

Jacek Pielecki*, Jacek Skwarcz**

*Katedra Technologii Przemysłu Rolno Spożywczego i Przechowalnictwa

**Katedra Podstaw Techniki

Akademia Rolnicza w Lublinie

NEURONOWA METODA MAKSYMALIZACJI WARTOŚCI WYNIKÓW RÓWNOCZESNEJ PRODUKCJI ENZYMÓW PRZEZ DROŻDŻE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* K-4

Streszczenie

W pracy zaprezentowano zastosowania sztucznych sieci neuronowych do modelowania związków przyczynowo-skutkowych w biotechnologicznym procesie jednoczesnej nadprodukcji inulinazy i inwertazy zewnątrzkomórkowej przez drożdże *K.marxianus* w warunkach stresu termicznego i tlenowego. Do analizy danych zastosowano sieć o architekturze warstwowej. Wyniki obliczone przez sieć neuronową weryfikowano doświadczalnie w warunkach głębokich hodowli wstrząsanych.

Słowa kluczowe: sztuczne sieci neuronowe, inulinaza, inwertaza, drożdże *K.marxianus*, stres termiczny, stres tlenowy

Wstęp

W niektórych procesach biotechnologicznych występuje zróżnicowany poziom produkcji co najmniej dwóch pożądaných metabolitów. Jeżeli ich stężenie lub poziom enzymatycznej aktywności w podłożu hodowlanym są zadowalające, wówczas z podłoża wydziela się i oczyszcza wszystkie metabolity. Jednak najczęściej w procesie równoczesnej produkcji metabolitów występuje istotne zróżnicowanie ich cech tak, że wydzielenie tylko jednego z nich znajduje uzasadnienie ekonomiczne. Dlatego są podejmowane prace badawcze mające na celu maksymalizację wyników równoczesnego wytwarzania przez mikroorganizmy różnych produktów w zakresie najwyższej ich koncentracji lub aktywności w podłożach hodowlanych.

Celem przeprowadzonych badań było zastosowanie sztucznych sieci neuronowych w modelowaniu relacji i związków przyczynowo skutkowych w biotechnologicznym procesie równoczesnej produkcji inulinazy i inwertazy przez szczep drożdży *Kluyveromyces marxianus* K-4.

Materiały i metody

W celu uzyskania wystarczająco dużej liczby doświadczeń jednostkowych do analiz, szczep *K.marxianus* K-4 hodowano w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych na ciekłych podłożach o pH 5 zawierających: 1,0% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,05% MgSO_4 , 0,015% FeSO_4 , 0,3% ekstrakt drożdżowy. Źródło węgla stanowiły uprzednio umyte w zimnej wodzie, pokrojone w plastry, wysuszone do stałej masy w temp. 80°C i następnie sproszkowane bulwy topinamburu (*Jerusalem Artichoke*) w ilości równoważnej 1% inuliny (1). W filtratach pochodowlanych oznaczano aktywności inulinazy i inwertazy zewnątrzkomórkowej (2). Plan doświadczenia zakładał, że każda następną hodowla zawierała w podłożu mniejszą lub większą o 50% ilość tylko jednego składnika w stosunku do hodowli poprzedniej. W ten sposób uzyskano zmiany wartości każdego składnika podłoża na trzech poziomach wartości (niski, średni i wysoki) przy różnych wartościach temperatury hodowli z przedziału od 25 do 35°C.

W celu znalezienia zależności przyczynowo skutkowych lub zależności występujących pomiędzy zmiennymi określającymi skład podłoża i temperaturą hodowli, a aktywnościami inulinazy i inwertazy produkowanej przez obydwa szczepy, zastosowano sieć neuronową o strukturze warstwowej. Do uczenia sieci wykorzystano część danych doświadczalnych. Następnie przeprowadzono rekonfigurację sieci wprowadzając na wejście sieci wartości aktywności enzymatycznych zewnątrzkomórkowych i związanych z komórką (sieć odwrócona). Na takiej sieci eksperymentowano w ten sposób, że na wejście sieci zadawano określoną wartość aktywności, a poszukiwano parametrów hodowli, które pozwoliłyby tą wartość osiągnąć. Do weryfikacji eksperymentu wykorzystano część przypadków doświadczalnych nie pokazywanych sieci w trakcie uczenia, w których aktywności obydwu enzymów były zadowalająco wysokie (3,4). W obliczeniach wykorzystano program komputerowy Neuro Shell 2 ver.2 firmy Ward System Group Inc.

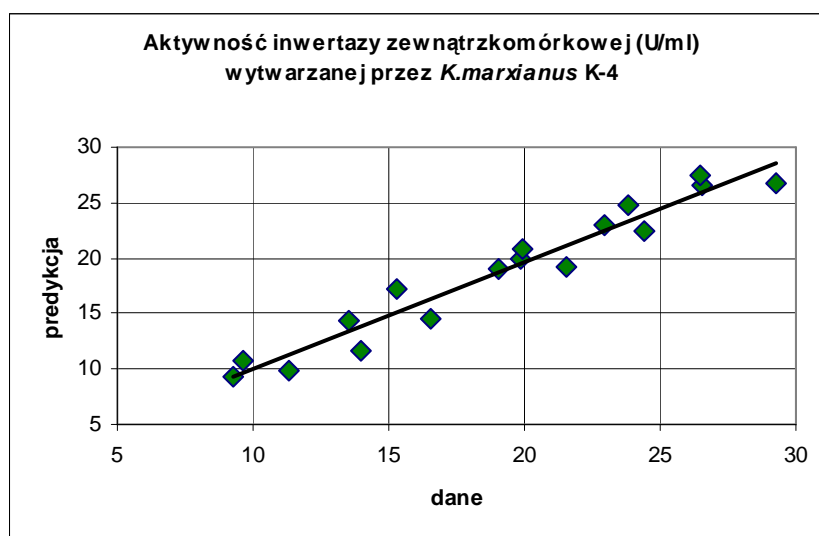
Wyniki i omówienie wyników

W procesie równoczesnej produkcji inulinazy i inwertazy przez drożdże *K.marxianus* K-4 największy wpływ na formowanie wartości wyjść wywierała zawartość siarczanu magnezu i temperatura podłoża hodowlanego. Trend ten obserwowano w trakcie przeprowadzania doświadczeń jednostkowych. Wyniki uzyskane z doświadczeń jednostkowych, wykonanych przy zróżnicowanym składzie i różnych temperaturach podłoża hodowlanego pozwoliły na obliczenie przez sieć chemicznego składu i temperatury podłoża zapewniających maksymalizację enzymatycznych aktywności zewnątrzkomórkowych inulinazy i inwertazy wytwarzanych równocześnie w jednym procesie biotechnologicznym (tab. 1).

Tabela 1. Skład podłoża obliczony przez sieć, zapewniający maksymalizację wyników jednoczesnej produkcji zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy przez *K.marxianus* K-4

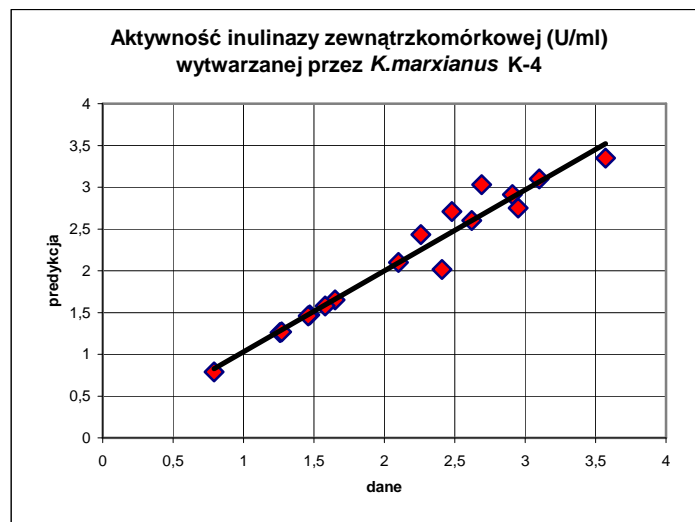
Table 1. Composition of the substrate calculated by the network, ensuring maximization of the results of simultaneous production of extracellular inulinase and invertase by *K.marxianus* K-4

Skład podłoża (g/l)	Standardowy skład podłoża [g/l]	Skład podłoża obliczony przez sieć [g/l]	Temperatura podłoża hodowlanego obliczona przez sieć [°C]
(NH ₄)H ₂ PO ₄	10,00	7,75	28
FeSO ₄	0,015	0,010	
MgSO ₄	0,5	0,98	
Ekstrakt drożdżowy	1,5	1,36	
Inulina	10	8,7	



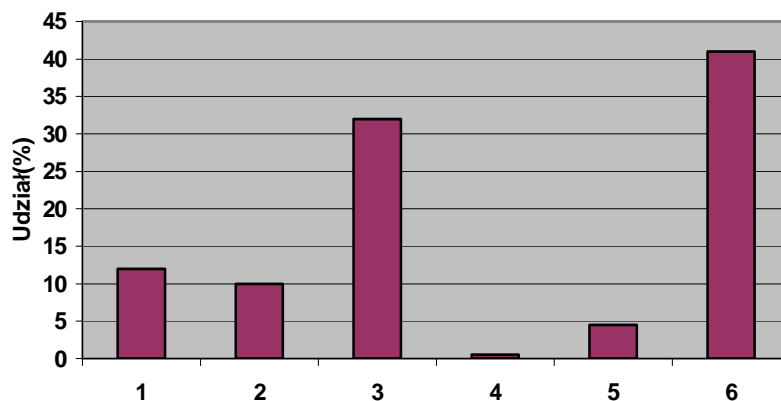
Rys. 1. Wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci i predykcji tych danych przez sieć neuronową w produkcji inwertazy przez drożdże *K.marxianus* K-4

Fig. 1. Dispersion diagram for network input data and prediction of the data by the neural network in production of invertase by yeast *K.marxianus* K-4



Rys. 2. Wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci i predykcji tych danych przez sieć neuronową w produkcji inulinazy przez drożdże *K.marxianus* K-4

Fig. 2. Dispersion diagram for network input data and prediction of the data by the neural network in production of inulinase by yeast *K.marxianus* K-4



inulina, 2. ekstrakt drożdżowy, 3. $MgSO_4$, 4. $FeSO_4$, 5. $(NH_4)_2HPO_4$, 6. temperatura podłoża hodowlanego

Rys.3. Względny udział wartości wejść w formowaniu wartości wyjść sieci w równoczesnym wytwarzaniu zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy przez *K. marxianus* K-4

Fig. 3. Relative contribution of input values in forming output values of the network in simultaneous production of extracellular inulinase and invertase by *K. marxianus* K-4

Powyższe wyniki obliczeń wygenerowane przez sieć neuronową weryfikowano doświadczalnie metodą głębokich hodowli wstrząsanych stosując w doświadczeniach jednostkowych wyliczony skład podłoża hodowlanego i temperaturę. W celu uniknięcia otrzymania przypadkowych wyników, doświadczenia weryfikujące wykonywano równocześnie w trzech powtórzeniach. Otrzymane w ten sposób wartości wyników doświadczeń uśredniano i porównywano z wartościami predykcji tych wyników obliczonych przez sieć. Dla otrzymanych wartości doświadczalnych i wartości predykcji obliczono współczynniki korelacji. Zestawienie tych wartości przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Zestawienie wartości wyników doświadczalnych, wartości predykcji tych wyników i współczynników korelacji w produkcji inulinazy i inwertazy przez drożdże K.marxianus K-4

Table 2. Comparison of the values of the experimental results, prediction values of these results and correlation coefficients in production of inulinase and invertase by yeast K.marxianus K-4

Szczep	Enzym	Wynik doświadczalny [U/ml]	Wartość predykcji [U/ml]	Współczynnik korelacji
K.marxianus K-4	zewnątrzkomórkowa inulinaza	11,16	12,38	0,9014
	zewnątrzkomórkowa inwertaza	112,17	120,45	0,9312

Zastosowanie techniki sieci neuronowych umożliwiło maksymalizację wartości wyników doświadczeń z udziałem badanego mikroorganizmu w zdefiniowanych przez sieć warunkach hodowli, przy wysokich współczynnikach korelacji od 0,9014 do 0,9312, co może świadczyć o dobrym dopasowaniu modelu sieci do warunków doświadczenia.

Bibliografia

Pilnik. W., Vervelde, G.J. 1976. Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus L.*) as a source of fructose, a natural alternative sweetener. J. Agronom. Corp. Sci. Vol. 142, p. 153-162.

Estaban Barranco-Flrido, Mariano Garcia-Garibay, Lorena Gomez-Ruiz, Alejandro Azaola. 2001. Immobilization system of *kluveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. Process Biochemistry. 37. p. 514.

I.A. Basheer, M. Hajmeer. 2000. Artificial neural networks: fundamentals, computing, desing, and application. *Journal of Microbiological Methods*. 43. p.3-31.

Dirk Weuster-Botz. 2000. Experimental design for fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search? *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.90, No.5. 437-483.

**NEURAL METHOD OF MAXIMIZING THE VALUES
OF THE RESULTS OF THE SIMULTANEOUS PRODUCTION
OF ENZYMES BY YEAST *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* K-4**

Summary

The paper presents applications of artificial neural networks in modeling of "if and when" relations in the biotechnological process of simultaneous overproduction of inulinase and extracellular invertase by yeast *K.marxianus* under thermal and oxygen stress conditions. The data were analyzed using a network of layer architecture. The results calculated by the neural network were verified empirically under immersion conditions of agitated cultures.

Key words: artificial neural networks, inulinase, invertase, filiform fungus *Aspergillus Niger*, yeast *K.marxianus*, thermal stress, oxygen stress