

Jacek Pielecki\*, Jacek Skwarcz\*\*

\*Katedra Technologii Przemysłu Rolno Spożywczego i Przechowalnictwa

\*\*Katedra Podstaw Techniki,

Akademia Rolnicza w Lublinie

## NEURALNA PREDYKCJA WYNIKÓW PROCESU RÓWNOCZESNEJ BIOSYNTETY INULINAZY I INWERTAZY PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER* W WARUNKACH WYBRANYCH STRESÓW ABIOTYCZNYCH

### Streszczenie

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

**Słowa kluczowe:** sztuczne sieci neuronowe, inulinaza, inwertaza, grzyb nitkowaty *Aspergillus Niger*, stresu termiczny, stres tlenowy

### Wstęp

Procesy biotechnologiczne charakteryzują się wysoką złożonością procesu, ze względu na równoczesny wpływ wielu czynników decydujących o jego powodzeniu. Szczególnie dużo uwagi poświęca się wglębnym hodowlom bioreaktorowym mikroorganizmów wytwarzających pożądane metabolity. Zastosowanie bioreaktorów umożliwia kontrolę i regulację wartości istotnych parametrów procesu biosyntezy jak temperatura i pH podłoża, napowietrzanie i intensywność mieszania podłoża. Obok tych parametrów proces biosyntezy zależy od chemicznego składu podłoża hodowlanego i zidentyfikowanych cech genetycznych użytego producenta mikrobiologicznego. Procesy równoczesnej biosyntezy dwóch lub więcej metabolitów zmuszają do przeprowadzenia dużej liczby doświadczeń jednostkowych w celu znalezienia odpowiednich wartości parametrów biosyntezy, nie zawsze zapewniających maksymalizację końcowych wyników. Należy podkreślić, że taka metoda jest niezwykle czasochłonna i kosztowna. W tej sytuacji wydaje się, że

alternatywą w stosunku do powyższej metody może być zastosowanie techniki sieci neuronowych w szybkim przewidywaniu pożądanych wartości wyników procesu biotechnologicznego prowadzonego przez określony mikroorganizm.

Celem niniejszej pracy była próba predykcji wartości wyników jednoczesnej biosyntezy inulinazy (E.C.3.2.1.7) i inwertazy (E.C.3.2.1.26), enzymów hydrolitycznych, przez szczep *Aspergillus niger* w warunkach stresu termicznego i tlenowego. Enzymy te znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym między innymi do wytwarzania z naturalnego biopolimeru roślinnego jakim jest inulina prebiotyków, będących składnikami żywności funkcjonalnej.

## **Materiały i metody**

W pierwszej części doświadczenia wykorzystano szczep grzyba strzępkowego *Aspergillus niger* wyizolowany ze środowiska naturalnego. Szczep przetrzymywano na skosach agarowych zawierających 2% inuliny w temperaturze 4°C i używano jako materiał posiewowy do zaszczepienia bioreaktora.

W hodowli grzyba strzępkowego *A.niger* stosowano płynne podłoże hodowlane o pH 5, zawierające: 0,23%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,37%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05%  $\text{MgSO}_4$ ; 0,15% ekstrakt drożdżowy, 1% inulina.

Równoczesną produkcję inulinazy i inwertazy zewnątrzkomórkowej prowadzono w warunkach węglnych hodowli bioreaktorowych. W tym celu szczep *A.niger* hodowano w bioreaktorze Bioflo-2 o pojemności roboczej 2,5 dm<sup>3</sup>, wyprodukowanym przez firmę New Brunswick. Bioreaktor wypełniano płynnym podłożem do objętości 2,5 dm<sup>3</sup>, sterylizowano, wychładzano do temperatury otoczenia i zaszczepiano 24 godzinnym inokulum o objętości 0,2 dm<sup>3</sup> zawierającym komórki mikroorganizmu poddane stresowi termicznemu lub tlenowemu. Temperatura podłoża hodowlanego wynosiła 28°C, względna rozpuszczalność tlenu w podłożu pO<sub>2</sub> 30% przy objętościowym natężeniu powietrza zasilającego bioreaktor 2dm<sup>3</sup> powietrza/1 dm<sup>3</sup> podłoża × min. i prędkości obrotowej mieszadła turbinowego 350 obr./min. (8).

Stres termiczny wywoływano przez inkubację kolb stożkowych zawierających inokulum *A.niger* w temperaturze 45, 50, 55 i 60°C w czasie 20, 40 i 60 min. Stres oksydacyjny wywoływano dodając do kolb z inokulum roztwór nadtlenu wodoru do osiągnięcia stężenia 100, 200, 300, 400, 500 i 600 mMol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Tak przygotowane kultury mikrobiologiczne używano kolejno do zaszczepiania bioreaktora. Bioreaktorowe hodowle prowadzono w stałych warunkach przez okres 7 dób,

pobierając co 24 godz. próbkę podłoża do analiz. W pobranych próbkach oznaczano aktywności enzymatyczne inulinazy i inwertazy zewnątrzkomórkowej (qq).

Plan doświadczenia zakładał również zbadanie wpływu zmian składu chemicznego podłoża na końcowy efekt równoczesnego wytwarzania zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy przez *A.niger*. Zależność ta została określona w doświadczeniach jednostkowych w ten sposób, że przy zachowaniu stałych wartości parametrów procesu biosyntezy jak pH i temperatura podłoża,  $pO_2$  i prędkość obrotowa mieszadła, kolejno zmieniano stężenie każdego ze składników podłoża o +50% lub -50% w stosunku do stężenia pierwotnego.

Otrzymane wyniki wszystkich doświadczeń jednostkowych wykorzystano do analizy przez sieć neuronową. Zastosowano sieć o architekturze warstwowej. Wejścia sieci reprezentowały rodzaj stresu abiotycznego, temperatura i czas przebiegu stresu termicznego, stężenie nadtlenu wodoru w przebiegu stresu tlenowego, ilość poszczególnych składników podłoża hodowlanego, rodzaj mikroorganizmu, stężenie tlenu w podłożu podczas hodowli bioreaktorowej, pH podłoża, czas trwania hodowli bioreaktorowej. Wyjścia sieci reprezentowały aktywności enzymatyczne zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy. Do oceny osiągalności zadawanych wartości wyjściowych zastosowano sieć odwróconą.

### Metoda modelowania – sieci neuronowe

Dane pomiarowe:

$X_1$ -aktywność enzymatyczna zewnątrzkomórkowej inwertazy,  $X_2$ - aktywność enzymatyczna zewnątrzkomórkowej inulinazy,  $X_3$ -temperatura w przebiegu stresu termicznego,  $X_4$ -czas przebiegu stresu termicznego,  $X_5$ -stężenie nadtlenu wodoru,  $X_6$ -rodzaj mikroorganizmu,  $X_7$ -stężenie  $(NH_4)_2HPO_4$ ,  $X_8$ -stężenie  $MgSO_4$ ,  $X_9$ -stężenie  $FeSO_4$ ,  $X_{10}$ -stężenie ekstraktu drożdżowego,  $X_{11}$ -stężenie  $KH_2PO_4$ ,  $X_{12}$ -stężenie  $NH_4NO_3$ ,  $X_{13}$ -stężenie inuliny

Dane uzyskane z doświadczeń jednostkowych zgrupowano w tabelach w taki sposób, aby możliwy był import tych danych do algorytmów wielowarstwowej sieci neuronowej w celu wykonania obliczeń. Przed importem z tabel do sieci wszystkie wartości wejściowe zostały odpowiednio zakodowane.

Zasada:

1. to co wiemy stanowi wejście sieci
2. to o co pytamy stanowi wyjście sieci

Zazwyczaj formułujemy pytania dotyczące:

1. związków przyczynowo skutkowych w modelowym procesie
2. czynników procesu zapewniających pożądane wartości na wyjściu (np. maksymalizujące jakość procesu)

Implementacja:

1. pytania o związki przyczynowo skutkowe implementujemy w ten sposób, że zmienne reprezentujące przyczyny stanowią wejście sieci a skutki wyjście (**sieć I** – pierwotna)
2. pytania o parametry procesu dające wymagany efekt implementujemy tak, że to co wiemy i czego wymagamy wprowadzamy na wejście sieci, a to o co pytamy, na wyjście (**sieć II** – odwrócona)

Problem osiągalności:

1. Pytania kategorii 2 mają postać:  
Jeżeli wiemy, że <.....> i żądamy aby <.....> to musimy zrobić <.....>.
2. Zmienne definiujące przestrzeń danych mają ograniczone zakresy co oznacza, że to czego żądamy może być nieosiągalne

**Sieć-II** służy do określenia wartości parametrów procesu przy zadanych wymaganiach odnośnie jego wyjść, a **sieć-I** do sprawdzenia czy to czego wymagamy jest osiągalne.

## Wyniki i omówienie wyników

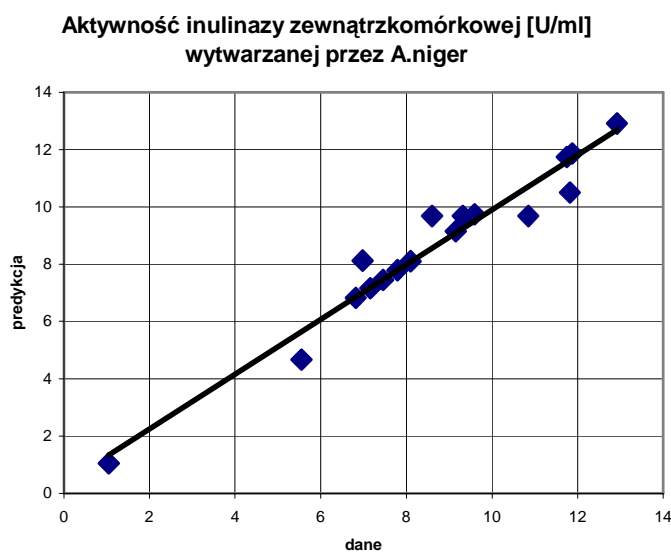
Poniżej przedstawiono wykresy rozrzutu dotyczące danych doświadczalnych i obliczonych przez sieć wielowarstwową w równoczesnej biosyntezie zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy przez szczep *A. niger* w warunkach wglębnych hodowli bioreaktorowych.

W doświadczeniach z użyciem szczepu *A.niger* największy wpływ na wartości wyjściowe sieci wywierała zawartość siarczanu magnezu w podłożu hodowlanym. Kolejnym ważnym składnikiem był azotan amonu i fosforan diamonowy. Najmniej istotny wpływ na produkcję obydwu enzymów wywierała zawartość jednozasadowego fosforanu potasu. Niewielki wpływ na wartości wyjściowe wykazywały również temperatura i czas jej oddziaływania w przebiegu stresu termicznego. Skład podłoża hodowlanego do równoczesnej produkcji inulinazy i inwertazy przez szczep *A.niger* zapewniający maksymalizację wartości aktywności enzymatycznych został obliczony przez sieć odwróconą (**sieć II**). Wyniki obliczeń przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Skład podłoża do jednoczesnej produkcji inulinyazy i inwertazy przez *A.niger* obliczony przez sieć

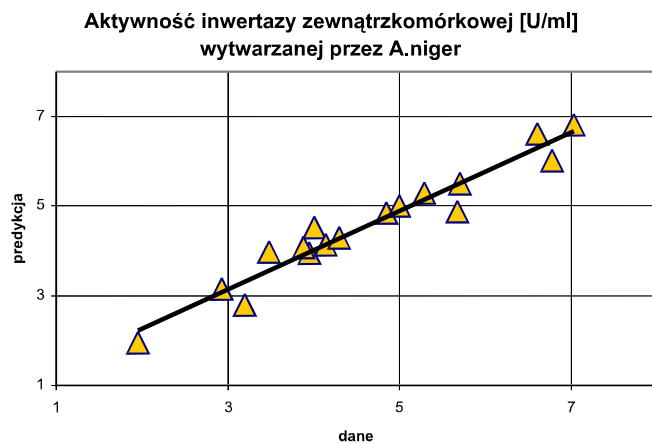
Table 1. Composition of the substrate for simultaneous production of inulinase and invertase by *A.niger* calculated by the network

Skład podłoża [g/l]	Standardowy skład podłoża [g/l]	Skład podłoża obliczony przez sieć [g/l]
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,3	3,18
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,7	1,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	0,50
MgSO <sub>4</sub>	0,5	1,10
Ekstrakt drożdżowy	1,5	1,25
inulina	10	8,7

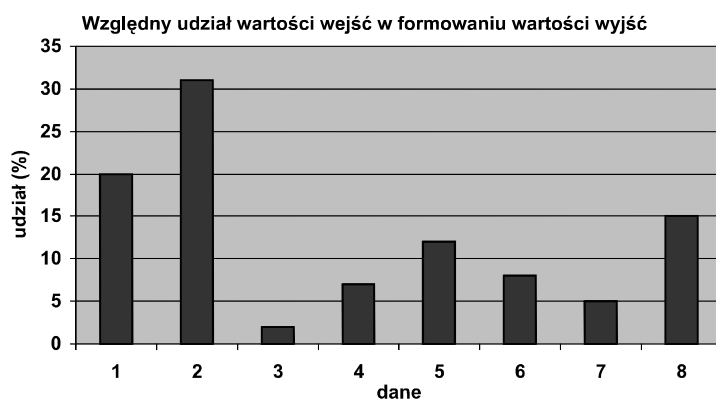


Rys. 1. Wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci - aktywności zewnątrzkomórkowej inulinyazy wytwarzanej przez *A. niger* w doświadczeniach jednostkowych i predykcji tych danych przez sieć neuronową

Fig. 1. Dispersion diagram for network input data - activity of extracellular inulinase generated by *A. niger* in unit experiments and prediction of these data by the neural network



Rys. 2. Wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci - aktywności zewnątrzkomórkowej inwertazy wytwarzanej przez *A. niger* w doświadczeniach jednostkowych i predykcji tych danych przez sieć neuronową  
 Fig. 2. Dispersion diagram for network input data - activity of extracellular invertase generated by *A. niger* in unit experiments and prediction of these data by the neural network



1.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  , 2.  $\text{MgSO}_4$ , 3.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4. temperatura przebiegu stresu termicznego, 5. ekstrakt drożdżowy, 6.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 7. czas działania temperatury w przebiegu stresu termicznego, 8. stężenie nadtlenku wodoru

Rys. 3. Względny udział wartości wejść w formowaniu wartości wyjść sieci w równoczesnym wytwarzaniu zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy przez *A. Niger*  
 Fig. 3. Relative contribution of input values in forming output values of the network in simultaneous production of extracellular inulinase and invertase by *A. niger*

Wyniki obliczeń dotyczące składu podłoża hodowlanego zweryfikowano doświadczalnie w warunkach wglębnych hodowli bioreaktorowych szczepu *A.niger*. Wyniki doświadczenia porównywano z wartościami predykcji tych wyników wyliczonymi przez sieć i obliczono współczynniki korelacji pomiędzy tymi danymi. Wyniki zestawiono w tab.2.

*Tabela 2. Przykładowe zestawienie wartości wyników doświadczalnych, predykcji tych wyników i współczynników korelacji w biosyntezie inulinazy i inwertazy przez A.niger*

*Table 2. Sample comparison of the values of the experimental results, prediction values of these results and correlation coefficients in biosynthesis of inulinase and invertase by A.niger*

Szczep	Enzym	Wynik doświadczalny [U/ml]	Wartość predykcji [U/ml]	Współczynnik korelacji
A.niger	zewnątrzkomórkowa inulinaza	13,56	11,00	0,8112
	zewnątrzkomórkowa inwertaza	7,04	8,15	0,8438

Na podstawie wartości współczynników korelacji należy stwierdzić, że otrzymano wysoką zgodność wartości predykcji sieci z danymi doświadczalnymi, co może świadczyć o dobrym dopasowaniu modelu sieci do warunków doświadczenia. Wartość współczynników korelacji pomiędzy predykcją sieci a danymi doświadczalnymi zawierała się w przedziale wartości od 0,8112 do 0,8438. Zastosowanie metody sieci neuronowych w analizie procesów biotechnologicznych może przyczynić się do znacznego uproszczenia procedur ustalania warunków procesu zapewniających jego maksymalizację w zakresie biosyntezy pożądaných metabolitów.

## Literatura

Ettalibi M., Baratti J.C. 1987. „Purification, properties and comparison on invertase, exoinulinase, and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 13-20.

Dirk Weuster-Botz. 2000. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.90. No.5, 473-483.

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

**NEURAL PREDICTION OF THE RESULTS OF THE PROCESS  
OF SIMULTANEOUS BIOSYNTHESIS OF INULINASE AND IN-  
VERTASE BY *ASPERGILLUS NIGER* UNDER CONDITIONS  
OF SELECTED ABIOTIC STRESSES**

**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 filiform fungus *Aspergillus niger* 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:** neural networks, inulinase, invertase, filiform fungus *Aspergillus Niger*, thermal stress, oxygen stress