

基于自联想神经网络的毕赤酵母发酵过程两阶段故障诊断

高敏杰^{1,2}, 詹晓北^{1,2}, 郑志永^{1,2}, 吴剑荣^{1,2}, 金虎^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在毕赤酵母表达人血清白蛋白-人白介素-2 融合蛋白(IL-2-HSA)过程中, 诱导期甲醇浓度和 pH 值直接影响了 IL-2-HSA 表达量的高低和发酵过程的稳定。为了准确有效的控制这两个参数, 本论文基于毕赤酵母诱导期的生理学特性和过程参数特征, 提出了基于自联想神经网络的毕赤酵母表达 IL-2-HSA 过程的诱导期两阶段故障诊断。研究结果表明该诊断系统能够在线快速准确地诊断出毕赤酵母诱导期的各种故障。当系统提示出现故障时, 离线分析, 对比最优的 pH 值和甲醇质量浓度变化曲线, 确定故障类型, 采取相应措施。

关键词: 毕赤酵母; 神经网络; 故障诊断; 甲醇浓度

中图分类号: TQ 926.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0592-07

Two-Stage Fault Diagnosis of *Pichia Pastoris* Fermentation Based on an Auto-Associative Neural Network

MIN-Jie Gao^{1,2}, XIAO-Bei Zhan^{1,2}, ZHI-Yong Zheng^{1,2}, JIAN-Rong Wu^{1,2}, HU Jin^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: For the IL-2-HSA expression with *Pichia pastoris*, methanol concentration and pH during induction phase are two important parameters affecting heterologous protein production and should be strictly controlled at adequate levels. In this study, based on the effective recognition of physiological status and characteristics of parameters, an auto-associative neural network (AANN) model was used for two-stage fault diagnosis in *Pichia pastoris* fermentation processes. The optimized AANN could provide on-line and accurate fault alarm for *Pichia pastoris* induction stage. It was potentially helpful in supplying useful information for removing fault and recovering abnormal fermentation. When detecting methanol over-feeding, glycerol limited feeding could improve the cell activity and release the toxicity of methanol.

Key words: *pichia pastoris*, neural network, fault diagnosis, methanol concentration

白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)是免疫调节中起核心作用的一种疏水蛋白质。它能促进 T 细

胞、B 细胞的分化、成熟及激活其生物活性, 诱导淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)活性, 还能促进许多

收稿日期: 2011-10-09

基金项目: 国家 973 计划项目 (2007CB714303)。

作者简介: 高敏杰(1980-), 男, 江苏省宜兴市人, 发酵工程专业博士研究生。E-mail: jmgao@jiangnan.edu.cn。

* 通信作者: 詹晓北(1962-), 男, 北京人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化工程与反应器等研究。
E-mail: xbzhan@yahoo.com

淋巴因子如干扰素,肿瘤坏死因子等的合成与释放以及抗体生成^[1]。临床应用方面,IL-2 对很多感染性疾病有治疗作用,对某些肿瘤和艾滋病的防治有良好的效果^[2]。目前 IL-2 是医药界公认的基因工程药物中最具有使用价值的药品之一。

甲醇营养型毕赤酵母(*Methylophilic Pichia pastoris*)是近些年来快速发展的、被广泛用来表达外源蛋白的表达系统。它具有许多明显优点,其诱导分泌表达的启动子 AOX1 可用甲醇严格调控,其表达的目标蛋白分泌到上清液,不需复杂的破菌处理等^[3]。近年来,中国毕赤酵母分泌表达 IL-2 的报道也越来越多。在前期的研究中,我们将 IL-2 和人白蛋白(HSA)进行基因融合、构建并获得了能实现 IL-2-HSA 融合蛋白高效表达的重组毕赤酵母,并利用该菌生产长效化 IL-2^[4-5]。IL-2 长效制剂可显著提高药物的生物利用度,有望大幅度降低给药剂量,减少每个临床治疗疗程的给药次数,预计可降低多次密集和大剂量给药所带来的副作用,并减轻频繁给药对患者所造成的痛苦。

在毕赤酵母表达重组融合蛋白过程中,在诱导期如何准确有效的控制甲醇的质量浓度并保持 pH 值的稳定是发酵过程控制的关键^[6]。在毕赤酵母表达目标蛋白过程中,采用甲醇电极反馈控制的方式在线调节反应器中甲醇的质量浓度。但是在生产过程中这种最优化的变化过程却不是每一批次都能实现。甲醇电极的原理是基于甲醇的挥发检测,容易受环境条件和其他挥发性物质的影响,出现以下一些问题:测量值不稳定、线性范围比较小;当实际浓度不在标定的范围内时,测量值在极值附近波动;显示值和实际值之间存在偏移等^[7]。同时,在发酵后期,菌体浓度较高,发酵液粘度相对较高,电极膜的通透性下降,也会造成测量值偏低。因此完全依赖甲醇电极的反馈控制系统存在很大的风险,一旦出现故障可能直接导致发酵失败^[8]。发酵过程的 pH 值在甘油培养期和甲醇诱导期一般都不一致,在发酵过程中要进行 pH 值的调整,同时发酵周期相对较长,pH 值也容易出现漂移或出现测量误差。综上所述,在没有有效改进甲醇电极和 pH 电极稳定性之前,如何及时发现并排除电极故障是毕赤酵母发酵生产外源蛋白过程所要解决的难题。

以前提出了各种基于神经网络的故障诊断方法,但大都基于复杂的数据分析和各种网络的构

建,没有具体结合发酵过程的特性,菌体的代谢以及生理状态分析,参数的选择也没有针对不同的阶段,识别的效果相对较差。本实验对所有的在线数据进行评价筛选后,建立了基于自联想神经网络的在线故障诊断模型并考察了模型的识别效果。结果表面,分段模型具有较高识别的准确率和及时性。同样的方法可以推广到毕赤酵母表达其他外源蛋白过程。

1 材料与方法

1.1 菌株

巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* KM71(MutS His⁻)、表达载体 pPIC9k 为 Invitrogen 公司产品,外源基因为 IL-2-HSA 基因,载体呈线性整合在染色体上(由江南大学工业生物技术教育部重点实验室课题组构建),表达的融合蛋白相对分子质量为 80 000 (IL-2-HSA)。

1.2 培养基

YPD 固体培养基(g/L):酵母提取物 10,胰蛋白胨 20,葡萄糖 20,琼脂 15;种子培养基(g/L):甘油 10,胰蛋白胨 20,酵母提取物 10,KH₂PO₄ 13.6, YNB(Yeast Nitrogen Base) 13.4,生物素 0.4 mg/L,pH 6.0;毕赤酵母摇瓶发酵培养基(g/L):甘油 10,胰蛋白胨 20,酵母提取物 10,KH₂PO₄ 13.6, YNB 13.4,生物素 0.4 mg/L,pH 6.0;毕赤酵母摇瓶诱导培养基(g/L):甲醇 3.96,胰蛋白胨 20,酵母提取物 10,KH₂PO₄ 13.6, YNB 13.4,生物素 0.4 mg/L,pH 6.0;毕赤酵母上罐发酵初始培养基(g/L):甘油 20,蛋白胨 20,酵母粉 10,KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.3,FeSO₄ · 7H₂O 0.2,MnSO₄ · H₂O 0.2;毕赤酵母上罐发酵流加培养基(g/L):甘油 500,蛋白胨 80,酵母粉 30,KH₂PO₄ 5,MgSO₄ · 7H₂O 5;毕赤酵母上罐发酵诱导培养基(g/L):甲醇 396,(NH₄)₂SO₄ 5,KH₂PO₄ 5,MgSO₄ · 7H₂O 3。

1.3 培养方法

将保藏菌种接种到 150 mL 种子培养基中,在 30 ℃,220 r/min 下培养 24 h 后,按体积分数 10% 接种量接入装有 1.5 L 初始培养基的 5 L 发酵罐(Biotech-2002,上海保兴生物设备工程有限公司)中进行发酵,pH 值维持在 5.5,温度为 30℃,通过调节转速和通气量使溶氧(DO)维持在体积分数 10%以上。发酵过程分 3 个阶段:生长阶段、过渡

阶段和诱导阶段。菌体先在上罐发酵初始培养基上间歇培养约 14 h,当甘油耗尽时(DO 迅速上升),采用 DO-Stat 法流加上罐发酵流加培养基进行流加培养。菌体达到一定细胞质量浓度(50 g/L)后,继续采用 DO-Stat 法流加甘油和甲醇的混合培养基(体积比 1:1)大约 3~4 h,使毕赤酵母逐步适应甲醇环境,这个阶段称为过渡阶段。过渡阶段结束后,停止流加,饥饿培养约 0.5 h,使菌体耗尽培养基中的甘油,以解除甘油对甲醇氧化酶(AOX)的阻遏作用。最后采用甲醇电极在线测量甲醇浓度,并以 on-off 的控制方式流加毕赤酵母上罐发酵诱导培养基进行诱导。在诱导阶段使用氨水控制 pH 值于 6.0,发酵温度不变。

发酵过程中,甲醇电极(FC-2002,华东理工大学研制)的输出电压通过 A/D 转换器(PCL-812PG,台湾研华公司产)输入到工控机进行数据采集。工控机将电压值换算成浓度单位后,根据在线测量的浓度和设定值的差异,利用 D/A 转换器(PCL-812PG,台湾研华公司产)驱动一个转速自动可调式蠕动泵(BT00-100 M,保定兰格公司产),并以 on-off 的控制模式流加甲醇诱导培养基。即,当甲醇测定浓度高于设定值时,蠕动泵停转;当浓度低于设定值时,流加泵开启。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞密度的测定 菌体浓度的测定采用分光光度计测定,测定波长为 600 nm。取 10 mL 不同 OD₆₀₀ 值的菌体在冷冻离心机中(11 000 r/min, 4℃)离心 5 min,去掉上清液。取出菌体,用去离子水冲洗 3 次,然后置于 80℃烘箱中至恒重,得出 OD₆₀₀ 值与细胞干质量的关系为:细胞干质量(DCW)=0.2504×(OD₆₀₀)。

1.4.2 甲醇质量浓度离线测定 用气相色谱仪测定。采用 PEG 毛细管柱,内径为 30 m×0.32 mm,初始温度为 50℃,保留 2 min,升温速率为 10℃/min,终止温度为 140℃,保留 8 min。汽化室 220℃,检测器温度 220℃。载气:高纯氮气;载气体积流量:1 mL/min;检测器 FID;H₂ 体积流量 30 mL/min;进样方式:手动进样;分流体积比为 50:1。采用正丁醇为内标。数据采用 N2000 型色谱工作站分析。

1.4.3 发酵尾气分析 采用 LKM2000A 尾气分析仪(韩国 LOKAS 公司)在线测定尾气中的 O₂、CO₂ 含量,并根据通气量、装液量等折算出摄氧速

率(OUR)和二氧化碳释放速率(CER)。

1.4.4 IL-2-HSA 质量浓度以及乙醇氧化酶(AOx)活性测定 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析(考马斯亮蓝 R250 染色),将电泳胶经凝胶成像仪(Biorad 公司)扫描,以低分子标准蛋白(Amersham 公司)为标准。将无细胞酶液加入到含有 100 μmol PBS、1 μmol 4-氨基安替比林、4.3 μmol 苯酚和 10 单位的过氧化物酶的 3 mL 体系中,最后加入 200 μmol 甲醇,开始反应,在 500 nm 下用分光光度计测吸光度的变化(反应产生的过氧化氢与苯酚和 4-氨基安替比林会形成有颜色的醌)。酶活单位定义为:30℃、pH 值 6.0 时,1 min 内产生的过氧化氢与苯酚和 4-氨基安替比林每生成 1 μmol 的产物醌所需的酶量为一个酶活单位(U)^[9]。

1.5 自联想神经网络(AANN)

自联想神经网络是在 20 世纪 90 年代初由 Krammer 首次提出的^[10]。从图 1 可以看出,它是一种特殊的前向网络,除了具有一般前向网络的特征外,其特别之处在于具有单位总增益,即在正常情况下,其输出与输入一致。当然,通过训练高度非线性化的神经网络学习单位映射通常是没有意义的。但自联想网络由于引入了瓶颈层,数据在传递中要经过瓶颈层前的压缩和瓶颈层后的解压缩过程,可以利用其冗余信息对包含于信号中的噪声进行滤波,瓶颈层以前的网络的作用是对输入信息进行映射,提取输入信息中的“精华”;而瓶颈层以后的网络的作用是对信息进行解映射,即对信号进行复原。由于瓶颈层神经元的个数少于输入层和输出层神经元的个数,所以网络对输入信号的映射和解映射过程也就是对信息的压缩和解压缩过程。

2 结果与分析

2.1 最优化 pH 值和甲醇质量浓度变化曲线

诱导期 pH 值和甲醇质量浓度直接影响了细胞的生理状态和目标蛋白的表达水平。前期,在相同的发酵罐中,经过多批次的实验确定了最优化的诱导期 pH 值和甲醇质量浓度变化曲线。在第一阶段的甘油培养期 pH 值控制在 5.5。当甲醇诱导开始时,pH 值调整到 6.0 最有利于外源蛋白的表达^[5]。甲醇质量浓度是诱导期另一个重要控制参数,甲醇质量浓度过高会对细胞产生毒害作用,而过低的甲醇质量浓度则不能有效诱导 AOX 的转录^[11]。图 2

显示了诱导期优化的甲醇质量浓度变化过程。发酵从培养 28 h 开始混加甲醇,4 h 后甲醇质量浓度大约为 0.2 g/L,从 32 h 到 42 h 控制甲醇的流加速度使得甲醇质量浓度缓慢上升到 5 g/L,从 42 h 到

56 h 适当提高甲醇的流加速度使质量浓度逐渐上升到 20 g/L。从 56 h 开始保持 20 g/L 的甲醇浓度不变直至发酵结束,整个流加过程对应于毕赤酵母对甲醇的逐渐适应过程。

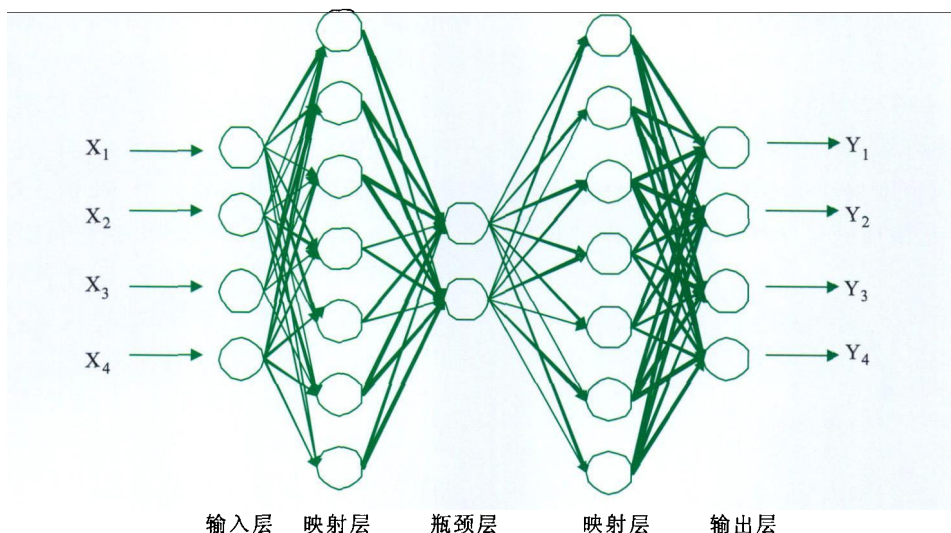


图 1 神经网络结构图

Fig. 1 Structure diagram of AANN. $X_i (i=1,2,3,4)$ and $Y_i (i=1,2,3,4)$ are inputs and outputs of the neural network

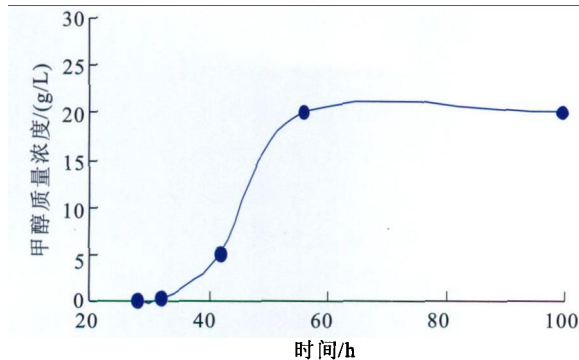


图 2 最优化发酵条件下的甲醇质量浓度随时间的变化曲线

Fig. 2 Optimal profile of methanol concentration during induction phase

图 3 对比了在最优化条件下以及出现一些典型故障情况下的 IL-2-HSA 浓度变化曲线。其中有两个批次((#1, 2) IL-2-HSA 的最高浓度水平达到了 50 mg/L,被认为是正常发酵。其余 4 个批次(#3, 4, 5, 6) IL-2-HSA 的最高质量浓度都在 30 mg/L 以下,被认为是非正常发酵。4 批非正常发酵的故障原因总结如下。由于甲醇电极在发酵前标定出现失误,导致线性范围过窄,批次 3 在诱导后 5 h 甲醇质量浓度就达到了 30 g/L, IL-2-HSA 的浓度只有 23.1 g/L。批次 4 进入诱导期后, pH 值出现了误差,显示的 pH 值为 6.0 但实际值为 7.0,导致整

个诱导期 IL-2-HSA 的质量浓度在 20 g/L 以下。批次 5 由于甲醇电极的线性范围过大,诱导期的甲醇质量浓度始终不超过 10 g/L, IL-2-HSA 的质量浓度也低于 20 g/L。最后的批次 6,由于甲醇电极测量值的漂移,发酵 60 h 开始,甲醇质量浓度超过 30 g/L,造成之后 IL-2-HSA 的浓度下降。从以上的电极故障分析看,当甲醇电极或者 pH 电极出现故障时,甲醇质量浓度和 pH 水平不能够控制在最优条件下,蛋白的表达量低于正常发酵水平的 50% (质量浓度比)。

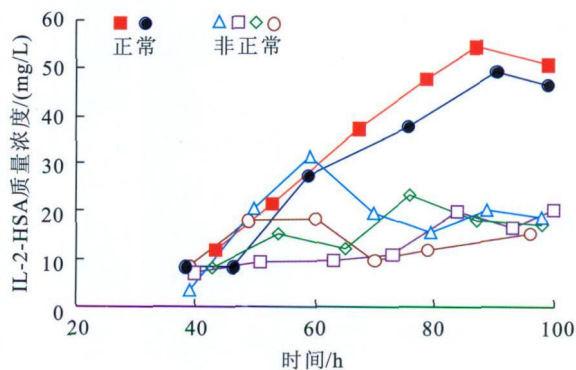


图 3 “正常”和“非正常”发酵过程的 IL-2-HSA 生产曲线
Fig. 3 Curves of “normal” and “abnormal” IL-2-HSA expression

2.2 基于醇氧化酶(AOX)酶活变化的诱导期分段

AOX 是甲醇代谢的第一个酶,将甲醇氧化为甲醛,同时释放 1 单位的过氧化氢。甲醛再被甲醛脱氢酶(FAD)氧化,形成 1 单位的 *s*-甲醛谷胱甘肽,然后在甲酸脱氢酶的作用下形成 CO_2 ,并重新释放谷胱甘肽。由于 AOX 的诱导效果将直接影响发酵过程中毕赤酵母对甲醇的利用情况以及目的蛋白的表达,因此,研究 AOX 在诱导初期的合成速率以及酶活变化就显得非常必要^[12]。AOX 活性变化的趋势可以间接反映出毕赤酵母诱导期代谢活性的变化。

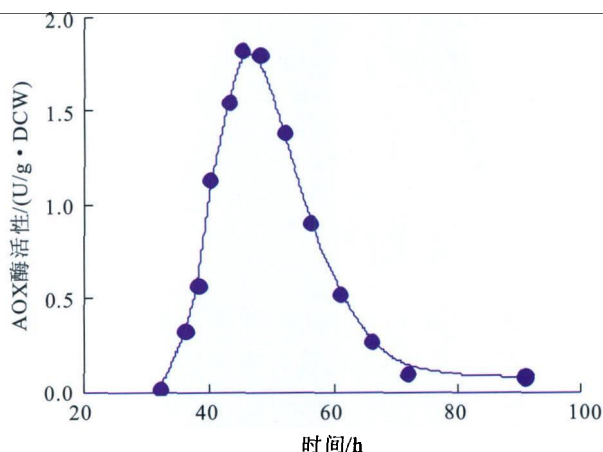


图4 甲醇诱导期 AOX 酶活性变化趋势

Fig. 4 Profiles of AOX activity in methanol induction phase

实验测定表明重组毕赤酵母以甘油为碳源进行细胞生长,在不存在甲醇的情况下,菌体内无法检测出乙醇氧化酶(AOX)的酶活。为了使毕赤酵母能够更好的适应碳源从甘油向甲醇的转变,在诱导前流加甘油和甲醇混合碳源的流加液,此时发酵培养基中只含有少量甲醇。如图4所示,在这个时期菌体已经合成了少量的乙醇氧化酶,此时的为 0.014 U/g。该现象说明在毕赤酵母培养的过渡阶段,正是乙醇氧化酶诱导形成过程,受甲醇的严格和精确调控。在诱导阶段的前 16 h, AOX 酶活呈线性增长,在诱导后 16 h 左右达到最大值单位细胞干质量的酶活 1.83 U/g。此后开始逐渐下降。

根据以上分析,基于细胞代谢活性的变化趋势,有必要把诱导期分成两个阶段,表达前 16 h 的 AOX 活性逐渐达到最大,即从发酵 32 h 到 48 h 为第一阶段,从 43 h 以后到发酵结束为第二阶段,这个阶段 AOX 活性逐渐下降。考虑到神经网络识别有滞后性,在两个阶段中间有 3 h 的重叠区域。

2.3 两阶段自联想人工神经网络的建立和测试

一般而论,利用在线可测的状态变量来构建 AANN 模型并进行发酵过程故障诊断是最理想的。毕赤酵母发酵过程可以在线监测的参数主要有温度、溶氧浓度、pH 值、搅拌转速、二氧化碳生成速率(CER)、氧气消耗速率(OUR)、甲醇消耗速率、氨水消耗速率。过程数据储存在上位机。根据诱导期两个阶段的特点,分别选用不同的输入参数构造两个不同的自适应神经网络,都是 5 层网络,传递函数是 S 型(sigmoid)传递函数。层数为 4、7、2、7、4。第一阶段是甲醇的添加量、搅拌转速、OUR、CER;第二阶段是氨水添加量、搅拌转速、OUR、CER,同时还把所有数据归一化到 0 到 1 之间。在诱导中后期,随着 AOX 活性的提高,毕赤酵母对甲醇逐渐适应,甲醇质量浓度从 0 提高到 20 g/L 左右,因此甲醇的添加量是反映甲醇质量浓度的重要指标。在诱导中后期,蛋白表达速度高于前期,氨水添加速度也随之增加,因此氨水添加量是一个重要的过程参数。对神经网络进行训练和测试是将每一批次的甲醇的添加量、氨水添加量、溶解氧浓度、二氧化碳的产生速率(CER)、搅拌转速、氧气的消耗速率(OUR)的值记为一批数据,并将所有发酵批次的发酵测量数据分成两部分,前 5 批数据为训练样本,后 5 批数据为检验样本。按照 AANN 模型的拓扑学结构,在输入正常发酵数据时,原有数据在 AANN 输出层的相应神经元上可以得到复原、网络的输出值与输入值基本保持一致;而在输入“非正常发酵”的数据时,位于瓶颈层处的数据将会被映像到不同的拓扑空间处,网络的输出值与输入值会出现很大的差异。通过在线计算各发酵时刻、网络输入和输出层中各单元值之差的平方和,并以此作为评价标准,就可以对发酵过程进行在线故障诊断并发布早期预警信息。

对于完成训练的神经网络,评价因子 J 定义

$$J = \sum_{i=1}^K (Y_i - X_i)^2 / K$$

其中 K 为自联想神经网络输入参数的个数, X_i 和 Y_i 分别为自联想神经网络输入层和输出层的第 i 个神经元的数据。在正常的发酵中,神经网络的输入和输出是相关的。用正常发酵数据作为输入数据时, J 值应该接近于零。另一方面,在采用非正常数据作为神经网络的输入时, J 应该大于零。因为,这

时输入参数会映射到一个与正常发酵不同的子空间。在本研究中, ϵ 为故障判定阈值, ϵ 值一般设定为高于训练数据可能出现的均方误差的两倍($\epsilon = 0.12$)作为“控制极限(阈值)”。当 J 值连续、长期地超出该控制极限时,就可以判定发酵过程中出现了异常情况。如果计算的误差 J 值小于或等于 ϵ , 发酵的状态被认为是正常的。参数 J 发酵状态能被很快诊断出来。图 5 是采用两阶段神经网络进行故障诊断的系统结构图。

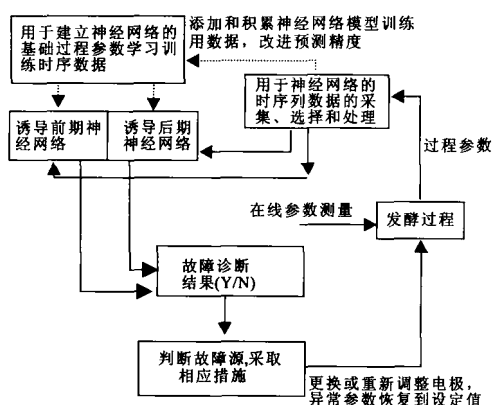


图 5 两阶段故障诊断系统结构图

Fig. 5 Structure of two-stage fault diagnosis system

2.4 利用通过测试的神经网络进行在线故障诊断

利用通过测试的神经网络进行预测必须将输入数据归一化到 0~1 之间,再输入到通过测试的神经网络中,在线计算 J 值,然后与 ϵ 值比较,就能实时判断是否有故障出现。图 6 显示了 3 批未参与 AANN 网络学习训练的毕赤酵母发酵过程 J 值的变化曲线。图 6(a)中 J 值自始至终没有达到或接近控制极限,可认定为是正常发酵。而图 6(b)和图 6(c), J 值分别在第 45 h 和 48 h 左右超过控制极限。据此可以判断在此期间,毕赤酵母发酵出现了故障。在图 6(b)的“非正常发酵”批次中,45 h 甲醇电极出现故障,导致甲醇质量浓度过高。由于没有及时采取补救措施,导致发酵彻底失败。在图 6(c)批次的“非正常发酵”中,实际的 pH 值只有 5 左右。

当系统提示出现故障时,对比最优化的 pH 和甲醇质量浓度变化曲线,反推可能造成发酵“异常”的原因,采取相应措施。对于 pH 值的异常可以通过 pH 值的离线校正然后更换电极来解决。由于甲醇电极的故障导致甲醇质量浓度过高时,有可能出现中毒现象,这时采取何种措施恢复菌体活性,降低甲醇质量浓度是发酵能否继续进行的关键。我

们尝试了限制性添加甘油的方法来恢复菌体的活性^[13]。如图 7 所示,当检测到发酵在 66 h 左右出现甲醇质量浓度过高故障时,立即停止甲醇的流加,同时限制性的流加甘油,流加速度控制在 2 g/(L·h)。图 7(b)显示 OUR 的水平从甘油流加前的 180 mmol/(L·h)恢复到 300 mmol/(L·h)。表示菌体的活性有一定程度的恢复,发酵可以继续进行的。

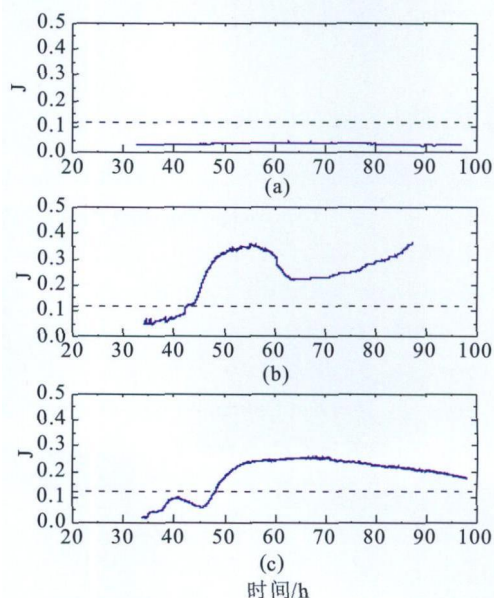


图 6 不同毕赤酵母发酵条件下的诊断结果

Fig. 6 Time curves of J value in different *Pichia pastoris* fermentations

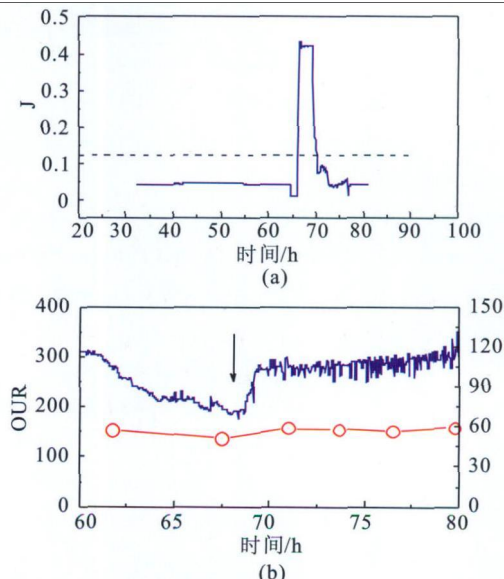


图 7 利用 AANN 的早期预警及处理方法(添加甘油调节活性)

Fig. 7 Early-alarm using AANN in fermentation and fault recovery by limited feeding glycerol

3 结 语

在毕赤酵母发酵过程中,针对诱导期的两个阶段,选择不同的输入参数组合,分别构建了两个自联想神经网络。本文引入了评价指标 J ,利用自联想神经网络对毕赤酵母发酵进行故障诊断。很明显,正常发酵过程的 J 值自始至终没有达到或

接近控制极限。而当诱导期的甲醇浓度或 pH 偏离优化的变化曲线时,发酵过程的 J 值达到并超过控制极限,可据此判断发酵故障产生。该诊断模型对毕赤酵母发酵故障的判断准确及时。甲醇浓度过高对细胞会产生毒害作用,采用限制性流加甘油的手段,菌体的活性明显提高,发酵过程可以延续,这样可以尽可能地降低因故障导致的损失。

参考文献(References):

- [1] Zhang X Y, Feng J, Ye X, et al. Development of an immunocytokine, IL-2-183B2scFv, for targeted immunotherapy of ovarian cancer[J]. **Gynecologic Oncology**, 2006, 103: 848—852.
- [2] McKallip R J, Fisher M, Do Y, et al. Targeted deletion of CD44v7 exon leads to decreased endothelial cell injury but not tumor cell killing mediated by interleukin-2-activated cytolytic lymphocytes [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003, 278: 43818—43830.
- [3] Cereghino G P, Cereghino J L, Ilgen C, et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2002, 13: 329—332.
- [4] 郭泽峰. 人血清白蛋白-人白介素-2 融合蛋白在毕赤酵母中的表达[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 8—22.
- [5] 金光泽, 段作营, 张莲芬, 等. 重组融合人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 突变体在毕赤酵母中的表达 [J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(4): 595—601.
JIN Guang-ze, DUAN Zuo-ying, ZHANG Lian-fen, et al. Expression of the fusion protein human serum albumin/mutant human interleukin 2 C125A in *Pichia pastoris* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(4): 595—601. (in Chinese)
- [6] Yu R S, Dong S J, Zhu Y M, et al. Effective and stable porcine interferon- α ? production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2010, 33: 473—483.
- [7] Jin H, Zheng Z Y, Gao M J, et al. Effective induction of phytase in *Pichia pastoris* fed-batch culture using an ANN pattern recognition model based on-line adaptive control strategy [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2007, 37: 26—33.
- [8] Gao M J, Dong S J, Yu R S, et al. Improvement of ATP regeneration efficiency and operation stability in porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* under lower induction temperature [J]. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 2011, 28: 1412—1419.
- [9] Suye S, Ogawa A, Yokoyama S, et al. Screening and identification of *Candida methanosorbosa* as alcohol oxidase-producing methanol using yeast [J]. **Agricultural Biology and Chemistry**, 1990, 54: 1297—1298.
- [10] Kramer M A. Nonlinear principal component analysis using auto-associative neural networks [J]. **AIChE Journal**, 1991, 37: 233—243.
- [11] Khatri N K, Hoffmann F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris* [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2006, 93: 871—879.
- [12] Jungo C, Marison I, von Stockar U. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures [J]. **Journal of Biotechnology**, 2007, 130: 236—246.
- [13] Sola A, Jouhten P, Maaheimo H, et al. Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates [J]. **Microbiology**, 2007, 153: 281—290.