The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	知識工学的手法を応用したバイオプロセスの状態認識と適合制御方策の決定に関する研究
Author(s)	中嶋, 幹男
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081525
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

知識工学的手法を応用した
バイオプロセスの状態認識と
適合制御方策の決定に
関する研究

平成６年１２月

中嶋幹男

知識工学的手法を応用したバイオプロセスの状態認識と適合制御方策の決定に関する研究

平成６年１２月

中嶋幹男

第１章　緒論 ・・・

４－４　ファジィエキスパートシステム　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３７
４－４－１　知識表現手法・推論手法の検討　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３８
４－４－２　データベース　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４７
４－５　結果および考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４７
４－６　要約　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５２

第５章　エキスパートシステムによる状態認識と
認識した状態に応じた制御方策の決定　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５３
５－１　はじめに　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５４
５－２　実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５４
５－２－１　菌株および培地　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５４
５－２－２　オフライン実験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５４
５－２－３　オンライン実験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５４
５－２－４　システム構成　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５４
５－３　ファジィエキスパートシステム　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５５
５－３－１　フォワードチェイン法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５７
５－３－２　異常検出のファジィ化　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５９
５－３－３　認識した状態に基づいた制御方策決定手法　・・・・・・・・・・・・・５９
５－４　結果および考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６２
５－４－１　データベース　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６２
５－４－２　知識取得実験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６３
５－４－３　状態認識と認識した状態に基づく制御方策の決定　・・・・・・・・・６７
５－５　要約　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７２

第６章　統括　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７３

Ａｐｐｅｎｄｉｘ　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７７

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７９

本論文に関連する報告　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・８５

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・８８

第　1　章

序　　論

バイオテクノロジーは、先行投資としての基礎技術開発の段階から、実りの時期である応用技術開発の段階を迎えつつある。これは、バイオ技術と他の技術領域の接点領域に関する研究が、近年盛んに行われるようになってきていることからもわかる。すなわち、基礎技術開発の段階では将来性探求のために採算を度外視して研究が行われるのに対し、工業化の段階では開発時より工学的技術を駆使してプロセス運用など各ステップが効率化され経済的評価が行われる必要がある。このような状況を反映して最近バイオテクノロジーと異なる分野の技術の導入により、新規バイオプロセスの実用化を達成しようとする試みが数多くなされている。その結果、従来のバイオテクノロジーでは考えられなかったような新しい技術が生まれており、その技術により、例えば菌株育種期間の短縮化、プロセスの効率化などが検討され、生産された有用物質を用いることで、医療の発展、機能性食品の開発などが期待されている。例えば、菌株の育種の効率化を目指した例としては、微細加工が可能な半導体製造技術を応用した細胞融合装置[66]、画像認識装置を用いたコロニー選別機や電気泳動ゲルの自動解析装置[52]などを挙げることができる。

また、バイオプロセスによる有用物質生産の効率化を図るため、長棟ら[32]は、グラスファイバなどの新規材料を使用した濁度センサを開発し、従来困難であった菌体濃度のオンライン測定[36),57]を可能にした。また、遠藤ら[9]は、焼結セラミックの加工技術の進歩を背景としてオンラインサンプリングユニットを開発し、高速液体クロマトグラフィーと組み合わせることにより、微生物培養液中の、基質濃度、生産物濃度、および、副生産物濃度のオンライン測定が可能なシステムの開発を行った。さらに、ＣＣＤカメラや高速の計算機など電子情報技術を基盤として、福田ら[77),78]は動物細胞の、Packer[38]らはカビ菌糸の画像認識による計測システムを開発した。また、誘電率を測定することにより生細胞濃度の推定を行う系[12),31),81]や、細胞の持つ蛍光物質を利用して細胞濃度と同時に細胞の代謝活性を測定する系[6),25),26]の開発などが行われた。さらに、酵素や固体半導体などによる基質濃度、生産物濃度の測定系[3),16),17),43),44),56]の開発も行われている。

これらの新規計測システムの開発と平行して、計算機技術の急速な発展を背景として、バイオプロセス、特に微生物培養プロセスにおける様々な情報処理に関する研究が、数多くなされてきた。プロセスの状態量の測定と得られた情報の処理、さらにそれらに基づく制御はプロセスの効率的運用に必要な技術であるが、バイオプロセスにおいては、この傾向が特に顕著であると言える。この原因として、バイオプロセスでは選択された生細胞を触媒として用いており厳密な無菌操作が必要であるが、殺菌が可能なセンサーが不足しており直接測定できるプロセスの状態量が少ないこと、細胞内の反応が複雑でありプロセス

の動的挙動を予測することが難しいことを挙げることができる。すなわち、細胞内部の反応の数が数千～数万であるのに対し、オンラインで測定が可能な変数の数は、高々数十に過ぎず、得られる情報量が不足している。この状況を打開するため、前述したように様々なセンサーの開発が精力的に行われているが、バイオプロセスの制御は、いまだ熟練者の経験や勘に頼っているのが現状である。これは、プロセスから得られる情報量の不足を、熟練者の持つ経験的知識で補っていると言えるが、熟練者の持つ知識はその個人固有のもので他人への伝承が難しいこと、熟練者の育成に時間がかかること、熟練者が長期間プロセスを監視する必要性があることなどの欠点を持つ。そこで、過去のデータの傾向からプロセスの動的挙動を整理した後、目的に応じたモデル化を行いそれらを熟練者の持つ経験的知識の代わりに用いる研究が進められた。また、従来は数式を用いた構造型モデルを用いてプロセスの動的挙動を表現していたが、単純な数式ではバイオプロセスが示す複雑な過渡応答などを記述することが不可能であり、複雑な非線形の数式を用いたモデルはパラメータの決定が非常に困難である。このため、岸本ら[15), 18), 20), 79)]は、プロセスの動的挙動のモデルとして回帰分析で得られた回帰式を時変係数モデルとして用いてバイオプロセスの挙動を予測することを試みた。また、Onerら[37)]、岸本ら[80)]は、B-Spline関数を用いて、バイオプロセスの挙動を表し、比速度の推定を行う研究を行った。

さらに、Thibaultら[51)]、Chatourouら[4)]は、ニューラルネットワークを用いてバイオプロセスの動的挙動を記述するモデルを作成した。Thibaultらの研究では、直接プロセスの動的挙動を記述するのではなく、プロセスの動的挙動と逆の動的挙動を持つ逆システムをニューラルネットワークを用いて作成することで、直接操作量を算出する方法をバイオプロセスに適用し、基質であるグルコース濃度の制御を行った。さらに、バイオプロセスの持つ不確定性を考慮して、プロセスの動的挙動モデルを実時間で適応的に変化させる研究が行われた。しかし、これらの非構造型モデルの共通の欠点としては、多くのデータを必要とし、かつ、多大な計算量を計算機に要求することである。

これらの研究では、菌体の比増殖速度、比基質消費速度および比生産速度をプロセスの動的挙動を表すパラメータとして利用するものが多く見られる。これらの比速度の定義を回分培養を場合を例に取り次に示す。

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$$

$$n = \frac{-1}{X}\frac{dS}{dt}$$

$$\rho = \frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$$

ここで、X，S，Pは、それぞれ菌体濃度、基質濃度、生産物濃度である。

これらの比速度の値は定義式から明らかなように、単位菌体が単位時間に生産・消費する物質・菌体の量を表しており、細胞の生理活性を直接表すパラメータであるといえる。従って、これらの値を任意に制御することが可能であれば、プロセスで用いている細胞の能力を最大限に利用することが可能となる。清水ら[46),47),69),70)]は、酵母の半回分培養系に拡張カルマンフィルタ[8)]を適用し、菌体の比増殖速度をオンラインで推定し、比増殖速度を任意の値に制御することに成功し、これを用いてパン酵母の品質制御を行う系を構築した。

しかし、比速度が直接推定できない場合も多く見られ、比速度以外の状態量を制御する研究が行われいてる。かつて合葉ら[2)]は、グルコース流加速度を操作変数としＲＱを定値制御することで、パン酵母の流加培養系を最適化し得ることを示した。この制御システムは、ＲＱという発酵槽全体での物質の生産・消費を表すパラメータの比の値を操作することで、直接測定することが比較的困難な単位菌体当たりの比速度[60)]を間接的に制御した系であると考えられる。また、ＲＱの値を指標として細胞の生理状態をエタノール生産期と菌体増殖期に分割し、各々の生理状態に対して適した制御方策を決定したと考えることも可能である。

近年、バイオプロセスの状態を計算機により認識[21),35),74)]させ、さらに、認識した状態に適合した制御方策を決定し、プロセスを制御する研究が盛んに行われている。これは、計算機の飛躍的な高速化、パターン認識などの基盤技術が進んだ結果であると思われる。

本論文では、バイオプロセスの状態認識と認識した状態に適合した制御方策の決定を行うことに注目し、第２章、第３章において比速度が直接測定できない系において、増殖期や生産期などの培養フェーズ[14),69)]を知識工学的手法を用いてオンラインで認識する手法

について検討を加え、第４章、第５章では、比速度が直接推定可能な系を用いて、バイオプロセスに異常が発生したことを検出し、さらに、その原因の探索と異常原因に対する対処方策を決定するシステムの構築をファジィエキスパートシステム[1),39),40)]を用いて行った。以下に本論文の概要を示す。

第２章では、直接比速度が測定できない系において、オンラインで直接測定することが可能であった変数の内で培養時間、炭酸ガス発生量、アンモニア添加量を指標として、培養フェーズの認識をオンラインで行い、さらに、認識した状態に基づいてグルコース流加速度を決定し、培地中のグルコース濃度の定値制御を行った結果について述べた。

第３章においては、炭酸ガス発生速度や酸素吸収速度など発酵槽全体の物質代謝速度がオンラインで測定可能な場合について、培養フェーズを推定する方法を検討し、これらの速度変数の比の値の変化を観測することが有効であることを示した。また、これらの速度変数の正規化変化率(Normalized Rate Gradient、ＮＲＧ)を定義することにより、細胞代謝の変化を予想することが可能であること、さらに、変数の比を考えるときの変数の組み合わせの決定を視覚的に行う手法を示した。

第４章では、比速度が直接測定できる系で、ファジィエキスパートシステムを用いて、バイオプロセスにおける異常検出と異常原因の探索を行うシステムの構築を行った。ファジィエキスパートシステムの構築に必要な知識の取得を乳酸発酵プロセス実験により行い、殺菌時間と植菌量がプロセスに与える影響を明らかにした。さらに、構築した異常診断システムが、オンラインでプロセスの異常を検出し、異常の原因を後ろ向き推論法により探索することが可能であることを示した。

第５章において、探索した異常原因に適合した取るべき操作を決定する知的制御システムをファジィエキスパートシステムを用いて構築することを試みた。また、雑菌汚染と正常状態のプロセスを認識することをシステムに前向き推論法を加えることで可能とした。さらに、異常状態から正常状態へ復帰させる制御方策の決定に各制御方策の緊急性、可逆性を考慮し、かつ脱ファジィ化を行う機能をシステムに追加することで、システムの安全性を高める検討を行った。

第６章では、本論文を統括した。

第　2　章

測定可能な変数を
直接用いた
培養フェーズの認識

第1節　はじめに

培養フェーズ[14),69)]と呼ばれる概念が、バイオプロセス内部の細胞の生理状態を表現するためにしばしば用いられている。培養フェーズには、増殖期、生産期および停止期などがあり、各々、増殖の盛んな時期、生産が盛んな時期および増殖がほとんど認められない時期を表現するために使用される。各々の培養フェーズに応じて、制御方策を切り替える必要性があるので、オンラインで培養フェーズを認識することは、バイオプロセスを制御する上で大きな意義を持つと考えられる。

また、培養フェーズは細胞が自律的に生理活性を変化させ切り替わる場合[45)]だけでなく、何らかの操作を加えることにより意図的に切り替えることが可能な場合もある[19)]。中間体や誘導因子などを加えることなどで操作員が能動的に培養フェーズを切り替えることが可能な場合を除き、培養フェーズをオンラインで認識することは難しいと言える。これは、細胞の比増殖速度や比生産速度をオンラインで測定することが困難であることが一因である。このため、プロセスより取得したサンプルを分析し、菌体濃度、生産物濃度、基質濃度および副生産物濃度などを測定し、その後、比増殖速度、比生産速度、比消費速度、比副生産物生産速度を算出し、各々の培養フェーズを決定する例が見受けられる。

また、このよう手順を用いてもいくつかの例外を除き、培養フェーズを完全に決定することができない。これは、菌体の生理活性が急激に変化するものではなく、徐々に変化するため、2つの培養フェーズの中間に位置する領域が存在したり、3つ以上のフェーズの性質を示すとか、時には予め設定した培養フェーズのいずれにも属さないという状態が存在するためである[22),23),69)]。例を図1に示す。すなわち、図1（a）の様に、比増殖速度がある時点において急激に低下し、比生産速度が急上昇する場合には、その時刻を境にして前半を増殖期、後半を生産期とすればよい。しかし、図1（b）に示すように、菌体の比増殖速度が緩やかに低下し、その間に比生

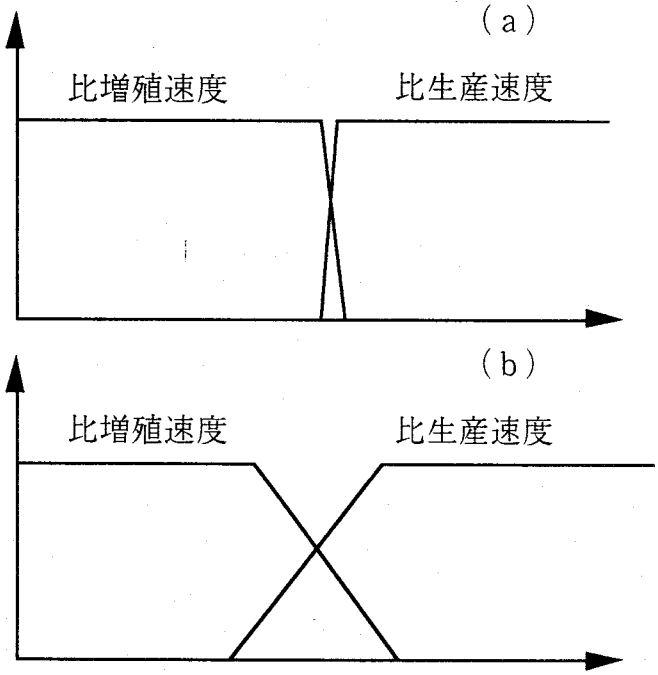


図1　比速度の変化の例

産速度が上昇している場合には、どこまでを増殖期として定義するかが曖昧になる。

このような曖昧な状態を表現するためには、ファジィ理論[33), 54), 58), 59), 67), 71)]を培養フェーズの決定に導入するべきであると考えられる、すなわち、現在の状態が各培養フェーズに属する割合を０～１の間の値により表現し、０をその培養フェーズである可能性が全くない状態、１をその培養フェーズであることが確実な状態であると定義する。これにより、培養フェーズの緩やかな遷移を表現することが可能となる。

また、各培養フェーズに対して異なる制御方策を用いる場合において、培養フェーズを通常の集合の概念により定義すると、図２に示すように、操作変数が急激に変化することが考えられる。また、状態変数が閾値の近傍にあるとき、わずかなノイズの影響で操作変数が急変し、プロセスに悪影響を与えることが考えられる。これに対して、培養フェーズをファジィ理論の概念を用いて定義し、各時期で培養フェーズに属する蓋然性に応じて操作変数を決定すると、操作変数は状態変数の変化に対して緩やかに変化し、上記のような問題が無くなると考えられる。

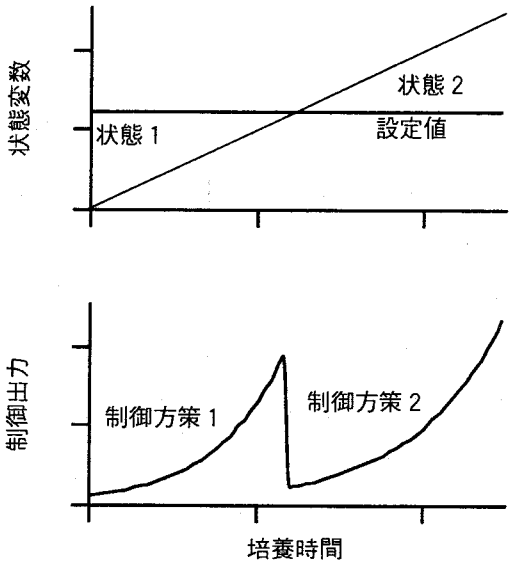


図２　制御方策の切り替えに伴う制御出力の変化

本研究においては、オンラインで培養フェーズの認識をファジィ推論により計算機に行わせ、さらに、認識した培養フェーズに適した流加方策を用いることにより基質濃度を一定に制御する系の構築を目的とした。なお、培養フェーズの認識に用いたオンラインで測定可能な変数は、培養時間、炭酸ガス発生量および中和のためのアンモニア水添加量である。

第２節　システム構成

用いたシステムのハードウエアの構成を図３に示す。用いた発酵槽は５ｌ容（Mitsuwa Co., LTD.）であり、基質としてグルコースを、また、中和用としてアンモニア水を連続的に流加している。また、制御用計算機（PC-9801VM, NEC）により、温度、ｐＨ、溶存酸素濃度、撹拌回転数、アンモニア水流加量、グルコース流加速度および排出ガス中の炭

酸ガス濃度をモニターし、グルコース流加ポンプの制御を行った。また、取得したデータは、オンラインで、ファジィ推論用計算機に転送している。

ファジィ推論用計算機は、取得したデータと、各々の変数に対するファジィメンバーシップ関数により現在の培養状態の認識と、認識した状態に対して適切なグルコース流加速度を決定する。

第３節　実験方法

味の素株式会社より分譲された、グルタミン酸生産菌株である*Brevibacterium* sp.を用いて、表１に示した培地[45]により培養を行った。また、前培養は、５００ｍｌの三角フラスコにより３０℃において、１８時間振盪培養を行った。さらに、本培養は、５ｌ容の発酵槽を用いて培養温度３０℃、ｐＨ７．８、通気量２ｌ／ｍｉｎの条件で４８時間培養を行った。なお、ｐＨは、１２％のアンモニア水を添加することにより制御した。また、本培養において、培地中のグルコース濃度を一定に保つため２５％のグルコース溶液を連続的に流加した。また、本培養中適宜サンプルを取得し、オフラインで菌体濃度、グルコース濃度、および、グルタミン酸濃度を測定した。菌体濃度は６１０ｎｍにおける濁度により測定し、グルコース、グルタミン酸濃度はそれぞれグルコースオキシダーゼあるいはグルタミン酸酸化酵素を用いる酵素法により測定した。

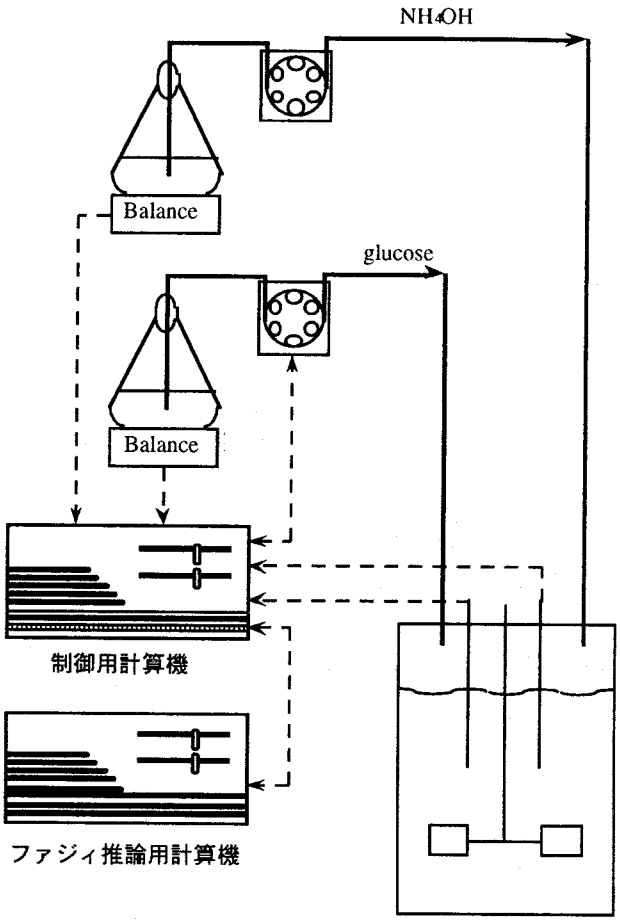


図３　システム構成

表１　培地組成

培地成分	濃度	
グルコース	３６	ｇ／ｌ
KH_2PO_4	１．０	ｇ／ｌ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	０．４	ｇ／ｌ
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	２	ｐｐｍ
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	２	ｐｐｍ
微量成分	必要量	

第４節　計算方法

オンラインで培養フェーズを認識する手法として、ファジィ推論[5), 10)]を選択した。これは、グルタミン酸発酵においては、数種の培養フェーズの中間状態が存在し、これを、”現在の培養状態は、増殖期である蓋然性が５０％であり、遷移期である蓋然性が３０％で、生産期である蓋然性が１０％である”というように表現することを可能にする。また、本研究では、各培養フェーズに応じて、基質の流加方策が異なるため、通常の集合の概念により培養フェーズを分割すると、流加速度が急変する恐れがあることを考慮して、ファジィ推論を用いて培養フェーズを表現し、現在の培養状態が各培養フェーズに属している蓋然性により、流加速度を調節することで、流加速度の急変化を防ぐことが可能である。

ファジィ推論は、プロダクションルール[28), 29)]とファジィメンバーシップ関数を用いて行った。プロダクションルールの一例を示す。

	培養時間が中位		
If	炭酸ガス発生量が中位	Then	現在は増殖期である
	アンモニア水添加量が中位		

プロダクションルールは、”Ｉｆ”と”ｔｈｅｎ”の間の前件部と”ｔｈｅｎ”以降の後件部から成り立っており、前件部で与えられた条件が全て満たされたときに、後件部の事象が成立することが示されている。すなわち、この例では、培養時間が”ｍｉｄｄｌｅ”に属しており、かつ（ＡＮＤ）、炭酸ガス発生量が”ｍｉｄｄｌｅ”に属し、かつ（ＡＮＤ）、アンモニア水添加量が”ｍｉｄｄｌｅ”である場合には、現在の培養状態が生産期であることを示している。

このプロダクションルールを用いて、培養状態の認識を行う場合には、培養時間、炭酸ガス発生量、および、アンモニア水添加量の測定値が各々の変数に対して定義された”ｍｉｄｄｌｅ”と呼ばれる集合に属していることを調べ、その論理積（ＡＮＤ）を求めればよい。また、”ｍｉｄｄｌｅ”、”ｌｏｗ”などをファジィ集合として定義し、論理演算子”かつ（ＡＮＤ）”をファジィ論理演算子”ＦｕｚｚｙＡＮＤ”に変更すれば、ファジィ推論が可能となる。なお、本研究においては、ファジィ演算子に対して、Ｍｉｎ－Ｍａｘ法[53), 63)]を適用している。複数のプロダクションルールを用いたファジィ推論を模式化したものを図４に示す。

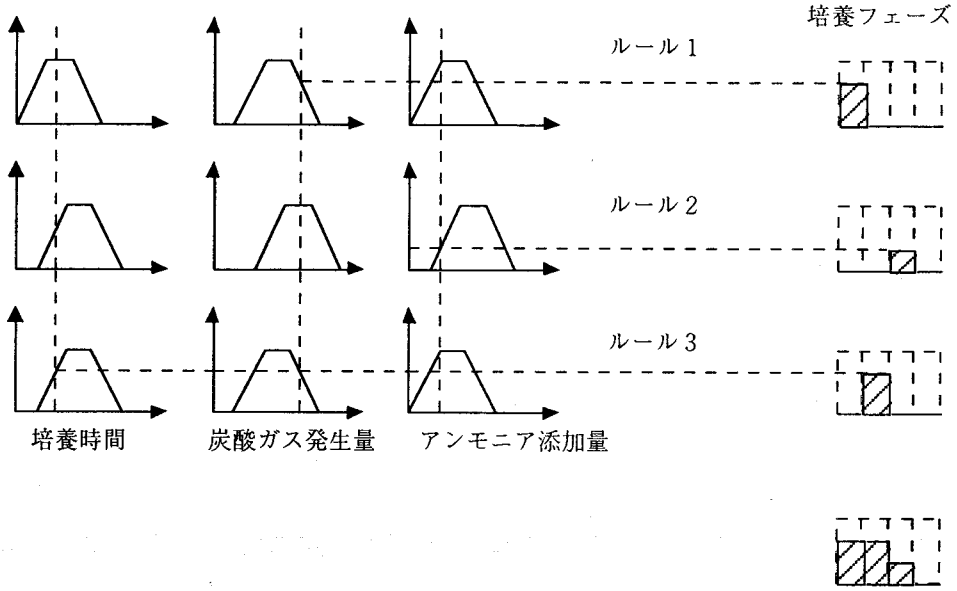


図4　ファジィ推論の模式図

図4は、3つのプロダクションルールによる推論過程を表しており、各々のプロダクションルールを以下に示す。

ルール1
Ｉｆ　培養時間が”短い”で
　　炭酸ガス発生量が”中位”で
　　アンモニア水添加量が”小さい”
　Ｔｈｅｎ　培養フェーズは遅延期である

ルール2
Ｉｆ　培養時間が”中位”で
　　炭酸ガス発生量が”大きい”で
　　アンモニア水添加量が”中位”
　Ｔｈｅｎ　培養フェーズは遷移期である

ルール3
Ｉｆ　培養時間が”中位”で
　　炭酸ガス発生量が”中位”で
　　アンモニア水添加量が”小さい”
　Ｔｈｅｎ　培養フェーズは増殖期である

これらのプロダクションルールと、”短い”などのファジィメンバーシップ関数より培養フェーズの推定を行う。ルール1を例に取り説明を加える。まず、現在の培養時間の実測値と培養時間に対して定義された”短い”のファジィメンバーシップ関数を比較し、実測

値が”短い”に属する適合度を求める。同様にして、炭酸ガス発生量が”中位”、アンモニア水添加量が”小さい”適合度を求める。この例では、各々１．０、０．７、および、１．０の適合度を持っている。プロダクションルールは前件部の条件が全て満たされる必要があるため、これらの値のファジィ論理和、すなわち、最小値である０．７がプロダクションルールが現在の状態に適合している割合である。さらに、プロダクションルールが現在の状況に０．７で適合しているならば、後件部の事象が前件部の条件により起こっている蓋然性が０．７であると考えられる。従って、培養フェーズが遅延期である蓋然性０．７が得られる。次に、全てのプロダクションルールに同様の操作をし、適合度を求める。その後、各培養フェーズに対する蓋然性の値の中で最も高い（ＦｕｚｚｙＯｒ）ものをその培養フェーズの起こっている蓋然性としている。

第５節　結果および考察

グルタミン酸発酵プロセスにおいて、グルコースとアンモニアをモル比で１：１で混合したものを用いてｐＨを７．８に制御し培養を行った結果を図５に示す。これより、培養開始後約６時間目までは、菌体増殖が盛んであるがグルタミン酸の生産がほとんど観察されない増殖期であり、１４時間目以降は、菌体はほとんど増殖しない生産期であることが判明した。この結果を基に、培養フェーズを認識するために用いるメンバーシップ関数を決定した。また、中村ら[33]が報告したように、生産期におけるアンモニア水添加量とグルコース消費量に直線関係が認められらた。これを、図６に示す。

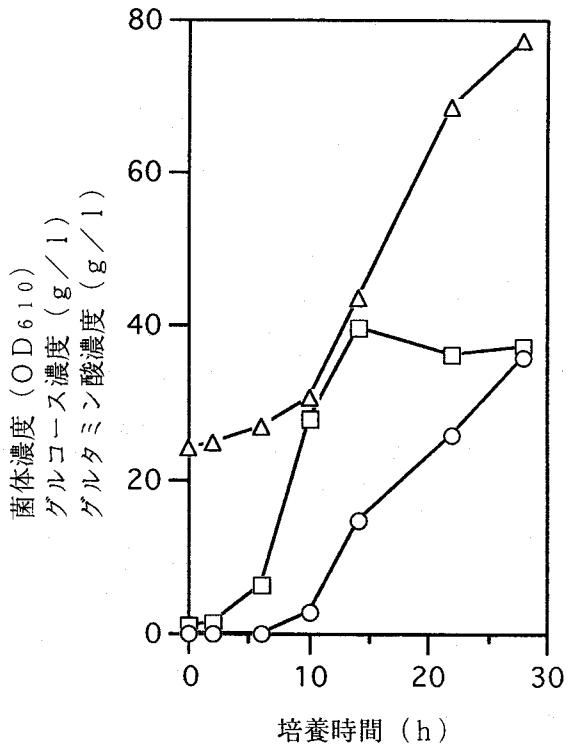


図５　グルタミン酸発酵プロセスの経時変化
□菌体濃度、△グルコース濃度
○グルタミン酸濃度

これより、生産期においては、アンモニア水添加量よりグルコース消費速度の推定が可能であることが示唆された。しかし、増殖期においては、ｐＨ調整に用いているアンモニア水の添加速度が小さく、アンモニア水添加量よりグルコースの消費量を推定することができないことが判明した。

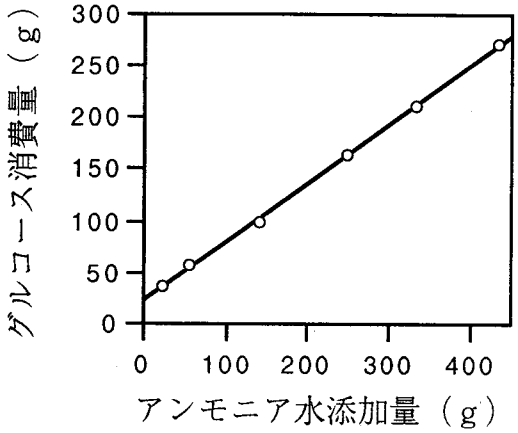


図6　生産期におけるグルコース消費量とアンモニア水添加量の関係

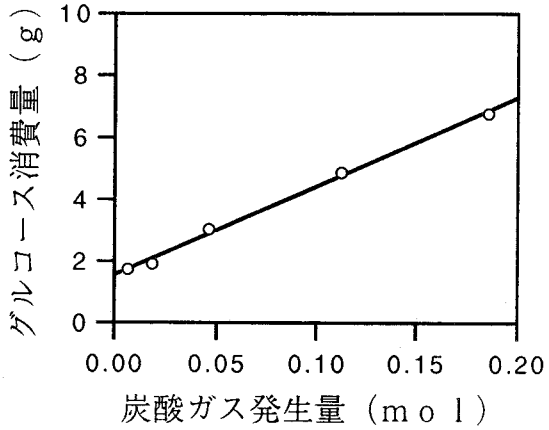


図7　増殖期におけるグルコース消費量と炭酸ガス発生量の関係

次に、増殖期におけるグルコース消費量と炭酸ガス発生量の関係を調べたところ両者の間に直線関係が認められた。図7に両者の関係を示す。これより、増殖期におけるグルコース消費量の推定に炭酸ガス発生量を用いることが可能であることがわかった。また、増殖期と生産期において異なる流加方策を用いる必要性があることが示唆された。さらに、遷移期においては、アンモニア水添加量、炭酸ガス発生量ともに、グルコース消費量と直線関係が認められた。これより、増殖期では発生した炭酸ガス量に比例してグルコースを流加し、生産期では中和のために添加したアンモニア水の量に比例した流加を行うことで、グルコース濃度を一定に保つことが可能であることが示唆された。なお、遷移期においては、両者の平均を流加速度として採用した。また、2つ以上の培養フェーズに属する蓋然性が求められている場合においては、各々の流加方策を用いて決定したグルコース流加速度に対し、蓋然性を重みとする加重平均[33]を求め流加速度とした。また、培養フェーズの認識に用いたプロダクションルールを表2に示す。

表２　培養フェーズの認識に用いたプロダクションルール

if	培養時間	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
	炭酸ガス発生量	1	2	3	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3	3
	アンモニア添加量	1	1	1	1	1	2	1	2	2	3	1	2	1	2	3
then	培養フェーズ	L	L	L	G	G	G	G	T	P	P	T	P	T	P	P

各々の記号は、１：短い・少ない、２：中位、３：長い・多い、
Ｌ：遅延期、Ｇ：増殖期、Ｔ：遷移期、Ｐ：生産期を表す。

上記の方針に従って、グルタミン酸発酵プロセスの流加培養を行い、グルコース濃度を一定値に保つことを試みた結果を図８に示す。また、その際にファジィ推論により決定された培養フェーズの経時変化を図９に示す。なお、図９は培養開始後１５時間目以降が省略してあるが、生産期の蓋然性が常に１と推定されていた。

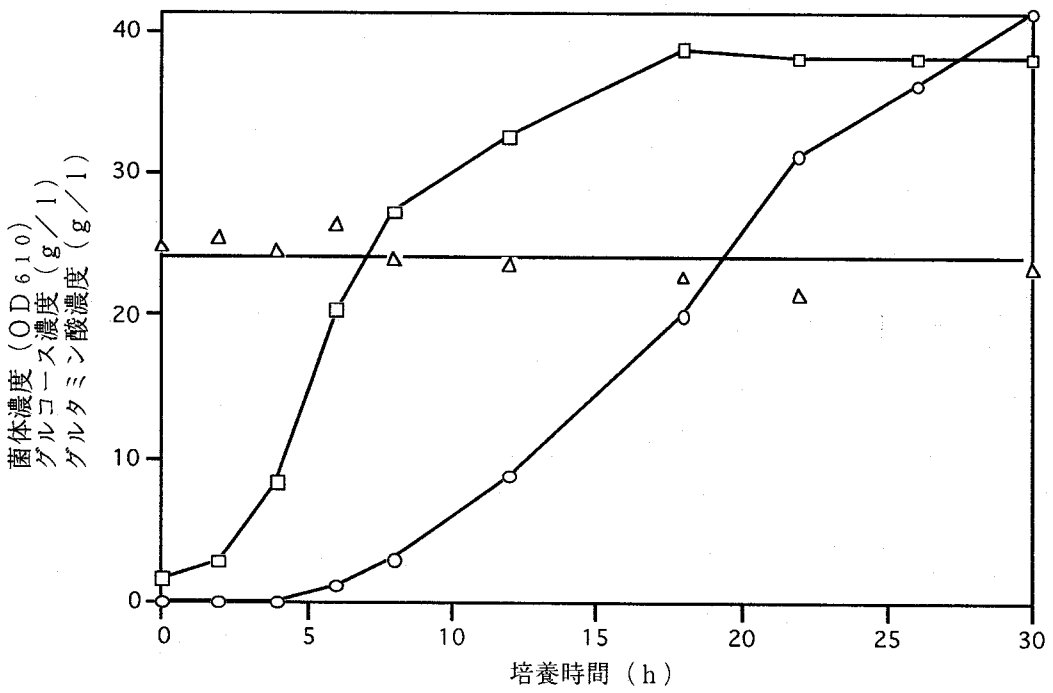


図８　グルタミン酸発酵プロセスにおける菌体濃度、基質濃度、生産物濃度の経時変化
（培養フェーズの認識に基づくグルコース流加）
□菌体濃度、△グルコース濃度、○グルタミン酸濃度

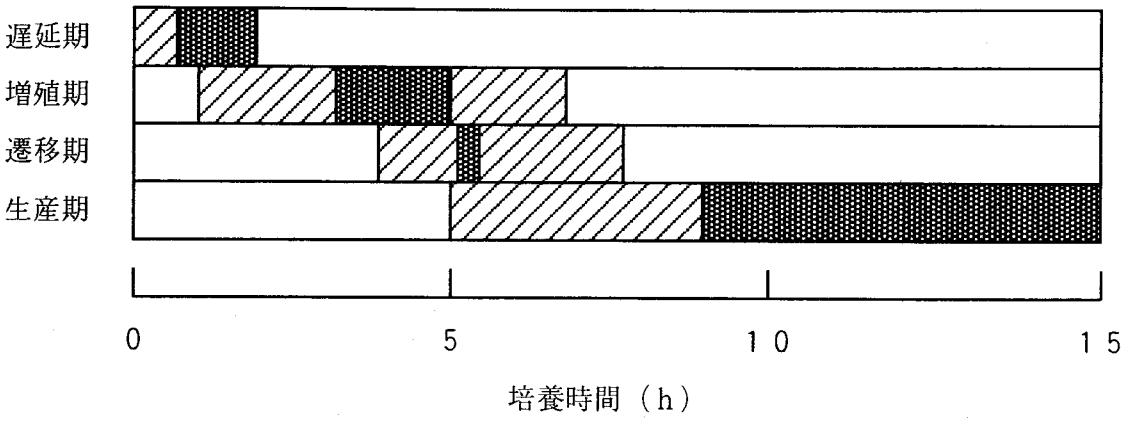


図９　オンラインで推定した培養フェーズの経時変化

該当する培養フェーズである蓋然性が１である状態

該当する培養フェーズである蓋然性が０から１の間である状態

図８より菌体の増殖は遅くとも培養開始後２時間より始まっていることから、ファジィ推論により推定された遅延期の範囲はほぼ的確であったと考えられる。さらに、培養開始後２～４時間目および４～６時間目の区間で、菌体濃度が各々２．９倍、２．４倍になっており、これはその区間での平均の比増殖速度が０．５３、０．４４（／ｈ）と培養中における最高値であったことを示している。また、６～８時間目の区間では、比増殖速度が０．１５（／ｈ）に過ぎず、さらにグルタミン酸の生産が培養開始後４時間目より始まっていることを考慮すると、増殖期は培養開始後２～６時間目であり、遷移期が培養開始後４～５時間目より始まっていると判断された。これは、図９で示したファジィ推論による結果とよく一致していると考えられる。

また、図８より、培養中の全領域に渡ってグルコース濃度が、培養開始時と同様の約２５ｇ／ｌに制御されていることがわかる。ここで、認識した培養フェーズに適合した制御方策を行わなかった場合を考える。まず、培養の全期間においてアンモニア水の添加量を指標としてグルコースの流加を行った場合には、培養開始後５時間を経過するまではアンモニア水の添加があまり認められなかったことより、グルコースの流加は行われず、グルコース濃度が約２０ｇ／ｌに低下していたものと思われる。逆に炭酸ガス発生量のみを指標にしたグルコースの流加を行った場合には、培養開始後１０時間以降において、グルコースの流加が一時的に停止したり急激に供給されたと考えられる。これは、消泡剤の添加の前後で炭酸ガス発生速度の測定値が一時的に０になったり急上昇することが観察されたためである。これより、培養フェーズをオンラインで認識し、制御方策をその時点での培養状態にあったものに切り替えることは、有意義であったと考えられる。

第6節　要約

比速度が測定できない系において、ファジィ推論を用いて培養フェーズを認識する手法を開発し、さらに、認識した培養フェーズに応じてグルコース流加方策を決定する培養制御システムを開発した。この方法においては、グルタミン酸発酵プロセスにおいて、増殖期における炭酸ガス発生量とグルコース消費量、および、生産期におけるアンモニア水添加量とグルコース消費量が直線関係にあることを利用し、各々の培養フェーズにおける流加方策を決定した。さらに、ファジィ推論により得られる現在のプロセスの状態が各培養フェーズである蓋然性を重みとする加重平均により最終的なグルコース流加速度を決定する手法を導入して、流加速度の急激な変化が起こらないシステムを開発した。

開発したシステムを用いてグルタミン酸発酵プロセスの培養フェーズをオンラインで認識し、さらに、認識した培養フェーズに応じたグルコース流加速度を決定することにより、培地中のグルコース濃度を一定値に制御することが可能であることを示した。

第　3　章

測定可能な変数の比の値と正規化変化率を指標とする培養フェーズの認識

Mikio Nakajima

第１節　はじめに

第２章では、培養フェーズをオンライン認識する手法と認識した培養フェーズに適合した流加速度決定手法に対して検討を加え、オンラインで培地中のグルコース濃度を定置制御するシステムを構築した。この際に、培養時間、炭酸ガス発生量およびアンモニア添加量を指標として培養フェーズの認識を行ったが、天然培地を用いたバイオプロセスなどは培養条件が培地の産地などに強く依存するため培養フェーズが遷移する時期がバッチ毎に変化することが多く見られ、このような場合には細胞の活性を示す他のパラメータを指標とする必要性があるものと考えられる。従って、このようなバイオプロセスの培養フェーズをオンラインで検知するためには、比速度が実時間で測定されていることが望ましい。比速度が直接測定されている場合には、比速度の値とその変化を指標として培養フェーズを容易に決定することが可能である。

しかし、多くのバイオプロセスにおいて比速度の値をオンラインで測定することは、困難である。かつて、合葉ら[2)]は測定が比較的容易な変数である炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度の比の値であるＲＱを用い、パン酵母生産プロセスの最適化を行った。このとき、ＲＱが１以上の場合は、菌体がエタノールを生産していることを利用し、基質流加速度を決定している。これは、通性嫌気性菌であるパン酵母が条件によって好気代謝とエタノール発酵のいずれかにスイッチするという特異な性質に基づいており、それを代表する指標ＲＱが制御対象のパラメータとして用いられた。ＲＱは速度変数の比であるが、他のバイオプロセスにおいても速度変数の比が状態推定を行うのに有効な指標となり得ると考えらる。

本章においては、測定が比較的容易である発酵槽当たりの菌体の代謝速度である炭酸ガス発生速度、酸素吸収速度などの速度変数の比の値を用いることにより、間接的に比速度の変化を捉えることを検討した。また、それらの速度変数の正規化変化率（Normalized Rate Gradient、ＮＲＧ）を定義することで、比を取る変数の選択を容易に行なう方法を開発した。さらに、この変化率をパラメータとした培養フェーズの認識についても検討した。

第２節　実験方法

２．１　菌株および培養方法

グルタミン酸生産菌である*Brevibacterium* sp.を含む培養液を１ｍｌづつセラムチューブに分注し、－８０℃で冷凍保存したものを前々培養の種菌として用いた。前々培養は、５００ｍｌの坂口フラスコに２０ｍｌの前培養培地を仕込み、１９時間振盪培養を行った。前培養は、２ｌの坂口フラスコに前培養培地を２５０ｍｌづつ仕込み、前々培養液を１ｍｌづつ植菌後、１８時間振盪培養を行った。また、本培養は、５０ｌジャーファーメンタ（丸菱バイオエンジ社製）に２３．５ｌの本培養培地を仕込み、１．２５ｌの前培養液を植菌した後、流加培養を行った。この際、初期グルコース濃度は１０ｇ／ｌで培養を行った。なお、使用した培地[45]を表１に示す。なお、本培養においては、ｐＨはアンモニア水を加えることにより７．６５に保ち、Ｄ．Ｏ．は撹拌回転数を変化することで５０％飽和に制御した。

表１　培地組成

培地成分	濃度		
	前培養	本培養	
グルコース	36	120	g/l
KH_2PO_4	1.0	1.0	g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4	0.4	g/l
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.0	2.0	ppm
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	2.0	ppm
味液	5.0	5.0	g/l
微量成分	必要量	必要量	

２．２　オンライン計測

本培養の際に、菌体濃度（オンライン懸濁固体濃度計、電気化学計器社製）、ｐＨ（ｐＨ電極、東亜電波工業社製）、ＤＯ（ＤＯ電極、丸菱バイオエンジ社製）、撹拌回転数，および排出ガス中に含まれる酸素濃度（磁化率型酸素濃度計、富士電機社製）、炭酸ガス濃度（赤外線炭酸ガス濃度計、富士電機社製）の各値は、Ａ／Ｄコンバータ[73]（コンテック社製）により実時間でパーソナルコンピュータ（ＰＣ－２８６、ＥＰＳＯＮ社製）

に取り込んだ。また、ｐＨを制御するために加えているアンモニア水の流量、および流加しているグルコース溶液の添加量は、各々のストックタンクに付設した電子上皿天秤（島津製作所社製）により測定し、ＲＳ２３２Ｃ通信回線[61]によりパーソナルコンピュータに転送した。また、測定、およびオンラインでの計算に用いたソフトウエアは、アセンブラ（ＯＰＴＡＳＭ、ＳＬＲ社製）により作成し、リアルタイム環境は、リアルタイムＢＡＳＩＣ（コンテック社製）を用いて実現した。なお、実験に用いたシステムの模式図を図１に示す。

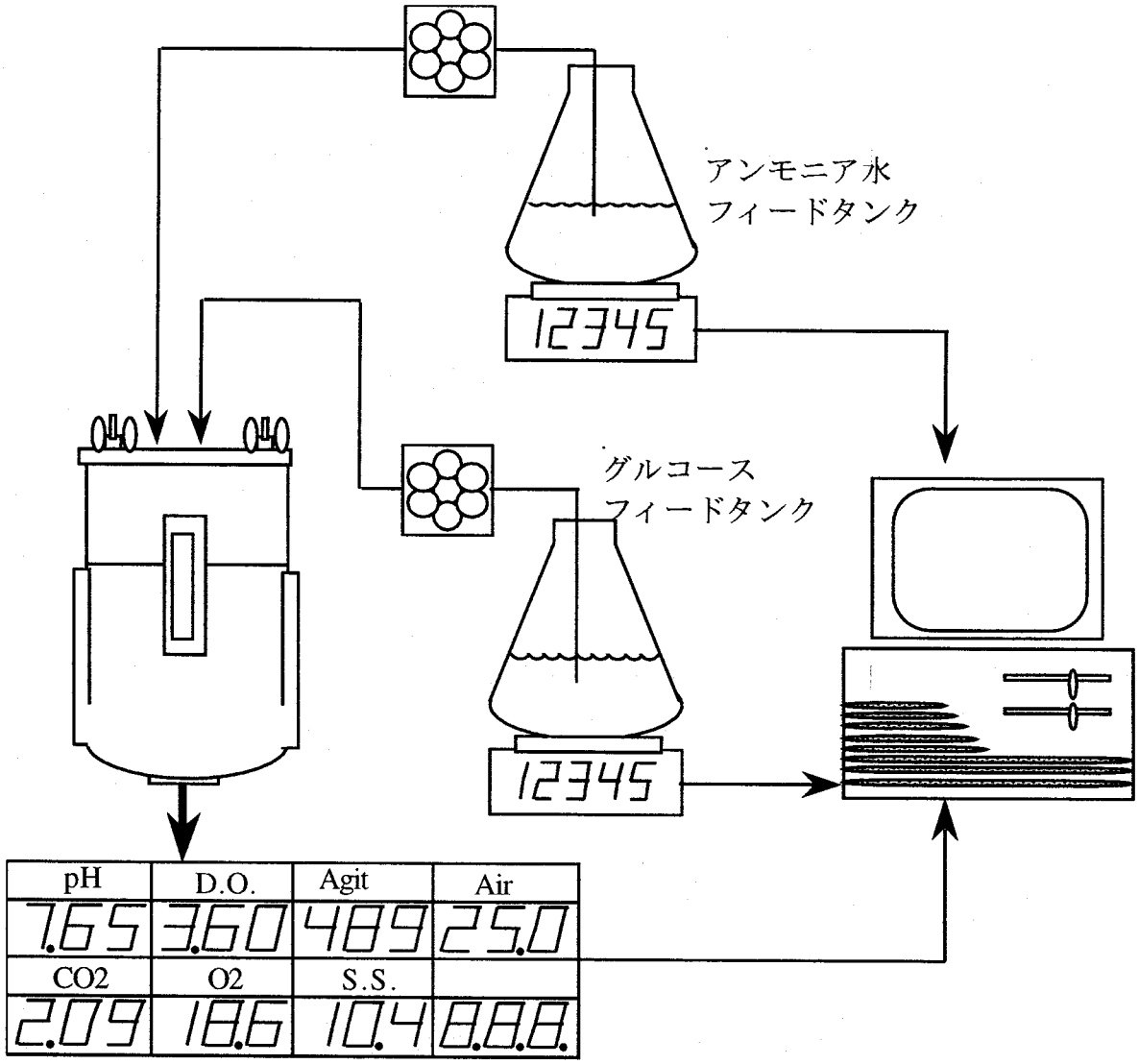


図１　システムの模式図

２．３　オフライン測定

本培養を行った際に１０分間隔でサンプルを取得し、遠心分離で菌体を除去した後に凍結保存した。培養が終了した時点で基質であるグルーコース濃度（グルコスタット、東洋紡社製）と生産物であるグルタミン酸濃度（グルタミン酸Ｆキット、ベーリンガーマンハイム社製）の測定を酵素法により行った。

第３節　認識に用いる手法

３．１　変数の比に関する検討

比増殖速度、比消費速度および比生産速度などの鍵となる比速度がオンラインで測定可能な系においては、培養フェーズのオンライン認識は比較的容易であるが、多くのバイオプロセスでは、これらのパラメータは、オンラインでの計測が難しい。そこで、比較的オンライン測定し易い炭酸ガス発生速度などの発酵槽全体での消費・生産を表す変数の比の値を用いることにより、培養フェーズを認識することを検討した。

炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度を例に取り、発酵槽全体での代謝速度を表す変数の比を（１）式に、また、物質収支を（２）、（３）式に示す。

$$CER / OUR = (V \times SR_{CO_2}) / (V \times SR_{O_2}) = SR_{CO_2} / SR_{O_2} \qquad (1)$$

$$SR_{CO_2} = m_{CO_2} + \frac{\mu}{Y_{X/CO_2}} + \frac{\rho}{Y_{P/CO_2}} + \sum_i \frac{\beta_i}{Y_{B_i/CO_2}}$$

$$= m_{CO_2} + \sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}} \qquad (2)$$

$$SR_{O_2} = m_{O_2} + \sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}} \qquad (3)$$

ここで、各々の記号は、

CER　：　炭酸ガス発生速度 [g h^{-1}]

OUR　：　酸素吸収速度 [g h^{-1}]

X　：　菌体濃度 [g l^{-1}]

V　：　実効容量 [l]

SR_{CO2}　：　比炭酸ガス発生速度 [h^{-1}]

SR_{O2}　：　比酸素吸収速度 [h^{-1}]

m　　：　維持定数 [h^{-1}]

Y　　：　収率定数[-]

μ　　：　比増殖速度 [h^{-1}]

ρ　　：　比生産速度 [g-product g-cell^{-1} h^{-1}]

β　　：　比副生産速度 [g-by-product g-cell^{-1} h^{-1}]

α　　：　比速度 [g g-cell^{-1} h^{-1}]

を表す。（2）、（3）式を（1）式に代入し、（4）式を得る。

$$CER / OUR = \left(m_{CO_2} + \sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}}\right) / \left(m_{O_2} + \sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}}\right) \qquad (4)$$

維持定数mおよび収率定数Yが定係数と考えるならば、全ての比速度α_jの値が培養中変化せず一定である場合には比の値が変化しないことがわかる。さらに、比速度の中でα_kが変化した場合を仮定すると、

$$CER / OUR = \left\{\frac{\alpha_k}{Y_{A_k/CO_2}} + (m_{CO_2} + \sum_{j\neq k} \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}})\right\} / \left\{\frac{\alpha_k}{Y_{A_k/O_2}} + (m_{O_2} + \sum_{j\neq k} \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}})\right\} \qquad (5)$$

（5）式の各定係数を以下のように置き換え、α_kで微分するとすると（6）式が得られる。

$$\frac{1}{Y_{A_k/CO_2}} = a_k, \qquad m_{CO_2} + \sum_{j\neq k} \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}} = b_k,$$

$$\frac{1}{Y_{A_k/O_2}} = c_k, \qquad m_{O_2} + \sum_{j\neq k} \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}} = d_k$$

$$CER / OUR = \frac{a_k\alpha_k + b_k}{c_k\,\alpha_k + d_k}$$

$$\frac{d\,(CER / OUR)}{d\,\alpha_k} = \frac{a_k}{c_k\,\alpha_k + d_k} - \frac{c_k\,(a_k\alpha_k + b_k)}{(c_k\,\alpha_k + d_k)^2}$$

$$= \frac{a_k d_k - b_k c_k}{(c_k\,\alpha_k + d_k)^2} \qquad (6)$$

ここで、（6）式の分子（$a_k d_k - b_k c_k$）に注目すると、この値が0でない場合には、

α_kの変化に伴い、炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度の比の値が変化することがわかる。しかし、（6）式の分子の値が0である場合には、比速度α_kが変化したときに炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度の比の値は変化しない。また、（4）式より明らかなように、全ての比速度の値が一定である場合には、炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度の比の値は定数となる。すなわち、オンラインで測定可能な変数の中で（6）式の分子の値が0にならない組み合わせを選択すれば、比の値の変化を観測することで、間接的に比速度の変化を捉えることが可能になることが示唆された。

しかし、（6）式の分子は、収率定数や維持定数を多く含み、値を直接求めることが困難であり、多くの場合において他の方法を用いる必要性があると考えられる。

3．2　速度変数の正規化変化率を用いた変数の視覚的選択と培養フェーズの推定

前節で述べたように、炭酸ガス発生速度や酸素吸収速度など発酵槽全体での代謝速度を表す変数の比の値を用いて培養フェーズの推定を行う場合には、比を取る変数の組み合わせを選択することが重要である。そこで、これらの速度の時間的変化率を速度で除して得られる正規化速度変化率（Normalized Rate Gradient、ＮＲＧ）を定義することにより、変数の選択を容易に行う方法について検討を加えた。

ＮＲＧは、変数ｒに対して（7）式の様に定義される。また、炭酸ガス発生速度のＮＲＧは（8）式で表現される。

$$NRG_r = \frac{1}{r}\frac{dr}{dt} \tag{7}$$

$$NRG_{CER} = \frac{1}{CER}\frac{d\,CER}{dt} \tag{8}$$

ここで、２つの変数のＮＲＧが異なる値を取った場合を炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度を例に取り検討する。なお、ここで、ＮＲＧが定義可能な条件として、炭酸ガス発生速度≠０、酸素吸収速度≠０を仮定する。

$$NGR_{CO_2} \neq NGR_{O_2}$$

$$\frac{1}{X\,V\,SR_{CO_2}}\frac{d\,(X\,V\,SR_{CO_2})}{dt} \neq \frac{1}{X\,V\,SR_{O_2}}\frac{d\,(X\,V\,SR_{O_2})}{dt}$$

$$\mu + \frac{1}{SR_{CO_2}}\frac{d\,SR_{CO_2}}{dt} \neq \mu + \frac{1}{SR_{O_2}}\frac{d\,SR_{O_2}}{dt}$$

$$\frac{1}{SR_{CO_2}}\frac{d\,SR_{CO_2}}{dt} \neq \frac{1}{SR_{O_2}}\frac{d\,SR_{O_2}}{dt} \tag{9}$$

（9）式に（2）、（3）式を代入することにより、（１０）式を得る。

$$\frac{1}{m_{CO_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}}}\frac{d\left(m_{CO_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}}\right)}{dt} \neq \frac{1}{m_{O_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}}}\frac{d\left(m_{O_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}}\right)}{dt} \qquad (10)$$

さらに、変形を加えると（１１）式になる。

$$\sum_k \left\{\frac{1}{\left(m_{CO_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}}\right)Y_{A_k/CO_2}}\frac{d\alpha_k}{dt}\right\} \neq \sum_k \left\{\frac{1}{\left(m_{O_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}}\right)Y_{A_k/O_2}}\frac{d\alpha_k}{dt}\right\} \qquad (11)$$

両辺に、SR_{CO2}を乗ずると（１２）式を得ることができる。

$$\sum_k \left\{\left(\frac{m_{O_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}}}{Y_{A_k/CO_2}} - \frac{m_{CO_2}+\sum_j \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}}}{Y_{A_k/O_2}}\right)\frac{d\alpha_k}{dt}\right\} \neq 0$$

$$\sum_k \left\{\left(\frac{m_{O_2}+\sum_{j\neq k} \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/O_2}}}{Y_{A_k/CO_2}} - \frac{m_{CO_2}+\sum_{j\neq k} \frac{\alpha_j}{Y_{A_j/CO_2}}}{Y_{A_k/O_2}}\right)\frac{d\alpha_k}{dt}\right\} \neq 0$$

$$\sum_k \left\{(a_k d_k - b_k c_k)\frac{d\alpha_k}{dt}\right\} \neq 0 \qquad (12)$$

すなわち、２つの変数のＮＲＧが異なる値を取る場合、

$(a_k d_k - b_k c_k)\ d\alpha_k / dt\ ;\ k=1...$

のすべてが０であるということはない。すなわち、（６）式の分子が０でなく、かつ比速度α_kが時間的に変化していることが、保証される。従って、発酵槽全体での代謝の速度を表す変数のＮＲＧを同一のグラフ上にプロットし、ＮＲＧが異なる値を持つ場合には、その時点でいずれかの比速度の値が変化していると判定される。また、その変数の組み合わせで比の値を計算すれば、比の値が変化したときに比速度が変化していることが確認できる。

以上の検討より、ＮＲＧを計算し比較すれば培養フェーズの分割に用いる比を計算するための変数の組み合わせを選択することが可能であることが示された。また、単に２つのＮＲＧの値を比較することで培養フェーズを推定することも可能であることが示唆された。ＮＲＧは、計算が非常に容易であり、オンラインで用いることが可能であると思われる。しかし、ＮＲＧは実測値の微分を含むため、ノイズの影響を受け易く本研究では、オフラ

インでの変数の選択に用いた。

また、本研究で測定が可能な変数で発酵槽全体の消費・生産を表す変数は、炭酸ガス発生速度、酸素吸収速度およびアンモニア水添加速度の３種であるため、それらの変数間の比は３種しか存在せずこれらをすべて培養フェーズと照らし合わせることは容易であるが、ｎ個の変数がオンライン測定が可能な場合、それらの間の比の数は$_{n}C_{2}$であるのに対し、本手法ではｎ個の変数のＮＲＧの経時変化より決定することが可能であるため、ｎが大きくなった時に有効であると考えられる。さらに、副生産物など測定を行っていない物質の生産が起こった場合などでは、未知の比速度の変化を推定する手がかりとして使用することが可能であると思われる。

第４節　培養フェーズ

本研究で用いたグルタミン酸発酵プロセスにおいて、オフラインで測定した比増殖速度、比基質消費速度、および、比生産速度を観察することにより培養フェーズを分割した。培養初期において菌体増殖が活発な増殖期が観察され、その後、比増殖速度が緩やかに低下し比生産速度が急上昇する遷移期が認められた。また、比生産速度がほぼ一定となる生産期が培養後期において観察された。しかし、これら３種の培養フェーズは、ある点を境に突然変わるものではなく、徐々に１つのフェーズから次のフェーズに変化し、２つのフェーズの間には、両者の中間の曖昧な領域が存在していた。

第５節　結果および考察

本研究でオンライン測定可能な変数を表２に示す。なお、菌体濃度はオンラインで測定可能であるが、提案したオンラインフェーズ認識手法を評価するため、オンラインでの培養フェーズの認識には使用しなかった。表２より、オンライン測定可能な速度変数である炭酸ガス発生速度（ＣＥＲ）、酸素吸収速度（ＯＵＲ）、アンモニア水添加速度（ＡＡＲ）に含まれるノイズが大きく、それらのＮＲＧも多くのノイズを含み、オンラインでの培養フェーズ認識に用いることができなかった。そのため、オフラインでの培養フェーズ認識と比を取る変数の決定に対して、ＮＲＧを用いることを検討した。

表２　オンラインで計測可能な変数と測定に含まれる遅れとノイズレベル

変数名	遅延時間*	ノイズレベル*
ｐＨ	１秒以下	１％以下
温度	１秒以下	１％以下
溶存酸素濃度	１０秒以下	１％以下
撹拌回転数	１秒以下	１％以下
炭酸ガス発生速度	２分以下	５％以下
酸素吸収速度	２分以下	５％以下
アンモニア水添加速度	１分以下	１０％以下
菌体濃度	１０分以下	１％以下
比増殖速度	１０分以下	１０％以下
NRG_{CER}	２分以下	１００％以下
NRG_{OUR}	２分以下	１００％以下
NRG_{AAR}	１分以下	１００％以上

*遅延時間は９０％応答時間で定義した。
**ノイズレベルは、Ｂ－Ｓｐｌｉｎｅでスムージングした値との残差より求めた。

オンラインで測定した炭酸ガス発生速度、酸素吸収速度およびアンモニア水添加速度をオフラインで、Ｂ－Ｓｐｌｉｎｅ[37),80)]を用いて平滑化し、定義式に従ってＮＲＧを計算した。これらの変数のＮＲＧの経時変化を図２に示す。なお、培養初期において各ＮＲＧの値に違いが見られるが、培養初期では各変数の変化率が小さくノイズレベルとほぼ同じであるため有用な情報は得られなかった。また、培養開始後４～５時間目において、全て

のＮＲＧはほぼ同一の値を取り、その後６～８時間目の期間でアンモニア水添加速度のＮＲＧが明瞭なピークを形成し、炭酸ガス発生速度、および、酸素吸収速度のＮＲＧの値と比べて高くなっていることが判明した。これより、培養開始後６～８時間において、菌体の比速度に何らかの変化があったと推察された。また、炭酸ガス発生速度とアンモニア水添加速度、および、酸素吸収速度とアンモニア水添加速度の比の値がこの区間で変化し、これらの比の値を用いることにより、培養フェーズの分割が可能となることが期待される。

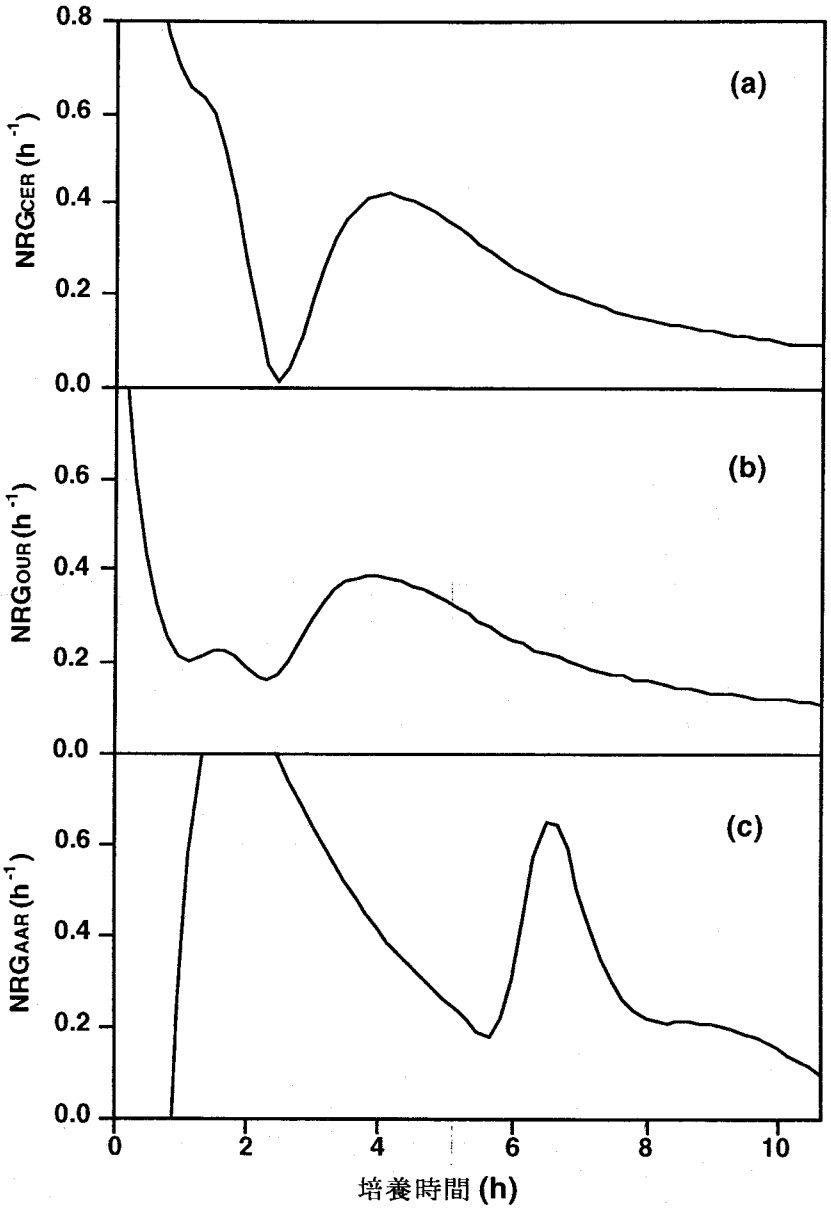


図２　Ｂ－Ｓｐｌｉｎｅにより平滑化したＣＥＲ、ＯＵＲ、ＡＡＲのＮＲＧの経時変化

実際に培養フェーズを分割するために、オフラインで計測した菌体濃度と生産物濃度のデータをＢ－Ｓｐｌｉｎｅを用いて平滑化したものより算出した比増殖速度と比生産速度の経時変化を、図３、および、図４に示す。これらのグラフより、比生産速度は、培養開始後約６時間目より急上昇し、８時間目においてほぼ一定の値を取ることが判明した。また、比増殖速度は、その区間でゆっくりと減少していることが観察された。

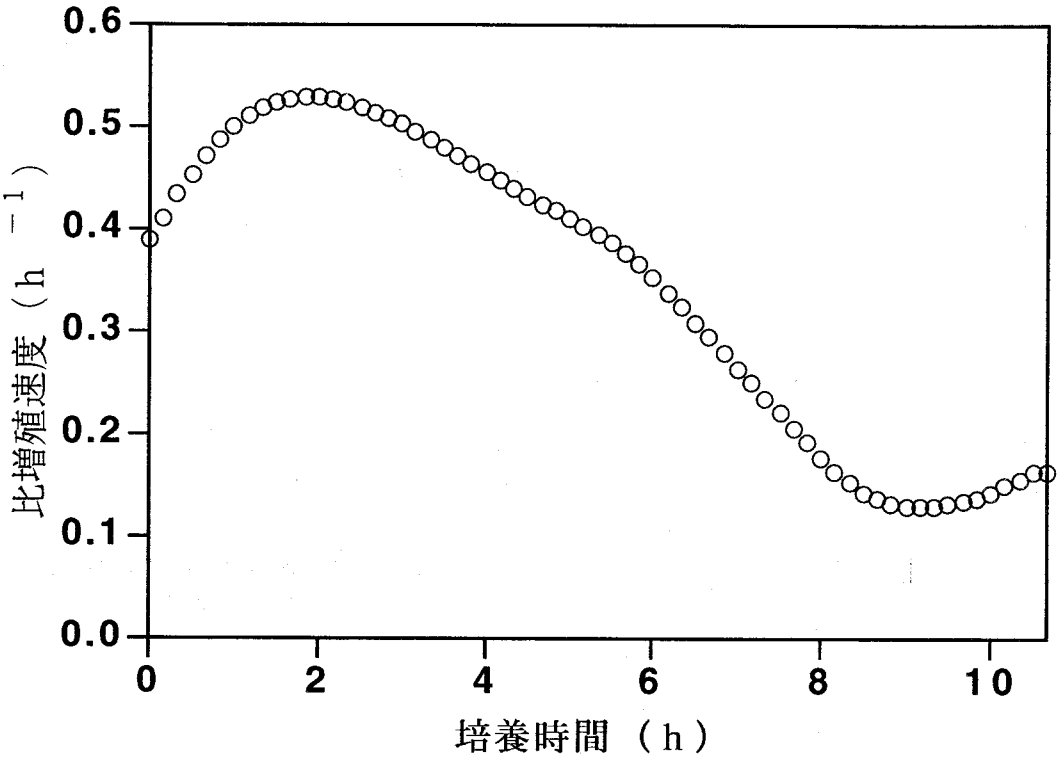


図3　グルタミン酸発酵プロセスにおける比増殖速度の経時変化

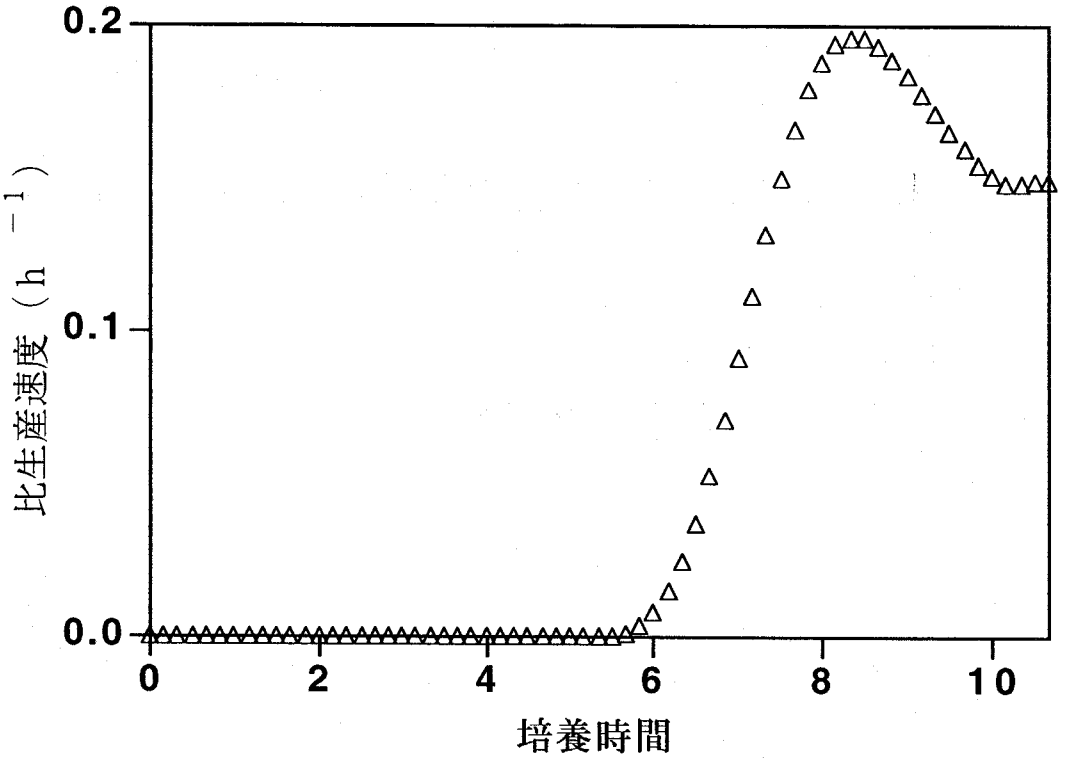


図4　グルタミン酸発酵プロセスにおける比生産速度の経時変化

これより、培養フェーズを図５の様に分割した。なお、図５に示したように３種の培養フェーズ、増殖期、遷移期、および、生産期の間にファジィな領域を設定した。これは、培養フェーズは、突然次のフェーズに移行するのではなく、両者のどちらにも属する曖昧な部分が存在したためである。

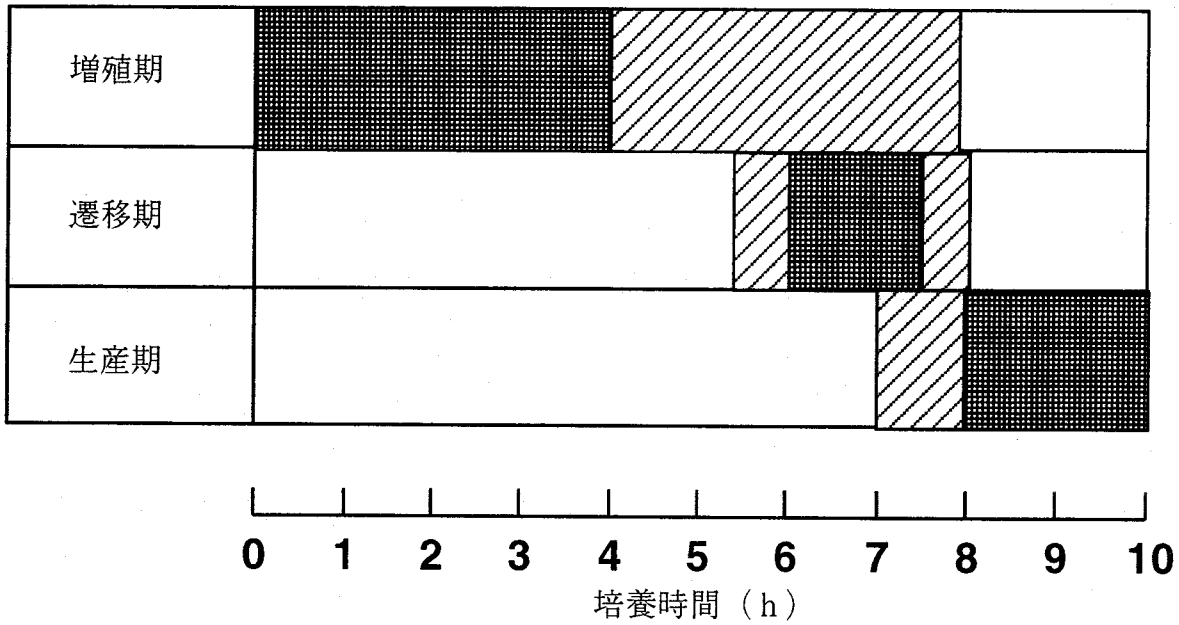


図５　グルタミン酸発酵における培養フェーズの経時変化

次に、オンライン測定が可能な炭酸ガス発生速度、酸素吸収速度およびアンモニア水添加速度の比を用いた培養フェーズの認識を試みた。これらの変数の比の値をオンラインで計測した結果を図６に示す。この図より、培養初期においては、炭酸ガス発生速度、酸素吸収速度、アンモニア水添加速度の値は非常に小さく、誤差の影響を受けたため、比の値は大きく変化したが、培養開始後４時間目よりほぼ一定の値を示した。さらに、培養フェーズが増殖期から生産期へと変化する培養開始後６～８時間目において、炭酸ガス発生速度と酸素吸収速度の比の値は、約１０％程度変化しただけであった。また、１０％の変化は、測定に含まれる誤差などの影響を考えるとオンラインで培養フェーズの認識に用いることが難しいと考えられる。また、炭酸ガス発生速度とアンモニア水添加速度の比の値、および、酸素吸収速度とアンモニア水添加速度の比の値は遷移期において大きく変化し、生産期と増殖期では２倍程度の差が認められた。この値は、この期間における比の値に含まれるノイズと比較して十分大きく、オンラインで検出可能である。

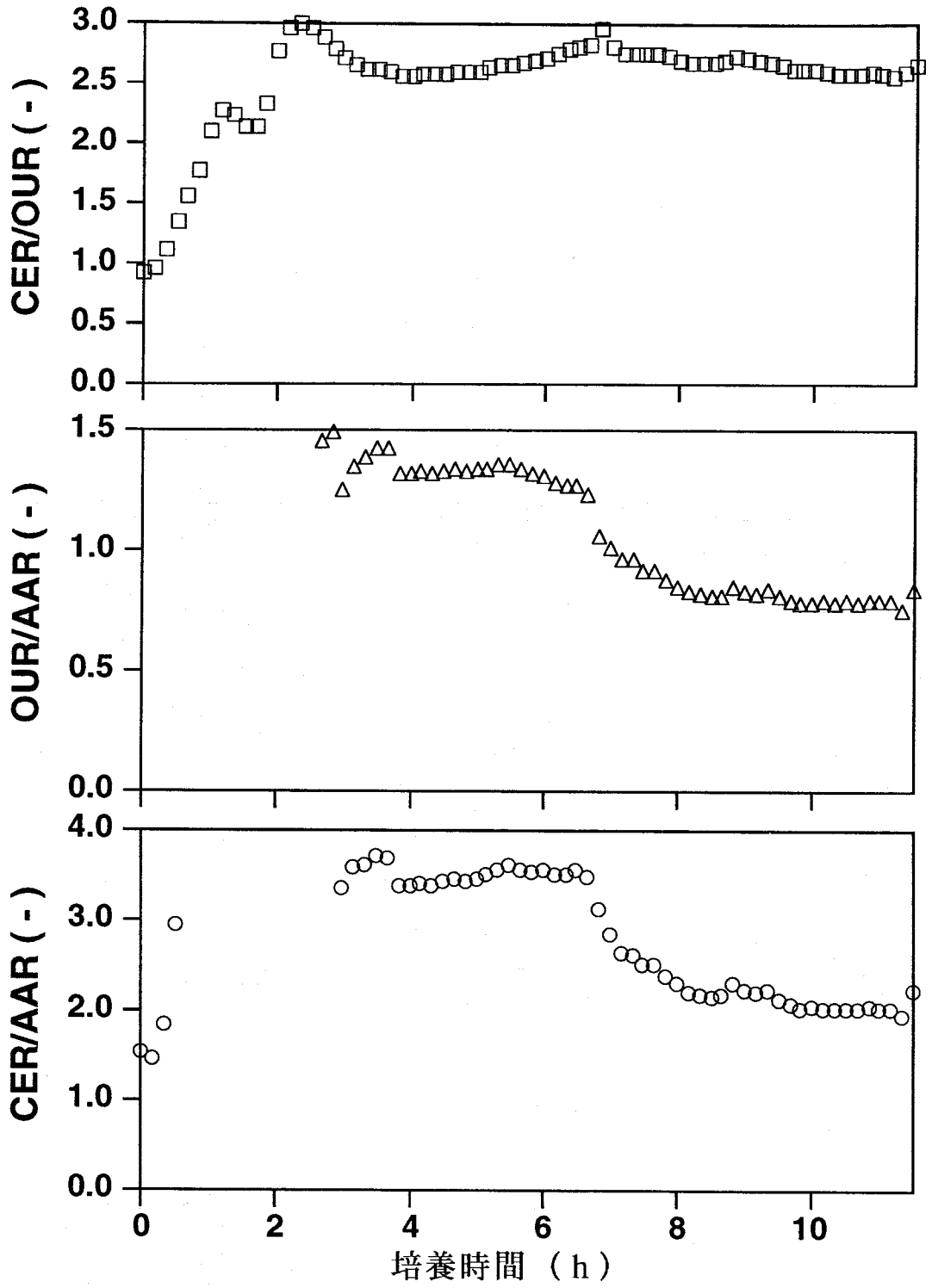


図6　オンラインで計測した（a）CER／OUR、（b）OUR／AAR、および、（C）CER／AAR

さらに、培養フェーズの移り変わりに応じて値が変化すると予想されたOUR／AARおよびCER／AARを用いて、第2章と同様にファジィ推論を用いて培養フェーズの認識

を行った。用いたプロダクションルールを図7に、またファジィ推論により出力された培養フェーズを図8に示す。

CER/AAR		比の値		
		小さい	中位	大きい
傾き	小さい	P	P	G
	中位	P	T	G
	大きい	T	T	T

OUR/AAR		比の値		
		小さい	中位	大きい
傾き	小さい	P	P	G
	中位	P	T	G
	大きい	T	T	T

図7　培養フェーズの認識に用いたプロダクションルール
G：増殖期、T：遷移期、P：生産期

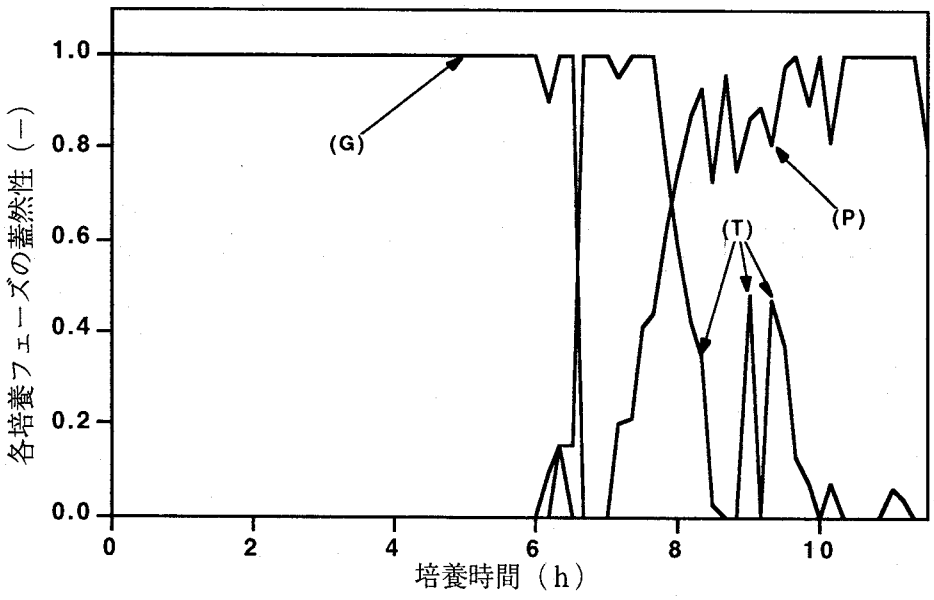


図8　推論された培養フェーズの蓋然性の経時変化
（G）増殖期、（T）遷移期、（P）生産期

これより、速度変数の比の値とその傾きにより推定した培養フェーズは、実際の比速度の変化より決定したものとよく一致しており、本手法がオンラインでの培養フェーズの認識に適用可能であることが示された。

第6節　要約

炭酸ガス発生速度や酸素吸収速度などの発酵槽全体の代謝速度を表す変数だけがオンラインで測定可能で、比増殖速度などの比速度が測定できない場合に対し、培養フェーズをオンラインで推定する手法に対して検討を加えた。この結果、発酵槽全体の代謝速度を表す変数の比の値が培養フェーズが変遷することを認識するのに有効であることを示し、さらに、培養フェーズ変遷の認識に用いる変数の組み合わせを視覚的に判断する手法を、速度変数の正規化変化率（ＮＲＧ）を定義することにより開発した。また、測定していない比速度の変化の予測にＮＲＧが有効であること、測定ノイズが少ない場合はＮＲＧが培養フェーズのオンライン推定に用いることが可能であることを示した。

これらの手法をグルタミン酸発酵プロセスに適用し、ＮＲＧを用いた変数の組み合わせの選択および比の値を用いた培養フェーズの推定を行い、これらの手法の有効性を実プロセスにより実証した。

第　4　章

比速度を指標とした状態認識とエキスパートシステムによる異常診断

第1節　はじめに

第2章、第3章において比速度が測定できないプロセスの培養フェーズ[14),69)]を認識する手法に対して検討を加えた。しかし、比速度がオンラインで測定、もしくは、推定できる系においては、培養フェーズの認識は容易となり、さらに詳細なプロセスの状態を推定することが可能であることが期待される。比速度を推定するために、菌体濃度が測定されていることが最低限必要であり、その他に、基質濃度、生産物濃度、副生産物濃度がオンラインで測定可能であることが望ましい。

菌体濃度がオンラインで測定されている場合には、その微分値を絶対値で割ることにより比増殖速度が推定でき、菌体濃度と生産物濃度の両者が測定されている系においては、生産物濃度の時間的変化を菌体濃度で除することにより、比生産速度が算出可能である、

しかし、これら比速度は実測値の微分を用いているため、ノイズに敏感であり、実際のプロセスの制御や状態の認識に用いるためには、ノイズを除去する手法の開発が不可欠である。清水ら[46),47),69),70)]は、拡張カルマンフィルターによりパン酵母生産プロセスの比増殖速度を推定・制御することによりパン酵母の品質を制御することに成功した。カルマンフィルターは、プロセスの状態変数の動的挙動を表すシステム方程式、状態変数と測定されている変数の関係を表す観測方程式、および、それらに含まれる外乱・ノイズの統計的パラメータを必要とするが、ノイズ除去率・応答速度ともに優れており理想的なノイズ除去法であると思われる。しかし、プロセスが、システム方程式と異なる動的挙動を示した場合には、追従性が著しく悪くなる欠点を有する。

従って、比速度を用いて培養フェーズを決定する場合には、カルマンフィルターによるノイズ除去を行うことが望ましいが、普段起こり得ないプロセスの異常状態を検出するためには、他のフィルタリング手法[82)]を用いる必要性がある。そして、異常状態の検出を行うためには、現在のプロセスの状態が通常観察される増殖期や生産期などと異なることを検出する機構が必須であり、かつ、観察された異常状態の原因の探索を行うことが可能であれば、その原因に対する対処を行うことにより、プロセスを正常な状態に復帰させることが可能となると考えられる。このように、観察された異常状態より、その異常を引き起こした原因を探索する手法を診断と呼んでいる。

現在のバイオプロセスでは、異常の診断などの高度な判断を必要とする過程は、熟練者と呼ばれる人間が行っており、自動化がされているとは言い難い。しかし、近年の計算機技術の進歩により、診断などの高度な判断さえも計算機によって行う研究がされている。これは、熟練者より取得した知識を知識ベースとして与えることにより、熟練者の思考を

模倣するシステム、すなわちエキスパートシステム[13), 24), 42), 49), 50), 62)]が開発されたことによる。エキスパートシステムは、熟練者より抽出した知識ベース[41), 42)]、知識ベースを用いて推論を行う推論エンジン[53)]、および、推論結果の入出力・知識の入力などの際に使用するユーザインターフェイスから成り立っている。通常の場合、推論エンジンは与えた知識に応じて様々な推論が可能となるように設計されている、しかし、推論エンジンの推論手法によって推論に得意・不得意が生じ、異常診断用推論エンジンを持つエキスパートシステムは、バイオプロセスの異常診断や機械の異常診断に使用することは可能でも、設計の分野では役立たないことが多い。従って、行いたい推論に適したエキスパートシステムを設計・選択する必要がある。

本研究では、菌体濃度、基質濃度、生産物濃度、および、副生産物濃度がオンラインで測定可能な系を用いて、比増殖速度、比基質消費速度、比生産速度、および、比副生産物生成速度を推定し、これら比速度の値を指標にしてプロセスの異常を検出し、さらに、異常の原因の探索が可能なバイオプロセス異常診断システムの構築を試みた。システムはバイオプロセスの異常診断に特化したものを設計し、オブジェクト指向[68), 72), 84)]環境であるSmalltalk[11)]を用いてプログラムし、乳酸発酵プロセスを例に取りその評価を行った。

第２節　実験方法

２．１　菌株および培地

乳酸菌（*Lactobacillus casei*）をロゴサ培地により培養し、培養液をセラムチューブに分注後、液体窒素により凍結した。凍結した培養液を種菌とし、ロゴサ培地を用いて静置培養を行い前培養とした。得られた前培養液を、ＣＳＬ培地を入れた発酵槽に植菌し、本培養を行った。用いた培地を次ページの表１に示す。

２．２　オフライン実験

乳酸発酵プロセスは、３ｌ容の発酵槽に２ｌのＣＳＬ培地を仕込み、１２４℃において２０分間殺菌・放冷後、前培養液を植菌した。植菌の際に、前培養条件が本培養に与える影響[55)]を調べるため、植菌量、および、前培養時間を変化させて実験を行った。また、ｐＨ、温度、および、撹拌回転数は、センサーおよびコントローラにより計測・制御した。設定値は、各々、６．５、３５℃、１５０ｒｐｍである。さらに、３０分毎にサンプルを取得し、濁度法により菌体濃度を、酵素法により生産物である乳酸とグルコースの濃度を

測定した。また、必要に応じて１００ｍｌの培地を仕込んだ５００ｍｌの３角フラスコを用いて、様々な条件検討を行った。

２．３　オンライン実験

オンライン実験は、３０ｌ容の発酵槽を用い、２０ｌのＣＳＬ培地により培養を行った。１２１℃において蒸気殺菌した後、放冷し、前培養液を植菌した。また、菌体濃度をオンラインレーザー濁度計により、基質・生産物濃度を高速液体クロマトグラフィーによりオンラインで測定した。さらに、ｐＨ、温度、および、撹拌回転数は、プロセスコントローラにより、各々、６．５、３５℃、および、２００ｒｐｍに制御した。また、３０分毎にサンプルを取得し、濁度法を用いて菌体濃度を測定した。

表１　使用した培地の組成

培地成分	濃度		
	Rogosa培地	CSL培地	
ペプトン	10.0		g/l
イーストエキス	5.0		g/l
トリプトース	3.0		g/l
K_2HPO_4	3.0	1.0	g/l
KH_2PO_4	3.0	1.0	g/l
クエン酸アンモニウム	2.0		g/l
Tween 80	1.0		ml/l
酢酸ナトリウム３水塩	1.7		g/l
システイン塩酸塩	0.2		g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.575		g/l
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	34.0		mg/l
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0.12	0.08	g/l
グルコース	20.0	25.0	g/l
CSL		20.0	g/l

第３節　システム構成

構築したシステムは、発酵槽、センサーシステム、プロセスコントローラ、上位制御システム、ファジィエキスパートシステム[27), 34)]、および、それらを接続するインターフェ

イスシステム[76]から成り立っている。システムのハードウエア構成を図１に示す。

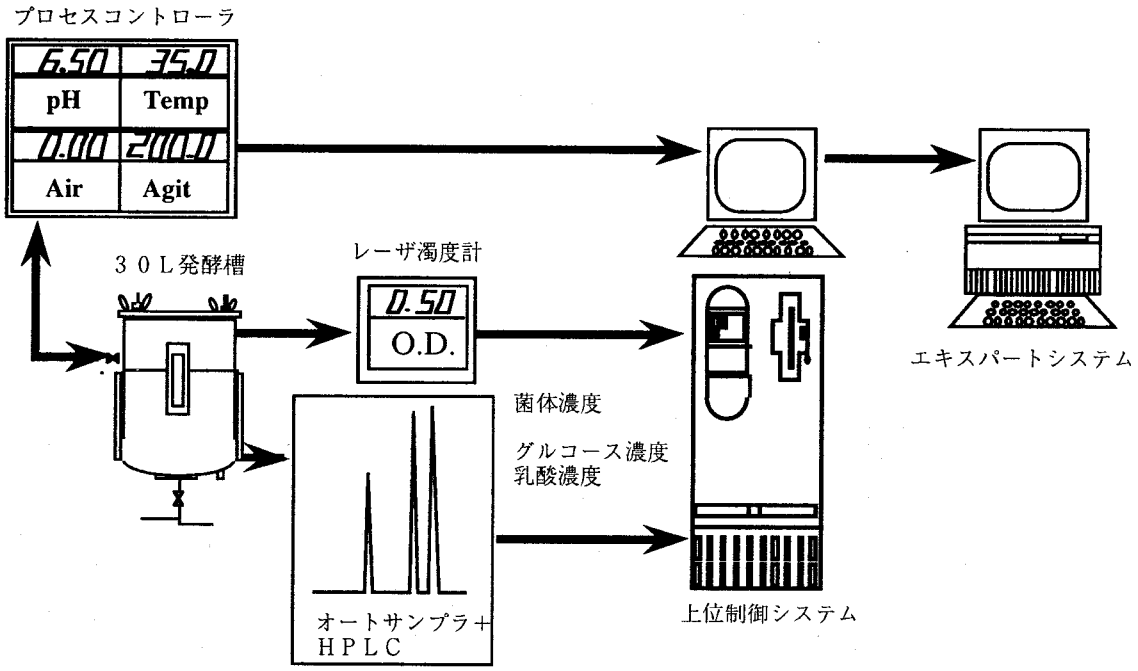


図１　バイオプロセス異常診断システムの構成

発酵槽に付設したセンサーシステムにより、ｐＨ、温度、撹拌回転数、菌体濃度、基質濃度および生産物濃度を測定し、プロセスコントローラによりｐＨ、温度、撹拌回転数が制御されている。また、ＵＮＩＸワークステーション上に構築した上位制御システムは、プロセスコントローラから測定値を受け取り、一定時間間隔（２０分）で測定値の平均を計算・記録し、実時間で比速度の計算、および、フィルタリング[75),82),83)]を行う。上位制御システムで計算された比速度、および、生データは、パーソナル計算機上でSmallTalk/Vを用いて作成したファジィエキスパートシステムに転送され、それらの値と、知識ベースに格納された知識を基にして、発酵槽内の状態を推定する。

第４節　ファジィエキスパートシステム

エキスパートシステムは、対象とする問題領域の専門的知識を利用して推論を行い、専門的に高度な問題の解決に関して専門家（エキスパート）と同等の能力を持つことを目標とする知的問題解決システムである。見方を変えれば、人間の持つ全ての知識を取り扱うことが可能な計算機を作成することは、ハードウエア、ソフトウエア、および記述する人

間の知識が膨大なものとなり、現在の技術では現実的ではないが、専門分野に範囲限定することにより、現状の計算機の能力である程度の知的判断機構を有するシステムの構築が可能であると言える。また、従来の計算機ソフトウエアが手続き中心であることと対照的に知識を中心としてシステムが設計されている。一般的にエキスパートシステムは、熟練者の知識を格納している知識ベース、知識ベース内の知識を用いて様々な推論を行う推論エンジン、および、推論結果の提示などを行うユーザーインターフェイスから成り立っている。また、推論エンジンは汎用性を持つように設計されており、知識ベースに与える知識に応じた推論が可能である。このため、汎用性を持つ推論エンジンとユーザインターフェイスを特にエキスパートシステムを作成するためのツールとして、エキスパートシステムシェルと呼ぶことが多い。我々の作成したファジィエキスパートシステム[27),34)]は、推論エンジン、知識ベース、データベース、および、ユーザーインターフェイスから成り立っているが、データベースは、知識ベースの一部として考えることができるため、一般のエキスパートシステムとほぼ同様の構成になっている。また、本研究で構築した推論エンジンは、ファジィ推論が可能な設計をしているため、特にファジィエキスパートシステムと呼んでいる。

4．1　知識表現手法・推論手法の検討

ファジィエキスパートシステムを構築する際に、知識表現手法と推論手法に対して検討を加えた。エキスパートシステムは、知識ベースに与えた知識に応じて様々な推論が可能となるように設計されているが、推論手法によって推論できる範囲が限られるため、目的とするバイオプロセスの状態認識に適合した推論手法を選択しなければならない。また、推論手法は、知識表現手法と密接な関連があり、推論手法に適した知識表現を用いなければ、推論の効率が大きく低下する。また、本研究では、ファジィエキスパートシステムの構築にパーソナル計算機を使用したため、計算機資源に限りがあり、多大なメモリや計算速度を必要とする推論手法や知識表現手法を選択することができない。利用可能な、計算機資源を以下に示す。

ＣＰＵ	６８０３０＋６８８８２（２５ＭＨｚ）
実メモリ	８ＭＢ
仮想メモリ	８ＭＢ
環境	マックＯＳ　６．０．７

また、本研究では、熟練者の知識を用いることを仮定しているため得られる知識構造を表現し易い表現手法を用いる必要性があった。そこで、熟練者のよく用いる知識表現を検討したところ、”もし、ｐＨが少し低いときには、培養条件が悪く、さらに、菌体増殖が悪くなる。”といったような事実間の因果関係が多く用いられていることが判明した。また、”少し低い”などの表現は、比較する対象として”標準時の値”を暗黙の内に必要としている。そこで、事実間の因果関係の表現にエキスパートシステムで一般的に用いられている”ＩＦ－ＴＨＥＮ　Ｒｕｌｅ”を、事実を表すために”フレーム[30]”を、標準時の値を定義するためにデータベースを、さらに、”少ない”、”少し多い”、”非常に高い”など、定性的な表現を取り扱うためにファジィメンバーシップ関数を用いることにした。

フレームは人間の持つ知識構造を表現するためにミンスキーによって提案されたもので、静的な知識とともに動的な知識構造を表現することが可能である[Appendix]。本研究では、バイオプロセスで起こり得る事実や現象を表現するためにフレームを用いている。また、フレームを効率よくプログラムするために、オブジェクト指向環境であるSmallTalk/Vを開発言語として選択した。これは、SmallTalk/Vが言語体系自体に継承（inheritance）の概念を有しており、上位フレーム持つ性質を下位フレームに継承することを無理なく記述できるためである。構築したファジィエキスパートシステムで用いたフレームの階層構造を以下に示す。ここで定義したクラスの中で、ＲｕｌｅＮｏｄｅ、および、ＲｕｎＮｏｄｅは、それに含まれるフレームに共通の性質を定義するための仮想的なフレームであり、現実の知識ベースの中に直接存在していない。また、他のフレームはバイオプロセスで起こり得る事実や現象を記述するために定義した抽象的なフレームであり、具体的な現象などはこれらの下位フレームとして知識ベースの中で定義される。フレーム間の階層構造と各フレームの持つスロットを以下に示す。なお、フレームの階層構造は、段下げがされているフレームがその直前のフレームの下位フレームであることを表している。

フレームの階層構造

ＲｕｌｅＮｏｄｅ
　ＡｎｄＮｏｄｅ
　ＯｒＮｏｄｅ
　　ＥｎｄＮｏｄｅ
　ＲｕｎＮｏｄｅ
　　ＡｃｔｉｏｎＮｏｄｅ
　　ＳｔａｒｔＮｏｄｅ

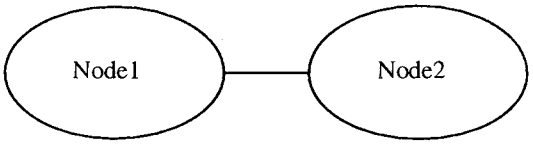


図２　因果関係のグラフィック表示

スロット

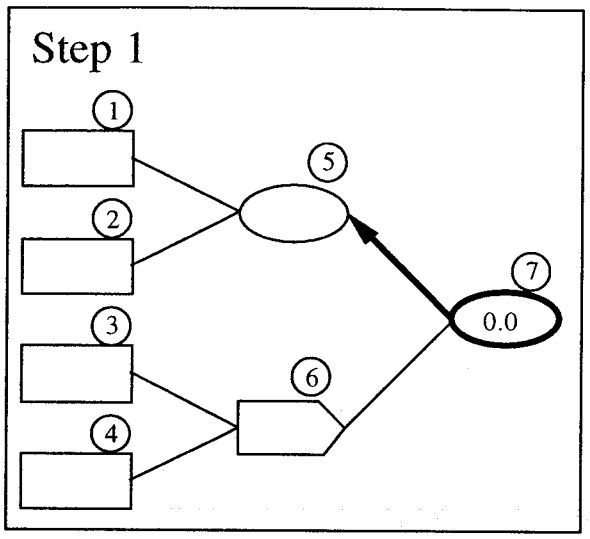
ｆａｃｔ	バイオプロセスで起こり得る事象や現象を表す。
ＩｎＮｏｄｅ	ｆａｃｔで示された現象を引き起こす原因を示す。
ＯｕｔＮｏｄｅ	ｆａｃｔが起こった結果引き起こされる現象を示す。
ｔｒｕｔｈ	ｆａｃｔが起こっている蓋然性を表す

さらに、フレームを用いて表現した事実や現象の間に存在する因果関係の入力と理解を容易にするために、ＩｎＮｏｄｅとＯｕｔＮｏｄｅの値をグラフィックを用いて計算機上で表示した。例を図２に示す。図２でＮｏｄｅ１とＮｏｄｅ２の間の直線は、アークと呼んでおり、Ｎｏｄｅ１のスロットＯｕｔＮｏｄｅの値がＮｏｄｅ２であり、Ｎｏｄｅ２のスロットＩｎＮｏｄｅの値がＮｏｄｅ１であることをグラフィックで表現したものである。すなわち、Ｎｏｄｅ１の事実が起こったことが原因となって、Ｎｏｄｅ２の現象が引き起こされることを示している。

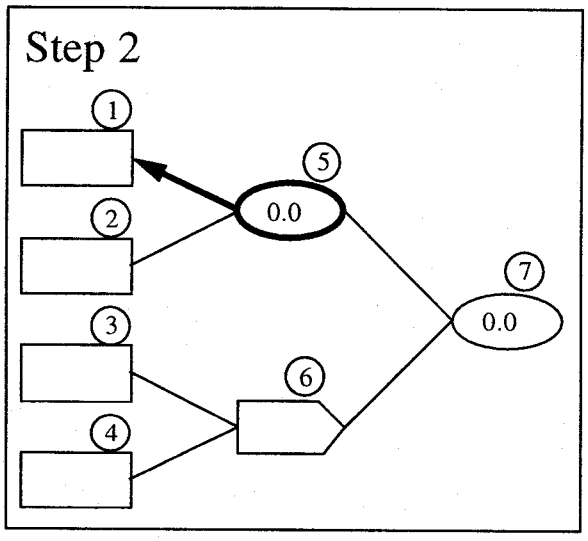
これらを用いて表現された知識を取り扱い、バイオプロセスの状態認識をするための推論手法として、バックワードチェイン法を選択した。バックワードチェイン法は、異常診断に適した方法としてよく用いられる後ろ向き推論[63)]の一種であり、事実間の因果関係を結果から原因に逆上ることで推論を行う。バックワードチェイン法のアルゴリズムを図式化したものを以下に示す。なお、アルゴリズムの説明と図が分離することと、説明が煩雑になることを防ぐため、説明を図の横に置き、さらに、本章で用いている図番ではなく、ルゴリズムアのステップにより各図を表記する。なお、説明文中で登場するデーモン（Ｄａｅｍｏｎ）は、フレームを用いた推論で何らかの条件が満たされたときに、自動的にシステムが起動するプロセスである[Appendix]。例えば、’Ｉｆ－ＮｅｅｄｅｄＤａｅｍｏｎ’は、何らかの値を必要としたときにその値を計算するためにシステムによ

り起動されるプロセスを示している。

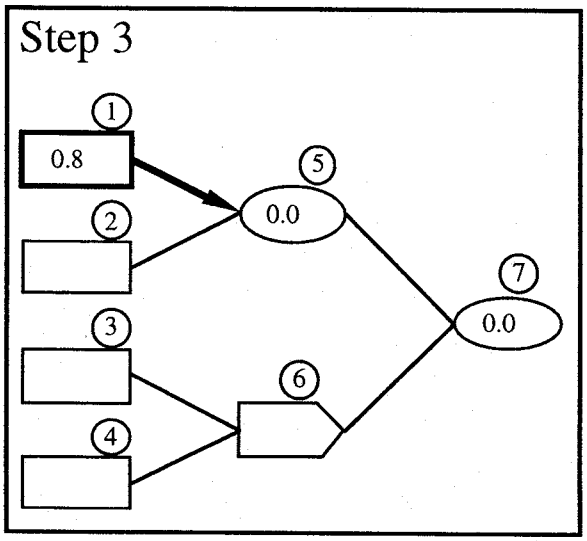
なお、図中でノード（７）はＥｎｄＮｏｄｅ、（１）～（４）はＳｔａｒｔＮｏｄｅ、（５）はＯｒＮｏｄｅ、および、（６）はＡｎｄＮｏｄｅであるとし、ノード（７）が表している異常が発生したと仮定する。また、ノード（１）～（４）の示す事実が起こっている蓋然性は、各々０．８、０．７、０．６および０．０であるとする。



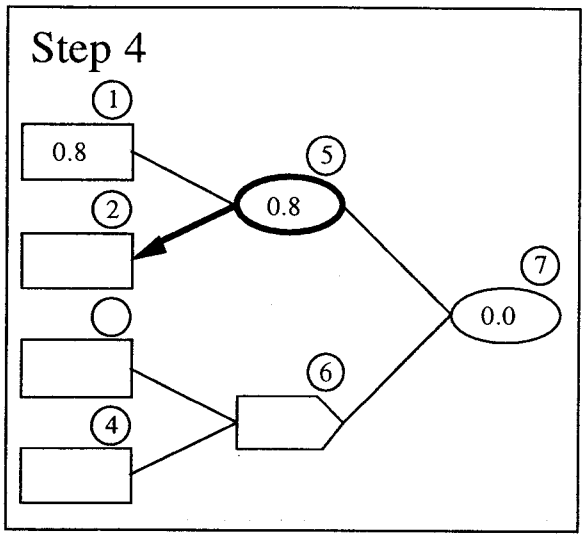
バックワードチェイン法では、推論エンジンはまず、起こっている蓋然性がある全てのＥｎｄＮｏｄｅに対して、バックワードチェインのメッセージを発生する。メッセージを受け取ったノード（７）は、自らの示す事実が起こっている蓋然性を求めるメソッド(Ｉｆ－Ｎｅｅｄｅｄ　Ｄａｅｍｏｎ)を起動する。Ｄａｅｍｏｎは、自身の確からしさの値を初期化し、ＩｎＮｏｄｅｓで示される原因を表すノードに対してバックワードチェインのメッセージを渡す。なお、ＥｎｄＮｏｄｅは、ＯｒＮｏｄｅの一種であるため初期値として０を用いる。



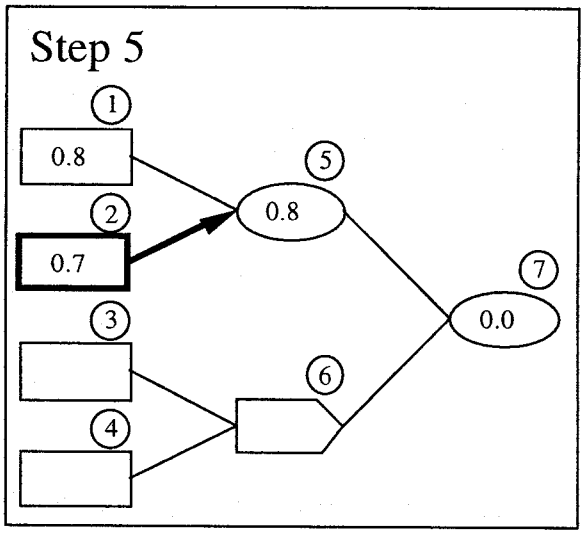
バックワードチェインのメッセージを受け取ったノード（５）は、そのノードの事実が起こっている確からしさを求めるメソッドであるＩｆ－Ｎｅｅｄｅｄ　Ｄａｅｍｏｎを起動し、ＯｒＮｏｄｅの確からしさの初期値である０を代入後、ＩｎＮｏｄｅｓの１つであるノード（１）にバックワードチェインのメッセージを発生する。



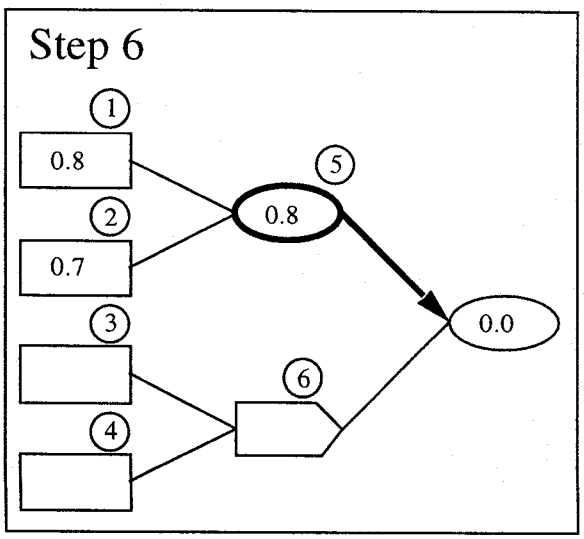
バックワードチェインのメッセージを受け取ったノード（１）は、自らの示す事実が起こっている蓋然性を求めるメソッドであるＩｆ－Ｎｅｅｄｅｄ　Ｄａｅｍｏｎを起動する。Ｄａｅｍｏｎは、ファジィメンバーシップ関数とそのときの測定値より、ノード（１）の示す事実が起こっている蓋然性を計算する。さらに、ノード（１）は、バックワードチェインのメッセージを送信したノード（５）に自身の蓋然性を渡す。



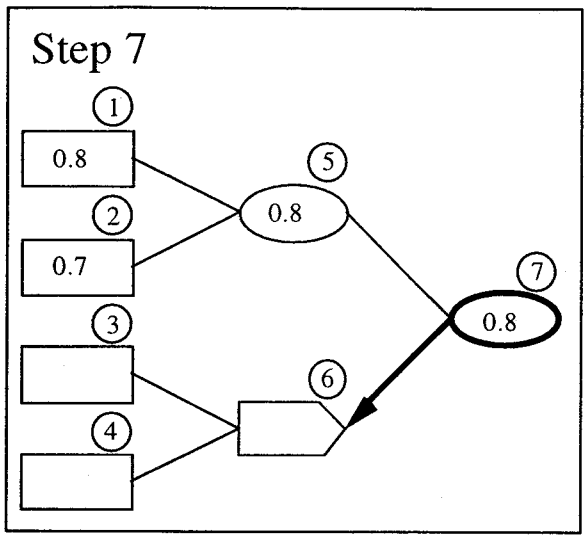
ノード（１）の起こっている蓋然性を受け取ったノード（５）は、自身の持つ蓋然性の値とノード（１）より受け取った蓋然性より、ファジィ演算により自身の蓋然性の値を更新する。ＯｒＮｏｄｅであるノード（５）は、ＦｕｚｚｙＯｒ演算により、新たな蓋然性の値を計算する。なお、本研究では、ＦｕｚｚｙＯｒ演算を、両者の最大値として定義した。さらに、ノード（５）は、まだ探索していないＩｎＮｏｄｅｓの示すノード（２）にバックワードチェインのメッセージを渡す。



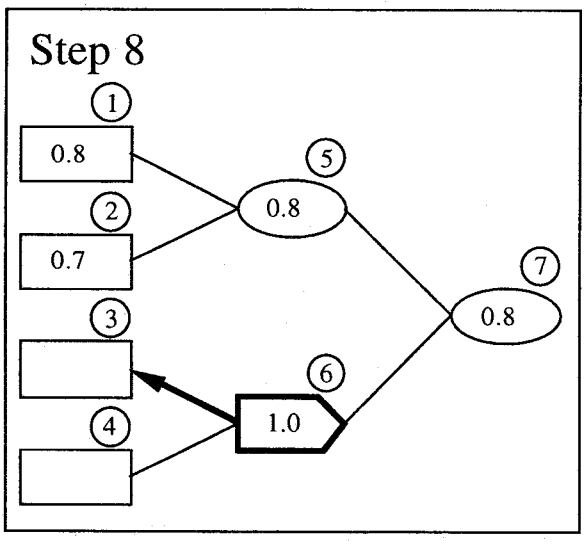
ノード（２）は、ノード（１）と同様に自身の示す事実が起こっている蓋然性を算出し、ノード（５）にその値を返す。



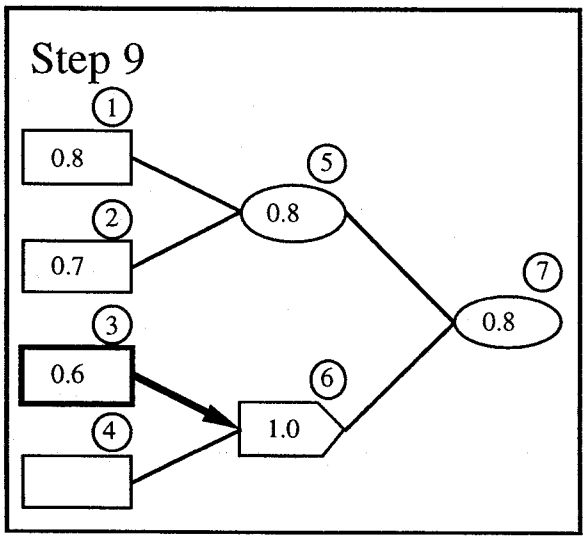
ノード（５）は、ノード（２）より受け取った蓋然性の値と、自身の持つ値より、新しい蓋然性の値をＳｔｅｐ４と同様にファジィ演算により算出する。さらに、ノード（５）の原因となるノードの探索が全て終了したため、最終的に自身の持つ蓋然性の値をノード（７）に返す。



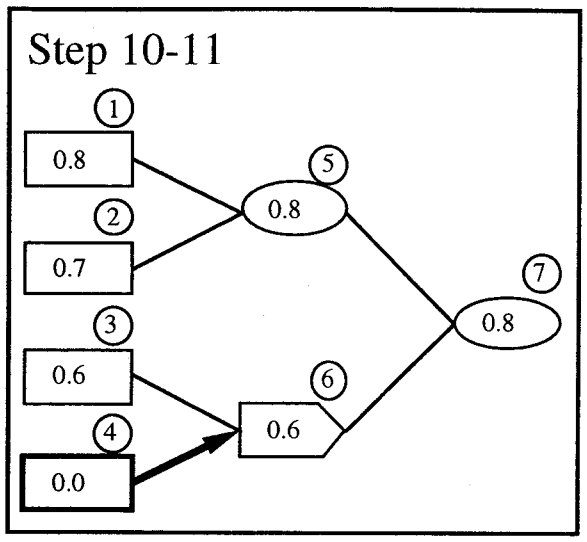
ノード（７）は、ノード（５）より受け取った蓋然性の値と自身の蓋然性の値より、新しい蓋然性をファジィ演算により算出する。ノード（７）は、ＯｒＮｏｄｅの一種であるため、０．０と０．８の最大値である０．８を新しい蓋然性の値とし、探索の済んでいないノード（６）にバックワードチェインのメッセージを発行する。



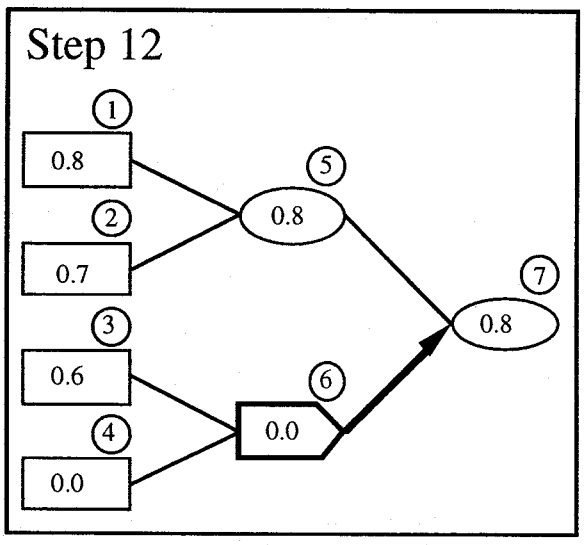
バックワードチェインのメッセージを受け取ったノード（６）は、そのノードの事実が起こっている蓋然性を求めるＩｆ－Ｎｅｅｄｅｄ　Ｄａｅｍｏｎを起動する。Ｄａｅｍｏｎは、ノード（６）にＡｎｄＮｏｄｅの確からしさの初期値である１．０を代入後、ＩｎＮｏｄｅｓの１つであるノード（３）にバックワードチェインのメッセージを発生する。



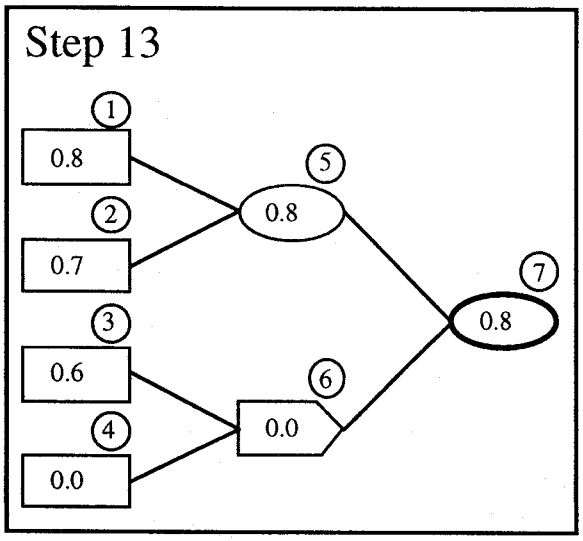
ノード（３）は、ノード（１）と同様に自身の示す事実が起こっている蓋然性を算出し、ノード（６）にその値を返す。なお、ノード（３）の事実が起こっている蓋然性を０．６と仮定する。



ノード（６）は、自身の持つ蓋然性の値である１．０とノード（３）より得られた０．６より、新たな蓋然性の値をファジィ演算により算出する。ノード（６）は、ＡｎｄＮｏｄｅであるため、両者の最小値である０．６を新しい蓋然性とする。さらに、未探索のノード（４）にバックワードチェインのメッセージを発行し、ノード（４）よりノード（４）の事実の起こっている蓋然性の値を受け取る。



ノード（４）より受け取った値と現在の値より新たな蓋然性の値を計算し（０．０）、ノード（７）に返す。



ノード（７）は、自身の蓋然性の値である０．８と受け取った０．０より自身の蓋然性を計算する。この場合、両者の最大値０．８が最終的に得られるノード（７）が起こる蓋然性として決定される。

バックワードチェイン法により、観察された事象であるノード（7）の原因として考えられる全てのノードが探索され、かつ、それらのノードの示す事実が起こっている蓋然性の値が得られる。さらに、、ノード（1）、（2）、（5）で、構成される小さなネットワークに注目すると、ノード（1）の事象が0．8の蓋然性で起こっており、かつ、ノード（2）の事象が0．7の蓋然性で起こっており、その結果として、ノード（5）の事象が0．8の蓋然性で起こっていると考えられることが示されている。このように、ＥｎｄＮｏｄｅの蓋然性を求める過程で、中間にある各ノードの蓋然性の値も同時に得られるメリットがある。

さらに、知識ネットワークに新たな知識を追加する場合を考える。図3で元の知識と表記されたネットワークに新たなネットワークを加えた場合、新たな知識を加えたことにより蓋然性の値が影響を受けたのは、図3でB，Cの2つのノードだけであり、他のノードは、影響を受けていないことがわかる。これは、既存のネットワークに新しい知識を加える場合に、加える知識と直接因果関係がない部分には影響を与えないことを表している。これにより、知識を加える際に、オペレータがネットワーク全体を考えずに済み、労力が削減できるものと考えられる。

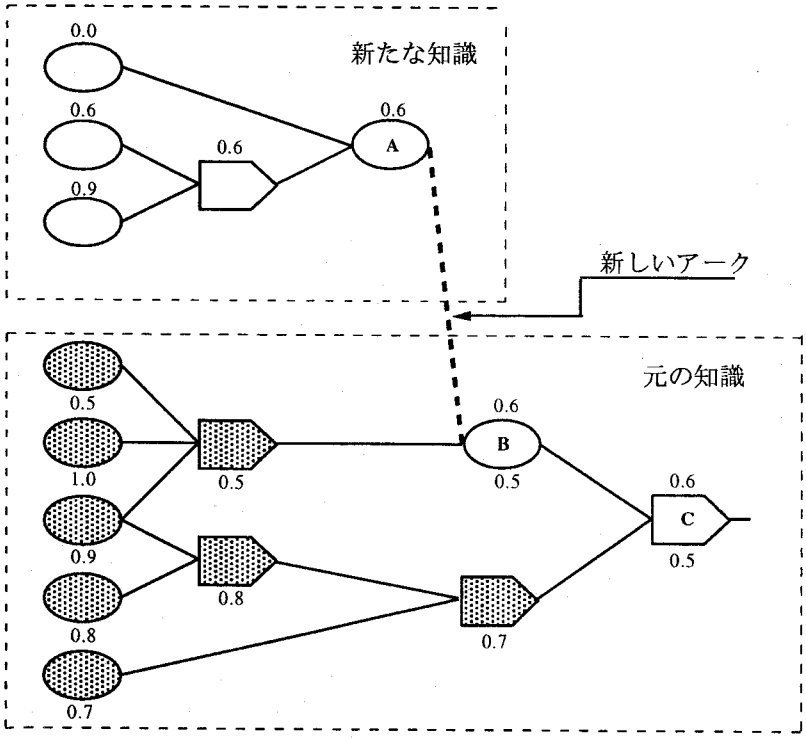


図3　知識ネットワークへの新しい知識の追加

４．２　データベース

乳酸発酵プロセスに生じた異常を検出するために、データベース[7]を構築した。データベースには、過去の正常なプロセスより得られた比速度の経時変化を記録する。また、実際のプロセスより得られるデータはノイズを含むため、３次のＢ－Ｓｐｌｉｎｅ[37),80)]を用いて平滑化した。さらに、オンラインでの比速度の推定は、ＩＩＲ型デジタルフィルター[82)]を用いており、フィルターの特性により信号に遅れが生ずる。そのため、平滑化したデータを、デジタルフィルターで処理し、故意に遅れを持たせ、さらに、微分を行って、比増殖速度、比消費速度、および、比生産速度を算出した。

また、実データに含まれるノイズの影響を考慮して、標準の比速度の経時変化に対して、各比速度の測定に含まれるノイズの大きさに比例した範囲を正常領域として定義し、その範囲を超えるデータを異常なデータであるとした。これより、オンラインで測定した比速度の値と、データベースに記録されている正常領域を比較し、測定値が正常範囲を逸脱したときにプロセスに異常が生じたと判断させた。

第５節　結果および考察

異常を引き起こす原因として植菌量と殺菌時間を選択し、様々な植菌量を用いて乳酸発酵を行い、植菌量、および、殺菌時間がプロセスに与える影響を調べた。用いた条件を表２に示す。なお、標準条件としてオフライン実験においては、植菌量１００ｍｌ、殺菌時間２０分を選択し、オンライン実験においては、植菌量５００ｍｌ、殺菌時間２０分を選択した。

表２　乳酸発酵プロセス実験条件

オフライン		オンライン	
植菌量	殺菌時間	植菌量	殺菌時間
７５	２０	４００	２０
８０	２０	５００	２０
１００	２０	７５０	２０
１２５	２０		
１００	１０		
１００	３０		

２ｌジャーファーメンタを用いたオフライン実験の結果を図４に示す。これより、菌体増殖は、植菌量に依存して変化することが判明した。植菌量が少ない培養では、培養の初期において菌体増殖が標準条件の培養とほぼ同一であるが、培養中期で菌体増殖が急に停止することが判明した。さらに、植菌量が多い培養では、培養の中期において菌体増殖速度が標準のプロセスより高くなり、最終菌体濃度が高くなることが示唆された。また、基質消費速度、生産速度も菌体増殖と同様の傾向を示すことが判明した。

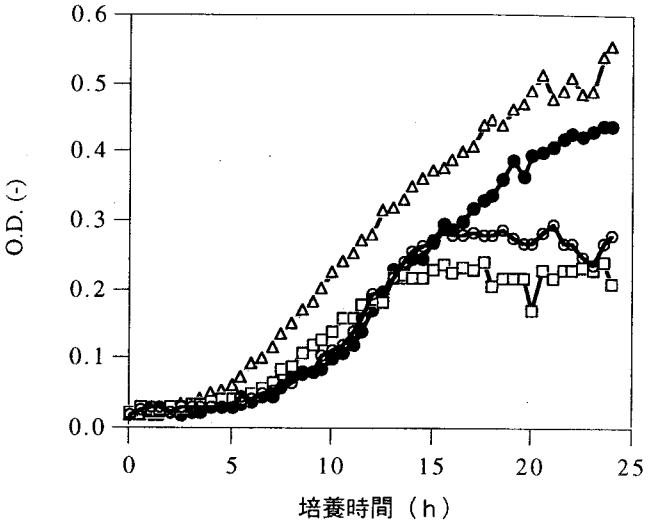


図４　植菌量が乳酸発酵プロセスに与える影響
□７５ｍｌ、○８０ｍｌ
●１００ｍｌ、△１２５ｍｌ

さらに、殺菌時間を変化させて実験を行った結果を図５に示す。これより、殺菌時間は、菌体増殖、基質消費、および、乳酸生産に影響を与えていないことが判明した。なお、殺菌時間が長いものほど培養開始時の基質濃度が低くなり、培地の色が濃くなることより、褐変が起こっていることが示唆された。

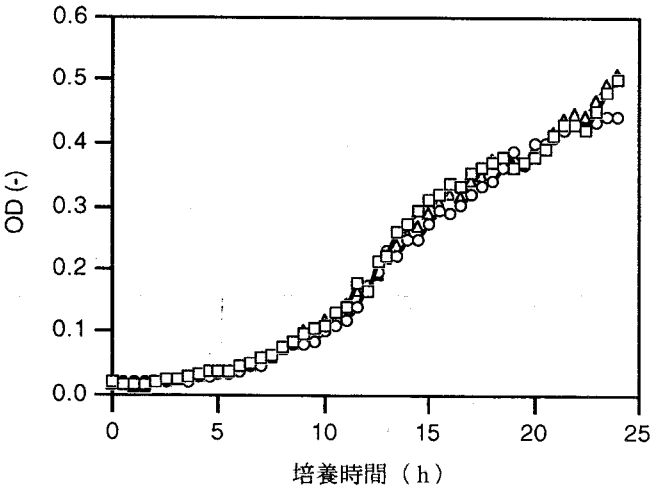


図５　殺菌時間が乳酸発酵プロセスに与える影響
□１０分、○２０分、△３０分

実験により得られた知識とバイオプロセスで一般的であると思われる知識を用いて知識ベースを作成した。作成した知識ベースの一部を図６に示す。なお、実験に用いた知識ベースは、約１００個のノードと約１００個の因果関係を含んでいる。

また、オンラインで異常を診断する際には、ノイズを除去するフィルターが不可欠であることが示唆されたため、フィルターに対して検討を加えた。本研究では、プロセスが異

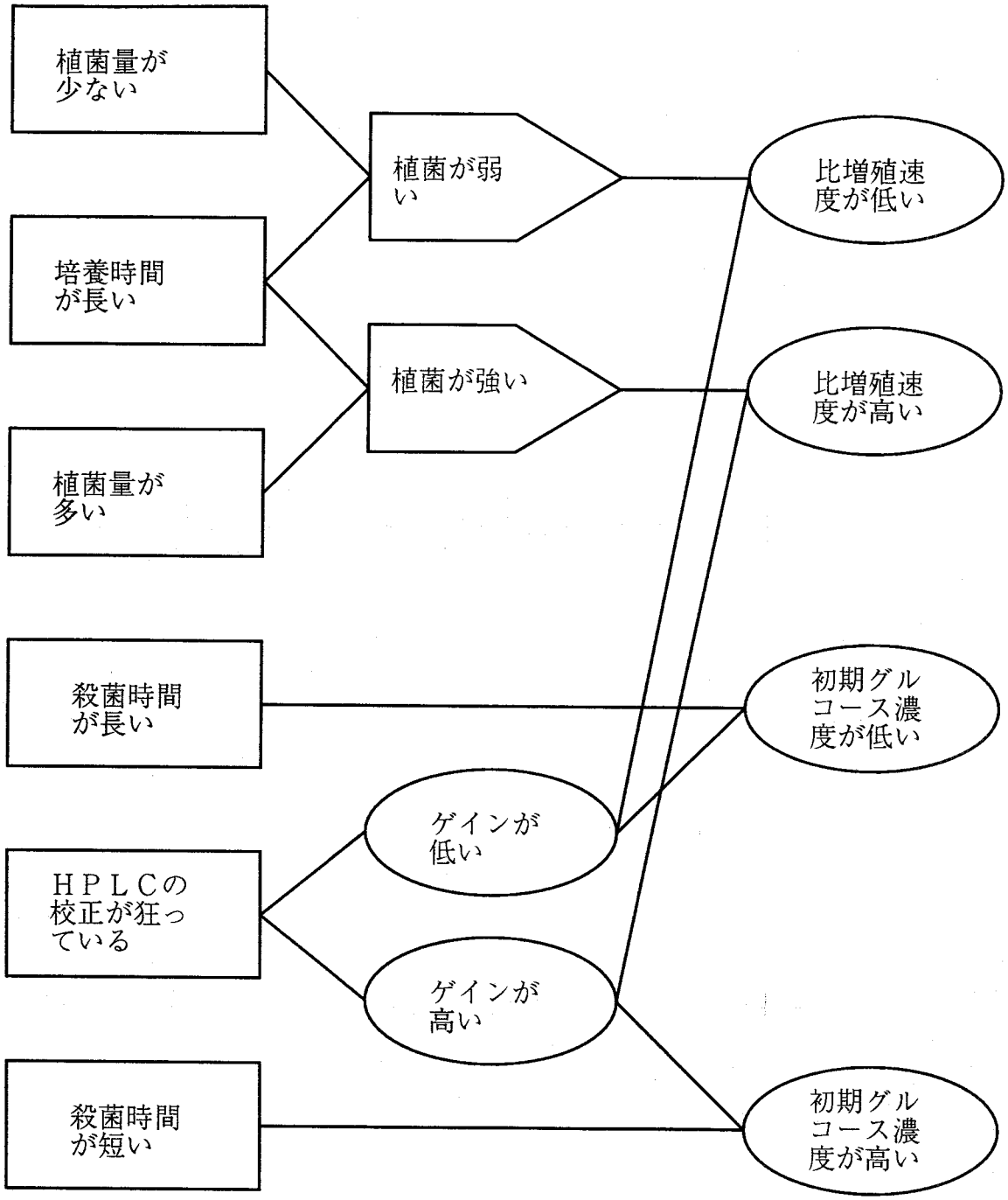

植菌量が
少ない
培養時間
が長い
植菌量が
多い
殺菌時間
が長い
ＨＰＬＣの
校正が狂っ
ている
殺菌時間
が短い
植菌が弱
い
植菌が強い
ゲインが
低い
ゲインが
高い
比増殖速
度が低い
比増殖速
度が高い
初期グル
コース濃
度が低い
初期グル
コース濃
度が高い

図６　知識ベースの一部

常を起こした場合を想定し、その診断を行うことを目的としており、カルマンフィルターなどの予測を用いるフィルターを使用することができなっかった。

従って、遅れを持つフィルターを用いる必要性があった。そこで、９０％応答時間が１２０分以内であるフィルターに対して検討し、ＦＩＲ[82]、ＩＩＲ型のデジタルフィルターを比較したところ、４次のＩＩＲフィルターが最も適していることが判明した。なお、フィルターの構成を図７に示す。

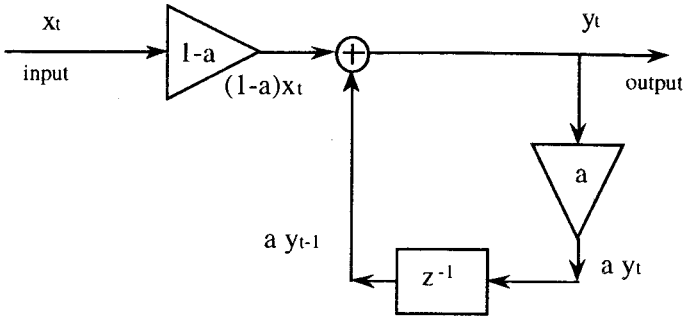


図７　ＩＩＲ型フィルターの構成

さらに、３０ｌジャーファーメンタを用いて標準条件で繰り返し実験を行い、各プロセス変数の時間変化をオンラインで記録した。また、実データに含まれるノイズを除去するため、３次のＢ－Ｓｐｌｉｎｅを用いて平滑化を行った。また、オンラインで得られる測定値はフィルターによる遅れを持っているため、平滑化したデータを、デジタルフィルターで処理し、故意に遅れを持たせ、さらに、微分を行って、比増殖速度、比消費速度および比生産速度を算出した。また、各比速度に含まれるノイズの大きさより、正常状態の領域の幅を決定し、標準のプロセスにおける比速度の経時変化とともにデータベースに格納した。データベースの一例を図８に示す。

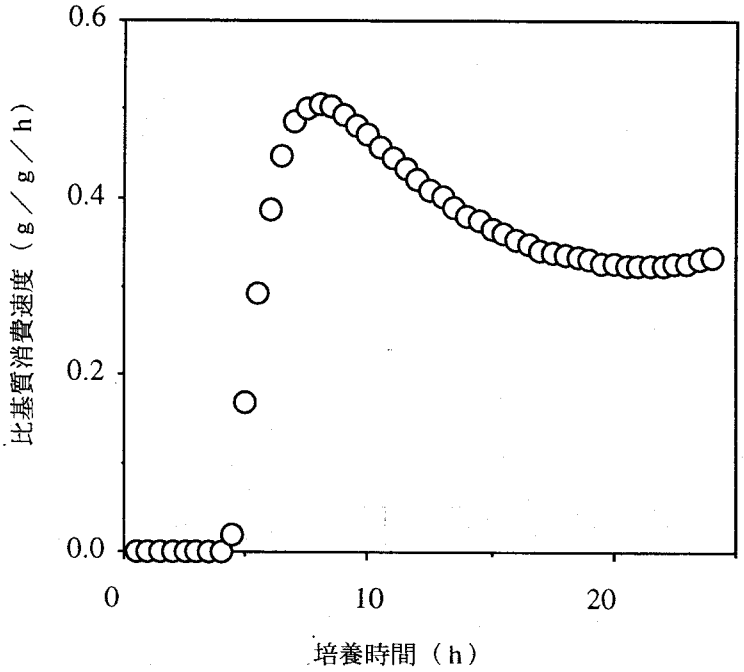


図８　データベースに格納した比基質消費速度の経時変化の例

知識ベース、データベース、および、ＳｍａｌｌＴａｌｋにより作成したエキスパートシステムシェルを用いてバイオプロセス異常診断システムを構築した。構築したシステムの模式図を図７に示す。異常診断システムは、ＲＳ２３２Ｃデバイスドライバ[76]を通じてオンラインで推定した比速度を受け取り、データベースに格納されている正常領域と比較

し、もし、正常領域を逸脱している場合には、バックワードチェイン法により知識ベースの探索を行い異常の原因を診断する。

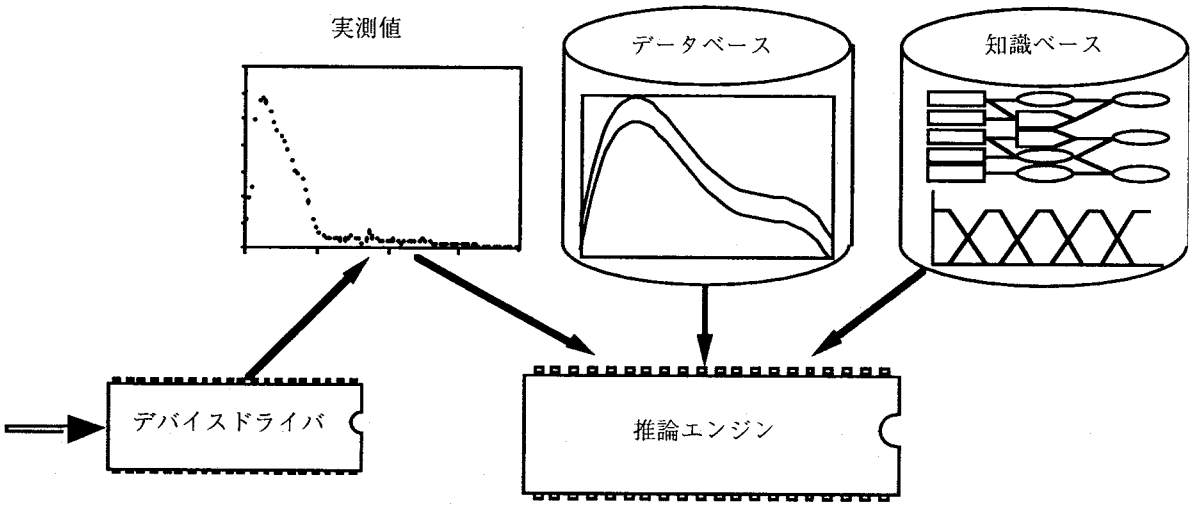


図９　異常診断システムの模式図

植菌量が標準のものより少ない条件で培養を行い、異常診断システムの評価を行った。結果を図１０に示す。異常診断システムは、図中矢印で示した時点でプロセスが異常であると判断し、その原因の探索を開始した。その結果、異常原因が植菌量であることを診断することが可能であった。また、探索に要した時間は約３０秒であった。なお、シミュレーション結果より、探索に最も時間がかかる場合でも１分以内に原因の探索は終了した。

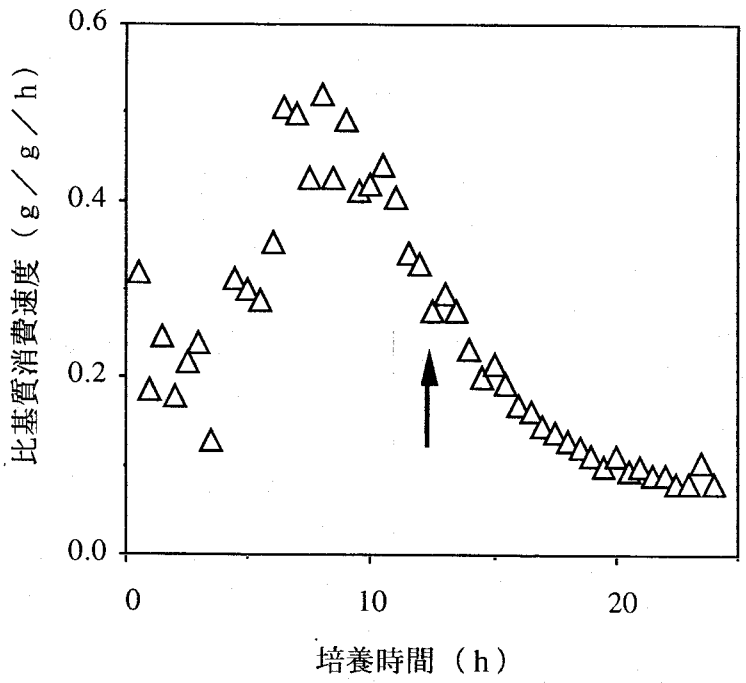


図１０　植菌量が少ない培養における比基質消費速度の経時変化

第6節　要約

オブジェクト指向環境であるＳｍａｌｌＴａｌｋ／Ｖを用いてファジィエキスパートシステムシェルをマッキントッシュ上に作成し、実験により得られた標準の比速度の経時変化を格納したデータベース、バイオプロセスに関する様々な知識を持つ知識ベースを与えることにより、ファジィエキスパートシステムシステムの構築を行った。また、バイオプロセスの測定に含まれるノイズの除去を行うため、ＩＩＲ型デジタルフィルターを作成し、オンライン測定可能な菌体濃度、基質濃度、生産物濃度より、比増殖速度、比基質消費速度、および、比生産速度をオンラインで推定し、ファジィエキスパートシステムと接続することにより、バイオプロセス異常診断システムを作成した。作成したシステムは、乳酸発酵プロセスの異常の検出、異常原因の探索を行うことが可能であった。

第　5　章

エキスパートシステムによる状態認識と認識した状態に応じた制御方策の決定

Mikio Nakajima

第1節　はじめに

第4章で述べたバイオプロセス異常診断システムは、熟練者の知識と過去のデータを基にして、バイオプロセスが異常状態であることを検出する機能と、異常を引き起こした原因の探索が可能であった。このシステムを拡張することにより、探索した異常原因に対する対応策がわかっている場合には、プロセスを異常状態から正常な状態へ復帰することが可能であると考えられる。

しかし、対応策の中には、プロセスが正常な状態である時に操作を加えることにより、逆にプロセスに悪影響を与える可能性のある場合も存在する。このような対応策は、プロセスが異常であることが確実でかつ異常原因が正しく推論されていることが確かな時を除き、実行すべきでないと考えられる。また、複数の異常原因が考えられ、かつ、それらの対応策が背反する場合などは、対応策の折衷案を作成するシステムが要求される[41)]。さらに、対応策の中には緊急に操作を加えなければ効果が得られない場合と、あまり緊急性を有しない場合が考えられる。

そこで、本章では、第4章で作成したバイオプロセス異常診断システムを拡張し、異常診断システムが認識した状態に対応した制御方策を知的に決定するバイオプロセス制御システムを構築することを目的とした。

第2節　実験方法

2．1　菌株および培地

第4章の同項目に同じ。

2．2　オフライン実験

方法は、第4章の同項目に同じ。

2．3　オンライン実験

方法は、第4章の同項目とほぼ同様であるが、エキスパートシステムが温度などのプロセスパラメータを変更することが可能である。

2．4　システム構成

構築したバイオプロセス制御システムのハードウエアの構成を図1に示す。異常診断システムでは、一方通行であったプロセスコントローラ・上位制御システム、上位制御シス

テム・ファジィエキスパートシステムの間の接続を両方向通信に切り替えた。これにより、ファジィエキスパートシステムで生成した制御方策を基に、プロセス変数を変更することが可能となる。

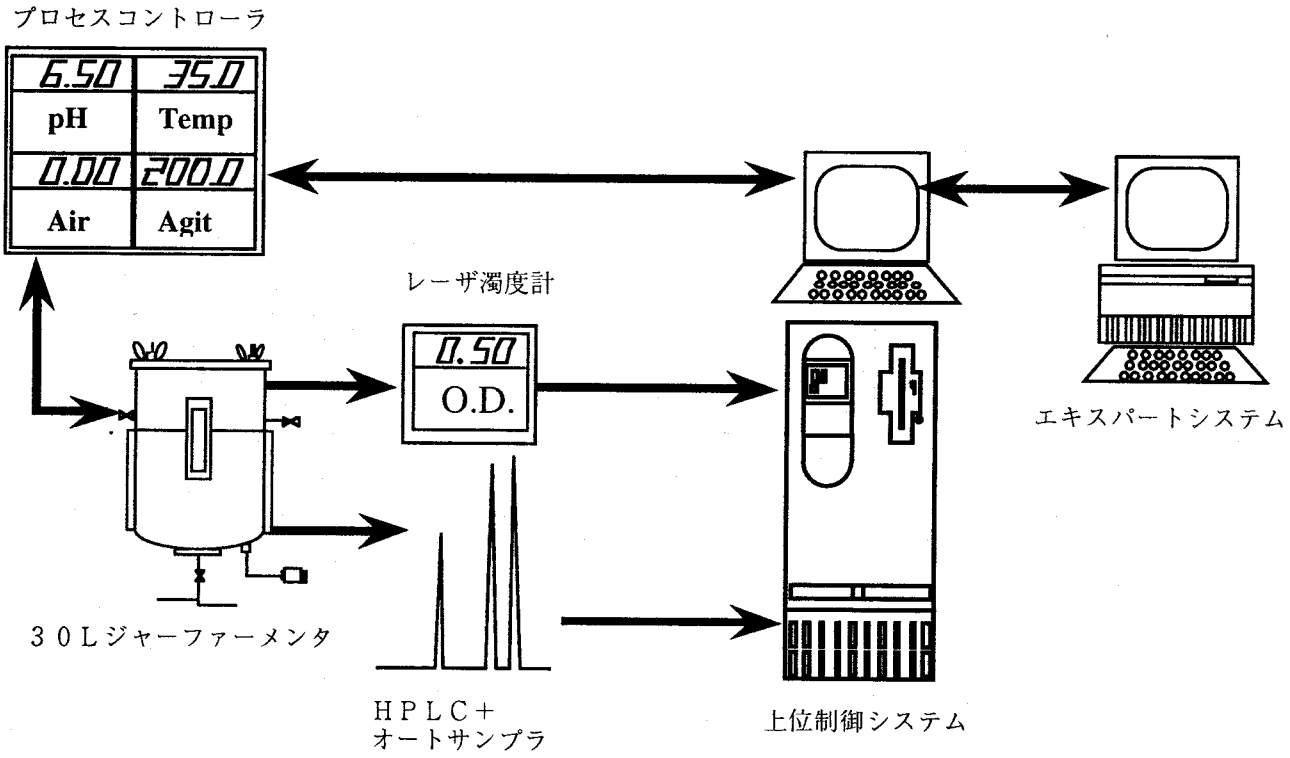


図１　バイオプロセス制御システムの構成

第３節　ファジィエキスパートシステム

第４章で開発したファジィエキスパートシステムに以下の拡張を加えた。

1．前向き推論法の一種であるフォワードチェイン法を新たに加え、推論できる異常原因の範囲を広げた。

2．プロセスの異常の検出にファジィ推論を用い、異常と正常の中間の状態を表現できるようにした。

3．比速度に含まれるノイズの大きさが、培養時期に応じて変化するため、正常領域の幅を培養時間に応じて切り替えることを可能にした。

4．推定した異常原因に対応した制御方策を出力できるようにした。

また、制御方策の決定を行う際に、制御方策の可逆性、緊急性を考慮した。

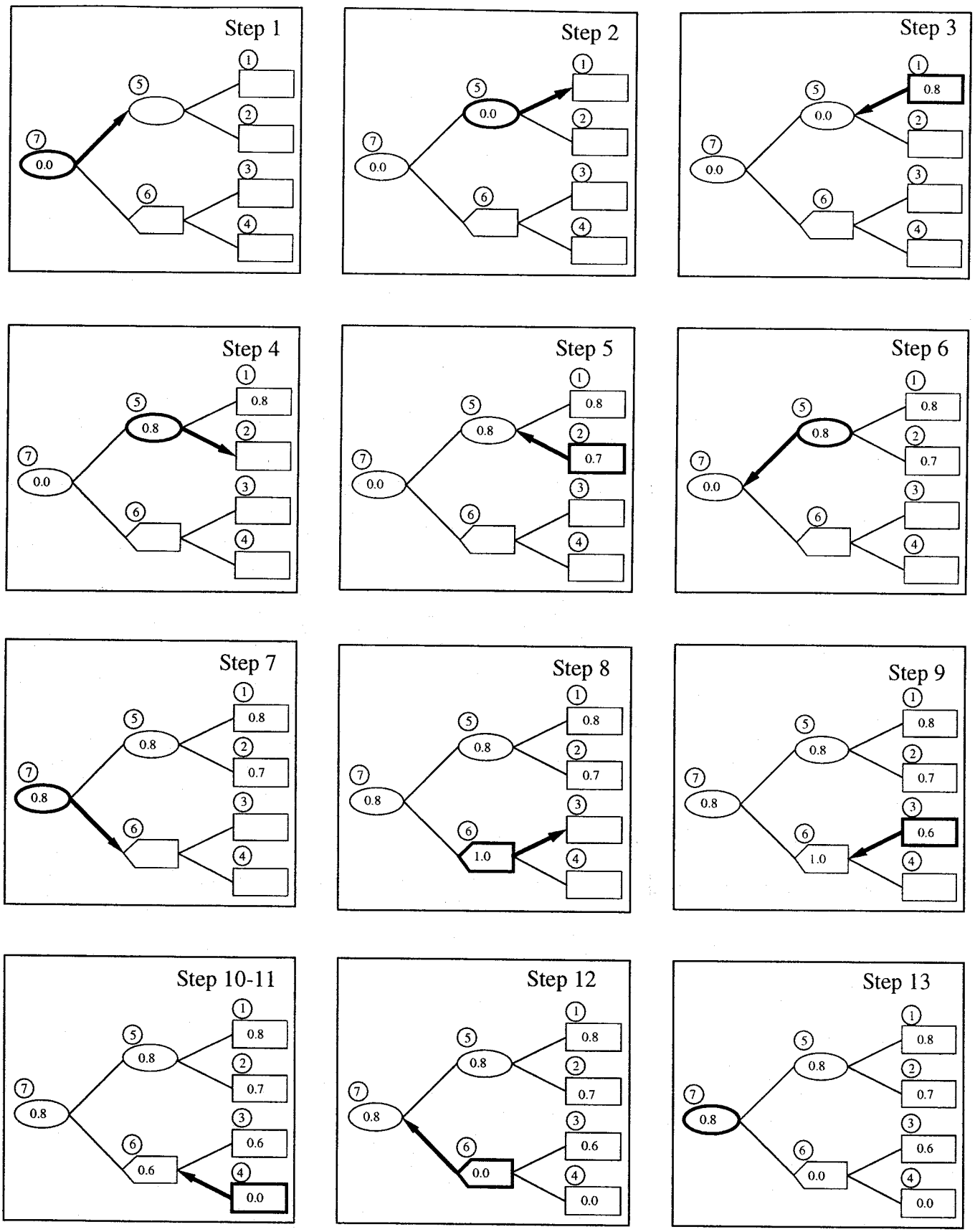


図２　フォワードチェイン法の動作原理

3．1　フォワードチェイン法

異常診断は前向き推論法[48]より後ろ向き推論法[63]が適しているとされているが、本研究では、前向き推論法の一種であるフォワードチェイン法を用いて、原因事象が観測できない場合の診断を行うことを検討した。前向き推論法は与えられた因果関係を使用して、原因から結果を推論する推論法であるが、原因となる事象が起こっていると仮定し、その結果引き起こされる現象を推論し、推論結果と現在の状態を比較することで、原因事象の起こっている蓋然性を算出することが可能である。フォワードチェイン法のアルゴリズムを図2に、またフォワードチェイン法で用いた雑菌汚染診断用ネットワークを図3に示す。なお、フォワードチェイン法のアルゴリズムは、前章で詳しく記述したバックワードチェイン法と逆にネットワークを辿る以外は同一であるため説明を省く。なお、図3で楕円は観測可能な事象であり、菱形はＦｏｗａｒｄＯｒＮｏｄｅ、５角形はＦｏｗａｒｄＡｎｄＮｏｄｅを表している。

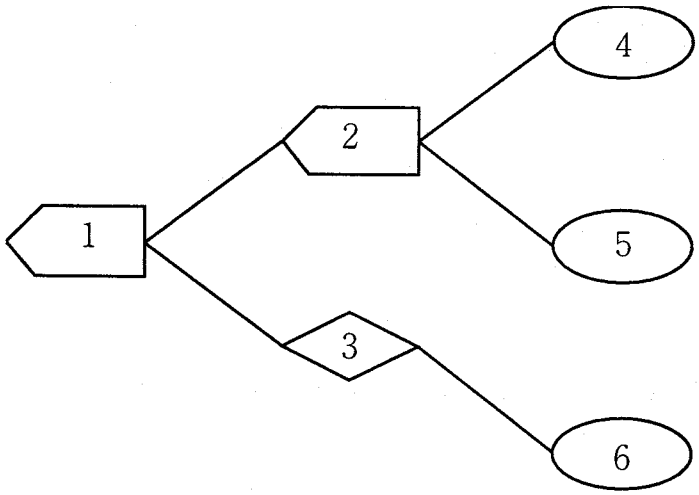


図3　前向き推論用知識

1：雑菌汚染、2：汚染菌は増殖が速い

3：汚染菌は目的生産物を生産しない

4：見かけの比増殖速度が高い

5：見かけの比基質消費速度が高い

6：見かけの比生産速度が低い

図3には、以下の1～3の知識が表現されている。

1）雑菌汚染が起こったときには、汚染菌は元の菌より増殖が速く、かつ生産を行わない。
2）元の菌より増殖の速い菌で汚染しているときには、見かけの比増殖速度と比基質消費速度が高くなる。
3）生産を行わない菌株で汚染したときには、見かけの比生産速度が低くなる。

図3のネットワークを用いてエキスパートシステムが算出する雑菌汚染の起こっている蓋然性は、下記の式で表される。

TV（2）＝FuzzyAnd（TV（4），TV（5））
TV（3）＝FuzzyOr（TV（6））
TV（1）＝FuzzyAnd（TV（2），TV（3））
　　＝FuzzyAnd（TV（4），TV（5），TV（6））
なお、ここでTVは、各々のノードの蓋然性の値を表している。

このアルゴリズムによるエキスパートシステムの推論を人間の行っている推論に翻訳すると以下のようになる。

もし　雑菌汚染が起こっている　ならば　汚染した菌は元の菌株より増殖が速いはずである。
もし　雑菌汚染が起こっている　ならば　汚染した菌は生産をしないはずである。
もし　汚染した菌が元の菌より増殖が速い　ならば　見かけのμが高いはずである。
もし　汚染した菌が元の菌より増殖が速い　ならば　見かけのνが高いはずである。
もし　汚染した菌は生産をしない　ならば　見かけのπが低いはずである。
しかし、現在μとνは高く、さらにπも高いため、最初の仮定が間違っていたと思われる。
従って、現在の状態を引き起こした原因は、雑菌汚染とは考えられない。

このような、推論を行うことで、雑菌汚染のように直接測定することができない事象に関しても、診断を行うことが可能となった。しかし、フォワードチェイン法で推論できない事象もある。例を以下に示す。

1）植菌量が多いとき、μ・ν・πの全てが高くなる。
2）前培養時間が長いとき、μ・ν・πの全てが高くなる。

これらの知識を基にフォワードチェイン法を用いて推論を行うと、μ・ν・πの全てが高い場合に、その原因が植菌量が多いためであるか、前培養時間が長いためであるかが判定できない。すなわち、フォワードチェイン法による異常診断は、その原因事象が引き起こす結果として観察される事象が、他の原因が引き起こす結果と異なっている必要がある。

本研究で用いた乳酸発酵プロセスにおいて、フォワードチェイン法を適用することが可能であった原因事象は、雑菌汚染と正常状態の２つであった。正常状態はμ・ν・πの全てが’ｎｏｒｍａｌ’である場合であり、この組み合わせは、他の原因では起こらない。また、雑菌汚染の場合の、μ＝’Ｈｉｇｈ’、ν＝’ｈｉｇｈ’、π＝’ｌｏｗ’の組み合わせも、他の原因では起こり得なかった。

３．２　異常検出のファジィ化

前章で作成した異常診断システムは、プロセスが異常であることの検出に状態変数の標準の経時変化と正常領域の幅だけを用いていたため、正常領域を少し越えただけで異常であると見なしていた。しかし、異常原因に対応する対処を行う制御システムでは、異常検出をファジィ化し、異常と正常の中間の状態を認識する必要性があると考え、比速度などの状態変数の経時変化と、正常領域の幅、中間領域の幅をデータベース[35]に格納した。また、比速度に含まれるノイズの大きさが、培養時期に応じて変化するため、正常領域の幅を培養時間に応じて切り替えた。

３．３　認識した状態に基づいた制御方策決定手法

ファジィエキスパートシステムを用いて認識したプロセスの状態に合わせた制御方策を決定する手法に対して検討を加えた。まず、個々の状態に対する制御操作を知識ネットワーク上に記述するために、ＡｃｔｉｏｎＮｏｄｅとＦｏｒｗａｒｄＡｃｔｉｏｎＮｏｄｅの２つのフレームを定義した。ＡｃｔｉｏｎＮｏｄｅは、バックワードチェイン法において、プロセスの現在の状態を引き起こしたと推論される根本的な原因に対する制御操作を記述することができ、ＦｏｒｗａｒｄＡｃｔｉｏｎＮｏｄｅはフォワードチェイン法に対する制御操作の記述に用いる。両者とも、内部に記述したＳｍａｌｌＴａｌｋ／Ｖのプログラムを直接実行する機能を持ち、それを利用して、上位制御システムにコマンドを送信している。上位制御システムに対する単位操作の記述には以下の３種を用い、これらを組み合わせることにより制御方策を記述している。

１．設定値

2．メッセージ

3．ＦｕｚｚｙＡｎｓｗｅｒ

上位制御システムは、設定値を受け取ると、対応するプロセス変数の設定値を変更する。また、メッセージは、制御方策の中で人手による操作を必要とするものであり、画面上に表示されオペレータに指示を与える。さらに、ＦｕｚｚｙＡｎｓｗｅｒは、プロセス変数、ファジィメンバーシップ関数、確信度の３個のパーツから成り立っており、上位制御システムにおいて脱ファジィ化されて、プロセス変数の設定値が変更される。上位制御システムは、受け取ったＦｕｚｚｙＡｎｓｗｅｒを蓄積し、１回のサンプルに対する推論が終わった時点で、以下の式で表されるＦｕｚｚｙ　Ｍｅａｎ法[41]を用いて脱ファジィ化を行いプロセス変数の設定値を決定・変更する。

$$A_D = \frac{\int_{S_-}^{S_+} x\mu_A(x)\,dx}{\int_{S_-}^{S_+} \mu_A(x)\,dx}$$

各記号を以下に示す。

A_D:　　設定値

x：　　プロセス変数

$\mu_A(x)$：　プロセス変数に対して定義されるファジィメンバーシップ関数

S_+、S_-：　メンバーシップ関数の定義される領域

このＦｕｚｚｙＡｎｓｗｅｒを用いることで、制御方策が滑らかに変化することが期待される。

さらに、制御操作の緊急性、可逆性に対して検討した。緊急性に関しては、緊急度と名付けた０～１の範囲の数値でその緊急性を表した。すなわち、緊急度が１として定義された操作は、その操作を急いで加えなければプロセスが悪影響を受けるものであり、０の緊急度を持つ操作は、急ぐ必要性が全くないものであり、０．５や０．３等の値を持つものは、両者の中間の緊急性を持つものである。

また、可逆性は“可逆”もしくは“不可逆”で表され、両者の中間の値は定義していな

い。つまり、“可逆”な操作とは、知的制御システムが認識した状態に応じてその操作をシステムに対して加えた後に認識した状態が間違いであったことが判明した場合に、操作を加えたことによってプロセスに与えた影響を取り除く操作が定義されているもの、もしくは、プロセスが他の状態にある時に加えても無意味な操作を表している。逆に、“不可逆”な操作とは、状態認識が間違って行われた場合、その操作をプロセスに加えることにより、プロセスに悪影響を及ぼし、かつその影響を取り除くことが不可能なものを指す。

上記の検討の結果、制御方策の決定に対し以下の拡張を加えた。緊急性、可逆性に応じて操作を加える度合いを以下のアルゴリズムに従って決定した。システムの状態がA、B、Cに属する確からしさを各々C_A、C_B、C_Cとし、その原因として考えられる事象a、b、cが起こっている確からしさをC_a、C_b、C_cとし、かつ、原因事象a、b、cに対して同じ操作Dを加えなければならない場合、この操作をプロセスに加える度合いC_Dを、以下の式によって計算した。

$$C_D = \mathrm{FuzzyOr}(\mathrm{FuzzyAnd}(C_A, C_a), \mathrm{FuzzyAnd}(C_B, C_b), \mathrm{FuzzyAnd}(C_C, C_c))$$

さらに、操作Dの緊急度をE_Dとしたとき、操作Dをプロセスに加える度合いを以下のように決定した。

もし　C_D　<　$(1-E_D)$　かつ　操作Dが“可逆”　ならば　操作DをC_Dの度合いで実行する。

もし　C_D　>　$(1-E_D)$　かつ　操作Dが“可逆”　ならば　操作DをC_Dの度合いで実行する。

もし　C_D　<　$(1-E_D)$　かつ　操作Dが“不可逆”　ならば　操作Dは実行しない。

もし　C_D　>　$(1-E_D)$　かつ　操作Dが“不可逆”　ならば　オペレータに対して実行の判断を求め、オペレータがその場にいない時には、操作DをC_Dの度合いで実行する。

このように可逆性、および、緊急性を考慮してプロセスに加える操作を決定することで、状態認識が誤った場合においても、プロセスに悪影響を与える可能性を低く保つことができると考えられる。

また、”可逆”な操作をシステムに加えた後に、その時点での状態認識が間違って行われていれば、その操作がプロセスに与えた影響を取り除くための操作を加える必要性がある。これより、過去の状態認識を評価できる機能をエキスパートシステムに付加することが必須であることがわかる。状態認識が間違って行われる主な原因は、測定値に含まれるノイズであると考えられるため、ノイズに関する検討を行った。実測値において、データの挙動が急に変化した場合、測定に含まれるノイズの影響とプロセスの挙動の急変の両方の可能性が考えられる。従って、その時点では、得られたデータを用いてプロセスの状態をファジィエキスパートシステムに認識させ、制御方策を決定する。しかし、測定点が増加した時点で、先ほどのデータの挙動の変化がノイズによるものであるかどうかが判明する。もし、ノイズの影響であった場合には、時間を逆上って[63]状態認識と制御方策の決定を再び行い、制御方策が異なった場合で、かつ、プロセスに加えた操作が”可逆”であったときには、プロセスに与えた影響を取り除くための操作を加える。

第4節　結果および考察

4．1　データベース

標準条件で繰り返し実験を行い、各プロセス変数の時間変化を記録した。また、第4章と同様に、実データは3次のB－Spline[37),80)]を用いて平滑化を行い、デジタルフィルター[75),82),83)]で処理し故意に遅れを持たせ、さらに、微分を行って、比増殖速度、比消費速度、および、比生産速度を算出した。

また、各々の変数に対するファジィメンバーシップ関数を設定した。菌体濃度、基質濃度、生産物濃度、および、各比速度に対するメンバーシップ関数は、B－Splineを用いて算出した最尤値を中心として、上下2σの範囲内を”normal”な領域とし、2σ～4σの範囲をファジィな領域として定義し、4σを越える領域を”low”、もしくは、”high”としている。なお、σはB－Splineにより得られた標準偏差である。これにより、標準的な挙動を示すプロセスから得られる測定値の97％前後が正常値としてシステムに認識されることが統計学的に期待される。

また、培養の初期には各比速度の測定値に含まれる誤差が大きく、培養が進むにつれて小さくなることを考慮し、培養期間を4つに分割して、メンバーシップ関数を決定した。データベース[7)]に格納した標準の比増殖速度とメンバーシップ関数を図7に示す。バイオプロセスの状態を認識する際には、データベースに格納した標準のプロセス変数、あるいは、比速度の値とそれらの実測値を比較し、両者に違いが生じた場合には、プロセスの状

態が標準条件で培養したものと異なることが認識できる。

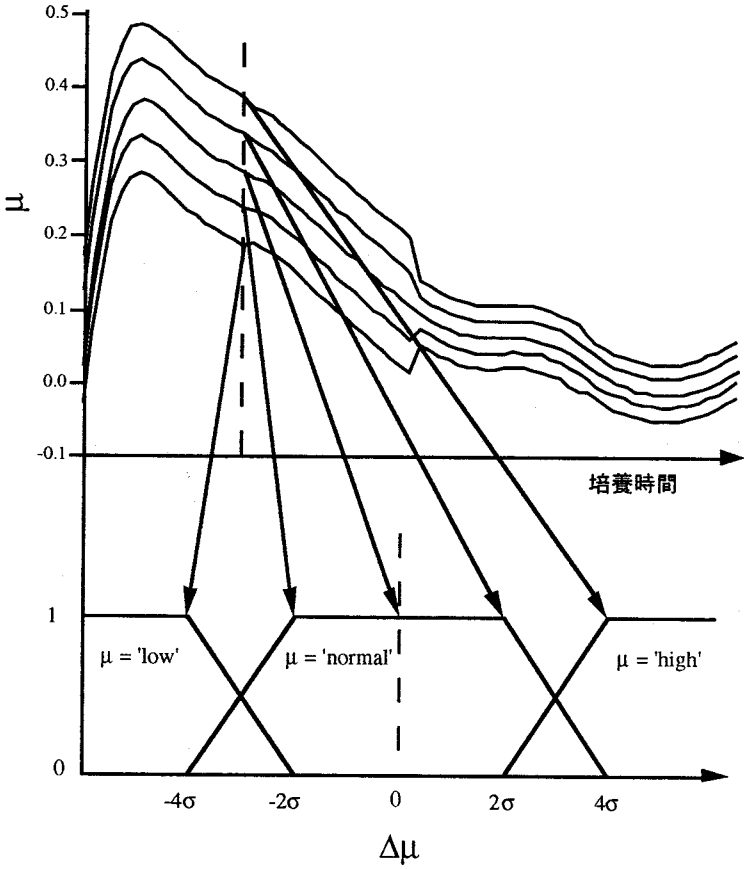


図4　データベースに格納した標準の比増殖速度の経時変化と
比増殖速度に対して定義したファジィメンバーシップ関数

4．2　知識取得実験

植菌量が少ない培養において菌体増殖が、培養中期で急激に停止することが観察された。この原因として考えられるモデルとして

1）前培養で用いているロゴサ培地に増殖必須因子が含まれており、植菌量が少ないものは増殖必須因子の量も少ないため、増殖が途中で停止した。

2）細胞は前培養中に増殖因子を生産し、本培養においてそれを消費しながら増殖するため、植菌量が少ない培養においては、増殖因子の供給が不十分で増殖が停止した。

3）前培養液中に含まれる増殖因子と同一の取り込み系を持つ因子が本培養液中に大量に含まれており、拮抗阻害の影響で細胞が増殖因子を摂取できず、前培養時に取り込んだ増殖因子を消費しながら増殖する。そのため、植菌量が少ない培養においては初期

菌体量が少なく、その結果利用できる増殖因子量も少なくなり、増殖が停止した。これらのモデルを参考にして表１の条件で乳酸発酵プロセスを行った。また、その結果を図５に示す。

表１　植菌条件

Run No.	前培養液	新鮮ロゴサ培地	前培養濾液
1	100	0	0
2	75	0	0
3	75	25	0
4	75	0	25

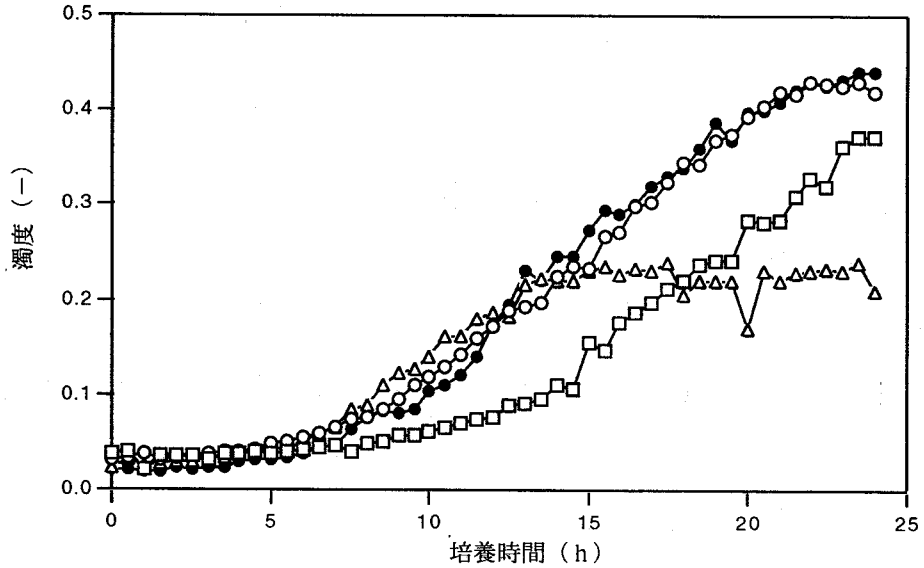


図５　植菌条件を変化させた乳酸発酵プロセスにおける菌体濃度の経時変化
●　Ｒｕｎ１、△　Ｒｕｎ２、□　Ｒｕｎ３、○　Ｒｕｎ４

図５より、前培養で用いているロゴサ培地を加えた培養においては、標準条件と比較して増殖が低いため、（１）で示した仮説が否定された。また、前培養を行った後の培養液をろ過した液を加えたものは、標準の植菌量の結果と一致していることより、（３）の仮説

が否定された。また、（2）の仮説は全ての実験結果を説明することができた。さらに、この実験により、前培養を行った培地をろ過して菌体を除去したろ液を添加することで、植菌量が少なく増殖が停止したプロセスを正常状態に復帰させ得ることが判明した。

次に、前培養時間がプロセスに与える影響を３ｌジャーファーメンター、および、３０ｌジャーファーメンターを使用して調べた。３ｌでの結果を図６に示す。

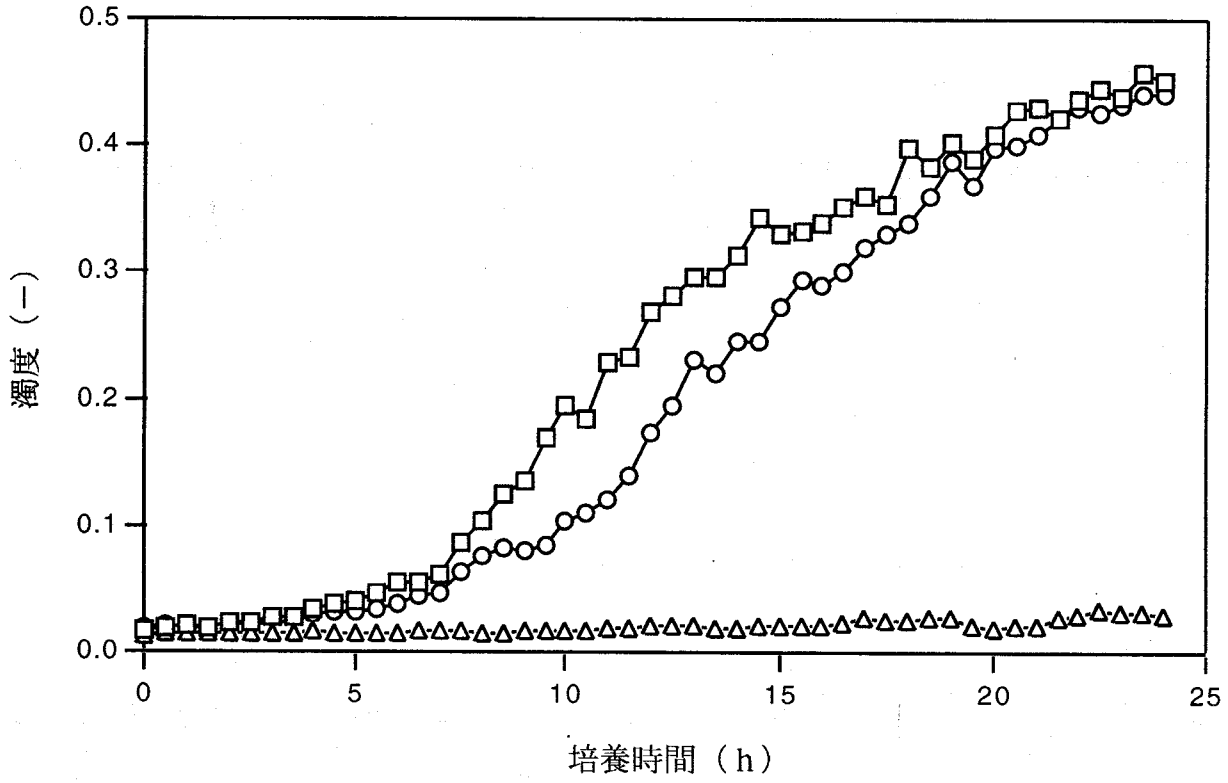


図６　前培養時間が乳酸発酵プロセスに与える影響

△　１８ｈ、○　２０ｈ、□　２４ｈ

これより、標準条件として選択した２０時間の前培養時間を行ったものと比較して、前培養時間が長い培養では、菌体増殖が若干良好であることが示唆された。また、前培養時間が１８時間の培養においては、全く増殖が観察されなかった。これは、植菌量を変化させた実験で考察したように、菌体は前培養条件下で増殖因子を生産しそれを消費して本培養で増殖するが、前培養時間が短い場合には、増殖因子が生産される前に本培養に植菌されたものと思われる。また、前培養時間が１８時間のものと２０時間のものを比較したとこ

ろ、前培養液中での菌体濃度は、約２０％程度の差しか認められなかった。また、３０ｌジャーファーメンターを用いて、前培養時間の影響を調べた結果を図７に示す。前培養時間が１９時間の培養を行った場合には、培養初期に菌体増殖が活発に起こるが、培養中期より全く菌体増殖が認められなかった。これは、前培養において菌体増殖が活発な時期に植菌が行われたため、初期の菌体増殖が良好であったが、前培養における増殖因子の蓄積が不十分であったため、菌体の増殖が停止したのではないかと推察された。

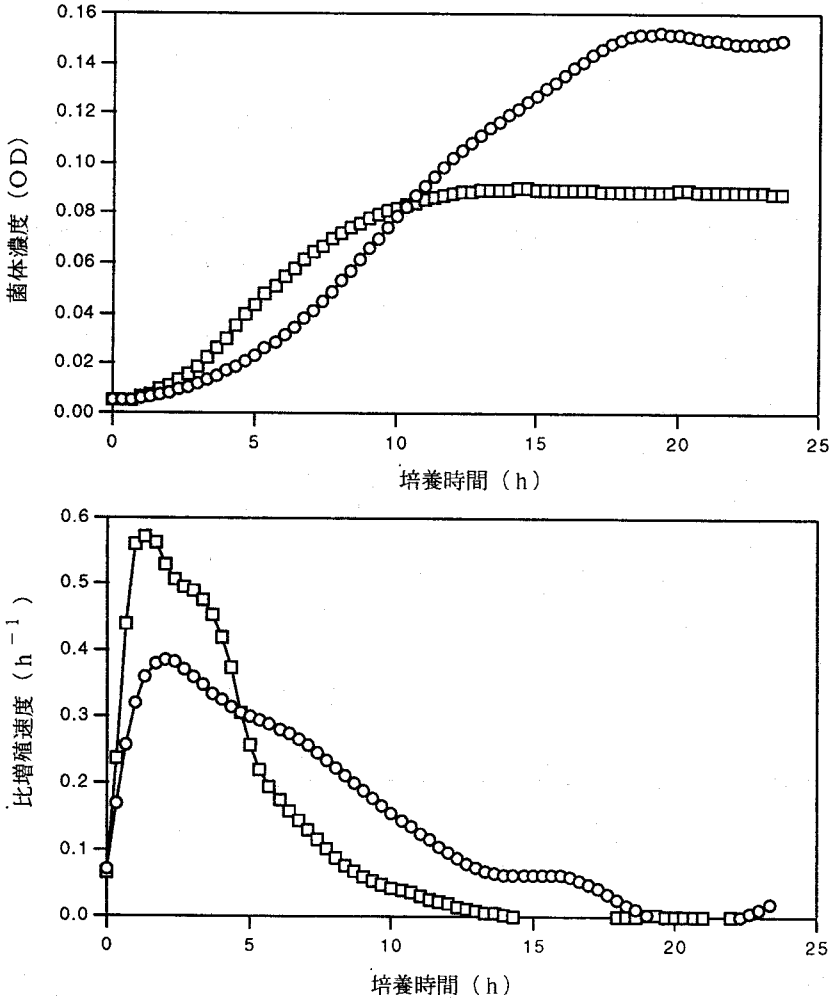


図７　乳酸発酵おける前培養時間が菌体増殖に与える影響

○　２０ｈ、□　１９ｈ

以上の結果より得た知識を以下に列挙する。

（１）殺菌時間が短いと初期グルコース濃度が高い。

（２）殺菌時間が長いと初期グルコース濃度が低い。

（3）殺菌時間が短いと褐変があまり起こらない。
（4）殺菌時間が長いと培地の褐変がひどくなる。
（5）菌体増殖は殺菌時間に依存しない。
（6）グルコース消費速度は殺菌時間に依存しない。
（7）乳酸生産速度は殺菌時間に依存しない。
（8）植菌量が少ないと本培養液中の増殖因子が不足する。
（9）前培養時間が短いと培養の後半で本培養液中の増殖因子が不足する。
(10) 増殖因子が不足すると培養中期で増殖が停止する。
(11) 前培養時間が短いと初期の菌体増殖活性が高い。
(12) 植菌量が多いと増殖因子が過剰に供給される。
(13) 前培養時間が長いと増殖因子が過剰に供給される。
(14) 増殖因子が過剰に供給されると増殖が過多になる。

実験により得られた知識と共に、バイオプロセスで一般的であると考えられた知識を文献などより抽出し、知識ベースを作成した。作成した知識ベースの中の知識ネットワークの一部を拡大したものを図８に示す。

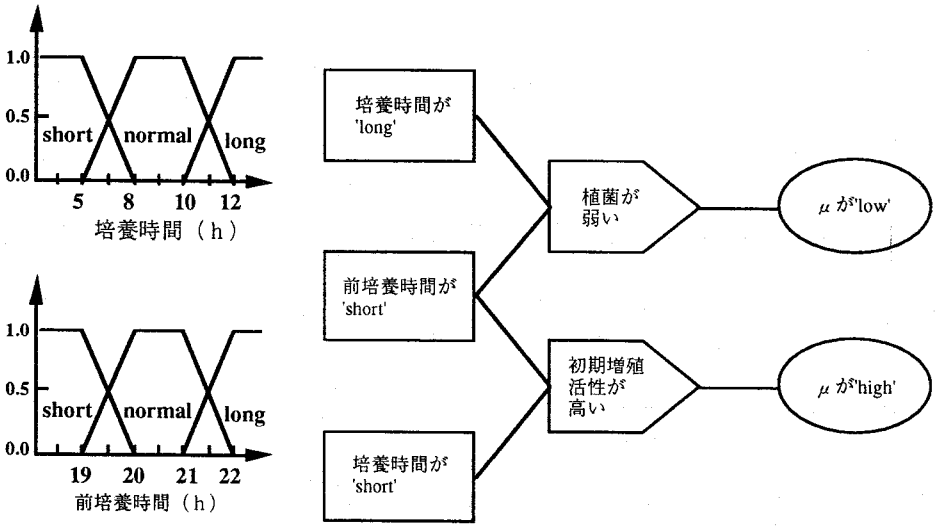


図８　知識ネットワークの一部

４．３　プロセスの状態認識と認識した状態に基づく制御方策の決定

バイオプロセス状態認識用ファジィエキスパートシステムシェルを作成し、実験により得られた知識と乳酸発酵プロセスで一般的であると思われる知識を基に作成した知識ベー

スより、バイオプロセス状態認識システムを構築した。また、発酵槽に付設したセンサーシステム、および、プロセスコントローラーをＲＳ２３２Ｃ通信回線を用いてＵＮＩＸワークステーションと接続した。さらに、ＵＮＩＸワークステーション上に、一定時間毎にデータを取得するプロセスモニタリングシステムと比速度を算出するための計算式評価システムをＣ言語を用いて構築し、上位制御システムを構築した。計算式評価システムは、オペレータの入力した数式を解析し、数式に従って値を計算する機能を持っており、プログラムを使って比速度などの計算を行うより柔軟性に富んでいる。数式評価システムの模式図を図９に示す。

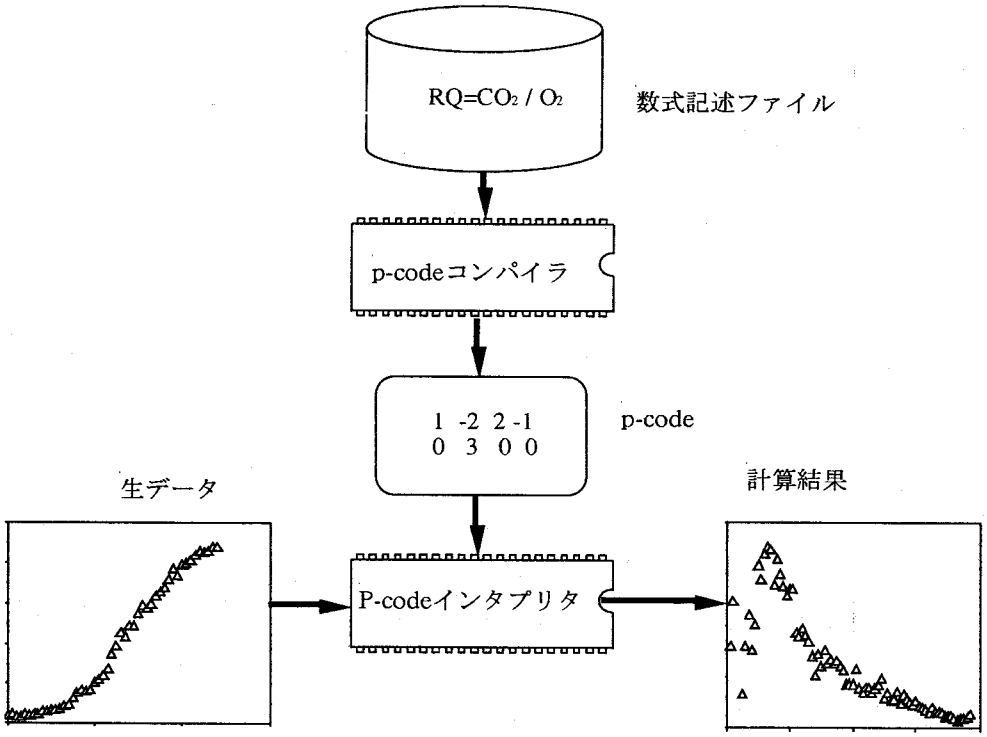


図９　数式評価システムの模式図

なお、図中でｐ－ｃｏｄｅと表記したものは、数式を計算機の内部で表現しやすくするために定義した中間言語[64]である。また、計算式評価システムで使用可能な演算子は、＋、－、＊、／、（、）、および、'F'である。なお、計算式評価システムで'F'で示した演算子は、デジタルフィルター処理を行うための３項演算子であり、演算子の右側の第１項をフィルター定数とし第２項を次数とする遅れ型フィルター処理を演算子の左側の変数に施す機能を持っている。ここで用いたフィルターは、単純な遅れフィルターであり、フィルター定数、および、次数を大きくすることにより高いノイズ除去率が期待できるが、そ

の反面遅れが大きくなる欠点を持っており[75),82),83)]、適切なフィルター定数を設定する必要がある。そこで、ステップ入力に対する９０％応答が６０ｍｉｎ以内で、かつ、オンラインで計測した菌体濃度に対するノイズ除去率が最良であった、フィルター定数０．２７、フィルター次数４のものを採用した。

さらに、バイオプロセス状態認識システムを構築したパーソナル計算機と、上位制御システムをＲＳ２３２Ｃ通信回線を用いて接続し、オンラインバイオプロセス状態認識システムを作成した。上位制御システムは、プロセスコントローラより測定値を受け取り、計算式評価システムを用いて、ノイズの除去、比速度の推定を行い、これらのデータをＲＳ２３２Ｃデバイスドライバを通してファジィエキスパートシステムに転送する。

ファジィエキスパートシステムは、データベースに格納されている標準のプロセス変数の経時変化と得られた実測値を比較し、知識ベースに格納された知識に基づいてプロセスのその時点での状態を推論する。さらに、ファジィエキスパートシステムは、推論の結果得られた状態に対して定義されている様々な単位操作とその操作をプロセスに加える度合いを上位制御システムに転送する。上位制御システムは、ファジィエキスパートシステムから送られた全ての単位操作から、制御方策を決定し、オンラインで可能な操作は、プロセスコントローラの設定値を変更することで実行し、人手による操作を必要とするものは画面表示を行うと共に警告音を発生しオペレータに指示を与える。

作成したオンラインバイオプロセス状態認識システムを用いて、バイオプロセスの状態認識と認識した状態に基づく制御方策の決定を行わせた。前培養時間を１９．５ｈとして、乳酸発酵プロセスを行い、オンラインバイオプロセス状態認識システムによる状態の認識と制御方策の決定を行わせた。菌体濃度と比増殖速度の経時変化を図１０に示す。前培養時間が１９．５時間の条件で培養を行った時は標準条件のものと比較して、培養開始後約４時間目より５時間目にかけて比増殖速度が高くなったが、その後、標準条件のものとほぼ同じ増殖を示した。しかし、培養開始後９時間４０分目より比増殖速度が急激に低下し、その後１時間の間にデータベースに定めた「μ＝ｌｏｗ」の領域に達した。また、菌体濃度は、培養開始後１０時間目より標準のものと比較して明らかに低くなり、菌体増殖がほぼ停止していることが確認された。この培養のａ～ｄで示した時点において、オンラインファジィエキスパートシステムシステムは、以下のメッセージを出力した。

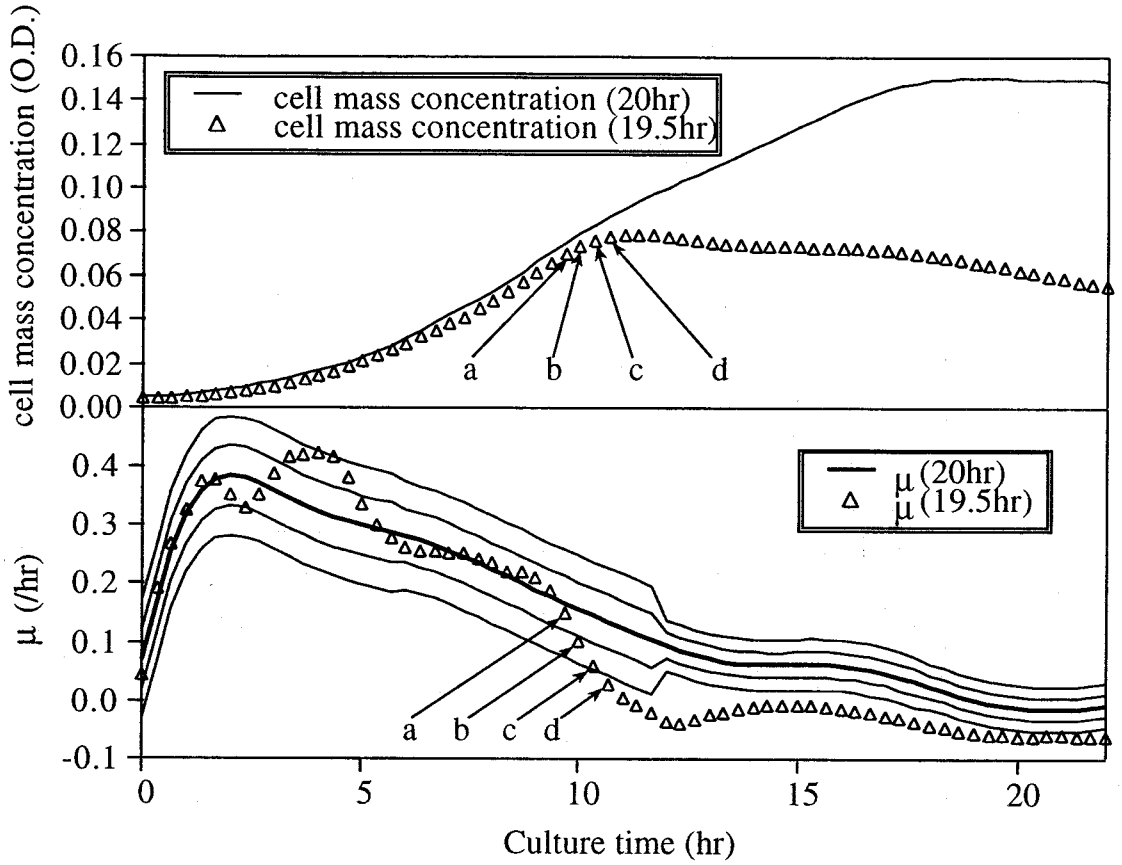


図１０　前培養時間が短い乳酸発酵プロセスにおける菌体濃度と比増殖速度の経時変化

(a) "process going well" 100%

(b) "process going well" 82%

"μ= 'low'" 18%

The reason of this fault is

"inoculum is week" 50%

"pre-culture is 'short'" 50%

"culture time is 'long'" 100%

(c) " process going well" 16%

"μ= 'low'" 84%

The reason of this fault is

"inoculum is week" 50%

"pre-culture is 'short'" 50%

"culture time is 'long'" 100%

(d) " process going well" 0%

"μ = 'low'" 100%

The reason of this fault is

"inoculum is week" 50%

"pre-culture is 'short'" 50%

"culture time is 'long'" 100%

これより、培養開始後１０時間目の前後で起こった比増殖速度の変化に対応して、ファジィエキスパートシステムは、プロセスが正常な状態から異常な状態まで両者の中間状態を通りながら変化していることを検出し、その原因が”植菌が弱い”ためであり、さらにその原因として”前培養時間が短く”かつ”培養時間が長い”ためであることを推論することが可能であった。

第5節　要約

第4章で構築したバイオプロセス異常診断システムに、前向き推論を新たに加え診断できる原因の範囲を拡大し、プロセスの異常の検出をファジィを用いて行うことで異常と正常の中間状態を表現可能とした。また、比速度に含まれるノイズの大きさが経時的に変化するため、異常検出に用いている正常の範囲を示す領域の幅を培養時間に応じて変化させた。さらに、推定した異常原因に対応した制御方策を出力するために、各制御方策に対して緊急度、可逆性を定義した。これらの拡張を行って、バイオプロセス知的制御システムを構築し乳酸発酵プロセスを例に、その評価を行った。

乳酸発酵プロセスを用いた知識取得実験により、用いた乳酸菌は前培養で培地中に蓄積した増殖因子を本培養中に消費して増殖することが明らかとなった。また、植菌量の不足や前培養時間の不足により、増殖因子が不足し、培養の中期において増殖が停止することが判明した。さらに、前培養を行った培養液から菌体を除去した濾液を取得し、増殖因子が不足している乳酸発酵プロセスに添加することで、増殖因子の不足を補うことが可能であることが示唆された。

開発したバイオプロセス知的制御システムは、オンラインで乳酸発酵プロセスの異常状態の認識、異常原因の探索が可能であった。

第　6　章

統　　括

Mikio Nakajima

バイオプロセスは一般的に非定常状態を持ち、さらにその挙動が高い非線形性を示すためわずかな外乱により系が大きな影響を受け、制御が難しい。また、高い安定性・再現性を有し、かつ、無菌的な測定が可能なセンサーの数が限られており、情報量が不足していることもバイオプロセスの制御を難しくしている原因であると思われる。本論文では、知識工学的手法を用いて計算機にバイオプロセスの状態を認識させ、さらに認識した状態に適合した制御方策の決定する手法に対して検討し、以下に示す知見を得た。

第2章において、グルタミン酸発酵プロセスを例に取り、増殖期で炭酸ガス発生量と炭素源として用いているグルコース消費量が比例し、さらに生産期で中和のために用いているアンモニア水添加量とグルコース消費量が直線関係にあることを見いだし、各培養フェーズにおけるグルコース流加方策を決定した。さらに、培養時間、炭酸ガス発生量、およびアンモニア水添加量を指標とし、ファジィ推論を用いて培養フェーズをオンラインで認識することを提案し、ファジィメンバーシップ関数、プロダクションルールを決定した。構築したファジィ推論システムは、オンラインで培養フェーズの移り変わりを認識することが可能であり、認識した各培養フェーズに適合した流加方策を選択した。さらに、その時点で2つ以上の培養フェーズに対して蓋然性がある場合においては、各培養フェーズに応じた流加速度を決定し、その後培養フェーズの蓋然性を重みとする加重平均を求めることにより流加速度の急激な変化を防いだ。この結果、培養期間中全期間に渡ってグルコース濃度を一定に保つことが可能であった。さらに、認識した培養フェーズに適合した流加方策を行わなかった場合には流加が正しく行われず、グルコース濃度が変化することを示し、本手法の有効性を確認した。

培養の各バッチにおいて培養フェーズが移り変わる時間などが異なる場合には、比増殖速度や比生産速度など比速度と呼ばれる菌体の生理活性を直接表す変数を用いて培養フェーズを認識することが望ましいが、比速度が直接できないプロセスも数多く存在する。第3章では、グルタミン酸発酵プロセスを例に取り、比速度が直接測定できない系において、炭酸ガス発生速度、酸素消費速度およびアンモニア水添加速度など、発酵槽全体での物質の生産・消費を表す変数を用いて比速度の変化を検出することを検討した。これらの速度変数の比の値をオンラインで観測することで培養フェーズが変遷することを観測することが可能であり、さらにこれら速度変数の正規化変化率を定義することにより、正規化変化率が十分低いノイズレベルでオンライン測定が可能であれば、正規化変化率を基にして培養フェーズの遷移を認識することが可能であることを示した。また、オフラインで平滑化した正規化変化率を用いて、培養フェーズの変遷を推定することができることを示した。さらに、正規化変化率を用いることで培養フェーズが変化する際に比の値が大き

な変化を示す速度変数の組み合わせを視覚的に選択することを可能とした。これらより、オンラインで比較的容易に測定できる速度変数の正規化変化率、もしくは速度変数の比の値をモニタリングすることで、間接的に菌体の比速度の変化を推定することができ、培養フェーズの遷移をオンラインで認識することができることを示した。

第４章では、乳酸発酵においてオンラインで比速度の推定が可能な系をＵＮＩＸワークステーションを用いて構築し、熟練者の判断機構を模倣するファジィエキスパートシステムと接続することにより、バイオプロセスの異常の検出と検出した異常状態を引き起こした原因となる事象を推論することが可能な異常診断システムの開発を試みた。ＵＮＩＸワークステーションを用いて作成した上位制御システムには、発酵槽に接続したプロセスコントローラよりプロセス変数の値を取得し、ノイズの除去をＩＩＲ型デジタルフィルタにより行い、比増殖速度、比生産速度および比基質消費速度を算出し、さらにこれらのデータをファジィエキスパートシステムに転送する機能を付加した。また、受け取ったデータから異常の検出と異常原因の探索が行えるファジィエキスパートシステムをパーソナル計算機上にＳｍａｌｌＴａｌｋ／Ｖを用いて作成した。構築したファジィエキスパートシステムは、受け取ったデータと過去の正常な培養のデータから構築したデータベースに格納されているプロセス変数の経時変化を比較することでバイオプロセスの異常状態を検出し、さらに異常が検出された場合、熟練者および過去の実験より取得した知識を用いて異常を引き起こした原因をバックワードチェイン法により探索する機能を持つ。後ろ向き推論の一種であるバックワードチェイン法により、ｐＨ、温度、前培養条件、殺菌時間などの異常による培養条件の不良、ＨＰＬＣなどの測定機器の不良に関する知識の記述と、異常原因の探索が可能であった。さらに、ファジィエキスパートシステムの知識表現にグラフィックを用ることにより、人間に理解し易い知識の表記と、推論結果の提示を行うことができた。作成した異常診断システムの評価を乳酸発酵プロセスにより行った。まず、植菌量および殺菌時間がプロセスに与える影響を実験により調べ、植菌量が少ない場合には菌体増殖が培養中期で停止すること、植菌量が多い場合には菌体増殖が標準の条件より良好であること、殺菌時間は菌体増殖に影響を与えないが殺菌時間が長いものほど初期グルコース濃度が低くなることを明らかとした。これらの実験より得た知識とともに、バイオプロセスにおいて一般的であると考えられる知識を知識ベースとしてファジィエキスパートシステムに与え、乳酸発酵プロセスをオンラインで診断させたところ、構築したシステムは異常の検出と異常原因の探索が可能であった。

第５章では、探索した原因事象に基づいてプロセスを異常状態から復帰させる制御方策を構築する手法に対して検討を加えた。第４章で開発したシステムに、前向き推論法の一

種であるフォワードチェイン法を新たに加え推論できる異常原因の範囲を広げ、プロセスの異常の検出にファジィ推論を用い、異常と正常の中間の状態を表現できるようにし、比速度に含まれるノイズの大きさが培養時期に応じて変化するため正常領域の幅を培養時間に応じて切り替えることを可能にし、さらに推定した異常原因に対応した制御方策を出力できるようにすることにより制御システムを作成した。前向き推論法を用いることで、後ろ向き推論で表記することができなかった雑菌汚染とプロセスの正常状態に関する知識を取り扱うことが可能になった。また、３次のＢ－Ｓｐｌｉｎｅを用いてオフラインで平滑化したデータを用いてデータベースを構築し、さらにオンライン測定時に含まれるノイズの影響を考慮して、Ｂ－Ｓｐｌｉｎｅによる平滑化の際に得られた標準偏差σを基にして、各々のパラメータに対して、正常状態、異常状態、および、両者の中間の状態をファジィメンバーシップ関数により表現した。正常状態と異常状態の間に中間領域としてファジィな領域を設けることで、プロセスに加える制御方策が急変することを防ぎ、プロセスが過度の応答をする事が少なくなると考えられる。さらに、探索した異常原因に適合した制御方策の決定を、緊急性、可逆性などの概念の導入と、脱ファジィ化プロセスをシステムに導入することで実現した。開発したシステムの評価を行うため、知識の取得を実験により行ったところ、本論文で用いている乳酸発酵プロセスでは前培養中に細胞が増殖因子を細胞外に分泌すること、さらに本培養中にその増殖因子を資化して増殖すること、前培養時間が短い場合や植菌量が少ない場合には増殖因子が不足し菌体増殖が停止すること、前培養濾液を本培養時に添加することで増殖因子を補うことが可能であることを明らかにした。これらの知識を与えたファジィエキスパートシステムシステムは、オンラインで乳酸発酵プロセスの異常状態の検出を行い、異常原因を探索する事が可能であることを示した。

本論文は、知識工学的手法の一種であるファジィ推論とエキスパートシステムをバイオプロセスの内部状態の認識、さらに認識した状態に適合した制御方策の決定に適用し、これらの用途に知識工学的手法が有効であることを示した。また、現在のバイオプロセスでは熟練者の果たしている役割は大きく、さらに酒造プロセスなどでは技術者の後継者不足が重要な問題となっており、熟練者の持つ経験的知識を計算機上で取り扱う知識工学的手法をバイオプロセスに適用する研究が盛んになるものと予想されており、本論文で行った研究をさらに発展させ実プロセスに応用することは大きな意義を持つと考えている。

Ａｐｐｅｎｄｉｘ　フレーム

フレームは人間の持つ知識構造を表現するためにミンスキーによって提案されたもので、静的な知識とともに動的な知識構造を表現することが可能である。フレームは、以下に示すような構造を持った知識表現である。

フレームの一般的構造

フレーム名
上位フレーム　上位フレーム名
スロット名　　スロット値
スロット名　　スロット値
　・　　・
　・　　・
　・　　・

フレームは、フレーム自身が格納している事実やものを表すフレーム名と、その事実に関連する情報であるスロットを持っている。スロットは、そのフレームによって示されている事実や概念との関係を示すスロット名と、その関係に含まれる事実、事柄、および概念を表すスロット値を持っている。また、フレームは上位フレームで示したフレームの持つ性質の全て、もしくは、一部を継承（ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ）することで、知識表現の効率化が図られている。さらに、スロット値は、単純な値である場合だけでなく、その値を導出するための手続きを示す場合もある。実際のフレームの例として、「脊椎動物」、「人間」、「山田太郎」、および「山田二郎」の４つのフレームを考える。

フレーム名　　脊椎動物
上位フレーム　動物
背骨　　有り

フレーム名　　人間
上位フレーム　脊椎動物
生年月日　　値を代入
年齢　　今日　－　生年月日

フレーム名	山田太郎	フレーム名	山田二郎
上位フレーム	人間	上位フレーム	人間
生年月日	１９６３／１／１	生年月日	１９７３／１１／１１
勤務先	会社	勤務先	大学
入所日	１９９０／７／１	入学日	１９９２／４／１

まず、「人間」のフレームに注目すると、「人間」が「脊椎動物」の一種であることが上位フレームが「脊椎動物」であることにより表現されており、「人間」は「生年月日」という値を持つことが次のスロットで示され、３番目のスロットで「年齢」を計算するための手続きが表現されている。また、次のフレームには、「山田太郎」が人間の１人であることが表現され、残るスロットで人物「山田太郎」の様々な特徴が示されている。また、表記はしていないが、「年齢」のスロットは上位フレームである「人間」から継承されている。ここで、「山田太郎」がどういった人物であったかを推論、あるいは思い出すときには、「山田太郎」のフレームにより関連する事実をその関連性とともに次々と連想し、さらに、上位フレームの「人間」の持つ「生年月日」、「年齢」の概念と手続きによりその人の「年齢」を推論（計算）することになる。この様に、フレームは、知識構造や事実や概念間の関連だけでなく、スロット値に値を取り出す手続きを導入したことで、様々な推論問題に柔軟に適用することができる。また、「人間」や「脊椎動物」などといった仮想的なフレームを定義し、共通の性質を１ヶ所にまとめて記述することで、「山田太郎」、「山田二郎」などの個々のフレームで「年齢の計算手順」や「背骨の有無」などを記述する必要性が無くなっている。

なお、この例における年齢の計算などの手続きは、エキスパートシステムではデーモン（Ｄｅａｍｏｎ）と呼ばれることが多い。これは、年齢の値が必要となったときなどに、エキスパートシステムでは、年齢の値を計算する手続きを人間（プログラマ）が明示的に呼び出すのではなく、システムが手続きを起動し、算出した値だけを受け渡すため、人間の知らないところで動くもののイメージから付けられた名前である。

引用文献

1) Aarts, R.J., Suviranta, A., Rauman-Aalto, P., Linko, P. 1990. An expert system in enzyme production control. Food Biotechnol. **4**, 301-315.

2) Aiba, S., Nagai, S., Nishizawa, Y. 1976. Fed batch culture of Saccharomyces cerevisiae: a perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. Biotechnol. Bioeng. **18**: 1001-1016.

3) Austin, G.D., Sankhe S.K., Tsao, G.T. 1992. Monitoring and control of methanol concentration during polysaccharide fermentation using an on-line methanol sensor. Bioproc. Eng. **7**: 241-247.

4) Chatourou, M. Najim, K., Dahhou, B. 1993. Control of a bioreactor using a neural network. Bioproc. Eng. **8**: 251-254.

5) Dohnal, M., 1985. Fuzzy bioengineering models. Biotechnol. Bioeng. **27**: 1146-1151.

6) Duysens, L.N.M., Amesz, J. 1957. Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. Biochem. Biophys. Acta. **24**: 19-26.

7) Endo, I., Nagamune, T. 1987. A database system for fermentation processes. Bioproc. Eng. **2**: 111-114.

8) Endo, I., Nagamune, T., Inoue, I. 1983. Application of Kalman filter to automatic monitoring system of microbial physiological activities., Biochem. Eng. III, Ann. New York Acad. Sc. **413**: 228-230.

9) Endo, I., Nagamune, T., Inoue, I. 1985. Autosampler. US Patent No 4 501 161.

10) Filev, P.D., Kishimoto, M., Segupta, S., Yoshida, T., Taguchi, H. 1985. Application of the fuzzy theory to simulation of batch fermentation. J. Ferment. Technol. **63**: 545-553.

11) Goldberg, A., Robson D., 1983. Smalltalk-80. Addison Wesley.

12) Harris, C.M., Todd, R.W., Bungard, S.J., Lovitt, R.W., Morris, J.G., Kell, D.B., 1987. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies. Enzyme Microb. Technol. **9**: 181-186.

13) Hitzman, B., Lubbert, A., Schugerl, K., 1992 An expert system approach for the control of a bioprocess. Biotechnol. Bioeng. **39**: 33-43.

14) Horiuchi, J., Kamasawa, M., Miyakawa, H., Kishimoto, M. 1993. Phase control of fed-batch culture for a-amylase production based on culture phase

identification using fuzzy inference. J. Ferment. Bioeng. **76**: 207-212.
15) Horiuchi. J., Kishimoto, M., Kamasawa, K., Miyakawa, H., Momose, H. 1993. Data base simulation of batch and fed-batch cultures for a-amylase production using a culture data base and a statistical procedure. J. Ferment. Bioeng. **76**: 326-332.
16) Kemblowski, Z., Kristiansen, B. 1986. Rheometry of fermentation liquids. Biotechnol. Bioeng. **28**: 1474-1483.
17) Kim, I., Cho, M.H., Wang, S.S. 1993. Measurement of hydrodynamic shear by using a dissolved oxygen probe. Biotechnol. Bioeng. **41**: 296-302.
18) Kishimoto, M., Alfafara, C.G. Nakajima, M., Yoshida, T. 1989. The use of the Maharanobis and modified distances for the improvement of simulation of glutamic acid production. Biotechnol. Bioeng. **33**: 191-196.
19) Kishimoto, M., Moo-Young, M., Allsop, P. 1991. A fuzzy expert system for the optimization of glutamic acid production. Bioproc. Eng. **6**: 163-172.
20) Kishimoto, M., Yoshida, T., Taguchi, H. 1981. Simulation of fed-batch culture for glutamic acid production with ethanol feeding by use of regression analysis. J. Ferment. Technol. **59**: 43-48.
21) Konstantinov, K.B., Nishio, N., Seki T., Yoshida, T. 1991. Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant Escherichia coli for phenylalanine production. J. Ferment. Bioeng. **71**: 350-355.
22) Konstantinov, K.B., Yoshida, T. 1990. On-line monitoring of representative structural variables in fed-batch cultivation of recombinant Escherichia coli for phenylalanine production. J. Ferment. Bioeng. **70**: 420-426.
23) Konstantinov, K.B., Yoshida, T., Aarts, R. 1993. Expert systems in bioprocess control: requisite features. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **48**: 169-192.
24) Laffey, T.J., 1991. The real-time expert. Byte **16**: 259-264.
25) Li, J., Humphrey, A.E. 1991. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. Biotechnol. Bioeng. **37**: 1043-1049.
26) Li, J., Humphrey, A.E. 1992. Factors affecting culture fluorescence when monitoring bioreactors. J. Ferment. Bioeng. **74**: 104-111.
27) Linko, P., 1988. Uncertainties, fuzzy reasoning and expert systems in bioengineering. Ann. N.Y. Acad. Sci. **542**: 83-101.
28) Mamdani, E.H., Assilian, S., 1974. A case study on the application of fuzzy set theory to automatic control. IFAC Stochastic Control Symp. Budapest.
29) Mamdani, E.H., Assilian, S., 1975. An experiment in linguistic synthesis

with a fuzzy logic controller. Int. J. Man-Machine Stud. **7**: 1-13.

30) Minsky, M. 1975. A framework for representing knowledge. Psychol. Comp. Vision. McGraw-Hill.

31) Mishima, K., Miura, A., Takahara, Y. 1991. On-line monitoring of cell concentrations during yeast cultivation by dielectric measurements. J. Ferment. Bioeng. **72**: 296-299.

32) Nagamune, T., Inoue, I., Takematsu, N. 1985. Instrument for measuring concentration of substance in suspension. US Patent No 4 561 779.

33) Nakamura, T., Kuratani, T., Morita, Y. 1985. Fuzzy control application to glutamic acid fermentation. Proc. of IFAC Modeling and Control of Biotechnology Process. 211-215.

34) NG, K.C., Abramson, B., 1990. Uncertainty management in expert systems. IEEE Expert. **5**: 29-48.

35) Oishi, K., Tominaga, M., Kawato, A., Imayasu, S. 1992. Analysis of the state characteristics of sake brewing with a neural network. J. Ferment. Bioeng. **73**: 153-158.

36) Olsvik, E.S.,, Kristiansen, B. 1992. On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. Biotechnol. Bioeng. **40**: 375-387.

37) Oner, M.D., Erickson, L.E., Yang, S.S. 1986. Utilization of spline function for smoothing fermentation data and for estimation of specific rates. Biotechnol. Bioeng. **28**: 902-918.

38) Packer, H.L., Keshavarz-Moore, E., Lily, M.D. 1992. Estimation of cell volume and biomass of Penicillium chrysogenum using image analysis. Biotechnol. Bioeng. **39**: 384-391.

39) Pokkinen M., Bustamante, Z.R.F., Asama, H. Endo, I. 1992. A knowledge based system for diagnosing microbial activities during a fermentation process. Bioproc. Eng. **2**: 331-334.

40) Pokkinen, M., Bustamante, Z.R.F., Asama, H., Endo, I., Linko, P. 1992. Diagnosing lactic acid fermentation based on specific rates of growth, substrate consumption and product formation. Bioproc. Eng. **7**: 319-323.

41) Postlethwaite, B., 1990. Basic theory and algorithms for fuzzy sets and logic. In: McGhee J., Grimble M.J., Mowforth, P. (Eds.), Knowledge-based systems for industrial control. Peregrinus, London. : 34-46.

42) Russo, M.F., Peskin, R.L., 1987. Knowledge-based systems for the engineer. Chem. Eng. Progress **83**: 38-43.

43) Shabtai, Y., Mandel C. 1993. Control of ethanol production and monitoring of membrane performance by mass-spectrometric gas analysis in the

coupled fermentation-pervaporation of whey permeate. Appl. Microbiol. Biotech. **40**: 470-476.

44) Shi, Z., Shimizu, K., Iijima, S. Izumi, R., Matsumoto, K., Kobayashi, T. 1992. Development of dual on-line analyzer and its application to fed-batch lactic acid fermentation. J. Ferment. Bioeng. **73**: 22-25.

45) Shiio, I., Otsuka, S. Takahashi, N. 1962. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. J. Biochem. **51**: 56-62.

46) Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., Takamatsu, T. 1989. An algorithmic approach to construction the on-line estimation system for the specific growth rate. Biotechnol. Bioeng. **33**: 33-38.

47) Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., Takamatsu, T. 1989. Profile control of specific growth rate in fed-batch experiments. App. Microbiol. Biotechnol. **30**: 276-282.

48) Stallman, R.M., Sussman, G.J., 1977. Forward reasoning and dependency-directed backtracking in a system for computer-aided circuit analysis. Artig. Intell. **9**: 135-196.

49) Stephanopoulos, G., San, K. 1984. Studies on on-line bioreactor identification. I. Theory. Biotechnol. Bioeng. **26**: 1176-1188.

50) Stephanopoulos, G. 1987. The future of expert systems in chemical engineering. Chem. Eng. Progress **83**: 44-51.

51) Thibault, J., Breusegem, V.V., Chéruy, A. 1990. On-line prediction of fermentation variables using neural network. Biotechnol. Bioeng. **36**: 1041-1048.

52) U.S. National Institutes of Health, 1994. About NIH Image. zippy.nimh.nih. gov.

53) White, D.A., Sofge, D.A.(ed), 1992. Handbook of intelligent control. Van Nostrand Reihold.

54) Yamakawa, T., 1992. A fuzzy logic controller. J. Biotechnol. **24**: 1-32.

55) Yamamoto, K., Ishizaki, A., Stanbury, P.F., 1993. Reduction in the length of the lag phase of L-lactate fermentation by the use of inocula from elctrodialysis seed cultures. J. Ferment. Bioeng. **76**: 151-152.

56) Yano, T., Kobayashi, T., Shimizu, S., 1978. Silicone tubing sensor for detection of methanol. J. Ferment. Technol. **56**: 421-427.

57) Yano, T., Masduki, A. Nishizawa, Y. 1992. Photometric measurement of high cell density by continuous dilution of broth with a circulating system. J. Ferment. Bioeng. **74**: 100-103.

58) Zadeh, L.A., 1965. Fuzzy sets. Inform. Control **8**: 338-353.

59) Zadeh, L.A., 1968. Fuzzy argorithms. Inform. Control **12**: 94-102.
60) 合葉修一、永井史郎、1975、生物化学工学、化学技術社
61) 石川祐次、1985、マイコン・データ通信技術のすべて（シリアルインターフェースの設計法）、トランジスタ技術 **22**: 355-384.
62) 大石　薫、富永光則、川戸章嗣、安部康久、今安　聴、1990、清酒醸造支援エキスパートシステムの開発、日本発酵工学会大会講演要旨集: 139.
63) 大須賀節雄（監訳）、1991、人工知能大辞典、丸善
64) 片岡雅憲、1988、ソフトウエアモデリング、日科技連出版.
65) 鴨下祐也、増田清敬、柳沢　昌、岸本通雅、1993. グルタミン酸発酵の生産フェーズにおける廃糖蜜流加の最適化、日本生物工学会大会講演要旨集: 193.
66) 河村喜雄、田中伸司、佐藤一雄、内田憲孝、小比田啓之、1990、マイクロメカニカルデバイスを用いた１対１細胞融合技術の開発、精密工学会誌 **56**: 96-91.
67) 岸本通雅、中嶋　茂、吉田敏臣、田口久治、1986、最適培養条件決定におけるファジィ理論的アプローチの一検討、日本発酵工学会大会講演要旨集: 216.
68) 小林史典、1989、オブジェクト指向とＳｍａｌｌｔａｌｋ、ＣＱ出版
69) 塩谷捨明、1991. 流加培養系における最適化とその実現に関する研究、日本発酵工学会大会講演要旨集: 58.
70) 清水　浩、高松武一郎、塩谷捨明、菅　健一、1986、半回分培養系における比増殖速度の推定と制御、日本発酵工学会大会講演要旨集: 217.
71) 清水　浩、三浦圭吾、C. Alfafara、塩谷捨明、菅　健一、1991. 発酵プロセスにおけるファジィ制御とその評価、日本発酵工学会大会講演要旨集: 63.
72) 竹内彰一、1986、オブジェクト指向の指向するもの、情報処理 **29**: 295-302.
73) 徳川敬三郎、川崎雄一、1984、Ａ／Ｄ・Ｄ／Ａのインターフェース技術（マイコンとのＡ／Ｄ・Ｄ／Ａインターフェース技術）、トランジスタ技術 **21**: 287-308.
74) 中嶋幹男、岸本通雅、吉田敏臣、田口久治、1986、グルタミン酸発酵におけるオンライン状態推定、日本発酵工学会大会講演要旨集: 216.
75) 西潟隆友、1980、ＯＰアンプ回路の最新技術（フィルタ回路編）、トランジスタ技術 **17**: 257-277.
76) ＢＮＮ第２企画部、1987、インサイドマック徹底ガイド（上下）、

ビー・エヌ・エス
77) 福田敏男、塩谷成敏、新井史人、淺間　一、長棟輝行、遠藤　勲、1991. 画像処理エキスパートシステムによるマイクロ・キャリア上動物細胞の視覚認識・計測法（第２報）、日本機械学会論文集（Ｃ編）**57**: 180-186.
78) 福田敏男、長谷川修、淺間　一、長棟輝行、遠藤　勲、199 0. 画像処理エキスパートシステムによるマイクロ・キャリア上動物細胞の視覚認識・計測法、日本機械学会論文集（Ｃ編）**56**: 174-182.
79) 堀内淳一、釜澤正実、岸本通雅、1990、発酵プロセス高度制御技術の開発（第１報）、日本発酵工学会大会講演要旨集: 138.
80) 堀内淳一、釜澤正実、宮川久司、岸本通雅、1993.　スプライン関数による菌体濃度および比増殖速度のオンライン推定、日本生物工学会大会講演要旨集: 190.
81) 三島　健、1989. バイオサイエンスとインダストリー, **47**: 850-851.
82) 三谷政昭、1987、デジタルフィルタデザイン、昭晃堂
83) 宮崎　仁、1991、基礎から学ぶフィルタ回路の全て（アクティブフィルタの実際）、トランジスタ技術 28: 440-451.
84) 米澤明憲、1988、オブジェクト指向計算の現状と展望、情報処理 **29**: 290-294.

本論文に関連する報告

原著論文

1. Kishimoto, M., Kitta, Y., Takeuchi, S., Nakajima, M., Yoshida, T. 1991. Computer control of glutamic acid production based on fuzzy clusterization of culture phases. J. Ferment. Bioeng. 72: 110-114.

2. Siimes, T., Nakajima, M., Yada, H., Asama, H., Nagamune, T., Linko, P., Endo, I. 1992. Object-oriented fuzzy expert system for on-line diagnosing and control of bioprocesses. App. Microbiol. Biotech. 37: 756-761.

3. Siimes, T., Nakajima, M., Yada, H., Asama, H., Nagamune, T., Linko, P., Endo, I. 1992. Knowledge-based diagnosis of inoculum properties and sterilization time in lactic acid fermentation. Biotechnol. Techn. 6: 385-390.

4. von Numers, C., Nakajima, M., Asama, H., Linko, P., Endo, I. 1994. A knowledge based system using fuzzy inference for supervisory control of bioprocesses. J. Biotechnol. 34: 109-118.

5. Nakajima, M., von Numers, C., Yada, H., Siimes, T., Pokkinen, M., Endo, I., Linko, P. An on-line advisory control system for lactic acid fermentation process. App. Microbiol. Biotech. in press.

6. Nakajima, M., Kishimoto, M., Yoshida, T. Monitoring culture phase transition by use of rate ratio and normalized rate gradient. Biotenol. Bioeng. submitted.

プロシーディングス等

1. Nakajima, M., Siimes, T., Yada, H., Asama, H., Nagamune, T., Linko, P., Endo, I. 1992. Knowledge based diagnosis in lactic acid fermentation.

In Modelling and control of biotechnical processes. Karim, M.N. and Stephanopoulos, G. (eds) Pergamon Press, Oxford: 179-183.

2. Nakajima, M., Siimes, T., Yada, H., Asama, H., Nagamune, T., Linko, P., Endo, I. 1992. Knowledge-based diagnosis of inoculum properties in lactic acid fermentation. In Biochemical Engineering for 2001 S. Furusaki, I. Endo and R. Matsuno (eds), Springer Verlag, Tokyo: 681-684.

3. Nakajima, M., Siimes, T., Yada, H., Asama, H., Nagamune, T., Linko, P., Endo, I. 1992. On-line diagnosis system in lactic acid process. In Proc. of ISKIT'92., Iizuka: 281-283.

4. Siimes, T., Linko, P., Yada, H., Nakajima, M., Asama, H., Endo, I., 1992. Knowledge-based diagnosis of inoculum properties and media sterilization time in lactic acid fermentation. In Abstract Book of the Japanese-Finnish Workshop on Bioprocess Engineering, Wako: 3.

5. von Numers, C., Nakajima, M., Yada, H., Linko, P., Endo, I. 1993. An on-line fuzzy reasoning system for bioprocess control. In Proc. of EUFIT'93., Aachen, l: 270-274.

6. Nakajima, M.,von Numers, C., Nagamune, T., Linko, P., Endo, I., 1993. Application of fuzzy expert system for on-line diagnosis in lactic acid fermentation. In Abstract Books, 6th European Congress on Biotechnology, Florence, Italy, 1: MO209.

7. Siimes, T., Nakajima, M., von Numers, C., Asama, H., Nagamune, T., Endo, I., Linko, P. 1993. The application of fuzzy inference in knowledge based bioprocess control. In Abstract Books, 6th European Congress on Biotechnology, Florence, 2: TU040.

8. Kishimoto, M., Kitta, Y., Takeuchi, S., Nakajima, M., Yoshida, T., 1993. Computer control of glutamic acid production based on fuzzy clustering of culture phases. Bioproducts and Bioprocesses 2, Yoshida, T. and Tanner, R.D. (Eds.), Springer Verlag,

Berlin: 23-29.

9. Endo, I. Asama, H. Nakajima, M., Nagamune, T., Siimes, T., Linko, P., 1993. On-line diagnosing system for fed-batch fermentation.
Bioproducts and Bioprocesses 2, Yoshida, T. and Tanner. R.D. (Eds.), Springer Verlag, Berlin: 165.

10. Endo, i., Nakajima, M., Siimes, T., von Numers, C., Linko, P. 1994. Advanced control of bio-chemical reaction process by using expert system. In Proc. of Asian Control Conference., Tokyo, 2: 299-302.

その他の業績

原著論文

1. Kishimoto, M., Alfafara, C.G., Nakajima, M., Yoshida, T. 1989. The use of the Maharanobis and modified distances for the improvement of simulation of glutamic acid production.
Biotechnol. Bioeng. 33: 191-196.

2. Siimes, T., Linko, P., von Numers, C., Nakajima, M., Endo, I. Real-time fuzzy knowledge-based control of baker's yeast production.
Biotenol. Bioeng. in press.

謝辞

本研究に対して終始ご懇篤なるご指導を賜りました吉田敏臣教授に心より感謝の意を表します。また、終始有益なご助言とご鞭撻を賜りました理化学研究所の遠藤　勲主任研究員に深く感謝の意を表します。さらに、本研究の進行に際し、様々なご指導を賜りました現東京理科大学岸本通雅助教授に感謝の意を表します。併せて、有益なご助言とご激励を賜りました東京大学の長棟輝行教授に深く感謝いたします。さらに、有益なご助言とご鞭撻を賜りましたＰｅｋｋａ　Ｌｉｎｋｏ教授、Ｙｕ－Ｙｅｎ　Ｌｉｎｋｏ先生に深く感謝いたします。

また、有益なご助言を賜りました今中忠行教授、卜部　格教授、大嶋泰治教授、塩谷捨明教授、新名惇彦教授、菅　健一教授、二井将光教授、山田靖宙教授に厚く感謝いたします。

併せて、有益なご助言とご激励を賜りました現北海道大学木下晋一教授、関　達治助教授、藤山和仁助手、理化学研究所淺間　一研究員、養王田正文研究員、尾高雅文研究員、嘉悦早人氏に厚く感謝いたします。

また、本研究の共同研究者としてご協力いただきました清水康之氏、原田巧貴氏、Ｃａｔａｌｉｎｏ　Ｇ．　Ａｌｆａｆａｒａ氏、矢田秀雄氏、Ｔｅｒｈｉ　Ｓｉｉｍｅｓさん、Ｃａｍｉｌｌａ　ｖｏｎ　Ｎｕｍｅｒｓさん、鈴木秀之氏、橘田洋一氏、辻　一政氏、淵上哲司氏を始めとする大阪大学工学部生物工学国際交流センターの皆様、理化学研究所化学工学研究室の皆様、ヘルシンキ工科大学化学工学科の皆様、さらに東京理科大学基礎工学部岸本研究室の皆様に感謝いたします。

併せて、本研究を始めるきっかけを作っていただき、有益なご助言とご激励を賜りました故田口久治教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、経済的にも精神的にも惜しみないご助力をいただきました父、中嶋二郎、母、中嶋佐喜子に心より感謝いたします。