**제18회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)**

**(생물분리 및 정제 부문)**

1. **혼합되어 있는 단백질들을 분리하기 위해 다양한 크로마토그래피 방법이 사용된다. 아래와 같은 특징을 갖는 세가지 단백질을 크로마토그래피 방법으로만을 사용하여 분리하고자 할 때, 사용해야하는 크로마토그래피 방법 (분리조건 포함)을 제시 하고 사용한 크로마토그래피 원리를 설명하시요.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **단백질** | **분자량 (kDa)** | **등전점 (pI)** |
| **A** | **100** | **6** |
| **B** | **50** | **6** |
| **C** | **50** | **10** |

**해답)**

1. **단백질 A는 단백질 B와 C와 비교하여 분자량이 크기 때문에 Gel (or size-exclusion) chromatography를 이용하여 분리가 가능하다. Column에 단백질 혼합물을 loading하여 이동을 하게 되면, 분자량이 큰 A 단백질이 먼저 통과를 하게되고, 분자량이 작은 B와 C 단백질이 상대적으로 늦게 통과를 하게 되어 분리가 가능하다.**

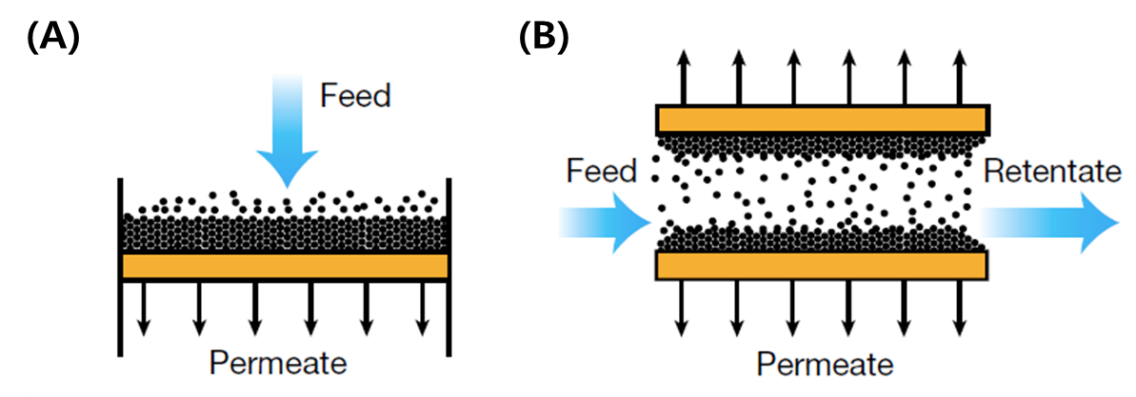
**원리: Gel chromatography column은 특정 pore size를 갖는 microbead로 구성되어 있다. 분자량이 작은 단백질은 microbead 내부를 통과하면서 내려오는 반면에 분자량이 큰 단백질은 microbead 내부에 들어가지 못하고 바로 내려오기 때문에 상대적으로 column을 통과하는 시간이 짧다. 즉, column chromatogram에서 앞쪽 peak에 나오는 단백질은 분자량이 큰 단백질이고, 뒤쪽 peak에 나오는 단백질은 분자량이 작은 단백질이다.**

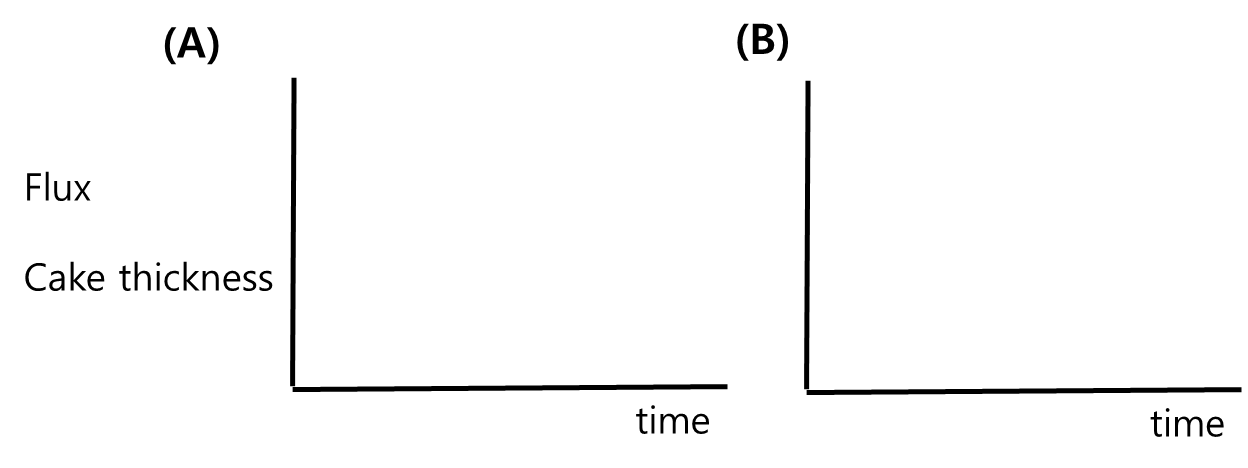
1. **다음, B와 C는 각각의 등전점이 다르기 때문에 ion exchange column chromatography를 사용하여 분리할 수 있다. 이동상 buffer의 pH를 8로 하게되면 등전점이 8보다 낮은 단백질 B는 음전하를 갖게 되고, 등전점이 8보다 높은 단백질 C는 양전하를 갖게 된다. Cation exchange column을 사용하면, 음전하를 갖는 단백질 B는 column에 남아 있지 못하고 빠져나가게 되며, 양전하를 갖는 단백질 C는 column에 남아 있게되어 서로 분리가 가능하다. B가 완전히 빠져나간뒤에 고농도의 salt (NaCl등)을 흘려보내주게 되면 단백질 C도 column에서 빠져나오게 된다. Cation exchange column 대신에 anion exchange column을 사용하게 되면 반대로 단백질 B가 column에 남아 있게 되고, 단백질 C는 빠져나오게 된다. 다시 고농도의 salt 용액을 넣어줌으로써 단백질 B를 빠져나오게 할 수 있다.**

**참고: (1)과 (2)의 순서를 바꾸어서 사용하여도 정답임.**

**원리 : 단백질마다 고유의 등전점을 갖고 있고 buffer pH의 조건에 따라 서로 다른 전하를 갖게 되며, 이 차이를 이용하여 분리하는 방법이다. Cation exchange column은 양전하를 갖는 단백질에 높은 친화력을 갖으며, 반대로 anion exchange column은 음전하를 갖는 단백질에 높은 친화력을 갖는다. 목적 단백질의 전하에 따라 적절한 ion exchange column을 선택하여 분리할 수 있다.**

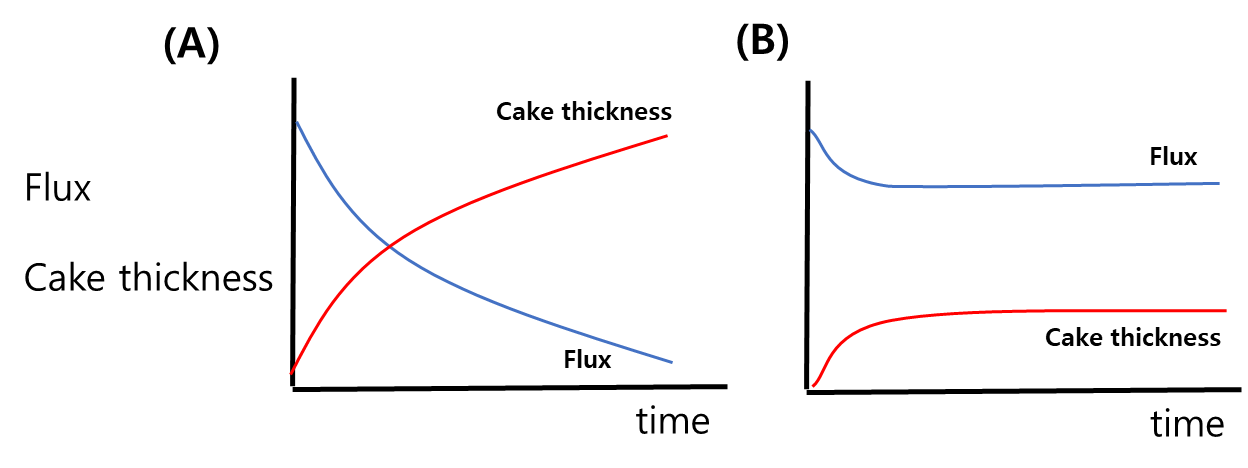
1. **미생물 배양후 세포외로 생산된 Product를 분리정제하기 위해 크게 두가지 Filtration 방법이 사용된다 (아래 그림). 각 Filtration의 명칭을 기술하고 각 방법에서 시간에 따른 Flux와 Cake thickness의 변화를 그래프로 나타내시오.**

****

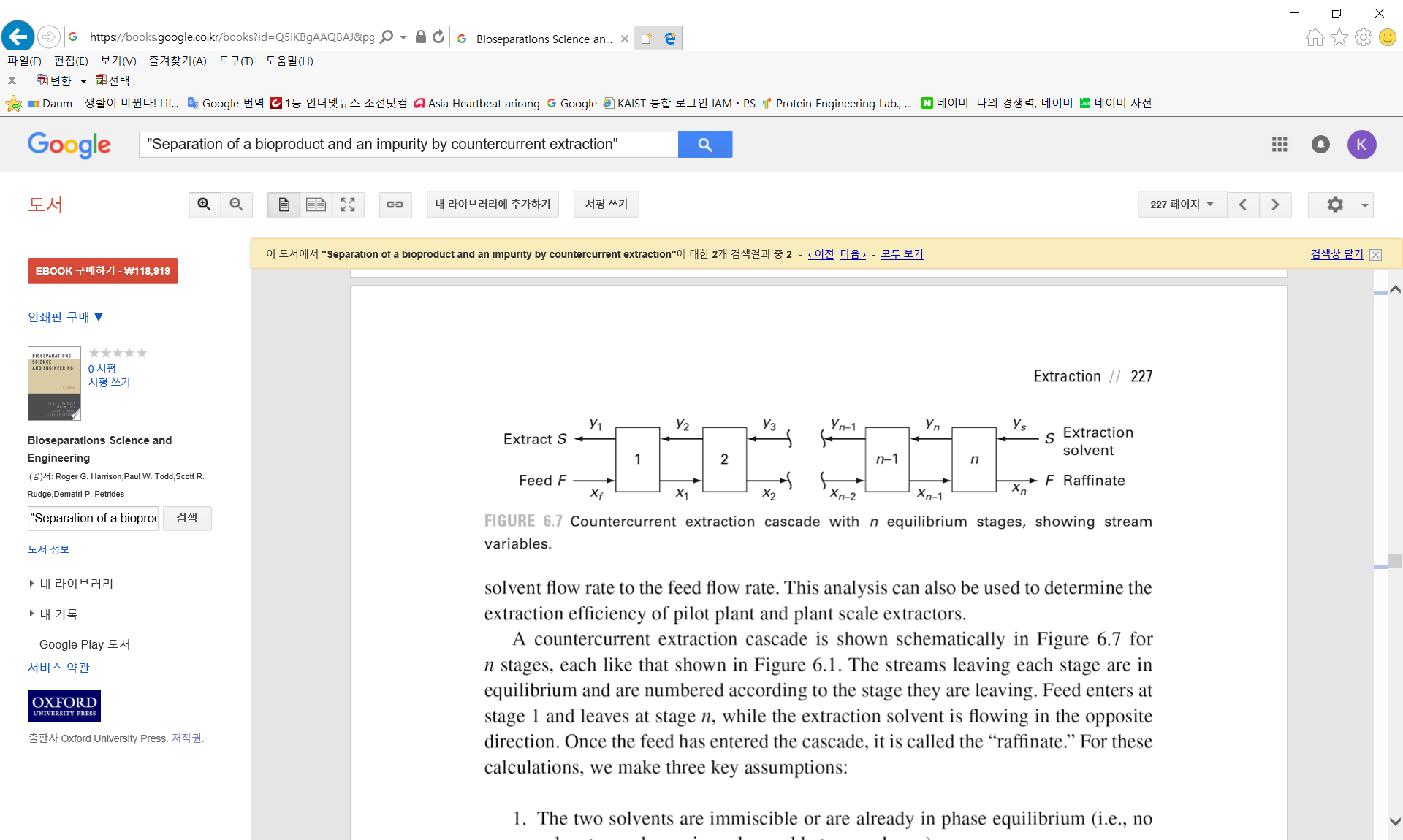
****

**[해답]**

1. **명칭 : (A) Conventional (or Dead-end) filtration, (B) Crossflow Filtration**
2. **시간에 따른 변화**

****

1. **4 stage로 구성된 Countercurrent extractor(아래 그림 n=4)를 이용하여 목적 bioproduct를 불순물이 섞여있는 용액으로부터 분리해내고자 한다. Feed stream에서 불순물의 함량은 bioproduct 총 무게의 10%이다. Feed stream과 혼합되지 않은 solvent를 사용하여 extaction을 수행할 때, Bioproduct의 Partition coefficient K의 값은 10이고, 불순물의 K 값은 1이다. S/F = 0.2일 때, extractor의 outlet 에서 extract phase에 존재하는 불순물의 bioproduct에 대한 상대적 비율(ratio of impurity to bioproduct in the extract)을 계산하시오.**

****

**[해답]**

**초기 feed 용액 대비 4단계의 증류과정을 거쳐 나오게 되는 용액에서의 bioproduct 및 불순물의 비율()을 계산하면 아래와 같다**

**Bioproduct :**

**불순물 (impurity) :**

**Feed solution에서 100g 의 Bioproduct를 가지고 extraction을 시작하였다고 가정한다면 불순물의 양은 bioproduct의 10%이기 때문에 outlet에서 bioproduct대비 불순물의 비율은 아래와 같이 계산할 수 있다.**

**ratio of impurity to bioproduct in the extract =**