

Análisis metabólico predictivo en cultivos por lote en bioreactor utilizando redes neuronales artificiales

José Manuel Martínez Sánchez, Luis Bernardo Flores Cotera

CINVESTAV Zacatenco,
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería,
México

{josem.martinez,lbcotera}@cinvestav.mx

Resumen. Un cultivo en lote de un microorganismo eucarionte operado en un bioreactor permite realizar mediciones en tiempo real de algunos parámetros biológicos y la colecta de muestras del cultivo para realizar mediciones a los parámetros que no pueden ser medidos en tiempo real. En el presente artículo se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de una red neuronal artificial para la predicción de condiciones limitantes en cultivos por lote en bioreactor de las tasas de incremento de biomasa en la levadura *P. Rhodozyma*. La red neuronal artificial se construyó con una arquitectura multicapa, escrita en lenguaje Python donde se evaluaron datos obtenidos de pH, oxígeno disuelto y azúcares reductores de cultivos por lote arrojando una capacidad predictiva del 99 % para el patrón de crecimiento de biomasa, evidenciando así importante capacidad predictiva de estas herramientas para la biotecnología moderna.

Palabras clave: Bioingeniería, redes neuronales, bioprocesos, heurística, bioreactores por lote.

Predictive Metabolic Analysis in Batch-Culture in Bioreactor Using Artificial Neural Networks

Abstract. A batch culture of a eukaryotic microorganism operated in a bioreactor allows real-time measurements of some biological parameters and the collection samples to perform measurements to the parameters that can not be measured in real time. This article shows the results obtained from the application of an artificial neural red for the prediction of limitations in culture per batch in bioreactor for the biomass growth rate in the yeast *P. Rhodozyma*. The artificial neuronal network was built with a multi-layer architecture, written in Python language where the obtained data of pH, dissolved oxygen, biomass and crop reducing sugars per batch yielding a predictive capacity of 99 % for the biomass growth rate, evidencing as important predictive power of these tools for modern biotechnology.

Keywords: Bioengineering, neural networks, bioprocesses, heuristics, batch bioreactors.

1. Introducción

Un bioreactor es un instrumento diseñado para implementar y operar un ambiente biológicamente apropiado para el mantenimiento de líneas celulares específicas en condiciones controladas [7]. El bioreactor está equipado con sensores y actuadores que permiten establecer y controlar con precisión parámetros fisicoquímicos de interés en experimentos de optimización de medios, cultivos continuos, selección de cepas etc (Figura 1) [1]. Los cultivos por lotes en bioreactor son una forma de cultivo donde se utiliza una cantidad de biomasa conocida y una cantidad fija de nutrientes en un medio de cultivo con volumen definido, sin adición subsecuente de biomasa o nutrientes ni salida de productos [7,12].

Este tipo de cultivos son ampliamente utilizados en diversos laboratorios en experimentos de fermentación de diversas líneas celulares, incluyendo microorganismos y células animales y vegetales y se utilizan en aplicaciones variadas como la optimización de medios de cultivo, estudios de escalamiento de bioprocesos, selección de colonias, entre otros [4,12]. Los experimentos en bioreactor permiten registrar mucha información biológica importante mediante la captura de datos de los sensores asociados al sistema, tales como sensor de pH, sensor de oxígeno disuelto y sensor de nivel principalmente, además de permitir establecer configuraciones fijas o dinámicas de parámetros como la agitación, la temperatura y el flujo de aire mediante los actuadores disponibles [5,6].

La caracterización metabólica de un cultivo continuo incluye la captura de datos en línea de los sensores y actuadores disponibles registrando así los niveles de pH, oxígeno disuelto en tiempo real sin embargo, valores de parámetros como los gramos de biomasa producida, el consumo de azúcares y la producción de etanol y proteínas no pueden ser registrados en tiempo real e implican la aplicación de procedimientos *downstream* analizando las muestras recolectadas durante el experimento implicando también un costo asociado de reactivos y mano de obra [6]. El oxígeno disuelto presente en el bioreactor puede ser medido en tiempo real mediante un sensor polarográfico que registre cambios en la conductividad eléctrica de su membrana provocados por una reacción química acoplada a la cantidad de oxígeno presente en el medio (Figura 2). Mientras que las variaciones de pH pueden ser registradas en tiempo real con un sensor electroquímico. La medición de estos parámetros es trascendental para revelar información sobre el desarrollo del cultivo en el bioreactor y están relacionados con una serie de variables biológicas (QO_2) y físicas (kLa) producto del crecimiento celular [3].

Un cultivo por lote en bioreactor puede presentar limitaciones provocadas de forma deliberada por el analista como parte del experimento [14] o pueden aparecer de manera eventual como resultado de ambientes no óptimos para las células en experimentos donde se desconocen los valores más apropiados de cada parámetro y se realizan pruebas para encontrar las mejores condiciones de

cultivo [2,15]. En la actualidad, se han desarrollado diversos estudios de modelos de predicción y análisis que integran técnicas de inteligencia artificial, cuya estructura computacional flexible es capaz de identificar relaciones complejas no lineales entre los datos de entrada y salida [10,13]. Estudios recientes han desarrollado distintos modelos de redes neuronales artificiales para la predicción de cambios en variables biológicas muy diversas, como los estudios llevados a cabo por las corporaciones Verily Life Sciences y Google Inc. donde desarrollaron una red neuronal para aprendizaje profundo denominada *DeepVariant* que es capaz de identificar variaciones genéticas en bases de datos de secuenciación masiva de ADN revelando detalles hasta ahora desconocidos sobre el genoma [11], o los estudios realizados en el Centro de Investigación para las Ciencias de la Salud de Portugal, donde se utilizaron redes neuronales artificiales para optimizar la temperatura, flujo de metanol y concentración de dimetilsulfóxido en un cultivo en bioreactor para producir la enzima Catechol-O-Metiltransferasa. Sus resultados mostraron que la red neuronal artificial fue capaz de describir con gran precisión los efectos de las variables biológicas mencionadas en la producción de la enzima [12], ejemplificando así la relevancia de estos modelos matemáticos en el desarrollo de muchas áreas de la biotecnología moderna.

P.Rhodozyma es un basidiomiceto facultativo con capacidades fermentativas de producción de etanol a partir de azúcar, además de representar una herramienta muy importante para la industria biotecnológica ya que es uno de los pocos microorganismos conocidos capaces de producir el oxo-carotenoide astaxantina, un pigmento con múltiples aplicaciones y un elevado valor en el mercado [15]. Los cultivos por lote de este microorganismo pueden ser implementados en Bioreactor para estudios de diversa índole en procesos con duraciones típicas de más de 80 horas, generando así grandes volúmenes de información [15].

Con base en este panorama, el presente trabajo tiene como objetivo implementar una red neuronal artificial para realizar inferencias acerca de las tasas de crecimiento de biomasa en condiciones de cultivo predeterminadas de la levadura *P.Rhodozyma*, el modelo se construyó con 3 conjuntos de datos de entrada (pH, oxígeno disuelto y azúcares reductores) y un conjunto de datos de salida (Biomasa) y se evaluó mediante parámetros estadísticos la respuesta de la red a la variación del número de capas (desde 1 hasta 5) y el número de neuronas por capa (desde 2 hasta 10); se muestran los resultados de la aplicación del modelo de la red neuronal seleccionada para la predicción de condiciones limitantes en cultivos por lote en bioreactor y cuyos resultados podrían utilizarse para la optimización de medios de cultivo y la selección de cepas.

2. Aspectos metodológicos

El proceso para la obtención de datos biológicos consistió en el desarrollo de 10 cultivos por lote en bioreactor de la levadura *P.Rhodozyma* cada uno durante 84 horas con registro en tiempo real de las concentraciones de oxígeno disuelto y análisis posteriores de los niveles de biomasa y azúcares reductores.

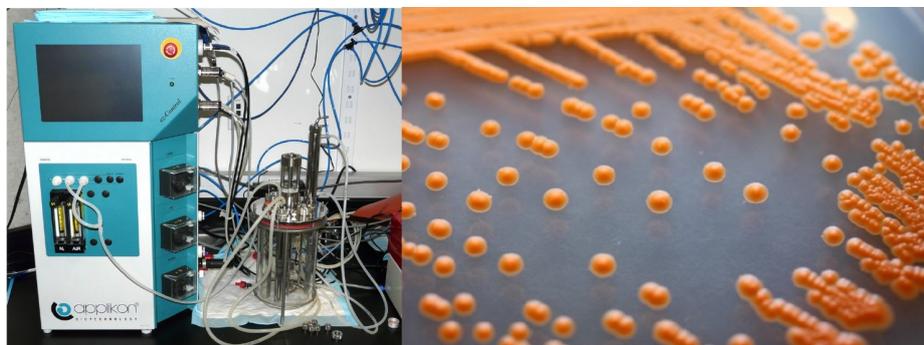


Fig. 1. Los cultivos por lote tienen muchas aplicaciones en biotecnología, a la izquierda, un bioreactor de 3L, a la derecha, colonias aisladas de *P. Rhodozyma*.

2.1. Datos de oxígeno disuelto y pH

La captura de las concentraciones de oxígeno disuelto en tiempo real se llevó a cabo mediante un sensor polarográfico de baja deriva AppliSens en intervalos de tiempo de 60 segundos durante todo el experimento y para cada cultivo, generando conjuntos de datos registrados y almacenados por una computadora acoplada al bioreactor, de igual forma, la captura de datos de pH se realizó con un sensor de pH esterilizable Applisens con registro de datos cada 60 segundos.

2.2. Datos de azúcares reductores

Los niveles de azúcares reductores se evaluaron mediante el método colorimétrico del ácido 3-5 Dinitrosalicílico[16] en muestras colectadas cada 6 horas durante todo el bioproceso.

2.3. Redes neuronales artificiales

Los modelos de redes neuronales artificiales (RNAs) son abstracciones matemáticas de la estructura del sistema nervioso, desarrollados para emular el funcionamiento de los sistemas neuronales biológicos. Estos modelos se basan en el óptimo tratamiento que realizan las millones de neuronas que conforman el cerebro a la información masiva, imprecisa y distorsionada proveniente del ambiente. El objetivo de emular estas estructuras neurobiológicas, es la construcción de sistemas de procesamiento paralelo de cálculo, memoria distribuida y adaptabilidad al entorno, mediante la interconexión de unidades de procesamiento virtuales.

Los modelos matemáticos obtenidos a partir de RNAs se caracterizan por su robustez y, capacidad de aprendizaje, generalización y tolerancia a fallas. Una red neuronal artificial (RNA) es fundamentalmente, un sistema reticular constituido por estructuras paralelas que contienen procesadores elementales,

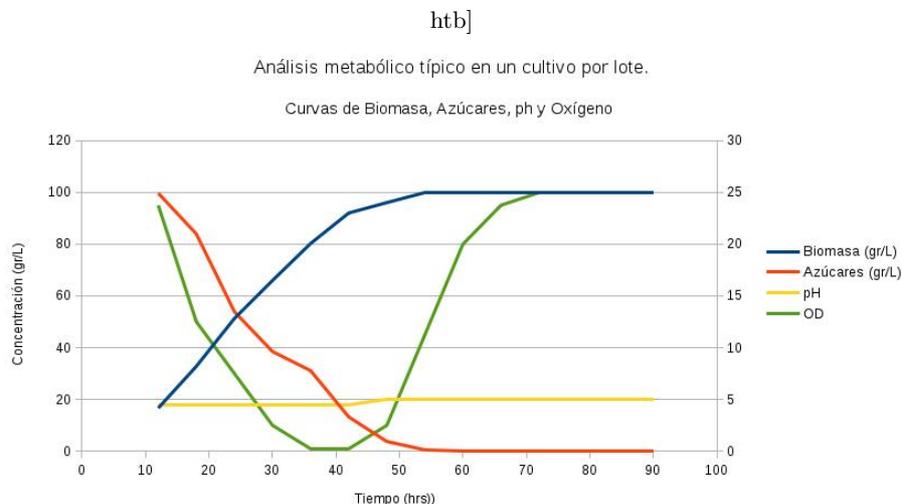


Fig. 2. Graficación de los valores de parámetros biológicos recolectados durante un cultivo por lote.

llamados neuronas, dispuestos en capas e interconectados a través de enlaces con diferentes pesos numéricos asociados a cada elemento. Los elementos fundamentales de toda red neuronal artificial son una capa de entrada, una capa de procesamiento y una capa de salida, donde se encuentran asociadas variables de entrada y de salida, pesos numéricos sinápticos, función de activación, función de propagación y función de salida (Figura 3). La configuración de estos elementos define la eficiencia del sistema[10].

Perceptrón multicapa. La red neuronal artificial utilizada para el desarrollo del programa se denomina red neuronal perceptrón multicapa (RNPM). Este modelo neuronal se caracteriza por ser unidireccional con conexiones *feedforward*, carente de interconexiones a otras neuronas de una misma capa o conexiones hacia neuronas de capas anteriores. En una RNPM el número de capas ocultas puede ser mayor o igual que uno, y difiere de la Red Neuronal Perceptrón (RNP) debido a la implementación de una función de activación no lineal. La arquitectura de la RPNM, dispone de 3 tipos de capas que son :

1. La capa de entrada: receptora de la información desde el exterior
2. Las capas ocultas: operadoras de las funciones de asociación entre la entrada y la salida.
3. La capa de salida: Devuelve las predicciones de la red neuronal (Ecuación 1).

La salida de una capa oculta del perceptrón multi capa, puede ser representada con la expresión:

$$f(x = GW^T x + b) f : R^D \rightarrow R^L, \quad (1)$$

donde D es el tamaño del vector de entrada x . L es el tamaño del vector de salida. G es la función de activación.

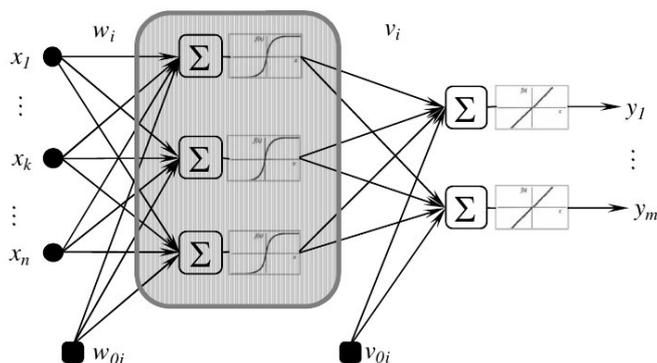


Fig. 3. Estructura general de una red neuronal perceptrón multicapa.

Algoritmo de implementación. El algoritmo para implementar la Red Neuronal Perceptrón Multicapa se implementó en el lenguaje python 2.7.13 cuyas operaciones clave se describen a continuación.

Definir las clases para representar las neuronas de la red.

```
class LayerN():
    def __init__(self, numero de entradas, numero de neuronas):
        asigna los pesos sinapticos iniciales.
```

```
class ANN():
    def __init__(self, capa_1, capa_n-1, capa_n):
        Asigna las capas correspondientes al objeto.
```

```
def_funcionSigmoide(Neurona)
    return La salida de la neurona.
```

```
pesos_S = Inicializa los pesos para la matriz de la primer
            sinapsis aleatoriamente.
```

```
Implementa cambios en las matrices de salida de las capas.
```

```
def test_N(self, inputs):
Donde i = 0
    salida en capa i = producto punto
    (pesos sinapticos de la capa 1,el array ingresado
 como parametro.)
    salida de la capa i + 1 = producto punto
    (salida de la capa i, los pesos sinapticos de la capa i + 1)
    Iterar sobre cada capa disponible.
    return salida en capa i, salida en capa n

Inicializamos parametros para construir la red.
x_0= Matriz de datos de entrada.
y_0= Vector de datos de salida.
ni= Numero de iteraciones.
nn = Numero de neuronas en la capa oculta.
Obtener conjunto de entrada.
Obtener conjunto de salida.

def entrenamiento (self, x_0, y_0, ni):
    for iteration in xrange(ni):
        salida en capa i= self.test_N(x_0)
        salida en capa i+1= self.test_N(x_0)
        Optimizacion para el error cuadratico medio mediante
        el algoritmo Levenberg Marquardt y el criterio
        early stopping.
        Calcular error y deltas para cada capa.
        ajuste_capa_i = producto punto(x_0, delta capa 1)
        ajuste_capa_i+1 = producto punto(x_0, delta capa 2)

        ajuste de pesos para capa i
        ajuste de pesos para capa i+1

Crear la capa i de la red con n neuronas y m entradas
capa_i = LayerN(n, m)
Repetir para cada capa de la red.

Crear la red con n neuronas.
ann = ANN(Numero de capas disponibles.)

Entrenar la red.
ann.entrenamiento(datos de entrada, datos de salida,
                  ciclos de entrenamiento)
```

2.4. Estructura y parámetros de la red

La estructura de la red se compone de 3 conjuntos de datos de entrada (pH, oxígeno disuelto y azúcares reductores) y un conjunto de datos de salida. Se utilizó el algoritmo Levenberg-Marquardt para optimizar el error cuadrático medio y mejorar el ajuste de reconocimiento de patrones debido a que para

este problema en particular, se considera que los parámetros para esta red no son numerosos, por lo tanto la elección de este algoritmo se justifica para ganar velocidad de procesamiento [17].

Se realizaron dos mil repeticiones de ejecución del programa hasta alcanzar la validación total de la información en conjunto con un gradiente con cinco revisiones de validación para evaluar la calidad del sistema. Se evaluó la respuesta de la red a la variación del el número de capas (desde 1 hasta 5) y el número de neuronas por capa (desde 2 hasta 10), generando así veinticinco versiones del modelo. El programa utiliza el 60 % de los datos de los periodos seleccionados para la fase de entrenamiento y los restantes para la validación y prueba del modelo (10 % para cada fase respectivamente). Los pesos iniciales fueron asignados aleatoriamente en el intervalo de (0.5,+0.5). En cada modelo se aplicó la función de entrenamiento y la posterior evaluación de las capacidades predictivas del sistema. Como entradas del modelo se utilizaron datos de pH,oxígeno disuelto y azúcares reductores y como salida del modelo se utilizaron los datos de biomasa.

2.5. Analisis estadístico y métricas de evaluación

Para evaluar la precisión de los modelos elegidos se implementó un programa en lenguaje R (Figura 4), manejado mediante un script en `python` como subproceso `subprocess.call()` que evalúa los valores de los parámetros estadísticos reportados como métricas de evaluación en estudios de modelos de simulación, [8] los cuales son el coeficiente de correlación (CC), coeficiente de concordancia (CCC), raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE), error porcentual absoluto de la media (MAPE), error medio cuadrático (MSE) y error medio absoluto (MAE) de los datos de salida de cada modelo disponible de la red neuronal, el programa almacena la información en disco para su análisis mediante objetos de la clase `shelve` y de acuerdo al siguiente esquema:

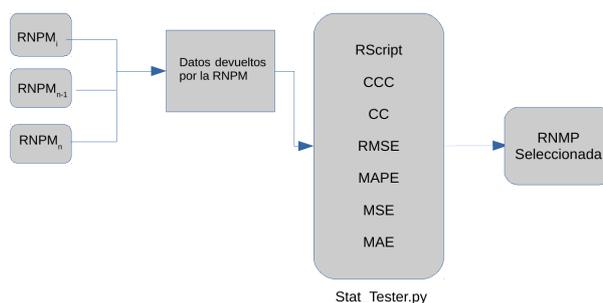


Fig. 4. Esquema de flujo para el análisis estadístico de resultados.

3. Resultados

Al analizar todos los criterios estadísticos antes mencionados entre todas las versiones del modelo, el modelo no. 25 ofreció mejores resultados a juzgar por el máximo coeficiente de correlación y por los valores de los otros criterios estadísticos antes mencionados, este modelo de la red se seleccionó debido a que presenta los mejores resultados favorables, con un máximo Coeficiente de Correlación (0.9958) revelando que dicho modelo presenta un 99 % de precisión del pronóstico en la correlación de los datos de prueba contra los datos simulados por la red neuronal (Tabla 1).

Se observa así mismo el mayor coeficiente de concordancia (0.9958), menor error medio absoluto (0.0171) y menor error medio cuadrático (0.00060), analizando los valores obtenidos de error porcentual absoluto de la media se observa que el resultado de las predicciones del modelo 25 son aceptables al tener un valor menor al 5%. En este modelo se implementaron 5 capas y 10 neuronas por cada capa y los resultados mostrados revelan la importancia de evaluar el número de capas y de neuronas para mejorar la predicción del sistema.

Tabla 1. Selección de los mejores modelos generados.

Modelo	CC	CCC	RMSE	MAPE	MSE	MAE
Mod1	0.9877	0.9877	0.0272	5.1920	0.00071	0.0199
Mod2	0.9751	0.9751	0.0270	5.1901	0.00079	0.0198
Mod3	0.9807	0.9807	0.0270	5.1881	0.00071	0.0198
Mod4	0.9817	0.9817	0.0268	5.0199	0.00074	0.0197
Mod5	0.9841	0.9841	0.0265	5.0190	0.00071	0.0197
Mod6	0.9839	0.9839	0.0265	5.0160	0.00073	0.0196
Mod7	0.9899	0.9899	0.0264	5.0030	0.00071	0.0196
Mod8	0.9905	0.9905	0.0265	5.0001	0.00072	0.0195
Mod9	0.9913	0.9913	0.0263	4.9980	0.00071	0.0193
Mod10	0.9916	0.9916	0.0260	4.9078	0.00078	0.0193
Mod11	0.9944	0.9944	0.0258	4.8950	0.00071	0.0189
Mod12	0.9945	0.9945	0.0254	4.8072	0.00071	0.0188
Mod13	0.9945	0.9945	0.0250	4.7033	0.00070	0.0182
Mod14	0.9946	0.9946	0.0243	4.5234	0.00070	0.0181
Mod15	0.9947	0.9947	0.0240	4.5099	0.00070	0.0181
Mod16	0.9949	0.9947	0.0238	4.4999	0.00070	0.0180
Mod17	0.9952	0.9952	0.0235	4.4556	0.00070	0.0180
Mod18	0.9955	0.9955	0.0226	4.4188	0.00069	0.0179
Mod19	0.9955	0.9955	0.0226	4.4102	0.00067	0.0178
Mod20	0.9956	0.9956	0.0225	4.4011	0.00068	0.0178
Mod21	0.9956	0.9956	0.0225	4.4001	0.00068	0.0176
Mod22	0.9957	0.9957	0.0225	4.3398	0.00068	0.0175
Mod23	0.9957	0.9957	0.0224	4.3399	0.00069	0.0174
Mod24	0.9957	0.9957	0.0224	4.3301	0.00069	0.0172
Mod25	0.9958	0.9958	0.0223	4.3121	0.00060	0.0171

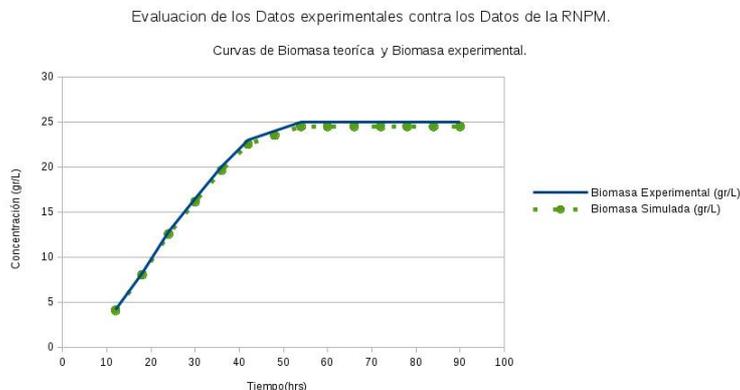


Fig. 5. Comparación entre los resultados de los niveles de biomasa experimentales contra los niveles de biomasa predichos por la red neuronal.

4. Conclusiones

La simulación de las tasas de aumento de biomasa en un bioreactor operado en cultivo por lote utilizando redes neuronales multicapa generó información estadística muy útil, presentada en la tabla 1, para predecir el comportamiento del cultivo en función del tiempo bajo condiciones definidas, representando así una herramienta muy eficiente para predecir limitaciones en desarrollo del cultivo o cambios en los patrones de crecimiento en experimentos de selección de colonias, esta conclusión se encuentra soportada por el análisis de los datos de salida de la red neuronal (Figura 5), cuya gráfica revela un patrón muy similar a la gráfica de los datos experimentales, donde una limitación en el crecimiento sería fácilmente identificable por pendientes negativas en la gráfica.

La implementación de la red neuronal perceptrón multicapa en el lenguaje Python 2.7.13 permitió obtener un modelo con coeficientes de correlación de pearson y concordancia de un 0.9958 reflejando una muy fuerte relación entre los datos experimentales y los datos simulados por la red neuronal y en conjunción con error porcentual absoluto de la media menor al 5%, se obtuvo un modelo robusto con una elevada precisión en la predicción. La aplicación de este tipo de modelos representa una importante alternativa para la generación de herramientas de detección de limitaciones metabólicas acoplado al sistema de adquisición de datos del bioreactor, que sea capaz de identificar cambios en patrones de los niveles de biomasa aportando información muy importante al experimentador para aplicar ajustes oportunos a las condiciones de cultivo o seleccionar cepas distintas de una misma línea celular optimizando condiciones de operación.

La propuesta elegida en el presente trabajo para inferir las tasas de variación de biomasa se encuentra justificada en el hecho de que una red neuronal permite modelar fenómenos de múltiples variables en relaciones no lineales como es el

caso del problema abordado en el presente trabajo y los resultados obtenidos, de igual manera Python y R son lenguajes ampliamente usados para la ciencia de datos y visualización de información compleja y ofrecen flexibilidad y potencia en para el diseño de software científico. La capacidad de las redes neuronales multicapa para modelar fenómenos no lineales sería muy útil en investigaciones futuras basadas en el presente trabajo para desarrollar un modelo predictivo que involucre los niveles de expresión genética de los genes relacionados a los cambios metabólicos de interés con las condiciones de operación del cultivo, conectado así datos de expresión genética con variables fisicoquímicas del ambiente surgiendo la posibilidad de disponer de un modelo predictivo avanzado que permita optimizar más finamente las condiciones de operación del cultivo para la producción de metabolitos específicos en esta importante levadura de interés comercial.

Agradecimientos. Los autores agradecen profundamente al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN por las facilidades prestadas en equipos e infraestructura para la realización del presente trabajo.

Referencias

1. Zhou, J.X., Huang, S.: Synthetic Biology- Tools and Applications. Chapter 5 - theoretical considerations for reprogramming multicellular systems, pp. 81–99, (2013)
2. Fritz, G., Buchler, N.E., Hwa, T., Gerland, U.: Designing sequential transcription logic: a simple genetic circuit for conditional memory. *Systems and Synthetic Biology*, 1, pp. 89–98 (2007)
3. Tu, B.P., Kudlicki, A., Rowicka, M., McKnight, S.L.: Logic of the yeast metabolic cycle: Temporal compartmentalization of cellular processes. *Science*, 310(5751), pp. 1152–1158 (2005)
4. Stano, P., De Souza, T.P., Kuruma, Y., Carrara, P., Luisi, P.L.: Synthetic Biology- Tools and Applications. Chapter 14 - semi-synthetic minimal cells: Biochemical, physical, and technological aspects, pp. 261–276 (2013)
5. Bishop, C.: *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford University Press (1996)
6. Abbas, A., Al-Bastaki, N.: Modeling of an RO water desalination unit using neural networks. *Chem. Eng. J.*, 114, pp. 139–143 (2005)
7. Inar, O., Hasar, H., Kinaci, C.: Modeling of submerged membrane bioreactor treating cheese whey wastewater by artificial neural networks. *J. Biotechnol.*, 123, pp. 204–209 (2006)
8. Lin, L., Hedayat, A.S., Sinha, B., Yang, M.: Statistical methods in assessing agreement: Models, issues, and tools. *Journal of the American Statistical Association*, 97(457), pp. 257–270 (2002)
9. Da Silva, I.N., Flauzino, R.A.: An approach based on neural networks for estimation and generalization of crossflow filtration processes. *Appl. Soft Comput.*, 8, pp. 590–598 (2008)
10. Harvey, R.L.: *Neural networks principles*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs (1994)
11. Poplin, R.: Creating a universal SNP and small indel variant caller with deep neural networks. Cold Spring Harbor Laboratory bioRxiv (2018)

12. Pedro, A.Q., Martins, L.M., Dias, J.M., Bonifcio, M.J., Queiroz, J.A., Passarinha, L.A.: An artificial neural network for membrane-bound catechol-O-methyltransferase biosynthesis with *Pichia pastoris* methanol-induced cultures. 14(113) (2015)
13. Da Silva, I.N., Flauzino, R.A.: An approach based on neural networks for estimation and generalization of crossflow filtration processes. Appl. Soft Comput., 8, pp. 590–598 (2008)
14. Mickel, L., Jansen, A., et. al.: Saccharomyces cerevisiae strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. FEMS Yeast Research, 17 (2017)
15. Mata-Gómez, L.C., et. al.: Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microb Cell Fact, 13(12) (2014)
16. Miller, G.L., et. al.: Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 31, (1959)
17. Kermani, B.G., et. al.: Performance of the LevenbergMarquardt neural network training method in electronic nose applications. Sensors and Actuators B: Chemical, 110(1), pp. 13–22 (2005)