



专论与综述

不同育种技术在乙醇及丁醇高产菌株选育中的应用

刘孟荧 黎秋玲 李志 张庆华 周智友 李汉广*

江西农业大学生物科学与工程学院 江西农业微生物资源开发与利用工程实验室 江西省菌物资源保护与利用重点实验室 江西 南昌 330045

摘要: 利用微生物发酵进行能源物质的生产是开发新型可再生能源的重要手段。在工业化生产过程中, 由于高温、渗透压及产物毒性效应等不良环境因素, 常导致生产菌株的多种重要生理功能发生改变, 从而降低产物转化效率。因此, 获取高产及抗逆性强的优良菌株是提高生物燃料工业化进程的重要途径之一。本文以乙醇与丁醇生产菌株为研究对象, 系统阐述当前提高生产菌株发酵性能的各种育种手段, 并对其在工业化生产过程中所面临的机遇与挑战进行简要评述。

关键词: 生物燃料, 生物丁醇, 诱变育种, 现代生物技术

Applications of different breeding technologies to obtain high ethanol and butanol producing strains

LIU Meng-Ying LI Qiu-Ling LI Zhi ZHANG Qing-Hua ZHOU Zhi-You LI Han-Guang*

College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University; Jiangxi Engineering Laboratory for the Development and Utilization of Agricultural Microbial Resources; Jiangxi Key Laboratory for Conservation and Utilization of Fungal Resources, Nanchang, Jiangxi 330045, China

Abstract: The production of energy via fermentation is an important method to develop the renewable energy sources. Due to adverse environmental factors such as higher temperature, higher osmotic pressure and solvent toxicity in the process of industrial production, the physiological functions of producing strains were often changed, then reducing biotransformation efficiency. Therefore, obtaining excellent strains with higher yield and higher solvent resistance is of great significance for the current ethanol and butanol industrial fermentation. In this paper, we propose to discuss the ethanol and butanol producing strains, and the current breeding methods for improving ethanol and butanol fermentation performance were systematically reviewed. The opportunities and challenges in the production process of ethanol and butanol were also discussed.

Keywords: Biofuel, Biobutanol, Mutation breeding, Modern biological technology

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21466014); Jiangxi Provincial Department of Education Scientific Research Project (GJJ160388); Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates from Jiangxi Agricultural University (201810410015); The Doctoral Starting up Foundation of Jiangxi Agricultural University (9232305387)

*Corresponding author: E-mail: hanguangli@jxau.edu.cn

Received: 24-07-2019; **Accepted:** 22-10-2019; **Published online:** 22-11-2019

基金项目: 国家自然科学基金(21466014); 江西省教育厅科学研究项目(GJJ160388); 江西农业大学国家级学生创新创业计划项目(201810410015); 江西农业大学博士启动基金(9232305387)

*通信作者: E-mail: hanguangli@jxau.edu.cn

收稿日期: 2019-07-24; **接受日期:** 2019-10-22; **网络首发日期:** 2019-11-22

石油化工技术的进步是推动世界经济飞速发展的不竭动力之一,然而随着人们对能源需求的不断增加及化石资源的过度开采与消耗,能源短缺危机逐渐显现。与此同时,化石资源开采利用所造成的环境污染问题也不容小视。因此,发展可再生能源代替化石燃料已逐步成为全球共识。生物质能作为继煤、石油、天然气后的第四大能源库,具有高效、环保及可再生性等众多优点。其中,生物乙醇被视为石油资源的理想代替品,已实现了大规模工业化生产和应用^[1];而生物丁醇因具有更高的辛烷值、污染轻及可与汽油任意比混合等优点,成为了汽油的最佳代替燃料之一^[2]。

与其他工业发酵相比,生物乙醇与丁醇发酵产物主要为有机溶剂,因此在生产过程中会对菌株产生毒害作用^[3],从而导致发酵终产物浓度及产率偏低。虽然近年来通过优化发酵工艺、耦合分离技术等手段,在减轻有机溶剂的毒性效应及提高生产效率方面取得了一定的研究进展,但对于产物产量的提高较为有限。

另一方面,在传统发酵过程中,生物乙醇与丁醇的发酵底物主要为淀粉质及糖质原料,如玉米、小麦、薯类、糖蜜等,而近年来随着世界人口的增长、气候的变化等因素,以传统粮食作物为底物的生产模式开始出现生产成本增加以及与人争粮等问题。为此,开发新型发酵底物如木质纤维、藻类等进行生物乙醇与丁醇的生产,成为近年生物能源领域研究热点之一,然而纤维水解液中的抑制剂及葡萄糖阻遏效应的存在,降低了菌株对廉价底物的利用效率,因此,获取高效的生产菌株仍是影响生产效率及成本的关键因素,而从自然界中获取的生产菌株往往存在突变频率低、幅度小、产物产量无法满足生产需求等弊端。因此,利用人工育种、组学技术等育种方法对生产菌株进行改良成为获得优良菌株的常用方法。本文从常规育种技术及多组学育种技术出发,系统介绍了近年来生物乙醇与丁醇生产菌株常用的育种手段,并对其在生物燃料发酵行业的应用前景进行了展望。

1 常规育种技术

1.1 传统育种技术

利用传统物理、化学手段获取突变菌株是当前工业诱变育种的常用方式之一,部分传统育种技术及效果见表1。其中,物理诱变技术以辐射诱变(如 β -射线、 γ -射线、紫外等)最为常见,其主要通过诱发DNA链断裂引起各种交联现象的产生,达到诱变育种的目的,具有操作简单、突变范围广等优势;而化学诱变则以著有“超诱变剂”之称的亚硝基胍(nitroso-guanidin, NTG)最为常见。与物理诱变相比,化学诱变常用于处理迟发性突变,其造成的染色体损伤相对较轻,多为基因的点突变,但由于化学诱变剂大多存在一定的致癌性和挥发性,因此使用时应严格遵守实验操作规则。

1.2 新型物理诱变技术

1.2.1 低能离子束注入

离子束是指元素经离子注入机加速电离成离子后,获得的一束具有能量的带电粒子放射线,其最早被运用于金属材料的表面改性中^[11],然而20世纪90年代以来有研究学者发现,当离子束与生物体相互作用时,其可作为优质诱变源引发相应的生物学效应,从而开启了离子束在生物诱变育种中的运用。与常规辐射诱变原理相同,低能离子束注入技术可通过能量及电离作用引起生物体中的染色体畸形或DNA链断裂,同时又因存在特有的能量、质量及电荷三因子协同效应,使其与生物体的相互作用更为复杂,在诱变过程中还可通过引起受体原子的重组、位移等多重损伤诱发基因突变^[12]。有大量研究发现,注入离子作用于生物体时存在能量沉积及动量传递效应,其可通过对微生物细胞壁或细胞膜产生不同程度的损伤及刻蚀,在细胞表面形成多个孔洞,随着注入剂量的增加,刻蚀程度不断加深,待孔洞连成一定通道后,离子束将直接作用于遗传物质,产生相应的生物学效应^[13-14]。目前常用的低能离子束种类主要包括 N^+ 、 H^+ 、 Ar^+ 、 C^{2+} 等,在这诸多的离子束中以 N^+ 离子束运用最为广泛。Liu等^[15]对*Clostridium beijerinckii*

表 1 部分传统诱变育种技术及其育种效果

Table 1 Some traditional mutagenesis breeding techniques and its effects

诱变手段 Methods	菌株 Strains	诱变结果 Mutagenesis effects	参考文献 References
^{60}Co - γ 射线 ^{60}Co - γ irradiation	树干毕赤酵母 CICC1960 <i>Pichia stipites</i> CICC1960	乙醇产量较出发菌株提高了 140% The ethanol production was 140% higher than the parent strain	[4]
^{60}Co - γ 射线 ^{60}Co - γ irradiation	拜氏梭菌 <i>Clostridium beijerinckii</i>	丁醇及总溶剂产量较出发菌株提高了 85.41% 和 81.46% Butanol and total solvent concentration increased by 85.41% and 81.46% compared with the parent strain	[5]
紫外诱变 Ultraviolet	酿酒酵母 NR1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NR1	乙醇产量及产率较出发菌株提高了 25.7% 和 42.9% The ethanol concentration and productivity were 25.7% and 42.9% higher than the parent strain	[6]
紫外诱变 Ultraviolet	拜氏梭菌 8052 <i>Clostridium beijerinckii</i> 8052	对玉米秸秆水解液中的糖利用率提高了 14% Sugar, which obtained from corn stalk hydrolysate, utilization was increased by 14%	[7]
甲基磺酸乙酯 Ethyl methyl sulfone	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	乙醇产量较出发菌株提高了 17.3% Ethanol production increased by 17.3% compared to the parent strain	[8]
甲基磺酸乙酯 Ethyl methyl sulfone	拜氏梭菌 4259 <i>Clostridium beijerinckii</i> 4259	可同时利用麦麸水解液中的己糖和戊糖发酵 The hexose and pentose in which collected from wheat bran hydrolysate were simultaneously utilized in butanol fermentation.	[9]
亚硝基胍 Nitrosoguanidine (NTG)	丙酮丁醇梭菌 PJC4BK <i>Clostridium acetobutylicum</i> PJC4BK	丁醇及总溶剂产量较出发菌株提高了 44.5% 和 30.5% The butanol and total solvent concentration increased by 44.5% and 30.5% compared with the parent strain	[10]

D64 进行 N^+ 离子束注入诱变处理, 获得的突变菌株 NT642, 在分批发酵过程中可产生 15.4 g/L 丁醇和 22.3 g/L 总溶剂, 同时可耐受 3% (体积比) 的丁醇, 丁醇耐受性较出发菌株(丁醇耐受性小于 2%)明显提高。

1.2.2 重离子束辐照

重离子就是比质子重的带电粒子, 其产生方式主要有两种: 一是宇宙空间中存在的带电粒子束; 二是利用重离子加速器将原子全部或部分外围电子的带电原子核剥离。与传统诱变源相比, 重离子束因其相对电离密度较大, 引起的 DNA 损伤常以双链断裂为主, 而在所有 DNA 损伤类型中, DNA 双链断裂是最为严重的损伤类型, 其损伤造成的致密性及空间复杂性往往会影响 DNA 片段与修复酶的结合, 阻碍细胞修复, 从而导致细胞死亡或产生突变^[16-18]。另一方面, 重离子束辐照诱变过程中, 细胞存活曲线呈“马鞍型”变化趋势, 即细胞存活率随注入剂量的增加先下降后上升再下降, 说明细胞在高辐射剂量下仍可保持较高的突变率及存活率,

突变谱大大增加^[19]。目前常见的重离子种类有 $^{16}\text{O}^{6+}$ 、 $^{12}\text{C}^{6+}$ 、 $^{36}\text{Ar}^{18+}$ 等, 其中 $^{12}\text{C}^{6+}$ 主要被用于生物体诱变育种中。张飞等^[20]在研究 C 离子辐照对 *Saccharomyces cerevisiae* CICC1308 的 DNA 损伤情况时发现, C 离子辐照可诱发高频率的 DNA 双链断裂, 同时引起一系列的生物学修复过程, 而错误修复可能是导致菌株生物学性状改变而产生突变效应的主要原因。Matuo 等^[21]通过对比 $^{12}\text{C}^{5+}$ 离子束辐照和 ^{60}Co - γ 射线对 *Saccharomyces cerevisiae* URA3 的诱变效果时发现, $^{12}\text{C}^{5+}$ 离子束辐照诱导的基因突变频率是 ^{60}Co - γ 射线的 10 倍。

1.2.3 常压室温等离子体诱变

等离子体又称电浆, 是由大量正负离子组成的离子化气状物质。与传统离子束注入技术相比, 常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术去除了复杂昂贵的真空系统, 避免了由真空产生的低温及离子束产生的高温对细胞造成的损伤, 大大提高了细胞的存活率^[22]。同时有研究发现, ARTP 诱变技术在改变遗传物质

结构的同时, 还可诱发 DNA 的多种修复机制, 其中以 SOS 修复最为常见, 而 SOS 修复是一种错误倾向修复, 在修复过程中会产生丰富的位点错配, 最终导致细胞具有较高的突变率^[23-25]。Zhang 等^[26]通过对比 ARTP、紫外、4-硝基喹啉-1-氧化物、N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍对细胞 DNA 损伤强度及突变率的关系时发现, ARTP 诱导的突变率要远高于其他诱变源。

本课题组采用 ARTP 诱变技术对 *Clostridium acetobutylicum* 进行诱变处理, 获得的突变菌株 ART18 发酵葡萄糖可产生 11.3 g/L 丁醇, 较出发菌株提高了 31%, 同时突变菌株 ART18 能以木薯粉作为唯一底物, 在优化发酵条件后, 最终可产生 12.9 g/L 丁醇和 20.7 g/L 总溶剂^[27]。

1.2.4 激光诱变

作为一种新型物理诱变源, 激光是一种不同于自然光的高亮度定向能束, 除了可通过直接作用引起染色体缺失、易位等变化外, 还可通过间接作用产生相应的生物学效应, 而由于生物系统的复杂性, 目前对于间接作用引起的诱变机理尚无确切了解, 但普遍接受的解释是, 激光通过辐照机体后产生光活化效应, 导致细胞核仁器抑制解除, 同时使大分子遗传物质及蛋白质系统活性提高, 机体生物合成能力增强^[28-29]。

与常规育种技术相比, 激光诱变具有选择性强、回复突变率低及当代变异等优点, 在微生物育种中具有广阔的应用前景。张云野等^[30]通过研究紫外、微波及 He-Ne 激光对 *Candida albicans* 的影响时发现, He-Ne 激光诱导的细胞正突变率可高达 48.62%, 远超于紫外诱变的 6.62% 及微波诱变的 20.44%, 同时 He-Ne 激光诱导产生的突变菌株 HN-3 乙醇产量及得率可达到 18.49 g/L 和 0.38 g/g, 较原始菌株均提高最多。

1.3 适应性实验室进化

适应性实验室进化 (adaptive laboratory evolution, ALE) 是指通过给予选择压力, 利用微生物的自发突变富集高表型菌株的一种育种手段^[31],

而选择压力的存在可实现突变菌株的定向淘汰, 因此与物理、化学诱变相比, ALE 可在短时间内有效改变菌株的某些表型或生理特征, 而对除目的表型外的其它优良性状不产生影响^[32]。

Shui 等^[33]利用高温适应性进化获得了一株可在 40 °C 条件下正常生长的 *Saccharomyces cerevisiae*, 其乙醇产量较出发菌株提高了 0.3%–0.5% (体积比)。Matsusako 等^[34]为解决 *Synechocystis* sp. PCC6803 对醇类耐受性较低的问题, 利用异丁醇作为选择压力进行定向驯化, 获得的突变菌株对各种醇类均有较强抗性, 同时通过全基因组测序及反向遗传技术分析发现, 进化过程中基因 *mcpA*、*hik43* 及 *envD* 的缺失可能是导致突变菌株具有强耐受性的主要原因。

1.4 复合诱变

在微生物育种过程中, 单因子诱变技术虽可获得某些性状优良的突变菌株, 但同时也存在着突变谱简单、易产生“疲劳效应”等问题。因此, 在实际生产过程中, 常采用复合诱变技术处理菌株, 利用诱变剂之间的协同效应弥补单一诱变的缺陷, 获得更为丰富的突变菌库。

随着育种技术的不断发展, 育种手段也愈加多样化, 因此, 广大学者对于复合诱变剂的多重组合做了大量探索并取得了一定的研究进展, 其中以理化因子复合诱变最为常见。Pattanakittivorakul 等^[35]为获得高抗及耐高温 *Saccharomyces cerevisiae*, 利用紫外及甲基磺酸乙酯对出发菌株进行复合处理, 获得的突变菌株 So87E100-265 对糠醛及乙酸耐受性明显提高, 在 40 °C 条件下发酵糖蜜可产生 62.5 g/L 乙醇。本课题组采用 N⁺离子束注入及 NTG 复合诱变处理 *Clostridium beijerinckii* L175 后, 获得的突变菌株 MUT3 发酵性能明显提高, 在以糖蜜为底物进行发酵时可产生 15.1 g/L 丁醇和 22.1 g/L 总溶剂, 较出发菌株分别提高了 34.8% 和 48.3%^[36]。虽然复合诱变较单因子诱变具有更大优势, 但由于缺乏对菌株遗传背景的清晰了解, 目前对于复合诱变剂的选择还带有较大盲目性, 如何进行诱变剂的有效组合将是提高复合诱变效率的关键。

2 现代生物技术的应用

2.1 基因组改组

1998 年 Stemmer 在体外同源重组技术(DNA shuffling)基础上,提出了基因组改组技术(genome shuffling),该育种技术是一种针对遗传背景不明确的微生物育种方式^[37-38],可在不了解整个代谢网络信息条件下,通过对诱变后的高表型突变菌株进行亲本融合,以达到改善菌种遗传特性、提高代谢产物产量的目的^[39-41]。Jeti 等^[42]利用基因组改组技术将 *Pichia stipitis* 的特异糖代谢基因转移到 *Saccharomyces cerevisiae* 中,获得的杂交菌株 SP2-18 对发酵液中木糖的利用率可达到 34%,与出发菌株完全不能利用木糖发酵相比,底物利用率显著增加。Li 等^[43]以 NTG 诱变处理后的 *Clostridium acetobutylicum* GX01 和 *Lactobacillus mucosae* M26 为出发菌株进行细胞融合,经 4 轮次基因组改组后,获得的改组菌株 GS4-3 淀粉酶活性及热稳定性均有所提升,在分批发酵过程中可产生 20.1 g/L 丁醇,丁醇得率达到 0.23 g/g,与出发菌株相比分别提高了 23.3%和 40%。

2.2 基因组编辑

基因组编辑技术是指通过对特定 DNA 片段的高效表达或敲除,以实现目标基因定向改造的一种遗传操作手段。与常规育种技术相比,基因组编辑技术可避免随机诱变造成的盲目性和不可控性,有效提高育种效率。随着近年来各种高效基因编辑工具的开发利用,基因组水平上的 DNA 序列定向改造有了强有力的技术支持^[44-45]。Zhang 等^[46]在转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术基础上,设计构建了一种可特异识别真核生物启动子中 TATA 框及 GC 框的多位点基因组编辑技术(TALENs-assisted multiplex editing, TAME)。Gan 等^[47]利用 TAME 技术对 *Saccharomyces cerevisiae* 进行基因组改造,同时以高温及高渗作为筛选条件,获得的耐高渗突变菌株 ScY001T 及耐高温突变菌株

ScY033T,在相应胁迫条件下乙醇发酵性能较出发菌株分别提高了 1.2 倍和 1.3 倍。Xu 等^[48]通过敲除 *Clostridium acetobutylicum* ATCC55025 中 *cac3319* 基因后,获得的突变菌株 HKKO 丁醇耐受性明显增强,发酵葡萄糖可产生 18.2 g/L 丁醇。

2.3 代谢工程

代谢工程作为一门通过构建全新代谢途径来产生特定目标代谢产物而建立起来的一个新的学科领域,主要通过多基因重组技术对细胞代谢网络进行合理设计及改造,实现细胞对目标产物的合成或提高目标产物合成能力^[49]。利用代谢工程育种时,应先对改造菌株的代谢网络及流量进行系统分析,待寻找到需要修饰或引进的生化反应后,再利用相关分子学技术进行遗传改造。Caspeta 等^[50]通过对耐高温突变菌的全基因组测序分析发现,突变菌株的多基因位点发生了单核苷酸多态性变异,其中甾醇和 ATP 合成相关基因拷贝数明显增加,以此为基础,利用代谢工程技术对 *Saccharomyces cerevisiae* 胆固醇合成途径进行改造,获得的工程菌株在 42 °C 时,葡萄糖消耗速率较亲本菌株提高了 300%。Zhang 等^[51]为提高 *Clostridium tyrobutyricum* 蔗糖利用率,将 *Clostridium acetobutylicum* 中参与蔗糖分解代谢途径的 3 种基因(*scrA*、*scrB*、*scrK*)及醇醛脱氢酶合成基因导入 *Clostridium tyrobutyricum* 后发现,与出发菌株完全不能利用蔗糖发酵相比,工程菌株 Ct(Δ ack)-p Δ scrBAK 发酵甘蔗汁可产生 14.8–18.8 g/L 丁醇,且丁醇占比达到 94%。

2.4 合成生物学

合成生物学技术是以工程化的设计理念为基础,从“元件-模块-系统”角度全方位地对细胞进行靶向改造或构建新的生物体。因其可创造自然界中尚不存在的人工生命系统而被誉为“第三次生物技术革命”^[52]。孙欢等^[53]通过将设计构建的 *Thermus thermophilus* HB8 热激蛋白元件 FBA1p-groes-SLM5t 导入 *Saccharomyces cerevisiae* 后,获

得的工程菌株 S.c-Gro ES 在 42 °C 条件下的细胞存活率可达到对照组的 3 倍,同时活性氧自由基水平较出发菌株降低了 37.6%, 菌株抗氧化性明显提高。Wen 等^[54]通过将梭菌内源性发酵调节元件 (fermentation regulating element, FRE) 导入 *E. coli* 中, 成功构建了一个可自我调节的丁醇生产系统, 并发现甲酸脱氢酶(Fdh)与 FRE_{adhE} 过表达组合时可显著提高丁醇产量,在不添加诱导剂及抗生素条件下,利用高密度发酵可产生 10.0 g/L 丁醇。虽然近年来利用合成生物学技术赋予了细胞崭新的生物学功能,但同时也为人类社会及生态环境带来了潜在风险。因此,如何促进合成生物学技术的健康是所有研究者需要解决共同难题。

3 问题与展望

随着多组学技术及系统生物学的发展,微生物育种实现了从自然筛选到人工育种、非理性诱变到定向诱变的跨越,育种方式也逐步趋于定向化、高效化和安全化。本文系统回顾了当前微生物育种技术在生物乙醇与丁醇生产菌株中的应用。其中,常规育种技术因其操作简单、育种手段多样、收效明显,成为当前工业生产过程中获取优良菌株的有效手段,但同时也存在着盲目性大等弊端;而基因编辑技术及多组学技术虽实现了已知功能基因的高效定向转移,但其构建菌株多以实验室培养为主,且由于工程菌株遗传背景较为复杂,代谢机理不够清晰,因此离工业化生产仍有较长距离。除此之外,由于突变的不可控性,常常需要花费大量的时间和精力进行目的菌株的筛选,如何从庞大的突变体文库中快速高效地获取优良菌株,将是未来广大学者所要攻破的难关。只有通过理性筛选与育种技术相结合,才能达到高效获取优良菌株的目的。

另一方面,生物乙醇与丁醇发酵已有上百年历史,虽然生物乙醇已步入产业化生产,但两者与化学合成法相比仍面临着诸多挑战,如低产率、低转化率、高成本等,针对上述问题,研究者可从以下几个方面加强研究:(1) 扩大生产菌谱,结合新型高通量筛选方法,通过对目的菌株的有效筛选,以

期发现更多高产、高抗生产菌株。(2) 利用代谢工程及合成生物学技术,过表达菌株自身或外源耐受性相关基因,在解除溶剂毒性效应的同时,有效提高产物产量。(3) 开发新型廉价可利用底物,通过构建高水平异源底物降解酶系,增强菌株底物利用能力,最终提高菌株对廉价底物的转化效率。若能充分整合各组学信息,准确模拟代谢网络结构,我们有理由相信,在不久的将来可真正实现优良菌株的高效生物转化。

REFERENCES

- [1] Khan MI, Shin JH, Kim JD, et al. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 36
- [2] Lee SH, Yun EJ, Kim J, et al. Biomass, strain engineering, and fermentation processes for butanol production by solventogenic clostridia[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8255-8271
- [3] Li HG, Zhou QX, Luo W, et al. Applications of microbial ethanol and butanol tolerance in biofuel production and biotransformation[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(9): 1864-1871 (in Chinese)
李汉广, 周秋香, 罗玮, 等. 微生物耐受乙醇与丁醇机制及其在生物燃料生产与生物转化中的应用[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(9): 1864-1871
- [4] Xiong DM, Zeng L, Xiong XY, et al. Screening of the diversity mutational strains of converting D-xylose to ethanol by ⁶⁰Co-γ irradiation and its fermentation characterization research[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(2): 290-295 (in Chinese)
熊冬梅, 曾璐, 熊兴耀, 等. 基于⁶⁰Co-γ 射线辐照的木糖乙醇发酵差异性突变菌株筛选及其发酵特性[J]. *核农学报*, 2015, 29(2): 290-295
- [5] Liu Y, Liu HJ, Zhang JA, et al. Mutation of *Cl. beijerinckii* protoplasts by ⁶⁰Co-γ irradiation[J]. *CIESC Journal*, 2009, 60(10): 2549-2554 (in Chinese)
刘娅, 刘宏娟, 张建安, 等. ⁶⁰Co-γ 对 *Cl. beijerinckii* 原生质体的辐照诱变[J]. *化工学报*, 2009, 60(10): 2549-2554
- [6] Thammasittirong SNR, Thirasaktana T, Thammasittirong A, et al. Improvement of ethanol production by ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* UVNR56[J]. *SpringerPlus*, 2013, 2: 583
- [7] Tian L, Liu ZY, Zhang PY, et al. Production of butanol from corn stover hydrolysate by *Clostridium beijerinckii* 8052[J]. *Renewable Energy Resources*, 2015, 33(4): 618-624 (in Chinese)

- 田磊, 刘自勇, 张培玉, 等. 拜氏梭菌发酵玉米秸秆水解液生产燃料丁醇[J]. 可再生能源, 2015, 33(4): 618-624
- [8] Mobini-Dehkordi M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, et al. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(4): 403-408
- [9] Liu ZY, Ying Y, Li FL, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(5): 495-501
- [10] Jang YS, Malaviya A, Lee SY. Acetone-butanol-ethanol production with high productivity using *Clostridium acetobutylicum* BKM19[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(6): 1646-1653
- [11] Parida SK, Medicherla VRR, Mishra DK, et al. Low energy ion beam modification of Cu/Ni/Si(100) surface[J]. Bulletin of Materials Science, 2014, 37(7): 1569-1573
- [12] Tanaka A. Ion beam-induced mutation in plants[A]//Kudo H. Radiation Applications[M]. Singapore: Springer, 2018: 163-184
- [13] Feng HY, Yu ZL, Chu PK, et al. Ion implantation of organisms[J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2006, 54(3/4): 49-120
- [14] Gu SB, Li SC, Feng HY, et al. A novel approach to microbial breeding-low-energy ion implantation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(2): 201-209
- [15] Liu XB, Gu QY, Yu XB, et al. Enhancement of butanol tolerance and butanol yield in *Clostridium acetobutylicum* mutant NT642 obtained by nitrogen ion beam implantation[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(6): 1024-1028
- [16] Song XQ, Zhang Y, Zhu XD, et al. Mutation breeding of high avermectin B_{1a}-producing strain by the combination of high energy carbon heavy ion irradiation and sodium nitrite mutagenesis based on high throughput screening[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(5): 539-548
- [17] Zhang HD, Lu D, Li X, et al. Heavy ion mutagenesis combined with triclosan screening provides a new strategy for improving the arachidonic acid yield in *Mortierella alpina*[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 23
- [18] Terato H, Shimazaki-Tokuyama Y, Inoue Y, et al. Quantitative characteristics of clustered DNA damage in irradiated cells by heavy ion beams[J]. Journal of Radiation Research, 2014, 55(S1): i89-i90
- [19] Guo XP, Zhang MM, Gao Y, et al. "Saddle-shaped" dose-survival effect, is it a general and valuable phenomenon in microbes in response to heavy ion beam irradiation?[J]. Annals of Microbiology, 2019, 69(3): 221-232
- [20] Zhang F, Lu D, Wang YG, et al. Study on DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae* irradiated with C ion beams[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2013, 31(2): 27-31 (in Chinese)
- 张飞, 陆栋, 王永刚, 等. C 离子辐照对酿酒酵母 DNA 损伤研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2013, 31(2): 27-31
- [21] Matuo Y, Nishijima S, Hase Y, et al. Specificity of mutations induced by carbon ions in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2006, 602(1/2): 7-13
- [22] Zhang X, Zhang XF, Li HP, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396
- [23] Wang XB, Lu MS, Wang SJ, et al. The atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) method on the dextranase activity and structure[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 284-291
- [24] Zhang X, Zhang XM, Xu GQ, 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
- [25] Wu XY, Wei YQ, Xu ZM, et al. Evaluation of an ethanol-tolerant *Acetobacter pasteurianus* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[A]. Zhang TC, Nakajima M. Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume II[M]. Berlin, Heidelberg: Berlin, 2015: 277-286
- [26] Zhang X, Zhang C, Zhou QQ, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5639-5646
- [27] Li HG, Luo W, Wang Q, et al. Direct fermentation of gelatinized cassava starch to acetone, butanol, and ethanol using *Clostridium acetobutylicum* mutant obtained by atmospheric and room temperature plasma[J]. Applied Biochemistry and biotechnology, 2014, 172(7): 3330-3341
- [28] Itri F, Monti DM, Ventura BD, et al. Femtosecond UV-laser pulses to unveil protein-protein interactions in living cells[J]. Cellular and Molecular Life Science, 2016, 73(3): 637-648
- [29] Drexler GA, Ruiz-Gómez MJ. Microirradiation techniques in radiobiological research[J]. Journal of Biosciences, 2015, 40(3): 629-643
- [30] Zhang YY, Wang YN, Ling HZ, et al. Effects of different physical mutagenesis methods on ethanol production by *Candida albicans*[J]. China Brewing, 2019, 38(2): 86-92 (in Chinese)
- 张云野, 王轶男, 凌宏志, 等. 不同物理诱变方式对休哈

- 塔假丝酵母产乙醇的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(2): 86-92
- [31] LaCroix RA, Palsson BO, Feist AM. A model for designing adaptive laboratory evolution experiments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(8): 3115-3116
- [32] Horinouchi T, Suzuki S, Hirasawa T, et al. Phenotypic convergence in bacterial adaptive evolution to ethanol stress[J]. BMC Evolutionary Biology, 2015, 15(1): 180
- [33] Shui WQ, Xiong Y, Xiao WD, et al. Understanding the mechanism of thermotolerance distinct from heat shock response through proteomic analysis of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2015, 14(7): 1885-1897
- [34] Matsusako T, Toya Y, Yoshikawa K, et al. Identification of alcohol stress tolerance genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 using adaptive laboratory evolution[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 307
- [35] Pattanakittivorakul S, Lertwattanasakul N, Yamada M, et al. Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2019, 112(7): 975-990
- [36] Li HG, Luo W, Gu QY, et al. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine induction[J]. Bioresource Technology, 2013, 137: 254-260
- [37] de Gérando HM, Fayolle-Guichard F, Rudant L, et al. Improving isopropanol tolerance and production of *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 by random mutagenesis and genome shuffling[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5427-5436
- [38] Zhang GQ, Lin YP, Qi XN, et al. Genome shuffling of the nonconventional yeast *Pichia anomala* for improved sugar alcohol production[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 112
- [39] Gu CK, Wang GY, Mai S, et al. ARTP mutation and genome shuffling of ABE fermentation symbiotic system for improvement of butanol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(5): 2189-2199
- [40] Pinel D, Colatriano D, Jiang H, et al. Deconstructing the genetic basis of spent sulphite liquor tolerance using deep sequencing of genome-shuffled yeast[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 53
- [41] Biot-Pelletier D, Martin VJJ. Evolutionary engineering by genome shuffling[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 3877-3887
- [42] Jetli KD, Gns RR, Garlapati D, et al. Improved ethanol productivity and ethanol tolerance through genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*[J]. International Microbiology, 2019, 22(2): 247-254
- [43] Li SB, Qian Y, Liang ZW, et al. Enhanced butanol production from cassava with *Clostridium acetobutylicum* by genome shuffling[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(4): 53
- [44] Chari R, Church GM. Beyond editing to writing large genomes[J]. Nature Reviews Genetics, 2017, 18(12): 749-760
- [45] Di Cristina M, Carruthers VB. New and emerging uses of CRISPR/Cas9 to genetically manipulate apicomplexan parasites[J]. Parasitology, 2018, 145(9): 1119-1126
- [46] Zhang GQ, Lin YP, Qi XN, et al. TALENs-assisted multiplex editing for accelerated genome evolution to improve yeast phenotypes[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(10): 1101-1111
- [47] Gan YM, Lin YP, Guo YF, et al. Metabolic and genomic characterisation of stress-tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains from TALENs-assisted multiplex editing[J]. FEMS Yeast Research, 2018, 18(5): foy045
- [48] Xu MM, Zhao JB, Yu L, et al. Engineering *Clostridium acetobutylicum* with a histidine kinase knockout for enhanced *n*-butanol tolerance and production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 1011-1022
- [49] Lian JZ, Mishra S, Zhao HM. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 85-108
- [50] Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant[J]. Science, 2014, 346(6205): 75-78
- [51] Zhang JZ, Yu L, Xu MM, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for *n*-butanol production from sugarcane juice[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4327-4337
- [52] Shaw AJ, Lam FH, Hamilton M, et al. Metabolic engineering of microbial competitive advantage for industrial fermentation processes[J]. Science, 2016, 353(6299): 583-586
- [53] Sun H, Jia HY, Feng XD, et al. Screening of heat-resistant device in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Biotechnology, 2015, 35(3): 75-83 (in Chinese)
孙欢, 贾海洋, 冯旭东, 等. 酿酒酵母耐热元器件的筛选[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(3): 75-83
- [54] Wen RC, Shen CR. Self-regulated 1-butanol production in *Escherichia coli* based on the endogenous fermentative control[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 267