

NEURALNA PREDYKCJA PARAMETRÓW PROCESU BIOTECHNOLOGICZNEGO

Streszczenie

Celem pracy była próba zastosowanie sieci neuronowych o konstrukcji wielowarstwowej do predykcji optymalnych warunków jednoczesnego wytwarzania inulinazy i inwertazy przez grzyb nitkowaty *Aspergillus niger* i drożdże *Kluyveromyces marxianus* w warunkach wstępnych wstępnych hodowli wstrząsanych. Wejścia sieci reprezentowała ilość poszczególnych składników podłoża hodowlanego (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ekstrakt drożdżowy, inulina), temperatura procesu biosyntezy enzymów, rodzaj mikroorganizmu i czasu trwania hodowli, a wyjścia – aktywność inulinazy i inwertazy w płynach pohodowlanych. Do oceny osiągalności zadawanych wartości wyjściowych zastosowano sieć odwróconą. W doświadczeniach z użyciem szczepu *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus* największy wpływ na końcowy efekt wytwarzania obydwu enzymów wywierała zawartość siarczynu magnezu obok źródła węgla. Kolejnym ważnym składnikiem podłoża był azotan amonu i fosforan dwuamonowy. Najmniej istotny wpływ na wytwarzanie obydwu enzymów wywierała zawartość siarczynu żelaza i jednozasadowego fosforanu potasu.

Słowa kluczowe: sztuczne sieci neuronowe, predykcja, inulinaza, inwertaza, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus*

Wstęp

Wytwarzanie przez mikroorganizmy o znanych cechach genetycznych metabolitów z najwyższą wydajnością i powtarzalnością wymaga poznania i starannego doboru warunków procesu biotechnologicznego. Wysoki stopień złożoności każdego procesu biotechnologicznego sprawia, że do osiągnięcia założonego celu konieczne staje się poznanie czynników istotnie wpływających na biosyntezę pożądaných metabolitów. Czynniki te można sklasyfikować jako fizyczne: temperatura biosyntezy, pH podłoża hodowlanego, szybkość mieszania podłoża i poziom natleniania itp. oraz chemiczne: ilościowy i jakościowy skład podłoża. W celu ustalenia optymalnych warunków przebiegu procesu stosuje się poznane wcześniej statystyczne metody optymalizacji [Nair, Panda 1997]. Polegają one na wyko-

naniu wielu doświadczeń jednostkowych obejmujących zmiany różnych parametrów procesu. Jedną z nich jest metoda "pełnowymiarowa", polegająca na zbadaniu wpływu różnych kombinacji czynników fizycznych i chemicznych na proces biotechnologiczny [Poora, Kulkarni 1995]. Przykładem może być optymalizacja składu podłoża hodowlanego. Jeżeli w podłożu hodowlanym znajduje się 6 składników, to musimy wykonać 2^6 (64) doświadczeń jednostkowych, a gdy liczba składników jest większa i wynosi np. 10, to liczba doświadczeń wzrasta do liczby 2^{10} (1024). Zważywszy, że czas doświadczenia wynosi od kilku do kilkunastu dób i każdy ze składników powinien być użyty na trzech poziomach stężenia (niski, średni i wysoki), to metody te są czasochłonne, wymagają dużego nakładu pracy i pochłaniają znaczne środki finansowe. Powiększanie skali lub zmiana warunków przebiegu procesu wymaga każdorazowo powtórzenia procedury opisanej powyżej.

Użycie sztucznych sieci neuronowych umożliwia nie tylko optymalizację warunków przebiegu procesu biotechnologicznego z udziałem określonego mikroorganizmu, lecz również predykcję (przewidywanie) z wysokim prawdopodobieństwem efektów biosyntezy pożądanego metabolitu, bez konieczności powtórnego wykonywania dużej liczby doświadczeń jednostkowych [Yu-Dong, Kuo-Chen 2000; Najjar i in. 1997; Shene i in. 1998]. Wykorzystuje się do tego celu warstwowe sieci neuronowe. Zbudowane są one z warstwowy wejściową, ukrytej oraz wyjściowej. [Fu 1995; Nguyen, Widrow 1990; Skwarcz i in. 2003].

Zaletą sieci neuronowych jest to, że w wyniku procesu uczenia sieć może nabyć zdolności przewidywania wartości wyjściowych sygnałów wyłącznie na podstawie obserwacji tzw. ciągu uczącego, bez konieczności stawiania w sposób jasny hipotez o naturze związku pomiędzy wejściowymi danymi a przewidywanymi wartościami wyników. Innymi słowy, sieć może nauczyć się prognozować sygnały wyjściowe także wtedy, gdy korzystający z niej badacz nie wie nic lub niewiele o naturze związków łączących przesłanki z wnioskami [Hudson, Postma 1995].

Realizacja takich założeń w biotechnologii może przyczynić się do znacznego obniżenia kosztów produkcji różnych metabolitów przy jednoczesnym zapewnieniu najwyższych, możliwych do osiągnięcia w danych warunkach wydajności procesu. Fakt ten nabiera istotnego znaczenia przy biosyntezie różnych metabolitów na skalę przemysłową, gdzie mamy do czynienia z powiększaniem skali procesu oraz gdy do ich produkcji są używane drogocenne komponenty podłoża hodowlanych.

Celem pracy była próba zastosowania sieci neuronowych o konstrukcji wielowarstwowej w predykcji wyników i optymalizacji warunków jednoczesne-

go wytwarzania inuliny i inwertazy przez grzyb nitkowaty *Aspergillus niger* i drożdże *Kluyveromyces marxianus* w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych

Metodyka i materiały.

W doświadczeniach użyto wyselekcjonowane wcześniej dwa naturalne szczepy: grzyb nitkowaty *Aspergillus niger* i drożdże *Kluyveromyces marxianus*, będące nadproducentami inuliny (E.C.3.2.1.7) i inwertazy (E.C.3.2.1.26). Do hodowli *A. niger* użyto płynnego podłoża o składzie: NH_4NO_3 -0,23%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -0,37%, KH_2PO_4 -0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5%, ekstrakt drożdżowy-0,15%, inulina-1,0%. Do hodowli *K. marxianus* użyto płynnego podłoża o składzie: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -1,0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5%, $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,015%, ekstrakt drożdżowy-0,3%, inulina-1,0%. Mikroorganizmy hodowano w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych w temp. 28°C, przy 200 obr./min., przez okres 7 dób. Po tym czasie oddzielano płyn pohodowlany od biomasy komórek mikroorganizmów metodą wirowania (5000 g, t=4°C), a następnie w filtratach z płynu pohodowlanego i ekstraktach z biomasy oznaczano aktywności enzymatyczne inuliny i inwertazy zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej. Aktywność enzymatyczną wyrażano w jednostkach aktywności (U/ml) filtratu pohodowlanego lub ekstraktu.

W innych doświadczeniach użyto podłoża hodowlanych o zmodyfikowanym składzie tak, że podłoże każdej następnej hodowli zawierało mniejszą lub większą o 50% ilość jednego tylko składnika w stosunku do hodowli kontrolnej, przy zachowaniu zawartości pozostałych składników.

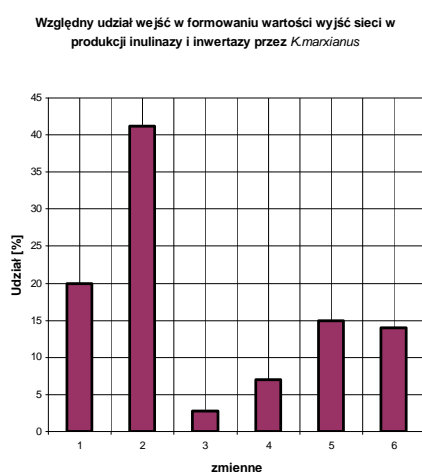
Budowa sieci neuronowych użytych do badań

Zastosowano 2 rodzaje sieci neuronowych o konstrukcji warstwowej. W pierwszej sieci wejścia sieci reprezentowały ilości poszczególnych składników podłoża hodowlanego (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ekstrakt drożdżowy, inulina), temperaturę procesu biosyntezy enzymów, rodzaj mikroorganizmu i czas trwania hodowli, a wyjścia aktywności inuliny i inwertazy. Druga odwrócona sieć warstwowa posłużyła do oceny osiągalności zadawanych wartości wyjściowych. Pozwoliła ona udzielić odpowiedzi na pytanie, jakie wartości parametrów powinien mieć wsad procesu i sam proces, ażeby osiągnąć produkt końcowy o wymaganych parametrach. Do budowy wyżej wymienionych sieci wykorzystano program komputerowy Neuro Shell 2 firmy Ward System Group Inc.

Wyniki i dyskusja

Wpływ poszczególnych składników podłoża hodowlanego na końcowy wynik doświadczenia jednoczesnej produkcji inuliny i inwertazy przez mikroorganizmy ilustrują wykresy (rys. 1, 2). W obydwu doświadczeniach, tj. z użyciem szczepu *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus* największy wpływ na końcowy efekt produkcji obydwu enzymów wywierała zawartość siarczanu(VI) magnezu. Kolejnym ważnym składnikiem podłoża był azotan(V) amonu i wodorooortofosforan(V) amonu. Najmniej istotny wpływ na produkcję obydwu enzymów miała zawartość siarczanu(VI) żelaza(II) i dwuwodorooortofosforanu(V) potasu.

Optymalny skład podłoża hodowlanych do jednoczesnej produkcji inuliny i inwertazy przez szczepy *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus* został obliczony przez sieć odwróconą (sieć II). Wyniki obliczeń przedstawiono w tabelach 1 i 2.

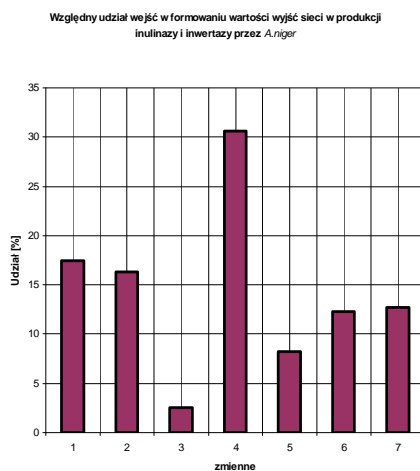


Rys.1 Względny udział wejść w formowaniu wartości wyjścia sieci w produkcji inuliny i inwertazy przez *Kluyveromyces marxianus*. 1.- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2.- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.Ekstrakt drożdżowy, 5.-Inulina, 6.-Temperatura

Fig. 1. Relative share of the inputs in formation of network output values at inulinase and invertase production by *Kluyveromyces marxianus*. 1- $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; 2- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3- $\text{FeSO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 4- yeast extract; 5- inuline; 6- temperature

Optymalny skład podłoża hodowlanych obliczony przez wielowarstwową sieć neuronową weryfikowano doświadczalnie w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych szczepów *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus*, porównując wartości predykcji tych wyników wyliczonych przez sieć z wynikami doświadczeń. Następnie obliczono współczynniki korelacji pomiędzy tymi danymi. Wyniki zestawiono w tabeli 3.

Na podstawie wartości współczynników korelacji należy stwierdzić, że otrzymano dobrą zgodność predykcji sieci z danymi doświadczalnymi, co może świadczyć o dobrym dopasowaniu modelu sieci do warunków doświadczenia. Wartości współczynników korelacji zawierały się w przedziale od 0,8112 do 0,9554.



Rys.2 Względny udział wejść w formowaniu wartości wyjść sieci w produkcji inulinazy i inwertazy przez *Aspergillus niger*. 1.- NH_4NO_3 , 2.- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3.- KH_2PO_4 , 4.- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.-Ekstrakt drożdżowy, 6.- Inulina, 7.-Temperatura

Fig. 2. Relative share of the inputs in formation of network output values at inulinase and invertase production by *Aspergillus niger*. 1- NH_4NO_3 ; 2- $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; 3- KH_4PO_4 ; 4- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5- yeast extract; 6- inuline; 7- temperature

Tabela1. Optymalny skład podłoża do jednoczesnej produkcji inulinazy i inwertazy przez szczep *Aspergillus niger* w warunkach wglębn-j hodowli wstrząsanej, wyliczony przez wielowarstwową sieć neuronową

Table 1. Optimum medium composition to simultaneous inulinase and invertase production by *Aspergillus niger* strain under conditions of deep, shaken culture, as computed by multilayer neural network

Składnik podłoża g/l	Standardowy skład podłoża (g/l)	Optymalny skład podłoża obliczony przez sieć (g/l)
NH_4NO_3	2,3	3,35
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	3,7	2,4
KH_2PO_4	1,0	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	1,15
Ekstrakt drożdżowy	1,5	2,20
Inulina	10	12,7
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	28	28

Na podstawie wykresów (rys.3,4,5,6) należy stwierdzić, że sieć jest prawidłowo wytrenowana i dobrze dopasowana do analizowanego modelu doświadczenia,

ponieważ zbiór punktów wartości pomiarowych rozłożony jest równomiernie wokół linii trendu i przechodzi ona w okolicach początku wykresu.

Tabela2. Optymalny skład podłoża do jednoczesnej produkcji inulinazy i inwertazy przez szczep Kluyveromyces marxianus w warunkach wglębnej hodowli wstrząsanej, wyliczony przez wielowarstwową sieć neuronową

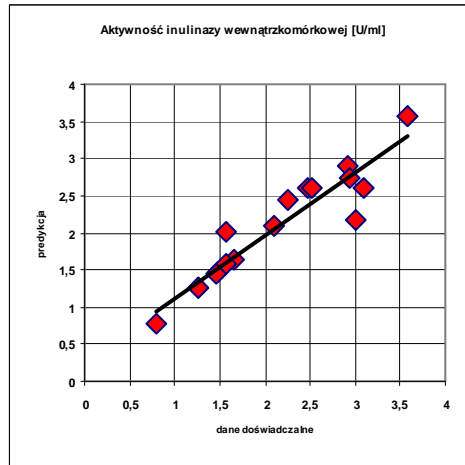
Table 2. Optimum medium composition to simultaneous inulinase and invertase production by Kluyveromyces marxianus_strain under conditions of deep, shaken culture, as computed by multilayer neural network

Składnik podłoża g/l	Standardowy skład podłoża (g/l)	Optymalny skład podłoża obliczony przez sieć (g/l)
(NH ₄)H ₂ PO ₄	10,00	4,75
FeSO ₄ ·2H ₂ O	0,015	0,01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	1,15
Ekstrakt drożdżowy	1,5	2,36
Inulina	10	9,1
Temperatura [°C]	28	30

Tabela3.Zestawienie wyników doświadczalnych, predykcji sieci i współczynników korelacji w biosyntezie inulinazy i inwertazy przez Aspergillus niger i Kluyveromyces marxianus

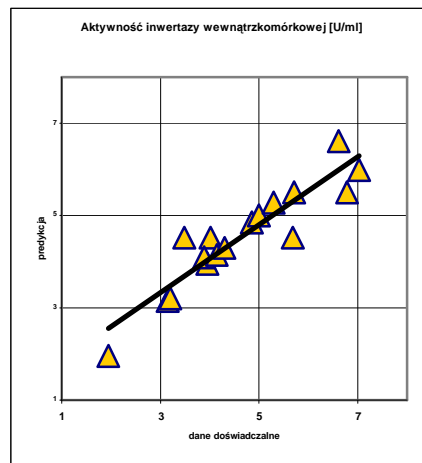
Tabela3. Table 3. Tabulation of the experimental results, network predictions and correlation coefficients for biosynthesis of inulinase and invertase by Aspergillus niger and Kluyveromyces marxianus

Mikroorganizm	Enzym	Wynik doświadczalny U/ml	Predykcja wyniku U/ml	Współczynnik korelacji
Aspergillus Niger	Inulinaza zewnątrzkomórkowa	12,56	11,30	0,8112
	Inulinaza wewnątrzkomórkowa	4,00	5,10	0,9282
	Inwertaza zewnątrzkomórkowa	28,35	31,17	0,9554
	Inwertaza wewnątrzkomórkowa	7,50	8,31	0,8438
Kluyveromyces marxianus	Inulinaza zewnątrzkomórkowa	10,80	12,44	0,9014
	Inulinaza wewnątrzkomórkowa	7,80	6,95	0,9144
	Inwertaza zewnątrzkomórkowa	122,44	120,52	0,9312
	Inwertaza wewnątrzkomórkowa	99,87	95,48	0,9425



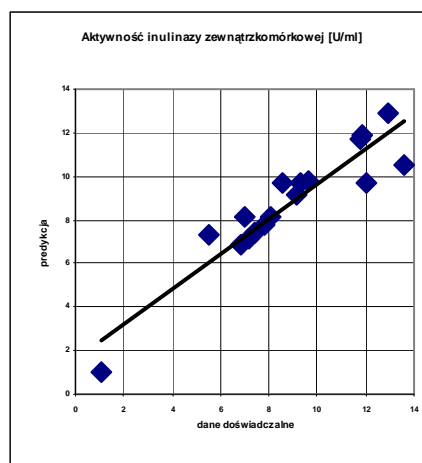
Rys.3. Przykładowy wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci - aktywności inulinazy wewnątrzkomórkowej produkowanej przez *A.niger* i predykcji tych danych przez sieć neuronową

Fig. 3. Exemplary dispersion diagram for the data at network input concerning activity of intracellular inulinase produced by *A. niger* and the same data predicted by the neural network



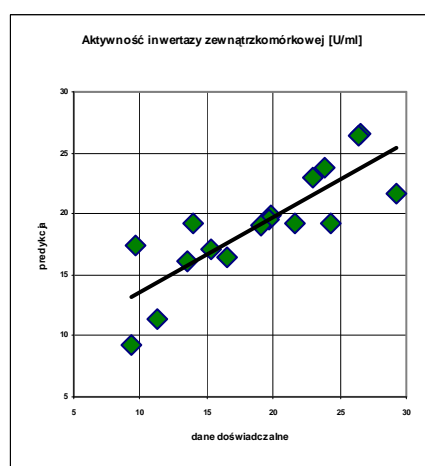
Rys.4. Przykładowy wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci - aktywności inulinazy wewnątrzkomórkowej produkowanej przez *K.marxianus* i predykcji tych danych przez sieć neuronową

Fig. 4. Exemplary dispersion diagram for the data at network input concerning activity of intracellular inulinase produced by *K. marxianus* and the same data predicted by the neural network



Rys.5. Przykładowy wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci – aktywności inulinazy zewnątrzkomórkowej produkowanej przez *A.niger* i predykcji tych danych przez sieć neuronową

Fig. 5. Exemplary dispersion diagram for the data at network input concerning activity of extracellular inulinase produced by *A. niger* and the same data predicted by the neural network



Rys.6. Przykładowy wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci - aktywności inulinazy zewnątrzkomórkowej produkowanej przez *K.marxianus* i predykcji tych danych przez sieć neuronową

Fig. 6. Exemplary dispersion diagram for the data at network input concerning activity of extracellular inulinase produced by *K. marxianus* and the same data predicted by the neural network

Wnioski

1. Zastosowanie techniki sieci neuronowych o wielowarstwowej architekturze umożliwiło predykcję wyników doświadczenia i określenie wpływu każdego ze składników podłoża hodowlanego na efekt końcowy produkcji inulinazy i inwertazy przez *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus*, w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych, w ustalonych wcześniej zakresach zmian wartości parametrów doświadczenia.
2. Na podstawie wyników doświadczeń jednostkowych istnieje możliwość optymalizowania warunków hodowli mikroorganizmów w zakresie maksymalizacji efektów końcowych doświadczenia.
3. Zastosowanie techniki sieci neuronowych może przyczynić się do znacznego obniżenia kosztów i czasochłonności analizy złożonych procesów biotechnologicznych.

Bibliografia

- Fu L. *Neural networks in computer intelligence*. 1995. McGraw-Hill, New York
- Hudson P., Postma E. 1995. *Choosing and using a neural net*. In: Braspenning, P.J. et al. (Eds.), *Artificial Neural Networks, An Introduction to ANN Theory and Practice*. Lecture Notes in Computer Science, Springer, NY
- Nair S.R., Panda T. 1997. *Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by aspergillus niger*. *Bioproc. Eng.*, 16: 169-173
- Najjar Y., Basheer I., Hajmeer, M. 1997. *Computational neural networks for predictive microbiology. 1. Methodology*. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 27-49
- Nguyen D., Widrow B. 1990. *Improving the learning speed of two-layer neural networks by choosing initial values of the adaptive weights*. In: *Proceedings of an IEEE International Joint Conference on Neural Networks, San Diego, CA*
- Poorna V., Kulkarni P. R. 1995. *Full factorial design to study fermentative production of inulinase using inulin from Kuth (Saussurea Lappa) root powder by A. niger van Teighem UV11 mutant*. *Bioresource Technology*, 54: 117-121
- Shene C., Andrews B., Asenjo J. A. 1998. *Optimization of Bacillus subtilis fed-batch fermentation for the maximization of the synthesis of a recombinant β -1,4-endoglucanase*. *Computer Applications in Biotechnology*, 7: 219-223
- Vandame E.J., Derycke D.G. 1983. *Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 29: 139-176
- Yu-Dong Cai, Kuo-Chen Chou. 2000. *Using neural network for prediction of subcellular location of prokaryotic and eukaryotic proteins*. *Molec. Cell Biol. Res. Commun.*, 4: 172-173

Skwarcz J., Pielecki J., Marciniak A.W. 2003. Zastosowanie sztucznych sieci neuronowych w konstruowaniu bazy wiedzy o procesie enzymatycznej hydrolizy celulozy. *Inżynieria Rolnicza*, 1 2 (54): 345-360

USING THE NEURAL NETWORKS FOR PREDICTION OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS PARAMETERS

Summary

An attempt was made to apply the neural networks of multilayer construction to predicting the optimum conditions for simultaneous inulinase and invertase production by *Aspergillus niger* fungi and *Kluyveromyces marxianus* yeasts in deep shaken cultures. The network inputs represented the numbers of particular compounds of agriculture medium (NH_4NO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; KH_4PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; yeast extract, inuline), the temperature of enzyme biosynthesis process, kind of microorganisms and culture duration, whereas the outputs— inulinase and invertase activities in post-culture liquids. The reversed networks was applied to evaluating the attainability of assigned output values. In experiments with *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* strains final results concerning production of both enzymes were strongest affected by magnesium sulphate content next to the source of carbon. Following important components of medium were ammonium nitrate and bi-ammonium phosphate. The least effect on production of both enzymes showed the contents of iron sulphate and monobasic potassium phosphate.

Key words: artificial neural networks, prediction, inulinase, invertase, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus*

Recenzent – Piotr Boniecki