

효모 배양을 위한 발효공정의 최적화 및 적응제어

백 승 윤 · 유 영 제 · *이 광 순
서울대학교 공과대학 화학공학과
*서강대학교 화학공학과

Optimization and Adaptive Control for Fed-Batch Culture of Yeast

Seung-Yoon Peck, Young-Je Yoo, and Kwang-Soon Lee*
Department of Chemical Engineering, Seoul National University
*Department of Chemical Engineering, Sogang University

ABSTRACT

The optimal glucose concentration for the high-density culture of recombinant yeasts was obtained using dynamic simulation. An adaptive and predictive algorithm complimented by the rule base was proposed for the control of the fed-batch fermentation process. The measurement of process variables has relatively long sampling period and relatively long time delay characteristics. As one of the solution on these problems, prediction techniques and rule bases were added to a classical recursive identification and control algorithm. Rule bases were used in the determination of control input considering the difference between the predicted value and the measured value.

A mathematical model was used in the estimation and interpretation of the changes of state variables and parameters. Better performances were obtained by employing the control algorithm proposed in the present study compared to the conventional adaptive control method.

서 론

최근의 분자 생물학 및 생물공학의 발전에 따라 많은 생물공학 제품이 산업화되기 시작하였으며, 미생물을 이용한 생물공정의 최적화 및 제어에 대하여 많은 연구가 수행되고 있다. 그러나, 생물공정은 일반적으로 비선형성과 시간의 변화에 따른 상태의 변화가 크다는 특성을 가지고 있으므로, 실제 광범위한 공정 조건에서 적용할 수 있는 모델식을 얻기에는 어려움이 있다. 따라서 화학공정에 많이 쓰이는 제어 방법인 비례-미분-적분 제어나 Kalman filtering과 같은 선형 제어 및 상태추정 방법들에 의한 생물공정의 제어에는 한계가 있어 방법의 개선이 요구된다고 하겠다.

효모는 성장요구 조건이 까다롭지 않으며 비교적 높은 비 성장속도를 갖기 때문에 에탄올 생산 공정에서부터 재조합 효모에 의한 특수 단백질의 생산 공정에 이르는 다양한 공정에 이용할 수 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 효모를 이용하는 공정의 생산성은 대부분 반응기내의 효모의 농도에 의존하게 되는데, 고농도의 효모를 얻는데 있어 가장 큰 장애 요인은 대사산물인 에탄올로 인해서 효모의 성장이 저해를 받는다는 것이다. 효모는 산소가 충분한 경우에도 기질의 농도에 따라서 발효가 시작되기도 하고 멈추기도 하는데 이러한 현상을 Crabtree 효과라고 한다(1). 이러한 대사 경로의 변화는 기질(주로 포도당)의 농도에 의존하여 그 값이 70~130 mg/l 사이에 분기점이 있으며(2,3), 그 값보다 높은

경우에는 호기성 발효가 일어나고, 낮은 경우에는 기질 산화 작용만이 일어나는 것으로 보고되어 있다. 따라서 효모 또는 재조합 효모의 고농도 배양을 위한 생산 공정의 효과적인 설계 및 개선을 위해서는 기질농도를 적절히 제어해야 한다.

기질 농도의 적절한 제어에 적합한 배양방식은 fed-batch 배양으로 이에 관한 많은 연구가 수행되어 오고 있다. Aiba 등(4)은 효모의 호기성 발효를 억제하는데 호흡 지수(RQ: respiratory quotient)를 이용하였으며, Wang 등(3)은 미리 결정한 기질 주입 속도와 데이터로 취한 RQ 값으로부터 컴퓨터를 이용하여 feedforward-feedback 제어를 하였다. Peringer와 Blachere(5)는 호흡 지수와 산소 소모 속도로부터 이론적인 최적 기질 주입 속도를 계산하였다. 그러나 이러한 방법들은 기질과 효모, 에탄올 농도의 수치식에 pseudo-steady state를 가정하였고 제어 출력으로 선택한 RQ 값과 제어 입력인 기질 주입속도와와의 관계에 최적화 개념이 들어 있지 않아 시간에 따라 변화하는 반응기의 상태에 적합한 제어라고 볼 수는 없다.

Takamatsu 등(6)은 기존의 비례-미분-적분 제어를 사용하 다변수 제어를 시도하였다. Waterworth와 Swanick(7)는 생물 화학공정에 있어서 적응제어 및 최적화 이론의 유용성을 제시하였으며, Wu 등(8)은 적응제어 개념의 일종인 moving window identification에 의한 pole placement technique을 도입하여 fed-batch에서의 효모의 비성장 속도의 제어를 시도하였다. Takamatsu 등(9)은 model reference adaptive control을 사용하여 효모의 발효공정에 있어서의 상태변수 profile을 최적으로 제어하는 이론을 보고하였다. Williams 등(10)은 자기-동조 제어 방식에 의하여 RQ, CO₂ 농도, DOT(dissolved oxygen tension), 에탄올 농도 등을 제어 출력으로 하고 rpm, 기질 주입속도 등을 제어 입력으로 하여 단일변수 입·출력(SISO)과 다변수 입·출력(MIMO) 제어를 하였다. 이러한 방법들은 비정상 상태이고 비선형적으로 변화하는 반응기의 조건을 고려하였을 때 적합하다고 할 수 있으나, 발효공정이 갖는 변수의 물리적 특성이 고려되어 있지 않고, 제어식에 나타난 행렬이나, pole 등이 물리적 의미 보다는 수학적 의미만으로 선택되었다는 단점을 갖고 있다. 이런 이유로 갑작스런 외란과 변화하는 setpoint에 대한 제어 성능을 알기에 어려움이 있고, 공정 부분과 제어 부분의 연관성 및 특성을 살피기에는 어려움이 있다.

본 논문에서는 비선형적이고 비정상 상태인 발효 공정을 극복하기 위하여 적응제어 방법의 일종인 자기-동조 제어 방식을 기본으로 하고 rule base를 포함하는 적응예측제어 방법을 사용하였다. 본 방법의 예측 알고리즘은

발효 공정이 갖는 단점인 긴 측정 시간 지연 현상을 극복하기 위한 것이며 rule base는 추정시에 나타나는 offset이 제어 결과에 미치는 영향을 줄이기 위한 것이다. 제어의 모델식은 앞의 방법들과는 달리, 발효공정의 물리적 특성을 고려하기 위하여 단순화된 세포농도, 포도당농도, 에탄올농도의 수치식을 직접 제어식으로 선택하였다. 즉, 종래의 방법들에서는 선형화된 제어입력과 출력의 관계식에서 수학적 의미만을 갖는 매개변수를 추정하였으나, 본 방법에서는 이산형태로 표현된 수치식에서 비 성장속도와, 비 포도당 소모속도, 비 에탄올 생성(또는 소모) 속도를 추정하도록 제어 방법을 설계하였다. 이러한 방법은 제어를 하면서 반응기의 상태와 변화속도를 알 수 있으므로 단순한 적응 제어 개념에 경험 법칙을 적용할 수 있어 adaptive learning control이나 지능 제어 시스템으로 발전시키는데 유리하다고 하겠다.

재료 및 방법

사용된 모델식

본 연구에서 모사 데이터의 생성과 최적화에 사용한 모델은 Coppella와 Dhurjati(11)가 보고한 재조합 효모에 의한 hEGF(human epidermal growth factor)의 생산 공정이다. 이 재조합 효모는 생산된 hEGF 전량을 발효액으로 배출하는 것으로 알려져 있다. 이 모델식에는 세포내의 효소의 상태에 따른 대사경로가 고려되어 있다. 이들이 모델에 포함한 효소의 집합은 포도당을 pyruvate로 변환시키는 반응에 관계된 효소군(E_G), pyruvate와 TCA 회로의 반응에 관계된 효소군(E_T), pyruvate에서 에탄올로 변환되는 데에 관계된 효소군(E_L), 그리고 에탄올을 pyruvate로 변환하는 데에 관계된 효소군(E_U) 등이다. 모델식은 Appendix에서 보여주는 바와 같이 Michaelis-Menten 식을 따르는 효소 반응으로 가정되어 포도당 발효에는 E_G와 E_L이, 포도당 산화에는 E_G와 E_T가, 그리고 에탄올 산화에는 E_L와 E_T가 포함된 식으로 표현된다. 효소의 농도식은 포도당 농도의 함수로 되어 있는데, E_G는 constitutive로, E_U와 E_T는 포도당에 대하여 repress되어 있도록, E_L은 induce되어 있도록 구성되어 있다. hEGF의 발현은 constitutive하며 활성도는 100%에 가까운 것으로 보고되어 있다(12).

자기-동조 제어(STR: self-tuning regulator)

발효에 있어서 농도 수치식을 벡터 형태로 표현하면 다음과 같다.

$$\dot{X} = \Lambda \cdot X \quad (1)$$

위의 식에서 X는 상태 변수의 벡터로 세포, 포도당, 그리고 에탄올의 농도이며 이들 변수들은 측정 변수이다. Λ 는 매개 변수의 행렬로 효모의 비성장속도와 에탄올의 비 소모속도 또는 비 생성속도, 그리고 포도당의 비 소모속도, 그리고 포도당의 주입 속도를 포함한다.

$$\dot{X} = (dX/dt, dG/dt, dE/dt)^T \quad (2)$$

$$X = (X, G, E)^T \quad (3)$$

$$\Lambda = (\Lambda_X, \Lambda_G, \Lambda_E)^T \quad (4)$$

$$\text{이때, } \Lambda_X = (\mu - F/V \quad 0 \quad 0) \\ \Lambda_G = (\psi \quad F(F-G_0)/V/G \quad 0) \\ \Lambda_E = (\pi \quad 0 \quad -F/V) \text{ 이다.}$$

위의 식에서 μ, ψ, π 는 각각 효모의 비 성장 속도, 포도당의 비 소모 속도, 에탄올의 비 생성 속도를 나타내며, 이들 값들은 농도, 온도, 용존산소 농도, 및 pH와 같은 상태 변수의 함수이므로 비정상상의 발효 조건에서는 일정하게 유지되지 않는다. 이와 같이 시간에 따라서 비선형적으로 변하는 공정에서는 일정한 크기의 gain을 갖는 PID(비례-미분-적분) 제어기에 의한 제어는 적합하지 않지만 적응 제어 방법은 이처럼 비선형적이고 비정상상태인 공정의 제어에 적합한 방법이다. 본 논문에서 사용한 자기 동조 제어방법은 적응 제어 방법의 일종으로 연속적으로 변하는 공정의 조건을 인식(identification)하여 제어식의 매개 변수를 추정하면서 제어입력을 결정하는 것을 기본 알고리즘으로 한다.

제어의 목적은 대사물인 hFGF의 생산성을 최적화하는 것이며, 이를 위하여 적절한 포도당의 주입속도를 정하여 포도당의 농도를 원하는 setpoint로 유지한다. 적응 제어 방법은 인식(변수추정 포함)과 제어의 두부분으로 나누어 생각할 수 있다. 인식, 즉 매개 변수의 on-line 추정은 적응제어에서 가장 중요한 요소 중의 하나로 매개 변수 추정의 정확도는 제어 전체의 성능을 좌우한다. 또한 적응제어 시스템에서 공정의 매개 변수는 연속적으로 변화하므로 재생적인(recursive) 추정 방법이 요구된다. 이러한 목적에 적합한 방법에는 recursive least squares, successive least squares, maximum likelihood 방법 등이 있는데 본 논문에서는 recursive least squares 방법을 사용하였다. 이 방법은 추정의 안정성과 적당한 식 변환으로 역행렬이 소거되어 추정시간이 짧으며, noise가 상대적으로 적기 때문에 가장 광범위하게 사용되는 방법 중의 하나이다.

측정 변수(observed variable)의 식이 식 (5)와 같을 때, recursive least squares 방법은 식 (6), (7), (8)로 요약된다.

$$Y(i) = \phi_1(i)\theta_1 + \phi_2(i)\theta_2 + \dots + \phi_n(i)\theta_n \\ = \Phi(i)^T \Theta \quad (5)$$

$$\Theta(i) = \Theta(i-1) + \Delta(i) \cdot (Y(i-1) - \Phi^T(i-1)\Theta(i-1)) \quad (6)$$

$$\Delta(i) = P(i-1)\Phi(i-1) \cdot (\lambda I + \Phi^T(i-1)P(i-1)\Phi(i-1))^{-1} \quad (7)$$

$$P(i) = (P(i-1) - P(i-1)\Phi(i-1) \cdot (\lambda I + \Phi^T(i-1)P(i-1)\Phi(i-1))^{-1} \cdot \Phi^T(i-1)) / \lambda \quad (8)$$

i는 시간의 단계를 나타내며, Θ 는 매개 변수의 벡터, P는 information matrix로 제어 시작 때에 사용자가 정의하는 값이며, Y는 측정 변수의 벡터이다. 위의 식은 (i-1) 번째와 (i) 번째의 측정 변수의 데이터, (i-1) 번째에 추정된 매개변수의 값으로부터 (i) 번째의 매개변수의 값을 추정할 수 있음을 의미한다. 즉 어떤 시간 단계에서의 매개변수의 추정은 그 전 단계의 측정 변수 데이터와 매개 변수 값에 의해 구해지며, 이렇게 추정된 매개변수는 제어 입력의 결정식에 사용된다.

식 (1)을 element form으로 표현하면 식 (9), (10), (11)과 같다.

$$X_{i+1} = X_i + \Delta t(\mu_{\text{overall},i}X_i - (F_i/V_i)X_i) \quad (9)$$

$$G_{i+1} = G_i + \Delta t(\xi_{\text{overall},i}X_i + (F_i/V_i)(G_0 - G_i)) \quad (10)$$

$$E_{i+1} = E_i + \Delta t(\pi_{\text{overall},i}X_i + (F_i/V_i)E_i) \quad (11)$$

농도 수치식 (9), (10), (11)을 식 (6), (7), (8)과 결합하면 매개 변수 $\mu_{\text{overall},i}, \xi_{\text{overall},i}, \pi_{\text{overall},i}$ 를 recursive least square 방법에 의하여 추정하는 식은 다음과 같이 유도된다.

$$\mu_{i+1} = \mu_i + \Delta t P_1 X_i (X_{i+1} - X_i - \Delta t \mu_{i+1} X_i + \Delta t (F_i/V_i) X_i) \quad (12)$$

$$\xi_{i+1} = \xi_i + \Delta t P_1 X_i (G_{i+1} - G_i - \Delta t \xi_{i+1} X_i + \Delta t (F_i/V_i)(G_0 - G_i)) \quad (13)$$

$$\pi_{i+1} = \pi_i + \Delta t P_1 X_i (E_{i+1} - E_i - \Delta t \pi_{i+1} X_i + \Delta t (F_i/V_i) E_i) \quad (14)$$

이때,

$$P_{1i} = \frac{P_1}{\lambda_1} \left(1 - \frac{(\Delta t X_{i+1})^2 P_1}{\lambda_1 + (\Delta t X_{i+1})^2 P_1} \right)$$

기질 주입 속도를 제어 입력(control input)으로 하고, 포도당의 농도를 출력 변수로 하여 포도당 농도의 setpoint 를 G^* 라고 하면 매 step에서 G_{i+1} 은 G^* 에 해당하므로 식 (15)와 같은 기질 주입 속도 결정식을 얻는다.

$$F_i = \frac{G^* - G_i - \xi_i X_i \Delta t}{\Delta t / V_i (G_0 - G_i)} \quad (15)$$

따라서 (i) 번째 시간에서 (i+1) 번째까지의 제어 입력은 사용자가 정한 setpoint와 (i) 번째 시간에 추정된, 그리고 (i) 번째 시간에 데이터로 받아들인 제어 출력에 의해 결정된다.

적응제어 알고리즘의 개선

앞에서 설명한 단순한 적응제어 방법은 수치해석적으로 매개변수를 추정하고 제어입력을 결정하므로 제어의 안정성은 sampling frequency의 크기에 영향을 받아 그 값이 클수록 제어의 성능은 좋아진다. 그러나, 실제의

발효공정에 적응제어 방법을 적용하면, 제어에 필요한 측정변수들(효모, 포도당, 에탄올 농도 등)을 측정하는 데에는 일정시간이 소요되고, 비슷한 크기의 time delay가 발생하여, sampling frequency를 크게 하는 데는 한계가 있다. 특히 반응기내의 효모농도가 높을 때에는 포도당이나 에탄올, 그밖의 생성물의 농도변화가 심해져 공정의 상태 변화가 심해지므로 안정된 제어는 불가능해진다. 따라서 어떤 시간 단계에서 제어 입력을 결정하는 데에 사용되는 효모 및 포도당의 농도는 한 단계 이전의 것이 된다. 특히 반응기의 효모농도가 높을 때에는 포도당이나 에탄올, 그밖의 생성물의 농도 변화가 커지므로 time delay의 문제는 제어 성능에 심각하게 영향을 주게 된다. 이러한 난점을 극복하고 time delay 효과에 적절히 대처하기 위해 본 연구에서는 이산 시간대의 추정을 포함하는 적응 예측제어(predictive and adaptive control with approximation) 알고리즘을 개발하였다. 본 알고리즘은 적절한 크기의 mesh에서의 discrete time approximation과 rule base를 통해 제어의 robustness와 stability를 보장

할 수 있으며, prediction을 통해 time delay에 의한 제어의 불안정성을 최소화할 수 있다.

Fig. 1에서와 같이 상태변수(측정 변수: observed variable)의 sampling period가 T 시간이라면 parameter의 추정은 T 시간 간격으로 이루어진다. 그러나 제어 입력은 T 시간 간격으로 생성시키지 않고 T 시간을 세분한 간격인 αT ($0 < \alpha < 1$) 시간마다 생성하도록 하였다. 즉 T 시간 전까지 받아들였던 상태 변수의 데이터로부터 매개 변수를 추정하여 αT 시간 전까지 받아들였던 상태 변수의 데이터로부터 매개 변수를 추정하여 αT 간격마다의 상태변수를 추정하고 T 시간 동안에는 상수로 고정된 매개 변수와의 결합에 의해 αT 마다의 제어 입력을 결정한다. 따라서 sampling period가 αT 인 경우보다는 다소 떨어지지만 거의 그에 근접하는 안정성을 얻을 수 있게 된다. 한편 time delay에 의해 컴퓨터는 T 시간 이전의 상태변수 데이터만을 인식할 수 있으므로 어떤 시간대의 제어입력 생성은 추정과 예측에 의존하게 된다. 따라서 T 시간마다 이루어지는 매개 변수의

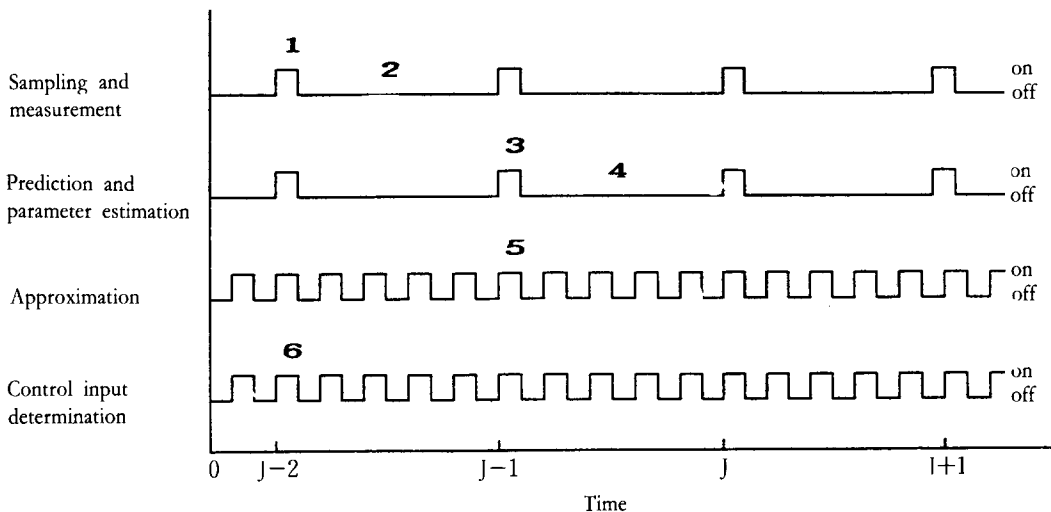


Fig. 1. The schematic diagrams representing sampling, prediction, estimation, and control in each time interval during the fed-batch fermentation.

- 1 : sampling point at time $(J-2)$;
- 2 : time delay to measure $(J-2)$ th data;
- 3 : prediction of state variable and parameter estimation at time $(J-1)$ from the data of $(J-2)$;
- 4 : parameters are assumed to be constant during the period $(J-1)-(J)$;
- 5 : estimation of state variables during the period $(J-1)-(J)$ per αT from the value of observed variable at time $(J-2)$;
- 6 : determination of control input from estimated parameter at time $(J-2)$ and estimated state variables per αT .

추정은 적응적인 방법에 의존하므로 오차가 적으나 αT 시간마다의 상태변수의 추정은 T 시간동안마다 바뀌는 매개 변수에 대해 선형적으로 이루어지므로 오차가 발생할 수 있다. 이것은 제어입력 결정식에 있어서의 오차 발생의 요인이 되어 출력에는 offset으로 나타나게 된다. 이러한 오차를 줄이기 위하여 적당한 rule-base가 필요한데 어떤 step에서의 제어 입력을 결정하는데 있어서 한 step 전의 setpoint와 추정된 제어출력 간의 오차를 고려하였다. 즉, 한 step전에 추정된 출력의 상태와 setpoint (off-set)의 상대 오차가 20%보다 크면 그 step의 제어 입력을 계산된 값에서 20% 만큼 줄이거나 20% 만큼 증가시키는 rule-base algorithm을 사용하였다.

```

· IF (G*[J-1]-G[J-1]estimated from J-2) / G*[J-1] > 0.2
  THEN F[J] := 0.8F[J]*
· IF (G*[J-1]-G[J-1]estimated from J-2) / G*[J-1] < -0.2
  THEN F[J] := 1.2F[J]*
    
```

여기에서 J 는 시간의 단계를, G 는 포도당의 농도를, G^* 는 포도당 농도의 setpoint를, F 는 포도당의 주입 속도를 나타낸다.

모사 방법

Coppella와 Dhurjati(11)에 보고된 모델식과 조건을 사용하여 적응제어의 동적 모사를 하였다. 모델식으로부터 세포농도, 에탄올 농도, 포도당 농도를 생성하고, 그 값에 5%의 random noise를 가하여 동적 모사의 측정값으로 하였다. 이로부터 비 성장속도와 비 소모속도를 추정하여 포도당 주입속도를 결정하였다. 이때, 데이터 생성 간격은 10분으로 하였고, 포도당 농도의 setpoint는 0.1에서 1.3 g/l 까지 0.01 g/l 간격으로 변화시키며 각 경우에 대해 모사를 하였다.

이렇게 결정한 setpoint로 적응제어 알고리즘을 적용하였고 이때 10분의 시간지연을 갖는 시스템의 경우에서의 제어성능을 알아보았다. 또한 시스템의 외란에 대한 제어의 성능을 알아보기 위하여 setpoint의 변화와 발효액 내 포도당 농도의 갑작스런 변화가 있는 경우에 대한 제어성능을 모사 하였다.

결과 및 검토

회분식 배양의 특성

모델식에 나타나 있는 변수들의 여러 특성들을 알아보기 위해 회분식 배양의 경우에 대해 모사를 하였다. Fig. 2에서와 같이 약 6시간 후에 포도당이 완전히 소모

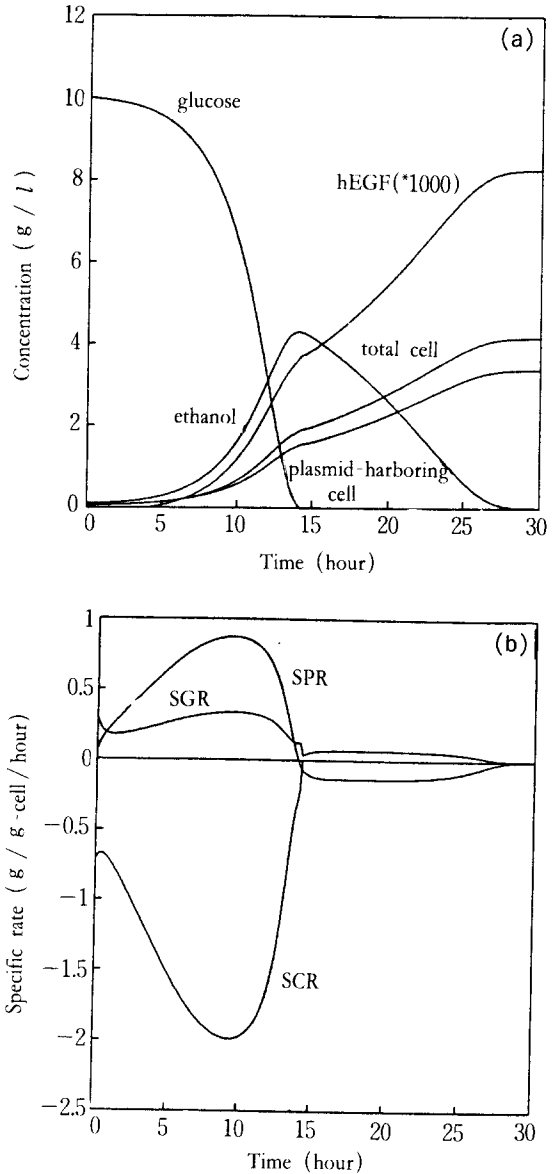


Fig. 2. Simulations of the batch fermentation.

- (a) cell, glucose, ethanol, hEGF concentrations vs. time
- (b) specific rate profile during the growth of yeast
- SGR: specific growth rate
- SPR: specific ethanol production(or consumption) rate
- SCR: specific glucose consumption rate.

되며, 그 이후는 에탄올의 분해에 의해 효모의 성장이 일어난다. 또한 hEGF는 약 3시간 반 정도의 delay를 보이고 생성이 시작된다. 효모는 5시간 이후 즉 포도당 농도 1.5 g/l 이하부터 포도당의 소모 대사경로에서 급격히, 에탄올의 분해 대사경로로 들어가게 된다. 에탄올의 생성은 포도당이 완전히 소모되기 직전인 0.2 g/l에서 멈추어 효모에 의한 에탄올의 분해가 시작된다. 따라서 포도당의 농도 0~1.5 g/l 범위에서 효모는 에탄올과 포도당의 분해를 동시에 한다. 세포의 비성장속도는 포도당 분해 시에는 0.2 h⁻¹ 정도이나, 포도당이 고갈되고 에탄올의 분해가 시작된 이후에는 0.1 h⁻¹로 느려진다. 이러한 결과는 다른 보고들(1, 11, 13, 14)과 일치한다.

포도당 농도 setpoint의 최적화

효모의 대사 경로는 포도당 및 산소의 농도에 영향을 받으며, 특히 산소가 충분히 공급되는 경우에는 포도당의 농도가 효모의 성장 및 에탄올의 생성에 가장 큰 영향을 준다. 그럼에도 아직까지 효모의 대사경로가 완전히 밝혀지지 않아 어떠한 농도의 포도당이 존재할 때, 또는 어떤 식으로 그 값을 변화시키는 것이 효모의 성장에 최적인가를 얻는 데에는 어려움이 있다. 간단하면서도 효모의 모든 대사 경로를 고려하는 모델식의 설정은 매우 중요하며, 이를 이용한 최적의 포도당 농도를 얻는 것은 효모를 이용한 발효 공정의 생산성 향상에 큰 기여를 할 것이다.

포도당, 효모, 에탄올의 초기 농도를 각각 2, 3, 0 g/l로 하고, 초기의 발효액의 부피를 3 l로 한 fed-batch system에 대하여 포도당 농도의 setpoint를 0.1에서 1.3 g/l까지 변화시켜 가며 20시간의 조업시간 동안 동력학적 모사를 하였다. Fig. 3에서와 같이 hEGF의 생산성은 포도당의 농도를 0.35 g/l 정도로 하였을 때가 가장 높은 4.2 mg/l/h를 나타냈다. hEGF의 생산과 가장 밀접한 관계를 갖는 효모는 포도당 농도 0.3~0.4 g/l에서 가장 생산성이 우수한 것으로 나타났고, 에탄올의 농도는 포도당의 농도를 높게 유지할 수록 그 생산성이 증가하는 경향을 보였다. 포도당의 농도가 너무 낮게 유지될 때에는 glycolysis에 관련된 효소군과 fermentation에 관련된 효소군이 지나치게 억제되어 세포의 비 성장속도가 감소하며 그에 따라 효모 및 hEGF의 생산성이 낮고, 포도당의 농도가 너무 높을 때에는 oxidation에 관련된 효소군의 억제 현상으로 세포의 비 성장속도가 감소하여 낮은 생산성을 얻게 되는 것이라 생각된다. 본 모사에 사용된 모델은 에탄올이나 초산과 같은 부산물에 의한 inhibition이 고려되어 있지 않는데,

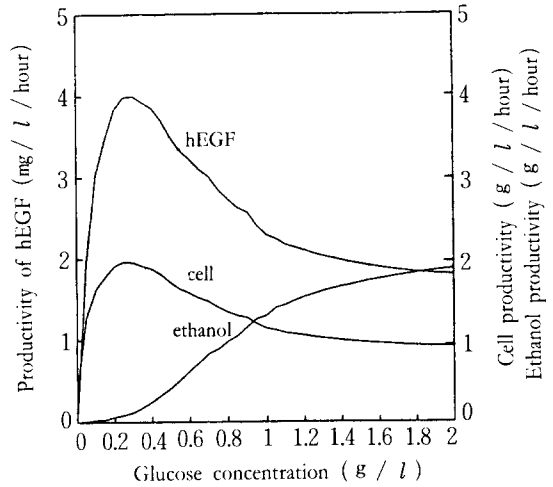


Fig. 3. The optimization of the productivity.

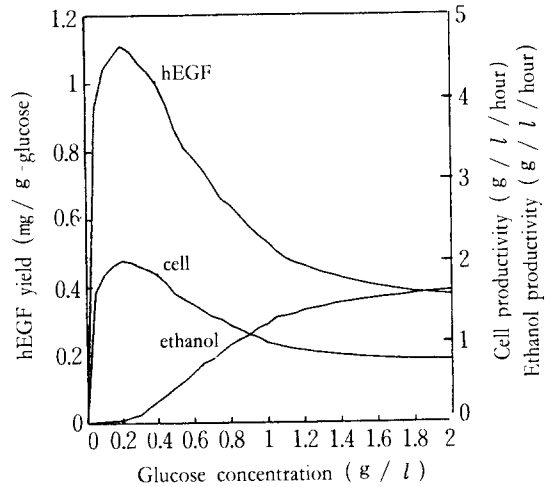


Fig. 4. The optimization of the yield.

에탄올 등의 부산물에 의한 inhibition이 크다는 것은 널리 인정받고 있는 사실이다(15). 따라서 이러한 점을 감안한다면 fed-batch system의 높은 포도당의 농도 setpoint의 경우에는 축적된 부산물들에 의한 inhibition 효과가 커지므로 실제로는 모사 결과보다도 낮은 hEGF의 생산성을 보일 것으로 예상된다.

Fig. 4에 hEGF, 효모, 에탄올의 수율 및 포도당의 소모량을 나타내었다. hEGF 및 효모의 수율은 포도당의 농도가 낮을수록 높은 것으로 나타났으며, 포도당 농도 0.3 g/l 이상에서는 수율의 감소 기울기가 더욱 증가

하는 결과를 얻었다. 포도당의 농도를 0.5 g/l로 하였을 때 효모의 수율은 이론상 최대치인 0.5 g/l를 결과로 얻었다. 에탄올의 수율은 포도당의 농도 setpoint를 높게할 수록 높게 나타났는데 포도당 농도가 0.3 g/l 미만일 때에는 에탄올의 생성이 억제되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 과량으로 존재하는 포도당은 효모의 성장이나 hEGF의 생산보다는 에탄올의 생성에 사용되는 것임을 반영한다. 이러한 해석은 최근 Alexander 등 (15)이 발표한 결과와도 같다. 생산성과 수율을 종합하였을 때 hEGF의 fed-batch system에 의한 생산에 있어 최적의 포도당 농도 setpoint는 0.3 g/l임을 알 수 있었다.

적응인식 및 제어(adaptive identification & control)

먼저 단순한 적응 제어 방법을 사용하여 10분의 시간 지연이 있는 경우에 대하여 모사하였다. Fig. 5에서와 같이 매개변수의 추정은 실제의 값을 따라가기는 하지만 fluctuation이 있으며 세포의 농도가 높아져 반응기내의 상태 변화가 빨라질수록 불안한 추정 상태를 보였으며 포도당 주입속도의 변화가 매우 심하였다. 이것은 종래의 적응제어 방법만으로는 10분의 time delay 및 sampling period를 갖는 시스템의 안정된 제어가 불가능하다는 것을 의미한다.

앞에서 설명한 rule-base와 2분마다의 discrete time approximation, 그리고 데이터의 예측 생성을 조합한 새로운 알고리즘을 사용하였을 때에는 Fig. 6에서와 같이 포도당의 비 소비속도의 추정은 거의 fluctuation이 없

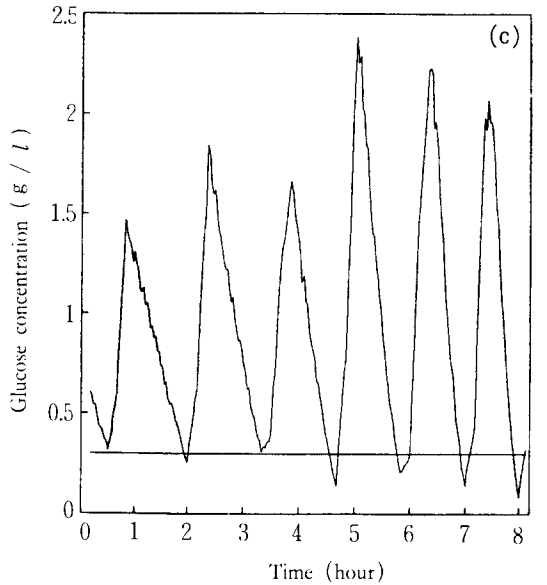
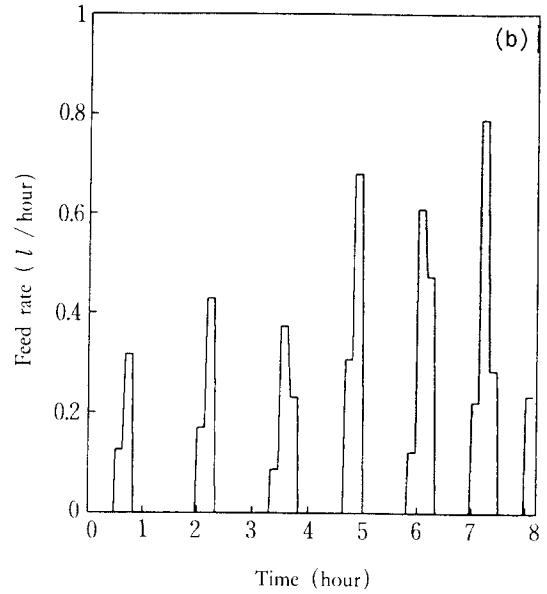
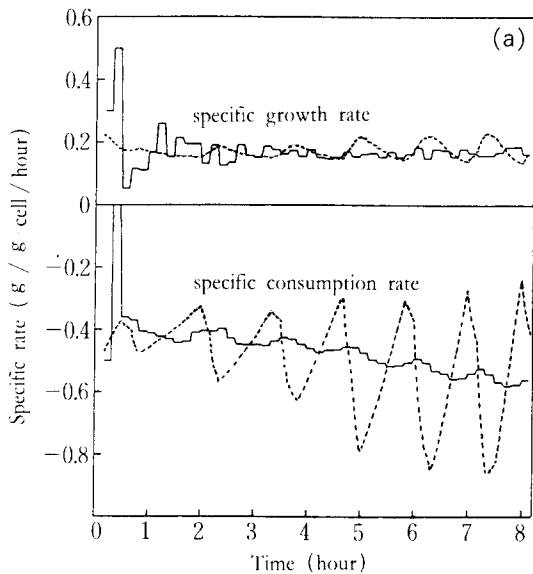
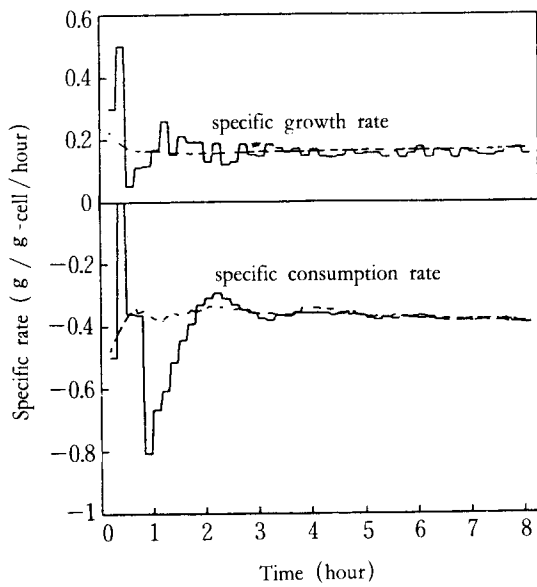
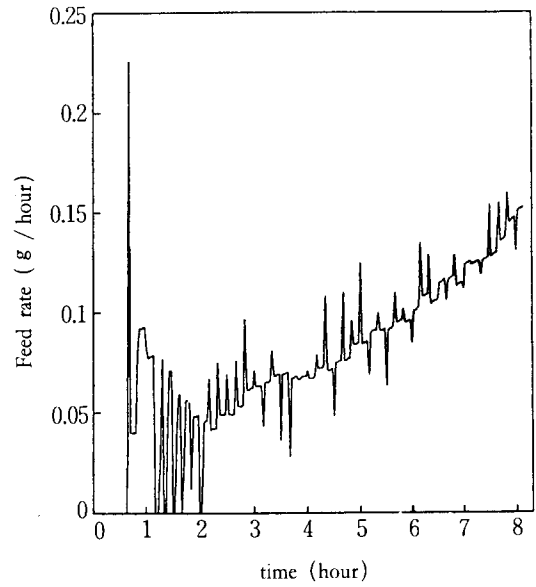


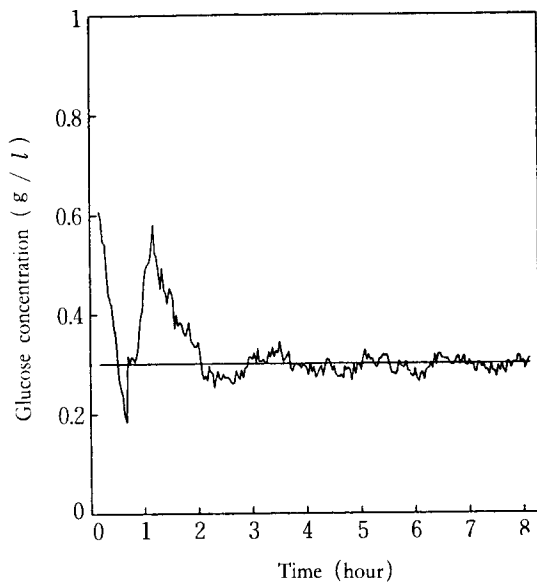
Fig. 5. Control results using conventional self-tuning regulator.
 glucose setpoint: 0.3 g/l ; noise: 5%
 (a) parameter estimation: ----- true value, ——— estimated value
 (b) feed rate, (c) glucose concentration.



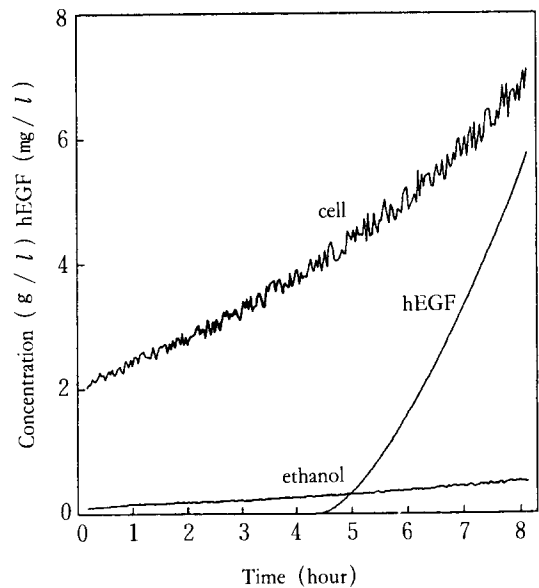
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 6. Control results using proposed control method. setpoint: 0.3 g / l; noise: 5%

(a) parameter estimation: ----- true value, ——— estimated value,
 (b) feed rate, (c) glucose concentration, (d) concentration profile.

고, 안정성도 좋으나 효모의 비 성장속도의 추정은 약간의 오차가 나타났다. 그러나 rule-base를 거쳐서 결정된 제어 입력(포도당 주입속도)은 제어출력(포도당 농도)의 안정성과 robustness를 향상시킨 결과를 얻었다. Fig. 6(d)는 이 방법에 의한 제어를 하였을 때 얻어진 효모, 에탄올, hEGF의 농도곡선이다. 에탄올은 약 2 g/l, hEGF는 약 9.5 g/l를 8시간만에 얻었다.

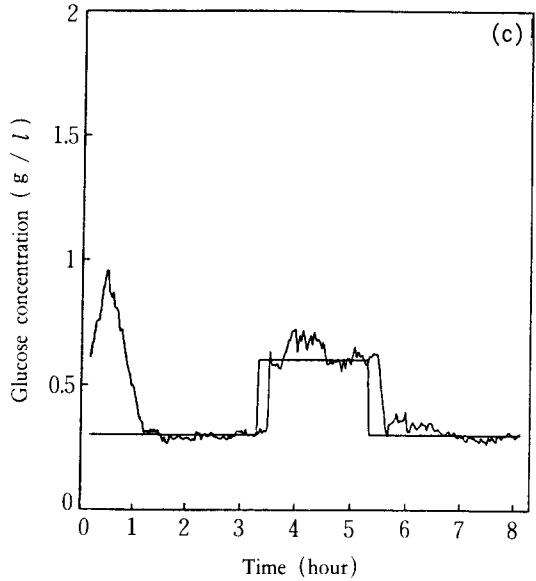
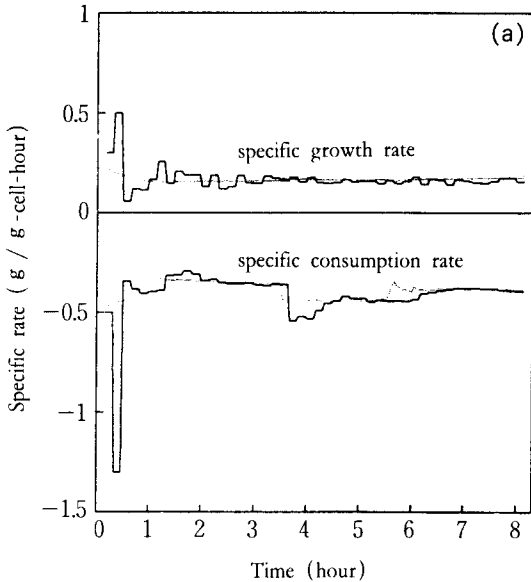
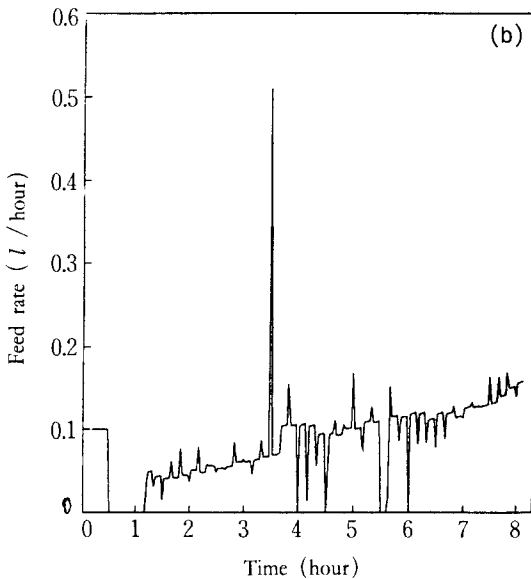


Fig. 7. Control results using proposed control method with setpoint change(servo problem).

setpoint change: 0.3 g/l \Rightarrow 0.6 g/l \Rightarrow 0.3 g/l; noise: 5%

(a) parameter estimation: ----- true value, ——— estimated value,
 (b) feed rate, (c) glucose concentration.



포도당 농도의 setpoint 변화(servo problem)에 대한 제어 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 포도당의 농도 setpoint는 초기 3시간까지는 0.3 g/l로 유지하였고, 그 이후 0.6 g/l로 하였고, 다시 2시간이 지나고 0.3 g/l로 하였다. setpoint에 대한 추종은 약 1시간 경과한 이후부터 잘 이루어질 수 있는 것으로 나타났다.

결 론

효모의 성장 및 hEGF의 생산을 나타내는 식으로부터 동력학적 모사를 통하여 최적의 포도당 농도를 구할 수 있었다. 최적의 포도당 농도는 0.3 g/l이며 이러한 농도로 유지하면 hEGF의 생산성은 4 mg/l/h를 얻을 수 있으며 수율은 1.1 mg/g-glucose를 얻을 수 있음을 알았다. 이 값은 회분식 배양에 의한 경우에 비하여 약 30% 향상된 값이다.

Sampling period 및 measurement time delay가 긴 발효

시스템에 안정성과 견고성이 우수한 제어방법을 개발하였다. 이 방법은 종래의 적응제어 방법으로는 제어 불가능한 경우에도 안정된 제어성능을 나타냈다. 이러한 제어 방법은 발효공장 이외에도 다른 생물화학 공정에 응용이 가능하며 발효의 매개변수를 온라인으로 추정할 수 있으므로 전문가 시스템의 knowledge base로 응용이 가능할 것으로 기대된다

요 약

제조업 효모를 고농도로 배양하기 위한 공정의 동력학적 모사를 통하여 생산성을 최대화 할 수 있는 최적의 포도당 농도를 구하였다. 발효공정의 상태변수들을 측정하기 위하여는 비교적 긴 sampling period와 time delay를 고려해야 하므로 이러한 난점을 극복하기 위하여 전통적인 반복 인식 및 제어 방법에 예측 알고리즘과 Rule base를 포함시켜 제어하였다. Rule base는 한 단계 전의 출력 변수의 예측치와 측정치와의 차이를 고려하여 그 단계의 제어 입력의 결정에 영향을 주도록 하였다. 또한 상태변수 및 매개변수들의 변화를 정성적으로 추정·해석할 수 있는 수학적인 모델을 사용하였다. 그 결과 전통적인 적응제어 방법만을 사용한 경우보다 우수한 성능을 보이는 제어 결과를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구를 지원하여 주신 (주)럭키에 감사드립니다.

NOMENCLATURE

Λ : parameter matrix of state equation
 Λ_X : row vector of matrix Λ for yeast
 Λ_G : row vector of matrix Λ for glucose
 Λ_E : row vector of matrix Λ for ethanol
 E : ethanol concentration [g/L]
 F : feed rate of glucose solution [L/hour]
 G : glucose concentration [g/L]
 G^* : setpoint of glucose concentration [g/L]
 G_0 : glucose concentration in feed [g/L]
 Pr : hEGF productivity [g/L/hour]
 Δt : time interval [hour]
 V : volume [L]
 X : column vector of state variables
 X : yeast concentration [g/L]
 Y : observed variable

Greek Letters

Δ : matrix for recursive identification
 Θ : parameter vector for recursive identification
 θ : parameter for recursive identification
 λ : forgetting factor
 μ : specific growth rate of yeast [hour⁻¹]
 π : specific production rate of ethanol [g / g_{dcw} / hour]
 P : information matrix for recursive identification
 Φ : know function vector for recursive identification
 ϕ : know function for recursive identification
 ψ : specific consumption rate of glucose [g / g_{dcw} / hour]

REFERENCES

1. H. K. von Meyenburg(1969), *Arch. Microbiol.*, **66**, 289.
 2. H. Y. Wang, C. L. Cooney, and D. I. C. Wang(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 68.
 3. H. Y. Wang, C. L. Cooney, and D. I. C. Wang(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 975.
 4. S. Aiba, S. Nagai, and Y. Nishizawa(1976), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001.
 5. P. Peringer and H. T. Blachere(1979), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **9**, 20.
 6. T. Takamatsu, S. Shioya, M. Shiota, and T. Kitabata (1979), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **9**, 283.
 7. G. Waterworth and B. H. Swanick(1981), *Trans. Inst. Measure Control*, **3**, 39.
 8. W. T. Wu, K. C. Chen, and H. W. Chiou(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 756.
 9. T. Takamatsu, S. Shioya, and Y. Okada(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1675.
 10. D. Williams, P. Yousefpour, and E. M. H. Wellington (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 631.
 11. S. J. Coppela and P. Dhurjati(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 976.
 12. S. J. Coppela and P. Dhurjati(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 356.
 13. J. P. Barford and R. J. Hall(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1735.
 14. M. Rieger, O. Käppeli and A. Fichter(1983), *Gen. Microbiol.*, **129**, 653.
 15. M. A. Alexander, T. W. Chapman, and T. W. Jeffries (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 478.
- (Received; February 12, 1991, Accepted; April 30, 1991)

APPENDIX

데이터 생성 모델식(II)

Mass Balance

효모

$$\frac{dX}{dt} = X - \frac{F}{V} \cdot X \dots\dots\dots (\text{A-1})$$

$$\frac{dX_R}{dt} = \mu X_R(1-P) \dots\dots\dots (\text{A-2})$$

$$\frac{dX_F}{dt} = \mu(X_F + X_R P) \dots\dots\dots (\text{A-3})$$

포도당

$$\frac{dG}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (G_0 - G) - (-r_G) \dots\dots\dots (\text{A-4})$$

에탄올

$$\frac{dE}{dt} = -(-r_E) - \frac{F}{V} \cdot E \dots\dots\dots (\text{A-5})$$

제품 hEGF

$$\frac{dH}{dt} = r_P - \frac{F}{V} \cdot H \dots\dots\dots (\text{A-6})$$

Specific Enzyme Synthesis Rate

$$\mu = (r_1 + r_2 + r_3) / X \dots\dots\dots (\text{A-7})$$

ADH-I 효소군

$$\nu_1 = k_{A1} Q_1 (\mu + k_{1M}) \dots\dots\dots (\text{A-8})$$

$$dE_1 / dt = \nu_1 - k_1 E_1 - \mu E_1 \dots\dots\dots (\text{A-9})$$

ADH-II 효소군

$$\nu_{II} = k_{AII} Q_{II} (\mu + k_{IIM}) \dots\dots\dots (\text{A-10})$$

$$dE_{II} / dt = \nu_{II} - k_2 E_{II} - \mu E_{II} \dots\dots\dots (\text{A-11})$$

TCA 효소군

$$\nu_T = k_T Q_T (\mu + k_{TM}) \dots\dots\dots (\text{A-12})$$

$$dE_T / dt = \nu_T - k_3 E_T - \mu E_T \dots\dots\dots (\text{A-13})$$

Rate Expressions

$$r_1 = \frac{k_1 E_G E_1 G}{K_1 + G} X \dots\dots\dots (\text{A-14})$$

$$r_2 = \frac{k_2 E_G E_T G}{K_2 + G} X \dots\dots\dots (\text{A-15})$$

$$r_3 = \frac{k_3 E_{II} E_T E}{K_3 + E} X \dots\dots\dots (\text{A-16})$$

$$(-r_G) = a_1 r_1 + a_3 r_2 \dots\dots\dots (\text{A-17})$$

$$(-r_E) = a_4 r_3 - a_2 r_1 \dots\dots\dots (\text{A-18})$$

$$r_P = (k_{P1} X + k_{P2} \mu X) R \xi / (n_0 + \xi) \dots\dots\dots (\text{A-19})$$

Plasmid Segregation

$$R = X_R / (X_R + X_H) \dots\dots\dots (\text{A-20})$$

$$P = \left(\frac{1}{1+zf} \right) 2C + \left(\frac{zf}{1+zf} \right) 2C \dots\dots\dots (\text{A-21})$$

$$f = 1 - 2\mu \dots\dots\dots (\text{A-22})$$

Induction and Repression Ratios

ADH-I 효소군

$$Q_1 = \frac{1 + k_{E1} q_G^m}{1 + k_{E1} q_G^m + k_{1b}} \dots\dots\dots (\text{A-23})$$

ADH-II 효소군

$$Q_{II} = \frac{1 + k_{EII} q_G^n}{1 + k_{EII} q_G^n (1 + k_{IIb})} \dots\dots\dots (\text{A-24})$$

TCA 효소군

$$Q_T = \frac{1 + k_{ET} q_G^o}{1 + k_{ET} q_G^o (1 + K_{Tb})} \dots\dots\dots (\text{A-25})$$

$$q_G = (a_1 r_1 + a_3 r_2) / X \dots\dots\dots (\text{A-26})$$