**АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ И СДАЧИ ЭКЗАМЕНА ПО ДИСЦИПЛИНЕ «БИОТЕХНОЛОГИЯ», специальность «Фармация»**

Экзамен по дисциплине « Биотехнология» проводится **в письменной форме.**

Для написания письменных ответов представляется **3 астрономических часа** времени. Ответы должны быть подробно изложены в рамках обозначенных вопросов.

По истечении выделенного времени работы сдаются преподавателю.

**Структура билета** включает 4 вопроса, из них 3 теоретических и 1 вопрос в виде ситуационной задачи. **Каждый вопрос оценивается в 25 баллов** при полном изложении ответов на поставленные вопросы, что равнозначно 100%.

<17 баллов-неудовлетворительно (менее 70%)

18-19 баллов-удовлетворительно (70%)

20-22 баллов-хорошо (80%)

23-25 баллов-отлично (90-100 %)

**Образец ответа на билет №1.**

 **Образец билета**

**ФГБОУ ВО КАЗАНСКИЙ ГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ**

**Институт фармации**

**Специальность 33.05.01 Фармация**

**Биотехнология**

**Экзаменационный билет №**

1.Биотехнология как наука и сфера производства. Краткая история развития биотехнологии. Связь биотехнологии с фундаментальными дисциплинами. (25б)

2.Рекомбинантные продуценты биологически активных веществ. Трансгенные растения и животные.(25б)

3.Биоконверсия (биотрансформация) как метод получения биологически активных веществ. Ферментные препараты как биокатализаторы в фармацевтической промышленности.(25б)

4. Дайте название оборудованию, назначение, принцип действия(25б.)



**Зам. директора по образовательной деятельности, проф. Егорова С.Н.**

 **Алгоритм ответа**

**1.Биотехнология как наука и сфера производства. Краткая история развития биотехнологии. Связь биотехнологии с фундаментальными дисциплинами. (25б)**

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент  | Содержание ответа |
| Определение биотехнологии как науки | Биотехнология- дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методами генной и клеточной инженерии. |
| Связь биотехнологии с другими фундаментальными науками | Науки, с которыми биотехнология находится в тесной связи: генетика, молекулярная биология, химия, биохимия, микробиология, эмбриология, клеточная биология, физиология, вирусология и др. |
| Основные научные открытия, обеспечивающие развитие биотехнологии: | 1. доказательства роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственной информации;2.расшифровка универсального для всех живых организмов генетического кода;3. совершенствование существовавших и разработка новых технологий культивирования микроорганизмов, клеток растений и животных;4.открытие различных классов ферментов;5.разработка технологий ДНК. |
| Исторические периоды развития биотехнологии: | Допастеровский период (до 1865г.)-использование спиртового и молочнокислого брожения для получения пива и вина, производства хлеба и сыра.Послепастеровский период(1866-1940гг.)-производство этанола, бутанола, ацетона, глицерола, органических кислот, вакцин, кормовых дрожжей. Аэробная очистка канализационных вод.Период антибиотиков (1941-1960гг.)-производство пенициллина и других антибиотиков путем глубинной ферментации, культивирование растительных клеток, получение вирусных вакцин.Период управляемого синтеза (1961-1975гг.)-производство аминокислот с помощью микробных мутантов, получение чистых ферментов, использование иммобилизованных ферментов и клеток, анаэробная очистка сточных вод, производство бактериальных полисахаридов.Период новой биотехнологии (после 1975г.)-использование генной и клеточной инженерии в целях получения агентов биосинтеза, получение моноклональных антител. |
| Современная биотехнология, составные части  | 1. молекулярная биотехнология, включающая клеточную и генетическую инженерию, призванная создавать новые высокопродуктивные формы организмов, пригодные для использования в промышленных условиях и разрабатывать эффективные методы культивирования микроорганизмов, грибов, клеток и тканей растений и животных;2. индустриальная биотехнология-это использование биотехнологий в различных отраслях экономики |
| Современная классификация | В настоящее время биотехнология является междисциплинарной наукой и её подразделяют на:- зелёную биотехнологию ‒ растения;- голубую биотехнологию ‒ морские и пресноводные микроорганизмы;- красную биотехнологию ‒ человек и животные;- серую биотехнологию ‒ природная биотехнология;- белую биотехнологию ‒ промышленное использование ферментов.-коричневая биотехнология-управление пустынями и засушливыми регионамиЗолотая биотехнология-биоинформатика, нанобиотехнологияФиолетовая биотехнология-правовые, этические, философские аспекты применения биотехнологииЧерная биотехнология-биооружие, биотерроризм |

**2. Рекомбинантные продуценты биологически активных веществ. Трансгенные растения и животные.**

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент  | Содержание ответа |
| Понятие генная (генетическая) инженерия:  | Технология по соединению in vitro фрагментов ДНК с последующим введением рекомбинантных (новых)структур в живую клетку. Этим методом получают сверхпродуценты рекомбинантных соединений в биотехнологии лекарственных средств, создают трансгенные растения и трансгенных животных, а также разрабатывают приемы генной терапии наследственных заболеваний. |
| Стадии технологии рекомбинантной ДНК  | 1. Получение клонируемого гена: из организма –донора нужных генов экстрагируют нативную ДНК(клонируемая ДНК, встраиваемая ДНК,ДНК-мишень,чужеродная ДНК) и подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают)2.Введение клонируемого вектора в вектор: клонируемую ДНК соединяют (лигируют,сшивают) с другой ДНК (клонирующий вектор) с образованием рекомбинантной (химерной)ДНК;3. Перенос рекомбинантной ДНК в реципиентную клетку: рекомбинантную ДНК вводят в компетентные прокариотические или эукариотические клетки(клетка-хозяин или клетка реципиент), где она реплицируется и передается потомкам;4. Идентификация клеток-реципиентов, содержащих рекомбинантную ДНК.Применяя методы идентифицируют и отбирают клоны клеток, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки)5. Получение клонируемого белка: получают специфический белковый продукт, синтезированный трансформированными клетками, что служит подтверждением клонирования нужного гена. |
| Определение понятия трансгенные растения и животные | Трансгенные растения и трансгенные животные- это организмы, геном которого содержит чужеродный генетический материал, передаваемый в ряду поколений. |
| Трансгенные животные | Трансгенез у животных основан на введении клонированного гена в ядро оплодотворенной яйцеклетки с последующей инплантацией в реципиентную женскую особь.Далее отбирают потомков, развившихся из имплантированных клеток, которые содержать клонированный ген во всех клетках и получают генетическую линию. Этот процесс длительный, экспериментальный. Генетические модификации животных позволяют получать модельные системы для изучения механизма возникновения рака, муковисцидоза, болезни Альцгеймера и других наследственных заболеваний человека, получать с молоком трансгенных животных аутентичные белки человека.  |
| Трансгенные растения | Признаки трансгенных растений: устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды, способность синтезировать инсектициды.устойчивость к вирусным инфекциям, изменение условий созревания плодов, изменение окраски цветков, измененный вкус плодов, повышенная пищевая ценность семян, способность к синтезу антител. |
| Пример механизма. Растения устойчивые к насекомым -вредителям | Основано на экспрессии гена инсектицидного протоксина, продуцируемого бактериями Bacillus thuringiensis.Протоксин попадает в кишечник насекомых, расщепляется под действием протеаз до активного токсина, приводящего к гибели вредителей.  |

**3.Биоконверсия (биотрансформация) как метод получения биологически активных веществ. Ферментные препараты как биокатализаторы в фармацевтической промышленности.(25б)**

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент  | Содержание ответа |
| Определение биотрансформации | Биотрансформация-процесс превращения веществ с помощью микроорганизмов в определенные продукты с ценными практическими свойствами. |
| Сущность метода | Метод использует ферменты, локализованные в клетке и способные менять функциональные группы добавленных извне химических соединений. |
| Пример применения метода | Примером является использование метода для превращения дигитоксина в дигоксин, клетками Digitalis tanata. При экстрагировании из массы плантационно- выращенных растений выделяется в основном дигитоксин.Недифференцированные культуры клеток Digitalis lanata из-за изменения характера питания с фотоавтотрофного на хемогетеротрофный , не образует сердечных гликозидов, но могут осуществлять определенные реакции биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду. Биотрансформация дигитоксина в дигоксин происходит в результате реакции 12-гидроксилирования, катализируемой ферментом клеток Digitalis lanata. |
| Ферменты-катализаторы | В реакциях биотрансформации и биокатализа биологическим объектом являются ферменты и мультиферментные комплексы, выделенные из состава биологических систем или находящихся внутри клеток, искусственно лишенных способности расти. |
| Свойства ферментов как катализаторов биологического происхождения: | Высокая активностьСпецифичность(селективность)действияРегулируемая активность а зависимости от условий средыКатализ реакций в «мягких»условияхЗависимость скорости реакций от количества фермента |

**4. Дайте название оборудованию, назначение, принцип действия(25б.)**

****

На схеме изображена установка непрерывной стерилизации питательной среды, состоящий из 1-приемник концентрата питательной среды, 2-фильтр для отделения комков среды, 3-насос, 4-паровой инжектор, 5-выдерживатель трубчатого типа, свернутый в виде плоской спирали, 6-теплообменник.

В промышленных условиях питательные среды обычно готовят в отдельных цехах предприятия в емкостях, снабженных механическими мешалками, добавляя в определенной последовательности компоненты. В случае необходимости отдельные компоненты подвергают дополнительной обработке: измельчению, просеиванию, отвариванию, экстрагированию. Среду прогревают до температуры 70-80 °С острым паром. Для надежности стерилизации твердые частицы нерастворимых компонентов должны быть достаточно мелкими, так как крупные частицы медленно прогреваются и повышается вероятность сохранения в них посторонней микрофлоры, особенно при непрерывной стерилизации. Приготовленную питательную среду стерилизуют в установках непрерывной стерилизации. Цикл периодической стерилизации состоит из трех стадий: нагревание, выдерживание при температуре 121°С, охлаждение.

В непрерывном режиме используется система с прямой инжекцией сверхчистого пара, системы с косвенным нагреванием с помощью теплообменников и обе системы работают при давлении выше атмосферного.

**Образец ответа на билет №2.**

**ФГБОУ ВО КАЗАНСКИЙ ГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ**

**Институт фармации**

**Специальность 33.05.01 Фармация**

**Биотехнология**

**Экзаменационный билет №23**

1.Особенности требований GMP к биотехнологическому производству. Правила GMP применительно к производству бета-лактамных антибиотиков. Причины проведения валидации при замене штаммов-продуцентов и изменении составов ферментационных сред. (25б)

2. Методы выделения внутриклеточных продуктов. Разрушение клеточной стенки (дезинтеграция клеток)биообъектов и экстрагирование целевых продуктов из биомассы. Шнековый экстрактор.(25б)

3. Биореакторы для процессов с использованием иммобилизованных биокатализаторов.(25б)

4. Может ли недобросовестная утилизация отходов биотехнологического производства ЛС нанести существенный вред экологии? Какова схема утилизации жидких отходов?(25б.)

**Зам. директора по образовательной**

**деятельности, профессор Егорова С.Н.**

**Алгоритм ответа**

1.Особенности требований GMP к биотехнологическому производству. Правила GMP применительно к производству бета-лактамных антибиотиков. Причины проведения валидации при замене штаммов-продуцентов и изменении составов ферментационных сред. (25б)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Правила GMP | Требования к регламенту производства ЛС, обеспечивающему высокую культуру работы на предприятии в отношении выпускаемых ЛС. |
| Особенности требований к биопроизводству антибиотиков | Учитывая аллергенность беталактамных структур рекомендуется производственные процессы связанные с производством пенициллина и его производных вести в отдельных помещениях.Пенициллин по сравнению со многими другими выпускаемыми промышленностью антибиотиками мало токсичен. Однако по сравнению с другими аллергенность проявляется при исключительно малых концентрациях вещества, поэтому попадание микроколичества пенициллина в другие продукты могут вызвать нежелательные последствия, поэтому используются отдельные емкости, трубопроводы.  |
| Валидация | Оценка и документированное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям.Повторная валидация проводится при частичном изменений технологии существующего процесса.Отличие биопроцесса от от химико-технологического производства в том, что проводится повторная валидация при замене штамма , так как несмотря на рентабельность штамма и его высокую активность могут происходить изменения в его метаболизме, что может приводить к сдвигам в наборе и концентрации ряда метаболитов у продуцента.Повторная валидация проводится и при замене ферментационной среды. |

2. Методы выделения внутриклеточных продуктов. Разрушение клеточной стенки (дезинтеграция клеток) биообъектов и экстрагирование целевых продуктов из биомассы. Шнековый экстрактор.(25б)

|  |  |
| --- | --- |
| Причины необходимости разрушения клеточной стенкиМетоды разрушения | *При локализации продукта внутри клеток* их разрушают, удаляют клеточные обрывки и выделяют продукты из осветленной среды; секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды.Применяют разнообразные *методы для разрушения клеточной стенки в зависимости от объекта.*Клеточные стенки микроорганизмов состоят из разных полимеров, и универсального метода их разрушения не существует. *У грамположительных микроорганизмов* клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N-ацетилглюкозамина и остатков N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных пептидными мостиками. *У грамотрицательных бактерий*клеточная стенка тоньше и покрыта снаружи слоем липидов. *Стенка дрожжевых клеток* состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннатов и бета глюканов.*Низшие грибы* имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из альфа и бета глюканов, гликопротеидов,хитина.*Методы разрушения :*1.Химический метод разрушения клеточных стенок - обработка щелочью.2.Основной биохимический метод разрушения- лизис с помощью ферментов.3.Физические методы: *немеханические способы* (осмотический шок, многократное замораживание -оттаивание); *механические* (обработка ультразвуком,соударением , гомогенизация под давлением). При большом количестве клеток используют *баллистическую дезинтеграцию* в высокоскоростных шаровых мельницах, куда помещают концентрированную суспензию клеток. *Соударение*- клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность, в месте соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки.4.Экструзионные методы (продавливание суспензии клеток через капиллярные отверстия)используются для обработки жидких или замороженных суспензий клеток.После разрушения клеток осколки удаляют низкоскоростным *центрифугированием* или *микрофильтрацией* через мембрану. Белковый продукт выделяют из лизата методом *высаливания-осаждением* высококонцентрированными растворами нейтральных солей, чаще всего натрия или аммония сульфатом. *Седиментация* белка может быть достигнута органическими растворителями (этанолом,ацетоном). |
| Шнековый экстрактор  | Все конструкции экстракторов отличаются транспортирующими средст, в качестве которых обычно используют шнеки или перфорированные диски, закрепленные на бесконечной цепи. Среди вертикальных аппаратов используется шнековый экстракторГильдебранта. Состоит из двух вертикальных и одной соединительной горизонтальной колонн, внутри которых расположены перфорированные шнеки.Скорость вращения шнеков каждой из колонн различается и увеличивается по ходу твердой фазы в отношениях 1:2:3(для предотвращения образования уплотнений материала в корпусе экстрактора). Каждая колонна представляет стальной цилиндр.Загрузочная и экстракционная колонны имеют паровые рубашки. Внутри каждой колонны расположены шнековые валы с перфорированными перьями с диаметром отверстий 5 мм. Для избежания проворачивания материала шнеками по длине колонны приварены 6 прямоугольных планок. Загрузочная колонна в верхней части имеет фильтр для выходящего извлечения. В верхней части экстракционной колонны установлен двухлопастной сбрасыватель шрота, вращающийся в направлении обратном направлению шнека и в 3 раза быстрее. Удаление материала из колонны проводят через специальный хобот. Растворитель подают через сопло, расположенное в верхней части экстракционной колонны, ниже сбрасывателя шрота.Шнеки вращаются с различной скоростью |

3. Биореакторы для процессов с использованием иммобилизованных биокатализаторов.(25б)

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент ответа | Содержание ответа |
| Биореактор  | Иммобилизованные биокаталитические системы функционируют в биореакторе в виде неподвижной фазы через которую протекает среда с субстратом, подлежащим биоконверсии. |
| Типы биореакторов | 1.Биореактор с циркуляционным перемешиванием и насадкой позволяет обеспечивать максимально плотную упаковку иммобилизованного биокатализатора в виде гранул. Таким способом повышают концентрацию биообъекта в реакторе, что влечет за собой выход целевого продукта. Недостатки: недостаточное эффективное перемешивание что приводит к образованию нежелательных температурных перепадов и градиентов рН в объеме реактора; затруднение с удалением углерода и других газообразных продуктов, которые поднимаясь в верхнюю часть биореактора разрушают гранулы с иммобилизованным ферментом2. Биореактор с механической мешалкой.Для улучшения перемешивания и газообмена биореактор снабжают механической мешалкой.Недостатки: повышенные энергозатраты на работу мешалки и возможность разрушения гранул;3. Биореактор «корзиночного типа» предохраняет гранулы с биокатализатором от разрушения в процессе перемешивания.Это достигается за счет образования 2-х уровней иммобилизации: гранулы с биокатализатором фиксированы в ячейках проволочной сетки;4.Биореактор с полыми волокнами: для ферментов, иммобилизованных в волокна полимера5.Эрлифтный биореактор предназначен для иммобилизованных растительных клетокДля иммобилизованных целых клеток используют колоночные биореакторы, обеспечивающие эффективный отвод газов из реакционной среды, чем биореакторы для иммобилизованных индивидуальных ферментов. |

4. Может ли недобросовестная утилизация отходов биотехнологического производства ЛС нанести существенный вред экологии? Какова схема утилизации жидких отходов? (25б.)

Недобросовестная утилизация отходов биопроизводства наносит существенный вред экологии, что требует пристального внимания со стороны всех государственных органов.

Жидкие отходы – это культуральная жидкость после отделения от мицелия. Этапы утилизации:

1. механический этап позволяет осуществить предварительную очистку сточных вод и является этапом подготовки к поступлению их на очистные сооружения для дальнейшей очистки. Используются решетки, ловушки позволяющие удалить твердые компоненты стоков. Их устанавливают перед отстойниками.

Биоочистка в железобетонных отстойниках. При этом удаляют 40% загрязнений. Осадок отсасывается в трубы, проложенные по дну отстойника. Вода отстаивается в специальном бассейне около 2-2,5 часов. Слизь,жиры собираются специальной машиной, тяжелый осадок оседает на дне , затем собирается скребком в метантеки. Тяжелый осадок -это органика.

2. этап-биологический метод очистки основан на способности микроорганизмов метаболизировать органические и минеральные загрязнения в аэробных и анаэробных условиях с образованием более простых низкомолекулярных продуктов разложения. Используются аэротенки и биофильтры. Аэрация в аэротенках. Происходит протекание окислительных процессов. При наличии активного ила образуются углекислый газ и вода. Активный ил состоит из нескольких десятков видов микроорганизмов: 70% относится к роду Pseudamonas 20 % к роду Bacterium, 10% к роду Bacillus

Блок доочистки – иммобилизация клеток биопленками.При увеличении нагрузки по очистке сточных вод могут добавляться деструкторы, увеличивающие пропускную способность системы очистки жидких отходов.

При аэробной очистке добавляют бактериальные закваски: Фенобак для углеводородов, Полибак для синтетических детергентов.