

常压室温等离子体诱变选育高产脂肪酶 解脂耶氏酵母

Breeding of *Yarrowia lipolytica* with high lipase production by
atmospheric room temperature plasma mutagenesis

季亚美^{1,2} 王立梅² 齐 斌^{1,2}

Ji Ya-mei^{1,2} WANG Li-mei² QI Bin^{1,2}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215000; 2. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215000, China;

2. College of Biological Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500, China)

摘要:采用常压室温等离子体 (Atmospheric room temperature plasma, ARTP) 对产脂肪酶的解脂耶氏酵母菌株 YL₁ 进行诱变; 通过三丁酸甘油酯平板法、p-NPP 法以及酸碱滴定法等筛选得到高产脂肪酶的目标菌株 C4, 并研究其遗传稳定性。结果表明, 解脂耶氏酵母菌株 YL₁ 的最佳诱变时间为 60 s, 菌株致死率达 97.45%; 突变株 C4 的脂肪酶酶活为 13.4 U/mL, 较出发菌株提高了 82.6%, 多次培养后遗传稳定; 与出发菌株相比, 突变株脂肪酶可使维生素 A 棕榈酸酯的合成转化率提高 36.9%。

关键词:常压室温等离子体; 解脂耶氏酵母; 脂肪酶

Abstract: A lipase-producing *Yarrowia lipolytica* strain YL₁ was mutagenized by atmospheric room temperature plasma. Tributyrin plate method, p-NPP method and acid-base titration method were used to screen out the target strain C4 with high lipase production, and then its genetic stability was studied. The results showed that the optimal mutagenesis time of *Y. lipolytica* strain YL₁ was 60 s, and the lethality rate of the strain reached 97.45%. The lipase activity of the mutant strain C4 was 13.4 U/mL, which was 82.6% higher than the original strain, and it was genetically stable after multiple generations of culture. Compared with the original strain, the mutant strain lipase could increase the synthesis-conversion rate of vitamin A palmitate by 36.9%.

Keywords: atmospheric room temperature plasma; *Yarrowia lipolytica*; lipase

维生素 A 是人体必需的微量营养素之一, 具有促进人体生长发育, 维持免疫, 癌症预防以及维持视力和上皮屏障^[1-3]等作用, 在医药、食品各行业具有广阔的市场。维生素 A 性质非常不稳定, 容易被光、热和氧气分解, 可以合成性质更为稳定的维生素 A 棕榈酸酯。

脂肪酶 (Triacylglycerol acylhydrolase, E.C. 3.1.1.3) 是一种可以在油水界面催化三酰甘油酯水解释放脂肪酸、甘油单酯、甘油二酯和甘油, 并且催化合成各种酯类的酶^[4]。脂肪酶在有机溶剂中结构稳定, 可以在低水条件下催化酯化或者酯交换反应, 对底物具有较高的专一性和选择性^[5], 并且具有催化活性高、反应条件温和、反应迅速、固定化后可重复利用^[6-9]等优点, 已被广泛应用于多种工业生产及商业应用中, 被认为是继蛋白酶和淀粉酶之后销量第三的酶类^[10]。

贺秋红等^[11]通过筛选鉴定得到一株产脂肪酶的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 并对其发酵培养基进行优化, 最终脂肪酶酶活达 4.3 U/mL, 较优化前提高了 16.22%。贾佳等^[12]以黑曲霉 *Aspergillus niger* G27 为出发菌株, 通过亚硝基胍对其原生质体进行诱变处理, 筛选得到 2 株遗传稳定的高产脂肪酶菌株, 与出发菌株相比, 酶活分别提高了 22.9% 和 20.1%。Pereira 等^[13]以芒果废料为材料, 优化解脂耶氏酵母脂肪酶生产条件, 其最大酶活可达 3.41 U/mL。Lopes 等^[14]以废弃食用油为底物, 诱导解脂耶氏酵母 W29 生产脂肪酶, 脂肪酶酶活达 12 U/mL。Cui 等^[15]对解脂耶氏酵母 Lip2 脂肪酶的固定化载体进行改性, 并将其应用于维生素 A 棕榈酸酯的合成。

野生菌株某些特性无法满足越来越高的工业需求, 因此需要对菌株进行诱变育种, 提高菌株的性能, 从而满足生产需求。常压室温等离子体 (Atmospheric room temperature plasma, ARTP) 诱变是一种新兴的诱变技

基金项目:江苏省科技厅重点研发计划 (重点) 项目 (编号: BE2018320; BE2020386); 苏州市科技计划项目 (编号: SS2019031; SS201818)

作者简介:季亚美, 女, 苏州大学在读硕士研究生。

通信作者:齐斌 (1965—), 男, 苏州大学研究员, 博士。

E-mail: qibin65@126.com

收稿日期:2020-09-01

术,与传统的诱变方法如紫外诱变、化学诱变相比,ARTP可以在室温常压下高效诱导 DNA 双链断裂,引发细胞 SOS 修复机制并得到大量高突变体样本^[16],其操作安全、方便,因此已成为微生物诱变育种领域的研究热点^[17-18]。Liu 等^[19]、Yuan 等^[20]通过 ARTP 对高产赤藓糖醇和高产丙酮酸的解脂耶氏酵母进行了选育,但目前尚未见通过 ARTP 筛选高产脂肪酶的解脂耶氏酵母的报道。试验拟以一株解脂耶氏酵母菌株 YL₁ 为研究对象,通过 ARTP 诱变,对其进行改造,以期筛选获得高产脂肪酶且遗传性能稳定的目标解脂耶氏酵母菌株,并将其应用于维生素 A 棕榈酸酯的合成,以提高维生素 A 棕榈酸酯的转化率,为维生素 A 棕榈酸酯的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

酵母菌株 YL₁: 实验室保藏;

酵母提取物: 英国 Oxoid 公司;

蛋白胨: 北京奥博星生物技术有限责任公司;

葡萄糖、蔗糖、硫酸镁、磷酸氢二钾、无水乙醇、橄榄油:

分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司;

硫酸铵: 生工生物工程(上海)股份有限公司;

三丁酸甘油酯: 上海源叶生物科技有限公司;

琼脂粉: 南京茂捷微生物科技有限公司。

1.1.2 培养基

YPD 培养基: 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min;

发酵培养基: 蛋白胨 20 g, 蔗糖 5 g, 橄榄油乳化液 30 mL, (NH₄)₂SO₄ 1 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min;

三丁酸甘油酯培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 10 g, NaCl 10 g, 三丁酸甘油酯 2 mL, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器设备

全温振荡培养箱: ZQZY-CF 型, 上海知楚仪器有限公司;

组织捣碎匀浆机: JJ-2B 型, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;

高效液相色谱仪: SPD-20AV 型, 日本 Shimadzu 公司;

微孔板分光光度计: XMARK 型, 美国 Bio-Rad 公司;

恒温培养箱: GHP-9270 型, 上海索普仪器有限公司;

电子天平: XS105DU 型, 梅特勒-托利多(上海)有限公司;

高速台式离心机: Legend Micro 17R 型, 美国 Thermo 公司;

ARTP 诱变育种仪: II S 型, 无锡源清天木生物科技

有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备 挑取活化后的 YL₁ 酵母菌接种至 YPD 液体培养基中, 于 28 °C、150 r/min 下培养 24 h, 制成种子液, 其 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8。种子液以体积分数 1% 接入 YPD 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 下培养至对数期, 取 1 mL 菌液, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 离心后的沉淀加无菌生理盐水悬浮, 使其 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8, 添加甘油保护使其终浓度为 5%, 即为菌体悬浮液。

1.2.2 YL₁ 菌株生长曲线测定 种子液以体积分数 1% 接种至 YPD 液体培养基, 于 28 °C、150 r/min 下振荡培养, 每隔 2 h 取样, 测定 600 nm 处的吸光值, 绘制 YL₁ 菌株生长曲线并确定其对数生长期。

1.2.3 ARTP 诱变致死率曲线测定 无菌环境中取 10 μL 菌体悬浮液均匀涂于无菌载片上, 将载片转移至提前灭菌处理的 ARTP 中, 功率 120 W, 照射距离 2 mm, 工作气体为纯度 99.999% 的氦气, 气量 10 SML, 处理时间分别为 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 s。将诱变处理后的载片置于装有 1 mL 无菌生理盐水的 EP 管中振荡洗脱 2 min 并梯度稀释后涂布, 28 °C 培养 2 d, 记录每个梯度的菌落数。以出发菌株为参照, 按式(1)计算致死率。

$$Z = \frac{X - X_1}{X} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Z——菌株致死率, %;

X——对照组菌落数;

X₁——ARTP 处理后的菌落数。

1.2.4 高产脂肪酶解脂耶氏酵母初筛

(1) 三丁酸甘油酯平板筛选: 根据致死率曲线设置合适的诱变参数进行诱变处理, 将处理后的菌悬液适度稀释并涂布至三丁酸甘油酯培养基, 28 °C 培养 2~3 d, 测定菌落水解圈直径(H)与菌落直径(C), A₀ 记为出发菌株, 对突变株进行编号, 选取 H/C 值较大的菌落进行液体培养, 备用。

(2) p-NPP 法筛选: 96 孔板中每孔加入 200 μL 发酵培养基, 将上述菌液以体积分数 3% 接种至各孔中, 28 °C、150 r/min 下于全温振荡培养箱中发酵。每 12 h 取样 5 μL 至另一 96 孔板中测定发酵液酶活。除 5 μL 样品外, 每孔中加入 100 μL 0.05 mol/L、pH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液和 5 μL 3 mg/mL、溶剂为乙腈的 p-NPP 溶液, 于 40 °C、150 r/min 下反应 30 min, 利用酶标仪测定 405 nm 处各孔吸光度, 比较突变株和出发菌株的测量值并计算相对酶活^[21], A₀ 记为出发菌株, 相对酶活为 1, 对突变株重新进行编号, 挑选出相对酶活较高的菌株。

1.2.5 高产脂肪酶解脂耶氏酵母复筛 将初筛挑选出的菌株和出发菌株分别接入 YPD 液体培养基, 28 °C、

150 r/min 下培养 24 h,将菌液按体积分数 3% 转接至发酵培养基中,30 ℃、150 r/min 下于全温振荡培养箱中摇瓶发酵,每 12 h 取样 1 mL,5 000 r/min 离心 6 min,取上清液测定脂肪酶酶活。

1.2.6 遗传稳定性分析 将突变株分别连续传代 5 次,并检测每代菌种在相同条件下发酵后的脂肪酶酶活,从而验证突变株的遗传稳定性。

1.2.7 酶活测定 按 GB/T 23535—2009 执行,并按式(2) 计算酶活力^[22]。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 50 \times n_1}{0.05} \times \frac{1}{15}, \quad (2)$$

式中:

X——样品酶活力,U/mL;

V₁——滴定样品时消耗的 NaOH 标准溶液体积,mL;

V₂——滴定空白时消耗的 NaOH 标准溶液体积,mL;

c——NaOH 标准溶液浓度,mol/L;

50——每 1 mL 0.05 mol/L NaOH 标准溶液相当于 50 μmol 脂肪酸;

n₁——样品稀释倍数,取值为 1;

0.05——NaOH 标准溶液浓度换算系数;

$\frac{1}{15}$ ——反应时间为 15 min,以 1 min 计。

1.2.8 维生素 A 棕榈酸酯的转化 向 25 mL 具塞锥形瓶中加入 0.164 g 维生素 A 醋酸酯、0.32 g 棕榈酸、0.48 g 冷冻干燥后的酶粉和 10 mL 正己烷,30 ℃、200 r/min 下振荡反应 24 h,取反应液 1 mL,吸取 20 μL 进样,高效液相色谱分析检测。色谱柱为 InertSustain C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为 100% 甲醇,检测器为 SPD-20AV,检测波长 327 nm,流速 1 mL/min,按外标法^[23-24] 计算。以反应体系内酯化生成维生素 A 棕榈酸酯的量计算转化率,并按式(3)进行计算。

$$Z = \frac{C}{C_1} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

Z——转化率,%;

C——生成的维生素 A 棕榈酸酯的摩尔数,mol;

C₁——起始的底物维生素 A 醋酸酯的摩尔数 mol。

1.2.9 数据处理 采用 Origin 8.0、SPSS 20.0 及 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 YL₁ 酵母菌生长曲线

由图 1 可知,将菌液以体积分数 1% 接入 YPD 液体培养基中,接种 14 h 内菌体浓度几乎没有变化,属于菌株生长延滞期;14~38 h 内菌株处于对数生长期,此时菌株适应环境后迅速繁殖,生长代谢旺盛;38 h 后菌株进入稳

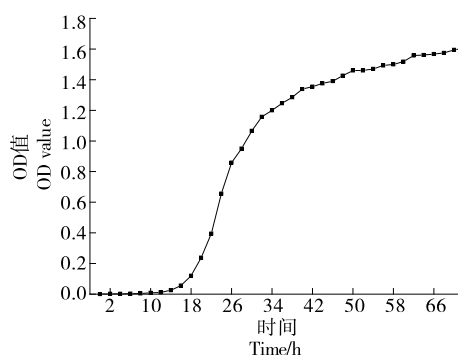


图 1 YL₁ 酵母菌生长曲线

Figure 1 YL₁ yeast growth curve

定期。当菌株处于对数期时,菌体繁殖迅速,代谢活性很高,易发生突变且重复性好^[25]。因此,选择接种 26 h 时的菌株进行诱变试验。

2.2 最佳诱变时间的确定

由图 2 可知,随着诱变处理时间的延长,菌株致死率明显升高。当诱变处理时间为 45 s 时,致死率为 25.04%;当诱变处理时间为 60 s 时,致死率为 97.45%;当诱变处理时间为 105 s 时,致死率为 98.5%;当诱变处理时间为 120 s 时,致死率接近 100%。Lu 等^[26-29] 认为,致死率较高时更易发生突变且正突变率较高。为了提高筛选效率以及获得足够进行筛选的样本,选择诱变处理时间为 60 s,其致死率为 97.45%。

2.3 高产脂肪酶菌株初筛

2.3.1 三丁酸甘油酯平板筛选 菌株产生的脂肪酶会分解三丁酸甘油酯,形成水解圈,水解圈越大说明菌株产脂肪酶能力越强。三丁酸甘油酯平板见图 3,其筛选结果见表 1。

由表 1 可知,出发菌株 A0 的 H/C 值为 6.0,从 83 株突变株中挑选 H/C 值>6.0 的 58 株突变株进行后续试验。

2.3.2 p-NPP 法筛选 H/C 值>6.0 的 58 株突变株接入 96 孔板发酵 60 h 后的相对酶活如图 4 所示。由图 4 可知,大部分菌株发生正向突变,其中有 8 株正突变菌株的脂肪酶相对酶活比出发菌株的提高了 40%~90%,编号

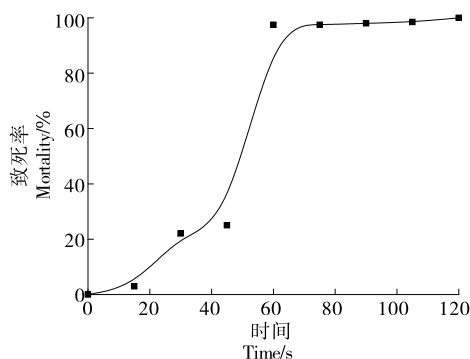


图 2 诱变处理时间对菌株 YL₁ 致死率的影响

Figure 2 Effects of different treatment time on lethality rate of strain YL₁

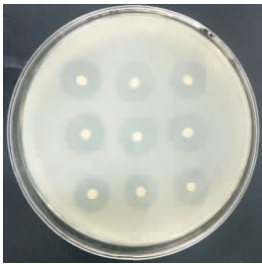


图 3 三丁酸甘油酯平板图
Figure 3 Picture of tributyrin plate

分别为 A6、A10、B3、C2、C4、D7、D8 和 E4,从中挑选 A6、A10、C4 和 E4 4 株菌株进行后续试验。

2.4 高产脂肪酶菌株复筛

将 4 株突变株接种至摇瓶发酵,24 h 后每 12 h 取样测定酶活,其结果如图 5 所示。由图 5 可知,与出发菌株 A0 相比,4 株突变株的酶活均有一定提高,当发酵时间为 60 h 时酶活最高。发酵培养 60 h 后,出发菌株 A0 酶活为 7.34 U/mL,突变株 A6 酶活为 12.22 U/mL,比出发菌株酶活提高了 66.5%;突变株 A10 酶活为 11.21 U/mL,

表 1 三丁酸甘油酯平板筛选结果
Table 1 Results of tributyrin plate screening

菌株编号	H/C 值	菌株编号	H/C 值	菌株编号	H/C 值	菌株编号	H/C 值
A0	6.0	21	6.9	42	7.3	63	7.4
1	6.8	22	7.5	43	8.7	64	5.3
2	5.3	23	8.5	44	6.7	65	5.7
3	6.5	24	8.2	45	9.8	66	7.8
4	7.0	25	6.5	46	7.7	67	6.5
5	7.8	26	8.5	47	8.2	68	7.2
6	9.5	27	5.5	48	7.4	69	8.5
7	7.5	28	7.4	49	6.0	70	8.7
8	8.0	29	7.8	50	6.0	71	7.7
9	8.3	30	5.5	51	7.4	72	5.8
10	9.2	31	5.3	52	6.0	73	4.0
11	7.3	32	6.6	53	5.5	74	7.0
12	8.0	33	8.2	54	5.6	75	7.0
13	8.3	34	7.1	55	7.1	76	6.0
14	9.0	35	8.3	56	7.0	77	4.5
15	7.0	36	6.8	57	7.2	78	5.5
16	7.7	37	5.7	58	6.8	79	6.0
17	7.5	38	5.8	59	6.7	80	5.8
18	8.3	39	5.9	60	6.0	81	5.5
19	6.8	40	6.0	61	6.9	82	7.0
20	7.6	41	5.5	62	6.5	83	6.5

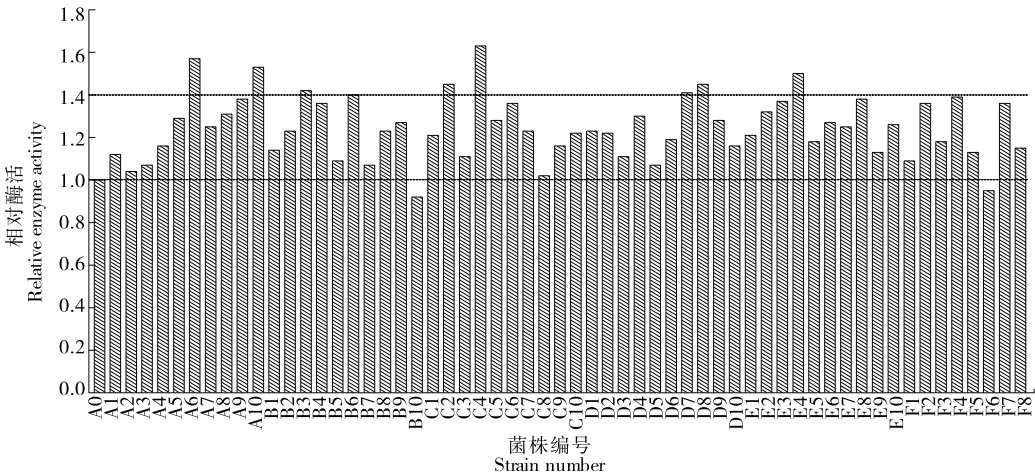


图 4 出发菌株及突变株的相对酶活
Figure 4 Relative enzyme activity of original bacteria and mutant

比出发菌株酶活提高了 52.7%；突变株 C4 酶活为 13.76 U/mL，比出发菌株酶活提高了 87.5%；突变株 E4 酶活为 9.49 U/mL，比出发菌株酶活提高了 29.3%。因此，确定突变株 C4 为目标菌株。96 孔板筛选显示酶活提高的菌株在摇瓶发酵中也表现了高酶活，说明 96 孔板快速筛选突变株脂肪酶的方法是可行的。但是由于 96 孔板发酵体系的缩小，可能会导致发酵过程中含氧量、营养成分的变化，限制酶产量，使最终结果不够精准。因此，96 孔板筛选可以初步大批量初筛，提高筛选效率，缩小范围后摇瓶复筛得到最优菌株。

2.5 遗传稳定性试验

由图 6 可知，第 1 代菌株产脂肪酶酶活最高为 13.84 U/mL，虽然每代菌株的产脂肪酶能力存在微小差距，但酶活基本维持在 13.40 U/mL 左右，差异不显著 ($P>0.05$)。因此，突变株 C4 的遗传性能稳定，与任春梅等^[30]的重组菌株 *P. pastoris* X-33/pPICZαA-CALB 相比，突变株 C4 的发酵时间缩短至 60 h，且酶活更高。

2.6 维生素 A 棕榈酸酯的转化率

出发菌株 A0 和突变株 C4 发酵后制得粗酶粉，正己烷体系内转化 24 h 后的样液 HPLC 结果如图 7 所示。由图 7 可知，出发菌株 A0 和突变株 C4 反应液中维生素 A

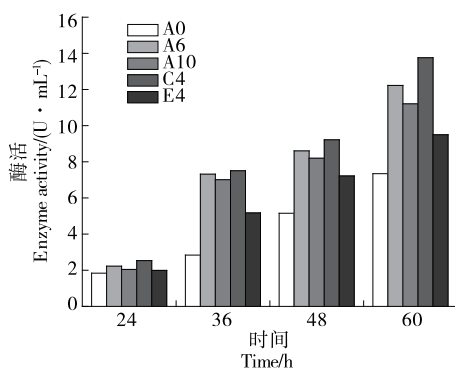


图 5 出发菌株及突变株摇瓶复筛的酶活

Figure 5 Enzyme activity of original strains and mutant strains in shake flask rescreening

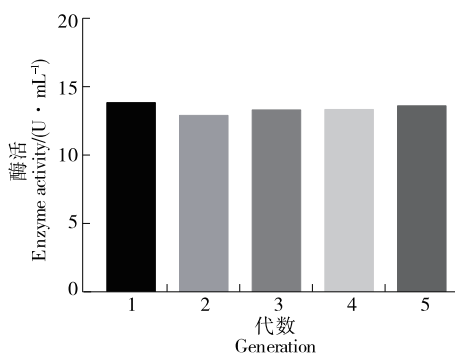


图 6 突变株 C4 脂肪酶活力的测定及其遗传稳定性分析

Figure 6 Genetic stability of mutant strain C4 for lipase production

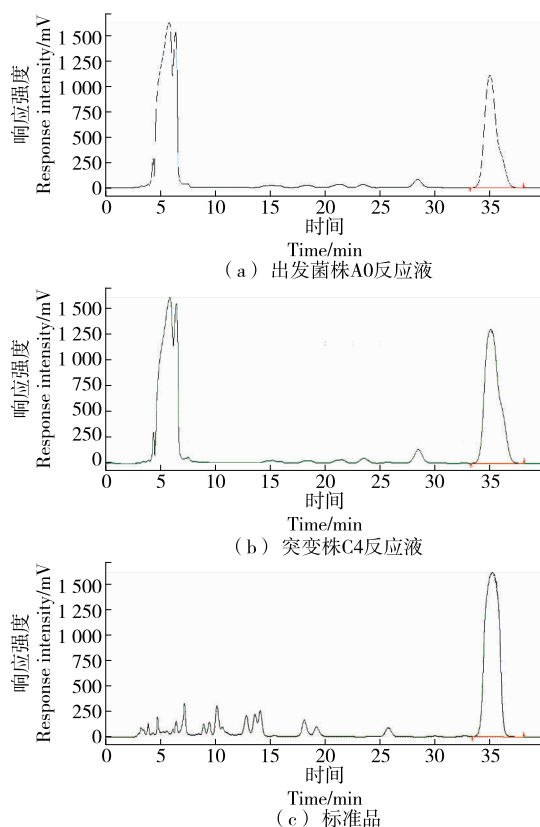


图 7 高效液相色谱图

Figure 7 The HPLC figure

棕榈酸酯的保留时间分别为 35.034, 35.064 min，与标品的保留时间 (35.271 min) 基本一致，故确定产物为维生素 A 棕榈酸酯。通过计算，突变株 C4 较出发菌株 A0 催化合成维生素 A 棕榈酸酯的转化率提高了 36.9%。

3 结论

以解脂耶氏酵母菌株 YL₁ 为研究对象，利用常压室温等离子体诱变技术对出发菌株进行处理，研究诱变时间对菌株致死率的影响，确定处理菌株的最佳时间为 60 s，此时致死率为 97.45%。采用三丁酸甘油酯平板试验和 p-NPP 法结合初步筛选突变菌株，经摇瓶复筛和遗传稳定性试验确定目标菌株 C4，其脂肪酶酶活为 13.4 U/mL，较出发菌株 A0 提高了 82.6%。该菌株所产脂肪酶可以应用于维生素 A 棕榈酸酯的转化，与出发菌株相比，突变株 C4 的转化率提高了 36.9%。但该研究仅将诱变菌株 C4 所产脂肪酶在维生素 A 棕榈酸酯转化中与出发菌株进行了对比，后续试验有待进一步优化发酵培养基以提高脂肪酶酶活。

参考文献

- [1] GONÇALVES A, ESTEVINHO B N, ROCHA F. Microencapsulation of vitamin A: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 51: 76-87.

- [2] O'BYRNE S M, BLANER W S. Retinol and retinyl esters: Biochemistry and physiology[J]. J Lipid Res, 2013, 54(7): 1 731-1 743.
- [3] DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE A A, DA ROCHA SOUSA L, ALENCAR M, et al. Retinol palmitate and ascorbic acid: Role in oncological prevention and therapy[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1 394-1 405.
- [4] PEREIRA A D S, DINIZ M M, DE JONG G, et al. Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 139: 621-630.
- [5] POPPE J K, MATTE C R, PERALBA M D C R, et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases[J]. Applied Catalysis A: General, 2015, 490: 50-56.
- [6] ARRIETA M P, BARRERA RIVERA K A, SALGADO C, et al. Degradation under composting conditions of lysine-modified polyurethane based on PCL obtained by lipase biocatalysis[J]. Polymer Degradation and Stability, 2018, 152: 139-146.
- [7] FATHI Z, DOUSTKHAH E, EBRAHIMPOUR G, et al. Noncovalent immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase on dendritic-like amino acid-functionalized silica nanoparticles[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 502-512.
- [8] DE SOUZA C E C, RIBEIRO B D, COELHO M A Z. Characterization and application of *Yarrowia lipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 189(3): 933-959.
- [9] DA SILVA J R, DE SOUZA C E C, VALONI E, et al. Biocatalytic esterification of fatty acids using a low-cost fermented solid from solid-state fermentation with *Yarrowia lipolytica*[J]. 3 Biotech, 2019, 9(2): 38.
- [10] BORRELLI G M, TRONO D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 20 774-20 840.
- [11] 贺秋红, 巩志金, 颜梅. 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定及发酵培养基优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 84-88.
- [12] 贾佳, 林智, 曾密, 等. 产脂肪酶黑曲霉原生质体 NTG 诱变研究[J]. 中国饲料, 2016(15): 9-12, 15.
- [13] PEREIRA A D S, FONTES-SANT'ANA G C, AMARAL P F F. Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst[J]. Food and Bioproducts Processing, 2019, 115: 68-77.
- [14] LOPES M, MIRANDA S M, ALVES J M, et al. Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2019, DOI:10.1002/ejlt.201800188.
- [15] CUI Cai-xia, LI Lin-jing, LI Ming-jie. Improvement of lipase activity by synergistic immobilization on polyurethane and its application for large-scale synthesizing vitamin A palmitate[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2019, 49(5): 485-492.
- [16] XIN Rong-yu, XIE Wan-cui, XU Zhi-ying, et al. Efficient extraction of chitin from shrimp waste by mutagenized strain fermentation using atmospheric and room-temperature plasma[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155: 1 561-1 568.
- [17] CHENG Li-kun, WANG Jing, ZHAO Xiu-bao, et al. An antiphage *Escherichia coli* mutant for higher production of *L*-threonine obtained by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. Biotechnol Prog, 2020, DOI: 10.1002/btpr.3058.
- [18] QIU Cheng-gang, ZHANG A-lei, TAO Sha, et al. Combination of ARTP mutagenesis and color-mediated high-throughput screening to enhance 1-naphthol yield from microbial oxidation of naphthalene in aqueous system [J]. Frontiers of Chemical Science and Engineering, 2020, 14(5): 793-801.
- [19] LIU Xiao-yan, LV Jin-shun, XU Jia-xing, et al. Erythritol production by *Yarrowia lipolytica* mutant strain M53 generated through atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. Food Sci Biotechnol, 2017, 26(4): 979-986.
- [20] YUAN Wei, LIN Xiao-qiong, ZHONG Shuang, et al. Enhanced pyruvic acid yield in an osmotic stress-resistant mutant of *Yarrowia lipolytica*[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2020, 44: 19-24.
- [21] 曹茜, 冯凤琴. 产脂肪酶菌株的常压室温等离子体诱变及高通量筛选方法的建立[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(2): 52-57.
- [22] 陈刚, 缪铭, 江波, 等. 压力-温度协同作用下根霉脂肪酶的催化行为研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 3-7.
- [23] 董丛丛, 黄高凌, 杨远帆, 等. 固定化脂肪酶转酯化合成维生素 A 棕榈酸酯的分离纯化[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 122-127.
- [24] 张文娟, 朱凯, 韩萍芳. 超声酶促合成维生素 A 棕榈酸酯[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 316-319.
- [25] 刘辉, 何太波, 赵国森, 等. 耐高温酿酒酵母菌的筛选及发酵性能研究[J]. 酿酒科技, 2020(6): 46-49.
- [26] LU Yuan, WANG Li-yan, MA Kun, et al. 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.
- [27] 赵天惠, 张佰清. 耐受性枯草芽孢杆菌的脉冲强光诱变筛选及产酶活力分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 192-197.
- [28] 朱孟峰, 许伟, 邵荣, 等. 桑叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂产生菌的分离鉴定及诱变选育[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 111-116.
- [29] 王犁烨, 王浩臣, 马珊, 等. 常压室温等离子体选育高产酒精及酸的酿酒酵母[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 26-31.
- [30] 任春梅, 周玲妹, 柳志强. 南极假丝酵母脂肪酶 B 的克隆、表达及发酵条件优化[J]. 发酵科技通讯, 2014, 43(3): 6-10.