

Технология перемешивания Reverse-Spin®: инновационный принцип выращивания микроорганизмов

Авторы:

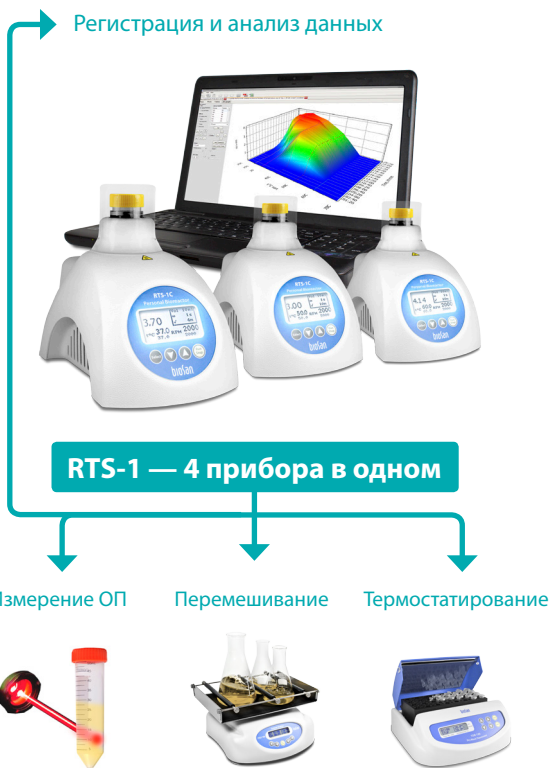
В. Банковский, И. Банковский, П. Банковский,
 Ю. Исакова, И. Дьячкова, А. Шарипо, А. Дишлерс,
 Р. Розенштейн, В. Сарычев, С. Дьяченко, В.
 Макаренко, У. Балодис.

Введение

В настоящей работе представлены теоретические и экспериментальные данные роста микроорганизмов с использованием принципа перемешивания Reverse-Spin (RS). Reverse Tube Spinner (RTS) - это персональный микробиореактор, в котором применяется не инвазивное, механически управляемое, энергосберегающее, инновационное перемешивание, где клеточная суспензия перемешивается вращением пробирки-биореактора вокруг своей оси с изменением направления вращения, что приводит к высокоэффективному перемешиванию и аэрации для аэробного культивирования. Так же, есть возможность культивирования микроаэрофильных и облигатно анаэробных микроорганизмов (не строгие анаэробные условия). Оптическая система в ближнем ИК позволяет регистрировать кинетику роста клеток не инвазивно в реальном режиме времени во время вращения пробирки.

В данной публикации впервые продемонстрированы экспериментальные результаты, полученные с использованием технологии Reverse-Spin. Оптимизированы условия роста для нескольких модельных микроорганизмов, таких как факультативные анаэробные *E.coli* и *B.subtilis*, экстремальный аэробный микроорганизм *Thermophilus sp.*, микроаэрофильный *L.acidophilus* и метилотрофные дрожжи *P.pastoris*. Обсуждаются научно прикладные аспекты одноразовых персональных биореакторов и их потенциальная ниша в разных областях биотехнологии.

Принципы перемешивания жидкостей являются одними из ключевых направлений в биоинженерии. Область смешивания не ограничивается биореакторами - перемешивание также имеет важное значение для изучения биохимических и молекулярно-биологических процессов. Технологии не инвазивного перемешивания включают в себя разные способы, как показано в таблице 1. Отсутствие инвазивных перемешивающих узлов внутри биореактора позволяет использовать RTS как устройство турбидиметрической регистрации кинетики роста микроорганизмов, измеряющее мутность образца в реальном режиме времени. Интуитивное программное обеспечение позволяет задавать оптимальные параметры ферментации, регистрирует все параметры (интенсивность перемешивания в об/мин и время смены вращения (RST), температуру, специфическую скорость роста и концентрацию клеток в ОП₆₀₀ или в других единицах, например г/л сухого веса).



№	Рисунок	Тип движения	Инструмент	Макс. V
1		Орбитальное		0,1–5 л
2		Колебательное		1–100 л
3		Круговое вращение с оборотом пробирки вокруг своей оси		1–50 мл
4		Возвратно-поступательное («движение руки»)		1–50 мл
5		Вихревое (вортекс)		1–50 мл
6		Реверсивное вращение (Reverse-Spin)		1–2000 мл

Табл. 1. Сравнение неинвазивных методов перемешивания

Инициирование Reverse-Spin перемешивания (RS) и глубина вихревой воронки зависят от 1) угловой скорости сосуда биореактора 2) времени, прошедшего с момента инициации вращения реактора 3) частоты смены вращения пробирки 4) вязкости среды 5) температуры. Эти параметры также определяют угловую скорость вращающегося вихревого слоя (vortex layer - VL) и длительность переходного состояния от потенциального вихря (irrotational vortex - IRV), для которого угловая скорость VL пропорциональна радиусу, до вращающегося вихря, для которого угловая скорость слоя VL та же, а сам слой VL выглядит как монолитная и однородная вихревая воронка, как показано на рисунках 1-2. Общие правила, регулирующие процессы смешивания вихревого типа, можно сформулировать следующим образом: чем больше времени прошло с момента образования вихря, тем более очевидным является переход от IRV к RV. Другими словами, смешивание жидкой среды осуществляется вращением и периодическим изменением направления вращения. Вращение несколько раз увеличивает площадь контакта между жидкой и газообразной фазами, и изменение направления вращения разрушает равномерный вихрь. Эти факторы значительно повышают эффективность смешивания, а также площадь интерфазы между жидкой и газообразной фазами. Таким образом, насыщение и растворимость газа в жидкости происходит с большей эффективностью, чем в большинстве стандартных перемешивающих устройствах. На основе этих предположений основана концепция Reverse-Spin перемешивания.

Путем использования центробежных сил, пузырьки создаваемые перемешиванием, выталкиваются в интерфазу между жидкой и газообразной фазами, как показано на рисунке 3. Также продемонстрированы другие преимущества RTS по сравнению с колбами и описаны на рисунке 4. Небольшое количество пузырьков и принцип перемешивания Reverse-Spin позволяет использовать RTS в качестве устройства регистрации и мониторинга кинетики роста клеток. Конечные концентрации клеток *E.coli* в богатых питательных средах значительно превышают 1 ОП₆₀₀, что требует остановки процесса культивирования для взятия стерильного образца с последующем его разбавлением. Это делает процесс выращивания клеток и контроль их концентрации очень трудно воспроизводимым. Проблема заключается в том, что турбидиметрические коэффициенты, в отличие от молярных коэффициентов экстинкции, не являются линейными. Поведение света в плотных клеточных суспензиях в 50 мл фальконах, как показано на рисунке 5, очень интересно, и при более чем 2 ОП₆₀₀ практически невозможно напрямую измерить концентрацию клеток (если не измерять рэлеевское рассеяние).

Мы подошли к этой проблеме с другой стороны. Как и в кювете с оптическим путем в 10 мм, когда достигается определенная концентрация образца, свет не может пройти к детектору фотометра, и требуется разбавить образец до диапазона 0-0,4 ОП₆₀₀. Как показано на рисунке 6, в случае перемешивания типа «RS» и сформированного монолитного слоя жидкости в зависимости от рабочего объема сравним с механическим разбавлением, уменьшающим оптический путь для измерения, что

Принцип неинвазивного вихревого перемешивания

Распределение жидкой среды внутри вращающейся пробирки в зависимости от скорости вращения

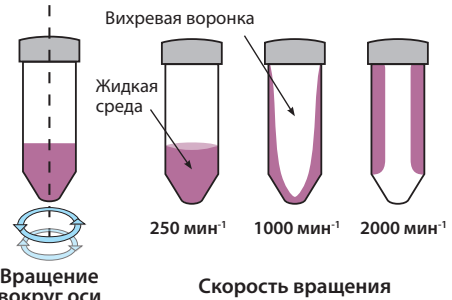


Рис. 1

Жизненный цикл вортекса Reverse-Spin®

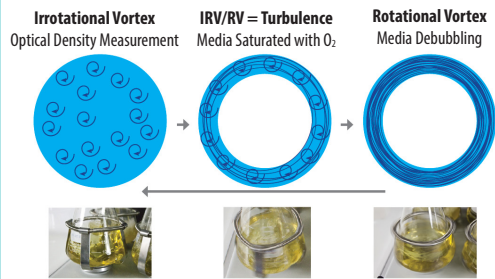


Рис. 2

Центробежные силы в качестве механического пеногасителя

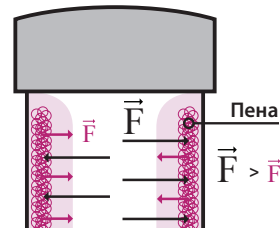


Рис. 3

позволяет регистрировать мутность до ~45 ОП₆₀₀ для бактерий, например *E.coli*, *B.subtilis*, *B.bifidum* и ~75 ОП₆₀₀ для дрожжей (*S.cerevisiae*, *P.pastoris*). Другими словами, интенсивно вращающиеся фальконы-биореакторы (2000 мин⁻¹), содержащие разные объемы среды, образуют монослой среды, толщина которого прямо пропорциональна объему культуральной среды в фальконе, как показано на рисунке 6, А-Б. Коэффициент корреляции (R2) между номинальным сигналом RTS и ОП₆₀₀ составляет 0,99 (рис. 6 и 7), в диапазоне от 0 до 20 ОП₆₀₀ для палочковидных бактерий и от 0 до 35 ОП₆₀₀ для дрожжей. Более высокие значения ОП могут быть «откалиброваны» с использованием нелинейных моделей, которые могут выполняться автоматически или в ручную во время процесса калибровки в прилагаемом пакете программного обеспечения RTS.

Реверсивное вращение по сравнению с орбитальным перемешиванием
Симметричное распределение жидкой среды по сравнению с асимметричным

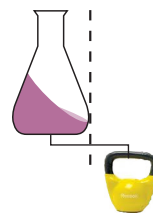
Реверсивное вращение



Характеристики:

- Вращающаяся емкость может иметь любой диаметр
- Автобалансировка по центру емкости
- Просто
- Не расходуется дополнительная энергия на компенсирующую балансировку
- Самоочистение оптических кювет

Орбитальное перемешивание



Характеристики:

- Пропорциональность диаметра кругового вращения и диаметра вращаемой емкости
- Принудительная автоматическая балансировка по принципу обруча
- Сложно
- Дополнительный расход энергии на компенсацию автобалансировки

Рис. 4.

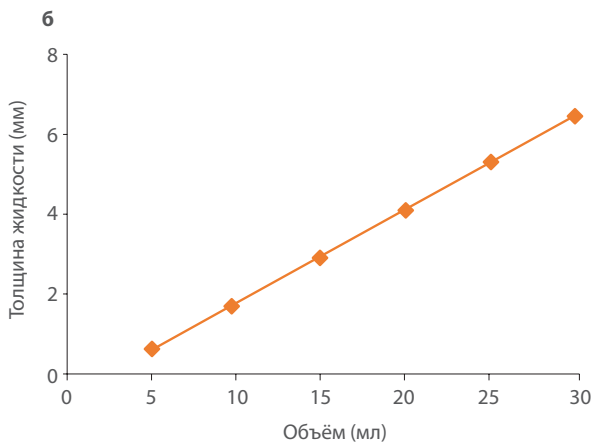
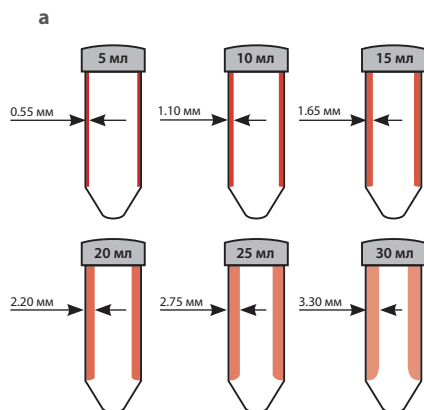


Рис. 6 (а, б)

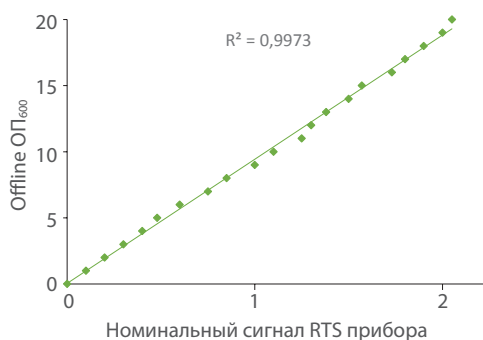


Рис. 7. Квадратичный коэффициент линейной корреляции (R^2) рассчитанных значений оптической плотности между данными полученными на RTS и на спектрофотометре (OP_{600}). Калибровочная кривая получена для *E.coli* BL 21.

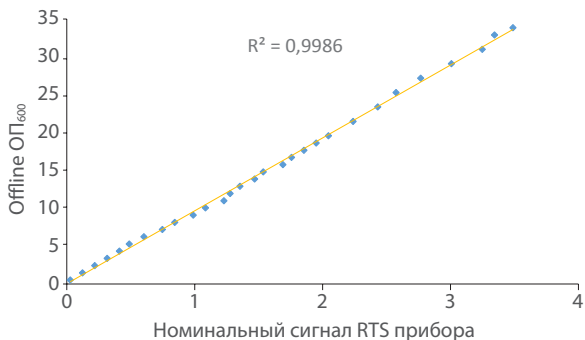


Рис. 8. Квадратичный коэффициент линейной корреляции (R^2) рассчитанных значений оптической плотности между данными полученными на RTS и на спектрофотометре (OP_{600}). Калибровочная кривая получена для *P.pastoris*.

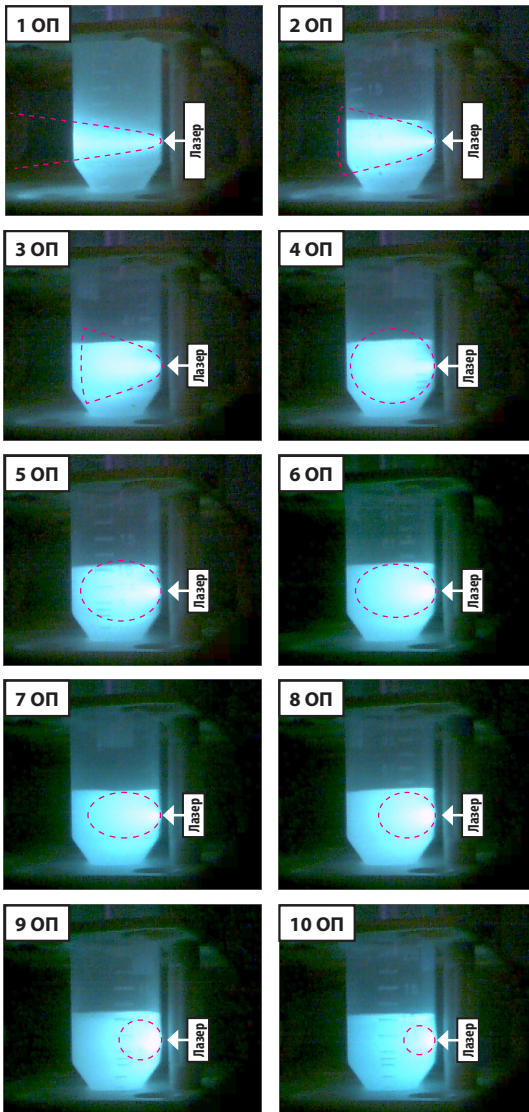


Рис. 5. Фотографии, отображающие светорассеяние клеточных суспензий *Saccharomyces cerevisiae*, (снимки сделаны под углом 90 градусов относительно светового потока; длина волны света 535 нм; диапазон оптической плотности от 1 до 10 с шагом в 1 ОП.) Штриховыми линиями выделены особенности распространения светового потока в зависимости от концентрации клеточной суспензии.

Пример применения биореактора RTS

Для биотехнологического процесса необходимо разработать и создать высокоэффективные технологии первоначального скрининга перспективных клонов и определить оптимальные параметры их культивирования. Культивирование в колбах на орбитальных шейкерах хорошо известно в основном благодаря исторической распространенности, гибкости, низкой стоимости и

простоте в эксплуатации [1]. Тем не менее, на этой начальной и важнейшей стадии развития биопроцесс сложно контролировать а, следовательно, управлять ключевые параметры процесса культивирования, такие как, аэрация, температура, pH среды, концентрация клеток, специфическая скорость роста. Ручной сбор образцов для регистрации кинетики роста в колбах затруднен, не имеет большой плотности данных, может создавать анаэробный стресс и несет риск контаминации. Шейкеры-инкубаторы не обладают индивидуальным контролем температуры для каждой колбы, что ограничивает возможность иметь промежуточные температурные условия, например при экспрессии термосенситивных белков. Кроме того, при работе с уплотненными биомассами клеток в результате недостаточного насыщения кислородом питательной среды может наступить анаэробный стресс, который приведет к неэффективному потреблению субстрата и низкому выходу целевого продукта [1]. Следовательно, существует ниша для новых принципов перемешивания, снимающие ограничения орбитальных шейкеров, обеспечивающие более эффективные и экономичные технологии массопередачи кислорода, автоматической и не инвазивной регистрации кинетики роста продуцентов, регуляции pO_2 среды, которые должны быть представлены на рынке в качестве дополнительного решения. Эту нишу может заполнить разработанный нами персональный биореактор РТС-1С, в котором эффективное перемешивание питательной среды в пробирках Фалькон основано на Реверсивном принципе, включающем вращение пробирки вокруг собственной оси и формированием в результате вращения вихря. RTS обеспечивает не инвазивную регистрацию кинетики роста клеток онлайн с частотой каждые 20 секунд между измерениями, возможность индивидуально и быстро регулировать температуру ($0,7^\circ C / \text{мин}$, реальная температура образца) и возможность соответствовать даже самым требовательным условиям аэрации, полученные на шейкерах. Следует также сказать что, технология РТС основана на использовании одноразовых пробирок, она проста, практична и выгодна.

В данной работе впервые представлены экспериментальные результаты по массопередаче кислорода в среду $k_L a$ (h^{-1}) полученные для РТС-1, позволяющие оценить возможности масштабирования биопроцесса. В работе также описаны сравнительные исследования биопроцесса полученные при использовании шейкеров и РТС-1, приведены экспериментальные данные кинетик роста используемых микроорганизмов (*E.coli* и *P.pastoris*) и выхода рекомбинантного белка полученные с помощью SDS-PAGE гель-анализа и специфической ферментативной активности (названия белков и штаммов являются конфиденциальными по желанию стороны предоставившей рекомбинантные штаммы), культивируемых на коммерчески доступных питательных средах полученные при использовании РТС как альтернативной системы культивирования, которая может решить описанные выше ограничения орбитальных шейкеров и колб.

Результаты измерений коэффициента массопередачи по кислороду $k_{L,a}$ (h^{-1})

Были проведены измерения $k_{L,a}$ в образцах 5, 10, 20, 30 мл деионизированной воды в 50 мл фальконах типа TPP Bioreaktor при скорости перемешивания 2000 об/мин и частотой смены направления вращения 1 раз в секунду. Эта скорость перемешивания была найдена оптимальной для принципа перемешивания Reverse-Spin® во время начального оптимизационного исследования. В этом диапазоне рабочих объемов значение $k_{L,a}$ увеличивалось с уменьшением объема жидкости (рис. 10). При рабочем объеме в 5 мл достигалось наибольшее значение $k_{L,a}$ $350 h^{-1} \pm 26$. Мы считаем, что, используя еще более низкий рабочий объем, можно увеличить $k_{L,a}$, поскольку в принципе перемешивания Reverse-Spin® скорость насыщения среды кислородом пропорциональна увеличению площади интерфазы на границе газ—жидкость. Таким образом, уменьшая рабочий объем среды в пробирке, массоперенос кислорода увеличивается. Приняв это во внимание, мы сделали предположение о возможности достижения на РТС еще более высокого значения ОТР. Для объемов среды ≤ 5 мл изме-

рение показаний ПреСенс датчиков не возможно из-за конструкции оптической оси, которая расположена на отметке 5 мл у 50 мл пробирки типа фалькон.

Неограниченная доступность кислорода во время скрининга клонов необходима для разработки биопроцесса на первичных стадиях [1,2], а OTR_{max} и $k_{L,a}$ являются важными параметрами в масштабировании процесса между колбами и биореакторами [3,4,5]. Типичными лабораторными условиями культивирования *E.coli* и *P.pastoris* являются орбитальное перемешивание, орбита 25-50 мм, скорость вращения 250 об/мин, 250 мл микробиологическая колба и 10-30% объем наполнения. В опубликованной литературе измерение $k_{L,a}$ для 250 мл колбы, 10% объема наполнения, 25-50 мм орбиты и 250 об/мин могут варьироваться из-за различий в методах и моделях расчета. К примеру, исследования с использованием не инвазивных датчиков и оптики измерения O_2 (PreSens, Regensburg, Germany) оценили значение в $100 h^{-1}$ [6,7], однако в других исследованиях с другой методологией в аналогичных условиях было показано более низкое $k_{L,a}$ [8].

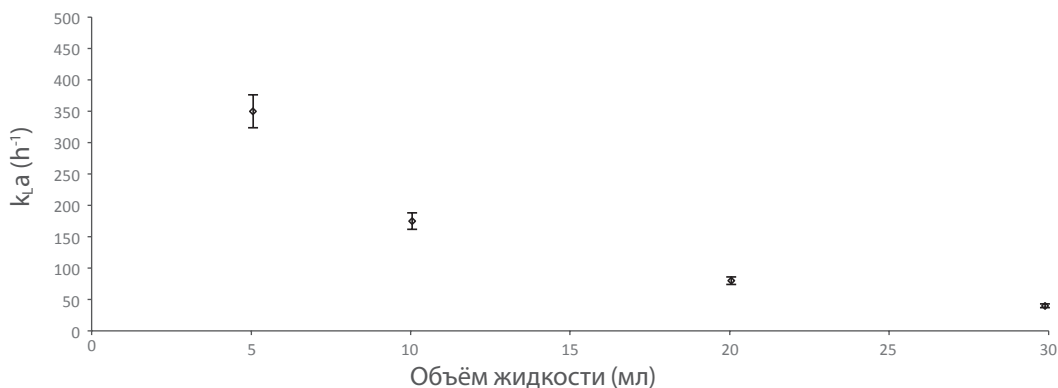


Рис. 9. Определение $k_{L,a}$ в 50 мл фальконах биореакторах TPP. Биореакторы были заполнены деионизированной водой объемом 5, 10, 20, и 30 мл, измерения проводились с помощью не инвазивных датчиков O_2 и оптики (PreSens, Regensburg, Germany) при $30^\circ C$ с использованием метода "gassing-out". Показано среднее и стандартное отклонение пяти независимых экспериментов.

Выращивание культур *E.coli* и *P.pastoris* и производство рекомбинантного белка

Бактериальное культивирование проводили с использованием полусинтетической среды, содержащую 1% глюкозы, IPTG в качестве экспрессирующего индуктора. Культивирование проводили при $37, 30$ и $25^\circ C$.

В этих экспериментах были использованы 250 мл колбы с объемом наполнения 10, 20, и 30%, что влияет на показатель $k_{L,a}$. В сравнительном эксперименте между РТС и колбами по оптимизации экспрессии термочувствительного рекомбинантного белка в *E.coli* при различных температурах ферментации влияние интенсивности аэрации ($k_{L,a}$) на кинетику роста хорошо видно и показано на Рис. 10 (а, б) и Табл. 2. Из полученных данных виден эффект большей аэрации или $k_{L,a}$ обеспечиваемый РТС. РТС обеспечивает больший выход биомассы (24%) и более высокую максималь-

ную скорость роста (19%) по сравнению с колбой.

Аналогичные задачи были поставлены в эксперименте с *P.pastoris*. Культивирование дрожжей проводили на среде VMGY при температуре $30^\circ C$ с последующей сборкой и центрифугированием для дальнейшего 5-кратного концентрирования клеток (до 200 ± 50 ОП₆₀₀) для экспрессии рекомбинантного термочувствительного белка используя метанол в качестве источника углерода и в качестве индуктора экспрессии белка, проводимого при $28^\circ C$ во всех условиях, используя среду BMMY с импульсами подачи, варьирующимися от 0,25 до 1,25% метанола с паузами разной продолжительности.

Полученные результаты представлены в Табл. 3. Как видно из представленных данных выход биомассы в РТС также был на 27% выше чем на шейкере.

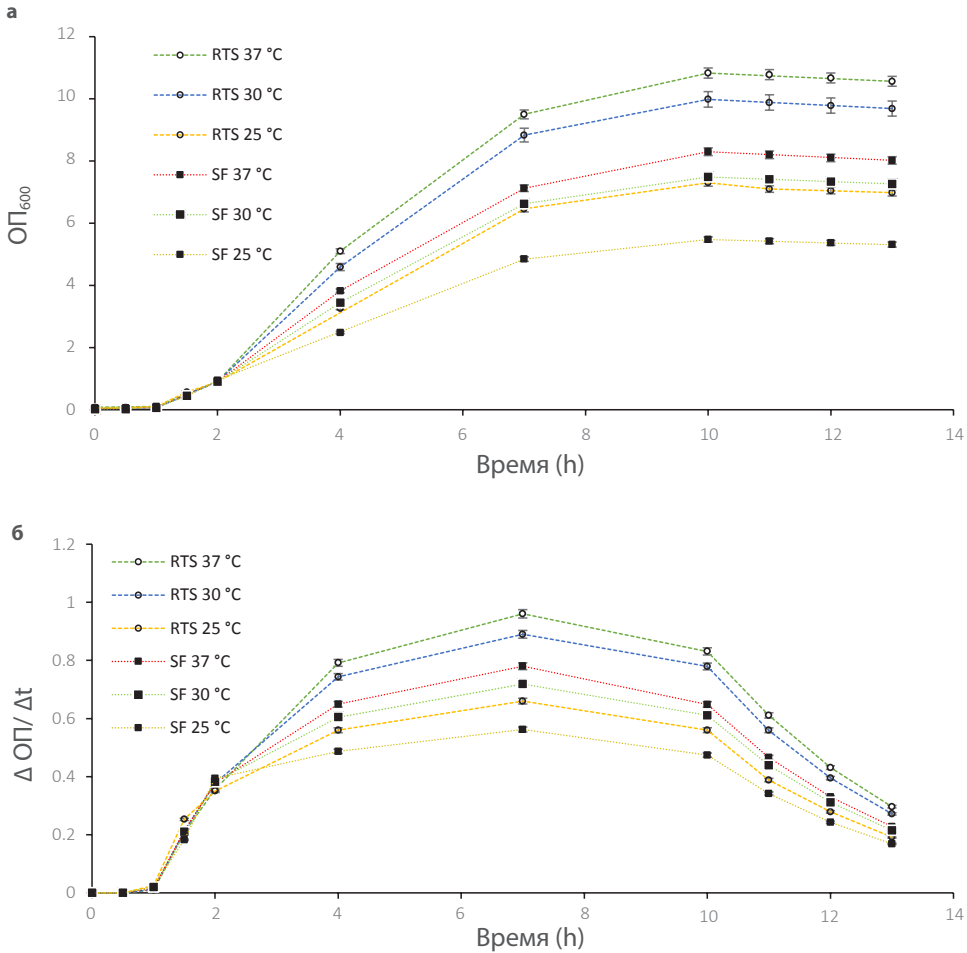


Рис. 10 (а, б). Влияние температуры, метода культивирования и типа сосуда на ОП₆₀₀ культур *E.coli*, экспрессирующих рекомбинантный термочувствительный белок 37 кДа, выращенных в колбах, перемешиванных инкубатором-шейкером и RTS-1. (RTS) RTS-1 TPP фальконы биореакторы; (SF) колбы; Во всех культурах, выращенных в колбах (номинальный объем 250 мл с 10% объема заполнения) с помощью инкубатора-шейкера 25 мм, 240 об/мин и RTS-1 (50 мл пробирки для биореактора TPP с объемом наполнения 20%) с 2000 об/ мин 1 с RST, культивированную с использованием полусинтетической среды, снабженной 1% глюкозы, IPTG в качестве экспрессирующего индуктора. Показано среднее и стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Выход биомассы	RTS 37 °C	RTS 30 °C	RTS 25 °C	SF 37 °C	SF 30 °C	SF 25 °C
^a ОП ₆₀₀	10.80 ± 0.16	9.98 ± 0.15	7.29 ± 0.11	8.3 ± 0.12	7.48 ± 0.11	5.5 ± 0.1
Δ ОП/ Δt	0.96 ± 0.02	0.89 ± 0.014	0.66 ± 0.01	0.78 ± 0.014	0.71 ± 0.01	0.56 ± 0.15

Табл. 2. Выход биомассы по окончании ферментации *E.coli* в ОП₆₀₀ и результаты максимального специфической скорости роста.

^a — Измерялось по окончании ночной культуры. Показаны среднее и стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Выход биомассы	RTS 10%	RTS 20%	RTS 30%	SF 10%	SF 20%	SF 30%
^a ОП ₆₀₀	65 ± 1.5	59 ± 2	51 ± 1.5	47.5 ± 2	30 ± 1.3	21 ± 0.7

Табл. 3. Выход биомассы по окончании ферментации *P.pastoris* в ОП₆₀₀ и результаты максимального специфической скорости роста.

^a — Измерялось по окончании ночной культуры. Показаны среднее и стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Известна методика ограничения агрегирования *in vivo* рекомбинантных белков и она заключается в культивировании продуцента белка при пониженных температурах [9]. Эта стратегия доказала свою эффективность при улучшении растворимости ряда сложных белков [10]. В эксперименте *E.coli* относительный уровень накопления рекомбинантного термочувствительного белка в суммарной, нерастворимой и растворимой фракциях клеточного лизата в индуцированных культуральных условиях можно видеть на 12% SDS-PAGE (рисунок 11). Кроме того, была идентифицирована специфическая ферментативная активность $U\text{ мг}^{-1}$ лизата клеток. В эксперименте с *E.coli* влияние температуры на уровень растворимого рекомбинантного белка хорошо виден. Самый высокий уровень был достигнут при 30 °C как в биореакторах RTS, так и в

колбах. Тем не менее, специфический показатель ферментативной активности (рис. 12) был на 18% больше в условии RTS 30 °C в сравнении с идентичным условием температуры в колбе. С другой стороны, в эксперименте *P.pastoris* различие между биореакторами RTS и колбами в относительном уровне рекомбинантного термочувствительного белка было более значительным (рис. 13). Более того, результаты измерений специфической ферментативной активности (рис. 14) повторили эту корреляцию, где $U\text{ мг}^{-1}$ в условии объема наполнения 20% RTS было на 62% выше, чем в условии колбы с одинаковым процентом наполнения питательной средой. Переменные, которые могут быть вовлечены в существенную разницу выхода белка в двух экспериментах, должны быть идентифицированы и изучены дополнительно.

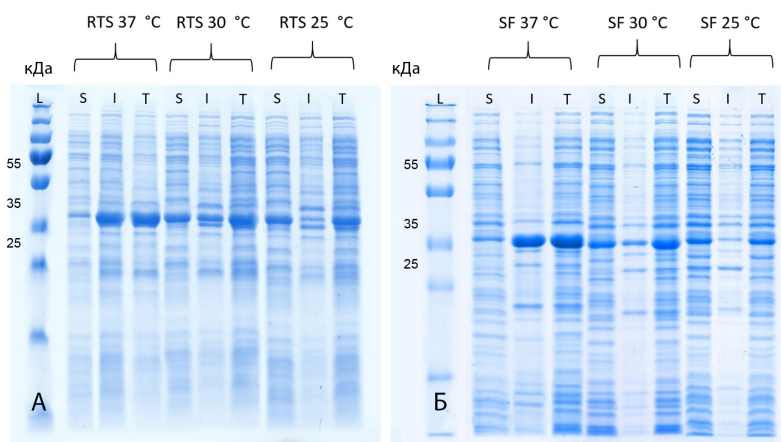


Рис. 11. Изображения SDS-PAGE (А и Б) суммарных, растворимых и нерастворимых фракций рекомбинантных термочувствительных белков культур *E.coli* выращенных в (RTS) RTS-1 TPP биореакторных фальконах; Условные сокращения: (SF) колбы; L - стандарт маркера размера белка (PageRuler™ Plus Prestained Ladder, Thermo Fisher Scientific), T – суммарная фракция белка, S - фракция растворимого белка и I – фракция нерастворимого белка.

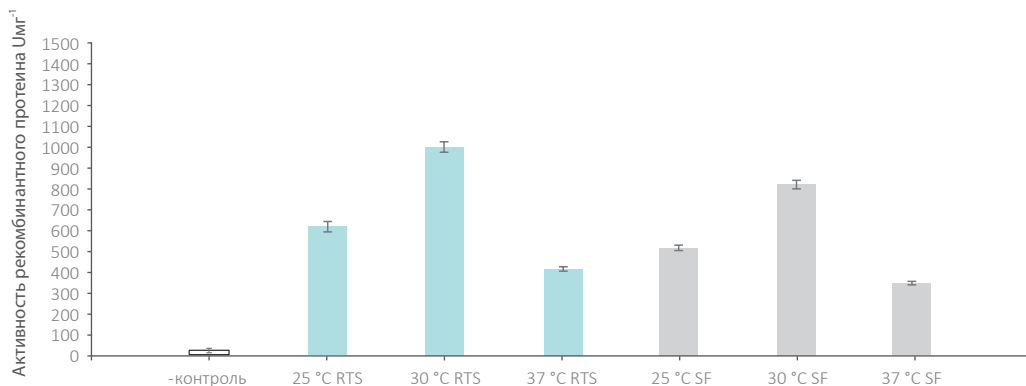


Рис. 12. Влияние температуры на специфическую ферментативную активность ($U\text{ мг}^{-1}$) лизата культур *E.coli*, экспрессирующих рекомбинантный термочувствительный белок с перемешиванием в колбах на шейкер-инкубаторе и RTS-1.

Принятые сокращения: (RTS) RTS-1 TPP фальконы биореакторы; (SF) колбы; (-control) культура *E.coli* перед индукцией. Показаны средние и стандартные отклонения трех независимых экспериментов.

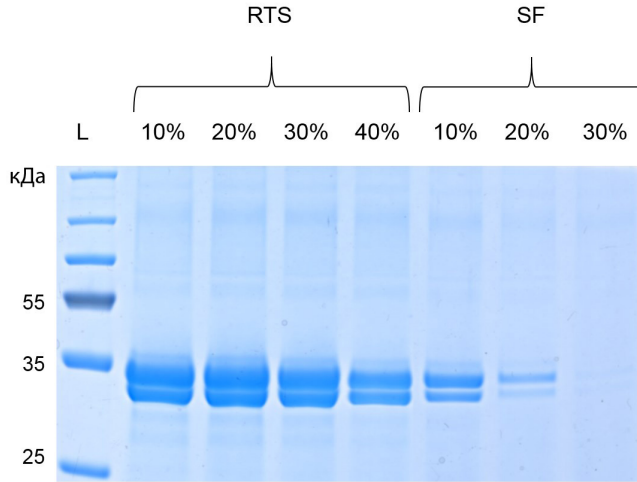


Рис. 13. Изображение 12% SDS-PAGE образцов супернатантов *P.pastoris*, экспрессирующих рекомбинантный термочувствительный 37 кДа белок в (RTS) RTS-1 TPP биореакторных фальконах; (SF) колбах; Во всех культурах, выращенных в колбах (номинальный объем 250 мл с 10, 20, 30% объемом наполнения) с помощью инкубатора-шейкера 25 мм, 240 об/мин и RTS-1 (50 мл пробирки биореакторы TPP с объемом наполнения 10, 20, 30, 40%) с 2000 об/мин 1 с RST, культивированных с использованием среды BMMY с различными импульсами подачи метанола от 0,25 до 1,25% с последующими различными временными паузами подпитки. Среднее и стандартное отклонение трех независимых экспериментов. L - стандарт маркера размера белка (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Белковые фракции формируются как «дублеты» из-за присоединения различных углеводных групп во время секреции.

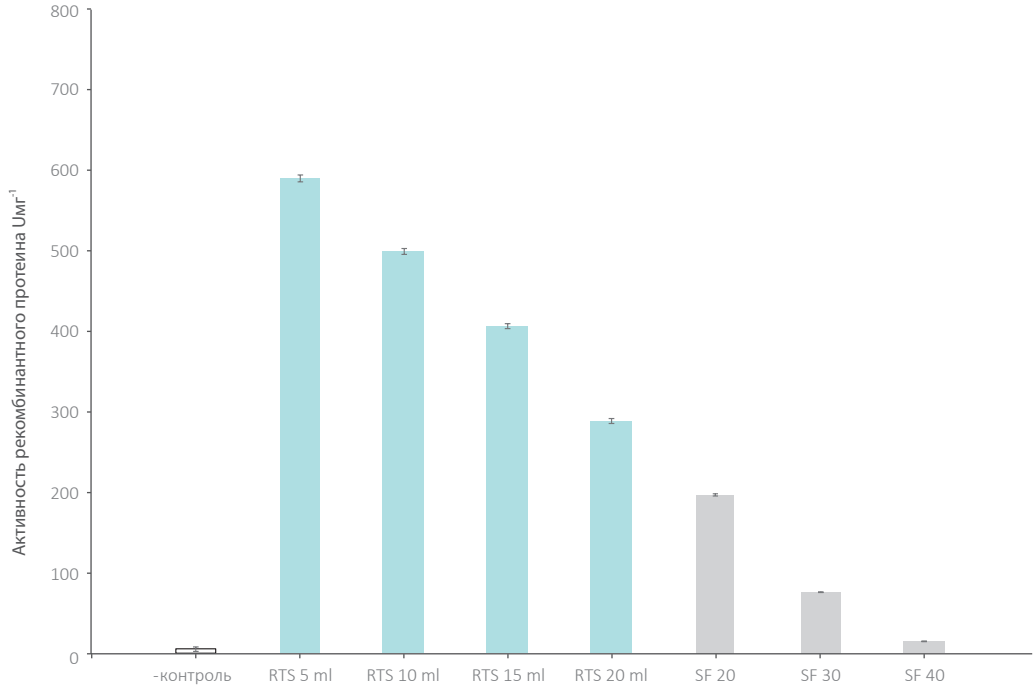


Рис. 14. Влияние различных объемов питательной среды ПТС и колб в (%)наполнения к общему объёму сосуда на специфическую ферментативную активность (U мг⁻¹) культур *P.pastoris*, экспрессирующих рекомбинантный термочувствительный белок в колбах с перемешиванием на шейкере инкубаторе и RTS-1. Сокращения: (RTS) RTS-1 TPP фальконы биореакторы; (SF) колбы; (-control) культура *P.pastoris* перед индукцией. Показаны среднее и стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Выводы

Предыдущая версия статьи RTS была сконцентрирована на оценке оптимальных условий роста до 10 мл рабочего объема. Тем не менее, после дополнительных исследований и модификаций, приводящих к результатам, которые приведены в статье, было обнаружено, что при рабочем объеме в 5 мл k_{La} резко возросло на 50%, следовательно, можно увеличить коэффициент массопереноса, дополнительно снижая рабочий объем. Более того, как видно из экспериментальных результатов, с ростом популярности продукта и полученной критической обратной связи, было экспериментально доказано, что биореактор RTS может быть успешно использован не только для ежедневного культивирования клеток с регистрацией кинетики роста в реальном времени, но и как альтернативная система для исходного скрининга кандидатов клонов для производства биомолекул. Примечательно, что это не единственные возможные применения RTS, поскольку индивидуальный и быстрый контроль и регуляция температуры позволяет использовать RTS в экспериментах температурных шоков и флуктуаций, для адаптивной лабораторной эволюции, в тестах на ингибирование и токсичность, например, для ингибирования молочнокислых бактерий бактериофагами.

Дальнейшие исследования по увеличению потенциала принципа перемешивания Reverse-Spin® будут выполнены в будущем. Кроме того, не инвазивные измерения pO_2 и pH будут доступны в устройствах следующего поколения RTS, которые планируется выпустить в третьем или четвертом квартале 2017 года.

Благодарности

Авторы благодарят Thermo Fisher Scientific Baltics, в частности Алгимантаса Маркаускаса за предоставленную возможность работать и проводить эксперименты в Thermo Fisher Scientific Baltics в Вильнюсе, а так же д-ра Ю.Шиуркуса за непосредственное руководство и предоставление штаммов и Д.Бугаева за помощь в экспериментальной работе. Мы благодарим Thermo Fisher Scientific Baltics за предоставление оборудования и расходных материалов. Мы также хотели бы поблагодарить Центр компетенции VMTKC, д-р Ю.Ванагса и Европейского фонда регионального развития за дополнительную интеллектуальную и финансовую поддержку по проектам KC / 2.1.2.1.1 / 10/01/0065 и 1.2.1.1/16/A/005.

Источники

1. Büchs, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7, 91–98 (2001).
2. Zimmermann, H. F., Anderlei, T., Büchs, J. & Binder, M. Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 1157–1160 (2006).
3. Konz, J., King, J. & Cooney, C. Effects of Oxygen on Recombinant Protein Expression. *Biotechnology Progress* 14, 393–409 (1998).
4. Freyer, S. A., König, M. & Künkel, A. Validating shaking flasks as representative screening systems. *Biochemical Engineering Journal* 17, 169–173 (2004).
5. Islam, R., Tisi, D., Levy, M. & Lye, G. Scale-up of Escherichia coli growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched k_{La} . *Biotechnology and Bioengineering* 99, 1128–1139 (2008).
6. Reynoso-Cereceda, G. I., Garcia-Cabrera, R. I., Valdez-Cruz, N. A. & Trujillo-Roldán, M. A. Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient k_{La} characterization and Escherichia coli cultures comparison. *Biochemical Engineering Journal* 105, 379–390 (2016).
7. Schiefelbein, S. et al. Oxygen supply in disposable shake-flasks: prediction of oxygen transfer rate, oxygen saturation and maximum cell concentration during aerobic growth. *Biotechnology Letters* 35, 1223–1230 (2013).
8. Klöckner, W. & Büchs, J. Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology* 30, 307–314 (2012).
9. Schein, C. H. Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nature Biotechnology* 7, 1141–1149 (1989).
10. Vasina, J. A. & Baneyx, F. Expression of Aggregation-Prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the Escherichia coli cspA and tacPromoter Systems. *Protein Expression and Purification* 9, 211–218 (1997).