

采用计算流体力学技术研究搅拌对兽疫链球菌发酵生产透明质酸的影响

顾小华, 段须杰, 谭文松, 张旭

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 搅拌是影响透明质酸(HA)发酵的一个重要因素, 然而有关搅拌对 HA 发酵影响的认知存在较大争议。本研究采用计算流体力学(CFD)技术深入研究了搅拌对菌体生长和 HA 合成的影响。结果表明, 菌体量和 HA 产量受搅拌转速的影响很小, 而 HA 分子量随着转速的增加呈现出先增加后降低的趋势。分阶段控制转速研究表明转速对 HA 分子量的影响主要体现在 HA 合成阶段。CFD 计算结果表明随着搅拌转速的增加, 混合时间降低的同时反应器内部的剪切速率明显增加。最终通过改变搅拌桨组合方式的手段有效地解决了上述矛盾, 并使得 HA 分子量提高 23.9%。

关键词: 透明质酸, 搅拌, 计算流体力学, 兽疫链球菌

Effect of agitation on hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* by using computational fluid dynamics

Xiaohua Gu, Xujie Duan, Wensong Tan, and Xu Zhang

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Agitation plays an important role in the hyaluronic acid (HA) fermentation process. However, views about the effect of agitation on HA production remain controversial. We investigated the effect of agitation on cell growth and HA synthesis during HA fermentation process by using Computational Fluid Dynamics (CFD) technology. The results showed that the biomass and HA yield changed a little with the increase of impeller speed, but the HA molecular weight firstly increased and then decreased. The results of phase agitation control strategy demonstrated that the influence of agitation on the HA molecular weight mainly exhibited at the stage of HA synthesis. Moreover, the CFD simulation results indicated that when impeller speed increased, the mixing time reduced while the shear rate increased significantly. The removal of anchor could moderate the contradiction between the mixing time and shear rate, and finally the HA molecular weight increased by 23.9%. The results of this work could provide guidelines for optimizing the HA fermentation, as well as the bioreactor design and scaling up.

Keywords: hyaluronic acid, agitation, computational fluid dynamics (CFD), *Streptococcus zooepidemicus*

透明质酸(HA)作为一种高分子粘多糖, 由于其独特的分子结构和理化性质, 已被广泛应用于医药、化妆品和食品行业中^[1]。采用微生物发酵法生产 HA 已经成为当前的主流工艺, 相关研究受到学

Received: May 12, 2009; Accepted: September 22, 2009

Corresponding author: Xu Zhang. Tel: +86-21-64252536; Fax: +86-21-64252250; E-mail: zhangxu@ecust.edu.cn

术界和产业界的普遍关注,其中 HA 的产量和分子量直接决定了产品的经济价值和使用范围^[2]。

目前,HA 发酵研究主要集中在培养方式,培养基组成以及培养条件等方面。Liu 等研究发现,分批培养有利于 HA 的合成,而补料-分批培养则有利于菌体的生长^[3]。Fong Chong 等和 Armstrong 等考察了不同碳源和氨基酸对 HA 产量和分子量的影响^[4-5]。而关于 HA 发酵过程中温度和 pH 的控制学者们也进行了大量的研究^[6-8]。

搅拌是保证菌体正常生长的必要条件,同时也是影响 HA 产量和分子量的重要因素,然而有关搅拌对 HA 发酵影响的认识存在较大争议^[8-13]。高海军等认为,在一定范围内,菌体量和 HA 产量随着搅拌转速的提高而增加,当搅拌转速过高时,HA 产量会出现下降,HA 分子量则随搅拌转速的升高显著降低^[9]。Kim 等研究发现,搅拌转速的提高导致菌体量和 HA 产量降低,反而 HA 的分子量提高了近一倍^[10]。而 Huang 等认为,搅拌转速对菌体量和 HA 产量没有显著影响^[11]。Armstrong 和 Johns 也发现搅拌转速的改变(从 300 r/min 到 1000 r/min)对 HA 分子量没有影响^[12]。

计算流体力学(CFD)是通过计算机数值计算和图像显示,对包含有流体流动和热传导等相关物理现象的系统所做的分析。近年来,CFD 在搅拌反应器领域的研究越来越广泛,而 CFD 在生物反应器方面的研究却很少。

本研究考察了搅拌转速和搅拌桨组合方式对菌体生长和 HA 合成的影响,并结合 CFD 技术分析了搅拌桨对反应器内部的混合效果和剪切力分布的影响,提出了搅拌转速影响透明质酸分子量的可能作用机制及其解决办法,为设计和优化 HA 工业发酵过程提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

实验菌种为 C 族兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)ATCC G1(实验室保藏号)。

种子培养基(g/L):葡萄糖 2,牛肉膏 10,聚蛋白胨 20,酵母粉 5,NaCl 2,Na₂HPO₄·12H₂O 1,

KH₂PO₄ 0.12, pH 7.0~7.2。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 40,聚蛋白胨 20,酵母粉 10,MgSO₄·7H₂O 1, K₂HPO₄ 2.5, NaCl 2, pH 7.0~7.2。

1.2 培养方法

种子培养:从斜面上接种到装有 30 mL 培养基的锥形瓶中,作为一级种子,在 37°C 下静置培养 8 h。一级种子接二级种子,接种量为 5%,在 37°C 下静置培养 8 h。

发酵培养:5 L 全自动发酵罐(华东理工大学),装液量 3 L,接种量为 5%,采用 5 mol/L 的 NaOH 溶液自动控制 pH 值为 7.0±0.1,培养温度为 37°C。初始葡萄糖浓度为 40 g/L,并通过流加葡萄糖维持其浓度为 10 g/L。发酵周期为 14 h。实验室传统控制溶氧的方法是通过逐步提升搅拌转速(每次增加 50 r/min)以保证 DO 水平不低于 30%。考察转速对 HA 发酵影响时 DO 水平保持一致(50%),通过调节空气、氧气和氮气三种气体在进气中的比例实现。

1.3 测定方法

菌体量测定:采用干重法与比浊法对照。干重法将发酵液离心后取沉淀,去离子水洗涤,80°C 干燥 24 h 后,称取细胞量。比浊法通过测定发酵液在 660 nm 的吸光值,与标准曲线对照,计算细胞浓度。

透明质酸含量测定:采用 Bitter-Muir 吡啶法^[14]。

透明质酸分子量测定:采用 Laurent 极限粘度法^[15]。

所有样品均进行 3 次平行测定,结果以平均值±方差的形式表示。

1.4 CFD 模拟方法

发酵罐直径为 150 mm,装液高度为 355 mm,配有 2 个六斜叶 45°涡轮桨,一个锚式桨,其中锚式桨位于反应器底部,如图 1 所示。六斜叶 45°涡轮桨和锚式桨的具体尺寸如表 1 所示。通过 ICFM CFD 10.0 对反应器内部的计算区域统一采用四面体网格进行网格划分。

利用 CFX 10.0 软件进行单相模拟。模拟方法采用多重参考坐标系法,湍流模型采用标准 k-ε湍流模型,离散格式采用一阶迎风格式^[16]。混合时间是指物料达到完全均匀的 95%所需要的时间。模拟时采用非耦合求解方法,示踪剂注入流场是通过 Fortran

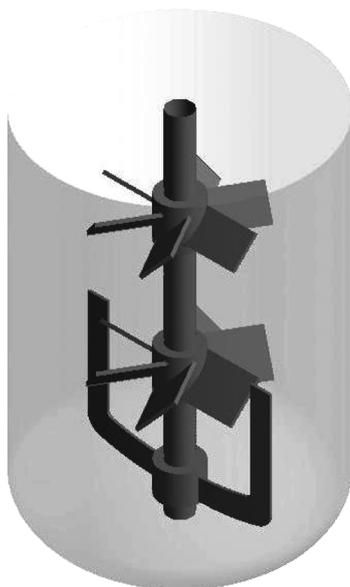


图 1 5 L 发酵罐桨叶组合结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of 5 L stirred reactor with impellers.

表 1 六斜叶 45° 涡轮桨和锚式桨尺寸

Table 1 Geometrical parameters of 6-bladed turbine with 45° pitched blades and anchor

Impeller	Geometry ^a (mm)
6-bladed turbine with 45° pitched blades	D=80; H=20; δ =2
Anchor	D=122; H=80; W=12; δ =3

^a D: diameter; H: height; δ : thickness; W: width.

用户子程序完成。剪切速率的模拟通过 CFX 软件自带的函数进行计算。

2 结果与讨论

2.1 HA 发酵动力学

图 2 所示是 HA 发酵过程中菌体量、HA 含量以及分子量的变化^[17]。菌体的生长大体可以分为 4 个阶段: 延迟期(0~3 h)、对数生长期(3~6 h)、减速期(6~10 h)和稳定期(10~14 h)。当菌体进入对数生长期以后, HA 开始大量合成。当发酵进行至 10 h 左右, 菌体就基本进入稳定期, 此时菌体量和 HA 产量就不再发生变化, 直至发酵结束。HA 分子量在发酵过程中也呈现出逐渐增加的趋势。在对数生长期时(6 h), HA 分子量仅有 1.3×10^6 D, 而到了减速期, 分子量已经增加到 2.0×10^6 D。同样, 当菌体进入稳定期以后, HA 的分子量也不再发生变化。

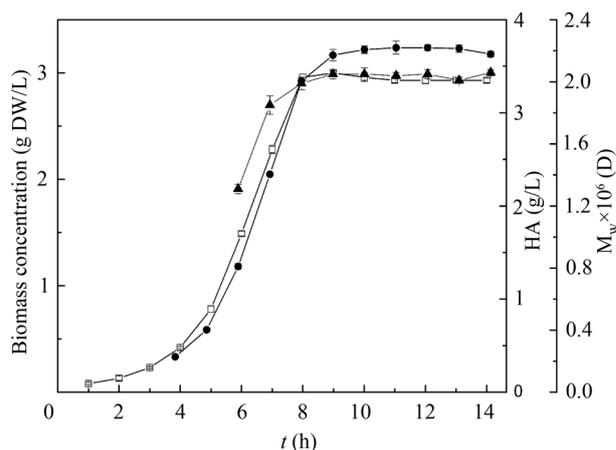


图 2 HA 发酵过程中菌体量、HA 产量和分子量的变化

Fig. 2 Fed-batch culture of *S. zooepidemicus* G1 under standard conditions during HA fermentation. □: biomass; ●: HA concentration; ▲: HA molecular weight.

2.2 搅拌转速对 HA 发酵的影响

随着发酵的进行, HA 的大量合成使得发酵液的粘度急剧增加, 搅拌转速的提高可以促进体系的混合和传质效果, 然而, 高转速引起的剪切力也有可能对 HA 的合成产生不利影响^[9]。段须杰等在研究中发现, 搅拌转速的增加对菌体量和 HA 产量的影响很小, 而对 HA 分子量的影响十分显著, 如表 2 所示^[17]。当转速为 150 r/min 时, HA 分子量只有 $(1.69 \pm 0.03) \times 10^6$ D, 可能是由于低转速已经远远不能够满足发酵体系的混合和传质要求。随着搅拌转速升至 450 r/min, 混合和传质环境得到改善, HA 分子量达到最大值。然而, 转速的进一步提高却导致了 HA 分子量的下降, 可能是由高剪切引起的 HA 非正常合成, 使得处于链延长阶段的 HA 分子提前脱落造成的^[9]。

2.3 分阶段控制转速对 HA 发酵的影响

为了进一步认识并调控搅拌对 HA 发酵过程的影响, 本研究采用了分阶段控制搅拌转速的策略, 着重考察了搅拌在不同发酵阶段的作用情况。分阶

表 2 搅拌转速对 HA 分子量的影响

Table 2 Effect of impeller speed on HA molecular weight

Impeller Speed (r/min)	Biomass (g DW/L)	HA (g/L)	HA molecular weight ($\times 10^6$ D)
150	2.55±0.01	3.87±0.01	1.69±0.03
450	2.53±0.02	3.84±0.01	2.11±0.05
700	2.58±0.02	3.86±0.03	1.84±0.03
1000	2.73±0.01	3.84±0.02	1.54±0.06

段控制转速的具体实施程序如下: (a) 0~6 h 控制搅拌转速为 450 r/min, 6~14 h 控制搅拌转速为 1000 r/min; (b) 0~6 h 控制搅拌转速为 1000 r/min, 6~14 h 控制搅拌转速为 450 r/min; (c) 0~10 h 控制搅拌转速为 450 r/min, 10~14 h 控制搅拌转速为 1000 r/min。

从图 3 中可以看出, 分阶段控制搅拌转速对菌体量和最终的 HA 产量都没有产生明显影响。表 3 所示是分阶段控制转速对 HA 分子量的影响。无论是程序(a)还是程序(b)控制都会造成 HA 分子量的下降, 只有程序(c)控制对 HA 分子量的影响不大。Van de Rijn、Cater 等研究发现, 当菌体进入稳定期以后就丧失了 HA 的合成能力^[18-19]。由此可见, 在 HA 合成阶段, 高剪切力对 HA 分子量的影响显著, 而在稳定期, 由于 HA 合成的终止, 剪切力对分子量的影响较小。Armstrong 和 Johns 曾在研究中发现, 搅拌转速在 300 r/min 和 1000 r/min 之间变化对 HA 分子量影响不大, 但是他们实验中转速的增加是在菌体进入稳定期以后, 所以搅拌转速不会对 HA 分子量产生明显影响^[12]。

根据转速对 HA 发酵过程的影响可以发现, 转速对菌体生长的影响很小, 而对 HA 分子量的影响十分显著, 并且影响主要体现在 HA 的合成阶段。

2.4 混合时间的 CFD 模拟

根据前面分析可知, 低转速(150 r/min)难以满足发酵体系的混合和传质要求, 但是缺乏直接的量化证据来说明低转速下的混合状况, 因此本研究通过 CFD 技术模拟不同搅拌转速下反应器内部的混合状况。

鉴于不同检测点位置的混合时间差异可能会很大, 因此需要定义一个平均混合时间来描述反应器

表 3 分阶段控制转速对 HA 分子量的影响

Table 3 Effect of phase impeller speed control strategy on HA molecular weight

Procedure	HA molecular weight ($\times 10^6$ D)
450 (r/min)	2.11 \pm 0.05
a	1.73 \pm 0.05
b	1.80 \pm 0.03
c	2.09 \pm 0.04
1000 (r/min)	1.54 \pm 0.06

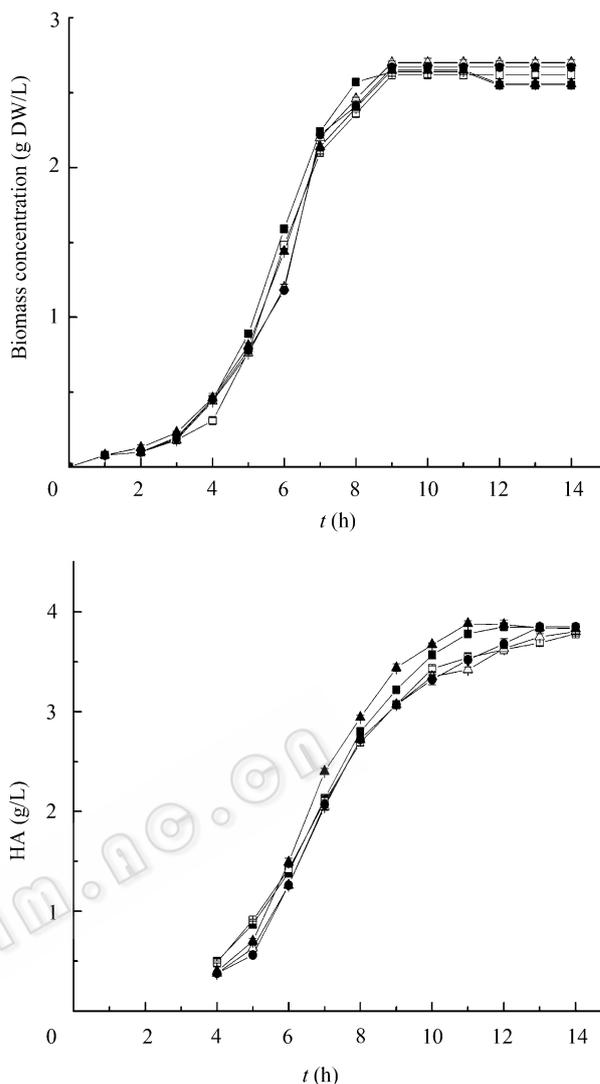


图 3 分阶段控制转速对菌体生长和 HA 产量的影响

Fig. 3 Effect of phase impeller speed control strategy on cell growth and HA production. ■: 450 r/min; □: procedure (a); ●: procedure (b); ▲: procedure (c); △: 1000 r/min.

内部的混合情况。反应器内共建立 6 个监测点, 从上至下依次记为 M1、M2、M3、M4、M5 和 M6(图 4)。定义从反应器底部加入示踪剂时, 6 个监测点混合时间的平均值为反应器的平均混合时间 θ_{average} , 结果列于表 4。

当搅拌转速为 150 r/min 时, 由于 HA 的大量合成致使发酵液的粘度急剧增加, 使得平均混合时间达到 29.0 s, 而且不同监测点处的混合时间最大相差超过 50%, 由此可见在该转速条件下反应器内部的混合效果较差, 与本研究 k_{La} 测定结果也相吻合, 发酵罐在该操作条件下的传质混合可能无法满足菌体生长和 HA 合成的需要。

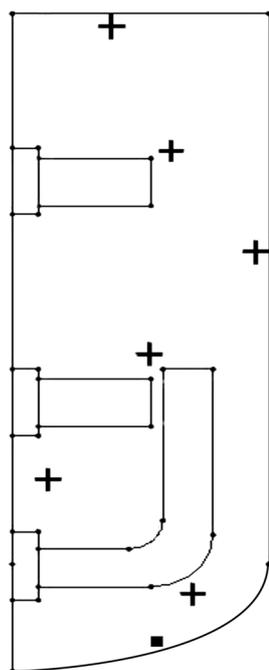


图4 加料点和监测点的位置示意图

Fig. 4 Schematic diagram of feeding positions and monitors.
■: feeding position; +: monitor.

随着搅拌转速的增加, 平均混合时间 θ_{average} 逐渐减少。与 150 r/min 相比, 450 r/min 下的平均混合时间 θ_{average} 已由原来的 29.0 s 减少至 2.8 s。随着转速进一步提高, θ_{average} 减少的幅度逐渐降低, 当搅拌转速增至 1000 r/min 时, θ_{average} 只有 1.1 s。实验结果表明搅拌转速控制在 450 r/min 以上可使反应器的混合状况得到明显改善。

2.5 剪切速率的 CFD 模拟

高转速引起的高剪切力导致了 HA 分子量的下降, 然而对于反应器内部复杂的流场分布而言, 仅通过转速的高低来衡量剪切力的大小, 存在一定的局限性, 为此本研究采用 CFD 技术对不同转速下反应器内部的剪切速率分布进行模拟。由于对数生长期大部分时间发酵液性质与水接近, 为了简化起见,

选用水作为模拟介质。由于水的粘度不随剪切速率改变, 因此模拟时使用剪切速率来代替剪切力。

图 5 所示是搅拌转速为 450 r/min 时反应器内部的剪切速率分布。由图可见, 较高的剪切速率主要集中在锚式桨的桨区周围, 而 2 个六斜叶 45° 涡轮桨桨区的剪切速率与主体流域的剪切速率均显著低于锚式桨区域。因此, 锚式桨区域的剪切速率分布应予以重点考察, 该区域剪切速率的分布随搅拌转速的变化如图 6 所示(图例同图 5)。

从图中可以看出, 锚式桨桨区的剪切速率随着搅拌转速的提高而不断增大, 当搅拌转速为 450 r/min 时, 桨区剪切速率最大只有 300 s^{-1} 左右, 当搅拌转速增加至 700 r/min 时, 最大剪切速率增加到 600 s^{-1} 左右。而当转速进一步提高至 1000 r/min 时, 剪切速率最高可以达到 1500 s^{-1} 。由此可见, 锚式桨是产生高剪切速率的主要来源, 随着搅拌转速的增加, 其桨区周围的剪切速率急剧增加, 而产生的高剪切速率将对 HA 分子量产生不利影响。

2.6 搅拌桨组合方式对 HA 发酵的影响

由上述讨论可知, 搅拌转速的改变同时影响了反应器内部的混合和剪切环境, 过低的搅拌转速会导致发酵体系的混合和传质效果较差, 不利于 HA 分子量的增加, 而高转速又会产生较高的剪切力, 造成 HA 分子量的降低。为了解决混合传质与剪切之间的矛盾, 本研究采用不同的搅拌桨组合方式来实现对 HA 发酵过程的优化。

相对于六斜叶 45° 涡轮桨而言, 锚式桨会产生较高的剪切力, 因此可以通过去除锚式桨的方法来降低反应器内部的剪切力, 进而提高 HA 的分子量。原有的搅拌桨组合方式包括 2 个六斜叶 45° 涡轮桨和 1 个锚式桨, 改进的组合方式桨仅包括 2 个六斜

表 4 搅拌转速对不同监测点混合时间的影响

Table 4 Effect of impeller speed on mixing time at various monitors

Impeller speed (r/min)	Mixing time at different monitor						Average mixing time (s)
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
150	36.9	34.4	16.6	25.1	29.5	31.7	29.0±7.3
450	3.1	2.7	1.8	2.8	2.9	3.7	2.8±0.6
700	1.7	1.4	1.2	1.6	1.6	2.1	1.6±0.3
1000	1.1	1.0	0.9	1.0	1.0	1.3	1.1±0.1

表 5 搅拌桨组合方式对菌体量、HA 产量以及分子量的影响

Table 5 Effect of impeller combination on biomass, HA yield and molecular weight

Impeller combination	Biomass (g DW/L)	HA concentration (g/L)	HA molecular weight ($\times 10^6$ D)
With anchor	2.60 \pm 0.05	3.92 \pm 0.02	1.59 \pm 0.09
Without anchor	2.62 \pm 0.07	3.79 \pm 0.03	1.97 \pm 0.04

的需求很大, 并且到了发酵后期发酵液的粘度往往很高, 需要高转速才能够满足菌体生长和 HA 合成对供氧混合的需要。锚式桨作为一种大直径桨型, 适合于低速运行, 而在高转速下就会产生较高的剪切力, 进而对 HA 分子量产生不利影响, 去除锚式桨一定程度上降低了反应器内部的剪切力, 使得 HA 分子量有了明显的提高。

为了深入认识搅拌桨组合方式对反应器内部剪切速率分布的影响, 本研究通过 CFD 手段对比分析两种搅拌桨组合方式下反应器内部的剪切速率分布差异。

图 7 所示为 1000 r/min 条件下两种搅拌桨组合方式产生的最大剪切速率在不同位置($2r/T=0.25$ 、 0.50 和 0.75)的轴向分布。从图中 7A 可以看出, 原有的搅拌桨组合方式有 3 处剪切速率较为明显, 分别对应的是锚式桨、下层六斜叶 45° 涡轮桨和上层六斜叶 45° 涡轮桨的位置, 其中以锚式桨产生的剪切速率最为突出, 除去锚式桨后可使剪切速率由 800 s^{-1} 降至 40 s^{-1} 。同样, 在 $2r/T=0.50$ 和 0.75 位置, 锚式桨的除去使剪切速率分别降至 30 s^{-1} 和 50 s^{-1} (图 7B 和 7C)。

图 8 所示为不同位置($z/H=0.25$ 、 0.40 和 0.75)两种搅拌桨组合方式的最大剪切速率的径向分布。从图 8A 中可以发现, 锚式桨去除后使得 $2r/T$ 在 0.6 到 0.8 之间的最大剪切速率都降至 60 s^{-1} 以下, $z/H=0.40$ 位置的最大剪切速率也由 1400 s^{-1} 降低到 1000 s^{-1} 左右(图 8B)。而对于 $z/H=0.75$ 来说, 此处是上层六斜叶 45° 涡轮桨的位置(图 8C), 所以剪切速率始终在 300 s^{-1} 以下。

通过对两种搅拌桨组合方式的 CFD 模拟可以发现, 去除锚式桨后, 可使反应器内部各个位置的剪切速率都有不同程度的减小, 从 CFD 角度

图 5 反应器内部剪切速率的分布情况

Fig. 5 Distribution of shear rate in stirred reactor (450 r/min).

图 6 不同搅拌转速下锚式桨桨区的剪切速率分布图

Fig. 6 Distribution of shear rate around anchor at various impeller speeds.

叶 45° 涡轮桨。表 5 所示是转速为 1000 r/min 条件下搅拌桨组合方式对 HA 发酵过程的影响。

从表中可以看出, 两种桨组合方式对菌体量和 HA 产量的影响并不明显, 但是对 HA 分子量的影响显著。当有锚式桨时, HA 的分子量仅有 $(1.59\pm 0.09)\times 10^6$ D; 而去除锚式桨后, HA 分子量却增加了 23.9%。在 HA 发酵过程中, 微生物对氧气

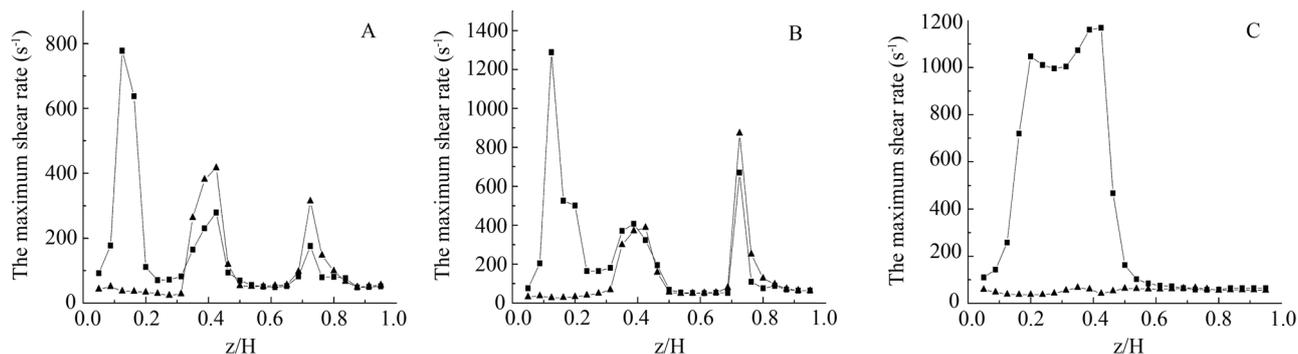


图7 两种搅拌桨组合方式下最大剪切速率的轴向分布

Fig. 7 Axial profiles of maximum shear rate with two different impeller combinations. ■: with anchor; ▲: without anchor.

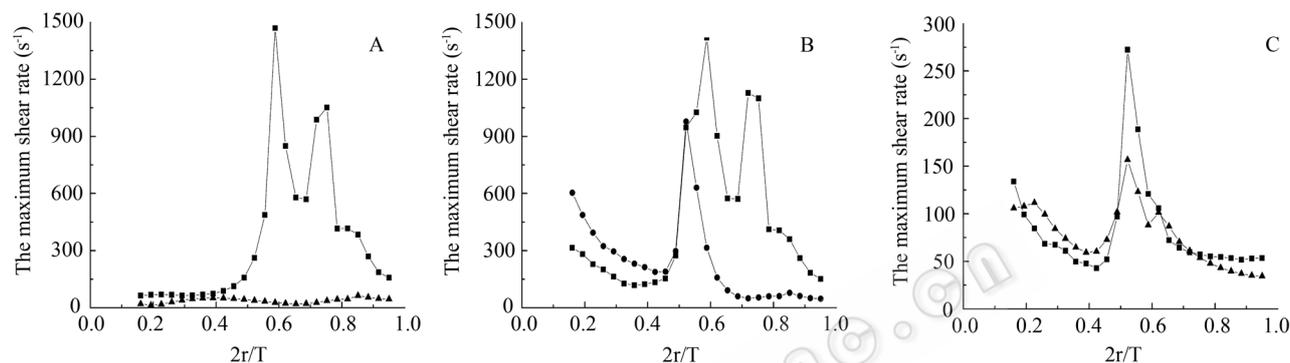


图8 两种搅拌桨组合方式下最大剪切速率的径向分布

Fig. 8 Radial profiles of maximum shear rate with two different impeller combinations. ■: with anchor; ▲: without anchor.

证明了本研究关于桨组合方式对 HA 分子量影响所做出的推断。

3 结论

本研究结合 CFD 技术研究搅拌对 HA 发酵过程的影响发现, HA 分子量随着搅拌转速的增加呈现出先增加后降低的变化趋势, 并且转速对 HA 分子量的影响主要体现在 HA 合成阶段。搅拌转速的提高使得混合时间明显降低, 同时反应器内部的剪切速率显著提高。最终通过去除锚式桨的手段解决了混合与剪切之间的矛盾, 使得 HA 分子量提高了 23.9%。

REFERENCES

- [1] Chong FB, Blank LM, McLaughlin, *et al.* Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **66**(4): 341–351.
- [2] Kogan G, Soltis L, Stern R, *et al.* Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(1): 17–25.
- [3] Liu L, Du G, Chen J, *et al.* Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresour Technol*, 2008, **99**(17): 8532–8536.
- [4] Chong FB, Nielsen LK. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochem Eng J*, 2003, **16**(2): 153–162.
- [5] Armstrong DC, Cooney MJ, Johns MR. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**(3): 309–312.
- [6] Hiruta O, Yamamura K, Takebe H, *et al.* Application of maxblend fermentor® for microbial processes. *J Ferm Bioeng*, 1997, **83**(1): 79–86.
- [7] Liu L, Wang M, Du G, *et al.* Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Lett Appl Microbiol*, 2008, **46**(3): 383–388.
- [8] Johns MR, Goh L-T, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnol Lett*, 1994, **16**(5):

- 507–512.
- [9] Gao HJ, Chen J, Du GC, *et al.* Effect of agitation and mixing on hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Chem Ind Eng*, 2003, **54**(3): 350–356.
高海军, 陈坚, 堵国成, 等. 搅拌与混合对兽疫链球菌发酵生产透明质酸的影响. *化工学报*, 2003, **54**(3): 350–356.
- [10] Kim JH, Yoo SJ, Oh DK, *et al.* Selection of a *Streptococcus equi* mutants and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microbiol Technol*, 1996, **19**: 440–445.
- [11] Huang WC, Chen SJ, Chen TL. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochem Eng J*, 2006, **32**(3): 239–243.
- [12] Armstrong DC, John MR. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **63**(7): 2759–2764.
- [13] Hasegawa S, Nagatsuru M, Shibutani M, *et al.* Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend[®] fermentor. *J Biosci Bioeng*, 1999, **88**(1): 68–71.
- [14] Bitter T, Muri HM. A modified uronic acid carbazol reaction. *Anal Biochem*, 1962, **4**(6): 330–334.
- [15] Laurent TC, Ryan M, Pietruszkiewicz A. Fractionation of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body. *Biochim Biophys Acta*, 1960, **42**: 476–85.
- [16] Aubin J, Fletcher DF, Xuereb C. Modeling turbulent flow in stirred tanks with CFD: the influence of the modeling approach, turbulence model and numerical scheme. *Exp Therm Fluid Sci*, 2004, **28**(5): 431–445.
- [17] Duan XJ, Yang L, Zhang X, *et al.* Effect of oxygen and shear stress on molecular of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(4): 718–724.
- [18] Van de Rijn I. Streptococcal hyaluronic acid: proposed mechanisms of degradation and loss of synthesis during stationary phase. *J Bacteriol*, 1983, **156**(3): 1059–1065.
- [19] Crater DL, Van de Rijn I. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci. *J Biol Chem*, 1995, **270**(31): 18452–18458.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

中国瓢虫原色图鉴

任顺祥 王兴民 庞虹 彭正强 曾涛 编著
978-7-0-025293-7 ¥350.00 2009年10月 出版

内容简介

世界上瓢虫记录已超过 6000 种。我国瓢虫资源丰富,是世界上已知瓢虫种类最多的国家,目前已记录 725 种。本书系统地介绍了瓢虫的外部形态,食性,瓢虫标本的采集、制作、保存及图像拍摄等基本知识;记述了我国瓢虫 375 种,包括 10 亚科 22 族 89 属或亚属。全部种类附有成虫彩图和外生殖器特征图,便于按图鉴定。书末附有拉丁学名和中文学名索引。

本书可供从事昆虫学、植物保护和生物防治领域的教学和科研工作者以及瓢虫爱好者参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目