
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

Peperiksaan Semester Pertama
Sidang Akademik 2008/2009

November 2008

IMG 315 – Bioteknologi Makanan
[Food Biotechnology]

Masa: 3 jam
[Duration: 3 hours]

Sila pastikan bahawa kertas peperiksaan ini mengandungi EMPAT BELAS muka surat yang bercetak sebelum anda memulakan peperiksaan ini.

Jawab LIMA daripada lapan soalan. Semua soalan boleh dijawab dalam Bahasa Malaysia ATAU Bahasa Inggeris.

Sila baca arahan berikut:

1. Kertas peperiksaan ini mengandungi 4 bahagian (Bahagian A, B, C dan D)
2. Jawab SEMUA BAHAGIAN soalan Bahagian A
3. Jawab DUA (2) soalan Bahagian B
4. Jawab SATU (1) soalan Bahagian C dan
5. Jawab SATU (1) soalan Bahagian D.

[Please check that this examination paper consists of FOURTEEN pages of printed material before you begin the examination.

Answer FIVE out of eight questions. All questions can be answered either in Bahasa Malaysia OR English.]

[Please read the following instructions:

1. *This examination paper consists of 4 parts (Part A, B, C and D)*
2. *Answer ALL PARTS OF question in Part A*
3. *Answer TWO(2) questions in Part B*
4. *Answer ONE(1) question in Part C and*
5. *Answer ONE(1) question in Part D.]*

...2/-

BAHAGIAN A. Jawab soalan berikut.

1. Tulis catatan-catatan ringkas mengenai perkara berikut:
 - (a) Enzim-enzim yang digunakan dalam manipulasi molekul DNA. (5 markah)
 - (b) Kriteria pemilihan proses perolehan produk fermentasi. (5 markah)
 - (c) Turbidostat. (5 markah)
 - (d) "salting-in" dan "salting-out" bagi protein. (5 markah)

BAHAGIAN B. Jawab DUA soalan sahaja.

2. Jawab kedua-dua bahagian soalan ini.
- (a) Tulis satu karangan berkenaan pembangunan, jenis-jenis, prinsip operasi dan kegunaan bioreaktor/fermentor.
(12 markah)
- (b) Lukiskan gambarajah bioreaktor dan labelkan bahagian penting. Nyatakan fungsi setiap bahagian tersebut.
(8 markah)
3. Dengan menggunakan contoh yang sesuai, bincangkan bagaimana prinsip bioteknologi dapat diaplikasi untuk meningkatkan proses penghasilan makanan terfermen tempatan.
(20 markah)
4. Jawab semua bahagian soalan ini.
- (a) Jadual 1 (dilampirkan) menunjukkan nilai Del untuk spora *Bacillus stearothermophilus* semasa proses pemanasan untuk pensterilan. Andaikan kemusnahan spora hanya berlaku pada suhu melebihi 100 °C dan kitaran proses pemanasan dan penyejukan adalah linear. Untuk medium yang diguna yang mengandungi bilangan sel sebanyak 10^{12} , nilai Del keseluruhan proses ialah 35.5. Kirakan masa penahanan (holding time) pada suhu 121 °C untuk satu proses pensterilan yang mana medium tersebut telah dipanaskan dari 100 °C ke 121 °C dalam masa 25 minit dan disejukkan dari 121 °C ke 100 °C dalam masa 15 minit.
(7 markah)
- (b) Sekiranya operasi tersebut dibesarkan daripada 1000 dm³ kepada 10000 dm³ dengan menggunakan medium yang sama, apakah nilai Del yang baru?
(3 markah)
- (c) Huraikan berkenaan pensterilan selanjur yang digunakan untuk pengolahan medium fermentasi.
(10 markah)

BAHAGIAN C. Jawab SATU soalan sahaja.

5. Anda sedang menyediakan satu prosedur penulenan enzim (protokol I). Protokol I kemudian telah dimodifikasikan dan dua prosedur lain telah disediakan (protokol II dan III) bagi penulenan enzim tersebut. Berikut adalah ketiga-tiga protokol yang telah disediakan.

Protokol I: Langkah pertama melibatkan pemendakan dengan 40 % larutan tepu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Protein termendak ditulenan seterusnya melalui kromatografi penukaran anion (menggunakan DEAE). Larutan tampan awal yang digunakan ialah pH 7.0 dan protein tidak terikat kepada turus. Fraksi yang terelut dari turus (fraksi yang tidak terikat kepada turus) telah dilakukan penumpuan isoelektrik keatasnya dalam julat pH 8-10. Fraksi pada pH 9.7 mengandungi enzim tersebut.

Protokol II: Protokol I telah diubahsuai dengan menjalankan kromatografi menggunakan DEAE pada pH 9.0 dan fraksi yang terelut daripada turus dikumpulkan.

Protokol III: Protokol I diubahsuai kepada kromatografi penukaran kation menggunakan selulosa karboksil metil, CM. Enzim terikat kepada turus CM dan dielut keluar dengan penambahan larutan NaCl dengan gradien kepekatan 0 - 0.5 M.

Dalam kedua protokol II dan III, teknik penumpuan isoelektrik tidak digunakan. Keputusan skema penulenan diberikan dalam Jadual 2. Lengkapkan jadual tersebut dan jawab soalan-soalan berikut.

- (a) Kirakan aktiviti spesifik, tahap penulenan dan % hasil enzim tersebut pada setiap langkah berbanding dengan bahan permulaan dan lengkapkan nilai-nilai pada tempat yang sesuai (A, B, C,...DD) pada jadual tersebut bagi protokol I, II dan III. Tunjukkan kiraan anda.
- (b) Didapati protokol II & III adalah lebih baik daripada protokol I. Apakah faktor-faktor yang harus difikirkan apabila hendak memilih protokol II atau III?
- (c) Apakah maklumat pada protokol I yang menyebabkan modifikasi kepada prosidur, iaitu penukaran kepada penggunaan kromatografi penukaran kation seperti dilakukan dalam protokol III?
- (d) Kenapa dengan mengubah daripada pH 7.0 ke pH 9.0 dalam protokol II memberikan tahap penulenan lebih baik pada peringkat kromatografi DEAE?

- (e) Jika protein tersebut adalah 0.1 % daripada bahan permulaan, apakah peratusan protein yang dikehendaki daripada protein total di dalam langkah akhir Protokol I, iaitu apakah tahap ketulenan protein yang anda dapati? Bagaimana anda boleh tentukan ini?
- (f) Terangkan prinsip pemendakan berperingkat dengan amonium sulfat.

Jadual 2

<u>Langkah anda (Protokol I)</u>	Pemulihan total		Aktiviti Spesifik	Tahap Penulenan	% Hasil
	Protein (mg)	Enzim (unit)			
Ekstrak sel kasar	511	4200	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
Pemendakan dengan larutan tepu 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	181	3991	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>
Fraksi yang terelut daripada teknik turus DEAE, pH 7.0	67.6	3787	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>I</u>
Penumpuan Isoelektrik (pH 9.7)	3.8	2949	<u>J</u>	<u>K</u>	<u>L</u>

<u>Protokol II</u>	Protein (mg)	Enzim (unit)	Aktiviti spesifik	Tahap penulenan	% Hasil
Ekstrak sel kasar	714	5880	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>O</u>
Pemendakan dengan larutan tepu 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	253	5584	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>
Fraksi yang terelut daripada teknik turus DEAE, pH 9.0	5.1	5174	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>U</u>

<u>Protokol III</u>	Protein (mg)	Enzim (unit)	Aktiviti spesifik	Tahap penulenan	% Hasil
Ekstrak sel kasar	410	3360	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>X</u>
Pemendakan dengan larutan tepu 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	146	3192	<u>Y</u>	<u>Z</u>	<u>AA</u>
CM, pH 7.0, gradien NaCl	1.9	2516	<u>BB</u>	<u>CC</u>	<u>DD</u>

6. Jawab kedua bahagian soalan ini.

(a) Terangkan bagaimana faktor-faktor yang mempengaruhi sifat keterlarutan sesuatu protein globul dapat digunakan dalam langkah penulenan enzim?

(8 markah)

(b) Bincangkan kegunaan (i) α -amylase dan (ii) invertase. Bagi setiap enzim bincangkan aplikasinya dalam dua operasi pemprosesan makanan.

(12 markah)

BAHAGIAN D. Jawab SATU soalan sahaja.

7. Jawab semua bahagian soalan ini.
- (a) Apakah pengklonan gen? (3 markah)
 - (b) Mengapakah pengklonan gen penting? (5 markah)
 - (c) Jelaskan langkah-langkah asas dalam eksperimen pengklonan gen? (12 markah)
8. Jawab semua bahagian soalan ini.
- (a) Apakah makanan terubah-suai genetik? (3 markah)
 - (b) Bagaimanakah rekombinan dikenalpasti? (5 markah)
 - (c) Jelaskan kaedah Tindakbalas Rantaian Polimerase (PCR) dalam penentuan makanan terubah-suai genetik. (12 markah)

PART A. Answer the following question.

1. Write short notes on the following parts of the question.

(a) Enzymes used in manipulation of a DNA molecule. (5 marks)

(b) Criteria for the choice of recovery process of fermentation products. (5 marks)

(c) Turbidostat. (5 marks)

(d) "salting-in" and "salting-out" of protein. (5 marks)

PART B. Answer TWO questions only.

2. Answer both parts of this question.
- (a) Write an essay on the development, types, operating principles and use of bioreactors/ fermenters.
(12 marks)
- (b) Draw a diagram of a bioreactor and label the important parts. State the functions of each of those parts.
(8 marks)
3. Using appropriate examples, discuss how the principles of biotechnology can be applied to improve the production process of local fermented food.
(20 marks)
4. Answer all parts of this question.
- (a) Table 1 (Appended) shows the Del values for *Bacillus stearothermophilus* spores during the heating process for sterilization. Assume that the spore destruction only occurs at temperatures beyond 100 °C and that the heating and cooling cycle is linear. For a medium containing 10^{12} cells that was used, the overall Del value was 35.5. Calculate the holding time at 121 °C for the sterilization process where the medium has been heated from 100 °C to 121 °C in 25 minutes and cooled from 121 °C to 100 °C in 15 minutes.
(7 marks)
- (b) If the operation was scaled up from 1000 dm³ to 10000 dm³ using the same medium, what is the new Del value?
(3 marks)
- (c) Explain continuous sterilization used for treatment of fermentation medium.
(10 marks)

PART C. Answer ONE question only.

5. You are developing a purification scheme for an enzyme (protocol I). Protocol I was then modified and two other procedures were prepared (Protocol II and III) for the purification of the enzyme. The following are the 3 protocols prepared.

Protocol I: The first step involves precipitation with 40% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The precipitated protein is purified further through anion exchange chromatography (using DEAE). The starting buffer used is pH 7.0 and the protein does not bind to the column. The flow-through fraction (the fraction that does not bind) was then subjected to preparative isoelectric focusing using pH range of 8-10. The fraction at pH 9.7 contained the enzyme.

Protocol II: Protocol I was modified by running the chromatography using DEAE column at pH 9.0 instead, and the collected flow-through fraction was collected.

Protocol III: Protocol I was modified to cation exchange chromatography using carboxyl methyl cellulose, CM. The enzyme bound to the CM column and was eluted with 0 – 0.5 M NaCl gradient.

In both protocols II and III, isoelectric focusing was not performed. The results of the three purification schemes are given in the Table 2 below. Complete the table and answer these questions.

- (a) Calculate the specific activity, fold purification and the % yield for each step as compared to the initial starting material, and fill in the values in the appropriate places (i.e. A, B, C, ...through DD) in the table for protocols I, II and III). Show your calculations.
- (b) You realize that protocols II & III are better than protocol I. What factors would you consider in choosing between protocol II and protocol III?
- (c) What information in protocol I prompted a modification to the procedure i.e. to switch to cation exchange chromatography as performed in protocol III?
- (d) Why did switching the pH from 7.0 to 9.0 in protocol II result in a better fold-purification at the DEAE chromatography step?

- (e) *If your protein is approximately 0.1 % of the initial starting material, what percentage of the total protein in the last purification step in protocol I is probably your protein. In other words, how pure is your protein? How could you assess this?*
- (f) *Explain the principles of fractionation by precipitation with ammonium sulfate.*

Table 2:

<u>Your steps (Protocol I)</u>	Total recovery		Specific activity	Fold-purified	% Yield
	Protein (mg)	Enzyme (units)			
Crude cell extract	511	4200	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
40% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	181	3991	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>
DEAE flow through, pH 7.0	67.6	3787	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>I</u>
Isoelectric focusing (pH 9.7)	3.8	2949	<u>J</u>	<u>K</u>	<u>L</u>
<hr/>					
<u>Protocol II</u>	Total recovery		Specific activity	Fold-purified	% Yield
	Protein (mg)	Enzyme (units)			
Crude cell extract	714	5880	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>O</u>
40% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	253	5584	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>
DEAE flow through, pH 9.0	5.1	5174	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>U</u>
<hr/>					
<u>Protocol III</u>	Total recovery		Specific activity	Fold-purified	% Yield
	Protein (mg)	Enzyme (units)			
Crude cell extract	410	3360	V	W	X
40% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	146	3192	Y	Z	AA
CM, pH 7.0, NaCl gradient	1.9	2516	BB	CC	DD

6. *Answer both parts of this question.*
- (a) *Explain how factors that influence the solubility of a globular protein could be used in enzyme purification steps.*
(8 marks)
- (b) *Discuss the applications of (i) α -amylase and (ii) invertase. For each enzyme discuss its application in 2 food process operations.*
(12 marks)

PART D. Answer ONE question only.

7. Answer all parts of this question.

(a) What is gene cloning? (3 marks)

(b) Why is gene cloning important? (5 marks)

(c) Explain the fundamental steps in a gene cloning experiment? (12 marks)

8. Answer all parts of this question.

(a) What is genetically modified food? (3 marks)

(b) How are recombinants identified? (5 marks)

(c) Explain Polymerase Chain Reaction (PCR) method in determining genetically modified food. (12 marks)

Lampiran/Appendix

Jadual 1. (Table 1) Del values for *B. stearothermophilus* spores for the heating-up period over a temperature range of 100 to 128 °C, assuming a rate of temperature change of 1min-1 and negligible spore destruction at temperatures below 100 °C (Richards,1968)

T °C	k min-1	Del
100	0.019	-
101	0.025	0.044
102	0.032	0.076
103	0.040	0.116
104	0.051	0.168
105	0.065	0.233
106	0.083	0.316
107	0.105	0.420
108	0.133	0.553
109	0.168	0.720
110	0.212	0.932
111	0.267	1.199
112	0.336	1.535
113	0.423	1.957
114	0.531	2.488
115	0.666	3.154
116	0.835	3.989
117	1.045	5.034
118	1.307	6.341
119	1.633	7.973
120	2.037	10.010
121	2.538	12.549
122	3.160	15.708
123	3.929	19.638
124	4.881	24.518
125	6.056	30.574
126	7.506	38.080
127	9.263	47.373
128	11.494	58.867