

VIII EDYCJA KONKURSU BIOTECHNOLOGICZNEGO ZADANIA NA I ETAP

ISTOTNE INFORMACJE (przeczytaj uważnie):

1. Rozwiązania zadań należy przesłać zarówno w formie elektronicznej jak i papierowej.
 - a) w formie elektronicznej - w formacie pdf na adres: konkurs.biotechnologiczny@pw.edu.pl.
 - b) W formie papierowej - uporządkuj kartki (treść zadania 1 + odpowiedź, treść zadania 2 + odpowiedź, itd.) – prosimy, abyś zrobił(a) to tak, aby każde zadanie wraz z odpowiedzią było oddzielnym pakietem (będziemy wdzięczni za spięcie ze sobą kartek przynależących do jednego zadania - bardzo ułatwi nam to sprawdzanie; na odpowiedź możesz wykorzystać też puste miejsce za zadaniem). Włóż do koperty i wyślij pocztą na adres:

**Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3
00-664 Warszawa
Z dopiskiem: KONKURS BIOTECHNOLOGICZNY**

2. Obie wersje, papierowa i elektroniczna, muszą być tożsame. Jeśli wszystkie odpowiedzi umieszczasz w tym pliku pdf (link do Acrobat Reader: <https://get.adobe.com/reader/>), to wydrukuj go do wysłania pocztą. Jeśli wydrukujesz ten plik i ręcznie udzielisz odpowiedzi (np. wypełniając tabele, czy pisząc odpowiedź na oddzielnej kartce), to zeskanuj wszystkie kartki do wysłania e-mailem biorąc pod uwagę punkt **1b**. Możesz również zastosować tryb mieszany udzielania odpowiedzi, tzn. np. odręcznie uzupełnić tabele (czy też pisać w miejscach wykropkowanych) oraz dołączyć wydrukowane kartki A4 z odpowiedziami.
3. W nagłówku nad numerem każdego zadania umieść imię i nazwisko (jeśli treść zadania zajmuje więcej niż jedną stronę/kartkę to wystarczy tylko stronie/stronach nieparzystych).
4. Każda dodatkowa kartka zawierająca odpowiedź/rozwiązanie musi mieć na górze umieszczone imię i nazwisko uczestnika konkursu i numer zadania, którego dotyczy odpowiedź.
5. Odpowiedzi muszą być samodzielnie sformułowane. Procedura Kopiuj/Wklej jest niedopuszczalna. Pod każdym zadaniem podano przykładowe źródła wiedzy, zachęcamy jednak do szerszych poszukiwań.

Termin nadsyłania odpowiedzi (w obu formach): do **31.01.2025 r.** Liczy się data stempla pocztowego. **Nie zapomnij zarejestrować się najpóźniej do 31.01.2025 r. za pomocą formularza zgłoszeniowego VIII edycji, dostępnego na stronie Konkursu:**

<https://forms.office.com/Pages/ResponsePage.aspx?id=nCJQO3jNiEWbz5e3Yp4vD6RBLyIdu6BF1gQPnjQnKl5UMlpDOThYQ1hPTjZUVjBVNzNISEhWWVWk0WC4u>

Życzymy dobrej zabawy przy rozwiązywaniu zadań i sukcesu!!!

*Komitet Organizacyjny
VIII Konkursu Biotechnologicznego*

.....
Imię i nazwisko uczestnika VII KB

ZADANIE 1 (8 pkt)

7 października 2024 r. laureatami Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny lub fizjologii zostali Victor Ambros i Gary Ruvkun. Komitet Noblowski wyróżnił ich za odkrycie mikroRNA (miRNA) i jego roli w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Pomogło to zrozumieć rozwój chorób autoimmunologicznych, nowotworów czy cukrzycy. 18 lat wcześniej Andrew Fire i Craig Mello otrzymali tę nagrodę za badania nad zjawiskiem interferencji RNA u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Obecnie trwają intensywne badania nad wykorzystaniem tej regulacji ekspresji genów w terapiach rozmaitych chorób. Wyszukaj informacje na temat zjawiska interferencji RNA z udziałem miRNA i odpowiedz na pytania:

- I. (2 pkt) Jak i gdzie w komórce powstają i dojrzewają cząsteczki miRNA i jaka jest ich rola w komórce i organizmie?**
- II. (2 pkt) Przedstaw schematycznie ścieżkę interferencji RNA (RNAi) zachodzącą w cytoplazmie z udziałem miRNA i prowadzącą do wyciszenia genów.**
- III. (1 pkt) Podaj 2 mechanizmy wyciszania genów przez miRNA.**
- IV. (2 pkt) Jak można wykorzystać zjawisko interferencji RNA w medycynie? Podaj mechanizm działania leku opartego na miRNA, posługując się konkretnym przykładem.**
- V. (1 pkt) Podaj 4 wyzwania, według Ciebie najważniejsze, związane ze stosowaniem miRNA w terapiach.**

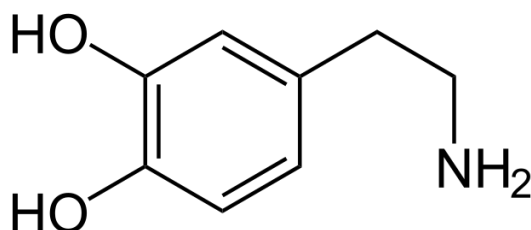
Przykładowe źródła wiedzy:

- Beata Biesaga (2007) Andrew Z. Fire i Craig C. Mello Nagroda Nobla 2006 w dziedzinie medycyny i fizjologii „Interferencja RNA – wyciszanie genów przez podwójnoniciowy RNA”. NOWOTWORY Journal of Oncology 57: 75-78
- Majorek K, Krzyżosiak WJ (2006) Rola mikroRNA w patogenezie, diagnostyce i terapii nowotworów. Współczesna Onkologia 10 (8): 359–366.
- Dexheimer PJ, Cochella L (2020) MicroRNAs: From Mechanism to Organism. Frontiers in Cell and Developmental Biology 8: 409, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>
- Lee JW. Et al. (2023) RNAi therapies: Expanding applications for extrahepatic diseases and overcoming delivery challenges. Advanced Drug Delivery Reviews 201: 11507, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.115073>

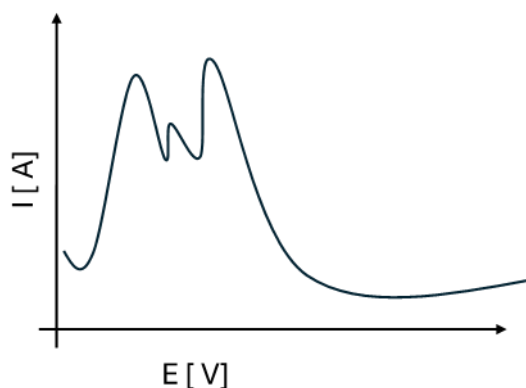
.....
Imię i nazwisko uczestnika VII KB

ZADANIE 2 (10 pkt)

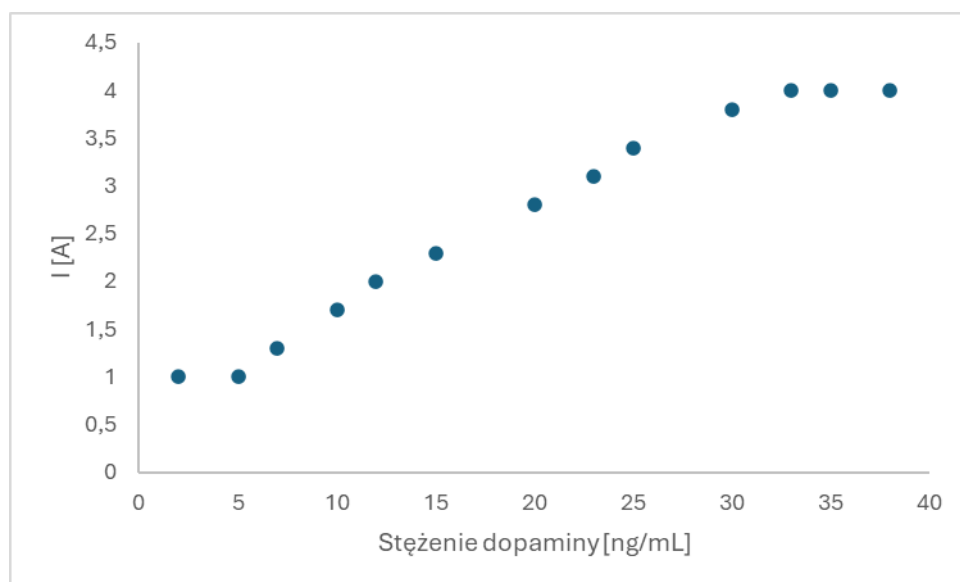
Jedną z cząsteczek pełniących istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego jest dopamina. Jest ona związkiem organicznym należącym do grupy katecholamin, a jej struktura została przedstawiona na poniższym rysunku. Należy podkreślić, że cząsteczka ta wykazuje właściwości elektroaktywne. Kontrolowanie poziomu dopaminy w organizmie ludzkim jest istotne ze względu na fakt, że ma ona wpływ na rozwój chorób takich jest ADHD, schizofrenia czy choroba Parkinsona. Wśród metod, które mogą być stosowane do wykrywania dopaminy znajdują się techniki elektrochemiczne - najczęściej prądowe, wykorzystujące elektrody złożone np. z materiałów węglowych bądź metalicznych, które często modyfikowane są warstwami złożonymi z cząsteczek kwasów nukleinowych.



- I. (2 pkt) Opisz w kilku zdaniach, jaką rolę biologiczną pełni dopamina w organizmie ludzkim.
- II. (3 pkt) Jako pracownik firmy biosensorowej otrzymałeś/otrzymałaś zadanie opracowania biosensora elektrochemicznego do wykrywania dopaminy. Firma zdecydowała się na zastosowanie elektrod złotych modyfikowanych aptamerami RNA (jednoniciowe RNA) o wysokiej selektywności wobec cząsteczek dopaminy. Cząsteczka aptameru w wyniku wiązania dopaminy zmienia swoją konformację, co pozwala na detekcję tej katecholaminy. W jaki sposób możliwe byłoby wykrycie dopaminy za pomocą elektrod modyfikowanych aptamerem i zastosowanie techniki prądowej – woltamperometrii fali prostokątnej? Czy sekwencja aptamerowa poza grupą disiarczkową na końcu 3' lub 5', która pozwala na jej unieruchomienie na powierzchni złotej elektrody, powinna zawierać dodatkową modyfikację? Narysuj schematycznie budowę biosensora i uzasadnij pisemnie swoją odpowiedź.
- III. (3 pkt) W wyniku analizy próbki krwi z wykorzystaniem elektrod modyfikowanych aptamerem otrzymano następujący woltamperogram (zależność prądu od potencjału). Jaka jest przyczyna powstania potrójnego pików prądowego? Czy na podstawie wykresu można określić stężenie dopaminy w próbce? Jakie zmiany można by wprowadzić w warstwie receptorowej biosensora, by poprawić jego działanie? Uzasadnij odpowiedź.



- IV. (2 pkt) Po wielu miesiącach pracy w laboratorium uzyskałeś krzywą kalibracji dla biosensora do wykrywania dopaminy, którą przedstawiono poniżej. W jakim zakresie ma ona charakter liniowy? Dlaczego przy wyższych stężeniach tzn. powyżej 33 ng/mL dochodzi do wypłaszczenia wykresu? Uzasadnij odpowiedź.



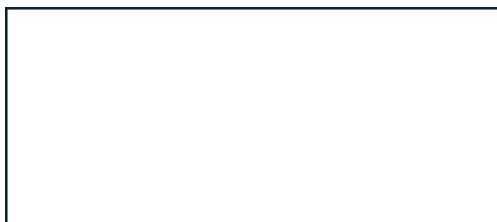
Przykładowe źródło wiedzy:

- Sensory chemiczne i biosensory, pod redakcją Zbigniewa Brzózki, Elżbiety Malinowskiej i Wojciecha Wróblewskiego, PWN, 2022

ZADANIE 3 (8 pkt)

Mikrofluidyka to dziedzina nauki zajmująca się badaniem i kontrolą przepływu płynów w bardzo małej skali. Dzięki temu jest kluczowa w rozwoju laboratoriów na chipie (ang. *lab-on-a-chip*), które umożliwiają przeprowadzanie skomplikowanych analiz chemicznych i biologicznych na bardzo małych próbkach. Technologia *lab-on-a-chip* znajduje szereg zastosowań w diagnostyce, badaniach nowych leków i wszelkiego rodzaju analizach. Jej uniwersalność wynika z dowolności tworzenia sieci kanalików i struktur umożliwiających przeprowadzanie różnych operacji jednostkowych np. mieszania, rozdzielania, detekcji, rozcieńczania.

- I. (1,5 pkt) Jednym z materiałów do tworzenia *lab-on-a-chip* jest polidimetylosiloksan (PDMS). Zapoznaj się z zaproponowaną literaturą i uzasadnij, dlaczego jest on dobrym materiałem do tworzenia modeli komórkowych. Podaj 3 argumenty.**
- II. (1,5 pkt) Zaprojektuj własny mikroukład przepływowy, w którym zawrzesz moduł rozcieńczający próbkę oraz moduł mieszający rozcieńczoną próbkę z odczynnikiem reakcji biochemicznej. Zaznacz miejsca wlotu i wylotu cieczy.**



- III. (2 pkt) Podaj 4 zalety wykorzystania w diagnostyce medycznej technologii *lab-on-a-chip*.**

Technologia *organ-on-a-chip* (OOC) to zaawansowane podejście, które pozwala na symulację struktury i funkcji ludzkich organów na mikroskopijnych chipach, które są zaprojektowane tak, aby jak najwierniej odwzorowywać środowisko fizjologiczne ludzkich organów. Dzięki temu możliwe jest przewidywanie reakcji organizmu na różne bodźce, w tym odpowiedzi na związki chemiczne i wpływ środowiska. Takie modele wykorzystuje się do porównywania skuteczności potencjalnych leków. Jednym z sposobów detekcji jest barwienie różnicowe modeli organów/hodowli jodkiem propidyny oraz kalceiną.

- IV. (2 pkt) Podaj molekularne podstawy wybarwienia kalceiną oraz jodkiem propidyny.**

- V. (1 pkt) Dlaczego można powiedzieć, że *Heart-on-a-chip* jest modelem serca, skoro nie wygląda jak serce?**

Polecana literatura:

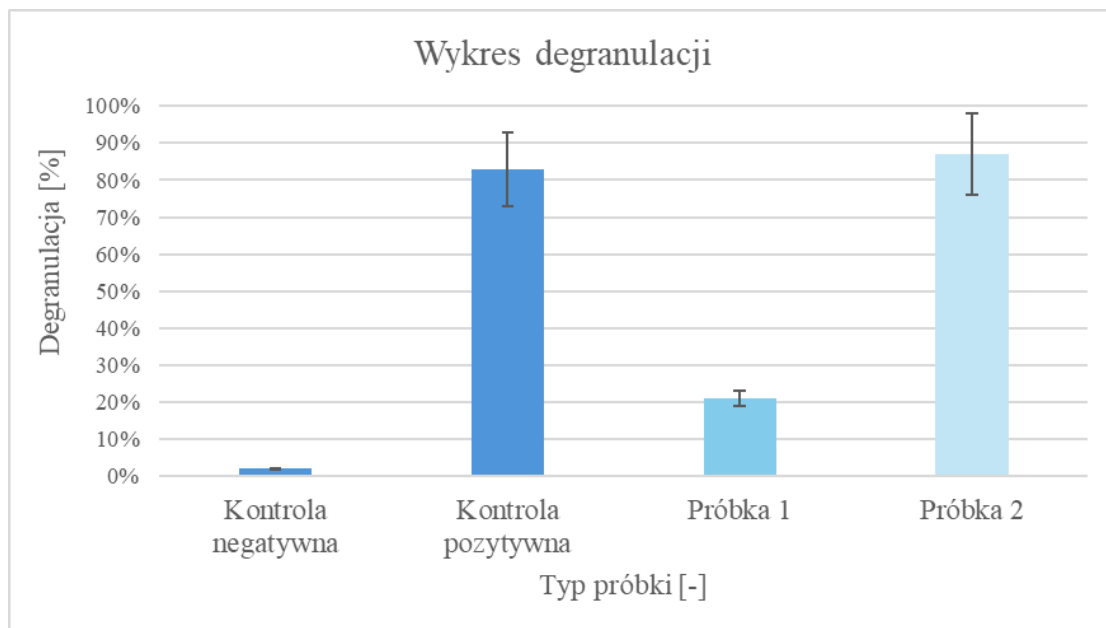
Leung, C. M., De Haan, P., Ronaldson-Bouchar, K., Kim, G., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., Takayama, S., Shuler, M. L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E., & Toh, Y. (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>

ZADANIE 4 (10 pkt)

Mastocyty (komórki tuczne) są w ostatnich latach intensywnie badane w celu dokładniejszego poznania ich funkcji w infekcjach. Jedną z cech charakterystycznych tych komórek jest uleganie procesowi degranulacji. Podczas tego procesu wydziela się β -heksozoaminidaza, która jest często badanym markerem degranulacji. Wysoki poziom tego enzymu wskazuje na stan zapalny. Modyfikacją testu służącego do oznaczenia poziomu β -heksozoaminidazy jest inkubacja mastocytów z patogenem, np. grzybem z gatunku *Candida albicans* i związkiem hamującym jego rozwój.

Pytania:

- I. (1 pkt) Wyjaśnij, na czym polega proces degranulacji.**
- II. (2 pkt) Wymień, w jakich procesach biorą udział mastocyty oraz opisz w 1-2 zdaniach, do czego prowadzi ich działanie.**
- III. (4 pkt) W trakcie testu zorientowałeś się, że brakuje Ci jednego z buforów. Stężenia końcowe zawartych w nim składników w nim wynoszą: 130 mM NaCl; 5,5 mM roztwór glukozy; 2,7 mM KCl; 1,0 mM CaCl₂; 0,1 % (w/v) BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*); 12 mM HEPES; 0,45 mM NaH₂PO₄. Szukając składników w szafkach laboratoryjnych, znalazłeś roztwory o stężeniach: 1 M NaCl; 0,9 M roztwór glukozy; 200 mM KCl; 1M CaCl₂; 0,1 % (w/v) BSA; 1 M HEPES oraz NaH₂PO₄ w formie stałej. Dysponując powyższymi odczynnikami przygotuj 10 ml tego buforu. Pamiętaj o uwzględnieniu wszystkich składników buforu i opisz sposób jego przygotowania.**
- IV. (3 pkt) Po przeprowadzeniu testu wraz z potencjalnym związkiem przeciwgrzybiczym otrzymałeś wynik, który przedstawiasz w postaci Ryciny 1. Zinterpretuj ten wykres oraz wskaż, czy któryś ze związków (1 lub 2) mógłby być stosowany jako potencjalna substancja przeciwgrzybicza. Odpowiedź uzasadnij.**



Rycina 1. Wpływ związków 1 i 2 na degranulację mastocytów. Kontrola negatywna – mastocyty, kontrola pozytywna – mastocyty inkubowane z patogenem, próbka 1 – mastocyty inkubowane z patogenem i ze związkiem 1, próbka 2 – mastocyty inkubowane z patogenem ze związkiem 2.

Polecana literatura:

- Baran, J. *et al.* Mast Cells as a Target—A Comprehensive Review of Recent Therapeutic Approaches. *Cells* **12**, 1187 (2023).
- Liao, H. *et al.* Novel reactivation and degranulation of mast cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **127**, 110157 (2020).
- Soria-Castro, R. *et al.* Valproic acid restricts mast cell activation by *Listeria monocytogenes*. *Scientific Reports* **12**, 15685 (2022).

ZADANIE 5 (10 pkt)

Wirusy stanowią jeden z tematów najbardziej eksplorowanych przez naukowców, zwłaszcza w kontekście obecnych i przyszłych epidemii, a także diagnostyki i nowoczesnych metod leczenia. Są to niewielkie cząstki o rozmiarach w granicach od 20 do 300 nm lecz największe wirusy potrafią osiągać rozmiary nawet 400 nm i więcej. Nie są one natomiast organizmami, gdyż nie są wykazują czynności życiowych takich jak przemiana materii, a także zdolność do samodzielnego rozmnażania.

- I. (1 pkt) Wymień trzy jednostki budulcowe, z których najczęściej składają się wirusy i krótko opisz (max. 2 zdania) jakie mają zadania w budowie wirusa.**
- II. (2,5 pkt) Opisz 5 głównych etapów cyklu infekcyjnego wirusa *Herpes simplex 1* (HSV-1). Do każdego z etapów cyklu, dołącz krótki opis, na czym on polega.**

Wirusy są trudne do sklasyfikowania. Niewielki rozmiar, pozwalający ujrzeć je dopiero dzięki zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) dodatkowo utrudnia to zadanie. Ponadto często różnią się znacząco w kwestii kształtu jak i namnażania. Sposoby wejścia do wnętrza komórki gospodarza jak i sposoby jej opuszczania często różnią się na poziomie molekularnym. Wirulencja tych wirusów także bywa różna, niektóre są w stanie zakazić organizm znikomą ilością materiału. Niektóre wirusy (np. norowirusy) potrzebują do infekcji zaledwie kilkanaście cząstek.

Ostatecznie, aby sklasyfikować wirusy, podjęto decyzję o podzieleniu ich względem posiadanego materiału genetycznego oraz procesu wytworzenia mRNA pozwalającego na syntezę białek wirusa. Klasyfikację tą nazywamy Systemem Baltimore.

III. (3 pkt) Uzupełnij Tabelę 1 dotyczącą systemu klasyfikacji Baltimore.

Do podstawowych informacji jakie powinniśmy mieć o próbce wirusa, oprócz powyższych informacji systematyzujących, jest miano wirusa. Ze względu na nanometrowe rozmiary wirusów, przy oznaczaniu posługujemy się metodami, które pośrednio informują nas o zakażeniu. Wykorzystuje się w związku z tym działanie wirusów na linii komórkowej, a następnie ocenę mikroskopową efektu cytopatycznego (CPE) i/lub testu wybarwienia fioletem krystalicznym po określonym czasie od zakażenia. Jednostką określającą miano wirusa jest TCID₅₀/mL (ang. *Tissue Culture Infectious Dose* - liczba cząstek wirusa w mL zawiesiny, powodująca infekcję 50% próbek linii komórkowej) lub IU/mL (ang. *Infectious Units* - jednostki infekujące/mL).

- IV. (0,5 pkt) Wymień przykładowe trzy, wykorzystujące hodowle komórkowe, metody, za pomocą których oznacza się miano wirusa. Podaj, w jakich jednostkach podaje się otrzymane wyniki w każdej z metod.**

Tabela 1. System Baltimore klasyfikacji wirusów

Grupa klasyfikacji Baltimore	Materiał genetyczny wirusa	Sposób transkrypcji na mRNA	Wirusy reprezentujące daną grupę (1 przykład dla każdej grupy)
I	dsDNA (dwuniciowy DNA)	mRNA transkrybowany bezpośrednio z DNA	HPV
II			
III			
IV			
V			
VI			
VII			

Najmniejsze widoczne odbiegnięcia od kontroli negatywnej lub najmniejsze widoczne odbarwienia w teście wybarwiania fioletem krystalicznym powinny zostać uznane za dodatni wynik na zaistnienie CPE.

- V. (3 pkt) Przeprowadzono analizę otrzymanej próbki krwi od pacjenta zakażonego wirusem RSV. Namnożono do poziomu pełnej monowarstwy linię komórkową odniesienia wobec wirusa RSV (np. 16HBE14o) na płytce 96-dółkowej. Następnie, po odpowiednim przygotowaniu otrzymanej próbki, zakażono linię komórkową i po 5 dniach oceniono płytkę pod mikroskopem odwróconego pola. Literą K oznaczono kolumnę 12. - kontrolę niezakażoną wirusem. Przyjmij, że objętość pożywki w każdym dołku płytki 96-dółkowej wynosi 100 μ L, a objętość próbki w trakcie przygotowania nie zmieniła się. Wynik podaj w IU/mL z dokładnością do 3 cyfr znaczących.

Rozcieńczenie		K											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 ⁻¹	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10 ⁻²	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10 ⁻³	C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10 ⁻⁴	D	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
10 ⁻⁵	E	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
10 ⁻⁶	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁷	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁸	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Polecane źródła wiedzy:

- Khan Academy, Lekcja 1 – Wirusy, data dostępu 11.11.2024
<https://pl.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/animal-viruses-hiv>
- Kornelia Polok, W08. Genetyka wirusów, data dostępu 11.11.2024,
<https://www.matgen.pl/P5%20Lekarski/W08%20Genetyka%20wirusow%20L.pdf>
- Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Diagnostyka Wirusologiczna w Praktyce Klinicznej, data dostępu 11.11.2024,
<https://immunopatologia.wum.edu.pl/sites/immunopatologia.wum.edu.pl/files/seminarium-diag-pol.pdf>
- Virology Research Services, Virology through numbers: converting TCID50 to IU, data dostępu 11.11.2024, <https://virologyresearchservices.com/2024/07/15/virology-through-numbers-converting-tcid50-to-iu/>

- Virology Research Services, Virology through numbers: Plaque and TCID50 assays, data dostępu 11.11.2024, <https://virologyresearchservices.com/2024/07/15/virology-through-numbers-plaque-and-tcid50-assays/>
- Miranda-Saksena, Monica & Denes, Christopher & Diefenbach, Russell & Cunningham, Anthony. (2018). Infection and Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Neurons: Role of the Cytoskeleton. Viruses. 10. 92. 10.3390/v10020092. Data dostępu: 17.11.2024 https://www.researchgate.net/figure/Entry-of-HSV-1-into-neurons-HSV-1-enters-neuronal-cells-by-attachment-and-fusion-of-the_fig2_323373096

ZADANIE 6 (15 pkt)

Biologia molekularna jest nauką, która bada cząsteczki biologiczne, ich strukturę i mechanizmy funkcjonowania. Jest to bardzo szeroka dziedzina, do której zaliczają się m.in. analiza metabolizmu, genomika, proteomika, inżynieria genetyczna itd. Obecnie wiele technik biologii molekularnej zostało znacznie usprawnionych dzięki zastosowaniu nowoczesnych technologii i komputerów. Dziedziną, która zajmuje się informatycznymi narzędziami stosowanymi do biologicznych analiz *in silico* (tj. analiz komputerowych) jest bioinformatyka.

Zadanie składa się z dwóch części – teoretycznej i praktycznej. Obydwie dotyczą zarówno biologii molekularnej, jak i bioinformatyki. Wykonanie części praktycznej wymaga od Uczestnika rzeczywistego wykorzystania narzędzi bioinformatycznych. Są one ogólnodostępne i darmowe, a w internecie znajduje się wiele materiałów dotyczących sposobu ich użytkowania. Umiejętność korzystania z tych narzędzi jest dużym ułatwieniem w pracy biotechnologa, dlatego warto się z nimi oswoić. Część odpowiedzi w części praktycznej należy przekazać wyłącznie drogą elektroniczną – dokładne instrukcje są umieszczone w każdym podpunkcie oraz pliku README.pdf, który jest dostępny w zakładce PLIKI na stronie konkursu.

Część teoretyczna (3,5 pkt)

- I. (0,5 pkt) Krótko (maksymalnie 3 zdania) opisz 3 zastosowania baz danych w bioinformatyce i biologii molekularnej. Podaj 3 przykłady baz danych białek. Rozwiń skrót PDB.**
- II. (2 pkt) W Tabeli 1 wymieniono kilka kluczowych związków używanych w technikach biologii molekularnej. Uzupełnij (wg wzoru) brakujące miejsca, wpisując odpowiednio funkcję związku oraz w jakiej technice/metodzie jest najczęściej stosowany.**
- III. (1 pkt) Co to jest plazmid? Podaj główną różnicę między plazmidem, a wektorem plazmidowym.**

Tabela 1. Kluczowe związki używane w technikach biologii molekularnej oraz ich funkcje

ZWIĄZEK	FUNKCJA	TECHNIKA/METODA
<i>dNTPs</i>	<i>To 4 deoksyrybonukelotydy niezbędne do utworzenia nowego DNA</i>	<i>PCR</i>
Enzymy restrykcyjne		
Bufor z jonami Mg^{2+}		
Polimeraza DNA Taq		
Bromek etydyny		
SDS		
Ligaza faga T4		

Część praktyczna (11,5 pkt)

A. (4,5 pkt) W zakładce PLIKI na stronie konkursu umieszczono pliki tekstowe rtf zawierające 5 sekwencji nukleotydowych zapisanych w konwencji FASTA: Sekwencja0.rtf, Sekwencja1.rtf, Sekwencja2.rtf, Sekwencja3.rtf, Sekwencja4.rtf. Za pomocą programu ApE (Aplazmid Editor) bądź dowolnego innego programu do edycji sekwencji nukleotydowych ustal czy przypisany w poniższej tabeli enzym przetnie sekwencję. Jeżeli tak, to na ile fragmentów? Podaj długość powstałych fragmentów. W odpowiedzi uwzględnij również obraz elektroforezy na żelu agarozowym strawionego *in silico* DNA.

Załóż, że podane sekwencje są poddawane cięciu jako fragmenty liniowe.

Pamiętaj, że sekwencje podano zgodnie z ogólnie przyjętą konwencją: górną nić DNA w kierunku 5' → 3'.

SEKWENCJA	ENZYM	PRZETNIE? (TAK/NIE)	NA ILE FRAGMENTÓW?	DŁUGOŚĆ UZYSKANYCH FRAGMENTÓW (liczba nukleotydów w jednej nici)
Sekwencja0	<i>EcoRV</i>	<i>tak</i>	3	1. 2096 nt 2. 805 nt 3. 424 nt
Sekwencja1	<i>EcoRI</i>			
Sekwencja2	<i>XcmI</i>			
Sekwencja3	<i>BamHI</i>			
Sekwencja4	<i>HindIII</i>			

Obrazy elektroforezy należy przesłać elektronicznie w formie pliku pdf. Pliki należy nazwać według poniższego wzoru (JanKow zastąpić swoim imieniem i nazwiskiem):

Obraz elektroforezy sekwencja1: <Sekwencja1_JanKow_elektro.pdf>

Obraz elektroforezy sekwencja2: <Sekwencja2_JanKow_elektro.pdf>

Obraz elektroforezy sekwencja3: <Sekwencja3_JanKow_elektro.pdf>

Obraz elektroforezy sekwencja4: <Sekwencja4_JanKow_elektro.pdf>

Przykładowy obraz elektroforezy fragmentu Sekwencja0 jest dostępny w zakładce PLIKI na stronie konkursu w pliku <Sekwencja0_przyklad_elektro.pdf>.

B. (3 pkt) W zakładce PLIKI na stronie konkursu umieszczono plik Sekwencja_kodujaca_bialkoX.rtf zawierający sekwencję nukleotydową mRNA kodującego białko X. Określ, który wektor i enzym restrykcyjny będzie najlepszy do sklonowania tego genu. Do dyspozycji masz:

- Enzymy restrykcyjne: *HincII*, *EcoRI*, *XbaI*, *NotI*
- Wektory: pUC19, pET-28a(+), pBR322

Do określenia, który wektor będzie najbardziej odpowiedni najlepiej będzie użyć ich map restrykcyjnych. Są one ogólnodostępne w internecie, przykładowo na stronie snapgene.com

Odpowiedź:

Wybrany enzym restrykcyjny:.....

Wybrany wektor:.....

Uzasadnienie wyboru:

.....
.....

Uwaga: W podanych w bazach sekwencjach mRNA (oraz sekwencjach z zakładki PLIKI na stronie konkursu) zamiast uracylu występuje tymina (T), tak jak w DNA kodującym białko.

C. (4 pkt) Białko X jest lekko zmodyfikowaną wersją prawdziwego białka występującego w naturze. W programie ApE dokonaj translacji sekwencji nukleotydowej na aminokwasową (sugerowane jest użycie jednoliterowych skrótów aminokwasów). Następnie, posługując się narzędziem BLAST, określ jakie rzeczywiste białko jest najbliższe białku X. W odpowiedzi uwzględnij plik z sekwencją aminokwasową w formacie .txt lub .rtf. Nazwij plik wg wzoru (dla imienia Jan Kowalski): <BialkoX_JanKow_transl.txt>. Załącz również zrzut ekranu z wynikami z programu BLAST w pliku .pdf. Nazwij go wg wzoru: <BialkoX_JanKow_BLAST.pdf>.

W wypadku, w którym program BLAST zwróci odpowiedź „unnamed protein product” należy ją pominąć, a wziąć pod uwagę tę, która zawiera konkretne, nazwane białko.

Źródła wiedzy:

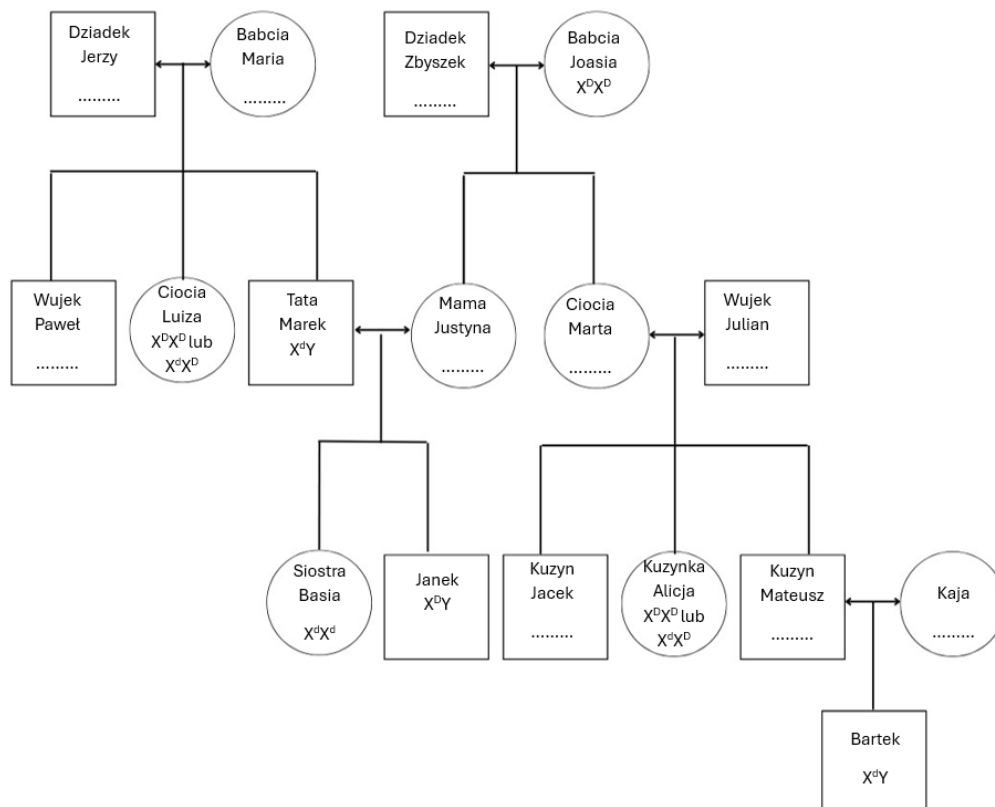
- Krótkie wykłady. *Biologia molekularna*. A. McLennan, P. Turner, A. Bates, M. White *Genomy*. T.A. Brown
- *Mikrobiologia*. J. Baj
- Filmy z kanału na YouTube A plasmid Editor: <https://www.youtube.com/@ape-aplasmideditor1346/videos>
- Strona do pobrania programu (za darmo, na MacOS oraz Windows):
<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>
- Film instruktażowy o użytkowaniu programu BLAST:
https://www.youtube.com/watch?v=WRKQGwh_Mw0

ZADANIE 7 (8 pkt)

Janek jest utalentowanym studentem zainteresowanym genetyką, którego czasem prześladowa pech. Ostatnio na zajęciach z genetyki były przerabiane choroby sprzężone z płcią i ich dziedziczenie. Niezmiernie zainteresowało to Janka, ponieważ zarówno jego siostra bliźniaczka jak i ich tata są daltonistami. Młody student postanowił więc prześledzić rodowód genetyczny swojej rodziny pod względem występowania genu warunkującego daltonizm. W tym celu zebrał informacje o członkach rodziny i rozpisał je w postaci potencjalnego rodowodu genetycznego. Niestety akurat w dniu, gdy chciał pokazać swoją pracę profesor prowadzącej zajęcia z genetyki padał deszcz, a ponieważ Janek nie schował kartki z rodowodem do teczki tylko trzymał ją w ręce, śpiesząc się na zajęcia, krople deszczu spowodowały, że niektóre dane w rodowodzie stały się nieczytelne.

I. (1,5 pkt) Pomóż Jankowi uzupełnić rodowód genetyczny jego rodziny (X^D oznacza zdrowy allel a X^d oznacza allel warunkujący daltonizm) posługując się informacjami, które zebrał:

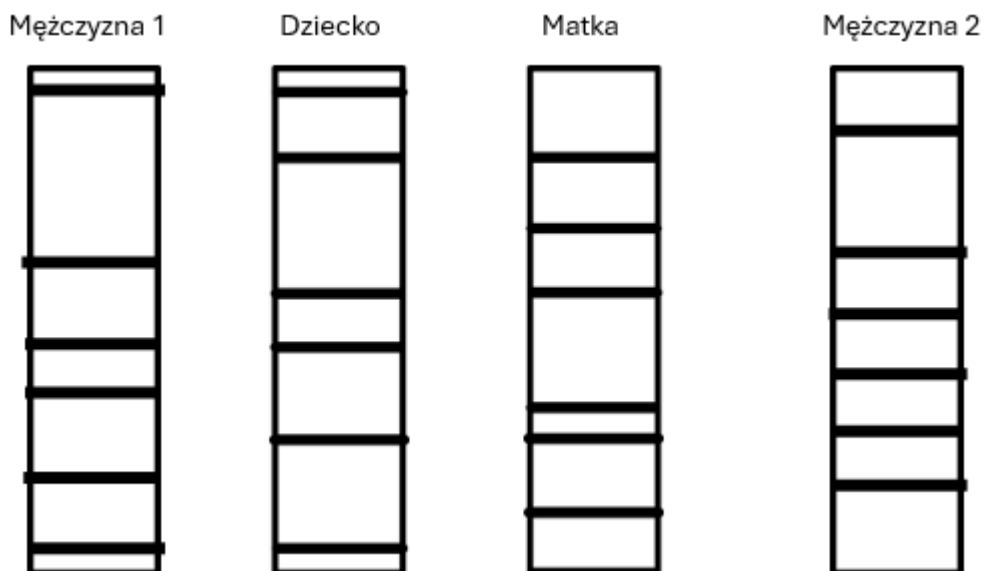
- Dziadek Jerzy nie był daltonistą.
- Siostra Janka, Basia, jest daltonistką.
- Ciocia Wanda ma syna daltonistę.
- Kuzyn Mateusz jak i jego żona Kaja nie są daltonistami, ale mają syna daltonistę.
- Ciocia Luiza nie jest daltonistką, ale jej brat Paweł jest.
- Ciocia Marta nie jest daltonistką.
- Mąż cioci Marty Julian nie jest daltonistą.
- Kuzyn Jacek jest daltonistą.
- Babcia Maria nie jest daltonistką



.....

Janek w ramach stażu na studiach zatrudnił się w laboratorium zajmującym się między innymi przeprowadzaniem testów na ojcostwo. Pewnego dnia dostał polecenie określenia ojcostwa na podstawie analizy próbek umieszczonych poniżej. Pomóż Jankowi w tym zadaniu.

II. (1,5 pkt) Na podstawie profili genetycznych określ kto jest ojcem dziecka. Odpowiedź uzasadnij



Odpowiedź:

Ojcem dziecka jest Mężczyzna.....

Uzasadnienie:

.....

.....

Janek w ramach przygotowania do egzaminu z inżynierii genetycznej zrobił sobie fiszki dotyczące różnych systemów klonowania, jednak okazało się, że przy ich robieniu niektórym określeniom nie przypisał rodzaju klonowania, które to określenie charakteryzuje.

**III. (1 pkt) Pomóż Jankowi określić cechy, które najlepiej opisują rodzaje klonowania.
Wstaw w miejsce kropek odpowiednie oznaczenia literowe tych cech**

Rodzaje systemów do klonowania:

Klonowanie Golden Gate:.....

Klonowanie Gibsona:.....

Klonowanie TA:.....

System Gateway:.....

Cechy:

- a. uporządkowane składanie 2-50 fragmentów DNA jednocześnie przy użyciu enzymów restrykcyjnych typu IIS i ligazy DNA
- b. wymaga użycia klonaz
- c. wykorzystuje się 5'-egzonukleazę, polimerazę DNA i ligazę DNA
- d. wykorzystuje topoizomerazę I
- e. wykorzystuje wiązanie adeniny z tyminą
- f. wymaga fragmentów DNA z homologicznymi fragmentami o długości 15-20 par zasad na końcach
- g. wykorzystuje miejsca rekombinacji attB i attP
- h. pozwala na klonowanie w wektorze kilku wstawek jednocześnie
- i. wykorzystuje polimerazę Taq
- j. enzymy restrykcyjne tną DNA poza miejscami rozpoznawania i generują zwykle niepalindromowe, 3 lub 4 nukleotydowe końce

W ramach swojej pracy inżynierskiej Janek miał z pomocą tej metody namnożyć pewien gen wykorzystując wektor bakteryjny pBluescript II KS i szczep bakterii *E. coli*.

IV. (1 pkt) Zaznacz wszystkie poprawne odpowiedzi

1. Klonowanie genów:
 - a. ma na celu uzyskanie dokładnej kopii całego organizmu
 - b. polega na namnażaniu genu wykorzystując organizm żywy
 - c. wymaga użycia enzymów restrykcyjnych i ligaz
 - d. jest niezgodne z prawem

2. Klonowanie genów wymaga użycia plazmidu bakteryjnego jako wektora.
 - a. Tak
 - b. Nie
3. Gen możemy sklonować wykorzystując:
 - a. komórki bakteryjne
 - b. komórki roślinne
 - c. drożdże
 - d. komórki zwierzęce
4. Klonowanie genu wymaga:
 - a. usunięcia całego DNA z organizmu, który wykorzystujemy do klonowania
 - b. wprowadzenia obcego DNA do organizmu
 - c. przygotowania zrekombinowanego wektora
 - d. zsyntetyzowania DNA

V. (2 pkt) Ułóż podane poniżej czynności w schemat przedstawiający klonowanie genów. Krótko wyjaśnij cel każdego z tych etapów

- a. Trawienie enzymami restrykcyjnymi wektora
- b. Transformacja *E.coli* zrekombinowanym plazmidem
- c. Ligacja genu do wektora
- d. Przygotowanie genu
- e. Wysianie bakterii na pożywkę selekcyjnej

Kolejność etapów (wpisz litery odpowiadające odpowiednim krokom)

1. 2. 3. 4. 5.

Wyjaśnienie czemu służy każdy z wymienionych wyżej etapów klonowania genów:

1.
.....
2.
.....
3.
.....
4.
.....
5.
.....

Janek w swoich badaniach wykonuje transformację bakterii zrekombinowanym plazmidem za pomocą metody szoku termicznego.

VI. (3 pkt) Wyjaśnij na czym polega transformacja metodą szoku termicznego. Pomóż Jankowi zaproponować etapy przeprowadzenia tej procedury. Jakie są inne metody transformacji jakich mógłby użyć Janek?

Proponowane źródła:

- <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/cloning/>
- <https://ppm.edu.pl/docstore/download/SUM7aee95d1351b4f1bb8107817896754e7/Transformacja+bakterii+klasyczny-A.wcag.pdf?entityType=article>
- Genomy T.A. Brown
- <https://pl.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning>
- <https://zpe.gov.pl/a/przeczytaj/DAXgVjX4m>
- <https://zpe.gov.pl/a/przeczytaj/DfJcM5Z8Y>

.....
Imię i nazwisko uczestnika VII KB

ZADANIE 8 (8 pkt)

Według definicji EFSA (*ang. European Food Safety Authority*): mikroplastik (MP) to heterogeniczna mieszanina różnego kształtu materiałów w postaci fragmentów, włókien, elipsoid, granulek, śrutu, płatków o wielkości w zakresie od 0,1 μm do 5 mm. Częstki o mniejszej średnicy są zaliczane do nanoplastiku. Struktura mikroplastiku tworzona jest przez różne polimery, takie jak polietylen (PE), polipropylen (PP), poli(tereftalan etylenu) (PET) i wiele innych.

Mikroplastik dzieli się na pierwotny i wtórny. MP pierwotny to cząstki dodawane m.in. do kosmetyków, materiałów budowlanych i innych produktów jako element zagęszczający lub nadający inne pożądane cechy produktowi końcowemu. Mikroplastik wtórny powstaje w wyniku użytkowania i produkcji innych wyrobów plastikowych podczas m.in. ścierania się ubrań lub degradacji plastikowych butelek. Mikrocząstki plastiku mogą być mimowolnie akumulowane przez organizmy wodne, stanowiąc dla nich ogromne zagrożenie. W dalszej kolejności te szkodliwe cząstki mogą przedostawać się w górę łańcucha pokarmowego, docierając również do organizmów ludzi.

Mikroplastik jest szkodliwy także w inny sposób: na jego powierzchni mogą adsorbować się toksyczne związki chemiczne takie jak [.....] oraz inne składniki aktywne. To powoduje wzrost ich akumulacji w środowisku oraz ułatwia ich transport, prowadząc do zwiększenia ich szkodliwości.

Ze względu na to, że mikroplastik stanowi poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego oraz dla człowieka, pojawia się potrzeba opracowania metod, dzięki którym możliwe będzie wykrywanie i oznaczanie stężenia tych szkodliwych cząstek oraz sposobów na neutralizowanie skutków ich obecności i ograniczanie przedostawania się mikroplastiku do środowiska. W tym pomocna może okazać się biotechnologia.

- I. (1 pkt) Podaj cztery przykłady związków chemicznych, które mogłyby uzupełnić lukę w powyższym tekście:**

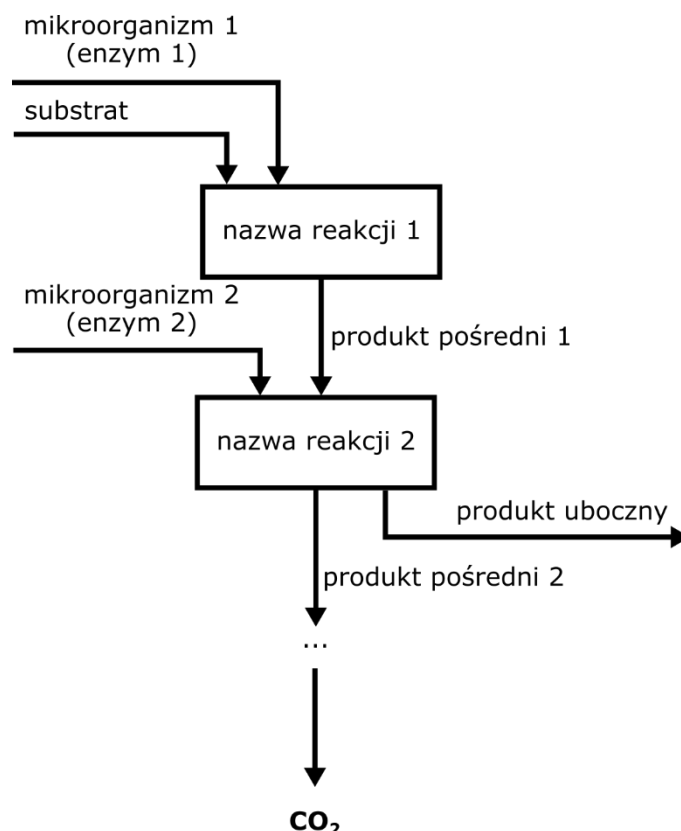
.....

- II. (3,5 pkt) Zaproponuj jakie mikroorganizmy występujące naturalnie można wykorzystać do przekształcenia poli(tereftalanu etylenu) (PET) w CO_2 . Przedstaw jedną z możliwych ścieżek procesu na schemacie ideowym**

Na schemacie uwzględnij:

- nazwę reakcji, której ulega dany związek,
- substrat,
- produkty pośrednie,
- produkty uboczne,
- produkt końcowy,
- enzymy odpowiedzialne za przekształcenia na każdym z etapów,
- mikroorganizm (nazwa gatunkowa), który jest odpowiedzialny za dane przekształcenie.

Podane elementy umieść na schemacie ideowym analogicznie do schematu poniżej:



Rycina 1. Przykładowy schemat ideowy.

- III. (2 pkt) Podaj trzy przykładowe metody wykrywania lub oznaczania stężenia mikroplastiku w próbkach wodnych wraz z krótkim opisem każdej z nich oraz wskazaniem wad i zalet. Jakie są największe trudności w wykrywaniu mikroplastiku? Wyjaśnij ich przyczyny.
- IV. (1,5 pkt) Zaproponuj własną metodę wychwytywania mikroplastiku ze środowiska wodnego (np. z jeziora, rzeki) i wyjaśnij zasadę jej działania.

Proponowane źródła:

- M. Kossakowska-Zwierucho, „Mikroorganizmy w walce z mikroplastikiem”, Biotechnologia.pl. [Online]. Dostępne na: <https://biotechnologia.pl/biotechnologia/mikroorganizmy-w-walce-z-mikroplastikiem,21479>.
- S. H. Joo, Y. Liang, M. Kim, J. Byun, i H. Choi, „Microplastics with adsorbed contaminants: Mechanisms and Treatment”, *Environ. Chall.*, t. 3, s. 100042, kwi. 2021, doi: 10.1016/j.envc.2021.100042.
- K. Samsonowska i A. Kaszuba, „Mikroplastik w środowisku naturalnym”, *p*, t. 67, nr 1, s. 28–33, sty. 2022, doi: 10.14314/polimery.2022.1.4.

ZADANIE 9 (7 pkt)

Mikroalgi w ostatnim czasie stają się coraz popularniejszym obiektem badawczym dla naukowców na całym świecie. Wykorzystywane są w wielu gałęziach przemysłu, między innymi w kosmetologii, przemyśle spożywczym czy w farmacji, co wynika ze zdolności produkcji różnorodnych i wartościowych związków chemicznych. Mają także bardzo pozytywny wpływ na środowisko. Dzięki przeprowadzanej fotosyntezie pochłaniają duże ilości dwutlenku węgla i wytwarzają tlen niezbędny Nam wszystkim do życia. Na tym ich środowiskowe znaczenie się nie kończy. Naukowcy udowodnili możliwość wykorzystania mikroalg w walce z problemem dużych ilości odpadów plastikowych.

- I. (1,5 pkt) Podaj trzy możliwości wykorzystania mikroalg w walce z plastikiem.**
- II. (1,5 pkt) Podaj trzy argumenty przemawiające za przewagą mikroalg nad bakteriami w zastosowaniach wymienionych w punkcie I.**
- III. (1,5 pkt) Podaj trzy inne przykłady wykorzystania mikroalg o pozytywnym wpływie na środowisko.**
- IV. (2,5 pkt) Narysuj/zaprojektuj schemat instalacji do hodowli mikroalg w celu degradacji plastiku. Wypisz niezbędne elementy/czynniki środowiskowe do wzrostu mikroalg.**

Przykładowe źródła:

- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9488055/>
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391017303816>
- <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-019-1220-z>
- <https://www.nature.com/articles/s41598-021-96315-6>

.....
Imię i nazwisko uczestnika VII KB

ZADANIE 10 (5 pkt)

Do laboratorium „Mikrob Wielki” wpłynęło zlecenie od producenta płynów do higieny jamy ustnej na wykonanie badań mikrobiologicznych zgodnie z normami ISO.

Pani Maria pobrała 1 ml płynu do higieny jamy ustnej i dodała do 9 ml bulionu Eugon LT100, który neutralizuje aktywność przeciwdrobnoustrojową większości komercyjnie dostępnych środków konserwujących dodawanych do kosmetyków. Po 20 h preinkubacji próbek płynu do higieny jamy ustnej w temperaturze 35°C, pani Maria wykonała następujące oznaczenia:

a) ocena ilości drobnoustrojów tlenowych mezofilnych w próbce kosmetyku poprzez wykonanie 10-krotnego rozcieńczenia poprzez zmieszanie 1 ml próbki + 9 ml płynu do rozcieńczeń z którego wykonała posiew po 100 µl na agar tryptonowo-sojowy w trzykrotnym powtórzeniu. Płytki wstawiła do inkubacji do cieplarki nastawionej na 37°C na 24 h. Po tym czasie, pani Maria zliczyła wyrosnięte kolonie, gdzie na płytkach odpowiednio wyrosło: 17, 23 i 29 kolonii.

b) jednocześnie, Pani Maria dokonała posiewu próbki kosmetyku (100 µl) na podłoże Baird-Parkera, podłoże z cetrymidem, podłoże MacConkeya, podłoże Sabourauda z dekstrozą i chloramfenikolem. Po 24 h inkubacji w temperaturze 37°C płytek z podłożem Baird-Parkera, podłożem z cetrymidem, podłożem MacConkeya nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów. Również na podłożu Sabourauda z dekstrozą i chloramfenikolem po 48 h inkubacji w 30°C nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów.

Pani Maria to doświadczony mikrobiolog i doskonale wie, że zgodnie z normami ISO, aby płyn do higieny jamy ustnej był dopuszczony do obrotu powinien spełniać jednocześnie wymagania ilościowe jak i jakościowe czystości mikrobiologicznej kosmetyków.

WYMAGANIA ILOŚCIOWE

- kosmetyki kategoria I – kosmetyki przeznaczone dla dzieci poniżej trzeciego roku życia, kosmetyki stosowane w okolicach oczu i na błony śluzowe - maksymalny limit akceptacji ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosi $2,0 \times 10^2$ jtk/g
- pozostałe kosmetyki stanowią kategorię II - maksymalny limit akceptacji ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosi $2,0 \times 10^3$ jtk/g

WYMAGANIA JAKOŚCIOWE

- *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* *Candida albicans* nieobecne w 1 g kosmetyku

Otrzymane wyniki badań czystości mikrobiologicznej płynu do higieny jamy ustnej trafiły na Twoje biurko (jesteś kierownikiem laboratorium mikrobiologicznego 😊). Po przeanalizowaniu tych wyników odpowiedz na pytania:

- I. (0,5 pkt) Do jakiej kategorii kosmetyków zaliczany jest płyn do higieny jamy ustnej?**
- II. (2,5 pkt) Czy płyn do higieny jamy ustnej spełnia wymagania ilościowe? Koniecznie poprzyj swoje stwierdzenie obliczeniami.**
- III. (1 pkt) Kolonie jakich mikroorganizmów wyrosły na podłożu Baird-Parkera, podłożu z cetrymidem, podłożu MacConkeya, podłożu Sabourauda z dekstrozą i chloramfenikolem? Jakie kolory kolonii obserwujesz na powyższych podłożach?**
- IV. (0,5 pkt) Czy kosmetyk spełnia wymagania jakościowe?**
- V. (0,5 pkt) Czy płyn do higieny jamy ustnej jest czysty mikrobiologicznie i może być dopuszczony do obrotu? Uzasadnij odpowiedź.**

ZADANIE 11 (11 pkt)

(Zadanie zostało ułożone w postaci opracowania podzielonego na rozdziały)

WSTĘP

Na opakowaniu jednego z bardzo popularnych napojów można przeczytać, co następuje:

Składniki: woda, dwutlenek węgla, barwnik (E150d), substancje słodzące (aspartam, acesulfam K), kwasy (kwas fosforowy, kwas cytrynowy), regulator kwasowości (cytryniany sodu), aromaty, w tym kofeina.

Zawiera źródło fenyloalaniny.

Średnia wartość odżywcza	100 ml	250 ml	%* (250 ml)
Energia	2 kJ/<1kcal	5kJ/1kcal	<1%
Tłuszcz	0g	0g	0%
- w tym kwasy nasycone	0g	0g	0%
Białko	0g	0g	0%
Węglowodany	0g	0g	0%
- w tym cukry	0g	0g	0%
Sól	0,01g	0,04g	1%

*Referencyjna wartość spożycia dla przeciętnej osoby dorosłej (8400 kJ/2000 kcal)

ROZDZIAŁ I.

SKŁAD NAPOJU

Pytania:

- I. (1 pkt) Uzupełnij Tabelę 1: narysuj wzory chemiczne wszystkich składników (bardziej rozbudowane związki można narysować pod tabelą) i określ ich rolę w recepturze. Zaznacz krzyżykiem te składniki receptury, które mogły wygenerować wartość energetyczną 2kJ/<1kcal.

(informacje o składnikach, których nie ma w podręcznikach szkolnych są w artykułach podanych pod Tabelą 1, dostępnych w internecie).

- II. (0,5 pkt) Dlaczego na etykiecie zaznaczono, że napój jest źródłem fenyloalaniny?

Tabela 1. Uzupełnij dane wymagane w punkcie I:

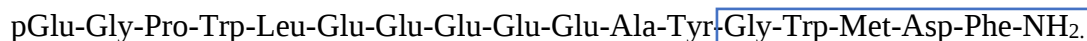
Lp	Nazwa	Wzór chemiczny lub opis związku	Rola w recepturze	Mogą generować 2kJ/<1kcal.
1	woda		uzupełnia ilość wody w organizmie	
2	dwutlenek węgla			
3	E150d ^a			
4	Aspartam ^b			
5	Acesulfam K ^b			
6	Kwas fosforowy			
7	Kwas cytrynowy			
8	Cytryniany sodu			
9	Aromaty	Patent firmowy nie udostępniony		
10	Kofeina			

- a. Jarosławski L., Zielonka R., Karmel a kształtowanie brązowej barwy, *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego* 2017 t. 72 nr 3
- b. Krzyżewska I., Koziarska A. Techniki i metody, *Środowisko*, rok 22, nr 2, Substancje słodzące (Krzyżewska_Koziarska_Substancje_2_2017-2.pdf) Uwaga! w artykule acesulfam występuje w postaci anionu. W napoju jest to sól potasowa Acesulfam K

ROZDZIAŁ II.

ASPARTAM – OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI

W latach 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku prowadzono intensywne badania nad peptydem wydzielanym przez błonę śluzową żołądka - gastryną I, zbudowaną z siedemnastu aminokwasów:



Odkryto, że tetrapeptyd złożony z czterech końcowych aminokwasów występujących w gastrynie też wykazuje aktywność biologiczną i szukano dalej. Poniżej fragment artykułu opisujący odkrycie aspartamu:

During the synthesis of gastrin C-terminal tetrapeptide, **tryptophylmethionylaspartylphenylalaninamide**, one of us (J.M. S.) discovered that an intermediate, L-Asp-L-Phe Me ester, was intensely sweet. Subsequent organoleptic evaluation has shown that the compound is 100-150 times as sweet as sucrose and free of unpleasant aftertaste. Structural variations' in the Asp, Phe, and Me ester parts of the molecule were made. The presence of (...) free, unsubstituted CO₂H of Asp as well as the distance between them and the absolute configuration of the asymmetric C were completely critical for sweetness; the requirement of absolute L configuration also held for Phe. Sweetness fell off rapidly with increasing size of the ester radical. For example, the n-Pr ester had about 1% the potency of the Met ester

(Mazur R.H., Goldkamp A.H., James P.A., Schlatter J.M., Journal of Medicinal Chemistry 18, 1217, 1970)

Pytania:

III. (2,5 pkt) Zaprojektuj syntezę słodkiego peptydu - estru metylowego aspartylo-feniloalaniny. W Tabeli 2 zestawiono surowce i odczynniki, z których można skorzystać.

Nie trzeba wykorzystywać wszystkich surowców; w podjęciu decyzji może pomóc lektura rozdziału 2.2 o syntezie peptydów w A.Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, WN PWN, Warszawa 2013.

IV. (1 pkt) Co się dzieje z aspartamem w przewodzie pokarmowym człowieka? Podaj równania zachodzących reakcji.

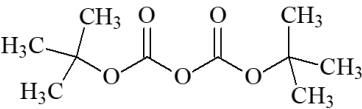
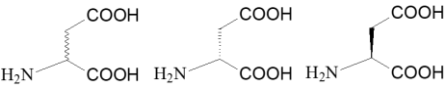
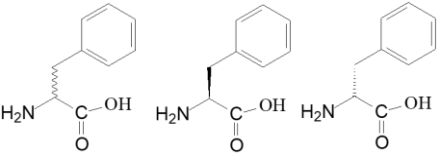
V. (2 pkt) Oblicz ile mg metanolu może powstać w twoim organizmie po wypiciu standardowej puszki omawianego napoju (250 ml), wiedząc, że średnia zawartość aspartamu w tego typu napojach jest regulowana przepisami EU i nie może przekroczyć stężenia 600 mg/l.

VI. (0,5 pkt) Oceń potencjalną szkodliwość tego napoju dla twojego organizmu. Czy coś się zmieni w ocenie potencjalnej szkodliwości jeśli poczęstujesz taką samą puszką napoju dwuletnią kuzynkę ważącą 13 kg?*

VII. (0,5 pkt) Dlaczego używa się jako słodzika estru metylowego a nie estru któregoś z mniej toksycznych alkoholi?

*Toksyczna dawka metanolu to 200 – 500 mg/kg wagi ciała.

Tabela 2. Surowce i odczynniki do syntezy słodkiego peptydu

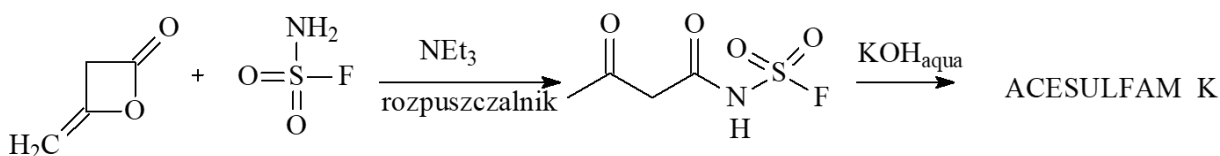
Nazwa związku	Wzór	Uwagi
Alkohole: metylowy, etylowy	CH ₃ OH, C ₂ H ₅ OH	
Wodorotlenek sodu	NaOH	stały
Kwas siarkowy	H ₂ SO ₄	stężony
Piowęglań di- <i>tert</i> -butylowy		
Kwas asparaginowy racemat; Kwas D-asparaginowy; Kwas L-asparaginowy*		
Feniloalanina racemat; L-feniloalanina D-feniloalanina*		
Preparaty enzymatyczne: termolizyna (proteaza), esteraza, lipaza *	Białko enzymatyczne immobilizowane na stałych nośnikach; można je stosować w środ. wodnym lub w rozpuszczalnikach.	Obce białko = alergie; przechowywać w lodówce

*Trzy osobne odczynniki, trzy osobne opakowania

ROZDZIAŁ III

ACESULFAM K – BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI

Przeczytaj fragment rozdziału z książki *“Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology”*:



„Acesulfame K, was accidentally discovered in 1967 by Claus and Jensen. It belongs to the class of dihydrooxathiazinone dioxides, which were then synthesised for the first time. Today it is one of the most important intense sweeteners.(...) As the dry substance, acesulfame K can be stored for years without visible or analytically detectable changes. Dry, solid acesulfame K withstands high temperatures. The decomposition limit depends on the rate of heating and is around 225°C under conditions of melting point determination.(...) In the human body acesulfame K is absorbed quickly, but excreted similarly fast. After a single dose, excretion is virtually complete within 24 h and it is excreted completely unchanged. Therefore it is non-caloric. No metabolism was observed in humans or other animal species

(Mitchell H.(edit),*Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, 2006)

Pytania:

- VIII. (0,5 pkt) Czy uważasz, że wyjątkowa trwałość cząsteczki acesulfamu w połączeniu ze słodkim smakiem w ustach jest jego wspaniałą zaletą? Odpowiedź krótko uzasadnij.**
- IX. (1,0 pkt) Przeczytaj fragment następnego opracowania i napisz co sądzisz o zrelacjonowanych w nim wynikach analiz próbek wody pobranych z jezior, rzek i zatok morskich w różnych częściach świata.**

The present work in Hong Kong revealed a median level of 0.06 mg L^{-1} for sucralose. This falls in the lower end of the general European range. In comparison, acesulfame with an average of 0.22 mg L^{-1} was the significant contributor to the local artificial sweetener contamination in Hong Kong waters. These results match the occurrence worldwide: In the surface and underground water environments in Spain, acesulfame was the most prevalent sweetener detected (53.7 mg L^{-1} , Ordonez et al., 2012), Canada (33.6 mg L^{-1} , Van Stempvoort et al., 2011), Switzerland (7.35 mg L^{-1} , Berset and Ochsenbein, 2012), China (4.65 mg L^{-1} , Gan et al., 2013), and Germany (2.00 mg L^{-1} , Scheurer et al., 2009). After acesulfame, the highest contaminations were also found in Spain where profiling studies uncovered the highest figures between 5.3 and 19.7 mg L^{-1} in surface waters, (...) The same trend was found in Switzerland and presently in Hong Kong (Berset and Ochsenbein, 2012; Buerge et al., 2009).
(Ziye Sang, Yanan Jiang, Yeuk-Ki Tsoi, Kelvin Sze-Yin Leung, water research 52 (2014) 260 e274)

ROZDZIAŁ IV

PODSUMOWANIE

- X. (1,5 pkt) Dlaczego syntetyczne związki słodzące są powszechnie stosowanymi dodatkami obecnymi w wielu produktach spożywczych ? (Pięć zdań).**