

2002. 6. 29(토)

한국화학공학회 생물화공부문위원회 주최

## 제 3 회

# 생물화공 경시대회

다음 I ~ V Group 중 4 Group의 문제를 택하여 답하시오.

\* Group I : 분자생물학 분야

Group II : 응용미생물학 분야

Group III : 효소 및 생물반응공학 분야

Group IV : 생물분리정제 분야

Group V : 생물공정 분야

## Group I : 분자생물학 분야

### 1. 다음의 핵산에 관한 질문에 답하십시오.

- 1) 아래의 DNA molecules에서 melting temperature( $T_m$ )가 높은 순서로 적으시오.
- |                |                |                |
|----------------|----------------|----------------|
| -AAGTTCTCTGAA- | -GGACCTCTCAGG- | -AGTGTCATGCAG- |
| ①              | ②              | ③              |
| -TTCAAGAGACTT- | -CCTGGAGAGTCC- | -TCACAGTACGTC- |

- 2) DNA에서 특정염기서열을 인식하여 가수분해시키는 효소를 무엇이라 하는가?
- 3) mRNA로부터 DNA를 합성하는 효소는 무엇인가?
- 4) DNA fragments를 전기영동하여 nitrocellulose paper에 transfer 시킨 후에 radio-labeling 시킨 DNA probe로 특정한 DNA를 확인하는 방법을 무엇이라 하는가?
- 5) DNA polymerase III에서 proof-reading(editing function)은 어떠한 효소활성에 의하여 이루어지는가?
- 6) Protein의 backbone을 형성하기 위한 amino acids간의 결합을 무엇이라 하는가?
- 7) Protein의  $\alpha$ -helix 구조의 형성은 어떠한 결합으로 이루어지는가?
- 8) 하나의 polypeptide가 2개 이상의 folding region을 갖는 경우 그 folding region을 무엇이라 하는가?
- 9) Protein 내에 존재하는 cysteine 간에는 어떠한 결합이 형성되는가?
- 10) Hemoglobin의 SDS-PAGE를 위하여 시료에 SDS를 첨가하는 이유는 무엇인가?

2. 인간 단백질의약품으로 개발될 가치가 매우 큰 가칭 “protinin- $\alpha$ ” 단백질을 encoding하는 유전자를 클로닝함과 동시에 이 단백질을 *E.coli* 에서 발현시켜 대량 생산하는 연구를 수행하고자 한다 (단 PCR은 사용하지 않는 것을 원칙으로 함). 현재 이 protinin- $\alpha$  에 대한 DNA hybridization probe는 확보되어 있지 않으나, 이 인간단백질을 다른 세포에 비해 약 100배 이상 더 생합성할 수 있는 human cell line은 분리, 확보되어 있는 상태이다. 클로닝 벡터 및 발현벡터의 제조와 관련해서 다음의 사항에 대해 답하십시오.

(1) 다음의 두 종류를 클로닝벡터로 이용하는 각각의 경우에 대해서, protinin- $\alpha$  유전자를 클로닝하는 방법에서부터 recombinant를 선별하는 방법까지 체계적으로 설명하시오.

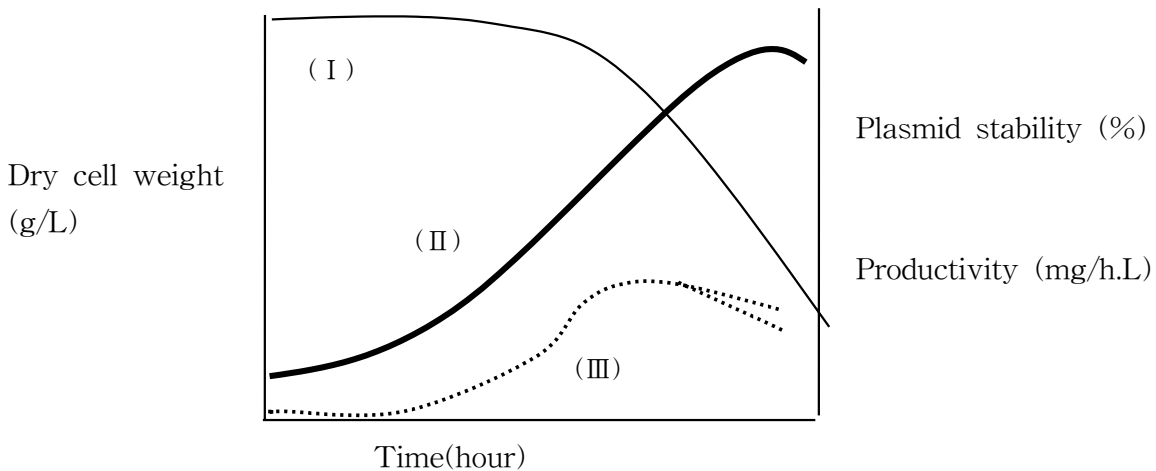
- pUG19 plasmid
- Bacteriophage lamda

(2) 발현된 단백질의 세포 밖으로의 분비를 수월하게 함과 동시에 활성 및 분리정제 수율을 높이기 위해, fusion protein을 생합성하는 발현벡터를 설계하고자 한다. 다음의 2가지 fusion partner를 이용할 때, (i) 대표적인 발현벡터를 그림을 그려 설명하고, (ii) *E.coli*를 이용해서 생산된 재조합 단백질을 분리 정제하는 과정을 설명하시오.

- Fusion partner: His tail
- Fusion partner: Flag (8 amino acids)

## Group II : 응용미생물학 분야

1. 다음 그림은 재조합 단백질을 세포 외로 분비하는 효모를 배양(batch cultivation)하면서 얻은 결과를 보여준다. 재조합 유전자는 2 $\mu$  벡터에 클로닝해서 숙주에 도입하였다.



1) (I),(II),(III) 곡선은 각각 무엇을 측정 한 값을 나타내는가?

2) 이 data에 근거해서 생각했을 때, productivity를 올리기 위해서 무엇을 어떻게 하는 것이 좋은지에 대해 설명하시오.(단, 배양방법에 대한 것은 제외)

2. 유용한 2차 대사산물을 생합성하는 미생물의 발효과정을 최적화하기 위해서 배지성분이 2차 대사산물의 합성에 미치는 영향을 검토한 결과 다음 table 과 같은 data를 얻을 수 있었다

배 지 성 분 (g/L)		2차 대사산물 (mg/g cell.L)
Glucose	20.0 g/L	5.0
Glucose	1.0 g/L	20.0
Ammonium sulfate	0.5 g/L	17.0
Ammonium sulfate	5.0 g/L	15.0
$KH_2PO_4$	5.0 g/L	7.0
$KH_2PO_4$	0.5 g/L	19.0

1) 2차 대사산물과 관련해서 위의 data로부터 얻을 수 있는 정보에 대해서 기술하고, 이 정보를 이용해서 발효과정을 개선할 수 있는 방법에 대해 설명하시오.

2) 이 미생물이 위와 같은 data를 보여주게 된 이유를 일반적인 2차 대사산물의 생합성 기작과 유전자 발현조절에 관한 지식을 활용해서 논하시오.

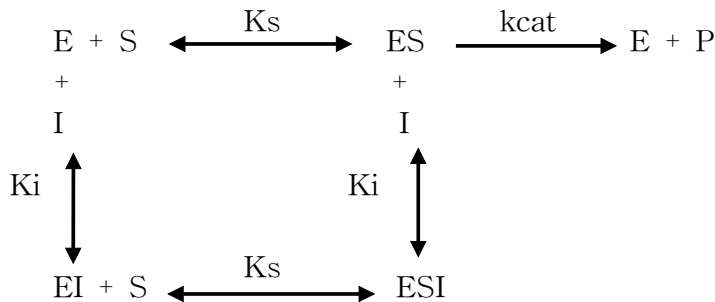
### Group III : 효소 및 생물반응공학 분야

1. 다음 효소 kinetics에 관한 문제에 답하시오.

1) 효소의 반응속도를 나타내는 Michaelis-Menten 식에서  $k_{cat}$ ,  $K_m$  값의 물리적 의미와 단위를 기술해 보시오.

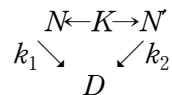
2) 다음과 같은 non-competitive inhibition의 메커니즘을 따르는 효소가 있다고 가정하자. 이 효소의 반응속도를 나타내는 식은 다음과 같이 나타낼 수 있다. 다음 식을 유도해 보시오.

$$V = V_{max}[S] / \{ (K_s + [S])(1 + [I]/K_i) \}$$



2. 효소 A는 50°C에서 산소분자에 의해 활성을 잃으며 denatured form ( $D$ ) 으로 되는 비활성 속도상수 ( $k_1$ ) 는  $2 \times 10^{-3} M^{-1}sec^{-1}$ 이다. 다른 한편으로는 효소는 가역적으로 conformation의 변화가 생기고 부분적으로 unfolding되면서 unstable unfolded form ( $N'$ ) 으로 되는데, 더욱 산소에 민감하게 되어 결국은 활성을 잃게 되며 unfolded form으로 부터의 비활성 속도상수 ( $k_2$ ) 는  $0.3 M^{-1}sec^{-1}$ 이다. 한편 50°C에서의 효소A의 산소에 대한 겉보기 비활성 속도상수 ( $k_{obs}$ ) 는  $0.05 M^{-1}sec^{-1}$ 로 측정되었다.

1) 다음의 그림을 참조하여 native form ( $N$ ) 과 unfolded form ( $N'$ ) 사이의 평형상수 ( $K$ )는 어떻게 되는지 계산해 보시오.



2) 위의 실험에서 효소 A의 반응기질이 존재하는 경우 비활성 속도상수가 어떻게 될것으로 예상되는지 논하고 그 이유에 대하여 설명하시오.

## Group IV : 생물분리정제 분야

1. 발효 후 어떤 세균을 연속적으로 침전시키기 위해 내경이 10cm이고 길이가 50cm인 관형 원심분리기를 15,000 rpm으로 운전하고 있다. 용액의 비중은 1.0, 점도는 1.0cp(=0.01g/cm · s)이며 세균의 비중은 1.12, 직경은 1μm이다.

(1) 만일 이 세균을 중력하에서 자유 침강시켰다면 그 속도( $v_g$ , m/s)는 얼마가 되겠는가?

$$\text{참고 } v_g = \frac{d_p^2}{18\mu}(\rho_p - \rho)g$$

(2) 원심분리에 의한 침강속도( $v_r$ )와 중력에 의한 자유침강의 속도비를 구하라.

(3) 멤브레인 막을 이용하는 경우 원심분리방법에 비하여 어떠한 장단점이 있는지 논하시오.

2. 실험실에서 단백질을 분리 · 정제하는 경우 전기영동(electrophoresis)방법이 많이 사용된다.

(1) 이러한 실험실 결과를 scale-up 할 때 생길 수 있는 문제를 설명하고 scale-up 가능한 방법을 제시하시오.

(2) 연속적으로 단백질을 분리할 수 있는 방법을 3가지 제시하고 장 · 단점에 대하여 설명하시오.

## Group V : 생물공정 분야

1. 재조합 미생물의 batch 배양에서 유전자 재조합 단백질의 발현양에 대해 아래와 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_e \cdot p}{K_t + p} - k_{-p} \cdot P - \mu \cdot P$$

$P$  : concentration of cloned-gene protein (mg protein/mg cell)

$t$  : time (h)

$k_e$  : maximum rate of protein synthesis  
(mg protein/mg cell per hour)

$p$  : intracellular plasmid concentration (mg plasmid/mg cell)

$K_t$  : transcription rate saturation constant (mg/mg cell)

$k_{-p}$  : cloned-gene protein denaturation rate constant ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu$  : specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )

- 1) 균형증식(balanced growth) 상태에서의 재조합 단백질 발현양을 플라스미드 농도의 함수로 나타내시오.

- 2) 빙핵단백질 유전자를 발현시킨 대장균을 22°C, 포도당 0.2%가 함유된 LB 배지에서 배양한 경우 적절한 실험과 모델식에 의해 파라미터 값을 아래와 같이 구해졌다. 시간에 따른 세포내 단백질 발현양을 나타내는 식을 유도 한 후 아래 빈칸을 채워 실제 실험치와 비교하여 보시오.

$$N_p = 31 \text{ (} N_p \text{:plasmid copy number, } p=0.0001186N_p \text{)}$$

$$\mu = 0.6290$$

$$k_e = 0.01039$$

$$K_t = 0.0021$$

$$k_{-p} = 0$$

Growth time (h)	P (mg/mg cell)	계산값 (P)
0	0.0060	
1	0.0075	
3	0.0096	
5	0.0105	
7	0.0105	
9	0.0106	

2. 유전자 재조합 단백질 생산 공정에서 융합단백질(fusion protein)을 발현시킨 후 가수분해하여 목적으로 하는 단백질을 얻는 경우가 있다. 이때 융합단백질을 가수분해하는 효소가 값이 비싸서 원가를 높이는 문제점이 있다. 다음에 가수분해효소를 batch 반응기에서 1회



용으로 사용하는 경우와 고정화 한 다음 충전층(packed-bed) 반응기로 반복하여 사용하는 경우의 경제성을 비교해본다. 가수분해 반응시간은 재조합 단백질의 변형을 방지하기 위하여 짧게 하는 것이 필요하므로 두 경우 동일하게 상온에 10 h가 되도록 한다. 기질 및 생성물의 반응 저해는 없음.

1) 총 1000 L 기질(융합단백질, 농도 0.01mM)의 가수분해 전환율이 90%가 되는데 사용되는 batch 반응기 운전에서 사용되는 효소의 가격을 계산하시오.

- 효소는 기질농도에 상관없이 first-order inactivation 특성을 가지며 상온에서 반감기는 12h, 가격은 100,000원/g
- Michaelis-Menten 반응특성  $K_m=0.1\text{molL}^{-1}$ ,  $v_{\max}=k \cdot e$   
( $k=0.3 \text{ mol/g 효소/h}$ ,  $e$  : 효소농도(g/L))

2) 충전층 효소반응기의 경제성을 높일 수 있는 방법을 논하시오(3가지 이상).

## <제 3 회 생물화학공정 경시대회 답안>

### Group I : 분자생물학 분야

1. 1) ②-③-①
  - 2) 제한효소(restriction enzyme)
  - 3) 역전사효소(reverse transcriptase)
  - 4) Southern blotting (or hybridization: 혼성화)
  - 5) 3'→5' exonuclease
  - 6) 펩티드 결합(peptide bond)
  - 7) 수소결합(hydrogen bond)
  - 8) Domain
  - 9) 이황화 결합(disulfide bond)
  - 10) 모든 protein을 동일한 negative charge를 띠고, 변성시키기 위함
2. Solution is not available at the moment.

## Ⅱ : 응용미생물학 분야

1.

1) (Ⅰ), plasmid stability; (Ⅱ), Dry cell weight; (Ⅲ), Productivity. (각 1점)

2) Plasmid stability 문제 언급 (2점)

Plasmid stability를 증가시키는 방법 제시 (5점)

2.

1) glucose repression (1점), phosphate repression (1점)

Slow feeding of glucose, 또는 use of other (slowly utilized) carbon sources (2점)

Maintaining a low P level, 또는 P level에 영향을 받지 않는 돌연변이주 이용 (2점)

2) glucose (carbon) catabolite repression 기작에 대한 분자생물학적 설명 (5점)

Phosphate regulation에 관한 가설 혹은 가능성 있는 논리적인 설명 (4점)

### III. 효소 및 생물반응공학 분야

1. 1) Km: 기질과 효소의 dissociation const

kcat: 효소의 기질에 대한 turn over rate

(단위 효소분자당, 단위시간당 conversion rate)

참고) M-M식은 다음과 같이 변환된  $v = (kcat/Km)[S][E]$

$$2). K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[E][I][S]}{[ESI]} \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$v = kcat[ES] \quad \frac{v}{[E]t} = \frac{Kcat[ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]}$$

$$[ES] = \frac{[S]}{K_s}[E], \quad [EI] = \frac{[I]}{K_i}[E]$$

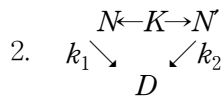
$$[ESI] = \frac{[S]}{K_s} [EI] = \frac{[S][I]}{K_s K_i} [E]$$

$$\frac{v}{kcat[E]t} = \frac{\frac{[S]}{K_s}[E]}{\left\{ [E] + \frac{[S]}{K_s}[E] + \frac{[I]}{K_i}[E] + \frac{[S][I]}{K_s K_i}[E] \right\}}$$

$$\frac{v}{Vmax} = \frac{[S]/K_s}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S][I]}{K_s K_i}}$$

$$\frac{v}{Vmax} = \frac{[S]}{K_s \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

$$v = \frac{Vmax}{(1 + [I]/K_i)} \left( \frac{[S]}{K_s + [S]} \right)$$



$$k_1 = 0.002 / (\text{M} \cdot \text{sec})$$

$$k_2 = 18 (\text{M} \cdot \text{min}) = 0.3 / (\text{M} \cdot \text{sec})$$

$$C_0 = N + N' + D, \quad K = N'/N, \quad N' = KN$$

$$\frac{d[D]}{dt} = - \frac{d[N + N']}{dt} = - \frac{d[N]}{dt} - \frac{d[N']}{dt}$$

$$- \frac{d[N]}{dt} = k_1[N], \quad - \frac{d[N']}{dt} = k_2[N']$$

$$\text{observed rate} = k_{obs}[N + N'] = k_1[N] + k_2[N']$$

$$kobs[N(1+K)] = k_1N + k_2KN$$

$$\therefore kobs = \frac{k_1 + k_2K}{[1 + K]}$$

$$\therefore 0.05 = \frac{0.002 + 0.3K}{1 + K}$$

$$0.05 = 0.05K = 0.002 + 0.3K$$

$$0.048 = 0.25K$$

$$K = 0.192$$

#### IV. 생물분리정제 분야

Not available at the moment

## V. 생물공정 분야

### 1. B&O 7.5.3 참조

1) 균형증식  $\rightarrow \frac{dP}{dt} = 0$

$$P = \frac{k_e \cdot p}{(k_p + \mu)(K_t + p)}$$

2)  $k_p=0$ ,  $\frac{dP}{dt} = \frac{k_e \cdot p}{K_t + p} - \mu \cdot P$

$$\frac{k_e \cdot p}{K_t + p} = a, \quad \frac{dP}{dt} = a - \mu \cdot P$$

$$\frac{dP}{P - \frac{a}{\mu}} = -\mu \cdot dt \quad \text{적분}(P=P_o \text{ at } t=0) \rightarrow \ln\left(\frac{P - \frac{a}{\mu}}{P_o - \frac{a}{\mu}}\right) = -\mu \cdot t$$

$$P(t) = P_o \cdot e^{-\mu \cdot t} + \frac{k_e \cdot p}{(K_t + p)\mu} (1 - e^{-\mu \cdot t})$$

Growth time (h)	P (mg/mg cell)	계산값 (P)
0	0.0060	0.0060
1	0.0075	0.0081
3	0.0096	0.0098
5	0.0105	0.0103
7	0.0105	0.0105
9	0.0106	0.0105

### 2.

1) Batch reactor 물질 수지식  $ds/dt = -k \cdot e \cdot s / (K_m + s)$

$K_m \gg s$  (가정하지 않고 계산해도 무방함),  $(1/s)ds = -(k/K_m) \cdot e \cdot dt$

$e = e_o \cdot e^{-k_d \cdot t}$  ( $e_o$ : 초기 효소농도,  $k_d$ : first-order deactivation constant)

따라서  $(1/s)ds = -(k/K_m) \cdot e_o \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot dt$

적분하면,

$$\ln(s/s_o) = \int_0^{10} -(k/K_m) \cdot e_o \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot dt$$

$$= \frac{k^* e_o}{K_m + k_d} [e^{-k_d t}]_0^{10}$$

$$e_o = \frac{\ln\left(\frac{s}{s_o}\right) \cdot K_m + k_d}{k^* [e^{-k_d t}]_0^{10}}$$

$$s/s_o = 0.1, k_d = \ln 2 / 12 = 0.058 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$e_o = 0.101 \text{ (g/L)}$$

1000 L의 용액을 처리하려면 101g의 효소가 필요하므로

효소가격은  $101 \times 100,000 = 10,100,000$ (원)

2)

a. 고정화효소의 촉매 효율을 높임( $K_m \downarrow$ ,  $V_{\max} \uparrow$ )

b. 고정화효소의 제조가격을 낮춤

c. 고정화효소의 안정성 증가에 의해 재사용성을 높임

d. 용액의 상온 노출시간을 감소시켜 칼럼충전부피와 흐름속도를 줄임 (예-기질용액을 분산하여 냉장보관하면서 차례로 일부를 꺼내어 상온으로 올린 후 칼럼에 주입)

f. 기타 타당한 답변