정답지

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(효소공학 부문)

1. (1) ① 상기 담체에 고정화된 Chymotrypsin의 상대활성에 대한 pH profile은 알칼리성 쪽으로 이동할 것이다.

② 왜냐하면, 담체가 음전하를 띄면 담체 주변에는 양전하를 갖는 H^+ 이온이 표면에 상대적으로 많게 되어 용액의 pH(겉보기 pH)보다 담체표면의 pH가 낮아진다. 즉, 담체 주변의 pH는 용액상의 겉보기 pH 값보다 낮은 상태가 되므로, 고정화된 효소의 최적 활성은 겉보기 pH가(용액상의 pH)가 더 알칼리성 쪽에서 나타난다.

(2) ① 기질이 용액에서 고정화효소의 표면까지 갈 때 나타나는 경막확산저항(film diffusion resistance)과 담체의 표면에서 담체 내부에 있는 촉매까지 확산해 들어갈 때 발생하는 세공확산저항(pore diffusion resistance)

② 고정화되지 않은 효소의 pH profile과 비교하여, 최적 pH에서의 효소활성을 기준으로 낮은 pH와 높은 pH에서 상대활성값이 더 높게 나타나 전체적으로 pH profile이 둔탁하게 나타날 수 있다.

③ 경막확산저항은 담체 주변의 유체의 흐름을 빠르게 함으로써 줄일 수 있고, 세공확산저항은 담체의 크기를 작게 함으로써 줄일 수 있다.

2. (1)

- Rational design: X-ray crystallography 등의 방법을 통해 얻어진 단백질의 3차원 구조를 기반으로 컴퓨터 기반의 분자모델링 (molecular docking, molecular dynamics 등)을 적용하여 목적에 맞는 효소 성능 (촉매활성, 열안정성, 기질특이성 등) 개량과 관련된 핵심 아미노산을 선정하고 site-directed mutagenesis 기법을 적용하여 적합한 아

정답지

미노산으로 치환된 개량형 효소 변이체를 얻는 방법. Rational design의 장점은 단백질의 3차원 구조와 컴퓨터 모델링을 통해 이론적이고 합리적인 접근을 통한 방식으로 변이체를 얻을 수 있고, directed evolution에 비해 실험 노동력 및 설비/장비 투자의 부담이 적다는 것이다. 단점은 단백질의 3차구조 정보가 필요하다는 것이고, 또한 단백질 구조 및 컴퓨터 모델의 정확도가 충분히 높지 않은 경우 효소 개량의 성공 확률이 낮다는 것이다.

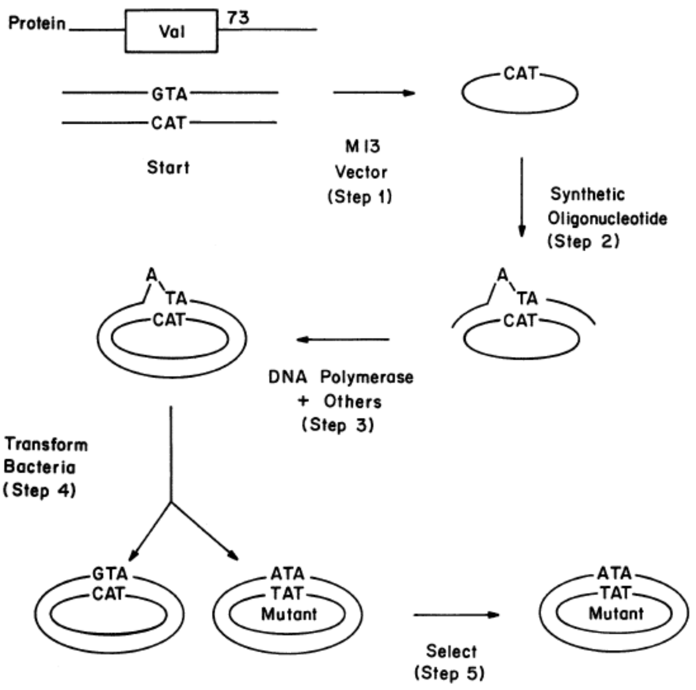
- Directed evolution: 단백질의 3차원 구조 정보에 의존하지 않으며, 해당 효소를 코딩하고 있는 유전자의 random mutagenesis에 의한 라이브러리 생성 단계와 screening 및 selection 단계를 통해 목적에 맞게 성능이 개량된 효소 변이체를 선택하는 방법. 무작위적 변이체 라이브러리 생성을 위한 대표적인 방법으로는 error-prone PCR과 DNA shuffling 등이 있으며, 최근에는 screening 및 selection 단계에서의 효율을 높이기 위해 HTS (High-Throughput Screening) 장비를 이용하는 것이 일반적이다. Directed evolution의 장점은 단백질의 3차구조 정보가 필요 없으며, 라이브러리 생성 기법 및 HTS 장비의 발전에 힘입어 효소 성능 개량의 성공 확률이 높아지고 있다는 것이다. 단점은 실험 노동력 및 설비/장비 구비를 위한 비용 부담이 높다는 것과 개량 목적에 맞는 screening 및 selection 기법을 별도로 개발할 필요가 있다는 점이다. 또한 성능 개량의 목적을 달성하더라도 구조를 기반으로 한 이론적 측면에서의 논리적 근거를 알 수 없다는 단점이 있다.

(2) 다음의 5단계 실험법을 통해 설명할 수 있다.

- 1단계: 해당 유전자를 M13에 클로닝한다.
- 2단계: 돌연변이를 적용할 유전자의 영역에 상보적 서열의 primer (올리고뉴클레오타이드)

를 화학적으로 합성한다. 이 때, 이 합성 mutation primer는 원하는 돌연변이를 유발하기 위한 미스매치 뉴클레오티드를 포함하는 형태로 설계한다.

- 3단계: 설계된 mutation primer와 DNA polymerase 등을 이용한 mutation PCR을 진행한다.
- 4단계: 돌연변이 유전자가 포함된 플라스미드를 transformation을 통해 박테리아 세포에 주입한다.
- 5단계: 돌연변이 유전자를 포함하는 박테리아 세포의 콜로니를 selection 하고 배양 후 해당 유전자가 포함된 플라스미드를 추출한다.



정답지

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(분자생물학 부문)

1.

답 1)

기질수준 인산화	산화적 인산화
기질 (인산화 화합물)에서 ADP로 직접 인산기를 전달하여 ATP를 생성	영양소의 화학적 산화에 의해 방출되는 에너지가 ATP 합성에 사용되는 과정. 전자 수송 사슬 관여.
혐기성 조건에서 발생	호기성 조건에서 발생

답 2)

산화적 인산화가 세포 내 에너지 생산에 더 효율적임. 인산화를 강화하기 위해 산화 환원 전위의 큰 차이가 생성됨.

2. (1)

입력신호 1 (Input 1)	입력신호 2 (Input 2)	GFP형광단백질 발현
0	0	
0	1	
1	0	
1	1	

Input 1	input 2	output
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

정답지

2)

입력신호 1 (Input 1)	입력신호 2 (Input 2)	GFP형광단백질 발현
0	0	
0	1	
1	0	
1	1	

Input 1	input 2	output
0	0	1
0	1	1
1	0	1
1	1	0

3)

입력신호 1 (Input 1)	입력신호 2 (Input 2)	GFP형광단백질 발현
0	0	
0	1	
1	0	
1	1	

Input 1	input 2	output
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	0

정답지

3. (1)

- ZFN: 펩타이드와 DNA 간의 결합이 기반이며, 도메인 하나당 3개의 뉴클레오타이드를 인지 한다.
- TALEN: 펩타이드와 DNA 간의 결합이 기반이며, 도메인 하나당 한 개의 뉴클레오타이드를 인지한다.
- CRISPR: RNA 와 DNA 간의 결합이 기반이다.
- CRISPR-Cas 의 장점은 target DNA 와의 결합 방식에 기인한다. crRNA 와 target DNA 간의 결합이기 때문에, 다른 위치의 target DNA 를 목표로 했을 때, crRNA 만 쉽게 바꾸면 해결된다. 반면, ZFN 과 TALEN 의 경우는 peptide 와 DNA 간의 결합이기 때문에, target site 를 바꿀 때마다 매번, peptide 디자인을 바꿔줘야 한다.

(2)

- CRISPR (Clustered Interspaced Short Palindromic Repeats)은 박테리아가 바이러스로부터 보호 할 수 있는 일종의 획득된 면역력으로 사용하는 유전 요소이다. 박테리아에 파지나 플라스미드가 들어오게 되면 외부 DNA 조각(protospace)을 박테리아 유전체 속 반복 서열 사이에 넣게된다. 이 반복된 서열을 CRISPR이라고 한다. CRISPR array에는 두개의 RNA가 암호화 되어 있는데, 하나는 crRNA(CRISPR RNA)이고, 다른 하나는 tracrRNA(trans activating CRPSPR RNA)이다. crRNA는 protospace 부분에서 전사되며, tracrRNA와 결합하여 3차 구조를 형성한다. 두 종류의 RNA는 핵산분해효소가 외부 DNA를 인지하고 자를 수 있도록 도와준다.

(3)

- 유전자 가위는 유전체 내 특정 표적 자리를 잘라내어 DNA 이중가닥 절단 (DSB; DNA double-strand break)을 일으키고, 이에 대응하여 세포는 세포 주기나 상동 유전체의 가용 여부에 따라 NHEJ (비상동말단연결; Non-homologous end-joining) 혹은 HDR (상동재조합수리; homology-directed repair)의 메커니즘으로 DNA 손상을 수리한다.
- NHEJ (비상동말단연결) 는 모든 세포 주기에서 가능한 수리 방식이기는 하지만,

주로 G1 시기와 같이 세포 내에 주형으로 쓸 상동유전체가 없을 때, 절단된 DNA 이중가닥의 끝을 직접 연결하는 방식이다. 이 과정에서 절단 부위를 손질하게 되므로, 종종 indel (insertion or deletion mutation) 이라고 불리는 일부 염기의 손실/추가 현상이 일어나고, 이로 인해 프레임쉬프트 변이가 발생한다. 결과적으로 NHEJ를 거친 유전자는 프레임쉬프트 된 전사체 mRNA를 만들어내고 이들은 넌센스-매개 붕괴 (nonsense-mediated decay)를 겪거나 온전한 길이의 정상 단백질을 합성해내는 데 실패함으로써 제 기능을 상실하게 된다.

- 한편, HDR (상동재조합수리)은 상동유전체를 주형으로 하여 절단 부위 주변을 재조합하여 수리하는 방식으로서 보통은 활발하게 분열하는 세포의 S나 G2/M시기에만 가능한 방식이다. 유전자 편집을 위해서는 유전자 가위와 함께 적당한 상동 염기서열을 갖추고 있는 DNA 주형을 인공적으로 제작하여 세포에 제공함으로써, 표적 자리 주변의 유전자를 임의로 편집하게 된다.

정답지

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(응용미생물학 부문)

1.

1) 대두와 밀에는 starch가 있음 (glucose의 폴리머). Glucose가 glycolysis 과정을 통해 pyruvate로 전환되는데, 산소 없는 발효인 경우 젖산이나 에탄올로 전환됨. 이때 NADH를 cofactor로 소모하게 되는데, glucose를 계속 소비하기 위해서는 NAD+ regeneration을 위해 반드시 필요한 과정임.

2) 산소가 존재하면 pyruvate이 젖산이나 에탄올로 전환되는 것이 아니라 acetyl-CoA 로 전환되면서 아세트산이 생성되고, 이로 인해 식초맛이남.

2.

대사 이름	생장 조건	Electron acceptor	Product	ATP 만들어지는 경로	사용하는 대사
Anaerobic respiration	Anaerobic	Usually an inorganic substance, such as NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}	NO_2^- ,N_2O N_2 H_2S ,CH_4	Oxidative and substrate-level	Variable (fewer than 38 but more than 2)
Fermentation	Aerobic or anaerobic	An organic Molecule, Such as pyruvic acid	Ethanol,lactic acid,butyric Acid,etc.	Substrate-level	2

3.

mRNA 백신: 항원의 정보를 가진 mRNA를 Lipidnanoparticle 운반체에 넣어 백신으로 사용

subunit 백신: 항원 단백질의 subunit을 면역증강제를 추가하여 백신으로 사용

viral 백신: 항원의 DNA 또는 RNA 를 vector에 삽입한 후 사람에게 해가 없는 virus 운반체에 넣

정답지

어 백신으로 사용

4.

Heterolactic fermentation

2 glucose -> 2 lactic acid + 2 ethnaol + 2 CO_2

Bifidum fermentation

2 glucose -> 2 lactic acid + 3 acetic acid

2분자의 포도당을 이용하여 2분자의 lactic acid가 생산되는 것은 같음. CO_2의 발생이 없는 발효를 수행, bifidobacteria의 경우 다른 lactic acid bacteria와 비교하여 strict anaerobe임

정답지

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(생물분리정제 부문)

1.

(1)

Ans) $\frac{X_1}{X_0} = \frac{1}{1+(LK_D/H)}$

위 그림에 대한 물질수지식을 세우면,

$H(X_0 - X_1) = LY_1$

(가정으로부터 H = H1, L = L1이다.)

$X_1 = X_0 - \frac{L}{H}Y_1$

$K_D = Y_1/X_1$이므로,

$\frac{X_1}{X_0} = \frac{1}{1+(LK_D/H)}$이다.

(2)

정답지

Ans) $\frac{X_N}{X_0} = \frac{1}{1+E+E^2+\cdots+E^N} = \frac{E-1}{E^{N+1}-1}$

위 그림에 대한 물질수지식을 세우면,

Stage 1:

$H(X_0 - X_1) = L(Y_1 - Y_2) = LK_D(X_1 - X_2)$

LK_D/H를 E라고 하면,

$X_0 - X_1 = E(X_1 - X_2)$1)

Stage 2:

Stage 1과 유사하게,

$X_1 - X_2 = E(X_2 - X_3)$2)

2) -> 1) 하면,

$X_0 - X_1 = E^2(X_2 - X_3)$3)

Stage N에서, $X_{N-1} - X_N = EX_N$이므로,

$X_0 - X_1 = E^N X_N$4)

따라서, 각 단에서의 물질수지식은 아래와 같이 표현된다.

$X_0 - X_1 = E^N X_N$

$X_1 - X_2 = E^{N-1} X_N$

...

정답지

$X_{N-1}-X_N=EX_N$이므로,

위 식을 모두 더하면,

$X_0-X_N=(E+E^2+\cdots+E^N)X_N$

따라서,

$X_0=(1+E+E^2+\cdots+E^N)X_N$

$$\therefore \frac{X_N}{X_0}=\frac{1}{1+E+E^2+\cdots+E^N}=\frac{E-1}{E^{N+1}-1}=\frac{(LK_D/H)-1}{(LK_D/H)^{N+1}-1}$$

(3).

Ans) 3303 L/min

1단 액-액 추출장치에서 $\frac{X_1}{X_0}=\frac{1}{1+(LK_D/H)}$이므로

$L=(X_0/X_1-1)H/K_D$

위 식에 X_0 = 20 g/L, X_1 = 5 g/L, H = 200 L/min, K_D = 12.05를 대입하면,

L = 49.8 L/min

(4)

정답지

Ans) 0.00274 g/L

5단 액-액 추출장치에서

$\frac{X_N}{X_0} = \frac{1}{1+E+E^2+\cdots+E^N} = \frac{E-1}{E^{N+1}-1} = \frac{(LK_D/H)-1}{(LK_D/H)^{N+1}-1}$ 이므로,

$X_N = \frac{(LK_D/H)-1}{(LK_D/H)^{N+1}-1}X_0$

위 식에 X_0 = 20 g/L, H = 200 L/min, L=49.8 L/min(3번 문항에서 구한 값), K_D = 12.05 를 대입하면,

X_N = 0.00274 g/L

2.

첫 번째 정치기에서 90%가 수용상에서 유기상으로 이동하므로,

m_{3p} = 0.90 * 1.5 =1.35 kg (유기상) , 0.15 kg (수상)

pH = 2.1 일 때, K = 25.0 = $\frac{\frac{1.35}{1.35+\text{부틸아세테이트}}}{\frac{0.15}{0.15+98.5}}$

∴ 부틸아세이트 = 34.16 kg

두 번째 정치기에서 유기상에서의 페니실린 90%가 수상으로 이동하므로,

m_{5p} = 0.90 * 1.35 = 1.215 kg (수상) , 0.135 kg (유기상)

pH = 5.8 일 때, K = 0.1 = $\frac{\frac{0.135}{0.135+34.16}}{\frac{1.215}{1.215+\text{알칼리 용액}}}$

정답지

∴ 알칼리 용액 = 29.65 kg

따라서,

(필요한 부틸아세테이트 kg/산성액 kg)의 비 = $\frac{34.16\,kg}{100\,kg} = 0.3416$

(알칼리 용액 kg/산성액 kg)의 비 = $\frac{29.65\,kg}{100\,kg} = 0.2965$

페니실린의 질량 분율 = $\frac{m_{5p}}{m_4 + m_{5p}} = 0.394$

3.

$E = LK_D/H = (10) \times (50)/(100) = 5$

$X_n/X_0 = 0.1/20 = 50 \times 10^{-3}$

☞ 그림 11.8을 사용하면, n=4

정답지

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(배양 및 생물반응공학 부문)

1.

(답 1-1) C (농도인자): 반응기 유출액의 세포농도에 대한 세포 재순환액의 세포농도 비

(답 1-2)

정상상태에서 $dX_1/dt = 0$

$X_0 = 0$

반응기 주변의 세포 농도에 대한 물질수지식은

$$FX_0 + \alpha FCX_1 - (1+\alpha)FX_1 + V\mu X_1 = V\frac{dX_1}{dt}$$

$\mu = (1+\alpha-\alpha C)D = [1+\alpha(1-C)]D$로 표현된다 (이때, dF/dt = D)

C>1 이고, α(1-C)<0 이므로 μ<D가 된다.

즉, 재순환이 있는 키모스탯의 경우, 비생장속도보다 높은 희석률로 운전될 수 있음.

(답 3)

Separator 주변의 물질수지식

$$(1+\alpha)FX_1 = FX_2 + \alpha FCX_1$$

$X_2 = (1+\alpha-\alpha C)X_1 = kX_1$(이때 k=(1+ α -αC))

Productivity $DX_2 = kDX_1$

정답지

X1을 구하기 위하여 growth limiting substrate (S)에 대한 물질수지식을 세우면,

$$FS_0 + \alpha FS - (1+\alpha)FS + 0 - \frac{\mu X_1 V}{Y_{X/S}} = V\frac{dS}{dt}$$

정상상태에서 dS/dt = 0

2에서 구한 $\mu = (1+\alpha-\alpha C)D$ 활용하여 정리하면,

$$X_1 = \frac{Y_{X/S}}{\mu}(S_0 - S)D = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{(1+\alpha-\alpha C)}$$

$$(1+\alpha-\alpha C)D = \mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}$$ (Monod equation 활용)

$$X_1 = \frac{Y_{X/S}}{\mu}(S_0 - S)D = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{(1+\alpha-\alpha C)}$$

$$S = \frac{kDK_S}{\mu_m - kD}$$

$$X_1 = \frac{Y_{X/S}}{\mu}(S_0 - S)D = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{(1+\alpha-\alpha C)} = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{k} = \frac{Y_{X/S}}{k}\left(S_0 - \frac{kDK_S}{\mu_m - kD}\right)$$

$$DX_2 = kDX_1$$

$$= kD\frac{Y_{X/S}}{k}\left(S_0 - \frac{kDK_S}{\mu_m - kD}\right)$$

$$= Y_{X/S}\left(S_0 D - \frac{kD^2 K_S}{\mu_m - kD}\right)$$ (여기까지 유도해도 정답)

$$= Y_{X/S}\left(S_0 D - \frac{D^2 K_S}{\frac{1}{k}\mu_m - D}\right)$$

정답지

2.

1)

$$Steady\ state, \qquad \mu_{net} = \frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2/K_I} = D$$

$$\mu_m S = (K_S + S + S^2/K_I)D$$

위 식을 S에 대한 2차식으로 정리하면,

$$\frac{D}{K_I}S^2 + (D - \mu_m)S + K_S D = 0$$

근의 공식으로 S를 구하면,

$$S = \frac{K_I}{2D}\left[\mu_m - D \pm \sqrt{(\mu_m - D)^2 - \frac{4D^2K_S}{K}}\right]$$

2) Washout을 포함하여 3개의 steady state가 존재할 수 있다 (단 $(\mu_m - D)^2 > \frac{4D^2K_S}{K}$ 이 참일 경우에만)

3.

$$H \overset{k_1}{\rightarrow} I, \qquad r_1 = k_1[H]$$

$$I + H \overset{k_2}{\rightarrow} 2I, \qquad r_2 = k_2[H][I]$$

$$I \overset{k_3}{\rightarrow} H, \qquad r_3 = k_3[I]$$

$$I \overset{k_4}{\rightarrow} D, \qquad r_4 = k_4[I]$$

정답지

Death rate $r_D = k_4[I]$

[I]를 식에서 제거하기 위해 PSSH를 [I]에 대해 적용하면, $r_I = r_1 + r_2 - r_3 - r_4 = 0$

$$k_1[H] + k_2[H][I] - k_3[I] - k_4[I] = 0$$

$$[I] = \frac{k_1[H]}{(k_3 + k_4) - k_3[H]}$$

$$r_D = \frac{k_1 k_4[H]}{(k_3 + k_4) - k_3[H]}$$