. Droplet-based microfluidic high-throughput screening of heterologous enzymes secreted by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-14
- [64] 张旭. 基于微流控液滴的单细胞培养及筛选平台[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2015  
Zhang X. Agarose beads-based long-term single-cell culture and sorting for rapid growth *Haematococcus pluvialis* microalgae screening[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2015 (in Chinese)
- [65] Huang MT, Bai YP, Sjöström SL, Hallström BM, Liu ZH, Petranovic D, Uhlén M, Joensson HN, Andersson-Svahn H, Nielsen J. Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast[J]. PNAS, 2015, 112(34): E4689-E4696
- [66] 黄文平. 基于微流控芯片技术筛选尿嘧啶核苷营养缺陷型米曲霉诱变菌株[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2020  
Huang WP. Screening of mutagenic mutations of *Aspergillus oryzae* based on microfluidic chip technology[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2020 (in Chinese)
- [67] 林玲. 微/纳流控单细胞分析方法[J]. 生命科学仪器, 2020, 18(4): 19-26, 11  
Lin L. Micro/nanofluidics for single cell analysis[J].

- Life Science Instruments, 2020, 18(4): 19-26, 11 (in Chinese)
- [68] 何想, 马国梁, 汪杨, 赵常, 刘汉龙, 楚剑, 肖杨. 基于微流控芯片技术的微生物加固可视化研究[J]. 岩土工程学报, 2020, 42(6): 1005-1012
- He X, Ma GL, Wang Y, Zhao C, Liu HL, Chu J, Xiao Y. Visualization investigation of bio-cementation process based on microfluidics[J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2020, 42(6): 1005-1012 (in Chinese)
- [69] 段玉. 用于单微球阵列捕获与单细胞力学分析的微流体芯片研究[D]. 深圳: 深圳大学硕士学位论文, 2019
- Duan Y. The study of a microfluidic chip for single microsphere capture array and single cell mechanical analysis[D]. Shenzhen: Master's Thesis of Shenzhen University, 2019 (in Chinese)
- [70] Barata D, Van Blitterswijk C, Habibovic P. High-throughput screening approaches and combinatorial development of biomaterials using microfluidics[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 34: 1-20
- [71] Zeng WZ, Xu BB, Du GC, Chen J, Zhou JW. Integrating enzyme evolution and high-throughput screening for efficient biosynthesis of L-DOPA[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2019, 46(12): 1631-1641
- [72] Yu ZY, Geisler K, Leontidou T, Young REB, Vonlanthen SE, Purton S, Abell C, Smith AG. Droplet-based microfluidic screening and sorting of microalgal populations for strain engineering applications[J]. Algal Research, 2021, 56: 102293