

BARTOSZ SOŁOWIEJ, JACEK PIELECKI, DOMINIK SZWAJGIER

PREDYKCJA WYNIKÓW JEDNOCZESNEJ PRODUKCJI INULINAZY I INWERTAZY PRZEZ SZCZEPY *ASPERGILLUS NIGER* I *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* PRZY ZASTOSOWANIU TECHNIKI SIECI NEURONOWYCH

Streszczenie

Celem pracy była próba zastosowania techniki sieci neuronowych o konstrukcji wielowarstwowej w predykcji wyników i optymalizacji warunków jednoczesnej produkcji inuliny i inwertazy przez grzyby nitkowate *Aspergillus niger* i drożdże *Kluyveromyces marxianus* w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych. 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), temperatura procesu biosyntezy enzymów, rodzaj mikroorganizmu i czas trwania hodowli, a wyjścia – aktywności inuliny i inwertazy. Do oceny osiągalności zadawanych wartości wyjściowych zastosowano sieć odwróconą.

W doświadczeniach z użyciem szczepu *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus* największy wpływ na końcowy efekt produkcji obydwu enzymów wywierała zawartość siarczanu magnezu obok źródła węgla. Kolejnym ważnym składnikiem podłoża był azotan amonu i fosforan dwuamonowy. Najmniej istotny wpływ na produkcję obydwu enzymów wywierała zawartość siarczanu żelaza i jednozasadowego fosforanu potasu.

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

Wprowadzenie

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, poziom natleniania itp. oraz chemiczne: ilościowy i jakościowy skład podłoża.

W celu ustalenia optymalnych warunków przebiegu procesu stosuje się poznane wcześniej statystyczne metody optymalizacji [4]. Polegają one na wykonaniu 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 [7]. 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 ilość 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 opisaną powyżej.

Wykorzystywane od niedawna metody techniki sztucznych sieci neuronowych umożliwiają 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 [10, 5, 8].

Pierwowzorem wszelkich sieci neuronowych jest mózg ludzki. Sieć neuronowa jest bardzo uproszczonym modelem mózgu. Składa się ona z dużej liczby (od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy) elementów przetwarzających informacje. Elementy te nazywane są neuronami, chociaż w stosunku do rzeczywistych komórek nerwowych ich funkcje są bardzo uproszczone. Neurony są powiązane w sieć za pomocą połączeń o parametrach (tzw. wagach) modyfikowanych w trakcie tzw. procesu uczenia. Topologia połączeń oraz ich parametry stanowią program działania sieci, zaś sygnały pojawiające się na jej wyjściach w odpowiedzi na określone sygnały wejściowe są rozwiązaniami stawianych jej zadań.

Większość współcześnie projektowanych i wykorzystywanych sieci neuronowych ma budowę warstwową, przy czym uwzględniając dostępność w trakcie procesu uczenia wyróżnia się warstwy: wejściową, wyjściową oraz tzw. warstwy ukryte [1, 6]. Ze względu na wysoką złożoność procesów biotechnologicznych coraz częściej do ich analizy są używane techniki sztucznych sieci neuronowych.

Ważną zaletą sieci neuronowych, jako urządzeń prognozujących, jest fakt, 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 o naturze związków łączących przesłanki z wnioskami [2]. 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 drogie komponenty podłoża hodowlanych.

Celem pracy była próba zastosowania techniki sieci neuronowych o konstrukcji wielowarstwowej w predykcji wyników i optymalizacji warunków jednoczesnej produkcji inuliny i inwertazy przez grzyb nitkowaty *Aspergillus niger* i drożdże *Kluyveromyces marxianus* w warunkach wglębnych hodowli wstrząsanych.

Material i metody badań

Drobnoustroje

W doświadczeniach użyto wyselekcjonowane wcześniej dwa szczepy pochodzące z kolekcji Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa Akademii Rolniczej w Lublinie: grzyb nitkowaty z gatunku *Aspergillus niger* i drożdże z gatunku *Kluyveromyces marxianus*.

*Wglębne hodowle wstrząsane szczepu *Aspergillus niger**

Wglębne hodowle wstrząsane prowadzono w kolbach Erlenmayera o poj. 500 ml, które wypełniono do objętości 100 ml płynnym podłożem o składzie: NH_4NO_3 – 0,23%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,37%, KH_2PO_4 – 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05%, ekstrakt drożdżowy – 0,15%, topinambur w ilości równoważnej 1% inuliny w podłożu. Początkowy odczyn podłoża regulowano roztworem kwasu fosforowego do wartości $\text{pH} = 5,0$. Następnie kolby sterylizowano w autoklawie w temp. 120°C przez 30 min. Po tym czasie kolby chłodzono i podłoża szczepiono 1 ml zawiesiny zawierającej zarodniki *Aspergillus niger* zmyte sterylnie ze skosów. Tak przygotowane kolby inkubowano we wstrząsarce orbitalnej przy 200 obr./min., w temp. 28°C przez 7 dób. Po tym czasie oddzielano płyn pochodzący od biomasy metodą sączenia przez sączek z tworzywa

sztucznego, a następnie w filtratach i ekstraktach oznaczano aktywności inulinyazy i inwertazy zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej.

Aktywność inulinyazy (inwertazy) zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej oznaczano w ten sposób, że do 0,9 ml 0,1 M buforu McIlvaine'a o pH = 5,0 (pH = 4,0), zawierającego 1% inuliny (0,1 M sacharozy) dodawano 0,1 ml odpowiednio rozcieńczonego filtratu. Tak przygotowaną mieszaninę reagującą inkubowano w termostacie o temp. 50°C (60°C) przez okres 30 min. Ilość cukrów redukujących uwolnionych w czasie reakcji oznaczano metodą Millera [3]. Za jednostkę aktywności enzymatycznej przyjęto taką ilość enzymu, która uwalniała z substratu 1 μ mol ekwiwalentu fruktozy (glukozy) w 1 ml mieszaniny reagującej w ciągu 1 min, w warunkach oznaczenia [9]. Aktywność enzymatyczną wyrażano w jednostkach aktywności (U/ml) filtratu pochodowlanego.

W innych doświadczeniach użyto podłoży 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.

*Wgłębne hodowle wstrząsane drożdży *Kluyveromyces marxianus**

Wgłębne hodowle wstrząsane prowadzono w kolbach Erlenmayera o poj. 500 ml, które wypełniono do objętości 100 ml płynnym podłożem o składzie: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,015%, ekstrakt drożdżowy – 0,3%, topinambur w ilości równoważnej 1% inuliny w podłożu. Początkowy odczyn podłoża regulowano do wartości pH = 5,0. Następnie kolby sterylizowano w autoklawie w temp. 120°C przez 30 min. Po tym czasie kolby chłodzono i podłoża szczepiono sterylnie 1 ml zawiesiny zawierającej komórki *Kluyveromyces marxianus* zmyte sterylnie ze skosów. Tak przygotowane kolby inkubowano we wstrząsarce orbitalnej przy 200 obr./min, w temp. 28°C przez 7 dób. Po tym czasie oddzielano płyn pochodowlany od biomasy komórek metodą wirowania przy 5000×g w temp. 4°C. W filtratach i ekstraktach oznaczano aktywność inulinyazy i inwertazy zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej metodą opisaną wyżej.

Podobnie modyfikowano skład podłoża hodowlanego w innych doświadczeniach.

Konstrukcja sieci neuronowej

Zastosowano sieć o konstrukcji warstwowej. 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), temperatura procesu biosyntezy enzymów, rodzaj mikroorganizmu i czas trwania hodowli, a wyjścia – aktyw-

ności inuliny i inwertazy. Do oceny osiągalności zadawanych wartości wyjściowych zastosowano sieć odwróconą.

Metoda modelowania – sieci neuronowe

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 (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:

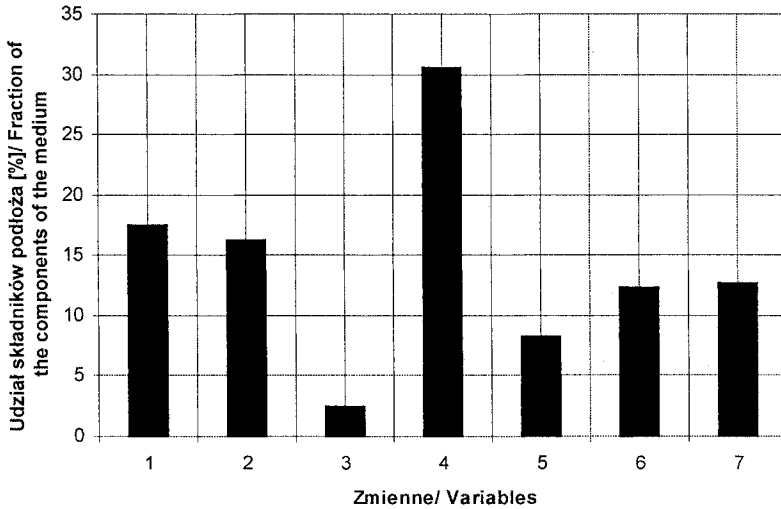
- 1) pytania kategorii 2 mają postać:
Jeżeli wiemy, że <.....> i żądamy, aby <.....> to musimy zrobić <.....>.
- 2) zmienne definiujące przestrzeń danych mają ograniczone zakresy, co oznacza, że to, czego żądamy może być nieosiągalne.

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.

W obliczeniach wykorzystano program komputerowy Neuro Shell 2 ver.2 firmy Ward System Group Inc.

Wyniki i dyskusja

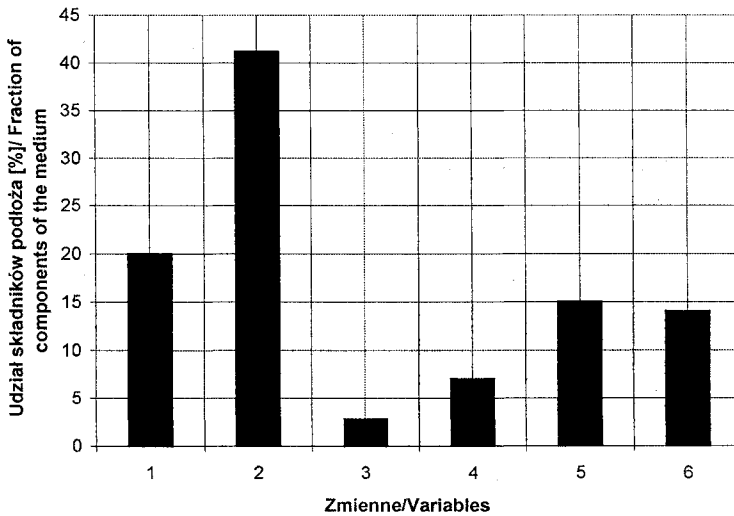
Wpływ poszczególnych składników podłoża hodowlanego na końcowy wynik doświadczenia jednoczesnej produkcji inuliny i inwertazy przez mikroorganizmy ilustrują wykresy (rys. 1, 2). W obydwu doświadczeniach, tj. z użyciem szczepu *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces marxianus* największy wpływ na końcowy 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.



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 / Yeast extract;
6. Inulina/ Inulin; 7. Temperatura/ Temperature.

Rys. 1. Względny udział wejść w formowaniu wartości wyjściowej sieci w produkcji inulinazy i inwertazy przez *Aspergillus niger*.

Fig. 1. Relative effect of the input values on the output values obtained while producing the inulinase and invertase by *Aspergillus niger*.



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/ Yeast extract;
5. Inulina/ Inulin; 6. Temperatura/ Temperature.

Rys. 2. Względny udział wejść w formowaniu wartości wyjściowej sieci w produkcji inulinazy i inwertazy przez *Kluyveromyces marxianus*.

Fig. 2. Relative effect of the input values on the output values obtained while producing the inulinase and invertase by *Kluyveromyces marxianus*.

Tabela 1

Optymalny skład podłoża do jednoczesnej produkcji inulinyazy i inwertazy przez szczep *Aspergillus niger* w warunkach wgłębnej hodowli wstrząsanej, wyliczony przez wielowarstwową sieć neuronową.

The optimum composition of medium for the purpose of simultaneously producing the inulinase and invertase by *Aspergillus niger* in the batch shaken culture, as calculated by a many-layered neural network.

Składnik podłoża Component of the medium [g/l]	Standardowy skład podłoża Standard composition of the medium [g/l]	Optymalny skład podłoża obliczony przez sieć The optimum composition of the medium as calculated by the network [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 ·7H ₂ O	0,5	1,10
Ekstrakt drożdżowy/ Yeast extract	1,5	1,25
Inulina/ Inulin	10	8,7
Temperatura/ Temperature [°C]	28	28

Tabela 2

Optymalny skład podłoża do jednoczesnej produkcji inulinyazy i inwertazy przez szczep *Kluyveromyces marxianus* w warunkach wgłębnej hodowli wstrząsanej, wyliczony przez wielowarstwową sieć neuronową.

The optimum composition of the medium for the purpose of simultaneously producing the inulinase and invertase by *Kluyveromyces marxianus* in the batch shaken culture, as calculated by a many-layered neural network.

Składnik podłoża Component of the medium [g/l]	Standardowy skład podłoża Standard composition of the medium [g/l]	Optymalny skład podłoża obliczony przez sieć The optimum composition of the medium as calculated by the network [g/l]
(NH ₄)H ₂ PO ₄	10,00	4,75
FeSO ₄ ·2H ₂ O	0,015	0,010
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,95
Ekstrakt drożdżowy Yeast extract	1,5	1,36
Inulina/ Inulin	10	9,1
Temperatura/ Temperature [°C]	28	30

Tabela 3

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

The experimental results obtained, the prediction as developed by a neural network, and the coefficients of correlation under a biosynthesis of the inulinase and invertase by *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*.

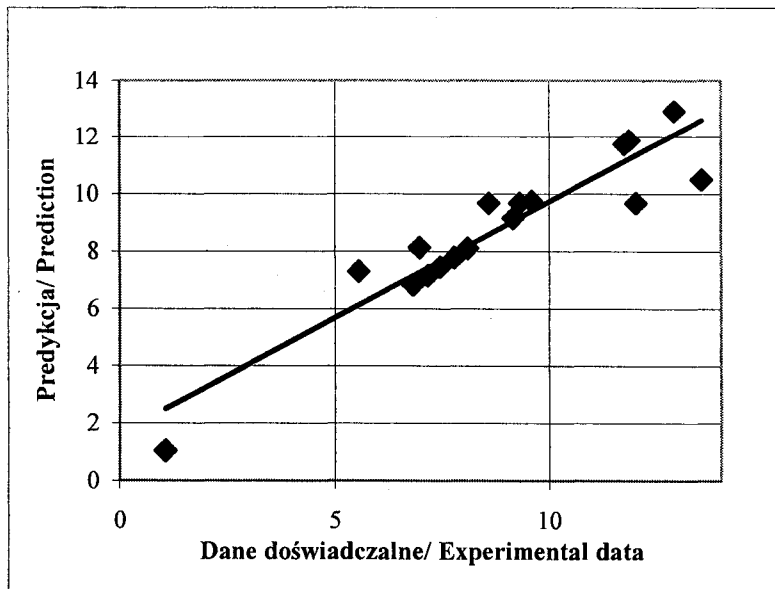
Mikroorganizm Microorganism	Enzym Enzyme	Wynik doświadczalny Experimental result [U/ml]	Predykcja wyniku Prediction of the result [U/ml]	Współczynnik korelacji Correlation coefficient
<i>Aspergillus niger</i>	inulinaza zewnątrzkomórkowa extracellular inulinase	13,56	11,00	0,8112
	inulinaza wewnątrzko- mórkowa intracellular inulinase	3,97	4,10	0,9282
	inwertaza zewnątrzko- mórkowa extracellular invertase	31,11	32,56	0,9554
	inwertaza wewnątrz- komórkowa intracellular invertase	7,04	8,15	0,8438
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	inulinaza zewnątrzkomórkowa extracellular inulinase	11,16	12,38	0,9014
	inulinaza wewnątrzko- mórkowa intracellular inulinase	7,60	6,95	0,9144
	inwertaza zewnątrzko- mórkowa extracellular invertase	112,17	120,45	0,9312
	inwertaza wew- nątrzkomórkowa intracellular invertase	98,80	94,12	0,9425

Optymalny skład podłoży 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 tab. 1 i 2.

Optymalny skład podłoży 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 tab. 3.

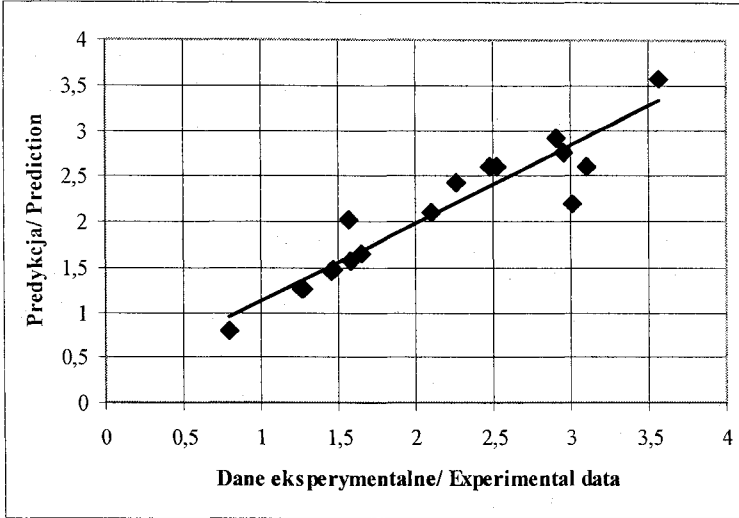
Na podstawie wartości współczynników korelacji należy stwierdzić, że otrzymano dobrą zgodność predykcji sieci z danymi doświadczalnymi, co może świadczyć o dobrym dopasowaniu modelu sieci do warunków doświadczenia. Wartości współczynników korelacji zawierały się w przedziale od 0,8112 do 0,9554.

Na podstawie rys. 3., 4., 5. i 6. należy stwierdzić, że jeżeli zbiór punktów wartości pomiarowych rozłożony jest równomiernie wokół krzywej trendu lub bezpośrednio na krzywej i krzywa przechodzi w okolicach początku wykresu, to sieć jest prawidłowo wytrenowana i dobrze dopasowana do analizowanego modelu doświadczenia.



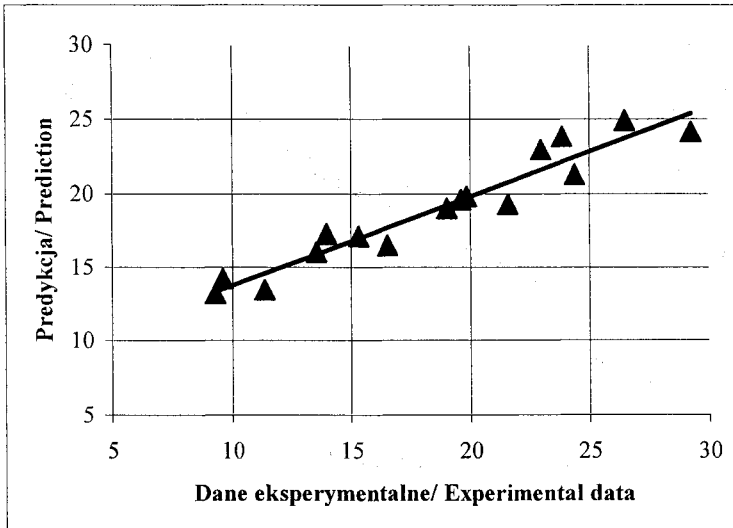
Rys. 3. Aktywność inuliny zewnątrzkomórkowej [U/ml] produkowanej przez *Aspergillus niger* i predykcja tych danych przez sieć neuronową. [U/ml] – jednostka/ml.

Fig. 3. Activity of the extracellular inulinase [U/ml] produced by *Aspergillus niger* and the prediction of these data developed by a neural network. [U/ml] – unit/ml.



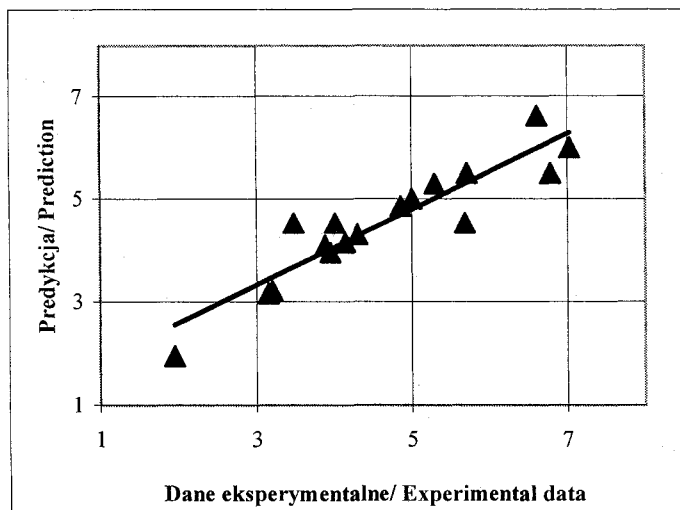
Rys. 4. Aktywność inulinyazy wewnątrzkomórkowej [U/ml] produkowanej przez *Aspergillus niger* i predykcja tych danych przez sieć neuronową. [U/ml] – jednostka/ml.

Fig. 4. Activity of the intracellular inulinase [U/ml] produced by *Aspergillus niger* and the prediction of these data as developed by a neural network. [U/ml] – unit/ml.



Rys. 5. Aktywności inwertazy zewnątrzkomórkowej [U/ml] produkowanej przez *Kluyveromyces marxianus* i predykcja tych danych przez sieć neuronową. [U/ml] – jednostka/ml.

Fig. 5. Activity of the extracellular invertase [U/ml] produced by *Kluyveromyces marxianus* and the prediction of these data as developed by neural network. [U/ml] – unit/ml.



Rys. 6. Aktywność inwertazy wewnątrzkomórkowej [U/ml] produkowanej przez *Kluyveromyces marxianus* i predykcja tych danych przez sieć neuronową. [U/ml] – jednostka/ml.

Fig. 6. Activity of the intracellular invertase [U/ml] produced by *Kluyveromyces marxianus* and the prediction of these data as developed by a neural network. [U/ml] – unit/ml.

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 inuliny 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.

Literatura

- [1] Fu L.: Neural networks in computer intelligence. McGraw-Hill, New York 1995.
- [2] Hudson P., Postma E.: Choosing and using a neural net. In: Braspennig, P.J. et al. (Eds.), Artificial Neural Networks, An Introduction to ANN Theory and Practice. Lecture Notes in Computer Science, Springer, NY 1995.

- [3] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
- [4] Nair S.R., Panda T.: Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. *Bioproc. Eng.*, 1997, **16**, 169-173.
- [5] Najjar Y., Basheer I., Hajmeer, M.: Computational neural networks for predictive microbiology. I. Methodology. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, **34**, 27-49.
- [6] Nguyen D., Widrow B.: 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, 1990.
- [7] Poorna V., Kulkarni P. R.: Full factorial design to study fermentative production of inulinase using inulin from Kuth (*Saussurea lappa*) root powder by *A. niger* van Teighem UV11 mutant. *Biore-source Technology*, 1995, **54**, 117-121.
- [8] Shene C., Andrews B., Asenjo J. A.: Optimization of *Bacillus subtilis* fed-batch fermentation for the maximization of the synthesis of a recombinant β -1,4-endoglucanase. *Computer Applications in Biotechnology*, 1998, **7**, 219-223.
- [9] Vandame E.J., Derycke D.G.: Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1983, **29**, 139-176.
- [10] Yu-Dong Cai, Kuo-Chen Chou.: Using neural network for prediction of subcellular location of prokaryotic and eukaryotic proteins. *Molec. Cell Biol. Res. Communic.*, 2000, **4**, 172-173.

**THE PREDICTION OF RESULTS TO BE OBTAINED WHILE SIMULTANEOUSLY
PRODUCING THE INULINASE AND INVERTASE BY *ASPERGILLUS NIGER* AND
KLUYVEROMYCES MARXIANUS, WITH APPLICATION OF A NEURAL NETWORKS
TECHNIQUE**

S u m m a r y

The objective of this paper was to present how a neural networks technique could be applied to predict the outcomes of a simultaneous production of the inulinase and invertase by *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*, as well as to optimize the conditions of the said production using a batch shaken culture. The inputs of the network represented the quantities of individual components of the medium (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, yeast extract, inulin), the type of a microorganism, and the cultivation time, the temperature of enzymes biosynthesis, whereas the outputs represented: the activity of inulinase and the invertase.

In experiments with *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*, the content of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and inulin showed the highest effect on the final production result of the two enzymes. The NH_4NO_3 and the $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were the second important components of the medium. The content of $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and KH_2PO_4 had the lowest significant effect on the production of inulinase and invertase.

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