

文章编号: 1673-1689(2006)05-0028-07

重组毕赤酵母表达期菌体浓度的软测量模型

许哲军, 何云, 郭美锦, 储炬, 张嗣良*

(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:建立了用于在线估计高密度重组毕赤酵母培养过程中处于表达阶段的菌体密度软测量模型。分别对比了基于遗传算法(GA)的动力学软测量模型以及基于人工神经网络(ANN)的软测量模型,并对神经网络软测量模型的拓扑结构以及训练参数进行了初步探讨。当采用基于遗传算法(GA)的动力学模型,模型拟合值的最大误差为7.63%;在采用神经网络软测量技术时,选取合适的模型结构和输入参数,最大误差为3.12%,而且软测量模型可以很好地反映菌体浓度实时变化趋势。该研究结果表明,在酵母细胞的高密度培养过程中采用基于神经网络的软测量模型具有较高的准确度,可以较好地实时反映发酵过程中菌体浓度的变化。

关键词:巴氏毕赤酵母;高密度培养;在线估计;遗传算法;神经网络;软测量

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Soft Sensor Modeling for Predicting Biomass Concentration at Recombinant *Pichia pastoris* Expression Phase

XU Zhe-jun, HE Yun, GUO Mei-jin, CHU Ju, ZHANG Si-liang*

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

Abstract: A soft-sensor model based on kinetics and neural network was established for online estimation of cell concentration in high-cell density cultivation of recombinant *Pichia Pastoris*. Performance comparison of the genetic algorithms (GA) and the artificial neural network (ANN) based soft-sensor kinetic models were also conducted, and topological structures and training parameters of the neural network model were computed. The results showed that the maximum error was 7.63% for the GA based model and 3.12% for the ANN model under the condition of the optimized structure and input parameters. Therefore, the ANN model could predict the real time biomass concentration well with a higher accuracy in *P. pastoris* high-cell-density culture.

Key words: *Pichia Pastoris*; high-cell-density cultivation; online estimation; genetic algorithms; artificial neural network; software sensing

微生物发酵过程是一个非常复杂的跨尺度、非线性、线性的动态系统,影响该过程的因素很多,如发酵

收稿日期: 2005-09-07; 修回日期: 2005-11-13.

基金项目: 国家“十五”高新技术发展计划(863计划)项目(2002 aa217021); 国家重大科技专项项目(2002

aa2z3451).

作者简介: 许哲军(1978-),男,江苏宜兴人,生物化学工程硕士研究生。* 通讯作者。

液的组成、浓度、发酵温度、pH 值、溶氧以及菌体浓度等^[1]。其中菌体细胞浓度是该过程中一个非常重要的生物量参数,但目前尚缺乏有效、实用的在线检测手段。

传统的发酵过程常采用离线方法测量菌体浓度,这些方法操作复杂、滞后时间长、误差比较大,而且会由此导致控制滞后的问题。目前解决方案主要集中在以下两个方面:1)研制先进的硬件检测系统,如电容传感器^[2];2)采用先进的软测量技术,建立数学模型在线估算菌体浓度^[3-7]。

软测量技术是一种基于统计数学模型或者人工智能方法的在线估算技术。软测量技术以当前可有效获取的测量信息为基础,以软测量模型为核心,通过计算机实现重要过程变量的估计。在发酵过程中,由易测量的过程变量(如排气 O₂ 和 CO₂),借助于“软测量模型”,通过各种计算和估计,实现对待测过程变量(如生物量、产物浓度)的软测量。其中人工神经网络(ANN)是目前在软测量技术中应用较广的一种建模方法。目前已经有较多的文献报道了基于神经网络的软测量技术在发酵过程中的应用,都取得了比较好的结果,如青霉素的生产过程以及木糖醇的发酵过程^[8]。

通过对重组酵母 *Pichia pastoris* 发酵过程离线和在线实验数据的研究,首先建立起一种基于遗传算法(GA)的动力学模型,然后建立神经网络(ANN)的软测量模型,并且对模型的结构以及训练方法进行了分析和对比研究,获得了一种比较精确的可用于在线估算菌体浓度的软测量模型。

1 材料与方法

1.1 菌种

毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 菌株, Mut^s His⁺, 载体 pPIC9K, 蛋白引导序列来自酿酒酵母的 α-杂交因子(α-Mating Factor, α-MF), 携带有植酸酶基因(*phyA*)。

1.2 培养基及种子制备

培养基及种子制备方法参照文献[9]。

1.3 培养方法

采用全自动 50 L 发酵罐 FUS-50L(A) (华东理工大学国家生化工程技术研究中心研制)装基础料发酵培养基 20 L, 将种子培养液以体积分数 10% 接种量接种, 培养温度 30 °C, 调节搅拌转速及空气流量, 使溶氧(DO)维持在 20% 以上, 用体积分数 25% 的氨水和磷酸调节 pH 值。接种后培养约 20 h, 甘油耗尽, 开始流加 50 g/dL 甘油补料培养基。待菌

浓达到一定值后, 流加甲醇进行诱导培养。

1.4 细胞密度测定方法

菌液稀释后于波长 600 nm 处以去离子水为对照进行比色测定。

$$OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}。$$

1.5 细胞干重测定方法

10 mL 发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 去离子水清洗 2 次, 80 °C 烘干至恒重。光密度值与细胞干重呈线性, 一个 OD₆₀₀ 约为细胞干重 0.231 g/L。

1.6 发酵尾气分析

排气 O₂ 采用顺磁氧分析仪(Magnos 4G)在线检测, 排气 CO₂ 采用分光红外仪(Uras 3G, 德国 H&B 制造)在线检测。代谢生理参数摄氧率(Oxygen Uptake Rate, OUR)和二氧化碳释放速率(Carbon Dioxide Evolution Rate, CER)计算参照文献[1], 呼吸商(Respiratory Quotient, RQ) = CER/OUR。

2 软测量模型的建立与验证

2.1 基于动力学过程的软测量模型

2.1.1 微生物补料分批培养过程动力学模型

Monod、Logistic 和 Haldane 方程是目前比较常用的用于描述细胞生长过程的模型。Logistic 方程能很好地反映分批发酵过程中因菌体浓度增加对自身生长存在抑制作用。Logistic 方程是一个典型的 S 型曲线。因此, 作者采用 Logistic 模型来描述表达相毕赤酵母生长过程。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (1)$$

式中, X 为细胞浓度(g/L); X_m 为最大细胞浓度(g/L); μ_m 为最大比生长速率(h⁻¹); t 为时间(h)。

以 $t = 0$ 时 $X = X_0$ 为条件, 上式积分可得菌体浓度的数学表示:

$$X = \frac{X_m X_0}{X_0 + (X_m - X_0) e^{-\mu_m t}} \quad (2)$$

式(2)表示了酵母生长的菌体生长模型。模型共 2 个参数, 描述了表达过程中菌体生长的变化规律。

2.1.2 模型的参数估计(GA) 遗传算法(GA)模拟生物在自然环境中的遗传和进化过程而形成的一种自适应全局优化概率搜索算法。由于遗传算法具有自适应性、全局优化性和隐含含并行性, 因此遗传算法已成为非线性优化和系统辨识的有效工具, 被广泛应用于机器人系统和神经网络学习过程, 以解决非多项式完全性、规划控制等问题, 均取得了很好的效果。遗传算法在发酵过程中的应用

也愈加广泛^[10-12],作者试图利用遗传算法求解酵母流加过程模型的参数。具体遗传算法的原理参照文献[13]。

确定适应函数^[14]:在已知各参数值的基础上,基于式(2),可通过模型求得各个时间的菌体密度 $X(t)$ 。而遗传算法的目的就是要使求得的模型输出数值 $X(t)$ 尽量接近实际过程中的菌体密度,精确程度高说明模型更接近实际过程。因此,为了准确求取各个待估参数,取以下适应度函数:

$$f(x) = \sum_{i=1}^n (X_i - X_j)^2 \quad (3)$$

式中, X_i 表示菌体实际浓度, X_j 表示模型预测的菌体浓度。适应度函数取实验值与计算值的离差平方和。 $f(x)$ 的值越小,说明求取参数的准确性越高。

估计结果:应用遗传算法进行参数估计,取交叉概率为0.8,变异概率为0.06,遗传世代数为1000代,各估计参数结果如下:最大细胞浓度 X_m 为113.51 g/L,最大比生长速率 μ_m 为0.216 1 h⁻¹。

综上所述,遗传算法求解得到的发酵动力学数学模型见式(4):

$$\frac{dX}{dt} = 0.216 \ln\left(1 - \frac{X}{113.51}\right)X \quad (4)$$

2.1.3 模型的验证 根据以上所建立的发酵动力学模型以及模型参数值,选取未参与模型参数估算的数据点8组,应用于所建的模型,可以得到在酵母表达阶段菌体浓度随诱导时间变化的拟合值,进而计算拟合值和实际实验值之间的相对误差,模拟结果见表1。

表1 未经训练的样本与动力学模型估计值的比较

Tab.1 Comparison of the experimental data with the untrained data

测试样本的 诱导时间/h	实验值/ (DWC g/L)	动力学模型估计值	
		估计值/ (DWC g/L)	误差/%
10	118.038 9	113.428	3.91
20	114.186 6	113.496	0.60
30	112.359 1	113.508	1.02
40	105.465 9	113.508	7.63
50	110.521 9	113.509	2.70
55	115.577	113.509	1.79
60	114.199 3	113.510	0.60
70	113.050 4	113.510	0.41

从表1可以看出:在酵母表达阶段,诱导40 h后,模型的预测菌体浓度和实验值有较大的误差,达到7.63%。其它数据点都比较接近实验值,误差

在5%以内,拟合情况较好。由此说明所建的动力学模型可以较好地反映毕赤酵母诱导阶段的菌体浓度实际变化情况。

此外,该模型也存在一定的局限性,Logistic模型所反映的是菌体发酵过程中自身浓度对反应速率的影响,为生物过程自身负载能力。从模型中可以看出,该过程受单因素控制,当菌体处于高密度培养时,菌体浓度只受自身浓度的限制,模型反映的菌体浓度为无限接近菌体最大浓度 X_m 。在实际反应过程中,当菌体处于低密度培养状态时,酵母生长过程受制约的因素较少,可以假设为单底物限制生长,菌体以指数状态增长,模型可以取得较高的拟合度;但当菌体处于高密度培养时,反应体系的复杂性增强,此时菌体的生长不再为单一底物限制,菌体的自身限制、发酵液中有毒代谢物质的积累、培养基中的供氧、培养液的粘度变化等都会影响菌体的生长,而模型的复杂性并没有改变,依然为单因素影响,从而导致预测数据的偏离。此外,高密度培养时,由于测量菌体密度(OD₆₀₀)过程中,受到发酵液稀释倍数、发酵液中杂质以及菌体自溶导致的对吸光度的影响等干扰,吸光度的测量亦较易出现偏差。而模型没有考虑到这些因素,依然假设为单因素控制,因此导致模型预测值和实验值的偏差。

2.2 基于神经网络的软测量模型

人工神经网络(ANN)是由大量神经元广泛互连而成的网络,是对人脑的数学抽象,它在某种程度上可以模拟生物神经系统的工作过程,从而具备解决实际问题的能力。它可以有效地对模型不确定的数据进行大规模非线性自适应信息处理,自动调节不同类型的非线性响应,是一种新型的黑箱方法。大约在20世纪90年代,ANN才应用到发酵过程。由于其对处理非线性非稳态系统独特的特性,受到科学研究者的注意。在短短的10年间,ANN在发酵过程中的应用已越来越广^[15-17]。

2.2.1 培养过程参数相关性分析 酵母流加培养过程中状态变量主要包括溶氧、菌体浓度、补料速率、二氧化碳释放率(CER)、摄氧率(OUR)、发酵时间 t 、pH值等。这些变量对生物过程都有影响,而且变量之间存在相关性,而它们之间的关系强弱可以用相关系数来表达,相关系数大表示两个变量之间存在强相关性,此时两个变量取其中一个便可以大致表示系统的变化趋势,从而减少神经网络的输入维数,降低网络的复杂性^[18]。相关系数计算公式见式(5):

$$r_{xy} = \frac{\text{cov}(x, y)}{\sqrt{D(x)}\sqrt{D(y)}} \quad (5)$$

式中, $\text{cov}(x, y)$ 为向量 x 和 y 的协方差, $D(x)$ 、 $D(y)$ 分别为向量 x 和 y 各自的方差。

从表 2 中可以看出: CER 与 DO、OUR 与 DO、OUR 与 CER 存在强相关性, 因此在建立相关模型时不需要将以上强相关变量同时作为网络输入变量。

表 2 模型输入变量之间的相关系数

Tab. 2 Relationship between input variables

项目	t (时间)	DO(溶解 氧浓度)	CER(二氧 化碳释放率)	OUR (摄氧率)	S(底物 浓度)
t	1.0000	0.0275	0.1082	0.0620	0.2695
DO	-	1.0000	-0.8916	-0.8992	-0.6712
CER	-	-	1.0000	0.9626	0.8394
OUR	-	-	-	1.0000	0.8467
S	-	-	-	-	1.0000

2.2.2 神经网络模型的确立 经过相关性分析, 为寻找最佳的神经网络拓扑结构, 确定如下的模型输入组合: 1) t 、CER 2) t 、S、CER 3) t 、S、DO 4) t 、S、DO、CER。发酵过程中的菌体浓度作为神经网络模型的输出, 所有模型为含单个隐含层。神经网络的训练算法采用 Levenberg-Marquardt 学习算法, 该算法是一种改进的 BP 算法, 具有训练速度快的优点。选取实验过程中的 71 组数据训练所建立的神经网络模型, 另取 8 组未经训练的实验数据作为测试样本, 模型训练及测试结果见表 3。

表 3 结构及训练方法对网络性能的影响

Tab. 3 Effects of structures and training parameters on the performance of neural network model

实验方案	模型输入	隐层 节点数	mse	最大相对 误差/%
方案 1	t 、CER	7	77.31	4.36
方案 2		8	40.17	2.22
方案 3		9	70.44	2.94
方案 4	t 、S、CER	6	149.78	3.80
方案 5		8	44.67	2.91
方案 6		10	196.66	6.77
方案 7	t 、S、DO	6	102.69	3.31
方案 8		8	40.55	3.12
方案 9		10	70.33	3.64

续表 3

实验方案 序号	模型输入	隐层 节点数	Mse	最大相对 误差/%
方案 10	t 、S、DO、CER	6	67.59	3.18
方案 11		8	56.91	2.93
方案 12		10	156.87	5.00

其中 mse 为模型估计值与实验测试值之间的误差平方和。其表达式见式(6):

$$mse = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y}_i)^2 \quad (6)$$

式中, Y_i 为模型估计值; \bar{Y}_i 为实验测试值; N 为样本个数。

采用以上四组参数作为神经网络模型的输入, 选取适当的隐层节点数, 实验取得了比较高的拟合度。表 3 中采用 t 、S、CER 作为模型的输入, 隐层节点数为 10 个时, 模型的相对误差比较大, Mse 达到了 196.66, 相应的最大误差为 6.77%, 而采用 t 、S、DO、CER 作为模型的输入, 隐层节点数为 10 个时模型的相对误差比较大, mse 达到了 156.87, 相应的最大误差为 5.00%。由此可见, 模型隐层节点数增加的同时也增加了模型的波动性, 容易产生较大的实验误差, 因此合适的隐层节点的选取非常重要。另外, 当隐层节点数为 8 时, 各网络取得了最小的 mse 和相对误差, 因此在网络模型的选取过程中, 8 个隐层节点数为网络模型的最佳选择, 相对误差在 2.22% ~ 3.12%。

2.2.3 模型的验证

对神经网络过程而言, 网络结构的优劣、训练样本的大小、训练参数的选择都会影响网络的性能。最能考验神经网络的性能指标是网络对训练样本集外的测试样本的相应准确度。从表 2、3 可以看出: 由于 DO、OUR、CER 之间具有强相关性, 因此在相同的网络结构以及采用相同的训练参数, 其结果具有较大的关联性。如表 3 所示, 使用 4 类不同的输入组合, 当隐含层为 8 时取得最佳的网络性能。从表 3 中还可以看出, 当网络的输入为 t 、CER 时, 模型已经取得较高的精度, 模型亦取得较高的拟合度。为进一步探讨不同的网络输入对模型性能的影响, 作者采用 2、5、8、11 方案所确定的网络模型, 并采用训练样本外的 8 组实验数据对网络进行性能测试, 测试结果见表 4。

从表 4 可以看出, 方案 2 的最大误差为 2.22%, 方案 5 的最大误差为 2.91%, 方案 8 的最大误差为 3.12%, 方案 11 的最大误差为 2.93%, 4

种实验方案都取得了比较好的拟合结果。其中最大的实验误差仅为 3.12%, 远低于动力学模型的 7.63% 的误差。方案 2 在模型输入只有 t 和 CER 的情况下, 亦达到了非常好的效果。在实际发酵过程中, 由于某些底物浓度测量比较困难, 此时可以使用方案 2 建立模型, 亦可达到较高的拟合精度, 因此相对其它模型输入方案, 方案 2 具有较高的实用价值。从图 1 还可以看出, 模型可以实时反映发酵过程受到多重因素影响时的菌体浓度的变化。由此可见, 神经网络软测量模型可以实现发酵过程中菌体浓度的实时估计。

表 4 未经训练的样本与模型估计值的比较

Tab. 4 Comparison of the experimental data with the untrained data

测试样本 诱导时间/h	实验值 OD ₆₀₀	方案 2		方案 5		方案 5		方案 5	
		估计值 OD ₆₀₀	误差/ %						
10	512	520	1.56	512	0.00	519	1.37	527	2.93
20	496	485	2.22	497	0.20	497	0.20	510	2.82
30	489	496	1.43	497	1.64	496	1.43	484	1.02
40	459	458	0.22	458	0.22	459	0.00	458	0.22
50	481	487	1.25	495	2.91	466	3.12	478	0.62
55	503	503	0.00	496	1.39	503	0.00	501	0.40
60	497	493	0.80	498	0.20	496	0.20	493	0.80
70	492	495	0.61	499	1.42	492	0.00	492	0.00

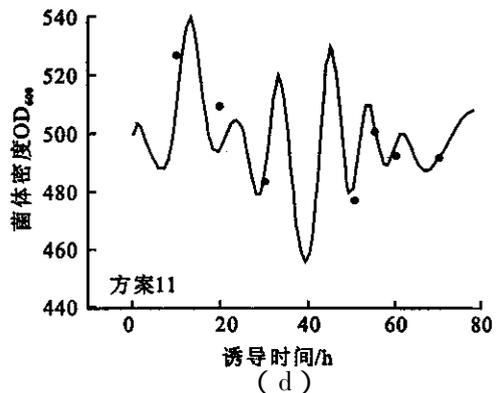
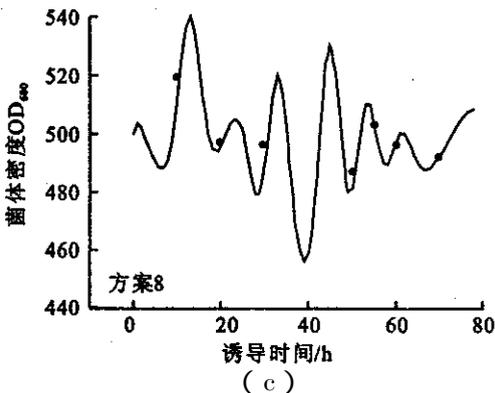
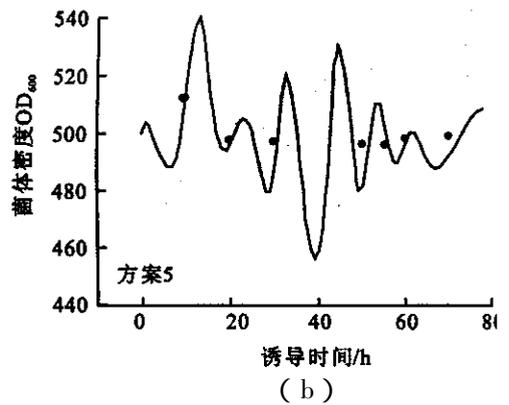
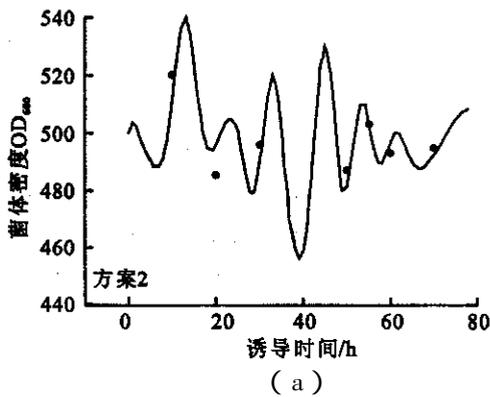


图 1 菌体密度的实验值与在线估计值的比较

Fig. 1 Comparison of the experimental data (·) with predicted biomass values using ANN model (—) 万方数据

动力学模型的建立,离不开模型参数的估算。于显著非线性的发酵动力学模型传统的回归方法具有一定的局限性,容易收敛于局部极值,而且计算困难。而遗传算法在处理复杂的参数非线性函数优化问题时,因为其具有多点并行搜索、寻优速度快、不依赖于模型形式、操作简单方便等特点,可以快速寻找到全局最优解。Pinchuk^[19]等运用遗传算法对建立的多参数发酵过程动力学模型进行参数估计,并对GA寻优参数与文献报道值进行了比较。结果表明,GA在发酵过程多参数动力学模型的参数估算中具有很好的效果,所得参数的拟合程度比其它算法更好。陈宏文等^[20]把遗传算法应用于求解分批发酵动力学模型参数。以赖氨酸分批发酵过程模拟为例,比较GA以及POWELL方法估算模型参数。实验结果表明,遗传算法能进一步提高赖氨酸分批发酵过程状态变量的计算值与实验值的吻合程度。作者首先提出了基于遗传算法的传统动力学软测量模型,并利用遗传算法对动力学模型参数进行了估算,取得了比较好的拟合效果。

自20世纪90年代ANN开始应用到发酵过程中,近10年来,ANN在发酵过程中得到越来越广泛的应用。无论从培养基的优化到发酵过程的模型化,还是从发酵过程的优化控制到错误诊断,ANN

都体现出无比的优越性。作者通过采用神经网络对发酵过程建模的研究,提出基于人工神经网络的软测量模型,对发酵过程酵母表达阶段的菌体浓度进行在线软测量。首先对神经网络的输入参数进行初步探讨,对过程参数进行相关性分析,进而得出模型输入参数的相关系数,大大简化了模型的复杂度和计算量。所建立的菌体软测量模型取得了较高的数据拟合度,从表4与图1可以看出,模型的最大误差仅为3.12%,远低于动力学模型的拟合结果。

在相同的发酵条件下,对以上两类模型进行模型的验证,模型的误差由动力学模型的7.63%降低到3.12%。实验证明,神经网络模型具有更高的适应性,可以更准确地反映发酵过程实时变化,为发酵过程优化提供有效的依据。

综上所述,对处于高密度培养的酵母发酵过程,传统的动力学模型具有一定的局限性,它只能反映少数过程变量对反应系统的影响,而神经网络由于其具有较强的非线性映射功能,对非线性系统建模具有较大的优势,能够对重要的发酵过程的生化变量进行实时预测,对发酵过程的优化具有指导意义。

参考文献:

- [1] 张嗣良,储炬. 多尺度微生物过程优化[M]. 北京:化学工业出版社,2003. 13-14.
- [2] 乔晓艳,贾莲凤. 生物发酵过程菌体浓度在线检测系统的设计[J]. 计算机测量与控制,2003,11(5):324-326.
- [3] 杜锋,刘全,雷鸣. 软测量技术及其在发酵过程中的应用[J]. 食品科学,2002,23(8):352-356.
- [4] Lei Zhi Chen, Sing Kiong Nguang. Soft sensors for on-line biomass measurements[J]. **Bioprocess Biosyst Eng**,2004(26):191-195.
- [5] Popova S, Patarinska T. Biomass estimation on the basis of yeast cultivation model with morphophysiological parameters[J]. **Bioprocess Engineering**,1998(19):313-315.
- [6] Vanek M, Hrnčirik P. On-line estimation of biomass concentration using a neural network and information about metabolic state[J]. **Bioprocess Biosyst Eng**,2004(27):9-15.
- [7] 方千山,王永初. 木糖醇发酵过程软测量[J]. 计算机自动测量与控制,2001,9(5):8-10.
- [8] 方柏山,谢晓兰. 木糖醇发酵过程参数的在线软测量[J]. 天津大学学报,2000,33(5):607-609.
- [9] Sreekrishna K, Kropp K. Non-conventional Yeasts in Biotechnology[M]. Berlin:Springer Press,1996. 203-252.
- [10] 王丹,高玲. 遗传算法及其在发酵工程领域中的应用[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2002,33(2):237-220.
- [11] Debasis Sarkar, Jayant M Modak. Optimisation of fed-batch bioreactors using genetic algorithms[J]. **Chemical Engineering Science**,2003(58):2283-2296.
- [12] J G Na, Y K Chang. Adaptive optimization of fed-batch culture of yeast by using genetic algorithms[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**,2002(24):299-308.
- [13] 王凌. 智能优化算法及其应用[M]. 北京:清华大学出版社,2003. 36-59.
- [14] 姜波,汪秉文. 基于遗传算法的非线性系统模型参数估计[J]. 控制理论与应用,2000,17(1):105-152.
- [15] Zhu Y H, Rajalahti T. Application of neural networks to lysine production[J]. **The Chemical Engineering Journal**,1996,

(62):207-214.

- [16] Petrova M, Koprinkova P, Bliznakova. Neural network modelling of fermentation processes[J]. **Bioprocess Engineering** ,1998 , (18) 281 - 287.
- [17] Shene C , Diez C , Bravo S. Neural networks for the prediction of the state of *Zymomonas mobilis* CP4 batch fermentations[J]. **Computers and Chemical Engineering** ,1999 (23) :1097 - 1108.
- [18] 曲雨水,黄德先. 基于多神经网络的发酵过程菌丝浓度估计[J]. 计算机工程与应用,2004 (10) 208 - 210.
- [19] Pinchuk R J , Brown W A , Hughes S M , et al. Modeling of biological processes using self-cycling fermentation and genetic algorithms[J]. **Biotechnol Bioeng** 2000 (67) :19 - 24.
- [20] 陈宏文,方柏山. 遗传算法应用于分批发酵动力学模型参数估算[J]. 华侨大学学报:自然科学版,2000,21(1):71 - 75.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 27 页)

- [7] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [8] 屠锡德,张均寿,朱家璧. 药剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [9] Mao Shi-rui , Chen Jian-ming , Wei Zhen-ping , et al. Intranasal administration of melatonin starch microspheres[J]. **International Journal of Pharmaceutics** ,2004 272 :37 - 43.
- [10] L Illum , A N Fisher , I Jabbal-Gill , et al. Bioadhesive starch microspheres and absorption enhancing agents act synergistically to enhance the nasal absorption of polypeptides[J]. **International Journal of Pharmaceutics** ,2001 222 :109 - 119.
- [11] Ghania Hamdi , Gilles Ponchel , Dominique Duchene. An original method for studying in vitro the enzymatic degradation of cross-linked starch microspheres[J]. **Journal of controlled release** ,1998 ,55 :193 - 201.
- [12] 李静茹,金征宇. 淀粉微球制备工艺优化[J]. 食品科技,2005 (11) 21 - 23.

(责任编辑:朱明)