

고정화 효소반응기에서의 민감도 분석 및 연속 변수 추정

이중헌·유영제

서울대학교 공과대학 화학공학과
(1989년 1월 27일 접수, 1989년 3월 31일 채택)

Sensitivity Analysis and Sequential Parameter Estimation in Immobilized Enzyme Reactor System

Jung Heon Lee and Young Je Yoo

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received 27 January 1989; accepted 31 March 1989)

요 약

생촉매 반응기를 on-line 으로 최적화하여 제어하기 위해서는 반응 속도상수를 정확히 추정하여야 한다. 고정화 효소에 의하여 포도당이 과당으로 전환되는 반응을 예로들어 생성물의 농도를 측정하여 반응속도식에서 민감도가 제일 큰 비활성화 속도상수를 추정하였다. 온도가 일정하게 유지되는 운전조건 및 시간에 따라 온도가 변하는 최적제어 조건하에서 시간에 따른 민감도가 변수 추정에 미치는 영향을 분석하였다. 민감도를 Kalman filtering에 고려함으로써 민감도가 낮은 운전초기에 추정값의 진동이 감소하며 민감도가 증가함에 따라 참값에 잘 수렴함을 알 수 있었다.

Abstract—Accurate estimation of the kinetic parameters is essential for on-line optimization and control in biocatalytic reactor system. Fructose production from glucose using immobilized enzyme was chosen as a model system and deactivation constant which is the most sensitive among the kinetic parameters was estimated from the measurements of product concentration. The effects of sensitivity on the sequential parameter estimation were analyzed under the operating conditions of both constant temperature and varying temperature. By considering the parameter sensitivity on Kalman filtering, estimated values showed reduced fluctuations in the initial period of operations where the sensitivity was low and better convergence to the true value as the sensitivity increased.

1. 서 론

최근 생물공학의 발달로 인하여 생물공학 제품이 점차 산업화됨에 따라 생물공정의 중요성이 강조되고 있다. 우수한 생물공정의 개발은 효율적인 생물공정의 설계 및 최적화 그리고 적절한 제어방법의 선정이 병행되어야 하며 최근 생물공정의 제어에 대하여 최근 많은 연구가 수행되고 있다[1-4]. 생물 시스템은 외부의 조그만 변화에도 민감하게 변화하고 적응하기 때문에 종

래의 setpoint feedback control 방법에 의하여는 많은 경우 생물공정을 원하는 수준으로 제어하는 것이 어려운 경우가 많다. 그러므로, 생물공정을 적절히 제어하기 위해서는 on-line 또는 적응제어 방식이 필요하며 이러한 제어 방식은 산업적으로 많이 이용되고 있다[5-7]. 적응제어 방식은 일반적으로 두 부분으로 구성된다. 한 부분은 변수 추정 부분이고 다른 부분은 최적화 또는 최적 제어기법 등을 이용하여 제어신호를 합성하는 부분이다. 변수 추정은 시스템의 상태를 알아내어

이에 근거하여 제어신호를 합성하는데 사용되므로 매우 중요하다고 하겠다. 특별히 생물공정에 있어서 세포농도, 기질 및 생성물의 농도 등과 같이 쉽게 측정할 수 있는 측정치로부터 원하는 상태를 추정하기 위하여 상태 추정방법이 적용된다. Dochain 등[5]은 연속적인 최소자승법을 이용하여 변수를 추정함으로써 연속반응기에서의 박테리아의 성장 및 수율을 적응제어하였으며 Chen 등[7]은 고정화 효소반응 시스템에서의 효소의 비활성화 속도상수를 시간에 대한 함수로 가정하여 최소자승법을 이용 추정하여 적응제어하였다. Chang 등[8]은 변수 추정방식을 채택하였으며 forgetting factor를 사용함으로써 연속 배양에서의 적응최적화에 응용하기 위한 변수를 효율적으로 추정할 수 있음을 보여주었다.

변수 및 상태 추정에 있어서 시스템을 나타내는 모델식이 있는 경우에는 모델식을 이용하여 변수 및 상태를 추정하는 것이 변수나 상태를 단순히 시간의 함수로 표시되는 것으로 간주하는 것보다 공정의 상태를 보다 정량적으로 그리고 정성적으로 이해할 수 있다. 또한 실제 측정시에 어느 정도 오차가 포함될 수 있으며 모델식에도 약간의 오차가 있으므로 이러한 오차가 고려되지 않는 단순한 최소자승법보다는 이들을 고려할 수 있는 변수 및 상태 추정방법을 사용하는 것이 바람직하며 이러한 목적으로 Kalman filtering 방법[14]이 많이 이용되고 있다. Suvcek 등[9]은 확장된 Kalman filter 방법을 연속 배양에 적용하여 Monod 식의 변수와 상수값을 추정하였으며 Jefferis 등[10]은 수치 filter 방법을 발효공정 분석에 이용하였다. Stephanopoulos와 San[11]은 기본적인 원소성분의 수치식을 사용하여 반응기의 상태를 추정하는데 이 방법을 사용하였다. Yoo 등[6]은 반연속식 배양기의 최적제어 목적에 응용하였으며 Lee 등[12]은 확장된 Kalman filter를 이용 고정화 세포반응기에서의 효율인자를 추정하였다.

본 논문에서는 변수를 추정하는데 사용되는 확장된 Kalman filter의 일반적인 특성을 살펴보았으며 민감도를 고려하여 변수 추정 효율을 향상시킬 수 있는 개선된 추정방법을 시험하였다.

2. 이론적 배경

2-1. 변수 추정방법

일반적으로 데이터를 얻고 난 후 데이터를 이용하

여 변수를 추정하는 방법으로는 최소자승법, mean square and minimum variance method와 maximum likelihood method 등[13]이 있다. 이와는 달리 데이터를 얻을 때마다 앞에서 얻은 변수의 값을 개선시키는 연속적인 추정방법이 있는 데 이러한 방법에는 연속적인 최소자승법, projection method 그리고 Kalman filter 방법 등[13, 14]이 있다. Kalman filter 방법은 오차가 포함된 측정치로부터 원하는 시스템의 상태변수를 추정할 수 있는 일종의 반복적인 추정방법으로 여러가지 공학분야에 응용되고 있다[15]. 비선형 시스템에서의 변수를 추정하는 데는 일반적으로 확장된 Kalman filter 방법이 많이 이용된다.

비선형 미분 방정식으로 표시하는 시스템을 모델식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\dot{x}(t) = f(x(t), u(t)) + w(t) \quad (1)$$

여기에서, $\dot{x}(t)$ 는 x 의 시간에 대한 미분형태이다. 이 식을 차분방정식으로 표시하면 다음과 같다.

$$x_{k+1} = f(x_k, u_k) + w'_k \quad (2)$$

여기에서, f 는 상태변수 x_k 와 제어변수 u_k 의 벡터함수이고 x_k 는 시스템의 상태벡터이다. w'_k 는 평균이 0인 white Gaussian noise로 공정에 주어지는 교란이나 시스템모델의 불확실성을 나타낸다. 측정은 다음과 같은 식으로 표시할 수 있다.

$$z_k = h_k(x_k) + v'_k \quad (3)$$

여기에서, z_k 는 측정벡터이고, h_k 는 상태변수 x_k 의 벡터함수이고 v'_k 는 평균이 0인 white Gaussian noise로 w'_k 와는 무관한 측정오차를 나타낸다. w'_k 와 v'_k 의 공분산(covariance)은 각각 Q 와 R 의 행렬로 표시한다. P 는 모델 시스템내에서 추정하는데 존재하는 공분산 행렬이다. $\hat{x}_{k/k}$ 는 시간 k 에서 추정된 x 를 나타내며 $\hat{x}_{k/k-1}$ 는 시간 $k-1$ 에서 시간 k 상태를 예측한 것을 의미한다. 이러한 확장된 Kalman filter 방법은 다음과 같은 식으로 표시될 수 있다.

prediction

$$\hat{x}_{k/k-1} = f_{k-1}(\hat{x}_{k-1/k-1}, u_{k-1}) \quad (4)$$

$$\hat{z}_{k/k-1} = h_k(\hat{x}_{k/k-1}) \quad (5)$$

$$P_{k/k-1} = \phi_{k-1} P_{k-1/k-1} \phi_{k-1}^T + Q_o \quad (6)$$

correction

$$\hat{x}_{k/k} = \hat{x}_{k/k-1} + w_k(z_k - \hat{z}_{k/k-1}) \quad (7)$$

$$P_{k/k} = (I - w_k H_k) P_{k/k-1} \quad (8)$$

여기서

$$\phi_{k-1} = \frac{df_{k-1}}{dx_{k-1}} \big|_{\hat{x}_{k-1/k-1}} \quad (9)$$

$$H_k = \frac{dh_k}{dx_k} \big|_{\hat{x}_{k/k-1}} \quad (10)$$

$$w_k = P_{k/k-1} H_k^T (H_k P_{k/k-1} H_k^T + R_o)^{-1} \quad (11)$$

식 (4)에서 식 (11)까지를 사용함으로써 시스템의 상태를 예측하고 실제 측정된 값을 이용하여 상태를 보정하게 된다.

2-2. Data Sensitivity

식 (1)로 표시되는 모델식으로부터 상태변수의 민감도는 다음과 같이 표시된다[6].

$$G_{ij} = \frac{\partial X_i}{\partial K_j} \quad (12)$$

G_{ij} 는 변수, K_j 의 조그만 변화가 상태변수 X_i 에 미치는 영향을 나타낸다.

2-3. 모델 시스템

고정화효소(glucose isomerase)에 의하여 포도당을 과당으로 전환시키는 고정화효소 반응공정을 모델 시스템으로 선정하였다. 반응속도식은 식 (13)과 같이 수정된 Michaelis-Menten 형태의 식으로 표시할 수 있다[3].

$$R = -\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{V_m \bar{S}}{K_m + \bar{S}} \frac{E}{E_o} \quad (13)$$

여기에서 \bar{S} 는 수정된 기질농도로 기질농도 S 에서 평형상태에서의 기질농도 S_e 를 빼값으로 정의된다. V_m 은 수정된 최대반응속도, K_m 은 수정된 Michaelis-Menten 상수, E_o 는 초기 효소의 활성, 그리고 E 는 시간에 따른 효소활성이다. 모델 시스템이 정상상태에 있고 packed-bed 반응기가 plug flow reactor 처럼 운전된다고 가정하면 반응기는 다음과 같이 표시된다.

$$\epsilon U_s \left(\frac{d\bar{S}}{dZ} \right) = -(1 - \epsilon) R \quad (14)$$

여기에서 ϵ 는 반응기의 공극율이고 U_s 는 표면속도이고 Z 는 반응기의 수직방향의 거리를 나타낸다. 경계조건 $Z=0$ 에서 $\bar{S}=S_o-S_e$ 와 식 (13)의 반응속도식을 식 (14)에 대입하여 정리하면 식 (15)가 얻어진다.

$$V_m \tau \frac{E}{E_o} = S_o X - K_m \ln(1 - \bar{X}) \quad (15)$$

여기에서 $X=1-S/S_o$, $\bar{X}=X/X_e$ 이고 $\tau=L/U_s$

$[(1-\epsilon)/\epsilon]$ 이다. L 은 반응기의 길이를 나타내며 X_e 는 평형상태의 전환율을 나타낸다.

이 반응 시스템에서 효소가 1차식으로 비활성화 된다고 하면,

$$\frac{dE}{dt} = -K_d \cdot E \quad (16)$$

그러므로 식 (13)은 다음과 같이 된다.

$$R = -\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{V_m \bar{S}}{K_m + \bar{S}} \text{Exp}(-K_d \cdot t) \quad (17)$$

식 (14)와 (17)로부터 반응기 출구에서의 전환율 X 를 구하면 다음 식 (18)이 된다.

$$X = X_e \left[1 - \exp \left(\frac{S_o \cdot X - V_m \tau \text{Exp}(-K_d \cdot t)}{K_m} \right) \right] \quad (18)$$

식 (18)을 이용하여 X 를 구하는 데 사용된 방법은 successive substitution으로 초기에 X 값을 가정하여 다음 X 를 구한 후 그 다음 X 를 구하는 과정을 계속 반복하여 오차범위가 0.0001 이하가 되도록 하여 X 값을 구하였다.

2-4. 모사방법

Park 등[3]에 의해 보고된 각 상수의 온도 의존도 (Table 1) 및 반응조건 (Table 2), 그리고 식 (18)을 사용하여 시간에 따른 전환율 X 를 구하였다. 구해진 전환율로부터 제품의 농도를 구하여 여기에 random number generator를 사용하여 평균오차 10%의 측정 data를 만들었다. Kalman filter 방법을 적용하여 측

Table 1. Temperature dependency of parameters [3]

Parameter	Temperature dependency
V_m	$-48.8 \exp(-4510/T)$
K_m	$-10.8 \exp(-1280/T)$
K_e	$4350 \exp(-2725/T)$
K_d	$1.95 \times 10^{12} \exp(-10960/T)$

Table 2. Operating conditions

Operating Condition	Value
Inlet substrate concn. (mol/l)	0.2
Reactor length (cm)	100
Void fraction of reactor	0.5
Superficial flow rate (cm/hour)	40
Enzyme loading (g)	5

정간격, 공분산, 초기값 추정치 등을 바꾸어 가며 속도 상수를 추정하였다. 각 시간마다 전환율에 대한 민감도를 계산하였다. 모사에 사용된 Q의 공분산 값들은 P의 초기값의 1/1000으로 가정하여 모사하였다.

본 연구에서 제안된 Kalman filtering에 민감도를 고려한 변수 추정은 추정 correction 부분에 민감도를 고려한 것으로 낮은 민감도에서는 correction weight를 줄여주고 민감도가 높아짐에 따라 correction weight가 커지도록 식 (7)을 수정시킨 것으로 식 (7)을 다음의 식 (19)와 같이 표시하였다.

$$\hat{x}_{k/k} = \hat{x}_{k/k-1} + w_k (z_k - \hat{z}_{k/k-1}) G_k \quad (19)$$

3. 결과 및 토의

3-1. 민감도 분석

Fig. 1(a)는 온도가 일정하게 유지되는 반응상태에서, 각 변수들의 민감도를 보여주고 있다. 비활성화 속도상수, Kd의 민감도는 다른 변수들에 비하여 상당히 크며 시간에 따라 증가함을 알 수 있다. Yoo 등[18]의 연구에서 비활성화 속도상수가 효소반응기의 최적조건 및 성능에 제일 크게 영향을 미치는 것으로 분석되었으므로 본 연구에서는 비활성화 속도상수만을 변수 추정하였다.

3-2. Kalman Filter의 특성

Fig. 2(a)는 Kalman filtering 방법을 사용하여 비

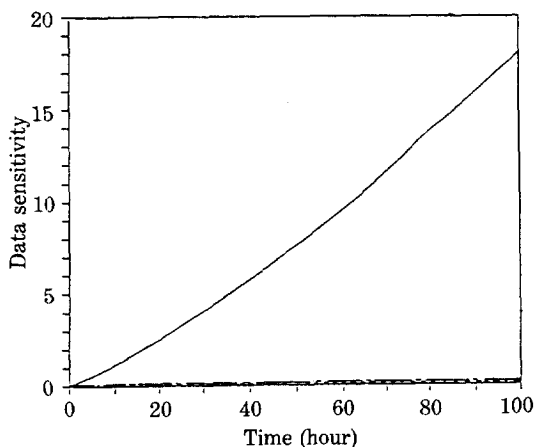


Fig. 1. Sensitivities (absolute values) of parameters under constant operating temperature (328 K).

— : Kd , ---- : Km , ... : Vm

활성화 속도상수를 추정한 결과를 보여준다. 초기운전 단계에서는 추정값이 참값에 수렴하지 않았으나 20시간 이후에는 참값에 수렴함을 볼 수 있었다. 초기단계에서는 비활성화 속도상수의 민감도가 낮아서 추정된 비활성화 속도상수 값이 참값으로부터 크게 벗어났으며 민감도가 증가함에 따라 추정된 변수가 참값에 잘 수렴한 것으로 해석된다. Fig. 2(b)는 비활성화 속도상수의 공분산을 10^{-5} 으로 했을 때 추정한 결과로 빠르게 수렴하나 추정편차가 커짐을 볼 수 있었다. 미생물 배양속도식의 변수 추정에 있어서도 공분산을 적절히 선정하여야 변수를 성공적으로 추정할 수 있음이 보고되어 있다[6]. 이러한 적당한 공분산은 측정오차 등에 따라 달라지므로 적당한 공분산을 구하기 위한 모사는 실제 Kalman filter를 이용한 변수 추정에 있어서 선행되어야 한다. Fig. 2(c)는 30분 간격으로 측정하였을 때의 변수 추정 결과를 보여준다. 추정 간격이 1시간인 Fig. 2(a)의 경우에 비하여 추정편차가 작아지고 빨리 수렴하였다. Fig. 2(d)는 초기 값 추정오차가 60% 일 때 변수를 추정한 결과를 보여준다. Fig. 2(c)에서의 150% 오차일 때와 비교하여 초기 몇 시간 이후에는 거의 같은 값을 가짐을 볼 수 있다. 이것은 초기에는 변수의 민감도가 낮기 때문에 변수 추정에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 해석된다. Fig. 2(e)는 측정오차가 10%에서 5%로 감소되었을 때의 결과를 보여주는 데 측정오차가 작을수록 정확한 추정결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

3-3. 민감도를 고려한 변수 추정방법

측정오차가 작고 측정간격이 짧은 경우에는 Kalman filter 방법에 의하여 좋은 추정결과를 얻을 수 있으나 측정오차가 크고 측정간격을 짧게 할 수 없을 때는 수렴성이 나빠져 또한 추정된 변수값이 심한 진동을 보인다. 추정된 변수값이 심한 진동을 보이면 반응 시스템의 상태를 결정하여 최적화하거나 제어에 사용하기에 부적당하게 된다. 그러므로 초기에 변수의 민감도가 낮은 영역에서는 처음 추정한 값을 그 반응 시스템의 상태로 사용하고, 민감도가 어느 정도 커진 후에 변수를 추정하는 방식을 고려할 수 있다. Fig. 3(a)에 나타난 대로 민감도가 커지기 시작하는 20시간부터 변수를 추정하기 시작하였는데 변수 추정시작 후 참값에 빨리 수렴하였다(이때 추정치의 평균값을 취하면 참값의 1% 이내의 오차를 보여주고 있다). 민감도가 작은 영역에서 초기 추정값을 사용하여 효소반응기의 최적운전 조건을 구하고 최적조건대로 운전한 경우의 전환율 및 전

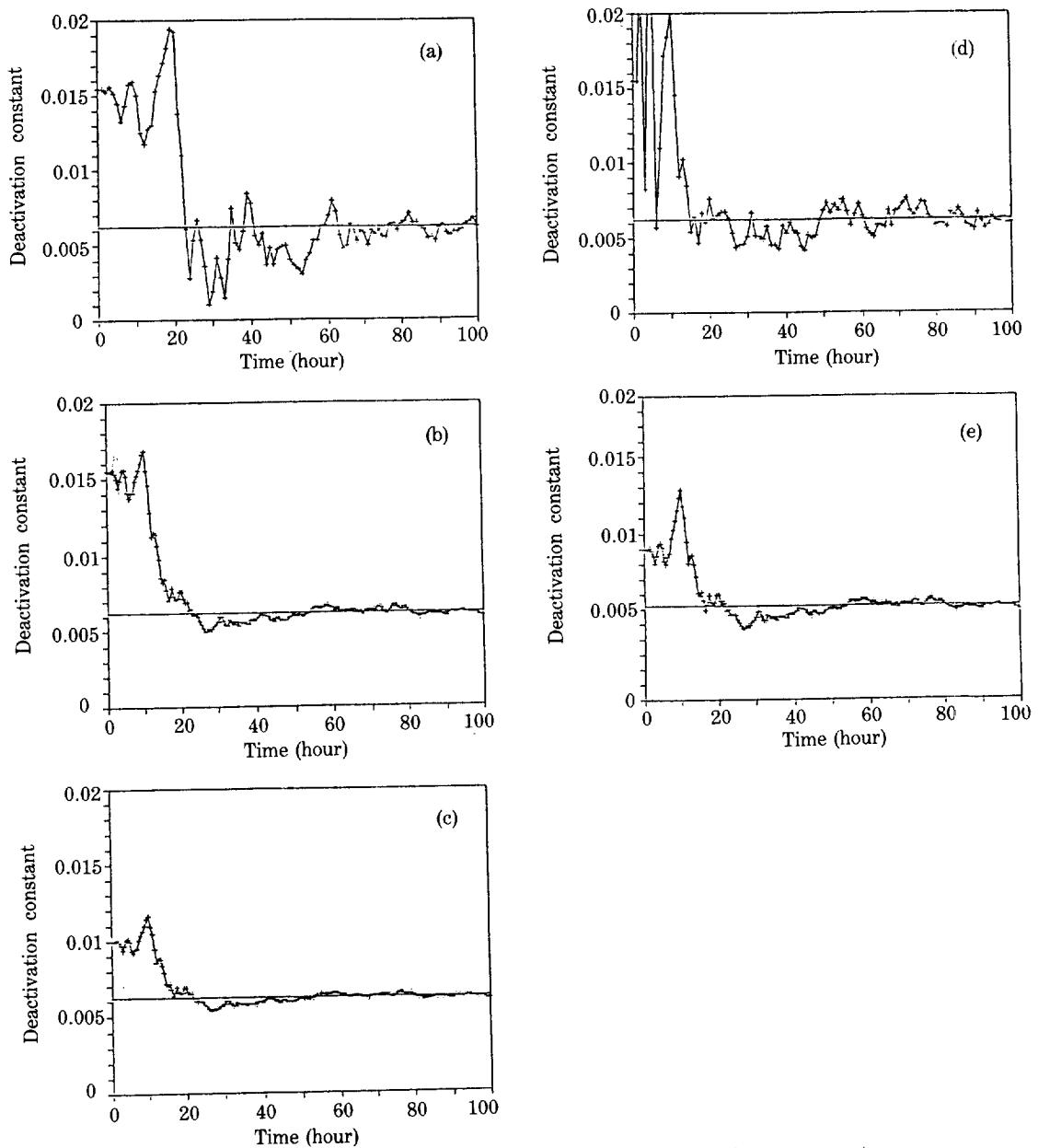


Fig. 2. Estimation of deactivation constant under constant operating temperature.

- (a) ($\Delta t = 1$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_o = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_o = [10^{-5}]$)
 (b) ($\Delta t = 1$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_o = [10^{-3}, 10^{-5}]$, $R_o = [10^{-5}]$)
 (c) ($\Delta t = 0.5$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_o = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_o = [10^{-5}]$)
 (d) ($\Delta t = 0.5$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +60%, diagonal element of $P_o = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_o = [10^{-5}]$)
 (e) ($\Delta t = 0.5$ hour, measurement error = 5%, initial guess = +60%, diagonal element of $P_o = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_o = [10^{-5}]$)

—: True value, +: Estimated value

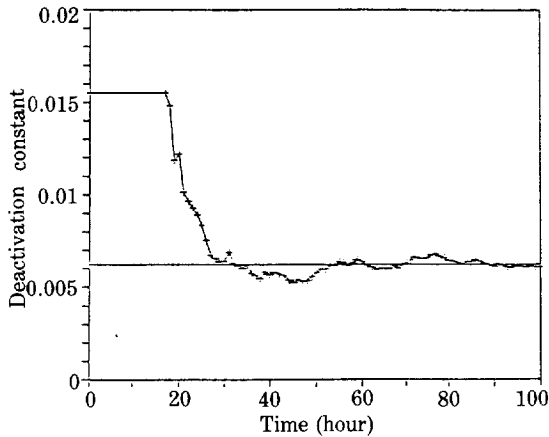


Fig. 3(a). Estimation of deactivation constant after 20 hours operation.

($\Delta t = 1$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_0 = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_0 = [10^{-5}]$)
 - : True value , + : Estimated value

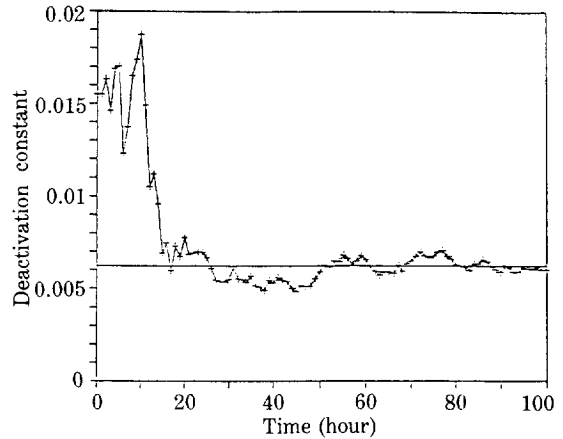


Fig. 3(c). Estimation of deactivation constant using modified Kalman filtering method with correction weight.

($\Delta t = 1$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_0 = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_0 = [10^{-5}]$)
 - : True value , + : Estimated value

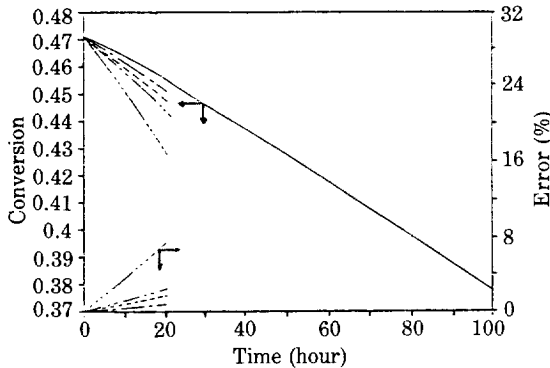


Fig. 3(b). Conversions and errors in conversion for different initial guesses of deactivation constant.

— : True value
 --- : 20% error in initial guess
 : 40% error in initial guess
 - · - · - : 60% error in initial guess
 - - - - - : 150% error in initial guess

환율의 오차는 Fig. 3(b)와 같이 초기 추정값이 60%의 오차를 갖고 있을 때에 20시간에서 3%의 오차를 보여주고 있어 제안된 변수 추정방법이 별 무리가 없음을 보여준다. Fig. 3(b)에서 볼 수 있듯이 민감도가 낮은 구간에서는 변수의 값이 실제 반응기의 운전에 크게 영향을 미치지 않고 민감도가 클수록 변수 추정이 효율적으로 수행되므로 Kalman filter 식에 민감도를 가중요소(weighting factor)로 고려하는 방법을 시험하였

다. 민감도 $G_{ij}(t)$ 를 식 (7)에 곱하여 식 (19)와 같이 수정함으로써 민감도가 낮을 때에는 수정 신뢰도를 줄여주어 편차를 줄일 수 있고 민감도가 높아질수록 추정을 정확하게 할 수 있는 방법이다. 식 (19)와 같은 수정된 방법을 사용하여 변수를 추정한 결과는 Fig. 3(c)에서와 같이 초기에도 추정값이 서서히 참값으로 이동하기 시작하고 20시간 이후에는 참값에 잘 수렴함을 보여주고 있다. 식 (19)를 이용함으로써 추정 초기에도 운전오차를 감소시킬 수 있으며 20시간 이후에는 변수값의 진동이 Fig. 2(a)에 비하여 현저히 줄어들음을 볼 수

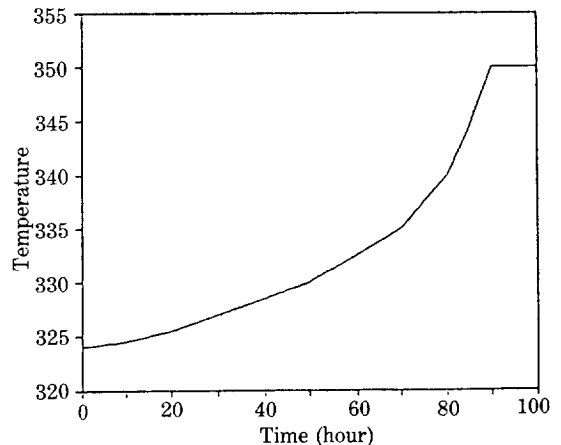


Fig. 4(a). Varying temperature profile for immobilized enzyme reactor operation.

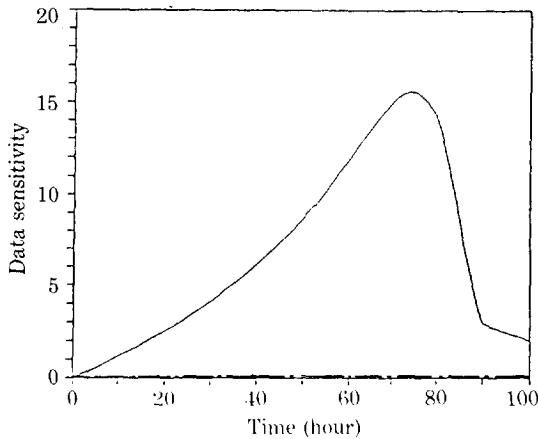


Fig. 4(b). Sensitivities (absolute values) of parameters under optimal operating temperature.

---: K_d , ----: V_m , - · - : K_m

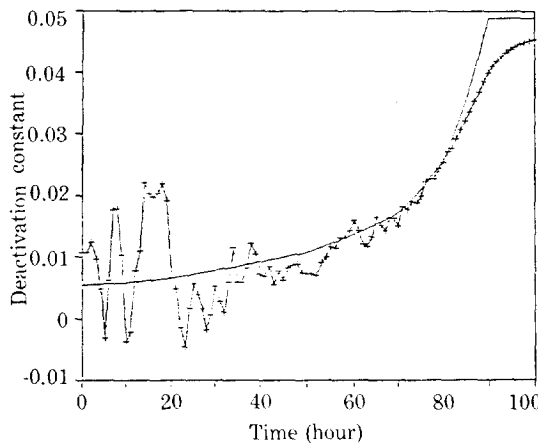


Fig. 4(c). Estimation of deactivation constant under optimal operating temperature.

($\Delta t = 1$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_0 = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_0 = [10^{-5}]$)

있어 전체적으로 추정 특성이 향상되었다.

3-4. 최적 제어상태에서의 변수 추정

최적온도가 시간에 따라 변하는 최적 제어방식이 Park 등[3]에 의해 보고되었는데 Fig. 4(a)와 같은 온도계획적으로 운전될 때 각 상수들의 민감도는 Fig. 4(b)와 같이 나타난다. Fig. 1의 경우와 마찬가지로 비활성화 속도상수가 가장 높게 나타났고 초기 30시간

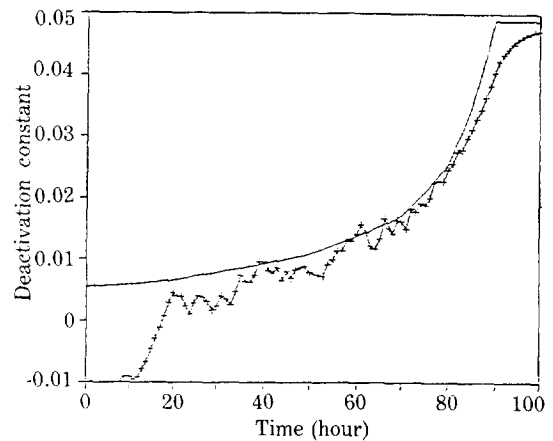


Fig. 4(d). Estimation of deactivation constant under optimal operating temperature using proposed equation.

($\Delta t = 1$ hour, measurement error = 10%, initial guess = +150%, diagonal element of $P_0 = [10^{-3}, 10^{-6}]$, $R_0 = [10^{-5}]$)

- : True value , + : Estimated value

이전, 말기 80시간 이후에 민감도가 떨어짐을 볼 수 있다. Fig. 4(c)는 온도가 시간에 따라 변하는 최적 제어 상태하에서의 비활성화 속도상수를 추정된 결과를 보여 준다. 이 그림에서 초기 30시간 이전 및 80시간 이후에는 참값에서 떨어지는 것을 볼 수 있는데 이러한 원인은 Fig. 4(b)에 나타나 있듯이 이 구간에서 변수의 낮은 민감도에 의한 것으로 해석된다. 온도가 시간에 따라 변하는 최적운전의 경우에도 수정된 변수 추정방식 (19)를 사용함으로써, Fig. 4(d)에서와 같이 Fig. 4(c)에 비하여 초기의 추정값의 진동이 감소하고 편차가 줄어들었다.

4. 결 론

고정화 효소를 이용한 반응 시스템에 있어서 Kalman filtering 방법을 사용하여 생성물의 농도를 측정하여 민감도가 제일 큰 속도상수를 연속적으로 추정할 수 있다. 민감도가 높을수록 추정값이 참값에 수렴하며 측정간격을 짧게 하고 측정오차를 적게 할수록 참값에 가까운 추정값을 얻을 수 있다. 변수의 민감도를 Kalman filtering에 포함시켜 변수 추정을 함으로써 민감도가 낮은 운전조건하에서 추정값의 진동을 줄일 수 있고 민감도가 커질수록 참값에 잘 수렴하였다.

감 사

본 연구를 지원하여 주신 (주)유공께 감사드립니다.

NOMENCLATURE

E	: enzyme activity [unit/mol]
E ₀	: initial enzyme activity [unit/mol]
K _d	: deactivation constant [h]
K _e	: equilibrium constant
K _m	: reduced Michaelis-Menten constant [mol/l]
L	: length of packed-bed reactor
R	: reaction rate [mol/g of immobilized enzyme-min]
S	: substrate concentration [mol/l]
\bar{S}	: reduced substrate concentration $\bar{S} = S - S_e$ [mol/l]
S ₀	: initial substrate concentration [mol/l]
S _e	: substrate concentration at equilibrium [mol/l]
t	: operating time [h]
T	: temperature [K]
U _s	: superficial velocity [cm/min]
V _m	: reduced maximum reaction rate [mol/g of immobilized enzyme-min]
X	: fractional conversion
Z	: axial coordinate or distance of packed-bed reactor [cm]

Greek Letters

ϵ	: void fraction of reactor
τ	: space time [h]

REFERENCES

1. Aiba, S.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **9**, 269 (1979).
2. Rolf, M.J. and Lim, H.C.: *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 370 (1982).
3. Park, S.H., Lee, S.B., and Ryu, D.Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1237 (1981).
4. Kim, C., Kim, H.S., and Ryu, D.Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1889 (1982).
5. Dochain, D. and Bastin, G.: International Federation of Automatic Control IFAC., 410 (1984).
6. Yoo, Y.J., Hong, J., and Hatch, R.T.: Proceedings of 1985 American Control Conference, **2**, 866 (1985).
7. Chen, K.C., Waki, T., Suga, K.I., Taguchi, H., and Ryu, D.Y.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 357 (1981).
8. Chang, Y.K., Pyun, Y.R., and Lim, H.C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 944 (1988).
9. Suvcek, W.Y., Elliott, R.F., and Jajic, J.E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 827 (1974).
10. Jefferis, R.P., Winter, H., and Vogelmann, H.: in Workshop Computer Applications in Fermentation Technology, July 5, 1976.
11. Stephanopoulos, G. and San, K.Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1176 (1984).
12. Lee, J.H. and Yoo, Y.J.: *Proceedings of Korea Automatic Control Conference*, **1**, 637 (1987).
13. Sorenson, H.W.: "Parameter Estimation", Marcel Dekker, New York (1980).
14. Kalman, R.E.: *Trans. ASME J. Basic Eng.*, **82**, 35 (1960).
15. Aoki, M.: "Optimization of Stochastic System", Academic Press, New York (1979).
16. Ryu, D.Y., Chung, S.H., and Katoh, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 159 (1977).
17. Lee, S.B., Kim, S.M., and Rhee, D.Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2023 (1979).
18. Yoon, S.K., Yoo, Y.J., and Rhee, H.-K.: Optimal Temperature Control in Multi-stage Immobilized Enzyme Reactor System, *J. Ferment., Bioeng. in press* (1989).