

研究报告

生长速度快且油脂产率高的湛江等鞭金藻诱变株的筛选

艾江宁 姚长洪 孟迎迎 褚亚东 曹旭鹏 薛松*

(中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物工程组 辽宁 大连 116023)

摘要:【目的】筛选生长速度快的高产油湛江等鞭金藻诱变株。【方法】利用常压室温等离子体射流诱变技术对湛江等鞭金藻进行诱变,通过 96 孔板、摇瓶和反应器培养对诱变株进行筛选。【结果】传至第 13 代,600 mL 反应器培养 7 d,诱变株 IM110020 最大比生长速率、细胞密度和油脂产率可分别达 0.72 d^{-1} 、 $16\ 750\times 10^4\text{ cells/mL}$ 、 $109.8\text{ mg/(L}\cdot\text{d)}$,分别比野生株提高 12.5%、20.8% 和 17.9%。【结论】获得了一株生长速度快且油脂产率高的诱变株 IM110020,且经过多次传代性质稳定。

关键词: 常压室温等离子体,湛江等鞭金藻,生长速率,油脂产率

Screening of fast growth and high oil productivity mutants of *Isochrysis zhangjiangensis*

AI Jiang-Ning YAO Chang-Hong MENG Ying-Ying CHU Ya-Dong
CAO Xu-Peng XUE Song*

(Marine Bioengineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences,
Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] Mutants of *Isochrysis zhangjiangensis* were screened for fast growth and high oil productivity. [Methods] Atmospheric and room temperature plasma jet mutation technique was used to mutate *I. zhangjiangensis*, and mutants were screened by different cultivation volume such as 96-well plates, flasks and bioreactors culture. [Results] After thirteen times passaged, mutant IM110020 was cultivated for 7 days in 600 mL bioreactor for evaluation. The maximum specific growth rate, cell density and lipid productivity could reach up to 0.72 d^{-1} , $16\ 750\times 10^4\text{ cells/mL}$ and $109.8\text{ mg/(L}\cdot\text{d)}$, respectively, which were 12.5%, 20.8% and 17.9% better than those of the wild strain correspondingly. [Conclusion] We obtained a mutant IM110020 with fast growth and high oil productivity, and the properties were stable after thirteen passages.

Keywords: Atmospheric and room temperature plasma, *Isochrysis zhangjiangensis*, Growth rate, Oil productivity

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA052101); 辽宁省自然科学基金项目(No. 2012010263); 中化集团科技项目;
中国科学院知识创新工程领域前沿项目(No. S201122)

*通讯作者: Tel: 86-411-84379069; 信箱: xuesong@dicp.ac.cn

收稿日期: 2014-04-16; 接受日期: 2014-06-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-26

在当今石油资源供应紧张和环境恶化的时代, 可再生性的生物质能越来越受关注。预计 10 年后, 全球总能耗将有 20% 来自生物质^[1-2]。利用微藻生产生物柴油是解决能源短缺的途径之一。微藻是光合自养的单细胞微生物, 是在自然界中分布最广、种类和数量最大的生物资源^[3]。利用微藻生产油脂有以下优点: 生长周期短, 不占用耕地, 生物产量高, 单位面积油产量是油料植物油产量的数十倍^[4]。

正常生长条件下的微藻油脂含量仅为 5%–35%^[5], 大多数微藻是在氮缺失培养条件下积累油脂, 与此同时也抑制了藻细胞的生长, 对于以获得高产油脂为目的的微藻培养来说, 提高生物量和提高细胞内油脂含量是同等重要的。现有的培养方式是以两步法实现的, 即先以最适宜细胞生长条件培养, 然后在氮缺失的培养条件下诱导油脂积累^[6-7]。为提高微藻产油能力, 对微藻的改造至少可从以下三方面进行: 一是加快微藻的生长速度; 二是提高微藻的光合效率; 三是增加微藻含油量^[8]。因此, 筛选油脂产率高的藻株, 即在油脂含量不变, 筛选生长更快的藻株, 是整体提高油脂产率的又一手段。

常压室温等离子体(ARTP)是近几年发展起来的一种新的等离子体源, 能够在常压、温度在 25–40 °C 之间产生具有高活性粒子(如处于激发态的氢原子、氧原子、氮原子、OH 自由基等)浓度的等离子体射流^[9-10]。科学研究表明, 等离子体中适当剂量的活性粒子作用于微生物, 能够使微生物细胞壁/膜的结构及通透性和 DNA 损伤修复能力改变, 导致微生物产生致畸突变, 进而使微生物基因序列及其代谢网络显著变化, 最终导致微生物产生致畸突变^[11]。理论上, 通过控制产生的等离子体射流强度, 能够切开任何一个 DNA 碱基, 从而产生多样性大的突变库, 一次操作可以形成 4–10 万个突变体, 结合高通量筛选可以方便的定向获得目标突变株, 这是生物诱变、化学诱变和物理诱变所无法比拟的, 而且生物诱变及化学诱变过程有有毒有害物质参与, 对环境有污染; 紫外诱变、射线、太

空诱变、离子束注入等物理诱变作用时间较长, 所需样品的剂量比较大^[12-13]。钝顶螺旋藻在亚硝基胍处理下比对照株耐受 3 倍, 但是生长并没有增加^[14]。Lanfalon 等用 UV 及 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理的钝顶螺旋藻没有得到理想的诱变株^[15]。Fang 等用 ARTP 处理钝顶螺旋藻, 使其碳水化合物生产能力提高 78%^[16]。ARTP 具有射流温度低、产生的等离子体均匀、无需真空装置、操作简易、成本低、与生物大分子和细胞作用明显等优点, 已成为快速突变微生物基因组的有效方法^[16]。

金藻已被公认为是产油微藻, 未调控自养培养时油脂含量平均为 27.1%, 而含油绿藻平均总脂含量为 25.5%, 含油硅藻平均总脂含量仅为 22.7%^[17]。本研究利用新型 ARTP 育种方法诱变湛江等鞭金藻, 通过固体平板、96 孔板快速筛选及摇瓶初筛, 建立诱变株筛选方法, 并通过柱状鼓泡式反应器培养研究诱变株生长特性。旨在获得油脂含量不变、生长速度快的藻株, 为利用光合生物反应器进行大规模培养提供重要的种质资源。

1 材料与方法

1.1 藻种及诱变方法

实验藻种: 野生型湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*), 保藏于中国科学院淡水藻种库, 保藏编号为 FACHB-1750。

诱变方法: 利用清华大学化学工程与工程物理系联合研制的常压室温等离子体育种机(ARTP)进行湛江等鞭金藻的诱变^[11,16]。在电源输出功率为 100 W、工作气流量为 10 SLM、等离子体发射源与样品之间距离为 2 mm 的条件下, 诱变主要的可变操作参数是处理时间。为了寻找最佳诱变条件, 首先需要得到致死率曲线。因此处理时间从 10 s 开始, 以 5 s 为间隔, 依次增加至 30 s。然后将处理的藻细胞稀释涂平板, 计算致死率。

1.2 培养基

将过滤后的天然海水于 1×10^5 Pa 灭菌 15 min, 冷却至室温后添加营养盐, 配制 f/2 培养基^[18]为基础培养基。

1.3 培养及筛选方法

固体平板：经 ARTP 诱变后的全部藻液，用 800 μL 培养基洗至 1.5 mL EP 管中，避光 3 h 以避免光修复，稀释一定浓度涂于平板培养，于光照强度 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ，温度为 $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 的光照培养箱中培养。待长出藻落较大或者颜色较浅的单藻落。

96 孔板：每孔加入 200 μL f/2 培养基，挑入从固体平板已选出的单藻落，于光照强度 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、温度为 $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 的光照培养箱中培养。每天取样进行细胞密度测定，最大比生长速率大于野生株 5% 的藻株，即为生长速度快的诱变株。

100 mL 摇瓶：将 96 孔板选出的生长速度快的诱变株转移至 100 mL 摇瓶中培养，以相同的初始密度接种，每瓶加入 30 mL f/2 培养基，隔天取样进行细胞密度测定，并计算最大比生长速率，其值高于野生株 5% 即为生长速度快的诱变株。

600 mL 反应器培养：600 mL 柱状鼓泡式反应器^[18]，培养体积为 500 mL，日光灯作光源，单侧平均光强为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ，光暗周期比为 14 h: 10 h。通入 2% CO_2 ，通气速率为 0.4 L/min，接种初始密度约为 800×10^4 cells/mL，培养温度为 $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 。每天加入 75 mg/L 的 NaNO_3 ， NaH_2PO_4 和培养基的其他成分每 3 d 添加一次。每天取样测定细胞密度，培养结束时收获藻细胞，进行油脂含量测定。

1.4 分析方法

1.4.1 致死率：将 ARTP 诱变后涂于平板上长出的藻落计数，致死率计算公式为：致死率(%)=(1-处理组存活细胞数/野生株组细胞数) $\times 100$ 。

1.4.2 细胞密度测定：96 孔板及 100 mL 摇瓶培养的细胞密度是通过酶标仪测定藻液在 655 nm 处的吸光度值(OD_{655})，并在光学显微镜(Olympus BH-2 显微镜)下用血球计数板计数微藻个数，建立微藻细胞数与吸光度的标准曲线，在一定范围内，可用 OD_{655} 代替细胞数进行细胞生长的表征。

湛江等鞭金藻标准曲线方程如下：
 $y=663.03x+4.943\ 5$ ， $R^2=0.998\ 3$

式中 x 为藻的吸光度值 OD_{655} ， y 为藻细胞密度 ($\times 10^4$ cells/mL)。

600 mL 反应器培养的细胞密度是直接用手球计数板计数微藻个数。

1.4.3 比生长速率：公式为： $\mu=(\ln N_{t_2}-\ln N_{t_1})/(t_2-t_1)$

其中 μ 为比生长速率， N_{t_2} 为 t_2 天时藻液的细胞密度， N_{t_1} 为 t_1 天时藻液的细胞密度。

1.4.4 细胞干重：取 5 mL 藻液过滤于预先干燥称重的 Whatman GF/C 纤维膜，再用 0.5 mol/L 碳酸氢铵洗涤两遍，烘干至恒重。

1.4.5 油脂含量测定：油脂含量(%)=(油脂质量/干藻粉质量) $\times 100$ (油脂提取：氯仿甲醇水法)^[19-20]。

2 结果与讨论

2.1 致死率曲线

等离子体对湛江等鞭金藻细胞具有较强的杀伤力，经 ARTP 处理 20 s，致死率可达 90.8%；处理 25 s，致死率达 99%；处理 30 s，致死率达 100%，如图 1 所示。突变本身具有随机性，其致死率与突变结果之间没有确定的联系。本实验选择致死率 99% 的条件进行诱导，即每次诱变选择诱变时间为 25 s。

2.2 湛江等鞭金藻诱变株的快速筛选

将经 ARTP 处理 25 s 的金藻按 1×10^5 – 4×10^5 个藻细胞涂于琼脂平板培养基上，每个平板能长出 100 个左右的单藻落，待长出 7 d 后，将藻落转入至 96 孔板中，每孔加入 f/2 培养基 200 μL 培养。每天将 96 孔板放入酶标仪中读取各孔的 OD 值，计算最大比生长速率。

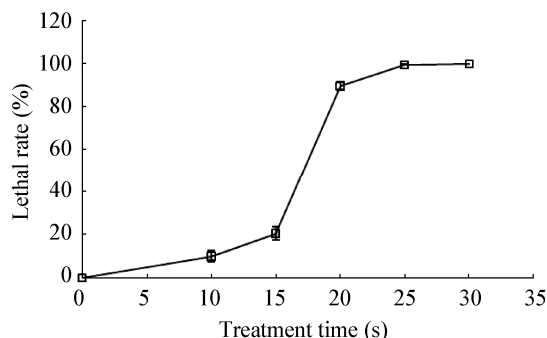


图 1 湛江等鞭金藻的致死率曲线

Figure 1 The lethal rate curve of *I. zhangjiangensis*

图 2 为诱变株相对于野生株的相对增殖速度。以野生株增殖速度为标准, 有 11 株生长速率超过野生株的 5% 以上, 其中有 6 株诱变株 IM110001、IM110002、IM110010、IM110020、IM110021 和 IM110022 的增殖速度达到野生株的 1.2 倍以上。将生长速度快的 11 株诱变株其转入 100 mL 摇瓶进行培养筛选。

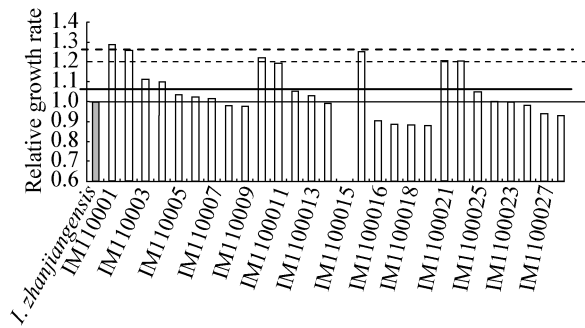


图 2 野生株和 28 株诱变株的相对增殖速率
Figure 2 Wild strain and 28 mutant strains of relative growth rate
注: 实线为野生株的相对增殖速率, 虚线为增殖速度达到野生株 1.2 倍的位置。
Note: The solid line is the relative proliferation rate of wild strain, the dotted line is 1.2 times as much as the wild strain.

2.3 湛江等鞭金藻诱变株的初筛

为了小规模的评估诱变株的特性, 在 100 mL 摇瓶中培养并测定生物量, 最大比生长速率见表 1。

最大比生长速率用来评价藻细胞的生长能力, 客观反映藻株在一个生长周期内的实际生长潜能。通过比较最大比生长速率, 诱变株 IM110004 和 IM110020 的最大比生长速率分别高于野生株 20.5% 和 8.0%, 其他诱变株均低于野生株。

2.4 湛江等鞭金藻诱变株的反应器培养特性

将诱变株 IM110004 和 IM110020 扩大至 3 L 摇瓶作为藻种, 进一步评估诱变株的生长及产油特性。诱变株 IM110004 传至第 5 代时细胞死亡。诱变株 IM110020 连续传代至第 13 代, 在第 7 代和第 13 代分别接入 600 mL 管式反应器进行培养评估, 以考察传代多次后的生长特性。

图 3 可以看出诱变株 IM110020 依然比野生株生长速度快。结果显示诱变株生物量较野生株高。所得细胞终密度、干重、油脂含量、油脂产率以及最大比生长速率见表 2。

表 1 <i>I. zhangjiangensis</i> 野生株与诱变株 100 mL 摇瓶培养的最大比生长速率								
Table 1 The maximum specific growth rate of wild type and mutants of <i>I. zhangjiangensis</i> in 100 mL flask								
	<i>I. zhanjiangensis</i>	IM110003	IM110004	IM110010	IM110011	IM110020	IM110021	IM110022
μ_{\max}	0.252	0.233	0.304	0.179	0.172	0.273	0.219	0.225

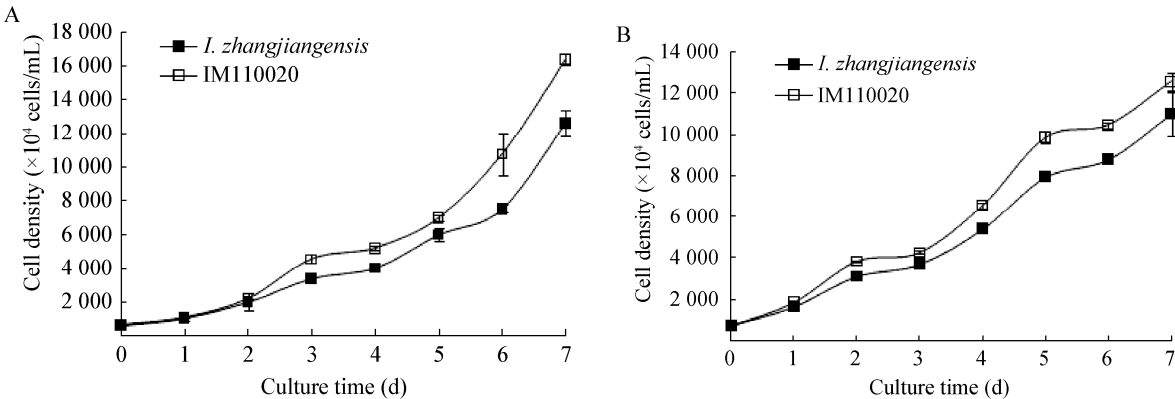


图 3 600 mL 反应器培养野生株和诱变株第 7 代(A)与第 13 代(B)的生长曲线
Figure 3 Growth curves of wild strain and the mutant in the 7th (A) and 13th (B) generation cultured in 600 mL bioreactor

表 2 600 mL 反应器培养野生株和诱变株(F7 代)的各成分含量						
Table 2 The content of each component of wild strain and the mutant (F7) cultured in 600 mL bioreactor						
传代次数 Generation	藻种 Strain	细胞密度 Cell density ($\times 10^4$ cells/mL)	最大比生长速率 Maximum specific growth rate (μ_{\max}) (d^{-1})	干重 Dry weight (g/L)	油脂含量 Lipid content (%, W/W)	油脂产率 Lipid productivity (mg/(L·d))
F7	<i>I. zhangjiangensis</i>	12 660±764	0.64	2.5±0.2	27.7±1.2	98.9±9.0
	IM110020	16 460±368	0.73	3.2±0.3	26.3±0.4	120.2±11.4
F13	<i>I. zhangjiangensis</i>	15 575±318	0.64	2.4±0.2	27.2±0.9	93.3±8.4
	IM110020	16 750±495	0.72	2.9±0.3	26.5±1.7	109.8±13.4

诱变株 IM110020 经 7 次传代后反应器培养至第 7 天, 与野生株相比, 最大比生长速率、细胞密度和干重分别比野生株高出 14.1%、30.0% 和 28.0%, 是一株生长快速的诱变株, 油脂产率诱变株高于野生株 21.5%, 可达 120.2 mg/(L·d)。经第 13 次传代后, 最大比生长速率、细胞密度和干重分别比野生株高出 12.5%、20.8% 和 7.5%。大多数藻株在自养条件下油脂产率仅为 6–30 mg/(L·d)^[21–22]。王立柱等^[23]从云南滇池的水样中分离筛选得到一株自养产油小球藻(*Chlorella vulgaris*), 其油脂产率为 28.6 mg/(L·d)。本实验用的野生金藻在自养条件下油脂产率均高于文献报道的藻株, 在此基础上筛选油脂产率更高的诱变株, 更具优势, 为本实验室增加了藻种资源。

本研究采用最新的常压室温等离子体进行藻株的选育工作, 该技术由于操作简单、安全性高、诱变效果明显、突变多样性大而颇受研究者欢迎, 已在发酵领域逐步得到应用^[24–26]。ARTP 对微生物作用的主要因子为高浓度的中性活性粒子, 而对于 ARTP 诱变育种, 其直接处理对象为细胞。由于细胞壁和细胞膜的存在, ARTP 产生的活性粒子并不能够直接作用于细胞内的生物大分子, 而是对整细胞造成损伤, 而在细胞发生损伤的同时, 细胞内又同时存在 DNA 修复等多种修复机制。因此, 关于 ARTP 与整细胞的作用机制研究至关重要。本研究测定了 PS II 最大光能转化效率, 野生株平均为 0.686, 诱变株平均为 0.714, 说明通过 ARTP 诱变可能强化了诱变株的光合系统, 间接证明了藻细胞

在受到 ARTP 诱变后产生了胁迫反应, 因此其生长速度快, 油脂产率提高。

3 结论

本研究通过 ARTP 诱变育种方法成功诱变湛江等鞭金藻, 经过 96 孔板和 100 mL 摇瓶初筛, 并经过 600 mL 柱状鼓泡式反应器评估, 获得了一株与野生株相比同等含油量但生长速度快的诱变株 IM110020。该诱变株在富氮培养下培养至第 7 天, 细胞密度为野生株的 1.2 倍。经过多次传代, 在第 7 代和第 13 代, 具有相同的生长特性。通过这种诱变方法以及筛选方式, 获得一株高油脂产率的诱变金藻藻株, 且经过多次传代性质稳定。该诱变株可以作为 30 L 和 100 L 光生物反应器的放大培养的藻株, 为下一步研究找到了优良种质资源。

致谢: 清华大学邢新会教授课题组为本实验提供常压室温等离子体育种机, 在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] Fan XL, Guo RB, Wei DZ. Key basic research in biorefinery of energy microalgae[J]. China Basic Science, 2009(5): 59-63 (in Chinese)
范晓蕾, 郭荣波, 魏东芝. 能源微藻与生物炼制[J]. 中国基础科学, 2009(5): 59-63

[2] Carla SJ, Stephen PM. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(3): 346-351

[3] Li T, Li AF, Sang M et al. Screening oleaginous microalgae and evaluation of the oil-producing characteristic[J]. China Biotechnology, 2011, 31(4): 98-105 (in Chinese)
李涛, 李爱芬, 桑敏, 等. 富油能源微藻的筛选及产油性评价[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(4): 98-105

[4] Singh J, Gu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production[J]. Renewable and Sustainable Energy

- Reviews, 2010, 14(9): 2596-2610
- [5] Jiang XM, Zheng YZ. Total lipid and fatty acid composition of 14 species of microalgae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(3): 243-247 (in Chinese)
蒋霞敏, 郑亦周. 14种微藻总脂含量和脂肪酸组成研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 243-247
- [6] Huang GH, Chen F, Wei D. Improvement of lipid content of *Chlorella pyrenoidosa* by two-step cultivation[J]. Journal of South China University of Technology, 2008, 36(12): 97-101 (in Chinese)
黄冠华, 陈峰, 魏东. 两步培养法提高蛋白核小球藻的油脂含量[J]. 华南理工大学学报, 2008, 36(12): 97-101
- [7] Potvin G, Debska D, Lan C, et al. Effect of operating conditions on the photobioreactor cultivation of *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2011, 5(3): 319-323
- [8] Zheng HL, Zhang Q, Ma XC et al. Research progress on biodiesel producing microalgae cultivation[J]. China Biotechnology, 2009, 29(3): 110-116 (in Chinese)
郑洪立, 张齐, 马小琛, 等. 产生物柴油微藻培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(3): 110-116
- [9] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851-858
- [10] Li HP, Wang ZB, Ge N, et al. Studies on the physical characteristics of the radio-frequency atmospheric-pressure glow discharge plasmas for the genome mutation of *Methylosinus trichosporium*[J]. IEEE Transactions on Plasmas Science, 2012, 40(11): 2853-2860
- [11] Jin LH, Fang MY, Zhang X et al. Operating conditions for the rapid mutation of the oleaginous yeast by atmospheric and room temperature plasmas and the characteristics of the mutants[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(3): 461-467 (in Chinese)
金丽华, 方明月, 张翀, 等. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件及其突变株的特性[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 461-467
- [12] Li G, Li HP, Wang LY, et al. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(22): 221504
- [13] Li HP, Sun WT, Wang HB, et al. Electrical features of radio-frequency, atmospheric-pressure, bare-metallic-electrode glow discharges[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2007, 27(5): 529-545
- [14] Singh DP, Singh N. Isolation and characterization of a metronidazole tolerant mutant of the cyanobacterium *Spirulina platensis* exhibiting multiple stress tolerance[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13(2): 179-183
- [15] Lanfalonì L, Trinei M, Russo M, et al. Mutagenesis of the cyanobacterium *Spirulina platensis* by UV and nitrosoguanidine treatment[J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 83(1): 85-90
- [16] Fang MY, Jin L, Zhang C, et al. Rapid mutation of *Spirulina platensis* by a new mutagenesis system of atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) and generation of a mutant library with diverse phenotypes[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77046
- [17] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 621-639
- [18] Feng D, Chen Z, Xue S, et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 6710-6716
- [19] Zhu M, Zhou PP, Yu LJ. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids[J]. Bioresource Technology, 2002, 84(1): 93-95
- [20] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917
- [21] Yang J, Jiang JC, Zhang N. Oil productivity capabilities of several microalgae strains in different cultivation methods[J]. Biomass Chemical Engineering, 2011, 45(2): 15-19 (in Chinese)
杨静, 蒋剑春, 张宁. 不同培养方式下微藻产油能力的研究[J]. 生物质化学工程, 2011, 45(2): 15-19
- [22] Hu WJ, Luo W, Li HG et al. Study on screening and identification of oleaginous microalgae and its oil-producing characteristic[J]. China Biotechnology, 2012, 32(12): 66-72 (in Chinese)
胡文军, 罗玮, 李汉广, 等. 产油微藻筛选和鉴定及其产油性能的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(12): 66-72
- [23] Wang LZ, Wen HC, Zou Y et al. Isolation, selection of microalgae for lipid production and optimization of its nitrogen resource and carbon resource in autotrophic culture[J]. Microbiology China, 2010, 37(3): 336-341 (in Chinese)
王立柱, 温皓程, 邹渝, 等. 产油微藻的分离、筛选及自养培养氮源、碳源的优化[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 336-341
- [24] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851-858
- [25] Yang Y, Yu WN, Jin Y, et al. Screening of mutants of xylanase high-producing strain of *Saccharomonospora viridis* by atmospheric and room temperature plasmas and its enzyme characterization[J]. Microbiology China, 2013, 40(5): 905-915 (in Chinese)
杨颖, 玉王宁, 金一, 等. 常压室温等离子体快速诱变绿色糖单孢菌筛选木聚糖酶高产菌株及其酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(5): 905-915
- [26] Cai YH, Li WF, Lu WN et al. A mutant strain with high threonine yield obtained by rapid mutation using novel atmospheric and room temperature plasmas[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1888-1892 (in Chinese)
蔡友华, 李文锋, 卢伟宁, 等. 新型常压室温等离子体(ARTP)快速诱变高产苏氨酸的突变株[J]. 现代食品科技, 2013, 29(8): 1888-1892