

# 常压室温等离子体结合高通量筛选技术在微生物育种方面的研究进展

康竞艺<sup>1</sup>, 艾奕伶<sup>1</sup>, 刘秀霞<sup>\*1,2,3</sup>, 白仲虎<sup>1,2,3</sup>

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

康竞艺, 艾奕伶, 刘秀霞, 白仲虎. 常压室温等离子体结合高通量筛选技术在微生物育种方面的研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 78-89.

KANG Jingyi, AI Yiling, LIU Xiuxia, BAI Zhonghu. Research progress in atmospheric and room-temperature plasma combined with high-throughput screening in microbial breeding[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 78-89.

**摘要:** 常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)是一种新型诱变技术, 具有诱变速度快、诱变条件温和、环境友好等特点。由于 ARTP 诱变的突变体具有高突变频率和良好的遗传稳定性, 因此在微生物育种领域应用广泛。本文综述了近年来 ARTP 诱变技术在微生物育种中取得的进展、诱变后突变菌株的筛选策略和 ARTP 诱导微生物发生突变的机制, 并对 ARTP 目前在微生物诱变育种中存在的问题进行讨论。

**关键词:** ARTP; 微生物育种; 高通量筛选; 突变机制

## Research progress in atmospheric and room-temperature plasma combined with high-throughput screening in microbial breeding

KANG Jingyi<sup>1</sup>, AI Yiling<sup>1</sup>, LIU Xiuxia<sup>\*1,2,3</sup>, BAI Zhonghu<sup>1,2,3</sup>

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Engineering Research Center for Bioactive Products Processing Technology of Jiangsu Province, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Atmospheric and room temperature plasma (ARTP), a new approach of mutagenesis, is

资助项目: 国家自然科学基金(22078128)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22078128).

\*Corresponding author. E-mail: liuxiuxia@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-04-20; Accepted: 2024-05-30; Published online: 2024-07-03

characterized by fast mutagenesis speed, mild mutagenesis conditions, and environmental friendliness. The ARTP-induced mutants have high mutagenesis frequency and good genetic stability. Therefore, ARTP is widely used in microbial breeding. This paper reviews the progress in ARTP in microbial breeding in recent years, the screening strategy of mutants after mutagenesis, and the mechanism of ARTP-induced mutagenesis in microorganisms. Finally, we discuss the existing problems of ARTP in microbial breeding.

**Keywords:** atmospheric and room temperature plasma (ARTP); microbial breeding; high-throughput screening; mutation mechanism

微生物作为底盘细胞在生物合成领域中应用广泛, 大多数微生物生产属于异源合成, 往往存在菌株生长速度缓慢、目标产品产量低等问题, 这使得如何改善微生物底盘细胞成为微生物育种的研究重点。常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)是一种新型的诱变技术, 相较于传统物理或化学诱变方法, 具有诱变环境友好、安全性能和突变率高等特点。近年来, 随着高通量筛选(high-throughput screening, HTS)技术的发展, 大大简化了 ARTP 诱变后筛选步骤, 扩大了 ARTP 在微生物育种领域的应用, 经过 ARTP 诱变获得高产、遗传稳定性良好的菌种已被广泛应用于农业、环境治理、医药、生物能源、食品等多个领域。本文综述了近年来 ARTP 诱变技术在微生物育种中的研究进展, 以期为微生物育种提供一种新思路。

## 1 ARTP 概述

### 1.1 ARTP 诱变技术介绍

ARTP 诱变装置包括射频系统、冷却系统、可编程控制器模块、触摸屏、供气系统、无菌系统、照明系统、工作台等。ARTP 工作的主要气体介质是氦气, 当接入电源, 工作气体被击穿, 放电产生不同的等离子成分, 例如带电粒子、自由基和中性粒子等多种活性粒子<sup>[1]</sup>。影响 ARTP 工作的关键参数是<sup>[2]</sup>: (1) 放电功率: 功率越高, 产生反应性物质越多, 但过高的功

率会导致微生物致死率过高。(2) 工作气氛: 不同的工作气氛发生不同的化学反应, 形成不同的反应性物质。(3) 载气流量: 载气流速过低产生反应性物质过少。(4) 处理时间: 诱变时间越高致死率越高, 但需结合阳性突变率选择合适的诱变时间。

### 1.2 ARTP 诱变微生物突变的机制

#### 1.2.1 生物大分子的损伤

细胞膜作为细胞与外界环境接触的一道重要屏障, 在细胞内外物质交换、能量转换和信号传导等方面具有非常重要的作用, 细胞膜的破坏对细胞的影响是毁灭性的。ARTP 放电过程中产生的大量活性物质先作用于细胞膜, 影响细胞膜的磷脂双分子层结构、流动性、通透性等, 也会引起真核细胞中磷脂或原核细胞中多糖的过氧化, 更有可能改变细胞内结合蛋白或酶的结构<sup>[3-4]</sup>。某些有关损伤修复或重组修复的蛋白受损将会导致细胞无法及时修复突变基因, 从而形成可遗传的突变。Zhang 等<sup>[5]</sup>用直流感光等离子体处理微藻, 发现经过 ARTP 诱变后, 细胞内产生了大量的反应活性物质, 导致细胞膜被氧化而严重受损。此外, ARTP 产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)也可以改变酶的分子结构, 导致酶活性增加<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.2 脂质过氧化

生物物质中有大量的不饱和脂肪酸, 主要存

在于膜脂质中, 这些不饱和脂肪酸使得细胞内的膜系统对外界理化因素具有高度敏感性, 从而能够及时响应外界环境的变化保护细胞。已有研究观察到核膜多处与染色体接触, 一旦脂质过氧化发生, 将会直接导致 DNA 的损伤<sup>[3]</sup>。此外, 脂质过氧化还会导致生物体内丙二醛(malondialdehyde, MDA)的积累<sup>[4,7]</sup>, 过量的 MDA 会引起蛋白质、核酸等大分子的交联聚合, 若不能被及时修复, 则会显示出遗传毒性从而导致突变。Sreedevi 等<sup>[8]</sup>发现, 由低温等离子体形成的活性物质(如·OH)可穿透细胞膜并切割膜脂质磷酸盐头部基团、过氧化并分离脂肪酸尾部, 引发进一步的细胞损伤。此外, 脂质过氧化和细胞膜表面结合蛋白或酶的结构变化将会激活细胞内不同的信号通路, 影响细胞内环境的稳态<sup>[9-10]</sup>。

### 1.2.3 DNA 的损伤

DNA 是细胞的遗传物质, 包含了生物体大部分遗传信息, 因此, 造成 DNA 损伤是 ARTP 导致微生物突变的最根本原因。研究人员<sup>[11-12]</sup>发现, 当质粒 DNA 暴露在 ARTP 下时, DNA 或寡核苷酸直接断裂, 发生倒置或翻转, 从而扰乱基因组, 改变基因结构, 导致相应编码基因的过表达或下调。同时诱导突变编码 Mg-螯合酶(Mg-chelatase, CHL)、原叶绿素酸酯氧化还原酶(light-independent protochlorophyllide oxidoreductase, POR)和叶绿素合成酶(chlorophyll synthetase, CS)的基因, 随着处理时间的增加, ARTP 产生的自由基可导致 DNA 单链或双链断裂, 增加致死率<sup>[13-15]</sup>。然而, 在 DNA 分子遭到损害的情况下, DNA 复制受到抑制, 细胞内损伤 DNA 的修复能量却迅速增加, 细胞分裂停止, 激发了 DNA 损伤修复(SOS response), SOS 修复系统可引起校对系统的松懈, 跨损伤修复促使某些特异的低保真度聚合酶越过错误继续合成 DNA<sup>[16]</sup>, 使得细胞存活。在此过程中, 可

能出现碱基错配、染色体结构异常等问题, 最终引起遗传物质的变化, 得到突变体。

## 2 ARTP 诱变在高产微生物育种中的应用

### 2.1 ARTP 诱变微生物在农业与环境治理中的应用

由于土壤空间和植物表面的生存空间有限, 一些病原微生物或致病性微生物必定会与农作物争夺生存资源以满足自身的营养需求。相较于传统化学防治有毒且污染环境等问题, 生物防治具有高特异性与高效率等特点, 通过引入与病原微生物起拮抗作用的微生物进而抑制其生长。马铃薯疮痂病是由疥疮链霉菌(*Streptomyces scabies*)引起的土传性病害, 周英俊<sup>[17]</sup>通过抑菌圈的方法筛选到一株抑制疥疮链霉菌的生防菌株—枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) YPS-7, 并通过 ARTP 诱变生防菌株, 获得拮抗活性更高的枯草芽孢杆菌 YPS-32, 对马铃薯种植期间施用 2 次枯草芽孢杆菌 YPS-32, 马铃薯疮痂病的防治率达到 83.70%, 马铃薯单果增产达到 38.32%。此外, ARTP 诱变获得的微生物在环境治理中发挥着重要作用, 如 Bao 等<sup>[18]</sup>通过 ARTP 获得一株高降解铬(Cr)能力的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) SA-23 突变株, 72 h 内 200 mg/L Cr(VI)的还原率达到 78.45%。

### 2.2 ARTP 诱变在微生物合成医药中的应用

传统药物生产存在工艺难度大、副产物多、下游纯化繁琐和产率低等问题。2010 年, Wang 等<sup>[19]</sup>首次使用 ARTP 诱变技术应用于菌株的药物生产, 为微生物药物合成提供一种新的路径。阿霉素(doxorubicin, DXR)是一种蒽环类抗生素, 用于癌症治疗, 由于野生型链霉菌(*Streptomyces peucetius*)的 DXR 生产率较低, 很难通过一步

发酵生产 DXR, Wang 等<sup>[20]</sup>通过多轮 ARTP 诱变链霉菌, 结合 DXR 耐药性筛选方法, 筛选获得一株 33-24 链霉菌突变体, 经验证 DXR 的产量高达 1 100 mg/L, 较野生型链霉菌产量提高 65.4%, 说明 ARTP 诱变可增强抗生素在微生物中的表达。Meng 等<sup>[21]</sup>使用 ARTP 诱变技术与高通量筛选技术结合的策略, 以增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)为报告蛋白, 优化谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)宿主细胞, 从突变体文库中筛选出 MC2、MA8 和 MA6 这 3 个菌株, 并使诱变菌株表达编码 3 种高价值药用蛋白, 证实了通过 ARTP 诱变技术优化宿主细胞能够增强异源蛋白的合成。

### 2.3 ARTP 诱变在微生物合成能源中的应用

受石油资源和环境问题影响, 生物资源生产新型物质能源为人类可再生资源的生产和使用提供新的发展思路。微藻具有分布广、易获取、繁殖速度快等特点, 在生物能源合成中应用广泛, Song 等<sup>[22]</sup>通过 ARTP 诱变小球藻(*Chlorella*), 获得的突变体碳交换增加约 11%, NADPH 含量增加 17.2%, 脂质产量增加 15.4% (最高产量 6.89 mg/L)。Elshobary 等<sup>[23]</sup>通过 ARTP 诱变凯斯氏小球藻(*Parachlorella kessleri*), 获得的突变体较原始菌株相比生物质生产力和脂质生产力分别提高了 75%和 44%。此外, 通过 ARTP 诱变优化细菌生产性能也可以用于微生物合成能源, 如潘俊潼等<sup>[24]</sup>通过 ARTP-紫外复合诱变大肠杆菌(*Escherichia coli*), 得到一株高产  $\beta$ -法尼烯的突变株 HVK-9, 经过发酵罐验证, 突变株产量高达 22.1 g/L。

### 2.4 ARTP 诱变在微生物合成食品中的应用

ARTP 诱变技术具有能够显著提高菌株生长

速率、目标产品产量和经济效益等特点, ARTP 诱变微生物合成氨基酸<sup>[25-26]</sup>、有机酸<sup>[27]</sup>等功能性食品不断发展。微生物合成氨基酸的过程往往伴随副产物的生成, 导致目的氨基酸收率低; 其次, 微生物菌株易被噬菌体感染, 导致转化率或产量低。近年来, 研究人员通过 ARTP 诱变来增强微生物氨基酸产量方面已取得诸多进展。Cheng 等<sup>[9]</sup>利用大肠杆菌表达 L-苏氨酸, 发现过表达 *fhuA* 可以降低噬菌体对大肠杆菌的感染, 他们采用 ARTP 诱变技术处理重组后的大肠杆菌, 发现突变株中不但 L-苏氨酸产量明显提高, 而且葡萄糖转化率明显提高, 这表明 ARTP 诱变不仅可以显著提高微生物菌株的生产效率, 同时还对微生物菌株的其他生物学性能起到积极作用。Yao 等<sup>[28]</sup>经 ARTP 诱变流行性链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)后, 获得的突变体透明质酸收率提高 42.9%, 达到 0.813 g/L。此外, ARTP 诱变在嗜热菌(*Myceliophthora thermophila*)<sup>[29]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[30]</sup>、灰树花(*Grifola frondosa*)<sup>[31]</sup>、灵芝(*Ganoderma lucidum*)<sup>[32]</sup>、桑黄(*Sanghuangporous sanghuang*)<sup>[33]</sup>等生产功能性食品的微生物中应用广泛。

综上, ARTP 诱变已经被广泛应用到农业与环境治理、医药、能源、食品等相关微生物的生产性能改善中, 总结见表 1。

## 3 ARTP 诱变后突变菌株的高通量筛选策略

ARTP 诱变微生物会产生大量的突变体菌株, 如何从构建的大规模突变库中高效筛选正向突变体成为目前的研究重点。传统筛选主要依靠人工分离、纯化和摇瓶筛选, 如吕苗苗等<sup>[42]</sup>使用 ARTP 诱变阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*), 后用摇瓶筛选高产突变体, 获得的 RW-51 诱变菌株效价为 7 268 U/mL, 较原始菌株提高 8.9%。

表1 ARTP 诱变技术在高产微生物工业菌株育种中的应用

Table 1 Application of ARTP mutagenesis technique in breeding high-yielding industrial microbial strains

产品应用类型 Type of product application	微生物 Mutagenic strain	诱变效果 Mutagenic effect	参考文献 Reference
农业与环境治理 Agricultural and environmental governance	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	马铃薯疮痂病的防治率达到 83.70%，马铃薯单果增产达到 38.32% The control efficacy on potato common scab reached 83.70% and single fruit weight of potatoes were 38.32%	[17]
	贝氏芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>	突变体 72 h 内 200 mg/L Cr(VI)的还原率达到 78.45% The mutant achieved 78.45% reduction of 200 mg/L Cr(VI) in 72 h	[18]
	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>	突变体的木聚糖酶活力提高 459.29%， $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活力提高 817.42% The mutant showed 459.29% increase in xylanase activity and 817.42% increase in $\beta$ -1,3-glucanase activity	[34]
	嗜热菌 <i>Myceliophthora thermophila</i>	木聚糖酶耐温性提高 15 °C The temperature tolerance of xylanase is increased by 15 °C	[29]
酶 Enzymes	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	碱性蛋白酶活性提高 23.38% The activity of alkaline protease increased by 23.38%	[30]
	球形红杆菌 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	辅酶 Q10 产量增加 25.5% (至 590 mg/L) Coenzyme Q10 production increased by 25.5% (to 590 mg/L)	[35]
	黄小球藻 <i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i>	蛋白产量增加 31% Protein production increased by 31%	[36]
蛋白质 Protein	谷氨酸棒状杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	异源蛋白表达产量增加 91% Heterologous protein expression yield increased by 91%	[21]
	医药 Medicine	链霉菌 <i>Streptomyces fradiae</i>	硫酸新霉素提高至(7 780±110) U/mL Neomycin sulphate raised to (7 780±110) U/mL
玫瑰孢链霉菌 <i>Streptomyces roseosporus</i>		达托霉素产量达到 752.67 mg/L Daptomycin yield reached 752.67 mg/L	[37]
筑斑链霉菌 <i>Streptomyces tsukubaensis</i>		大环聚酮(FK506)产量较原始菌株增加 27.9% Macrocyclic polyketide (FK506) yield increased by 27.9% over the original strain	[14]
流行性链球菌 <i>Streptococcus zooepidemicus</i>		葡萄糖利用率为 0.54 g/(L·h)，琥珀酸生产率提高 2.5 倍[0.38 g/(L·h)] Glucose utilisation was 0.54 g/(L·h) and succinic acid productivity increased 2.5-fold (0.38 g/(L·h))	[28]
能源 Energy	运动发酵单胞菌 <i>Zymomonas mobilis</i>	乙醇生产率提高了 61.7%，最高达到 0.63 g/(L·h) Ethanol productivity increased by 61.7%, up to 0.63 g/(L·h)	[38]
	皮状丝孢酵母 <i>Trichosporon cutaneum</i>	生物量、油脂产量、油脂产率分别提高了 41.6%、120.3%、58.3% Biomass, oil production and oil yield increased by 41.6%, 120.3% and 58.3%, respectively	[39]

(待续)

(续表 1)

产品应用类型 Type of product application	微生物 Mutagenic strain	诱变效果 Mutagenic effect	参考文献 Reference
	野生油脂酵母 <i>Trichosporon dermatis</i>	生物量、油脂产量、油脂含量分别提高 12.6%、33.2%、7.8% Biomass, oil production and oil yield increased by 12.6%, 33.2% and 7.8%, respectively	[40]
	小球藻 <i>Chlorella</i>	碳交换增加约 11%，NADPH 含量增加 17.2%，脂质产量增加 15.4% (最高产量 6.89 mg/L) Carbon exchange increased by about 11%, NADPH content increased by 17.2% and lipid production increased by 15.4% (maximum yield 6.89 mg/L)	[22]
	凯斯氏小球藻 <i>Parachlorella kessleri</i>	生物质生产力和脂质生产力分别提高了 75%和 44% Biomass productivity and lipid productivity increased by 75% and 44%, respectively	[23]
食品 Foodstuff	鞘氨醇单胞菌 <i>Spingomonas sp.</i>	韦兰胶和蔗糖转化率分别提高 98.95%、137.50% The yield of welan gum and sucrose conversion were increased by 98.95% and 137.50%, respectively	[41]
	灰树花 <i>Grifola frondosa</i>	突变体 GFA2 生长速率提高 6.0 mm/d，多糖产量提高 2.65 g/L The mutant GFA2 showed a 6.0 mm/d increase in growth rate and a 2.65 g/L increase in polysaccharide production	[31]
	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$\gamma$ -谷氨酸最高产量为(18.54 $\pm$ 0.39) g/L，工艺时间缩短 17% The highest yield of $\gamma$ -glutamic acid was (18.54 $\pm$ 0.39) g/L and the process time was reduced by 17%	[26]
	灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	菌柄长度增加 33.63%，菌柄面积大个体数增加 28% Stem length increased by 33.63%, and the number of individuals with large stem area increased by 28%	[32]
	桑黄 <i>Sanghuangporous sanghuang</i>	多糖产量增加 1.5 倍 The yield of polysaccharide was increased by 1.5-fold	[33]
	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	生物质增加 43.76%，柠檬酸产能提高 20.34% Biomass increased by 43.76% and citric acid production increased by 20.34%	[27]

由于传统筛选效率低、成本高，不利于大规模的工业生产。高通量筛选技术具有自动化程度高、速度快、成本低，短时间可以筛选大量突变体等特点，高通量筛选技术已被广泛应用于 ARTP 诱变后高产微生物细胞的分离与筛选<sup>[43]</sup>。

### 3.1 微量滴定板筛选(microtiter plate screening, MTP)

微量滴定板筛选是一种常见的高通量筛选策略，以 pH 值<sup>[44]</sup>作为筛选指标，用于初步筛

选那些改变 pH 值或产生有机酸的微生物。如 Wang 等<sup>[45]</sup>将 ARTP 诱变技术与微量滴定板筛选技术结合，筛选获得高产番茄红素的三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)，较野生型菌株产量提高 56.27%。

### 3.2 流式细胞术(flow cytometry, FC)

FC 于 20 世纪 60 年代后期首次开发用于单细胞分析，由于其具有对细胞进行计数、表征和分选的能力，在过去 20 年中已被广泛用于微

生物细胞分选<sup>[46]</sup>。N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-L-homoserine lactones, AHLs)广泛存在于土壤环境的革兰氏阴性细菌中, Liu 等<sup>[47]</sup>构建高选择性荧光标记抗体和碘化丙啶来识别活的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 可以快速检测牛奶和奶粉中的金黄色葡萄球菌。Tu 等<sup>[48]</sup>使用 3-脱氢莽草酸作为生物传感器, 通过 FC 筛选蛋白酶, 发现蛋白酶的靶向进化可增强其热稳定性和抗氧化剂的抗性。

### 3.3 荧光活化细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)

FACS 是一种可通过突变体自身物理或化学特性产生的荧光信号、快速识别和分选细胞的高通量筛选方法, 在微生物育种方面应用广泛。Abuaita 等<sup>[49]</sup>通过 FACS 筛选得到毒力缺陷的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)突变体。单细胞绿藻雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)天然产生抗氧化剂虾青素, 但由于其特殊的细胞壁结构, 虾青素的提取效率受到限制, Lin 等<sup>[50]</sup>将荧光素凝集素-蓖麻凝集素 I 与雨生红球藻细胞壁糖的部分进行偶联, 通过 FACS 筛选荧光值弱的细胞, 得到细胞壁缺陷的雨生红球藻突变体, 与野生型相比, 突变体细胞壁糖总含量降低了 43.9%, 虾青素含量和提取效率分别提高了 13.1%和 16.5%。

### 3.4 液滴微流控分选技术 (droplet-based microfluidics, DMFS)

DMFS 由微滴生成、液滴培养、微滴融合、皮升注射器、液滴检测和分选等步骤组成, 是一种能从大量的液滴中分离出目标液滴, 从而获得高效的微生物底盘细胞的技术手段, 如图 1 所示。DMFS 以纳升至皮升级液滴作为微反应器, 其优点在于能够将单个细胞封装在液滴中, 其中每个液滴作为一个独立的反应系统, 能够培养细胞并产生代谢物或酶。DMFS 克服了 FC 的局限性, 细胞之间物质不会流通, 同时适用分选微生物细胞的胞内表达和胞外分泌<sup>[51]</sup>。此外, DMFS 具有通量高、速度快、体积微小、均一性好、单分散性良好等优点。Yu 等<sup>[52]</sup>开发了一种高效的基于 DMFS 的筛选方法, 通过双砷-四半胱氨酸反应定向筛选高产纳米抗体的谷氨酸棒状杆菌突变体, 证实 DMFS 可以应用于筛选高产重组蛋白的微生物突变体。

#### 3.4.1 荧光激活液滴分选 (fluorescence-activated droplet sorting, FADS)

FADS 结合了 MTP 和 FACS 的许多优点, 它允许检测试剂沿着皮升注射器进入单个细胞并被封装在微反应器中, 检测试剂与细胞产物结合产生荧光信号, 随后在微流体装置中对单细胞荧光值进行定量检测和微通量分选<sup>[53]</sup>。

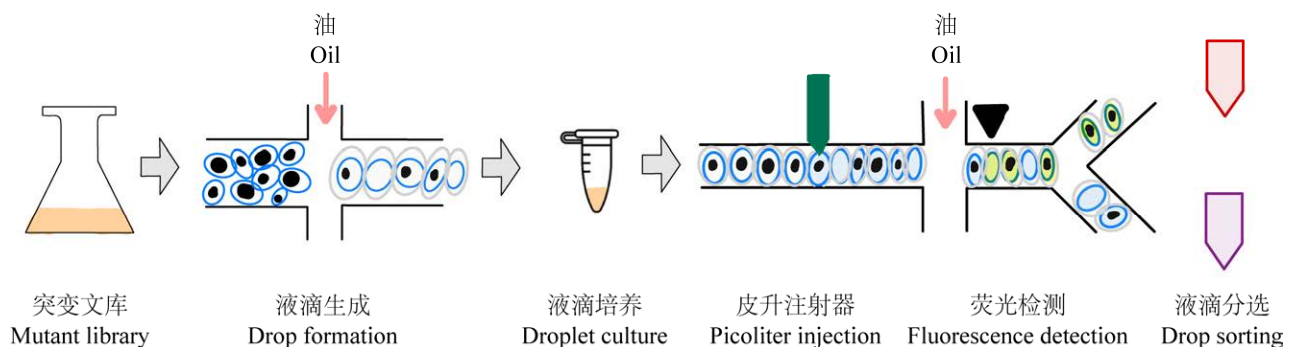


图 1 液滴微流控分选技术操作示意图

Figure 1 Schematic diagram of the operation of droplet microfluidic sorting technology.

Ma 等<sup>[54]</sup>证明 FADS 可以将通量提高  $10^3$ – $10^4$  倍, 超过传统的基于微孔板的筛选方法, 此外, FADS 中检测的单细胞规模所需要的试剂成本是基于微孔板测定成本的  $1/10^7$ – $1/10^6$ , 大大降低了成本。但在荧光检测中, 大部分微生物产物是非荧光的, 因此, 将微生物产物转换成荧光信号的荧光偶联策略 (fluorescence coupling strategies, FCSs) 对于 FADS 是必不可少的。

根据 FCS 基本原理, 可将 FADS 分为 3 个不同类别, 如图 2 所示。(1) 荧光底物策略: 荧光底物本身不具有荧光信号, 但荧光底物可以直接与酶发生反应产生强烈的荧光信号, 荧光值与酶活性成正比。在过去的 10 年中, 荧光底物多用于酶活性的检测, 包括糖苷酶<sup>[51]</sup>、脂肪酶<sup>[55]</sup>、过氧化物酶等; 此外, 荧光底物分析已被用于从宏基因组文库或不可培养的细菌群落中鉴定新的酶或新进化的催化酶<sup>[56]</sup>。(2) 酶偶联策略: 大部分小分子代谢物是非荧光的, 酶偶联策略可以间接将小分子代谢物转化为荧光信号。用氧化还原酶处理代谢物, 产生  $H_2O_2$  和 NADH, 这些新生成的物质可以与偶联酶和荧光探针结合转化为荧光信号, 进而对其进行筛选。目前, 酶偶联策略已广泛应用于各种代谢物的测量, 如 Hammar 等<sup>[57]</sup>利用乳酸脱氢酶将乳酸氧化为丙酮酸, 同时将 NAD 转化为 NADH, 后通过 NADH 荧光着色试剂盒将 NADH 转换为荧光信号, 从而分离获得高产乳酸的蓝藻。(3) 基于生物传感器的策略<sup>[58]</sup>: 荧光生物传感器是一种使用荧光分子产生信号的生物传感器。它们可以被设计成多种识别元件, 包括适体、抗体和酶, 能够在基于 FADS 的超高通量筛选中将分析物识别并转化为荧光信号<sup>[59]</sup>。生物传感器有 2 种类型: 1) 基于蛋白质的生物传感器。通过转录因子和工程荧光蛋白产生荧光

信号。2) 基于核酸的生物传感器。RNA Spinach<sup>[60]</sup>是一种特殊的结构, 可以与表达产物产生荧光信号。这些生物传感器已应用于氨基酸、糖、有机酸等<sup>[48,61]</sup>代谢物的高通量筛选。

### 3.4.2 吸光度激活液滴分选 (absorbance-activated droplet sorting, AADS)

AADS 不需要激光器和光电倍增管, 适用于不能通过荧光偶联策略产生荧光信号的化合物筛选, 因此 AADS 比 FADS 操作简单, 成本低。但相较于 FADS, AADS 的荧光检测灵敏度有限且需要体积较大的液滴进行分选, Gielen 等<sup>[62]</sup>通过 AADS 实现超高通量的酶的定向进化。

## 4 ARTP 诱变突变株的遗传稳定性

突变高产菌种的遗传稳定性是实现工业化生产的一个重要基础, 它反映了其在基因水平上的任何潜在突变。若突变株不具有良好的遗传稳定性, 那么在菌种传代过程中容易丢失其高产特性或其他筛选特性, 最终导致大规模发酵中目的产物产量的大幅度减少或纯化困难, 造成经济的损失。Ma 等<sup>[63]</sup>通过连续亚培养评估了枯草芽孢杆菌 WB600 mut-12# 的遗传稳定性, 20 代后重组碱性  $\alpha$ -淀粉酶 (alkaline  $\alpha$ -amylase, AMY) 的生产率仍保持在 200 U/mL 左右。陈洲琴等<sup>[64]</sup>对高产红色诺卡氏菌细胞壁骨架 (*Nocardia rubra* cell wall skeleton, N-CWS) 的突变株 FIM-PO8-16 进行 6 次传代培养摇瓶发酵, 结果表明突变株 FIM-PO8-16 菌体细胞浓度在传代过程中维持基本稳定, 展现良好的遗传稳定性。类似的研究还测定了突变体产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) MU-1<sup>[65]</sup>和白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*) A-29<sup>[66]</sup>的遗传稳定性, 它们在经过多轮培养后都表现出良好的遗传稳



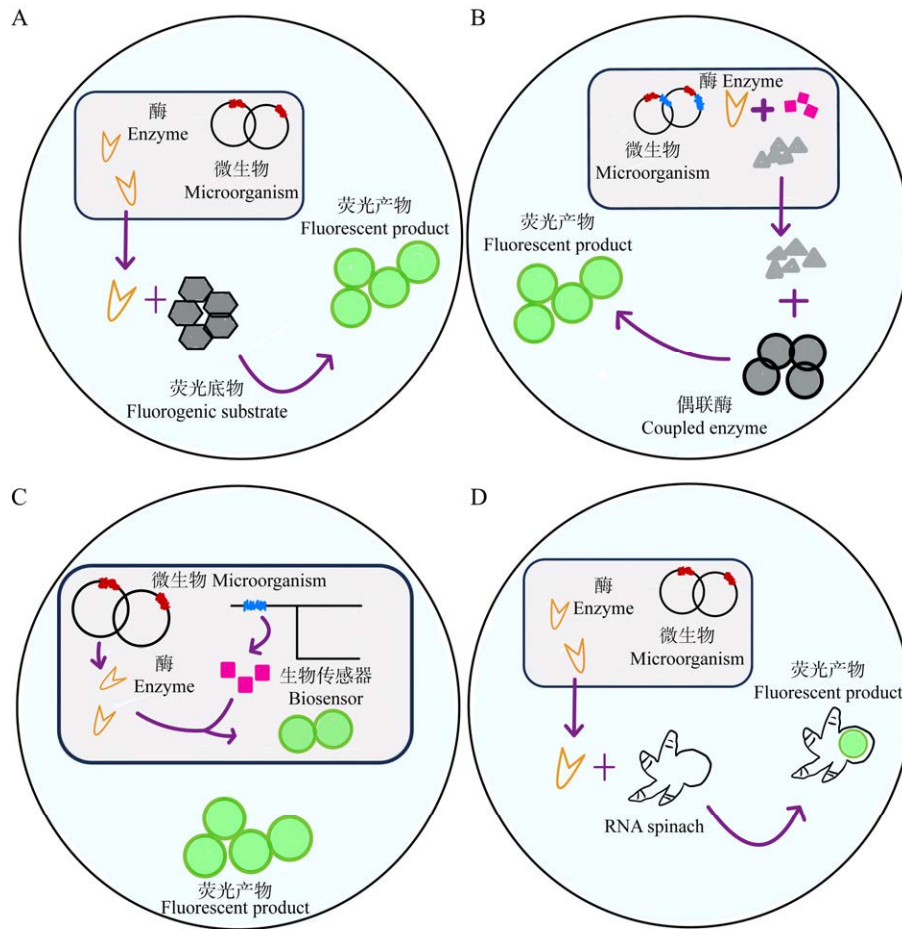


图2 荧光偶联策略 A: 荧光底物策略; B: 酶偶联策略; C: 转录因子; D: RNA 荧光复合物。

Figure 2 Fluorescent coupling strategies. A: Fluorescent substrate strategy; B: Enzyme coupling strategy; C: Transcription factors; D: RNA fluorescent complexes.

定性。这些结果表明, ARTP 诱变育种是获得高度遗传稳定性突变体的一种很有前景的方法。

## 5 总结

本文综述了 ARTP 在微生物育种领域的生物学效应、ARTP 诱变后突变菌株的筛选策略以及 ARTP 诱变微生物的突变机制。ARTP 诱变技术在微生物育种领域应用广泛, 相较于传统诱变方法, ARTP 诱变具有高效、安全、环保等优势。ARTP 诱变可以改善菌株特性, 如增加微生物对某些极端条件的耐受性、提高微生物生物

质量, ARTP 诱变后的突变体具有良好的遗传稳定性。此外, 高通量筛选技术的应用简化 ARTP 诱变后的筛选过程, 大大增加 ARTP 在微生物育种领域应用的潜力。尽管 ARTP 诱变技术在微生物育种领域取得了不错的进展, 但仍有一些理论研究和关键技术有待解决<sup>[2]</sup>。例如, 对 ARTP 诱变装置关键参数的研究不够深入, 缺少对诱变作用剂量的优化研究, ARTP 诱变机理在分子水平的研究还不够清晰, 这些问题的逐步解决有望使 ARTP 诱变技术在微生物育种领域有更广阔的应用前景。

## REFERENCES

- [1] ZHANG X, ZHANG XF, LI HP, WANG LY, ZHANG C, XING XH, BAO CY. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396.
- [2] LI DA, SHEN J, DING Q, WU JY, CHEN XS. Recent progress of atmospheric and room-temperature plasma as a new and promising mutagenesis technology[J]. Cell Biochemistry and Function, 2024, 42(3): e3991.
- [3] DOBRYNIN D, FRIDMAN G, FRIEDMAN G, FRIDMAN A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue[J]. New Journal of Physics, 2009, 11(11): 115020.
- [4] LIU KY, FANG H, CUI FJ, NYABAKO BA, TAO TL, ZAN XY, CHEN HY, SUN WJ. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6363-6373.
- [5] ZHANG H, YANG LF, YU ZL, HUANG Q. Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by DC glow discharge plasma: impacts on cell integrity, pigment contents and microcystins degradation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 268: 33-42.
- [6] LI HP, WANG LY, LI G, JIN LH, LE PS, ZHAO HX, XING XH, BAO CY. Manipulation of lipase activity by the helium radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharge plasma jet[J]. Plasma Processes and Polymers, 2011, 8(3): 224-229.
- [7] ZHANG AD, MA YD, DENG Y, ZHOU ZW, CAO Y, YANG B, BAI J, SUN Q. Enhancing protease and amylase activities in *Bacillus licheniformis* XS-4 for traditional soy sauce fermentation using ARTP mutagenesis[J]. Foods, 2023, 12(12): 2381.
- [8] SREEDEVI PR, SURESH K. Cold atmospheric plasma mediated cell membrane permeation and gene delivery-empirical interventions and pertinence[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2023, 320: 102989.
- [9] CHENG LK, WANG J, ZHAO XB, YIN HH, FANG HT, LIN CW, ZHANG SS, SHEN ZQ, ZHAO CG. An antiphage *Escherichia coli* mutant for higher production of L-threonine obtained by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. Biotechnology Progress, 2020, 36(6): e3058.
- [10] SUN X, LI PF, LIU XS, WANG X, LIU YJ, TURAB A, CHENG ZW. Strategies for enhanced lipid production of *Desmodesmus* sp. mutated by atmospheric and room temperature plasma with a new efficient screening method[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 250: 119509.
- [11] WANG LY, ZHAO HX, HE D, WU YN, JIN LH, LI G, SU N, LI HP, XING XH. Insights into the molecular-level effects of atmospheric and room-temperature plasma on mononucleotides and single-stranded homo- and hetero-oligonucleotides[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 14298.
- [12] LI G, LI HP, WANG LY, WANG S, ZHAO HX, SUN WT, XING XH, BAO CY. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(22): 221504.
- [13] YU F, ZHANG M, SUN JF, WANG F, LI XF, LIU Y, WANG Z, ZHAO XR, LI JH, CHEN J, DU GC, XUE ZL. Improved neomycin sulfate potency in *Streptomyces fradiae* using atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis and fermentation medium optimization[J]. Microorganisms, 2022, 10(1): 94.
- [14] 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.
- [15] YIN XQ, LI YY, ZHOU JW, RAO SQ, DU GC, CHEN J, LIU S. Enhanced production of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* through random mutagenesis and site-directed genetic modification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(10): 3144-3153.
- [16] 陆欢, 沈玲, 尚晓冬, 刘建雨, 王瑞娟, 杨慧. 常压室温等离子体技术在微生物诱变育种中的研究进展[J]. 生物学杂志, 2023, 40(4): 92-97.
- [17] LU H, SHEN L, SHANG XD, LIU JY, WANG RJ, YANG H. Application of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis in microbial and edible fungi mutation breeding[J]. Journal of Biology, 2023, 40(4): 92-97 (in Chinese).
- [17] 周英俊. 马铃薯疮痂病生防菌的选育及其抗病机理研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2023.
- [17] ZHOU YJ. Breeding and biocontrol mechanism of antagonist bacterium against the potato common scab pathogen[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [18] BAO ZJ, WANG XM, WANG QF, ZOU L, PENG LX, LI LJ, TU WY, LI Q. A novel method of domestication combined with ARTP to improve the reduction ability of *Bacillus velezensis* to Cr(VI)[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2023, 11(1): 109091.
- [19] WANG LY, HUANG ZL, LI G, ZHAO HX, XING XH, SUN WT, LI HP, GOU ZX, BAO CY. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851-858.
- [20] WANG XR, TIAN XR, WU YJ, SHEN XF, YANG SB, CHEN SX. Enhanced doxorubicin production by *Streptomyces peucetius* using a combination of classical strain mutation and medium optimization[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(6): 514-521.
- [21] MENG LH, GAO X, LIU XX, SUN MM, YAN H, LI A, YANG YK, BAI ZH. Enhancement of heterologous protein production in *Corynebacterium glutamicum* via atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 339: 22-31.
- [22] SONG CF, HAN XX, YIN QR, CHEN DQ, LI HW, LI SH. Performance intensification of CO<sub>2</sub> absorption and microalgae conversion (CAMC) hybrid system via low temperature plasma (LTP) treatment[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 801: 149791.
- [23] ELSHOBARY ME, ZABED HM, QI XH, EL-SHENODY RA. Enhancing biomass and lipid productivity of a green microalga *Parachlorella kessleri* for biodiesel

- production using rapid mutation of atmospheric and room temperature plasma[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 122.
- [24] 潘俊潼, 寇凤雨, 刘瑞艳, 王一然, 赵辉. 常压室温等离子体-紫外复合诱变选育  $\beta$ -法尼烯高产菌株[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(2): 542-551.  
PAN JT, KOU FY, LIU RY, WANG YR, ZHAO H. Breeding of high  $\beta$ -farnesene producing strain by ARTP-UV combined mutation[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(2): 542-551 (in Chinese).
- [25] HAN GQ, XU N, SUN XP, CHEN JZ, CHEN C, WANG Q. Improvement of L-valine production by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(10): 4751-4758.
- [26] QIU YB, ZHANG YT, ZHU YF, SHA YY, XU ZQ, FENG XH, LI S, XU H. Improving poly-( $\gamma$ -glutamic acid) production from a glutamic acid-independent strain from inulin substrate by consolidated bioprocessing[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(10): 1711-1720.
- [27] ZHANG N, JIANG JC, YANG J, WEI M, ZHAO J, XU H, XIE JC, TONG YJ, YU L. Citric acid production from acorn starch by tannin tolerance mutant *Aspergillus niger* AA120[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 188(1): 1-11.
- [28] YAO ZY, GONG JS, LIU YR, JIANG JY, ZHANG YS, SU C, LI H, KANG CL, LIU L, XU ZH, SHI JS. Genetic variation reveals the enhanced microbial hyaluronan biosynthesis via atmospheric and room temperature plasma[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 312: 120809.
- [29] ZHANG N, JIANG Y, SUN YJ, JIANG JC, TONG YJ. Breeding of a thermostable xylanase-producing strain of *Myceliophthora thermophila* by atmospheric room temperature plasma (ARTP) mutagenesis[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 10: 1095323.
- [30] LIU YK, LI SC. Breeding of high-yield alkaline protease producing strain by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, 453(1): 012089.
- [31] LIU WM, YANG WW, WU J, CHENG Y, WEI ZC, WANG T, AMPOFO KA, MA HL, CUI FJ, YANG XM, YAN JK, YANG LQ, ZHANG H. ARTP mutagenesis to improve mycelial polysaccharide production of *Grifola frondosa* using a mixture of wheat bran and rice bran as substrate[J]. *Journal of Food Quality*, 2021, 2021: 6110743.
- [32] LI MQ, HUANG XY, XIONG ZL. Investigation of stimulated growth effect using pulsed cold atmospheric plasma treatment on *Ganoderma lucidum*[J]. *Plasma Science and Technology*, 2022, 24(11): 115503.
- [33] LI TT, CHEN LJ, WU D, DONG GC, CHEN WC, ZHANG HN, YANG Y, WU WH. The structural characteristics and biological activities of intracellular polysaccharide derived from mutagenic *Sanghuangporus sanghuang* strain[J]. *Molecules*, 2020, 25(16): 3693.
- [34] 崔杰宇. 毛竹发酵制备高抑菌性哈茨木霉微生物农药的研究[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2023.  
CUI JY. A high antibacterial biopesticide production from a mutant strain of *Trichoderma harzianum* based on moso bamboo substrate[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2023 (in Chinese).
- [35] ZOU RS, LI SY, ZHANG LL, ZHANG C, HAN YJ, GAO G, SUN XY, GONG XQ. Mutagenesis of *Rhodobacter sphaeroides* using atmospheric and room temperature plasma treatment for efficient production of coenzyme Q10[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 127(6): 698-702.
- [36] LIU Y, CHEN X, WEI D, XING XH. Breeding a novel chlorophyll-deficient mutant of *Auxenochlorella pyrenoidosa* for high-quality protein production by atmospheric room temperature plasma mutagenesis[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 390: 129907.
- [37] ZHU CY, ZHAO XY, LYU ZY, GAO WL, ZHAO QW, CHEN XN, LI YQ. Daptomycin production enhancement by ARTP mutagenesis and fermentation optimization in *Streptomyces roseosporus*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(10): 1xad230.
- [38] DUAN GW, WU B, QIN H, WANG WT, TAN Q, DAI YH, QIN Y, TAN FR, HU GQ, HE MX. Replacing water and nutrients for ethanol production by ARTP derived biogas slurry tolerant *Zymomonas mobilis* strain[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 124.
- [39] 许鹏飞. 皮状丝孢酵母 ARTP 诱变选育及其产油关键酶基因转录组分析[D]. 宜昌: 三峡大学硕士学位论文, 2020.  
XU PF. Mutagenic breeding of *Trichosporon cutaneum* by ARTP and transcriptome analysis of key enzyme genes for oil production[D]. Yichang: Master's Thesis of China Three Gorges University, 2020 (in Chinese).
- [40] 周秋利, 顾喆, 龙凌凤, 郭书贤, 刘汝宽, 孙海彦, 孙付保. 复合诱变野生酵母 ZZ-46 选育高产油脂菌株[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(21): 16-22.  
ZHOU QL, GU Z, LONG LF, GUO SX, LIU RK, SUN HY, SUN FB. Improving microbial oil yield in *Trichosporon dermatis* by mutagenesis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(21): 16-22 (in Chinese).
- [41] WEI LL, MAO YR, LIU H, KE CZ, LIU XL, LI SB. Effect of an inorganic nitrogen source (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the production of welan gum from *Sphingomonas* sp. mutant obtained through UV-ARTP compound mutagenesis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 210: 630-638.
- [42] 吕苗苗, 牛春, 石彦鹏, 张萍. 阿维链霉菌高产菌株的复合筛选[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2024, 45(2): 94-99.  
LYU MM, NIU C, SHI YP, ZHANG P. Compound screening of high-yield strain of *Streptomyces avermitilis*[J]. *World Notes on Antibiotics*, 2024, 45(2): 94-99 (in Chinese).
- [43] CHIU FWY, STAVRAKIS S. High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes[J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(21): 2860-2872.
- [44] YU QH, LI YC, WU B, HU W, HE MX, HU GQ. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: advances and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1517-1531.
- [45] WANG Q, CHEN YL, FU JJ, YANG QX, FENG LR. High-throughput screening of lycopene-overproducing mutants of *Blakeslea trispora* by combining ARTP

- mutation with microtiter plate cultivation and transcriptional changes revealed by RNA-seq[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 161: 107664.
- [46] GONG YL, FAN N, YANG X, PENG B, JIANG H. New advances in microfluidic flow cytometry[J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(8): 1212-1229.
- [47] LIU SY, WANG B, SUI ZW, WANG ZQ, LI LQ, ZHEN XX, ZHAO W, ZHOU GP. Faster detection of *Staphylococcus aureus* in milk and milk powder by flow cytometry[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(5): 346-353.
- [48] TU R, LI LP, YUAN HL, HE RL, WANG QH. Biosensor-enabled droplet microfluidic system for the rapid screening of 3-dehydroshikimic acid produced in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(12): 1155-1160.
- [49] ABUAITA BH, WITHEY JH. Genetic screening for bacterial mutants in liquid growth media by fluorescence-activated cell sorting[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(1): 109-113.
- [50] LIN J, CHEN Y, YAN HL, NAHIDIAN B, HU Q, HAN DX. High-throughput fluorescence-activated cell sorting for cell wall-deficient microalgal mutants screening[J]. *Algal Research*, 2020, 50: 102011.
- [51] 孙梦楚, 陆亮宇, 申晓林, 孙新晓, 王佳, 袁其朋. 基于荧光检测的高通量筛选技术和装备助力细胞工厂构建[J]. *合成生物学*, 2023, 4(5): 947-965.
- SUN MC, LU LY, SHEN XL, SUN XX, WANG J, YUAN QP. Fluorescence detection-based high-throughput screening systems and devices facilitate cell factories construction[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 947-965 (in Chinese).
- [52] YU XY, LI S, FENG HB, LIAO XH, XING XH, BAI ZH, LIU XX, ZHANG C. CRISPRi-microfluidics screening enables genome-scale target identification for high-titer protein production and secretion[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 75: 192-204.
- [53] JIANG JJ, YANG GY, MA FQ. Fluorescence coupling strategies in fluorescence-activated droplet sorting (FADS) for ultrahigh-throughput screening of enzymes, metabolites, and antibodies[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 66: 108173.
- [54] MA FQ, CHUNG MT, YAO Y, NIDETZ R, LEE LM, LIU AP, FENG Y, KURABAYASHI K, YANG GY. Efficient molecular evolution to generate enantioselective enzymes using a dual-channel microfluidic droplet screening platform[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1030.
- [55] CHENG F, TANG XL, KARDASHLIEV T. Transcription factor-based biosensors in high-throughput screening: advances and applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(7): e1700648.
- [56] VITELLI M, BUDMAN H, PRITZKER M, TAMER M. Applications of flow cytometry sorting in the pharmaceutical industry: a review[J]. *Biotechnology Progress*, 2021, 37(4): e3146.
- [57] HAMMAR P, ANGERMAYR SA, SJOSTROM SL, van der MEER J, HELLINGWERF KJ, HUDSON EP, JOENSSON HN. Single-cell screening of photosynthetic growth and lactate production by cyanobacteria[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 193.
- [58] HU SY, WANG BX, LUO Q, ZENG RM, ZHANG JM, CHENG J. Advances in droplet-based microfluidic high-throughput screening of engineered strains and enzymes based on ultraviolet, visible, and fluorescent spectroscopy[J]. *Fermentation*, 2023, 10(1): 33.
- [59] 刘帅. X射线诱变选育红曲霉高产 Monacolin K 菌株及发酵工艺优化研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2023.
- LIU S. Study on the breeding of *Monascus purpureus* with high production of Monacolin K by X-ray mutation and optimization of fermentation process[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2023 (in Chinese).
- [60] POTHOUKAKIS G, CERONI F, REEVE B, ELLIS T. The spinach RNA aptamer as a characterization tool for synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(3): 182-187.
- [61] MAHR R, FRUNZKE J. Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(1): 79-90.
- [62] GIELEN F, HOURS R, EMOND S, FISCHLECHNER M, SCHELL U, HOLLFELDER F. 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.
- [63] MA YF, YANG HQ, CHEN XZ, SUN B, DU GC, ZHOU ZM, SONG JN, FAN Y, SHEN W. Significantly improving the yield of recombinant proteins in *Bacillus subtilis* by a novel powerful mutagenesis tool (ARTP): alkaline  $\alpha$ -amylase as a case study[J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 114: 82-88.
- [64] 陈洲琴, 张祝兰, 杨煌建, 程贤, 严凌斌, 连云阳. 红色诺卡氏菌高产菌的 ARTP 诱变选育与发酵条件优化[J]. *化学与生物工程*, 2024, 41(3): 46-52.
- CHEN ZQ, ZHANG ZL, YANG HJ, CHENG X, YAN LB, LIAN YY. ARTP mutagenesis breeding and fermentation conditions optimization of high *Nocardia rubra*-producing strain[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2024, 41(3): 46-52 (in Chinese).
- [65] LU Y, WANG LY, MA K, LI G, ZHANG C, ZHAO HX, LAI QH, LI HP, XING XH. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55(1): 17-22.
- [66] ZONG H, ZHAN Y, LI X, PENG LJ, FENG FQ, LI D. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6: 3154-3158.