

مدل کردن و بهینه سازی سنتز آنزیمی کافئیک اسید فن اتیل استر با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی و الگوریتم ژنتیک

کبری خانزادی^۱، منصور غفاری مقدم^{۲*}، مصطفی خواجه^۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۰۳

چکیده

در این تحقیق، واکنش کافئیک اسید و ۲- فنیل اتانول در حضور لیپاز تثبیت شده از مخمر آنتارکتیکا (نوزیم ۴۳۵) به منظور تولید کافئیک اسید فن اتیل استر در سیستم ایزواکتان با استفاده از روش‌های شبکه عصبی مصنوعی و ژنتیک الگوریتم مدل سازی و بهینه گردید. بدین منظور از یک طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر با ۴ متغیر و ۵ سطح جهت مدل کردن واکنش آنزیمی به کمک شبکه عصبی مصنوعی استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل دما، زمان، نسبت مولی سابستریته‌ها و مقدار آنزیم بوده؛ در حالیکه درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به استر به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد. از الگوریتم لوبنرگ- مارکوارت جهت آموزش شبکه عصبی مصنوعی استفاده گردید. بنابراین ابتدا مدل سازی توسط شبکه عصبی مصنوعی و با کمک الگوریتم لوبنرگ- مارکوارت انجام گرفت. بهترین مدل شامل یک شبکه با ۴ ورودی، ۱۰ نورون در لایه مخفی و ۱ خروجی است (۱-۱-۴). پس از مدل سازی با شبکه عصبی مصنوعی، از الگوریتم ژنتیک جهت بهینه‌سازی مدل استفاده شد. شرایط بهینه عبارت بودند از: زمان ۶۰ ساعت، دما ۶۹ درجه سانتیگراد، نسبت مولی سابستریته‌ها ۷۳:۱ (کافئیک اسید: ۲- فنیل اتانول) و مقدار آنزیم ۳۲۲ PLU مقدار واقع و پیش‌بینی شده درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به استر در این شرایط به ترتیب ۹۸/۱۲ و ۱۰۰/۵۴ بودند.

واژه‌های کلیدی: مدل کردن، بهینه‌سازی، سنتز آنزیمی، کافئیک اسید، شبکه عصبی مصنوعی، ژنتیک الگوریتم

^۱. کارشناس ارشد شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل

^{۲*}. نویسنده‌ی مسئول: دانشیار شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل؛

Email: mansghaffari@uoz.ac.ir

^۳. استاد شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل

۱- مقدمه

ترکیبات فنلی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتوسیانین و ... می‌باشند که معمولاً در میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه و همچنین در سایر قسمت‌های گیاه دیده می‌شوند. این مواد کاربرد قابل توجهی در صنایع مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی آنها از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی دارند. ترکیبات فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند (لاکشمناشیتی^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). فنولیک اسیدها شامل کافئیک اسید، مشتقات سینامیک اسیدها هستند. کافئیک اسید با ساختار فنلی در بسیاری از محصولات غذایی شامل قهوه، میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود. فنولیک اسیدهای طبیعی حلالیت و پایداری کمی در حلال‌های مختلف از خود نشان می‌دهند. بنابراین افزایش حلالیت این ترکیبات می‌تواند باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها گردد. یکی از روش‌ها برای اصلاح این ترکیبات، استری کردن آنها با استفاده از الکل‌های آلیفاتیک است (چن^۲ و همکاران، ۲۰۱۰). پروپولیس یک محصول رزینی طبیعی است که توسط زنبور عسل از منابع گیاهی متفاوت جمع‌آوری می‌گردد. این محصول شامل ترکیبات شیمیایی متفاوتی است و خواص زیادی از جمله ضد باکتری و ضد سرطان دارد. کافئیک اسید فن اتیل استر^۳ یکی از ترکیبات اصلی پروپولیس است (چن و همکاران، ۲۰۱۰). این ترکیب می‌تواند از استری شدن آنزیمی کافئیک اسید با ۲- فنیل اتانول سنتز گردد. مهمترین مسئله در سنتز آنزیمی این ترکیب بهینه‌سازی و افزایش راندمان واکنش است.

شبکه عصبی مصنوعی^۴ (ANN) یک مدل بسیار ساده شده‌ای از ساختار شبکه بیولوژیکی می‌باشد (مندال^۵ و همکاران، ۲۰۰۹). عنصر پردازش اساسی یک شبکه عصبی مصنوعی نورون مصنوعی (و یا به سادگی یک نورون) است. از ویژگی‌های نورون‌های مصنوعی دریافت ورودی از منابع دیگر، ترکیب آنها، انجام یک عملیات غیرخطی و سپس خروجی

1. Lakshmanashetty & et al

2. Chen & et al

3. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)

4. Artificial Neural Network (ANN)

5. Mandal & et al

نتیجه نهایی می‌باشد (باس و بویاسی^۱، ۲۰۰۷). شبکه عصبی شامل شبکه‌ای از عناصر پردازش ساده (نورون‌ها) است، که می‌تواند رفتار پیچیده کلی تعیین شده‌ای از ارتباط بین عناصر پردازش و پارامترهای عنصر را نمایش دهد. منبع اصلی و الهام بخش برای این تکنیک، از آزمایش سیستم مرکزی عصبی و نورون‌ها نشأت گرفته است. در حالی که یک شبکه عصبی نباید به خودی خود سازگارپذیر باشد، استفاده عملی از آن بواسطه الگوریتم‌هایی امکان‌پذیر است، که جهت تغییر وزن ارتباطات در شبکه (به منظور تولید پاسخ مورد نظر) طراحی شده باشد. با استفاده از دانش برنامه نویسی رایانه می‌توان ساختار داده‌ای طراحی کرد که همانند یک نورون عمل نماید. سپس با ایجاد شبکه‌ای از این نورون‌های مصنوعی به هم پیوسته، ایجاد یک الگوریتم آموزشی برای شبکه و اعمال این الگوریتم به شبکه آن را آموزش داد. این شبکه‌ها برای تخمین و تقریب، کارایی بسیار بالایی از خود نشان داده‌اند. گستره کاربرد این مدل‌های ریاضی بر گرفته از عملکرد مغز انسان، بسیار وسیع می‌باشد که به عنوان چند نمونه کوچک می‌توان استفاده از این ابزار ریاضی در پردازش سیگنال‌های بیولوژیکی، مخابراتی و الکترونیکی تا کمک در نجوم و فضانوردی را نام برد (کاسابو^۲، ۱۹۹۸).

الگوریتم ژنتیک^۳ (GA) یک تکنیک بهینه‌سازی ترکیبی است که جستجو برای یک مقدار بهینه هدف توسط شبیه‌سازی فرآیند تکاملی بیولوژیکی بر اساس تابع مختلط تقاطع و جهش در ژنتیک می‌باشد. مقدار بهینه را به موازات با یک روش جستجوی چند نقطه می‌توان جستجو کرد (گلدبرگ^۴، ۱۹۸۹). از آنجایی که الگوریتم‌های ژنتیک برای هدایت عملیات جستجو به طرف نقطه بهینه از روش‌های آماری استفاده می‌کنند (در فرایندی که به انتخاب طبیعی وابسته است) جمعیت موجود به تناسب برازندگی افراد آن برای نسل بعد انتخاب می‌شوند. سپس عملگرهای ژنتیکی شامل انتخاب؛ پیوند (ترکیب)؛ جهش و دیگر عملگرهای احتمالی اعمال شده و جمعیت جدید به وجود می‌آید. پس از آن جمعیت جدید جایگزین جمعیت قبلی شده و این چرخه ادامه می‌یابد. هنگامی جستجو نتیجه بخش است که

¹. Bas & Boyaci

². Kasabov

³. Genetic Algorithm (GA)

⁴. Goldberg

به حداکثر نسل ممکن رسیده باشیم یا همگرایی حاصل شده باشد و یا معیارهای توقف برآورده شده باشد (میرزازاده و همکاران، ۲۰۰۸).

مطالعات متعددی در زمینه کاربرد شبکه‌های عصبی مصنوعی در سنتزهای آنزیمی انجام گرفته است. در اینجا به برخی از آنها اشاره می‌شود: فرناندس و رودریگس^۱ (۲۰۰۶) از شبکه عصبی مصنوعی به منظور بهینه‌سازی تولید پانوز به کمک آنزیم در یک بیج^۲ و فد-بیج^۳ استفاده کردند. نتایج بهینه‌سازی پانوز نشان داد که حداکثر راندمان وقتی است که فرآیند فد-بیج با غلظت اولیه ساکاروز $S_0 = 100$ میلی مول بر لیتر یک نسبت مالتوز به ساکاروز ۵/۵۸ و سرعت جریان ۳۰۰۰ (ساعت/لیتر) برای تولید ۳۵/۳ (لیتر در ساعت/گرم) پانوز انجام گردد که ۷۴ درصد بالاتر از تولید بدست آمده در فرآیند بیج بود. به طور مشابه، در مطالعه دیگری از شبکه عصبی مصنوعی برای پیش‌بینی راندمان سنتز آنزیمی دی آکتیل آدیپات استفاده شد (رحمن^۴ و همکاران، ۲۰۰۹). چهار متغیر ورودی دما، زمان، مقدار آنزیم، و نسبت مولی سوبسترا بودند. پس از ارزیابی سیستم‌های مختلف ANN، بهترین شبکه، از هفت نود در لایه مخفی با استفاده از یک تابع انتقال تانژانت سیگموئید تشکیل شد. ضریب همبستگی^۵ (R^2) و میانگین خطای مطلق^۶ (MAE) میان پاسخ‌های واقعی و پیش‌بینی شده ۰/۹۹۹۸ و ۰/۰۹۶۶ برای مجموعه آموزش ۰/۹۲۴۱ و ۱/۹۴۳۹ برای مجموعه ارزیابی تعیین گردید.

در تحقیق پیشرو، واکنش کافنیک اسید و ۲-فنیل اتانول در حضور آنزیم لپاز تثبیت شده از مخمر آنتارکتیکا^۷ (نووزیم ۴۳۵) به منظور تولید کافنیک اسید فن اتیل استر در حلال ایزواکتان به کمک روش‌های شبکه عصبی مصنوعی و ژنتیک الگوریتم مدل‌سازی و بهینه می‌گردد. از یک طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر^۸ با ۴ متغیر و ۵ سطح جهت مدل کردن واکنش آنزیمی استفاده خواهد شد. متغیرهای مستقل شامل دما، زمان، نسبت مولی سوبسترت-ها و مقدار آنزیم می‌باشند. درصد تبدیل کافنیک اسید به استر نیز به عنوان متغیر وابسته در نظر

1. Fernandes & Rodrigues

2. Batch

3. Fed-Batch

4. Rahman & et al

5. Correlation Coefficient

6. Mean Absolute Error (MAE)

7. Candida Antarctica

8. Central Composite Rotatable Design (CCRD)

گرفته می شود. از الگوریتم لونبرگ-مارکوارت جهت آموزش شبکه عصبی مصنوعی استفاده خواهد شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آنزیم

لیپاز تثبیت شده (تری آسیل گلیسرول هیدرولاز، EC 3.1.1.3، نووزیم ۴۳۵) از مخمر آنتارکتیکا بر روی رزین آکرلیک از شرکت ناوو نوردیکس (بگس ویرد، دانمارک) تهیه شد. فعالیت کاتالیزوری این آنزیم^۱ (PLU) ۷۰۰۰ بود که شامل ۲-۱ درصد وزنی-وزنی آب است.

۲-۲- مواد شیمیایی

کافنیک اسید و ۲- فنیل اتانول با خلوص ۹۹/۵ درصد از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) تهیه گردیدند. ایزواکتان به عنوان حلال محصول کمپانی Tedia (Fairfield, OH, USA) بود. غربال ملکولی^۲ ۴ آنگسترم از شرکت شیمیایی Davison (Baltimore, MD, USA) بدست آمد. همه مواد شیمیایی دیگر با درجه آنالیتیکال بودند.

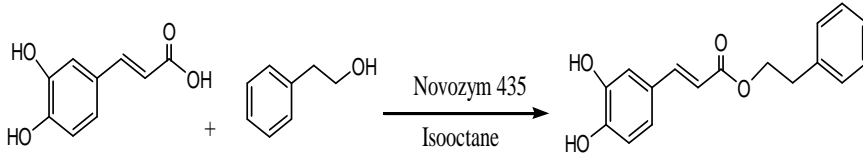
۲-۳- سنتز آنزیمی کافنیک اسید فن اتیل استر

قبل از استفاده، همه مواد به مدت ۲۴ ساعت توسط غربال ملکولی^۴ آنگسترم آزدایی می گردند. جهت سنتز آنزیمی کافنیک اسید فن اتیل استر، کافنیک اسید و ۲- فنیل اتانول با نسبت های مولی متفاوت (۱:۹۰:۱) با نووزیم ۴۳۵ (PLU ۵۰۰-۱۰۰) در ایزواکتان در دماهای (۷۰-۳۰) درجه سانتیگراد و در یک حمام آب که به شکل اوربیتالی هم می خورد (۱۸۰ دور در دقیقه) قرار داده می شود. محلول ها در زمان های متفاوت (۷۲-۲۴ ساعت) به خوبی مخلوط می گردد. پس از آن محلول ها جهت آنالیز به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۳ HPLC تزریق می گردند. شکل ۱ واکنش آنزیمی مورد استفاده در واکنش را نشان می دهد (چن و همکاران، ۲۰۱۰).

¹ Propyl Laurate Units/g (PLU)

² Molecular Sieve

³ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



Caffeic acid (CE) + 2-Phenylethanol (PE) → Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)

شکل ۱. استری شدن مستقیم کافئیک اسید با ۲-فنیل اتانول به کمک آنزیم لیپاز (نووزیم ۴۳۵) در حلال ایزواکتان

۲-۴- تعیین مقدار کافئیک اسید فن اتیل استر به کمک HPLC

۵۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر به داخل یک دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC Hewlett-Packard ۱۱۰۰ Series, USA) مجهز به یک ستون موئینه C_{18} (۲۵۰ mm × ۴/۶ mm, Agilent, USA) تزریق شد. شستشو با استفاده از تری فلورو استیک اسید ۰/۱ درصد در استونیتریل و آب انجام شد. سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و نمونه در ۳۴۵ نانومتر توسط آشکارساز UV شناسایی می‌گردد. درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به استر مربوطه به صورت زیر محاسبه می‌گردد:

$$\text{درصد تبدیل مولی} = \frac{\text{میلی مول استر}}{\text{میلی مول کافئیک اسید}} \times 100 \quad (1)$$

۲-۵- مجموعه داده‌ها

داده‌ها شامل ۳۰ آزمایش بر اساس طرح CCRD با شش نقطه مرکزی از کار چن و همکاران (۲۰۱۰) اقتباس گردیده است. نقاط مرکزی به صورت میانگین در نظر گرفته می‌شود. بنابراین کل داده‌ها شامل ۲۵ آزمایش می‌باشد. این داده‌ها به طور تصادفی به سه دسته تقسیم شدند: ۱۹، ۳ و ۳ که به ترتیب به عنوان داده‌های آموزش^۱، ارزیابی^۲ و تست^۳ استفاده شدند. داده‌های آموزش برای محاسبه پارامترهای شبکه مورد استفاده قرار می‌گیرند. داده‌های اعتبار سنجی برای اطمینان از کیفیت پارامترهای شبکه استفاده می‌گردند. اگر یک شبکه به کمک داده‌های آموزش خیلی خوب آموزش نبیند ممکن است برای بقیه داده‌ها مناسب نباشد. برای جلوگیری از پدیده "Overfitting"، داده‌های ارزیابی جهت کنترل خطا مورد استفاده قرار می‌گیرند، بدین صورت که وقتی پدیده "Overfitting" افزایش یابد، آموزش متوقف می‌-

1. Learning
2. Validation
3. Testing

شود (سانگ^۱ و همکاران، ۲۰۰۴). داده‌های تست برای ارزیابی توانایی پیش‌بینی مدل‌های ایجاد شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. داده‌های تجربی مورد استفاده جهت ساخت مدل ANN در جدول ۱ ارائه شده است.

۲-۶- شبکه عصبی مصنوعی (ANN)

در این کار، از نرم افزار متلب^۲ (Version 7.12, Mathworks, Natick, MA) برای پیش بینی درصد مولی کافنیک اسید به استر در واکنش آنزیمی استفاده شده است. از یک پرسپترون چند لایه^۳ (MLP) بر اساس شبکه عصبی رو به جلو برای ساخت مدل استفاده می‌گردد. این شبکه شامل یک لایه ورودی، لایه پنهان و یک لایه خروجی است. ورودی برای شبکه شامل زمان، دما، نسبت مولی و مقدار آنزیم است؛ خروجی درصد تبدیل مولی کافنیک اسید به استر می‌باشد. شبکه‌های عصبی با کمترین خطای میانگین مربع^۴ (MSE) و بیشترین ارزش ضریب همبستگی (R²) به عنوان مدل خوب انتخاب می‌شود (آکسوی و داهامشه^۵، ۲۰۰۹).

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - Y_{di})^2}{N} \quad (2)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{di})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{di} - y_m)^2} \quad (3)$$

y_i مقدار پیش‌بینی شده توسط شبکه عصبی مصنوعی، y_{di} مقدار واقعی، y_m میانگین مقادیر واقعی و N فراوانی داده‌ها می‌باشد (خواجه، ۲۰۱۲). پردازش توزیعی اطلاعات، حساسیت شبکه را به وجود خطا کاهش می‌دهد. به دلیل اینکه تعداد زیادی نورون در یک زمان درگیر فعالیت هستند سهم هر یک از نورون‌ها چندان حائز اهمیت نیست، بنابراین وجود خطا در یکی از آنها و نتیجه‌ی آن تاثیر چندانی بر روی سایر واحدهای محاسباتی ندارد (میثاقی و محمدی، ۱۳۸۱). سیگنال خروجی نورون، O می‌باشد که با معادله زیر شناخته می‌شود:

¹. Song & et al

². MATLAB

³. Multi Layer Perceptron (MLP)

⁴. Mean Squared Error (MSE)

⁵. Aksoy & Dahamsheh

$$O = f(\text{net}) = f(\sum_{j=1}^n w_j x_j) \quad (۴)$$

که در آن w_j فاکتور وزن و $f(\text{net})$ تابع انتقال می‌باشد. توابع انتقالی که بیشتر برای حل مشکلات رگرسیون خطی و غیر خطی استفاده می‌شوند، تابع انتقال سیگموئید^۱، تابع انتقال تانژانت سیگموئید هایپربولیک^۲ و تابع انتقال خطی^۳ می‌باشند (خاییت و کوجاکارو^۴، ۲۰۱۲). در این کار، Tansig به عنوان تابع انتقال بین لایه‌های ورودی و پنهان، و Purelin به عنوان تابع انتقال بین لایه‌های پنهان و خروجی، که توسط معادلات زیر نشان داده شده است مورد استفاده قرار گرفتند:

$$\text{Tansig}(\text{sum}) = \frac{1 - \exp(-\text{sum})}{1 + \exp(-\text{sum})} \quad (۵)$$

$$\text{Purelin}(\text{sum}) = \text{sum} \quad (۶)$$

الگوریتم BP تنوع بسیاری برای آموزش شبکه‌های عصبی دارد. در طول مرحله آموزش وزن (w) و بایاس‌ها (b) به روش لونبرگ مارکوارت (LM)، تکرار و بروز رسانی شده تا همگرایی به مقدار خاص بدست آید (ظفر^۵ و همکاران، ۲۰۱۲). وارد کردن داده‌ها به صورت خام باعث کاهش سرعت و دقت شبکه می‌شود. از این رو برای جلوگیری از اشباع زود هنگام نورون‌ها و یکسان سازی ارزش داده‌ها برای شبکه، بایستی ورودی خالص آنها در محدوده تابع سیگموئید قرار گیرد. این کار مانع از کوچک شدن بیش از حد وزن‌ها شده و از اشباع زود هنگام نورون‌ها جلوگیری می‌کند (کوچک‌زاده و بهمنی، ۱۳۸۴).

1. Logsig
 2. Tansig
 3. Purelin
 4. Khayet & Cojocar
 5. Zafar & et al

جدول ۱. داده‌های تجربی (آموزش، ارزیابی و تست)، مقادیر واقعی و پیش بینی شده درصد تبدیل مولی کافنیک اسید به استر در مدل سازی به کمک شبکه عصبی مصنوعی

آزمایش	زمان (ساعت)	دما (درجه سانتیگراد)	نسبت مولی (PE/CA) ^a	مقدار آنزیم (PLU)	تبدیل مولی (درصد)	
					مقدار واقعی	مقدار پیش بینی شده توسط ANN
Training						
۱	۳۶	۴۰	۳۰	۴۰۰	۱۴/۹۱	۱۵/۲۸۰۵۶
۲	۳۶	۴۰	۷۰	۲۰۰	۱۴/۰۷	۱۴/۰۴۴۲
۳	۳۶	۶۰	۳۰	۲۰۰	۲۷/۳۷	۲۷/۹۲۶۳
۴	۳۶	۶۰	۷۰	۴۰۰	۵۵/۷۳	۵۵/۶۹۰۲
۵	۶۰	۴۰	۷۰	۴۰۰	۳۱/۷۷	۳۱/۶۵۳۵
۶	۶۰	۶۰	۷۰	۲۰۰	۶۱/۳۵	۶۱/۱۱۳۳
۷	۳۶	۴۰	۳۰	۲۰۰	۱۱/۷۷	۱۰/۹۰۳۵
۸	۳۶	۶۰	۳۰	۴۰۰	۴۳/۰۱	۴۲/۹۰۴۹
۹	۳۶	۶۰	۷۰	۲۰۰	۴۲/۳۳	۴۲/۷۲۶۶
۱۰	۶۰	۴۰	۳۰	۴۰۰	۲۵/۰۳	۲۵/۰۸۹۸
۱۱	۶۰	۴۰	۷۰	۲۰۰	۲۱/۲۴	۱۹/۰۸۴۰
۱۲	۶۰	۶۰	۳۰	۲۰۰	۴۴/۰۶	۴۳/۴۶۰۴
۱۳	۶۰	۶۰	۷۰	۴۰۰	۷۸/۷۶	۷۸/۱۷۱۳
۱۴	۲۴	۵۰	۵۰	۳۰۰	۲۰/۹۷	۲۱/۰۷۳۵
۱۵	۴۸	۷۰	۵۰	۳۰۰	۶۳/۵۵	۶۳/۶۸۵۰
۱۶	۴۸	۵۰	۱۰	۳۰۰	۰۷/۲۵	۷/۷۷۹۹
۱۷	۴۸	۵۰	۹۰	۳۰۰	۴۵/۶۳	۴۵/۳۶۵۶
۱۸	۴۸	۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۹/۰۸	۱۹/۴۴۹۹
۱۹	۴۸	۵۰	۵۰	۳۰۰	۳۶/۷۳	۳۵/۹۲۲۱
Validation						
۲۰	۴۸	۵۰	۵۰	۵۰۰	۳۷/۵۵	۳۲/۹۷۵۷
۲۱	۳۶	۴۰	۷۰	۴۰۰	۱۹/۲۸	۱۸/۷۰۰۳
۲۲	۶۰	۶۰	۳۰	۴۰۰	۴۱/۵۵	۳۸/۲۱۱۳
Testing						
۲۳	۶۰	۴۰	۳۰	۲۰۰	۱۳/۷۵	۱۶/۹۹۷۳
۲۴	۷۲	۵۰	۵۰	۳۰۰	۴۳/۹۴	۴۲/۷۴۶۳
۲۵	۴۸	۳۰	۵۰	۳۰۰	۰۷/۸۱	۰۷/۹۹۸۳

^a PE:2-Phenylethanol; CA: Caffeic Acid

در گام اول تمامی ورودی‌ها و خروجی‌ها در طیف یکنواخت ۰-۱ با توجه به معادله زیر نرمال می‌شوند (کومار^۱ و همکاران، ۲۰۰۲):

$$x_{\text{norm}} = \frac{(x - x_{\text{min}})}{(x_{\text{max}} - x_{\text{min}})} \quad (7)$$

که x متغیر، x_{max} بزرگترین مقدار و x_{min} کوچکترین مقدار است (خواجه و همکاران، ۲۰۱۳). در صورتیکه اطلاعات استفاده شده در شبکه عصبی به یک حدود مناسب مقیاس بندی نگردد، شبکه هنگام یادگیری به یک نقطه همگرا نخواهد شد، یا نتایج معنی داری نخواهد داد (خاییت و کوجاکارو، ۲۰۱۲).

۲-۷- الگوریتم ژنتیک

زمانی که مدل ANN آماده شد متغیرهای ورودی آن با استفاده از الگوریتم ژنتیک بهینه‌سازی می‌شوند. بهینه‌سازی با الگوریتم ژنتیک شامل چند مرحله می‌باشد. آغاز: جمعیت n کروموزومی به صورت تصادفی ایجاد می‌شود (راه حل‌های مناسب مسأله) که شامل دو مرحله می‌باشد:

۱- ارزش گذاری: برازندگی $f(x)$ هر کروموزوم X در جمعیت ارزیابی می‌شود.

۲- جمعیت جدید: جمعیت جدیدی تشکیل شده و مراحل زیر را تکرار کرده تا جمعیت جدید کامل شود:

انتخاب: دو کروموزوم (والدین) را با توجه به برازندگی آنها از میان جمعیت انتخاب می‌شود (هر چه برازندگی بیشتر باشد شانس انتخاب بیشتر است).

ترکیب: با توجه به احتمال ترکیب شدن، والدین برای تشکیل فرزندان جدید با هم ترکیب شده و با توجه به احتمال جهش، فرزندان در هر لوکاس (موقعیت در کروموزوم) مورد جهش قرار می‌گیرد.

پذیرفتن: فرزندان جدید را در جمعیت جدید گذاشته و جمعیت جدید ایجاد شده را برای روند الگوریتم بکار می‌بریم. کل فرآیند همچنان ادامه می‌یابد تا زمانی که نتایج مناسب بدست آید (میرزازاده و همکاران، ۲۰۰۸).

¹. Kumar & et al

۳- نتایج و بحث

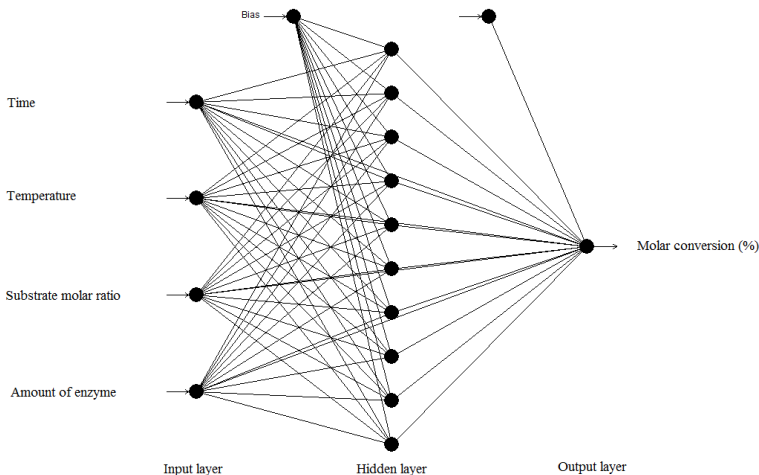
۳-۱- مدل سازی با استفاده از ANN

برای تعیین پیش بینی درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به استر از یک شبکه جلو رونده با روال تعلیم انتشار به عقب^۱ (FFBP) استفاده گردید. این شبکه عصبی شامل لایه های ورودی، پنهان و خروجی است. ورودی برای شبکه شامل ۴ متغیر مستقل یعنی دما، زمان، نسبت مولی ساپستریت و مقدار آزیم و خروجی آن درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به کافئیک فن اتیل- استر است. ۲۵ داده آزمایش بطور تصادفی به سه دسته تقسیم شدند: ۷۶ درصد برای مجموعه آموزشی، ۱۲ درصد برای مجموعه ارزیابی و ۱۲ درصد برای مجموعه تست (جدول ۱). توپولوژی یا ساختار شبکه نقش مهمی در نتایج پیش بینی شده دارد. تعداد نورون های ورودی و خروجی با تعداد داده های ورودی و خروجی برابر است. با این حال، تعدادی از نورون ها در لایه پنهان با چند بار آموزش شبکه عصبی از توپولوژی های مختلف شناسایی شد و بر اساس به حداقل رساندن MSE یک مقدار بهینه انتخاب می گردد. نورون های لایه مخفی از توابع تبدیل تانژانت سیگموئید و نورون های لایه خروجی از توابع تبدیل خطی به منظور تابع انتقال استفاده می کنند. از الگوریتم های LM برای به هنگام سازی وزن های شبکه عصبی مصنوعی استفاده شد. این الگوریتم یکی از الگوریتم های پر کاربرد می باشد زیرا آموزش شبکه را بسیار سریع انجام داده و سطح خطای موجود را حداقل می سازد. در این مطالعه ساختار بهینه مدل ANN ایجاد شده شامل ۴ ورودی، یک لایه پنهان با ۱۰ نورون و یک لایه خروجی بود (شکل ۲). مقادیر پیش بینی شده با استفاده از مدل بهینه در جدول ۱ ارائه شده است. شکل ۳ ارزیابی MSE در مرحله آموزش را با استفاده از الگوریتم LM نشان می دهد. بر اساس این شکل فرآیند آموزش در نظر گرفته شده بصورت رضایت بخش خاتمه یافته است. در شکل ۴ مقادیر پیش بینی شده درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به استر با استفاده از مدل ANN و الگوریتم LM در مقابل داده های واقعی برای مجموعه های آموزش، ارزیابی، تست و همچنین کل داده ها نشان داده شده است. بر اساس این اشکال نتایج همبستگی خوبی بین مقادیر پیش- بینی شده و واقعی مشاهده می شود.

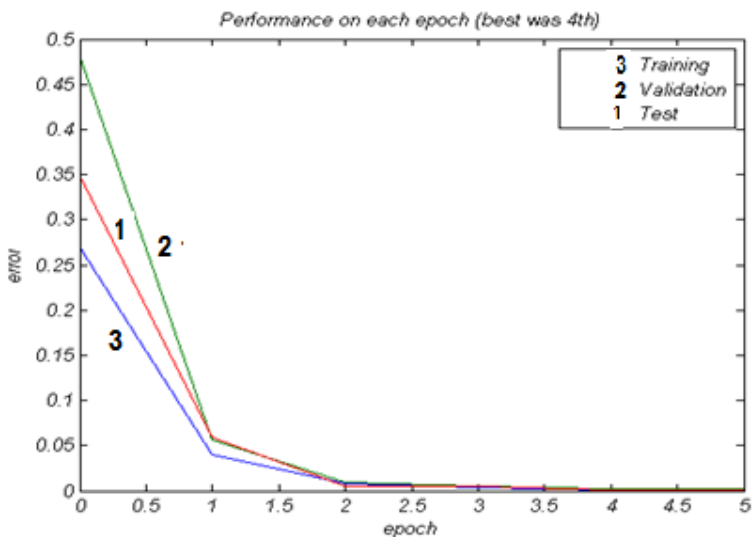
¹. Feed Forward Back Propagation (FFBP)

۳-۲- آنالیز حساسیت

جهت تعیین میزان اثر هر پارامتر ورودی از نظر مقدار بر روی نتایج مدل‌های شبکه عصبی و نیز تشخیص بهترین ترکیبات ورودی از آنالیز حساسیت استفاده می‌شود. در این تحقیق عملکرد چهار گروه (یک، دو، سه و چهار) متغیر به وسیله‌ی مدل بهینه ANN با استفاده از الگوریتم LM با ۱۰ نورون در لایه پنهان مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای ورودی بصورت زیر تعریف می‌شوند: زمان: P_۱، دما: P_۲، نسبت مولی: P_۳ و مقدار آنزیم: P_۴. نتایج در جدول ۲ خلاصه شده است. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که P_۲ به دلیل MSE پایین (۰/۰۵۷۲۹) به عنوان موثرترین پارامتر در گروه یک متغیرها می‌باشد. همچنین مقدار MSE به طور قابل توجهی کاهش یافته زمانی که P_۲ در تعامل با سایر متغیرها در گروه‌های دیگر مورد استفاده قرار گرفت. حداقل مقدار MSE در گروه دو با تعامل بیشتر P_۲ ۰/۰۱۰۰۸۹ تعیین شد. حداقل مقدار MSE در گروه سه با استفاده از تعامل P_۱ + P_۲ + P_۳ ۰/۰۰۴۹۲۵۹ بود. زمانی که P_۴ در تعامل با سایر متغیرها در گروه چهار مورد استفاده قرار گرفت مقدار MSE از ۰/۰۰۴۹۲۵۹ تا ۰/۰۰۰۴۰ کاهش یافت.



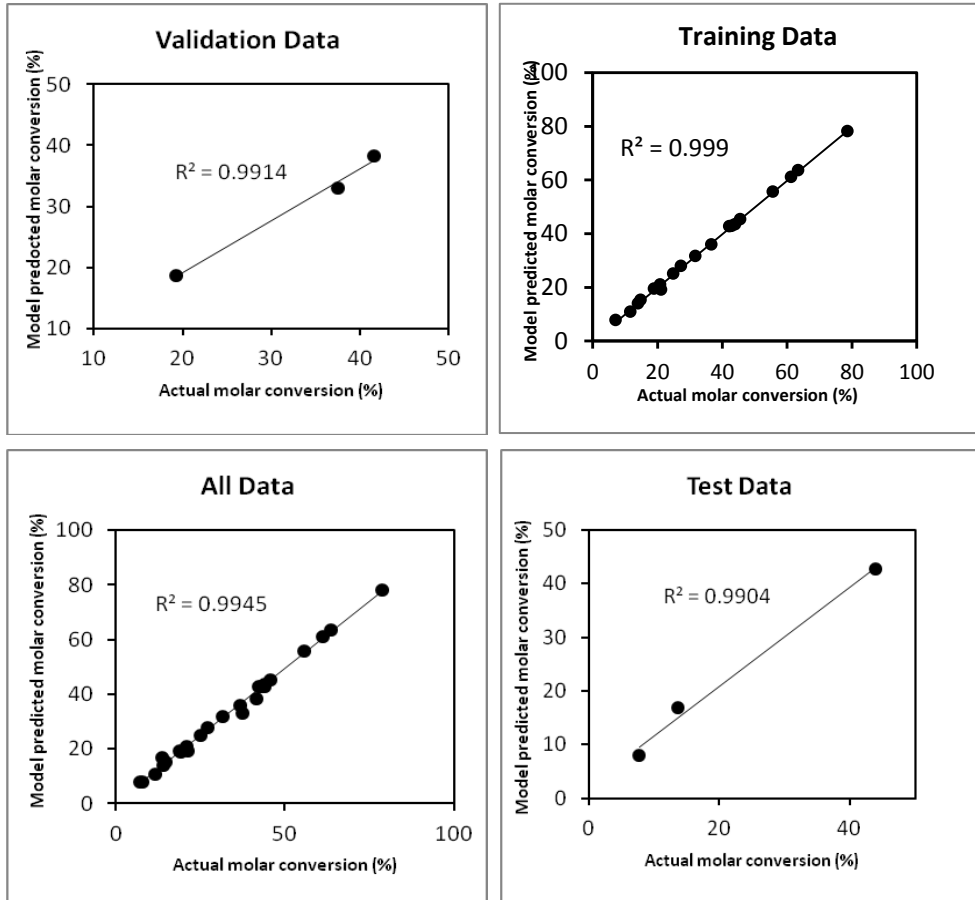
شکل ۲. ساختار بهینه بدست آمده از مدل آموزش دیده ANN با استفاده از الگوریتم LM شامل ۴ ورودی، یک لایه مخفی با ۱۰ نورون و یک خروجی



شکل ۳. میانگین مربعات خطای آموزشی، ارزیابی و تست برای الگوریتم LM

۳-۳- بهینه سازی به کمک GA

از الگوریتم ژنتیک (GA) به منظور بهینه سازی ورودی های مدل ANN با هدف دستیابی به مقدار بهینه درصد تبدیل مولی کافنیک اسید به استر در واکنش آزیمی استفاده شد. اندازه جمعیت به کار رفته در این تحقیق ۱۰، احتمال تقاطع ۰/۸ و احتمال جهش ۰/۵ می باشد. شرایط بهینه پس از ارزیابی روش الگوریتم ژنتیک برای ۲۰ تکرار برای رسیدن به بهترین مقدار درصد تبدیل مولی انتخاب شده است. شرایط بهینه پس از اجرای الگوریتم ژنتیک با استفاده از بهترین مدل ANN عبارتند از: زمان ۶۰ ساعت، دما ۶۹ درجه سانتیگراد، نسبت مولی ۱:۷۳ (کافنیک اسید:۲- فنیل اتانول) و مقدار آنزیم PLU ۰.۳۳۲. مقدار پیش بینی شده تحت این شرایط ۹۸/۱۲ درصد بود. پس از بدست آوردن مقدار واقعی خطای حاصل ۲/۴۲ درصد گزارش گردید.



شکل ۴. نتایج داده‌های پیش بینی شده در برابر داده‌های واقعی برای داده‌های آموزش^۱، داده‌های ارزیابی^۲، داده‌های تست^۳، کل داده‌ها^۴

1. Training Data
2. Validation Data
3. Test Data
4. All Data

جدول ۲. ارزیابی عملکرد اثرات متقابل متغیرهای ورودی برای الگوریتم LM با ۱۰ نوروں در لایه پنهان برای آنالیز حساسیت

No	Interaction	MSE	R ²	IN ^a	Gradient	BLE ^b
Group of one variables						
۱	P _۱	۰/۱۰۵۲۰۰	۰/۰۷۵۴۰۸۰	۳	$۸/۴۳ \times ۱۰^{-۱۰}$	$Y = ۰/۱۳X + ۰/۳۴$
۲	P _۲	۰/۰۸۵۷۲۹	۰/۵۶۱۳۹۱	۱	$۸/۸۸ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۶۷X + ۰/۱۱$
۳	P _۳	۰/۰۸۹۶۳۲	۰/۱۶۰۴۱۶	۳	$۶/۴۷ \times ۱۰^{-۱۰}$	$Y = ۰/۲X + ۰/۳۴$
۴	P _۴	۰/۱۲۷۴۴۴	۰/۰۵۹۵۷۰	۱	$۷/۱۶ \times ۱۰^{-۱۱}$	$Y = ۰/۰۶۴X + ۰/۳۴$
Group of two variables						
۵	P _۱ +P _۲	۰/۰۱۰۰۸۹	۰/۶۵۷۶۴	۱	$۱/۹۶ \times ۱۰^{-۱۰}$	$Y = ۰/۸۲X + ۰/۰۵$
۶	P _۱ +P _۳	۰/۱۱۴۸۹۰	۰/۰۵۵۷۵۳	۳	$۹/۸ \times ۱۰^{-۸}$	$Y = ۰/۱۳X + ۰/۳$
۷	P _۱ +P _۴	۰/۰۸۹۲۸۴	۰/۰۳۷۰۱۴	۲	$۲/۴۷ \times ۱۰^{-۸}$	$Y = ۰/۱۴X + ۰/۳۴$
۸	P _۲ +P _۳	۰/۰۲۲۴۱۸	۰/۶۲۷۶۶	۳	$۱/۳۴ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۶۶X + ۰/۱۴$
۹	P _۲ +P _۴	۰/۰۴۵۳۲۲	۰/۶۳۴۵۵۶	۱	$۱/۳۵ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۷X + ۰/۱۳$
۱۰	P _۳ +P _۴	۰/۰۹۳۷۵۹	۰/۰۶۹۳۴۳	۳	$۹/۹۴ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۱۳X + ۰/۲۶$
Group of three variables						
۱۱	P _۱ +P _۲ +P _۳	۰/۰۰۴۹۲۵۹	۰/۸۴۴۲۱۲	۴	$۱/۵۲ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۷۷X + ۰/۰۹۹$
۱۲	P _۱ +P _۲ +P _۴	۰/۰۶۰۵۶۵	۰/۲۱۲۰۷۹	۱	$۲/۰۰ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۴۲X + ۰/۰۵$
۱۳	P _۱ +P _۳ +P _۴	۰/۱۱۳۲۰۰	۰/۱۶۹۷۲۸	۲	$۱/۵۱ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۴۲X + ۰/۱۸$
۱۴	P _۲ +P _۳ +P _۴	۰/۰۲۷۶۸۹	۰/۸۲۵۵۷۲	۲	$۳/۰۴ \times ۱۰^{-۶}$	$Y = ۰/۹X + ۰/۴۴$
Group of four variables						
۱۵	P _۱ +P _۲ +P _۳ +P _۴	۰/۰۰۰۴۰۰	۰/۹۹۴۵۰۰	۴	$۱/۰۸ \times ۱۰^{-۱۰}$	$Y = ۰/۹۸X + ۰/۱۹$

^aIteration Number (IN) ; ^bBest Linear Equation (BLE)

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از هیبرید روش شبکه عصبی مصنوعی و الگوریتم ژنتیک (ANN-GA) جهت مدل‌سازی و بهینه‌کردن واکنش آنزیمی کافئیک اسید و ۲- فنیل اتانول به کمک نووزیم ۴۳۵ استفاده شد. داده‌های ورودی شامل زمان، دما، نسبت مولی ۲- فنیل اتانول به کافئیک اسید و مقدار آنزیم؛ و داده خروجی درصد تبدیل مولی کافئیک اسید به استر است. بنابراین ابتدا از الگوریتم لونبرگ-مارکوارت جهت ساخت بهترین مدل شبکه عصبی مصنوعی استفاده گردید. بهترین شبکه شامل یک لایه ورودی با ۴ نورون، یک لایه مخفی با ۱۰ نورون و یک لایه خروجی با یک نورون است. نتایج آنالیز حساسیت نشان داد که پارامتر دما به دلیل MSE پایین به عنوان موثرترین پارامتر در گروه یک متغیرها می‌باشد. در ادامه این تحقیق، مدل توسعه یافته شبکه عصبی مصنوعی با استفاده از الگوریتم ژنتیک بهینه می‌گردد. شرایط بهینه واکنش آنزیمی عبارتند از: زمان ۶۰ ساعت، دما ۶۹ درجه سانتیگراد، نسبت مولی ۷۳:۱ (کافئیک اسید: ۲- فنیل اتانول) و مقدار آنزیم ۳۳۲ PLU. مقدار واقعی و پیش‌بینی شده تحت این شرایط به ترتیب ۱۰۰/۵۴ و ۹۸/۱۲ درصد بود.

منابع

- میثاقتی، فرهاد و محمدی، کوروش. (۱۳۸۱). شبیه سازی بارش-رواناب و روندیابی در رودخانه با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی. ششمین سمینار بین‌المللی مهندسی رودخانه، دانشگاه شهید چمران اهواز.
- کوچک زاده، مهدی؛ بهمنی، عارف. (۱۳۸۴). ارزیابی عملکرد شبکه های عصبی مصنوعی در کاهش پارامترهای مورد نیاز، جهت برآورد تبخیر و تعرق. *مجله علوم کشاورزی*، ۴: ۹۶-۸۷.
- Aksoy, H. and Dahamshed, A. (2009). Artificial neural network models for forecasting monthly precipitation in Jordan. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, 23: 917-931.
- Bas, D. and H. Boyaci, I. (2007). Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction, *Journal of Food Engineering*, 78: 846-854.
- Chen, H.C., Ju, H.Y., Twu, Y.K., Chen, J.H., J. Chang, C.M., Liu, Y.C., Chang, C. and Shieh, C.J. (2010). Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM, *New Biotechnology*, 27: 89-93
- Fernandes, F.A.N. and Rodrigues, S. (2006). Optimization of panose production by enzymatic synthesis using neural networks, *Process Biochemistry*, 41: 1090-1096.
- Goldberg, D.E. (1989). *Genetic algorithms in search, optimization, and machine learning*; New York: Addison-Wesley.
- Kasabov, N.K. (1998). *Foundations of Neural Networks, Fuzzy Systems, and Knowledge Engineering*; The MIT Press.
- Khajeh, M., Ghaffari-Moghadam, M. and Shakeri, M. (2012). Application of artificial neural network in predicting the extraction yield of essential oils of *Diplotaenia cachrydifolia* by supercritical fluid extraction, *Journal of Supercritical Fluid*, 69: 91-96.
- Khajeh, M., Kaykhahi, M. and Sharafi, A. (2013). Application of PSO-artificial neural network and response surface methodology for removal of methylene blue using silver nanoparticles from water samples, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 5: 1624-1630.
- Khayet, M. and C. Cojocar. (2012). Artificial neural network modeling and optimization of desalination by air gap membrane distillation, *Separation and Purification Technology*, 86:171-182.
- Kumar, M., Raghuvanshi, N.S., Singh, R., Wallender, W.W.W, and Pruitt, W.O. (2002). Estimating evapotranspiration using artificial neural network, *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 128: 224-233.
- Lakshmanashetty, H.R., B. Nagaraj, V., G. Hiremath, M. and Kumar, V. (2010). In vitro antioxidant activity of *Vitex negundo* L. Leaf extracts, *Chiang Mai Journal of Science*, 37: 489-497.
- Mandal, S., Sivaprasad, P.V., Venugopal, S. and Murthy, K.P.N. (2009). Artificial neural network modeling to evaluate and predict the deformation

- behavior of stainless steel type AISI 304L during hot torsion, *Applied Soft Computing*, 9: 237-244.
- Mirzazadeh, T., Mohammadi, F., Soltanieh, M. and Joudaki, E. (2008). Optimization of caustic current efficiency in a zero-gap advanced chlor-alkali cell with application of genetic algorithm assisted by artificial neural networks, *Chemical Engineering Journal*, 140:157-16
- Rahman, A., Basyaruddin, M., Chaibakhsh, N., Basri, M., Salleh, A.B. and A. Rahman, R.N.Z.R. (2009). Application of artificial neural network for yield prediction of lipase-catalyzed synthesis of dioctyl adipate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158: 722-735.
- Song, X., Mitnitski, A., MacKnight, C. and Rockwood, K. (2004). Assessment of individual risk of death using self-report data: an artificial neural network compared with a frailty index, *Journal of the American Geriatrics Society*, 52:1180-1184.
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S. and K. Dhiman, K. (2012). Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1: 70-79.