

제 1회 생물화공 경시대회

일시 : 2000.9.23.

문제 I. 단백질의 용해도는 염(Salt)농도에 의하여 많은 영향을 받는다. 이러한 원리를 이용하여 염석(salting out)이라는 침전법이 단백질의 분리에 널리 사용되고 있다. 단백질A와 단백질B가 혼합되어 있는 수용액에서 각각의 단백질을 황산암모늄[(NH₄)₂SO₄]을 이용해 침전분리하고자 한다.

용액의 이온강도에 따른 각 단백질의 용해도는 다음과 같은 식으로 표현된다. 단백질의 침전에서 각 단백질의 상호영향은 없다고 가정한다.

$$\log(S_A) = \beta_A - k_A \mu$$

$\log(S_B) = \beta_B - k_B \mu$
여기서, S는 단백질의 용해도 (g/L), k와 β : 상수, μ : 용액의 이온강도 (mol/L)를 나타낸다. 용액의 이온강도는

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 C_i$$

여기서, z_i 는 이온의 전하, C_i 는 용액중 이온의 농도 (mol/L)를 나타낸다.

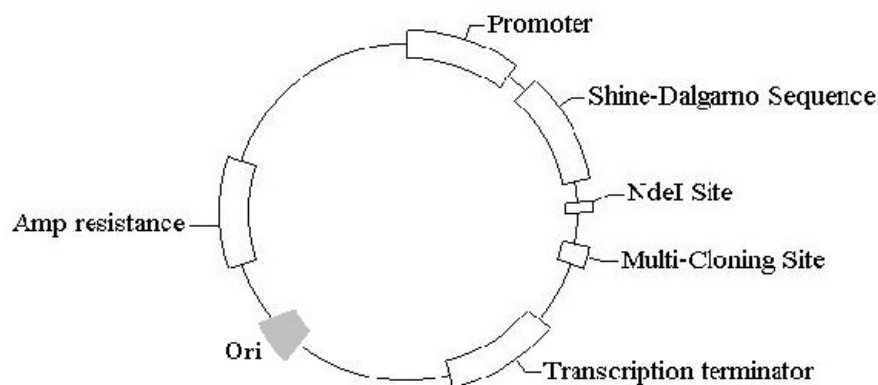
- 1) 황산암모늄을 첨가할 때 단백질이 침전하는 이유를 설명하시오. (20%)
- 2) 초기 용액내 단백질 A의 농도를 S_{A0} (g/L)라 할 때 단백질 A가 침전하기 시작할 때의 이온강도를 구하고 단백질 A의 회수율을 이온강도의 함수로 표현하시오. 단 초기 단백질 수용액내의 염농도는 무시한다. (30%)
- 3) 초기 수용액 내에 단백질 A와 B가 $10^{0.5}$ g/L씩 동일한 양이 용해되어 있다고 가정하자. 단백질 A, B에 대한 상수 k_A , k_B 가 각각 0.75, 0.25 L/mol 이고 β_A 및 β_B 값이 각각 4.25, 1.25 일 때 순수한 단백질 B를 분리하기 위한 황산암모늄의 최대 농도 (mol/L)를 구하시오. (30%)
- 4) 3)과 같은 단백질 혼합용액에서 순수한 단백질 A를 회수하기 위한 다단계 조작 방법을 설명하시오. (20%)

문제 II. 사람이 입는 상처의 치유를 촉진하는 유전자 (hWHF)가 사람으로부터 새롭게 발견되어 이를 대장균으로부터 대량으로 생산하여 치료에 이용하고자 한다.

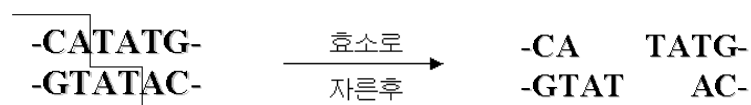
1) 유전자조작에 관련된 다음 물음에 답하시오 (65%).

- ① 이를 위해 대장균에서 복제 (replication)되는 플라스미드 (plasmid)인 pBR322를 근간으로 하여 만들어진 그림 2-1과 같은 발현벡터 (expression vector)에 그림 2-2와 같은 hWHF 유전자의 상보 DNA (cDNA, complementary DNA)를 클로닝하고자 한다. 완전한 단백질을 생산하기 위해 어떻게 클로닝할 것인가를 주어진 제한효소를 이용해 설계하고 이 때 클로닝이 완료된 발현 벡터를 그려보시오. 이 때, 발현벡터를 만드는 과정과 이렇게 만들어진 발현벡터로부터 단백질이 만들어지는 이유도 설명하시오. 그리고, 그 이유도 설명하시오 (30%). (단, 그림 2-1에서 변동이 없는 부분도 포함하여 그리시오).

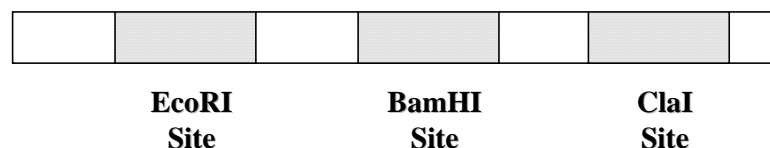
그림 2-1. 발현 벡터



ㄱ. NdeI site :



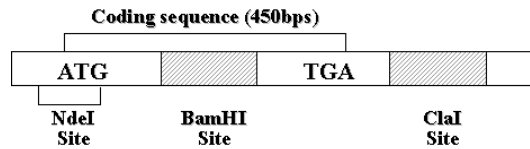
ㄴ. Multi-cloning site :



ㄷ. Amp^r : Ampicillin resistance gene

ㄹ. Ori : Origin of replication

그림 2-2. hWHF의 cDNA

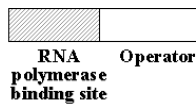


Coding Sequence - 단백질을 만드는데 사용되는 염기로 이 경우 ATG로부터 TGA까지를 이용하여 만들어지는 단백질이 실제 치료에 이용되는 단백질임

(단, 그림 2-1과 2-2에 나오는 제한효소의 자리는 발현벡터와 cDNA에서 한번만 (unique) 나타난다)

- ② 그림 2-1에서 사용된 프로모터는 그림 2-3과 같이 구성되어 있다. 이 운전자 (operator)에는 억제인자 (repressor) (o로 표시)가 결합하여 그 발현을 억제하다가 유도체 (inducer)가 투입되면 유도체가 억제인자와 결합하여 전사 (transcription)가 시작된다. 이 과정을 그림으로 설명하시오 (20%).

그림 2-3. 프로모터



- ③ 유도 (induction)에 의해 만들어진 mRNA는 다음과 같으며 이 mRNA로부터 번역 (translation)에 의해 단백질 hWHF가 만들어진다. 이 때 Shine-Dalgarno sequence가 하는 역할에 대해 설명하시오. 초기에 만들어지는 단백질의 아미노산의 수는 얼마일 것으로 예상되는가? (15%)

2) 반응기를 이용한 배양에 대한 다음 물음에 답하시오. (35%)

- ① 이렇게 만들어진 발현벡터를 대장균 숙주에 형질변환시켰다. 이 때 실수로 ampicillin을 넣는 것을 잊어버렸다. 대장균이 성장하는 동안에 세포 내에 들어있는

프라스미드는 어떻게 되며 그 이유는? (15%)

- ② 이 hWHF를 생물반응기 (bioreactor)를 이용하여 생산하고자 한다. 이 때 단위 생물 반응기 한 batch 당 최대의 hWHF를 생산하기 위해서는 (단위 batch당 세포 수) \times (세포당 hWHF의 양)이 최대로 되는 것이 바람직하다. 이러한 배양조건을 찾기 위해 실험실에서 할 수 있는 구체적인 실험방법을 디자인 해보시오. (20%)

문제 III. *Zymomonas mobilis*가 일반적으로 발효에 이용되는 육탄당 (hexose) 즉 glucose 외에 xylose와 같은 오탄당 (pentose)도 이용할 수 있도록 유전적으로 재조합 되어져 왔다.

이 균주의 Monod parameter들은 glucose를 이용하여 성장시에 $\mu_{\max}=0.40 \text{ hr}^{-1}$, $K_s=0.1 \text{ g/L}$, $Y_{x/s}=0.11 \text{ g} \cdot \text{cell/g} \cdot \text{glucose}$, $Y_{p/s}=0.48 \text{ g ethanol/g glucose}$ 이고, Xylose를 이용하여 성장시는 $\mu_{\max}=0.30 \text{ hr}^{-1}$, $K_s=0.5 \text{ g/L}$, $Y_{x/s}=0.10 \text{ g} \cdot \text{cell/g} \cdot \text{xylose}$, $Y_{p/s}=0.45 \text{ g ethanol/g xylose}$ 이다.

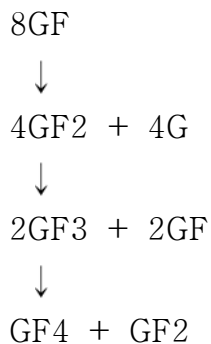
그러나 glucose 농도가 0.2g/L 이상일 경우, xylose를 이용한 성장이 억제 (repression) 를 받는다.

이 균주를 연속배양기(chemostat)에서 배양하며 50g/L glucose와 50g/L xylose를 함유하고 있는 배지를 연속적으로 공급(feeding)할 때 정상상태(steady state)에서 자라고 있는 균주의 최대 에탄올 생성 속도 (Maximum ethanol production rate)를 구하여라. (사용된 모든 합당한 가정을 기술하고 문제를 푸시오) (100%)

문제 IV. 설탕으로부터 생산되는 프락토올리고당 (fructooligosaccharides)은 비피더스 (Bifidus)활성, 저칼로리, 칼슘흡수촉진 등의 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있어 건강식품 소재로 쓰이고 있는 기능성 당류이다. 프락토올리고당은 sucrose에 fructose moiety가 1-8개 붙어있는 올리고당의 혼합체로서 현재 시판되고 있는 올리고당의 주요성분과 함량은 다음과 같다.

구 분	성 분	구 조	분자량	고형분 중 함량 (%)
일반당	glucose	G	180	28
	sucrose	GF	342	16
	sub-total			44
프락토올리고당	1-kestose	GF2	504	40
	nystose	GF3	666	15
	fructofuranosyl nystose	GF4	828	1
	-	GF5	990	0
	sub-total			56
	total			100

이때 프락토올리고당 성분 중 비피더스 (Bifidus) 활성이 가장 높은 1-kestose의 함량이 높을 수록 좋은 제품이다. 프락토올리고당은 fructosyltransferase라는 효소에 의하여 다음과 같은 연속반응(series reaction)에 따라 생성된다. (GF5 이하는 반응 정도가 미미하므로 생략)



즉 8분자의 sucrose에서 4분자의 1-kestose가 생성되고 4분자의 glucose가 남게 된다. 이어서 생성된 1-kestose가 다시 효소의 기질로 이용되어 하나의 fructose moiety가 이동되면서 nystose가 생성되고 동시에 같은 수의 sucrose가 만들어진다. 이후에도 이런 반응이 계속된다.

특정한 반응조건 하에서 이 효소반응의 kinetics를 연구한 결과 얻은 kinetic

parameter들은 다음 표와 같다.

substrate	$K_m(\text{g/L})$	$v_m(\text{g/L}\cdot\text{h})$
sucrose (S)	$K_{mS} = 330$	$v_{mS} = 120$
1-kestose (K)	$K_{mK} = 750$	$v_{mK} = 25$
nystose (N)	$K_{mN} = 850$	$v_{mN} = 15$

- 1) 본 반응에서 부산물로 생성되는 glucose 영향을 알아보기 위하여 sucrose를 기질로 이용한 효소반응에서 glucose challenge(투입) 실험을 수행한 결과 다음과 같은 실험 data를 얻었다.

S (g/L)	v (g/L·h)	
	without glucose (G = 0)	with glucose (G = 40 g/L)
100	30	15
200	49	27
300	62	36
400	71	44
500	78	51
600	84	57

이 data로부터 glucose(G)의 저해(inhibition) 종류를 판정하고 저해계수 (K_I) 구하여라 (20%).

- 2) 이 효소반응 시스템의 반응속도식을 완성하라. (분자량의 차이를 고려할 것) (30%)

$$dS/dt =$$

$$dK/dt =$$

$$dN/dt =$$

$$dG/dt =$$

단, glucose의 저해는 sucrose가 기질일 경우에만 발생한다.

- 3) 위의 반응속도식을 이용하여 500 g/L의 sucrose를 기질로 효소반응시 1-kestose 농도가 최대가 되는 시간 및 그 때의 총당 중의 1-kestose의 함량(%)을 구하여라.

연립미분방정식의 해를 구하기 위해 Numerical method (Finite Difference Method)를 적용한다. 즉, $dS/dt = f(S, K, G)$ 일때,

$dS/dt = \Delta S / \Delta t = (S_{n+1} - S_n) / \Delta t = f(S_n, K_n, G_n)$ 가 성립하는 것으로 가정하고 $\Delta t = 5 \text{ hr}$ 로 설정한다. (dK/dt , dN/dt , dG/dt 도 동일방법 적용) (30%)

- 4) 프락토올리고당은 1-kestose의 함량이 높을수록 부가가치가 높아진다. 1-kestose의 함량을 획기적으로 높일수 있는 실용적인 방법을 제안하여 보라. (20%)

1

: 2000.9.23

(1) (4) .

1) (10) 가 .
() - 5
(activity)가 salt
가 - 5

2) (15) S_{AO} 가 A 가

$$\log S_{AO} = \beta_A - k_A \mu$$

$$\therefore \mu = \frac{\beta_A - \log S_{AO}}{k_A} \quad 5 \text{ points}$$

$$= \frac{S_{AO} - S_A}{S_{AO}} = 1 - \frac{S_A}{S_{AO}}$$

$$= 1 - \frac{10^{(\beta_A - k_A \mu)}}{S_{AO}} \quad 10 \text{ points}$$

3) (15) 가 A B 가 .

$$\log(10^{0.5}) = 4.25 - 0.75\mu$$

$$\therefore \mu = 5 \text{ mol/L} \quad 5 \text{ points}$$

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 C_i$$



$$\therefore \frac{1}{2} (1^2 \cdot 2x + (-2)^2 \cdot x) = 5$$

$$\therefore x = 1.67 \text{ mol/L} \quad 10 \text{ points}$$

4) (10) (i) $\mu = 5 \text{ mol/L}$ B
(ii) $\mu = 5 \text{ mol/L}$ A 가 B

(iii) (ii)

(iv) B

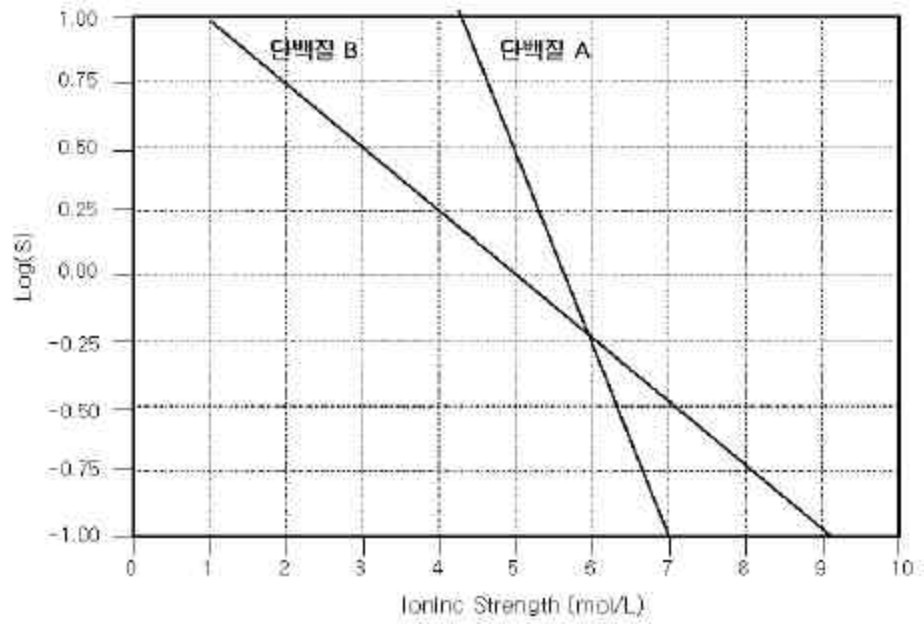
-
-

10

A 가

B

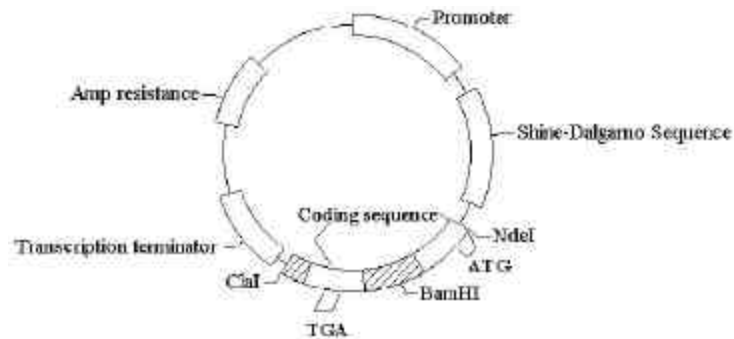
5



2.

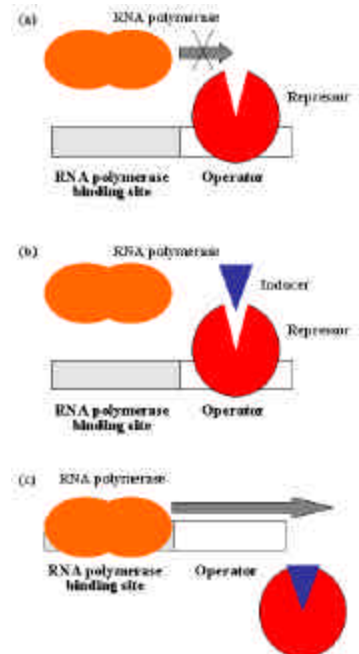
1) (30)

(1) 2-1 Ndel site start codon ATG
 2-2 hWHF hWHF cDNA
 Ndel site Clal site DNA (coding sequence)
 2-1 Ndel Clal DNA



Promoter mRNA 가 transcription transcription terminator mRNA Shine-Dalgarno translation
 sequence downstream ATG(AUG) (hWHF)
 TGA(UGA)

(2) (20) repressor inducer 가 operator RNA
 polymerase 가 RNA polymerase binding site
 transcription 가,
 inducer 가 가 repressor 가 operator
 RNA polymerase 가 RNA polymerase
 binding site transcription



(3) (15) Shine-Dalgarno sequence
 ribosome start codon
 ATG , ribosome
 Sine-Dalgarno sequence
 sequence 가 가 ATG translation

hWHF cDNA start codon (ATG) stop codon (TGA) 가 450 bp .
TGA amino acid codon 3
amino acid (450-3)/3 = 149 .

2)

(1) (15) plasmid 가 가
가
plasmid 가 , , plasmid 가
plasmid 가
가 . , ampicillin selection plasmid
가
가

(2) (20) batch 가
inducer inducer 가
hWHF
가 inducer
inducer
hWHF
inducer
가
hWHF
hWHF
batch hWHF

()

1) (65)

(1) (30)

(1) 10

(2) 10

(3) () 10

(1) DNA

(2) *(가) 2-1 10 NdeI ClaI

backbone DNA fragment
*() 2-2 hWHF cDNA NdeI ClaI DNA fragment
4

(가) () DNA fragment (ligation) 2
(3) Promoter transcription promoter transcription
terminator mRNA 가 mRNA 가
5 5 (hWHF)가
5

(2)(20)

(1) 10

(2) 10

(1) * inducer 가 repressor 가 operator binding
RNA polymerase 가 repressor RNA
polymerase binding site 4
*Inducer 가 repressor binding repressor-inducer complex 가
operator 4
*RNA polymerase 가 repressor 가 binding RNA
polymerase binding site transcription
2

(2) * inducer 가 repressor 가 operator binding
RNA polymerase 가 repressor RNA
polymerase binding site 4
*Inducer 가 repressor binding repressor-inducer complex 가
operator 4
*RNA polymerase 가 repressor 가 binding RNA
polymerase binding site transcription
2

(3)(15)

(1) Shine -Dalgarno sequence 8

(2) Amino acid 7

(1) Shine -Dalgarno sequence ribosome binding 2
sequence binding ribosome sequence downstream
ATG translation 6 translation initiation
(3) amino acid 3 base codon 150 amino
acid 가 4
Stop codon TGA (UGA) amino acid 가 149
amino acid 3

2) (35)

(1) (15)

* plasmid 가 random 가 가
가 5
*Ampicillin plasmid 가 가
(plasmid)
5
* plasmid 가 가 5

(2) (20)

: 가 가

.
* hWHF (10)
() * Inducer 5
* Inducer
5
* inducer inducer 가
hWHF
가 10

3

1) substrate 가 glucose
 가 0.2 g/L (critical concentraion) xylose 가
 glucose substrate 가
 standard chemostat (5).

Ethanol growth -associated fermentation process 가 ,
 growth -associated production constant (in Leudeking - Piret equation)
 .? ?
 ? ? ? ? $\frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} = 0.48/0.11 = 4.36$ g ethanol/ g cell mass
 ethanol growth associated fermentation process 가 cell
 가 가 ethanol 가 μ_{max} 가 optimum dilution
 rate (D_{opt}) ethanol 가 (5).

D_{opt}
 $D_{opt} = m_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_f}} \right)$ (eq. 7.18 from Bailey and Ollis II edition)
 parameter D_{opt} 0.382 hr⁻¹
 (5 -).

optimal dilution rate chemostat glucose

$$S = \frac{DK_s}{(m_{max} - D)} \quad (\text{eq. 7.15 from Bailey and Ollis II edition})$$

glucose parameter
 optimal dilution rate chemostat glucose 2.122 g/l
 0.2 g/L (critical glucose concentration) 가 (glucose
 substrate) (5 -).

ethanol production rate
 ethanol production rate $Y_{p/s} = 0.48$ g ethanol / g glucose
 x (the cell mass concentration)
 ethanol production rate
 ? ? ethanol
 , $Y_{p/s}(S_f - S) = 22.981$ g/L 가 .

ethanol production rate rate(D_{opt})	ethanol	optimal dilution
Ethanol production rate	$D \cdot E = 0.382 \cdot 22.981 = 8.7787$ g ethanol/liter.hour	
가 ,	optimal dilution rate	only glucose

ethanol production rate
optimal dilution rate cell (x) $X = Y_{x/s}(S_f - S)$
(5.267 g cell/l), D_{opt} 8.771g ethanol/liter hour
(10).

2) dilution rate glucose . dilution rate 가
glucose glucose .
 $\frac{m_{MAX} S_{crit}}{K_s + S_{crit}}$ dilution rate glucose glucose
 S_{crit} 가 , $D_{crit} = 0.2667 \text{ hr}^{-1}$ (5).

dilution rate glucose 가 glucose
, xylose 가 dilution rate
dilutin rate glucose, xylose 가
가 .
가 .

(Komoala, D.S., et al.
"Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates" Biotechnology and Bioengineering, 26: 1272-1281, 1984)

MS Excel
dilution rate glucose xylose

$$S = \frac{DK_s}{m_{max} - D}$$

(additive growth) 가 cell glucose xylose 가
(additive growth) dynamic
cybernetic
coupled non-linear algebraic
 $D_{crit} = 0.2666662 \text{ hr}^{-1}$ glucose xylose 가
Chemostat
 $Y_{p/S}(S_f - S)$
 $E_{total} = Y_{p/G}(G_f - G) + Y_{p/X}(X_f - X)$

•

•

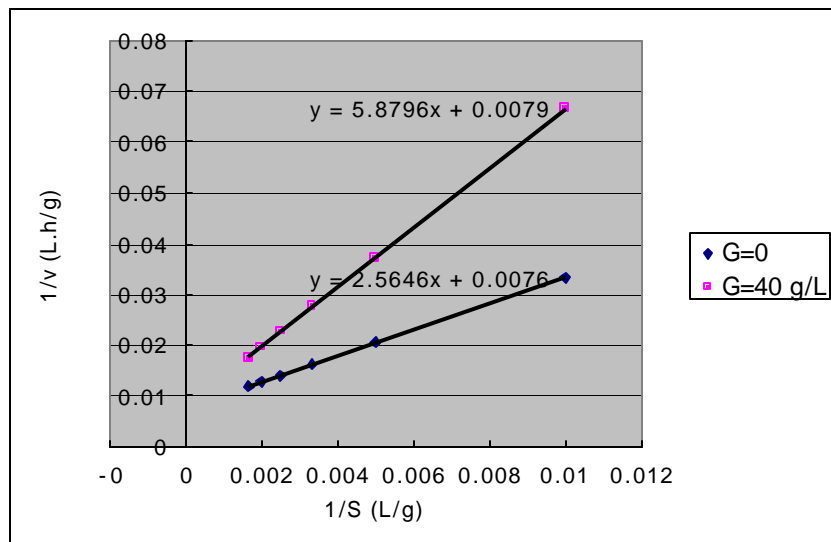
m

1



1) (10) Lineweaver-Burk Plot

S	v		1/S	1/v	
	G=0	G=40		G=0	G=40
100	30	15	0.01	0.0333	0.0667
200	49	27	0.005	0.0204	0.0370
300	62	36	0.00333	0.0161	0.0278
400	71	44	0.0025	0.0141	0.0227
500	78	51	0.002	0.0128	0.0196
600	84	57	0.00167	0.0119	0.0175



y - Competitive inhibition

$$(1 + 40/K_i) = 5.8796/2.5646 \quad K_i = 30.9 \text{ g/L}$$

2) (15)

$$dS/dt = -v_{mS} \times S / \{S + K_{mS}(1+G/K_i)\} + (2 \times 342) / (4 \times 504) \times v_{mK} \times K / (K_{mK} + K)$$

$$dK/dt = -v_{mK} \times K / (K_{mK} + K) + (4 \times 504) / (8 \times 342) \times v_{mS} \times S / \{S + K_{mS}(1+G/K_i)\} + (1 \times 504) / (2 \times 666) \times v_{mN} \times N / (K_{mN} + N)$$

$$dN/dt = -v_{mN} \times N / (K_{mN} + N) + (2 \times 666) / (4 \times 504) \times v_{mK} \times K / (K_{mK} + K)$$

$$dG/dt = (4 \times 180) / (8 \times 342) \times v_{mS} \times S / \{S + K_{mS}(1+G/K_i)\}$$

3) (15) Numerical method

$$dS/dt = -120S/(S+330(1+G/30.9)) + 8.48K/(K+750)$$

$$dK/dt = -25K/(K+750) + 88.4S/(S+330(1+G/30.9)) + 5.68N/(N+850)$$

$$dN/dt = -15N/(N+850) + 16.5K/(K+750)$$

$$dG/dt = 31.6S/(S+330(1+G/30.9))$$

	t = 0 hr	t = 5 hr	t = 10 hr	t = 15 hr
S	500	138.6	93.7	69.9
K	0	266.3	274.8	267.9
N	0	0	21.6	41.9
G	0	95.2	109.9	119.2
Total	500	500.1	500.0	498.9

t = 10 hr K = 274.8 g/L 55.0%

4) (10)

- Chromatographic separation
- Glucose oxidase ion exchange resin gluconate
- Glucose sucrose

OK