

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-005

等离子体微生物育种技术在生物制造中的应用进展

钟奶才^{1,2}, 陈缘¹, 潘文锋¹, 苏小凤¹, 廖景文¹, 翟英雷², 钟近艺^{1,3}

(¹ 广州先进技术研究所, 广东 广州 511458; ² 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 117004; ³ 国家生物制造产业创新中心, 广东 深圳 518107)

摘要: 可持续绿色生物制造是各国关注的战略重点, 但微生物性能仍是制约生物制造产业化的瓶颈之一。传统育种方法常面临育种周期长、效率低、成本高等问题, 难以满足工业化生产对高效、稳定生产菌株的需求。低温等离子体技术作为一种高效、绿色环保的微生物育种方法, 可通过刺激突变位点、提升突变效率、扩展突变范围, 有效提高目标菌株性能和产品产量, 为工业微生物改良提供重要助力。本文综述了等离子体诱变技术的理论基础、三种等离子体源 (ARTP、DBD、CD) 的技术特点、等离子体诱变作用机制及其与高通量筛选、传统诱变、理性育种等技术的联用进展, 归纳出生物酶、有机酸、生物能源、生物材料等生物制造领域的典型等离子体育种案例, 为相关领域的研究和产业化提供参考。未来需要开发基于空气源的新型等离子体发生器, 在小型化的基础上实现低成本、低能耗、低温升; 与高通量筛选和 AI 等技术相融合进行菌株精准诱变和高效育种, 实现技术瓶颈突破, 最终推动生物制造产业升级。

关键词: 生物制造; 工业微生物; 等离子体诱变技术; 筛选; 诱变机制; 生物材料

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Application of plasma microbial breeding technology in biofabrication

ZHONG Naicai^{1,2}, CHEN Yuan¹, PAN Wenfeng¹, SU Xiaofeng¹, LIAO Jingwen¹, ZHAI Yinglei², ZHONG Jinyi²

(¹Guangzhou Institute of Advanced Technology, Guangzhou 511458, Guangdong, China; ²Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 117004, Liaoning, China; ³National Innovation Center for Bio-Manufacturing Industry, Shenzhen 518107, Guangdong, China)

Abstract: Sustainable and green biomanufacturing has emerged as a strategic priority for nations globally; however, microbial performance remains one of the key constraints hindering the industrialization of biomanufacturing. Traditional breeding methods often face challenges such as long breeding cycles, low efficiency, and high costs, making it difficult to meet the demands for highly efficient and stable microbial strains in industrial-scale production. Low-temperature plasma technology, as an efficient and environmentally friendly method for microbial breeding, can stimulate mutation hotspots, enhance mutation efficiency, and expand mutation ranges, effectively improving the

收稿日期: 2025-01-20 修回日期: 2025-03-05

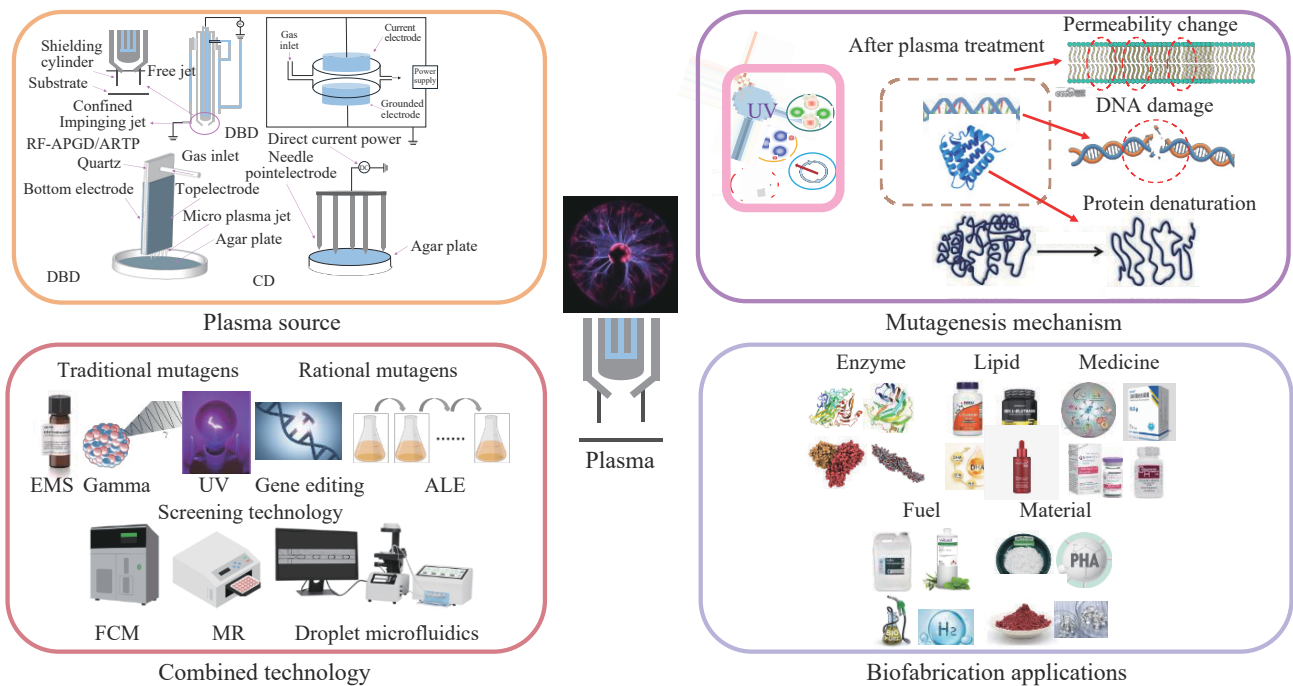
基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC2604700)

引用本文: 钟奶才, 陈缘, 潘文锋, 苏小凤, 廖景文, 翟英雷, 钟近艺. 等离子体微生物育种技术在生物制造中的应用进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(4): 789-805

Citation: ZHONG Naicai, CHEN Yuan, PAN Wenfeng, SU Xiaofeng, LIAO Jingwen, ZHAI Yinglei, ZHONG Jinyi. Application of plasma microbial breeding technology in biofabrication[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(4): 789-805

performance of target strains and product yields. By combining plasma mutagenesis's advanced capabilities with other techniques, significant improvements in the performance and productivity of microbial strains can be achieved, thus driving the commercialization of sustainable bioprocesses. This review outlines the theoretical basis of plasma mutagenesis technology, the technical characteristics of three plasma sources (ARTP, DBD, and CD), the mechanisms of plasma mutagenesis, and the progress of combining this technology with high-throughput screening, classic mutagenesis, and rational breeding methods. Furthermore, it summarizes typical plasma breeding cases in biomanufacturing fields such as bio-enzyme, organic acids, bioenergy, and biomaterials. These insights offer important references for research and industrialization in related fields. By combining plasma mutagenesis's advanced capabilities with other techniques, significant improvements in the performance and productivity of microbial strains can be achieved, thus driving the commercialization of sustainable bioprocesses. The cases discussed in this review provide a practical understanding of how plasma mutagenesis can be applied to optimize microbial strains for industrial-scale production of valuable bioproducts, providing a reference for research and industrialization in related fields. In the future, it is essential to develop novel plasma generators based on air source, which, while being miniaturized, achieve low cost, low energy consumption, and minimal temperature rise. Integrating them with high-throughput screening and AI technologies will enable precise microbial mutagenesis and efficient strain breeding, thereby overcoming technical bottlenecks and ultimately advancing the biomanufacturing industry.

Application of plasma microbial breeding technology in Biofabrication



Keywords: biological manufacturing; industrial microbiology; plasma mutagenesis technology; screening; mutagenesis mechanism; biological materials

全球气候变化愈发严重、自然危害频发，环境危机、能源短缺等问题日益凸显，以化石资源为基础的传统工业制造产业链向可持续绿色制造

转型已迫在眉睫。利用微生物或生物酶生产化学品、燃料、材料的可持续生物制造技术广受各国重视，美国2022年启动《国家生物技术和生物制

造计划》，我国同年发布的《“十四五”生物经济发展规划》中也将生物制造列为重要内容。但目前生物制造仍存在微生物特异性较差、产量低、性状不良等许多实际问题，需要选育高性能工业微生物助力产业化进程^[1]。

当前主流的微生物育种包括诱变育种、基因工程育种和定向进化育种等，这些方法在育种策略和应用上各具特点，且可以根据具体需求互为补充^[2]。其中，诱变育种主要是通过物理辐射、化学试剂等手段诱导损伤菌株DNA引起SOS修复机制使菌株基因发生突变，改良菌株性能，能显著提高微生物的遗传多样性和经济价值^[3-5]。但上述两种手段都存在一定问题：化学诱变剂毒性较高，有致癌风险，物理诱变成本高昂且突变率和突变类型较为有限^[6]。基于基因编辑的生物诱变技术（如CRISPR-Cas9系统）已通过靶向DNA切割与修复机制实现菌株性能的精准改良，其诱变效率较传统方法提升3~5倍，已在多个领域应用，但仍然受到脱靶效应与精准性局限以及操作复杂和伦理问题等问题困扰^[7]（图1）。这些局限性促使研究者寻找更加高效、绿色且具备较高突变率的优化方案。

室温下能产生大量高能活性粒子（RONS）的低温等离子体被认为是一种有前景的物理诱变方法^[8]。等离子体也称为物质的第四态，是气体被

高压电激发后部分电离或完全电离时的状态，主要由处于中性、电离和激发态的自由电子、原子和分子等成分组成^[9-11]，可有效作用于微生物的DNA分子，导致DNA链断裂或碱基损伤引发基因突变（图2）。邢新会等^[12]研发了氦气为工作气体的常压室温等离子体（ARTP）^[13]，证明使用氦气等离子体能诱导产生更高的DNA损伤能力、突变率更高，可有效地在其他方法难以靶向的基因中产生突变。该方法操作简便，也更绿色环保^[14-15]。澳大利亚的Plasma Leap公司和美国的Koh团队都基于阵列针尖放电冷等离子体原理研发了诱变装置^[16-17]。

本文通过总结等离子体微生物育种技术的诱变理论，综述用于微生物育种的不同等离子体发生源的技术特点，等离子体诱变过程中引发的生物效应，以及在生物医药、生物化工、生物能源、可降解生物材料等相关领域的典型应用案例，分析等离子体诱变育种技术在应用领域存在的优势和问题，以为促进等离子体诱变育种技术的应用研究提供基本参考。

1 微生物育种等离子体源

微生物育种使用的等离子体主要是能在室温状态下产生冷等离子体，其根据放电气体、放电

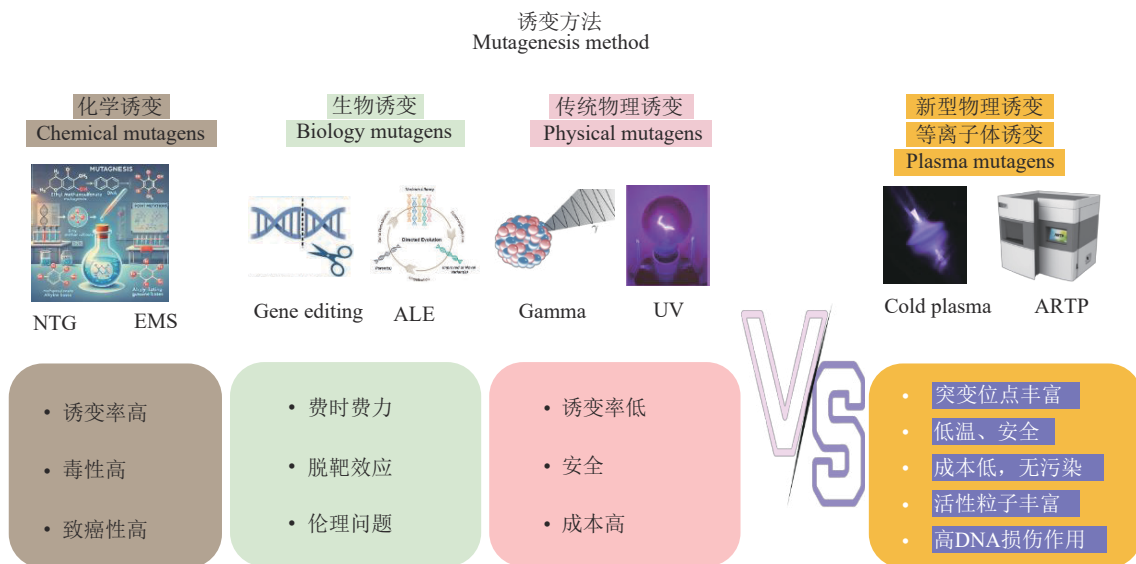


图1 不同随机诱变方法差异

Fig. 1 Differences between various random mutagenesis methods

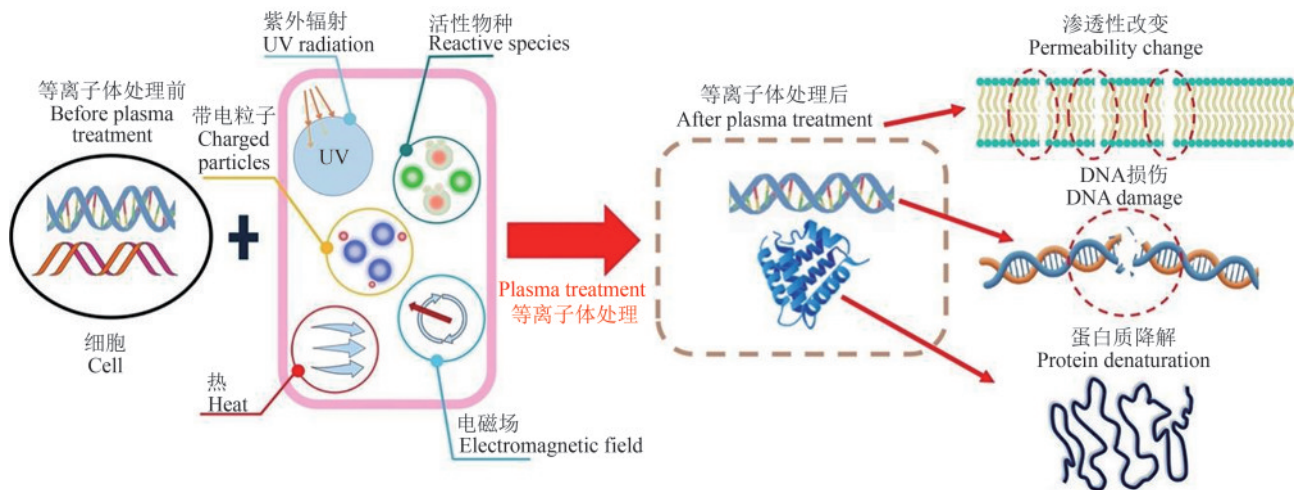


图2 等离子体诱变作用过程示意图

Fig. 2 Schematic diagram of plasma mutagenesis process

方式等的不同,大致分为大气压射频辉光放电等离子体(又称常压室温等离子体,atmospheric and room temperature plasma,ARTP)、介质阻挡放电等离子体(dielectric barrier discharge,DBD)和电晕放电等离子体(corona discharge,CD)等三种等离子体^[18-21](图3)。三者因放电机制与特性差异,在诱变效率、成本及适用性上各具优劣。

现在研究中使用最多的是基于大气压射频辉光放电等离子体的ARTP等离子体育种装置^[18,22]。该装置是一种典型的同轴等离子体发生器,由两个同轴水冷铜电极组成,中心电极由RF电源供电。气体在进入射频电场时,电子被加速,从而产生高能粒子;此种等离子体的最大优势在于所采用放电气体为氦气,而氦气作为最小的单原子分子,放电时所产生的活性粒子的能量级别最高,所以能够引起的DNA损伤强度也最高;其射流温度低,可控制在室温范围(25~40℃),活性物质浓度高且种类丰富,诱变效率显著。例如对阿维链霉菌的诱变总突变率达30%以上,正突变率约21%^[23]。但ARTP的120~140W的高功率运行会导致显著发热,因此需配备冷却系统,增加了运行成本。

介质阻挡放电等离子体(DBD)是大气压或高于大气压条件下产生和维持低温等离子体的方法,主要是将石英、玻璃、硅橡胶或塑料等介电材料安装在高电压电极之间激发产生等离子体^[14,24]。用不同激发方式如直流、交流、脉冲、

微波等激发工作气体,形成高活性和高化学选择性的等离子体。通过电极间的气体放电来激发空气中的分子,产生较多的激活分子和自由基,对DNA的损伤作用较为温和。DBD设备简易、成本低廉,但放电均匀性差,诱变效果不稳定,如处理雨生红球藻可提升虾青素产量,而针对*R. toruloides*菌株的突变率仅0.44%。此外,其工作电压常高于3kV,基础研究滞后制约了应用推广^[17,24]。

直流电晕放电等离子体(CD)^[25-26]是一种在不均匀电场中产生的局部自持放电,电极是针尖或细线,因放电区域像冠状放电区域,又称为电晕放电等离子体。通常仅在施加约10~20kV高电压形成的不均匀电场中观察到,和ARTP以及DBD相比,电晕放电具有低温、高活性及低成本优势。研究表明,其对贝莱森芽孢杆菌的诱变率高达75.67%,正突变率达88.23%,显著提升菌株酶活^[27]。然而,CD处理时间较长(5~15min),放电区域小,处理范围有限,且活性物种生成机制不明,相关研究匮乏限制了其系统性应用。

2 等离子体育种机制

诱变效果是等离子体技术生物效应的外在表现,可以通过其存活曲线来指示,表明等离子体放电对微生物具有特定作用^[28]。诱变机制是等离子体技术作用的内在表现,目前仅有关于ARTP诱

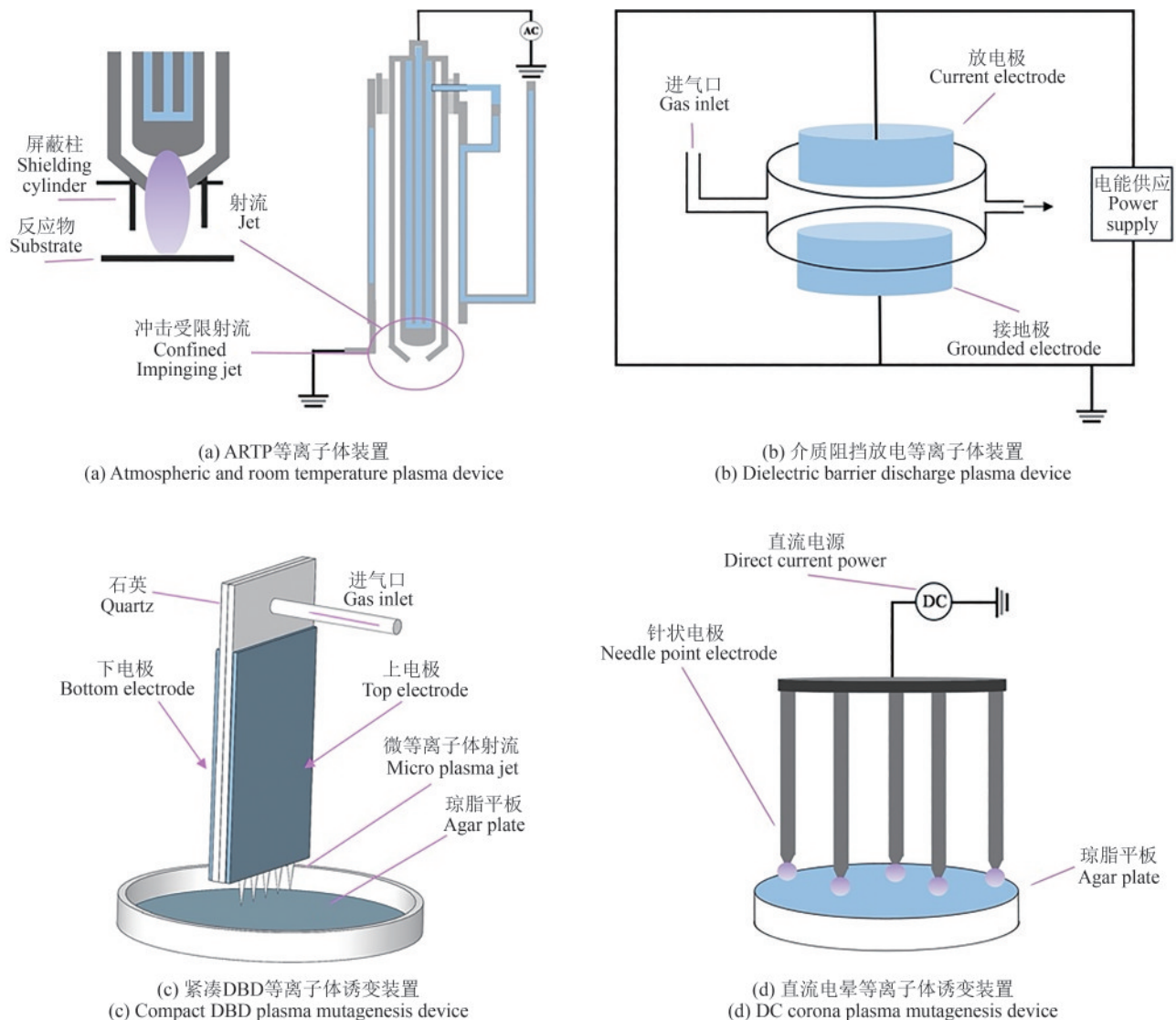


图3 不同微生物育种等离子体源

Fig. 3 Plasma sources for different microbial breeding

变机制的详细研究（图4），DBD和CD的机制研究较少。

等离子体通过产生大量的活性物质，如自由基、氧化剂、氮化物等，能够直接或间接地作用于微生物DNA。这些活性物质能引起DNA的氧化、单链或双链断裂、碱基修饰及其他形式的突变。例如，超氧化物阴离子（ O_2^- ）、氢过氧化物（ H_2O_2 ）等活性氧物质可以直接氧化DNA中的碱基，导致碱基替换或插入/缺失突变^[3, 8]。

Wang^[13]等发现不同等离子体成分作用于细胞壁细胞膜，使得磷脂及多糖过氧化从而改变膜和蛋白结构通透性（图4）。活性粒子透过细胞膜对

DNA物质产生作用，引起DNA结构的多样性损伤。如DNA单链或双链断裂造成DNA大量损伤，细胞致死率增加；促进细胞诱发SOS修复机制形成更多的突变位点，在修复DNA损伤、耐受性和随后的反式损伤DNA合成中发挥重要作用，并导致微生物突变^[29-35]。这些修复过程可能导致不准确修复或错误修复，从而产生突变。这些突变既可能是有益突变，比如提高微生物的适应性或产物生成能力，也可能是具致死性的有害突变。

其中，DNA损伤是ARTP引起微生物组突变的最根本原因^[36]。等离子体使DNA或寡核苷酸直接断裂、倒置或翻转，从而破坏基因组，改变基

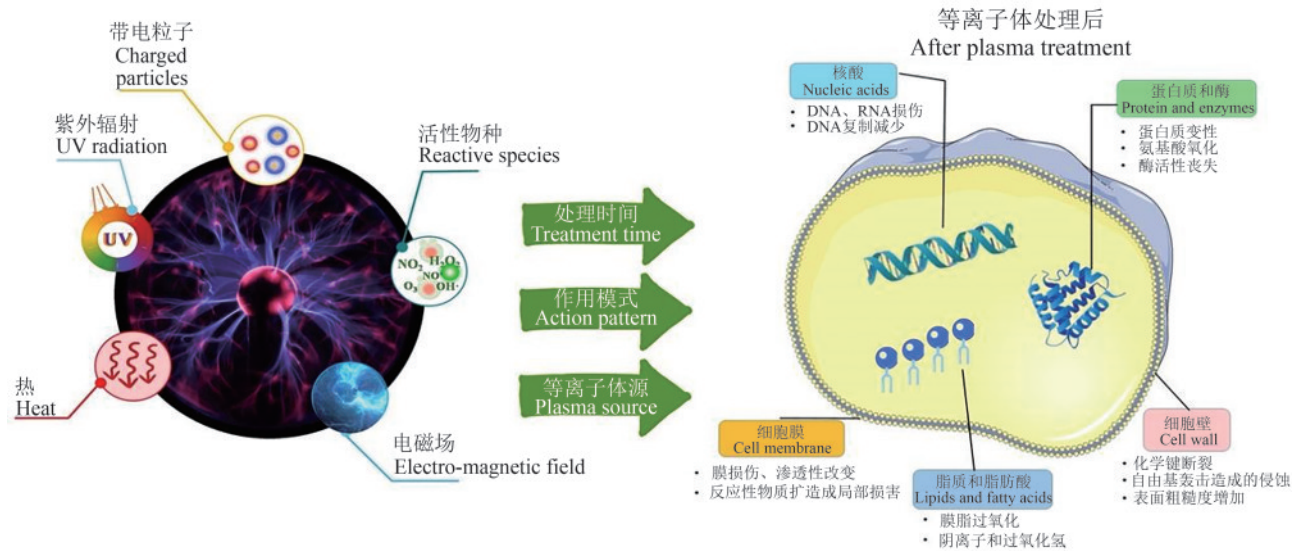


图4 ARTP 诱变机制

Fig. 4 ARTP mutagenesis mechanism

因结构，导致相应编码基因的过表达或上调^[18, 37-41]。研究发现ARTP诱变造成的损伤程度及作用靶点基因范围明显优于其他物理诱变方法及化学诱变方法^[26, 42]。除此之外，化学活性粒子（RONS）还可以调节酶分子结构，促使酶活性增加^[36]。RONS也会导致细胞膜被氧化而严重受损。脂质过氧化则会使得丙二醛（MDA）在生物体中积累，反过来又导致DNA损伤^[43]。脂质过氧化和细胞膜表面结合蛋白或酶的结构变化还会激活不同的细胞内信号传导途径^[36]。在微生物育种中，等离子体能够显著改变微生物的基因序列和代谢网络，从而提高其生产能力和抗逆性。

3 等离子体联用技术

等离子体诱变结合其他研究方法可实现更精准和高效的菌株改良。主要包括高通量筛选技术、传统诱变方法和理性育种方法（图5）。这些方法和等离子体诱变方法的联用效果也各有优劣（表1）。

3.1 与高通量筛选技术联用

等离子体微生物诱变产生的突变株中大多数是无用或负突变，主要依靠人工分离、纯化和摇瓶筛选以及表型表征法、气相色谱法、筛选培养基等传统筛选方法，普遍存在检测效率低、分

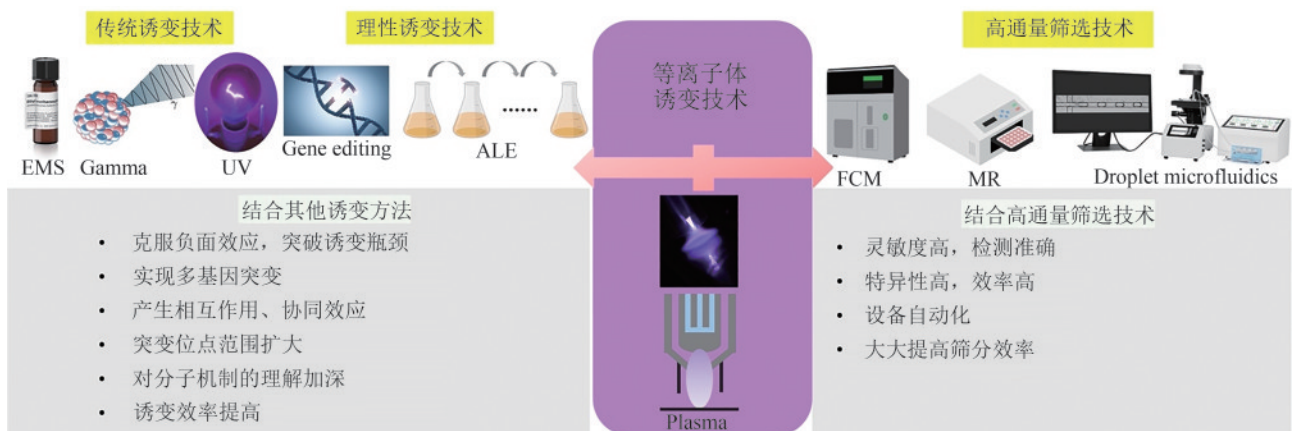


图5 等离子体与其他技术联用

Fig. 5 Plasma combined with other technologies

表1 等离子体联用技术优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of plasma coupling technology

等离子体联用技术	优点	缺点
高通量筛选技术	筛选效率高,筛选范围广通量高	设备成本要求高,操作复杂
传统诱变方法	互补性强突变位点广,突破单一方法局限	操作烦琐,遗传稳定性差
理性突变方法	精准性高,突变效果明显	技术要求高,成本较高,伦理限制

选范围小、周期长、筛选工作量大、成本高等问题^[44-45]。祝金山等^[46]通过等离子体诱变、平板初筛、药瓶复筛选育产核黄素突变菌,筛选时间长达21 d。

许多研究者将等离子体诱变育种技术和高通量筛选技术结合,来提高筛选效率和准确性。Yuan等^[47]开发了一种24深孔板酶标仪和TB分光光度法的高通量筛选方法来快速评估突变体性能,加速菌株选育过程。Hu等^[48]采用液滴微流控分选检测仪器与随机诱变方法相结合(HTS),以每秒300滴的分选速率实现了45.6倍突变体富集。Qiu等^[49]使用流式细胞仪(FCM)构建了荧光激活细胞分选方法(FACS),根据FACS的前向散射(FSC)信号对ARTP诱变的8000个白僵菌突变体进行快速读数筛选,得到一株FSC读数比野生型(WT)高37.4%、昆虫毒力增加32.6%的高生物防治潜力真菌菌株B6。Ding等^[50]通过FCM对细胞内虾青素浓度进行筛选鉴定,得到了两株ARTP诱变后高产虾青素黄叶酵母突变体,干重比原始菌株高25.3%和33.8%。

3.2 与传统诱变方法联用

等离子体微生物诱变育种技术与其他诱变策略也具有良好的兼容性,可进一步提升在诱变育种中的应用价值。多重叠加诱变作用也有助于增加突变位点多样性,提高目标菌株突变诱变率,突破单一手段的局限性,加速目标性状的改造^[51-53]。

Ma等^[54]将等离子体微生物诱变技术和乙醇诱变相结合,对雨生红球藻进行诱变,发现虾青素和脂质的总质量与总细胞质量之比高于单独诱变。Wang等^[55]利用ARTP结合化学诱变剂LiCl对产谷氨酰胺酶菌株*C. proteolyticum*进行复合诱变,并通过丙二酸抗性筛选得到了一株比原始蛋白谷

氨酰胺酶菌株产量高48.69%的突变菌,传代15代后仍具有遗传稳定性,其大豆分离蛋白的溶解度、发泡性、乳化活性和乳液稳定性等功能也得以提升。

Sun等^[56]把ARTP和传统物理诱变方法UV紫外线辐射结合,突变菌JC-28-UA12木质素对木质的降解速率提高16.18%。Xia等^[57]发现每轮UV-ARTP复合诱变迭代后产柚苷酶菌株*Aspergillus tubingensis*活性均有所上升,复合诱变效率均优于单一ARTP和UV诱变,目标产物柚苷酶活性提高206%。Pan等^[58]将ARTP和生物育种方法孢子杂交结合对食用蛋白菌红平菇进行了复合诱变育种,菌株的生物量和蛋白质含量显著提高,蛋白产量提升128.02%。张萍等^[59]利用甲基磺酸乙酯(EMS)化学诱变、紫外物理诱变和ARTP诱变进行叠加的方法选育出一株高产免疫抑制药物霉酚酸短密青霉菌(*Penicillium brevicompactum*)突变菌,霉酚酸发酵效价提高137.3%。

3.3 与理性突变方法联用

通过将等离子体诱变与CRISPR/Cas9等基因编辑技术结合,可以针对特定基因进行精确修改,提高育种的准确性。Zhang等^[60]将ARTP诱变结合高通量筛选得到对尿苷一磷酸结构类似物具有较高耐受性和稳定遗传性的大肠杆菌突变体后,进一步结合CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除突变体参与胞苷分解代谢的*udk*和*rihA*基因,重组大肠杆菌胞苷的效价、产量达15.7 g/L、0.164 g/g,显著高于初始菌株,重组菌株的胞苷代谢通路基因呈现上调趋势。

Belinda Amanda Nyabako^[61]将ARTP和理性突变方法适应性进化ALE结合处理嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus*,得到一株酸胁迫耐受性增强的突变菌株,在pH 3.0和2.5条件下培养3 h

后, 乳酸耐受性增强, 存活率分别为 75.67% 和 25.78%。该突变菌株主要通过更低的膜通透性、更高的疏水性以及较高的不饱和脂肪酸 (UFA) 与饱和脂肪酸 (SFA) 的比例来影响细胞膜的物理状态, 提高其在 pH 3.0 和 2.5 条件下的存活率。Ren 等^[62] 将等离子体微生物诱变育种方法和适应性实验室进化 (ALE) 结合, 通过高通量筛选方法选育出产高滴度吡咯喹啉醌 (PQQ) (增加 148%) 的反硝化嗜血杆菌突变株。Zhou 等^[63] 在等离子体微生物诱变技术和 ALE 结合的基础上, 使用理性突变代谢工程技术过表达、敲除或抑制特定基因等手段对酿酒代谢网络进行理性设计和优化, 使番茄红素的滴度增加 60%, 达到 703 mg/L。

4 在生物制造领域中的应用

等离子体微生物诱变技术已在生物酶、有机酸、药物, 生物能源、生物材料等生物制造领域中崭露头角 (图 6), 主要体现在以下几个方面: ①刺激的突变位点多、突变量大、效率高, 为创建突变体库奠定了基础; ②可改善微生物对特定环境的耐受性, 扩大微生物能合成应用的范围,

针对性提高目标菌株产品产量或菌株性能, 促进产业化发展; ③有利于增强产品生产模式的可持续性。等离子体诱变育种技术在生物制造上的相关案例应用总结于表 2。

4.1 生物酶

生物酶因其绿色高效而成为各行各业的关键催化剂, 具有良好的经济效益和环境效益, 特别是随着环保意识的逐年增加, 生物酶的市场需求越来越大。到 2030 年, 全球酶市场预计将达到 5250 亿美元, 增长率为 6.7%^[90-92]。等离子体诱变育种技术能有效提高酶合成菌株的耐受性、原料利用率和产量, 进而推动酶产业化。

Zhang 等^[64] 对具有药用特性的食用真菌 *Pleurotus djamor* 进行等离子体诱变提高了菌株漆酶产量和生长遗传稳定性, 酶活最高提高了 86.36% 且生长迅速遗传稳定。Ye^[65] 等通过结合基因工程双交叉同源重组技术对 ARTP 25 轮诱变后的莫巴拉链霉菌突变菌株高酶活基因和耐热基因进行整合构建, ARTP 技术在较短时间内产生大量随机突变, 为后续整合特定功能基因提供了丰富的突变背景。并通过双交叉同源重组方法保证了



图 6 等离子体诱变技术在生物制造中应用

Fig. 6 Application of plasma mutagenesis technology in biofabrication

表2 等离子体诱变育种技术在生物制造上的应用

Table 2 Application of plasma mutagenesis breeding technology in biofabrication

应用领域	诱变菌株	诱变目的	评价参数	实验结果	参考文献
酶	红平菇	漆酶	酶活	酶活提高86.36%,遗传稳定	[64]
	莫巴拉链霉菌	谷氨酰胺转氨酶	比活性	TGase提高35.6倍和2.9倍	[65]
	米曲霉	蛋白酶	酶活	酶活及相关关键基因表达提高	[66]
	黑曲霉	单宁酶	酶活	酶活提高2.27倍,具良好遗传稳定性	[67]
	高山被孢霉	花生四烯酸(ARA)	花生四烯酸产量	ARA总脂肪酸占比及总产量分别提高75.40%和232.21%	[68]
脂肪酸	大肠杆菌	L-半胱氨酸	滴度	L-半胱氨酸滴度增加了2.2倍	[69]
	谷氨酸棒状杆菌	谷氨酸	耐高糖和丙二酸	合成关键基因表达提高	[70]
	酿酒酵母	酪氨酸	前体香豆酸 p-CA滴度	p-CA产量提高7.6倍	[71]
	裂殖壶菌	二十二碳六烯酸(DHA)	关键酶表达及 DHA产量	DHA产量提高14.3%	[72]
	琥珀酸放线杆菌	琥珀酸	抗性、产量	琥珀酸环境抗性提高2倍,产量增加113%	[73]
生物 药物	马杜拉放线菌	喷司他丁	喷司他丁产量	喷司他丁产量增加33.79%	[74]
	短孢杆菌SPR20	抗菌肽	MIC值	MIC值达到250~500 μg/mL和500 μg/mL	[75]
	玫瑰链霉菌	达托霉素	达托霉素产量	达托霉素产量提高58.33%	[76]
	大肠杆菌 <i>E. coli</i> NXBG-13	胞苷	胞苷滴度、产量、 生产率	胞苷的效价、产量和生产率达到15.7 g/L, 0.164 g/g和0.327 g/(L·h)	[60]
	桑黄多孔菌	胞内多糖	多糖产量	多糖产量提高1.5倍	[77]
生物 燃料	丁酸梭菌	1,3-丙二醇(1,3-PD)	1,3-PD滴度	1,3-PD滴度提高4.88倍	[78]
	嗜热毁丝霉	木聚糖酶	酶活、耐酸性	木聚糖酶活性提高21.71%,酸性(pH 4.0~7.0)适应性提高	[79]
	酿酒酵母	乙醇	乙醇及前体产量	乙酸乙酯和乙酸异戊酯浓度提高2.8倍和3.3倍	[80]
	卷枝毛霉	生物柴油	甲醇耐受性、 生物柴油产率	甲醇耐受性提高,柴油产率达到91%	[81]
	热带念珠菌 莱茵衣藻	脂质 氢气	脂质产量 氢气产量	脂质产量增强16.8% 氢气产量增加1.8~5.2倍和2.7~3.1倍	[82] [83]
凯斯小球藻	生物柴油、脂质	生物柴油、脂质产量	生物量和脂质生产力提高75%和44%	[84]	
生物 材料	嗜盐单胞菌	聚羟基脂肪酸酯	盐胁迫条件	生产盐度降低,PHA生产成本降低33%	[85]
	出芽短梗霉	普鲁兰多糖	普鲁兰多糖产量	普鲁兰多糖产量提高17.6%	[86]
	蜡样芽孢杆菌	壳聚糖酶	酶活	壳聚糖酶活性提高2.49倍	[87]
	紫红曲霉	色素	橙色素、橘霉素含量	橙色素产量提高66.7%,橘霉素降低69%	[88]
	克雷伯氏菌	苯二甲酸丙二醇酯单体 1,3-丙二醇	1,3-丙二醇产量, 甘油转化率	1,3-丙二醇产量达到118 g/L,甘油转化率为42%	[89]

外源基因在目标位点的准确整合,从而实现了高效表达和功能叠加,解决了野生型莫巴拉链霉菌的不耐热问题,突变菌株半衰期和比活性比野生型TGase高35.6倍和2.9倍,分别达到64 min和71.15 U/mg。但同时双交叉同源重组技术存在整合效率与表达稳定性问题。在实际操作中,整合效率可能受到菌株生理状态的影响,且长期传代过程中,外源基因的稳定表达仍需验证。多轮ARTP

诱变引入的大量随机突变也可能在改善目标性状的同时,产生一些副作用或引发代谢失衡,从而影响菌株整体生长和生产能力。

Gao等^[66]使用ARTP技术得到的米曲霉菌突变菌株遗传稳定性优异(15代),中性蛋白酶、碱性蛋白酶和天冬氨酸氨基肽酶等酶活性显著提高,耐盐碱性蛋白酶基因和天冬氨酸氨基肽酶基因的转录表达水平分别提高了约30%和27%。马东旭

等^[67]使用ARTP对产单宁酶黑曲霉进行诱变处理后将单宁酶的酶活力提高了2.27倍,具有良好的遗传稳定性。张鑫等^[68]将ARTP与紫外-LiCl诱变方法结合选育出产人体必需脂肪酸花生四烯酸(ARA)的高山被孢霉突变株,突变菌株Z6-A23所产油脂中ARA占总脂肪酸含量高达44.57%,ARA产量达3.62 g/L,较出发菌株提高了75.40%和232.21%。

4.2 生物脂肪酸

等离子体诱变同样可以用于改善微生物的产生生物脂肪酸能力^[93]。Yang等^[69]使用ARTP和ALE显著提高了大肠杆菌的L-半胱氨酸耐受性和氨基酸关键合成基因表达,L-半胱氨酸滴度增加了2.2倍。Shangguan等^[70]以耐高糖和丙二酸为指标,使用ARTP技术对谷氨酸棒状杆菌进行了两轮迭代诱变筛选,获得了具有高谷氨酸生产能力和遗传稳定性的突变株。通过设定耐高糖和丙二酸为关键指标,促使诱变菌株在谷氨酸合成途径中发生特定基因的表达调控。等离子体诱变使谷氨酸合成途径中关键基因上调,编码氧代戊二酸脱氢酶复合物(odhc)的抑制基因下调,促进TCA循环的碳流及其分支代谢流向谷氨酸合成,表明等离子体微生物诱变育种技术不仅可以显著提高微生物菌株的生产效率,还有利于改善菌株其他生物学特性。但强化谷氨酸合成可能影响代谢负荷与细胞健康,导致细胞代谢负担增加,影响生长速率,需要优化培养基和发酵条件促进生长效率,以维持高产性能。Cai等^[71]结合等离子体微生物诱变育种技术和基因敲除技术选育得到了一株前体对香豆酸(*p*-CA)产量提高7.6倍、能稳定遗传10代的高产酪氨酸酿酒酵母菌株。

目前大多数有机酸的生产依赖于经济高效的微生物发酵系统,然而野生型菌株通常生长缓慢、有机酸产量低,需要复杂的目标化合物纯化过程,制约生物有机酸工业应用的瓶颈。等离子体育种技术可通过放电产生的活性物种(如 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2 和NO)对微生物基因组产生影响,从而导致编码有机酸合成调控基因的过度表达提高菌株产量。Wang等^[72]通过将ARTP诱变与高通量筛选策略相

结合,对二十二碳六烯酸(DHA)生产菌株*Aurantiochytrium* sp.进行改良,获得了几株高产突变株。诱变使得突变株柠檬酸合成途径相关基因的表达水平显著提高,两种合成关键酶乙酰辅酶A羧化酶和酮酰还原酶的表达分别上调了4.78倍和6.95倍,抑制酶脂肪酸合酶表达下调了2.79倍,导致转运到聚酮合酶途径前体变多,DHA产量提高14.3%。Wu等^[73]通过ARTP诱变处理琥珀酸放线杆菌筛选得到耐受高浓度琥珀酸的高产突变菌株。突变菌株在琥珀酸环境中的抗逆性提高了2倍,琥珀酸产量增加113%。

4.3 生物药物

等离子体微生物诱变育种方法也可以用于改善产药物菌株效价比,减少副产物或杂质,提高产品转化率,提高经济效益^[94]。微生物天然产物资源中大部分具有药用价值,但由于原始微生物菌种生产效率低下限制其生物制造产业化进程^[95-97]。Zhang等^[74]通过等离子体诱变联合核糖体筛选提高马杜拉放线菌产物喷司他丁(恶性肿瘤和毛细胞白血病的一线治疗药物)的产量,通过采用核糖体筛选技术,侧重于那些在蛋白质合成和药物代谢上表现优异的突变株,确保选出的菌株在药物生产上具备竞争优势。在初步获得高产突变株后,通过系统性的发酵工艺优化,突变株S-15产量提高33.79%,发酵优化后喷司他丁产量达到现有研究报道的最高水平152.06 mg/L,突变菌具有良好的遗传稳定性。但高产菌株在工业化生产中可能因发酵条件细微变化而表现出批次间的产量波动,需要对发酵条件进行优化和严格把控。Nuttapon Songnaka等^[75]通过使用等离子体诱变技术提高抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)活性及抗生素的生产,MIC值达到250~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Zhu等^[76]将等离子体诱变技术结合双报告基因体系筛选得到达托霉素产量显著提高58.33%的*S.roseosporus*玫瑰链霉菌高性能突变菌。

Zhang等^[60]使用ARTP和代谢工程构建了抗病毒和抗肿瘤药物化学合成的重要商业前体胞苷的高产量细胞工厂,得到一株在5 L发酵罐胞苷效

价、产量和生产率达到 15.7 g/L、0.164 g/g 和 0.327 g/(L·h) 的突变大肠杆菌, 重组菌株的胞苷从头合成途径基因显著上调。Li 等^[77] 使用 ARTP 诱变传统珍稀药用真菌桑黄多孔菌, 使多糖产量提高了 1.5 倍。

4.4 生物燃料

为降低碳排放, 实现 2030 全球碳中和目标, 世界各国都在大力减少石油燃料的使用, 也在寻找研发石油燃料的替代品新型。微生物资源生产能源为石化燃料提供了一种新的可再生资源的生产和使用发展思路^[98-101]。

等离子体诱变育种可通过改善菌株对于环境生产条件的耐受性优化生物燃料产能。丁酸梭菌可以将甘油生物转化生成 1,3-丙二醇 (1,3-PD)。Yun 等^[78] 在常温等离子体诱变生物燃料生产菌株丁酸梭菌对甘油的耐受性基础上, 结合微生物微滴培养系统 (MMC) 介导的 ALE 进一步改善菌株耐受性。突变菌株产物 1,3-PD 的产量 (滴度) 提高了 4.88 倍, 10 个 1,3-PD 合成相关关键基因的表达水平显著提高。Zhang^[79] 等使用 ARTP 对木聚糖酶生产菌株嗜热毁丝霉菌进行了诱变, 得到了具有高木聚糖酶生产力的热稳定突变体 M2103。该突变体木聚糖酶活性提高了 21.71%, 最适温度从 60 °C 达到 75 °C, 对酸性 (pH 4.0~7.0) 环境适应性强、酶活高。Hong 等^[80] 使用 ARTP 诱变技术结合高盐筛选得到的耐盐酿酒酵母菌株 HF-130 乙醇产量显著增加了 98.8%, 乙酸乙酯和乙酸异戊酯浓度也提高了 2.8 倍和 3.3 倍。乙醇等生物燃料生产的效率增强且生产成本降低。Ji 等^[81] 采用 ARTP 诱变结合自适应实验室进化 (ALE) 来提高卷枝毛霉的甲醇耐受性和催化活性, 克服甲醇对脂肪酶活性有害的缺点, 筛选出三个具有稳定基因型的卷枝毛霉突变体, 它们表现出比野生型 (WT) 更高的催化活性和甲醇耐受性, 在 30% 甲醇中孵育活性明显改善, 突变体 JLW5 生物柴油产率达到 91%, 相比野生型反应时间显著缩短了 54 h, 具备生物柴油商业化生产潜力。

Luo 等^[82] 通过 ALE 结合 ARTP 诱变对热带念珠菌进行突变, 得到一株能在 45 °C 高温下生长的

耐热菌株。解决制约生物柴油生产的发酵温度与微生物耐热性不协调的问题, 使突变菌株脂质产量增强了 16.8%, 生成效率达到 (86.2±2) mg/g。Ban 等^[83] 通过 ARTP 对能产生清洁能源氢气的莱茵衣藻进行诱变, 突变菌氢气产量增加 1.8~5.2 倍和 2.7~3.1 倍, 突变细胞中光合作用相关基因表达量明显上升, 微藻叶绿体大小减小显著, 提高了微藻吸收光子利用率和光合作用, 显示出诱变对微藻能量代谢的显著调控作用。但微藻在大规模培养时对光强、温度及营养供应极为敏感, 需对其进行环境适应性与光条件控制确保培养环境能够维持突变菌株的高效产氢状态。Mostafa E. Elshobary 等^[84] 使用 ARTP 对筛选到的产生物燃料的微藻凯斯小球藻进行诱变, 生物量生产力和脂质生产力提高 75% 和 44%, 有效改善微藻野生种产量偏低的生产限制。

4.5 生物材料

等离子体诱变育种技术对生物材料产生菌株进行诱变育种的研究主要集中在提高生物材料的产量和优化其性质。

Zhang 等^[85] 使用 ARTP 技术对聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 工程菌嗜盐单胞菌进行了诱变, 通过生长曲线筛选和盐胁迫条件变化筛选出低盐条件下能高效稳定生产 PHA 的低盐胁迫突变体。并结合基因工程调控 PHA 合成相关基因的表达, 使得工程嗜盐单胞菌细胞在低盐胁迫下依然保持高效的聚合能力, PHA 生产成本降低 33%, 扩大了嗜盐单胞菌的应用范围及产业化潜力。但低盐条件下的适应性可能伴随着其他生理变化, 长期稳定性和发酵过程中细胞活性保持仍需验证。同时在大规模生产过程中, 需要进一步优化发酵参数、下游处理工艺及原料成本, 以确保整体经济效益。Bai 等^[86] 通过 ARTP 诱变结合转录组分析显著提高了 *Aureobasidium pullulans* 出芽短梗霉新菌株的普鲁兰多糖 (HA) 生产性能, 增强其工业应用潜力。HA 产量提高了 17.6%, 突变体中与支链淀粉的合成和分泌有关的 α/β -水解酶、 α -淀粉酶和糖波特家族 MFS 转运蛋白表达显著提高。Zhang 等^[87] 对蜡样芽孢杆菌进行了诱变, 使新型生物材料壳聚糖

的前体壳聚糖酶活性提高了2.49倍。Zhang等^[88]对紫红曲霉菌株进行诱变,菌株橙色素产量提高66.7%,色素毒素橘霉素降低69%,红色素黄色素水平也得到改善。张少伦等^[89]把ARTP与代谢工程及高通量筛选方法进行结合增强工程克雷伯氏菌产新型聚酯类纤维苯二甲酸丙二醇酯(polytrimethylene terephthalate, PTT)单体1,3-丙二醇的性能,最终1,3-丙二醇产量达到118 g/L,甘油转化率为42%。

5 结论及展望

低温等离子体作为一种新型微生物诱变技术,凭借其高效、绿色环保、操作简便等优势,为微生物育种领域提供了重要工具。ARTP、DBD和CD等不同等离子体源在诱变效率、突变率和适用范围等方面各具特色,能够显著提高目标菌株的产量、耐受性以及特定环境适应能力。但ARTP等离子体诱变装置主要基于辉光放电原理,功耗较大(达到200 W),诱变过程产热,需额外增加冷却装置,体积笨重(0.5~1 m³),无法在洁净台中操作。DBD等离子体工作电压较高,通常是3 kV以上,放电均匀性差、局部气体温度较高,难以产生稳定诱变效果,诱变突变机制研究相对较少。CD等离子体存在诱变处理时间较长(需要5~15 min)、区域小、电流弱、等离子体及活性物种产生效率低等缺陷。需要针对诱变育种需求,开发更高效、放电稳定、作用距离大、可在洁净台规模化使用的低成本等离子体诱变发生装置,提升诱变效率和菌株筛选成功率,并优化操作参数以满足不同工业需求。当前三种等离子体源均依赖氦气等稀有气体作为工质以提高突变率,增加了诱变成本,未来可研发基于微纳米材料的新型等离子体源,改用空气作为诱变工质,通过针对性解决散热问题实现能耗降低与放电稳定性提升,在探索提高诱变率的同时减少冷却系统开支。为了更好地适应工业化生产,未来可以开发模块化小型化的等离子体诱变设备,这样可以根据不同需求调整设备规模和功能,使其能够在小型洁净台或大型生产线上灵活应用。

由等离子体产生的各种活性粒子RONS及其化

学反应引起的氧化DNA损伤是突变过程中最重要因素^[34]。但目前主要的等离子体诱变机制文献较少且主要是关于ARTP等离子体的,未来可以对其等离子体的诱变机制进行研究。此外,等离子体对活细胞中DNA的分子作用机制仍不清晰,需要深入解析等离子体诱变过程中对DNA分子和细胞代谢网络的具体作用机制及剂量研究,为突变路径的设计提供理论支持。未来可通过高通量基因组学等手段,系统性地研究等离子体诱变对DNA的具体影响,特别是突变位点、损伤类型以及修复机制。

等离子体诱变育种方法虽然具有高效性、安全性、多样性等优点,但高突变性同样也加大突变的不确定性,获得目标性状的突变株仍需大量筛选。需要进一步优化等离子体处理参数并联合使用高通量筛选技术,以提高目标突变株的筛选效率。目前与等离子体装置联用的大部分高通量筛选方法仍需与荧光蛋白结合、产生荧光信号读数才能进行表型分析,需要开发无损、快速、实时的筛选自动化新技术。例如,利用质谱分析或拉曼光谱实现无损筛选,通过实时检测代谢物的变化来评估突变体的性能,从而提高筛选效率和精度。同时结合机器学习和大数据分析等AI技术,对筛选数据进行高效分析,优化筛选过程。通过预测和模式识别,实现快速识别表现优异的突变菌株并加速筛选周期。与此同时,未来可通过强化与基因编辑、代谢工程等前沿技术的结合,实现从随机突变到定向育种的突破。通过代谢通路的系统性优化,可以进一步提升菌株的生产能力和稳定性。同时,利用系统生物学工具对突变菌株的代谢网络进行建模和分析,可以更好地预测和设计高效的工业菌株。

等离子体诱变技术在酶制造、有机酸生产、生物能源开发以及生物材料等生物制造领域展现了巨大潜力,但真正产业化落地的案例不多。未来需要通过与工业企业的联合开发,从企业需求出发推动等离子体诱变技术在更多工业场景中的应用。生物材料作为绿色替代品的重要性日益凸显,目前在生物材料领域尚存在不小的挑战,等离子体诱变导致生物材料产量变化的分子机制研究较少,未来可通过选择性等离子体诱变技术定

向提高菌株的生物材料产量，例如增强聚羟基脂肪酸酯等生物基聚合物的合成能力，通过优化菌株代谢途径和提高原料转化率，降低生产成本，从而加速生物材料的工业化进程。并对其具体分子机制进行研究，重点关注等离子体如何影响微生物的代谢途径，通过基因组学和蛋白质组学手段，揭示其在基因表达、代谢网络和蛋白质功能方面的变化，解析等离子体对生物材料产量的影响机制。

相信通过等离子体诱变与生物技术、高通量筛选技术等前沿技术的深度融合，可有效推动并拓展等离子体诱变技术在各场景中的应用，为生物制造提供重要技术支撑，推动生物制造产业的快速进步，也将为全球可持续发展目标的实现作出重要贡献。

参 考 文 献

- [1] YU Q H, LI Y C, WU B, et al. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: advances and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1517-1531.
- [2] MAGOCHA T A, ZABED H, YANG M M, et al. Improvement of industrially important microbial strains by genome shuffling: current status and future prospects[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 257: 281-289.
- [3] WU Y N, JAMEEL A, XING X H, et al. Advanced strategies and tools to facilitate and streamline microbial adaptive laboratory evolution[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(1): 38-59.
- [4] CABAHUG R A M, HA M K T T, LIM K B, et al. LD₅₀ determination and phenotypic evaluation of three *Echeveria* varieties induced by chemical mutagens[J]. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2020, 12(1): 1-9.
- [5] KODYM A, AFZA R. Physical and chemical mutagenesis[M/OL]//Plant functional genomics. New Jersey: Humana Press, 2003: 189-203[2025-01-01]. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:189>.
- [6] OTTENHEIM C, NAWRATH M, WU J C. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1): 12.
- [7] LIU T, HUANG Z Y, GUI X, et al. Multi-omics comparative analysis of *Streptomyces* mutants obtained by iterative atmosphere and room-temperature plasma mutagenesis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 630309.
- [8] ACHEAMPONG A, BONDZIE-QUAYE P, FETISOA M R, et al. Applications of low-temperature plasma technology in microalgae cultivation and mutant breeding: a comprehensive review[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 419: 132019.
- [9] FOOLADI S, RABIEE N, IRAVANI S. Genetically engineered bacteria: a new frontier in targeted drug delivery[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(42): 10072-10087.
- [10] VADIKKEETIL Y, SUBRAMANIAM Y, MURUGAN R, et al. Plasma assisted decomposition and reforming of greenhouse gases: a review of current status and emerging trends[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2022, 161: 112343.
- [11] JIA Y K, LI T H, ZHANG R, et al. Different bactericidal abilities of plasma-activated saline with various reactive species prepared by surface plasma-activated air and plasma jet combinations[J]. *Plasma Science and Technology*, 2024, 26(1): 015502.
- [12] WANG L Y, ZHAO H X, HE D, et al. 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.
- [13] ZHU Z R, DING X Z, RANG J, et al. Application and research progress of ARTP mutagenesis in actinomycetes breeding[J]. *Gene*, 2024, 929: 148837.
- [14] SETSUHARA Y. Low-temperature atmospheric-pressure plasma sources for plasma medicine[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 605: 3-10.
- [15] BRANDENBURG R. Dielectric barrier discharges: progress on plasma sources and on the understanding of regimes and single filaments[J]. *Plasma Sources Science and Technology*, 2017, 26(5): 053001.
- [16] VO P H N, KIM M, KUZHIUMPARAMBIL U, et al. Random mutagenesis using cold atmospheric plasma to produce mutant microalgae for hyper-recovery of rare earth elements from mining materials[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 503: 158512.
- [17] KOH H G, KIM J, RAO C V, et al. Construction of a compact array of *Microplasma* jet devices and its application for random mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(11): 3406-3413.
- [18] ZHANG X, ZHANG X F, LI H P, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387-5396.
- [19] UMAIR M, JABBAR S, AYUB Z, et al. Recent advances in plasma technology: influence of atmospheric cold plasma on spore inactivation[J]. *Food Reviews International*, 2022, 38(S1): 789-811.
- [20] WEI Q Y, YUAN Y, ZHANG J H, et al. Fungicidal efficiency

- of DBD cold plasma against *Aspergillus niger* on dried jujube [J]. *Food Microbiology*, 2024, 121: 104523.
- [21] MA C L, NIKIFOROV A, DE GEYTER N, et al. Plasma for biomedical decontamination: from plasma-engineered to plasma-active antimicrobial surfaces[J]. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2022, 36: 100764.
- [22] 徐欢欢, 张红兵, 李会宣, 等. 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 H H, ZHANG H B, LI H X, et al. Application progress of atmospheric and room temperature plasma technology in microbial mutagenesis[J]. *Current Biotechnology*, 2020, 10(4): 358-362.
- [23] WANG L Y, HUANG Z L, 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.
- [24] LIU J H, CHEN J, CHEN Z, et al. Isolation and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) produced by dielectric barrier discharge plasma[J]. *Phycologia*, 2016, 55(6): 650-658.
- [25] GUAN Y X, TANG S Y, WANG S Q, et al. Degradation of toluene with negative DC Corona plasma enhanced by microdischarge[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2022, 50(1): 61-68.
- [26] MAGUREANU M, PIROI D, GHERENDI F, et al. Decomposition of methylene blue in water by Corona discharges[J]. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2008, 28(6): 677-688.
- [27] WANG R R, BIAN W, HU Z R, et al. Mutation of *Bacillus velezensis* using Corona discharge[J]. *Agronomy*, 2022, 12(1): 166.
- [28] XU Y Y, BASSI A. Non-thermal plasma decontamination of microbes: a state of the art[J]. *Biotechnology Progress*, 2025, 41(2): e3511.
- [29] YARANGSEE P, KHACHA-ANANDA S, PITCHAKARN P, et al. A nonclinical safety evaluation of cold atmospheric plasma for medical applications: the role of genotoxicity and mutagenicity studies[J]. *Life*, 2024, 14(6): 759.
- [30] PATENALL B L, HATHAWAY H J, LAABEI M, et al. Assessment of mutations induced by cold atmospheric plasma jet treatment relative to known mutagens in *Escherichia coli* [J]. *Mutagenesis*, 2021, 36(5): 380-387.
- [31] LI G, LI H P, WANG L Y, et al. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium [J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 92(22): 221504.
- [32] KHLIUSTOVA A, LABAY C, MACHALA Z, et al. Important parameters in plasma jets for the production of RONS in liquids for plasma medicine: a brief review[J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2019, 13(2): 238-252.
- [33] CHEN H X, BAI F W, XIU Z L. Oxidative stress induced in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to dielectric barrier discharge plasma in air at atmospheric pressure[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2010, 38(8): 1885-1891.
- [34] SREEDEVI P R, 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.
- [35] NIEDŹWIEDŹ I, WAŚKO A, PAWŁAT J, et al. The state of research on antimicrobial activity of cold plasma[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2019, 68(2): 153-164.
- [36] ZHANG A D, MA Y D, DENG Y, et al. Enhancing protease and amylase activities in *Bacillus licheniformis* XS-4 for traditional soy sauce fermentation using ARTP mutagenesis[J]. *Foods*, 2023, 12(12): 2381.
- [37] JIANG P X, WANG L Y, HUANG Z L, et al. Studies on the mutation breeding mechanism of *Streptomyces avermitilis* by a novel atmospheric-pressure, low-temperature discharge plasma [J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136: S22.
- [38] LIEW K J, ZHANG X H, CAI X H, et al. The biological responses of *Staphylococcus aureus* to cold plasma treatment [J]. *Processes*, 2023, 11(4): 1188.
- [39] GAUR N, KURITA H, OH J S, et al. On cold atmospheric-pressure plasma jet induced DNA damage in cells[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2021, 54(3): 035203.
- [40] ADHIKARI E R, PTASINSKA S. Correlation between helium atmospheric pressure plasma jet (APPJ) variables and plasma induced DNA damage[J]. *The European Physical Journal D*, 2016, 70(9): 180.
- [41] LI M T, GAO S H, YANG P C, et al. Improvement of ribonucleic acid production in *Cyberlindnera jadinii* and optimization of fermentation medium[J]. *AMB Express*, 2024, 14(1): 24.
- [42] HUANG Y T, WANG L Y, ZHANG X, et al. Quantitative evaluation of DNA damage caused by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and other mutagenesis methods using a rapid umu-microplate test protocol for microbial mutation breeding[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2021, 39: 205-210.
- [43] ZHANG H, YANG L F, YU Z L, et al. 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.
- [44] FAN X G, WU H Y, LI G L, et al. Improvement of uridine production of *Bacillus subtilis* by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening

- [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0176545.
- [45] YU F, ZHANG M, SUN J F, et al. 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.
- [46] 祝金山, 吴焯飞, 陆建卫. 常压室温等离子体诱变选育核黄素高产突变株[J]. 发酵科技通讯, 2020, 49(1): 58-62.
- ZHU J S, WU Y F, LU J W. Mutagenesis of *Bacillus subtilis* using the atmospheric and room temperature plasma technology for improved riboflavin production[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2020, 49(1): 58-62.
- [47] YUAN H L, TU R, TONG X W, et al. Ultrahigh-throughput screening of industrial enzyme-producing strains by droplet-based microfluidic system[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(3): kuac007.
- [48] HU W, LI W, CHEN J. Recent advances of microbial breeding via heavy-ion mutagenesis at IMP[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(4): 274-280.
- [49] QIU L, NIE S X, HU S J, et al. Screening of *Beauveria bassiana* with high biocontrol potential based on ARTP mutagenesis and high-throughput FACS[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 171: 104732.
- [50] DING R R, HUANG R L, SU H, et al. Screening of astaxanthin-overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains via iterative ARTP mutagenesis and cell sorting by flow cytometry[J]. Journal of Applied Microbiology, 2024, 135(2): lxae020.
- [51] 袁姚梦, 邢新会, 张翀. 微生物细胞工厂的设计构建: 从诱变育种到全基因组定制化创制[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 656-673.
- YUAN Y M, XING X H, ZHANG C. Progress and prospective of engineering microbial cell factories: from random mutagenesis to customized design in genome scale[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 656-673.
- [52] 梁英, 闫译允, 赖秋璇, 等. 微藻诱变育种研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(6): 19-32.
- LIANG Y, YAN Y Y, LAI Q X, et al. Researching advances in microalgal mutation breeding[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(6): 19-32.
- [53] WAN Z J, HU H B, LIU K, et al. Engineering industrial yeast for improved tolerance and robustness[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2024, 44(8): 1461-1477.
- [54] MA Y H, SUN X, SUN Y R, et al. Synchronous enhancement of astaxanthin and lipid accumulation in *Haematococcus lacustris* through co-mutation of ethanol and atmospheric and room temperature plasma: exploration of characteristics and underlying mechanisms[J]. Bioresource Technology, 2024, 394: 130305.
- [55] WANG L J, LYU Y B, MIAO X, et al. Enhanced protein glutaminase production from *Chryseobacterium proteolyticum* combining physico-chemical mutagenesis and resistance screening and its application to soybean protein isolates[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(9): 4562-4572.
- [56] SUN J J, ZHANG Z, LIU J S, et al. UV-ARTP combined mutagenesis selection of lignin-degrading strain and enzymatic characterization of the resultant organisms[J]. Food Bioscience, 2024, 60: 104478.
- [57] XIA X K, ZHANG Y E, LEI S J, et al. Identification and iterative combinatorial mutagenesis of a new naringinase-producing strain, *Aspergillus tubingensis* MN589840[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 72(2): 141-148.
- [58] PAN J, ZHANG J, WEI H F, et al. Optimizing mycelial protein yield in *Pleurotus djamor* via ARTP mutagenesis and hybridization strategies[J]. Journal of Biotechnology, 2024, 386: 64-71.
- [59] 张萍, 石彦鹏, 牛春, 等. 霉酚酸高产菌株短密青霉菌 SA-2 的选育[J]. 生物资源, 2022, 44(4): 411-416.
- ZHANG P, SHI Y P, NIU C, et al. Screening of *Penicillium brevicompactum* SA-2 with high yield of mycophenolic acid [J]. Biotic Resources, 2022, 44(4): 411-416.
- [60] ZHANG X J, LIU L, MA C, et al. Improving the level of the cytidine biosynthesis in *E. coli* through atmospheric room temperature plasma mutagenesis and metabolic engineering[J]. Journal of Applied Microbiology, 2024, 135(6): lxae133.
- [61] Belinda Amanda Nyabako. 基于常压室温等离子体诱变 (ARTP) 结合适应性进化 (ALE) 提高嗜酸乳杆菌的耐酸性能 [D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- NYABAKO B A. Enhancing acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus* atmospheric and room temperature plasma (ARTP) with adaptive laboratory evolution (ALE) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.
- [62] REN Y, YANG X W, DING L T, et al. Adaptive evolutionary strategy coupled with an optimized biosynthesis process for the efficient production of pyrroloquinoline quinone from methanol [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16 (1): 11.
- [63] ZHOU K, YU C, LIANG N, et al. Adaptive evolution and metabolic engineering boost lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* via enhanced precursors supply and utilization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(8): 3821-3831.
- [64] ZHANG Z C, SHAH A M, MOHAMED H, et al. Improved laccase production in *Pleurotus djamor* RP by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2022, 58: 1-9.
- [65] YE J C, YANG P H, ZHOU J W, et al. Efficient production of a thermostable mutant of transglutaminase by *Streptomyces*

- mobarraensis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(8): 4207-4216.
- [66] GAO X L, LIU E M, YIN Y Y, et al. Enhancing activities of salt-tolerant proteases secreted by *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room-temperature plasma mutagenesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(9): 2757-2764.
- [67] 马东旭, 李忠辉, 张子恒, 等. 高产单宁酶黑曲霉菌株的常温常压等离子体诱变选育及发酵工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(12): 115-122.
- MA D X, LI Z H, ZHANG Z H, et al. Atmospheric room temperature plasma mutagenesis breeding and fermentation optimization of *Aspergillus niger* with high yield of tannase[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(12): 115-122.
- [68] 张鑫, 凤元邦, 冯雪, 等. 紫外-LiCl联合 ARTP 诱变选育高产花生四烯酸的高山被孢霉突变株[J]. 中国油脂, 2025, 50(4): 82-87, 110.
- ZHANG X, FENG Y B, FENG X, et al. Breeding of *Mortierella alpina* mutants with high yield of arachidonic acid by UV-LiCl combined with ARTP mutagenesis[J]. China Oils and Fats, 2025, 50(4): 82-87, 110.
- [69] YANG H, ZHANG B, WU Z D, et al. Synergistic application of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and adaptive laboratory evolution improves the tolerance of *Escherichia coli* to L-cysteine[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(2): 2300648.
- [70] SHANGGUAN L L, ZHANG H Y, LIU Z X, et al. Improved glutamic acid production capacity of *Corynebacterium glutamicum* by the ARTP mutagenesis method[J]. Fermentation, 2023, 9(7): 599.
- [71] CAI M, WU Y Z, QI H, et al. Improving the level of the tyrosine biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through *HTZI* knockout and atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(1): 49-62.
- [72] WANG Q, JIN W B, ZHOU X, et al. Enhancing docosahexaenoic acid production in *Aurantiochytrium* species using atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and comprehensive multi-omics analysis[J]. Science of The Total Environment, 2024, 912: 169217.
- [73] WU J, LI Y L, YIN J B, et al. Mutation breeding of high-stress resistant strains for succinic acid production from corn straw [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 278.
- [74] ZHANG H Y, ZHANG D G, LIU R, et al. Enhanced pentostatin production in *Actinomadura* sp. by combining ARTP mutagenesis, ribosome engineering and subsequent fermentation optimization[J]. Fermentation, 2023, 9(4): 398.
- [75] SONGNAKA N, LERTCANAWANICHAKUL M, HUTAPEA A M, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis improved the anti-MRSA activity of *Brevibacillus* sp. SPR20[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(15): 12016.
- [76] ZHU C Y, ZHAO X Y, LYU Z Y, et al. Daptomycin production enhancement by ARTP mutagenesis and fermentation optimization in *Streptomyces roseosporus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(10): 1xad230.
- [77] LI T T, CHEN L J, WU D, et al. The structural characteristics and biological activities of intracellular polysaccharide derived from mutagenic *Sanghuangporous sanghuang* strain[J]. Molecules, 2020, 25(16): 3693.
- [78] YUN J H, ZABED H M, ZHANG Y F, et al. Improving tolerance and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* using physical mutagenesis, adaptive evolution and genome shuffling[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 127967.
- [79] ZHANG N, JIANG Y, SUN Y J, et al. 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.
- [80] HONG K Q, FU X M, LEI F F, et al. Selection of salt-tolerance and ester-producing mutant *Saccharomyces cerevisiae* to improve flavour formation of soy sauce during co-fermentation with *Torulopsis globosa*[J]. Foods, 2023, 12(18): 3449.
- [81] JI S L, XIE X Y, ZHANG Y, et al. Atmospheric and room temperature plasma treatment to improve methanol tolerance and catalytic activity of *Mucor circinelloides* for one-step biodiesel production[J]. Fuel, 2025, 387: 134343.
- [82] LUO H, ZHAO Z J, HUANG R, et al. High-temperature fermentation of corn stover for biodiesel production using *Candida tropicalis* with enhanced lipid accumulation: a new strategy for breeding thermotolerant biodiesel-production strains[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 206: 117542.
- [83] BAN S D, LIN W T, LUO Z W, et al. Improving hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by reducing chlorophyll content via atmospheric and room temperature plasma[J]. Bioresource Technology, 2019, 275: 425-429.
- [84] ELSHOBARY M E, ZABED H M, QI X H, et al. 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.
- [85] ZHANG L Z, LIN Y N, YI X Q, et al. Engineering low-salt growth *Halomonas bluephagenesis* for cost-effective bioproduction combined with adaptive evolution[J]. Metabolic Engineering, 2023, 79: 146-158.

- [86] BAI R X, CHEN J L, HAO Y Q, et al. ARTP mutagenesis of *Aureobasidium pullulans* RM1603 for high pullulan production and transcriptome analysis of mutants[J]. Archives of Microbiology, 2024, 206(9): 375.
- [87] ZHANG C Z, LI Y, ZHANG T S, et al. Increasing chitosanase production in *Bacillus cereus* by a novel mutagenesis and screen method[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 266-277.
- [88] ZHANG C, SUN Q, YANG L, et al. Mutation breeding of *Monascus* to produce a high yield of orange pigment and low citrinin content using the ARTP method[J]. Journal of Fungi, 2024, 10(8): 553.
- [89] 张少伦, 高聪, 李晓敏, 等. 代谢工程改造克雷伯氏菌生产1,3-丙二醇[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2386-2402.
ZHANG S L, GAO C, LI X M, et al. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2386-2402.
- [90] HASSAN F S, EL-FAKHARANY E M, EL-MARADNY Y A, et al. Comprehensive insight into exploring the potential of microbial enzymes in cancer therapy: progress, challenges, and opportunities: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277: 134535.
- [91] KUDDUS M, ROOHI, BANO N, et al. Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications[J]. Microbial Biotechnology, 2024, 17(4): e14467.
- [92] THAPA S, LI H, OHAIR J, et al. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives[J]. Molecular Biotechnology, 2019, 61(8): 579-601.
- [93] JIANG N, ZHANG A, MIRUKA A C, et al. Synergistic effects and mechanisms of plasma coupled with peracetic acid in enhancing short-chain fatty acid production from sludge: motivation of reactive species and metabolic tuning of microbial communities[J]. Bioresource Technology, 2023, 387: 129618.
- [94] LI D A, SHEN J, DING Q, et al. Recent progress of atmospheric and room-temperature plasma as a new and promising mutagenesis technology[J]. Cell Biochemistry and Function, 2024, 42(3): e3991.
- [95] ABDEL-RAZEK A S, EL-NAGGAR M E, ALLAM A, et al. Microbial natural products in drug discovery[J]. Processes, 2020, 8(4): 470.
- [96] ZHANG J, HANSEN L G, GUDICH O, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine [J]. Nature, 2022, 609(7926): 341-347.
- [97] MEDEMA M H, BREITLING R, BOVENBERG R, et al. Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(2): 131-137.
- [98] LOVE J. Microbial pathways for advanced biofuel production [J]. Biochemical Society Transactions, 2022, 50(2): 987-1001.
- [99] CHEN G Y, ZHAO K G, LI W Q, et al. A review on bioenergy production from duckweed[J]. Biomass and Bioenergy, 2022, 161: 106468.
- [100] KEASLING J, GARCIA MARTIN H, LEE T S, et al. Microbial production of advanced biofuels[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(11): 701-715.
- [101] JIANG Y J, DONG W L, XIN F X, et al. Designing synthetic microbial consortia for biofuel production[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(8): 828-831.



通讯作者: 钟近艺(1975—),女,研究员,博士生导师。研究方向为核生化防护技术。

E-mail: jy.zhong@giat.ac.cn



第一作者: 钟奶才(1999—),男,硕士研究生。研究方向为等离子体微生物育种。

E-mail: kylian66@163.com