



عاقلان نقطه پرگار وجودند ولی

عشق داند که درین دایره سرگردانند





# تعیین عوامل مؤثر در محیط کشت تولید بیوسورفکتانت

دانشجو:

سرور جوان

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد  
در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

استاد راهنما:

دکتر فرشته نعیم پور

امرداد ماه 1387

برای

پدر و مادر عزیزم،

برادر همسر بانی همسر سان،

خواهر نازنینم همسر او،

و

تمام آنهایی که دوستشان دارم...

و برای...

لحظه‌هایی که جاودانه شدند در قاب خاطره

با سپاس از

استاد بزرگوارم، دکتر فرشته نعیم پور،

برادر عزیزم، مهندس مهران جوان،

مهندس مصیبه ذوالفقاری

و

مهندس احسان معتمدیان

که به خاطر تمام لحظه‌هایی که برایم صرفه کردند،

به خاطر تمام راهنمایی‌های مهربانانه‌شان،

به خاطر تمام آنچه به من آموختند،

و به خاطر تمام خوبیهایشان

همیشه سپاسگزارشان خواهم بود.

سرور جوان

# چکیده

سورفکتانت‌ها از جمله مواد فعال سطحی هستند. خصوصیت منحصر به فرد این مواد در کاهش کشش سطحی و افزایش امولسیفیکاسیون مواد غیر محلول در آب باعث کاربردهای زیاد این مواد در صنایع غذایی، صنایع شوینده‌ها، صنایع وابسته به نفت، محیط زیست و ... شده است. مواد فعال سطحی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها به بیوسورفکتانت‌ها معروفند. زیست تجزیه‌پذیر بودن این مواد، سمیت کمتر، قابلیت تولید از مواد ارزان قیمت و ... از مهمترین مزیت‌های بیوسورفکتانت‌ها نسبت به نمونه‌های شیمیایی است. با وجود چنین مزایای مهمی، به دلیل هزینه‌های تولیدی نسبتاً بالا هنوز از بیوسورفکتانت‌ها به طور گسترده در صنعت استفاده نشده است. یک روش ممکن برای کاهش هزینه‌ها، فراهم نمودن محیط‌هایی با ترکیب بهینه اجزا و یا استفاده از سوبستراهای جایگزینی همچون ضایعات کشت و صنعت می باشد. در این مطالعه، بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت با هدف افزایش تولید بیوسورفکتانت توسط *Bacillus subtilis* ATCC 6633 انجام گرفته است. در ابتدا با استفاده از روش طراحی آزمایش فاکتوریل کسری غلظت هشت جزء تشکیل دهنده محیط کشت ( $Fe^{+2}$ ,  $K^{+1}$ ,  $Na^{+1}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ، نیترات و گلوکز) در دو سطح مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نتایج، نشان‌دهنده بیشترین میزان تاثیر، به ترتیب برای پنج فاکتور اول می‌باشد. با استفاده از این پنج فاکتور، آزمایش‌های طرح ترکیب مرکزی اجرا و مشاهده گردید که ترمهای درجه اول مربوط به غلظت‌های  $Fe^{+2}$ ،  $K^{+1}$  و ترمهای متقاطع مربوط به  $Fe^{+2}$ ،  $Na^{+1}$  و  $Fe^{+2}$ ،  $Mg^{+2}$  و  $K^{+1}$ ،  $Na^{+1}$  و  $K^{+1}$ ،  $Ca^{+2}$  و  $Na^{+1}$  و  $Ca^{+2}$  دارای اثر معنادار بر تولید بیوسورفکتانت می‌باشند. با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از روش سطح پاسخ، میزان سورفکتین نسبت به حالت کنترل 1.5 برابر افزایش یافت. با توجه به پیچیدگی روابط متقابل میان فاکتورهای محیط کشت، سیستم با شبکه عصبی مدلسازی شد و سپس با استفاده از روش الگوریتم ژنتیک، بهینه‌سازی محیط کشت انجام گرفت. ورودی‌ها و خروجی شبکه همان ورودی و خروجی مدل سطح پاسخ هستند. تعداد نورونها در لایه ورودی 5 نورون و در لایه خروجی 1 نورون بوده و در لایه میانی با سعی و خطا 12 نورون به دست می‌آید. مدل بدست آمده از شبکه عصبی مصنوعی در مقایسه با مدل سطح پاسخ دارای ضریب تعیین ( $R^2$ ) بالاتری است. بنابراین مدل شبکه عصبی در مقایسه با مدل رگرسیون قوی‌تر است (0.9455 در مقابل 0.746). روش الگوریتم ژنتیک نیز در مقایسه با روش‌های سطح پاسخ بهتر عمل کرده و نتایج قابل اعتماد و بهتری را ارائه می‌کند. با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از روش الگوریتم ژنتیک، میزان سورفکتین به 1.8293 رسید که نسبت به حالت کنترل، 2 برابر افزایش را نشان می‌دهد.

**واژه های کلیدی:** بیوسورفکتانت، بهینه سازی، محیط کشت، مدلسازی، شبکه های عصبی مصنوعی، الگوریتم

ژنتیک، کشش سطحی، *Bacillus subtilis* ATCC 6633

صفحه	عنوان
4	1Ñ <sub>1</sub> ®
4	مقدمه
7	2Ñ <sub>1</sub> ®
7	طراحی آزمایشها و روشهای مختلف بهینه سازی
8	1-2. مقدمه
11	2-2. طراحی آزمایشات کلاسیک - یک عامل در یک زمان
12	3-2. طراحی آزمایشات آماری
17	1-3-2. روش فاکتوریل کامل و کسری از فاکتوریل کامل
30	2-3-2. روش پلاکت - بورمن
32	3-3-2. روش تاگوچی
35	4-3-2. مدل‌های سطح پاسخ (روش ترکیب مرکزی)
40	4-2. استخراج مدل از داده های آزمایشی
41	1-4-2. استخراج مدل با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی
48	5-2. بهینه سازی مبتنی بر مدل با استفاده از الگوریتم ژنتیک
50	1-5-2. الگوریتم ژنتیک
56	3Ñ <sub>1</sub> ®
56	تولید محصولات بیولوژیکی و روشهای مختلف بهینه سازی و طراحی آزمایشها
57	1-3. مقدمه
58	2-3. بهینه سازی با استفاده از روش یک عامل در یک زمان
58	3-3. بهینه سازی با استفاده از روش فاکتوریل کامل و کسری
61	4-3. بهینه سازی با استفاده از روش پلاکت - بورمن
62	5-3. بهینه سازی با استفاده از مدل‌های سطح پاسخ
68	6-3. بهینه سازی با استفاده از مدل‌های سطح پاسخ و شبکه عصبی مصنوعی
72	7-3. بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانتها
72	1-7-3. بیوسورفکتانتها
76	2-7-3. روشهای شناسایی وجود بیوسورفکتانت در محیط
77	3-7-3. روشهای محاسبه غلظت بیوسورفکتانت
79	4-7-3. محاسبه غلظت با استفاده از کشش سطحی
80	5-7-3. استفاده از روشهای کسری از فاکتوریل و سطح پاسخ در بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانتها
82	6-7-3. بهینه سازی با استفاده از روش تاگوچی

7-7-3. بهینه سازی با استفاده از مدل شبکه عصبی مصنوعی و الگوریتم تکاملی بر مبنای جستجو.... 83

88

4Ñ<sub>1</sub>®

88

مواد و روشها

- 89 ..... 1-4. مقدمه
- 89 ..... 2-4. مشخصات میکروارگانیزم و شرایط نگهداری
- 90 ..... 3-4. محیط کشتهای جامد و مایع
- 91 ..... 1-3-4. محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA)
- 91 ..... 2-3-4. محیط کشت مایه تلقیح NB
- 92 ..... 3-3-4. محیط کشت پایه (نمکی) تولید بیوسورفکتانت
- 93 ..... 4-4. دستگاههای مورد استفاده
- 94 ..... 5-4. روشهای آنالیز
- 94 ..... 1-5-4. اندازه گیری غلظت سلولی
- 95 ..... 2-5-4. شناسایی وجود بیوسورفکتانت و اندازه گیری غلظت آن
- 97 ..... 6-4. آزمایشهای انجام شده
- 97 ..... 1-6-4. آزمایشهای تعیین ترکیب محیط کشت کنترل
- 98 ..... 2-6-4. آزمایشهای منحنی رشد و تولید بیوسورفکتانت
- 98 ..... 3-6-4. طراحی آزمایشها
- 101 ..... 4-6-4. بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانت با استفاده از مدل شبکه عصبی و الگوریتم ژنتیک

106

5Ñ<sub>1</sub>®

106

نتایج و بحث

- 107 ..... 1-5. مقدمه
- 107 ..... 2-5. تعیین ترکیب محیط کشت کنترل
- 111 ..... 3-5. منحنی رشد و تولید بیوسورفکتانت
- 113 ..... 4-5. تغییرات کشش سطحی
- 114 ..... 5-5. تعیین عوامل موثر در محیط کشت تولید بیوسورفکتانت با استفاده از روش فاکتوریل کسری
- 121 ..... 6-5. بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانت با استفاده از طرح ترکیب مرکزی و روش سطح پاسخ
- 133 ..... 7-5. بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانت با استفاده از مدل شبکه عصبی و الگوریتم ژنتیک
- 134 ..... 1-7-5. مدلسازی با استفاده از شبکه عصبی
- 142 ..... 2-7-5. بهینه سازی با استفاده از الگوریتم ژنتیک

144

6Ñ<sub>1</sub>®

144

جمع بندی و پیشنهادات

145	1-6. مقدمه
145	2-6. جمع بندی
147	3-6. پیشنهادات
170	پیوست الف - جدولهای مربوط به طرح و تحلیل آماری
149	پیوست ب - جدولهای مربوط به نمونه های بررسی شده در فصل 3
156	پیوست پ - جدولهای مربوط به برخی از نمودارهای فصل 5
1625	پیوست ت - جدولهای مربوط به غلظت محلولهای استوک
1650	مراجع



## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول 2-1. طرحهای آماری پایه‌ای برای آزمایشها.....	13
جدول 2-2. آرایه متعامد مربوط به طرح فاکتوریل کامل دو سطحی $2^3$ (A, B و C نشانگر سه فاکتور مورد بررسی در دو سطح بوده و AB, AC, BC و ABC نشانگر اثرات متقابل دوتایی و سه تایی این سه فاکتور هستند).....	15
جدول 2-3. یک آزمایش عاملی.....	19
جدول 2-4. یک آزمایش عاملی با اثر متقابل.....	19
جدول 2-5. گزیده‌های از طرحهای عاملی کسری $2^{k-p}$ .....	29
جدول 2-6. علامتهای بعلاوه و منها برای طرحهای پلاکت- بورمن.....	30
جدول 2-7. طرح پلاکت- بورمن برای $N=12$ و $k=11$ .....	31
جدول 2-8. ساختار طرح چرخشی.....	39
جدول 2-9. تفاوت‌های الگوریتم ژنتیک با روشهای استاندارد بهینه سازی.....	51
جدول 3-1. مطالعات انجام شده با استفاده از روش فاکتوریل کامل و کسری از فاکتوریل.....	59
جدول 3-2. مطالعات انجام شده در زمینه بهینه سازی با استفاده از مدل‌های سطح پاسخ.....	63
جدول 3-3. پارامترهای مدل و مقادیر اولیه متغیرهای حالت مورد استفاده در شبیه سازی.....	86
جدول 4-1. مواد تشکیل دهنده محیط کشت نوترینت آگار ساخت شرکت Liofilchem.....	91
جدول 4-2. اجزای محیط کشتهای مولد بیوسورفکتانت.....	92
جدول 4-3. محدوده آزمایشی و سطوح مربوط به متغیرهای مستقل مورد استفاده در طراحی کسری از فاکتوریل... ..	99
جدول 4-4. متغیرها و سطوح مورد استفاده آنها در طرح ترکیب مرکزی.....	101
جدول 5-1. قطر ناحیه شفاف با استفاده از تست گسترش روغن.....	109
جدول 5-2. مقادیر میانگین بدست آمده برای کشش سطحی هر یک از شش نمونه در روزهای سوم و چهارم.....	109
جدول 5-3. مقادیر کشش سطحی نمونه ها بدون رقیق سازی و با رقت 20 برابر و غلظت بیوسورفکتانت محاسبه شده از رابطه 3-4.....	110
جدول 5-4. نتایج مربوط به مقادیر غلظت میانگین بیوسورفکتانت با استفاده از رابطه 4-1.....	110
جدول 5-5. رشد، تولید و تغییرات کشش سطحی محیط برای میکروارگانیسمهای مختلف.....	112
جدول 5-6. طرح فاکتوریل کسری $2_{IV}^{8-4}$ و نتایج مربوط به آن.....	115
جدول 5-7. آنالیز واریانس (ANOVA) آزمایشهای طرح فاکتوریل کسری $2_{IV}^{8-4}$ .....	116
جدول 5-8. نتایج آنالیز رگرسیون برای طرح فاکتوریل کسری $2_{IV}^{8-4}$ .....	117
جدول 5-9. طراحی آزمایش و نتایج طرح ترکیب مرکزی.....	122
جدول 5-10. آنالیز واریانس (ANOVA) آزمایشهای طرح ترکیب مرکزی.....	123
جدول 5-11. نتایج آنالیز رگرسیون و آنالیز واریانس برای طرح ترکیب مرکزی.....	124
جدول 5-12. سطوح بهینه کد شده پیشنهادی برای متغیرها با استفاده از روش سطح پاسخ.....	127

جدول 5-13. مقادیر میانگین مربعات خطا برای داده های آموزش و تست، انحراف استاندارد و بیشترین و کمترین مقدار خطا برای هر شبکه.....	135
جدول 5-14. مقادیر ضریب تعیین ( $R^2$ ) برای داده های آموزش و تست، انحراف استاندارد و بیشترین و کمترین مقدار ضریب تعیین برای هر شبکه.....	136
جدول 5-15. مقادیر ضریب تعیین ( $R^2$ )، انحراف استاندارد و بیشترین و کمترین مقدار ضریب تعیین برای هر شبکه.....	138
جدول 5-16. سطوح بهینه کد شده پیشنهادی برای متغیرها با استفاده از الگوریتم ژنتیک.....	143
جدول الف-1. جدول نسبت فیشر (توزیع F).....	152
جدول الف-2. جدول Student's t Distribution.....	156
جدول ب-1. نتایج آنالیز رگرسیون آزمایشهای طرح عاملی کامل 24 به منظور تعیین آثار سه جزء از محیط کشت (عصاره مخمر، گلوکز، و سولفات آمونیوم)، و pH اولیه محیط کشت بر روی تولید پلی- $\epsilon$ -لیزین ( $\epsilon$ -PL) توسط Streptomyces albulus IFO 14147 در شرایط کشت در ظروف لرزان.....	157
جدول ب-2. ماتریس طراحی آزمایشها پلاکت- بورمن برای ارزیابی اهمیت نسبی مواد مغذی انتخاب شده برای اکتیویته xylanase تولیدی توسط A.terreus.....	157
جدول ب-3. درجه اثرات منفی و مثبت مواد مغذی گوناگون بر اکتیویته xylanase تولیدی توسط A.terreus بر اساس طرح آزمایشی پلاکت- بورمن.....	158
جدول ب-4. طراحی آزمایش و نتایج طرح ترکیب مرکزی همراه با راندمانهای پیش بینی شده از معادله مدل درجه دوم به منظور تعیین آثار سه جزء از محیط کشت (عصاره مخمر، گلوکز، و سولفات آمونیوم)، بر روی تولید پلی- $\epsilon$ -لیزین ( $\epsilon$ -PL) توسط Streptomyces albulus IFO 14147 در شرایط کشت در ظروف لرزان.....	158
جدول ب-5. محدوده آزمایشی و سطوح سه متغیر مستقل مورد استفاده در RSM بر حسب فاکتورهای واقعی و کد شده برای بهینه سازی پارامترهای محیط کشت به منظور تولید پروتئاز خارج سلولی.....	158
جدول ب-6. میکروارگانیسرها و بیوسورفکتانتهای تولید شده.....	159
جدول ب-7. محدوده آزمایشی و سطوح مربوط به متغیرهای مستقل مورد استفاده در طراحی کسری از فاکتوریل به منظور بهینه سازی اجزای محیط کشت برای تولید بیوسورفکتانها به وسیله باکتریهای پروبیوتیک.....	160
جدول ب-8. آنالیز واریانس (ANOVA) مربوط به مدلهای درجه اول بدست آمده بوسیله روش طراحی کسری از فاکتوریل (FFD) به منظور بهینه سازی اجزای محیط کشت برای تولید بیوسورفکتانها به وسیله باکتریهای پروبیوتیک.....	160
جدول ب-9. فاکتورها و سطوح برای بهینه سازی ترکیب $Mg^{+2}$ و $K^{+}$ به منظور تعیین بهترین میزان از دو فاکتور مهم $Mg^{+2}$ و $K^{+}$ برای بهبود بیشتر راندمان تولید سورفکتین با استفاده از روش تاگوچی.....	160
جدول ب-10. طراحی و نتایج آزمایشی برای بهینه سازی ترکیب $Mg^{+2}$ و $K^{+}$ به منظور تعیین بهترین میزان از دو فاکتور مهم $Mg^{+2}$ و $K^{+}$ برای بهبود بیشتر راندمان تولید سورفکتین با استفاده از روش تاگوچی.....	161
جدول پ-1. تغییرات رشد نسبت به زمان مربوط به شکل 4-5.....	163
جدول پ-2. تغییرات تولید سورفکتین نسبت به زمان مربوط به شکل 4-5.....	163
جدول پ-3. تغییرات کشش سطحی نسبت به زمان مربوط به شکل 5-5.....	164
جدول ت-1. غلظت محلولهای استوک مورد استفاده در آزمایشها.....	166
جدول ت-2. حجم مورد نیاز از هر یک از محلولهای استوک به ازای سطوح مورد استفاده در طراحی فاکتوریل کسری.....	166

- جدول ت-3. جدول طراحی فاکتوریل کسری بر مبنای حجم‌های برداشته شده از محلولهای استوک.....172
- جدول ت-4. حجم مورد نیاز از هر یک از محلولهای استوک به ازای سطوح مورد استفاده در طراحی ترکیب مرکزی  
173 .....
- جدول ت-5. جدول طراحی ترکیب مرکزی بر مبنای حجم‌های برداشته شده از محلولهای استوک.....173

صفحه	عنوان
8	شکل 1-2. مدل کلی سیستم یا فرآیند.....
18	شکل 2-2. توزیع آزمایش‌ها یا نقاط طراحی در فضای عاملی (الف) $m=2$ ، تعداد آزمایشها $= 2^2$ (ب) $m=3$ ، تعداد آزمایشها $= 2^3$ .....
20	شکل 3-2. یک آزمایش عاملی بدون اثر متقابل.....
20	شکل 4-2. یک آزمایش عاملی با اثر متقابل.....
36	شکل 5-2. یک سطح (رویه) پاسخ سه بعدی که $\eta$ را به صورت تابعی از دما ( $x_1$ ) و فشار ( $x_2$ ) نشان میدهد.....
37	شکل 6-2. نمودار منحنیهای تراز سطح پاسخ.....
39	شکل 7-2. توزیع نقاط طراحی قابل چرخش برای دو عامل و سه عامل.....
42	شکل 8-2. مدل ساده یک نورون.....
44	شکل 9-2. تابع Logsig برای مقدار شیب واحد.....
45	شکل 10-2. شبکه ساده دولایه‌ای.....
46	شکل 11-2. شبکه پرسپترون چند لایه با تمام جزئیات.....
50	شکل 12-2. تفاوت میان بهینه‌ی محلی و مطلق.....
52	شکل 13-2. شمای کلی الگوریتم ژنتیک.....
53	شکل 14-2. جفت شدن دو کروموزوم، عمل تقاطع و تولید دو کروموزوم فرزند از کروموزومهای والدین.....
54	شکل 15-2. عمل تقاطع در ماتریس جمعیت.....
73	شکل 1-3. ارتباط کشش سطحی، کشش بین سطحی و حلالیت با غلظت سورفکتانت.....
74	شکل 2-3. ساختار سورفکتین.....
77	شکل 3-3. امولسیفیکاسیون گازوئیل.....
78	شکل 4-3. تست گسترش روغن سمت راست نفت خام که بر روی سطح آب مقطر گسترده شده است عقب نشینی ذرات روغن به سمت دیواره ظرف و ایجاد ناحیه شفاف پس از افزودن بیوسورفکتانت.....
79	شکل 5-3. قطر ناحیه شفاف ایجاد شده در تست گسترش روغن نسبت به غلظت سورفکتین.....
85	شکل 6-3. ساختار شبکه عصبی مصنوعی برای تخمین نرخ ویژه تولید بیوسورفکتانت ( $q_p$ ) در معادله مدل 3-8.....
87	شکل 7-3. خط سیر زمان بهینه محاسبه شده مربوط به نرخ خوراک دهی و متغیرهای حالت فرآیند (خطوط ممتد) و مقادیر اندازه گیری شده از متغیرهای حالت در آزمایشها مربوطه (نقاط): (a) نرخ خوراک دهی، (b) اکتیویته امولسیفیکاسیون، (c) حجم محیط کشت، (d) شاخص عملکرد فرآیند، (e)-(h) به ترتیب غلظتهای توده سلولی، گلوکز، نیتروژن آمونیاکی، و فسفر فسفاتنی.....
89	شکل 1-4. تصویری از باکتری <i>Bacillus subtilis</i> .....
90	شکل 2-4. زیر کشت از باکتری <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....
94	شکل 3-4. دستگاه تنسیومتر KSV مدل Sigma 701.....
95	شکل 4-4. منحنی استاندارد وزن خشک سلولی نسبت به جذب نوری.....

- شکل 4-5. حلقه پلاتینیوم دو نوی آویخته شده بر روی سطح نمونه..... 96
- شکل 4-6. شبکه عصبی به عنوان مدل فرآیند..... 104
- شکل 5-1. مقایسه غلظت توده سلولی در شش محیط کشت مختلف مورد استفاده ( به دلیل ناچیز بودن میزان رشد در محیط کشت MS که فاقد یون منگنز بود، از ارئه نتایج مربوط به این محیط خودداری گردیده است)..... 108
- شکل 5-2. منحنی رشد و غلظت بیوسورفکتانت بر حسب زمان با استفاده از محیط کشت  $MMS_2$ ..... 111
- شکل 5-3. کشت سطحی و تولید بیوسورفکتانت نسبت به زمان با استفاده از محیط کشت  $MMS_2$ ..... 113
- شکل 5-4. رابطه میان مقادیر آزمایشی غلظت بیوسورفکتانت و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل ارائه شده در رابطه 1-5..... 118
- شکل 5-5. نمودار احتمال نرمال ماندهها برای مدل رگرسیونی خطی ساده، ارائه شده در رابطه 1-5..... 119
- شکل 5-6. نمودار مانده ها نسبت به مقادیر پیش بینی شده در طرح فاکتوریل کسری..... 120
- شکل 5-7. رابطه میان مقادیر آزمایشی غلظت بیوسورفکتانت و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل ارائه شده در رابطه 2-5..... 125
- شکل 5-8. نمودار احتمال نرمال ماندهها برای مدل رگرسیونی خطی ساده، ارائه شده در رابطه 2-5..... 126
- شکل 5-9. نمودار مانده ها نسبت به مقادیر پیش بینی شده در طرح ترکیب مرکزی..... 127
- شکل 5-10. تولید بیوسورفکتانت بر روی گراف سه بعدی مربوط به بهینه سازی رویه پاسخ بر حسب  $Ca^{+2}$  و  $Na^{+1}$ ..... 128
- شکل 5-11. نقشه کانتوری اثر  $Ca^{+2}$ ،  $Na^{+1}$  و برهم کنش آنها در تولید بیوسورفکتانت..... 129
- شکل 5-12. تولید بیوسورفکتانت بر روی گراف سه بعدی مربوط به بهینه سازی رویه پاسخ بر حسب  $Fe^{+2}$  و  $Na^{+1}$ ..... 129
- شکل 5-13. نقشه کانتوری اثر  $Fe^{+2}$ ،  $Na^{+1}$  و برهم کنش آنها در تولید بیوسورفکتانت..... 130
- شکل 5-14. تولید بیوسورفکتانت بر روی گراف سه بعدی مربوط به بهینه سازی رویه پاسخ بر حسب  $K^{+1}$  و  $Na^{+1}$ ..... 130
- شکل 5-15. نقشه کانتوری اثر  $Na^{+1}$ ،  $K^{+1}$  و برهم کنش آنها در تولید بیوسورفکتانت..... 131
- شکل 5-16. تولید بیوسورفکتانت بر روی گراف سه بعدی مربوط به بهینه سازی رویه پاسخ بر حسب  $Fe^{+2}$  و  $Mg^{+2}$ ..... 131
- شکل 5-17. نقشه کانتوری اثر  $Fe^{+2}$ ،  $Mg^{+2}$  و برهم کنش آنها در تولید بیوسورفکتانت..... 132
- شکل 5-18. تولید بیوسورفکتانت بر روی گراف سه بعدی مربوط به بهینه سازی رویه پاسخ بر حسب  $K^{+1}$  و  $Ca^{+2}$ ..... 132
- شکل 5-19. نقشه کانتوری اثر  $Ca^{+2}$ ،  $K^{+1}$  و برهم کنش آنها در تولید بیوسورفکتانت..... 133
- شکل 5-20. نمودار میانگین مربعات خطا برای داده های آموزش و تست بر حسب تعداد نورونها..... 136
- شکل 5-21. مقادیر ضریب تعیین ( $R^2$ ) برای داده های آموزش و تست بر حسب تعداد نورونها..... 137
- شکل 5-22. رسم مقادیر ضریب تعیین ( $R^2$ ) بر حسب تعداد نورونها..... 139
- شکل 5-23. ساختار شبکه عصبی مصنوعی برای تخمین غلظت بیوسورفکتانت..... 140
- شکل 5-24. نمودار پیشرفت شبکه در آموزش..... 141
- شکل 5-25. رابطه میان مقادیر غلظت بیوسورفکتانت آزمایشگاهی (دادههای آزمایشی) و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل شبکه عصبی..... 141
- شکل الف-1. برخی از طرحهای آرایه‌ای متعامد..... 160

**1Ñ1®**

مقدمه

سورفکتانت‌ها از جمله مواد فعال سطحی هستند. خصوصیت منحصر به فرد این مواد در کاهش کشش سطحی و افزایش امولسیفیکاسیون مواد غیر محلول در آب باعث کاربردهای زیاد این مواد در صنایع غذایی، صنایع شوینده‌ها، صنایع وابسته به نفت، محیط زیست و ... شده است. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادرند مواد فعال سطحی تولید نمایند که به بیوسورفکتانت‌ها معروفند. زیست تجزیه پذیر بودن این مواد، سمیت کمتر، قابلیت تولید از مواد ارزان قیمت و ... از مهمترین مزیت‌های این دسته مواد نسبت به نمونه‌های شیمیایی است.

با وجود چنین مزایای مهمی، به دلیل هزینه‌های تولیدی نسبتاً بالا هنوز از بیوسورفکتانت‌ها به طور گسترده در صنعت استفاده نشده است. یک روش ممکن برای کاهش هزینه‌ها فراهم نمودن محیط‌هایی با ترکیب بهینه اجزا و یا استفاده از سوبستراهای جایگزینی همچون ضایعات کشت و صنعت می‌باشد. مشکل عمده در زمینه استفاده از سوبستراهای جایگزین اینست که محیط کشت باید حاوی میزان مناسبی از مواد مغذی باشد تا رشد سلولی و تولید محصول مناسب باشد. استفاده از محیط کشت بر پایه ضایعات با مشکل دیگری نیز مواجه است چرا که نوع و خصوصیات محصول نهایی به ترکیب محیط کشت وابسته است (Nitschka, et al., 2004).

رشد سلولی و انباشتگی محصولات متابولیکی به شدت تحت تاثیر ترکیبات محیط کشت است. بنابراین یافتن فاکتورهای مهم و بهینه‌سازی آنها برای فرآیندهای بیوتکنولوژیکی بسیار دشوار است، زیرا این فاکتورها اثرات متقابل پیچیده‌ای داشته و علاوه بر این از عوامل محیطی همچون pH، دما، میزان در دسترس بودن اکسیژن تاثیر می‌پذیرند. به منظور بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت تا کنون از روشهای گوناگونی استفاده گردیده است. بسیاری از این روشها مانند یک فاکتور در یک زمان<sup>۱</sup> علاوه بر وقت گیر بودن نتایج قابل اعتمادی را نیز به دلیل در نظر نگرفتن اثرات متقابل فاکتورها ارائه نمی‌کنند. روشهایی همچون پلاکت-بورمن<sup>۲</sup> نیز به دلیل داشتن ترمهای هم اثر<sup>۳</sup> زیاد، تنها برای غربال نمودن اولیه فاکتورها مناسبند. استفاده از روش تاگوچی<sup>۴</sup> نیز علی‌رغم استقبال عمومی و نتایج مناسب در برخی موارد، راهکار مناسبی نمی‌باشد.

<sup>۱</sup> - One factor at a time

<sup>۲</sup> - Placket - Burman

<sup>۳</sup> - Alias

<sup>۴</sup> - Taguchi

هدف از انجام این مطالعه بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانت توسط *Bacillus subtilis* ATCC 6633 می باشد. تابع هدف میزان بیوسورفکتانت است که بایستی در فرآیند بهینه سازی بهینه گردد. متغیرهای مورد بررسی غلظت اجزای تشکیل دهنده محیط کشت هستند. پس از بدست آوردن منحنی های رشد و تولید بیوسورفکتانت با استفاده از یک طرح فاکتوریل کسری<sup>۱</sup> آزمایشهایی طراحی و اجرا شد. با انجام این آزمایشها از میان هشت فاکتور مورد بررسی در محیط کشت، پنج فاکتور موثر تشخیص داده شده و در طرح ترکیب مرکزی<sup>۲</sup> برای بهینه سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. شبکه های عصبی مصنوعی ابزار مدلسازی غیر پارامتری است و به همین دلیل از قدرت بیشتری در مدلسازی فرآیند برخوردار می باشد. با توجه به پیچیدگی روابط متقابل میان فاکتورهای محیط کشت مدلسازی سیستم با شبکه عصبی مصنوعی<sup>۳</sup> انجام گرفت و سپس با استفاده از روش الگوریتم ژنتیک، بهینه سازی محیط کشت انجام گرفت. نتایج بدست آمده، بر برتری شبکه های عصبی نسبت به روش رگرسیونی صحنه می گذارند. در عین حال الگوریتم ژنتیک نیز نتایج بهتری را نسبت به روش سطح پاسخ<sup>۴</sup> ارائه می کند.

این تحقیق در شش فصل ارائه گردیده است. در فصل دوم این تحقیق، مبانی نظری روش های مختلف طراحی آزمایشها و بهینه سازی معرفی شده است. در فصل سوم، کاربرد روش های مختلف طراحی آزمایش و بهینه سازی در تولید محصولات بیولوژیکی و به طور خاص در تولید بیوسورفکتانتها مورد بررسی قرار گرفته است. در این قسمت به طور مختصر به معرفی بیوسورفکتانتها و مقایسه آنها با سورفکتانت های شیمیایی و بیان مزیت های آنها، و همچنین روش های مختلف شناسایی و اندازه گیری غلظت آنها پرداخته شده است. مواد و روش های مورد استفاده در فصل چهارم و نتایج و بحث در فصل پنجم ارائه گردیده است. در فصل ششم به جمع بندی و ارائه پیشنهادات پرداخته شده است. در انتها نیز 4 پیوست ارائه گردیده است.

<sup>1</sup> - Fractional factorial

<sup>2</sup> - Central composite design

<sup>3</sup> - Artificial Neural Network (ANN)

<sup>4</sup> - Response Surface Methodology (RSM)



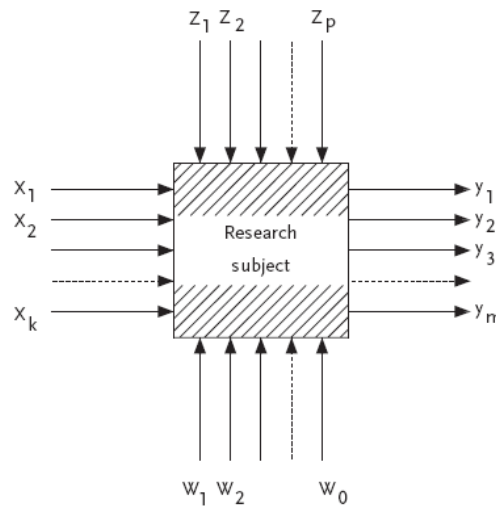
2Ñ1®

طراحی آزمایش‌ها و روش‌های  
مختلف بهینه‌سازی

## 1-2. مقدمه

یک فرآیند یا یک پدیده طبیعی همواره تحت تاثیر عوامل مختلف می باشد. مطالعه و شناخت این عوامل و تعیین چگونگی اثرگذاری آنها بر رفتار فرآیند این امکان را فراهم می آورد که بتوان آن فرآیند را به سمت اهداف از پیش تعیین شده سوق داد.

مدل کلی سیستم یا فرآیند را می توان به صورت شکل 1-2 در نظر گرفت.



شکل 1-2. مدل کلی یک سیستم یا فرآیند همراه با ورودیها و خروجیها

همانطور که مشاهده می گردد، فرآیند را می توان به صورت ترکیبی از ماشینها، روشها، اشخاص و منابع دیگر تصور کرد که ورودیها ( $X_1, X_2, \dots, X_k$ ) را تبدیل به خروجیهایی می کنند که یک و یا چند پاسخ قابل مشاهده دارند ( $Y_1, Y_2, \dots, Y_m$ ).

بعضی از متغیرها در فرآیند، کنترل پذیرند ( $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$ )، در صورتیکه متغیرهای دیگر کنترل ناپذیرند ( $w_1, w_2, \dots, w_0$ ).

متغیرهای قابل کنترل و غیر قابل کنترل هر دو بر روی فرآیند اثر می گذارند اما فرق آن دو در این است که مقدار متغیر قابل کنترل را می توان تنظیم نمود. در حالیکه تنظیم متغیر غیر قابل کنترل از عهده آزمایشگر خارج است.

متغیرها به دو دسته مستقل و وابسته تقسیم می شوند. متغیر مستقل متغیری است که با سایر متغیرهای ورودی دیگر ارتباط ندارد. به عبارت دیگر اگر با ایجاد تغییر در متغیری، تغییری در متغیرهای دیگر ورودی ایجاد نشود، آن متغیر را مستقل می گوئیم. متغیر وابسته متغیری است که

مقدار آن تابعی از متغیرهای مستقل می باشد.

متغیر پاسخ، متغیری وابسته است که تابعی از متغیرهای مستقل بوده و قابل اندازه گیری می باشد. فاکتور، متغیر قابل کنترل و مستقل در یک آزمایش می باشد. هر گونه تغیر و تنظیمی در فاکتورهای ورودی بر روی متغیر پاسخ اثر می گذارد. فاکتورهای مورد بررسی در یک آزمایش را می توان به دو دسته کمی<sup>۱</sup> و کیفی یا قیاسی<sup>۲</sup> تقسیم نمود. فاکتورهای کمی آنهایی هستند که نشان دهنده میزان یک کمیت بوده و دارای مقدار عددی مشخصی هستند. میزان قد، وزن و یا غلظت یک ماده نمونه- هایی از فاکتورهای کمی هستند. فاکتورهای کیفی توصیفی بوده و حالتی یا ویژگی خاصی را توصیف می کنند. به عنوان مثال این ویژگی خاص می تواند رنگهای مختلف مثل قرمز، سفید و یا آبی باشد (Lazic, 2004).

با وجود این تعاریف و مقدمات اکنون باید پرسید چرا آزمایش انجام می دهیم؟ به طور کلی علوم دقیقه<sup>۳</sup> می توانند با توجه به کیفیت شناخت آنها به سه دسته تقسیم شوند. در بالاترین سطح شناخت، تمام فاکتورهایی که بخشی از یک پدیده هستند، به همراه قوانین طبیعی حاکم میان آنها و نحوه اثر آنها بر یکدیگر شناخته شده باشند. ارتباط میان تمام فاکتورها در پدیده ای که از قوانین طبیعی تبعیت می کند بوسیله یک فرمول ریاضی بیان می گردد (Lazic, 2004).

سطح میانی شناخت زمانی اتفاق می افتد که تمام فاکتورهایی که بخشی از یک پدیده هستند، شناخته شده می باشند، در حالیکه روابط میان آنها و تاثیرات آنها کاملاً مشخص نشده اند. این حالت معمولاً زمانی اتفاق می افتد که ما با پدیده ای پیچیده که دارای فاکتورهای زیادی است مواجه شده ایم. برخی اوقات ما می توانیم این فاکتورها را به صورت یک سیستم از معادلات دیفرانسیل همزمان اما بدون راه حل به یکدیگر ارتباط بدهیم.

سطح پایین شناخت یک پدیده، بصورتی است که تنها تعدادی مشخص از فاکتورهای مربوط به پدیده برای ما شناخته شده هستند، در حالیکه تعداد زیادی از فاکتورها ناشناخته مانده اند. در چنین سطحی، ما قانون طبیعی یا به عبارت دیگر مدل ریاضی عمل فاکتورها را نمی شناسیم. در این صورت برای دستیابی به چنین مدلی، دست به انجام آزمایش می زنیم (Lazic, 2004).

<sup>1</sup>- Quantitative

<sup>2</sup>- Qualitative or categorical

<sup>3</sup>- Exact sciences

آزمایش، یک عمل طرح ریزی شده است که برای رد و یا قبول نمودن یک فرض، یا کشف واقعیتی انجام می‌گیرد. در فرآیند تحقیق، توسعه و بهینه‌سازی یک سیستم تعداد زیادی آزمایش انجام می‌گیرد. یک آزمایش ممکن است فیزیکی و یا بر مبنای مدل<sup>1</sup> باشد. آزمایش همچنین می‌تواند بر روی یک مدل ریاضی ساده شده نیز انجام پذیرد. هنگامی که یک مدل، موضوع مورد مطالعه را با دقت کافی توصیف کند، عموماً آزمایش بر روی موضوع مورد مطالعه با آزمایشی بر روی مدل جایگزین می‌گردد. اخیراً به واسطه پیشرفت سریع تکنولوژی کامپیوتر، مدل‌های فیزیکی مکرراً توسط مدل‌های ریاضی ساده شده جایگزین شده‌اند (Lazic, 2004).

آزمایش جایگاهی عمده در علم دارد، مخصوصاً اکنون که مسایل علمی دارای پیچیدگی‌های بی‌شماری هستند. براساس تخمینی که توسط Bernal انجام گرفته است، یک تحقیق علمی که کاملاً بی‌نظم انجام گرفته باشد از نظر قابلیت استفاده‌پذیری تنها دارای ضریبی در حدود 2٪ می‌باشد. بنابراین به منظور افزایش راندمان تحقیق، لازم است که روشی کاملاً نوین در مطالعات آزمایشگاهی کلاسیک معرفی گردد (Lazic, 2004).

مطالعات مهندسی و شیمیایی، همچون رشته‌های دیگر، بر اساس آزمایشات پیچیده، وقت‌گیر و تا حدی گران قیمت استوار هستند. کار آزمایشی شامل موارد ذیل است (Lazic, 2004):

- مطالعات فیزیکی و شیمیایی برای برقرار نمودن ثوابت و خواص اجزا، ترکیبات شیمیایی و مواد؛
- آنالیز معمولی مواد خام، محصولات میانی و نهایی؛
- مطالعات آزمایشگاهی برای طراحی و توسعه فرآیندهای حرفه‌ای صنعتی؛
- بهینه‌سازی روشهای حرفه‌ای صنعتی در سیستمهای آزمایشگاهی، واحدهای نیمه صنعتی و صنعتی؛
- بهینه‌سازی ترکیبات، بهینه‌سازی خواص، و یا بهینه‌سازی مخلوط (ترکیب-خواص)؛
- مدلسازی ریاضی یک سیستم؛
- انتخاب فاکتورها با توجه به میزان تاثیر آنها بر روی میزان پاسخ اندازه‌گیری شده؛
- تخمین و تعیین ثوابت مدل تئوری.

---

<sup>1</sup> - Model based