

高密度发酵解脂假丝酵母生产 RNA 的工艺研究

林忠¹, 罗众球¹, 窦洁¹, 王慧¹, 邱蔚然², 曹静², 周长林^{1*}¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; ²南通秋之友生物科技有限公司, 南通 226236

摘要 为进一步优化 RNA 生产工艺, 通过对解脂假丝酵母发酵培养, 研究了 pH、溶氧、还原糖浓度、高密度补料分批发酵和高密度连续发酵等因素对 RNA 产量及还原糖转化成菌体的转化率(g-DCW/g-reducing sugar)的影响。实验结果表明, 最佳培养条件为 pH 4, 溶氧 30%。在分批发酵中, 培养基糖浓度为 40 g/L 时, 最高 DCW (dry cell weight) 可达 19.5 g/L, 培养时间为 8 h, RNA 最高含量达到 14.3% (g-RNA/g-DCW), 转化率为 48.2%。在最佳 pH 和溶氧条件下进行 pH-stat 补糖分批发酵, 控制罐内培养基糖浓度始终维持在 15 g/L 以下, 最高核酸含量达到 14.2%, 转化率达到 43.5%, 最高菌体浓度 35.6 g/L, 比 40 g/L 糖浓度条件下分批发酵时的菌体浓度提高了 75%。在此基础上进行高密度连续发酵, 最终结果与高密度分批发酵相似。首次实现了高密度发酵解脂假丝酵母制备 RNA。

关键词 RNA; 生产工艺; 解脂假丝酵母; 溶氧; 分批补料发酵

中图分类号 Q815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)04-0369-06

Fermentation process for preparation of RNA from *Candida tropicalis*LIN Zhong¹, LUO Zhong-qiu¹, DOU Jie¹, WANG Hui¹, QIU Wei-ran², CAO Jing², ZHOU Chang-lin^{1*}¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²Nantong Qiuzhiyou Bioscience and Biotechnology Co., Ltd., Nantong 226236, China

Abstract In this study, effects of the pH, dissolved oxygen (DO) and reducing sugar concentration, high density batch fermentation and high density continuous fermentation on RNA production and reducing sugar conversion rate (g-DCW/g-Glucose) were investigated by the fermentation of *Candida tropicalis*. It was found that the optimal condition was of pH 4 and DO of 30%. In batch fermentation, 19.5 g/L of dry cell concentration was obtained at 40 g/L reducing sugar and the total fermentation time was 8 h and the RNA level reached 14.3%. In pH-stat fed-batch fermentation by pH and DO at optimal levels, cell concentration reached 35.6 g/L which was 75% higher than that of 19.5 g/L (40 g/L glucose) with the RNA level of 14.2% and reducing sugar conversion rate of 43.5%. The results showed that high density continuous fermentation was similar to high density batch fermentation.

Key words RNA; production; *Candida tropicalis*; dissolved oxygen; fed-batch fermentation

This study was supported by the Industrialization of Scientific Research Promotion Projects of Colleges and Universities in Jiangsu Province (No. JH10-12); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. SBK200921231)

研究表明, RNA 及其酶解物核苷酸具有维持机体免疫功能、抗氧化、提高机体蛋白质和铁的生物利用率、降低胆固醇和抗衰老等多种生理功能^[1]。RNA 为原料通过分解法生产核苷酸已被广泛应用, 而通过酵母发酵法制备 RNA 是目前工业生产的主要方法^[2]。Yoshio 等^[3]通过化学诱变的

方式得到了对数生长期核酸含量达 11% 的高产 RNA 的解脂假丝酵母 (*Candida tropicalis*)。目前被用于工业化生产的微生物法产核酸的菌种主要有酿酒酵母和解脂假丝酵母^[4]。

一般酵母厂每升发酵液中酵母菌体浓度在 30 g/L 以下。Connor 等^[5]采用间接反馈控制摄氧

* 收稿日期 2011-02-25 * 通讯作者 Tel: 025-83271323 E-mail: cl_zhou@cpu.edu.cn

基金项目 江苏省高校科研成果产业化推进项目资助(No. JH10-12); 江苏省自然科学基金资助项目(No. SBK200921231)

率和呼吸熵,解除了葡萄糖高浓度引起的菌体抑制,在乙醇的生产过程中酿酒酵母菌体浓度达 78.7 g/L。pH 的不断变化是酵母代谢的结果,在 pH-stat 流加高密度发酵中,成功调节 pH 使菌体达到高密度^[6]。

Miki 等^[7]报道了利用酿酒酵母进行分批补料发酵培养,菌体浓度达到 30 g/L, RNA 含量达到了 10%,转化率达 30.5%。我国福建莆田糖厂年产 1 500 吨高产核酸解脂假丝酵母,在 40 g/L 的糖浓度条件菌体浓度可达 16 g/L, RNA 含量达 12%,转化率达 40%,但是单位体积、单位时间的 RNA 产率与日本的生产工艺相比,仍存在较大的差距^[8]。因此,改进目前我国生产 RNA 的生产工艺,生产出高纯度、高转化率、低环境污染的 RNA,是实现核苷酸绿色生产的必经之路。本研究采用高密度发酵生产核酸的方法,首次使用 pH-stat 补料的方法,通过控制发酵过程的糖浓度(低于 15 g/L),使菌体能够在最佳的比生长速率条件下进行生长,减少了副产物的生成,实现了高产核酸解脂假丝酵母高密度分批发酵和高密度连续发酵,使糖转化率在高密度发酵条件时达到 43.5%,菌体浓度达 35.6 g/L, RNA 含量达到 14.2%,提高了单位时间、单位体积菌体和 RNA 的糖转化率,减少了发酵废水的排放,与目前已报道的方法相比,研究结果在国内外尚属领先水平。

1 材料

1.1 试剂、菌种和培养基

糖蜜由南通秋之友生物科技有限公司提供,其余试剂均为市售分析纯。解脂假丝酵母,由中国药科大学生命科学与技术学院微生物学教研室筛选并保藏。

斜面培养基:30 g/L 葡萄糖、3 g/L 牛肉膏、3 g/L 酵母膏、5 g/L 硫酸铵、0.1 g/L 无水硫酸亚铁和 25 g/L 琼脂。发酵培养基:40 g/L 还原糖、1.2 g/L 硫酸镁、1.2 g/L 尿素、0.3 g/L 硫酸铵、0.15 g/L 硫酸锌、0.15 g/L 硫酸亚铁、0.1 g/L 氯化钠、用磷酸将 pH 调至 4。补料培养基 A:280 g/L 还原糖。补料培养基 B:280 g/L 还原糖、8 g/L 硫酸镁、8 g/L 尿素、2.3 g/L 硫酸铵、1.5 g/L 硫酸锌、1.5 g/L 硫酸亚铁、0.5 g/L NaCl,用磷酸将 pH 调至 4。

高密度发酵培养基:70 g/L 还原糖、2.1 g/L 硫酸镁、2.1 g/L 尿素、0.525 g/L 硫酸铵、0.28 g/L 硫酸亚铁、0.28 g/L 硫酸锌、0.2 g/L 氯化钠,用磷酸将 pH 调至 4。

1.2 仪器

752 紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);高压蒸汽灭菌锅(北京盛达生物电子设备有限公司);Sorvall 离心机(美国科峻仪器公司);15 L 发酵罐(Biostat B,德国贝朗生物系统公司)。

2 方法

2.1 分批发酵

将 4 ℃ 保存的解脂假丝酵母菌种接种到斜面培养基,30 ℃ 培养 32 h。转接到装有 100 mL 摇瓶培养基的 500 mL 摇瓶,置摇床中以 200 r/min 振荡,30 ℃ 发酵培养 20 h,菌体浓度为 15 g/L。以 5% 接种量接种至装有 10 L 发酵培养基的 15 L 发酵罐中培养,研究 pH、溶氧及糖浓度对菌体生长及 RNA 含量的影响。其间溶氧通过空气流量和搅拌速度的改变而维持,pH 通过流加 50% 氨水溶液维持。

2.2 高密度发酵

分批补料时首先采用发酵培养基,其中起始还原糖浓度为 10 g/L。当发酵过程中接近对数生长期末期时,pH 维持在 4.0 不再下降,此时开始在 10 min 内流加补料培养基 A 250 mL,使菌体继续维持其对数生长期,当所加糖蜜再次被耗尽 pH 不再下降时,继续与以上相同的方式流加补料培养基 A,以此重复至干菌浓度达到 18 g/L。继续以相同的流加方式流加补料培养基 B,重复至干菌浓度达到 35 g/L 时,开始以 0.3、0.4、0.5 h⁻¹ 的稀释率流加高密度发酵培养基进行高密度连续发酵。

2.3 菌体湿重、菌体干重以及还原糖浓度的测定

取发酵液 4 mL,以 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液即得湿重。然后将离心所得的菌体放置 110 ℃ 温度干燥 24 h,冷却至恒重即得干重。用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定培养基中还原糖的含量^[9]。

2.4 RNA 含量的测定

取发酵菌液 10 mL,8 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,称菌体湿重。用生理盐水 10 mL 悬浮细

胞,8 000 r/min 离心 10 min,再用生理盐水悬浮后取菌悬液 2 mL 于干净试管,再加入高氯酸 2 mL,70 °C 水浴 20 min,每 5 分钟振荡 1 次,水浴后取 1 mL 加入 EP 管中混匀,用紫外分光光度计于 260 nm 处测吸收度。

2.5 糖对酵母转化率的计算

转化率(%) = 单位体积发酵液中酵母细胞干重(g/L)/单位体积发酵液中糖的消耗量(g/L) × 100。

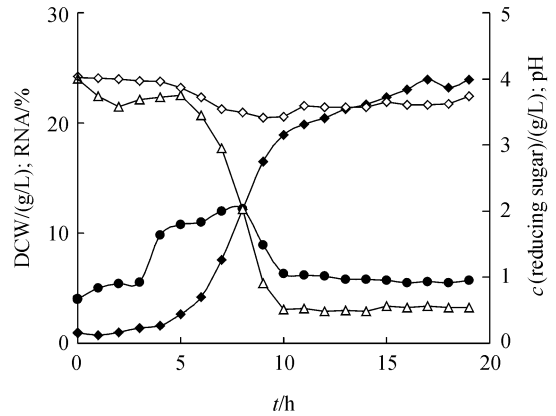
3 结果

3.1 pH 对菌体生长和 RNA 积累量的影响

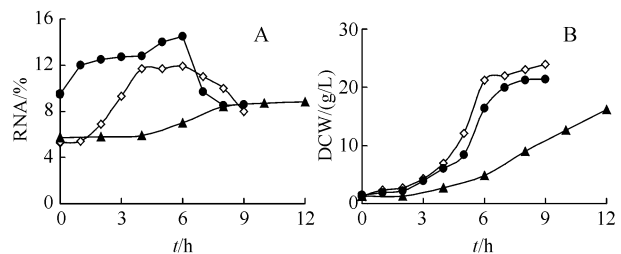
发酵结果表明,与传统的发酵生长曲线一样,解脂假丝酵母的生长同样包括了延滞期(0~3 h)、对数生长期(4~10 h)和稳定期(10~19 h)。从生长曲线来看,在 0~3 h 时,pH 缓慢下降,菌体浓度基本维持不变,RNA 含量也比较低,说明在这段时间内,整个体系的增殖细胞数量不是很多,菌体处于停滞生长状态,耗糖量很低,因此糖通过糖酵解途径转化成葡萄糖酸的量也比较有限。5~10 h 时,pH 急速下降至 3.4,菌体进入对数生长期,最高菌体浓度达到 19 g/L,还原糖含量急剧下降至 4 g/L,RNA 含量急速上升至 12% 左右,比稳定期提高 2~2.5 倍,与 Bremer 等^[10] 研究结果基本一致。说明这一过程中菌体代谢非常旺盛,产生了大量的葡萄糖酸。10~19 h,进入稳定期,此时,糖已经基本消耗完毕,所积累的葡萄糖酸也已基本消耗完,pH 有所上升,菌体生长进入稳定期,比生长速率为 0,RNA 含量为 6.7%,最终菌体浓度达到 24 g/L,见图 1。

pH 对于酵母菌的生长影响比较大^[11],前面的分批发酵过程中葡萄糖酸的产生导致发酵液 pH 的下降,因此,在 15 L 发酵罐中通过流加氨水将 pH 分别控制在 pH 3、pH 4、pH 5 的条件下进行发酵,研究 pH 对解脂假丝酵母生长过程及其 RNA 含量的影响。由图 2 可知,发酵过程的曲线与没有控制 pH 的发酵过程曲线是相似的。pH 3 的时候菌体生长速度最快,在 6 h 进入稳定期,最高菌体浓度达到 21 g/L,还原糖基本上消耗完,最高 RNA 含量达到 11.8%。pH 4 时菌体生长速度也比较快,8 h 进入稳定期,最高菌体浓度达到 19.5 g/L,RNA 最高含量达到 14.3%。pH 5 时,菌体生长速率缓慢,

RNA 含量基本上与稳定期持平。pH 3 和 pH 4 的发酵过程与 pH 不加控制的发酵过程相比,提前 4 h 进入稳定期,缩短了发酵时间,提高了生产效率。而 pH 4 的条件下虽然比 pH 3 的条件下推迟 2 h 进入稳定期,但是 RNA 含量则相对较高,可以达到 14%。因此,选择 pH 4 作为最佳发酵条件。



—●— DCW; —■— RNA; —△— Glucose concentration; —◇— pH
Figure 1 Time course of pH, dry cell weight (DCW), ribonucleic acid content and reducing sugar in batch fermentation of *Candida tropicalis* without pH control and dissolved oxygen (DO) maintained at 40% using fermentation medium



—◇— pH 3; —●— pH 4; —▲— pH 5
Figure 2 (A) RNA level and (B) cell concentration in batch culture of *Candida tropicalis* using fermentation medium at a constant pH. The pH of the culture medium was maintained separately at 3, 4, 5 through adding 50% aqueous ammonia

3.2 DO 对菌体的生长过程及 RNA 积累量的影响

研究在对数生长期缺氧 2 h 的条件下,溶氧对于解脂假丝酵母生长过程及其 RNA 积累量的影响,结果见图 3。溶氧 40% 以下从 4 h 进入对数生长期,菌体迅速增长,到 7 h 菌体浓度达到了 3.8 g/L, RNA 含量达到了 9.5%。在 8 h 和 9 h DO 控制在 3%,菌体浓度下降至 2 g/L, RNA 含量也下降至 4%,同时还还原糖浓度在此期间也在不断下降,可能是在此过程中酵母利用糖进行了厌氧发酵产生了乙醇。之后溶氧恢复至 40% 以上,菌体继续进入对数生长期,在 12 h 达到了最高菌体浓

度 6.5 g/L, 此时还原糖浓度已经降至最低点 5 g/L。13~16 h 菌体浓度一直处于稳定期, 维持在 6.5 g/L, RNA 含量下降至 7%。16~18 h 重新进入对数生长期, 最高菌体浓度达到 11 g/L, 这段时间内菌体可以自身代谢产生的乙醇为碳源进行菌体繁殖^[12]。但是最终菌体浓度与氧气充分条件下已经有了较大的差距。

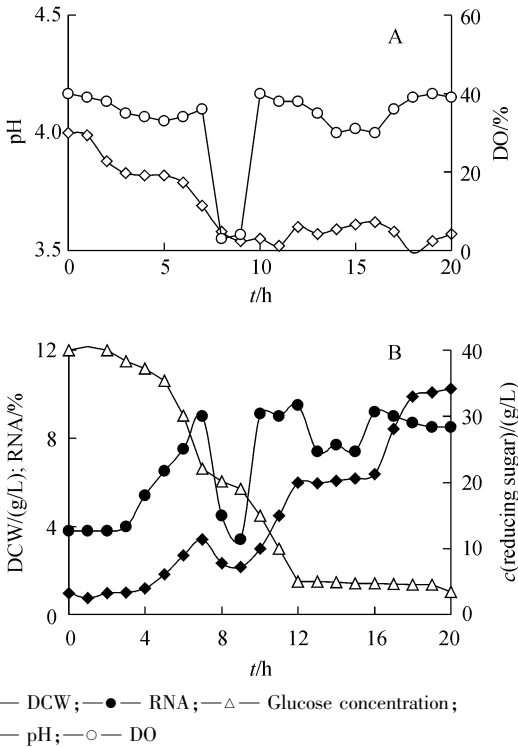


Figure 3 (A) Time course of pH, DO, (B) dry cell concentration, ribonucleic acid content and reducing sugar in batch fermentation of *Candida tropicalis* for 2 h oxygen deficit at exponential phase without pH control using fermentation medium

以上缺氧实验的结果表明, 溶氧对菌体的生长及 RNA 积累的影响非常显著。为了进一步说明, 在 15 L 发酵罐中分别以 10%、20%、30%、40% DO 条件下进行发酵, 结果表明, 在 30% 和 40% 溶氧条件下, 菌体最高菌体浓度分别达到了 19.5 g/L 和 17.3 g/L, 而在 10% 和 20% 的条件下, 菌体浓度仅 10.1 g/L 和 15.2 g/L。因此选择 30% 作为解脂假丝酵母生产 RNA 的最佳溶氧条件。结果见表 1。

3.3 糖浓度对菌体生长和 RNA 积累量的影响

菌体浓度及 RNA 含量与培养基的糖浓度是直接相关的。还原糖浓度为 10 g/L 时, 虽然菌体浓度和 RNA 含量相对来说比较低, 但是转化率最高, 达到 70.1%。还原糖浓度为 40 g/L 时, 菌体浓度

达到 19.3 g/L, RNA 含量达到 13.1%, 但是转化率最低, 仅为 48.4%。Tilak 等^[13]研究了起始糖浓度对转化率的影响, 结果表明较低的起始糖浓度组中, 产生较少的乙醇, 同时增加了菌体的存活率及菌体数量。由于较高的糖浓度最终会导致菌体及 RNA 的含量降低, 因此可以在较低的起始糖浓度下进行补料发酵(见表 2)。

Table 1 Effect of dissolved oxygen level on RNA production in batch culture of *Candida tropicalis*

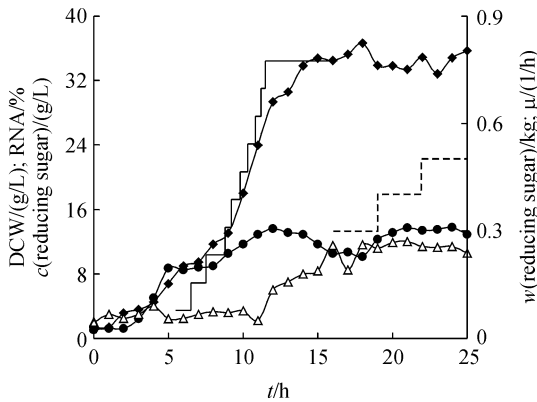
Parameter	Oxygen deficit	DO/%			
		10	20	30	40
DCW/(g/L)	11.0	10.1	15.2	19.5	17.3
RNA/%	9.1	10.0	11.2	13.3	13.5
Conversion rate/%	27.2	25.4	37.2	48.5	42.6
RNA productivity/(g/L·h)	0.052	0.122	0.203	0.312	0.310

Table 2 Effect of reducing sugar concentration and fed-strategy on RNA production in batch culture of *Candida tropicalis*

Parameter	Fed-batch fermentation	Glucose/(g/L)				Continuous fermentation
		10	20	30	40	
DCW/(g/L)	35.6	7.1	13.0	16.2	19.3	35.7
RNA/%	14.2	10.1	11.3	13.0	13.1	13.2
Conversion rate/%	43.5	70.1	65.2	53.2	48.4	51.1
RNA productivity/(g/L·h)	0.354	0.121	0.202	0.262	0.310	4.712

3.4 高密度发酵的补料策略和 RNA 生物合成

Lee 等^[14]使用 pH-stat 补料发酵的方法最后得到了 173 g/L 恶臭假单胞菌干细胞浓度, 因此, 分批补料发酵是达到高密度发酵最有效的方法^[15]。本研究根据菌体实际生长过程确定了以 pH 变化趋势来进行糖源的补料, 从而使培养基内的糖浓度始终维持在菌体最佳生长状态的浓度下, 减少副产物的产生, 从而提高了菌体的浓度。在最佳发酵条件下, 起始糖浓度为 10 g/L, 从第 3 小时开始菌体进入对数生长期, 至 5 h 时糖浓度降低至 4.5 g/L, 5.5 h 开始进入补料阶段, 培养时间 14 h, 培养基糖浓度始终维持在 3~10 g/L 之间, 最终菌体浓度达到了 35 g/L, RNA 的含量达到 14.2%, 转化率达到 43%。菌体浓度比分批发酵中还原糖浓度为 40 g/L 时提高了 75%。从 16 h 开始以 0.3, 0.4, 0.5 h⁻¹ 的稀释率流加高密度连续发酵培养基进行连续发酵, 菌体浓度维持在 34.2~36.4 g/L 之间, 比 Miki 等^[7]报道的酿酒酵母发酵培养制备 RNA 提高了 17%, 达到目前国内外文献报道中制备 RNA 的领先水平。见图 4 和表 2。



—◆— DCW; —●— RNA; —△— Glucose concentration;
—— Glucose added; ····· μ

Figure 4 Time course of cell concentration and RNA lever in pH-stat fed-batch high density fed-batch fermentation using FM containing 10 g/L of reduce sugar. Additionally, 250 mL fed-batch fermentation medium was fed during fed-batch fermentation and the dilution rate was changed from 0.3^{-1} , 0.4^{-1} , 0.5^{-1} during continuous fermentation

4 讨论

核苷酸主要有两种生产方式,即化学法和 RNA 降解法。化学法制造的核苷酸因为有少量溶剂残留,并且成本高、污染严重,因此制备核苷酸主要是采用 RNA 降解法。基本过程是培养酵母、提取 RNA、酶解 RNA、分离核苷酸、纯化核苷酸等。日本已经通过化学诱变的方式得到了高产 RNA 酵母,核酸含量达到 10%^[16]。

本实验室在核苷酸研究中诱变分离得到一株高产 RNA 解脂假丝酵母,核酸含量最高达到 14%^[17]。本研究主要是在原有研究的基础上,通过研究溶氧、pH、糖浓度对其生长的影响进行优化,并且通过补糖发酵的方式实现了高产 RNA 解脂假丝酵母的高密度发酵。

Julian 等^[18]认为 pH 对于酵母生长过程中所需关键酶活性的影响非常大。实验结果证明,解脂假丝酵母最佳培养条件为 pH 4,菌体浓度可以达到 19 g/L, RNA 含量 14%。

溶氧是发酵过程中的关键因素。卫功元等^[19]认为溶氧的改变会导致菌体培养体系中氧化还原电位的改变,同时也会对细胞生长和产物形成产生影响。不同溶氧实验证明溶氧的多少直接关系到发酵结果的成败。最佳发酵溶氧条件是 30%,菌体浓度可以达到 19.3 g/L,核酸含量 13.1%,糖转化率 48.4%。在 10% 溶氧条件下菌体浓度, RNA

含量,糖转化率都明显下降。因为在低氧状态下酵母通过厌氧发酵产生大量的乙醇,影响菌体的生长^[20]。

碳源是发酵过程中不可缺少的成分,培养基中不同的糖浓度直接影响着发酵的结果,解脂假丝酵母在 40 g/L 起始糖浓度下,菌体浓度最高达 19.3 g/L,但是转化率仅有 48.4%。从代谢流角度来考虑,可以认为初始糖浓度的不同直接影响着碳源代谢的流向,初糖浓度较高时,碳源更多的流向产物的合成。但过高的初始糖浓度会抑制菌体生长^[21]。

RNA 的合成与菌体的比生长速率成正比例线性关系^[22],因此本研究采用间歇补料发酵,在 10 g/L 的起始还原糖浓度下,根据 pH 的变化来进行培养基流加,控制菌体的比生长速率适合于 RNA 合成,最终达到了 35 g/L 的菌体浓度,同时也保证了 40% 以上的转化率,最高 RNA 含量也达到 13%,大大降低了生产成本,减少了发酵废水的排放,提高了单位体积、单位时间 RNA 的生产能力。

本实验室通过几年的研究,结果与已报道文献相比处于国内外领先水平。但是要实现工业化大规模的生产还需要进一步改进,比如对于传统生产线的调整、流加条件的细化以及核酸代谢动力学的建立等。

参考文献

- [1] 董再珍 (Dong ZZ), 王 龙 (Wang L), 章君照 (Zhang JZ). 核酸对机体作用的研究 [J]. 中国药学杂志 (*Chin Pharm J*), 1995, **30**(12): 725 - 727.
- [2] 桂建芳 (Gui JF). RNA 加工与细胞周期调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 20 - 128.
- [3] Yoshio N, Ibaraki, Isao B, et al. Process for preparing yeast cells containing an enhanced amount of ribonucleic acid: US, 3411989 [P]. 1968-11-19.
- [4] Shinji Y, Yaizu, Hisao K, et al. Ribonucleic acid-enriched brewer's yeast cells and process for producing the same: US, 7135327 B2 [P]. 2006-11-14.
- [5] Connor GM, Fernando SR, Charles LC. Design and evolution of control strategies for high cell density fermentations [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **39**(3): 293 - 304.
- [6] Thomas KC, Hynes SH, Jones AM, et al. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology effect of sugar concentration and fermentation temperature [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1993, **43**(3): 211 - 227.
- [7] Miki K, Frank H, Trang QJ, et al. Method for producing yeast

cells; *JP*, 5-176757 [P]. 1993-07-20.

- [8] 朱才庆 (Zhu CQ), 应汉杰 (Ying HJ), 欧阳平凯 (Ouyang PK), 等. 核糖核酸的应用与制备 [J]. *南京化工大学学报 (J Nanjing Tech Univ)*, 2001, **23**(4): 97-100.
- [9] Bernfeld P. *Amylases α and β . Methods in enzymology* [M]. New York: Academic Press, 1959: 27-29.
- [10] Bremer H, Dennis P. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate [J]. *Am Soc Microbiol*, 1987, **120**(5): 1 527-1 542.
- [11] Kudriavzevii S, Noé ALF, Sandi O, et al. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, **131**(2): 120-127.
- [12] Xiao J, Shi ZH, Gao P, et al. On-line optimization of glutamate production based on balanced metabolic control [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2006, **29**(2): 109-117.
- [13] Tilak W, Nagodawithana, Carmine C, et al. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1974, **28**(3): 383-391.
- [14] Lee SY, Wong HH, Choi JI, et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **68**(4): 466-470.
- [15] Lee J, Lee SY, Park S, et al. Control of fed-batch fermentations [J]. *Biotechnol Adv*, 1999, **17**(1): 29-48.
- [16] Shinji Y, Yamashita, Yaizu, et al. Ribonucleic acid-enriched brewer's yeast cells and process for producing the same; US, 7135327 B2 [P]. 2006-11-14.
- [17] 周长林 (Zhou CL), 方圆 (Fang Y), 林忠 (Lin Z), 等. 一种高产核糖核酸的解脂假丝酵母及应用: CN, 101805704 A [P]. 2010-08-18.
- [18] Julian K, Stanley A, Claudia N, et al. The regulatory properties of yeast pyruvate kinase effect of pH [J]. *Biochem J*, 1986, **234**(3): 699-703.
- [19] 卫功元 (Wang GY), 王大慧 (Wang DH), 陈坚 (Chen J). 不同溶氧控制方式下的谷胱甘肽分批发酵过程分析 [J]. *化工学报 (J Chem Ind Eng)*, 2007(9): 2 330-2 332.
- [20] 何向飞 (He XF), 张梁 (Zhang L), 石贵阳 (Shi GY). 利用溶氧控制策略进行高密度和高强度乙醇发酵的初步研究 [J]. *食品与发酵工业 (Food Fer Ind)*, 2008, **34**(1): 20-23.
- [21] Johns MR, Goh LT, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. *Biotech Lett*, 1994, **15**(5): 507-512.
- [22] 林忠 (Lin Z), 罗众球 (Luo ZQ), 黄慧 (Huang H), 等. 菌体比生长率及不同培养基成分变化对解脂假丝酵母中 RNA 累积的影响 (英文) [J]. *中国药科大学学报 (J China Pharm Univ)*, 2011, **42**(2): 169-175.

· 书 讯 ·

《药物临床试验方法学》出版发行

《药物临床试验方法学》是一本介绍临床试验管理和操作的工具书。此书由国外长期从事新药临床试验管理工作的作者撰写, 内容包括国际医药管理机构对药物临床研究的指导原则和各项具体要求。此书不仅涉及医药和药学的临床试验知识, 还介绍了与临床试验有关的药政、伦理、财务、法律和商务管理的实施程序和文件要求, 其中许多内容是首次出版, 如药物供应、经费预算、医疗器械临床试验, 首次人体临床试验、药物相互作用临床试验、电子化数据管理、安全性监督和管理、临床试验的文档准备和建立、临床试验方案和试验报告的设计和管理、临床试验结果报告的格式和管理等。本书在拓宽临床试验全过程的管理和细节的同时, 还加深了操作规范上的要点和方法, 对临床试验各个环节规范要点、操作程序、监查对象等逐一展开论述。对临床试验领域中各个方面的参与者, 包括申办者、监查员、研究者、合同研究组织、数据管理、伦理委员会等都有非常重要的参考价值。

购书电话: 010-6451888; 传真: 010-64519686

有关此书的信息还可以查询化学工业出版社网站。