

2004. 6. 26(토)

한국화학공학회 생물화공부문위원회 주최

LG 생명과학 후원

## 제5회 LG 생물화공 경시대회

### 시험문제

다음 Group I ~ V 중 4 개의 분야 문제를 택하여 답하시오.  
(배점: 각 분야당 100점)

Group I : 분자생물학 분야

Group II : 응용미생물학 분야

Group III : 효소공학 분야

Group IV : 배양 및 생물공정 분야

Group V : 생물분리정제 분야

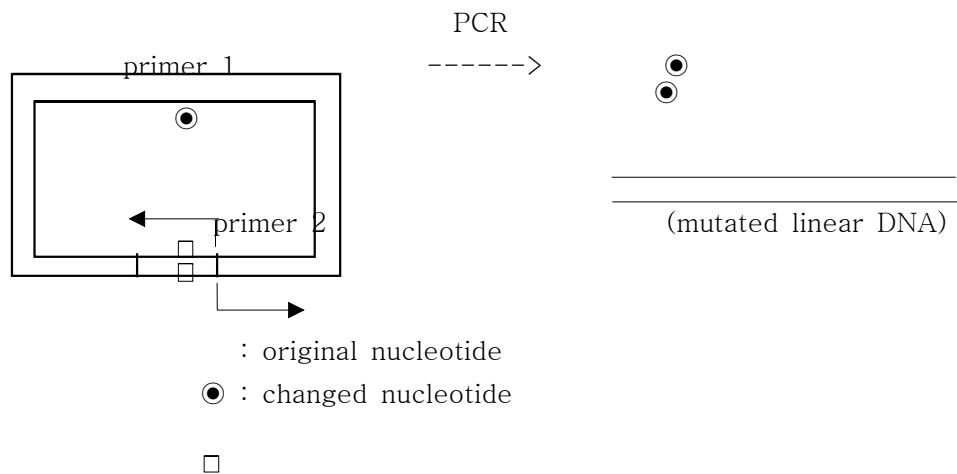
## Group I. 분자생물학 분야

1. 재조합 단백질을 *E. coli*내에서 대량 생산하고자 한다. 이를 위해 고려해야 할 사항들을 다음의 각 단계별로 열거하고 이에 대해 설명하라. (20점)

- (1) transcriptional level
- (2) translational level
- (3) protein stability

2. 어떤 plasmid를 *EcoR1*으로 complete digestion 하였더니, size가 서로 다른 3개의 fragments(600 bp, 800 bp, 1400 bp)로 잘려졌다. 이 plasmid를 *EcoR1*으로 partial digestion하여 전기영동 하면 몇 종류의 linear DNA band가 관찰되는가? (풀이과정 기술할 것) (20점)

3. PCR을 이용한 oligonucleotide-directed mutagenesis를 수행함에 있어서, one-nucleotide mismatched primer (primer 1)와 correct sequence를 갖는 primer (primer 2)를, 같은 reaction tube에 넣고 PCR을 수행하여 아래 그림과 같이 mutated linear DNA를 얻는다. 생성된 linear DNA 중에 처음에는 original nucleotide를 포함한 linear DNA의 비율이 높으나, PCR을 거듭할수록 mutated linear DNA의 비율이 점점 높아진다. 그림의 오른쪽과 같은 mutated linear DNA가 전체의 50%를 차지하기 위해서는 PCR을 몇 cycle 수행해야 하는가? (각 cycle을 수행한 후의 mutated linear DNA의 %를 기록할 것) (20점)



4. The chromosome of a certain bacterium is a circular, double-stranded DNA molecule of  $5.2 \times 10^6$  base pairs. (20점)

(a) The rate of replication-fork movement is 1000 nucleotides per second.

Calculate the time required to replicate the chromosome.

(b) Under extremely favorable conditions, the bacterial generation time can be as short as 25 min. Given that the maximum rate of DNA replication is 1000 nucleotides per second and that the chromosome contains only one origin of replication, explain how the cells are able to divide so rapidly.

5. The sequence of a segment of DNA from the middle of the coding region of a gene is shown below

5'-AACTGCACGAGGTAACACAAGATGGCT-3'

3'-TTGACGTGCTCCATTGTGTTCTACCGA-5'

#### The Universal Genetic code

First position	Second position				Third position
	U	C	A	G	
U	Ser	Tyr	Cys		U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

(a) Write the two mRNA sequence that could be transcribed from this sequence.

(b) Identify the codons in all possible reading frames of this DNA fragment.

Which amino acid sequence corresponds to the actual gene product? (20점)

## Group II. 응용미생물학 분야

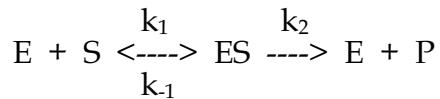
1. 강원도 덕구온천에서 alpha-amylase를 생산하는 thermophilic bacteria를 분리하였다. 이 효소는 매우 thermostable하고 active하여 regulation mechanism을 규명하고 고역가 생산균주 특히 regulatory mutants를 개발하고 싶어 다음과 같은 기초실험 결과를 얻었다.

탄 소 원		2-deoxyglucose (g/l) added	Growth (OD <sub>660</sub> )	α-Amylase activity(u/ml)
glucose(g/l)	starch(g/l)			
20.0	0.0	0.0	12.0	0.0
0.0	20.0	0.0	12.0	50.0
20.0	5.0	0.0	12.0	0.8
5.0	20.0	0.0	12.0	32.0
0.0	0.0	10.0	0.0	0.0
20.0	0.0	10.0	12.0	0.0
0.0	20.0	10.0	0.0	0.0

- 1) Induction과 Repression에 대해 간략히 Define하라. (15점)
- 2) 위의 결과에서 α-amylase의 biosynthesis는 어떤 Regulation mechanism에 의해 control되고 있는지 자세히 설명하라. (15점)
- 3) 2-deoxyglucose는 α-amylase의 biosynthesis에 어떤 작용을 하고 있는가? (15점)
- 4) Regulation을 받지 않는 regulatory mutants를 분리하고자 한다. 즉 Glucose와 Starch가 함께 포함된 배지에서 α-amylase를 생산하는 mutants나 Carbon source에 관계없이 항상 α-amylase를 생산하는 mutants를 분리하기 위해서, 그러한 mutants들을 어떻게 enrichment 시킬 수 있을 것인지 실험방법을 set-up하라. (15점)
- 5) 그런 mutants를 어떻게 screening하여 분리할 것인지 agar 배지를 이용한 실험방법을 set-up하라. 전분에 대한 iodine reaction을 이용하라. (20점)
- 6) Mutagenized cells을 위에서 set-up된 procedure에 따라 enrichment, screening을 거쳐 isolation한 결과 그 균주는 starch는 없이 20g/l의 glucose를 sole carbon source로 포함한 배지에서 200 u/ml의 α-amylase를 생산하였다. 이런 mutant를 무슨 mutant라 하는가? 이 mutant를 characterize하기 위해 이 mutant에서 α-amylase에 대한 operon(promoter+operator+structural gene of α-amylase)을 분리하여 wild type균주에 cloning한 결과 carbon source로서 glucose만을 포함한 배지에서 전혀 α-amylase를 생산하지 않았다. 어디에 mutation이 일어났는가? 왜? (20점)

## Group III. 효소공학 분야

1. 기질 S가 생성물 P로 변환하는 다음의 효소반응이 있다.



- (a) 위기작을 표현하는 속도식을 유도하라. 이러한 속도식을 표현하기 위하여 도입된 가정들을 나타내라. (30점)
- (b) 위의 (a)에서 적용시킨 가정들이 실제와 맞지 않을 경우 속도식을 표시하며 이를 풀기 위한 방법에 대하여 설명하라. (20점)
- (c) 효소가 first-order로 시간에 따라 불활성이 되는 경우의 속도식을 유도하라. (20점)
- (d) 효소가 불활성되는 경우 모든 기질을 생성물로 전환시키기 위하여 실제로 필요한 효소의 양을 계산하는 식을 표현하라. Special case ( $S_0 \gg K_m$  및  $S_0 \ll K_m$ )의 효소양 계산식을 단순화하라. (30점)

## Group IV. 배양 및 생물공정 분야

1. 다음과 같이 고농도의 기질에서 성장 저해를 받는 미생물에 대하여 물음에 답하라.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2/K_i}$$

(1) 최대의 비성장속도 ( $\mu_{highest}$ )를 얻기 위한 최적의 기질농도 ( $S_{opt}$ )는  $S_{opt} = \sqrt{K_s K_i}$ 임을 증명하라. (15점)

(2)  $\mu_m = 1^{h^{-1}}$ ,  $K_s = 10\text{ g/L}$ ,  $K_i = 10\text{ g/L}$  일 경우,  $\mu_{highest}$ 를 계산하라. (15점)

(3) 최대 성장속도 ( $\mu = \mu_{highest} = \text{constant}$ )를 유지하면서 fed-batch culture를 하고자 한다. 최대성장속도를 유지하기 위한 Feed의 유량을 시간에 따른 함수 ( $Q(t)$ )로 표시하고, 총 배양시간( $t$ )과 최종적으로 얻을 수 있는 바이오매스의 중량 ( $X^t = XV$ )을 계산하라. (50점)

조건) 초기 배양부피  $V_0 = 1\text{ L}$ , 최종배양 부피  $V = 100\text{ L}$ , Feed내 기질의 농도  $S_f = 100\text{ g/L}$ , 초기 세포 농도  $X_0 = 0.5\text{ g/L}$ , 수율  $Y_{x/s} = 0.5$

(4) 이론적으로 계산한 feed의 유량조건  $Q(t)$ 으로 운전해도 기대하는 만큼의  $X^t$ 를 얻지 못하는 경우가 많다. 반응기 내의 실제 기질 농도를 전극을 통해 계속 측정할 수 있으면,  $S_{opt}$ 를 유지하도록 feed의 유량을 제어하여 문제를 해결할수 있다. 이러한 제어 시스템을 구성하는데 어떤 기술적인 문제가 있는가? (20점)

## Group V. 생물분리정제 분야

1. 추출계수,  $K(=C_{\text{유성}}/C_{\text{수성}})$ 가 3인 추출계가 있다. 이 계에서 모액(수용액)과 같은 부피의 유기용매를 사용할 경우, 전량의 용매를 1회에 사용할 경우와, 용매를 같은 부피로 나누어 2회에 걸쳐 교차흐름(cross-current)식으로 사용할 경우의 추출효율(fraction extracted)을 비교하라. (40점)
2. 어떤 단백질 A를 흡착 할 수 있는 수지가 채워진 컬럼을 이용하여 정제하려고 한다. 우선 A의 수지에 대한 흡착 특성을 알아보기 위하여 여러 다른 농도의 단백질 A 용액을 준비하여 각각 일정량의 수지를 가하고 회분식 흡착 평형실험을 수행하였다. 충분한 시간동안 교반 접촉시켜 흡착 평형에 도달한 후 A의 액상농도와 이를 근거로 수지에 흡착된 농도를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

액상농도 $C_A$ (mg/mL)	0.8	1.6	5.0	17	38	56
흡착농도 $Q_A$ (mg/g)	0.086	0.163	0.410	0.825	1.077	1.169

(1) A의 흡착이 Langmuir 등온평형식을 따른다고 할 때 수지 단위질량당 단백질 A의 흡착용량 [단백질 A의 mg/수지 g]을 구하라. (20점)

(2) 전체적으로 Langmuir 평형관계를 따른다 하더라도 A의 농도가 둑은 범위에서는 선형 평형관계가 성립할 수 있다. A의 흡착 평형이 선형관계 ( $Q_A \approx K_L C_A$ )임을 가정하고 선형 흡착평형상수  $K_L$  [mL/g]을 구하라. (20점)

(3) 컬럼에 50 cm높이로 수지를 충진하고 단백질 A가 들어있는 용액을 pulse로 주입하였다. 수지입자의 밀도( $\rho_p$ )는 2.8 g/cm<sup>3</sup>, 충진된 bed의 공극율( $\epsilon$ )은 0.4, 이동상의 유속( $v$ , superficial velocity)은 15 cm/min이다. 컬럼 내에서 A의 이동에 대한 물질수지식은 다음으로 표현할 수 있다.

$$v \frac{\partial C_A}{\partial z} + \epsilon \frac{\partial C_A}{\partial t} + \rho_p (1 - \epsilon) \frac{\partial Q_A}{\partial t} = 0$$

여기서  $C_A$ 는 액상 평형농도(mg/L),  $Q_A$ 는 흡착 수지상 평형농도(mg/g),  $z$ 는 컬럼내 이동거리,  $t$ 는 이동시간이다. (2)번에서 얻어진 선형 평형상수를 이용하여 단백질내 A의 배출시간[min]을 계산하다. (20점)