Контрольная работа

по биотехнологии

# Содержание.

Содержание.

24. Из каких основных компонентов состоит пища?

1. Белки

2 Жиры

3 Жирные кислоты

4. Углеводы

5. Витамины

Витамин А (ретинол)

Витамин Д (кальциферолы)

Витамин С

Витамин B1 (тиамин)

Витамин В2 (рибофлавин)

Витамин РР (ниацин)

Витамин В12 (цианокобаламин)

Витамин Р (рутин, цитрин)

6. Минеральные вещества

Железо

Магний

Калий

Кальций

Натрий

Фосфор

Сера

Йод

Марганец

Медь

Цинк

Хлор

7. Пищевые волокна

8. Вода

59. Каковы принципы конструирования биосенсоров?

Биосенсоры

Принципы конструирования биосенсоров

Ферментные (или безреагентные) электроды

Ферментные микрокалориметрические датчики

Хеми- и биолюминесцентные датчики

Клеточные биосенсоры

64. Приведите примеры микробных ферментов, использующихся вместо растительных и животных.

# 24. Из каких основных компонентов состоит пища?

При определении количества полезных элементов в пище необходимо учитывать возраст, особенности обмена веществ и степень физической активности человека. Например, человек, у которого сидячая работа и очень мало физической нагрузки, нуждается в меньшем количестве калорий, чем рабочий.

Наш организм должен получать с пищей белки, углеводы, жиры, витамины, минеральные вещества, клетчатку и воду.

*1. Белки* - незаменимые вещества, без которых невозможны не только рост и развитие организма, но и сама жизнь. Они необходимы для синтеза постоянно расходующихся пищеварительных соков, гормонов, гемоглобина крови и иммунных тел, обеспечивающих невосприимчивость к инфекционным заболеваниям. Мужчинам в возрасте 18-29 лет в зависимости от тяжести выполняемого труда требуется в сутки 90-118 г белка, женщинам - от 77 до 87 г. С возрастом потребность в белке снижается и в 30-39 лет составляет для мужчин 87-113 г, для женщин 74-84 г. К полноценным пищевым белкам относятся белки, в которых содержатся все незаменимые аминокислоты в количестве и соотношениях, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность организма, его рост и развитие. Такими белками являются преимущественно белки животного происхождения, содержащиеся в мясе, рыбе, твороге и молочных продуктах, яйцах, сыре и т. д.

*2 Жиры* относятся к жизненно необходимым пищевым веществам.

 Соответственно, жиры нужны для обеспечения пластических процессов в организме, являются структурной частью клеток и тканей. Их присутствие необходимо для всасывания из кишечника других нутриентов, в частности витаминов А, Е и D. Недостаток жира в питании может привести к нарушению деятельности центральной нервной системы, ослаблению иммунобиологических механизмов, возникновению дегенеративных изменений кожи, почек, органов зрения. Отрицательно сказывается и избыточное потребление жира. Потребление значительного количества животных жиров, содержащих предельные жирные кислоты, способствует повышению уровня холестерина в крови, возникновению атеросклероза, заболеванию сердца и головного мозга.

Среднесуточная потребность в жире молодых мужчин 18-29 лет с массой тела 70 кг с учетом названных обстоятельств должна составлять 103-158 г, женщин того же возраста с массой тела 60 кг - 88-119 г. В возрасте 30-39 лет потребность в жире снижается до 99-150 г у мужчин и 84-112 г у женщин.

*3 Жирные кислоты* - составные компоненты жиров и жироподобных веществ, обладающих выраженной биологической активностью (фосфатиды, стерты). В природных жирах содержится более 60 видов жирных кислот.

По химической структуре жирные кислоты делятся на предельные (насыщенные) и непредельные (ненасыщенные). Из предельных жирных кислот наиболее распространены пальмитиновая, стеариновая, миристиновая, масляная, капроновая и др. Физические свойства и биологическая активность предельных жирных кислот зависят от их молекулярной массы: высокомолекулярные имеют твердую консистенцию, низкомолекулярные - жидкую. Непредельные жирные кислоты присутствуют во всех жирах, но более всего в растительных. Это главным образом высоконепредельные (полиненасыщенные) олеиновая, линолевая и арахидоновая кислоты, которые в организме не синтезируются и являются витаминоподобными веществами, образуя группу незаменимых жирных кислот. Они отличаются более активным участием в процессах жизнедеятельности, важны для нормализации жирового и холестеринового обменов. Больше всего (50-80% от всех жирных кислот) их содержится в растительных маслах, потребление 15-20 г которых способно удовлетворить суточную потребность организма в этих соединениях, меньше их в свином сале, гусином и курином жире (требуется уже 50-60 г), минимальное количество - в бараньем, говяжьем и молочных жирах (потребность в таких кислотах эти жиры удовлетворить не могут).

*4. Углеводы*, одна из основных и важнейших групп пищевых веществ. Основное их значение в питании человека - энергетическое снабжение организма: они обеспечивают более половины суточной калорийности пищевого рациона. По своей энергетической ценности углеводы равноценны белкам (1 г углеводов при сгорании в организме освобождает 4 ккал). Они используются в качестве энергетического материала для любой деятельности человека, связанной с физической работой, поэтому при всех видах физического труда отмечается повышенная потребность в них.

Источниками углеводов в питании человека служат зерновые продукты, содержание углеводов в которых составляет не менее 75% сухого вещества. Значение животных продуктов как источника углеводов несущественно: гликоген в незначительных количествах содержат печень и мясо; лактоза (молочный сахар) содержится только в молоке в количестве около 5%.

 Углеводы пищевых продуктов в зависимости от химической структуры, скорости усвоения и использования делятся на простые (моносахариды и дисахариды) и сложные (полисахариды). Простые углеводы при поступлении в организм быстро поступают в кровь и при необходимости окисляются с выделением энергии. Сложные сахара используются медленнее. Кроме того, углеводы можно разделить на рафинированные и нерафинированные (защищенные). Рафинированные углеводы - это сахара, освобожденные от сопутствующих примесей в процессе очистки. Продукты на основе рафинированных углеводов очень легко усваиваются в организме, что в большей степени способствует формированию избыточного веса, нарушению холестеринового и жирового обмена. Источники рафинированных углеводов - свекловичный и тростниковый сахар, все виды кондитерских изделий, изделий из высших сортов пшеничной муки, концентраты, смеси и изделия из зерновых. Источники защищенных углеводов - хлебные изделия из муки, приготовленной из цельного зерна, крахмал картофеля, большинство овощей, фруктов и ягод. Суточное потребление углеводов составляет примерно 350-500 г.

*5. Витамины* представляют собой биологически активные органические соединения, имеющие большое значение для нормального обмена веществ и жизнедеятельности организма. Они повышают физическую и умственную работоспособность человека, способствуют устойчивости организма к различным заболеваниям, благодаря чему могут рассматриваться как важное средство их профилактики.

Витамин А (ретинол). Ретинол оказывает нормализующее влияние на процессы роста, в том числе на рост и формирование скелета, обеспечивает оптимальное структурное и функциональное состояние эпителиальных клеток кожи, желез и слизистых оболочек, выстилающих поверхности и полости ТеЛа. Содержание ретинола в основных продуктах питания сильно колеблется. В молоке его 0,02 г в 100 мл, в сливочном масле - 0,5 мг на 100 г продукта (0,5 мг%). Значительное количество этого витамина в свиной и говяжьей печени, в яйцах его 0,35 мг%.

Потребность взрослого человека в витамине А составляет до 1,5 мг в сутки.

Витамин Д (кальциферолы) оказывает влияние на минеральный обмен, обеспечивает всасывание кальция и фосфора в кишечнике, влияет на отложение кальция в костной ткани. Витамин D необходим для профилактики рахита у детей. Он содержится только в продуктах животного происхождения (сметана, сливки, молоко, печень трески, тунца). Суточная потребность детей в витамине D от 0,0025 до 0,01 мг.

Витамин Е (токоферолы) нормализует мышечную деятельность, предотвращая развитие мышечной слабости и утомления. Этот витамин тесно связан с функцией эндокринной системы, особенно половых желез, щитовидной железы, гипофиза. Содержится витамин Е в продуктах растительного и животного происхождения. Много его в растительных маслах, в частности в хлопковом, подсолнечном, соевом. В небольшом количестве витамин Е находится в овощах, бобовых, молоке, сливочном масле, куриных яйцах, мясе, рыбе. Взрослому здоровому человеку необходимо ежедневно получать с пищей 2-6 мг токоферолов.

Витамин К - обязательный и непременный участник механизма свертывания крови. При недостатке его в пище снижается свертываемость крови, что проявляется кровотечением. Витамином К богаты белокочанная и цветная капуста, томаты, тыква, свиная печень. Немало его в моркови, свекле, картофеле, в бобовых овощах, в пшенице и овсе. Сбалансированное питание круглый год восполняет потребность человека в этом витамине, которая составляет 1,8-2,2 мг в сутки.

Витамин С, один из давно и наиболее широко известных водорастворимых витаминов. Содержится в овощах, фруктах, ягодах и многих дикорастущих растениях. Витамин С нужен для оптимального течения многих жизненно важных процессов обмена веществ в организме, обеспечивает нормальное состояние соединительной ткани, обусловливающей эластичность и прочность кровеносных сосудов, повышает устойчивость к заболеваниям, холоду и многим другим неблагоприятным факторам окружающей среды. Полное и длительное отсутствие витамина С в рационе или прекращение его усвоения вследствие болезни ведет к возникновению заболевания, известного под названием цинги. Суточная потребность взрослого здорового человека в аскорбиновой кислоте колеблется в пределах 70-100 мг.

Витамин B1 (тиамин), один из важнейших водорастворимых витаминов группы В, роль которого в обеспечении здоровья и высокой работоспособности человека очень велика.

Суточная потребность в тиамине составляет 1,3-2,6 мг, для детей - 0,3-1,7 мг. Основным источником тиамина являются зерновые продукты. При этом полезно знать, что в любом зерне этот витамин концентрируется в его зародышевой части и оболочке. Вследствие этого наиболее ценны изделия из муки грубого помола, где сохраняются все части зерна.

Витамин В2 (рибофлавин), один из важнейших водорастворимых витаминов, относящихся к ростовым факторам. В большой степени предопределяет физическое развитие. Рибофлавин нужен для полного расщепления углеводов. Суточная потребность взрослого человека в витамине Е2 составляет около 2,5 мг. Больше всего его содержится в мясе, печени, молоке, сыре, твороге и курином яйце. Достаточно много рибофлавина в стручках бобовых, в зародыше и оболочках пшеницы, ржи, овса.

Витамин РР (ниацин). Под этим названием известна группа водорастворимых витаминов, основными, наиболее распространенными в природе представителями которой являются никотиновая кислота и никотинамид. Избыток ниацина для организма опасности не представляет, хотя и может сопровождаться неприятным ощущением кожного жара. Основным источником витамина РР для человека являются продукты животного происхождения.

Витамин В6 (пиродоксин). Основные источники пиродоксина - молоко, творог, сыр, гречневая и овсяная крупы, мясо и субпродукты, куриное яйцо, рыба, хлеб из муки грубого помола. В зависимости от возраста и рода занятий взрослый здоровый человек должен получать с пищей в сутки 2,0-3,0 мг пиродоксина.

Витамин В12 (цианокобаламин) в организме человека принимает участие во многих обменных реакциях. При его недостатке в рационе может развиться тяжелая форма малокровия. Суточная потребность взрослого человека в витамине B12 составляет 0,02 мг, что вполне компенсируется наличием в рационе молока, творога, сыра, мяса, печени убойного скота и некоторых видов рыбы.

Витамин Р (рутин, цитрин) вместе с аскорбиновой кислотой участвует в важнейших для организма человека окислительно-восстановительных процессах. Гипоавитаминоз Р - причина крайне нежелательного повышения проницаемости кровеносных сосудов. Естественная потребность в рутине (25 мг) вполне восполняется наличием в пищевом рационе чая, цитрусовых, отвара сушеного шиповника. Много его в рябине, грецких орехах, черной смородине.

*6. Минеральные вещества* в организме человека не синтезируются и потому относятся к незаменимым компонентам питания. Их содержание в целом предопределяется химическим составом местных продуктов питания и питьевой воды.

Минеральные элементы, содержащиеся в тканях организма и продуктах питания в значительных количествах (десятки и сотни миллиграммов на 100 г продукта), принято называть макроэлементами. Это кальций, фосфор, магний, калий, натрий, хлор, сера.

Большое значение имеет поддержание в организме кислотно-щелочного равновесия, которое существенно зависит от характера питания: преобладание в нем кислотных (фосфор, сера, хлор) или щелочных (калий, натрий, магний и др.) минеральных веществ. Необходимо знать, что источниками кислых минеральных веществ являются пищевые продукты, содержащие в значительном количестве серу, фосфор, хлор. Это мясные, рыбные продукты, яйца, хлеб, крупа, макаронные изделия. Пищевые же продукты, в которых содержится значительное количество кальция, магния, натрия или калия, являются источниками щелочных элементов. Это растительные продукты - овощи, фрукты, ягоды, бобовые, а из животных - молоко и молочные продукты.

Железо, один из наиболее важных микроэлементов. Его основная биологическая роль в организме - вхождение в состав гемоглобина эритроцитов крови и железосодержащих ферментов. В теле взрослого человека содержится 3-4 г железа. Функцию переноса кислорода вдыхаемого воздуха (в составе гемоглобина) осуществляет примерно 60% этого количества железа.Суточная потребность взрослого здорового человека в железе (10-20 мг) восполняется обычным сбалансированным питанием. Наиболее богаты железом сушеные белые грибы, печень и почки убойного скота, персики, абрикосы, рожь, зелень петрушки, картофель, репчатый лук, тыква, свекла, яблоки, айва, груши, фасоль, чечевица, горох, толокно, куриное яйцо, шпинат. Железо из различных продуктов усваивается неодинаково. Железо, входящее в состав гемоглобина крови, миоглобина мышц мясной, рыбной пищи, клетками слизистой оболочки тонкой кишки всасывается практически полностью, чего нельзя сказать о железе, входящем в состав продуктов растительного происхождения или, например, в состав куриного яйца. Всасываемость железа в кишечнике человека обычно не превышает 20% общего его содержания в смешанном пищевом рационе.

Магний, один из жизненно важных минеральных элементов питания. В организме взрослого человека его содержится около 25 гСуточная потребность в магнии для взрослого человека составляет 400 (300-500) мг. В питании пожилых людей рекомендуется увеличение количества этого элемента, особенно при атеросклерозе, ишемической болезни сердца и гипертонии. Высоким содержанием магния отличаются продукты растительного происхождения.

Калий, жизненно необходимый минеральный элемент питания из числа макроэлементов. Он играет важную роль в функционировании клеток всех тканей организма, является непременным компонентом систем обеспечения кислотно-щелочного равновесия в тканевых и межтканевых жидкостях.

При обычном питании основным источником калия является картофель. Еще больше его в фасоли (1100 мг%) и горохе (870 мг%). В наибольшем количестве содержат калий сухофрукты. В персиковой кураге 2 г калия на 100 г продукта, в абрикосовой - 1,7 г, в сушеной вишне - 1,3 г, черносливе, изюме и сушеных грушах - около 0,9 г, в сушеных яблоках - 0,6 г. Суточная потребность человека в калии составляет 3-5 г. Обычное (сбалансированное) питание обеспечивает ее полностью.

Кальций, один из важнейших минеральных элементов питания. Участвует в пластических и обменных процессах, в формировании костной ткани. Он необходим для обеспечения деятельности сердца, входит в состав крови, участвует в процессах ее свертывания, а также в стабилизации защитных механизмов, повышающих устойчивость организма к болезням и действию внешних неблагоприятных факторов.

Наиболее значимыми и полноценными источниками кальция являются молоко и молочные продукты. Взрослому человеку нужно 800 мг кальция в сутки.

Натрий, один из наиболее важных минеральных веществ. Больше всего натрия содержится во внеклеточных жидкостях (лимфе и сыворотке крови), так же он присутствует практически во всех органах и тканях. В организм он поступает в основном в виде поваренной соли - хлорида натрия. Суточное потребление натрия составляет 4-6 г, что соответствует 10-15 г поваренной соли.

Фосфор, минеральный элемент питания, соединения которого активно участвуют во многих обменных процессах. В теле взрослого человека содержится 600-900 г фосфора. Излишнее поступление фосфора в организм вероятно при длительном преобладании в питании мясных, рыбных и зерновых продуктов. Основными источниками фосфора для человека являются животные продукты - мясо, рыба, яичный желток, творог, сыр, которые хорошо усваиваются.

Сера. Как минеральный элемент нечасто рассматривается в специальных пособиях по питанию человека, вероятно, в связи с тем, что потребность в нем (около 1 г в сутки) практически легко удовлетворяется обычным пищевым рационом и поэтому специфических заболеваний, связанных с дефицитом или избытком серы в питании, не установлено. Значительна роль серы в процессах обезвреживания ядовитых веществ в печени. Основные источники серы - продукты животного происхождения, но довольно значительно ее содержание и в растительной пище.

Йод. Источником йода являются пища и вода, а в приморских районах и воздух. В организме он обнаруживается во всех тканях, но основное его количество сосредоточено в щитовидной железе. Оптимальная норма потребления йода составляет 100-200 мкг в сутки. Наиболее естественно и эффективно включение в рацион морской рыбы и других продуктов моря (морской капусты, креветок и т. п.).

Марганец, микроэлемент, широко распространенный в окружающей Среде - почве, воде, пищевых продуктах. Он стимулирует процессы роста, необходим для поддержания функции воспроизводства, образования костной и нормального функционирования соединительной ткани.

Физиологическая потребность человека в марганце составляет 5-10 мг в сутки. Он содержится во многих продуктах животного и растительного происхождения, больше его в злаковых, бобовых (0,5-5 мг на 100 г съедобной части), в чае и кофе (1,3 мг в одной чашке).

Медь содержится практически во всех органах и тканях человека: в печени, мозге, сердце, почках, накапливается в мышечной и костной тканях. Суточная потребность в меди для взрослых составляет около 2 мг. Разнообразное питание обычно ее обеспечивает. Но детям, особенно при малокровии, в пищевой рацион необходимо включать продукты, наиболее богатые этим элементом, - печень, рыбу, овощи, лиственную зелень, черную смородину, клюкву, абрикосы, крыжовник, груши, клубнику.

Цинк. Норма содержания его в организме человека от 1,5 до 3 г, распределяется он в костях, коже, мышцах, волосах. Основные5 источники цинка - мясо, рыба, яйца, сыры. Богаты им грибы, зерновые, бобовые, орехи. Суточная потребность человека в цинке составляет 10-15 мг.

Хлор, один из минеральных элементов питания достаточно высокой активности. При обычном питании общее количество хлора у взрослых людей составляет 10-15 г. Для удовлетворения потребности организма взрослого человека требуется 4-6 г хлора в сутки. Содержание хлора в пищевых продуктах незначительно. Несколько больше его в крупах и бобовых, мало во фруктах и овощах. В продуктах животного происхождения хлора содержится значительно больше.

Минеральные вещества имеют отношение и к красоте. Железо оказывает влияние на чистоту и свежесть кожи. Сера входит в лекарства, применяемые для лечения угрей и перхоти. Йод укрепляет ногти. Магниевые соли придают упругость мышцам и улучшают питание кожи. Кальций, калий, фосфор укрепляют мышцы и кожу. Чем богаче рацион, тем больше в нем необходимых минеральных веществ.

*7. Пищевые волокна*. Этим термином определяются так называемые балластные вещества, вопрос о роли которых в составе пищи и сохранении функциональной и метаболической стабильности организма относится к наиболее новым и интересным проблемам гигиены питания. Химический анализ этих веществ показал, что в основном это некрахмальные полисахариды, которые могут быть разделены на целлюлозу (клетчатку) и нецеллюлозные полисахариды - гемицеллюлозы, пектин, запасные полисахариды, подобные инсулину и гуару, а также растительные камеди и слизи. Кроме того, в них входит неуглеродное вещество - лигнин. Пищевые волокна содержатся в больших количествах в хлебе из непросеянной муки, орехах, бобовых, несколько меньше их в овощах, корнеплодах, фруктах. Предполагается, что пищевые волокна, содержащиеся в некоторых продуктах питания, оказывают защитное действие против сахарного диабета, ишемической болезни сердца, некоторых заболеваний печени и толстой кишки. Пищевые волокна в значительных количествах попадают в организм человека вместе с овощами, фруктами, орехами, картофелем, горохом, фасолью и кукурузой.

*8. Вода* составляет около 70% нашего организма. Чтобы сохранить нормальный уровень воды в организме, мы нуждаемся в постоянном ее пополнении. Добавляя в рацион много фруктов и овощей, мы вводим в организм большое количество дистиллированной воды.

Пища не может быть усвоена без воды. С ее помощью идет превращение белков, крахмалов и жиров в пищу, необходимую для нормальной жизнедеятельности организма. Вода необходима также для стимуляции работы желудка, в кишечнике она помогает формированию фекальных масс и своевременному выводу их из организма.

Человек в среднем потребляет только около 2,5 л воды в день, а в его организме циркулирует до 5 л. Разницу и составляет метаболическая вода.

# 59. Каковы принципы конструирования биосенсоров?

*Биосенсоры* - это аналитические устройства, использующие биологические материалы для «узнавания» определенных моле­кул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. Принцип анализа, реализуемый в биосенсорах, основан на том, что биоматериал (ферменты, клет­ки, органеллы, иммунокомпоненты), иммобилизованный на физических датчиках, при взаимодействии с анализируемыми со­единениями генерирует зависимый от концентрации сигнал, ре­гистрируемый преобразователем.

Идея создания такого рода устройств возникла сравнительно недавно, в 60-х годах XX века. Впервые ее высказали Кларк и Лионе в 1967 г. Идея Кларка состояла в использовании фермент­ного электрода, т.е. электрохимического датчика с иммобилизо­ванным на его поверхности ферментом. Затем в обиход вошло понятие «биосенсор» или «биочип». Это важное событие к нау­ке. Здесь отражаются глубокие причины, связанные с так назы­ваемыми интеграционно-синтетическими процессами в науке, приводящими к появлению новых знаний.

Большинство биосенсоров ориентированы на анализ биологи­ческих жидкостей. Действительно, например, в крови находятся тысячи различных соединений. Задача заключается в том, чтобы быстро и эффективно (количественно) определить концентрацию нужного соединения, например, глюкозы. Для людей, страдаю­щих диабетом, это жизненно важный клинический анализ. Био­сенсоры обеспечивают такую возможность.

Функционально биосенсоры сопоставимы с датчиками живо­го организма — биорецепторами, способными преобразовывать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды, в элек­трические. Наибольшее распространение сейчас получили био­сенсоры на основе ферментов, Среди таких устройств различают субстратные и ингибиторные биосенсоры. С их помощью реша­ют различные медико-биологические задачи (например, опреде­ление сахара в крови) и контролируют состояние среды обитания (контроль содержания токсикантов). Чувствительность ингиби­торных биосенсоров чрезвычайно высока, например, возможно определение остаточных количеств некоторых пестицидов на уровне 0.01 мкг/л и меньше.

*Принципы конструирования биосенсоров*. Конструктивно любой биосенсор представляет комбинированное устройство, состоящее из двух принципиальных функциональных элементов: биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Биохимический элемент представляет собой *биоселектирующую структуру* и выполняет функцию биологического элемента распознавания. В качестве бкохимического преобразователя используют все типы биологических структур: ферменты, антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты и даже живые клетки. Физический преобразователь сигнала, на­зываемый *трансдьюсер,* преобразует определяемый компонент, а точнее, концентрационный сигнал, в электрический. Для счи­тывания и записи информации используют электронные системы усиления и регистрации сигнала.

Трансдьюсерами могут быть электрохимические преобразо­ватели (электроды), различного рода оптические преобразовате­ли, гравитационные, калориметрические, резонансные системы. Все виды биоселектирующих элементов можно комбинировать с

различными трансдьюсерами. Это создает большое разнообразие различных типов биосенсоров.

Основными характеристиками, позволяющими биосенсорному анализу успешно конкурировать с традиционными методами, являются оперативность анализа, высокая специфичность и чув­ствительность при низкой стоимости, отсутствие необходимости использовать дорогостоящую аппаратуру и квалифицированный персонал.

Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойст­вами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким Дополнительным операциям, связанным с использованием дру­гих реагентов, концентрированием и т.д. (отсюда и название безреагентные методы анализа). Существует большое разнообра­зие физических преобразователей: электрохимические (электро­ды), спектроскопические (оптроды), пьезоэлектрические и т.д.

Разработка биосенсоров относится к наукоемким технологиям и представляет одну из ветвей современной биотехнологии. В настоящее время существует несколько типов биосенсоров. Наи­большее развитие получили ферментные и клеточные биосенсо­ры. Например, ферментные электроды, ферментные микрокало­риметрические датчики, биодатчики на основе хеми— и биолю­минесценции.

*Ферментные (или безреагентные) электроды –* используют электрохимический способ определения веществ, образующихся в ходе ферментативного превращения. Представляют собой электрод с нанесенным поверхностным слоем (каким-либо при­родным полимером), содержащим один или несколько иммоби­лизованных ферментов (иногда фермент может находиться в растворимом состоянии в приэлектродном слое, окруженном мембраной). В зависимости от типа взятого за основу электрода подразделяются на потенциометрические и амперометрические.

*Ферментные микрокалориметрические датчики* - использу­ют тепловой эффект ферментативной реакции. Состоит из двух колонок (измерительной и контрольной), заполненных носите­лем с иммобилизованным ферментом и снаряженных термисто-рами. При пропускании через измерительную колонку анализи­руемого образца происходит химическая реакция, которая со­провождается регистрируемым тепловым эффектом. Данный тип датчиков интересен своей универсальностью.

*Хеми- и биолюминесцентные датчики —* регистрируется све­товое излучение с различной длиной волны, испускаемое про­дуктами ферментативной реакции, находящимися в возбужден­ном состоянии. Конструкция включает колонку с иммобилизо­ванными на носителе ферментами (люциферазой, пероксидазой) и светоприемное устройство. Заложенный в систему этого типа датчиков аналитический метод характеризуется, прежде всего, крайне высокой чувствительностью — позволяет определять фем-томольные (10-12М) количества вещества.

*Клеточные биосенсоры.* Одно из достижений биотехнологии связано с развитием методов включения живых клеток в полимеры и твердые носители различной природы, и применение та­кого рода материалов для решения задач медицины, управляемо­го биосинтеза, анализа. Иммобилизованные клетки обладают рядом удивительных свойств.

 Клетки являются доступным биологическим материалом. Используют клетки растений, животных, человека, ко наи­большее применение нашли клетки микроорганизмов, ко­торые культивируются, легко воспроизводятся и поддер­живаются в чистой культуре. В отличие от ферментов при использовании клеток не требуется дорогостоящих стадий очистки.

Имеющиеся методы иммобилизации: позволяют получить клетки, сохраняющие около 100% активности ферментов и способные функционировать достаточно длительные про­межутки времени. Клетки сохраняют все наиболее важные структуры и проявляют большую стабильность. В некото­рых случаях клетки сохраняют жизнеспособность и актив­ность ферментных систем в течение нескольких лет.

 Клетки сохраняют, как правило, все системы жизнеобеспе­чения. Это позволяет проводить сложные последователь­ные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

Для многих типов клеток, особенно микробных, разрабо­таны эффективные методы генетических операций, даю­щие возможность получать мутанты с высоким содержа­нием того или иного белка или фермента, что дает воз­можность оперировать с высокоэффективными каталити­ческими системами. Поскольку клетки сохраняют аппарат биосинтеза белка, потенциально могут быть разработаны высокоэффективные методы генодиагностики. Основными недостатками этих биосенсоров являются мед­ленный отклик электрода, связанный с необходимостью исполь­зовать толстые мембраны, а также сравнительно низкая селек­тивность, обусловленная присутствием в клетке или тканях не­скольких ферментных систем.

Для создания клеточных биосенсоров используют различные физические трансдьюсеры: электрохимические (амперометриче-ские, потенциометрические), оптические, акустические, калори­метрические. Развитие получили биосенсоры с использованием техники LAPS (светоадресуемых потенциометрических сенсо­ров). На основе LAPS-системы созданы достаточно чувствитель­ные системы слежения за физиологическим состоянием отдель­ных клеток - так называемые микрофизиометры.

Для создания биосенсоров используют микроорганизмы: *Neyrospora europea -*  для определения аммиака, *Trichosporon brassicae -* для определения уксусной кислоты, *Sarcina flava —* для определения глутамина, *Azoiobacier vineiaudii —* для опреде­ления нитратов и другие. В тканевых электродах используют срезы почек и печени свиньи, срезы желтой тыквы, банана и другие. На основе гриба *Aspergilus niger* группой японских уче­ных были созданы биосенсоры для определения биогенных ами­нов в мясных продуктах.

Для иммобилизации клеток с сохранением их активности первоначально использовали материалы природного происхож­дения: желатину, агар, альгинат кальция, каррагенан. В послед­ние годы разработаны и развиты методы включения живых кле­ток в синтетические полимерные гели. Особенно интересные и перспективные результаты получены с использованием так на­зываемого метода криоиммобилизации клеток. Процедура крио-иммобилизации состоит из стадии получения суспензии клеток: в растворе полимера, замораживания суспензии с получением криоструктурированных гелей, размораживания с образованием пористого, механически прочного материала, устойчивого до температур 70-80°С. Клетки, включенные в такого рода порис­тый материал, сохраняют активность и способны функциониро­вать в течение нескольких месяцев.

# 64. Приведите примеры микробных ферментов, использующихся вместо растительных и животных.

Микробные *ферменты* все активнее заменяют растительные и животные ферменты. Так, амилазы из *Bacillus* и *Aspergillus* за­менили аналогичные ферменты из пшеничного солода и ячменя в пивоварении, хлебопечении и производстве сухого печенья, а также в текстильной промышленности; протеазы из *Aspergillus* - животные и растительные протеазы, употребляемые для раз­мягчения мяса: протеазы из *Aspergillus* и *Bacillus lichemformis* заменили панкреатические протеазы в процессе размягчения ко­жи (дубления) и в производстве моющих средств; реннины из M*ucor* — сычужный фермент из желудка телят в сыроварении.

**Ферменты и их применение**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ферменты** | **Продуценты** | **Применение** |
| Амилазы | Бактерии, грибы | Производство патоки, глюкозы, этанола. Добав­ка к хлебопродуктам. Способствующее пище­варению средство |
| Протеазы из микроорганизмов | Бактерии, грибы | Производство и созревание сыра. Приготовление соевого соуса и получение аминокислот.Выделка кожи. Активаторы пищеварения (дайджестанты). Осветление пива. Удаление бел­ковых комков из алкогольных напитков. Размяг­чение мяса (папайи). Производство моющих средств. |
| Реннин | Желудок теленка, грибы | Производство сыра |
| Липазы | Дрожжи | Производство масла и глицеридов. Активаторы пищеварения (дайджестанты) |
| Пеюгйназы | Грибы | Осветление и повышение выхода зина и фруктовых соков |
| Гемицеллюлазы | Грибы | Гидролиз гемицеллюлоз злаков и овощей |
| Целлголазы | Грибы | Гидролиз целлюлозы в глюкозу. |
| Инулаза | Бактерии, грмбы | Гидролиз инулина во фруктозу. |
| Инвертаза | Дрожжи | Предотвращение кристаллизации сахара в производстве кондитерских изделий. Производ­ство шоколада, высококачественной мелассы. |
| Глюкозоизомераза | Бактерии | Превращение глюкозы во фруктозу, |
| Нарингиназа | Грибы | Устранение горького привкуса соков цитрусовых. |
| Антоцианаза | Грибы | Обесцвечивание фруктовых соков |
| ДНКаза, рибонуклеотидаза | Бактерии, грибы | Гидролиз ДНК; получение монодезоксирибо- нуклеотидов и рибонуклеотидов, получение инозиновой кислоты |
| Глюкозооксидаза | Бактерии | Удаление кислорода или деструкция глюкозы для антисептики пищевых продуктов. Получение обезвоженного яичного порошка. |
| Каталаза | Бактерии | Стерилизация молока |
| Уреаза | Дрожжи, грибы | Разрушение мочевой кислоты |

В настоящее время в промышленных масштабах получают четыре фермента: протеазу, глюкоамилазу, а-амилазу и глюко-зоизомеразу. Мировой рынок данных ферментов оценивается на сумму около 300 млн долл. Ежегодно производится 530 т протеа-зы, 350 т глюкоамилазы, 320 т а-амилазы и 70 т глюкозоизоме-разы. Основными производителями являются европейские ком­пании, причем 60% всей мировой торговли ферментами прихо­дится на датскую фирму «Ново индастри» и голландскую фирму «Гито-Брокадес НВ».

Все ферменты подразделяют на две категории - *внеклеточ­ные* и *внутриклеточные* ферменты. К первой категории относят­ся ферменты, выделяемые клеткой в среду, где они расщепляют питательные полимерные вещества до низкомолекулярных со­единений, которые могут проникать в клетку через клеточную стенку. Внутриклеточные ферменты в нормальных условиях сконцентрированы в объеме клетки и в среду не транспортиру­ются. Поэтому для их выделения необходимо разрушить клетки тем или иным способом.

Для некоторых областей применения ферментов необходимы относительно чистые препараты. Например, глюкозооксидаза, применяющаяся в производстве яичного порошка, не должна содержать ферменты расщепления яичного белка. Протеазы, во­димые внутримышечно домашнему скоту перед забоем для мяг­чения мяса не должны содержать никаких соединений, которые могли бы вызвать аллергическую реакцию у потребителей этого мяса. Относительно чистые ферменты применяются в клиниче­ской диагностике и в процессах, связанных с производством и обработкой пищевых продуктов.

В то же время многие из применяемых в промышленности препаратов ферментов очищены в гораздо меньшей степени. Как правило, они содержат ряд ферментов с различными каталитиче­скими свойствами.

Ценность, полученных микробиологическим способом фер­ментов наиболее ярко демонстрирует превращение крахмала в кукурузную патоку с высоким содержанием фруктозы, заме­няющую сахарозу в безалкогольных напитках. Хотя этот процесс внедрен в производство недавно, он уже дает более 2 млн. т па­токи в год. Превращение крахмала происходит в три этапа, на которых субстрат последовательно подвергается воздействию *а-амилазы, глюкоамилазы* и *глюкозоизомеразы.*

Стоимость выработанной патоки зависит исключительно от эффективности способа получения ферментов. Буньи Маруо и его сотрудники из Университета Нихон увеличили выход а-амилазы из *Bacillus subtilis* почти в 200 раз, комбинируя класси­ческие методы мутагенеза и селекции с техникой генетической рекомбинации. Они обнаружили ряд регуляторных механизмов, контролирующих синтез а-амилазы; действуя совместно, эти регуляторы повышают выход фермента в отобранных штаммах *В.subtilis.*

Технология рекомбинантных ДНК была использована также для производства температуроустойчивой а-амилазы. Бактерия *B.subtilis* растет при комнатной температуре, и синтезируемая ею а-амилаза легко денатурируется при нагревании. Если бы фер­мент обладал активностью при повышенной температуре, ката­литическое расщепление крахмала до глюкозы протекало бы с более высокой скоростью. Один из возможных путей для полу­чения такого фермента - это встраивание в геном *B.subtilis* гена а-амилазы из термофильной бактерии. Термофильные бактерии живут при повышенной температуре, и их ферменты устойчивы к нагреванию. Однако эти бактерии не могут служить источни­ком а-амилазы, так как организация их генома изучена плохо. Шойи Шиномия и его сотрудники из Токийского университета продемонстрировали, что введение в *В.subtilis* гена а-амилазы из термофильной бактерии приводит к увеличению выхода термо­стабильной а-амилазы.

Другим путем повышения эффективности производства фруктозы могла бы стать замена трех этапов утилизации крахма­ла одним. Этого можно достичь, включив в геном одного орга­низма гены для а-амилазы, глюкоамилазы и глюкозоизомеразы Превращение крахмала в кукурузную патоку с высоким содер­жанием фруктозы проходило бы тогда в одном ферментацион­ном сосуде.

*Протеазы* в промышленных масштабах выделяют из орга­низмов животных (из поджелудочной железы), высших растений (из соков и латексов), а также из дрожжей, плесеней и бактерий.

Протеазы применяются в производстве моющих средств, в химической чистке, при мягчении мяса, в сыроделии (только реннин), дублении, извлечении серебра из фотографических пленок и бумаг, производстве препаратов, способствующих пи­щеварению, а также в медицине при лечении воспалительных процессов и ран.

В качестве добавок к моющим средствам ферменты применя­лись, начиная уже с 19.13 г. Особенно резкий рост потребления протеаз в производстве детергентов наблюдался в конце 1960-х гг. наибольшего уровня производство ферментов для этих целей достигло в 1969 г., когда с ферментными добавками выпускалось 30-75% всех моющих средств в Западной Европе и 40% в США. Затем Федеральная комиссия по торговле США высказала опа­сение, что детергенты опасны для здоровья человека и окру­жающей среды. В результате в 1970-1971 гг. производство бак­териальных протеолитических ферментов резко сократилось. Позднее Федеральная комиссия сняла предупреждение. Были. внедрены усовершенствованные методы. В результате уже в 1980 г. в США было произведено протеаз на сумму около 6 млн. долл.

Различные методы мягчения разделанных мясных туш осно­ваны на использовании недорогих и устойчивых к действию теп­ла растительных протеаз папаина и бромелаина. До разделки и расфасовки целые туши подвергают действию протеаз при тем­пературе около 15°С с одновременным облучением ультрафио­летом, что предотвращает развитие нежелательных микроорга­низмов.

Сырые ферментные препараты поджелудочной железы раз­личных животных содержат все пищеварительные протеазы и обладают мощной активностью. Поэтому они используются для обезволашивания (удаления волос) шкур животных.

В молочной промышленности широко применяется только один фермент - реннин. Реннин превращает растворимый казеи­нат кальция в относительно малорастворимый параказеинат кальция, осаждающийся в виде творожного сгустка. Нехватка животного реннина стимулировала разработку методов получе­ния аналогичных бактериальных ферментов. С помощью мето­дов генетической инженерии реннин теленка теперь получают с помощью микроорганизмов.

Свободные или внеклеточные ферменты находят все более широкое применение в медицине.

**Ферменты, применяющиеся в медицине**

|  |  |
| --- | --- |
| **Фермент** | **Область применения** |
| Трипсин | Противовоспалительное средство; применяется при обработке ран |
| Глюкозооксидаза | Определение глюкозы в крови и моче |
| Лизоцим | Лечение некоторых язв, кори, рассеянного склероза, ряда кожных заболеваний и послеопера­ционных инфекций (антибактериальное средст­во) |
| Гиалуронидаза | Вводится совместно с другими лекарственнымипрепаратами для облегчения их проникновения |
| Стрептокиназа | Противовоспалительное средство |
| Пенициллиназа | Разрушает аллергенные формы пеиициллинов у чувствительных к ним больных |
| Урокиназа | Предотвращение и рассасывание тромбов в кровеносных сосудах |
| Активатор тканевого плазминогена | Растворение тромбов к кровеносных сосудах |
| Аспарагимаза | Противоопухолевое средство |

Протеазы применяются в медицине и клинической практике в качестве способствующих пищеварению средств, а также при лечении тяжелых ран. Поскольку ферменты представляют собой белки, то способствующие пищеварению ферменты применяют только в капсулах, предохраняющих ферменты от кислой среды желудка, которая неминуемо вызвала бы их разрушение. Из при­меняемых в медицине протеаз нет ни одного, который был бы выделен из организма человека.

Введение протеаз животных человеку применяется также для подавления воспалительных процессов в тканях. В отличие от живых мертвые клетки обычно не способны защищать себя от действия протеаз. На этом различии основано применение рас­творов протеаз для лечения вирулентных ран. Протеазы способ­ствуют размягчению омертвевшей ткани и клеток, облегчая тем самым дренаж ран и ускоряя их заживление.