

문제 III. *Zymomonas mobilis*가 일반적으로 발효에 이용되는 육탄당 (hexose) 즉 glucose 외에 xylose와 같은 오탄당 (pentose)도 이용할 수 있도록 유전적으로 재조합 되어져 왔다.

이 균주의 Monod parameter들은 glucose를 이용하여 성장시에  $\mu_{max}=0.40 \text{ hr}^{-1}$ ,  $K_s=0.1 \text{ g/L}$ ,  $Y_{x/s}=0.11 \text{ g.dry cell/g.gluose}$ ,  $Y_{p/s}=0.48 \text{ g ethanol/g glucose}$ 이고, Xylose를 이용하여 성장시는  $\mu_{max}=0.30 \text{ hr}^{-1}$ ,  $K_s=0.5 \text{ g/L}$ ,  $Y_{x/s}=0.10 \text{ g.dry cell/g.xylose}$ ,  $Y_{p/s}=0.45 \text{ g ethanol/g xylose}$ 이다.

그러나 glucose 농도가 0.2g/L 이상일 경우, xylose를 이용한 성장이 억제 (repression)를 받는다.

이 균주를 연속배양기(chemostat)에서 배양하며 50g/L glucose와 50g/L xylose를 함유하고 있는 배지를 연속적으로 공급(feeding)할 때 정상상태(steady state)에서 자라고 있는 균주의 최대 에탄올 생성 속도 (Maximum ethanol production rate)를 구 하여라. (사용된 모든 합당한 가정을 기술하고 문제를 푸시오) (100%)

### 해답 3

1) 먼저 하나의 substrate 만이 이용되는 가장 단순한 경우를 가정해 보자. 이는 glucose 의 농도가 0.2 g/L (critical concentration) 이상이 유지되어 xylose 가 이용되지 않는 경우에 해당한다. 따라서 단지 glucose 만이 substrate 로 이용될 수 있다고 가정할 수 있으므로 standard chemostat 에 적용되는 식들을 이용할 수 있다 (5 점).

---

Ethanol 의 생산과정이 growth-associated fermentation process 라고 가정하면, 다음과 같이 growth-associated production constant (in Leudeking-Piret equation)를 구할 수 있게 된다.□□

$$\square\square\square\square \frac{Y_p/s}{Y_x/s} = 0.48/0.11 = 4.36 \text{ g ethanol/g cell mass}$$

또한 ethanol 의 생산이 growth associated fermentation process 라고 가정하였으므로 cell 의 농도가 최대가 될 때 ethanol 의 생산도 최대가 되므로  $\mu_{\max}$  가 되는 optimum dilution rate ( $D_{\text{opt}}$ )에서 ethanol 생산도 최대가 된다고 할 수 있다 (5 점).

---

$D_{\text{opt}}$  는 아래의 식으로 구할 수 있다.

$$D_{\text{opt}} = \mu_{\max} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_f}} \right) \quad \dots \text{(eq. 7.18 from Bailey and Ollis II edition)}$$

주어진 parameter 값들을 위의 식에 대입하여  $D_{\text{opt}}$  를 구하면  $0.382 \text{ hr}^{-1}$  이다. (5 점-식 유도포함).

---

이 optimal dilution rate 에서 chemostat 에 잔존하는 glucose 의 농도는 다음의 식으로 구할 수 있다.

$$S = \frac{DK_s}{(\mu_{\max} - D)} \quad \text{(eq. 7.15 from Bailey and Ollis II edition)}$$

glucose 의 양을 계산하기 위해 주어진 parameter 값들을 위의 식에 대입하면 optimal dilution rate 에서 chemostat 에 잔존하는 glucose 의 양은  $2.122 \text{ g/l}$  이 되며 이 농도는  $0.2 \text{ g/L}$  (critical glucose concentration) 이상이 되므로 초기가설 (단지 glucose 만이 substrate 로 이용된다)을 만족하게 된다 (5 점 - 식 유도포함).

---

이제 ethanol production rate 를 계산해 보자.

이 ethanol production rate 값을 구하기 위해서는 주어진  $Y_{p/s} = 0.48 \text{ g ethanol / g glucose}$  를 이용하여 직접적으로 계산하는 방법과  $x$  (the cell mass concentration) 값을 구하고 여기에 계산된 값을 적용하여 ethanol production rate 를 계산할 수 있는 방법이 있다 □□

먼저 첫번째 방법으로 다음식을 이용하고 문제에 주어진 값을 대입하여 ethanol 농도를 구하면,  $Y_{p/s}(S_f - S) = 22.981 \text{ g/L}$  가 된다.

이제 ethanol production rate 를 구하기 위해 ethanol 농도에 앞서 구한 optimal dilution rate( $D_{opt}$ )를 곱하여 주면 된다.

따라서 Ethanol production rate 는  $D \cdot E = 0.382 * 22.981 = 8.7787$  g ethanol/liter.hour 가 되며, 이 값은 optimal dilution rate 에서 단지 only glucose 만이 이용되었을 때에 산출 된 값이다.

두번째 ethanol production rate 를 구하는 방법은 값을 적용하는 방법으로 먼저 optimal dilution rate 에서의 cell 농도(x)를  $X=Y_{x/s}(S_f-S)$  식을 이용하여 주어진 값으로부터 구하고 (5.267 g cell/l), 여기에  $D_{opt}$  값을 곱하여 주면 8.771g ethanol/liter hour 이 된다 (10 점).

- 
- 2) 이제 낮은 dilution rate 을 고려해야 한다. 0이 dilution rate 에서는 두 가지의 당이 소비되어 지며 glucose 의 농도는 임계 glucose 농도보다 낮을 수 있다.

$\frac{\mu_{MAX} S_{crit}}{K_s + S_{crit}}$  의 임계 dilution rate 에서 glucose 만이 사용되어지는 길이라면 잔존하는 glucose 의 농도는  $S_{crit}$  가 된다. 주어진 값을 이용하면,  $D_{crit}$  는  $0.2667 \text{ hr}^{-1}$  이 된다 (5 점).

---

이 임계 dilution rate 이하에서는 잔류 glucose 농도가 임계 glucose 농도보다 더 낮아 질 것이며, xylose 가 낮은 dilution rate 에서 사용 될 수 있다.

그러나 낮은 dilution rate 에서 잔존하는 glucose, xylose 의 농도를 계산하기 위해서는 추가적 성장과 같은 단순화된 가정이 필요하다.

단순화된 계산을 위해 우리는 위에서 언급한 가정을 사용할 수 있다. 정확한 계산을 원한다면 생물공학 수업이나 몇몇의 저널에서 그 실마리를 찾을 수 있다. (Komoala, D.S., et al. "Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates" Biotechnology and Bioengineering, 26: 1272–1281, 1984)

여기에는 이 논의와 관련된 MS Excel에서 사용된 방정식이 있다.

낮은 dilution rate 에서는 잔존 glucose 와 xylose 농도는 다음과 같은 식으로 계산할 수 있다.

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{max} - D}$$

위의 식을 두 번 사용하기 위해 언급된 가정은 cell 은 glucose 와 xylose 에서 모두 부가적으로 잘 성장(additive growth)할 수 있다 (additive growth)는 것이다. 좀 더 정확한 해를 위해서는 앞서 언급된 논문에 나타나 있는 cybernetic 식을 사용하거나 dynamic 모사 또는 coupled non-linear algebraic 방정식을 사용할 수 있다.

$D_{crit} = 0.2666662 \text{ hr}^{-1}$ 에서 잔존하는 glucose 와 xylose 의 농도가 위의 식을 이용해 계산되어질 수 있으며 그 값은 아래에 나타내었다. Chemostat에서 에탄올의 농도는 두개의 기질에 대해  $Y_{P/S}(S_f - S)$ 를 더해서 사용 할 수 있다.

$$E_{total} = Y_{P/G}(G_f - G) + Y_{P/X}(X_f - X)$$

따라서 최대 에탄을 생산률은 임계 dilution rate 과 에탄을 농도를 곱함으로써 구해진다.

$$\Pi = DE_{\text{total}} = \Pi_G + \Pi_X$$

임계 이하의 농도에서 glucose 와 xylose 가 사용된다.

D<sub>critical</sub> 0.26666667 1/hour

Residual Glucose 0.2 g/l

Residual Xylose 4 g/l

Total Ethanol 44.604 g/l

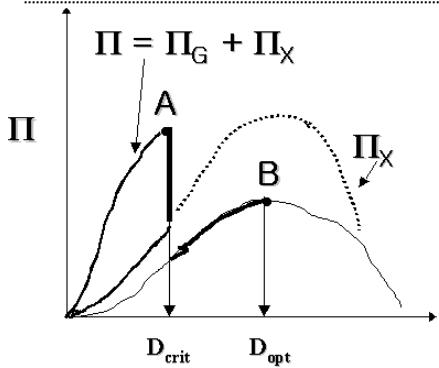
Total Ethanol Prod. Rate 11.8944 g/l-hr is higher at D<sub>crit</sub> (10 점)

---

glucose 와 xylose 가 임계 dilution rate 에서 모두 사용된다고 가정 하였을 때 계산된 에탄을 생산률인 11.89 g/l-hr 은 최적 dilution rate에서 오직 glucose 만을 사용하였을 때의 에탄을 생산률 8.7789 g/l-hr 보다 높다.

그리고 dilution rate 가 임계 dilution rate 보다 낮은 경우 에탄을 생산성을 비교해 보면 (그림 참조) dilution rate 감소에 따라 항상 감소할 것이다. 따라서 이 경우 local maximum 은 임계 dilution (A) 또는 D<sub>opt</sub> 에서 (B) 존재하며 따라서 이를 비교하면 global maximum 은 11.8944 g/L-hr 가 된다 (5 점).

---

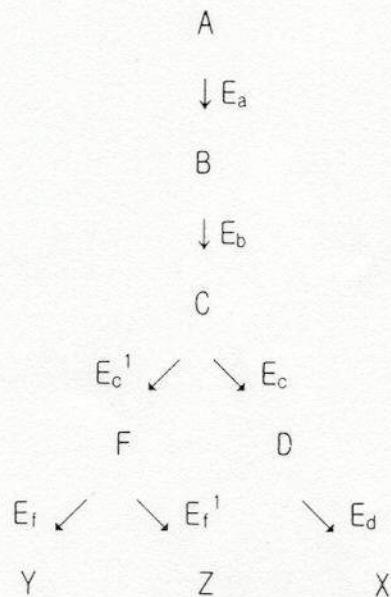


**End of Document**

---

## 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 Ea, Eb, Ec, Ec', Ed, Ef, Ef'는 각 반응단계에 관여하는 효소들이다. 아미노산들의 합성조절에서 효소 Ec는 아미노산 X에 의하여 feedback inhibition을 받고, Ec'는 아미노산 Y에 의하여 feedback repression을 받는다. 또한 효소 Ea는 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

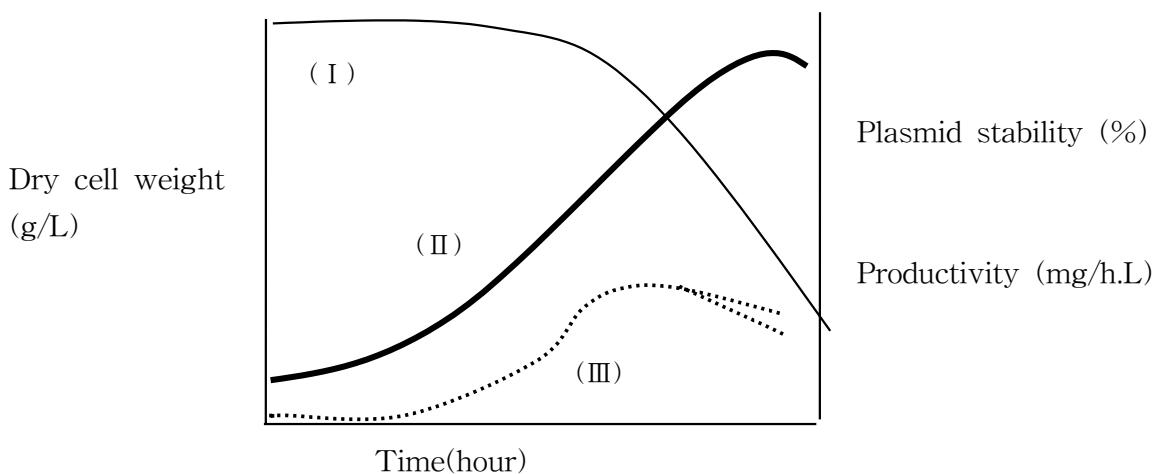
1. F (또는 Z와 Y)에 대한 영양요구성 변이균주(auxotrophic mutant) 개발
  - 1) 선별방법(10점)
  - 2) 아미노산 X의 생성 향상의 원인 (5)
  
2. 아미노산 X에 의한 Ec와 Ea의 feedback resistant(non-sensitive) mutant  
이면서 아미노산 Y에 의한 Ea의 feedback resistant(non-sensitive) mutant인  
변이균주 개발
  - 1) 선별방법(10점)
  - 2) X의 생성 향상 원인(10점)
  
3. 유전자조작 기술을 이용한 Ea 유전자 수를 증가시킴
  - 1) 아미노산 X에 feedback resistant한 Ea 유전자 클로닝 원리(10)
  - 2) X의 생성 향상 원인 (5)

**End of Document**

---

## 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 측정한 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 table과 같은 data를 얻을 수 있었다

배지성분 (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.

## 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)

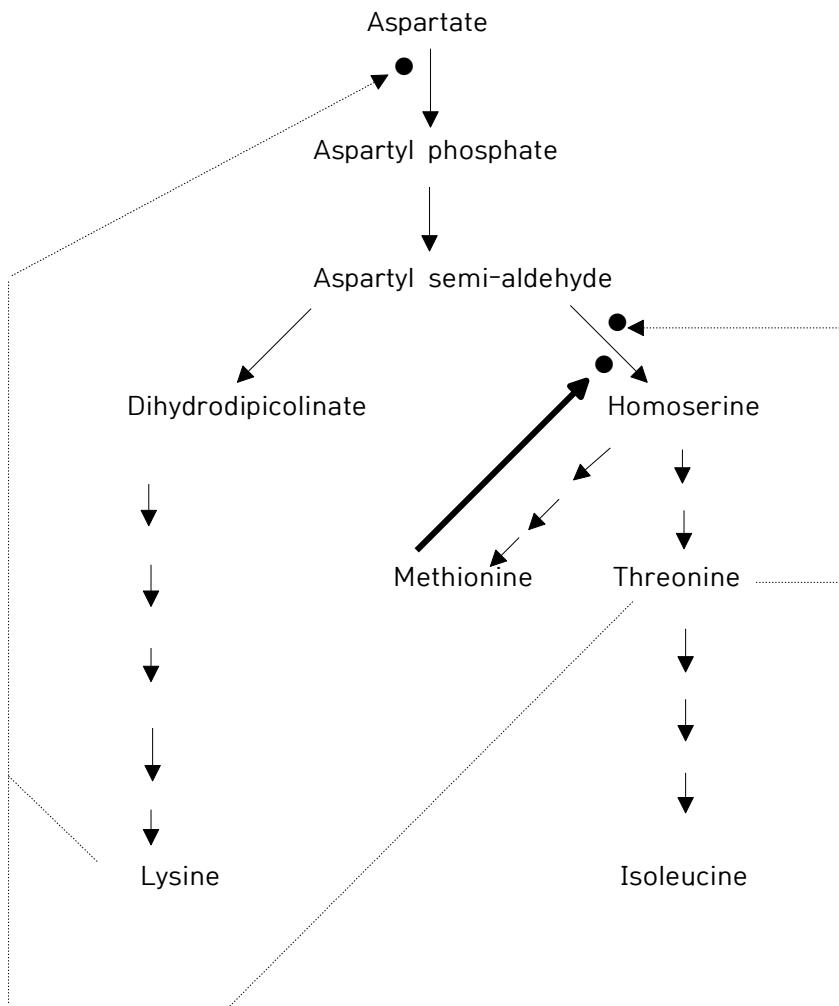
Phosphate regulation에 관한 가설 혹은 가능성 있는 논리적인 설명 (4점)

**End of Document**

---

## Group II. 응용미생물학 분야

1. C. glutanicum의 aspartate 관련 아미노산의 합성 경로 및 metabolic control은 다음과 같다.



- Biosynthetic pathways
- ● Feedback inhibition
- ● Feedback repression

이 pathway의 첫 번째 효소인 aspartokinase는 lysine과 threonine에 의

해 concerted feedback inhibition을 받고 있다. 한편 Homoserine dehydrogenase(aspartyl semi-aldehyde를 homoserine으로 전환시키는 효소)는 threonine에 의해 feedback inhibition을 받고 있고, methionine에 의해 feedbak repression을 받고 있다.

- a) Feedback inhibition과 Feedback repression의 차이점은?
- b) Concerted feedback inhibition이란?
- c) 이러한 metabolic pathway를 이용하여 lysine을 과량 생산(over-production) 할 수 있는 고생산성 산업용 균주 개발 전략에 대해 설명하시오.
- d) lysine을 과량 생산(overproduction)할 수 있는 mutant를 선발하는 방법에 대해 설명하시오.

2. 다음의 질문에 답하시오.

- 1) Gram negative bacteria의 경우 의약단백질을 만드는 시스템으로 사용될 경우 박테리아 outer membrane의 한 성분에 의하여 커다란 문제가 일어날 수 있다. 이 성분은 무엇이며, 이 성분이 왜 문제가 되는지를 간단히 설명하시오.
- 2) Facultative bacteria 들은 산소가 없는 경우 많은 organic acid들을 생성하는데, 이러한 organic acid 들을 만드는 이유에 대하여 설명하시오.

## Group II 응용미생물학 분야

### 1. a) ① Feedback inhibition (5pt)

biochemical pathway의 endproduct가 pathway중의 어떤 한 반응(보통 첫 번째 반응)을 촉매하는 효소의 활성(activity)를 저해함으로써 최종산물(end product)의 농도를 제어(regulation)하는 현상(3 pt). Feedbak inhibition에는 allosteric enzyme이 관계하는데 보통 최종산물이 allosteric enzyme의 두 번째 활성부위(active site)에 결합하여 효소의 구조를 바꿔 기질이 결합하는 첫 번째 활성 부위의 활성을 저해한다(2 pt).

### ② Feedback repression (5 pt)

biochemical pathway의 endproduct가 pathway중의 어떤 한 반응(보통 첫 번째 반응)을 촉매하는 효소를 더 이상 생산하지 않게 함으로써 최종산물(end product)의 농도를 제어(regulation)하는 현상(3 pt). Repressor는 operator 영역에 결합하여 RNA polymerase와의 결합을 막아서 transcription을 막는데, 보통 대사의 최종산물이 corepressor로 작용하여 repressor와 결합하였을 때에만 전사를 막음으로써 효소를 위한 mRNA를 합성하지 않는다(2 pt).

### b) Concerted feedback inhibition (10 pt)

$P_1$ ,  $P_2$ 를 각각 생산하는 Branched pathway가 있을 경우,  $P_1$ 과  $P_2$ 에 대하여 2개의 allosteric binding site를 가진 하나의 효소가 경로를 제어한다(4 pt).  $P_1$ 과  $P_2$  어느 한쪽의 농도만 높은 경우에는 feedback inhibition이 일어나기 불충분하지만,  $P_1$ 과  $P_2$  둘 다 높은 수준이 되어야만 feedback inhibition이 일어난다(4 pt).

Shuler textbook Fig.4.12 b) 참조 (2pt)

c) Lysine을 과량생산하기 위해서는 metabolic flux가 methionine이나 isoleucine을 생성하는 branch로 흐르지 않고 lysine 쪽으로만 흐르게 할 뿐만 아니라(3 pt) threonine이 생성되지 않게하여 concerted feedback inhibition을 제거할 수 있도록(3 pt) homoserine의 합성이 blocking된 균주를 돌연변이 및 선발법(3 pt)에 의해서 개발하는 전략을 사용. 즉 homoserine의 합성이 blocking되어 성장하는데 homoserine이 반드시 필요한 homoserine auxotroph(3 pt)나 threonine과 methionine이 동시에 필요한 threonine과 methionine의 double auxotroph(3 pt)를 선발하면 고생산성 균주가 될 것임. 또한 lysine의 feedback inhibition을 막기 위하여 lysine analogue에 대하여 저항성이 있는 mutant를 선별하여야 한다.

d) UV, 또는 chemical mutagen을 처리하여 mutant를 만들고, auxotroph mutant는 replica-plating 방법을 통해 선별할 수 있다(7 pt). replica-plating method는 Shuler textbook Figure 8.3과 같다.(8 pt). (growth factor = homoserine or threonine/methionine)

### 2.

- 1) Lipopolysaccharide (LPS) : 단백질의 분리정제시에 LPS를 잘 제거하지 못할 경우에는 LPS가 endotoxin으로 작용하여 부작용을 일으킴.
- 2) 산소가 없을 경우에는 해당과정에서 만들어지는 pyruvate가 TCA cycle로 들어갈 수 없기 때문에 Facultative bacteria 들은 에너지를 만들기 위해서 pyruvate로부터 유기산을 만든다. 이 때 해당과정에서 만들어진 NADH 가 NAD<sup>+</sup>로 재산화되어 계속적으로 해당과정이 진행되도록 한다.

**End of Document**

---

## 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> )	$\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase의 biosynthesis는 어떤 Regulation mechanism에 의해 control되고 있는지 자세히 설명하라. (15점)
- 3) 2-deoxyglucose는  $\alpha$ -amylase의 biosynthesis에 어떤 작용을 하고 있는가? (15점)
- 4) Regulation을 받지 않는 regulatory mutants를 분리하고자 한다. 즉 Glucose와 Starch가 함께 포함된 배지에서  $\alpha$ -amylase를 생산하는 mutants나 Carbon source에 관계없이 항상  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase를 생산하였다. 이런 mutant를 무슨 mutant라 하는가? 이 mutant를 characterize하기 위해 이 mutant에서  $\alpha$ -amylase에 대한 operon(promoter+operator+structural gene of  $\alpha$ -amylase)을 분리하여 wild type균주에 cloning한 결과 carbon source로서 glucose만을 포함한 배지에서 전혀  $\alpha$ -amylase를 생산하지 않았다. 어디에 mutation이 일어났는가? 왜? (20점)

**End of Document**

---

## Group II. 응용미생물학 분야

1. Human growth hormone (hGH) 유전자를 가지고 있는 두 종류의 플라즈미드 (PI와 PII)와 특성이 다른 2 종류의 *E. coli* 균주 (ECI과 ECII)가 있다. 두 플라즈미드로 두 *E. coli*를 형질 전환하여 다음 4 종류의 재조합 *E. coli* 균주를 제조하였다. (50 점)

**ECI/PI** : *E. coli* ECI strain carrying the PI plasmid

**ECI/PII** : *E. coli* ECI strain carrying the PII plasmid

**ECII/PI** : *E. coli* ECII carrying the PI plasmid

**ECII/PII** : *E. coli* ECII carrying the PII plasmid

이 4 종류의 재조합 *E. coli*를 다양한 조건에서 배양한 후 Human growth hormone 이 발현되는지를 조사하여 다음 표와 같은 결과를 얻었다.

	condition		
	Glucose / IPTG / 30°C	Glucose / Nothing / 40°C	Glucose / IPTG / 30°C
<b>ECI/PI</b>	no	yes	no
<b>ECI/PII</b>	yes	no	yes
<b>ECII/PI</b>	yes	yes	yes
<b>ECII/PII</b>	yes	no	yes

Yes, hGH expressed ; No, hGH not expressed.

각 균주와 플라즈미드의 유전적 특성을 hGH 유전자 발현의 관점에서 설명하시오. (T7 promoter는 사용되지 않았음. 플라즈미드 안정성은 고려하지 않음)

2. DNA의 오류를 복구하지 못하여 유도되는 돌연변이(mutation)는, 경우에 따라 역돌연변이(back mutation) 또는 복귀(reversion)이라는 기작으로 원래의 표현형이 회복되기도 한다. 가령, 100개의 아미노산으로 구성된 가상의 효소 X가 존재하고, 이 효소의 활성에 가장 중요한 요소가 20번째의 glutamate와 80번째의 lysine과의 ionic interaction이라고 가정하고, 20번째의 glutamate에 해당하는 유전자의 코돈(GAA) 부분에 돌연변이가 생겨 arginine의 코돈(AAA)로 치환된 돌연변이 효소 Y가 만들어 졌다면,(50점)

- a) GAA에서 AAA로의 돌연변이와 같이, 특정 purine 염기 하나가 다른 종류의 purine 염기로 치환되는 돌연변이를 무엇이라 하는가?
- b) 돌연변이 효소 Y에 유도된 20번째 arginine 코돈의 같은 자리에 back mutation이 발생하여, 원래 효소 X의 활성 대부분이 회복하였다면, 이 복귀주(revertant)의 20번째에 존재 할 수 있는 2가지 아미노산은 무엇인가?
- c) 돌연변이 효소 Y의 80번째 lysine 코돈에서 second-site mutation에 의해서 효소 X의 활성이 회복되었다면, 이 복귀주(revertant)의 80번째에 존재 할 수 있는 2가지 아미노산은 무엇인가?

## Group II. 응용미생물학 분야

### 1번 ( 50점)

PI 플라즈미드

특성 : hGH 유전자 앞에  $P_L$  promoter를 가지고 있음, cI repressor (cI857) 유전자는 없음

이유 : 만일 PI 플라즈미드에 cI repressor가 포함되어 있다면, ECII/PI의 경우  $30^{\circ}\text{C}$  에서는 발현이 되지 않아야 함

PII 플라즈미드

특성 : hGH 유전자 앞에 tac (혹은, 동일한 조절기작을 가진) promoter를 가지고 있음. 단, lac promoter는 아님. lacI<sup>Q</sup> 유전자를 가지고 있음

이유 : PII 플라즈미드를 가진 균주는 IPTG 존재 시에만 hGH 발현. 그런데, o] promoter는 glucose에 의해 repression이 되지 않음. 따라서, 적어도 lac promoter는 아님

ECI 균주

특성 : 온도감수성 cI repressor (cI857) 유전자를 크로모좀에 가지고 있음

이유 : PI 플라즈미드에 cI repressor가 없으면 온도와 상관없이 hGH가 발현되어야 하나  $40^{\circ}\text{C}$  에서만 발현된다는 것은 숙주인 ECI의 cI repressor를 만들기 때문임.

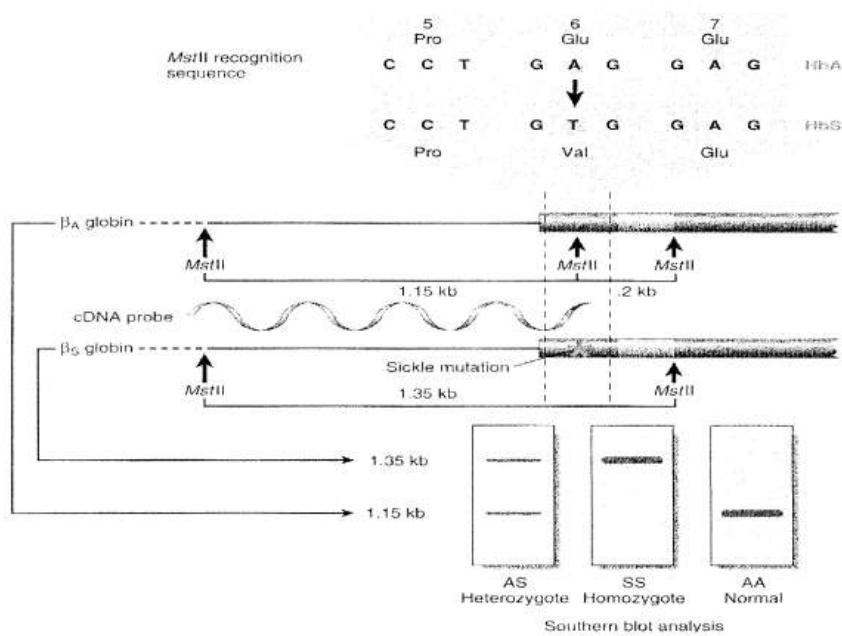
### 2번 ( 50점)

a) transition

b) aspartate와 glutamate

c) aspartate와 glutamate

anemia를 진단할 수 있다. 간단히 설명하면 먼저 환자로부터 genomic DNA를 분리한다. 이들 DNA를 MstII로 절단하고 agarose gel에 전기영동 후 membrane에 transfer한다. 아래 cDNA 단편을 P<sup>32</sup> labelling 하고 membrane과 hybridization 하여 x-ray film상에서 비교해보면 정상적인 beta-globin 유전자를 MstII로 절단한 DNA상에서는 1.15kb single band를 얻을 수 있다. 반면 mutant beta-globin 유전자는 이들 제한효소가 인지 못하는 DNA sequence를 가지고 있기 때문에 1.35kb DNA fragment가 나타난다. 따라서 정상적인 beta-globin 유전자는 mutant beta-globin 보다 DNA size가 작게 나타난다.



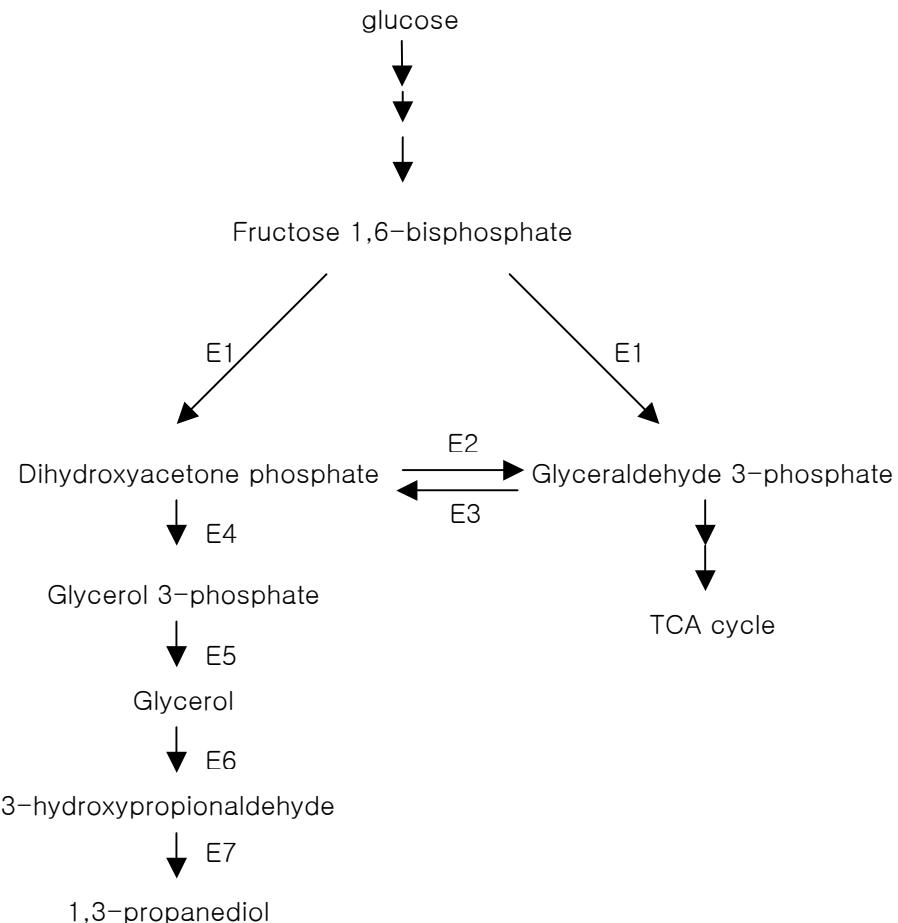
**End of Document**

---

### 3. 응용미생물

[주관식] (50점)

1. 다음은 대장균에서 1,3-propanediol을 생산하기 위한 metabolic pathway를 간략하게 표시한 것이다.



E1 ~ E7 : 각 단계에 작용하는 효소를 나타냄

- (1) 대장균을 glucose와 glycerol을 각각 탄소원으로 이용하여 배양한 결과, glycerol을 사용한 경우만 1,3-propanediol이 생성되었다. 위와 같은 결과가 나온 원인을 분석하고 glucose를 사용할 수 있는 대책을 제시하시오.

(2) 각 물질의 단가가 다음과 같을 때 1,3-propanediol을 생산하는 가능한 방법을 제시하시오.

물질명	단가(\$/kg)	물질명	단 가 (\$/kg)
Glucose	1	Glycerol 3-phosphate	500
Fructose 1,6-bisphosphate	800	Glycerol	3
Dihydroxyacetone phosphate	>5000	3-hydroxypropionaldehyde	>30
Glyceraldehyde 3-phosphate	>10000	1,3-propanediol	30

**[단답형] (50점)**

1. 어떤 미생물들은 호기성과 협기성 조건에서 모두 자랄 수 있게 그 대사경로를 바꿀 수 있다. 그러한 것들을 무엇이라 하는가? (10점)
2. 대부분의 미생물에는 외래 DNA가 세포내로 들어왔을 때, 이를 자신의 DNA와 구분하여 선택적으로 제거하는 효소시스템을 갖고 있으며, 현재 유전자 재조합의 필수적인 도구로 사용되는 이것은 무엇인가? (10점)
3. 지구에서 달나라까지 (거리는 320,000 km) 뻗어있는 DNA 이중나선 구조의 무게를 g으로 계산하시오. DNA 이중나선의 무게는 1000 nucleotide 쌍 당  $1 \times 10^{-18}$  g이고 각 염기쌍의 길이는 3.4 Å(옹스트롱)이다. 참고로 당신의 몸에 있는 DNA의 양은 0.5 g이다. (10점)
4. 6개의 뉴클레오티드 (nucleotide)로 이루어진 DNA 단일가닥을 가지고 있다고 하자. (20점)
  - (a) 몇개의 DNA sequence가 가능한가? 4 종류의 nucleotide가 있다는 것을 명심하라.
  - (b) DNA 이중 가닥이 있을 경우는 몇 개의 sequence가 가능한가?

### 3. 응용미생물

#### [주관식]

(1) (25점)

(i) (원인) glycerol로부터 1,3-propanediol은 생성되므로 E6, E7 효소는 발현됨.

E1은 fructose 1,6-bisphosphate로부터 dihydroxyacetone phosphate와 glyceraldehydes3-phosphate를 생성하므로 발현됨.

따라서 1,3-propanediol의 pathway 중 E4 또는 E5가 발현되지 않았거나 또는 극소량 발현됨. 또한, E2>>E3, E2>>E4가 되어 E1에 의해 생성된 dihydroxyacetone phosphate가 거의 대부분 Glyceraldehyde 3-phosphate쪽으로 진행되어 이후 단계가 거의 진행되지 않은 것으로 해석 됨  
(ii) (대책) E4, E5가 잘 발현되도록 변이균주 개발, 유전자클로닝 등 또한, E2의 발현을 억제 또는 줄이는 방법을 도입

(2) (25점) 1,3-propanediol 생성을 위한 중간물질로 사용가능한 것은 glucose와 glycerol 뿐

(i) glucose로부터 1,3-propanediol을 생성하는데 관여하는 효소의 발현 수준을 향상시켜 발효로 생산하는 방법

(ii) glycerol을 원료로 사용하여 발효로 생산하는 방법

(iii) E6, E7을 확보하여 glycerol로부터 생물 전환반응하여 생산하는 방법

#### [단답형]

1. 답: 통성협기성 (facultative) (10점)

2. 답: 제한효소 (restriction endonuclease) (10점)

3. 답: DNA의 길이는  $(320,000 \text{ km})(1012 \text{ nm/km})(10 \text{ 옹스트롱/nm}) = 3.2 \times 10^{18} \text{ 옹스트롱}$

염기쌍 숫자는  $3.2 \times 10^{18} \text{ (옹스트롱)}/3.4 \text{ (옹스트롱)/bp} = 9.4 \times 10^{17} \text{ bp}$

그러므로, DNA 분자의 무게는  $(9.4 \times 10^{17} \text{ bp})(1 \times 10^{-18} \text{ g}/10^3 \text{ bp}) = 9.4 \times 10^{-4} \text{ g} = 0.00094 \text{ g}$  (10점)

4. 답: (a)  $4^6 = 4096$  (10점), (b)  $4^6 = 4096$  (10점)

**End of Document**

---

## 제 8 회 LG 생명공학경시대회 2007.9.15. - 응용미생물분야

### I. 서술형문제 (전체 50 점)

제조합 대장균 배양에 관한 아래의 문제들에 답하시오.

1. 제조합 대장균배양의 샘플을 취하여 희석한 다음 고체배지에 도말(spreading)하여 plate 당 평균 200개의 colony를 얻었다. 희석할 때 1 ml의 샘플에서 0.1 ml을 취하여 9.9 ml의 증류수에 희석하는 것을 3번 반복하였다고 최종 희석된 샘플에서 0.1 ml을 취하여 도말 하였다고 한다면 전체 희석 비율은 얼마이고 원래 샘플 배양 액에 존재하는 제조합 대장균의 수는 ml당 얼마인가? (20)
2. 이때 고체배지에 항생제를 넣어야 하는 이유에 대하여 간단히 설명하라. (10)
3. 이 제조합 대장균은 Monod equation을 따라 성장한다고 가정한다 (플라스미드가 없는 세포는 없다고 가정). 이때 maximum specific growth rate( $\mu_{\max}$ )는 0.7 1/h이고  $K_s$ 는 5 g/L이며, 세포 수율(Y)은 0.65 g/g-기질이다. 한 개의 발효기를 사용하여 연속 배양한다고 할 때 정상상태(steady state)에서 기질의 주입속도flow rate(f)와 기질농도( $S_f$ )는 각각 500 L/h와 85 g/L이고, outlet의 기질의 농도(S)는 5 g/L이다. 이때 발효기 크기( $V[L]$ )와 세포농도( $X[g DCW/L]$ )를 구하라. (20)

### II. 단답형

1. 어떤 미생물들은 호기성과 혐기성 조건에서 모두 자랄 수 있게 그 대사 경로를 바꿀 수 있다. 그러한 것들을 무엇이라 하는가?
2. 대부분의 미생물에는 외래 DNA가 세포내로 들어왔을 때, 이를 자신의 DNA와 구분하여 선택적으로 제거하는 효소시스템을 갖고 있고 있으며, 현재 유전자 재조합의 필수적인 도구로 사용되는 이것은 무엇인가?
3. 어떤 효소를 분석해보았더니 480개의 아미노산이 있는 단일 폴리펩티드 chain으로 구성되어 있다는 사실을 알았다.  
start, stop 등의 기능성 영역을 무시하는 경우 이 효소를 생산하기 위한 translation된 mRNA에서 발견되는 ribonucleotide의 개수는?
4. 온천지대나 화산지대와 같은 뜨거운 지역에서 왕성하게 생육하는 미생물의 총칭은? (영어로 쓸 것)
5. 대사에 꼭 필요한 특정 영양분을 만들어 낼 수 없어 외부로부터 공급 받아야 생존할수 있는 돌연변이 미생물을 무엇인가? (영어로 쓸 것)

# 6월 미시생물

## 답안

I. 재조합 대장균 배양에 관한 아래의 문제들에 답하시오.

1. 재조합 대장균 배양의 샘플을 취하여 희석을 한 다음 고체배지에 도말(spreading)하여 plate 당 평균 200개의 colony를 얻었다. 희석할 때 1 ml의 샘플에서 0.1 ml를 취하여 9.9 ml의 증류수에 희석하는 것을 3번 반복하였다고 최종 희석된 샘플에서 0.1 ml를 취하여 도말 하였다고 한다면 전체 희석 비율은 얼마이고 원래 샘플 배양액에 존재하는 재조합 대장균의 수는 ml당 얼마인지?

Ans) 100 배 희석  $\times$  3회 =  $10^6$  배 희석

0.1 ml를 취하여 도말하였으니 마지막 희석된 샘플의 대장균 수는  $200 \times 100 = 2 \times 10^4$  cell.

그러므로 원 샘플의 재조합 대장균 수는  $2 \times 10^4 \times 10^6 = 2 \times 10^{10}$  cell

2. Ans) 플라스미드를 대장균에서 유지시키기 위하여 배지에 넣는다. 즉, 항생제에 저항할 수 있는 유전자를 가지고 있는 플라스미드를 가지는 대장균은 항생제에 대항하여 성장할 수 있는 가지지 못하는 대장균은 사멸된다.

$$\text{세포증식법칙: } \frac{d(CV)}{dt} = \mu \times V - f_x = V \frac{dx}{dt} + x \underbrace{\frac{dV}{dt}}_{=0} = V \frac{dx}{dt}$$

$$\therefore \frac{dx}{dt} = (\mu - f) \times = \text{○ 증식법칙}$$

$$\therefore \mu = f \quad \dots \textcircled{1}$$

$$\therefore V = \frac{f}{\mu} = \frac{f(1_S + S)}{\mu \times S} = \frac{500 \times (5+S)}{0.1 \times S} = 1429 \text{ L}$$

$$\mu = \frac{\mu \times S}{1_S + S} \text{ (monod eqn)}$$

$$\text{기초법칙: } \frac{d(CV)}{dt} = f \cdot S_f - \frac{1}{V} \mu \times V - f \cdot S = \text{○ 증식법칙}$$

$$\therefore \frac{f}{V} (S_f - S) = \frac{1}{V} \mu \times$$

$$\therefore x = \frac{V}{\mu} \cdot \frac{f}{V} (S_f - S) = \frac{V}{\mu} \cdot \frac{f}{\mu} \cdot (S_f - S) = V(S_f - S)$$

3. Ans)

$$= 0.65 \times (85-S) = 52.8 \text{ g/L}$$

$$\therefore \text{증가하기 } V = 1429 \text{ L}, \text{ 세포농도 } X = 52.8 \text{ g/L}$$

1 Ans 통성혐기성 (facultative)

2. 제한효소 (restriction endonuclease)

3 Ans  $480 \times 3 = 1440$

4 Ans) Thermophile, Thermophilic bacteria, Thermophilic microorganism

5 Ans) Auxotroph, Auxotropic microorganism

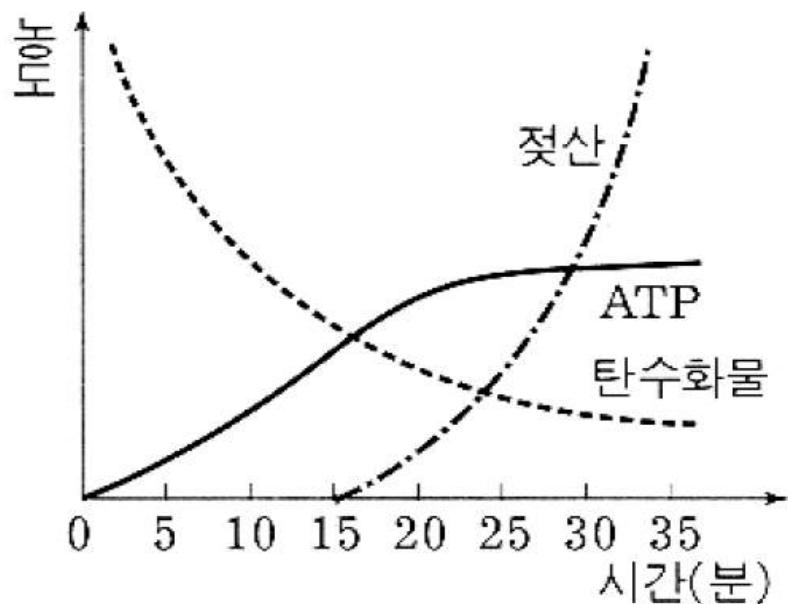
**End of Document**

---

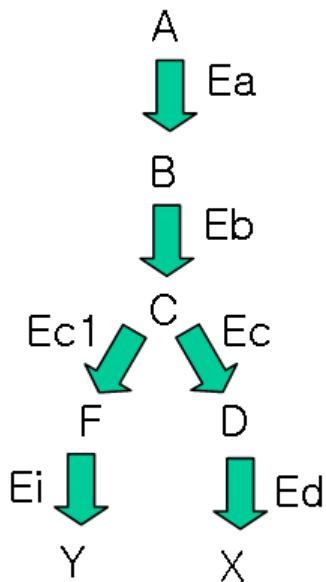
## 제9회 LG 생명공학 경시대회

### 출제 분야 2: 응용 미생물

1. 다음은 어떤 미생물을 탄수화물인 포도당(glucose)이 들어있는 배지에서 배양하면서 초기 15분간은 산소를 공급하고, 그 이후에는 산소 공급을 차단하면서 반응물과 생성물의 변화를 나타낸 그래프이다. 15분을 전후해서 1) 이 미생물의 대사에 일어난 변화를 간단하게 표현하시오. (10) 2) 그 변화를 일으킨 요인을 cofactor와 연관지어 설명하시오. (15) 3) ATP 생산속도가 변화한 원인을 대사와 연관 지어 설명하시오. (15)



2. 다음은 어떤 박테리아에서 특정 아미노산들의 생합성 과정과 합성 조절 기작이다. A는 아미노산 X, Y의 생합성을 위한 전구물질이고, B, C, D, F는 대사과정의 중간물질이다. 또한 Ea, Eb, Ec, Ec1, Ed, Ei는 각 반응단계에 관여하는 효소들이다. 아미노산들의 합성 조절에서 효소 Ec는 아미노산 X에 의해 feedback inhibition을 받고, Ec1은 Y에 의해 feedback inhibition을 받는다. 또한 A로부터 X까지의 반응 중 rate-limiting step은 A에서 B로 전환되는 과정이고 아미노산 X는 세포 내에서 배지로 분비가 잘 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이러한 조건의 박테리아를 이용하여 아미노산 X를 최대로 생산하여야 한다. 어떻게 아미노산 X의 생성을 향상 시킬 수 있을지 설명하시오. (30)



3. P:O ratio란 무엇인가? 간단히 설명하여라. (10)

4. 돌연변이를 통해 특정 영양분이 없으면 자라지 못하도록 생리가 바뀐 미생물을 무엇이라 부르는가? (10)

5. 그람양성균과 그람음성균의 세포표면구조의 차이점에 대해 설명하여라. (10)

[응용 미생물학-해답]

1. [40점]

- (1) [10점] (Aerobic) Respiration으로부터 (Anaerobic) Fermentation으로 전환됨
- (2) [15점] Glycolysis를 통하여 glucose가 pyruvate로 전환될 때 NAD<sup>+</sup>가 NADH로 전환된다. 15분 이전까지는 이 NADH가 respiratory chain을 통해 전자를 산소로 전달하며 NAD<sup>+</sup>로 recycle 될 수 있지만 15분 이후에는 산소가 공급되지 않아 pyruvate가 전자를 받으며 lactate가 되면서 NADH를 NAD<sup>+</sup>로 recycle하게 된다.
- (3) [15점] 산소가 공급되는 15분까지는 glucose를 TCA cycle 및 respiratory chain을 통하여 산화시키며 다양한 ATP를 생산하나, 15분 후부터는 glucose가 lactate로 전환되는 발효를 하며 TCA cycle이 중단되어 ATP가 glycolysis에서만 생산되며 그 생산량이 줄어듦.

2. [30점]

E<sub>c</sub>의 feedback inhibition 감소, E<sub>c1</sub>의 feedback inhibition 증가, X를 증가시키기 위하여 rate limiting step인 A -> B 단계의 반응속도를 증가시키기 위하여 Ea 농도나 A 농도를 증가시키는 방법으로 접근

3. [10점] oxidative phosphorylation (or respiratory chain)을 통해 1개의 산소원자가 2개의 전자를 받아 환원될 때 만드는 ATP의 양

4. [10점] Auxotroph

5. [10점] 그람양성균은 1겹의 membrane과 그 바깥쪽에 1겹의 두꺼운 peptidoglycan층으로 이루어져 있으며, 그람음성균은 2겹의 membrane과 그 중간에 얇은 1겹의 peptidoglycan층으로 이루어져 있다.

**End of Document**

---

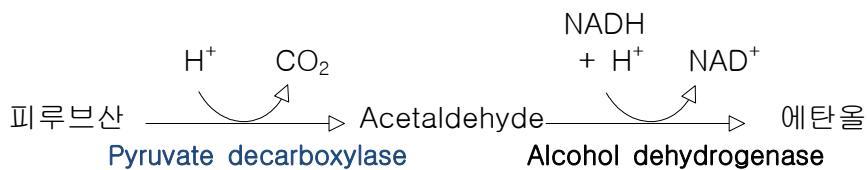
## 응용 미생물

1. 간장은 콩과 밀, 소금 등을 효모등과 같은 몇 가지의 미생물과 섞어서 8 - 12 개월간 발효하여 만든다. 얹어진 간장은 젖산과 에탄올 등을 풍부하게 가지고 있다. 이들 두 가지 화합물은 어떤 과정을 거쳐 생산되게 되는가? 해당과정의 최종산물인 피루브산을 전구체로 한 반응식과 관여하는 효소이름을 함께 표기하라.(50점)
2. Pentose phosphate pathway 에서는 해당과정과는 달리, 주로 생체분자 생합성에 필요한 환원력을 제공해 주는 조효소를 생산한다. 이 조효소는 무엇인가? (10점)
3. 박테리아는 크게 Gram 염색법을 사용하여 Gram(+) 와 Gram(-) 균주로 구분할 수 있다. Gram 염색법에서 각 균주의 차이를 나타내게 하는 원리를 설명하시오. (50점)
4. 대부분의 절대 혐기성 균주 (Strict anaerobes)는 O<sub>2</sub>에 노출이 되었을 경우 생성되는 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 H<sub>2</sub>O로 전환시키는 두가지 효소를 갖고 있지 않기 때문에 산소가 있는 환경에서 성장하지 못하고 죽게된다. 이 효소들은 무엇이며 각 효소가 어떤 반응에 관여하는지 쓰시오.(10점)
5. DNA를 미생물에 집어넣는 방법으로는 transformation과 transduction이 있다. 이 두가지 방법의 차이점을 설명하라.(50점)
6. Glycolysis를 통해 포도당 한 분자가 2개의 pyruvate로 전환되었을 때 생산되는 ATP와 NADH의 양은 얼마인가?(10점)

## 문제해답

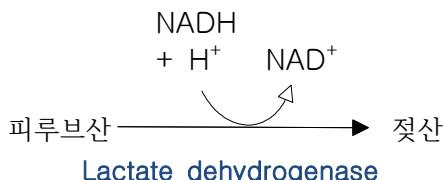
### 1. 1) 에탄올 발효 (효모와 미생물)

우선 acetaldehyde로 탈카르복시화되어 이산화탄소가 생성되고 에탄올로 환원된다. 첫 번째 단계를 촉매하는 pyruvate decarboxylase는 비산화적 decarboxylation 반응을 촉매하며 조효소로 TPP를 필요로 한다. 두 번째 alcohol dehydrogenase에 의해 NADH로부터 수소이온이 전달되면서 에탄올로 환원되고 NAD<sup>+</sup>의 재생이 이루어진다.



### 2) 젖산 발효.

lactate dehydrogenase에 의해 촉매되며 이 효소는 isozyme으로 존재한다. LDH에 의해 NADH로부터 수소이온이 전달되어 NAD<sup>+</sup>가 재생되고 피루브산은 젖산으로 환원된다. 따라서 이 반응은 혼기상태에서 전자수용체의 역할을 하는 것이다.



### 2. 답: NADPH

3. 그람 양성균의 경우 그람 음성균에 비해 상대적으로 매우 두꺼운 peptidoglycan 층을 가지고 있다. 이 두꺼운 peptidoglycan 층은 그람염색 과정에서 형성되는 Crystal violet-Iodine complex가 에탄올에 용해되어 나가는 것을 방지하여 탈색되지 않고 보라색을 나타내게 된다. 반면에 그람음성균은 얇은 peptidoglycan 층에 의해 쉽게 탈색되었다가 마지막에 Safranin 염색으로 다시 분홍색을 띠게 되어 서로 구별되게 된다.

4. 답: Superoxide dismutase :  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$   
Catalase :  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
5. Transformation은 미생물을 DNA와 binding하기 좋은 competent cell로 만들어서 집어넣는 방법이며, Transduction은 virus나 phage를 이용하여 DNA를 집어 넣는 방법을 말함.
6. 답: ATP 2개, NADH 2개

**End of Document**

---

## 제11회 LG 생명공학경시대회 문제

### (i) 분자생물학

1. DNA와 RNA의 차이에 관한 문제이다.

- (1) 당: 각 물질의 구조를 도식하고 몇번째 탄소 위치들에서 다른 nucleotide들과 결합이 형성되는지를 표시하라.
- (2) Stability : 두 물질이 구조상 stability가 차이가 나는 이유에 대하여 간단히 설명하고 생명체가 왜 이렇게 두 물질의 stability를 다르게 하는지에 대하여 간단히 설명하라.
- (3) DNA의 염기들은 서로 결합할 수 있는 상대를 가지고 있다. 여러 결합을 무슨 결합이라 부르며 각각 그 파트너 끼리를 짹지으며 어떤 파트너 결합이 더 강한지 나타내고 그 이유에 대하여 간단히 설명하라.

2. 단백질은 선형고분자임에도 불구하고 접힘과정을 통해 전체적으로 구형의 모양을 취하는 경우가 많습니다. 다음 중 어느 아미노산이 구형 단백질의 내부 중심부분에서 자주 발견될 것인지 예측하고 그 이유를 설명하십시오.

Serine (세린), glutamine (글루타민), lysine (리신), phenylalanine (페닐알라닌), glutamic acid(글루탐산)

### (ii) 응용미생물학

1. 미생물을 포도당과 글리세롤 2 종류의 탄소원에서 자라게 하면, diauxic growth를 하게 된다. Diauxic growth란 무엇인가?

2. Clostridium acetobutylicum은 혐기성 발효를 통하여 포도당으로부터 아세톤과 부탄올 및 소량의 butyrate와 acetate를 생산한다. 발효에서 포도당 100 mol과 질소원인 NH<sub>3</sub> 11.2 mol로부터 다음과 같은 생성물 조성을 얻었다.

생성물	화학식	moles
cells	C <sub>a</sub> H <sub>b</sub> O <sub>c</sub> N <sub>d</sub>	13
butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	56
acetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	22
butyric acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.4
acetic acid	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	14
carbon dioxide	CO <sub>2</sub>	221
hydrogen	H <sub>2</sub>	135
ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	0.7

탄소, 질소, 수소, 산소 수지식으로부터 세포의 화학식을 결정하라.

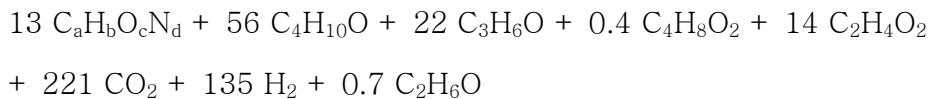
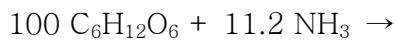
## 응용미생물학

1.

미생물이 자랄 때, 흔히 세포가 더 좋아하는 탄수화물(이 경우 포도당)을 우선적으로 소모하면서 빠른 성장을 한 다음, 덜 좋아하는 탄수화물(이 경우 글리세롤)을 소모하며 성장을 한다. 이 때, 두 개의 탄수화물을 이용한 성장곡선 사이에 성장하지 않고 적응하는 lag period를 갖는데, 이를 "diauxic shift"라고 부른다.

2.

발효에 대한 수지는 다음과 같이 나타낼 수 있다.



$\text{C}_a\text{H}_b\text{O}_c\text{N}_d$ 는 *Clostridium* 세포의 화학식을 나타낸다. C, H, O, N의 물질수치로부터 a, b, c, d의 값을 구할 수 있다.

i) carbon balance

$$100X6 = 13a + 56X4 + 22X3 + 0.4X4 + 14X2 + 221 + 0.7X2$$

$$600 = 13a + 542$$

$$a = 4.46$$

ii) hydrogen balance

$$11.2X3 + 100X12 = 13b + 560 + 132 + 3.2 + 56 + 270 + 4.2$$

$$b = 16.01$$

iii) oxygen balance

$$600 = 13c + 56 + 22 + 0.8 + 28 + 442 + 0.7$$

$$c = 3.88$$

iv) nitrogen balance

$$11.2 = 13d$$

$$d = 0.86$$

그러므로 세포의 화학식은  $\text{C}_{4.46}\text{H}_{16.01}\text{O}_{3.88}\text{N}_{0.86}$ 이다.

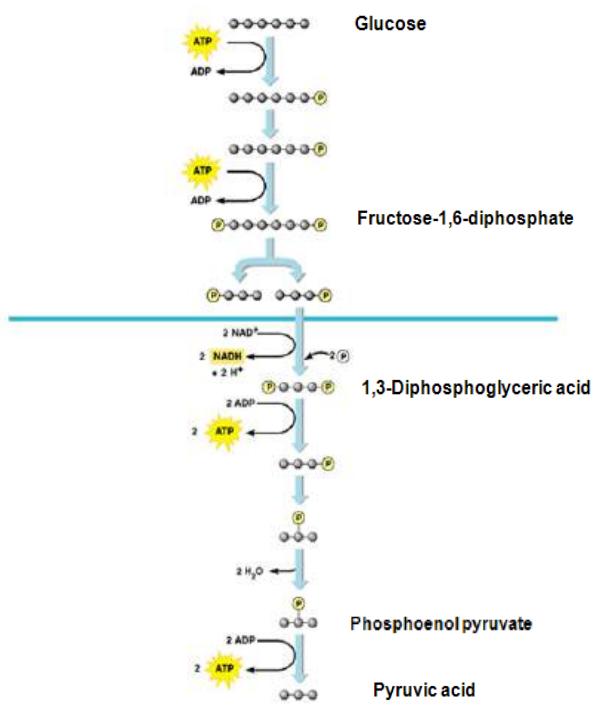
**End of Document**

---

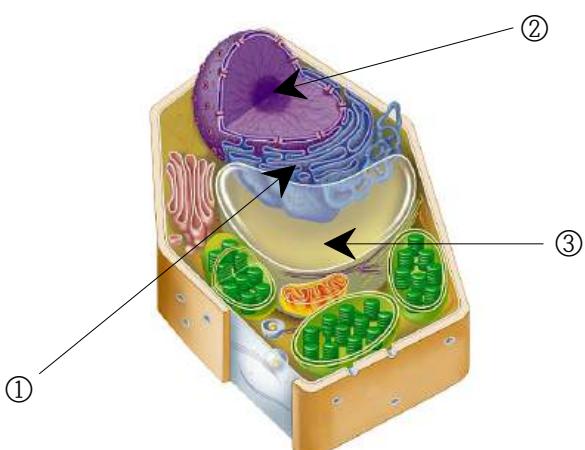
## (ii) 응용미생물학

1. 진핵 세포에서 포도당 1 mole 이 완전 산화될 경우 38 mole의 ATP가 생성된다고 알려져 있다. 1 mole 의 다음 기질이 완전 산화될 경우 생성된 ATP는 각각 얼마인가? [각각의 이유도 간단히 설명하시오.]  
 (단, 해당과정, TCA 회로, 산화적 인산화반응은 완전한 활동을 있다고 가정하라.)

- 1) pyruvic acid
- 2) fructose-1,6-diphosphate
- 3) 1,3-diphosphoglyceric acid
- 4) phosphoenol pyruvate
- 5) acetyl-CoA



2. 오른쪽 그림은 진핵세포 중 식물세포의 모식도이다. ①, ②, ③의 이름을 적고 각각의 특징을 간단히 기술하시오.



$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dp}{dt}$$

$m$  은 세포가 생명을 유지하기 위하여 소모하는 기질의 소비속도를 나타내는 항(specific maintenance rate)이며, 균체에 비례하여 기질을 소모시킨다.

비성장속도는 정상상태에서  $\mu = \mu_m \frac{s}{K_s + s}$  를 따른다고 가정한다.

정상상태에서 기질의 농도 ( $s$ ), 균체의 농도 ( $x$ ), 생성물의 농도 ( $p$ )를 희석률 ( $D$ ) 의 함수로 구하여라.

2. 미생물의 회분식 배양(batch culture)에서 세포의 성장 곡선을 그래프로 나타내고 각 단계를 구분하시오.
3. 산소전달률(OTR; oxygen transfer rate)과 산소요구도(OUR; oxygen uptake rate)를 각각 정의하시오.

#### (vi) 추가문제 (동점일 경우만 채점)

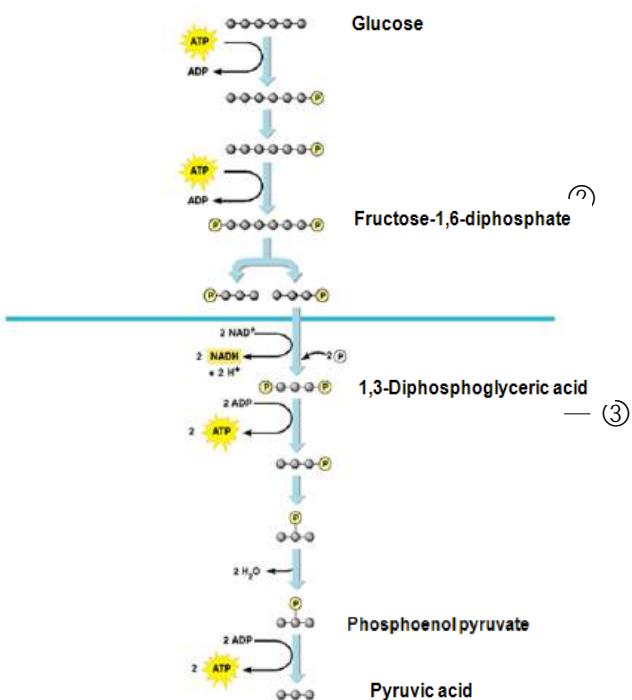
1. 대장균에서 전사종결이 일어나는 두 가지 메커니즘은 무엇인가?
2. 미생물에서 pyruvate 가 산소가 없을 때 전환되는 대표적인 발효물질은 무엇인가?
3. 효소를 담체안에 고정화할 때 (entrapment 방식), (1) effectiveness factor란 무엇이며, (2) 담체안에 고정화된 효소의 농도가 높고 낮을 때 단위부피당 효소의 활성 및 effectiveness factor의 일반적인 상관관계를 설명하시오.
4. 산소전달률(OTR; oxygen transfer rate)과 산소요구도(OUR; oxygen uptake rate)를 각각 정의하시오.
5. 단백질의 침전 및 분획에 황산암모늄을 가장 널리 사용하는 이유를 3 가지 이상 제시하라.

Second base in codon					
	U	C	A	G	
First base in codon	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

## (ii) 응용미생물학

1. 진핵 세포에서 포도당 1 mole가 완전 산화될 경우 38 mole의 ATP가 생성된다고 알려져 있다. 1 mole의 다음 기질이 완전 산화될 경우 생성된 ATP는 각각 얼마인가? [각각의 이유도 간단히 설명하시오.]  
 (단, 해당과정, TCA 회로, 산화적 인산화반응은 완전한 활동을 있다고 가정하라.)

- 1) pyruvic acid
- 2) fructose-1,6-diphosphate
- 3) 1,3-diphosphoglyceric acid
- 4) phosphoenol pyruvate
- 5) acetyl-CoA



2. 오른쪽 그림은 진핵세포 중 식물세포의 모식도이다. ①, ②, ③의 이름을 적고 각각의 특징을 간단히 기술하시오.

1. 오른쪽 그림과 같이 해당과정에서 포도당 1몰은 산화되어 2몰의 pyruvic acid와 2몰의 ATP, 그리고 2몰의 ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ )가 생성된다. 진핵세포에서 포도당 1몰이 완전 산화되어 총 38몰의 ATP가 생성되었고 NADH의 P/O 비가 3 이므로, 1 mole의 pyruvic acid가 완전 산화될 경우 총 15 mole의 ATP가 생성됨을 알 수 있다. [  $(15 \times 2) + (3 \times 2) + (1 \times 2) = 38 \text{ mole}$  ]

- (1) 15 mole의 ATP
- (2) 40 mole의 ATP 생성 (해당과정의 초기단계 (preparatory phase) 에서는 2몰의 ATP가 사용)
- (3) 17 mole의 ATP
- (4) 16 mole의 ATP
- (5) 12 mole의 ATP (pyruvic acid에서 acetyl-CoA로 변환되는 과정에서 1몰의 ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ )가 생산됨. 따라서 총 12 mole의 ATP가 생성)

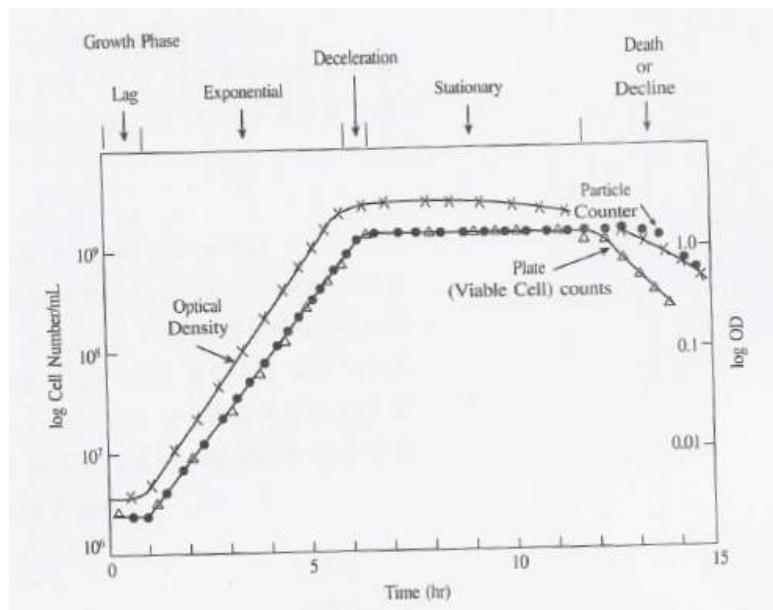
2. (1) 조면 소포체 (rough ER): ribosome 이 결합되어 단백질 합성에 참여. glycosylation 및 protein folding이 일어남.

- (2) 핵인 (nucleolus); rRNA 합성
- (3) 액포 (vacuole); 생체고분자의 분해, 재생 및 저장

### (iii) 효소공학

1. 아래 그래프는 저해제 ( $I$ )가 있을 때와 없을 때의 효소반응을 비교한 결과이다.

- 1) 아래의 결과는 효소반응의 3가지 저해작용중에서 어떤 경우에 해당하는가?
- 2) 저해제가 없는 경우에 ( $[I]=0 \text{ g/L}$ ) Michaelis-Menten 식의  $V_m$  와  $K_m$  값을 구하시오.
- 3) 저해상수 (Inhibition constant,  $K_i$ )값을 구하시오
- 4) 저해제가 있는 경우 ( $[I]=0.4 \text{ g/L}$ ) 기질의 농도가  $[S]=200 \text{ mg/L}$ 일 때



### (vi) 추가문제 (동점일 경우만 채점)

- 대장균에서 전사증결이 일어나는 두 가지 메커니즘은 무엇인가?  
 $\rho$  - dependent,  $\rho$  - independent
- 미생물에서 pyruvate 가 산소가 없을 때 전환되는 대표적인 발효물질은 무엇인가?  
lactate, acetate, ethanol
- 효소를 담체안에 고정화할 때 (entrapment 방식), (1) effectiveness factor란 무엇이며, (2) 담체안에 고정화된 효소의 농도가 높고 낮을 때 단위부피당 효소의 활성 및 effectiveness factor의 일반적인 상관관계를 설명하시오.

(1) diffusion limitation이 있을 때와 없을 때 반응속도의 비율

$$\eta = \frac{\text{reaction rate with diffusion limitation}}{\text{reaction rate with no diffusion limitation}}$$

(2) 고정화된 효소의 농도가 높을 때 단위부피당 효소의 활성은 높아지지만 effectiveness factor는 낮아진다. 반면에 효소의 농도가 낮을 때 단위부피당 효소의 활성은 낮아지지만 effectiveness factor는 높아진다.

- 산소전달률(OTR; oxygen transfer rate)과 산소요구도(OUR; oxygen uptake rate)를 각각 정의하시오.

(1) 산소전달률(OTR; oxygen transfer rate) - 기체(공기) 중에 있는 산소가 액체로 용해되는 속도.

(2) 산소요구도(OUR; oxygen uptake rate) - 배양액의 단위량에 포함하는 미생물의 산소 소비 속도(호흡 속도).

5. 단백질의 침전 및 분획에 황산암모늄을 가장 널리 사용하는 이유를 3 가지 이상 제시하라.

- \* 높은 농도의 용액을 제조할 수 있다.
- \* 용해도의 변화가 온도에 민감하지 않다.
- \* 고농도의 황산암모늄 용액이라도 일반적인 단백질 침전물에 비해 밀도가 낮아 원심분리로 단백질 침전물을 분리할 수 있다
- \* 고농도 황산암모늄 용액에서 단백질 분해 효소나 미생물의 활성이 낮다.
- \* 침전된 단백질이 안정하다 (침전된 형태로 냉장 보관)
- \* 평형에 빨리 도달한다 (농도의 위치적 불균형이 일어날 가능성이 낮다)

**End of Document**

---

## 제13회 한국화학공학회 LG생명공학 경시대회 문제지

### <응용미생물학 분야>

1. 다음 (1)~(5)에 가장 알맞은 단어를 아래 주어진 표의 A-T중에서 고르시오 (총 20점)

세균, 진균, 바이러스 등의 미생물을 분류하고 그 특성을 파악하는 것은 매우 중요하다. 이 중 세균은 주로 Gram stain을 이용한 염색 특성에 따라 분류되는데 대부분의 세균은 Gram positive와 Gram negative로 나눌 수 있기 때문에 일반적으로 널리 사용되는 분류법이다.

Gram positive 세균의 대표적인 예는 ( 1 ) 이다. Gram positive 세균은 outer membrane을 가지고 있지 않은 대신에 두꺼운 ( 2 ) 을 포함하는 cell wall을 가지고 있다. 이 ( 2 ) layer는 밖으로 돌출된 ( 3 ) 를 가지고 있는데 이는 ( 2 ) layer와 공유결합이 되어 있고 Gram positive 세균에서만 관찰된다.

Gram negative 세균의 대표적인 예는 *Escherichia coli* 이다. Gram negative 세균은 얇은 ( 2 ) layer가 outer membrane에 의해 감싸진 구조를 가지고 있다. 이 outer membrane은 세포막처럼 인지질과 단백질을 함유하는 지질 이중층이지만 독특한 단백질과 독특한 지질인 ( 4 ) 함유하는데 이 ( 4 ) 은 그 구조적 특성 때문에 세포로 독성 화합물들이 outer membrane을 통과해 들어가는 것을 막아준다. ( 5 ) 는 ( 2 ) layer와 cytoplasmic membrane를 분리시키는 부분이며 물질대사나 물질 수송 등의 세포 기능에 있어서 중요한 세포 공간이다.

A) Porins	B) Fimbriae	C) Peptidoglycan	D) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E) Endoplasmic reticulum	F) Teichoic acids	G) Carbohydrates	H) Lipopolysaccharides (LPS)
I) Muropeptides	J) <i>Salmonella typhimurium</i>	K) Crystal violet	L) N-acetylmuramic acid
M) Cytoplasm	N) <i>Bacillus subtilis</i>	O) Phospholipids	P) N-acetylglucosamine
Q) Safranin	R) Resting potential	S) Periplasmic space	T) Ethylenediaminetetraacetic acids

### 정답

- (1) \_\_\_\_\_ (4점)  
(2) \_\_\_\_\_ (4점)  
(3) \_\_\_\_\_ (4점)  
(4) \_\_\_\_\_ (4점)  
(5) \_\_\_\_\_ (4점)

2. 아래 내용은 *lac* 오페론에 대한 내용이다. 빈칸을 채우시오 (총 20점)

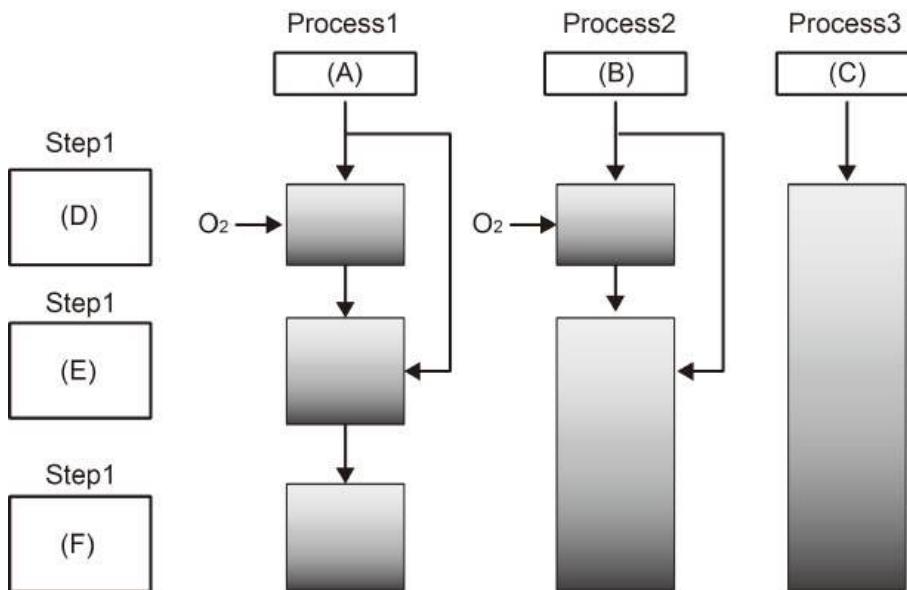
대장균(*Escherichia coli*)의 배양에서 배지에 glucose가 lactose와 첨가되어 있는 경우에 초기에는 대장균의 *lac* 오페론은 유도되지 않는다. 이러한 glucose의 효과는 이화생성물(catabolite)이 관여된 두 번째 조절기작의 결과가 원인이며 ( 1 )라고 한다. ( 1 )를 부르는 명칭과는 대조적으로 ( 1 )는 cAMP와 ( 2 )이 관여된 기작이다. cAMP는 ( 2 )과 결합하여 복합체를 형성하게 되고 이 복합체는 *lac* 유전자들을 위한 프로모터와 인접한 부위의 특정 부위에 결합하여 RNA 중합효소의 결합을 증가시킨다. 만약 세포 내의 glucose의 농도가 높으면 cAMP의 농도가 낮아진다. 낮은 농도의 cAMP는 복합체를 형성하지 못하게 되고 *lac* 오페론의 유도가 일어나지 않게 된다. 이때 ( 3 )는 계속해서 lacO (*lac operator*)에 결합된 상태를 유지하게 된다. 이후에 glucose를 많이 사용하여 glucose의 농도가 감소하게 되면 cAMP의 생성이 유도되어 농도가 증가하게 되고 충분한 양의 cAMP에 의해 복합체가 형성되어 Lactose 프로모터에 결합하게 된다. 또한 Lactose가 ( 4 )로 전환되고, ( 4 )는 ( 3 )와 복합체를 형성하여 ( 3 )는 lacO에 결합하는 것을 막아주게 되고 이로 인해 *lac* 오페론의 유도가 일어난다. 이런 기작들을 통해 초기에는 glucose를 사용하여 cell이 성장하게 되고 glucose를 모두 사용한 후에는 lactose를 사용하여 성장하게 되는 이중단계의 성장 패턴인 ( 5 )을 관찰할 수 있게 된다.

정답 (정답은 국문 혹은 영문 모두 인정)

- (1) \_\_이\_\_\_\_\_ (C\_\_\_\_\_) (4점)  
(2) \_\_이\_\_\_\_\_ (C\_\_\_\_\_) (4점)  
(3) \_\_I\_\_\_\_\_ (I\_\_\_\_\_) (4점)  
(4) \_\_알\_\_\_\_\_ (A\_\_\_\_\_) (4점)  
(5) \_\_이\_\_\_\_\_ (D\_\_\_\_\_) (4점)

3. 다음은 병합적 바이오매스 처리 공정 (Integrated Bioprocesses)에 대한 내용이다. 그림을 참조하여 빈칸에 가장 알맞은 단어들을(를) 채우시오. (총 30점)

전처리된 바이오매스는 바이오연료 생산을 위해 다양한 공정 배치를 사용하여 처리된다. 이들 공정 중 각 생물학적 처리 단계의 통합 여부에 따라 크게 일반적으로 \_\_\_\_\_ (A) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ (B) \_\_\_\_\_, 그리고 \_\_\_\_\_ (C) \_\_\_\_\_ 공정으로 구분된다. \_\_\_\_\_ (A) \_\_\_\_\_ 공정은 바이오매스를 활용하기 위한 \_\_\_\_\_ (D) \_\_\_\_\_ 와 \_\_\_\_\_ (E) \_\_\_\_\_ 가 분리된 1단계와 이를 통해 형성된 당을 미생물을 이용하여 \_\_\_\_\_ (F) \_\_\_\_\_ 처리를 거치는 2단계로 구성된 전통적인 공정으로 각 단계가 각각 최적조건에서 실행되어 전처리된 바이오매스의 세척, 독물제거, 영양물 공급 등이 없이 수행되는 장점을 가진다. \_\_\_\_\_ (B) \_\_\_\_\_ 공정은 그에 비해 \_\_\_\_\_ (D) \_\_\_\_\_ 단계가 우선 선행된 후에 \_\_\_\_\_ (E) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ (F) \_\_\_\_\_ 단계가 동일한 용기 내에서 일어나 최종산물 억제의 제거로 인해 바이오매스 가수 분해율이 높으며 내열성이스트의 사용이 가능하고 전처리된 재료를 세척하면 억제복합물의 제거로 인해 바이오매스의 전환율이 향상되는 장점을 가진다. 마지막으로 \_\_\_\_\_ (C) \_\_\_\_\_ 공정은 세 개의 생물학적 처리 단계가 단일 공정으로 처리하여 바이오매스 분해 효소 생산에 대해 저비용 고효율의 잠재성을 제공하며 이는 기질, 다른 원료, 분해 효소 생산 관련 설비 등에 들어가는 비용을 절약할 수 있게 해준다.



정답 (정답은 국문 혹은 영문 모두 인정)

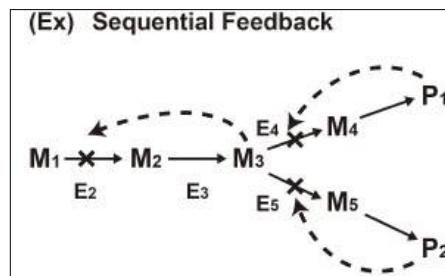
- (A) \_\_\_\_\_ (5점)  
(B) \_\_\_\_\_ (5점)  
(C) \_\_\_\_\_ (5점)  
(D) \_\_\_\_\_ (5점)  
(E) \_\_\_\_\_ (5점)  
(F) \_\_\_\_\_ (5점)

4. 미생물은 주어진 자원을 최대한의 효율로 이용하기 위해 많은 다양한 시도를 한다. 이와 비슷하게 발효 미생물을 이용하여 산업적으로 유용한 물질을 최대로 생산하기 위해서는 이를 위한 환경 및 조건을 조성해 주어야 할 경우가 있다. 따라서 응용 미생물을 이용한 생물 공정 반응을 이해하기 위해서는 미생물, 특히 여러 효소의 조절 작용을 이해하여야 한다. 아래는 효소 반응 조절을 통한 Metabolic Pathway Control의 간단한 예들이다. 이에 대한 설명을 읽고 기질 (M)의 효소 (E)를 통한 최종생산물 (P)을 만드는 조절 작용을 추론하여 그림을 완성해 하시오. 아래의 예(Ex)로 주어진 그림을 참조하여, 주어진 그림(A-C) 위에 실선으로 혹은 다른 색깔의 선으로 그리시오. (총 30점)

(예) 순차적 되먹임 저해

(sequential feedback inhibition)

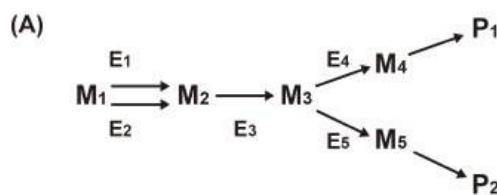
- 생화학 반응의 경로에서 순차적으로 생산되는 산물이 순차적으로 앞 반응에 관여하는 효소를 저해함



(A) 유사효소 (10점)

(isozyme, enzyme multiplicity)

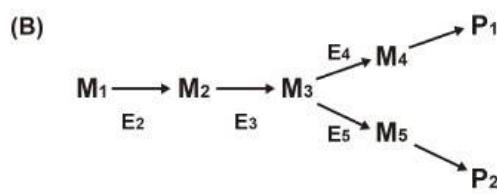
- 같은 생화학 반응에 관여하는 서로 다른 효소
- 각각 다른 최종산물에 의하여 저해를 받음
- 최종산물의 종류에 따라 각기 다른 효소가 작용



(B) 협력 되먹임 저해 (10점)

(concerted feedback inhibition)

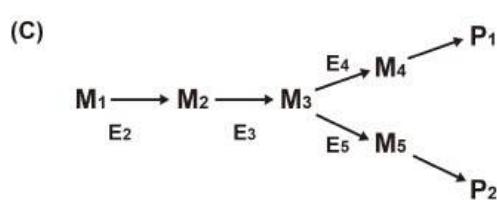
- 각각의 최종산물이 일정한 농도 이상이 되어야 효소를 저해함
- 한 가지 최종산물 만으로는 효소를 저해 모함
- 효소가 2개의 allosteric sites을 가지고 있음



(C) 누적되먹임 저해 (10점)

(cumulative feedback inhibition)

- 각각의 최종산물은 초기 반응에 관여하는 효소를 부분적으로 저해
- 각각 최종산물의 양 (농도)의 합이 일정 수준을 넘으면 전체 효소를 저해



정답

1.

- (1) N
- (2) C
- (3) F
- (4) H
- (5) S

2.

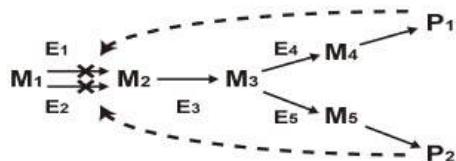
- (1) 이화생성물 억제 (Catabolite repression)
- (2) 이화생성물 활성단백질 (Catabolite activator protein, CAP)
- (3) lac 억제인자 (lac repressor, lacI)
- (4) 알로락토스 (Allolactose)
- (5) 이중 영양적 생장 (Diauxic growth)

3.

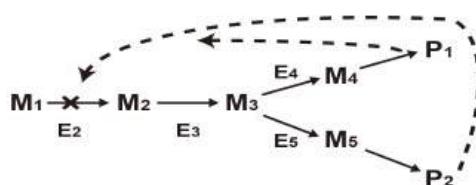
- (A) 분리적 가수분해와 발효 (SHF: separate hydrolysis and fermentation)
- (B) 동시적 당화와 발효 (SSF: simultaneous saccharification and fermentation)
- (C) 병합적 생물공정 (CBP: consolidated bioprocessing)
- (D) 바이오매스 분해 효소 (ex) 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제 생산
- (E) 바이오매스를 (ex) 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 단량체 당으로 전화시키는 가수분해
- (F) 육탄당과 오탄당의 발효 (Fermentation)

4.

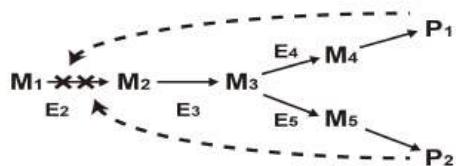
(A)



(B)



(C)

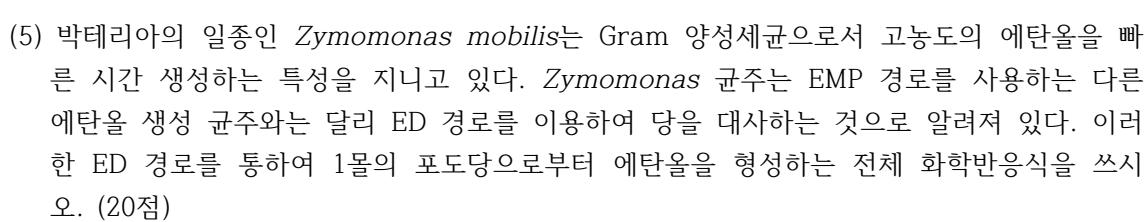


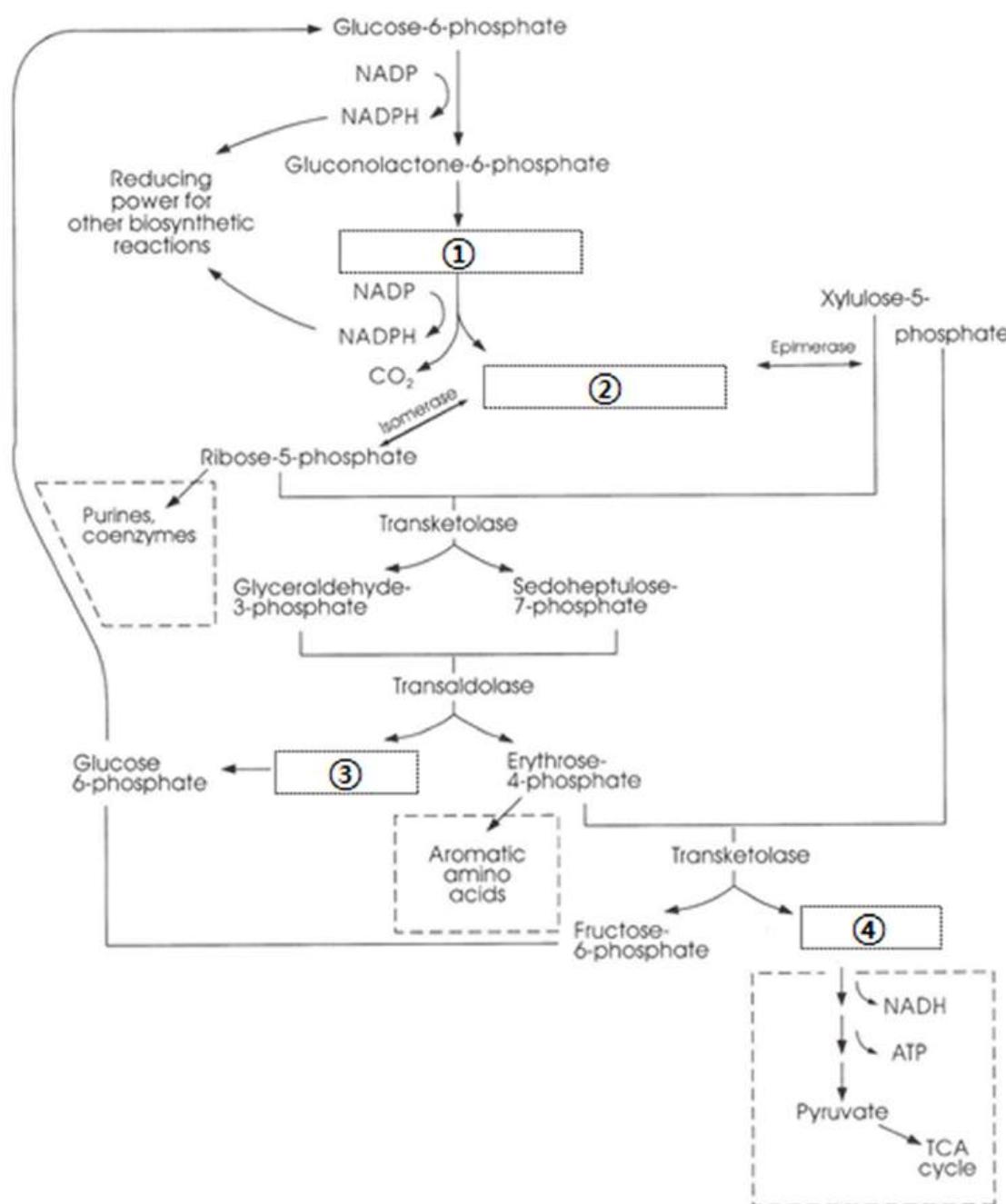
**End of Document**

---

## <응용미생물학 분야>

포도당은 많은 생물들이 필요로 하는 주요 탄소원 및 에너지원이다. 많은 생물들에 있어서 포도당의 분해 대사는 주로 EMP(Embden-Meyerhof-Parnas) 경로, HMP(hexose monophosphate) 경로, ED(Entner-Doudoroff) 경로 등을 거쳐 일어난다. 이와 관련하여 아래 질문에 답하시오. (100점)

- (1) 1 몰의 포도당으로부터 pyruvate가 만들어지는 EMP 경로의 대사 과정을 종합하는 화학 반응식을 쓰시오. (20점)
- (2) EMP 경로에서 유일하게 ATP를 소모하는 반응이며 비가역적으로 일어나는 반응에 관여하는 효소 두 개의 이름을 쓰시오. (20점)
- (3) 흔히 pentose pathway 혹은 pentose shunt라고 불리는 HMP 경로의 기본 역할은 생합성 반응에 필요한 탄소계 골격물질과 동화작용을 지탱하기 위한 환원력을 마련하는 것이다. 이 때 ① HMP 경로가 효율적으로 가동될 경우 1몰의 포도당으로부터 몇 몰의 ATP를 소모하고, 몇 몰의 NADPH를 생산하는가? ② 또한 아미노산 중 하나인 히스티딘 합성의 주요 전구체로서, HMP 경로로부터 얻을 수 있는 물질은 무엇인가? (각각 10점)
- (4) 아래 그림 1은 HMP 경로를 나타내었다. 빈칸(①~④)에 알맞은 내용을 적으시오. (각각 5점)  

- (5) 박테리아의 일종인 *Zymomonas mobilis*는 Gram 양성세균으로서 고농도의 에탄올을 빠른 시간 생성하는 특성을 지니고 있다. *Zymomonas* 균주는 EMP 경로를 사용하는 다른 에탄올 생성 균주와는 달리 ED 경로를 이용하여 당을 대사하는 것으로 알려져 있다. 이러한 ED 경로를 통하여 1몰의 포도당으로부터 에탄올을 형성하는 전체 화학반응식을 쓰시오. (20점)



(그림 1. HMP pathway with relations to other cellular processes)

## <응용미생물학 분야> - 답안

- (1)  $C_6H_{12}O_6 + 2P_i + 2ADP + 2NAD^+ \rightarrow 2C_3H_4O_3 + 2ATP + 2(NADH + H^+)$
- (2) Hexokinase, Phosphofructokinase
- (3) ① 1 몰의 ATP 소모, 12 몰의 NADPH 생산, ② ribose-5-phosphate
- (4) ① 6-phosphogluconate, ② Ribulose-5-phosphate,  
③ Fructose-6-phosphate, ④ Glyceraldehyde-3-phosphate
- (5)  $C_6H_{12}O_6 + P_i + ADP + H^+ \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + ATP$

**End of Document**

---

## <응용미생물 분야>

1. 미생물 auxotrophic mutant란 무엇인가?
2. 현재 국내산업체에서 미생물을 통해 활발히 생산되고 있는 유기산 발효시스템에 auxotrophic mutant가 많이 이용되는데 합당한 이유를 쓰시오.
3. Auxotrophic mutant를 이용하여 대사산물 생산성(productivity) 최대를 목표로 배양한다고 한다. Batch(회분식), Fed-batch(유가식), Continuous(연속) 배양공정 중 어떠한 공정이 효율적인가? 이유는 무엇인가?
4. Glucose와 Lactose가 동시 존재하는 배지에서, 대장균의 *lac* Operon (*lacO*) 작동이 어떻게 진행되는지 특히 이중 영양적 생장(diauxic growth)이 발생하는 이유를 설명하라.
5. Gram positive 미생물과 Gram negative 미생물의 세포벽 차이를 schematic 그림으로 그리고 중요 구성 성분을 표시하며 설명하라.

## <응용미생물 분야 답안>

1. Auxotrophic mutant: Wild-type에서와 달리 특정한 물질을 배지의 supplement로서 자신의 성장에 꼭 필요로 하는 미생물
2. 항생제 등을 이용하지 않고도, 결핍 물질을 이용하여 균주개량에 있어 필수적인 균주 selection 등을 효율적으로 할 수 있다. 결핍물질 농도조절을 통한 균주배양 공정개발을 효율적으로 할 수 있다.
3. Fed-batch가 적합하다. Auxotrophy관련 supplement 물질의 결핍, 첨가 등의 조절을 통해 세포성장, 대사산물 생산을 조절할 수 있기 때문이다.

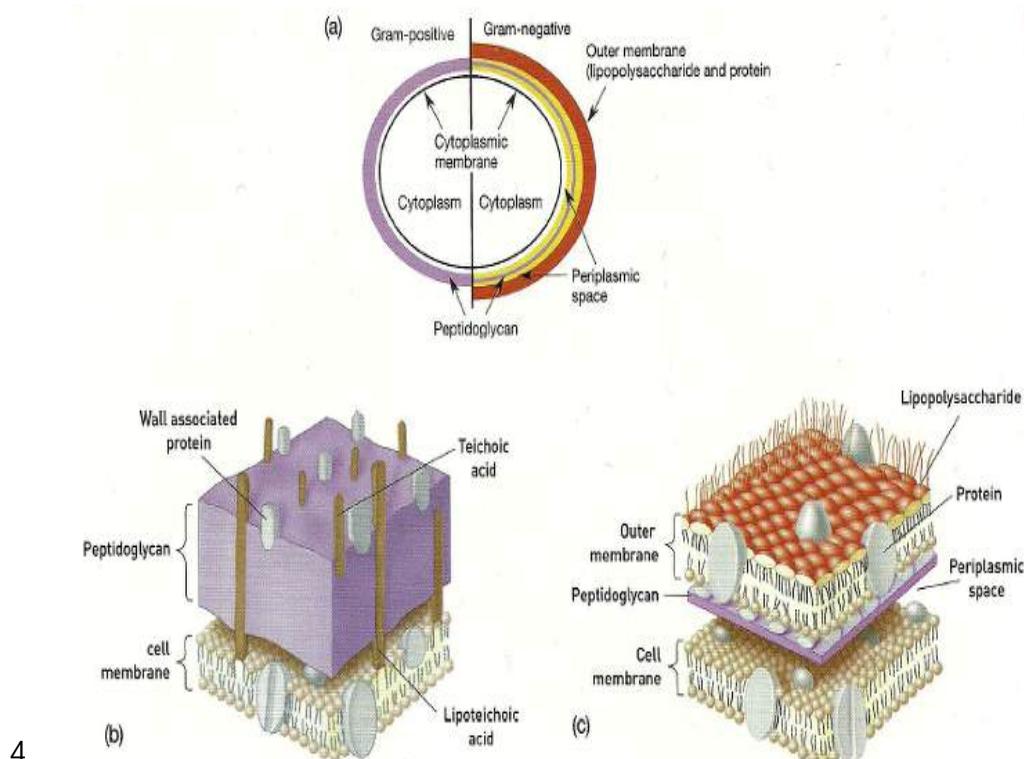


그림 6.2 그람-양성 세균과 그람-음성 세균의 세포 표층구조, 그람-양성 및 그람-음성 세균 세포 벽의 개략적인 모식(a) 그람-양성 세균(b)과 그람-음성 세균(c)의 세포 표층구조의 단면 모형도. (월드사이언스로부터 제공 받은 그림).

5. 대장균(*Escherichia coli*)의 배양에서 배지에 glucose가 lactose와 첨가되어 있는

경우에 초기에는 대장균의 lac 오페론은 유도되지 않는다. 이러한 glucose의 효과는 이화생성물 (catabolite)이 관여된 두 번째 조절기작의 결과가 원인이며 이를 이화생성물 억제 (Catabolite repression)라고 한다. 이 기작은 cAMP와 이화생성물 활성단백질 (Catabolite activator protein, CAP)이 관여된 기작이며, 서로 결합하여 복합체를 형성하게 되고 이 복합체는 lac 유전자들을 위한 프로모터와 인접한 부위의 특정 부위에 결합하여 RNA 중합효소의 결합을 증가시킨다. 만약 세포 내의 glucose의 농도가 높으면 cAMP의 농도가 낮아진다. 낮은 농도의 cAMP는 복합체를 형성하지 못하게 되고 lac 오페론의 유도가 일어나지 않게 된다. 이때 lac 억제인자 (lac repressor, lacI)는 계속해서 lacO (lac operator)에 결합된 상태를 유지하게 된다. 이후에 glucose를 많이 사용하여 glucose의 농도가 감소하게 되면 cAMP의 생성이 유도되어 농도가 증가하게 되고 충분한 양의 cAMP에 의해 복합체가 형성되어 Lactose 프로모터에 결합하게 된다. 또한 Lactose가 알로락토스(Allolactose)로 전환되고, 알로락토스(Allolactose)는 lac 억제인자 (lac repressor, lacI)와 복합체를 형성하여 lacO에 결합하는 것을 막아주게 되고 이로 인해서 lac 오페론의 유도가 일어난다. 이런 기작들을 통해 초기에는 glucose를 사용하여 cell이 성장하게 되고 glucose를 모두 사용한 후에는 lactose를 사용하여 성장하게 되는 이중단계의 성장 패턴인 이중 영양적 생장 (Diauxic growth)을 관찰할 수 있게 된다.

**End of Document**

---

1. 미생물을 바이오의약품( 단백질) 과 같은 제품의 생산 균주로 활용하고자 할 때 여러가지 문제들이 발생할 수 있다. 특히 대장균을 바이오의약품 생산에 활용하는 데 있어 발생하게 되는 문제점들을 네 가지 이상 이야기 하면 어떤 것이 있는가? (5+5+5+5)

해답:

1. Heterologous proteins accumulate intracellularly (Additionally primary processing steps are required, i.e. cellular homogenization with subsequent removal of cell debris by centrifugation or filtration)
- 2 Inability to undertake post-translational modifications (particularly glycosylation) of proteins
3. The presence of lipopolysaccharide (LPS) on its surface
4. More extensive chromatographic purification is required in order to separate the protein of interest from the several thousand additional homologous proteins produced by the *E. coli* cells
5. phage 감염

2. 미생물 대사에 있어서 (5+5+5)

1). 산소의 주역할은 무엇이며

2) 산소가 없게 되면 어떤 일이 일어나고

3). 산소가 부족한 상황을 극복하기 위하여 미생물 대사와 관련해서 어떤일이 일어나는가?

해답

- 1) Electron acceptor
- 2) NADH -> ATP를 만들지 못하며, NADH가 축적, ATP 생산량 감소
- 3) 미생물마다 다르나 .NADH -> NAD를 위한 NADH 소모적인 부산물들 (lactic acid, Ethanol)들을 생성하여 NAD를 만들어 다른 대사의 조효소로 다시 활용

1. 외래 유전자를 효모에 유전공학적으로 도입하여 목질계 Cellulose 를 분해하는 형질전환 효모를 구성하려고 한다. 외래 Cellulase 유전자를 클로닝하여 효모에서 발현하는 벡터를 만들었고, 재조합 효모내에서 잘 발현되고 있음을 발현 확인과 활성 측정으로 확인하였다. 하지만, 재조합 효모를 전처리로 얻어진 Cellulose 기질로 적용하였을 때 가지고 있는 Cellulose 가수분해 활성에 비해 잘 성장하지 못하였다. 이유는 무엇인가? Cellulose 분해하기 위해 추가적으로 재조합 효모 개발에 필요한 것은 무엇인가?

해답

기질이 되는 Cellulose 는 효모가 Uptake 하지 못한다.

발현된 외래 Cellulase 가 배지로 분비 또는 세포 표면 배열 등 세포외에 활성이 나타날수 있도록 cellulase 발현을 설계해야 한다.

2. Cellobiose 분해 활성을 가진 효모를 가지고 Cellobiose(5g/L) 와 Glucose (5g/L) 기질을 대상으로 발효하고자 한다. 시간에 따른 Cellobiose 분해 곡선, 효모의 성장 곡선, 그리고 에탄올 생산 곡선을 그림으로 그려라

해답

(Glucose 소비 속도가 Cellobiose 소비 속도 보다 빨라 마치 Diauxic 패턴의 기질 감소가 보이며, 효모 성장, 성장에 따른 에탄올 생산 (Glucose 및 Cellobiose 소비에 따른 3-4g/L 수준의 증가)

3. Xylose 분해하는 효모를 사용할 때 두가지 재조합 효모 개발이 가능하다.  
한가지는 (1) Xylose Reductase (Xylose->Xylitol)와 Xylitol Dehydrogenase (Xylitol->Xylose) 기능을 가진 형질전환 효모 또 다른 한가지는 (2) Xylose Isomerase (Xylose->Xylulose) 기능을 가진 형질전환 효모이다.  
-생성된 Xylulose 가 인산화를 거칠 경우 처리되는 대사로에 이름은 무엇이며 대사회로에 함께 참여하는 대사물질은 무엇인가? (Pentose phosphate pathway, Ribose-5-phosphate)  
-두번째 경우가 첫번째 보다 대사공학적으로 유리한 점을 서술하시오. (Xylose isomerase 기능은 조효소인 NADH 와 NADPH 등 사용을 하지 않아 효모내 조효소 balance 에 대한 부담이 적다.)

# 제17회 한국화학공학회 생명공학 경시대회(LG생명과학 후원)

## (응용미생물학 부문)

학교명 : \_\_\_\_\_ 이름 : \_\_\_\_\_

(공간이 부족하면 시험지 뒷면을 이용하시오.)

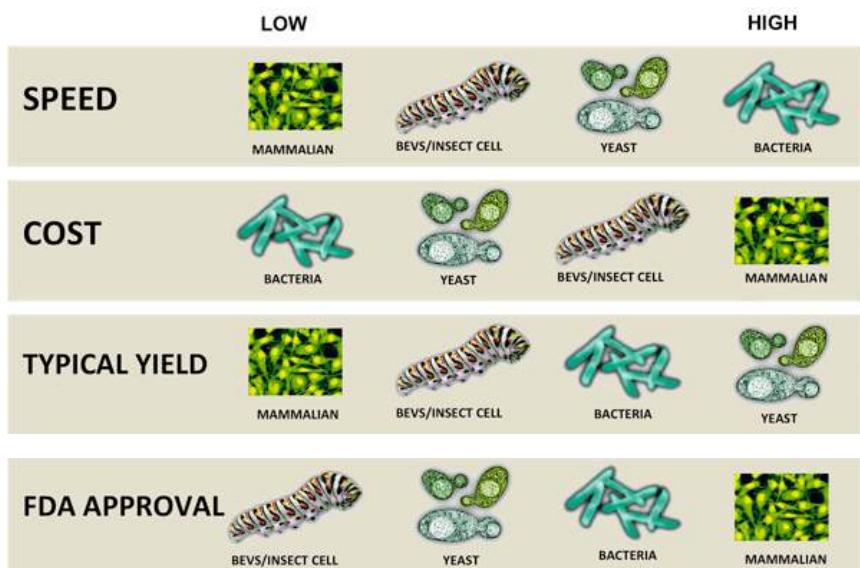
1. 의료용 단백질을 생산하기 위해 사용되는 방법으로 대장균, 효모, 동물세포 등이 생산 균주로 주로 사용된다. 이들 의료용 단백질 생산용 균주들이 생산속도, 비용, 생산수율, FDA승인의 4가지 요인에 대해 각각 어떠한 특성을 가지고 있으며 그 이유는 무엇인지 기술하시오.
  2. 산소가 존재하는 조건과 존재하지 않는 조건에 각각 미생물의 대사 과정이 크게 달라진다.
    - 1) 산소가 존재하는 조건과 존재하지 않는 조건에서의 대사과정의 차이를 각각 기술하시오.
    - 2) 산소가 존재하지 않는 경우 1 분자의 포도당(glucose)로부터 최종적으로 몇 분자의 ATP와 NADH가 각각 생성되는지 계산하고 그 이유를 설명하시오.
  3. 최근 extremophiles에 대한 연구가 다양이 진행되고 있다 특히 그중에서도 thermophiles에 대한 연구가 비교적 활발히 진행되고 있으며 산업적 또는 기술적으로 많은 영향을 주고 있다. Thermophiles의 특징에 대해 기술하시고 산업적 적용 사례를 기술하시오.

## <응용 미생물 분야 답안>

- 의료용 단백질을 생산하기 위해 사용되는 방법으로 대장균, 효모, 동물세포 등이 생산 균주로 사용된다. 이들 3가지 의료용 단백질 생산용 균주들이 생산속도, 비용, 생산수율, FDA승인 등 4가지 요인에 대해 각각 어떠한 특성을 가지고 있으며 그 이유는 무엇인지 기술하시오.

답 :

- **대장균**은 Doubling time이 짧기 때문에 생산 속도가 제일 빠르고, 값싼 배지를 이용하기 때문에 생산 비용 또한 많이 들지 않는다. 단백질 생산량이 많아 수율 측면에서도 좋지만, PTM(Post-translational modification) 되지 않는 원핵 생물이기 때문에 FDA 승인이 어렵다. 그러나 대장균은 유전자 조작이 용이하므로, 요즘에는 PTM이 되는 방향으로 개량되고 있어 승인이 되는 추세이다.
- **효모**는 단세포 진핵 생물로, 성장속도가 대장균보다는 느리지만 동물세포보다는 빠르므로 생산 속도가 빠르다. 사용되는 배지가 비교적 저렴하므로 생산하는 비용이 적게 듈다. 단백질 생산량이 많은 발현시스템이기 때문에 생산 수율이 비교적 좋다. 효모는 사람과의 PTM mechanism이 다르므로, FDA 승인에는 어려움이 있다.
- **동물세포**는 성장속도가 느리기 때문에 생산 속도가 가장 느리다. 배지 또한 비싼 배지가 사용되므로 생산 비용이 많이 듈다. 발현 수준이 낮아 수율도 낮지만, 복잡한 PTM이 가능해 치료용 단백질 생산을 위한 발현 시스템이므로 FDA 승인을 잘 받을 수 있다.



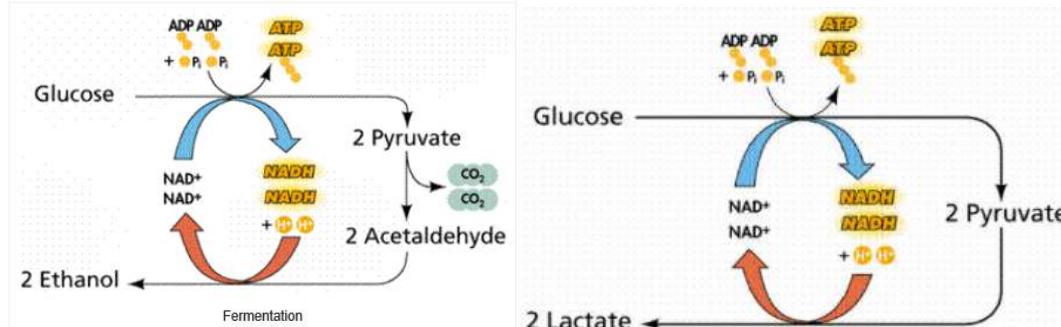
2. 산소가 존재하는 조건과 존재하지 않는 조건에 각각 미생물의 대사 과정이 크게 달라진다.

1) 산소가 존재하는 조건과 존재하지 않는 조건에서의 대사과정의 차이를 각각 기술하시오.

답 :

산소가 존재하는 경우, 해당과정, TCA회로, 전자 전달계 순의 과정을 거친다. 먼저 세포기질에서 해당과정을 거쳐 NADH를 형성하고, TCA회로를 통해 산화시켜 ATP에 에너지를 일부 저장하고, 나머지를 NADH, FADH<sub>2</sub>등의 중간체의 형태로 전자전달계에 넘겨준다. 전자 전달계는 산소가 필요한 반응으로, 전자가 이동하는 힘에 의해 다량의 ATP가 합성된다.

산소가 존재하지 않을 경우, 해당과정은 그대로이나 TCA회로와 전자전달계의 과정을 거치지 못한다. 전자전달계에서 산소가 최종 전자 수용체이다. 그러나 산소가 존재하지 않으면 TCA회로에서 만들어진 NADH, FADH의 전자를 수용할 수 없다. 따라서 NAD, FAD로 재순환되지 못하고 TCA 회로가 정상적으로 작동되지 못하게 되어 전자전달계도 작동하지 않는다. 결과적으로 해당과정 중 생성된 NADH가 사용되지 못하고 축적되기 때문에, pyruvate를 이용하여 NADH를 재순환시키는 젖산 발효 또는 알코올 발효가 진행된다. 이 경우, 산소가 존재할 때보다 적은 양의 ATP가 생성된다.



2) 산소가 존재하지 않는 경우 1 분자의 포도당(glucose)로부터 최종적으로 몇 분자의 ATP 와 NADH가 각각 생성되는지 계산하고 그 이유를 설명하시오.

답 :

TCA회로와 전자전달계가 작동하지 않기 때문에 해당과정에서의 대사, 즉 기질 수준의 인산화만 가능하다. 먼저 glucose를 fructose1,6-bisphosphate로 전환될 때 2분자의 ATP가 소비되고 fructose1,6-bisphosphate가 분해되어 pyruvate가 생성될 때 4분자의 ATP가 생산된다. 결과적으로 총 2분자의 ATP가 생성된다. NADH는 2분자 생성 되나 Pyruvate로부터 젖산 또는 알코올을 생성하는 발효과정에서 NADH가 NAD로 재순환되어 해당과정에 이용되기 때문에 결과적으로 0분자이다.

3. 최근 **extremophiles**에 대한 연구가 다양이 진행되고 있다. 특히 그중에서도 **thermophiles**에 대한 연구가 비교적 활발히 진행되고 있으며 산업적 또는 기술적으로 많은 영향을 주고 있다. **Thermophiles**의 특징에 대해 기술하시고 산업적 적용 사례를 기술 하시오.

답 :

**Thermophiles(고온성 균)**는 매우 높은 온도(45°C 이상)에서 살아 남을 수 있는 균으로, 온천이나 해저화산 근처, 토비더미에서 발견된다. Thermophiles는 생육 온도에 따라 moderate thermophiles, extreme thermophiles, hyperthermophiles로 나뉜다.

Thermophiles는 현재 다양한 바이오 산업에 활발히 활용되고 있으며, 특히 이들로부터 생산되는 내열성 효소는 생물 촉매, 생물전환 공정 등 광범위하게 이용되고 있다. 따라서 이 미생물의 지속적 탐색 및 개발은 기존 바이오 산업의 획기적 개선 및 미래 산업의 창출 등에 크게 기여 할 수 있을 것으로 예상된다.

Thermophiles은 효소는 열에 안정적이라는 특징을 이용하여 **PCR**에 응용되었다. PCR 과정은 고온에서 진행되기 때문에 thermophiles로부터 얻은 DNA polymerase를 이용한다. 주로 사용되는 polymerase는 *Thermus aquaticus*로부터 얻은 Taq DNA polymerase이다. 또한, 다양한 분해효소 (Protease, Amylase, Lipase 등)로 이용되어 식품 공정, 양조 공업, 세제 등 다양하게 이용 되고 있다.

**End of Document**

---

# 응용미생물학

## 문제

최근 연구참여 프로그램을 시작한 철수는 유전자재조합을 위한 competent cell을 제조하기 위해, 우선 포도당(glucose)이 들어있는 배지를 이용하여 대장균 배양을 준비하였으나, 무의식적으로 배양용기에 배양액을 가득채우고 안전한 배양을 해야겠다는 생각에 뚜껑을 완전히 밀봉하여 대장균 배양을 진행하였다.

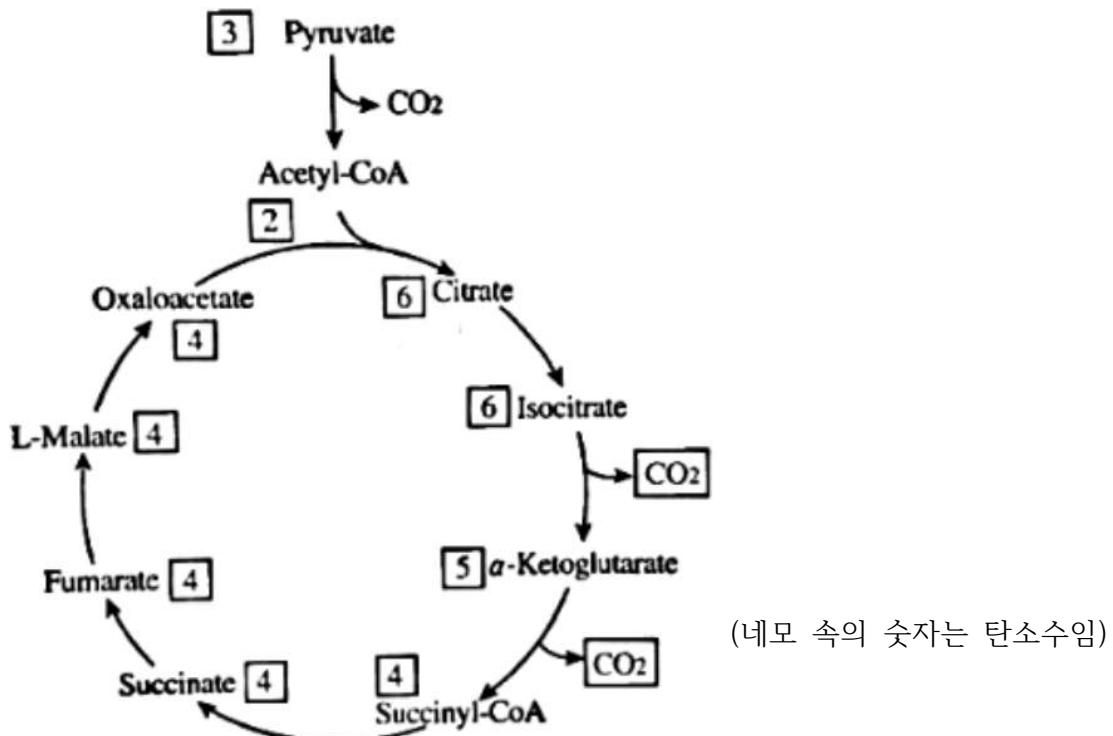
- (1) 대장균은 대사과정을 통해 초기 포도당(glucose)의 농도가 점차 감소하게 되는데, 1분자의 포도당이 2분자의 피루브산(pyruvate)으로 전환될 때 생성되는 물질은 무엇인가? (10점)
- (2) 배양 중 어느 순간 이 미생물의 대사과정에 변화가 발생하였다면, 그 원인과 이러한 대사과정의 변화를 통해 생성이 저해되는 대표적인 물질은 무엇인가? (20점)
- (3) 상기 (2)의 원인과 관련된 대표적인 대사경로의 과정을 그림으로 나타내어 설명하고, 1분자의 피루브산(pyrucate)은 이를 통해 어떤 물질들을 생성하는가? (20점)
- (4) 상기 (2)의 대사과정 변화로 인해 새롭게 생성되는 대표적인 대사산물은 무엇인가? (10점)
- 5) 포도당(glucose) 1몰(mole)을 완전히 산화하면 686 kcal의 열이 발생한다. 고등생물의 진핵세포의 경우 포도당(glucose) 1몰(mole)이 완전히 산화될 경우 38몰(mole)의 ATP가 생성된다고 알려져 있다. 하지만, Algae, Yeast, Fungi와 같은 진핵세포는 포도당(glucose) 1몰(mole)이 완전히 산화될 경우 그 효율이 다소 감소하여 32몰(mole)의 ATP가 생성된다. 그렇다면,
  - ① 대장균과 같은 원핵세포인 박테리아의 경우에는 포도당(glucose) 1몰(mole)이 호흡사슬(respiratory chain)을 통한 산화형 인산화 과정(oxidative phosphorylation)을 통해 몇 몰(mole)의 ATP가 생성될까? (10점)
  - ② 그리고 이 때 박테리아의 총 에너지 효율은 얼마인가? (15점)
  - ③ 한편, 상기 (2)의 원인에 의해 대사과정 변화이 변화되었다면, ATP 생성 측면에서 이로 인한 박테리아의 총 에너지 효율은 얼마나 감소하였는가? (단 상기 (4)의 새롭게 생성된 대표적인 대사산물은 산화되지 않고 축적된다고 가정) (15점)

## 답안

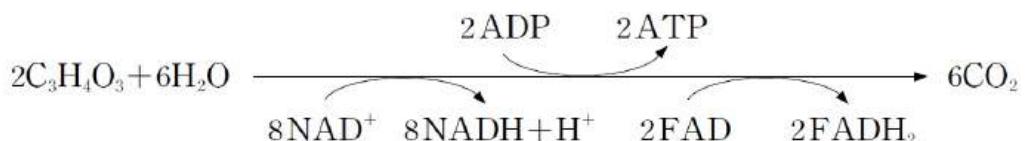
(1) 2분자의 ATP, 2분자의 NADH

(2) 배양용기와 배지에 존재하는 산소가 모두 소모되어, 대장균의 대사과정이 호기성 호흡(respiration)에서 혐기성 발효(fermentation)로 변화되며, 이로 인해 TCA 회로(TCA cycle)가 중단됨. 그리고 그 결과 ATP의 생성이 해당(glycolysis)과정에서만 이루어지므로 전체적으로 ATP의 생성이 저해됨

(3) TCA 회로(TCA cycle, 또는 Krebs cycle 또는 citric acid cycle)



그리고 이를 통해 1분자의 ATP, 1분자의 FADH<sub>2</sub>, 4분자의 NADH가 생성됨



(4) 피루브산(pyruvate)이 전자를 받아 젖산(lactate)이 생성됨

(5)

① 16몰(mole)의 ATP

② 1몰(mole)의 ATP에는 7.3 kcal의 열량이 저장되어 있으므로,

$$\text{고등생물의 진핵세포의 총 에너지 효율은 } \frac{38 \times 7.3}{686} \cong 0.40 = 40\% \text{ 임}$$

박테리아는 1몰(mole)의 포도당(glucose)에서 16몰(mole)의 ATP를 생성하므로,

$$\text{박테리아의 총 에너지 효율은 } \frac{16 \times 7.3}{686} \cong 0.17 = 17\% \text{ 임}$$

③ TCA 회로가 중단되었으므로, ATP는 해당(glycolysis)과정에서만 생성될 수 있으므로 1몰(mole)의 포도당(glucose)에서 2몰(mole)의 ATP가 생성됨. 해당(glycolysis)과정에서 생성된 2몰(mole)의 NADH는 젖산(lactate)로의 전환에 사용됨.

따라서, 이 때 박테리아의 총 에너지 효율은  $\frac{2 \times 7.3}{686} \cong 0.021 = 2.1\%$  임

	Algae, Yeast, Fungi	Bacterin
해당과정 $\rightarrow 2\text{pyruvate}$	2	2
2		
Oxidation of 2NADH + H <sup>+</sup>	$2 \times 2=4$	$2 \times 1=2$
TCA cycle		
pyruvate $\rightarrow 3\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$		
oxidation of 4NADH + 4H <sup>+</sup>	$4 \times 2.5=10$	$4 \times 1=4$
1FADH <sub>2</sub>	$1 \times 2=2$	1
succinyl-SCoA	1	1
	13	6
2Pyruvate $\rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	$2 \times 13=26$	$2 \times 6=12$
Glucose + 6O <sub>2</sub> $\rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	32	16

**End of Document**

---

## 응용미생물학

1. (20점) 미생물의 세포막을 통하여 기질을 획득하는 방법중에 (i) 촉진확산 (Facilitated diffusion)과 (ii) 능동수송 (active transport)을 에너지 이용 및 기질 농도 관점에서 차이점을 기술하시오

2. (20점) 아래 탄수화물을 구성하는 단당류에 대해 모두 기술하시오.

(i) Maltose : \_\_\_\_\_

(ii) Sucrose : \_\_\_\_\_

(iii) Lactose : \_\_\_\_\_

(iv) Amylopectin : \_\_\_\_\_

3. (20점) 미생물이 포도당을 이용하여 ATP를 생성하는 과정에서 나타나는 Pasteur effect와 Crabtree effect에 대해 설명하시오.

4. (40점) 미생물이 포도당을 기질로 이용하여 성장하였을 때 생물전환반응이 아래 식과 같으며, 공급된 포도당의 50%만이 미생물(biomass) 성장에 이용되었다고 한다.



(1) 위 생물 반응식의 계수 a,b,c,d,e를 구하여라

(2) 포도당에 대한 생산 수율 ( $Y_{X/S}$ )를 구하여라.

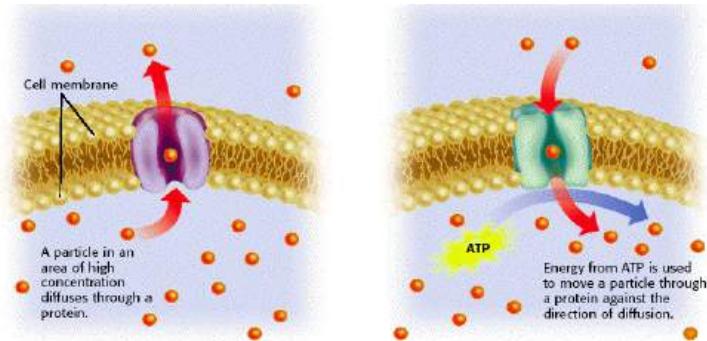
(3) 호흡률 (Respiratory quotient, RQ)를 구하여라.

## [정답]

1.

측진 확산

능동 수송



측진 확산 : 에너지를 필요로하지 않는 과정이며, 기질을 고농도에서 저농도로 수송한다.

능동 수송 : 에너지 (ATP)를 필요로 하는 과정이며 기질을 저농도에서 고농도로 수송한다.

2.

(i) Maltose : \_\_\_\_glucose\_\_\_\_\_

(ii) Sucrose : \_\_\_\_glucose, fructose\_\_\_\_\_

(iii) Lactose : \_\_\_\_Glucose, galactose\_\_\_\_\_

(iv) Amylopectin : \_Glucose\_\_\_\_\_

3.

(1) **Pasteur effect** : 호기적 조건에서 TCA 및 전자전달체인을 통해 많은 양의 ATP가 합성되면서 ADP+Pi의 고갈을 야기시키고, 이로 인해 Glycolysis에 관여하는 주요 효소중의 하나인 Phosphofructokinase의 활성이 저해됨. 또한 높은 산소조건에서 Glycolysis 및 TCA에 관여하는 효소들중에 -SH를 갖고 있는 효소들의 활성이 저해됨. 이로 인해 호기적 조건에서 glycolysis의 속도는 혐기적 조건에서의 glycolysis에 비해 느려짐.

(2) **Crabtree effect** : 산소가 충분한 호기적 조건에서 과량의 포도당이 공급되는 경우에 TCA 및 전자전달을 통한 산화적 인산화과정(Oxidative phosphorylation)에 의한 ATP 생성은 감소하고, 혐기적 조건에서와 같이 pyruvate에서 ethanol로 전환되는 알코올발효가 진행됨으로써 호기적 조건임에도 불구하고 산화적 인산화과정대신 기질수준 인산화과정(Substringe-level phosphorylation)을 통해 ATP를 생성하게 됨.

#### 4.

##### (1) 원소 수지

$$C : 6 = 4C + e \quad - (1)$$

$$H : 12 + 3b = 8c + 2d \quad - (2)$$

$$O : 6 + 2a = 1.5c + d + 2e \quad - (3)$$

$$N : b = c \quad - (4)$$

공급된 기질의 50%만이 biomass에 이용되었으므로,

$$12x6x0.5 = 12x4xc \rightarrow c = 3/4 \text{ 이므로,}$$

식 (1)에서  $e = 3$ ,

식 (4)에서  $b = 3/4 = 0.75$  이고,

식 (2)에서  $d = 33/8 = 4.125$ ,

식 (3)에서  $a = 42/16 = 2.624$

답 :  $a = 2.624 \quad b=c=0.75, \quad d=4.125, \quad e=3$

$$(2) Y_{X/S} = \frac{\text{생성된 미생물의 양}}{\text{소모된 기질의 양}} = \frac{c \times MW_{biomass}}{1 \times MW_{glucose}} = \frac{\left(\frac{3}{4}\right) \times 94}{1 \times 180} = 0.392 \text{ g/g}$$

$$(3) \text{ 호흡률 (RQ)} = \frac{\text{생성된 } CO_2}{\text{소비된 } O_2} = \frac{e}{a} = \frac{3}{\left(\frac{42}{16}\right)} = 1.143$$

**End of Document**

---

## 제20회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원) (응용미생물학 부문)

1. 아래 내용은 lac 오페론에 대한 내용이다. 빈칸을 채우시오 (총 40점)

대장균(*Escherichia coli*)의 배양에서 배지에 glucose가 lactose와 첨가되어 있는 경우에 초기에는 대장균의 lac 오페론은 유도되지 않는다. 이러한 glucose의 효과는 이화생성물 (catabolite)이 관여된 두 번째 조절 기작의 결과가 원인이며 ( 1 )라고 한다.

( 1 )는 두 단계의 조절을 통해서 매우 효과적으로 lac오페론을 조절한다. ( 1 )를 부르는 명칭과는 대조적으로 ( 1 )는 cAMP와 ( 2 )이 관여된 기작이다.

첫 번째로, cAMP는 ( 2 )과 결합하여 복합체를 형성하게 되고 이 복합체는 lac 유전자들을 위한 프로모터와 인접한 부위의 특정 부위에 결합하여 RNA 중합효소의 결합을 증가시킨다. 만약 세포 내의 glucose의 농도가 높으면 cAMP의 농도가 낮아진다. 낮은 농도의 cAMP는 복합체를 형성하지 못하게 되고 lac 오페론의 유도가 일어나지 않게 된다.

이때 ( 3 )는 계속해서 lacO (lac operator)에 결합된 상태를 유지하게 된다. 이후에 glucose를 많이 사용하여 glucose의 농도가 감소하게 되면 cAMP의 생성이 유도되어 농도가 증가하게 되고 충분한 양의 cAMP에 의해 복합체가 형성되어 Lactose 프로모터에 결합하게 된다. 이를 통해서 최소한의 lactose 오페론이 발현하게 되어, lactose 대사에 필요한 효소 및 수송단백질을 구성하게 된다.

둘째로, 초기 발현을 통해서 얻어진 Lactose가 ( 4 )로 전환되고, ( 4 )는 ( 3 )와 복합체를 형성하여 ( 3 )는 lacO에 결합하는 것을 막아주게 되고 이로 인해서 lac 오페론의 유도가 가속화하여 지속적으로 일어난다.

따라서 glucose와 lactose가 동시에 존재할 경우, 이런 기작들을 통해 초기에는 glucose를 사용하여 cell이 성장하게 되고 glucose를 모두 사용한 후에는 lactose를 사용하여 성장하게 되는 이중단계의 성장 패턴인 ( 5 )을 관찰할 수 있게 된다.

정답 (정답은 국문 혹은 영문 모두 인정)

(1) \_\_이 \_\_\_\_\_ (C\_\_\_\_\_ )\_\_ (8점)

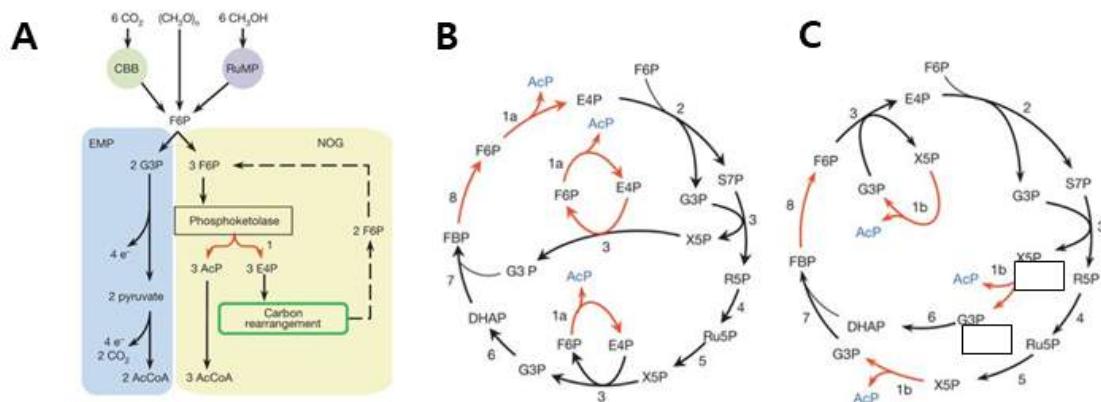
(2) \_\_이 \_\_\_\_\_ (C\_\_\_\_\_ )\_\_ (8점)

(3) \_\_I \_\_\_\_\_ (I\_\_\_\_\_ )\_\_ (8점)

(4) \_\_알 \_\_\_\_\_ (A\_\_\_\_\_ )\_\_ (8점)

(5) \_\_이 \_\_\_\_\_ (D\_\_\_\_\_ )\_\_ (8점)

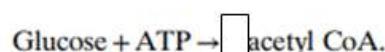
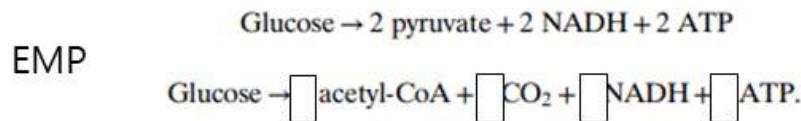
2. 다음 내용은 세포내 Non-oxidative glycolysis (NOG) 대사경로에 관한 학설이다. 빈칸을 채우시오 (총 30 점)



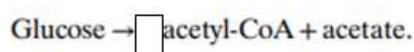
(1) 그림 A에 나타난 NOG경로를 구성할 때 phosphoketolase (PKT)의 반응과 대사회로의 재구성이 필요하다. 그림 B와 그림 C는 각기 다른 PKT를 이용한 경로이다. 포도당으로부터 당대사과정에서 NOG 내 각각의 반응을 정의하고 NOG경로를 이용한 전체반응식을 작성하시오. (10점)

(2) NOG를 통하여 세포내 대사경로가 일어날 경우, EMP경로에 비교하여 어떠한 이점이 있는지를 탄소관점에서 논의하시오. (10점)

(3) 빈칸을 채우고, NOG경로의 특이점을 Redox 관점과 바이오리파이너리 관점에서 EMP와 NOG를 논의하시오. (10점)



**NOG**      ATP can be provided by converting acetyl-CoA to acetate:



3. 이론수율과 실제수율을 계산식 (x, y)으로 정의하고 (5점) 효모를 이용하여 포도당에서 에탄올을 반응기에서 생산할 경우 실제수율을 계산하시오 (10점). 계산된 실제수율과 이론수율의 차이를 설명하시오 (5점). 만약 2번 문항의 NOG균주를 이용한다면, 반응식을 새롭게 구성하고 어떤 이론수율의 결과를 예측할 수 있는가? (10점)

[발효과정] 5L반응기에 실제배지부피 1L를 준비하고 초기 40g/L농도의 포도당을 이용하여 회분식발효를 진행하고, 초기 포도당이 전부 고갈됨을 확인하고, 500g/L의 포도당 원액을 두 번에 걸쳐 10 mL식 펄스피딩을 진행하는 유가식발효를 진행하였다. 유가식 발효종료 후 포도당은 전부 고갈되었고, 에탄올의 농도는 20g/L로 측정되었다. 추가된 배지의 부피 증가는 무시할 수 있다.

i.e. Ethanol production: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> → x C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O + y CO<sub>2</sub>

approx. Molecular weight: 180 g/mol glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), 45 g/mol Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)

(1)

(2)

(3)

(4)

## 제20회 한국화학공학회 생명공학 경시대회 (LG화학 후원) (응용미생물학 부문)

### 정답

1.
  - (1) 이화생성물 억제 (Catabolite repression)
  - (2) 이화생성물 활성단백질 (Catabolite activator protein, CAP)
  - (3) lac 억제인자 (lac repressor, lacI)
  - (4) 알로락토스 (Allolactose)
  - (5) 이중 영양적 생장 (Diauxic growth)
2.
  - (1) B는 F6P  $\rightarrow$  E4P + AcP로써 PKT의 F6P활성을 가지고 있는 반응이고, C는 X5P  $\rightarrow$  G3P + AcP로써 PKT의 X5P활성을 가지고 있는 반응이다. 전체 반응식은 Glucose  $\rightarrow$  3 AcCoA이다.
  - (2) EMP는 PDH의 반응에 따라서 CO<sub>2</sub>를 배출하는 과정이 필수적인데 비하여, NOG는 이산화탄소를 끓어버리지 않는 경로이다. 따라서 전체 반응경로를 구성해볼 때, 6개의 탄소를 갖고 있는 glucose에서 탄소2개를 갖는 AcCoA가 3몰 얻어지므로, 탄소가 보존된다.
  - (3) 숫자 차례대로, 2, 2, 2, 4, 2, 3, 2  
NOG경로는 EMP경로에 비해서 NADH 및 ATP의 에너지물질로부터 자유로울 수 있는 대사경로이다. 이는 이산화탄소가 가장 oxidized된 화합물로 추가 잉여 NADPH/NADH의 밸런스에서 자유로울 수 있다. 또한 대사공학적으로 개량한다면, acetate보다 더욱 환원된 물질을 생산할 수 도 있다.
3.

반응식에서 몰수가 x = 2, y = 2 이므로, 이론적으로 포도당을 통해 최소한의 경로를 통하여 최대한의 에탄올을 얻을 수 있는 양의 비율은  $2 \times 45 \text{ g} / 180 \text{ g} = 0.5 \text{ g/g}$  임. 실제수율은 실제 발효를 통하여 소비된 포도당의 양과 실제 생산된 에탄올의 양을 측정하여, 에탄올/포도당을 g/g으로 계산한 것임

유가식 발효를 통하여 아래와 같이 실제 수율이 계산됨.

$$20 \text{ g 에탄올} / (40\text{g} + 5\text{ g} + 5\text{ g}) = 20/50 = 0.4 \text{ g/g}$$

이론수율과 실제수율의 차이는 세포성장에 따른 바이오매스의 증가에 있다. 탄소의 사용이 에탄올의 생산과 함께 바이오매스의 증가에도 사용되기 때문에 이론적 수율의 결과와 동일할 수 없다. 따라서 후반부 유가식 발효시 세포성장과 별개의 생산회를 구성하다면 보다 이론수율에 접근할 수 있다.

NOG경로를 이용할 경우, CO<sub>2</sub>를 줄일 수 있어  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ C}_2\text{H}_6\text{O} + 3\text{O}_2$  으로 구성하고, 이론수율이  $3 \times 45 / 180 = 0.75\text{g/g}$  으로 생물반응시스템을 기준 이론수율인 0.5g/g에서 획기적으로 높일 수 있음.

**End of Document**

---

## 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 설명하시오 (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, 현재 까지 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 설명하시오. (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 설명하시오. (25점)

## 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-CoA로 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 $\text{NO}_3^-$ $\text{SO}_4^{2-}$ $\text{CO}_3^{2-}$	$\text{NO}_2^-$ , $\text{N}_2\text{O}$ $\text{N}_2$ $\text{H}_2\text{S}$ , $\text{CH}_4$	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

$2 \text{ glucose} \rightarrow 2 \text{ lactic acid} + 2 \text{ ethnaol} + 2 \text{ CO}_2$

Bifidum fermentation

$2 \text{ glucose} \rightarrow 2 \text{ lactic acid} + 3 \text{ acetic acid}$

2분자의 포도당을 이용하여 2분자의 lactic acid가 생산되는 것은 같음.  $\text{CO}_2$ 의 발생이 없는 발효를 수행, bifidobacteria의 경우 다른 lactic acid bacteria와 비교하여 strict anaerobe임

**End of Document**

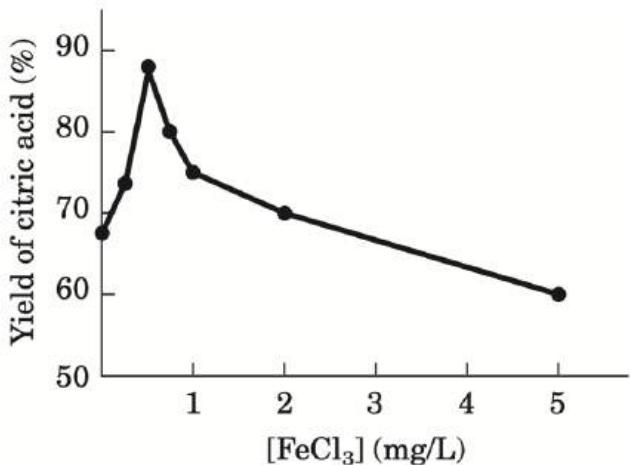
---

## 2023 LG생명공학경시대회 문제지

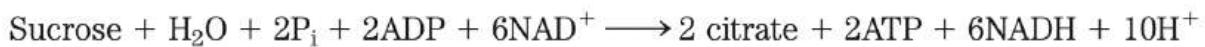
### 응용미생물

1. 구연산 (Citric acid) 은 청량 음료, 과일 주스 및 기타 여러 식품의 향료로 사용됩니다. 전 세계적으로 구연산 시장은 연간 수억 달러에 달합니다. 현재 구연산의 상업적 생산은 특정 배양 조건에서 Sucrose를 대사하는 곰팡이 *Aspergillus niger*를 사용합니다.

- 1-1. 구연산의 수율은 아래 그래프에 표시된 것처럼 배양 배지의  $\text{FeCl}_3$  농도에 크게 의존합니다.  $\text{Fe}^{3+}$ 의 농도가 최적값인 0.5mg/L보다 높거나 낮을 때 수율이 감소하는 이유는 무엇입니까?



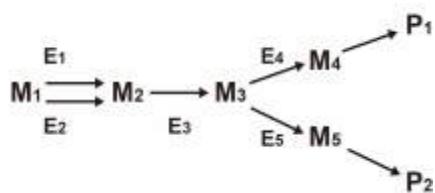
- 1-2. Sucrose로부터 구연산 전환의 최종 반응식은 아래와 같을 때, 상업 공정에서 곰팡이를 배양 시 호기성 혹은 혐기성 중 어떤 공정을 따라야 하는지 세포의 대사 관점에서 자세히 설명하시오.



2. 간장은 콩과 밀, 소금 등을 효모 등과 같은 몇 가지의 미생물과 섞어서 8–12 개월간 발효하여 만든다. 얻어진 간장은 젖산과 에탄올 등을 풍부하게 가지고 있다. 이들 두 가지 화합물은 어떤 과정을 거쳐 생산되게 되는가? 해당과정의 최종산물인 피루브산을 전구체로 한 반응식과 관여하는 효소이름을 함께 표기하라. (50점)

- 최종산물의 종류에 따라 각기 다른 효소가 작용

(A)

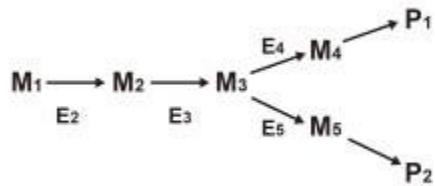


(B) 협력 되먹임 저해 (10점)

(concerted feedback inhibition)

- 각각의 최종산물이 일정한 농도 이상이 되어야 효소를 저해함
- 한 가지 최종산물 만으로는 효소를 저해 모함
- 효소가 2개의 allosteric sites을 가지고 있음

(B)

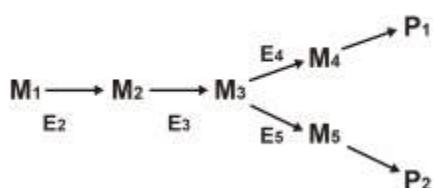


(C) 누적되먹임 저해 (10점)

(cumulative feedback inhibition)

- 각각의 최종산물은 초기 반응에 관여하는 효소를 부분적으로 저해
- 각각 최종산물의 양 (농도)의 합이 일정 수준을 넘으면 전체 효소를 저해

(C)



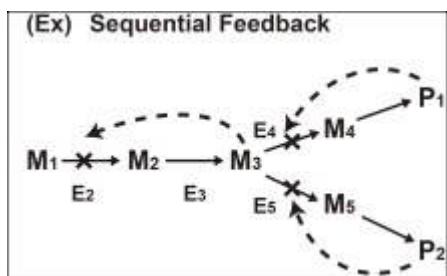
3. Pentose phosphate pathway 에서는 해당과정과는 달리, 주로 생체분자 생합성에 필요한 환원력을 제공해 주는 조효소를 생산한다. 이 조효소는 무엇인가? (10점)

4. 미생물은 주어진 자원을 최대한의 효율로 이용하기 위해 많은 다양한 시도를 한다. 이와 비슷하게 발효 미생물을 이용하여 산업적으로 유용한 물질을 최대로 생산하기 위해서는 이를 위한 환경 및 조건을 조성해 주어야 할 경우가 있다. 따라서 응용 미생물을 이용한 생물공정 반응을 이해하기 위해서는 미생물, 특히 여러 효소의 조절 작용을 이해하여야 한다. 아래는 효소 반응 조절을 통한 Metabolic Pathway Control의 간단한 예들이다. 이에 대한 설명을 읽고 기질 (M)의 효소 (E)를 통한 최종생산물 (P)을 만드는 조절 작용을 추론하여 그림을 완성해 하시오. 아래의 예(Ex)로 주어진 그림을 참조하여, 주어진 그림(A-C) 위에 실선으로 혹은 다른 색깔의 선으로 그리시오. (총 30점)

(예) 순차적 되먹임 저해

(sequential feedback inhibition)

- 생화학 반응의 경로에서 순차적으로 생산되는 산물이 순차적으로 앞 반응에 관여하는 효소를 저해함



(A) 유사효소 (10점)

(isozyme, enzyme multiplicity)

- 같은 생화학 반응에 관여하는 서로 다른 효소
- 각각 다른 최종산물에 의하여 저해를 받음

## 응용미생물

1.

1) Citrate는 Oxaloacetate와 acetyl-CoA에 대한 citrate synthase의 작용을 통해 생성됩니다. Citric acid cycle은 일반적으로 중간체의 축적을 초래하지 않지만 (1) 새로운 oxaloacetate와 acetyl-CoA의 지속적인 유입이 있고 (2) citrate가 isocitrate로 전환되는 것이 제한될 때 citrate가 synthase에 의해 생산되어 축적될 수 있습니다.

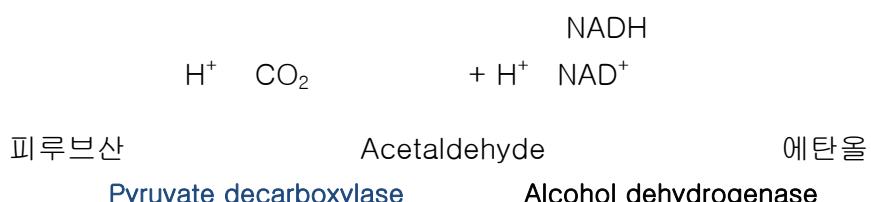
Citrate를 isocitrate로 전환하는 aconitase는 온 Fe3+ 함유 효소이기에 Fe3+ 제한 배지에서는 citrate의 분해가 제한될 수 있습니다. 그러나 더 높은 Fe3+ 농도에서는 aconitase 합성 양도 증가하고 활성도 증가되면서 citrate의 축적이 줄어듭니다. 물론 Fe3+가 너무 없으면 곰팡이가 성장할 수 없기에 곰팡이 성장과 citrate 생산의 trade-off를 맞춰주는 최적의 농도가 필요하며 그 농도가 0.5mg/L가 됩니다.

2) 전체 반응을 살펴보면 NAD<sup>+</sup>를 소비하는 반응입니다. 산화된 형태의 코엔자임 풀은 세포내에 제한적이므로 산소 소비와 함께 electron transport chain을 통해 NADH의 산화를 바탕으로 재활용되어야 합니다. 결과적으로 sucrose가 citrate로 전환되는 것은 호기성 과정이므로 배양 시 산소 공급이 필요합니다.

2.

1) 에탄올 발효 (효모와 미생물)

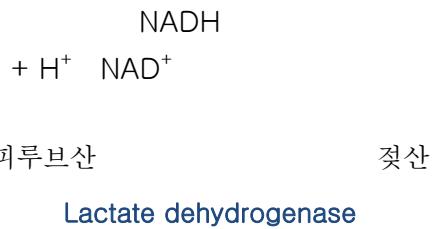
우선 acetaldehyde로 탈카르복시화되어 이산화탄소가 생성되고 에탄올로 환원된다. 첫 번째 단계를 촉매하는 pyruvate decarboxylase는 비산화적 decarboxylation 반응을 촉매하며 조효소로 TPP를 필요로 한다. 두 번째 alcohol dehydrogenase에 의해 NADH로부터 수소이온이 전달되면서 에탄올로 환원되고 NAD<sup>+</sup>의 재생이 이루어진다.



2) 젖산 발효.

lactate dehydrogenase에 의해 촉매되며 이 효소는 isozyme으로 존재한다. LDH에 의해 NADH로

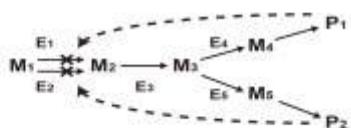
부터 수소이온이 전달되어 NAD<sup>+</sup>가 재생되고 피루브산은 젖산으로 환원된다. 따라서 이 반응은 혐기상태에서 전자수용체의 역할을 하는 것이다.



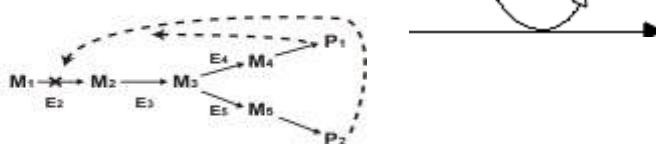
### 3. 답: NADPH

### 4.

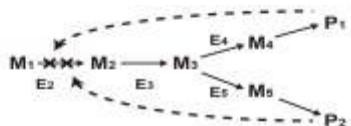
(A)



(B)



(C)



**End of Document**

---

## I. 응용미생물학

1. CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술은 유전체 편집에 혁신을 가져왔습니다. Type II CRISPR-Cas9 시스템의 구성요소와 각각의 기능을 설명하고, 이 시스템이 외래 DNA를 인식하고 절단하는 과정을 단계별로 기술하시오. 또한 CRISPR-Cas9의 오프타겟 효과 메커니즘과 이를 최소화하기 위한 최신 연구 동향을 한가지 정도 소개하시오. (250~300자) (25점)
2. 합성생물학(Synthetic Biology)은 생물학적 시스템을 설계하고 구축하는 학문 분야입니다. Bottom-up 방식과 Top-down 방식의 차이를 설명하고, 각 방식의 장단점을 비교하시오. 또한 유전자 회로 설계 시 고려해야 할 요소들과 이를 최적화하기 위한 전략을 제시하시오. (250~300자) (25점)
3. 대장균(*Escherichia coli*)은 분자생물학 연구에서 가장 널리 사용되는 모델 미생물입니다. 한 개의 대장균 세포의 부피가  $1.0 \times 10^{-15}$  L이고, 세포 내 단백질 농도가 300 g/L라고 할 때, 단백질의 평균 분자량을 50,000 g/mol로 가정하면 한 세포 내 단백질 분자의 총 개수를 계산하시오. 또한 이 결과가 대장균을 이용한 재조합 단백질 생산에 어떤 시사점을 주는지 논하시오. (200~250자) (25점)
4. Glucose 와 lactose 가 동시에 존재하는 배지에서, 대장균의 *lac* operon (lacO) 작동이 어떻게 진행되는지 특히 이중 영양적 생장(diauxic growth)이 발생하는 이유를 설명하시오. (25 점)

## 2024 생명공학경시대회 정답지

### I. 응용미생물학

1. (25점) Type II CRISPR-Cas9 시스템은 Cas9 nuclease, crRNA, tracrRNA로 구성된다. Cas9은 crRNA와 tracrRNA의 도움을 받아 표적 DNA를 인식하고 절단한다. crRNA는 표적 DNA와 상보적인 서열을 가지며, tracrRNA는 crRNA와 결합하여 Cas9의 활성을 돋는다. Cas9은 PAM 서열을 인식하여 표적 DNA에 결합하고, crRNA의 가이드에 따라 DNA 절단을 수행한다. 오프타겟 효과를 줄이기 위해 Cas9 변이체 개발, sgRNA 설계 최적화, Cas9 활성 조절 기술 등이 연구되고 있다.

- CRISPR-Cas9 시스템 구성요소와 기능 (10점)
  - Cas9, crRNA, tracrRNA의 역할 (7점)
  - PAM 서열과 DNA 절단 (3점)
- 오프타겟 효과 메커니즘과 최소화 전략 (15점)
  - 오프타겟 효과 발생 원인 (10점)
  - Cas9 변이체, sgRNA 설계, Cas9 활성 조절 등의 전략 (5점)

2. (25점) Bottom-up 방식은 생물학적 부품을 조립하여 새로운 시스템을 설계하는 것이고, Top-down 방식은 기존 생물체의 유전체를 최소화하거나 개조하는 것이다. Bottom-up은 높은 설계 자유도를 가지나 복잡한 시스템 구현이 어렵고, Top-down은 안정적이나 설계 범위가 제한적이다. 유전자 회로 설계 시에는 프로모터, RBS, 코돈 사용 패턴, 터미네이터 등을 고려해야 한다. 정량적 모델링과 합성 생물학 CAD 도구를 활용하여 회로를 최적화할 수 있다.

- Bottom-up과 Top-down 방식 비교 (10점)
  - 각 방식의 정의와 특징 (5점)
  - 장단점 비교 (5점)
- 유전자 회로 설계 고려 요소와 최적화 전략 (15점)
  - 프로모터, RBS, 코돈 사용 패턴, 터미네이터 등 (8점)
  - 정량적 모델링과 CAD 도구 활용 (7점)

3. (25점) 단백질 몰수 = 단백질 무게 / 단백질 평균 분자량 =  $(300 \text{ g/L} * 1.0 \times 10^{-15} \text{ L}) / (50,000 \text{ g/mol}) = 6.0 \times 10^{-18} \text{ mol}$ . 아보가드로수( $6.02 \times 10^{23}$ )를 곱하면, 한 세포 내 단백질 분자 수는 약 361,200개이다. 이는 대장균 세포의 제한된 자원 내에서 재조합 단백질 생산량에 한계가 있음을 시사한다. 따라서 발현 벡터 최적화, 대사공학적 숙주 개량, 생물공정 제어 등의 전략을 통해 생산성을 높이는 것이 중요하다.

- 세포 내 단백질 분자 수 계산 (10점)
  - 단위 환산과 계산 과정 (6점)
  - 아보가드로수 적용과 최종 결과 (4점)
- 재조합 단백질 생산에 대한 시사점과 활용 방안 (15점)
  - 제한된 세포 자원과 생산성의 한계 (6점)
  - 발현 벡터 최적화, 대사공학, 생물공정 제어 등의 전략 (9점)

4. (25점) 대장균(*Escherichia coli*)의 배양에서 배지에 glucose가 lactose와 첨가되어 있는 경우에 초기에는 대장균의 lac 오페론은 유도되지 않는다 (10). 이러한 glucose의 효과는 이화생성물 (catabolite)이 관여된 두 번째 조절기작의 결과가 원인이며 이를 이화생성물 억제 (Catabolite repression)라고 한다. 이 기작은 cAMP와 이화생성물 활성단백질 (Catabolite activator protein, CAP)이 관여된 기작이며, 서로 결합하여 복합체를 형성하게 되고 이 복합체는 lac 유전자들을 위한 프로모터와 인접한 부위의 특정 부위에 결합하여 RNA 중합효소의 결합을 증가시킨다. 만약 세포 내의 glucose의 농도가 높으면 cAMP의 농도가 낮아진다. 낮은 농도의 cAMP는 복합체를 형성하지 못하게 되고 lac 오페론의 유도가 일어나지 않게 된다. 이때 lac 억제인자 (lac repressor, lacI)는 계속해서 lacO (lac operator)에 결합된 상태를 유지하게 된다. 이후에 glucose를 많이 사용하여 glucose의 농도가 감소하게 되면 cAMP의 생성이 유도되어 농도가 증가하게 되고 충분한 양의 cAMP에 의해 복합체가 형성되어 Lactose 프로모터에 결합하게 된다. 또한 Lactose가 알로락토스(Allolactose)로 전환되고, 알로락토스(Allolactose)는 lac 억제인자 (lac repressor, lacI)와 복합체를 형성하여 lacO에 결합하는 것을 막아주게 되고 이로 인해서 lac 오페론의 유도가 일어난다 (10). 이런 기작들을 통해 초기에는 glucose를 사용하여 cell이 성장하게 되고 glucose를 모두 사용한 후에는 lactose를 사용하여 성장하게 되는 이중단계의 성장 패턴인 이중 영양적 생장 (Diauxic growth)을 관찰할 수 있게 된다 (5).

**End of Document**

---

제25회 한국화학공학회 생명공학 경시대회(LG화학 후원)  
(응용미생물학 부문)

학교 명 : \_\_\_\_\_ 이름 : \_\_\_\_\_

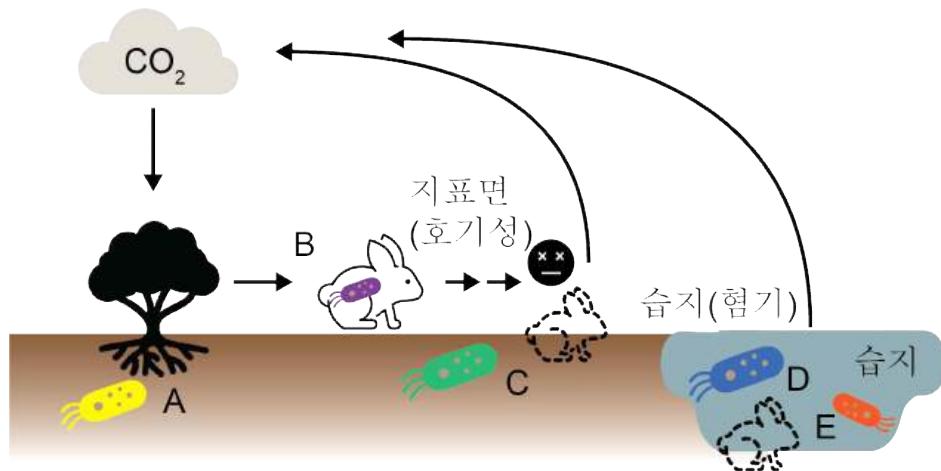
(공간이 부족하면 시험지 뒷면을 이용하세요.)

[1] 미생물 중 박테리아는 원핵생물에 해당한다. 박테리아의 대표격인 대장균의 길이로 가장 적절한 것은? [5점]

- ① 1 nm    ② 10 nm    ③ 100 nm    ④ 1 μm    ⑤ 10 μm    ⑥ 100 μm    ⑦ 1 mm

정답: ④

2. 지구내에서 탄소 원자는 다양한 형태로 이동되고 변환되는데, 이 과정에서 미생물이 핵심적인 역할을 한다. 아래 그림은 이산화탄소의 유기물(식물)로의 고정, 호기적 및 혐기적 유기물의 분해에 이르는 과정에서 필요한 미생물의 주요 역할에 대하여 각각에 대하여 설명하시오. [각 5점, 총 25점]



[2-1] A: 대기중의 이산화탄소는 식물에 의해 고정되는데, 토양의 미생물은 식물의 성장을 촉진하는 물질을 만들어 식물에게 공급하거나 식물 병원균으로부터 보호한다.

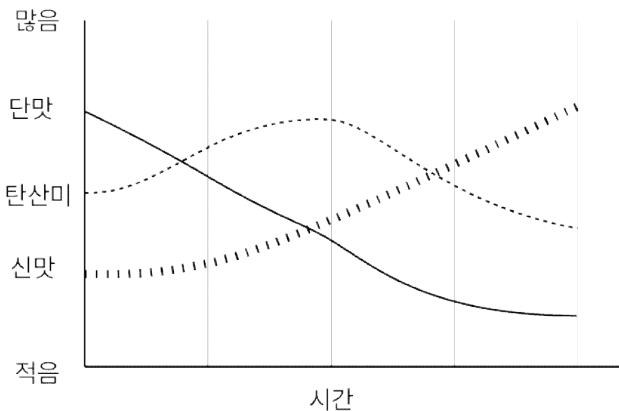
[2-2] B: 동물의 장내 미생물은 식물을 구성하는 성분의 분해를 도와 동물이 잘 소화할 수 있도록 돋는다.

[2-3] C: 동식물이 죽고나면, 미생물들이 분해하여 이산화탄소로 방출한다.

[2-4] D: 동식물이 죽고나면, 산소가 없는 조건에서는 고세균에 의한 혐기성소화반응이 일어나 메탄으로 전환된다.

[2-5] E: 혐기성소화작용에 의해 생성된 메탄을 메탄영양생물에 의해 대사되어 이산화탄소로 전환된다.

- [3] 막걸리는 쌀을 원료로 하여 누룩과 물을 넣고 발효시켜 만드는 전통주이다. 누룩 속 곰팡이(*Aspergillus, Rhizopus* 등)는 전분을 포도당으로 분해하고, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 이를 이용해 에탄올과 CO<sub>2</sub>를 생성한다. 이렇게 만들어진 막걸리는 시간에 따라 맛이 변화하는데, 일반적으로 아래 그림과 같다. 왜 이러한 변화가 나타나는지, (1) 단맛, (2) 탄산미, (3) 신맛에 대하여 미생물의 대사과정을 위주로 설명하시오. [각 10점, 총 30점]



- [3-1] 단맛: 미생물이 시간에 따라 포도당을 소모하여 발효를 일으키므로, 단맛은 지속적으로 감소한다.
- [3-2] 탄산미: 발효과정이 지속됨에 따라 부산물로 이산화탄소가 발생하며, 막걸리속의 탄산은 증가하게 된다. 후반부에는 포도당이 줄어 탄산 생산량이 줄어들게 된다.
- [3-3] 신맛: 시간이 지남에 따라 에탄올은 아세트산으로 전환되며, 이에 산미가 증가한다.

- [4] 마이크로바이옴(microbiome)은 특정 환경에 서식하는 미생물 집단과 그들의 유전정보를 통칭하며, 숙주나 환경의 대사, 면역, 생태계 기능 유지에 중요한 역할을 한다. 최근에는 차세대염기서열분석(NGS) 기술을 이용하여 인간 장내의 마이크로바이옴을 분석하고 이를 건강 증진에 활용하고 있다. 일례로서 만성 염증성 장질환을 가지고 있는 환자들에게 마이크로바이옴을 기반으로 한 치료 전략이 활용되고 있는데, 이를 원리와 함께 설명하시오. [10점]

정답: 염증성 장질환을 가지고 있는 환자들의 마이크로바이옴을 분석하여, 유익균 및 유해균의 양상을 분석해볼 수 있고, 유해균 억제를 하기 위하여 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 복용을 권유한다. 또한 건강한 사람의 미생물 군총을 이식하는 분변미생물이식 (Fecal Microbiota Transplantation) 또한 치료 방법으로 사용되고 있다.

[5] 미생물은 산소의 유무에 따라 호흡과 발효과정이 조절된다. 이와 관련하여 올바른 표현에는 “○”, 틀린 표현에는 “×” 표시하시오. [각 3점, 총 30점]

[5-1] 호기성 호흡은 산소를 최종 전자수용체로 사용한다. (O)

[5-2] 협기성 호흡은 산소가 전혀 없는 조건에서만 일어난다. (X) – 질산염, 황산염 등을 전자수용체로 사용 가능.

[5-3] 발효는 전자전달계를 거치지 않고 ATP를 생성한다. (O)

[5-4] 발효에서는 기질수준 인산화(substrate-level phosphorylation)가 ATP 생성의 주된 경로이다. (O)

[5-5] 일부 미생물은 산소가 있을 때 발효를, 없을 때 호흡을 수행한다. (X)

[5-6] 호기성 호흡은 발효보다 ATP 생성 효율이 높다. (O)

[5-7] 발효의 최종 산물은 항상 에탄올과 CO<sub>2</sub>이다. (X) – 젖산, 혼합산, 부티르산 등 다양함.

[5-8] 발효를 수행하는 미생물은 항상 산소에 민감하게 죽는다. (X) – 통성혐기성 미생물은 산소 존재하에서도 생존 가능.

[5-9] 발효 과정에서는 NADH가 전자전달계를 거쳐 산화된다. (X) – 발효에서는 유기 분자가 전자수용체로 작용.

[5-10] 일부 미생물은 동일한 기질에서 호기·협기 조건에 따라 서로 다른 발효 산물을 만든다. (O) – 대사 경로 선택이 환경에 따라 다름.

**End of Document**

---