Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 21, No. 4, 354-365 (1993)

유가식 생물반응기에서의 용존산소농도 및 비성장속도의 제어

김창겸 · 이태호 · 이승철 · 장용근* · 장호남
한국과학기술원 생물공정연구센터 및 화학공학과

Control of Dissolved Oxygen Concentration and Specific Growth Rate in Fed-batch Fermentation

Kim, Chang-Gyeom, Tae-Ho Lee, Seung-Cheol Lee, Yong-Keun Chang* and Ho-Nam Chang
BioProcess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

Abstract — A novel control method with automatic tuning of PID controller parameters has been developed for efficient regulation of dissolved oxygen concentration in fed-batch fermentations of *Escherichia coli*. Agitation speed and oxygen partial pressure in the inlet gas stream were chosen to be the manipulated variables. A heuristic reasoning allowed improved tuning decisions from the supervision of control performance indices and it could obviate the needs for process assumptions or disturbance patterns. The control input consisted of feedback and feedforword parts. The feedback part was determined by PID control and the feedforward part is determined from the feed rate. The proportional gain was updated on-line by a set of heuristics rules based on the supervision of three performance indices. These indices were output error covariance, the average value of output error, and input covariance, which were calculated on-line using a moving window. The integral and derivative time constants were determined from the period of output response. The specific growth rate was maintained at a low level to avoid acetic acid accumulation and thus to achieve a high cell density. The specific growth rate was estimated from the carbon dioxide evolution rate. In fed-batch fermentations, the simutaneous control of dissolved oxygen concentration (at 0.2; fraction of saturated value) and specific growth rate (at 0.25 hr^{-1}) was satisfactory for the entire culture period in spite of the changes in the feed rate and the switching of conrtol input.

일반적으로 호기성 미생물의 배양에 있어서, 물에 대한 산소의 용해도가 매우 작기 때문에 용존산소(DO ; Dissolved Oxygen)가 결핍되는 현상이 발생하게 된다. 특히, 고농도 세포 배양을 하는 반응기에서는 산소의 부족이 심각한 문제가 될수 있다. 용존산소의 결핍은 세포의 성장을 저해할 뿐만 아니라 세포 성장을 저해하는 물질을 생성하는 등 세포 성장에 직간접적인 영향을 미치게 된다(1). 그러나 oxydative damage를 받기 쉬운 동물 세포들에 대해서는 너무 높은 용존산소 농도(DOC ; DO Concentration)가 오히려 세포의 성장을 저해하는 경우도 있다(2). Sadettin 등은 동물 세포 배양에 있어서 어떤 최적 용존산소 농도가 존재하여 이 용존 산소농도에서 세포가 최대로 성장함을 발표하였다(3). 이밖에도 용존 산소 농도는 세포성장 뿐 아니라 세포생존, 대사, 그리고 항체와 같은 생합성물 생산 등 세포의 여러가지 특성에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 따라서 반응기내의 용존산소 농도는 배양 미생물의 배양조건 및 배양 목적을 고려하여 적당히 유지되어야 할 필요가 있다.

이러한 이유로 용존산소 농도를 제어하고자 하는 연구가 많이 되어 왔다. 그러나, 생물 반응기 시스템은 시간에 따라 계의 특성이 변하고 비선형성을 갖기때문에 제어하는데 어려움이 많다. 일반적으로 특성이

Key words: Fed-batch culture, *E. coli*, dissolved oxygen concentration, auto-tuning PID control
*Corresponding author

시간에 따라 변하지 않는 선형 시스템인 경우에는 제어기 매개변수가 적당한 값으로 사전 동조되어 있으면 시간이 지나가더라도 좋은 제어성능을 나타내게 된다. 그러나 비선형 또는 시변성 시스템의 경우 제어기는 제어기 매개변수를 사전 동조할 때의 조건과 비슷한 어느 한 영역에서만 제대로 작동하게 된다. 그렇기 때문에 시간에 따라 시스템의 특성이 변하므로 이에 맞는 제어기 매개변수를 동조하려는 노력이 있어 왔다(4). 지금까지의 용존산소 농도 제어 연구를 살펴보면 다음과 같다. 초기의 연구는 Flynn 등에 의해 이루어졌는데 거의 ON/OFF 제어기를 응용한 것이었다(5). 그 이후로 Yano나 Clark 등은 fixed-gain PID 제어기를 도입하였으나 생물 반응기 시스템의 비선형성과 시변성 때문에 좋은 결과는 얻지 못했다(6, 7). 이러한 문제를 해결하기 위하여 여러가지 형태의 적응제어가 시도되었다(8-10). 일반적으로 *Escherichia coli*의 고농도 세포 배양을 하는데 있어서 몇가지 문제점들이 있는데 이것들은 기질의 고갈, 기질에 의한 성장저해, 산소 공급의 문제, 그리고 부생성물에 의한 성장저해를 들 수가 있다. Meyer 등은 *E. coli* 배양시 부생성물인 아세트산의 성장저해를 제거하기위해 투석배양을 하여 부생성물을 밖으로 뽑아내는 방법으로 140~150 g/L의 세포농도를 얻었다(11). 그리고 Lee 등은 투석 시스템에서 발생하는 문제를 해결하기 위하여 막 세포 재순환 반응기를 이용하여 *E. coli* 농도를 100 g/L 이상으로 배양하였다(12). 그리고 Paalme 등은 아세트산의 생성을 미연에 방지하기 위하여 비성장속도를 제어하면서 배양하였다(13). Mori 등은 세포의 산소 요구량을 충족시키기 위해 순수 산소를 공급하면서 포도당을 공급하여 세포농도를 125 g/L에 도달하도록 하였다(14).

본 연구에서는 제어성능 지표를 on-line으로 관찰하여 PID 제어기를 자동으로 동조해주는, Hwang 등에 의하여 개발된 자동 동조 PID control 알고리듬을(15) 유가식 반응기의 용존산소 농도를 제어하는데 응용하였다. 이 방법은 앞의 방법들과는 달리 제어매개변수를 동조하기 위하여 인위적으로 시스템에 계단 입력을 가할 필요가 없을 뿐만 아니라 초기 제어변수를 동조할 필요가 없는 특징을 가지고 있다. 대상 시스템으로는 *E. coli*의 유가식 배양을 택하였다. 앞에서 언급한 자동 동조 알고리듬을 이용하여 용존산소 농도를 제어하는 동시에, 배지공급속도를 조절하여 비성장속도를 너무 높지 않은 특정값에 유지하여 *E. coli*가 성장저해를 받지 않도록 하였다. 본 연구에서 대상으로 삼고있는 유가식 생물 반응기에 있어서는 회분식 반응기와는 다르게 시스템 외부로부터 시간에 따라 변하는 유량의 배지가 공급되어진다. 이것은 생물 반응기내의 용존산소등 제어하고자 하는 입장에서 보면 일종의 외부 교란 (disturbance)으로서 인식되어질 수 있다. 특히, 고농도의 기질을 함유한 배지가 반응기 안으로 주입될 때는 용존산소 농도 제어에 더욱 큰 영향을 미치게 된다. 이 영향은 제어기의 성능을 저하시킬 뿐만 아니라 자동 동조 알고리듬을 사용하여 제어기 매개 변수 (parameter)를 동조하고자 할때 자동 동조 알고리듬이 시스템 특성 변화를 판단하는데 방해가 된다. 이와 같은 이유때문에 본 연구에서는 외부로부터의 배지 유량 변화에 기인하는 외부 교란을 보상해주기 위하여 기존의 피드백 구조에 피드포워드 구조가 첨가되었다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 *E. coli* K-12로서 유전공학연구소 유전자 은행에서 분양받아 사용했다. 균주는 agar를 첨가한 고형화된 고형 배지에서 배양하여 4℃ 에서 보관하면서 접종에 사용하였다. 보관용 agar plate는 4주마다 계대배양하여 사용하였다.

초기 회분 배양 기간의 배지 조성과 유가식 배양 기간의 공급배지 조성은 Table 1에 나타나있다. Seed culture를 위한 성장배지의 조성은 초기 회분 배양 기간의 조성과 같은 것을 사용하였다. 모든 액상 배

Table 1. Medium composition (g/L)

(initial batch period)			
Glucose	10	Yeast extract	5
Casamino acid	5	KH2PO4	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	$CaCl_2$	0.02
$FeSO_4$	0.04	$MnSO_4 \cdot nH_2O$	0.01
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	0.01	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.004
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.001	H_3BO_3	0.0005
(fed-batch period)			
Glucose	300	Yeast extract	90
Casamino acid	90	KH_2PO_4	15
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3	$CaCl_2$	0.6

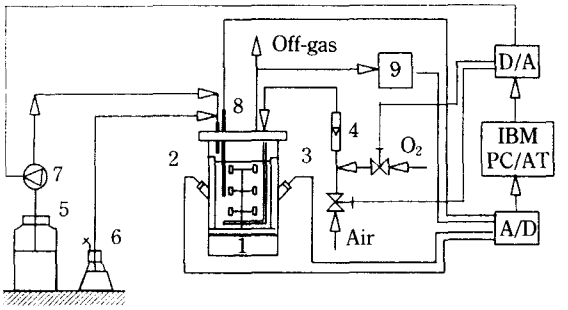

Fig. 1. Schematic diagram of experimental set-up.

1. Bioreactor
2. DO Probe
3. pH Probe
4. Gas Flow Meter
5. Feed Medium
6. NH_4OH Solution
7. Peristaltic Pump
8. Temperature Sensor
9. Mass Spectrometer

지는 120℃에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다.

실험장치

본 실험에서 사용한 실험장치의 개요도는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 발효기는 Bio-Stat E fermenter system(B. Braun Biotech.)을 사용하였으며 반응기의 조업부피는 5 L였다. 반응기내의 용존산소 농도는 Ingold 사의 산소 전극을 사용하여 측정하였다. 용존산소 농도, RPM, pH, 온도 등의 데이타들과 컴퓨터로부터의 제어 변수값들은 A/D, D/A converter(Analog Design)를 경유하여 받아들여지고 또 전달되었다. 비성장속도를 추정하는데 필요한 Q_{CO_2}(specific carbon evolution rate)값들과 그 밖의 가스 데이타들은 mass-spectrometer(VG SX200)로 측정되어 컴퓨터로 읽혀들여졌다. 공급배지는 배지보관병으로부터 컴퓨터로 제어되는 Masterflex 펌프(Cole Parmer Instrument Co.)를 통하여 반응기내로 주입되었다. 산소의 유량의 제어는 AALBOG사의 mass flow controller를 사용하였다.

실험조건

초기 회분 반응은 1.5 L로 시작했다. 조업기간 동안에 pH와 온도는 각각 6.8과 37℃로 유지되었다. pH는 50(v/v)% NH_4OH를 사용하여 제어하였다. 균을 접종한뒤 4~5시간 가량 지난 후에 off-gas 중의 이산화탄소량이 갑자기 감소하면 반응기내의 포도당이 고갈되었다고 판단하고 그 시점부터 배지공급을 시작했다.

분석방법

반응기내의 포도당 농도는 효소법(glucose E-kit, 영동제약)을 이용하여 포도당을 발색시킨 후 spectrophotometer(BECKMAN, DU-65)를 사용하여 505 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하여 구했다. E. coli 의 농도는 600 nm에서 optical density를 측정하여 구했다. 아세트산은 FID(flame ionization detector)를 장착한 gas chromatography(Varian 3300)를 사용하여 분석하였다. 아세트산의 기화를 돕기 위해 시료를 강염산으로 처리하여 pH가 2.0 이하로 만든 후 분석하였다.

용존산소 제어 알고리듬

피드백 제어기의 일종인 자동 동조 PID 제어 알고리듬과 배지 공급속도 변화에 따른 효과를 보상해 주기위한 피드포워드 알고리듬이 함께 사용되었다. 또한, 교반속도를 조작변수로 사용하여 제어하는 중 세포량의 증가에 따른 산소요구량의 증가를 최대 교반속도로도 더이상 감당할 수 없을 경우에는 조작변수를 교반속도로부터 유입공기중의 산소분압으로 바꾸어주었다.

피드백 제어 알고리듬 : 기본 구조는 기존의 디지탈 PID 제어기와 같으며 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$U_b(k)=U_b(k-1)+K_c\left\{\{C(k)-C(k-1)\}+\frac{T}{\tau_i}e(k)+\frac{\tau_d}{T}\{C(k)-2C(k-1)+C(k-2)\}\right\} \quad (1)$$

앞에서도 언급했지만 생물 반응기 시스템은 시변성이 강하고 비선형 시스템이기 때문에 초기에 맞도록 동조된 제어기 매개변수(K_c, τ_d, τ_i)값들은 시스템 특성이 변함에 따라 부적절한 값으로 바뀌게 된다. 그렇기 때문에 제어기 매개변수값을 연속적으로 시스템 특성에 맞도록 동조해주어야 할 필요가 있다. 본 연구에서는 PID 제어기 매개변수를 동조하기 위해서 4가지의 제어 성능 지표를 이용하였다.

비례이득의 동조를 위한 제어 성능 지표들로는 제한된 크기의 moving window를 사용하여 실시간에서 계산되는 시스템 출력오차의 분산(CovC(k)), 제어입력 분산(CovU(k)), 그리고 잔류오차(Offset)의 세가지가 사용되었다. 또 하나의 성능지표인 출력응답의 임계주기를 τ_d, τ_i의 동조를 위해 사용하였다.

$$CovC(k)=S_1(k)-S_2(k)^2 \quad (2)$$

$$CovU(k)=S_3(k)-S_4(k)^2 \quad (3)$$

$$Offset(k)=C_s-S_2(k)$$

where

$$S_1=\frac{1}{n}\sum_{l=k-n}^{k-1} C(k-1)^2$$

$$S_2=\frac{1}{n}\sum_{l=k-n}^{k-1} C(k-1)$$

$$S_3=\frac{1}{n}\sum_{l=k-n}^{k-1} U(k-1)^2$$

$$S_4=\frac{1}{n}\sum_{l=k-n}^{k-1} U(k-1)$$

여기서 n은 moving window의 크기를 나타내는 값으로 본 연구에서는 40(80 sec)을 사용하였다. 또 다른 제어 성능지표는 다음과 같은 시스템 출력의 moving window offset이다. 이들 제어 성능지표를 이용하여 비례이득을 동조하는 알고리듬은 다음과 같다. 먼저 시스템이 진동하고 있는 경우 현재의 비례이득이 너무 크다고 판단하여 그 값을 줄이도록 하였다. 시스템의 진동하는 정도는 시스템출력 분산값과 제어입력 분산값으로 판단하였다. 시스템 출력 분산값을 이용하여 현재의 비례이득 값을 동조하는 방법은 시스템 입력에 대한 출력의 변화가 민감한 경우에 적당하고 제어입력 분산값을 사용하는 것은 시스템 입력에 대해 출력이 둔감할 때에 적당하다. 시스템 출력 분산값이나 제어입력 분산값이 어느 기준값 이하인 상태에서, 잔류오차가 발생하게 되면 시스템의 비례이득이 작다고 판단하여 비례이득값을 증가시켜준다. 이와 같은 알고리듬을 종합하여 식 (4)와 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned}&\text{IF } CovC(k)>CovC_{max} \text{ and } CovU(k)>CovU_{max}\\&\text{THEN } K_c(i)=K_c(i-1)-\alpha\cdot\{CovU(k)+CovC(k)\}\\&\text{IF } CovC(k)<CovC_{min} \text{ and } |Offset(k)|>Offset_{crit}\\&\quad\text{THEN} \quad K_c(i)=K_c(i-1)+\beta\cdot|Offset(k)|\\&\quad\text{OTHERWISE } K_c(i)=K_c(i-1)\end{aligned} \quad (4)$$

이러한 비례이득의 재조정은 매 sampling마다 이루어지는 것이 아니라 한번 조정이 이루어지면 일정시간 동안 비례이득 재조정 결정을 보류하도록 하였다. 이는 제어기의 비례이득을 바꿈으로서 생기는 효과를 시스템의 특성과 구별할 수 있게 해준다. 본 연구에서 제어기 매개변수를 동조하기 위해 사용된 설계변수들은 Table 2와 같다.

Table 2. Design values used for tuning controller parameters

$CovC_{max}=1.0\times10^{-4}$
$CovU_{max}=8.0\times10^{-5}$
$CovC_{min}=1.0\times10^{-6}$
$Offset_{crit}=2.0\times10^{-2}$
$p_w=0.3$
$T=2.0$ sec

앞에서 언급했듯이 미분 및 적분 시간상수의 동조를 결정하기 위한 제어 성능지표로서 시스템 출력응답의 임계주기를 사용하였다. 이는 미분 시간상수가 시스템 출력응답의 임계주기에 비례하도록 해주는 Ziegler-Nichols 방법을 원용한 것이다. 이와 같은 방법을 사용하기 위해서 먼저 제어성능지표인 임계주기를 on-line으로 측정하였다. 그리고 시스템의 출력 오차의 주기변화가 시스템의 동특성이 변화에 의한 것인지 잡음효과에 의한 것인지를 판단하는 방법을 사용하였다. 적분 시간상수는 미분 시간상수과 일정한 비(4.0)를 갖도록 하였다. 이것 역시 Ziegler-Nichols 방법을 원용하였다. 우선 제어 성능지표인 시스템 진동주기를 구하기 위하여 시스템 출력의 local minimum을 찾는 방법을 고안하였다. Local minimum에서는 미분값이 0이고 두번 미분한 값이 양수값을 가지므로 다음과 같은 알고리듬을 사용하여 진동주기를 결정할 수 있다.

$$\begin{aligned}&\text{IF}|\Delta C(k)|\le\varepsilon \text{ and } \Delta^2C(k)>0\\&\quad\text{THEN } T_m(j)=\text{Time}, \ Period(j)=T_m(j)-T_m^*(j-1)\end{aligned} \quad (5)$$

여기서 ε는 충분히 작은 값을, Δ은 1차 미분을, Δ^2은 2차 미분을 의미한다. 또한 Time은 local minimum이 발견된 시간을 나타낸다. 이와 같은 알고리듬만으로는 측정잡음이나 외부 교란에 의한 미세진동이 진동주기를 결정하는데 착오를 가져올 수 있기 때문에 다음과 같은 noise filter로 보완하여 시스템의 진동주기를 결정하였다.

$$\begin{aligned}&\text{IF } Period(j)>4\cdot T \text{ and } CovC(k)>CovC_{pd}\\&\quad\text{THEN } Period(j)=Period(j-1)+pw\{Period(j)\\&\qquad\qquad-Period(j-1)\}\\&\quad\text{ELSE } Period(j)=Period(j-1)\end{aligned} \quad (6)$$

여기서 $CovC_{pd}$는 시스템의 동특성이 심하게 변하지 않는 한 우선적으로 비례이득을 조정하게하는 역할을 하는 임의의 상수이다. 이렇게 구한 시스템 진동주기를 이용하여 최종 τ_i와 τ_d를 동조하는 알고리듬은 다음과 같다. 현재 사용하고 있는 미분 및 적분 시간상수를 구하는데 사용한 시스템 진동주기와 새롭게 계산된 시스템의 진동주기를 비교하여 그 변화도가 15% 이상인 경우에만 시간상수를 재동조하도록 하였다.

$$IF \left| \frac{Period(j)-Period(j-1)}{Period(j)+\varepsilon} \right| \geq 0.15$$

$$THEN\ \tau_d(j)=\tau_d(j-1)+p_w\{0.16\cdot Period(j) -\tau_d(j-1)\}$$
$$\tau_j(j)=4\cdot\tau_d(j) \quad (7)$$

피드포워드 알고리듬 : 유가식 배양시 반응기 안의 포도당 농도가 높게 되면 *E. coli*는 아세트산을 생산하게되어 성장을 저해받게 된다(16). 그러므로 이를 방지하기 위해서는 반응기안의 포도당 농도는 거의 고갈상태로 유지된다. 이런 상태에서 반응기안으로 고농도의 배지를 주입하게되면 포도당에 의해 성장이 제한되었던 세포들은 왕성하게 포도당을 섭취하게 된다. 이에 따라 용존산소 농도 또한 급격하게 떨어지게 된다. 이런 현상은 세포농도가 높아질수록 더욱 심하게 나타나게 되며 용존산소 농도를 제어하는데 있어서 일종의 외부 교란 역할을 하게 되어 제어성능 지표로부터 실제 시스템의 동특성을 파악하는데 혼란을 가져올 수 있다. 그렇기 때문에 이를 보상해 주어야할 필요가 있는데 이를 위하여 식 (8)과 같은 피드포워드 알고리듬을 도입하였다.

$$U_f(k)=G_{ff}\cdot U(k-1)\frac{F(k)-F(k-1)}{F(k)} \quad (8)$$

이와 같이 계산된 제어 입력은 $\Delta F(k)(=F(k)-F(k-1))$에 해당하는 양의 기질이 반응기안으로 유입되는 것으로 인하여 발생하는 용존산소 농도 변화를 보상할 수 있는 양이다.

피드포워드 이득값은 $\Delta F/F(k)$이 양수일 때와 음수일 경우를 고려하여 값을 달리하였는데, 이는 배지공급속도가 감소할 때 생기는 DO(dissolved oxygen)의 증가효과와 배지공급속도가 증가할때 DO의 감소효과에 차이가 있기 때문이다. 본 연구에서는 $\Delta F(k)$가 양수일 때 음수인 경우보다 이득값을 2배로 해주었다.

제어 입력변수 전환 : 본 연구에서는 용존산소 농도를 제어하기 위하여 교반속도와 유입 산소분압을 제어 입력 변수로 사용하였다. 세포 농도가 낮은 회분 배양시와 유가식 배양 초기에는 교반속도(RPM)를 조작 변수로하여 용존산소 농도를 제어하였다. 그러나 유가식 배양을 계속하게되면 반응기안의 세포농도가 점점 증가하게 되고 RPM이 최대 한계값(1000 rpm)에 도달하게 되어 RPM만으로는 더이상 원하는 수준의 용존산소 농도를 유지할 수 없게 된다. 이때 RPM을 800으로 낮추어 고정시키고 조작변수를 RPM에서 산소분압으로 바꾸어 제어하였다. 산소분압은 순수 산소의 유량과 공기유량의 비를 변화시킴으로써 총 기체 유입속도를 일정하게 유지하면서 조작할 수 있었다. 제어 변수 전환은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$IF(RPM>950\ rpm)$$
$$THEN\ RPM=800\ rpm\ \ P_{O_2}=27.32\%$$
$$start\ oxygen\ supply,\ and\ manuplate\ P_{O_2} \quad (9)$$

where RPM is a movingk average rpm ;

$$RPM=\frac{1}{n}\sum_{l=k-n}^{k-1} RPM(k-1)$$

위에서 보는 것과 같이 제어 변수를 전환할 때 RPM을 800으로 낮추어서 고정시켰는데 이는 전환 초기에 산소분압을 가지고 제어할 때 제어할 수 있는 폭을 확보해주고 한편으로는 있을지도 모르는 높은 교반속도에 의한 세포의 손상과 반응기에 기계적 무리가 가는 것을 방지하기 위해서이다.

가스 데이타로부터의 비성장속도 추정

세포의 비성장속도가 특정 문턱값($\mu_{threshold}$)보다 크게 되면 *E. coli*는 아세트산을 생산하기 시작한다. 이렇게 생산되어진 아세트산은 세포의 성장을 저해하게되어 결국 고농도 세포 배양을 할 수 없게 된다. 그러므로 고농도 세포 배양을 하기 위해서는 비성장속도(μ)를 충분히 낮은 값, 즉 $\mu_{threshold}$보다 낮은 값으로 유지해야 할 필요가 있다. 그러나 반응기 안의 비성장속도나 세포농도를 on-line으로 측정할 수 없기 때문에 비성장속도를 제어하기 위해서는 다른 측정가능한 값으로부터 그 값을 추정해야 한다.

본 연구에서는 다음과 같이 가스 데이타로부터 Q_{CO_2} 값을 계산하여 이로부터 비성장속도를 추정하였다.

기본적으로 Q_{CO_2}값은 세포성장속도에 선형적으로 변한다고 가정하였다(16). XV를 total cell mass, x로 표시하면 물질수지식을 식 (10), (11)와 같이 나타낼 수 있다. 여기에서 m은 세포의 유지에 의한 CO_2 발생을 나타내며 $Y_{CO_2/X}$는 세포질량에 대한 CO_2의 수율값이다.

$$\frac{dx}{dt}=\mu\cdot x \tag{10}$$

$$Q_{CO_2}=m\cdot x+Y_{CO_2/X}\cdot\mu\cdot x \tag{11}$$

윗 식 (11)를 시간에 대해서 0에서 t까지 적분하면 비성장속도가 일정하게 유지되고 초기 세포농도가 무시할 만큼 작다는 가정하에 아래의 (12)식을 얻을 수 있다.

$$\int_0^t Q_{CO_2}dt=\int_0^t(m\cdot x+Y_{CO_2/X}\cdot\mu\cdot x)dt$$

$$=\frac{m\cdot x}{\mu}+Y_{CO_2}\cdot x \tag{12}$$

식 (11)을 식 (12)로 나누어 주면

$$\frac{Q_{CO_2}}{\int_0^t Q_{CO_2}dt}=\frac{m\cdot x+Y_{CO_2/X}\cdot\mu\cdot x}{\frac{m\cdot x}{\mu}+Y_{CO_2/X}\cdot x}=\mu \tag{13}$$

결국 반응기안의 비성장속도를 계속적으로 일정하게 유지할 수만 있다면 (13)식을 이용하여 가스 데이타 Q_{CO_2}로부터 비성장속도를 on-line으로 추정할 수 있게 된다.

Feeding policy

위에서 설명한 것과 같이 아세트산의 생산을 방지하기 위해서는 비성장속도를 특정치(threshold)문턱값 이하로 유지시켜 줄 필요가 있다. 이를 위한 제어 알고리듬을 살펴보면 다음과 같다. 제어 알고리듬은 추정된 비성장속도와 유지하고자 하는 set point와의 차이에 비례하는 비례제어기 항과 다음 제어조치가 있을 때까지 세포가 성장하는 것을 예측하여 동작을 취해주는 피드포워드 항의 합으로 이루어져 있다. 이때 어떤 시점 t에서 취해야할 feed rate상의 변화는 다음과 같이 나타내어진다.

$$\delta F(t)=F(t)\cdot G\cdot(\mu_s-\mu)+\delta t\cdot\frac{dF(t)}{dt} \tag{14}$$

여기서 δ는 미세 변화를 나타내는 operator이다. 일반적으로 유가식 배양 기간 동안에 세포는 대수증식(exponential growth)을 하기 때문에 이에 따라 세포가 성장하는데 필요한 기질의 양 또한 대수적으로 증가해야 한다. 그러므로 어느 한 시점에서 취해주어야 할 배지공급속도를 다음과 같이 예측할 수 있다. 먼저 비성장속도가 μ_s값으로 일정하게 유지된다고 가정하면 배지공급속도, F(t)는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$F(t)=F_0\cdot\exp(\mu_s\cdot t) \tag{15}$$

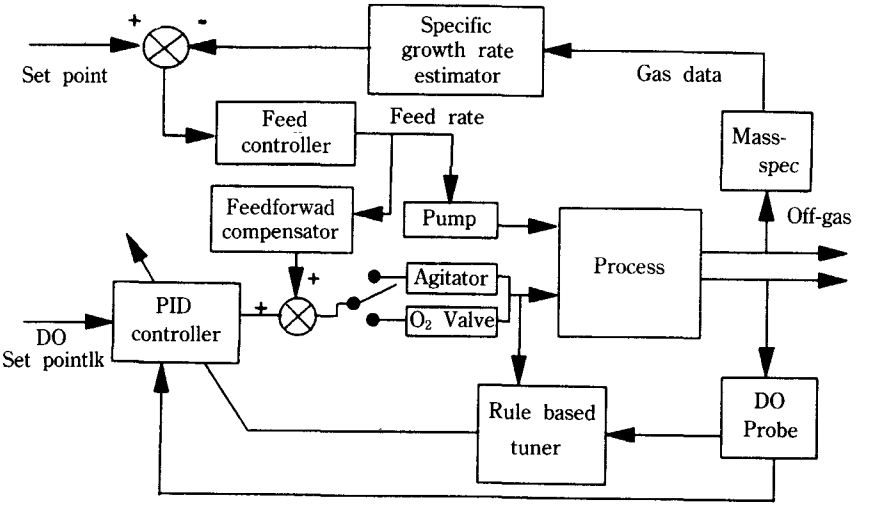

Fig. 2. Block diagram of control algorithm.

그러므로

$$\frac{dF(t)}{dt} = \mu_s \cdot F(t) \quad (16)$$

그리고 비례제어기항의 비례이득 값도 배지공급속도에 비례하여 증가하도록 하였다. 디지탈 제어기에서 사용할 수 있도록 이산화하면 (17)식과 같은 결과를 얻을 수 있다.

$$F(i) = F(i-1) \cdot \{1 + \mu_s \cdot T' + G \cdot [\mu_s - \mu(i)]\} \quad (17)$$

본 연구에서 제어 동작은 매 3분마다($T'=3$ min) 이루어졌다. 전체 알고리듬의 개요를 Fig. 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

본 연구에서 실험은 처음 5시간 가량 회분작업을 수행하고 포도당 농도가 300 g/L인 공급배지를 넣으면서 대략 11시간 가량 더 수행하였다. 용존산소 농도의 set point값은 20%로 하였다. 그리고 비성장속도의 set point값은 0.25 hr^{-1}를 사용하였다.

자동 동조 PID 제어

자동 동조 알고리듬의 초기 제어기 매개변수값들은 비례이득, 적분 및 미분 시간 상수값이 각각 0.35, 28초, 그리고 7초이었다. Fig. 3(a)는 자동 동조 PID 제어기만을 사용하여 용존산소 농도를 제어한 결과를

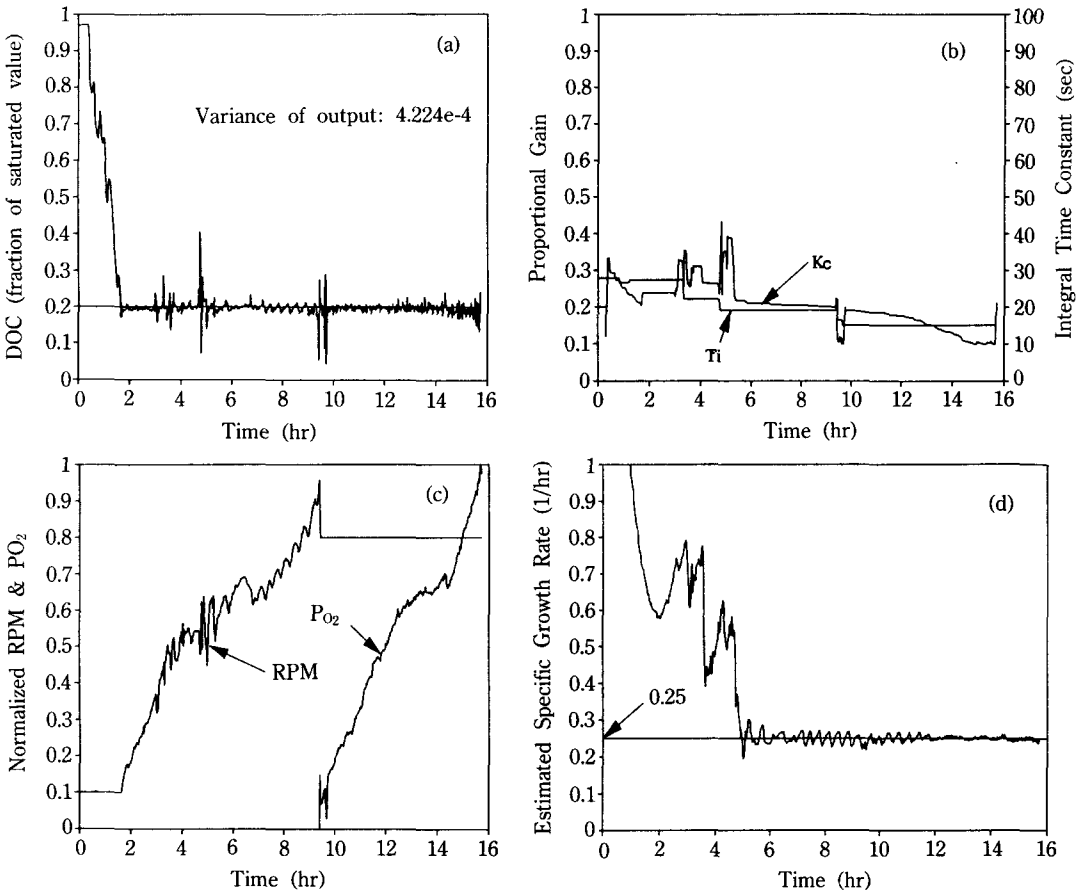

Fig. 3. Simultaneous control of dissolved oxygen concentration and specific growth rate in a fed-batch culture of *E. coli* (Auto-tuning PID control, $K_c(0)=0.2$, $\tau_i(0)=28$ sec, $\tau_d(0)=7$ sec).

(a) DOC control using auto-tuning PID controller.
(b) Changes in controller parameters.
(c) Profiles of RPM and oxygen partial pressure of inlet gas stream.
(d) Profile of estimated specific growth rate.

보여준다. 처음 균을 접종하였을 때부터 용존산소 농도가 설정점에 도달할 때까지는 반응기내의 혼합을 위하여 100 rpm을 유지하였다. 세포가 성장하면서 두시간 가량 지난후부터는 용존산소 농도가 설정점 이하로 떨어지기 시작했고 이때부터 제어기가 작동하기 시작하였다. 그림에서 보면 처음 회분작업을 하는 동안에는 제어 성능이 좋지 못한데 이는 반응기안의 특성이 계속적으로 변하기 때문이다. 그러나 곧 제어기 매개변수가 자동으로 동조되면서(Fig. 3(b)) 제어성능이 향상되고 있음을 볼 수 있다. 4시간 30분 정도가 지나면서 rpm 이 감소하고 비성장속도 또한 감소하기 시작하였다(Fig. 3(c), 3(d)). 이때를 반응기 안의 포도당 농도가 고갈된 상태라고 생각하고 5시간째부터 배지를 공급하기 시작하였다. 배지공급이 시작되면서 용존산소 농도가 크게 흔들리는 것을 볼 수가 있는데 이는 공급 초기에 공급 속도가 너무 적어 펌프를 작동하는데 기계적인 문제가 있어 배지유량에 큰폭의 진동이 있었고 이에 의해 용존산소 농도가 영향을 받았기 때문이다. 시간이 지나면서 다시 비교적 안정적으로 제어됨을 볼 수가 있었다. Fig. 3(b)에서는 약 9.5시간 경과후 조작 변수가 rpm에서 산소분압으로 바뀜 (Fig. 3(c))에 따라 자동 동조 알고리듬이 이에 따른 시스템 특성의 변화를 인식하고 비례이득값을 변화시켜 몇분 후에는 다시 좋은 제어 성능을 보임을 알 수 있다. 그러나 시간이 지나면서 세포농도가 증가하고 배지공급속도의 변화가 급격히 커질 경우 자동 동조 기능에도 불구하고 제어 성능이 어느 정도 떨어짐을 볼 수가 있었다. 유가식 배 양기간 동안 용존산소 평균 분산값은 $4.224\times10^{-4}\left[\frac{\text{g/L dissolved } O_2}{\text{g/L saturated } O_2}\right]^2$이었다.

비성장속도는 Fig. 3(d)에 나타나있다. 그림에서 보듯이 배지공급이 시작된 5시간 이후부터는 지속적인 진동이 있기는 하지만 전체적으로 설정점(0.25 hr^{-1})를 잘 따라가고 있음을 알 수 있다. 특히 끝으로 갈수록 더욱 정밀하게 제어되고 있음을 볼 수가 있는데 이는 가스 데이타 Q_{CO_2}를 가지고 비성장속도를 추정할 때 Q_{CO_2}의 적분항이 커짐에 따라 좀더 안정적으로 비성장속도를 추정할 수 있었기 때문이라 생각된다.

피드포워드 알고리듬이 첨가된 자동 동조 PID

자동 동조 PID만을 사용한 경우(Fig. 3(a)) 전반적으로 용존산소 농도가 설정점에서 잘 유지되었지만 배지공급이 시작된 시점과 제어변수가 변환된 시점에서 큰폭의 진동현상이 발생했다. 이런 문제점을 극복하기위해서 자동 동조 PID 제어기에 피드포워드 알고리듬을 첨가하였다. 먼저 다음의 Fig. 4(a)와 4(b)는 피드포워드 알고리듬을 사용하지 않은 경우와 사

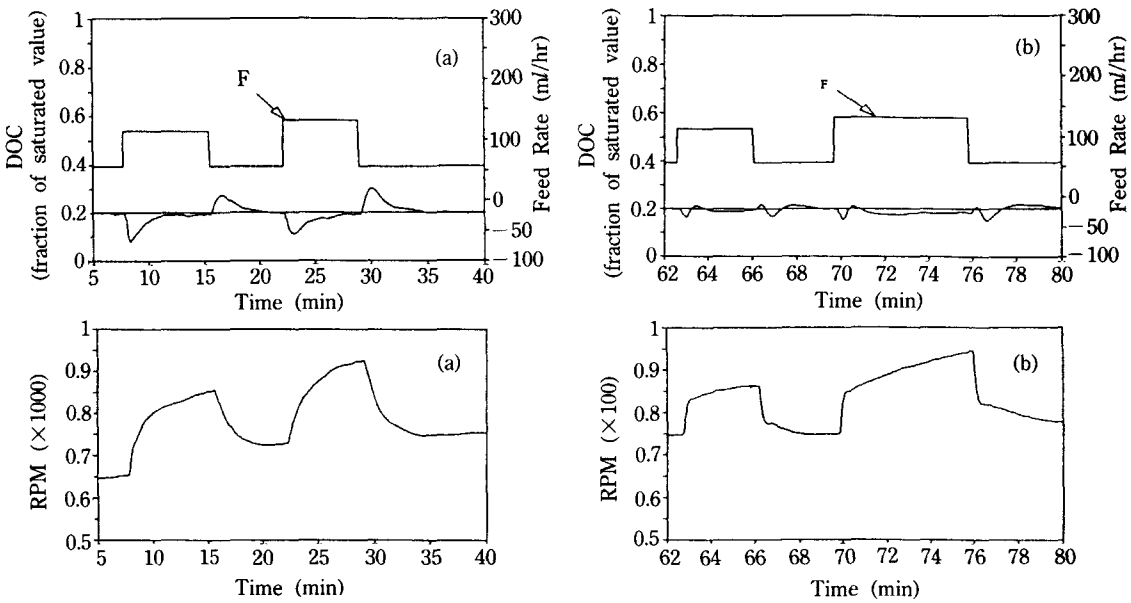

Fig. 4. Effect of feedforward compensation for feed flow rate change.
(a) Feedback only
(b) Feedback & feedforward

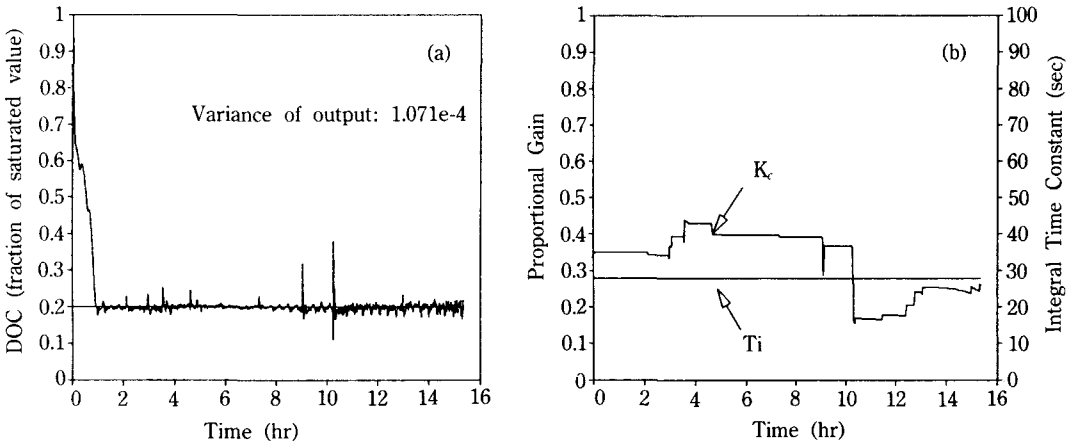

Fig. 5. Simultaneous control of dissolved oxygen concentration and specific growth rate in a fed-batch culture of *E. coli* (Auto-tuning PID control with feedforward compensation, $K_c(0)=0.35$, $\delta_i(0)=28$ sec, $\delta_d(0)=7$ sec).
(a) DOC control using auto-tuning PID controller with feedforward compensation.
(b) Changes in controller parameters.

용한 경우의 제어 성능을 비교한 것으로 배지공급속도를 계단입력으로 증가시켰다 감소시키는 조작을 반복했을 때의 조작 변수(RPM)의 변화와 용존산소 농도의 변화를 각각 보여준다. Fig. 4(a)에서 보면 공급속도가 계단입력으로 증가했을 경우 이 효과를 보상하기 위한 조작 변수가 너무 느리게 동작함을 볼 수 있다. 그렇기 때문에 이 외부 교란 효과를 충분히 상쇄시키지 못함을 알 수 있다. 이에 비해 Fig. 4(b)는 외부 교란 효과를 미리 예상하여 좀 더 빠르게 제어 동작을 취해줌으로써 외부 교란 효과를 효과적으로 상쇄시켜주고 있음을 볼 수 있다.

Fig. 5(a)는 피드포워드 알고리듬이 첨가된 자동 동조 PID 제어기로 용존산소 농도를 제어한 결과를 보여준다. 피드포워드 알고리듬을 사용하지 않았을 경우와 비교하여 보면 몇가지 차이점을 발견할 수 있는데 무엇보다도 시스템 조작 변수가 바뀌었을 때 자동 동조 PID 만을 사용했을 경우보다 더 빠르게 시스템에 적응한다는 것이다. 이는 제어기 매개변수가 어떻게 변하고 있는지, Fig. 3(b)와 5(b)를 비교하여 보면 쉽게 알 수 있다. 그리고 전반적으로 제어 성능이 개선되었음을 볼 수가 있다. Fig. 5(a)에서 유가식 배양기간 동안의 용존산소 분산값은 $1.071\times10^{-4}\left[\frac{\text{g/L dissolved } O_2}{\text{g/L saturated } O_2}\right]^2$으로 피드포워드 알고리듬을 사용하지 않았을 때의 1/4에 해당하는 값이다.

이 경우에도 비성장속도는 자동 동조 PID 제어기만을 사용했을 경우와 마찬가지로 설정점(0.25 hr^{-1})을

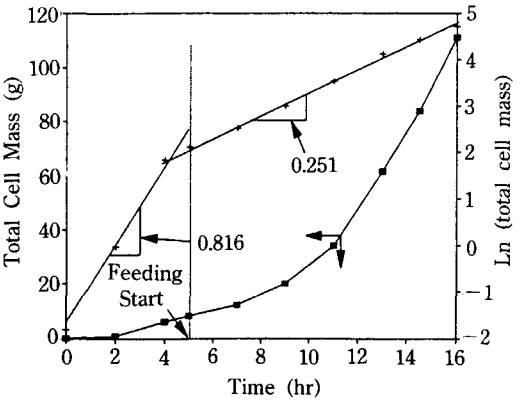

Fig. 6. Calculation of specific growth rate from cell mass.
+: logarithm of cell mass, ■: Total cell mass

비교적 잘 따라가고 있음을 볼 수가 있었다. Fig. 6은 실제 총 세포량으로부터의 비성장속도를 계산한 결과를 보여준다. Fig. 6의 직선은 총 세포량을 자연로그값(ln)으로 취하여 regression한 것으로 기울기가 0.251, 상관계수 r= 0.9967이었다. 실험 중 추정에 의한 비성장속도값이 설정점인 0.25 hr^{-1}에 매우 가깝게 유지되었던 것을 감안하면 본 연구에서 사용한 비성장속도 추정 방법이 비록 간단하지만 좋은 성능을 나타냄을 알 수 있다.

Fig. 7은 반응기안의 포도당 농도와 아세트산 농도를 나타내고 있다. 그림에서 보면 처음 4시간 이전까지의 회분배양을 하는 동안에는 비성장속도를 제

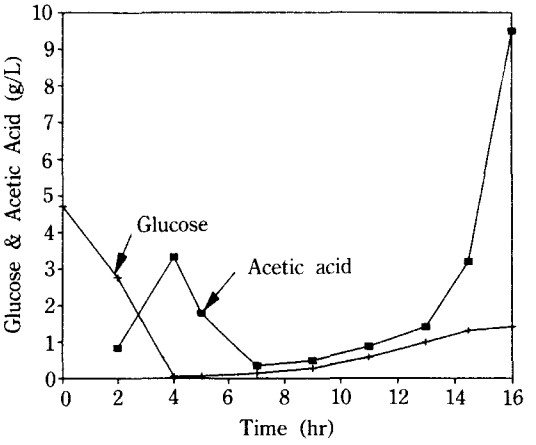

Fig. 7. Profiles of glucose and acetic acid concentrations.
+: glucose, ■: acetic acid

어하지 않으므로 포도당 농도가 급격히 감소하면서 반대로 아세트산이 3~4 g/L 정도까지 발생함을 볼 수가 있는데 이는 회분 배양기간 동안에 세포가 최대 성장속도로 성장하기 때문이다. 그러나, 곧 포도당 농도가 거의 0으로 떨어지면서 세포들은 포도당 대신 아세트산을 기질로 이용하기 시작하므로 아세트산 농도도 점차 감소함을 볼 수가 있다. 유가식 배양이 시작되면서부터는 배지공급속도를 가지고 비성장속도를 제어하기 때문에 반응기 안의 비성장속도가 설정점 근처의 낮은 값으로 유지되었다. 그러므로 13시간 정도까지는 과도한 아세트산의 축적없이 잘 조업되고 있음을 볼 수가 있다. 그러나, 그 이후로 아세트산이 급격히 축적되면서 포도당 농도 또한 증가하고 있는 것을 볼 수가 있다. 이는 세포의 성장이 아세트산에 의해 저해 받고 있음을 간접적으로 보여주고 있다. 따라서, 본 연구에서 사용된 비성장속도 설정점인 0.25 hr^{-1}가 아세트산의 축적을 장기간 억제하기엔 너무 높았던 것으로 생각된다.

요 약

시변성이 있고 비선형 시스템인 유가식 생물 반응기에서의 용존산소 농도를 제어하기 위하여 사전 동조가 필요없는 자동 동조 PID 제어 알고리듬이 사용되었다. 본 연구에서 사용한 자동 동조 제어 알고리듬에서는 제어기 매개변수를 동조하는데 시스템 출력오차의 분산(CovC(k)), 제어입력 분산(CovU(k)), 잔류오차(Offset), 그리고 출력응답의 임계주기 등의 4가지의 제어성능 지표를 사용하였다. 이 방법은 제어기 매개변수를 동조하기 위하여 공정 모델을 필요로 한다거나 임의적으로 시스템에 외부 교란을 가할 필요가 없다. 그리고, 고농도의 기질이 반응기 안으로 들어올 때 용존산소 제어에 미치는 교란효과를 보상해 주기 위하여 피드포워드 제어 알고리듬이 함께 사용되었다. 결과에서 보듯이 시스템의 특성이 시간에 따라 상당히 변함에도 불구하고 회분배양 기간에서 유가식 배양 구간까지 전 구간에 걸쳐 좋은 용존산소 농도의 제어성능을 나타냈다. 본 연구에서 얻은 결론을 간략히 요약하면 다음과 같다.

첫째, 피드포워드 알고리듬을 첨가함으로써 전체적인 용존산소 제어성능이 향상되었다. 피드포워드 알고리듬을 사용하여 배지공급속도의 변화에 따른 외부 교란을 보상해 줌으로써 자동 동조 알고리듬은 시스템 특성 변화만에 의거해서 효과적으로 제어기 매개변수 값들을 동조할 수 있었다.

둘째, 조작변수가 바뀌는 경우에도 제어가 효율적으로 이루어졌다. 용존산소 농도를 제어하기 위해 교반속도를 조작변수로서 사용하였고 교반속도가 최대 RPM까지 도달하면 조작변수를 유입가스내의 산소분압으로 바꾸었다. 이 경우에도 자동 동조 알고리듬으로 제어기 매개변수값들을 적당히 동조시켜 줌으로서 용존산소 농도(20%)가 계속해서 잘 제어됨을 알 수 있었다.

셋째, 반응기안의 비성장속도의 제어가 효과적으로 이루어질 수 있었다. 반응기안에 아세트산의 축적을 방지하기 위하여는 비성장속도를 어떤 특정치($\mu_{threshold}$) 이하로 유지할 필요가 있는데 이를 위하여 배지공급속도를 제어하였다. 비성장속도는 이산화탄소 발생속도로부터 추정되었으며 이 추정치(0.25 hr^{-1})와 실제값이 매우 잘 일치하였다. 비성장속도를 제어하기 위하여 비례제어기항과 공급속도의 증가분에 해당하는 제어 동작을 미리 취해주는 피드포워드 알고리듬이 함께 사용되었다. 이 알고리듬을 이용하여 제어했을 경우 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 비성장속도의 설정점이 너무 높았던 관계로 배양말기에 상당한 양의 아세트산이 축적되었고 따라서 충분히 높은 세포농도를 얻을 수 없었다.

용어설명

C, C(k) : dissolved oxygen concentration (fraction

of saturated value)

CovC(k) : moving window covariances of system output

$CovC_{max}$: maximum moving window covariances of control input

$CovC_{min}$: minimum moving window covariances of system output

$CovC_{pd}$: constant in Eq. (6)

CovU(k) : moving window covariances of control input

C_s : set point of dissolved oxygen concentration (fraction of saturated value)

e(k) : control error ($=C_s-C(k)$)

F, F(k) : feed rate(L/hr)

F_0 : initial feed rate (L/hr)

G : constant in Eq. (17)

G_{ff} : feedforward gain

K_c : proportional gain

Period(j) : period of system output

Q_{CO_2} : carbon dioxide evolution rate (mmol CO_2/hr)

RPM : agitation speed (rpm)

RPM : moving average rpm

T : sampling time for DOC (sec)

T' : sampling time for growth rate control (min)

U : control input

U_b : control input, feedback

U_f : control input, feedforward

V : culture volume (L)

X : cell concentration (g/L)

$Y_{CO_2/x}$: yield of CO_2 based on cell mass (mmol/g cell)

k : time index

p_w : weighting factor, Eq. (6)

x : total cell mass (g)

Greek letters

α, β : weighting factor, Eq. (4)

μ_s : set point of specific growth rate (hr^{-1})

ρ_d : derivative time constant (sec)

τ_i : integral time constant (sec)

μ : specific growth rate (hr^{-1})

ε : constant in Eq. (5)

Δ : differential operator

참고문헌

1. Thompson, B.G. and Walter, T.L. 1986. Effect of dissolved oxygen on growth and production of exopolysaccharide by *Rhizobium trifolii*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 335-338.
2. Suleiman, S.A. and J.B. Stevens. 1987. The effect of dissolved oxygen tension on rat Hepatocytes in shor term culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **23**: 332-337.
3. Sadettin S.O. and B.ϕ Palsson. 1990. Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnol. Prog.* **6**: 437-446.
4. Ralph J. Cardello and Ka-Yiu San. 1987. The design of controller for batch bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 519-526.
5. Flynn, D.S. and M.D. Lilly. 1967. A method for the control of the dissolved oxygen tension in microbial culture. *Biotechnol. Bioeng.* **9**: 515-531.
6. Yano, T., H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu. 1981. Contol system of dissolved oxygen concentration employing a microcomputer. *J. Ferment. Technol.* **59**: 295-301.
7. Clark, T.A., T. Hesketh and T. Seddon. 1985. Automatic control of dissolved oxygen tension via fermenter agitation speed. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1507-1511.
8. Dochain, D. and G. Bastin. 1985. Stable adaptive controllers for waste treatment by anaerobic digestion. *Environ. Technol. Letters.* **16**: 584-593.
9. Åström, K.J. 1983. Theory and application of adaptive control. *Automatica.* **20**: 471-486.
10. Goodwin, G.C. and K.S. Sin. 1984. *Adaptive Filtering, Prediction, and Control,* Pp. 178-244. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
11. Meyer, H.P., Kuhn, H.J., Brown, S.W. and A. Fiechter. 1984. Production of human leukocyte interferon by *E. coli* in batch culture. *Proceedings of 3rd European Congress on Biotechnology,* Munich, September 10-14.
12. Lee, C.W., M.B. Gu and H.N. Chang. 1989. High-density culture of Escherichia coli carrying recombinant plasmid in a membrane cell cycle fermenter. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 49-54.
13. Paalme, T., K. Tiisma, A. Kahru, K. Vanatalu and R. Vilu. 1990. Glucose-limited fed-batch cultivation of Escherichia coli with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 312-319.
14. Mori, H., T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu. 1979. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. *J. of Chem. Eng. of*

Japan. **12**: 313-319.
15. Hwang, Y.B., S.C. Lee, H.N. Chang and Y.K. Chang. 1991. Dissolved oxygen concentration regulation using auto-tuning proportional-intergral-derivative controller in fermentation technology. *Biotechnol. Techniques.* **5**: 85-90.
16. Reiling, H.E., H. Laurila and A. Fiechter. 1985. Mass culture of *Escherichia coli*; Medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *J. of Biotechnol.* **2**: 191-206.

(Received May 29, 1993)