

常压室温等离子体 (ARTP) 诱变选育高核酸酿酒酵母

李小坤, 王旺, 林影, 梁书利

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 核糖核酸(RNA)是一类非常重要的生物分子, 降解后得到的核苷酸、核苷及碱基具有广泛用途。酿酒酵母是目前生产 RNA 的主要食品级微生物。本研究采用常压室温等离子体 (ARTP) 技术进行酿酒酵母诱变育种, 利用氯化钾敏感性筛选, 多次反复诱变最终得到在以糖蜜为碳源的摇瓶试验中 RNA 含量为 112 mg-RNA/g-DCW, 提高了 39% 的突变菌株 Y17aM3。经过对 Y17aM3 培养条件优化后, 确定生产 RNA 最适接种量为 10%, 最适 pH 为 5.5, 最适温度为 26 °C, 且传代稳定性良好。研究发现在最佳培养条件下, 添加磷酸可使 Y17aM3 的 RNA 含量提高至 119 mg-RNA/g-DCW; 添加蛋白胨可使 Y17aM3 的 RNA 含量提高至 122 mg-RNA/g-DCW。上述结果不仅证明 ARTP 诱变育种方法突变效果显著, 可应用于工业微生物的选育, 而且有助于降低基于核苷酸的食品添加剂的生产成本。

关键词: 酿酒酵母; ARTP; 氯化钾; RNA; 诱变选育

文章编号: 1673-9078(2018)12-137-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.021

Screening of High-yield Nucleic Acid *Saccharomyces cerevisiae* Strain by Atmospheric and Room-temperature Plasma (ARTP) Technique

LI Xiao-kun, WANG Wang, LIN Ying, LIANG Shu-li

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: As an important biomolecule, ribonucleic acid (RNA) can be degraded into nucleotides, nucleosides and bases which exhibit a great potential in wide applications. *Saccharomyces cerevisiae* is widely used in food industry and generally regarded as safe are the preferred source of nucleic acid. In this study, the cells were repeatedly exposed under atmospheric and room temperature plasma (ARTP), with the aim to screen high-yield nucleic acid strains with potassium chloride sensitivity. A mutant strain Y17aM3 was successfully obtained. In shake flask test with molasses as carbon source, Y17aM3 contained 112 mg-RNA/g-DCW RNA, 39% higher than that of the untreated control. The optimal inoculation quantity of Y17aM3 to produce RNA was 10%. The optimal pH and temperature of fermentation was 5.5 and 26 °C, respectively. When culturing with optimal condition, it was found that adding phosphoric acid increased RNA content to 119 mg-RNA/g-DCW, and adding peptone increased RNA content to 122 mg-RNA/g-DCW. The results not only demonstrate the effectiveness of using ARTP mutation strategy for the industrial microorganism breeding, but also can greatly reduce the production cost of nucleotide-based food additives.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; ARTP; potassium chloride; RNA; mutation breeding

核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA)是一类重要的生物大分子, 它不仅在基因的表达和蛋白质的生物合成中起着关键的作用, 而且还能促进细胞的诸多生理功能^[1]。核糖核酸降解后得到的核苷酸、核苷及碱基用途广泛。5'-核苷酸可作为增味剂应用于食品工业, 而它主要来源是 RNA^[2,3]。目前, 绝大部分生产核糖核酸的企业是利用经诱变筛选后的产朊假丝酵母或热带假丝酵母等发酵提取得到核糖核酸^[4]。解脂假丝酵母

收稿日期: 2018-02-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (30471225); 中央高校基本科研业务费项目 (2017MS103)

作者简介: 李小坤 (1991-), 女, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 梁书利 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶学与酶工程

为念珠菌的一种, 念珠菌是引起全身性念珠菌感染的主要致病原, 至今为止仍不能完全说明假丝酵母对人畜健康无害。而酿酒酵母是最早人类认识和利用微生物之一, 几个世纪以来, 酿酒酵母被用于食品和酒精饮料生产^[5]。

应用常压室温等离子体 (ARTP) 技术进行诱变育种^[6]。等离子体 (Plasma) 是与物质的固态、液态和气态并存的物质第四态, 是一种正离子和电子密度大致相等的电离气体, 具有导电、发光、化学性质活泼以及分布广等特点^[7]。均匀的等离子体射流作用于细胞, 可引发种类丰富的 DNA 损伤, 获得大量突变库^[8]。到目前为止, ARTP 诱变育种已经成功应用于包括细菌、真菌、微藻在内的多种微生物, 并且突

变率和正突变率均较高, 突变株遗传稳定性好等诸多优点^[9]。

本研究以从环境中分离得到的菌株 Y17 作为出发菌株, 对其进行反复多次 ARTP 等离子诱变, 利用氯化钾敏感筛选得到核酸含量提高的突变菌株 Y17aM3, 然后对突变菌株进行生理生化特性分析, 并进行发酵培养条件优化及传代稳定性分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

野生酿酒酵母酿酒酵母 Y17 均由广东江门生物技术开发中心有限公司提供。

1.1.2 培养基与溶液

麦芽汁培养基: 购买于广东环凯微生物科技有限公司, 称取 130.1 g 产品溶解于 1000 mL 蒸馏水中, 搅拌至完全溶解, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

麦氏培养基: 葡萄糖 0.1%、KCl 0.18%、NaAc 0.82%、酵母浸膏 0.25%、琼脂 2%, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

碳源同化试验基础培养基: (NH₄)₂SO₄ 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、CaCl₂ 0.01%、NaCl 0.01%、酵母浸膏 0.02%、糖或其它碳源 2%, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

氮源同化试验基础培养基: 葡萄糖 2%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、酵母浸膏 0.02%, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

糖蜜酸化液: 80 g 糖蜜加 120 mL 蒸馏水搅拌均匀, 用硫酸调节 pH 4.0~4.3, 90~95 °C 水浴并不断搅拌 15 min, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清。

糖蜜培养基: 上述糖蜜酸化液加水至 1000 mL, 加 3% 营养液并调 pH 至 4.8, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

营养液: 85% 磷酸 4.55%、硫酸铵 25%、尿素 12.5%、硫酸镁 1.25%。

1.2 仪器与设备

购于江苏无锡源清天木生物科技有限公司的 ARTP 诱变育种仪; UV-5200 型紫外可见分光光度计。

1.3 实验方法

1.3.1 培养条件

1.3.1.1 菌种活化

用无菌牙签从保种管中蘸取菌液于麦芽汁平板上

划线, 在 30 °C 培养箱培养 2~3 d。

1.3.1.2 摇瓶种子培养

从麦芽汁平板上挑取单菌落接种于装有 10 mL 麦芽汁培养基的 50 mL 三角瓶中, 在柜式旋转摇床上 30 °C, 250 r/min 培养 24 h。

1.3.1.3 摇瓶发酵培养

按 5% 的接种量将种子液转接于装有 100 mL 糖蜜培养基的 500 mL 三角瓶中, 在柜式旋转摇床上 30 °C, 250 r/min 培养 18 h。

1.3.2 RNA 含量测定方法

收集并洗净发酵培养后的酿酒酵母, 称取一定重量菌体, 采用高氯酸法^[2,10]测定 RNA 含量。RNA 含量的计算公式如下:

$$RNA \text{ 含量 (mg-RNA/g-DCW)} = \frac{0.03365 \times 5 \times OD_{260}}{W_{\text{干重}}}$$

式中: OD₂₆₀ 是紫外可见分光光度计于 260 nm 测得的吸光值, W_{干重} 是样品的干重。

1.3.3 酿酒酵母单倍体分离

酿酒酵母在麦芽汁培养基中经二级活化后于麦氏培养基平板上划线, 28 °C 培养。每天进行子囊孢子染色并镜检, 观察酿酒酵母产孢情况^[11]。产孢率较高时 (5~7 d 左右), 采用文献^[12]进行酿酒酵母单倍体分离。将单倍体分离后得到的菌液适当稀释, 涂布于麦芽汁培养基平板上, 28 °C 培养 2~3 d, 最后 PCR 鉴定单倍体菌株^[13]。

1.3.4 ARTP 诱变育种

参考文献^[14,15]进行 ARTP 诱变育种, 分别设定了菌悬液诱变的处理时间为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 s, 统计不同处理时间内菌株的致死率。致死率计算公式如下:

$$\text{致死率 (\%)} = \frac{T - A}{T}$$

式中: T 是样品在未经 ARTP 处理时的总菌落数, A 是样品在 ARTP 处理后存活的菌落数。

1.3.5 筛选方法

采用 KCl 敏感筛选高核酸突变菌株^[16]。诱变处理后培养 2~3 d, 影印到含一定浓度 KCl 的麦芽汁培养基平板, 筛选出对 KCl 敏感的突变株, 摇瓶发酵培养并测定 RNA 含量。

1.3.6 生理生化特性

参考文献^[17]进行酿酒酵母培养特征和细胞形态观察、碳源同化试验、氮源同化试验、耐糖性、耐酸性以及耐盐性等一系列生理生化特性分析。

1.3.7 发酵培养优化

参考文献^[18]进行酿酒酵母培养条件和培养基成

分进行优化,包括接种量、初始 pH、培养温度、氮源和无机盐,确定最适的培养条件以及培养基成分。

1.3.8 传代试验

参照文献^[19]进行传代试验,将酿酒酵母突变菌株 Y17aM3 连续传代培养至 10 代。

1.3.9 数据统计分析

对研究过程中所得到的数据进行统计分析,本研究所采用的统计量为标准差^[20]。标准差是各数据偏离平均数的距离的平均数,是离均差平方和平均后的方根,用公式表示为:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

式中:数值 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_N$ (皆为实数),其算术平均值为 μ ,标准差为 σ 。

2 结果与讨论

2.1 酿酒酵母单倍体分离

用光学显微镜观察酿酒酵母产孢情况结果如图 1,图中绿色的为子囊孢子,红色的为营养细胞。由图可看出细胞形成子囊孢子的数量并不都相同,其中形成 2 个和 3 个子囊孢子相对较多,能形成 4 个子囊孢子非常少。

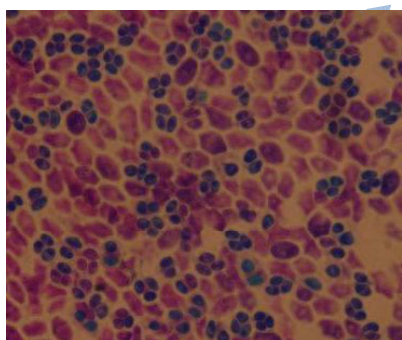


图 1 酿酒酵母 Y17 的子囊孢子

Fig.1 The ascospores of *Saccharomyces cerevisiae* Y17

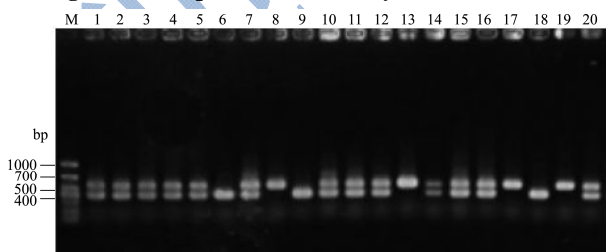


图 2 酿酒酵母 Y17 单倍体配型 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of the haploid types of *Saccharomyces cerevisiae* Y17 by PCR

酿酒酵母的交配型是由位于酵母染色体 III 上 MAT 座控制的, MAT 座上的两个等位基因 MATa 和 MAT α 大约相差 100 bp^[21]。PCR 产物仅有一条 544 bp

条带的为 a 型单倍体,PCR 产物仅有一条 404 bp 条带的为 α 型单倍体,两条产物都有的为二倍体^[22]。如图 2,得到 4 株 Y17a 型单倍体,3 株 Y17 α 型单倍体。两种交配型单倍体分别挑取 3 株与原始出发菌株 Y17 同时培养测定 RNA 含量,结果如图 3。两种配型单倍体 RNA 含量分配不均,a 型单倍体 RNA 含量比 α 型单倍体约高 50%。

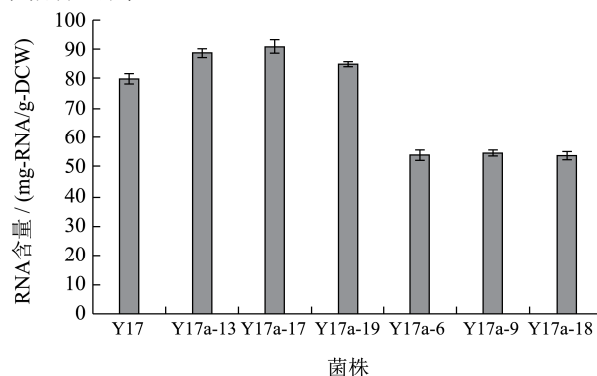


图 3 酿酒酵母 Y17 单倍体 RNA 含量

Fig.3 The RNA content of haploid of *Saccharomyces cerevisiae* Y17

2.2 ARTP 诱变育种

以 RNA 含量最高的 a 型单倍体为出发菌株进行 ARTP 诱变,致死率和诱变处理时间关系如图 4。选择诱变效应最强即致死率 90%~95%的 55 s 进行反复诱变^[23],最终得到一株 RNA 含量比原始出发菌株 Y17 高 39%突变菌株 Y17aM3 (如图 5)。将 Y17aM3 在糖蜜培养基中培养,从第 6 h 开始每隔 2 h 取一次样,得到 Y17aM3 生长及产 RNA 曲线如图 6。由图 6 可知,发酵培养至 12 h 之前,酵母生长和 RNA 含量都随着培养时间增加而增加;12~18 h 酵母生长处于稳定期,而 RNA 含量在 18 h 时最高;18 h 之后,酵母生长处于衰亡期, RNA 含量随着培养时间增加而降低。

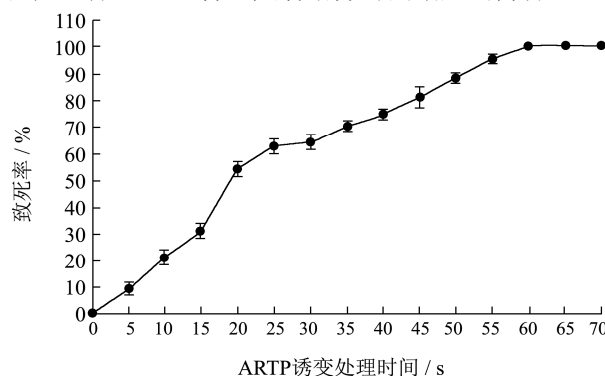


图 4 致死率和诱变处理时间关系

Fig.4 The relationship between lethality rate and time of mutagenesis

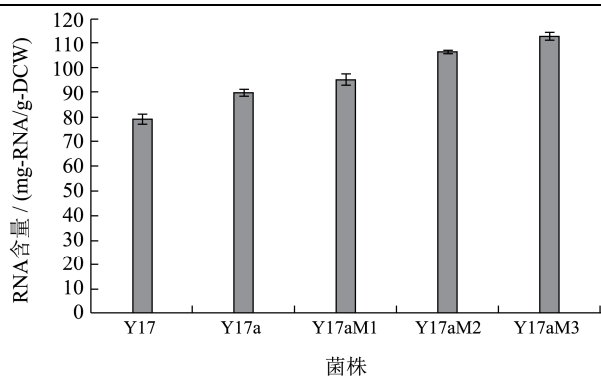


图5 突变菌株 RNA 含量

Fig.5 The RNA content of Mutant strains

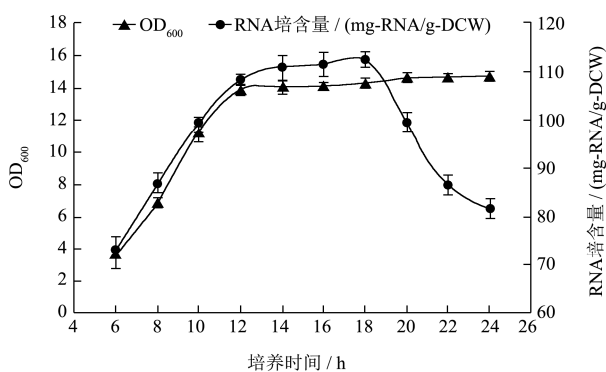


图6 突变菌株 Y17aM3 生长及生产 RNA 曲线

Fig.6 The growth and RNA production of mutant strain

Y17aM3

2.3 酿酒酵母生理生化实验

2.3.1 形态特征

将 Y17aM3 和 Y17 进行培养并诱导产孢, 观察菌

表1 酿酒酵母形态特征

Table 1 Morphological characteristics of Y17aM3

菌株	菌落	细胞	子囊孢子	无性繁殖方式	液体培养
Y17	凸起, 乳白色, 表面湿润, 易挑取, 有光泽, 边缘整齐	柠檬形	卵圆形	出芽生殖	菌体白色沉淀于底部
Y17aM3	凸起, 乳白色, 表面湿润, 易挑取, 有光泽, 边缘整齐	柠檬形	-	出芽生殖	菌体白色沉淀于底部

表2 酿酒酵母糖发酵结果

Table 2 The results of *Saccharomyces cerevisiae* to ferment sugars

菌株	葡萄糖	麦芽糖	果糖	蔗糖	糊精	木糖	木聚糖	乳糖
Y17	+	+	+	+	-	-	-	-
Y17aM3	+	+	+	+	-	-	-	-

菌株	半乳糖	可溶性淀粉	鼠李糖	棉子糖	纤维二糖	甘露醇	菊糖	木糖醇
Y17	+	+	-	+	-	-	-	-
Y17aM3	+	+	-	+	-	-	-	-

2.3.2 糖发酵试验

对 Y17aM3 和 Y17 进行糖发酵试验, Y17W 和 Y17aM3 均能够发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、

落形态和培养特征, 并在油镜下观察细胞形态和产孢情况。结果如图7和表1。Y17aM3和Y17细胞形态均为柠檬形, 菌落均为乳白色、有光泽、边缘整齐, 无性繁殖方式均为出芽生殖, 液体培养均产生白色沉淀。Y17aM3为单倍体, 不能产生子囊孢子。Y17aM3的形态特征与Y17一致, 符合酿酒酵母基本形态特征。

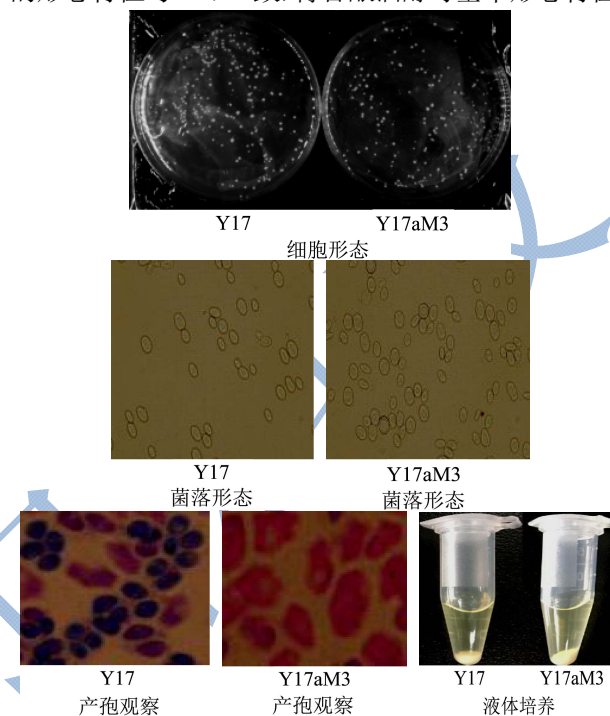


图7 酿酒酵母的形态特征观察

Fig.7 Observation on the morphological characteristics of

Saccharomyces cerevisiae

半乳糖、可溶性淀粉、棉子糖, 均不能够发酵糊精、木糖、木聚糖、乳糖、鼠李糖、纤维二糖、甘露醇、菊糖、木糖醇, 与菌种鉴定手册中酿酒酵母糖类发酵

结果一致。

2.3.3 碳源同化试验

对 Y17aM3 和 Y17 进行碳源同化试验, 结果如图 8。对比了两株菌同化碳源的能力, 发现 Y17aM3 对葡萄糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉、菊糖的同化能力稍有降低, 而几乎丧失了对半乳糖的同化能力, 但对糊精特别是乳糖的同化能力提高了, 而 Y17 几乎没有同化乳糖的能力。

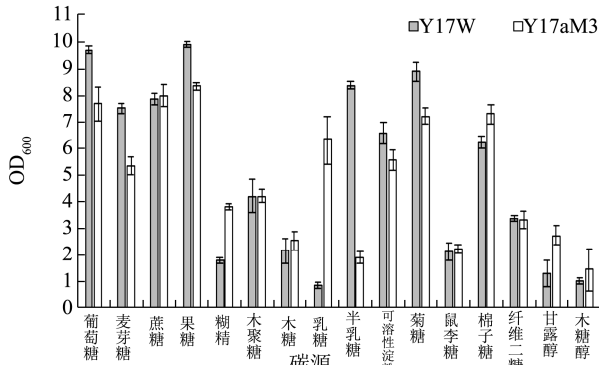


图 8 Y17 和 Y17aM3 碳源同化实验结果

Fig.8 The results of carbon source assimilation of Y17 and Y17aM3

2.3.4 氮源同化试验

对 Y17aM3 和 Y17 进行氮源同化试验, 结果如图 9。Y17aM3 除了对大豆蛋白胨的同化能力提高了, 对其余几种氮源同化能力与 Y17 出发菌大致相同。因此在糖蜜培养基中加入大豆蛋白胨可以促进 Y17aM3 的生长。

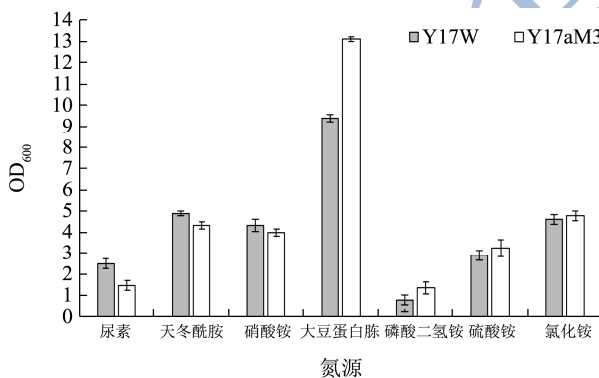


图 9 Y17 和 Y17aM3 氮源同化实验结果

Fig.9 The results of nitrogen source assimilation of Y17 and Y17aM3

2.3.5 耐糖性

葡萄糖对 Y17aM3 生长的影响结果如图 10-a。在低浓度的葡萄糖中都能良好生长, 当葡萄糖浓度>5% 时, Y17aM3 的生长随葡萄糖浓度的增加而减慢; 当葡萄糖浓度为 60% 时, Y17aM3 的生长完全被抑制。

2.3.6 耐酸性

麦芽汁培养基初始 pH 对 Y17aM3 生长的影响结

果如图 10-b。当 pH 为 3.5~5.5 时, Y17aM3 的生长随初始 pH 的增大而逐渐加快; 当 pH=5.5 时, Y17aM3 生长最快; 当 pH>5.5 时, Y17aM3 的生长明显减慢。因此, Y17aM3 的最适生长 pH 为 5.5。

2.3.7 耐糖性

培养基中盐浓度的变化可以影响酵母的好氧量、生长速度以及发酵率等方面的生理功能。麦芽汁培养基中 KCl 对 Y17aM3 生长的影响结果如图 10-c。随着 KCl 浓度的增加, Y17aM3 的生长受到不同程度的抑制, 当 KCl 浓度达 160 g/L 时, Y17aM3 基本不生长。

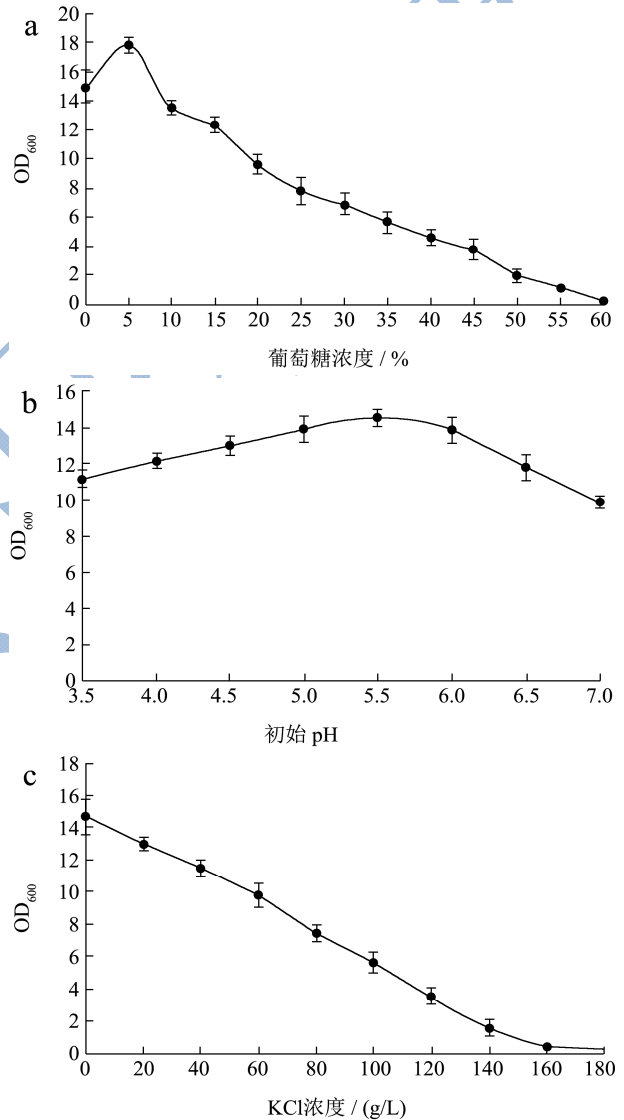


图 10 葡萄糖、初始 pH 和 KCl 对 Y17aM3 生长的影响

Fig.10 The effect of glucose, initial pH and KCl on the growth of Y17aM3

2.4 发酵培养优化

2.4.1 最适接种量确定

研究了接种量对 Y17aM3 生长及生产 RNA 的影响, 结果如图 11。随着接种量逐渐增加, Y17aM3 生

产RNA含量逐渐提高,大于10%时Y17aM3生产RNA含量逐渐降低。因此最适接种量为10%,此时Y17aM3生长OD₆₀₀最高为15, RNA产量最高达到112 mg-RNA/g-DCW。

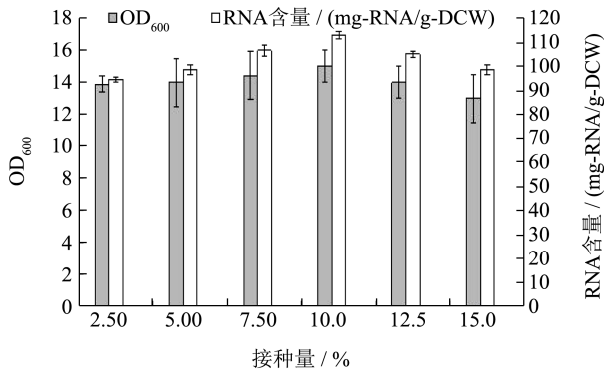


图11 接种量对Y17aM3生长及生产RNA影响

Fig.11 The effect of inoculation on the growth and RNA production of Y17aM3

2.4.2 最适初始pH确定

pH对酿酒酵母生长代谢有重要影响作用,研究了pH对Y17aM3生长及生产RNA的影响,结果如图12。初始pH为3.5~5.5时,Y17aM3随着初始pH升高而生长加快及RNA产量增加,初始pH为5.5~7时,Y17aM3随着初始pH升高而生长减慢及RNA产量减少。因此,最适初始pH为5.5,此时Y17aM3生长OD₆₀₀最高为14, RNA产量最高为112 mg-RNA/g-DCW。

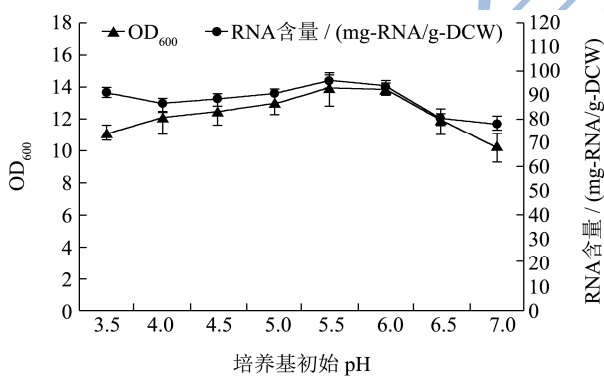


图12 初始pH对Y17aM3生长及生产RNA影响

Fig.12 The effect of initial pH on the growth and RNA production of Y17aM3

2.4.3 最适温度确定

适合的温度有利于酿酒酵母更好的生长代谢,研究了温度对Y17aM3生长及生产RNA的影响,结果如图13。Y17aM3随着培养温度升高而生长减慢及RNA产量减少,因此低温更有利于Y17aM3生长和积累RNA。最适温度为26℃,此时Y17aM3生长OD₆₀₀最高为14.5, RNA含量最高为115 mg-RNA/g-DCW,比在30℃条件下提高了3 mg-RNA/g-DCW。

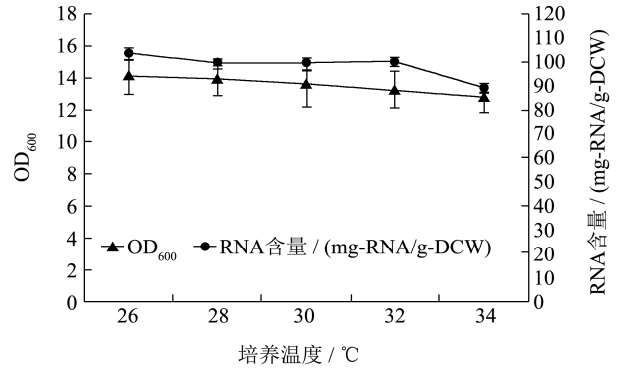


图13 培养温度对Y17aM3生长及生产RNA影响

Fig.13 The effect of culture temperature on the growth and RNA production of Y17aM3

2.4.4 氮源对Y17aM3生长和生产RNA的影响

氮源是微生物生长过程中不可或缺的营养元素^[24],其主要功能是合成含氮物质。研究几种氮源对Y17aM3生长及生产RNA的影响,结果如图14。添加大豆粉能明显促进Y17aM3的生长,生长OD₆₀₀由14提高至17,但是对酵母生产RNA没有明显促进作用;添加酵母提取物也能明显促进Y17aM3的生长,生长OD₆₀₀由14提高至17,且RNA含量提高至119 mg-RNA/g-DCW,提高了7 mg-RNA/g-DCW;其中蛋白胨对Y17aM3的生长和生产RNA促进作用最明显,生长OD₆₀₀由14提高至17, RNA含量提高至122 mg-RNA/g-DCW,提高了10 mg-RNA/g-DCW。

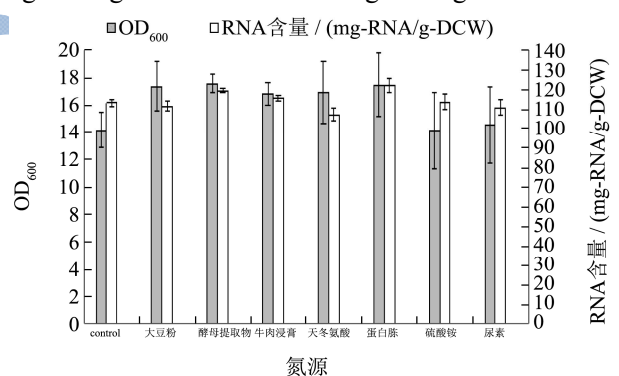


图14 氮源对Y17aM3生长及生产RNA影响

Fig.14 The effect of nitrogen source on the growth and RNA production of Y17aM3

2.4.5 无机盐对Y17aM3生长和生产RNA的影响

无机盐是微生物生长不可缺少的营养物质,对微生物合成RNA有重要意义^[25]。研究了几种无机盐对Y17aM3生长及生产RNA的影响,结果如图15。只有磷酸对Y17aM3生产RNA促进作用最明显, RNA含量提高至119 mg-RNA/g-DCW,提高了7 mg-RNA/g-DCW,而对Y17aM3生长没有促进作用亦

没有抑制作用。

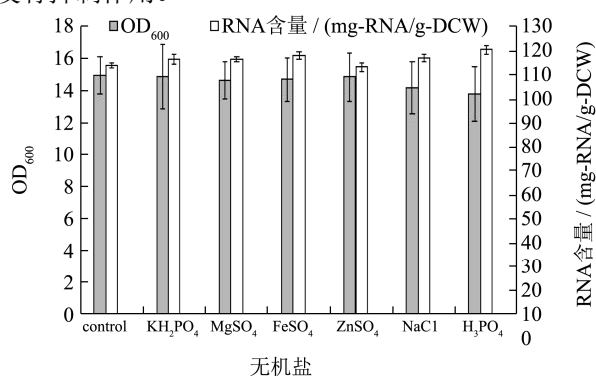


图 15 无机盐对 Y17aM3 生长及生产 RNA 影响

Fig.15 The effect of inorganic salt on the growth and RNA production of Y17aM3

2.5 酿酒酵母突变菌株 Y17aM3 的传代稳定性分析

性分析

应用物理化学方法进行菌种选育得到的突变菌株包含很多隐性突变，且突变性状不稳定容易发生回复突变，因此对筛选得到的突变菌株进行传代试验验证传代稳定性是非常必要的^[19]。将突变菌 Y17aM3 连续传代培养至 10 代，培养并测定 RNA 含量，结果如图 16。传代至 10 代，生长 OD₆₀₀ 稳定在 14.6~15.0 之间，RNA 含量稳定在 109~112 mg-RNA/g-DCW 之间，变化幅度非常小，因此说明经过 ARTP 诱变得到的突变菌 Y17aM3 传代稳定性良好，不易发生回复突变。

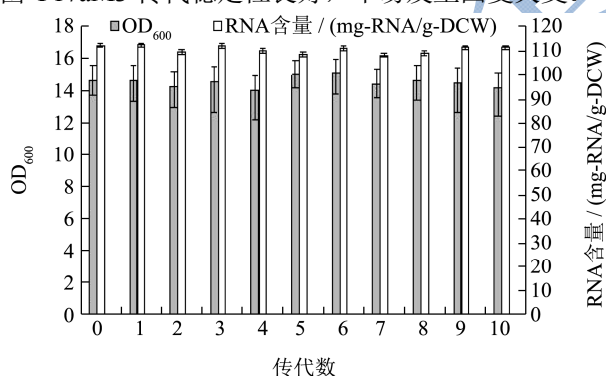


图 16 Y17aM3 传代及其生长和 RNA 含量

Fig.16 The growth and RNA content of Y17aM3 passages

3 结论

由于 ARTP 诱变对生物的遗传物质损伤效果明显、损伤机制丰富，尤其是对于染色体等真核生物的遗传物质均有很强的损伤效果^[26]。本研究通过 ARTP 诱变选育获得了在以糖蜜为碳源的摇瓶试验中 RNA 含量比原始出发菌株 Y17 提高了 39% 突变菌 Y17aM3，经过发酵培养条件优化后，RNA 含量最高

可达 122 mg-RNA/g-DCW，达到目前文献报道的最高水平^[2]。要实现工业大规模生产，还需要进一步改进，比如发酵罐流加条件的细化及核酸代谢动力学的建立等。酿酒酵母 RNA 含量的大幅度提高，将大大降低食品工业中添加剂的生产成本以及增加经济效益。在研究过程中发现，与传统的诱变方法相比，ARTP 能够有效造成 DNA 多样性的损伤，突变率高，并易获得遗传稳定性良好的突变株，将为工业微生物的系统改造提供仪器和方法平台，有望成为现代生物技术的通用工具。

参考文献

- [1] 沈浥. 调味品中呈味核苷酸的研究进展和我国标准化现状 [J]. 中国调味品, 2017, 42(1): 177-180
SHEN Yi. Research progress of the flavor nucleotides in condiment and standardization status in China [J]. China Condiment, 2017, 42(1): 177-180
- [2] Sasano Y, Kariya T, Usugi S, et al. Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content by harnessing essential ribosomal RNA transcription regulator [J]. Amb Express, 2017, 7(1): 32
- [3] 俞灿, 郑国斌, 姚娟, 等. 富含核糖核酸酿酒酵母的选育及其高密度发酵工艺 [J]. 中国酿造, 2016, 35(12): 66-71
YU Can, ZHENG Guo-bin, YAO Juan, et al. Breeding and high density fermentation technology of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content [J]. China Brewing, 2016, 35(12): 66-71
- [4] 任华景. 核糖核酸高产菌株选育及其应用研究 [D]. 南京工业大学, 2011
REN Hua-jing. Breeding high-yield strain for ribonucleic acid production its application [D]. Nanjing University of Technology, 2011
- [5] Rollero S, Bloem A, Camarasa C, et al. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(5): 2291
- [6] 张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展 [J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684
ZHANG Xue, ZHANG Xiao-fei, WANG Li-yan, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications [J]. CIESC Journal, 2014, 65(7): 2676-2684
- [7] Dey A, Chronos A, Braithwaite N S J, et al. Plasma engineering of graphene [J]. Applied Physics Reviews, 2016,

- 3(2): 666
- [8] Zhang X, Zhang C, Zhou Q Q, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(13): 5639
- [9] 吴亦楠,邢新会,张翀,等. ARTP 生物育种技术与装备研发及其产业化发展[J]. *生物产业技术*, 2017, 1: 37-45
WU Yi-nan, XING Xin-hui, ZHANG Chong, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma (ARTP) biobreeding technology, instrumentation and its industrialization [J]. *Biotechnology & Business*, 2017, 1: 37-45
- [10] Herbert D, Phipps P J, Strange R E. Chapter III chemical analysis of microbial cells [J]. *Methods in Microbiology*, 1971, 5: 209-344
- [11] 赵海泉. 微生物学实验指导[M]. 中国农业大学出版社, 2014
ZHAO Hai-quan. *Experiment and guide for microbiology* [M]. China Agricultural University Press, 2014
- [12] 杨瑞娟. 高产酒率酿酒酵母单倍体的分离与杂交育种[D]. 浙江: 浙江大学, 2007
YANG Rui-juan. Study on separation of haploids from diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae* and hybridization breeding of strains with high ethanol production [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2007
- [13] 侯丽华. 酿酒酵母遗传操作方法研究及乙醇发酵高产菌株构建[D]. 天津: 天津大学, 2007
HOU Li-hua. Development of new methods for genetic manipulation in *Saccharomyces cerevisiae* and construction of strains with improved ethanol yield [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007
- [14] 赵宇, 刘珊珊, 陈叶福, 等. ARTP 诱变以及基因组重排筛选具有耐高温性能的酿酒酵母[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(11): 37-41
ZHAO Yu, LIU Shan-shan, CHEN Ye-fu, et al. Screening the *Saccharomyces Cerevisiae* with high temperature tolerance by ARTP mutagenesis and genome shuffling [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2017, 33(11): 37-41
- [15] 李英英, 杭海峰, 庄英萍, 等. 常压常温等离子体(ARTP)诱变选育头孢霉高产菌[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(11): 945-950
LI Ying-ying, HANG Hai-feng, ZHUANG Ying-ping, et al. High throughput screening of high-yield cephalosporin C producing strain by mutagenesis using atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(11): 945-950
- [16] 杨依顺, 丁玥, 曹静, 等. 酿酒酵母发酵制备 RNA 的研究[J]. *药物生物技术*, 2013, 4: 310-313
YANG Yi-shun, DING Yue, CAO Jing, et al. Studies on the preparation of RNA from *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 4: 310-313
- [17] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification, 3rd edition [J]. *Pediatric Dermatology*, 2001, 18(6): 547-547
- [18] 陈文明, 郑国斌, 姚娟, 等. 高产 RNA 酿酒酵母培养条件及发酵培养基的优化[J]. *中国调味品*, 2015, 40(11): 28-32
CHEN Wen-ming, ZHENG Guo-bin, YAO Juan, et al. Optimization of culture conditions and fermentation medium of *Saccharomyces cerevisiae* of high-yield RNA [J]. *China Condiment*, 2015, 40(11): 28-32
- [19] 封晓霞, 王雅琴. 复合诱变和原生质体融合选育 S-腺苷甲硫氨酸酿酒酵母高产菌株[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2011, 38(6): 87-92
FENG Xiao-xia, WANG Ya-qin. Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* giving an enhanced yield of S-adenosyl-L-methionine by composite mutagenesis and protoplast fusion [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Nature Science)*, 2011, 38(6): 87-92
- [20] 赵文若, 李新江, 包岩. 生物统计学[M]. 吉林大学出版社, 2016
ZHAO Wen-ruo, LI Xin-jiang, BAO Yan. *Biostatistics* [M]. Jilin University Press, 2016
- [21] Kim M. Determination of mutation rates of mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Brandeis University, 2009
- [22] Jones E W, Pringle J R, Broach J R, et al. The Molecular and cellular biology of the yeast *saccharomyces* [M]. Cole Spring Harbor Laboratory Press, 1992: 340-340
- [23] Wang L, Chen X, Wu G, et al. Improved ϵ -poly-L-lysine production of *Streptomyces*, sp. FEEL-1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and streptomycin resistance screening [J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(4): 2009-2017
- [24] Vankudoth K R, Shilpa P, Rao K N, et al. Influence of carbon and nitrogen source on growth, don and niv production by two species of *Fusarium* isolated from finger millets [J]. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2015, 7(3): 136-139
- [25] Vranova V, Rejsek K, Formanek P. Proteolytic activity in soil: A review [J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 70: 23-32

[26] Zhang X, Zhang C, Zhou Q Q, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(13): 5639

