

메타놀자화균의 연속배양에 의한 균체생산의 온-라인 적응최적화

이 형춘 · 박 정오

서울보건전문대학

(1988. 11. 10 수리)

Adaptive On-line Optimization of Cellular Productivity of Continuous Methylotroph Culture

Hyeong-Choon Lee · Chung-Oh Park

Seoul Health Junior College

(Received November 10, 1988)

ABSTRACT

An adaptive on-line optimization method has been applied to test the ability to maximize the cellular productivity of a continuous methylotroph culture system which was simulated by a variable yield Monod-type model.

Optimum dilution rate and productivity were successively obtained and maintained at all times by the algorithm that utilizes steepest descent technique as optimization method and recursive least-square method with forgetting factor as dynamic model identification.

서론

메타놀은 값이 저렴하고 순도가 높으며, 용해성이 우수하다는 등 여러가지 장점을 지닌 기질이므로 이로부터 단세포단백질을 생산하는 연구가 많이 이루어졌다.

메타놀로부터 균체를 생산하기 위한 배양법으로써는 크게 유가배양법과 연속배양법을 들 수 있는데, 유가배양법이 많이 연구된 것은 메타놀 농도를 적정수준으로 유지함으로써 기질저해를 방지하여 고농도배양이 가능하기 때문이다. 연속배양에 있어서는 배양액중의 기질농도는 최소상태가 되므로 기질저해는 큰 문제가 되지 않으나, 균체

생산성을 최적상태로 유지시켜주는 것이 중요하다.

연속배양에 있어서 최적생산성을 얻기위하여 종래에는 증식파라미터를 실험적으로 산출하여 증식모형을 얻은 후 이 모형에 대하여 최적화기법을 적용하여 최적조건을 구하거나 또는, 전혀 실험적인 방법에 의존하였다. 그러나, 배양조건은 변이균주의 출현, 외부환경인자의 교란등에 의해 끊임없이 변화하므로 최적조건 역시 변화하며, 위의 방법에 의해서는 진정한 최적생산성을 얻을 수 없게 된다.

따라서, 배양조건이 변화할 경우, 그에 따르는 최적배양조건을 끊임없이 추적하면서 생산성의

극대화를 달성할 목적으로 개발된 방법이 연속배양프로세스의 온-라인 적응최적화법이다.

미생물연속배양시스템의 온-라인 적응최적화에 대한 연구는 Bamberger와 Isermann¹⁾에 의해 개발된 방법을 *Saccharomyces cerevisiae*의 연속배양시스템에 응용한 Rolf와 Lim²⁾의 연구가 있으며, 또한 Harmon 등³⁾은 Rolf와 Lim²⁾이 최적회색율을 산출하기 위하여 구배법(gradient method)을 이용한 것과는 달리, 균체농도를 회색율의 2차식으로 표현한 위(僞)정상상태식(pseudo-steady-state equation)으로부터 최적회색율을 산출하는 간단한 알고리즘을 이용하여 연속배양시스템의 온-라인 적응최적화를 수행하였다.

본 연구에서는 위의 연구들 중에서 모델의 파라미터추정방법이 비교적 안정하고 실험연구에 의해 그 적용이 확립된 Rolf와 Lim²⁾의 방법을 메타놀자화균의 연속배양시스템에 도입하여 일차적으로 시뮬레이션연구를 통한 온-라인 적응최적화의 적용가능성 여부를 조사하였다.

실험방법

1. 적응최적화 알고리즘⁴⁾

연속배양시 균체생산을 최적화할 경우의 최적화대상이 되는 목적함수는 균체생산성이 되며 균체생산성은 회색율과 균체농도의 곱으로 나타낼 수 있다.

$$p = Dx \quad (1)$$

여기서, 시스템의 입력변수는 회색율 D 이며, 출력변수는 균체농도 x 이므로 D 를 조작함으로써 p 를 최적화할 수 있다.

최적화법으로써는 최급강하법(steepest descent optimization technique)을 사용하였는데, 그 경우의 최적화알고리즘은 다음과 같다.

$$D(N+1) = D(N) + \alpha \{x(N) + D(N) \frac{dx}{dD}\} \quad (2)$$

(2)식에서 α 는 최적화이득(optimization gain)이며 다음단계의 최적회색율 $D(N+1)$ 을 구하기 위해서는 현재의 균체농도 $x(N)$ 및 현재의 회색율 $D(N)$ 과 정상상태이득(steady state gain)인 dx/dD 을 알

아야 한다. 정상상태이득 dx/dD 는 x 와 D 의 함수관계를 2차의 단일입력단일출력선형모델(second order single input-single output linear model)로 설정한 후, 이 동적모델을 동정(identification)함으로써 구할 수 있다. 우선, 2차의 SISO모델은 $x(k) + a_1x(k-1) + a_2x(k-2) = b_0D(k) + b_1D(k-1) + b_2D(k-2) + C$ (3)

로 나타낼 수 있으며, 여기서 k 는 샘플링시간(T)을 나타내는 지수이고 a_1, a_2, b_0, b_1, b_2 및 C 는 모델의 파라미터이다. (3)식을 후진연산자(backward shift operator) q 를 사용하여 나타내면,

$$x(k) = \frac{(b_0 + b_1q + b_2q^2)D(k) + C}{1 + a_1q + a_2q^2} \quad (4)$$

가 되며, 정상상태에서는 $x(k) = x(k-1) = x(k-2)$ 및 $D(k) = D(k-1) = D(k-2)$ 이므로 $q = 1$ 로 놓은 후 정상상태이득을 구하면,

$$\frac{dx}{dD} = \frac{b_0 + b_1 + b_2}{1 + a_1 + a_2} \quad (5)$$

가 된다.

따라서, 정상상태이득 dx/dD 를 구하기 위해서는 모델의 파라미터를 구해야 되는데, 파라미터추정법으로써는 (2)식으로 표현되는 최적화알고리즘의 실시간적용을 위하여 배양조건의 변화에 대응하여 온-라인으로 파라미터를 추적할 수 있는 축차최소자승법(recursive least square method)을 사용하였다.

축차최소자승법의 사용에 있어서는 초기에 상당수의 데이터군을 확보한 후 최소자승법을 일시에 적용하여 정확한 파라미터값을 추정한 후, 여기에 축차최소자승알고리즘을 적용하였다. 초기의 데이터군의 확보를 위하여 시스템에 부여하는 회색율의 입력신호로써는 간단한 컴퓨터프로그램을 사용하여 얻을 수 있는 가중 m 시퀀스(weighted m sequence)⁵⁾를 사용하였다.

가중 m 시퀀스를 부여하여 얻은 초기데이터군에 최소자승법을 1회적으로 적용하여 초기의 파라미터추정치들을 구하는 알고리즘은

$$\theta = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (6)$$

이며, 여기서

$$X = \begin{pmatrix} x^T(i) \\ x^T(i+1) \\ \vdots \\ x^T(i+5) \end{pmatrix} \quad (7)$$

$$x^T(i) = [-x(i-1), -x(i-2), D(i), D(i-1), D(i-2), 1] \quad (8)$$

$$y^T = [x(i), x(i+1), \dots, x(i+5)] \quad (9)$$

이고 θ 는 파라미터추정치이다.

또한, 축차최소자승법에 의한 반복적인 파라미터추정알고리즘은

$$\theta(k+1) = \theta(k) + \gamma(k+1)P(k)x(k+1)(y(k+1) - x^T(k+1)\theta(k)) \quad (10)$$

이며, 여기서

$$P(k+1) = \lambda^{-1} \{ P(k) - \gamma(k+1)P(k)X^T(k+1)X^*T(k+1)P(k) \} \quad (11)$$

$$\gamma(k+1) = (1 + x^T(k+1)P(k)x(k+1))^{-1} \quad (12)$$

$$X^*(k) = [x(k), 0, 0, 0, 0, 0] \quad (13)$$

$$P(0) = (X^T X)^{-1} \quad (14)$$

이고, $0 < \lambda \leq 1$ 는 forgetting factor이다.

위에서 기술한 알고리즘의 기본적인 과정을 Fig. 1에 흐름도로써 나타내었다. Fig.1에서 h는 가중 m시퀀스로써 부여되는 입력신호의 최대치이며, TOL^+ 와 TOL^- 는 회석율D가 최적치에 가까이 접근하였을 때 최적화알고리즘을 정지시키기 위하여 부여하는 값으로써, 히스테레시스를 고려하여 +방향과 -방향의 값을 다르게 하였다. 또한, T는 출력변수인 균체농도x의 샘플링시간간격을 나타내며, NMOVE는 입력변수를 변화시키기 위하여 필요한 출력변수의 샘플링횟수를 나타낸다.

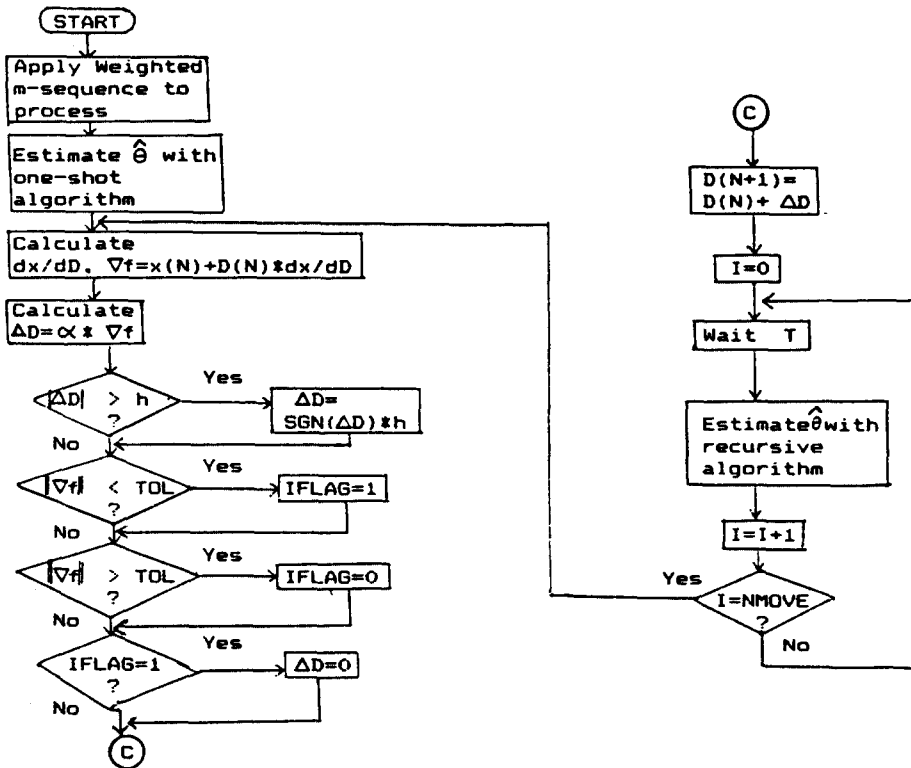


Fig.1. Flowchart of the basic procedure for adaptive on-line optimization

2. 메놀자화균의 증식모델

시뮬레이션에 이용한 메타놀자화균의 증식모델 및 파라미터값은 Dibiasio등⁶⁾에 의하였다.

증식모델은 모노드형모델(Monod-type model)으로써 증식수율이 기질 즉 메타놀농도에 따라 변화하는 증식수율가변모델(variable yield model)을 사용하였으며 그 수식적 표현은 다음과 같다.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - D x \quad (15)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \mu x / Y(S) \quad (16)$$

$$\mu = \left(\frac{a S}{b + S} \right) \left(\frac{1 - c S}{1 - d S} \right) \quad (17)$$

$$Y(S) = Y_0 \left(\frac{1 - c S}{1 - d S} \right) \quad (18)$$

여기서 μ , S , S_0 , $Y(S)$, Y_0 는 각각 비증식속도, 배양조내의 기질농도, 공급배지중의 기질농도, 증식수율 및 총괄수율계수(total yield coefficient)이며, a , b , c , d 는 모델의 상수값이다.

3. 시뮬레이션방법

시뮬레이션에 사용한 컴퓨터는 IBM PC-XT였다. IBM PC-XT는 중앙연산처리장치로써 16bit IC인 Intel 8088을 채용하고 있으며, 연산속도와 정도(精度)를 높이기 위하여 보조연산프로세서(co-processor)인 Intel 8087-2를 부가하였다.

프로그램언어는 Fortran77을 사용하였고, Microsoft fortran optimizing compiler version 4.0⁷⁾으로 프로그램을 컴파일하였으며, Microsoft codeview window oriented debugger⁸⁾로써 디바깅하였다. 또한, 시뮬레이션결과는 Lotus 1-2-3 release2⁹⁾를 사용하여 도표화하였다.

프로그램중 연립미분방정식의 해를 구하는 프로그램은 Press등¹⁰⁾의 RK4서브루틴에 근거하여 구성하였으며, 역행렬의 해를 구하는 프로그램은 IMSL¹¹⁾의 라이브러리중 LINV2F를 사용하였다.

실험결과 및 고찰

시뮬레이션에 사용한 증식모델의 파라미터값과

최적화알고리즘의 파라미터값을 각각 Table1과 Table2에 나타내었으며, 공급배지의 메타놀농도 S_0 는 2%로, 초기회석율은 0.35 hr^{-1} 로 설정하였다.

Table1. Values of parameters of methylotroph growth model used for simulation

Parameter	value
a	0.455 hr^{-1}
b	0.00712 w/v%
c	0.216 (w/v%) ⁻¹
d	0.0598 (w/v%) ⁻¹
Y ₀	0.6

Table2. Values of parameters of on-line optimization algorithm

h=0.01 hr, test signal amplitude
$\Delta t=1.6$ hr, test signal interval
N=15, number of changes in test signal
T=0.02 hr, sampling time
NMOVE=0.8hr, number of sampling times between input variable moves
$\lambda=0.98$, forgetting factor
TOL ⁻ =0.075, optimization tolerance limit
TOL ⁺ =1.0, optimization tolerance limit
$\alpha=0.001$, optimization gain

위의 조건하에서 시뮬레이션프로그램을 실행한 결과를 Fig.2, Fig.3 및 Fig.4에 나타내었다.

Fig.2에서 보는 바와 같이 회석율 D값은 초기 25.6시간까지는 임의로 부여한 가중 m시퀀스의 값을 그대로 나타내고 있으나, 그 이후에는 최적화알고리즘의 최적치탐색작업에 따라 계속 증가하며, 약75시간 이후에는 최적치인 0.405 hr^{-1} 에 도달하여 그 값이 계속 유지되는 양상을 보이고 있다. 또한, Fig.3의 균체생산성은 회석율의 경우와 거의 같은 양상을 나타내어 역시 약75시간 후에 최적치인 $0.469\% \cdot \text{hr}^{-1}$ 에 도달하였다. Fig.4의 균체농도는 초기에 1.174%로부터 회석율과 생산성이 최

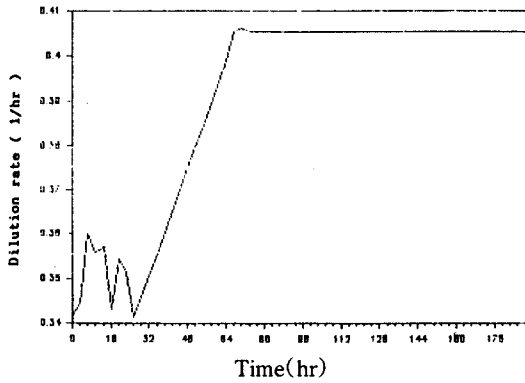


Fig.2 Computer simulation of adaptive on-line optimization of methylotroph(temporal variation of dilution rate, D)

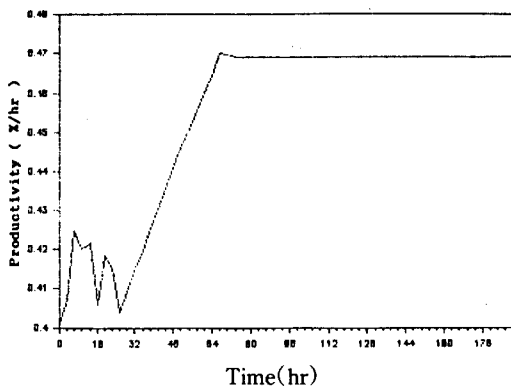


Fig.3 Computer simulation of adaptive on-line optimization of methylotroph(temporal variation of productivity, Dx)

적치에 도달하는 시간에 1.157%에 도달하여 계속 그 값이 유지되었다. 즉, 메타놀자화균에 있어서 연속배양시의 균체생산성을 온-라인으로 최적화할 수 있는 알고리즘이 성공적으로 적용될 수 있음을 나타내었다.

Rolf와 Lim²⁾이 보고한 *Saccharomyces cerevisiae*에 있어서는 최적치도달시간이 약 100시간 후로써 본 연구의 메타놀자화균보다 약 25시간 느린 데, 이것은 *S.cerevisiae*의 경우 최적회색율이 약 0.31hr⁻¹이고, 본 연구의 메타놀자화균의 경우 약 0.41hr⁻¹

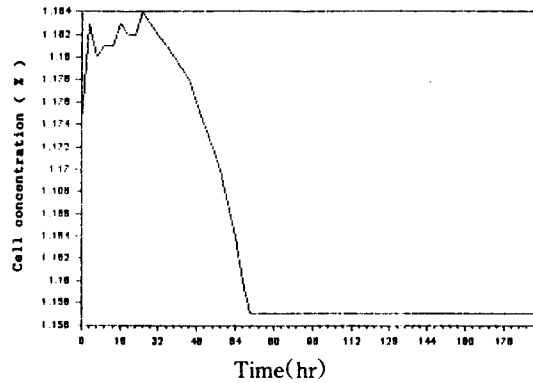


Fig.4 Computer simulation of adaptive on-line optimization of methylotroph(temporal variation of cell concentration, x)

로써 후자의 경우가 시간상수(dominant time constant)값은 더 작아지므로 NMOVE도 작아지며 결과적으로 최적치도달속도가 빨라지기 때문이라 생각된다.

Harmon등³⁾은 본 연구와 동일한 메타놀자화균의 모델에 대하여 자신들이 개발한 최적화알고리즘으로 시뮬레이션할 경우, 약 15시간 후에 최적치에 도달함을 보고하였는데, 이는 본 연구에 사용한 Rolf와 Lim²⁾의 방법보다 약 5배 빠른 결과로써 Rolf와 Lim²⁾의 방법에서는 최적치도달시간을 줄이는 방법에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

요약

메타놀자화균의 연속배양프로세스에 대하여 배양조건의 변화를 추적하면서 균체생산성을 최적화할 수 있는 온-라인 적응최적화법의 적용가능성 여부를 알아보기 위하여 시뮬레이션연구를 수행하였다.

온-라인 적응최적화법에서 최적화법으로써는 최급강하법을, 동적모델동정법으로써는 *forgetting factor*을 도입한 축차최소자승법을 사용하였으며, 동적모델은 2차의 단일입력단일출력선형모델로 하였다.

메타놀자화균 연속배양프로세스의 시뮬레이션

모델로써는 증식수율이 기질농도에 따라 변화하는 모노드형 모델을 설정하였고, 이에 대하여 온-라인 적응최적화를 수행하였을 때, 약75시간 후에 성공적으로 최적생산성이 얻어졌다.

참 고 문 헌

1. Bamberger, W. and Isermann, R. : Adaptive on-line steady-state optimization of slow dynamic processes, *Automatica*, **14**, 223(1978).
2. Rolf, M. J. and Lim, H. C. : Experimental adaptive on-line optimization of cellular productivity of a continuous baker's yeast culture, *Biotech. and Bioeng.*, **27**, 1236(1985).
3. Harmon, J., Svoronos, S. A. and Lyberatos, G. : Adaptive steady-state optimization of biomass productivity in continuous fermentors, *Biotech. and Bioeng.*, **30**, 335(1987).
4. Rolf, M. J. : Computer control and adaptive on-line optimization of a continuous bioreactor, PhD thesis, Purdue University, West Lafayette (1984).
5. Kashiwagi, H. : A method of system identification using weighted m-sequence signal, Proceedings of the 15th joint automatic control conference, AICHE publications, 285(1974)
6. Dibiasio, D., Lim, H. C., Weigand, W. A. and Tsao, G. T. : Phase-plane analysis of feedback control of unstable steady states in a biological reactor, *AICHE Journal*, **24**, 4, 686(1978).
7. Microsoft Corporation : Microsoft fortran optimizing compiler for the MS-DOS operating system version 4.0, Microsoft Corporation(1987).
8. Microsoft Corporation : Microsoft codeview window-oriented debugger for the MS-DOS operating system, Microsoft Corporation(1987).
9. 김우용 : 완벽 Lotus 123 release2, 영진출판사 (1988)
10. Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A. and Vetterling, W. T. : Numerical recipes, Cambridge University Press, 553(1986)
11. IMSL Inc. : IMSL library, Problem-solving software system for mathematical and statistical fortran programming, IMSL Inc.(1984)