

## *Kruyveromyces marxianus*의 발효상태 및 대사 양론식 추정

류 두 현

전주대학교 이공대학 미생물학과

### Estimation of Fermentation State and Metabolic Stoichiometry of *Kruyveromyces marxianus*

Doohyun Ryoo

Department of Microbiology  
Jeonju University, Jeonju,  
Jeonbuk 560-759, Korea

#### ABSTRACT

State variables were estimated for fermentations of *K. marxianus* under various dilution rates and dissolved oxygen concentrations. The number of elementary reaction stoichiometry with fixed coefficients was determined by singular variable decomposition. Stoichiometry with feasible physical meaning was obtained by target factor analysis. States of fermentations were estimated by linear quadratic programming. The process conditions of single cell production to maximize carbon source consumption were suggested.

#### 서 론

세포, 기질, 대사 생성물 등의 농도를 측정할 수 있는 적절한 센서가 부족하여, 발효공정의 제어 및 최적화에 어려움을 겪고 있다. 발효 진행 도중 필요한 정보를 직접 측정할 수 없는 경우, 측정 가능한 정보를 이용하여 요구되는 발효정보를 간접 추정하여야 하며, 이 경우 대사경로 및 양론관계를 정확히 알아야 한다. 일반적으로 발효 진행 도중 생리, 공정 변수가 변화하기 때문에 상대적인 대사경로에 영향을 주어 총괄 양론관계가 변화하여 간접적인 추정에 어려움이 있다. 이러한 생물반응의 상태를 정확히 추정하기 위하여, 양론관계를 정확히 추정하여야 한다.

생물공정 진행 중 양론식 변화 특성을 추정하기 위하여 총괄 양론계수의 변화를 측정 가능한 정보에서부터 직접 추정하는 방법(1-3)과, 각 구성 단위

반응의 양론계수는 고정시키고, 각 단위 반응의 진행도를 추정하는 방식(4-6) 등이 있다. 후자에 속하는 요소분석법(Factor Analysis)은 다성분계의 화학반응, 복잡한 경로의 생화학반응이 일어나는 경우, 총괄 양론식의 양론계수의 변화를 해석 가능한 단위 반응의 진행 정도 변화로 추정하는 방법으로 대사과정의 해석에 효과적으로 사용될 수 있다.

효모는 가용 탄소원의 농도와 산소 공급 상태에 따라서 세포와 알코올의 생산량이 변화한다. 유당이 주성분인 치즈 제조공정의 부산물인 유장은 높은 BOD의 폐수문제를 야기하여 다각적인 활용방안이 모색되어 왔으며, 효모를 사용한 단세포단백질의 생산 등이 연구되어 왔다. 경제성 있는 단세포단백질을 생산하기 위하여, 첫째, 알코올의 생성을 방지하여야 하며, 둘째, 폭기에 따른 원가를 절감하기 위하여 폭기량을 가능한 한 낮게 유지하여야 하므로 적

절한 용해산소농도를 유지하는 것이 필요하다(7).

본 연구는 가용 탄소원의 농도와 산소 공급 상태가 변화하는 경우, *Kruyveromyces marxianus*의 대사 양분식과 발효상태의 변화를 요소분석법을 사용하여 분석하고, 영향을 살펴보는 데 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 방법

#### 균주 및 배지 조성

균주는 *Kruyveromyces marxianus* (NCTC 587)를 계대배양하면서 사용하였다. 1ℓ를 기준으로 하여 유당(20g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4g), 이스트 추출물(1g), Antiform B(0.2g)를 함유하는 배지를 사용하여 배양하였다.

#### 배양

변수는 측정 및 제어가 가능한 5ℓ의 발효조(Biostat E, B. Brown, Germany)에서 회석물과 용존 산소량을 변화시킨 25가지 조건에 대해 발효를 진행하였다. 조건을 변화시킨 후 적어도 10회 이상의 증식 기간이 경과한 후 정상 상태에 도달한 것으로 간주하였다.

#### 발효상태의 측정

세포량은 건조 중량법을 사용하여 측정하였다. 여과지에 세척, 여과된 세포를 105°C에서 건조하여, 더 이상의 중량 감소가 없는 건조 무게를 측정하여 단위 부피당 세포 무게로 환산하였다. 유당과 알코올의 농도는 HPLC로 Fermentation Monitoring column(150×7.5mm, Bio-Rad, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 배지내의 암모니아를 기준으로 한 질소원의 농도는 개선된 micro-Kjeldahl 방법을 이용하여 측정하였다(8). 발효액 5ml를 여과지를 통해 거른 후, 여액 3ml를 취한 후 진한 황산 2ml를 넣어 360°C에서 5분간 가열 분해하였다. 분해 용액에 50% 과산화수소수 10ml를 2ml/min 속도로 천천히 부가하여 완전 표백한 후, 충분히 냉각하여 증류수를 부가해 전체 100ml의 시료 용액을 제조하였다. 이 시료 용액 1ml에 Nessler 시약 1ml와 증류수 10ml를 부가한 후, 비색계를 사용하여 460nm에서 측정하였다. 이와같은 과정을 기지 농도의 bovine serum albumin 용액으로 반복하여 비교 정량하였다. 발효조에서 배출되는 산소와 이산화탄소의 농도

는 Helium을 carrier로 한 gas chromatography를 사용하여, molecular sieve 13x가 충전된 column과 60/80 mesh의 Chromosorb P에 30%의 di-2-ethyl hexyisebacate가 담지되어 충전된 column을 이용하여  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  분리 후 측정하였다. 용해산소 농도는 polarographic probe (Orbi-sphre, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

### 2. 해석방법

본 단원에서는 요소분석법을 사용하여 연속 발효조에서 얻은 데이터를 분석하는 방법에 대하여 설명한다(4).

#### 반응 측정 데이터의 표현

반응이 진행되는 연속 흐름 교반형 발효기(CSTR)에 대한 물질수지식은 일반적으로 다음과 같이 표현된다.

$$\frac{d(V_R C_i)}{dt} = F(C_{if} - C_i) + V_R r_i \quad (1)$$

여기서  $V_R$ ,  $C_i$ ,  $r_i$ ,  $F$ 는 각 발효기의 체적, 일정 성분 농도, 반응속도, 유량속도 등을 나타내며,  $f_i$ 는 입구의 상태를 나타낸다.

정상상태의 경우 (1)식은 다음과 같이 표현된다.

$$r_i = d(C_i - C_{if}) \quad (2)$$

즉, 특정한 공정조건에서 일정 성분의 생성 및 소멸속도는 입구와 출구에서의 농도와 회석속도( $d$ )로부터 계산될 수 있으며 일정하다. 여러 생리조건과 회석속도에서 data를 (2)식을 사용하여 계산한 각 성분의 생성 및 소멸속도로 전환한 후 물질 수지를 행렬식으로 표현하면 다음과 같이 표현된다.

$$D = XN \quad (3)$$

위에서  $D$ 는  $B \times S$ 차원의 측정된 데이터의 행렬로 정상상태의 CSTR의 경우는 각 성분의 생성 혹은 소멸 속도로 표현될 수 있다.  $B$ 와  $S$ 는 측정 데이터 수와 측정 정보의 수를 나타낸다.  $X(B \times R)$ ,  $N(R \times S)$ 은 반응의 전환율(extent)과 양론관계를 나타내며,  $R$ 은 단위 양분식의 수를 나타낸다.

#### 요소분석법

(3)식의 측정된 데이터는 다음과 같이 3성분으로 분해할 수 있다.

$$D = U S V^T \quad (4)$$

여기에서 U(BxB), V(SxS)는 좌, 우 singular matrix이며, S(BxS)는 singular 값이다. (3), (4) 식을 비교하면 다음 관계를 얻을 수 있다.

$$X = U S \tag{5}$$

$$N = V^T \tag{6}$$

$$D = U S V^T = X N = X T^{-1} T N = X_i N_i \tag{7}$$

V 행렬의 각 열은 실험에 의하여 관찰된 양론관계를 나타내며, orthogonal한 각 열의 조작으로 얻어진 행렬은 같은 반응공간(reaction space)에 존재한다(4). 물리적인 의미가 있는 양론관계를 나타내는 행렬은 전환행렬인 T에 의해 전환되어 얻어진다. 위에서 t 첨자는 조작에 의해 변형되어 전환된 것을 의미한다.

**양론식의 결정**

일반적으로 데이터를 singular value decomposition(SVD)하여 구해진 양론식을 직관적으로 이해하기 어렵다. 따라서 해석 가능한 형태의 양론식으로 전환하여야 한다. 해석 가능한 형태로 변환하는 방법은 좌표의 회전을 이용하는 방법(5)과 target test(TT)에 의한 방법 등이 있다. 본 연구에서는 TT법을 사용하였으며 결과식을 보면 다음과 같다(4, 9).

$$N_i = T N \tag{8}$$

$$n^T = t^T N \tag{9}$$

$$t = n_{tar}^T N^+ \tag{10}$$

$$n_i^T = n_{tar}^T P \tag{11}$$

$$P = N^+ N = V V^T \tag{12}$$

(8)-(11)식에서 tar, t는 전환되기 전과 후의 값을 나타내며, n, t는 양론계수와 전환된 행렬의 vector 성분을 나타낸다. + 기호는 Moore-pentose of Pseudo-inverse를 나타낸다(9).

**비측정 상태의 유추(4)**

비측정 상태를 유추하는 결과식은 다음과 같다.

$$D M^T = D_g M_g^T + D_1 M_1^T \tag{13}$$

$$D_g = -(D_g M_g^T) (M_1^T)^+ \tag{14}$$

$$D = [D_g, D_1] \tag{15}$$

위에서 D<sub>g</sub>, D<sub>1</sub>은 측정정보와 유추정보를 포함하는 행렬이고, 첨자 g와 1은 측정, 유추상태를 나타낸다.

**상태변수의 추정**

실험에서 측정된 상태변수는 다음의 선형 제곱법(linear quadratic programing)에 의하여 측정하였다(6).

$$D_{es} = U U^T D \tag{16}$$

여기서 D<sub>es</sub>는 측정된 상태변수의 값이다.

**결과 및 고찰**

**실험 결과**

Table 1은 여러 회석속도와 용존산소농도에서 세포 생성기간의 10배 이상의 시간이 경과하여 정상 상태에 도달한 후 발효조의 입구와 출구에서 측정된 각 성분의 농도이다.

발효기 입구와 출구의 농도 data를 사용하여 각 성분의 단위체적당 생성 및 소멸속도로 계산한 값은 Table 2와 같다. D<sub>ij</sub>는 용해산소농도와 회석속도가 다른 j 조건에서의 i 성분의 생성 및 소멸속도를 나타내는 (3) 식의 D 행렬의 성분값이다.

**비측정 상태변수의 추정**

알맞은 측정 센서가 없는 경우, 측정 가능한 정보로부터 측정하지 못한 성분의 생성 혹은 소모량을 유추하는 것이 필요하다. 액상발효공정 중 생성되거나 소모되는 화합물 중 일반적으로 측정이 불가능한 것의 대표적인 것이 물이다. 액상발효의 경우, 물의 생성 혹은 소모량은 액상 배지중에 포함된 다량의 물의 양에 비하여 미소하기 때문에 많은 경우 무시되어 왔다. 고품발효에서는 생성 혹은 소멸된 물의 양이 고품발효의 중요한 생리학적 조건인 발효 기질 내의 수분 함량의 변화에 큰 영향을 주나, 고체 기질 내 포함된 생성 혹은 소멸되는 물의 양을 직접 측정할 수 없으므로 발효정보로서 수분 함량의 변화를 직접 사용하는 것이 제한된 형편이다(8). 그러나 고체 기질 중 수분의 함량은 중요한 생리학적 변수로 이의 정확한 추정이 필요하다.

본 실험에서 조성이 C, H, O, N 성분으로 구성된 각 측정화합물의 조성 행렬은 다음과 같다.

$$M_k = \begin{pmatrix} \text{cell} & \text{lactose} & \text{EOH} & \text{NH}_3 & \text{O}_2 & \text{CO}_2 \\ 1 & 12 & 2 & 0 & 0 & 1 \\ 1.882 & 22 & 6 & 3 & 0 & 0 \\ 0.550 & 11 & 1 & 0 & 2 & 2 \\ 0.156 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \tag{17}$$

Table 1. The raw data of continuous culture.

DO (%)	D (hr <sup>-1</sup> )	X (g/L)	S (mM)	EOH (mM)	NH <sub>3</sub> (mM)	q <sub>o<sub>2</sub></sub> (mmol/L)	q <sub>c<sub>o<sub>2</sub></sub></sub> (mmol/L)	V (L)	S <sub>0</sub> (mM)
70	0.053	7.93	0.088	0	20.40	68.50	70.42	4	55.03
60	0.106	8.61	0.205	0	25.30	130.40	125.29	4	55.52
60	0.158	8.75	0.438	0	21.35	208.95	210.63	4	56.92
60	0.208	9.08	0.994	0	18.82	263.40	258.92	4	56.65
55	0.254	8.15	4.006	0	21.35	314.59	308.92	4	57.01
50	0.309	7.49	9.649	0	24.23	340.10	332.62	4	56.99
50	0.360	6.67	15.640	0	26.88	344.00	336.78	4	57.23
50	0.405	6.13	20.470	0	29.59	340.05	331.54	4	57.40
55	0.454	4.98	27.780	0	33.76	317.80	310.81	4	57.62
60	0.507	3.95	34.060	0	38.30	277.51	275.02	4	57.74
7.5	0.206	8.96	0.760	1.568	18.35	256.78	259.12	4	56.61
5	0.101	7.66	0.234	0.911	23.00	155.55	151.73	4	57.42
5	0.211	8.57	4.386	0.365	21.41	276.64	289.70	4	57.71
5	0.305	6.43	1.930	70.498	30.23	240.48	332.04	4	57.46
5	0.448	4.56	11.260	90.100	38.18	152.12	281.69	3	58.07
5	0.45	3.18	28.480	50.598	46.00	143.86	235.41	4	58.13
1	0.102	8.70	0.254	2.049	26.47	177.48	180.44	4	57.83
1	0.204	9.44	0.804	1.480	21.27	272.63	278.48	4	57.76
1	0.207	7.99	1.579	40.643	25.23	189.45	244.51	4	57.80
1	0.308	6.61	11.660	47.987	31.70	195.66	263.69	4	57.97
1	0.458	2.14	32.750	60.033	52.82	74.39	203.18	4	58.33
0.7	0.456	2.41	15.350	126.720	52.12	41.93	226.26	3	58.31
0.5	0.206	6.81	2.360	90.049	31.06	104.60	195.42	4	57.93
0.1	0.455	1.39	27.310	105.800	58.18	4.42	158.66	3	58.41
0	0.193	1.51	10.119	174.850	54.94	0	149.02	4	58.38

DO, dissolved oxygen concentration; D, dilution rate; S, lactose; X, cell; EOH, ethanol; q<sub>o<sub>2</sub></sub>, oxygen evolution rate; q<sub>c<sub>o<sub>2</sub></sub></sub>, carbon dioxide production rate; V, working volume; S<sub>0</sub>, lactose(inlet).

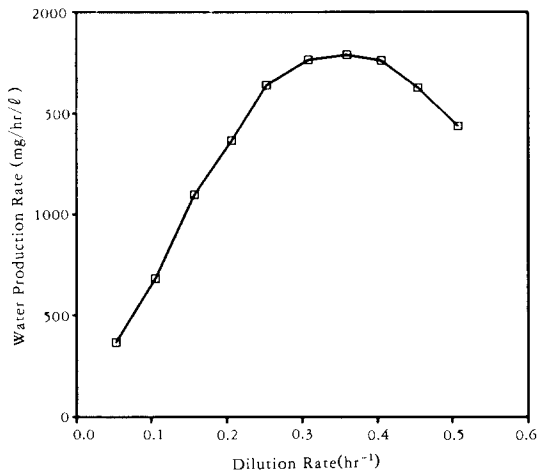


Fig.1. Estimated production rate of water for aerobic fermentation.

각 조건에서 물의 생성 속도는 (14)식을 사용하여 추정할 수 있으며, Fig.1은 호기 상태에서 물의 생성 속도를 추정된 결과를 보여주며, 유침 1에 호기적인 경우 계산 과정을 예시하였다.

발효 중 추정된 물의 생성속도로 구성된 행렬(D<sub>1</sub>)과 직접 측정된 성분의 생성 및 소멸속도로 구성된 행렬(D<sub>2</sub>)을 포함한 발효에 참가하는 구성성분의 행렬식(D)을 사용하여 호기적인 조건과 호기-혐기 전이 조건으로 나누어 SVD을 한 결과, singular variable(S)는 다음과 같다.

$$\text{Aerobic : } S = \text{diag}[19035 \ 422 \ 96 \ 42 \ 27 \ 0 \ 0] \quad (18)$$

$$\text{Aerobic-: } S = \text{diag}[29066 \ 6388 \ 866 \ 179 \ 133 \ 65 \ 0] \quad (19)$$

Anaerobic

우세한 singular value의 수는 대사 정보를 적절히 표현하기 위하여 필요한 고정된 양론계수를 갖는 양론식의 수를 나타낸다. 우세한 singular value의 개수는 전체의 data의 variance를 99.99% 이내에

Table 2. Production and consumption rates of measured components.

$D_X$	$D_S$	$D_{EOH}$	$D_{NH_3}$	$D_{O_2}$	$D_{CO_2}$
420.29	-995.88	0	-36.22	-548.00	774.62
912.66	-2005.28	0	-63.61	-1043.20	1378.19
1382.50	-3052.06	0	-105.43	-1671.60	2316.95
1888.64	-3959.15	0	-147.73	-2107.20	2848.16
2070.10	-4604.35	0	-169.48	-2516.72	3398.08
2314.41	-5002.90	0	-191.05	-2720.80	3658.78
2401.20	-5120.56	0	-206.37	-2752.00	3704.58
2482.65	-5115.17	0	-213.50	-2520.40	3646.94
2260.92	-4633.20	0	-207.15	-2542.40	3418.89
2002.65	-4105.97	0	-192.20	-2220.08	3025.22
1845.76	-3934.74	14.82	-147.96	-2054.24	2850.36
773.66	-1975.32	4.23	-64.56	-1244.40	1669.03
1808.27	-3847.97	3.54	-140.58	-2213.12	3186.70
1961.15	-5792.33	989.09	-157.47	-1923.84	3652.44
2042.88	-7172.04	1856.78	-170.75	-1622.61	4131.45
1431.00	-4563.14	1047.38	-111.69	-1150.88	2589.51
887.40	-2008.48	9.61	-59.18	-1419.84	1984.84
1925.76	-3973.71	13.89	-136.74	-2181.04	3063.28
1653.93	-3980.11	387.00	-124.47	-1515.60	2689.61
2035.88	-4878.11	679.88	-151.32	-1565.28	2900.59
980.12	-4006.75	1264.77	-60.58	-595.12	2234.98
1098.96	-6699.70	2657.97	-65.74	-447.25	3318.48
1402.86	-3915.02	853.30	-103.45	-836.80	2149.62
632.45	-4839.47	2214.35	-18.72	-47.15	2327.01
291.43	-3186.11	1552.27	-18.57	0	1639.22

$D_i$ , production rate of  $i$  component [mmol/hr/l]; X, cell; S, substrate; EOH, ethanol;  $NH_3$ , ammonia;  $O_2$ , oxygen;  $CO_2$  carbon dioxide.

서 나타낼 수 있는 singular value의 개수로 나타내었다.

즉  $\sum_{i=1}^n \sigma_i^2 / \sum_{i=1}^m \sigma_i^2$ 의 값이 0.9999 이상인 값을 기준으로 우세한 singular value의 수를 결정하였다. 위에서  $m$ 과  $n$ 은 전체의 측정 및 추정된 변수의 수와 우세한 singular value의 수를 나타낸다.

호기성 발효의 경우에는 처음 2개의 singular variable의 다른 것보다 크므로 2개의 단위 식으로 전체 양론식을 충분히 표현할 수 있다. 또한 첫번째 대각 성분이 다른 대각 성분보다 월등히 크므로 고정된 값을 갖는 1개의 총괄 양론식만으로도 전체 반응을 대표할 수 있을 것으로 예측된다.

호기-혐기 전이조건의 경우는 처음 3개의 singular variable이 우세하므로 발효반응을 적절히 해석하기 위하여 고정된 양론계수를 갖는 3개의 단위 반응이 필요함을 알 수 있다. 우세한 3개의 sin-

gular vector에 관계된 right singular vector는 다음과 같다.

$$V = \begin{pmatrix} \text{Rxn 1} & \text{Rxn 2} & \text{Rxn 3} \\ 0.282 & -0.270 & 0.645 \\ -0.746 & -0.375 & -0.276 \\ 0.098 & 0.601 & -0.189 \\ -0.022 & 0.028 & -0.064 \\ -0.285 & 0.526 & 0.302 \\ 0.491 & -0.094 & -0.609 \\ 0.176 & -0.372 & 0.082 \end{pmatrix} \begin{matrix} \text{cell} \\ \text{substrate} \\ \text{ethanol} \\ NH_3 \\ O_2 \\ CO_2 \\ H_2O \end{matrix} \quad (20)$$

위의 행렬에 각 열이 나타내는 반응렬은 물리적인 의미가 없는 반응의 양론관계처럼 보인다. 우리가 직관적으로 이해할 수 있는 실제 일어나는 반응은 (20)식에 나타난 세 반응의 적절한 변형으로 얻어질 수 있다. 첫번째 반응렬은 한 개의 양론관계로 발효를 대표하는 경우인 총괄 양론관계를 나타낸다. 추

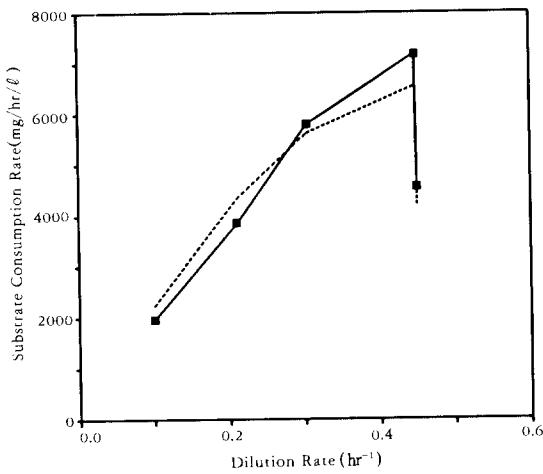


Fig. 2 (a)

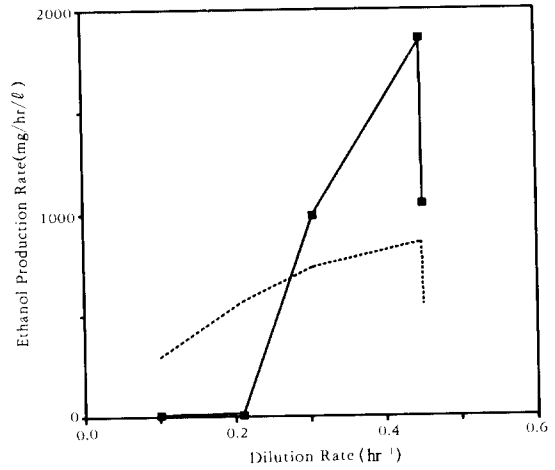


Fig. 2 (c)

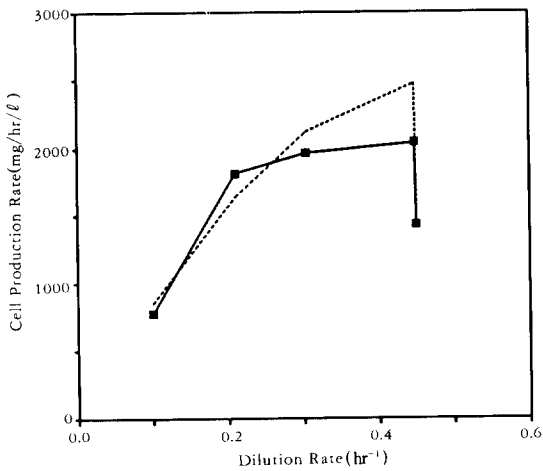


Fig. 2 (b)

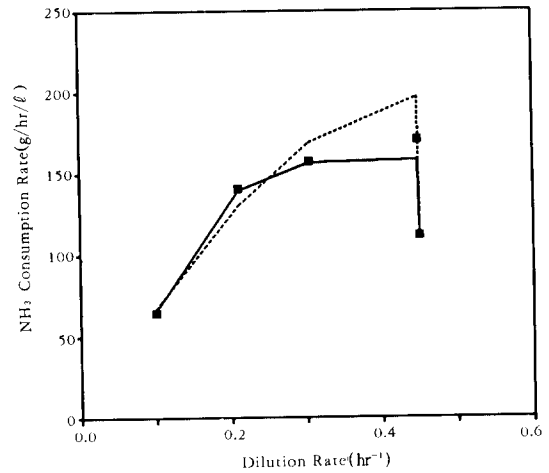
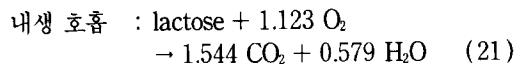


Fig. 2 (d)

상적인 양론관계에서부터 실제 의미가 있는 반응의 양론관계를 얻는 방법은 도표를 이용하는 방법(5)과 target test(TT)를 하는 방법(4) 등이 있다. 도표를 이용하여 좌표를 회전시키는 방법은 대상 단위 반응수가 적을 때는 이용될 수 있으나, 반응수가 많을 때는 적합하지 않다. 또한 도표의 해석을 위하여 도표의 확대, 축소 기능을 갖는 소프트웨어가 요구된다. 일반적으로 주요 단위 생화학반응의 양론관계는 많이 연구되어 있으므로 기지의 단위반응을

TT하는 것이 도표를 이용하는 것보다 용이하다. 여러 가지 가능한 단위 양론관계를 초기적인 조건과 초기-협기의 전이 조건, 혐기 조건에 (7)-(10)식의 관계를 이용하여 TT한 결과 다음 3개의 단위 양론식이 초기, 혐기, 초기-혐기 전이상태를 표현하는데 필요하다고 판명되었다.



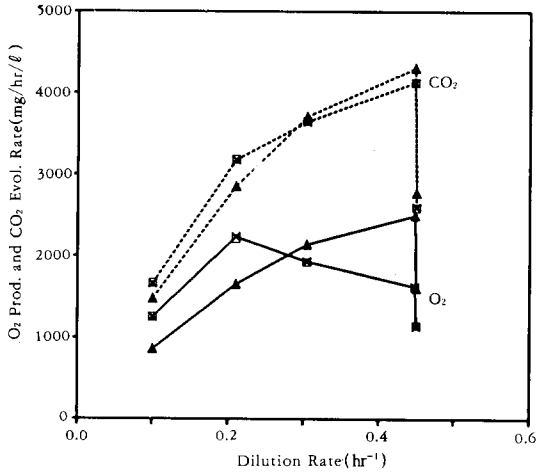
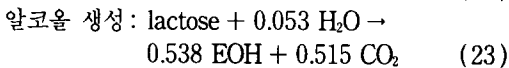
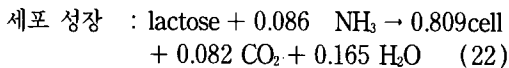


Fig.2 (e)

Fig.2. Consumption and production rates for fermentation at 5% DO: (a) lactose consumption, (b) cell production, (c) ethanol production, (d) NH<sub>3</sub> consumption, (e) O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production. (■, □) measurement, (---) estimation by 1 stoichiometry and (—) estimation by 3 stoichiometry for (a)–(e).



TT는 실제로 일어날 수 있다고 예측되는 반응율 (8)식을 사용하여 계산한 후 그 결과를 예측 값과 비교하는 과정이다. 실제로 일어나는 양론관계는 TT후에도 거의 양론계수가 변화하지 않는다. 즉, (21)–(22)의 세 양론식을 사용하여 산소 공급의 충분, 불충분에 관계없이 발효계를 충분히 표현할 수 있다.

한편, 호기적 세포성장의 경우에는 singular value 계산에서 규명된 바와 같이 두 개의 식, 즉 식 (21)과 (22)로 발효상태를 충분히 추정할 수 있다.

### 발효상태의 추정

반복 실험으로 실험 오차가 무시되는 경우, 실험으로 측정된 발효상태를 추정하기 위하여, 용해 산소 농도가 5%인 경우 식 (16)의 선형 제곱식을 사용하여 추정된 CSTR 내 각 성분의 생성 및 소멸속도는 Fig. 2와 같다. 이때 D는 측정된 속도 data인 D<sub>0</sub>와 추정된 물의 생성속도 data인 D<sub>1</sub>로 구성된 행렬이다. 실선은 3개 단위 양론식을 사용하여 추정된 결과이며 점선은 1개의 대표적인 단위 양론식인 총괄 양론식을 사용하여 추정된 결과이다. 호기성의 경우에는 1개의 양론관계, 즉, 계수가 고정된 총괄 양론식만으로도 발효상태를 근사적으로 추정할 수 있다. 그러나 호기, 혐기의 전이상태에서는 1개의 고정된 계수를 갖는 총괄 양론식으로 발효상태를 예측하기 힘든 것을 알 수 있다. 호기적인 경우에는 2개의 단위 양론식으로, 호기, 혐기의 전체조건은 3개의 단위 양론식으로 발효의 상태를 더 정확히 예측할 수 있었다.

### 반응 전환율의 추정

SVD에 의하여 구해진 직관적인 해석이 어려운 (20)식의 단위 양론식의 전환율은 Fig. 3와 같다. 이를 target test로 발효 시스템에 적용할 수 있다고 판단된 물리적인 의미를 갖는 (21)–(23)식의 단위 반응이 일어나는 경우로 변경한 후 계산된 각 반응의 전환율은 호기 조건과 용존산소가 5%인 경우 각각 Fig. 4, Fig. 5와 같다. 호기적인 조건하에서는 세포의 성장과 호흡반응의 전환율은 회석속도에 별 영향을 안 받는 것을 알 수 있다. 반면 호기, 혐기의 전이상태에서는 회석속도에 따라 각 양론식의 전환율이 영향을 받음을 알 수 있다.

유장을 이용하여 단세포 단백질을 생산하는 경우, 지나치게 적은 산소를 공급하는 경우 원하지 않는 알코올의 생산에 에너지를 낭비하게 되고, 반면 지나치게 많은 산소의 공급은 고정비와 운전비의 상승을 초래하므로 알코올을 생산하지 않는 최소의 산소 공급량에 대한 정보를 아는 것이 필요하다.

Fig. 6은 회석속도가 0.21, 0.45에서 용존산소의 변화에 따른 ethanol 생성반응의 전환율을 나타낸다. ethanol 생성을 방지하기 위하여 회석속도가 큰 경우에 회석속도가 작은 경우보다 더 높은 용존산소 농도를 유지하여야 함을 알 수 있다.

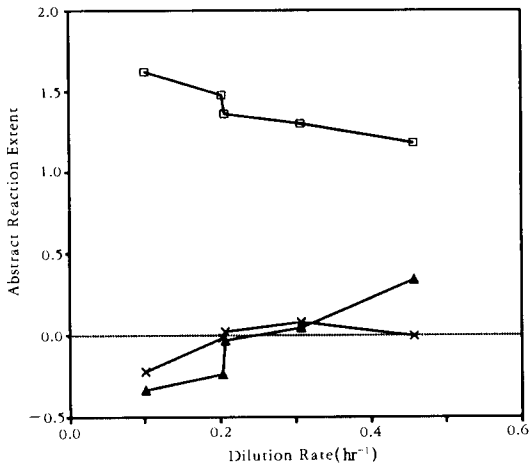


Fig.3. Abstract extents of dominant abstract reactions during fermentation at 5% D.O.: (□) 1<sup>st</sup> rxn, (▲) 2<sup>nd</sup> rxn and (×) 3<sup>rd</sup> rxn.

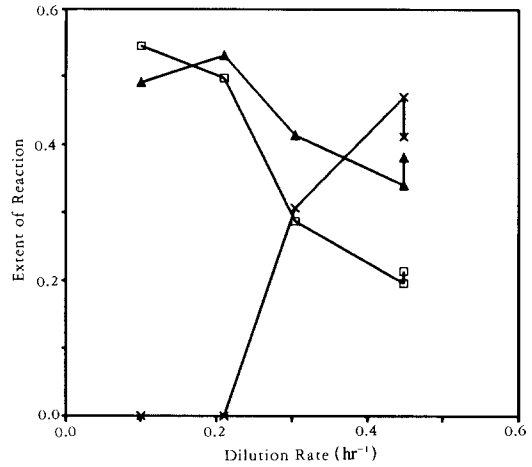


Fig.5. Extents of three reactions during fermentation at 5% DO: (□) pure respiration, (▲) cell growth and (×) product formation.

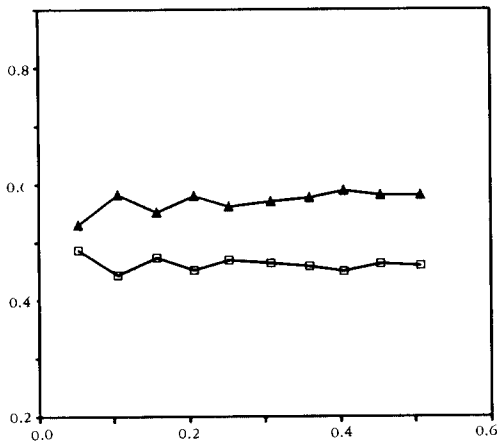


Fig.4. Extents of two reactions during aerobic fermentation: (□) pure respiration and (▲) cell growth.

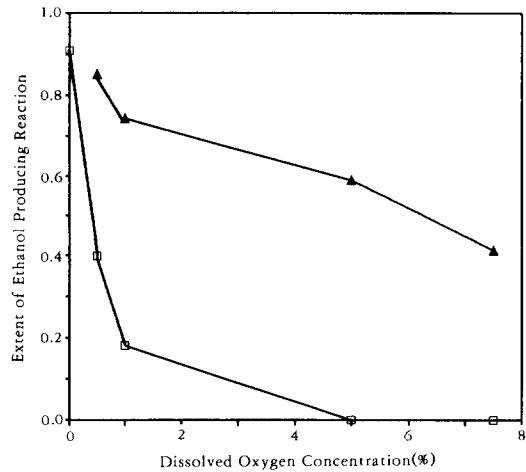


Fig.6. Extent of ethanol formation reaction vs. dissolved oxygen concentration under dilution rate variation: (□) 0.21 and (▲) 0.45.

사용기호

B number of measurements(observations)  
 C compositions(mM)

d dilution rate(hr<sup>-1</sup>)  
 D rate matrix of dimension (BxS)  
 F flow rate(L/hr)  
 M composition matrix of compounds



N stoichiometry matrix (R×S)  
 n stoichiometry vector (1×S)  
 r fermentation rate (mM/hr)  
 R number of stoichiometry equations  
 S number of species  
 T transposing matrix  
 X extent-of-reaction matrix(B×R)  
 U matrix of left singular vectors  
 V matrix of right singular vectors  
 V<sub>R</sub> reactor volume (L)  
 σ<sub>i</sub> diagonal elements of singular variables

위첨자

+ Moore-Pentose pseudo-inverse

T Transposed

아래첨자

aer associated with aerobic

es associated with estimated value

f condition of the inlet

g associated with measured species

i i<sup>th</sup> component

l associated with numeasured species

t transformed object

tar target

tarn associated with transition state

### 비측정 상태의 측정

(14)식의 D<sub>g</sub>는 측정된 생성, 소멸속도 data이다. 호기적인 경우 측정된 화합물의 조성식 행렬(M<sub>g</sub>)과 추정하려고 하는 화합물의 조성식 행렬(M<sub>l</sub>)과 (D<sub>g</sub>)를 이용하여 측정되지 않은 화합물의 값을 예측할 때 각각의 값은 다음과 같다.

$$D_g = \begin{pmatrix} 420.29 & -995.88 & 0 & -36.22 & -548.00 & 774.62 \\ 912.66 & -2005.28 & 0 & -63.61 & -1043.20 & 1378.19 \\ 1382.50 & -3052.06 & 0 & -105.43 & -1671.60 & 2316.95 \\ 1888.64 & -3959.15 & 0 & -147.73 & -2107.20 & 2848.16 \\ 2070.10 & -4604.35 & 0 & -169.48 & -2516.72 & 3398.08 \\ 2314.41 & -5002.90 & 0 & -191.05 & -2720.80 & 3658.78 \\ 2401.20 & -5120.56 & 0 & -206.37 & -2752.00 & 3704.58 \\ 2482.65 & -5115.17 & 0 & -213.50 & -2720.40 & 3646.94 \\ 2260.92 & -4633.20 & 0 & -207.15 & -2542.40 & 3418.89 \\ 2002.65 & -4105.97 & 0 & -192.20 & -2220.08 & 3025.22 \end{pmatrix} \quad (A-1)$$

$$M_g = \begin{pmatrix} \text{cell} & \text{lactose} & \text{EOH} & \text{NH}_3 & \text{O}_2 & \text{CO}_2 \\ 1 & 12 & 2 & 0 & 0 & 1 \\ 1.882 & 22 & 6 & 3 & 0 & 0 \\ 0.550 & 11 & 1 & 0 & 2 & 2 \\ 0.156 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \quad (A-2)$$

$$M_l = \begin{pmatrix} C & H & O & N \\ 0 & 1 & 2 & 0 \end{pmatrix}^T \quad (A-3)$$

이를 (14)식에 대입하여 물의 생성속도를 예측하면 다음과 같다.

$$D_{l, aer} = \begin{bmatrix} 367.9 & 705.5 & 1071.7 & 1359.2 & 1654.1 \\ 1769.5 & 1804.7 & 1764.3 & 1607.0 & 1429.0 \end{bmatrix}^T \quad (A-4)$$

위와 같은 예측은 호기-혐기 전이조건에도 시행될 수 있고 예측 결과는 다음과 같다.

$$D_{l, tran} = \begin{bmatrix} 1343.6 & 765.8 & 1298.6 & 1210.4 & 948.3 \\ 698.1 & 692.6 & 1298.8 & 981.1 & 985.6 & 292. \\ 3 & 158.9 & 528.0 & -175.3 & -153.5 \end{bmatrix}^T \quad (A-5)$$

### 요 약

유당을 탄소원으로 *K. marxianus*를 발효하는 경우, 용해산소의 농도와 조업조건에 따른 발효의 진행 상태를 정확히 예측하였다. 예측에 필요한 고정된 계수를 갖는 양론식의 수를 singular variable decomposition 분석에 의하여 결정하고 발효의 추정에 사용될 수 있는 양론관계를 target test에 의하여 결정하였으며, 발효의 진행상태를 추정하였다. 또한, 단세포 단백질을 유당으로부터 연속생산하는 경우에 에너지를 효율적으로 이용하기 위한 조업조건을 제시하였다.

### 감 사

본 연구를 수행하는데 도움을 주신 스위스 연방공대(Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne)의 D. Bonvin 교수와 P. Peringer 교수께 감사드립니다.

### 참고문헌

1. K. Y. San and G. Stephanopoulos(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1176.
2. K. Y. San and G. Stephanopoulos(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1189.

3. K. Y. San and G. Stephanopoulos(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1198.
4. D. Bonvin and D. W. T. Rippin(1989), *Chem. Eng. Sci.*, **45**, 3417.
5. J. W. Hamer(1987), *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 2363.
6. J. C. Liao, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 613.
7. R. Grosz and G. Stephanopoulos, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1006.
8. D. Ryoo(199), *Ph. D. Thesis*, Dept. of Agri. and Chem. Eng. Colorado State Univ., Fort Collins, Colorado, U. S. A.
9. R. A. Horn and C. A. Johnson(1985), *Matrix Analysis*, Cambridge University Press, U. K.