

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% NH_4NO_3 ; 0,37% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% 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 dm³, wyprodukowanym przez firmę New Brunswick. Bioreaktor wypełniano płynnym podłożem do objętości 2,5 dm³, sterylizowano, wychładzano do temperatury otoczenia i zaszczepiano 24 godzinnym inokulum o objętości 0,2 dm³ zawierającym komórki mikroorganizmu poddane stresowi termicznemu lub tlenowemu. Temperatura podłoża hodowlanego wynosiła 28°C, względna rozpuszczalność tlenu w podłożu pO₂ 30% przy objętościowym natężeniu powietrza zasilającego bioreaktor 2dm³ powietrza/1 dm³ 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 H₂O₂/dm³. 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

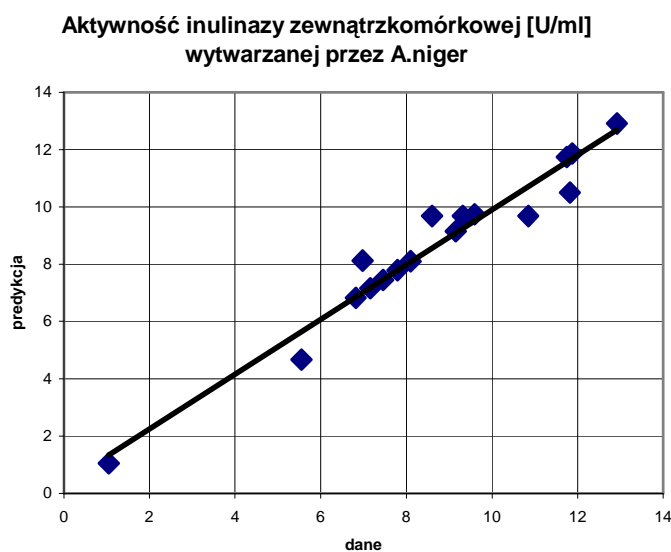
Poniżej przedstawiono wykresy rozrzutu dotyczące danych doświadczalnych i obliczonych przez sieć wielowarstwową w równoczesnej biosyntezie zewnątrzkomórkowej inulinazy i inwertazy przez szczep *A. niger* w warunkach wglębnych hodowli bioreaktorowych.

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

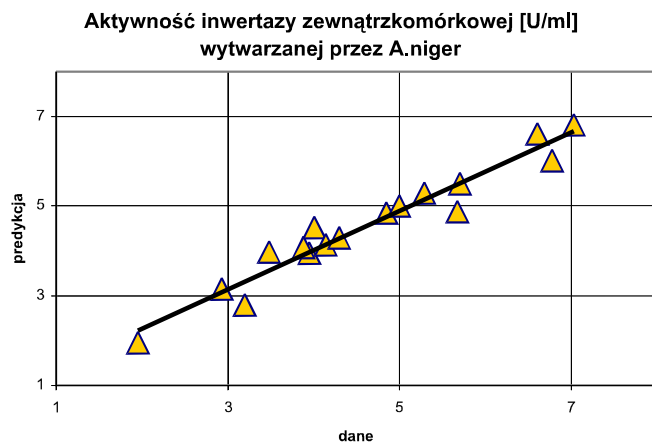
Table 1. Composition of the substrate for simultaneous production of inulinase and invertase by *A.niger* calculated by the network

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

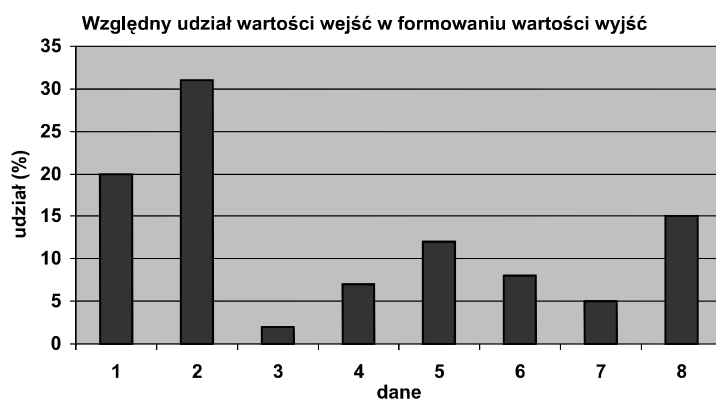


Rys. 1. Wykres rozrzutu dotyczący danych na wejściu sieci - aktywności zewnątrzkomórkowej inulinyazy wytwarzanej przez *A. niger* w doświadczeniach jednostkowych i predykcji tych danych przez sieć neuronową

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. NH_4NO_3 , 2. MgSO_4 , 3. KH_2PO_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