

기질저해가 있는 유가식 발효공정의 퍼지제어

Fuzzy Control of a Fed-Batch Fermentation with Substrate Inhibition Kinetics

최정우*, 오승목*, 이광순*, 이원홍*
Jeong-Woo Choi*, Seng Mok Oh*, Kwang Soon Lee*, Won Hong Lee*

요약

본 논문에서는 박테리아에서 생성되는 생체 계면활성제인 emulsan의 생산을 위한 유가식 배양에서 에탄올 농도의 제어에 퍼지기법을 적용하였다. 기질저해가 있는 유가식 배양에서 emulsan의 생산을 향상시키기 위해 최대 비성장속도를 갖는 최적 기질농도가 유지되도록 기질인 에탄올의 공급 속도가 조절되어 졌다. 생물반응기에서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 박테리아를 회분식과 유가식으로 배양 실험하여 최적 에탄올 농도를 구하고, kinetic 모델을 제시하였다. 배양실험의 결과와 지식을 바탕으로 퍼지 규칙을 구성하였다. 퍼지 제어기에서 제어 입력변수는 기질농도의 최적치와 운전치의 오차와 오차의 변화로서 구성되고, 제어 출력변수는 기질 공급 속도의 변화량으로 구성되었다. 멤버십 함수를 입력변수의 퍼지 집합화 과정을 통하여 구하였고, 최소-최대법과 무게 중심법을 이용하여 출력 제어값을 구하였다. 유가식 배양의 전산모사와 실험 결과에서 퍼지제어 기법은 최적 기질 농도를 정확히 제어하였으며, emulsan 생산은 향상되었다.

ABSTRACT

In this paper, fuzzy control method is applied for the control of substrate concentration for the production of emulsan, bioemulsifier produced by bacteria, in fed-batch culture. The feed rate of substrate, ethanol, is regulated to maintain the optimal substrate concentration with the maximum specific growth rate for emulsan production in fed-batch culture with substrate inhibited specific growth rate. Batch and fed-batch suspension cultures of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 in a bioreactor are done to investigate optimal ethanol concentration and the kinetic model is proposed based on experimental results. Membership functions and fuzzy rules are determined by sets of data and experiences in culture experiments. The fuzzy control algorithm proceeds as follows: (1) fuzzification of input variables, error and change of error between optimal and operating ethanol concentration, using the membership functions, (2) inference using fuzzified variables and the control rules by the min-max composition to obtain a fuzzy output, change of ethanol feeding rate, and (3) defuzzification of change of ethanol feeding rate by the center of gravity method to obtain the numerical value. The results show that the optimal ethanol concentration is well maintained using fuzzy control algorithm and emulsan production is increased in fed-batch culture.

*서강대학교 화학공학과
Dept. of Chemical Engineering, Sogang University,
Seoul, Korea

* 이 논문은 1992년도 교육부 지원 한국 학술진흥재단의 자유 공모 과제 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

최근에 생명공학은 유전공학의 발전과 더불어 급속한 발전을 이루고 있으며, 의약품, 식품, 생활용품 분야등 각종 산업 분야에 응용되어 다양한 종류의 유용한 생화학 물질들을 생물 공정기술을 통해 생산하고 있다.[1] 그러나 현재 유용한 생화학 물질들의 대량생산을 위한 생물 공정기술 분야에서 생물 공정의 제측 및 제어에 관한 기술의 개발은 아직 초기 단계에 있다.[2] 생물 공정에 대한 최적화 및 제어기술을 개발함으로써 생화학 물질의 경제적인 대량 생산을 이룩할 수 있으리라 예상되고 있다. 최근에 제어 관련 분야에서 각광을 받고 있으며 선진국에서 실효를 거두고 있는 퍼지 알고리즘을[3] 생물 공정의 제어에 응용함으로써 생물공정 제어기술을 발전시킬 수 있다.[4][5] 이와 같이 생물공학에 있어서 제어 기술의 개발은 유용 생화학 물질의 생산의 상업화에 중요하며, 생물 공정에 효과적이라고 판단되는 퍼지 제어 기법이 최근에 이용되고 있다.[6][7]

생물 공정은 일반적인 화학공정에 비하여 복잡한 반응 기구에 의한 복합된 생합성 반응이 수반되므로 반응기내의 상태 변수와 제어 변수 사이의 함수 관계를 정확히 수학적으로 동적 모델화한다는 것은 매우 복잡하고 어려운 일이며 설령 구성한다 할지라도 정확한 묘사가 힘들고 제한된 구간에서만 적용될 수 있다. 또한 살아있는 생물체를 대상으로 하고 있으므로 발효 환경의 변화와 균체의 활성변화에 대한 적절한 대응이 필요하고 예기치 못한 조업 조건의 변화가 일어날 수 있으므로, 생물 반응기 공정은 기존의 수학적 모델에 의존하는 제어 방법이나 최적화 방법을 사용하여서는 높은 생산성을 얻기 어렵다. 이러한 문제점에 근거하여 일반적으로 생물 공정은 전문가의 경험과 사고에 의한 제어가 필요하다.

복잡한 최적화 모델이 필요 없고 단지 전문가의 지식과 경험에 의존하는 퍼지 제어 개념은 여러 산업계에서 기존의 제어 방식보다 우수한 제어 효과를 얻어냈다. 이러한 퍼지 제어는 공정제어의 관점에서 정확한 동적 모델이 정의되기 어려우며 연구자의 지식과 경험이 중요한 생물 공정에서 우수한 제어 효과를 가질 수 있다.

유가식 생물 공정의 생산성을 높이기 위한 방안으로써 효율적인 전산기 제어는 산업적으로 매우 중요하다. 기질이 저해 물질로 작용하는 미생물의 유가식 배양의 경우에 반응기내의 비성장속도와 생산성이 최대가 되도록 기질 농도의 적절한 제어가 필요하다. 반응기내 기질의 농도는 기질 공급 속도의 제어를 통해 제어할 수 있으며 이를 통하여 건조세포중량과 생성물을 최대화할 수 있다. 본 연구는 미생물 계면활성제인 Emulsan의 생산을 위한 유가식 발효공정에 퍼지 이론을 응용하여 기질 농도를 적합하게 제어할 수 있는 퍼지 제어 시스템을 개발하는 것을 목적으로 한다.

Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 박테리아에 의해 생성되는 미생물 계면활성제 (Bioemulsifier)인 emulsan은 polyanionic hetero-polysaccharide로서 원유(Crude oil)에 대하여 뛰어난 계면활성제의 성질을 가지고 있다. Emulsan은 산업체에서 오일에 오염된 저장 탱크 및 토양의 처리, MEOR(Microbial Enhanced Oil Recovery), Heavy oil의 운송, 크립, 로션, 샴푸, 치약등에 이용되고 있다.[8][9][10] 기질 저해가 있는 미생물을 배양하는 경우의 유가식 생물 공정에 대하여 퍼지 제어를 적용하기 위해서는 대상 공정에 대한 기본적인 지식과 기술이 필요하므로, 이를 위하여 회분식과 유가식 배양실험이 수행되었다. 생체계면활성제의 생산을 향상시키기 위한 전략을 수립하기 위해 최적 기질농도가 구해졌으며, 미생물의 성장과 계면활성제의 생성을 예측할 수 있는 kinetic 모델이 제시되었다. 제시된 kinetic 모델을 이용하여, 생체계면활성제의 생산을 위한 유가식 발효공정의 퍼지제어기를 구성하고 전산모사를 수행하였다. 제시된 퍼지제어기를 이용하여 유가식으로 운전되는 생물반응기에서 최적 기질농도의 제어 실험이 수행되었다.

II. 실험 및 분석 방법

2.1. 사용 균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012)로서 gram negative, rod shaped, 그리고 obligaytory aerobic bacterium이다.

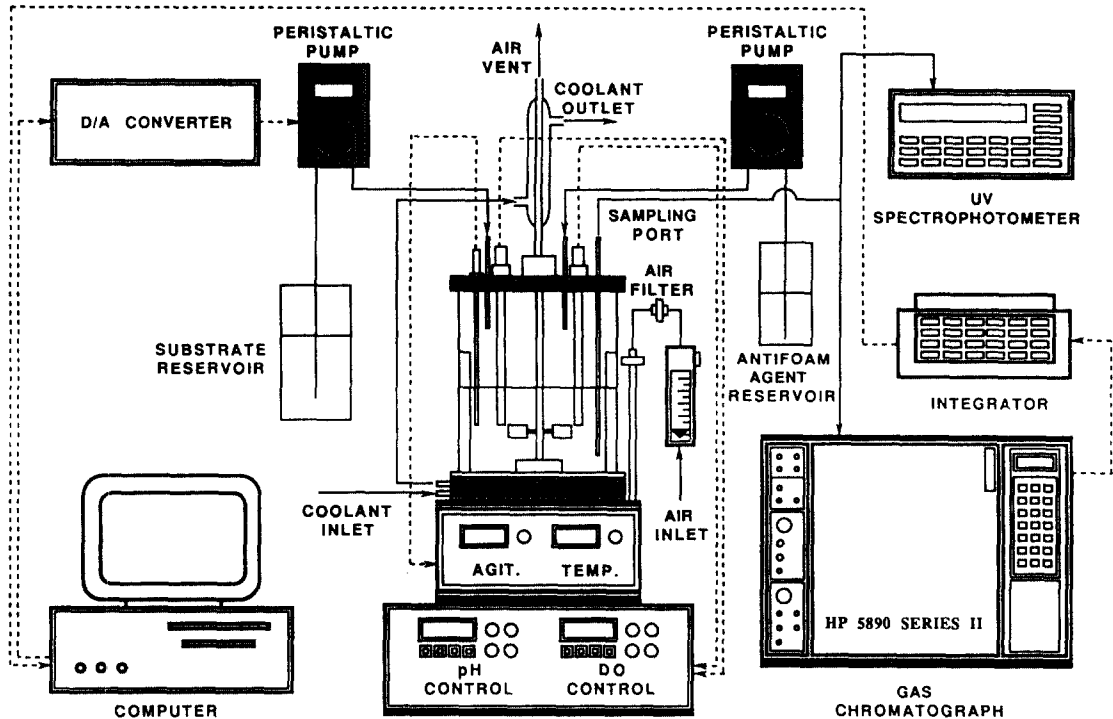


그림 1. 실험장치의 구성.

2.2. 배지 조성 및 배양 조건

미생물배양을 위해 사용된 배지의 조성은 7.3g/L KH_2PO_4 , 16.9g/L K_2HPO_4 , 0.5g/L MgSO_4 , 4g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 trace salt로 구성되었다. 미생물은 4°C에서 아가 평판 (Agar plates)에서 보관하였다. 각 평판에서 에탄올 200 μL 를 적신 filter paper를 각 뚜껑에 부착하여 기화된 에탄올이 탄소원으로 사용되게 하였으며 30°C, 2일간 incubator에서 배양하였다. Shake plask 배양은 30°C, 180 rpm의 조건에서 수행하였다.

2.3. 생물반응기 (Bioreactor)

발효는 초기 부피 2 L로 시작하였으며 5 L 용량의 생물반응기 (B.E. Marubishi Ltd., MD-300)를 사용하였다. 실험장치는 그림1에 나타내었다. 조작 조건은 pH 7.0, 온도 30°C, 교반 속도 500 rpm, 공기 유량 속도 0.5 VVM이다.

2.4. 분석 방법 및 시약

2.4.1. 건조 세포 중량 (Dry Cell Weight, DCW)

배양액 5 ml를 채취하여 5000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 침전물에 증류수를 채우고 다시 원심분리한다. 이 침전물을 중량이 더 이상 변화하지 않을 때까지 70°C에서 건조한다. 건조된 세포량과 흡광도의 관계에 대한 표준곡선을 구한다. 발효 실험시에 시료는 증류수로 희석한 후 표준곡선을 이용하여 660 nm에서 UV-spectrophotometer (Shimadzu, UV-240)로 그 흡광도를 측정한다.

2.4.2. 에탄올

에탄올은 내부기준시약으로 n-prophanol를 이용하고 thermal conductivity detector가 장착된 gas chromatography (GOW-MAC, GC model 69-550)을 사용하여 측정하였다. GC column은 porapak type Q(Waters, mesh 80-100)으로 충전하였고 헬륨을 carrier gas로 40 mL/min의 속도로 하면서 135℃에서 조작하였다. Detector와 Injector의 온도는 각각 145℃와 230℃이다.

2.4.3. Phosphate

배지내의 phosphate 농도의 결정은 vanadmolybdophosphoric acid method를 사용하였다. 시료를 채취하여 heteropoly acid인 molybdophosphoric acid를 형성시키기 위해 molybdate를 반응시킨다. 그러면 노란색 성분인 vanadmolybdophosphoric acid가 vanadium의 존재하에 형성된다. 400nm에서 optical density는 phosphate의 농도에 비례하므로 이를 calibration하여 농도를 구한다. 세포 내부의 phosphate 농도는 sonicator로 세포를 붕괴시킨 후 같은 방법으로 측정하였다.

2.4.4. Emulsan

Emulsan 농도의 측정 방법으로는 반응의 민감성이 높고 측정시간이 짧은 phenol-sulfuric acid method를 사용하였다. 채취한 시료에 원심분리하고 측정이 가능한 범위로 희석시킨 후 희석한 시료에 80% aqueous phenol 50μL를 함께 혼합한다. 5mL의 농축 sulfuric acid를 첨가하여 반응시킨다. 반응시킨 용액을 완전히 냉각시킨 후 480nm에서 UV spectrophotometer로 측정한다. Emulsan의 표준곡선을 구하여 사용하였으며 세포 외벽의 emulsan (cell-bound emulsan)의 농도는 시료를 EDTA로 처리하고 60℃에서 incubation한 후 같은 방법으로 측정한다.

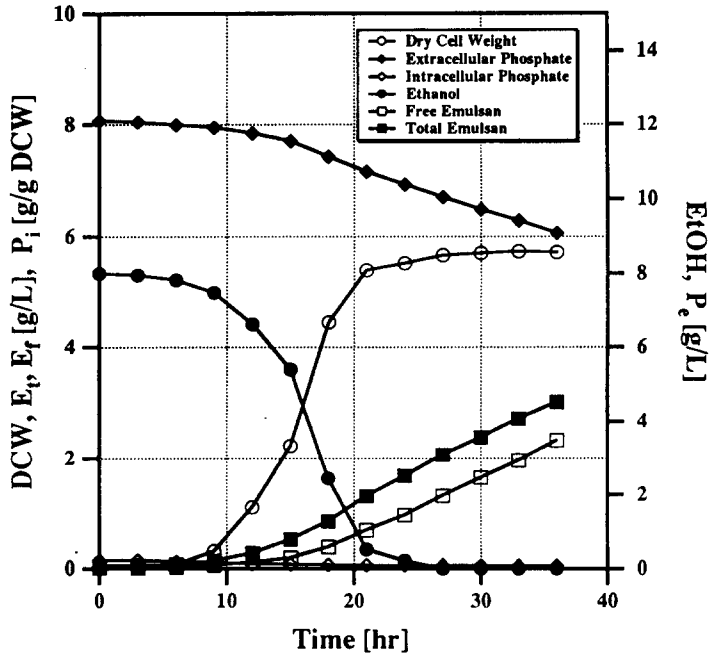


그림 2. 회분식 배양의 실험결과.

III. 기초 실험과 Kinetic 모델

3.1. 모델 수립을 위한 기초실험

퍼지제어는 공정에 대한 기초적인 지식과 경험이 필요하므로 수 차례의 배양실험을 수행하였다. 회분식 실험은 5L의 생물반응기에서 초기 배지 부피 2L로 수행되었다. 상태변수와 제어변수의 관계에 대한 지식과 경험이 있어 야만 연구하고자 하는 배양공정에 대하여 퍼지 제어계를 구성할 수 있으므로 기질의 농도, 건조세포중량과 그로부터 계산된 비성장속도의 변화하는 형태를 측정하였다. 대상 박테리아의 특성을 알아내기 위하여 기질농도의 초기값을 변화시키며 미생물을 배양하여 일정 시간간격으로 건조세포중량과 기질의 농도를 측정하여 기질의 세포농도에 따른 세포성장 속도의 변화를 조사하였다.

그림2는 8 g/L의 에탄올과 12.1 g/L의 phosphate로서 회분식 발효하는 동안 미생물의 성장과 emulsan의 생성을 보여주고 있다. 조업 6시간 후 미생물은 빠르게 성장하며 탄소원이 고갈됨에 따라 성장속도는 감소하고 약 21 시간 후에는 결국 성장이 정지하게 된다. 최종상태에서 건조세포중량은 5.7 g/L, 총 emulsan은 3.1 g/L가 생산되었다. Emulsan생산은 대수기에서 세포의 성장에 비례하며, 정체상 동안에도 계속되므로 emulsan생성은 혼합성장연계생산(mixed growth-associated production)임을 알 수 있다. Emulsan은 혼합성장 연계 생산의 유형으로 생산되므로 미생물의 비성장속도를 최대화함으로써 대수기에서 emulsan의 생성속도를 향상시킬 수 있고 성장이 멈춘 정지기에서도 emulsan은 건조세포중량에 비례하여 생산되므로, 비성장속도가 최대가 되도록 기질 농도를 유지하는 것이 emulsan의 생산성을 향상시키는 효과적인 방법으로 선택되어졌다. Emulsan의 특성을 보면, 대수상에서는 생성된 emulsan은 세포 외벽에 존재하지만, 정지상에서는 세포외부로 나와 배지내의 emulsan이 크게 증가하여 최종상태에서는 생산된 총 emulsan량의 75%가 배지내에 존재한다.

배지내에 있는 세포 외부의 phosphate는 대수상에서 미소하게 소비되어 농도에 큰 변화가 없지만 정지상에서는 그 농도가 빠르게 감소한다. 이는 대수상에서보다 정지상에서 건조세포중량이 많기 때문이다. 세포내의 phosphate는 대수상에서 빠르게 감소하고 세포의 성장이 멈춘 다음에는 미소하게 감소한다. 이와 같은 현상은 대수상과 정지상에서 세포내부와 세포외부의 phosphate간의 동적 평형에 기인한 것으로 보인다.

기질인 에탄올의 저해현상을 규명하고자, 기질농도의 초기값을 변화시키며 미생물을 배양하여 일정시간 간격으로 건조세포중량과 기질 및 emulsan의 농도를 측정하였고, 기질의 초기농도에 따른 세포의 비성장속도와 emulsan생성의 변화를 조사하였다. 실험 결과로부터 최대의 비성장속도를 나타내는 최적의 기질농도와 최적 기질농도에 도달하는 배양시간을 구하였다. 그림3은 초기 에탄올 농도에 대한 비성장속도의 의존성을 나타내었다. 세포의 비성장속도에 대한 에탄올 저해 kinetics를 구하기 위하여, Aiba-Edwards(식1), Haldane(식2), Loung(식3)에 의하여 제안된 식들이 검토되었다.[11][12][13]

$$\mu_e = \frac{\mu_{max} S}{S + K_s + \frac{S}{K_i}} \quad (1)$$

$$\mu_e = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \exp\left(-\frac{S}{K_i}\right) \quad (2)$$

$$\mu_e = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \left(1 - \frac{S}{S_{max}}\right)^{n_e} \quad (3)$$

제시되어진 kinetics에서 실험 데이터로부터 비선형 매개변수 추정법을 이용하여 최적변수를 구하였다. 그림 3에서 식(3)이 세포의 비성장속도에 대한 에탄올 저해를 가장 정확히 예측할 수 있었으며 최대의 비성장속도를 나타내는 최적 초기 에탄올 농도는 6.5 g/L를 구할 수 있었다. 최대의 비성장속도를 갖을 때 최대 emulsan 생성

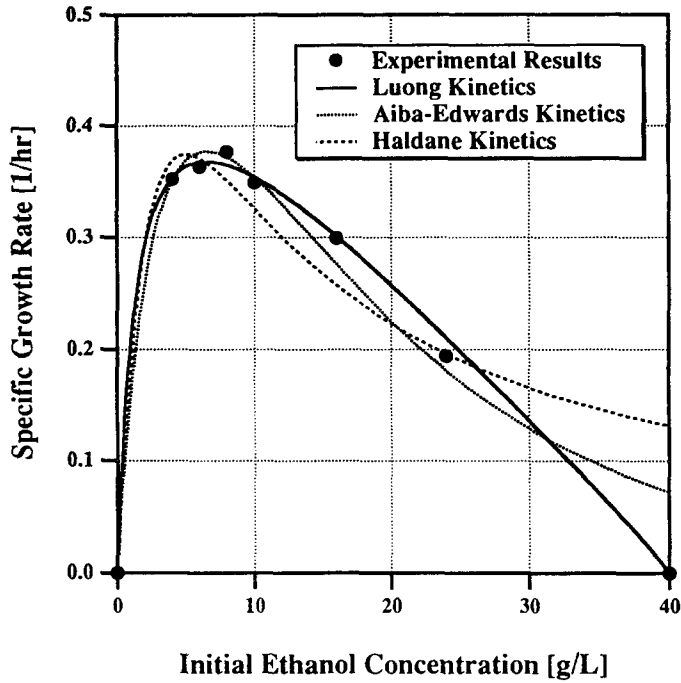


그림 3. 초기 에탄올 농도와 비성장속도의 관계.

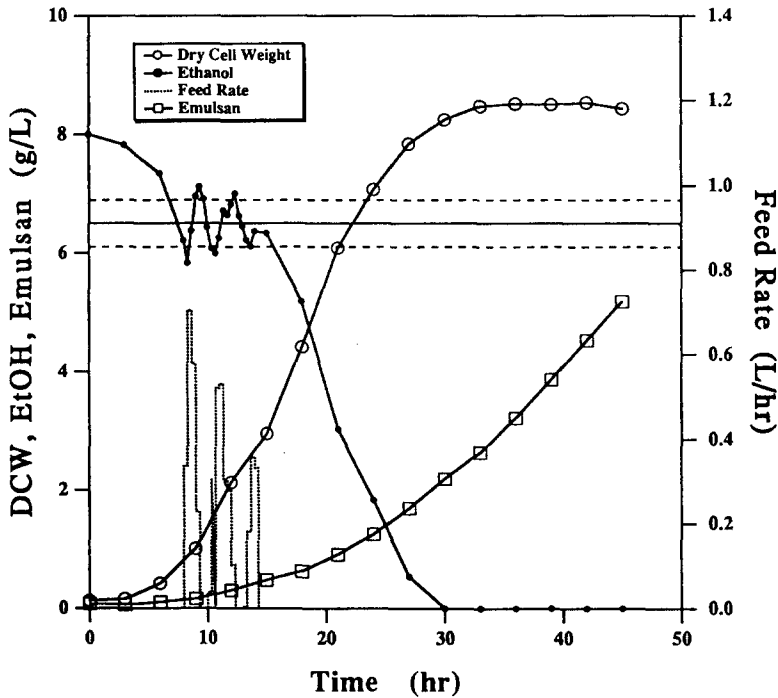


그림 4. PID를 이용한 유가식 배양의 실험 결과.

속도가 나타나므로, emulsan 생성과 미생물 배양을 위한 최적 초기 에탄올 농도는 6.5 g/L로 추론되어 졌다.

위의 결과에서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 박테리아의 배양시에 생물반응기내 기질의 농도가 과다하게 존재할 경우 기질이 저해물질로 작용하여 미생물의 성장을 억제하므로, 최적 기질 농도를 유지하면 생물반응기내의 세포의 비성장속도와 emulsan 생성속도는 최대가 될 수 있다. 따라서 기질 공급속도를 조절함으로써 유가식 생물반응기내의 최적 기질농도를 배양시간 동안 유지시켜 emulsan의 생성속도를 향상시킬 수 있다. 생물반응기내에서 배양시간과 기질농도의 변화에 따른 균체 농도와 emulsan농도의 변화량의 관계에 대한 지식을 통하여, 상태변수인 기질 농도와 제어변수인 기질 공급 속도의 관계에 대한 퍼지제어계를 유가식 배양공정에 대하여 구성할 수 있다.

유가식 배양공정에 대한 연구자의 지식과 경험의 축적을 위해, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1의 기질인 에탄올 농도를 최적으로 유지시키는 유가식 배양을 수행하여, 기질의 공급에 따라 변화되는 기질의 농도, 건조세포중량, emulsan농도 변화등의 배양 동특성을 관찰하였다. (그림 4) 이 실험에서 얻어지는 동특성에 대한 지식을 바탕으로 소속함수와 퍼지제어 규칙을 수립하여 유가식 배양공정에서 기질의 공급 속도를 퍼지 제어할 수 있었다. 회분식 발효실험에서 구해진 비성장속도와 총 emulsan의 생산수율을 최대화하는 에탄올의 최적 농도인 6.5 g/L와 phosphate의 최적농도인 12.1 g/L을 유지하도록 유가식 발효공정을 수행하였다. 발효 시작 9 시간 후부터 기질을 공급하였고, 매 10 분마다 에탄올 농도를 측정하며 PID 제어를 사용하여 기질 공급 속도를 8 시간동안 제어하였다.

발효가 완료된 후 얻어진 건조세포중량은 8.4 g/L이고 emulsan의 총량은 5.0 g/L이었다. 결과적으로 회분식 배양에 비하여 유가식 배양에서 총 건조세포중량은 50 % 증가되었고 총 emulsan 생산량은 70 % 이상 증가되었다. 그러나 유가식 배양중에 에탄올은 최적 농도범위에서 잘 유지되지 못하고 오차가 발생함이 관찰되었다. 그 이유는 제어체계가 적절하지 못했기 때문이므로, 유가식 배양에서 에탄올의 농도를 정확히 제어해 주기 위하여 기질 공급 속도에 대한 적절한 제어방식을 개발해야 한다. 그리고 미생물 성장에 적합한 phosphate의 농도는 비교적 넓은 범위 (12.1 ~ 18.15 g/L)이므로 reservoir내의 phosphate 농도를 적절한 수준으로 하여 에탄올과 phosphate이 혼합된 기질을 공급하는 경우에 에탄올 농도만을 제어대상 변수로 설정하여 조업하더라도 반응기내의 phosphate의 농도는 최적 농도범위에서 크게 벗어나지 않게 되어 phosphate의 농도를 제어하기 위한 별도의 제어체계를 구성하지 않아도 된다. 따라서 본 연구에서는 유가식 배양에서 에탄올의 공급 속도에 대한 제어방식으로 퍼지제어계를 구성하였다. 이 실험에서 얻어진 기질의 공급에 따라 변화되는 기질의 농도, 건조세포중량, emulsan 농도의 변화등의 배양 동특성에 대한 지식을 바탕으로 소속함수와 퍼지제어 규칙을 수립하였다.

3.2. Kinetic 모델

수행되어진 배양실험의 결과를 바탕으로, 미생물의 성장과 emulsan의 생성에 대한 kinetic 모델이 제시되었다.

건조세포중량에 대하여,

$$\frac{dX}{dt} = \left[\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{lag}}\right) \right] \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \left(1 - \frac{S}{S_{max}}\right)^{n_s} \right. \\ \left. \left[1 - \exp\left(-K_{P_i} \left(\frac{P_i}{P_{i0}}\right)^2\right) - k_d \right] X \right] \quad (4)$$

에탄올에 대하여,

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} = & - \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{lag}}\right) \right] \frac{\mu}{Y_{X/S}} X - m_s X \\ & - \left[k_{e1} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{lag}}\right) \right] \mu + \frac{k_{e2} P_i}{K_{P_n} + P_i} \exp\left(-\frac{P_i}{K_{P_n}}\right) \right] \frac{1}{Y_{E/S}} X \end{aligned} \quad (5)$$

세포외부의 phosphate에 대하여,

$$\frac{dP_e}{dt} = - \frac{k_{P_e} + P_e}{K_{P_e} + P_e} + (Y_{P/X} + P_i) k_d X \quad (6)$$

세포내부의 phosphate에 대하여,

$$\begin{aligned} \frac{dP_i}{dt} = & - \frac{k_{P_i} + P_e}{K_{P_e} + P_e} - \alpha(Y_{P/X} + P_i) k_d - m_{P_i} \\ & - Y_{P/E} \left[k_{e1} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{lag}}\right) \right] \mu + \frac{k_{e2} P_i}{K_{P_n} + P_i} \exp\left(-\frac{P_i}{K_{P_n}}\right) \right] \end{aligned} \quad (7)$$

세포외벽의 emulsan에 대하여,

$$\frac{dE_b}{dt} = \left[k_{e1} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{lag}}\right) \right] \mu + \frac{k_{e2} P_i}{K_{P_n} + P_i} \exp\left(-\frac{P_i}{K_{P_n}}\right) - k_r \right] X - \xi k_d X \quad (8)$$

세포외부의 emulsan에 대하여,

$$\frac{dE_f}{dt} = k_r X + \xi k_d X \quad \text{where } \xi = \frac{E_b}{X} \quad (9)$$

총 emulsan에 대하여,

$$\frac{dE_b}{dt} = \left[k_{e1} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{lag}}\right) \right] \mu + \frac{k_{e2} P_i}{K_{P_n} + P_i} \exp\left(-\frac{P_i}{K_{P_n}}\right) \right] X \quad (10)$$

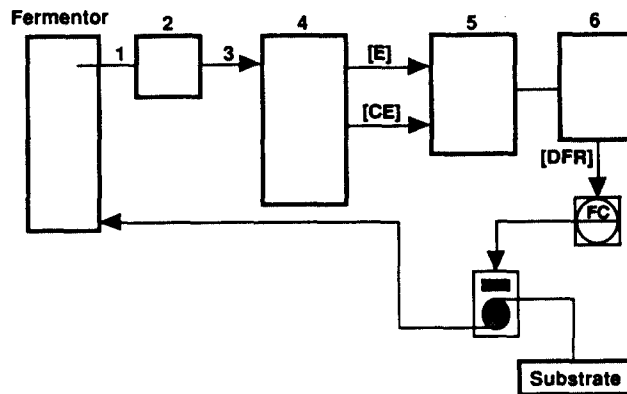
제안된 모델에 사용된 매개 변수들은 NONLIN(Nonlinear Parameter Estimation Package)을 사용하여 값을 구하였으며, 제안된 모델식의 결과는 건조세포중량, ethanol, emulsan생성의 실험결과와 잘 일치하였다.[15]

IV. 퍼지 제어기의 구성과 전산모사

유가식 생물 발효 공정의 제어를 위해서는 합리적인 소속함수와 퍼지 규칙을 구성해야 하며, 이의 구성은 앞에서 수행된 수 차례의 기초적 실험과 동특성을 이용하여 수립되었다. 유가식 배양공정에서 emulsan생성을 향상시키는 최적 기질농도를 유지하는 퍼지제어 시스템을 구성하기 위하여, 입력변수로서 생물 반응기내 기질농도의 오차량을 고려하고 기질농도를 제어하기 위한 출력변수로서 기질공급속도의 변화량을 고려하였다. 경험과 지식으로 구성된 언어적 제어규칙들을 퍼지추론에 적용하기 위해서는 이를 보다 일반적인 형태로 바꾸어야 한다. 따라서 설정치(Set point)인 최적의 기질농도와 현 시간대에서 측정된 기질농도의 차이인 오차(Error, E), 현재의 오차와 그 전단계의 오차와의 차이를 나타내는 오차변화(Change of error, CE), 그리고 계에 들어가는 제어입력 신호를 나타내는 기질공급속도의 변화량(Change of flow rate, DFR)을 정의하여 사용하였다.

퍼지제어계의 구성을 그림5에 나타내었다. 생물반응기에서 측정되는 기질로 작용하는 에탄올의 농도를 이용하여 설정치로부터 계산된 오차와 오차변화가 퍼지화되어 소속함수에 적용되며, 퍼지규칙에 따라 각 제어규칙의 출력이 구해진다. 각 제어규칙의 출력을 비퍼지화하여 최종 제어출력인 기질공급속도 변화량을 구하게 되며 이 값은 기질공급의 속도조절을 위한 신호로 출력된다.

본 공정의 제어계에서는 3개의 소속함수와 37개의 퍼지 규칙을 구성하여 적용하였다. 오차[E]와 오차 변화[CE], 그리고 기질공급속도 변화 [DFR]의 소속함수와 퍼지 규칙을 7개의 퍼지집합(NB(negative big), NM(negative medium), NS(negative small), Z(zero), PS(positive small), PM(positive medium), PB(positive big))을 사용하여 나타내었다. 앞에서 수행된 배양실험 결과에서 결정된 emulsan 생산을 위한 최적 에탄올 농도 6.5 g/L 를 설정점(set point)으로 지정하였다. 현 시간대에서 측정된 기질농도가 설정점보다 적으면 오차는 양



1. Concentration data
2. Calibration data
3. Measured ethanol concentration
4. Membership functions
5. Fuzzy rules
6. Defuzzification block

그림 5. 퍼지 제어기의 구성.

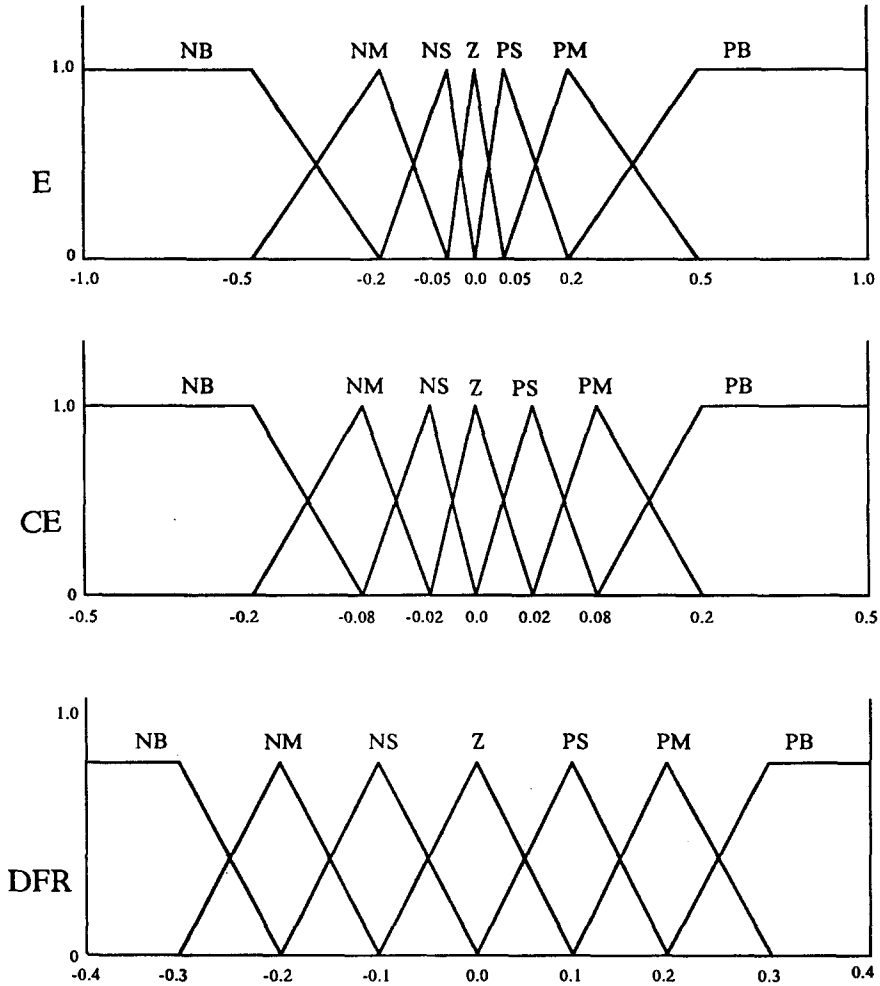


그림 6. 퍼지 멤버십 함수.

표 1. 퍼지 규칙 테이블

E \ CE	NB	NM	NS	Z	PS	PM	PB
NB	NB	NB	NM	NM			
NM	NB	NM	NM	NS	NS		
NS	NM	NM	NS	Z	Z	PS	
Z	NM	NS	Z	Z	PS	PS	PM
PS		Z	Z	Z	PS	PM	PM
PM			Z	PS	PM	PM	PB
PB			PM	PM	PM	PB	PB

의 값을 가지게 되며, 현 시간대에서 측정된 기질농도가 설정점보다 적으면 오차는 양의 값을 가지게 된다. 앞에서 수행된 배양실험 결과와 수회의 보충 배양실험을 통하여 오차 값들을 구하고 최대변화를 예상하였으며, 이를 근거로 대칭의 모양을 가지는 소속함수를 구성하였다. 함수들은 확실한 경계가 아닌 애매한 경계를 가지고 있으므로 100%의 확률을 1로 나타내고 0%의 확률을 0으로 나타내어 각각의 소속정도 (Degree of Membership)를 구하였다. E는 -1.0에서 1.0까지 변화하며, CE는 -0.5에서 0.5, DFR는 -0.4에서 0.4까지 변화함을 구하였으며, DFR의 소속함수는 실험장치에 부착되어 있는 기질공급 펌프의 성능과 주입되는 기질농도를 고려하여 DFR의 범위와 각 집합들의 소속정도를 구하였다. 이러한 최대변화 범위의 수치는 소속함수와 퍼지규칙의 구성에 유용하며, 범위의 간격을 줄일수록 제어의 성능을 뛰어나게 할 수 있다.

구성되어진 오차, 오차 변화량, 기질공급속도 변화량의 소속함수(Membership function)를 그림 6에 나타내었다. E와 CE의 소속함수는 Z 근처로 갈 수록 좁은 범위로 인해 뾰족한 삼각형 모양을 나타내며 외각으로 벗어날 수록 넓은 범위로 인해 완만한 모양을 나타낸다. 이러한 소속함수는 제어의 처음 부분에서 기질의 농도가 설정점에서 다소 벗어나더라도 어느 정도 시간이 경과함에 따라 기질농도가 뾰족한 삼각형내의 값을 가지게 되어 기질농도의 정확하고 미세한 제어를 가능하게 해준다. 제어오차 E와 제어오차의 변화량 CE에 근거하여 DFR을 결정하는 39개의 제어 규칙을 구성하였으며 규칙관계도표 (Look-up Table)를 표 1에 나타내었다.

제어오차 E와 제어오차의 변화량 CE는 퍼지화단계를 거쳐서 소속함수와 퍼지규칙에 적용되어 퍼지화된 출력 변수인 DFR이 정해지며, 이는 비퍼지화 (Defuzzification) 단계를 통과하여 DFR의 최종 제어신호 출력이 추출된다. 측정치로 부터 유도된 입력변수는 여러개의 퍼지규칙에 적용되며, 각 제어규칙에 의하여 출력치들이 계산된다. 이들 각 제어규칙의 출력으로 부터 하나의 최종 제어신호 출력을 구하기 위하여 Max-min composition 추론에 근거한 무게중심법 (Center of gravity method)이 사용되었다. 최대치를 취할 때 보다 신뢰성이 높은 무게중심법을 사용하여 전체 면적의 질량 중심값을 최종 제어신호 출력으로 사용하였다. 무게중심법을 사용하여 최종 제어 출력신호를 구하는 예를 그림 7에 나타내었다.

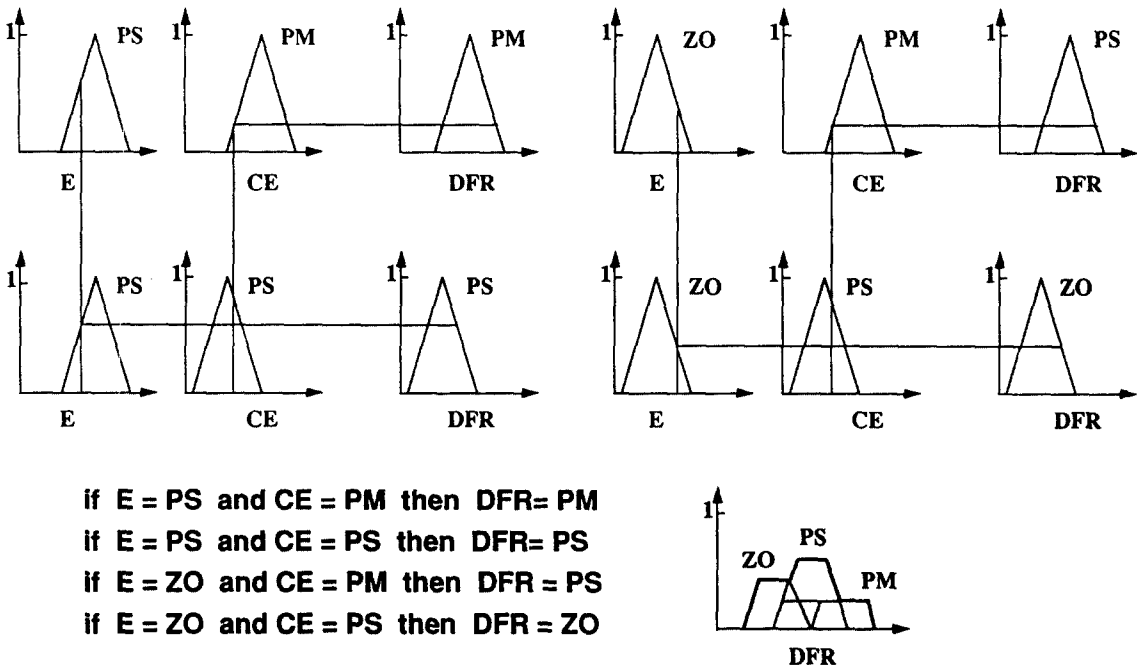


그림 7. 비퍼지화 과정.

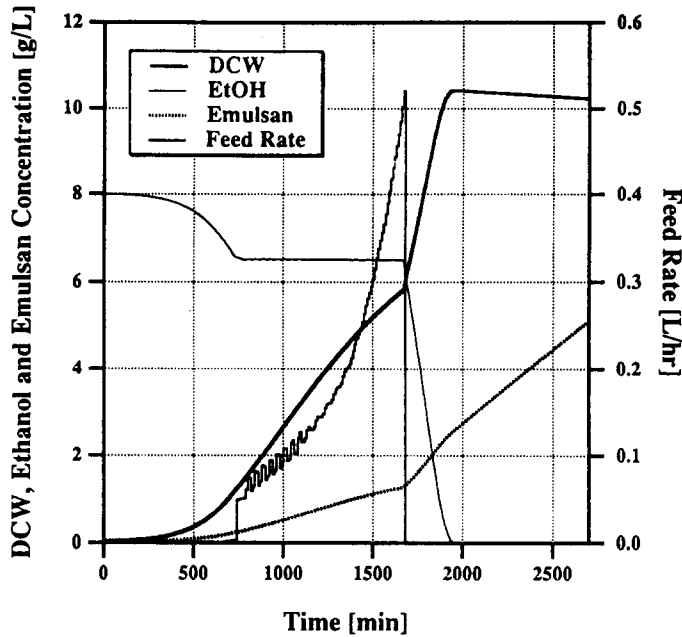


그림 8. 퍼지제어기를 이용한 유가식 배양의 전산모사 결과.

위와 같은 과정을 통하여 입력으로 들어오는 최적의 기질농도와 현 시간대에서 측정된 기질농도의 차이를 소속 함수를 통해 퍼지화하여 해당되는 퍼지규칙에 입력하고, 퍼지규칙을 통해 출력된 변수인 기질공급속도의 변화량을 무게중심법을 이용해서 비퍼지화하는 퍼지 제어계를 구성하였다.

제안된 kinetic모형을 이용하여 유가식 배양공정에 구성된 퍼지제어기를 적용한 전산 묘사를 수행하였으며 이를 그림8에 나타내었다. 그림8은 퍼지 제어를 사용한 유가식 발효공정에서 건조세포중량, 에탄올, emulsan, 그리고 기질공급 속도의 시간에 따른 거동을 보여주고 있다. 퍼지제어기를 이용한 8시간의 제어기간 동안 최적 에탄올 농도 6.5 g/L는 정확히 유지되었다. 건조세포중량은 회분식 발효에서 5.7 g/L인 반면 퍼지제어를 수반하는 유가식 발효공정에서는 8.94 g/L가 얻어졌다. Emulsan의 총 생산량은 3.0 g/L에서 5.3 g/L까지 향상되었다. 이는 에탄올 농도가 최적 설정치에 효과적으로 되었기 때문이다. 이와 같은 전산 모사 결과들은 구성된 퍼지제어 알고리즘이 잘 이루어졌음을 나타내고 있으며, 제안된 퍼지제어기를 이용한 유가식 발효 실험을 수행할 수 있는 토대를 제공하였다.

V. 퍼지제어기를 이용한 유가식 배양의 실험 결과

퍼지제어기를 이용한 유가식 배양 실험은 퍼지제어기를 이용한 전산모사의 결과가 계와 잘 일치될 때 수행된다. 그러나 퍼지제어의 전산모사의 결과에서 제어성능이 우수하다라도, 실험에서는 예측하기 힘든 세포의 특성변화와 다루기 어려운 생물반응기의 조작 그리고 측정상의 지연 때문에 생기는 지연시간때문에 실제 실험에서의 결과는 전산모사의 결과와 달라진다. 유가식 배양공정 실험은 초기상태의 발효 배지의 농도는 에탄올 8.0 g/L와 phosphate 12.1 g/L로서 구성되어졌으며 발효는 에탄올 농도가 6.5 g/L로 떨어질 때까지 회분식으로 수행한 후 에탄올과 phosphate등이 혼합된 기질을 공급하는 유가식으로 전환하였다. 회분식에서 유가식으로 전환되면 최적의 에탄올 농도(6.5 g/L)를 유지시켜 주기 위하여 연속적으로 기질을 공급하였다. 그리고 반응기내의 배양액의 부피가 3.5 L를 초과하게 되면 유가식을 회분식으로 전환하였다. 이와 같이 운전하는 이유는 emulsan은 혼합

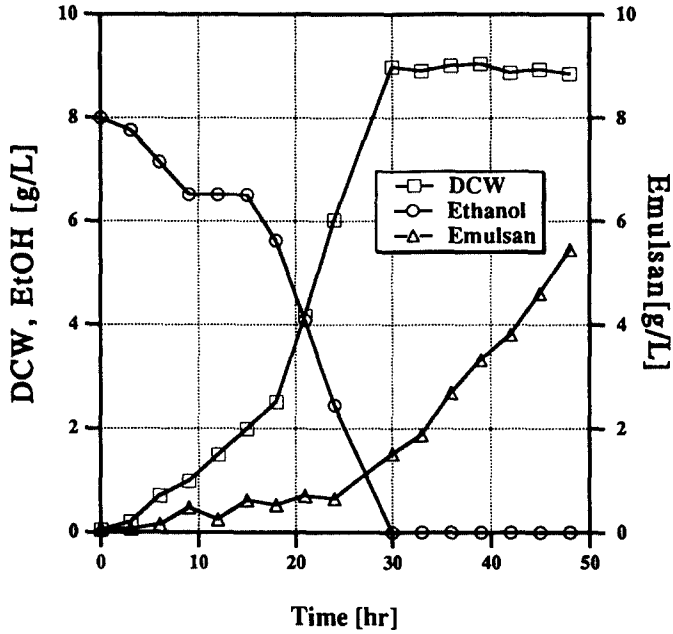
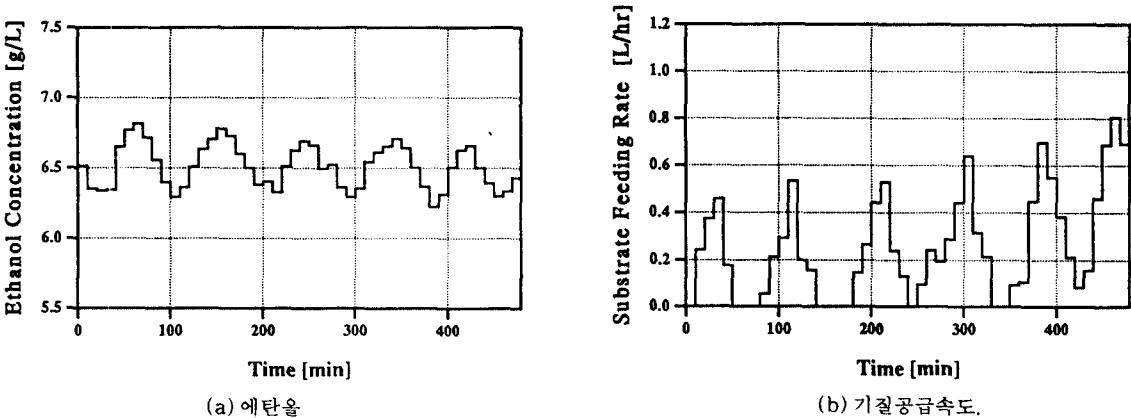


그림 9. 퍼지제어기를 이용한 유가식 배양의 실험 결과.

성장연계 생산의 유형으로 생산되므로 유가식 배양으로 미생물의 비성장속도를 최대화함으로써 대수기에서의 emulsan의 생성속도를 향상시키도록 건조세포중량을 최대화한 후, 기질 공급이 없는 회분식 배양으로 운전하여 성장이 멈춘 정지기에서 emulsan이 생산되도록 하였다.

실험결과를 그림9에 나타내었다. 실험 종결 후 반응기 부피는 약 3.5 L에 도달하였으며 건조세포중량은 9.1 g/L, emulsan은 5.5 g/L까지 얻을 수 있었다. 에탄올의 퍼지제어는 9시간 경과후부터 17 시간째까지 8 시간 동안 수행하였고 sampling time은 10분으로 하였다. Ethanol의 측정시간은 시료의 원심분리에 소요되는 10 분과 GC를 사용하여 측정에 소요되는 10 분을 합하여 20 분이지만 지연시간을 10 분으로 고려하고 sampling time을 10



(a) 에탄올

(b) 기질공급속도.

그림 10. 퍼지 제어기간 동안의 궤적

분으로 하였다. 건조세포중량은 제어가 끝난 후 30 시간째까지 크게 증가하다가 30 시간 후 정지상에 도달하였고 에탄올은 30 시간 이후 완전히 고갈되었다. 본 연구의 주 목적인 emulsan생산의 향상은 회분식 실험 수행시 3.1 g/L 이던 emulsan농도가 5.5 g/L까지 크게 증가하였다. 측정 지연에도 불구하고 제어 기간동안 그림 10(a)에서와 같이 에탄올 농도가 최적 에탄올 농도 6.5g/L 에서 0.4 범위내에서 유지되었다. 그림 10(b)에서는 기질공급 속도의 변화되는 형태를 보여주고 있는데 시간에 따라 세포가 증가함에 따라 기질이 많이 필요하기 때문에 기질공급 속도도 같이 점점 증가하였음을 알 수 있다.

전산모사 결과와 실험결과를 비교하면 차이가 발생하였는데, 이러한 차이는 실제 생물공정상의 세포 특성변화와 직접측정이 가능한 에탄올 센서의 부재로 인한 측정상의 문제에 원인이 있으리라 예상된다. 결과적으로 퍼지 제어기를 이용한 유가식 배양에서 건조세포중량과 생산된 emulsan의 양은 회분식 배양에 비하여 크게 증가하고 기질 농도제어에 있어 좋은 성능을 나타내었다.

VI. 결론 및 제언

본 연구에서는 에탄올 저해가 있는 유가식 발효공정의 운전에서 세포의 최대 비성장속도를 유지하면서 생성물인 생체 계면활성제인 emulsan의 생산성을 향상시키는 최적의 에탄올 농도를 유지시키기 위한 퍼지제어기를 구성하였다. 최적 기질농도와 반응기내의 농도 사이의 오차와 오차 변화를 입력으로 기질공급속도 변화량을 출력으로 퍼지 집합화하였으며, 기질농도의 최적치의 유지는 기질공급속도의 조절에 의하여 수행되었다. 전산기제어를 위한 퍼지제어 알고리즘이 개발되었으며, 생체 계면활성제를 생산하는 박테리아의 유가식 배양공정에 이용되었다. 퍼지제어기를 응용한 유가식 배양에서 최적 기질농도는 유지되었으며, 건조세포중량과 emulsan의 생성량은 회분식 배양보다 크게 증가되었다. 퍼지제어 시스템은 유가식 박테리아 배양공정의 전산기제어에 유용하게 적용되었다.

생물 공정에 퍼지제어의 적용의 발전 방향으로 세포의 생리적인 측면을 고려하여 모델을 수립하고 제어계를 구성한다면 더 좋은 제어 성능을 가질 수 있으리라 예상된다. 퍼지 알고리즘을 생물공정에 적용함에 있어, 유효도는 생물공정에 대한 사람의 경험과 지식에 따라 구성되는 집합규칙과 소속함수에 의해 좌우되므로, 각 전문가의 공정에 대한 고려도에 따라 변한다. 따라서, 신경망과 유전자 알고리즘등을 이용하여 자동적인 퍼지 규칙을 생산하면 생물공정에 퍼지제어의 정확도를 증가시키며 적용가능할 것이다. 또한 기질의 측정시간이 길어 시간지연때문에 퍼지제어의 성능이 감소하므로, 기질의 실시간대 제어를 가능하게 하기 위하여 생화학물질을 on-line으로 단 시간내에 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하여 생물 공정에 사용한다면 퍼지제어는 더 우수한 성능을 발휘할 것이다.

퍼지제어 알고리즘은 기질저해가 있는 유가식 발효공정에 대해 효과적으로 적용될 수 있었으며, 본 연구에서 생성물의 최대화를 위해 개발된 퍼지 제어기술은 유전자 재조합 세포배양, 식물세포 배양, 동물세포 배양과 같은 고등세포 배양에 확장, 응용되어 생물공정의 생산성을 향상시킬 수 있는 우수한 제어 결과를 얻을 수 있을 것이다. 복잡한 생화학 반응이 일어나는 생물공정의 전산기 제어에 있어 다른 기존의 제어방법보다 퍼지 제어방식이 제어의 성능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

- 사용 기 호 -

E_b	Cell-Bound Emulsan [g/L]
E_f	Free Emulsan [g/L]
E_t	Total Emulsan [g/L]
$f(P_i)$	Function of Growth Activation by Intracellular Phosphate
k_{e1}	Factor Related to the Growth-Associated Production [g/g DCW]

k_{e2}	Rate Constant of Non Growth-Associated Production [g/g DCW-hr]
K_i	Inhibition Constant of Ethanol [g/L] and [g ² /L ²]
k_{P_e}	Rate Constant of Active Transport [1/hr]
K_{P_e}	Saturation Constant of Extracellular Phosphate [g/L]
k_{P_i}	Active Transport Rate [1/hr]
$k_{P_{i0}}$	Reference Value for Active Transport Rate [1/hr]
K_{P_i}	Growth Index [$k_{P_i}/k_{P_{i0}}$]
$K_{P_{i1}}$	Saturation Constant of Intracellular Phosphate [g/g DCW]
$K_{P_{i2}}$	Production Inhibition Constant [g/g DCW]
K_S	Saturation Constant of Ethanol [g/L]
n_S	Inhibitory Index of Ethanol
P_e	Extracellular Phosphate [g/L]
P_i	Intracellular Phosphate [g/g DCW]
S	Ethanol [g/L]
t	Time [hr]
X	Dry Cell Weight [g/L]

- 그리스 문자 -

μ	Specific Growth Rate [1/hr]
μ_{max}	Maximum Growth Rate [1/hr]
$\mu_{s, max}$	Maximum Growth Rate by Ethanol Concentration [1/hr]
$\mu_{P_i, max}$	Constant in Growth Rate Eq.
v	Specific Production Rate [g/g DCW·hr]
v_{GA}	Growth-Associated Production Rate [g/g DCW-hr]
v_{NGA}	Non Growth-Associated Production Rate [g/g DCW-hr]

참 고 문 헌

1. M. L. Shuler and F. Kargi, Bioprocess Engineering, Prentice-Hall Inc., 1992.
2. G. O'Connor, F. Sanchez-Riera and L. C. Cooney, "Design and Evaluation of Control Strategies for High Cell Density Fermentations", Biotech. Bioeng., Vol. 39, pp. 293-304, 1992.
3. L. A. Zadeh, "Fuzzy Sets", Information and Control, Vol. 8, pp. 338-353, 1965.
4. M. Dohnal, "Fuzzy Bioengineering Models", Biotech. Bioeng, Vol. 27, pp. 1146-1151, 1985.
5. K. Konstantinov and T. Yoshida, "Physiological State Control of Fermentation Process", Biotech. Bioeng, Vol. 33, pp. 1145-1156, 1989.
6. B. E. Postlethwaite, "A Fuzzy State Estimators for Fed-Batch Fermentation", Che. Eng. Res. Des., Vol. 67, pp. 267-272, 1989.
7. Y. Yamada, K. Haneda, S. Murayama and S. Shiomi, "Application of Fuzzy Control System to Coenzyme 10 Fermentations", J. Chem. Eng. Japan, Vol. 24, pp. 94-99, 1991.
8. A. Reisfeld, E. Rosenberg and D. L. Gutnick, "Microbial Degradation of Crude Oils : Factors Affecting Dispersion in Sea Water by Mixed and Pure Culture", Appl. Microbiol., Vol. 24, pp. 363-368, 1972.

9. E. Rosenberg, N. Kplan, O. Pine, M. Rosenberg and D. L. Gutnick, "Capsular Polysaccharides Interfere with Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to Hydrocarbon", FEBS Microbiol. Lett., Vol. 17, pp. 157-160, 1973.
10. E. Rosenberg, A. Perry, D. T. Gibson and D. L. Gutnick, "Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : Specificity of Hydrocarbon Substrate", Appl. Env. Microbiol., Vol. 37, pp. 409-413, 1973.
11. P. D'Adamo, A. Rozich and A. Gaudy, "Anaysis of Growth Data with Inhibitory Carbon Sources", Biotech. Bioeng., Vol. 26, pp. 397-402, 1984.
12. J. Loung, "Characterization of Monod Kinetics for Analysis of Growth Data with Substrate Inhibition", Biotech. Bioeng., Vol. 29, pp. 242-248, 1984.
13. A. Mulchandani and J. Loung, "Microbial Inhibition Kinetics Revisited", Enzyme Microb. Technol., Vol. 11, pp. 66-73, 1989.
14. J. W. Choi, H. G. Choi and W. H. Lee, "Kinetic Model for Effects of Ethanol and Phosphate on Cell Growth and Emulsan Production in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, Biotech. Bioeng., Submitted, 1993.
15. W. Pedrycz, Fuzzy Control and Fuzzy Systems, Research Studies Press LTD., 1989.