

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(효소공학 부문)

1. 철수는 대학원 실험실 연구참여를 통하여 다음의 효소고정화 실험을 수행하였다.

- (1) 철수는 실험실의 특정 소재를 이용하여 효소고정화용 담체를 제조하였고, 제조된 담체의 zeta potential을 측정하였을 때 -50mV의 값을 얻었다. 철수가 이 담체 표면에 Chymotrypsin을 고정화하였을 때, ① 기대할 수 있는 Chymotrypsin의 상대활성의 pH profile이 어떻게 나타날지에 대해 제시하고 (10점), ② 그 이유를 설명하시오. (단, 효소 고정화로 인해 Chymotrypsin 자체의 구조적 변화는 일어나지 않았고, 효소는 담체의 표면에 고정화되었다고 가정한다.) (10점).
- (2) 철수는 효소고정화 효율을 높이려고 고정화 담체 제조과정을 변형하여 담체의 내부에 효소고정화가 일어날 수 있도록 다공성 담체를 제조하고, 이를 통해 효소고정화를 진행하였다. 이 때, ① 발생할 수 있는 두 가지 확산저항이 무엇인지 설명하고 (10점), ② 이러한 확산저항에 따라 고정화 되지 않은 효소의 pH profile과 비교하여 고정화효소의 pH profile의 변화가 어떻게 일어날 수 있는지 서술하시오 (10점). ③ 그리고 이러한 확산 저항을 줄일 수 있는 방법을 제시하시오. (10점)

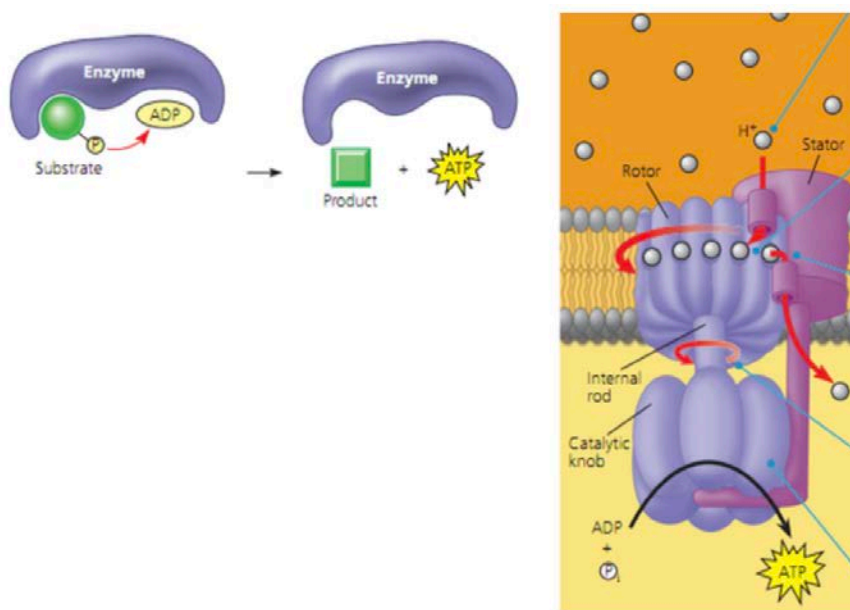
2. 효소개량을 위한 단백질공학적 접근법에 대한 다음 물음에 답하시오.

- (1) Rational design과 Directed evolution은 단백질공학적 접근법을 통해 효소의 성능 (촉매활성, 안정성, 기질특이성 등)을 개량하고자 할 때 사용되는 대표적인 방법이다. 이 두 방법의 내용을 설명하고 장단점에 대해 서술하시오 (20점).
- (2) Site-directed mutagenesis 기법을 적용하여 어떤 단백질의 아미노산 서열상 73번 위치에 해당하는 valine (Val, 코돈: GAT)을 isoleucine (Ile, 코돈: ATA)으로 치환하고자 한다. 해당 실험 절차의 개요를 그림과 함께 설명하시오 (단, 유전자 클로닝은 M13 벡터를 기반으로 진행한다.) (30점).

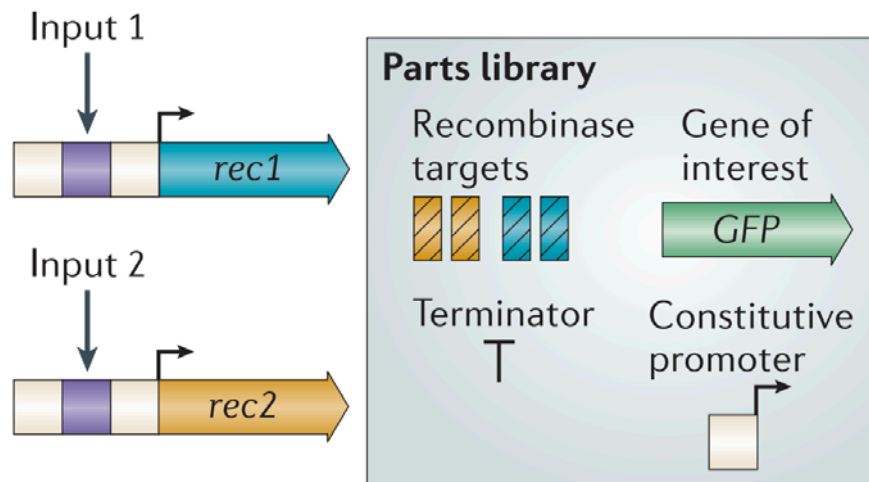
제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(분자생물학 부문)

1. 미생물이 세포 내 에너지(ATP)를 얻는 기작으로 크게 기질수준 인산화(substrate-level phosphorylation)와 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)가 존재한다. 두 기작의 큰 차이점 2가지를 언급하고, 어느 쪽이 에너지 생산에 더 효과적인지 고르시오 (30점).



2. 아래 그림은 DNA 재조합효소(recombinase) 기반으로 '로직 게이트(logic gate)'를 구현한 유전자회로에 관한 것이다. 이들 유전자 회로는 **방향성(directionality)을 가지는** 생물학적인 유전적 요소부분들인 전사 개시자 (promoter), 전사 종결자(terminator), 발현하고자 하는 유전자(gene of interest)등과 재조합효소 (Rec1 및 Rec2효소)를 인코딩하는 유전자로 구성되어 있으며, 재조합 효소의DNA서열 뒤집기(inversion) 활성을 이용하여 로직 게이트를 만들 수 있다. 재조합 효소의 뒤집기 활성은 결합자리(recombinase target)를 인식하여 나타난다. 유전자 회로의 구성요소들은 아래 그림에 주어진 바와 같다.



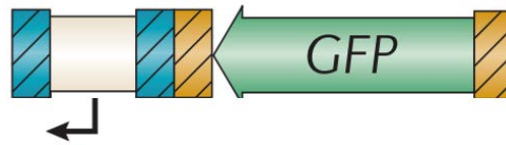
각각의 재조합 효소 Rec1 및 Rec2의 발현은 입력신호 (input 1, input 2)에 의해 결정된다고 알려져 있다. Rec1 효소는 파란색 target (recombinase target)만 인식하고, Rec2 효소는 노란색 (recombinase target)만 인식하여 비가역적으로 target 내의 서열을 뒤집는다. 그 서열 뒤집기가 일어나는 경우의 target서열사이에 존재하는 서열의 변화는 다음에 예시된 경우와 같은 형태로 일어난다.



아래 각 문제의 주어진 그림대로 유전자 회로가 구성된다고 하면, 각 입력신호의 유무 (존재 시 1, 부재 시 0으로 표기됨)에 따른 출력신호의 발현 유무(발현될 때 1, 발현되지 않을 때 0)를 나타내시오 (문제1)-3) 총 35점).

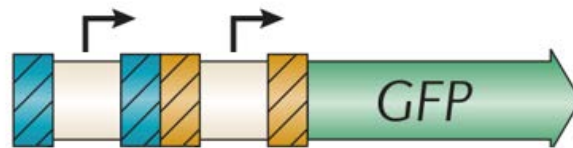
1) 다음과 같은 유전자 회로가 있을 때, 각 입력신호의 유무(존재 시 1, 부재 시 0으로 표기됨)에 따른 출력신호의 발현 유무(발현될 때 1, 발현되지 않을 때 0)를 아래표에 표기하시오 (10점).

문제지



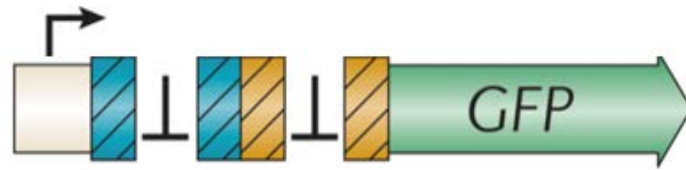
입력신호 1 (Input 1)	입력신호 2 (Input 2)	GFP형광단백질 발현
0	0	
0	1	
1	0	
1	1	

2) 다음과 같은 유전자 회로가 있을 때, 각 입력신호의 유무(존재 시 1, 부재 시 0으로 표기됨)에 따른 출력신호의 발현 유무(발현될 때 1, 발현되지 않을 때 0)를 아래표에 표기하시오 (10점).



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

3) 다음과 같은 유전자 회로가 있을 때, 각 입력신호의 유무(존재 시 1, 부재 시 0으로 표기됨)에 따른 출력신호의 발현 유무(발현될 때 1, 발현되지 않을 때 0)를 아래표에 표기하시오 (15점).



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

3. 유전자 편집에 대한 문제 (문제 1)-3) 총합 35점)

1) 유전자 편집 기술들을 세대별로 나누면 Zinc Finger Nuclease (ZFN), TALEN 그리고 CRISPR-Cas로 나눌 수 있다. 현재 이 중에서 CRISPR-Cas가 기존 ZFN과 TALEN에 비해서 큰 각광을 받고 있고, 노벨 화학상도 수상할 정도로 뜨거운 관심의 중심에 있다. 그렇다면, 각 기술들의 target DNA와의 결합 방법에 대해서 설명하고, CRISPR-Cas의 기존 기술들 (ZFN, TALEN)에 대한 장점이 무엇인지 설명하시오 (10점).

2) CRISPR-Cas 시스템에 대해서 설명하시오 (10점).

3) 유전자 편집은 유전자 가위에 의한 DNA break에 의해서 야기된다. DNA break가 세포내에서 일어난 후 2가지 DNA repair mechanism이 작용한다. 2가지 DNA repair mechanism이 무엇인지와 그 상세한 내용을 설명하시오 (15점).

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

(응용미생물학 부문)

1. 간장은 대두와 밀의 혼합물에 효모를 비롯한 여러 미생물을 8~12개월 동안 발효시켜 만듭니다. 이로 인해 만들어지는 소스에는 (고형물은 제거) 젖산과 에탄올이 풍부합니다. 1) 이 두 화합물은 어떻게 생성되며, 이 발효 과정 중 이 산물들의 생성이 왜 미생물에게 중요한가요? (10점)
2) 간장이 식초맛이 강하지 않게 하려면 발효조에 산소가 들어가지 않도록 해야합니다. 왜 그런가요? (15점)

2. 미생물의 대사 중에 Aerobic respiration 과 Fermentation의 차이를 아래의 순서대로 설명하십시오 (25점)

- 1) Aerobic or Anaerobic 여부
- 2) Electron acceptor
- 3) Product
- 4) ATP 만들어 지는 경로
- 5) 생산되는 ATP의 양

3. 세계보건기구 (WHO)는 2020년 3월 11일 COVID-19을 세계적인 팬데믹으로 선포하였고, 현재까지 많은 수의 사망자를 발생시키며 우리나라를 비롯한 전세계인들의 삶을 송두리채 바꾸고 있다. 이를 예방하기 위한 방법으로 다양한 백신이 개발되었다. 특히 COVID-19의 백신은 최초로 mRNA백신이 상용화가 되었다. 이 mRNA 백신이 가지는 기존의 다른 백신과의 차이점을 설명하십시오. (25점)

4. Lactic acid를 생산하는 유산균 중 Bifidobacterium은 2분자의 포도당을 이용하여 lactic acid와 acetic acid를 생산하는 heterolactic fermentation을 하는 미생물이다. lactic acid 와 ethanol을 동시에 생산하는 다른 heterolactic fermentation과의 차이점을 반응식을 이용하여 설명하십시오. (25점)

제21회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원)

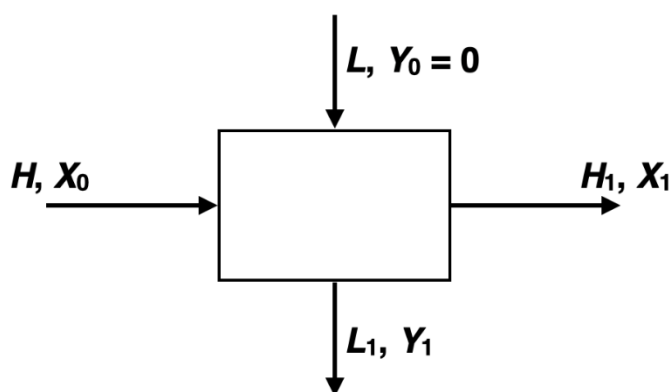
(생물분리정제 부문)

1. 발효액에 포함된 페니실린을 이소아밀아세테이트로 추출하여 분리하고자 한다. pH = 3.015에서 페니실린의 분배계수는 12.05이다.

$$K_D = \frac{Y_L}{X_H} = 12.05 \quad (1)$$

식 (1)에서 Y_L 과 X_H 는 각각 평형상태에서 이소아밀아세테이트 상과 발효액 상의 페니실린의 농도이다. K_D 가 일정하고 발효액과 이소아밀아세테이트는 서로 섞이지 않으며, 각 상에서 페니실린이 차지하는 부피를 무시할 수 있다고 가정할 때, 다음 질문에 답하시오.

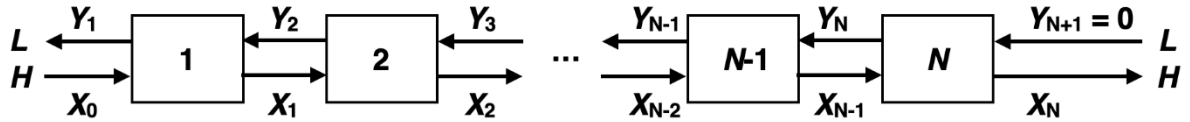
(1) 아래 그림과 같은 1단 액-액 추출장치가 평형을 이루고 있을 때 추출장치를 빠져나가는 발효액 상의 페니실린 농도 X_1 을 발효액 내 페니실린의 농도(X_0), 발효액의 유량(H), 유기용매 유량(L), 분배계수(K_D)로 표현하라. (10 점)



(2) 추출의 효율을 증진시키기 위하여 다단 향류 액-액 추출장치를 도입하고자 한다 (그림 2 참조). 각 단에서 시스템이 평형을 이룰 때, 마지막 단(N)을 빠져나가는 수용액 상의 페니실린 농도 X_N 을 발효액 내 페니실린의 농도(X_0), 발효액의 유량(H), 유기용매 유량(L), 분배

문제지

계수(K_D), 단수(N)로 표현하라. (10 점)



(3) 20 g/L의 페니실린을 포함한 발효액의 유량이 200 L/min이다. 1단 액-액 추출장치를 사용하여 수용액 내의 페니실린 농도를 5 g/L까지 감소시킬 때 필요한 이소아밀아세테이트 상의 유량을 구하라. (10 점)

(4) 5단으로 구성된 향류 액-액 추출장치를 사용하여 (3)에서와 동일한 유량의 이소아밀아세테이트를 사용할 경우 마지막 단을 빠져나가는 수용액 상의 페니실린 농도를 구하라. (10 점)

2. 페니실린은 발효에 의해 생산되고, 부틸아세테이트를 사용한 추출에 의해서 발효 수용액으로부터 회수된다. 페니실린 분배 계수 K (부틸아세테이트 상에서의 페니실린 질량 분율 / 물 상에서의 페니실린 질량 분율)는 수용액 상에서의 pH에 영향을 받는다.

이러한 의존성은 다음에 기술된 공정에 대해서 기준을 제공한다. 물과 부틸아세테이트는 불용성으로 간주한다. 추출은 다음과 같이 3장치 공정에 의해서 수행된다.

● 용해된 페니실린, 용해된 불순물, 물이 들어있는 발효기에서 생성된 발효액이 혼합탱크에서 산성화된다. 1.5wt% 페니실린을 포함하는 산성화된 발효액은 혼합기로 구성된 추출장치에서 부틸아세테이트액과 접촉하여 수용상과 유기상이 서로 밀접하게 접촉한다. 그런다음, 정치 탱크에서 두 상이 중력에 의해서 분리된다. 추출 장치에서 수용상의 pH는 2.1이다. 혼합 장치에서 공급액 중 페니실린의 90%가 수용상에서 유기상으로 이동된다.

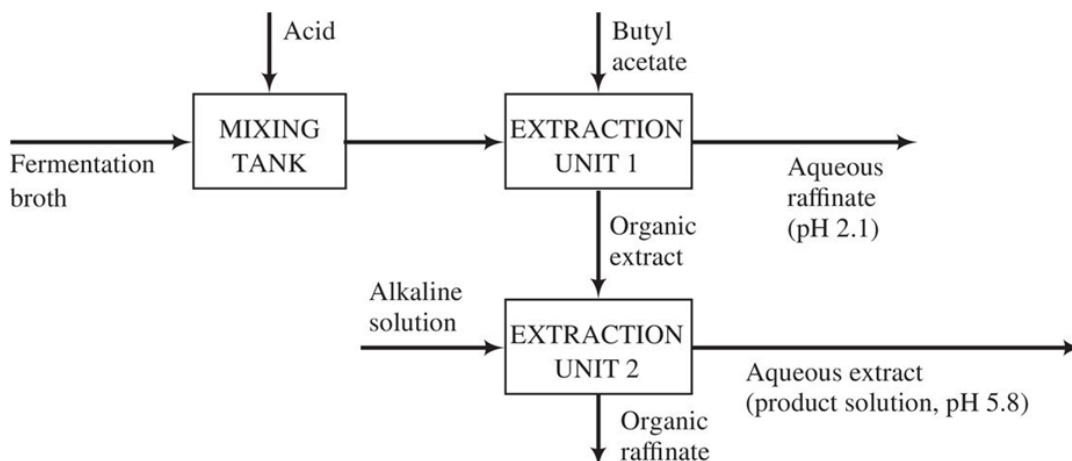
문제지

pH	2.1	4.4	5.8
K	25.0	1.38	0.10

● 정치기를 떠나는 두 흐름은 서로 평형이다. 즉, 두 상에서 페니실린 질량 분율의 비는 수용상의 pH와 연관된 K 값과 같다. 공급액 중의 불순물은 수용상에 남아있다. 추출 장치 1을 떠나는 추출 잔류물은 추가적으로 처리하기 위해서 다른 곳으로 보낸다; 유기 추출물은 두 번째 혼합-정치 장치로 보내진다.

● 두 번째 장치에서, 혼합 단계에 공급된 유기 용액은 수용상의 pH를 5.8로 조절하는 알칼리 수용액과 접촉한다. 혼합 장치에서는 유기 공급물 용액으로 유입되는 페니실린의 90%가 수용상으로 이동된다. 정치 장치로부터 생성된 두 흐름은 평행을 이룬다. 수용상의 추출물이 공정의 생산품이다.

생성된 용액에서 (필요한 부틸아세테이트 kg/산성액 kg)의 비와 (알칼리 용액 kg/산성액 kg)의 비를 각각 구하고, 페니실린의 질량 분율을 계산하라. (30 점)



문제지

3. 페니실린은 연속식 향류다단추출장치에서 유기용매로 이소아밀아세테이트를 사용하여 발효액 으로부터 추출한다. 유기상의 유량 (L)과 수상의 유량 (H)은 각각 $L = 10 \text{ l/min}$, $H = 100 \text{ l/min}$ 이 다. pH = 3에서 유기상과 수상 사이의 페니실린 분배계수는 $K_D Y_L/X_H = 50$ 이다. 공급액 내의 페니 실린 농도가 20 g/l 일 때, 추출장치의 유출액에서 페니실린 농도가 0.1 g/l 로 감소되는 데 필요한 단수를 구하라. (30 점)

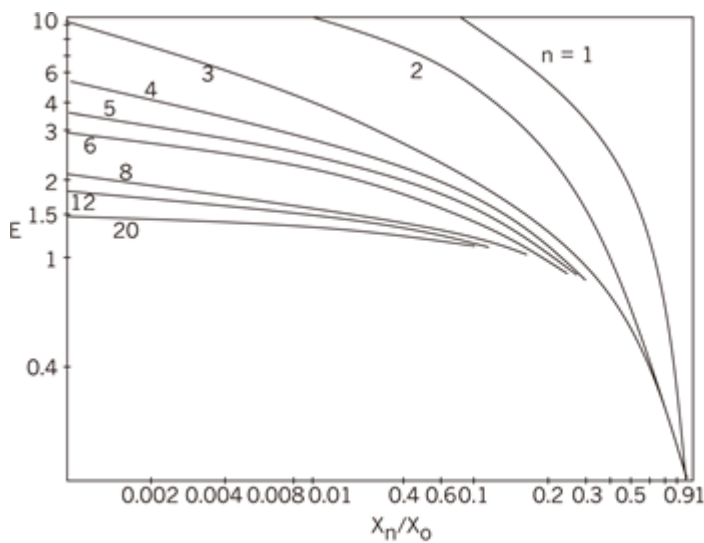


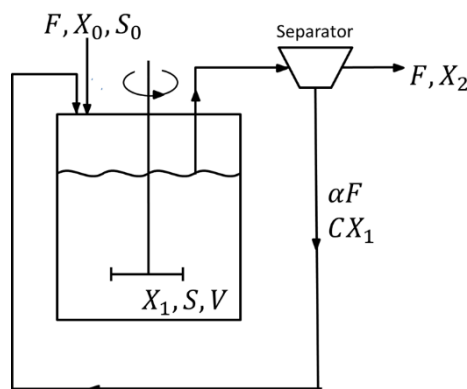
Figure 11.8. Variation of the extraction factor (E) with the degree of extraction (X_n/X_0) for different number of stages (n) in multistage continuous countercurrent extraction.

제 21 회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG 화학 후원)

(배양 및 생물반응공학 부문)

1. “재순환이 있는 키모스탯(chemostat; 연속배양)”에 일반적인 정상상태 (steady-state)보다 더 높은 세포농도를 유지하기 위하여 유출액의 세포를 반응기로 재순환시킨다. 이러한 세포의 재순환은 전환속도 (혹은 생산성)을 증가시키고, 공정의 변동요인에 의한 영향을 최소화하여 시스템의 안정성도 증가시킨다.

아래와 같이, α : Recycle ratio (부피유속에 근거한 재순환비)와 C : concentration factor (농도인자)를 갖는 세포 재순환이 있는 키모스탯을 고려하여 다음의 질문에 답하시오.



D: dilution rate (희석속도)

μ : specific growth rate (비생장속도)

μ_m : maximum specific growth rate (최대비생장속도)

Ks: saturation constant (포화상수)

X: cell concentration (세포농도)

S: substrate concentration (기질농도)

F: volumetric flow rate (부피유속)

V: volume (키모스탯 내 부피)

문제지

1-1) **C (농도인자)의 정의를** 기술하고 (5점),

1-2) **반응기 주변의 세포 농도에 대한 물질수지식**을 활용하여, 재순환이 있는 키모스탯에서의 비
생장속도 (μ)와 희석속도 (D)의 크기를 비교하시오. (10점)

(가정 1) $X_0 = 0$

(가정 2) 반응기 내에서 사멸되는 세포의 농도는 무시한다

(가정 3) 정상상태 (steady state) 가정

2) **Separator 주변의 물질수지식을 기반**으로 하여, 해당 재순환이 있는 키모스탯에서의 생산성
(Productivity)를 D , μ_m , K_S 을 포함하는 식으로 나타내시오. (20점)

2. Chemostat에서 미생물이 steady-state를 유지한 상태에서 배양되고 있다. 미생물의 증식이
substrate inhibition을 받고 있다고 할 때, 다음과 같은 식으로 net growth rate를 표현할 수 있다.

$$\mu_{net} = \frac{\mu_m S}{K_S + S + S^2/K_I}$$

위 식에서,

μ_{net} = Net growth rate

S = Substrate concentration

K_S = Michaelis Menten constant

K_I = Substrate inhibition constant

μ_m = Maximum growth rate

1) **Steady-state일때의 substrate의 농도 S** 를 D , μ_m , K_S , K_I 를 이용한 수식으로 표현하시오. (D =
dilution rate) (20점)

2) 일반적인 (substrate inhibition이 없는) chemostat의 경우 2개의 steady-state가 존재한다 (미생
물이 정상적으로 증식하면서 chemostat이 유지되는 상태와 wash-out이 된 상태). 이 문제의 경우
wash-out 상태를 포함해서 몇 개의 steady-state가 존재하는가? 이유를 설명하고, 답한 steady-
state의 개수가 성립하기 위한 조건이 있다면 이를 언급하시오. (15점)

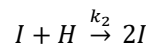
문제지

3. 질병역학을 연구하기 위해 어떤 인구집단 내에서 질병이 전파하는 과정을 다음과 같이 수학적으로 표현할 수 있다.

- 건강한 사람이 병에 걸림



- 건강한 사람이 병에 걸린 사람과 접촉하여 병에 걸림



- 병에 걸린 사람이 회복해서 건강해짐



- 병에 걸린 사람의 사망



위 표현식에서,

H: 건강한 사람

I: 병에 걸린 사람

D: 사망자

k_1, k_2, k_3, k_4 : 각 단계의 속도 상수

를 의미한다.

위 표현식을 참고하여 사망자가 발생하는 속도 r_D 의 표현식을 건강한 사람의 수 [H]와 k_1, k_2, k_3, k_4 로 이루어진 식으로 유도하시오 (병에 걸린 사람의 수 [I]는 식에 포함되지 않아야 함). 유도를 위해 pseudo steady-state hypothesis를 사용할 것. (30점)