

碳离子束辐照诱变选育丁醇耐受菌株

高越^{1,2} 杨阳³ 张苗苗^{1,2} 郭晓鹏^{1,2} 李文建¹ 陆栋¹

¹(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

²(中国科学院大学 北京 100049)

³(兰州理工大学生命科学与工程学院 兰州 730050)

摘要 利用¹²C⁶⁺离子束辐照诱变出发菌株丙酮丁醇梭菌CICC 8012, 筛选获得了一株具有高产且高抗丁醇胁迫的丙酮丁醇梭菌突变株G01。通过比较两者的生理特性发现, 突变株G01比出发菌株具有更好的丁醇耐受性, 可在质量浓度19 g/L的丁醇培养基中良好生长, 且突变株G01的丁醇产量相较出发菌株CICC 8012提高了33%。结果表明, ¹²C⁶⁺离子束辐照诱变可有效地提高丙酮丁醇梭菌产丁醇和抵抗丁醇胁迫的能力。

关键词 ¹²C⁶⁺离子束, 辐照诱变, 丁醇发酵, 丁醇耐受

中图分类号 Q691.5, TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.010401

Carbon ion-beam irradiation screening of a butanol-tolerant mutant of *Clostridium acetobutylicum*

GAO Yue^{1,2} YANG Yang³ ZHANG Miaomiao^{1,2} GUO Xiaopeng^{1,2} LI Wenjian¹ LU Dong¹

¹(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT To improve butanol tolerance of *Clostridium acetobutylicum* strains, ¹²C⁶⁺ ion-beam irradiation screening identified a *C. acetobutylicum* mutant (G01) with high productivity and resistance to butanol stress. Compared with the wild type *C. acetobutylicum* CICC 8012, mutant G01 was resistant to 19 g/L butanol and exhibited a 33% higher butanol production. The results indicate that ¹²C⁶⁺ ion beam irradiation can increase butanol tolerance and productivity of *C. acetobutylicum*. These data provide a reference for further culture and development of industrially relevant strains of *C. acetobutylicum* that have higher butanol tolerance and productivity.

KEYWORDS ¹²C⁶⁺ ion beam, Irradiation mutation, Butanol fermentation, Butanol tolerance

CLC Q691.5, TL99

基金资助: 中国科学院重点部署项目(KFZD-SW-109)、中国科学院—工业技术研究院两院合作计划(CAS-ITRI201801)资助
第一作者: 高越, 女, 1992年10月出生, 2016年于天津科技大学获理学学士学位, 现为中国科学院近代物理研究所博士研究生, 辐射生物学专业, E-mail: gaoyue@impcas.ac.cn
通信作者: 陆栋, 博士, 副研究员, E-mail: ld@impcas.ac.cn
收稿日期: 初稿 2018-09-03; 修回 2018-11-16

Supported by the Key Deployment Projects of the Chinese Academy of Sciences (KFZD-SW-109), and CAS-ITRI cooperation program(CAS-ITRI201801)

First author: GAO Yue (female) was born in October 1992, and graduated with a bachelor's degree from Tianjin University of Science & Technology in 2016. Now she is a doctoral candidate at Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, majoring in radiation biology. E-mail: gaoyue@impcas.ac.cn

Corresponding author: Ph.D. LU Dong, associate professor, E-mail: ld@impcas.ac.cn

Received 03 September 2018; accepted 16 November 2018

石油资源是现代社会的能源和资源基础,由于石油资源紧缺而导致的石油价格持续上涨已成为不可逆转的趋势,迫切需要寻找环境友好,经济可行,可替代化石燃料的新型能源^[1]。丁醇以其亲水性弱,腐蚀性小,便于管道输送,能与汽油任意比混合等优良特性,成为一种极具潜力的新型生物燃料。目前,生物丁醇生产面临的主要问题是丁醇毒性造成的产物浓度低,导致丁醇发酵缺乏经济竞争力。菌株通过遗传、随机突变和基因重组等改造,增强其丁醇耐受性,将为提高丁醇生物合成的选择性和产物浓度创造有利条件。重离子束可提供较高的剂量分布^[2],且具有明显的生物效应,拥有广泛的突变谱,可提高突变频率;利用离子束辐照诱发突变的育种技术已取得重大进展,成为一种有效的育种方法,在微生物领域得到了广泛应用^[3]。Hu等^[4]利用碳($^{12}\text{C}^{6+}$)离子束辐照方式筛选出的H4002突变体具有较高的柠檬酸产量,为柠檬酸工业提供了强有力的竞争。Zhou等^[5]通过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照方式结合响应面优化,提高了从油性纤维中分离的新型生物源菌株的石油降解能力。由此可见, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照是一种高效的诱变育种方法。

丁醇作为一种重要的生物燃料和化工原料,其生物制备法已逐渐成为世界范围内的研究热点。当前,迫切需要解决的问题是进一步提高丙酮丁醇梭菌的丁醇耐受性,解决在ABE(丙酮-丁醇-乙醇)发酵过程中所产生的丁醇毒性问题。

本研究利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变技术对丙酮丁醇梭菌CICC 8012进行诱变,筛选出一株丁醇耐受性和丁醇产量显著提高的突变菌株G01。比较初发菌株丙酮丁醇梭菌CICC 8012和突变株G01在高浓度丁醇胁迫下的生长状态,并通过玉米粉发酵对两菌株进行丁醇代谢物产量的分析,从而对突变株G01抵抗丁醇胁迫的能力进行评价。通过研究突变菌株的生理特性,对其丁醇耐受性和产丁醇能力进行探讨,为选育适合工业生产的菌株提供新的诱变技术。

1 材料与方法

1.1 菌种

丙酮丁醇梭菌CICC 8012,购买于中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基与培养条件

梭菌生长培养基(Clostridial growth medium, CGM)(g/L):葡萄糖 50.00, K_2HPO_4 0.75, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.71, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 1.00, 天冬酰胺 2.00, 酵母提取物 5.00。

基础玉米粉培养基:70 g全玉米粉过40目筛,加1 L自来水不断搅拌,煮沸1 h使其糊化,分装于厌氧管中,121 °C灭菌30 min。

发酵玉米粉培养基(g/L):玉米粉 70.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.00, CaCO_3 3.00, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.00, KH_2PO_4 1.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH=6.5。

强化梭菌培养基(Reinforced clostridial medium, RCM)筛选平板^[6](g/L):肉膏 10.00, 蛋白胨 10.00, 酵母提取物 3.00, 葡萄糖 5.00, 淀粉 1.00, NaCl 5.00, 乙酸钠 3.00, 半胱氨酸盐酸盐 0.50, 琼脂 15.00。

梯度丁醇平板:取10 mL RCM培养基于9 cm培养皿中,立即将培养皿斜放(皿底需垫高皿径的1/16)。待凝固后,将培养皿平放,再加入含有丁醇(20 g/L)的RCM培养基10 mL。凝固后便得到丁醇从20 g/L到0逐渐递减的浓度梯度培养皿。

培养条件:为保证菌体良好生长和较高的溶剂产量,种子培养时控制培养温度37 °C,培养时间24 h,发酵培养控制接种量的体积分数为8%,37 °C发酵72 h至玉米粉培养基完全液化,形成醪盖,不再产气为发酵终止。

1.3 方法

1.3.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变选育高耐受丁醇菌株

将培养到对数中后期的菌悬液随机分为 n 组($5 \leq n \leq 10$),利用兰州重离子研究装置(HIRFL)提供的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束,能量为80 MeV/u,按照0、30、60、90、120和150 Gy的吸收剂量对丙酮丁醇梭菌CICC 8012菌种悬浮液分别进行辐照处理,每个剂量做3个平行;将诱变后的菌液,经适当稀释,涂布于RCM淀粉筛选培养基上,37 °C厌氧培养48 h,用碘液染色,挑取菌苔直径与淀粉透明圈直径比例大于对照的单菌落继续培养与保存。用无菌的0.1 mol磷酸钾缓冲液将初筛的菌落洗下来,收集菌体悬液,将菌体悬液均匀涂布到梯度丁醇平板(0~20 g/L)上,37 °C厌氧培养48 h。对高浓度丁醇区域长出来的菌落进行丁醇耐受性和产量的检测。

1.3.2 丁醇耐受性的比较

挑取丙酮丁醇梭菌 CICC 8012 及突变株单克隆接种于不同浓度丁醇 5 mL RCM 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养, 每隔 4 h 取样, 直至 72 h, 每次分别从 3 个厌氧瓶中各取 1 mL 发酵培养液, 混匀, 利用酶标仪测定波长在 600 nm 时的吸光度 (OD_{600}), 标记培养时间, 绘制菌体生长过程曲线, 分别进行 0、19 g/L 丁醇胁迫实验, 检测丙酮丁醇梭菌 CICC 8012 和突变株在不同浓度丁醇胁迫下的生长情况。

1.3.3 丁醇发酵实验

挑取丙酮丁醇梭菌 CICC 8012 及突变株单克隆接种于 5 mL RCM 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h 至对数期 ($OD_{600}=1.0$), 二次转接 RCM 培养基活化至菌体对数期作为种子液, 以体积分数为 8% 的接种量接种于玉米粉发酵培养基中, 37 °C 厌氧发酵 72 h, 至不产气终止发酵。

1.3.4 遗传稳定性实验

将筛选得到的突变菌株转接到 RCM 培养基中, 37 °C 培养 24 h 后作为 F1 代, 从 F1 代斜面转接至 RCM 培养基中, 37 °C 培养 24 h 后作为 F2 代, 以同样方式传代至 F5。取 F1、F2、F3、F4、F5 代斜面, 接种至玉米粉发酵培养基中进行 72 h 发酵培养, 测定发酵液中各溶剂含量, 考察其产溶剂稳定性。

1.4 溶剂分析检测方法

丙酮、丁醇、乙醇含量测定使用 456-GC 气相色谱仪(德国布鲁克公司), 以外标法定量分析。取发酵样品 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 用 0.22 μm 针头式过滤器过滤。色谱条件: 毛细管柱 (HP-INNOWAX, 30 m \times 0.32 mm), 检测器 (FID) 240 °C, 柱流量 3 mL/min, 载气(氮气)流量 28 mL/min, 空气流量 300 mL/min, 氢气流量 40 mL/min, 柱温 65~80 °C, 进样口温度 120 °C。

2 结果与分析

2.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变选育丁醇耐受突变菌株

由图 1 可知, 菌株 CICC 8012 经过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后, 存活率随着吸收剂量的增加而下降, 当剂量在 30 Gy 时, 存活率出现明显下降; 剂量在 30~150 Gy 时, 存活率变化相对较缓, 呈缓慢下降的趋势; 剂量 120 Gy 时致死率在 60% 左右, 在此剂量筛选到了最多的正突变体。将诱变后的菌株转接至

RCM 淀粉平板 37 °C 厌氧培养 48 h, 共挑取 125 株生长良好的单菌落到梯度丁醇平板中, 厌氧培养 36 h, 得到 34 株能在高浓度丁醇区域生长的突变菌株。对 34 株突变菌株进行玉米粉发酵复筛, 有 6 株 ABE 产量均有一定程度的提高, 其中一株被命名为 G01 的菌株, 相较于原始菌株 CICC 8012, 丁醇产量提高 33%(图 2)。后续对该菌株 G01 进行相关特性研究分析。

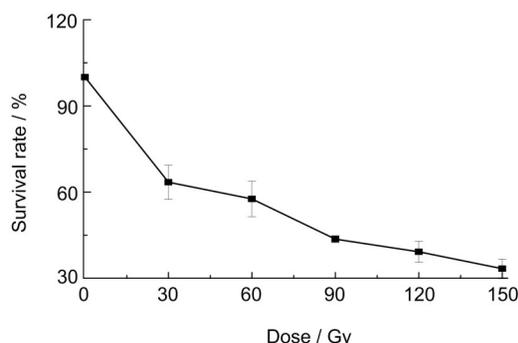


图 1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照丙酮丁醇梭菌 CICC 8012 存活曲线
Fig.1 Survival curve of *C. acetobutylicum* CICC 8012 after $^{12}\text{C}^{6+}$ ion-beam irradiation

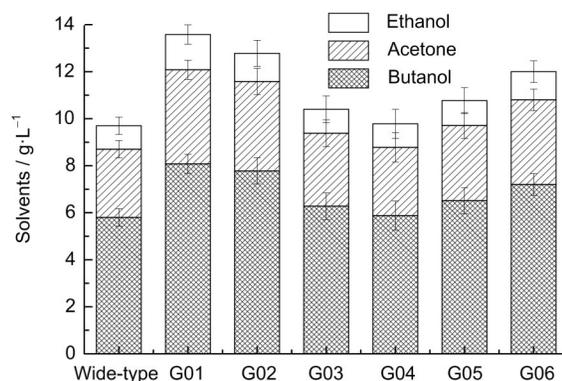


图 2 野生型菌株和突变株的丁醇产量
Fig.2 Butanol production by the wild-type and mutant strains

2.2 CICC 8012 和突变株的丁醇耐受性

将野生菌株丙酮丁醇梭菌 CICC 8012 和突变株接至不同丁醇浓度的 RCM 液体培养基中, 进行丁醇胁迫实验, 监测其生长曲线(图 3)。由图 3(a)可知, 在没有丁醇胁迫下, 野生菌株 CICC 8012 和突变株的生长曲线基本重合, 说明其在正常生长状态下无显著性差异。由图 3(b)可知, 突变株在 19 g/L 丁醇中可以生长, 但受到了部分抑制, 而野生菌株 CICC 8012 完全不能在 19 g/L 丁醇中生长, 其生长被完全抑制。结果表明, 突变株 G01 在丁醇毒害下具有更好的生长表现, 且能够耐受更高浓度的丁醇。

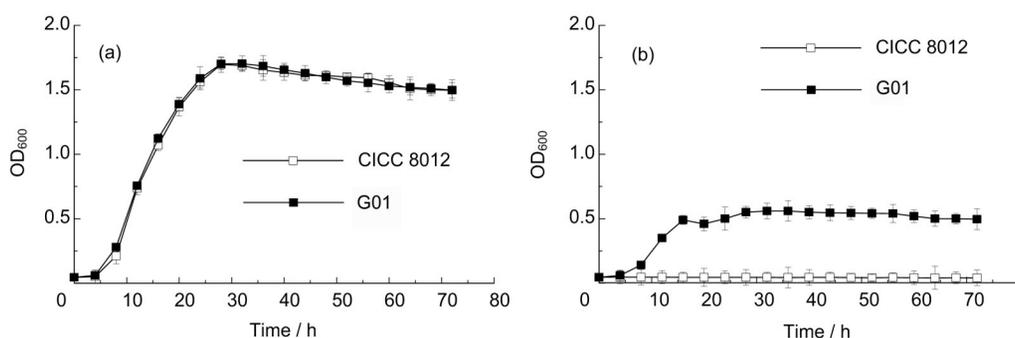


图3 野生型丙酮丁醇梭菌CICC 8012和突变菌株G01在含0 g/L丁醇(a)和19 g/L丁醇(b)培养基中的生长情况
Fig.3 Growth profiles of the wild-type strain CICC 8012 and the mutant G01 in nutrient medium with butanol mass concentration of 0 g/L (a) and 19 g/L (b)

2.3 CICC 8012和突变株丁醇发酵特性及遗传稳定性

为了获得突变株G01的更多发酵特征,将CICC 8012和突变株G01进行玉米醪发酵小试实验。分别进行了3次生物学重复实验取平均值作为最终结果,发酵结果见图4。突变株G01相较野生型菌株表现出更快的pH值下降阶段(12 h前),两菌株在酸的生产方面有相似的趋势,在24 h之前显著增加,之后缓慢减少趋于稳定。突变株G01在发酵过程中丁醇最高产量相对于野生型CICC 8012丁醇的产量提高了33%。由图4可知,突变株G01在12~24 h内丁醇产量迅速增长,生产速率达0.33 g/(L·h),随后生产速率逐渐减慢,40 h后,产量趋于稳定。结合发酵过程中pH值的变化,对比野生型菌株和突变株表明,G01可在较快时间内生产出较高浓度的产物丁醇,在发酵过程中可缩短发酵时间,提高生产速率。将突变株G01在RCM培养基中保存、传代,再测定其产溶剂能力,结果如表1所示。G01传代5次,其产溶剂能力并没有下降,依然保持稳定,表明G01有良好的遗传稳定性,可进一步研究和开发。

表1 突变株G01遗传稳定性
Table 1 ABE-producing stability of the mutant G01 in pass-generaion tests (g/L)

传代 Generation	丙酮 Acetone	丁醇 Butanol	乙醇 Ethanol	总溶剂 Solvent
F1	3.28±0.16	8.08±0.24	1.12±0.19	12.48
F2	3.33±0.44	7.94±0.56	1.24±0.26	12.51
F3	3.41±0.29	8.01±0.26	1.36±0.54	12.78
F4	3.58±0.13	8.12±0.58	1.20±0.29	12.90

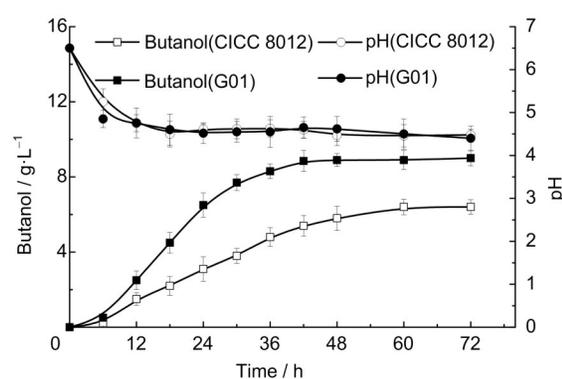


图4 野生型菌株*C. acetobutylicum* CICC 8012和突变株G01发酵曲线
Fig.4 Fermentation curves of *C. acetobutylicum* CICC 8012 and G01 displaying pH values and butanol production

3 讨论

丁醇耐受性是限制丁醇工业化发酵生产的重要因素。由于丁醇毒性机制具有复杂的多重效应,迄今为止,耐受并能产生高浓度丁醇的突变株非常少,所以分离到具有高耐受性的丁醇突变株对工业化生产意义重大。目前,国内外也有不少利用诱变技术以及基因工程手段来获得高耐受丁醇菌株的研究报道。毛绍名等^[7]利用紫外线-氯化锂复合诱变技术得到M6突变株,其丁醇耐受性提高了46%。Li等^[8]通过分离筛选得到一株GX01新丙酮丁醇梭菌,该菌株在耐受丁醇的情况下,可以利用木薯淀粉进行高水平和高稳定性丁醇的生产。Liu等^[9]通过氮离子束诱变获得丁醇突变株NT642可以耐受体积分数为3%的丁醇。在*C. acetobutylicum*中过量表达spo0A基因能显著增强其丁醇耐受性,并且在丁醇胁迫条件下能延长细胞代谢^[10]。热激蛋白在丙酮丁醇梭菌耐受性中扮演着重要的角色,在*C. acetobutylicum*中过量表达热激蛋白能显著增强宿

主的丁醇产量和耐受性^[11]。相较于当前工业化生产的菌株,本研究筛选得到的G01优势在于丁醇耐受性显著提高:首先,提高生产菌的溶剂耐受性可以保证微生物细胞在发酵过程中保持较好的细胞活性和较高的发酵性能;其次,有机溶剂是工业化生产中污染的主要来源之一,由于丁醇耐受菌及其它溶剂耐受菌具备在极端环境中生存及生长的能力,利用丁醇耐受菌进行生物修复,通过其生物转化,一定程度上消除环境污染,因此,有机溶剂耐受菌将具有更广泛的应用前景^[12]。

与传统的紫外线、X射线、 γ 射线和激光等常用的物理诱变源辐射育种手段相比,本研究利用的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变,具有突变率高、突变谱宽、育种周期短等优点。由于传统诱变源的反复利用,许多工业菌株都对其产生了耐受性, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照诱变育种技术的开展弥补了这一缺点,为辐射育种研究注入了新的活力^[13]。利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照技术在面包酵母^[14]、谷氨酸棒状杆菌^[15]和黑曲霉^[16]等微生物育种中已经取得了良好的效果。重离子因其致密的电离辐射特性,诱导细胞产生复杂的DNA团簇损伤,易产生有效突变株,使其在辐射生物诱变育种方面具有显著的优势,对工业发酵的发展将有很大的帮助,但 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子在丁醇菌株诱变方面鲜有研究报道^[17]。本研究将 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变技术应用到丙酮丁醇梭菌菌种育种中,成功地获得了一株可耐受浓度为19 g/L丁醇的突变菌株G01,通过比较出发菌株丙酮丁醇梭菌CICC 8012和突变株G01在0 g/L和19 g/L丁醇胁迫下的生理特性,发现突变株G01比出发菌株CICC 8012具有更好的丁醇耐受性,且突变株G01的丁醇产量相较出发菌株丙酮丁醇梭菌CICC 8012提高33%。菌种发酵产量受多种因素的影响,除了菌种的遗传特性,其发酵条件(发酵时间、温度、初始pH值、培养基、接种量等)同样会对微生物的生长和丙酮丁醇的合成产生影响。所以,为了将优良菌株的潜力充分发挥出来,还需对突变菌株的发酵条件进行优化,确立其最佳发酵工艺,进一步提高丁醇产量,为丁醇发酵工业化提供参考。研究表明,通过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变的方法,可将丙酮丁醇梭菌高耐受丁醇和高产丁醇的性能集于同一菌株,为选育优良的丁醇工业生产菌株提供新诱变思路。

参考文献

- Campos E J, Qureshi N, Blaschek H P. Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii*, BA101[M]// Finkelstein M, McMillan J D, Davison B H. Biotechnology for fuels and chemicals. New Jersey: Humana Press Inc., 2002: 553-561. DOI: 10.1007/978-1-4612-0119-9-45.
- Tsujii H, Kamada T. A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy[J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2012, 42(8): 670-685. DOI: 10.1093/jjco/hys104.
- Li Q. Biomedical research with heavy ions at the IMP accelerators[J]. Advances in Space Research, 2007, 40(4): 455-460. DOI: 10.1016/j.asr.2007.03.096.
- Hu W, Liu J, Chen J, et al. A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2014, 15(11): 1006. DOI: 10.1631/jzus.B1400132.
- Zhou X, Xin Z J, Lu X H, et al. High efficiency degradation crude oil by a novel mutant irradiated from *Dietzia* strain by $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ion using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2013, 137(137C): 386-393. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.097.
- Hirsch A, Grinstead E. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin[J]. Journal of Dairy Research, 1954, 21: 101-110. DOI: 10.1017/S0022029900007196.
- 毛绍名, 章怀云. 丙酮丁醇梭菌高耐丁醇突变株的选育及其生理特性的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(8): 103-107. DOI: 10.14067/j.cnki.1673-923x.2012.08.004.
MAO Shaoming, ZHANG Huaiyun. Study on screening the butanol-tolerant mutant of *Clostridium acetobutylicum* and its physiological characteristics[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(8): 103-107. DOI: 10.14067/j.cnki.1673-923x.2012.08.004.
- Li S, Guo Y, Lu F, et al. High-level butanol production from cassava starch by a newly isolated *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(4): 831-41. DOI: 10.1007/s12010-015-1781-1.
- Liu X B, Gu Q Y, Yu X B, et al. Erratum to: enhancement of butanol tolerance and butanol yield in *Clostridium acetobutylicum*, mutant NT642 obtained by nitrogen ion beam implantation[J]. Journal of Microbiology, 2013, 51

- (1): 145-145. DOI: 10.1007/s12010-015-1781-1.
- 10 Alsaker K V, Spitzer T R, Papoutsakis E T. Transcriptional analysis of *spo0A* overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress[J]. Journal of Bacteriology, 2004, **186**(7): 1959-1971. DOI: 10.1128/JB.186.7.1959-1971.2004.
- 11 Tomas C A, Beamish J, Papoutsakis E T. Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, **186**(7): 2006-2018. DOI: 10.1128/JB.186.7.2006-2018.2004.
- 12 Watanabe H, Tanji Y, Unno H, *et al.* Rapid conversion of toluene by an *acinetobacter* sp. Tol 5 mutant showing monolayer adsorption to water-oil interface[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, **106**(3): 226-230. DOI: 10.1263/jbb.106.226.
- 13 李仁民, 王菊芳, 李文建. 重离子束在微生物诱变育种及生物能源开发中的应用[J]. 原子核物理评论, 2007, **24**(3): 234-237. DOI: 10.11804/NuclPhysRev.24.03.234.
- LI Renmin, WANG Jufang, LI Wenjian. Application of heavy ion beams to microbial mutation breeding and exploitation of biological energy[J]. Nuclear Physics Review, 2007, **24**(3): 234-237. DOI: 10.11804/NuclPhysRev.24.03.234.
- 14 李奎清, 马良, 李文建. $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照环境下酵母高产 β -葡聚糖菌株筛选及条件优化研究[J]. 食品科技, 2017, **42**(3): 2-6. DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2017.03.003.
- LI Longqing, MA Liang, LI Wenjian. The selection for high-yield β -glucan production mutant strain by $^{12}\text{C}^{6+}$ -ion irradiation[J]. Food Science & Technology, 2017, **42**(3): 2-6. DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2017.03.003.
- 15 缪建顺, 曹国珍, 张苗苗, 等. 重离子束诱变选育谷氨酸高产菌株[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2015, **33**(5): 39-45. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rrj.33.050401.
- MIAO Jianshun, CAO Guozhen, ZHANG Miaomiao, *et al.* High-yield glutamic acid strain screened by heavy ion irradiation[J]. Journal of Radiation Research & Radiation Processing, 2015, **33**(5): 39-45. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rrj.33.050401.
- 16 Hu W, Liu J, Chen J, *et al.* A mutation of *aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor[J]. Journal of Zhejiang University B, 2014, **15**(11): 1006. DOI: 10.1631/jzus. B1400132.
- 17 贾蓉, 苏锋涛, 胡步荣. 重离子的辐射生物效应及其在生命科学中的应用[J]. 生物技术通报, 2018(1): 67-78. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0735.
- JIA Rong, SU Fengtao, HU Burong. The biological effects induced by heavy ion radiation and its application in life science[J]. Biotechnology Bulletin, 2018(1): 67-78. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0735.