

I. [10]

Double-stranded DNA helix 구조에 대하여 다음의 물음에 답하시오.

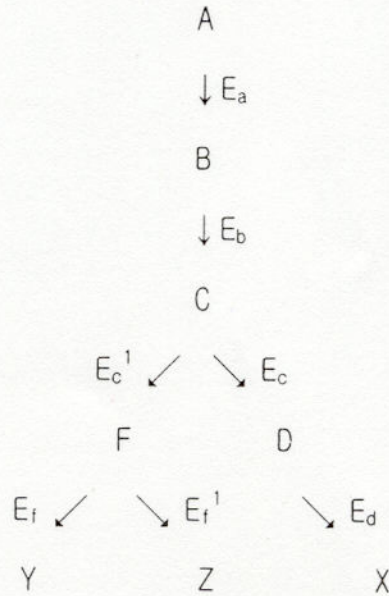
- 1) DNA strand에서 각각의 end에 존재하는 chemical group은 무엇인가? [2]
- 2) Nucleotides에서 염기의 N-atom과 당의 C-atom 사이의 결합을 무엇이라 하는가? [2]
- 3) Polynucleotide backbone 형성을 위한 nucleotides간의 결합을 무엇이라 하는가? [2]
- 4) RNA는 존재하지 않고 DNA에만 존재하는 base는 무엇인가? [2]
- 5) DNA의 double-stranded helix에서 내부에 존재하는 한쪽 strand의 bases는 다른 쪽 strand의 bases와 어떠한 결합을 형성하는가? [2]

답 : () 이유:

답: 1. 5'-P, 3'-OH, 2. N-glycosidic bond, 3. phosphodiester bond, 4. thymine, 5. hydrogen bond.

II. [15]

다음은 어떤 박테리아에서 특정 아미노산들의 생합성 과정과 합성조절 기작이다.



A는 아미노산 X, Y, Z의 생합성을 위한 전구물질이고, B, C, D, F는 대사과정의 중간물질이다. 또한 E_a , E_b , E_c , E_c' , E_d , E_f , E_f' 는 각 반응단계에 관여하는 효소들이다. 아미노산들의 합성조절에서 효소 E_c 는 아미노산 X에 의하여 feedback inhibition을 받고, E_c' 는 아미노산 Y에 의하여 feedback repression을 받는다. 또한 효소 E_a 는 X와 Y에 의하여 concerted(cooperative) feedback regulation을 받는다. 단 물질 A로부터 아미노산 X까지의 생합성 과정에서 반응의 율속단계(rate limiting)는 물질 A가 B로 전환되는 과정이며, 아미노산 X는 세포내에서 배지로 분비가 잘 이루어지는 것으로 밝혀졌다. 이러한 조건의 박테리아를 이용하여 최대의 수율(yield)과 생산성(productivity)으로 아미노산 X를 생산하기 위하여 어떠한 변이 또는 재조합 균주를 개발하여야 하며, 각 단계의 변이균주 선별을 위한 방법을 설명하고, 이들이 어떻게 아미노산 X의 생성을 향상시키는지에 대하여 설명하시오.

답

1. F (또는 Z와 Y)에 대한 영양요구성 변이균주(auxotrophic mutant) 개발
 - 1) 선별방법(10점)
 - 2) 아미노산 X의 생성 향상의 원인 (5)

2. 아미노산 X에 의한 E_c 와 E_a 의 feedback resistant(non-sensitive) mutant 이면서 아미노산 Y에 의한 E_a 의 feedback resistant(non-sensitive) mutant인 변이균주 개발
 - 1) 선별방법(10점)
 - 2) X의 생성 향상 원인(10점)

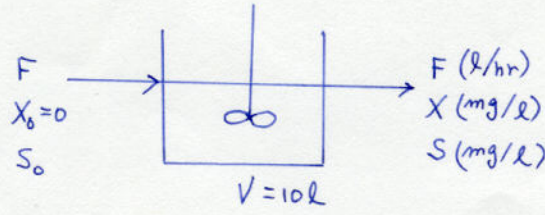
3. 유전자조작 기술을 이용한 E_a 유전자 수를 증가시킴
 - 1) 아미노산 X에 feedback resistant한 E_a 유전자 클로닝 원리(10)
 - 2) X의 생성 향상 원인 (5)

II. #3

답안 및 채점 기준표

문제 I.

data: $\left\{ \begin{array}{l} V = 10 \text{ l} \\ S_0 = 1000 \text{ mg/l} \\ \mu_{max} = 0.8 \text{ hr}^{-1} \\ K_s = 250 \text{ mg/l} \\ Y_{X/S} = 0.5 \end{array} \right.$



4점 1) Cell mass balance :

$$\cancel{FX_0} - FX + \mu V X = V \frac{dX}{dt}$$

$\circ (\because X_0=0)$ $\circ (\because \text{st. st.})$

$$\therefore \frac{F}{V} = \mu$$

Momod 속도식을 사용하면 $\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} = \frac{F}{V} = D \dots \textcircled{1}$

$$\therefore F = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} V$$

Cell washout 조건 : $S = S_0$

$$\therefore F = \frac{\mu_{max} S_0}{K_s + S_0} V = \frac{(0.8 \text{ hr}^{-1})(1000 \text{ mg/l})}{250 \text{ mg/l} + 1000 \text{ mg/l}} \times 10 \text{ l} = 6.4 \text{ l/hr}$$

Cell washout 원인 : $D > \mu_{max}$

미생물이 반응기내에서 최대로 자랄 수 있는 속도보다 빠져나가는 속도가 크기 때문

4점 2) from ①

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} = \frac{F}{V} = D$$

식을 정리하면 $S = \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} = \frac{(\frac{3}{10})(250)}{0.8 - \frac{3}{10}} = 150 \text{ mg/l}$ ②

Substrate mass balance: $FS_0 - FS - \frac{\mu V X}{Y_{X/S}} = V \frac{dS}{dt}$ ③
 $\circ (\because \text{st. st.})$

식을 정리하면

$$X = \frac{F(S_0 - S) Y_{X/S}}{\mu} = \frac{F(S_0 - S) Y_{X/S}}{\frac{F}{V}} = (S_0 - S) Y_{X/S} = (1000 - 150)(0.5) = 425 \text{ mg/l}$$

4점 3) 미생물의 배출속도 (cell production rate) = $DX = D(s_0 - s) Y_{X/S}$

$$= D \left(s_0 - \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} \right) Y_{X/S}$$

미생물 배출속도가 최대가 되기 위한 조건 :

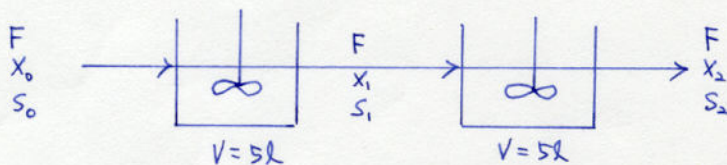
$$\frac{d(DX)}{dD} = 0 \quad : D = D_{max}$$

미분하며 식을 정리하면

$$D_{max} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + s_0}} \right)$$

$$\therefore F = D_{max} \cdot V = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + s_0}} \right) V = 0.8 \left(1 - \sqrt{\frac{250}{250 + 1000}} \right) (10) = 4.42 \text{ l/hr}$$

4점 4)



from ① & ②

$$s_1 = \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} = \frac{\left(\frac{3}{5}\right)(250)}{0.8 - \frac{3}{5}} = 750 \text{ mg/l}$$

$$X_1 = \frac{D(s_0 - s) Y_{X/S}}{\mu} = (s_0 - s) Y_{X/S} = (1000 - 750)(0.5) = 125 \text{ mg/l}$$

5점 5) 2nd reactor

Cell mass balance: $FX_1 - FX_2 + \mu_2 V_2 X_2 = V_2 \frac{dX_2}{dt}$

$$\therefore X_2 = \frac{FX_1}{F - \mu_2 V_2} \dots \textcircled{4}$$

Substrate mass balance:

$$FS_1 - FS_2 - \frac{\mu_2 V_2 X_2}{Y_{X/S}} = V_2 \frac{dS_2}{dt}$$

$$\therefore X_2 = \frac{FY_{X/S}(S_1 - S_2)}{\mu_2 V_2} \dots \textcircled{5}$$

from ④ & ⑤

$$\frac{FX_1}{F - \mu_2 V_2} = \frac{F Y_{X/S} (S_1 - S_2)}{\mu_2 V_2}$$

2차식 $\mu_2 = \frac{\mu_{\max} S_2}{K_S + S_2}$ 이므로

$$\frac{X_1}{F - \frac{\mu_{\max} S_2}{K_S + S_2} V_2} = \frac{Y_{X/S} (S_1 - S_2)}{\frac{\mu_{\max} S_2}{K_S + S_2} V_2}$$

$$\frac{125}{3 - \frac{(0.8)(5)S_2}{250 + S_2}} = \frac{0.5(1750 - S_2)}{\frac{(0.8)(5)S_2}{250 + S_2}}$$

식을 정리하면

$$S_2^2 - 2500S_2 + 562500 = 0$$

$$\therefore S_2 = 250 \text{ mg/l}$$

from ⑤

$$\therefore X_2 = \frac{(3)(0.5)(1750 - 250)}{\frac{(0.8)(250)}{250 + 250} (5)} = 375 \text{ mg/l}$$

{ First reactor : cell growth
 { Second " : secondary metabolite production

IV.

#4

해답

1.

양이온 교환수지를 pH 5.9 인 MES 완충용액 5 volume 으로 평형화 시킨다. 이 후에 시료를 loading 하여 등전점에 아직 이르지 않아 양이온을 띤 흡착된 단백질 (D, E, F, G, H)을 고농도의 염용액 (혹은 1 M NaCl) 으로 용리시켜서 보관하고 등전점을 통과하여 음이온을 띤 흡착되지 않은 단백질 (A, B, C)은 버린다. 흡착된 5 개의 단백질을 pH 8.2 Tris 완충용액으로 투석한 다음에 음이온교환수지에 loading 한다. 등전점을 통과하여 음이온을 띤 3 개의 단백질 (D, E, F)만이 흡착되고 나머지 2 개의 단백질은 등전점을 통과하지 않아 음이온을 띄어서 흘러내린다. 흡착된 단백질 (D, E, F)을 염용액으로 용리하여 농축한 다음 gel filtration column 에 loading 한다. 3 개의 시료단백질 (D, E, F)는 각기 20, 50, 100 kDa 의 분자량을 가지고 있다. Gel filtration 에서는 크기가 큰 단백질 순서로 단백질이 용리되어 나온다. 그러나 단백질 F 는 void volume 에서 제일 먼저 용리되어 나오므로 구분하여 분리할 수 있고 chromatogram 에서 다음에 나오는 단백질 peak 가 목적으로 하는 단백질 E 이다.

2.

Bead 외부에 있는 Void volume = $V_0 = 30$ ml

Bead 내부에 있는 void volume = $V_i = 70 \times 0.2 = 14$ ml

단백질 I 의 partition coefficient $K_D = 0$

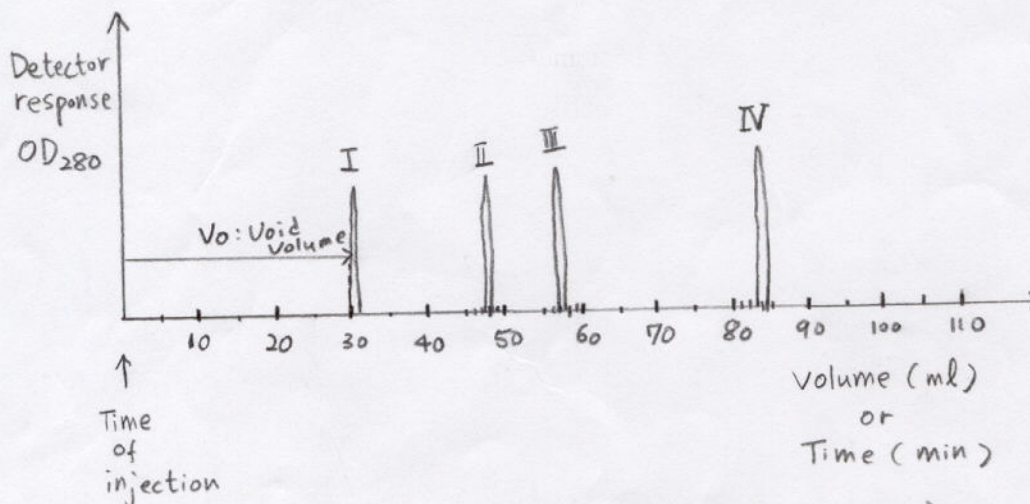
단백질 II 의 partition coefficient $K_D = 75/60 = 1.3$,

단백질 III 의 partition coefficient $K_D = 75/40 = 1.9$

단백질 IV 의 partition coefficient $K_D = 75/20 = 3.8$

각 단백질의 용리부피 $V_e = V_0 (1 + K_D \times V_i/V_0)$

단백질 I, II, III, IV 의 용리부피 는 각기 30, 48, 57, 83 ml



< gel filtration chromatogram >

V.

#5

Soulution

1번 - 7점, 2번 - 4점, 3번 - 7점, 4번 - 7점

$$(1) k_L a (C_L^* - C_L) = \frac{1}{Y_{X/O_2}} \mu X$$

when $C_L = 0$

$$X = \frac{Y_{X/O_2}}{\mu} k_L a C_L^* = \frac{0.1 \text{ mol/L} \cdot \text{h}}{0.1 \text{ h}^{-1}} \times \frac{0.6 \text{ gcell}}{\text{g O}_2} \times \frac{32 \text{ g O}_2}{1 \text{ mol O}_2}$$

$$= 19.2 \text{ g cell / L}$$

$$Y_{\text{cell/glucose}} (S_0 - S) = X - X_0 = 19.2 - 0.5 = 18.7 \text{ (g/L)}$$

$$\therefore S_0 = \frac{1}{Y_{X/S}} 18.7 \text{ g/L} = \frac{18.7}{0.5} = 37.4 \text{ (g/L)}$$

(2) 온도를 낮추거나 pH를 변화시켜 균체 성장 속도를 낮추어 준다. 온도를 낮추려면 냉각수의 온도를 낮추거나 냉각수 순환 속도를 증가 시켜야 하는데 이 경우 에너지 소모량이 증가한다. 한편 pH를 낮추려면 산을 첨가하여야 하는데 반응기와 용량이 큰 경우 산 첨가후 균일한 mixing에 상당한 시간이 소요된다. RPM을 증가하여 산소전달 속도를 증가시키는 방법도 생각 할 수 있으나 일반적으로 산소전달속도의 증가에 따라 균체 성장 속도도 더불어 증가하므로 얼마 지나지 않아 다시 DO가 하락할 것이므로 적절한 대책이라 하기 어렵다. 즉 공급측면의 확대보다는 수요측면에서 필요량을 낮추는 것이 좋다.

(3) Fed-batch reactor 운전에서

$$\frac{d(VS)}{dt} = 0 = F \cdot S_F - \frac{1}{Y_{X/S}} \mu(VX) \quad \text{or}$$

$$F \cdot S_F = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu(VX) \quad \text{or}$$

$$S_F \int_0^t F dt = \frac{1}{Y_{X/S}} \int_0^t \mu(VX) dt = \frac{1}{Y_{X/S}} (VX - V_0 X_0)$$

↑

$$\therefore \frac{d(VX)}{dt} = \mu(VX)$$

$$Y \cdot S_F (V - V_0) = VX - V_0 X_0$$

$$\therefore V = \frac{V_0 \cdot X - V_0 \cdot S_F \cdot Y_{X/S}}{X - S_F \cdot Y_{X/S}} = \frac{0.5 \cdot 500 - 500 \cdot 500 \cdot 0.5}{19.2 - 500 \cdot 0.5} = 540.5 \text{ (L)}$$

$$\therefore VX = 540.5 \times 19.2 = 10377.6 \text{ g}$$

배양시간은 세포성장식에서 계산할수 있다. 즉

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu(VX) \quad (VX) = (VX)_0 e^{\mu t} \quad \text{or}$$

$$t = \frac{1}{\mu} \ln \frac{(VX)}{(VX)_0} = \frac{1}{0.1} \ln \frac{10377.6}{0.5 \times 500} = 37.3 \text{ (h)}$$

(4) 먼저 포도당 소모속도를 계산해야 한다.

$$\frac{d(VS)}{dt} = 0 = F \cdot S_F - \frac{1}{Y_{X/s}} \mu (VX) - \frac{1}{Y_{p/s}} \cdot q \cdot VX$$

$$F \cdot S_F = \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + \frac{q}{Y_{p/s}} \right) VX$$

생산단계 시작된 후 30 시간 경과시 VX 는

$$(VX)_p = (VX)_{p0} e^{\mu t} = 10377.6 e^{0.01 \times 30} = 14008.3 \text{ (g)}$$

따라서

$$F \cdot S_F = \left(\frac{0.01}{0.5} + \frac{0.05}{0.2} \right) \cdot 14008.3 = (0.02 + 0.25) \cdot 14008.3 = 3782.2 \text{ (g/h)}$$

$$\therefore \text{방출되는 열량} = 3782.2 \times 3811 \times 0.5 = 7.207 \times 10^3 \text{ (kcal/h)}$$