

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

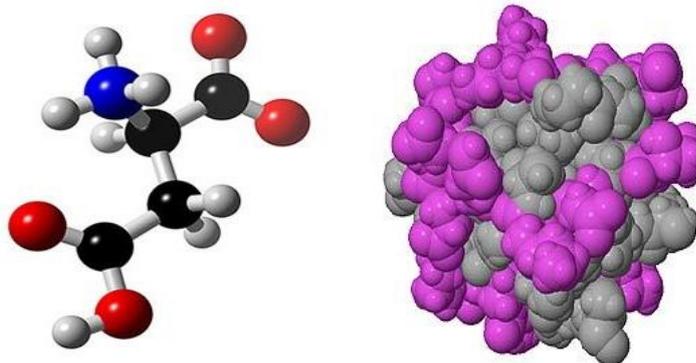


Кафедра фундаментальной и клинической биохимии

Введение в биохимию.

Аминокислоты. Белки

Учебно-методическое пособие
для студентов 1 и 2 курса медицинского вуза



Краснодар
2019

УДК 577
ББК 28.072
В 24

Составители: сотрудники кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

М.Г. Литвинова, к.м.н., доцент,

К.И. Мелконян, к.м.н., доцент

Под редакцией заведующего кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, д.м.н., профессора, Заслуженного деятеля науки РФ **И.М. Быкова**.

Введение в биохимию. Аминокислоты. Белки: учебно-методическое пособие/ М.Г. Литвинова, К.И. Мелконян, под ред. И.М. Быкова. – Краснодар, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, 2019. – 110 с.

Рецензенты:

Доценко В.В., д.х.н., профессор кафедры органической химии и технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет».

Стрелков В.Д., д.х.н., профессор кафедры органической химии и технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет».

Учебно-методическое пособие «Введение в биохимию. Аминокислоты. Белки» для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной работы подготовлено на базе рабочих программ по химии и биохимии (2017), составленных в соответствии с ФГОС ВО (3+ и 3++). Предназначено для студентов 1 и 2 курсов лечебного, педиатрического, стоматологического и медико-профилактического факультетов Кубанского государственного медицинского университета. Может быть использовано аспирантами.

Рекомендовано к изданию ЦМС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Протокол № 11 от 21 июня 2019 года.

УДК 577
ББК 28.072
Литвинова М.Г., Мелконян К.И.

Оглавление

Предисловие.....	5
Введение.....	6
Рекомендуемая литература.....	9
Глава 1. АМИНОКИСЛОТЫ.....	10
Краткая теоретическая часть.....	10
§ 1. Строение, классификация аминокислот.....	10
1.1 Стереоизомерия аминокислот.....	16
1.2 Биологическая роль аминокислот.....	18
§ 2. Свойства аминокислот.....	20
2.1 Физические свойства.....	20
2.2 Изoeлектрическая точка аминокислот (pI).....	21
2.3 Химические свойства аминокислот.....	24
2.3.1 Амфотерность аминокислот.....	24
2.3.2 Реакции карбоксильной группы.....	24
2.3.3 Реакции аминогруппы.....	25
2.3.4 Реакции функциональных групп, содержащихся в радикалах аминокислот.....	28
2.3.5 Специфические реакции α -аминокислот.....	30
2.3.6 Специфические реакции аминокислот, имеющие аналитическое значение.....	34
2.3.7 Реакции аминокислот в организме (<i>in vivo</i>).....	35
§ 3. Обмен аминокислот.....	45
3.1 Обмен отдельных аминокислот.....	45
3.2 Применение аминокислот в качестве лекарственных препаратов.....	51
§ 4. Методы анализа аминокислот.....	53
4.1 Качественные реакции (см. подраздел 2.3.6).....	53
4.2 Количественный химический анализ – титриметрический метод.....	53
4.3 Хроматографические методы анализа.....	55
§ 5. Обучающие и контролирующие материалы.....	59
5.1 Задачи с решением.....	59
5.2 Вопросы и задачи для самостоятельного выполнения.....	61
5.3 Тестовые задания.....	62
Глава 2. БЕЛКИ, ПОЛИПЕПТИДЫ.....	69
Краткая теоретическая часть.....	71
§ 1. Основные понятия. Классификации белков, полипептидов.....	69
1.1 Основные понятия.....	69
1.2. Классификации белков.....	70
1.3 Классификации полипептидов.....	73
1.4 Биологические функции полипептидов, белков.....	75
§ 2. Строение полипептидов и белков.....	80
§ 3. Кислотно-основные свойства белков.....	88
3.1 Изoeлектрическая точка белков.....	88
§ 4. Коллоидные свойства белков.....	90
4.1 Растворимость.....	91
4.2 Устойчивость белков как лиофильных коллоидов.....	91
4.2.1 Высаливание.....	92
4.2.2 Денатурация.....	94
§ 5. Методы анализа белков.....	96
5.1 Качественные реакции.....	96

5.2 Методы количественного определения белка	96
в биологическом материале.....	96
5.2.1 Электрофорез	97
5.2.2 Хроматография.....	99
§ 6. Применение растворов белков и пептидов, а также белковых гидролизатов в медицине	100
§ 7. Обучающие и контролируемые материалы	103
7.1 Задания с решением.....	103
7.2 Вопросы и задачи для самостоятельного выполнения.....	105
Контрольные вопросы	105
7.3 Тестовые задания	107
7.4 Ответы на тестовые задания	113
Использованная литература	114
Приложение.....	117

Предисловие

Учебно-методическое пособие «Введение в биохимию. Аминокислоты. Белки» предназначено для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной работы студентов 1 и 2 курсов лечебного, педиатрического, стоматологического факультетов и направлено для формирования у них понимания тесной интеграции химии и биохимии, биохимии и генетики, биологии, клиники.

Цель данного пособия – отбор учебного материала, его систематизация, структурирование для методической помощи студентам в освоении учебного материала касающегося современной биохимии аминокислот и белков с учетом их медико-биологической направленности, формирования умений и навыков интеллектуального характера.

Предлагаемое учебно-методическое пособие составлено с учетом требований ФГОС ВО, на основе реализации дидактических принципов преемственности и последовательности, межпредметной интеграции, профессиональной направленности.

Преемственное, интегративное, профессионально направленное изучение химии и биохимии аминокислот и белков студентами первого и второго курсов медицинского вуза направлено на формирование у них как универсальных, так и общепрофессиональных компетенций, создающих основу будущего профессионализма.

Учебно-методическое пособие содержит в краткой форме основной фундаментальный теоретический материал, а также некоторый дополнительный информационный блок для стимулирования мотивации, развития интереса к химическому компоненту медицинского образования. В пособие включены учебные задания обучающего и контролирующего характера.

Обучающие и контролирующие материалы подобраны с учетом принципов фундаментализации, межпредметной интеграции, рациональной минимизации, профессиональной направленности.

Список основной и дополнительной литературы, ресурсы Интернет дают возможность студентам самостоятельно работать с другими учебными материалами.

Профессиональная направленность содержания, четкая формулировка целей его изучения, предложенная методическая поддержка позволят студентам освоить необходимый химический и биохимический учебный материал, осознать его значимость для медицинского образования.

Данное учебно-методическое пособие рассчитано на развитие у студентов познавательной активности, формирования комплекса компетенций, понимания значимости химических знаний для освоения биохимии, и, далее физиологии, фармакологии, клинических дисциплин, молекулярной медицины.

Учебно-методическое пособие может быть полезным для студентов старших курсов всех факультетов медицинского вуза, аспирантов.

Введение

Биохимия – биологическая наука, которая располагается на стыкочных наук, изучающих физические и химические явления, и биологических дисциплин. Биохимические процессы, протекающие в живом организме, полностью подчиняются всем известным физическим и химическим законам. Биохимия показывает, как на основе физических и химических явлений возникает качественно новое состояние материи – биологическая функция.

Биологическая химия – наука, изучающая химическую природу веществ, входящих в состав живых организмов, превращения этих веществ (метаболизм), а также связь этих превращений с деятельностью отдельных тканей и всего организма в целом.

Биохимия – это наука о молекулярных основах жизни.

Задачи биохимии:

1. Дать объяснение, как функционирует организм на молекулярном уровне в норме.
2. Изучить и объяснить нарушения на уровне молекулярных процессов, приводящих к заболеваниям, а также выявить эффективные пути лечения.

Объектами биохимических исследований являются:

1. Организмы.
2. Отдельные органы и ткани.
3. Срезы органов и тканей.
4. Гомогенаты органов и тканей.
5. Биологические жидкости.
6. Клетки.
7. Дрожжи, бактерии.
8. Субклеточные компоненты и органоиды.
9. Ферменты.
10. Химические вещества (метаболиты).

В зависимости от объекта исследований выделяют биохимию микроорганизмов, простейших, растений, животных. В медицинском вузе изучают биохимию человека – медицинскую биохимию.

В медицинской биохимии можно выделить три основных раздела:

1. *Статическая биохимия* – изучает химическую природу организма.
2. *Динамическая биохимия* – изучает обмен веществ в организме (метаболизм).
3. *Функциональная биохимия* – изучает роль превращений веществ в функционировании клеток, тканей, органов организма.

К актуальным методам исследования в биохимии относятся:

1. Гомогенизация тканей.
2. Центрифугирование:

- а) простое
 - б) ультрацентрифугирование
 - в) центрифугирование в градиенте плотности.
3. Диализ.
 4. Электрофорез.
 5. Хроматография.
 6. Изотопный метод.
 7. Колориметрия.
 8. Спектрофотометрия.
 9. Определение ферментативной активности.

Биохимия тесно связана с другими дисциплинами, изучаемыми в медицинском вузе:



Существует несколько причин тому, что в наши дни биохимия привлекает большое внимание и быстро развивается.

В последние десятилетия сделан ряд выдающихся открытий в биологической химии и в некоторых ее разделах: энзимологии, биохимической генетике, молекулярной биологии, биоэнергетике и др., что выдвигает ее в разряд фундаментальных научных дисциплин и делает биохимию мощным орудием решения многих важных проблем биологии и медицины.

Белки составляют основу и структуры, и функции живых организмов.

Белки – высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, состоящие из аминокислот, соединенных в полипептидные цепи с помощью пептидных связей, и имеющие сложную структурную организацию.

Аминокислоты – не только структурные единицы белков, они выполняют многочисленные функции в организме человека (рис. 1).

Ф. Энгельс в работе «Анти Дюринг» дал определение жизни: «Жизнь – есть способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой. Причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и сама жизнь, что приводит к разложению белка».



(Рис. 1 из <https://100ing.ru/publication/biologicheskie-funkcii-aminokislot/>)

Исключительная важность взаимосвязанных разделов «Аминокислоты» и «Белки» для понимания и объяснения многих проявлений жизни, биохимии как науки и дисциплины стала причиной написания данного методического пособия.

Рекомендуемая литература

Основная

1. Биологическая химия: учебник / Т. Т. Березов; Б.Ф. Коровкин. – Москва : Медицина, 2008, 2012, 2016. – 744 с.
2. Биохимия: учебник / Под ред. чл.-корр. РАН проф. Е.С. Северина – Москва : МИА, 2008. Москва : "ГЭОТАР-Медиа", 2016. – 768 с.
3. Слесарев, В.И. Химия: Основы химии живого: учебник для вузов / В.И. Слесарев. – Санкт-Петербург : Химиздат, 2007, 2009, 2015, 2017.– 784 с.
4. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия: учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 416 с.

Дополнительная

1. Наглядная биохимия / Я. Кольман; К.-Г. Рем. Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009, 2012. – 469 с.
2. Биохимия и молекулярная биология / Н.А. Белясова. – Минск : Книжный Дом, 2004. – 414 с.
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами / Под ред чл.-кор РАН проф. С. Е. Северина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008, 2012.– 384 с.
4. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев. – Москва : МИА, 2001, 2004, 2007. – 565 с.
5. Лекции
6. Основы биоорганической химии: учебно-методическое пособие / М.Г. Литвинова.– Краснодар, КубГМУ, 2017. – 156 с.

Интернет-ресурсы

<p>ЭБС «Консультант студента Электронная библиотека ме- дицинского вуза» https://www.biochemistry.pro http://www.college.ru/chemistr у http://www.alhimik.ru</p>	<p>http://www.studmedlib.ruhttps://www.xumuk.ru / http://www.chem21.info https://himija-online.ru/organicheskaya-ximiya/aminokisloty</p>
--	---

Глава 1 АМИНОКИСЛОТЫ

После изучения темы студент должен

Знать:

- строение, стереохимию аминокислот;
- классификацию аминокислот;
- физические свойства аминокислот;
- химические свойства, биологически важные реакции аминокислот;
- биологическую роль аминокислот;
- общий и индивидуальный обмен аминокислот;
- применение аминокислот в качестве лекарственных препаратов;
- методы анализа аминокислот.

Уметь:

- изображать структурные формулы аминокислот, входящих в состав белков;
- расшифровывать сокращенные названия аминокислот;
- писать химические реакции аминокислот (по амино- и карбоксильной группе), метаболические реакции аминокислот;
- строить пептиды, называть их;
- устанавливать причинно-следственные связи между строением и свойствами аминокислот и их производными;
- обобщать приобретенные знания по химии аминокислот, применять их для характеристики белков.

Владеть навыками:

- поисково-аналитической работы с информацией (учебной, научной, нормативно-справочной литературой, и другими источниками), с информационными технологиями, Интернет-ресурсами.

Краткая теоретическая часть

§ 1. Строение, классификация аминокислот

Для аминокислот можно дать следующие определения:

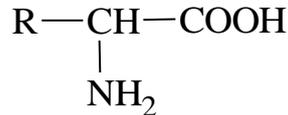
Аминокислоты – органические карбоновые кислоты, у которых хотя бы один из атомов водорода углеводородной цепи замещен на аминогруппу.

Аминокислоты – структурные единицы белков, содержащие аминогруппу ($-\text{NH}_2$), карбоксильную группу ($-\text{COOH}$), атом водорода и боковую цепь, связанную с α -углеродным атомом.

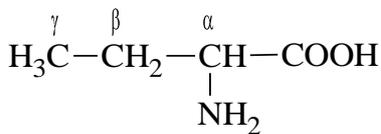
Аминокислоты – гетерофункциональные производные углеводов, которые содержат, как минимум, две разные функциональные группы: карбоксильную группу $-\text{COOH}$ и аминогруппу $-\text{NH}_2$.

В настоящее время установлено, что в природе встречается около 300 аминокислот. Многие из них найдены только в нескольких организмах, а некоторые – только в каком-либо одном организме. У человека найдено около 60 различных аминокислот и их производных.

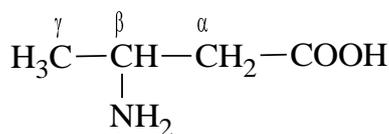
Все природные аминокислоты, входящие в состав белков, содержат аминогруппу только в α -положении и имеют общую формулу:



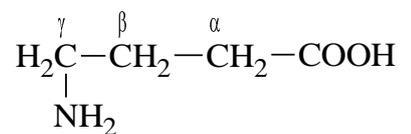
В зависимости от положения аминогруппы по отношению к карбоксильной группе различают α , β , γ и так далее аминокислоты:



α -аминомасляная
кислота



β -аминомасляная
кислота



γ -аминомасляная
кислота

В настоящее время единой классификации аминокислот не существует.

Аминокислоты могут быть природными (содержатся в растениях и животных организмах) и синтетическими, т.е. получены искусственным путем.

Аминокислоты, входящие в состав белков (их 20), называются *протеиногенными*. Те аминокислоты, которые не участвуют в образовании белков, являются *непротеиногенными*.

Приняты также следующие классификации аминокислот:

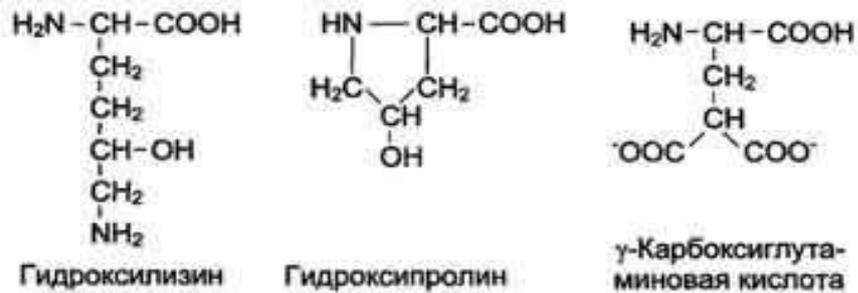
1. Структурная – по строению бокового радикала.
2. Электрохимическая – по кислотно-основным свойствам.
3. Биологическая – по степени незаменимости аминокислот для организма.

Незаменимые аминокислоты не могут синтезироваться организмом из других соединений, поэтому они обязательно должны поступать с пищей или с биодобавками. Дефицит их повышает риск развития серьезных заболеваний. Абсолютно незаменимых аминокислот для человека восемь: валин, лейцин, изолейцин, треонин, лизин, метионин, фенилаланин, триптофан.

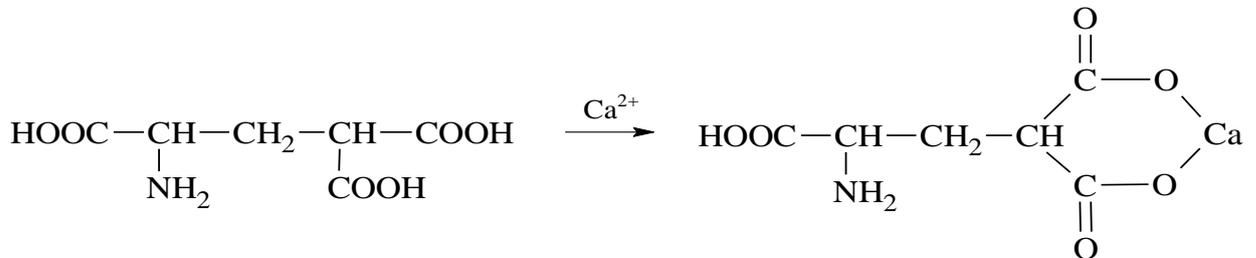
Частично заменимые аминокислоты синтезируются в организме, но в небольшом количестве, поэтому они тоже должны поступать в организм с пищей или в составе биодобавок. Такими аминокислотами являются аргинин и гистидин.

Есть группа условно заменимых аминокислот, которые синтезируются только при наличии незаменимых аминокислот. Такими являются: тирозин и цистеин.

Это интересно! Существуют модифицированные аминокислоты, содержащие в радикале дополнительные функциональные группы: гидроксизин, гидроксипролин, γ -карбоксиглутаминовая кислота и др.



Эти аминокислоты могут входить в состав белков, однако модификация аминокислотных остатков осуществляется уже в составе белков, т.е. только после окончания их синтеза. Введение дополнительных функциональных групп в структуру аминокислот придает белкам свойства, необходимые для выполнения ими специфических функций. Так, γ -карбоксиглутаминовая кислота входит в состав белков, участвующих в свертывании крови. Две близко находящиеся карбоксильные группы необходимы для связывания белка с ионами Ca^{2+} :



Нарушение карбоксилирования глутамата приводит к снижению свертываемости крови.

По природе радикала аминокислоты делят на:

1. Моноаминомонокарбоновые

Строение радикала кислоты -R	Название		Условное обозначение
	Тривиальное	Систематическое	
-H	Глицин	аминоэтановая	Гли Gly
-CH ₃	Аланин	2-аминопропановая	Ала Ala
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ / \\ -\text{CH} \\ \backslash \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Валин	2-амино-3-метил- бутановая	Вал Val
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ / \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \backslash \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Лейцин	2-амино-4-метил- пентановая	Лей Leu

$\begin{array}{c} \text{—CH—CH}_2\text{—CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Изолейцин	2-амино-3-метил-пентановая	Иле Ile
--	-----------	----------------------------	------------

2. Гидроксилсодержащие

Строение радикала кислоты —R	Название		Условное обозначение
	Тривиальное	Систематическое	
$\text{—CH}_2\text{—OH}$	Серин	2-амино-3-гидрокси-пропановая	Сер Ser
$\begin{array}{c} \text{—CH—OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Треонин	2-амино-3-гидрокси-бутановая	Тре Thr
$\text{—CH}_2\text{—} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{—OH}$	Тирозин	2-амино-3-(4-гидроксифенил) пропановая	Тир Tyr

3. Серусодержащие

$\text{—CH}_2\text{—SH}$	Цистеин	2-амино-3-меркаптопропановая	Цис Cys
$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—S—CH}_3$	Метионин	2-амино-4-метилтиобутановая	Мет Met

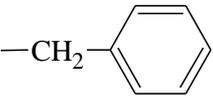
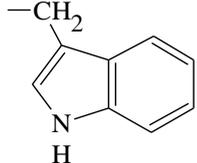
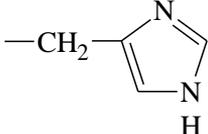
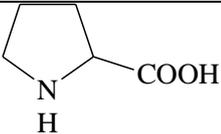
4. Аминокислоты, содержащие в радикале дополнительную аминогруппу или гуанидильный остаток

$\text{—CH}_2\text{—(CH}_2\text{)}_3\text{—NH}_2$	Лизин	2,6-диаминогексановая	Лиз Lys
$\text{—CH}_2\text{—(CH}_2\text{)}_2\text{—NH—C(=NH)—NH}_2$	Аргинин (содержит гуанидиновую группу)	2-амино-5-гуанидилпентановая	Арг Arg

5. Аминокислоты, которые содержат в радикале дополнительную карбоксильную или амидную группы

$\text{—CH}_2\text{—COOH}$	Аспарагиновая	2-аминобутан-диовая	Асп Asp
$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH}$	Глутаминовая	2-аминопентан-диовая	Глу Glu
$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—C—NH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$	Аспарагин	2-амино-3-карбоксамидопропановая	Асн Asn
$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—C—NH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$	Глутамин	2-амино-4-карбоксамидобутановая	Глн Gln

6. Ароматические и гетероциклические аминокислоты

Строение радикала кислоты -R	Название		Условное обозначение
	Тривиальное	Систематическое	
	Фенилаланин	2-амино-3-фенилпропановая	Фен Phe
	Триптофан	2-амино-3-индолпропановая	Три Trp
	Гистидин (аминокислота)	2-амино-3-имидазолилпропановая	Гис His
	Пролин (полная форма)	2-пирролидин-карбоновая	Про Pro

Современная рациональная классификация аминокислот основана на полярности их радикалов. Именно полярность радикала во многом определяет важное свойство аминокислот – растворимость в воде и в других полярных растворителях. Полярные группы радикала ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ и др.) притягивают воду и тем самым повышают растворимость аминокислот в воде. Неполярные радикалы, наоборот, отталкивают воду и уменьшают растворимость аминокислот в воде.

По полярности радикалов различают:

1. Аминокислоты с неполярными (гидрофобными) радикалами

К ним относятся *аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин, фенилаланин и триптофан*. Для них характерны гидрофобные взаимодействия, в результате которых происходит отталкивание молекул воды из пространства между гидрофобными участками, что приводит к дисперсионному взаимодействию между этими участками.

2. Аминокислоты с полярными (гидрофильными) радикалами

К ним относятся *серин, треонин, тирозин, аспарагин, глутамин и цистеин*. В состав радикалов этих аминокислот входят полярные функциональные группы, образующие водородные связи с водой.

В свою очередь, эти аминокислоты делят на две группы:

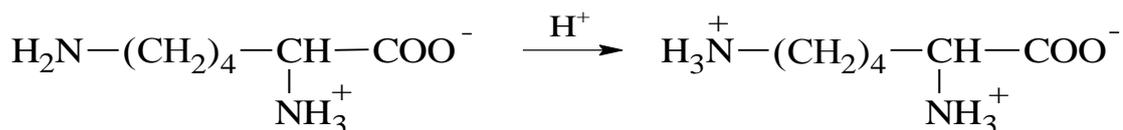
1) способные к ионизации в условиях организма (*ионогенные*):

Например, при $\text{pH} = 7$ фенольная гидроксильная группа *тирозина* ионизирована на 0,01%; тиольная группа *цистеина* – на 8%.

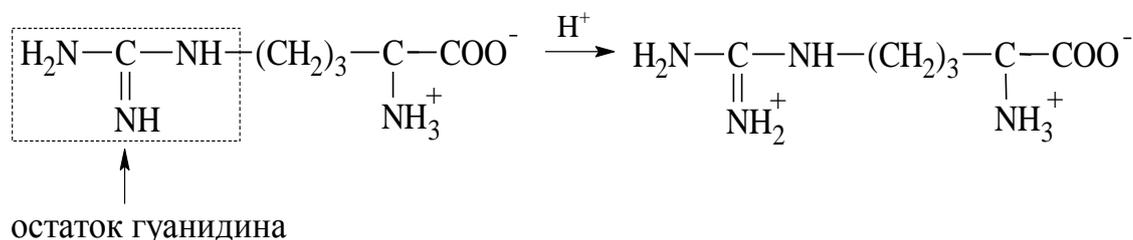
Величины pK_a β -карбоксовой группы аспарагиновой кислоты и γ -карбоксовой группы глутаминовой кислоты выше по сравнению с pK_a α -карбоксовых групп и в большей степени соответствуют значениям pK_a карбоновых кислот.

4. Аминокислоты с положительно заряженными радикалами

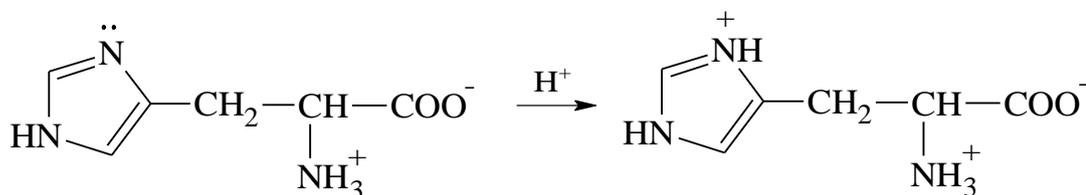
К ним относят лизин, аргинин и гистидин. У лизина есть вторая аминогруппа, способная присоединять протон:



У аргинина положительный заряд приобретает гуанидиновая группа:



Один из атомов азота в имидазольном кольце гистидина содержит неподеленную пару электронов, которая также может присоединять протон, т.е. проявлять основные свойства:

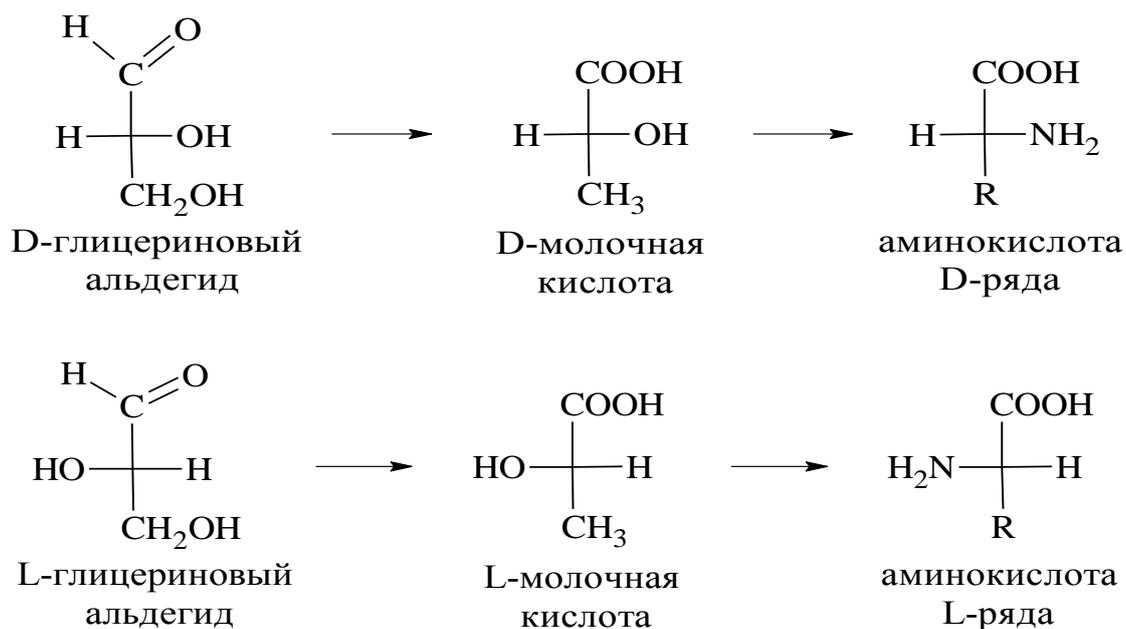


Именно через этот атом азота имидазольного кольца гистидина (донор электронной пары), белок глобин соединяется с ионом железа(II) гема (Fe^{2+} – акцептор электронной пары) с образованием гемоглобина.

1.1. Стереизомерия аминокислот

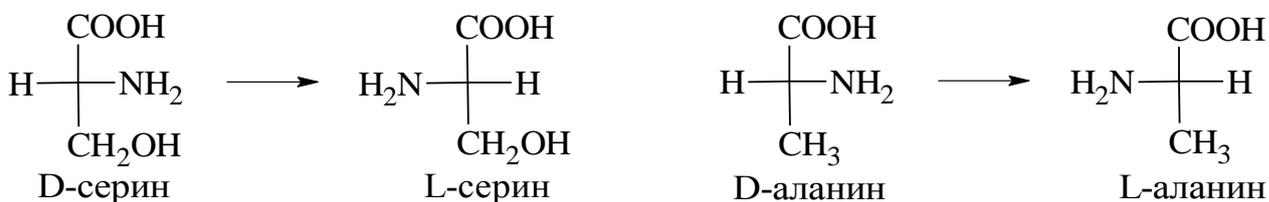
Все природные α -аминокислоты, кроме глицина ($\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$), имеют асимметрический атом углерода (α -углеродный атом), а некоторые из них даже два хиральных центра, например, треонин. Поэтому все аминокислоты могут существовать в виде пары несовместимых зеркальных антиподов (энантиомеров).

За исходное соединение, с которым принято сравнивать строение α -аминокислот, условно принимают D- и L-молочные кислоты, конфигурации которых, в свою очередь, установлены по D- и L-глицериновым альдегидам:



Все превращения, которые осуществляются в этих рядах при переходе от глицеринового альдегида к α -аминокислоте, происходят в соответствии с главным требованием – они не создают новых и не разрывают старых связей у асимметрического центра.

Для определения конфигурации α -аминокислоты в качестве эталона часто используют серин (иногда аланин). Конфигурации их так же выведены из D- и L-глицериновых альдегидов:



Природные аминокислоты, входящие в состав белков, относятся к **L-ряду**. D-аминокислоты встречаются редко, они синтезируются только микроорганизмами и называются «неприродными» аминокислотами. Животными организмами D-аминокислоты не усваиваются.

Интересно, что D- и L-аминокислоты действуют на вкусовые рецепторы по-разному: большинство аминокислот L-ряда имеют сладкий вкус, а аминокислоты D-ряда – горькие или безвкусные.

По оптической активности аминокислоты делятся на право- и левовращающие. Наличие асимметричного атома углерода (хирального центра) делает возможным только два расположения химических групп вокруг него. Это приводит к особому отличию веществ друг от друга, а именно – изменению направления вращения плоскости поляризованного света, проходящего через

раствор. В соответствии с углом поворота выделяют правовращающие (+) и левовращающие (–) изомеры.

Деление на L- и D-формы не равнозначно делению на право- и левовращающие. Для одних аминокислот L-формы (или D-формы) являются правовращающими, для других – левовращающими. Например, L-аланин – правовращающий, а L-фенилаланин – левовращающий. При смешивании L-и D-форм одной аминокислоты образуется рацемическая смесь (смесь равных количеств энантиомеров), не обладающая оптической активностью.

Это интересно! Без участия ферментов самопроизвольный переход L-изомеров в D-изомеры с образованием эквимолярной смеси (рацемическая смесь) осуществляется в течение достаточно длительного промежутка времени.

Рацемизация каждой L-кислоты при данной температуре идет с определенной скоростью. Это обстоятельство можно использовать для установления возраста людей и животных. Так, например, в твердой эмали зубов имеется белок дентин, в котором L-аспартат переходит в D-изомер при температуре тела человека со скоростью 0,01% в год. В период формирования зубов в дентине содержится только L-изомер, поэтому по содержанию D-аспартата можно рассчитать возраст человека или животного.

1.2 Биологическая роль аминокислот

Практически все α -амино- и α -карбокисильные группы участвуют в образовании пептидных связей белковой молекулы, теряя при этом специфические для свободных аминокислот кислотнo-основные свойства. Поэтому всё разнообразие особенностей структуры и функции белковых молекул связано с химической природой и физико-химическими свойствами радикалов аминокислот. Благодаря им белки наделены рядом уникальных функций, не свойственных другим биополимерам.

Без достаточного содержания аминокислот и белков организм не может правильно развиваться и функционировать. Поэтому существуют оптимальные суточные нормы употребления аминокислот, которые обеспечивают правильный обмен веществ и наделяют организм дополнительной энергией.

Основные биологические функции аминокислот и их производных:

- структурные компоненты пептидов и белков (протеиногенные аминокислоты, их 20);
- входят в состав коферментов, желчных кислот, антибиотиков;
- являются сигнальными молекулами;
- метаболиты;
- источники энергии;
- предшественники биологически активных веществ (например, гистамина, ГАМК и др.).

Глицин является предшественником пуринов, гемоподобных структур, коллагена, является тормозным медиатором ЦНС.

Аланин – исходный продукт для синтеза каротиноидов, жиров и углеводов.

Валин участвует в синтезе алкалоидов, некоторых циклических пептидов, пантотеновой кислоты, пенициллина.

Лейцин и изолейцин – источники энергии на клеточном уровне, повышают выносливость мышц, источники сивушных масел при брожении.

Серин входит в состав фосфолипидов, полипептидов брадикинина и каллидина, участвует в синтезе аминспирта сфингозина.

Треонин – участник синтеза витамина В₁₂, актиномицина D (антибиотик).

Цистеин входит в состав глутатиона, в кофермент А (в виде амина), образует дисульфидные связи; система 2 цистеин ↔ цистин является важной окислительно-восстановительной системой живых организмов.

Метионин – донор метильных групп в биосинтезах, является липотропным фактором.

Лизин участвует в синтезе алкалоидов, ε-аминогруппой в образовании комплекса между белковой частью фермента и коферментом.

Аргинин необходим для синтеза мочевины, креатина.

Аспарагиновая кислота, аспарагин (амид аспарагиновой кислоты) участвуют в реакциях трансаминирования, синтезе мочевины, креатина, циклических пептидов.

Глутаминовая кислота входит в состав глутатиона, фолиевой кислоты, участвует в реакциях трансаминирования, непрямого дезаминирования и реаминирования, глутамин (амид глутаминовой кислоты) – исходное соединение для синтеза пуриновых, пиримидиновых оснований, никотиновой кислоты.

Фенилаланин участвует в биосинтезе флавоноидов, алкалоидов, антибиотиков. Из фенилаланина в организме образуется тирозин.

Тирозин – исходное вещество для синтеза гормонов щитовидной железы, адреналина, меланинов, алкалоидов.

Триптофан – необходим для синтеза серотонина, никотиновой кислоты.

Гистидин в большом количестве содержится в белке глобине гемоглобина, необходим для связи глобина с железом Fe(II) гема, входит в состав активных центров некоторых протеолитических ферментов.

Пролин, оксипролин содержатся в значительных количествах коллагене, эластине, белках эмали зубов, входят в состав некоторых антибиотиков – циклических пептидов.

§ 2. Свойства аминокислот

2.1 Физические свойства

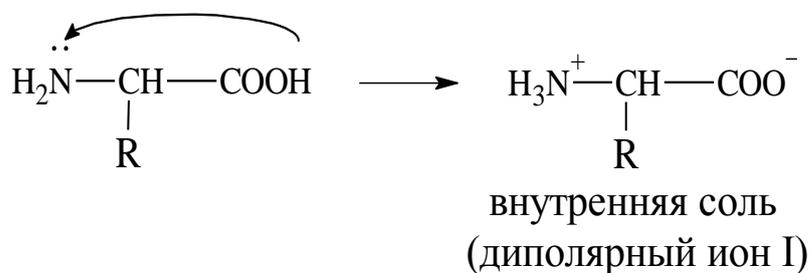
Присутствие в молекуле у одного атома углерода двух функциональных групп приводит к появлению ряда специфических свойств, что не согласуется со структурой аминокислот $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$.

В отличие от аминов и карбоновых кислот аминокислоты представляют собой нелетучие кристаллические вещества, плавящиеся с разложением при близких и достаточно высоких температурах, что затрудняет идентификацию аминокислот по температурам плавления.

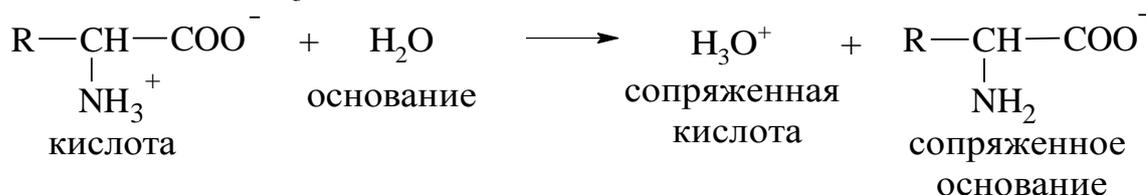
Аминокислоты очень плохо растворимы в неполярных растворителях типа петролейного эфира, диэтилового эфира, бензола и хорошо растворимы в воде, причем, в водных растворах они имеют высокие дипольные моменты.

Следует отметить, что константы кислотности и основности для функциональных групп COOH и NH_2 очень малы. Например, для глицина константа кислотности $K_a = 1,6 \cdot 10^{-10}$, а константа основности $K_b = 2,5 \cdot 10^{-12}$. Для сравнения у большинства карбоновых кислот $K_a \approx 10^{-5}$, а для алифатических аминов $K_b \approx 10^{-4}$.

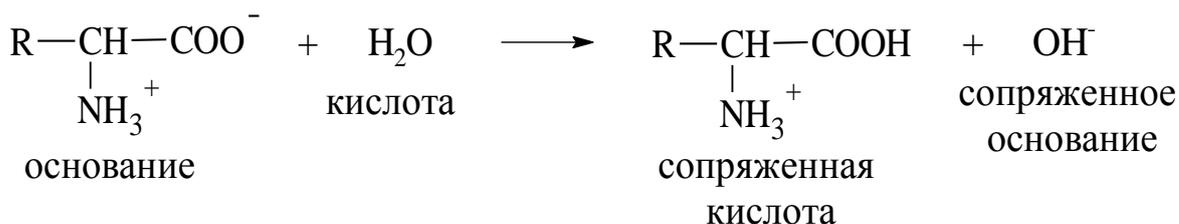
Объясняется это явление тем, что аминокислоты существуют в виде биполярного (или диполярного) иона, который образуется за счет отщепления протона от карбоксильной группы и присоединения его к аминогруппе. Биполярный ион называют внутренней солью:



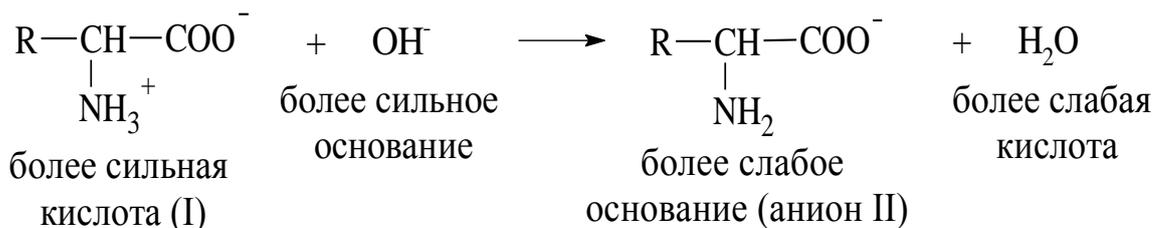
Кислотно-основные свойства объясняются с точки зрения протолитической теории тем, что измеряемая K_a в действительности относится к кислотности иона $\text{R}-\text{NH}_3^+$:



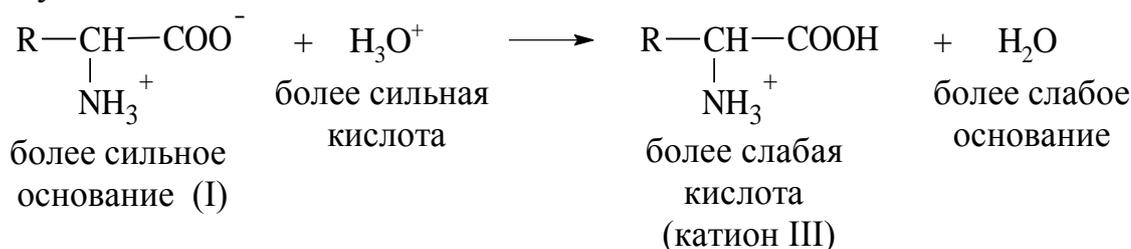
Константа основности (K_b) реально относится к основности карбоксилат-иона.



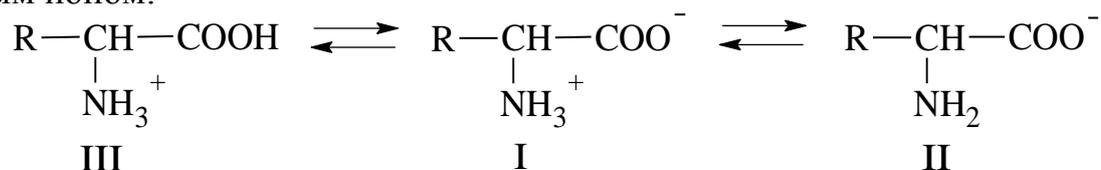
При подщелачивании раствора аминокислоты происходит следующий процесс:



Если подкислить раствор аминокислоты, то более сильная кислота, отдавая протон более сильному основанию, превращает его в более слабую кислоту:



Важно отметить, что ионы II и III, содержащие свободную аминогруппу или свободную карбоксильную группу, находятся в равновесии с биполярным ионом:



В этом равновесии участвует также небольшое количество незаряженных молекул аминокислот.

2.2 Изоэлектрическая точка аминокислот (pI)

Концентрация ионов водорода (pH), при которой аминокислота не перемещается в электрическом поле, так как ее суммарный заряд равен 0, называется **изоэлектрической точкой** данной аминокислоты (pI).

Изоэлектрическая точка аминокислоты зависит от следующих факторов:

- кислотности группы $-\text{NH}_3^+$;
- основности карбоксилат-аниона;

- природы радикала;
- присутствия в молекуле кислоты любой дополнительной основной или кислотной группы;
- рН среды.

При $pH \neq pI$ в растворе присутствует равновесная смесь диполярного иона и катионной или анионной формы, что может привести к появлению у растворов аминокислот буферных свойств. Значительной буферной ёмкостью в интервале физиологических значений рН, (в интервале 6–8) обладает только гистидин. При $pH = pI$ растворы аминокислот буферным действием не обладают.

В табл. 1 показано изменение суммарного заряда аминокислот с анионными и катионными группами в радикале, в зависимости от рН среды.

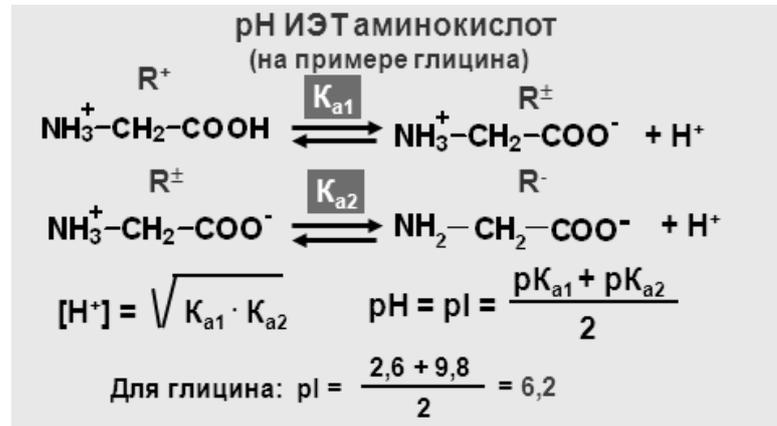
Таблица 1

Суммарный заряд аминокислот и рН среды

СРЕДА		
Сильнокислая	Нейтральная	Сильнощелочная
<i>I. Аминокислоты с недиссоциирующими радикалами</i>		
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$ Заряд: +1	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{R} \end{array}$ 0	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{R} \end{array}$ -1
<i>II. Аминокислоты, содержащие в радикале анионные группы</i>		
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Заряд: +1	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ -1	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ -2
<i>III. Аминокислоты, содержащие в радикале катионные группы</i>		
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ Заряд: +2	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ +1	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ -1

Приведем пример расчета pI на примере глицина.

При диссоциации глицина образуется следующая равновесная система:
 $\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \rightleftharpoons \text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
 R^+ (катион глицина) R^{\pm} R^- (анион глицина)
 (биполярный ион глицина)



$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COOH}]} \quad \text{и} \quad K_{a2} = \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COOH}]}$$

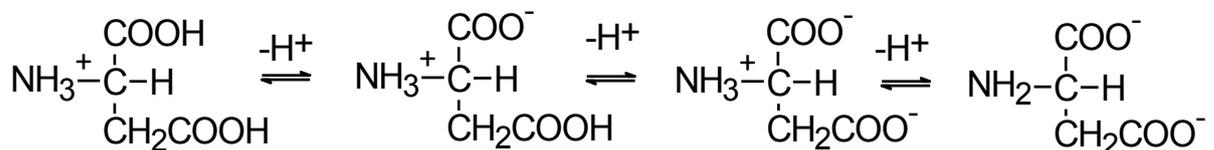
$$\text{Следовательно, } K_{a1}K_{a2} = \frac{[\text{H}^+]^2[\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COOH}]}$$

В изоэлектрической точке $[\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-] = [\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COOH}]$,
 поэтому $K_1K_2 = [\text{H}^+]^2$. Отсюда $[\text{H}^+] = \sqrt{K_1K_2}$.

После логарифмирования получаем: $\text{pH} = \text{pI} = \frac{\text{p}K_1 + \text{p}K_2}{2}$

$$\text{Для глицина: } \text{pH} = \frac{2,6 + 9,8}{2}$$

Для диаминомонокислот или моноаминодикарбоновых кислот расчет **pI** усложняется. Например, для аспарагиновой кислоты диссоциация выглядит следующим образом:



изоэлектрическое
состояние

Для каждого этапа диссоциации величины $\text{p}K_a$ составляют 1,99; 3,90 и 9,90,
 соответственно. При расчете изоэлектрической точки следует учитывать значения

$$\text{лишь двух первых величин } \text{p}K_a. \text{ Тогда } \text{pI} = \frac{1,99 + 3,90}{2} = 2,95$$

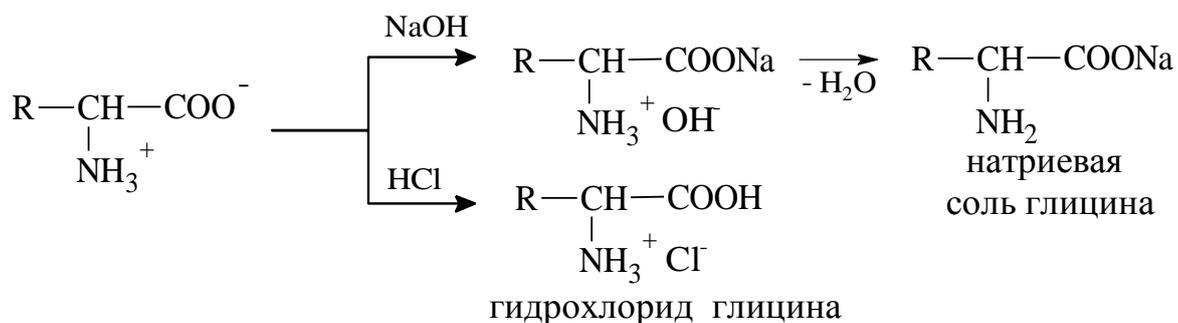
Экспериментально изоэлектрическую точку определяют электрофоретически (наблюдение за поведением частиц в электрическом поле при электрофорезе). При pI подвижность частицы равна нулю.

При пропускании постоянного тока через раствор, содержащий смесь нескольких аминокислот, каждая из них будет двигаться к катоду или к аноду со скоростью, зависящей от природы этой аминокислоты и от pH среды. Разделение и анализ смесей аминокислот, основанное на этом явлении, называется *электрофорезом*.

2.3. Химические свойства аминокислот

2.3.1. Амфотерность аминокислот

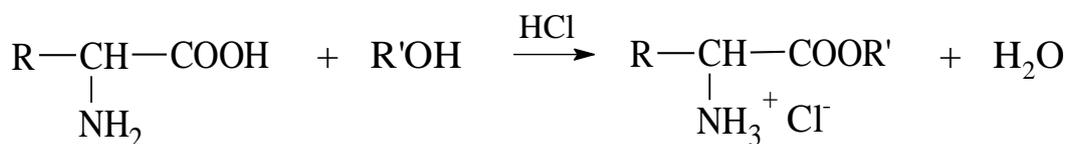
Амфотерность аминокислот обусловлена наличием в молекуле функциональных групп кислотного и основного характера. Как любое амфотерное соединение, аминокислоты взаимодействуют с кислотами и щелочами, образуя соли:



2.3.2. Реакции карбоксильной группы

Образование сложных эфиров

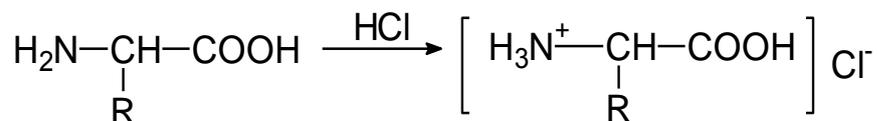
Реакция этерификации протекает в кислой среде, сложные эфиры аминокислот образуются в виде солей по аминогруппе:



Образовавшиеся эфиры не могут существовать в виде биполярных ионов, поэтому, в отличие от исходных аминокислот, они растворяются в органических растворителях и имеют более низкие температуры кипения. Это даёт возможность разделить смесь эфиров аминокислот перегонкой.

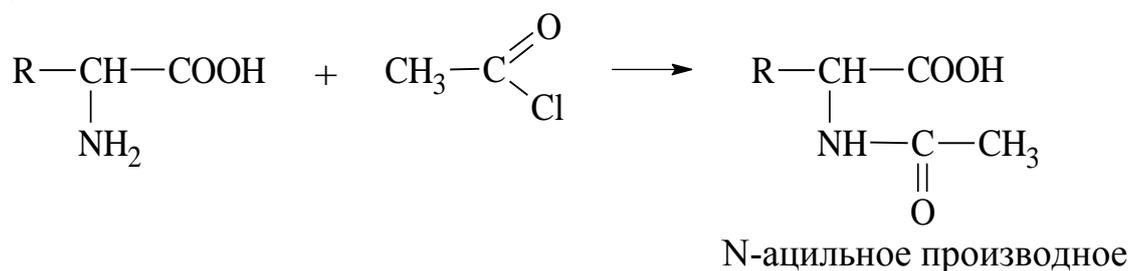
Продукт взаимодействия этанола с пара-аминобензойной кислотой называется анестезин и применяется в медицине для обезболивания. Еще большей эффективностью обладает новокаин – продукт ацилирования той же самой кислотой β -диэтиламиноэтилового спирта.

Образование солей с минеральными кислотами



Реакция ацилирования. Образование N-замещённых амидов

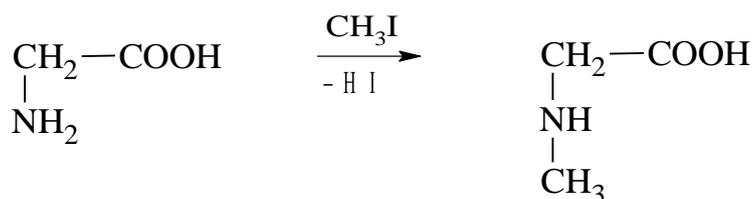
Эта реакцию можно рассматривать как реакцию защиты аминогруппы, а также как процесс ацилирования аминогруппы хлорангидридами или ангидридами кислот:



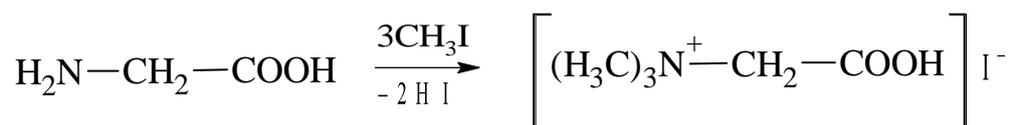
Реакция протекает лучше в щелочной среде. Щёлочь необходима для связывания выделяющегося хлороводорода, так как в кислой среде N-ацильные производные легко гидролизуются, освобождая исходную аминокислоту.

Алкилирование аминокислот

Аминокислоты можно алкилировать по аминогруппе галоидными алкилами (обычно йодистыми алкилами). Например, алкилированием глицина можно получить метиламиноуксусную кислоту – **саркозин**, которая в связанном виде содержится в некоторых белках:



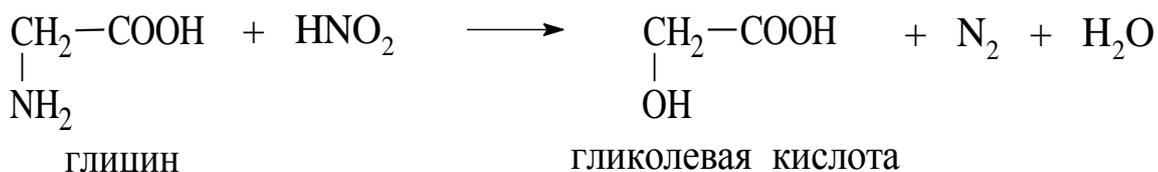
При избытке иодистого метила образуется четвертичная аммонийная соль:



Саркозин входит в состав некоторых антибиотиков.

Действие азотистой кислоты (дезаминирование *in vitro*)

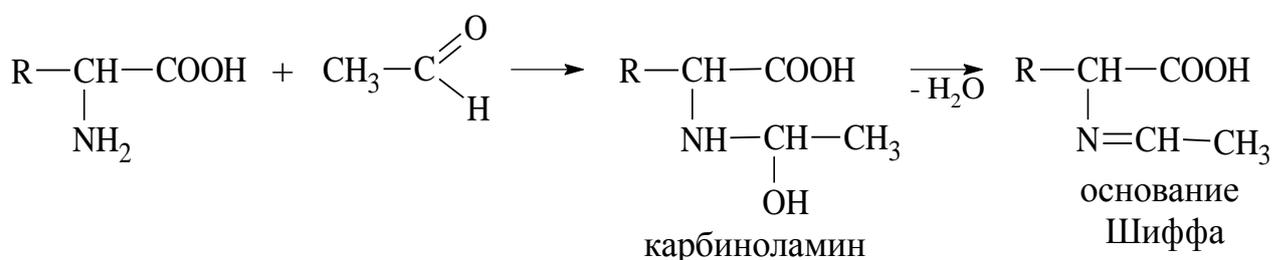
Реакция протекает аналогично, как и при взаимодействии с азотистой кислотой алифатических первичных аминов, т.е. выделяется азот, а аминогруппа замещается на гидроксильную группу:



Эта реакция свидетельствует о структурном родстве аминокислот с соответствующими оксикислотами. По объёму выделившегося азота определяют количество α -аминокислоты, вступившей в реакцию (метод Ван-Слайка).

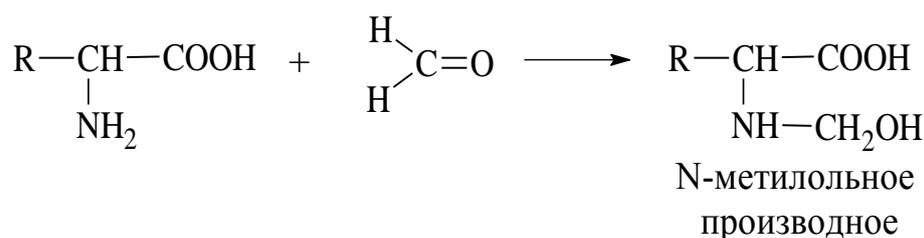
Взаимодействие с альдегидами

Как и первичные амины, α -аминокислоты реагируют с альдегидами, образуя замещенные имины (основания Шиффа). Реакция протекает через стадию образования карбиноламинов:



При взаимодействии α -аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины —N-метилольные производные, свободная карбоксильная группа которых может быть оттитрована щелочью.

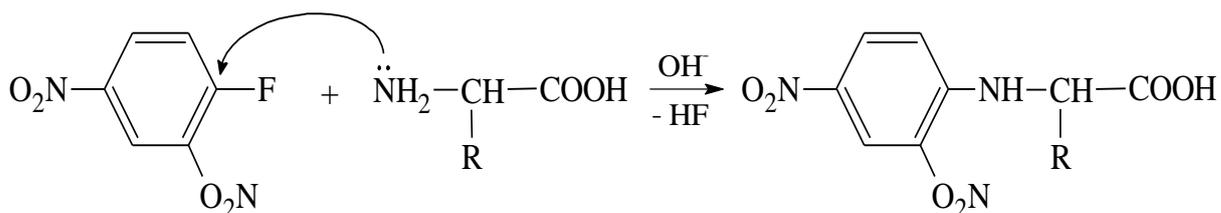
Формальдегид, взятый в избытке, способствует отщеплению протона от NH_3^+ группы биполярного иона и легко соединяется со свободной (непротонированной) аминогруппой, образуя устойчивое метилольное производное:



Титрование аминокислоты в избытке формальдегида (формольное титрование) представляет собой аналитический метод (метод Серенсена), при помощи которого определяется, например, образование свободных аминокислот в процессе гидролиза белков.

Взаимодействие с динитрофторбензолом (ДНФБ)

Эту реакцию, протекающую в слабощелочном растворе, впервые использовал Фредерик Сенгер для количественного введения метки в аминокислоты и пептидов. Эта реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения:



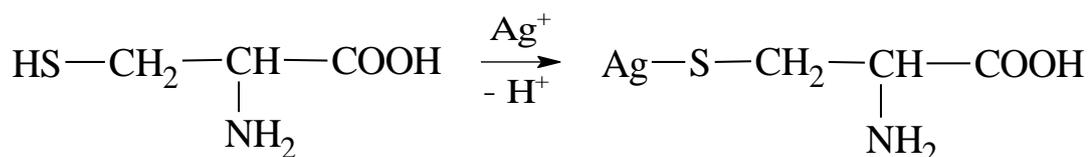
Продукт реакции окрашен в интенсивно желтый цвет. Эта реакция представляет исключительную ценность для идентификации N-концевых аминокислот полипептидных цепей.

2.3.4 Реакции функциональных групп, содержащихся в радикалах аминокислот

Аминокислоты вступают также в реакции, типичные для функциональных групп, присутствующих в их радикалах. Например, для SH-групп цистеина, OH-группы тирозина и треонина, гуанидиновой группы аргинина.

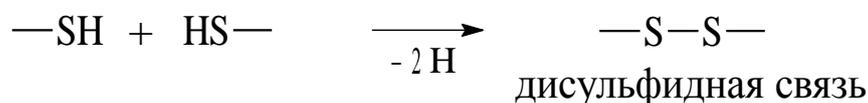
Реакции сульфгидрильной (тиоловой) группы

Для сульфгидрильной группы характерна исключительно высокая реакционная способность. Например, при действии на цистеин незначительных концентраций ионов некоторых тяжелых металлов образуются меркаптиды:



В щелочных растворах цистеин легко теряет атом серы. Так, при нагревании цистеина с ацетатом свинца в щелочном растворе образуется черный осадок сульфида свинца. Эта реакция применяется для обнаружения сульфгидрильной группы в пептидах и белках.

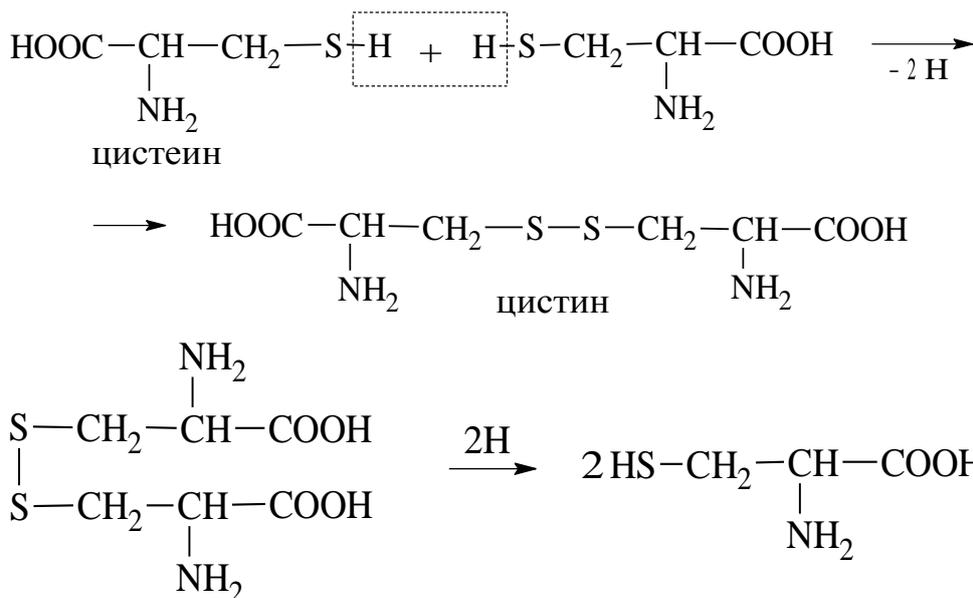
Тиоловая группа цистеина легко подвергается окислению с образованием дисульфида. Этот процесс можно отразить следующей схемой:



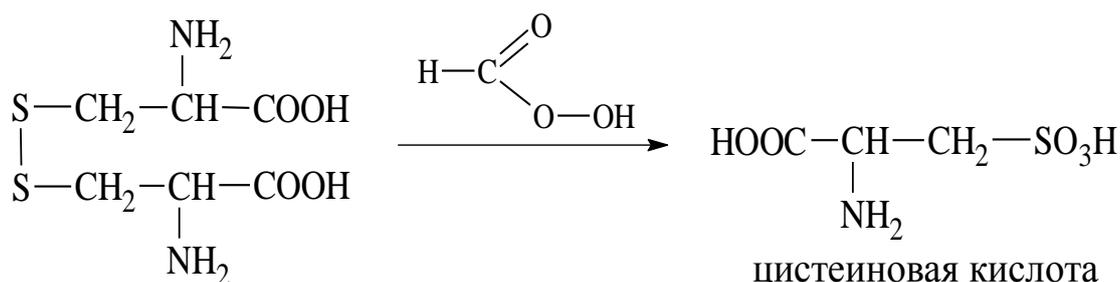
Дисульфидные связи, присоединяя два атома водорода, переходят в сульфгидрильные (тиоловые) группы:



Например, при превращении цистеина в цистин, образуется дисульфидная связь, которая при действии восстановителей разрывается и образуется снова две молекулы цистеина:



Дисульфидная связь может подвергаться окислению под действием жестких окислителей (например, надмуравьиная кислота), в результате чего образуется цистеиновая кислота:

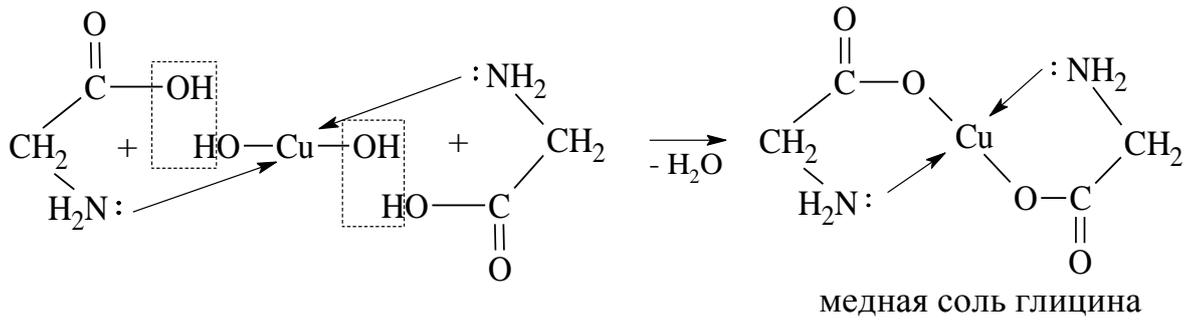


Реакции гидроксильной группы – реакции элиминирования

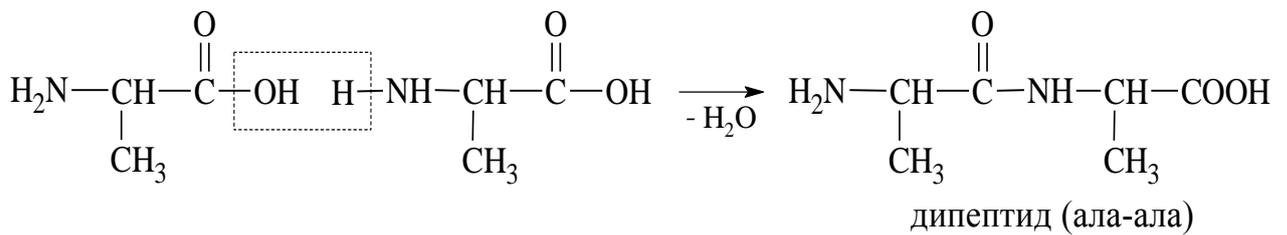
Эти реакции характерны для аминокислот, содержащих в радикале гидроксильную группу в β -положении по отношению к карбоксильной группе (серин и треонин).

В результате ряда последовательных реакций аминокислота превращается в кетокислоту. Приведем пример превращения треонина в 2-оксобутановую кислоту:

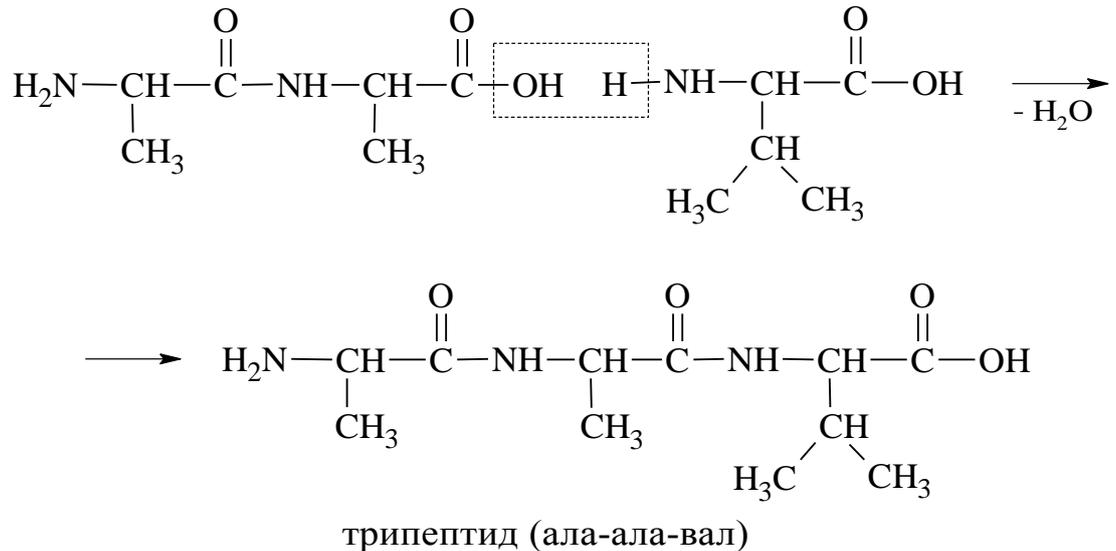




Образование пептидов – реакция ацилирования одной аминокислоты другой аминокислотой:



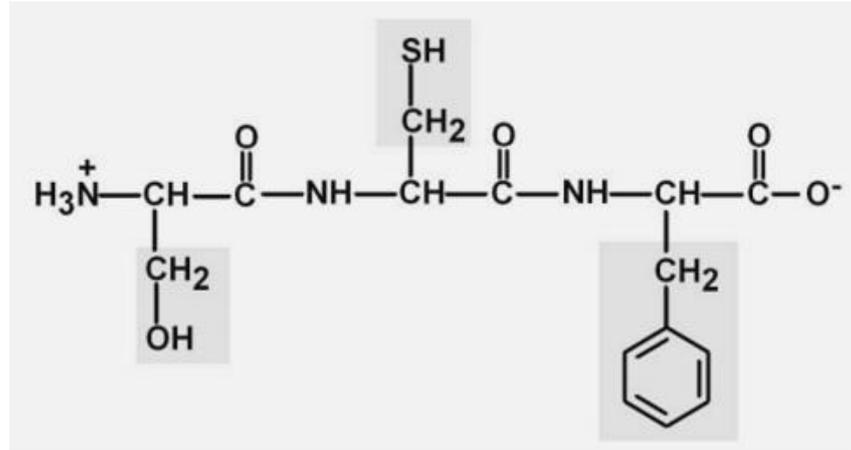
Затем дипептид присоединяет следующую молекулу аминокислоты, образуя трипептид, и так далее:



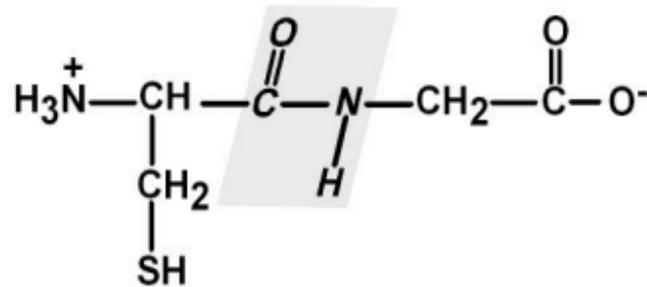
Пептидная связь – это связь между α -карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой аминокислоты.

Для пептидной связи характерно:

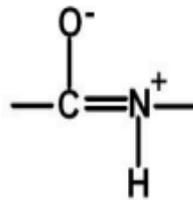
1. Трансположение заместителей (радикалов) аминокислот по отношению к C–N связи. Например:



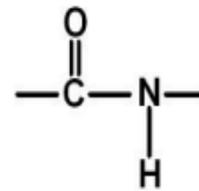
2. Копланарность. Все атомы, входящие в пептидную группу, находятся в одной плоскости, при этом атомы «Н» и «О» расположены по разные стороны от пептидной связи:



3. Наличие кетоформы и енольной формы:

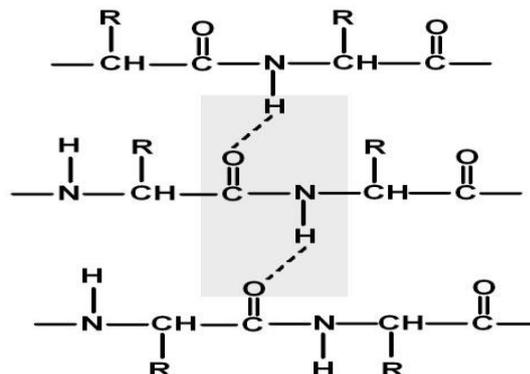


Енольная форма



Кетоформа

4. Способность к образованию двух водородных связей. Атомы кислорода и водорода, входящие в пептидную группу, обладают способностью образовывать водородные связи с атомами кислорода и водорода других пептидных групп:



5. Пептидная связь имеет частично характер двойной связи. Ее длина меньше, чем одинарной связи, она является жесткой структурой, и вращение вокруг нее затруднено.

Однако, кроме пептидной, в белке есть и другие связи, поэтому цепочка аминокислот способна вращаться вокруг основной оси, что придает белкам различные конформации.

Напомним, что конформации – это пространственные формы, которые возникают за счет вращения атомов или групп вокруг ординарных связей без их разрыва.

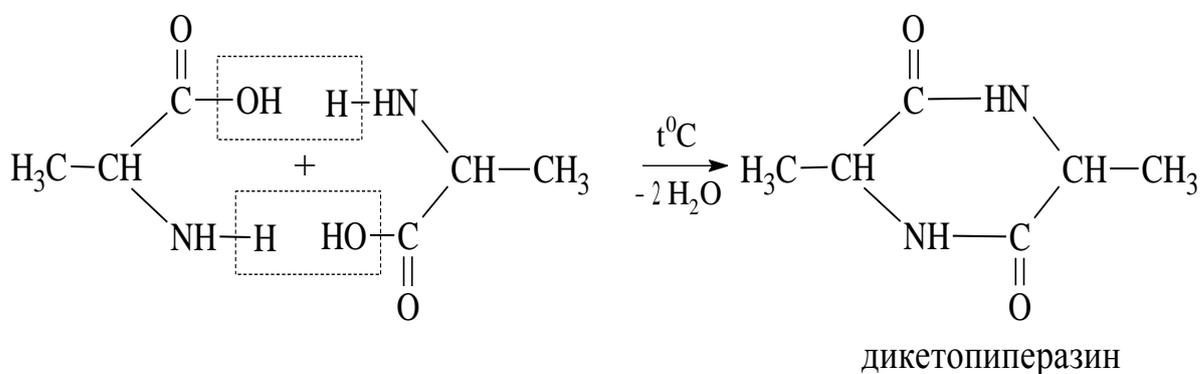
Межмолекулярная циклизация аминокислот с образованием циклопептидов

Циклопептидами называют пептиды, пептидная цепь которых замкнута в кольцо. По количеству аминокислотных остатков, входящих в цикл, циклические пептиды делят на ди-, три-, тетра- и т.д.-циклопептиды.

Циклодипептиды обычно называют 2,5- дикетопиперазинами, рассматривая их как производные 6-членного гетероцикла пиперазина.

Дикетопиперазины были выделены Н.Д. Зелинским и В.С. Садиковым из белков в 1923 г.

При отщеплении двух молекул воды от двух молекул аминокислот образуется циклический дипептид – дикетопиперазин:



Дикетопиперазины в условиях кислотного или основного катализа способны гидролизоваться с образованием исходных α-аминокислот.

2,5-Дикетопиперазины весьма широко распространены в природе. Они выделены из различных микроорганизмов и морских организмов. В организмах животных дикетопиперазины встречаются редко.

Некоторые представители дисульфидных 2,5-дикетопиперазинов обладают разнообразной биологической активностью: антибактериальной, противовирусной, фунгицидной и противоопухолевой.

В зависимости от типов связей, участвующих в образовании кольца, циклические пептиды делятся на *гомодетные* и *гетеродетные*. Гомодетные пептиды содержат в цикле только пептидные (CO–NH) группы и >CHR

структурные фрагменты. Гетеродетные пептиды, наряду с этими структурными элементами, содержат дисульфидные мостики, амидные связи небелковой природы, сложноэфирные связи и др.

В состав циклопептидов входят не только остатки протеиногенных аминокислот, но модифицированных α -L-аминокислот и α -D-аминокислот.

Циклопептиды разнообразны по биологической функции – это гормоны (окситоцин, вазопрессин, инсулин), ингибиторы ферментов, антибиотики (актиномицины, аманидины, грамицидин S, полимиксины), токсины, ионофоры – каналобразующие соединения (валиномицин). Ионофорные антибиотики токсичны, поэтому в медицине не применяются. Их применяют в биохимических исследованиях для регуляции ионного транспорта через мембраны, в химии – для экстракции ионов и мембранного катализа.

2.3.6. Специфические реакции аминокислот, имеющие аналитическое значение

Нингидриновая реакция – это общая качественная реакция на α -аминогруппу. Продукт реакции имеет сине-фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при 570 нм. Поэтому реакция с нингидрином используется для визуального обнаружения α -аминокислот при хроматографировании (на бумаге или в тонком слое) и для их спектрофотометрического определения.

Ксантопротеиновая реакция (Мульдера) на α -аминокислоты, содержащие ароматические радикалы: тирозин, триптофан, фенилаланин. Аминокислоты с ароматическими кольцами в боковой цепи, а также пептиды и белки, в состав которых входят такие аминокислоты, при нагревании с концентрированной азотной кислотой дают желтое окрашивание, которое обусловлено образованием нитросоединений. Нитросоединения тирозина и триптофана в отличие от нитрофенилаланина при подщелачивании образуют *аци*-нитросоли оранжево-красного цвета, что позволяет отличить фенилаланин от тирозина и триптофана.

Реакция Миллона. Этот метод определения тирозина основан на том, что, во-первых, тирозин, в отличие от триптофана и фенилаланина, нитруется даже разбавленной азотной кислотой, а во-вторых, образующийся нитротирозин дает красную, нерастворимую в кислой среде *аци*-нитросоль с ионом $[\text{Hg}_2]^{2+}$.

При низкой концентрации тирозина возникает красное окрашивание, при высокой – выпадает красный осадок.

Эта реакция положительна также для фенольных соединений.

Реакция Адамкевича. При действии на белок концентрированной уксусной кислоты с примесью глиоксиловой кислоты на границе раздела появляется темно-фиолетовое кольцо; обусловленное наличием триптофана.

Реакция Фоля позволяет определять наличие серы в меркаптанах и сульфидах. Метод заключается в кипячении раствора препарата с щелочным раствором плюмбита натрия; при этом образуется черный осадок сульфида свинца: $R-SH + Na_2Pb(OH)_4 \rightarrow R-OH + PbS\downarrow + 2NaOH + H_2O$

Положительную реакцию Фоля дают не только цистеин, цистин, но и пептиды и белки, содержащие эти аминокислоты.

Определению серосодержащих аминокислот мешают соединения, содержащие в своей молекуле сульфидную или меркаптановую функциональные группы, например антибиотик пенициллин.

Нитропруссид натрия – $Na_2[Fe(CN)_5NO]$ дает с меркаптанами в щелочной среде характерную красную или красно-фиолетовую окраску. Цистеин дает положительную реакцию в разбавленном растворе аммиака, а цистин и метионин – отрицательную. Аммиак, а не щелочь, как обычно, используется для того, чтобы исключить возможность образования меркаптанов из цистина и метионина, так как меркаптаны дают положительную реакцию с нитропруссидом натрия.

Реакция Сакагучи. Аргинин легко конденсируется с α -дикетонами с образованием имидазольного цикла, что используется в пептидном синтезе для защиты гуанидиновой группы аргинина. В реакции Сакагучи происходит аналогичная конденсация с 1,2-нафтохиноном, который образуется при окислении α -нафтола гипобромитом или гипохлоритом натрия.

Реакция Сакагучи является общей для любых производных гуанидина. Так, например, антибиотик стрептомицин также дает положительную реакцию Сакагучи, поскольку содержит в своей молекуле гуанидиновый остаток $((H_2N)HN=C-NH-)$.

Открытие глутаминовой кислоты и глутамина. При нагревании глутаминовой кислоты или глутамина они циклизуются с отщеплением воды и образованием пирролидонкарбоновой кислоты (пироглутаминовая кислота) или ее амида. Пироглутаминовая кислота при нагревании с резорцином в присутствии концентрированной серной кислоты образует краситель, приобретающий в щелочной среде красно-фиолетовый цвет.

2.3.7. Реакции аминокислот в организме (*in vivo*)

Существуют три источника аминокислот в клетке – поступление из крови, распад собственных внутриклеточных белков и синтез заменимых аминокислот. Путь дальнейшего превращения аминокислот зависит от вида и функции клетки, условий ее существования и гормональных влияний.

Источники и «судьба» аминокислот в клетке представлены на рис. 2.

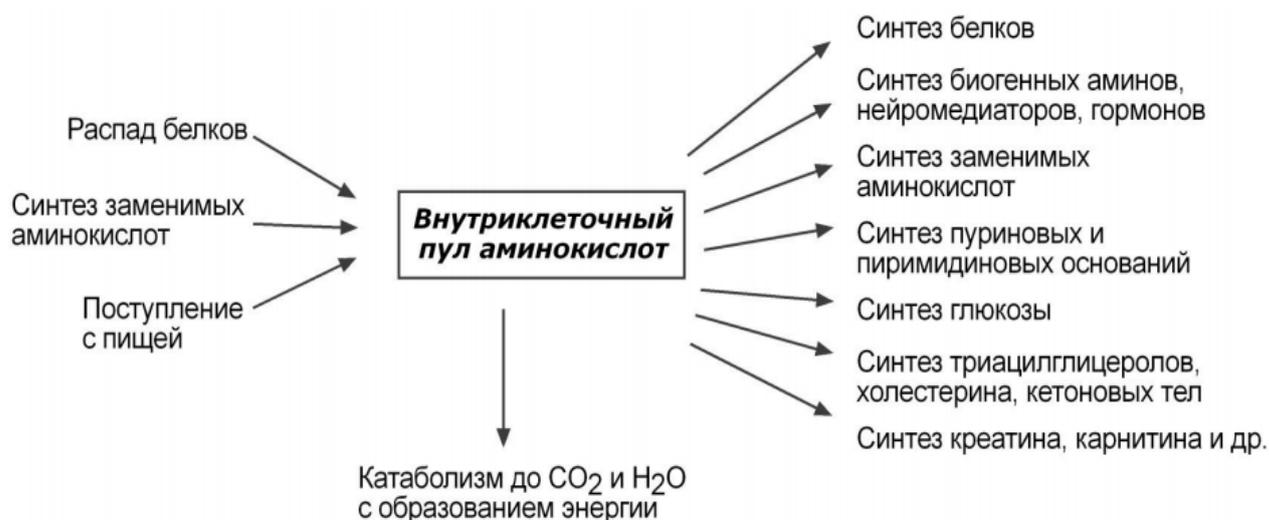


Рис. 2. Источники и «судьба» аминокислот в клетке
(Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018 г.), www.biokhimija.ru)

Простые аминокислоты не накапливаются в клетке, как правило, их избыток разрушается при помощи реакций, которые снабжают живую систему энергией.

Реакции превращения аминокислот в клетке условно разделяют на три части, в зависимости от реагирующей группы:

- по радикалу;
- по аминогруппе (дезаминирование, переаминирование);
- по карбоксильной группе (декарбоксилирование).

Превращение аминокислот по радикалу

В организме присутствует 20 протеиногенных и еще больше непротеиногенных аминокислот. Соответственно, существует аналогичное количество специфических путей для их метаболизма.

При определенных условиях (голодание, длительная физическая нагрузка) углеродный скелет аминокислот не сгорает полностью, а может участвовать в синтезе углеводов в печени (гликогенные аминокислоты) и липидов (кетогенные аминокислоты).

К гликогенным относятся аминокислоты (аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, метионин и др.), при распаде которых образуются пируват и метаболиты ЦТК, например, оксалоацетат, фумарат или α -кетоглутарат. Эти метаболиты способны включаться в синтез глюкозы, например, при голодании.

Кетогенными являются лизин и лейцин, при их окислении образуется только ацетил-SКоА. Он в состоянии принять участие в синтезе кетоновых тел, жирных кислот и холестерина.

Также выделяют небольшую группу смешанных аминокислот (гликогенные и кетогенные – изолейцин, лизин, фенилаланин, тирозин, тиртофан),

из них образуется пируват, метаболиты ЦТК и ацетил-SКоА (фенилаланин, тирозин, изолейцин, триптофан).

Классификация аминокислот по признаку кето- или гликогенности условна, так как промежуточные продукты обмена некоторых аминокислот могут включаться как в синтез углеводов, так и в синтез жиров.

При направлении аминокислот на катаболизм пути их обмена сходятся к 6 продуктам, которые вступают в ЦТК и полностью окисляются до углекислого газа и воды с выделением энергии.

Из общего количества энергии, образующейся в организме, на долю аминокислот приходится около 10% (рис. 3).

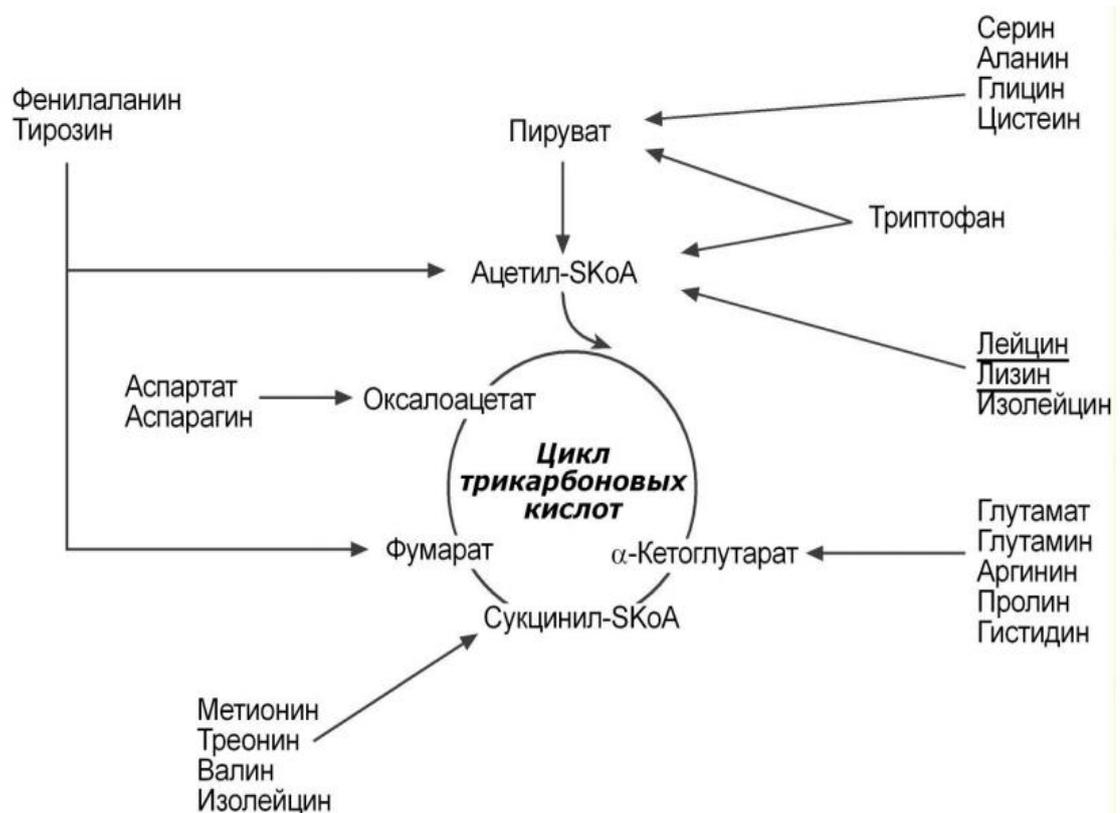
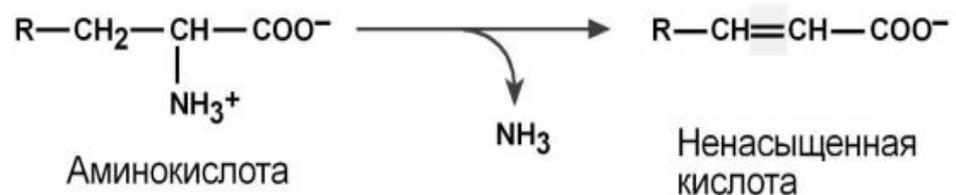


Рис. 3. Пути превращения углеродного радикала протеиногенных аминокислот (Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018 г.), www.biokhimija.ru)

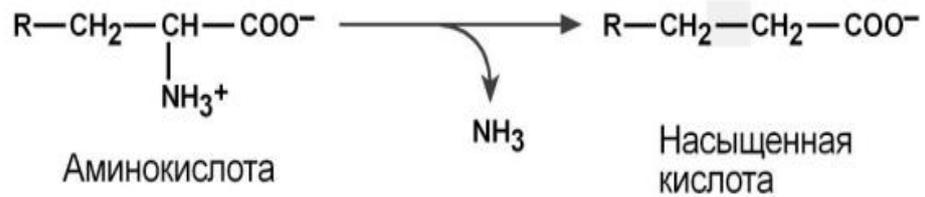
Дезаминирование аминокислот.

Типы дезаминирования

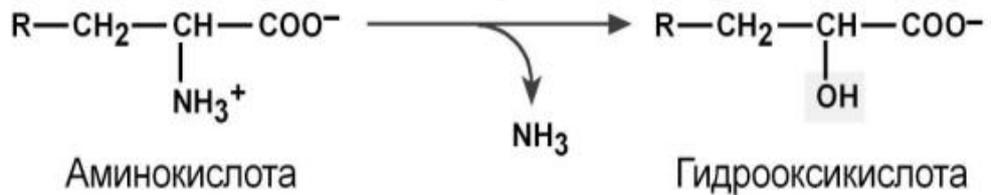
1. Внутримолекулярное – с образованием ненасыщенной жирной кислоты:



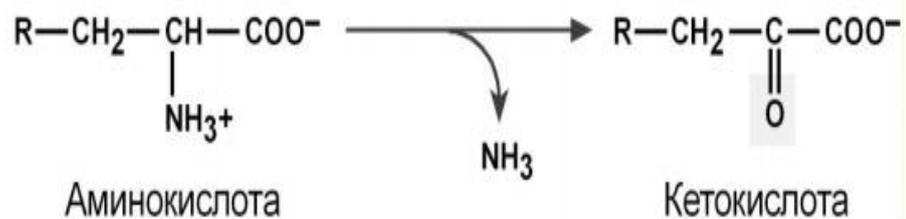
2. **Восстановительное** – с образованием насыщенной жирной кислоты:



3. **Гидролитическое** – с образованием карбоновой гидроксикислоты:



4. **Окислительное** – с образованием кетокислот:

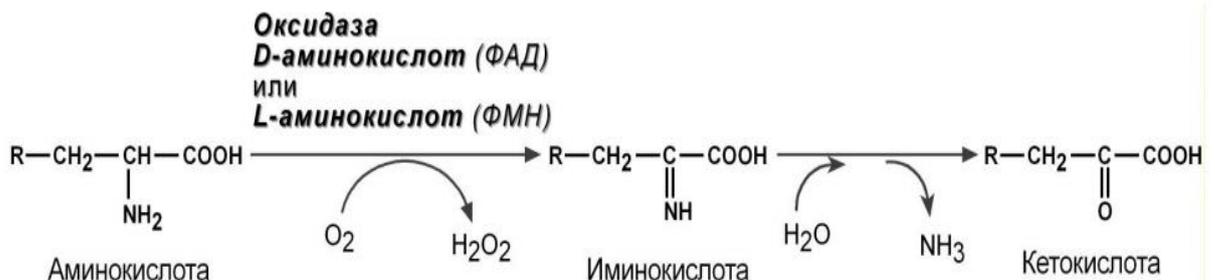


Окислительное дезаминирование является основным путем катаболизма большинства аминокислот. Однако гистидин теряет аминогруппу с использованием внутримолекулярного дезаминирования, а треонин и серин сразу подвергаются прямому расщеплению до глицина и ацетальдегида (треонин) или гидроксиметила (серин).

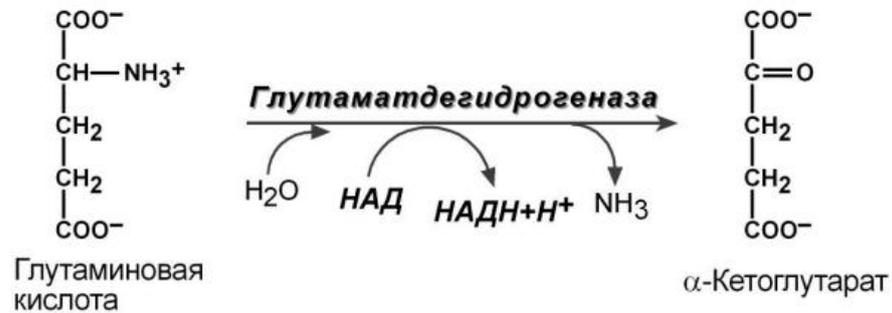
Выделяют два варианта окислительного дезаминирования: прямое и непрямое.

Прямое дезаминирование катализируется одним ферментом, в результате образуется NH₃ и кетокислота. Прямое окислительное дезаминирование может идти как в присутствии кислорода (аэробное), так и не нуждаться в кислороде (анаэробное).

1. Аэробное прямое окислительное дезаминирование катализируется оксидазами D-аминокислот (D-оксидазы) в качестве кофермента использующими ФАД (флавинадениндинуклеотид), и оксидазами L-аминокислот (L-оксидазы) с коферментом ФМН:



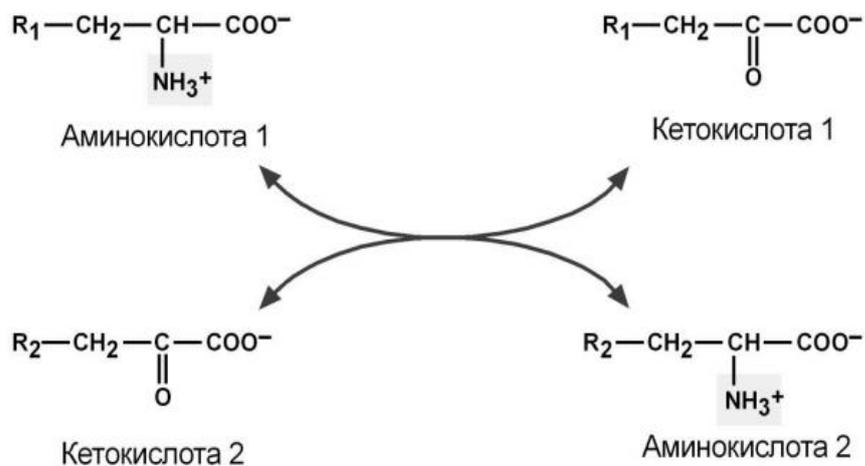
2. Анаэробное прямое окислительное дезаминирование существует только для глутаминовой кислоты, катализируется только глутаматдегидрогеназой, превращающей глутамат в α -кетоглутарат:



Фермент глутаматдегидрогеназа имеется в митохондриях всех клеток организма (кроме мышечных).

Непрямое окислительное дезаминирование включает 2 этапа и активно идет во всех клетках организма.

Первый этап заключается в обратимом переносе NH_2 -группы с аминокислоты на кетокислоту с образованием новой аминокислоты и новой кетокислоты – этот перенос называется трансаминированием:



В качестве кетокислоты-акцептора («кетокислота-2») в организме обычно используется α -кетоглутаровая кислота, которая превращается в глутамат. В результате трансаминирования свободные аминокислоты теряют α - NH_2 -группы и превращаются в соответствующие кетокислоты. Далее их кетоскелет катаболизируют специфическими путями и вовлекается в цикл трикарбоновых кислот и тканевое дыхание, где сгорает до CO_2 и H_2O . При необходимости (например, голодание) углеродный скелет глюкогенных аминокислот может использоваться для синтеза глюкозы.

Второй этап состоит в отщеплении аминогруппы от новообразованной аминокислоты (всегда глутамат) – происходит дезаминирование, которое осуществляется глутаматдегидрогеназой.

Учитывая тесную связь обоих этапов, непрямое окислительное дезаминирование называют *транздезаминирование*.

Это интересно! В организме коллектором всех аминокислотных аминогрупп (аминного азота) является глутаминовая кислота, и только она подвергается окислительному дезаминированию с образованием аммиака и α -кетоглутаровой кислоты. Фермент глутаматдегидрогеназа имеется в митохондриях всех клеток организма (кроме мышечных) и катализирует реакцию дезаминирования глутамата.

Биологическая роль реакций трансаминирования и трансдезаминирования

Реакции трансаминирования:

- активируются в печени, мышцах и других органах при поступлении в клетку избыточного количества тех или иных аминокислот с целью оптимизации их соотношения,
- обеспечивают синтез заменимых аминокислот в клетке при наличии их углеродного скелета (кетоаналога),
- необходимы после прекращения использования аминокислот на синтез азотсодержащих соединений (белков, креатина, фосфолипидов, пуриновых и пиримидиновых оснований) – с целью дальнейшего катаболизма безазотистого остатка аминокислот и выработки энергии,
- необходимы при внутриклеточном голодании, например, при гипогликемиях различного генеза – для использования безазотистого остатка аминокислот в печени для кетогенеза и глюконеогенеза, в других органах для его прямого вовлечения в реакции ЦТК,
- при патологиях (сахарный диабет, гиперкортицизм) обуславливают наличие субстратов для глюконеогенеза и способствуют патологической гипергликемии,
- продукт трансаминирования – глутаминовая кислота: 1) является одной из транспортных форм аминного азота в гепатоциты, 2) способна реагировать со свободным аммиаком, обезвреживая его.

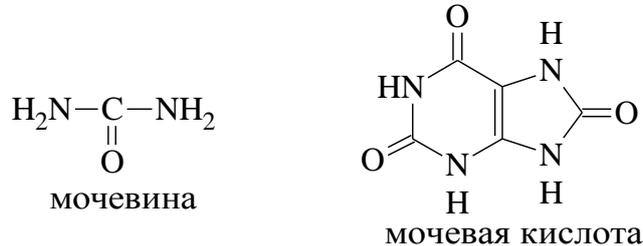
Процесс *трансдезаминирования* идет в организме непрерывно: сопряженные реакции трансаминирования и дезаминирования создают поток аминного азота из периферических клеток в печень для синтеза мочевины и в почки для синтеза аммонийных солей. В сутки с мочой выделяется 30 г мочевины и 1,2 г аммонийных солей.

В медицине нашло практическое применение определение активности двух аминотрансфераз – аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Хотя активность обоих ферментов значительно возрастает при заболеваниях сердечной мышцы и печени, при поражении клеток миокарда наибольшая активность в сыворотке крови обнаруживается для АСТ, при гепатитах – для АЛТ.

В клинической практике определение активности АЛТ и АСТ используется для дифференциальной диагностики болезней печени и миокарда, глубины поражения и контроля эффективности их лечения.

Реакции дезаминирования позволяют организму удалять избыток аминокислот, однако при этом повышается концентрация нежелательных азоти-

стых веществ. Высокие концентрации аммиака и его производных токсичны для организма, который поэтому стремится освободиться от них, выделяя избыточный азот в виде мочевины или мочевой кислоты:

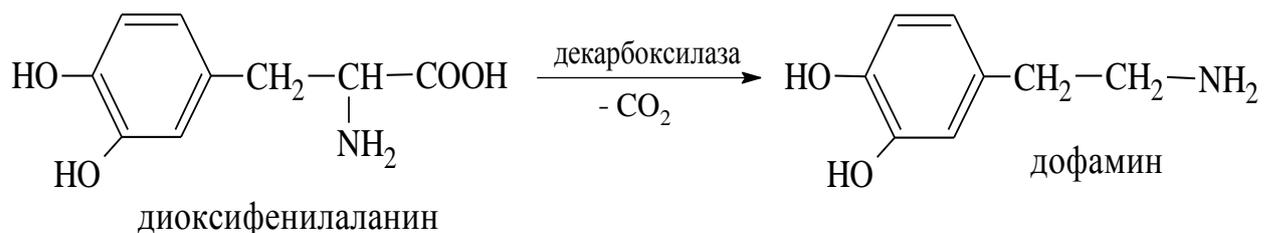


Обратите внимание! Мочевая кислота образуется в организме взрослого человека в качестве конечного продукта распада нуклеозидов и выводится с мочой. Высокое содержание мочевой кислоты приводит к мочекаменной болезни. Мочевая кислота в виде кристаллов моносодиевой соли образует камни в почках и в мочевом пузыре. Соли мочевой кислоты в суставах вызывают болезненные симптомы подагры – очень широко распространенного заболевания человека. Ежедневно из организма выводится 04-06 г мочевой кислоты и уратов.

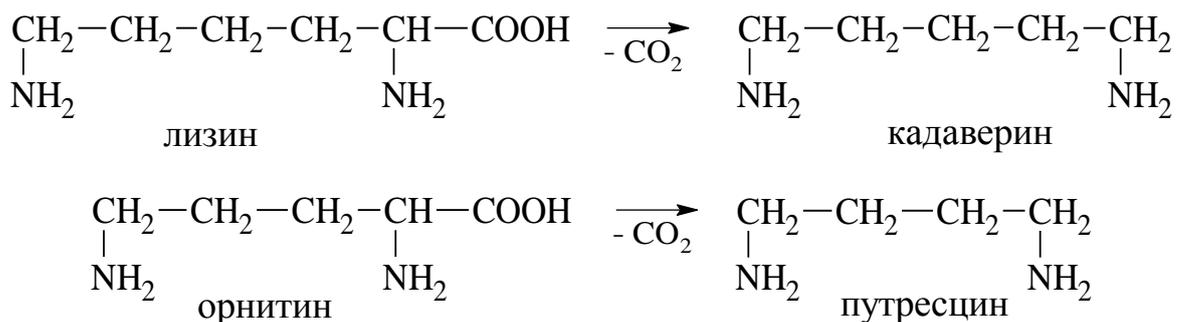
Декарбоксилирование аминокислот

Декарбоксилирование *in vivo* – это путь образования биогенных аминов. В организме эта реакция катализируется ферментами – декарбоксилазами, содержащими в качестве кофермента пиридоксальфосфат (производное витамина B6).

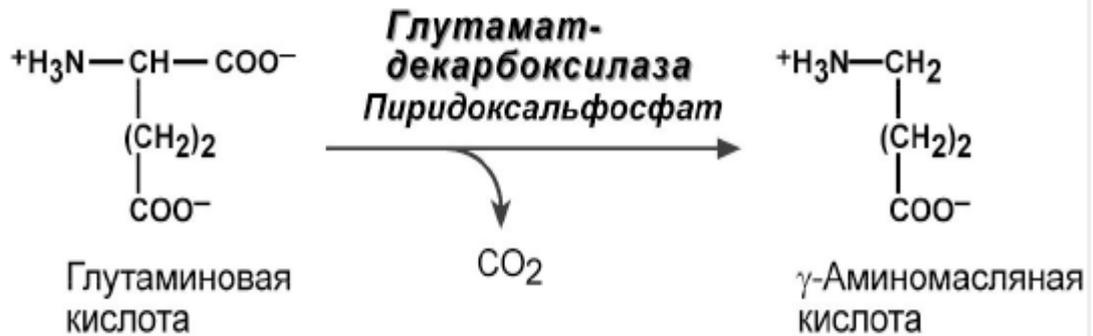
Некоторые амины обладают ярко выраженной биологической активностью. Интересной, например, является реакция образования дофамина при декарбоксилировании диоксифенилаланина, поскольку дофамин – это биологический предшественник адреналина:



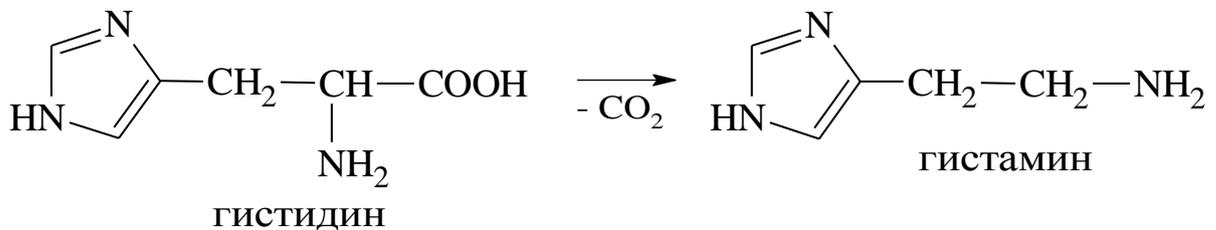
В реакции декарбоксилирования, которая протекает при гниении белков, лизин и орнитин, образуют диамины: кадаверин и путресцин:



Реакция декарбоксилирования глутаминовой кислоты приводит к образованию γ -аминомасляной кислоты, которую рассматривают как природный транквилизатор:



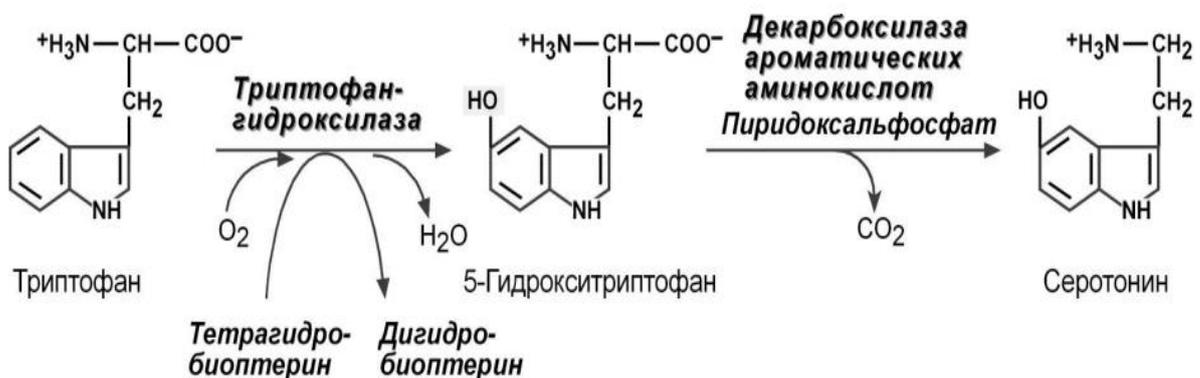
Ярко выраженной биологической активностью обладает амин, образующийся при декарбоксилировании гистидина:



Гистамин является медиатором аллергии: он расширяет все периферические сосуды, что приводит к резкому падению артериального давления, нарушает проницаемость сосудистой стенки (одна из причин появления отеков), вызывает бронхоспазм и др.

Группа препаратов, применяемых в медицине для уменьшения проявления аллергических реакций, так или иначе связанных с гистамином, была названа *антигистаминными препаратами*.

Серотонин активно синтезируется в клетках головного мозга, желудочно-кишечного тракта, щитовидной железе и других органах из *триптофана*:



Серотонин или как часто его называют «гормон радости» впервые был открыт в 1935 году итальянским фармакологом Витторио Эрспамером. Его физиологические эффекты оказались весьма разнообразны.

Так, серотонин:

- стимулирует сокращение гладких мышц желудочно-кишечного тракта и, как следствие, повышает перистальтику ЖКТ;
- выражено стимулирует сокращение гладких мышц кровеносных сосудов в тканях, кроме миокарда и скелетных мышц, и, как следствие, вызывает повышение артериального давления;
- в центральной нервной системе является тормозным медиатором;
- в периферических нервных окончаниях обуславливает возникновение боли и зуда (например, при укусе насекомых) и др.

Биологическую роль серотонина можно подразделить на два основных действия – центральное и периферическое:

- Центральное действие (ЦНС) – повышение аппетита, регуляция памяти, настроения, поведения, функций сердечно-сосудистой и эндокринной систем.
- Периферическое действие – активирует перистальтику, повышает агрегацию тромбоцитов, проницаемость мелких сосудов, оказывает радиопротекторное действие.

Существуют два типа реакций инактивации биогенных аминов – дезаминирование и метилирование.

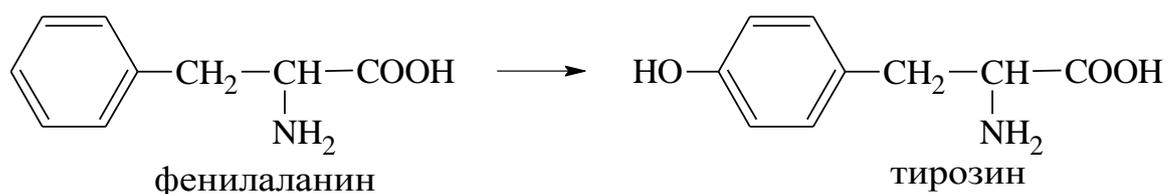
Дезаминирование протекает с образованием свободного аммиака и с участием ФАД. Катализирует реакцию моноаминоксидаза, она обнаружена во многих тканях, но наиболее активна в печени, желудке, почках, кишечнике, нервной ткани.

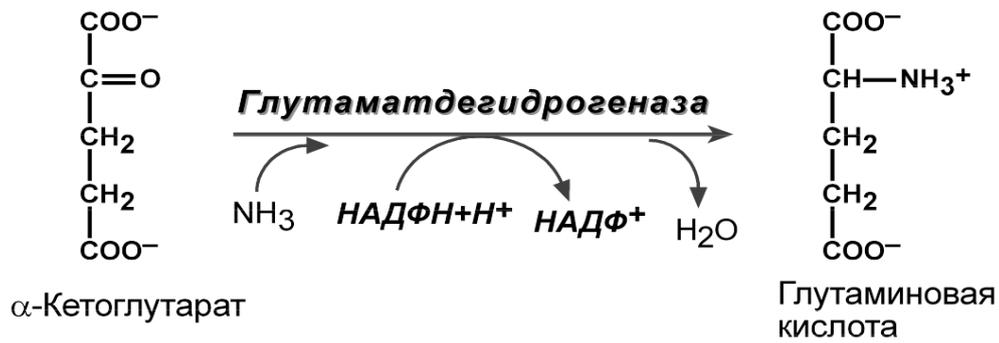
Метилирование биогенного амина происходит при наличии у него гидроксильной группы (дофамин, серотонин). В реакции принимает участие активная форма метионина – S-аденозилметионин (SAM), образуется метилированная форма амина и S-аденозил-гомоцистеин (САГ).

Реакции гидроксирования и карбоксилирования

С помощью этих реакций в молекулу органического соединения вводится дополнительная гидроксильная или карбоксильная группы. Реакции протекают при участии соответствующих ферментов и приводят к образованию модифицированных аминокислот. Эти реакции не имеют аналогов в химии *in vitro*.

Гидроксированием называют введение в молекулу органического соединения гидроксильной группы. Так, гидроксирование фенилаланина приводит к образованию тирозина:



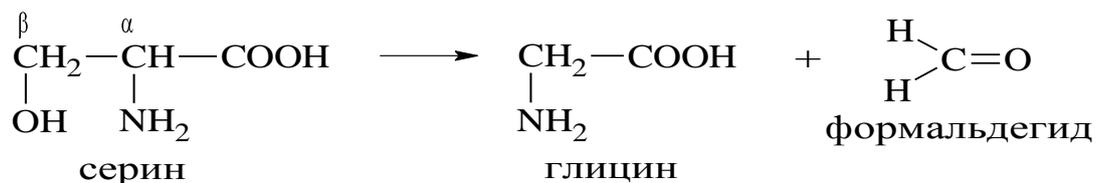


Реакция восстановительного аминирования

Альдольное расщепление

Реакция протекает с α -аминокислотами, содержащими гидроксильную группу в β -положении углеводородного радикала.

Рассмотрим, например, реакцию расщепления серина, в результате которой образуются глицин и формальдегид:



В результате этой реакции расщепляется С-С связь между α - и β -углеродными атомами. Образующийся формальдегид не выделяется, а связывается с другим коферментом – тетрагидрофолиевой кислотой и в качестве одноуглеродного фрагмента участвует далее в синтезе многих важных соединений.

§ 3. Обмен аминокислот

3.1. Обмен отдельных аминокислот

(схемы из Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018г), www.biokhimija.ru)

Глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

В организме аспартат и глутамат используются всеми клетками для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований. Амидные производные этих аминокислот являются транспортными формами аммиака из тканей в почки и печень. Кроме этого, глутаминовая кислота входит в состав глутатиона – вещества, выполняющего две различные функции – перенос аминокислот через мембрану и ключевое звено в антиоксидантной системе клетки. Глутамат и его производное γ -аминомасляная кислота являются медиаторами в ЦНС. Пути использования аспартата и глутамата представлены на рис. 4.

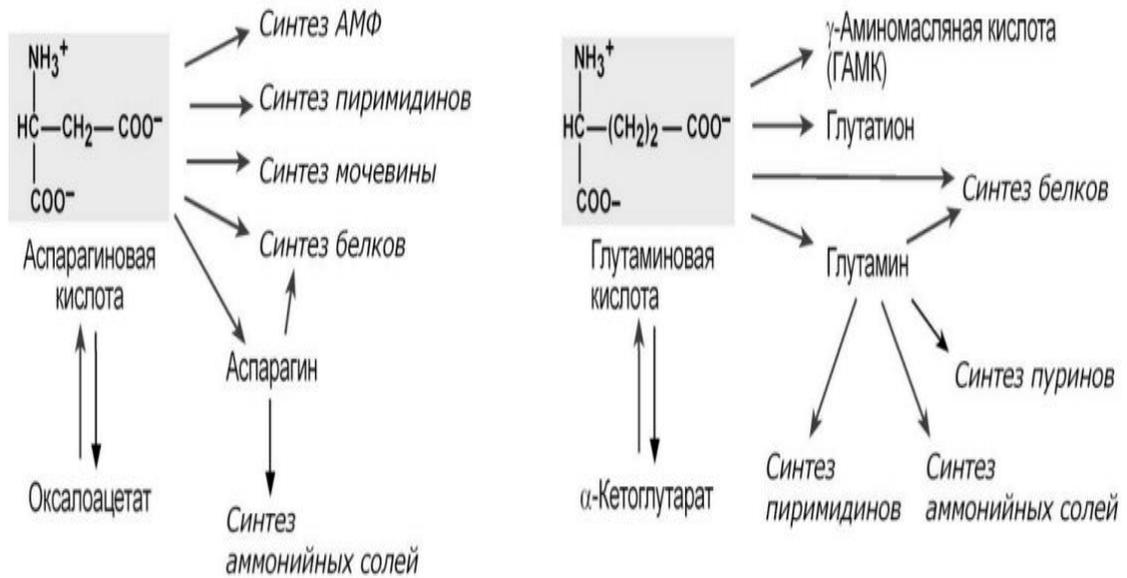


Рис. 4. Пути использования аспарагиновой и глутаминовой кислот

Цистеин.

Цистеин является чрезвычайно важной аминокислотой в связи с тем, что это единственный источник органической серы для клеток организма. В результате реакций метаболизма эта сера переходит в состав других серусодержащих веществ – фосфоаденозинфосфосерная кислота (ФАФС), коэнзим А, глутатион, сульфированные производные углеводов (хондроитинсульфат, кератансульфат, дерматансульфат) или выводится почками в виде сульфатов. Одним из производных цистеина является таурин, обладающий следующими функциями: является обязательным компонентом желчных кислот и играет роль внутриклеточного антиоксиданта (рис. 5):

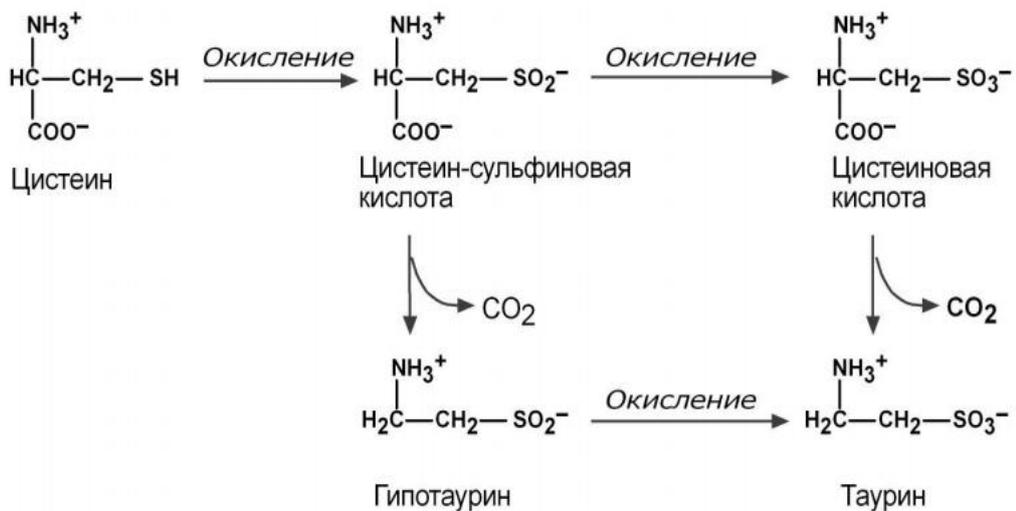


Рис. 5. Схема синтеза таурина

Есть данные о функции таурина как тормозного нейромедиатора.

Использование цистеина в организме можно представить общей схемой (рис. 6):

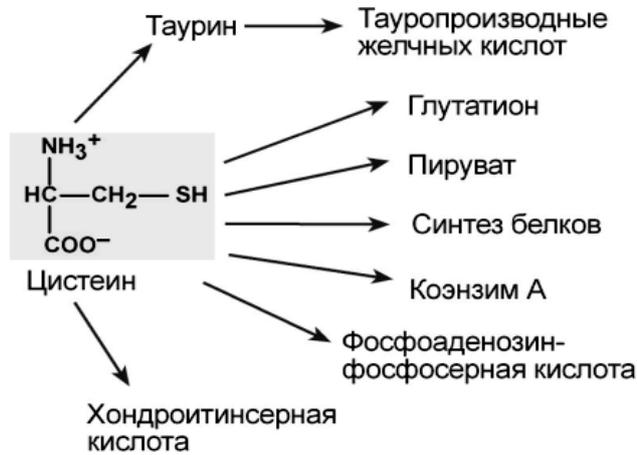
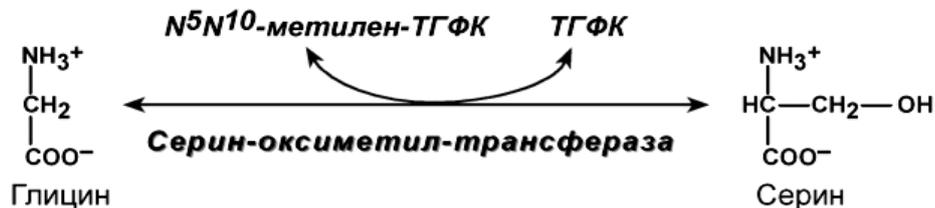


Рис. 6. Схема использования цистеина в организме

Глицин и серин.

Несмотря на простоту строения, глицин и серин весьма востребованы в клетках.

Роль реакции превращения серина в глицин состоит в образовании активной формы тетрагидрофолиевой кислоты – N⁵,N¹⁰-метилен-ТГФК. Одновременно данная реакция является первой на пути катаболизма серина:



Пути превращения глицина и серина представлены на схеме (рис. 7.):

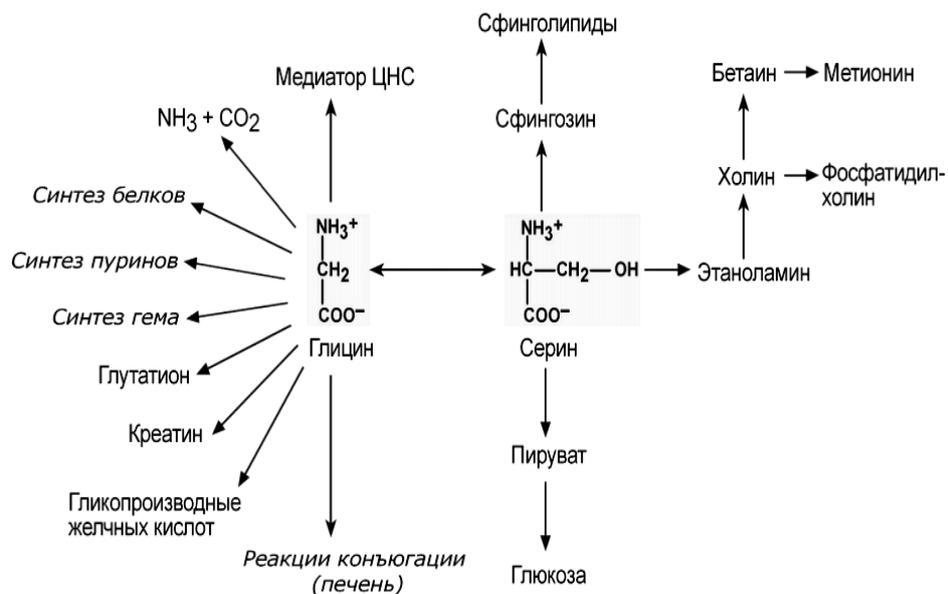


Рис. 7. Схема пути превращения глицина и серина

Это полезно знать! Взаимосвязь обмена глицина, серина, метионина и цистеина

Образованный в реакции распада серина до глицина N5,N10-метилен-ТГФК при участии фермента метилен-ТГФК-редуктазы превращается в N5-метил-ТГФК. Это соединение участвует в метионин-синтазной реакции реметилирования гомоцистеина в метионин. Метионин затем присоединяет аденозильный остаток и превращается в активную форму метионина – S-аденозилметионин, участвующий во многих реакциях метилирования, в частности, при синтезе креатина, фосфатидилхолина, адреналина.

В результате перемещения метильной группы и отщепления аденозина остается гомоцистеин, имеющий два пути метаболизма. Первый путь – реметилирование до метионина и вновь участие в реакциях метилирования. Второй путь – взаимодействие с серином при участии цистатионин-синтазы, превращение в цистатионин с последующим распадом в цистеин и α-кетобутират. Реакции метилирования необходимы для синтеза, кроме указанных, холина, нуклеотидов в ДНК и РНК, гистонов, используются для метилирования чужеродных соединений, в том числе лекарственных веществ.

Нарушение обмена серосодержащих аминокислот проявляется в виде:

1. Цистинурия – заболевание, при котором серосодержащие аминокислоты теряются с мочой в результате нарушения реабсорбции в почках.

2. Цистиноз – накопление серосодержащих аминокислот в тканях в результате снижения активности лизосомальных ферментов их распада.

3. Гомоцистинурия – патологическое состояние, при котором с мочой выделяется гомоцистеин в результате нарушения промежуточных стадий обмена серосодержащих аминокислот. Накапливающиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что гомоцистеин играет существенную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, тромбозов.

В настоящее время самым актуальным нарушением является *гомоцистеинемия* – накопление гомоцистеина в крови.

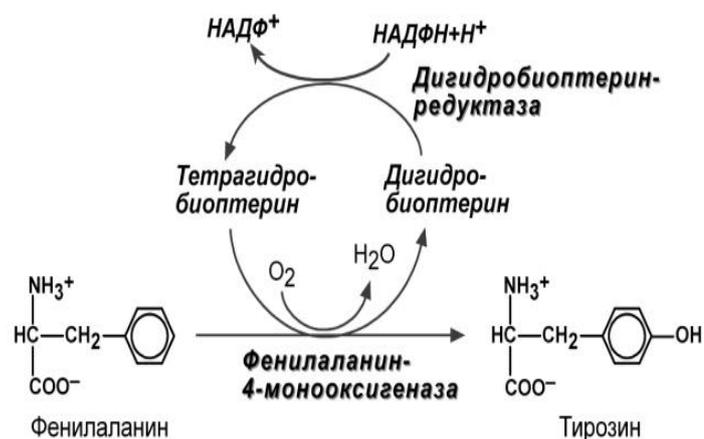
Все причины данного нарушения делят, как минимум, на две группы:

1. Дефицит витаминов B₁₂, B₆, B₉, которые участвуют в метаболизме гомоцистеина.

2. Наследственный дефект ферментов – метионинсинтазы, цистатионин-синтазы, метилен-ТГФК-редуктазы.

Фенилаланин и тирозин.

Фенилаланин относится к незаменимым аминокислотам, поскольку ткани животных не обладают способностью синтезировать его бензольное кольцо. В организме фенилаланин используется только в синтезе белков. Весь неиспользованный запас аминокислоты превращается в тирозин:



Окисление фенилаланина в тирозин происходит при участии фермента фенилаланингидроксилазы и кофермента тетрагидробиоптерина.

При врожденном дефекте данного фермента развивается заболевание *фенилкетонурия*, при котором фенилаланин переходит в токсичные для ткани мозга соединения фенилпируват, фенилацетат. К тому же возникающий дефицит тирозина блокирует синтез нейромедиаторов. Фенилкетонурия сопровождается развитием слабоумия (фенилпировиноградная олигофрения).

Тирозин полностью заменим при достаточном поступлении фенилаланина с пищей. Кроме синтеза белков, он необходим для синтеза тиреоидных гормонов, катехоламинов и пигментов. Схема использования тирозина (рис. 8).

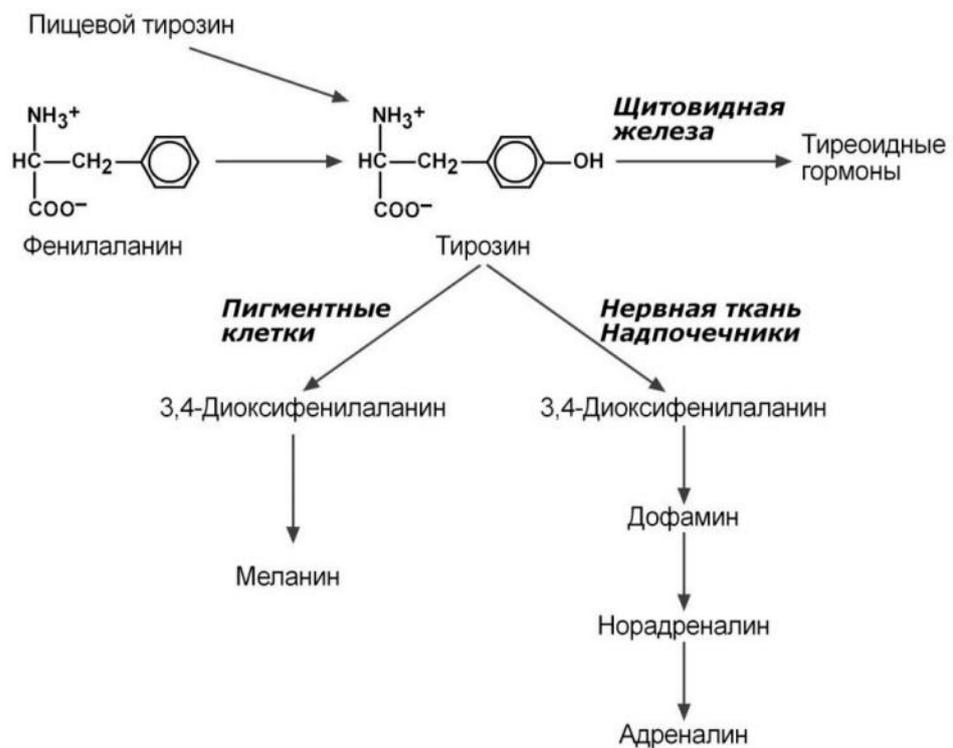


Рис. 8. Схема использования тирозина

При врожденном дефекте трансаминазы, гидроксилазы, гидролазы развиваются различные виды *тирозинозов*. При отсутствии оксидазы гомогентизиновой кислоты наблюдается *алкаптонурия*, характеризующаяся повышенным выделением с мочой гомогентизиновой кислоты, которая при контакте с воздухом переходит в продукты тёмного цвета.

При полном или частичном дефекте синтеза фермента *тирозиназы* (частота 1:20000), необходимой для синтеза диоксифенилаланина и меланинов в пигментных клетках, развивается *альбинизм*. При полном отсутствии фермента – полная депигментация кожи, волос, глаз, причем окраска одинакова для всех расовых групп и не меняется с возрастом. При частичной недо-

статочности фермента отмечаются светло-желтые волосы, слабопигментированные родинки, очень светлая кожа.

По данным исследований многих авторов, болезнь Паркинсона является полиэтиологичным заболеванием. Одной из причин *паркинсонизма* является низкая активность *тирозин-гидроксилазы* или *ДОФА-декарбоксилазы* в нервной ткани, при этом развивается дефицит нейромедиатора дофамина и накопление тирамина. Распространенность *болезни Паркинсона* составляет 0,15 %, достигая приблизительно 1% среди людей в возрасте старше 60 лет. Абсолютные причины возникновения болезни Паркинсона до настоящего времени точно не установлены.

Аргинин.

Аргинин является положительно заряженной и условно незаменимой аминокислотой. Понятие «условно незаменимая» используется потому, что у детей и подростков, у пожилых людей синтез аргинина не покрывает потребности организма.

Аргинин в тканях входит в состав белков и, в частности, гистонов, регулирующих состояние ДНК.

Метаболизм аргинина по аргиназному пути ведет к синтезу регуляторных полиаминов спермина и спермидина. Превращение по NO-синтазному пути используется для образования оксида азота (NO), выполняющего функцию мессенджера.

Аргинин используется в орнитиновом цикле мочевины, при синтезе креатина, выполняющего функцию запасного макроэргического соединения (рис. 9).

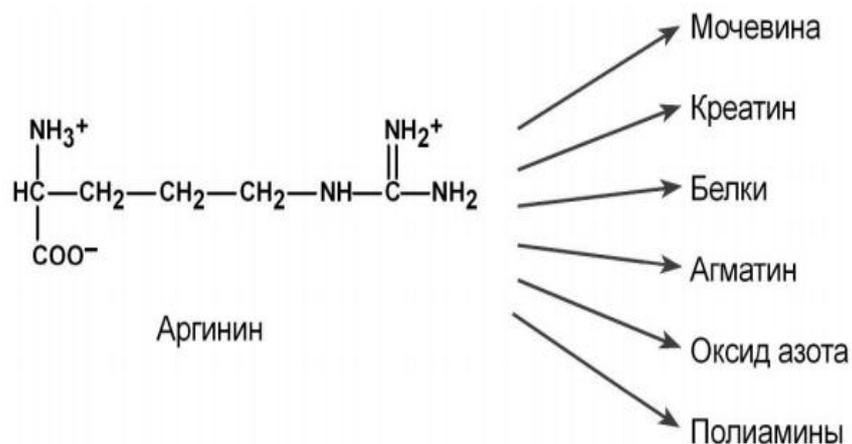


Рис. 9. Пути использования аргинина

3.2 Применение аминокислот в качестве лекарственных препаратов

В последние десятилетия наибольшее внимание в фармацевтической промышленности уделяется разработке лекарственных средств на основе биологически активных веществ, которые участвуют в процессах жизнедеятельности человека. В медицинской практике для лечения и профилактики различных патологий широко применяются лекарственные препараты, наиболее эффективными из которых являются аминокислотные средства. Ниже приводится их краткая фармакологическая характеристика.

Глутаминовая кислота стимулирует процессы окисления в организме, способствует обезвреживанию и выведению из организма аммиака, активирует синтез ацетилхолина и АТФ, является медиатором, стимулирующим передачу возбуждения в синапсах ЦНС. Применяется главным образом при лечении заболеваний ЦНС: эпилепсии, реактивных состояний, протекающих с явлениями истощения и депрессии, церебральных параличей, болезни Дауна и др.

Метионин – незаменимая аминокислота, необходимая для поддержания роста и азотистого баланса организма, обладает липотропным действием, повышает антитоксическую функцию печени. Применяют метионин для лечения и предупреждения заболеваний и токсических поражений печени, а также при хроническом алкоголизме, сахарном диабете, атеросклерозе и др.

Орнитин снижает концентрацию аммиака в плазме крови, способствует нормализации кислотно-щелочного равновесия в организме. Назначают для лечения гепатита, цирроза печени, печеночной энцефалопатии, печеночной комы, поражений печени алкогольного генеза.

Гистидин – частично заменимая аминокислота, в организме подвергается декарбоксилированию с образованием гистамина. Гистидина гидрохлорид предложен для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а также атеросклероза.

Глицин – центральный нейромедиатор тормозного типа, оказывает успокаивающее действие, улучшает метаболические процессы в тканях мозга. Рекомендован как средство, ослабляющее влечение к алкоголю, уменьшающее явление абстиненции у больных хроническим алкоголизмом.

Цистеин участвует в обмене веществ хрусталика глаза и предложен для задержки развития катаракты и просветления хрусталика при начальных формах катаракты.

Таурин способствует улучшению энергетических процессов в организме, в ЦНС играет роль тормозного нейромедиатора, обладает противосудорожной активностью. Одной из характерных особенностей таурина является его способность стимулировать репаративные процессы при дистрофических нарушениях сетчатки глаза, травматических поражениях тканей глаза.

Цитруллин – аминокислота, участвующая в биосинтезе мочевины в орнитиновом цикле. Способствует нормализации обмена веществ и активизации

ции неспецифических защитных факторов организма. Применяется для симптоматической терапии функциональной астении (при переутомлении, усталости, в послеоперационном периоде, у спортсменов и т.п.).

Тавамин основан на комплексном воздействии входящих в его состав незаменимых разветвленных альфа-аминокислот – валина, лейцина, изолейцина, а также таурина. Валин обеспечивает обмен азота в организме и нужен для нормального мышечного метаболизма и регенерации поврежденных тканей. Лейцин, как незаменимый компонент синтеза белков и источник энергии, обеспечивает восстановление всех тканей организма, а также стимулирует синтез соматотропина (гормона роста) и незначительно снижает уровень сахара в крови. Изолейцин также участвует в синтезе белков, регенерации поврежденных тканей, выработке гемоглобина и регулировании содержания сахара в крови. Таурин, регулируя внутриклеточный обмен ионов калия, натрия и магния, оказывает антиоксидантное и регенерирующее действие, а также способствует выработке желчных кислот, которые обеспечивают переваривание жиров.

Препараты для парентерального питания:

Полиамин (набор 13 аминокислот).

Вамин (набор 18 аминокислот).

Ваминолакт (набор 18 аминокислот, соответствующих составу грудного молока).

Гидролизин (гидролизат белков крови крупного рогатого скота).

Аминотроф(гидролизат казеина).

Фибриносол(гидролизат фибрина крови).

Высокоочищенные аминокислоты используются для создания композиций, повышающих выносливость человека при интенсивных физических нагрузках, для снижения воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, а также при изготовлении смесей для детского питания. Также препараты аминокислот широко используются в спортивной практике в виде диетических добавок как изолированно, так и в сочетаниях друг с другом и с другими веществами. Они оказывают множественные эффекты на разные функциональные системы и органы человека, стимулируя или угнетая их деятельность. В медицинской практике используют только L-формы.

§ 4. Методы анализа аминокислот

4.1 Качественные реакции (см. подраздел 2.3.6)

4.2 Количественный химический анализ – титриметрический метод

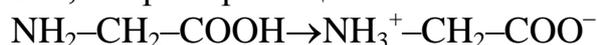
Аминокислоты нельзя титровать ни кислотами, ни щелочами в водной среде, однако их можно определять методами неводного титрования – титрованием хлорной кислотой в среде ледяной уксусной кислоты или титрованием этилатом натрия в диметилформамиде. Эти методы приемлемы лишь для анализа сухих образцов и непригодны для определения аминокислот в водных растворах, поэтому их применение в биохимии не представляет интереса. Из всех протеиногенных аминокислот лишь аспарагиновую и глутаминовую аминокислоты можно определять алкалиметрически в водной среде, поскольку их кислые свойства выражены достаточно сильно за счет наличия в их молекулах двух карбоксильных групп. Есть два общих метода алкалиметрического титрования, которые позволяют проводить анализ водных растворов любых аминокислот.

Первый метод алкалиметрического титрования разработан еще в 20-е годы прошлого века биохимиком Сёренсенем в период его работы в Баварской пивной компании, когда перед ним встала задача определения аминокислот в пиве.

Сёрен Петер Сёренсен – датский биохимик разработал метод количественного определения аминокислот в водных растворах. Ввел понятие рН (1909 г.).

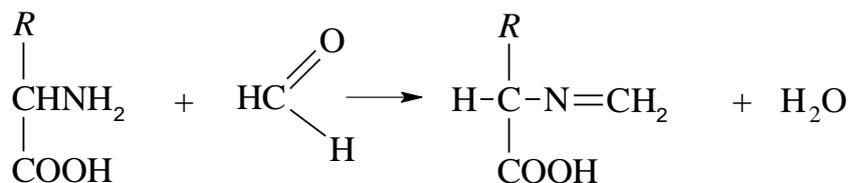
Метод Сёренсена – титрование аминокислот водным раствором щелочи в избытке формалина – формольное титрование, которое позволяет определять аминокислоты с первичными аминогруппами. Метод неприемлем для определения пролина и оксипролина, содержащих вторичную аминогруппу.

Формольное титрование служит для определения количества карбоксильных групп, которое увеличивается вследствие разрыва пептидных связей в процессе гидролиза. В водных растворах аминокислоты образуют внутримолекулярные соли, например глицин:



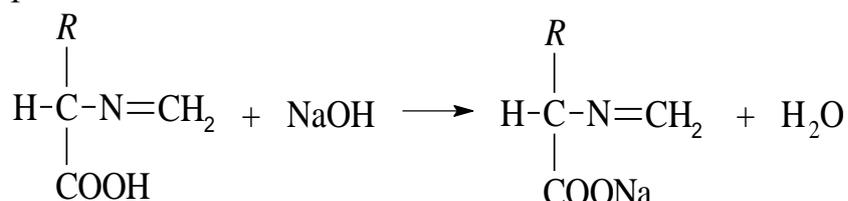
Поэтому без предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом непосредственно титровать карбоксильные – группы аминокислот щелочью невозможно.

Сущность реакции формольного титрования заключается в том, что аминные группы взаимодействуют с формальдегидом (так же, как и с другими альдегидами) и образуют метиленовые производные. При этом аминогруппы теряют свои основные свойства, карбоксильная группа оттитровывается едкой щелочью. Реакция с формальдегидом следующая:



метиленаминокислота

В процессе реакции формальдегид блокирует α -аминогруппу. Образующееся метиленовое соединение (метиленаминокислота) оттитровывается щелочью с образованием:



Определяя количество карбоксильных групп титрованием, одновременно можно судить и о содержании аминогрупп, так как количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминогрупп. Метод формолового титрования позволяет следить за ходом гидролиза белка и изучить действие протеолитических ферментов. При полном гидролизе белка количество амино- и карбоксильных групп в гидролизате перестает увеличиваться, и биуретовая реакция становится отрицательной.

Второй метод заключается в титровании водного раствора аминокислоты, разбавленного в 10 раз 96%-ным этиловым спиртом, 0,1М водным раствором КОН с индикатором тимолфталейном. По этому методу определяют содержание карбоксильных групп в небольших полипептидах, которые не осаждаются спиртом, и в белковых гидролизатах, предварительно обработанных катионитами.

Еще одним общим методом титриметрического анализа аминокислот является йодометрический метод, который приемлем для анализа кислых белковых гидролизатов. Метод основан на следующих реакциях и операциях:

Сначала получают суспензию ортофосфата меди и обрабатывают этой суспензией, взятой в избытке, в присутствии боратного буфера исследуемый раствор аминокислоты. При этом образуется растворимая комплексная медная соль аминокислоты, которую отфильтровывают от избытка ортофосфата меди. Аликвотную часть фильтрата обрабатывают избытком йодида калия в присутствии уксусной кислоты и выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом натрия. Следует отметить, что этим методом определяется не любой азот, а только α -аминокислотный.

4.3 Хроматографические методы анализа

Хроматография – один из современных методов разделения, очистки, выделения и идентификации аминокислот, пептидов и белков.

Хроматография – это метод разделения и анализа смесей веществ, основанный на повторяющихся процессах сорбции и десорбции между подвижной и неподвижной фазами.

Разработал хроматографический метод **Михаил Семёнович Цвет** (1872–1919) – русский ботаник-физиолог и биохимик растений.

Хроматографические методы классифицируются по характеру взаимодействий, лежащих в основе разделения, по агрегатному состоянию фаз, по технике выполнения анализа и аппаратному оформлению.

По принципу разделения хроматографические методы делятся на адсорбционные, распределительные, ионообменные и гель-фильтрацию.

В основе адсорбционных методов лежит явление адсорбции на поверхности твердых тел, и поэтому основными параметрами, определяющими эффективность разделения веществ, являются коэффициент адсорбции и в меньшей степени растворимость в подвижной фазе. В распределительных методах хроматографии фактором, определяющим эффективность разделения, является константа распределения вещества между фазами; в ионообменных – константа диссоциации вещества, заряд молекулы и ее ионный диаметр; в гель-фильтрации – эффективный диаметр молекулы.

По агрегатному состоянию фаз, технике анализа и его аппаратному оформлению различают адсорбционную газовую, газожидкостную (ГЖГ), высокоэффективную жидкостную (ВЭЖХ), бумажную (БХ), тонкослойную (ТСХ), колоночную и другие виды хроматографии.

В анализе аминокислот и полипептидов наибольшее распространение получили методы БХ, ТСХ, ВЭЖХ и гель-фильтрации. Для анализа аминокислот и низкомолекулярных пептидов широко применяются БХ и ТСХ на стандартных пластинках «Silufol», вследствие достаточно высокой эффективности разделения, простоты аппаратного оформления и анализа. Из приборных методов анализа аминокислот основным является метод ионообменной хроматографии, лежащий в основе работы аминокислотного анализатора.

Бумажная распределительная хроматография. В основу распределительной хроматографии, за открытие которой американские ученые Арчер Мартин и Ричард Синг получили Нобелевскую премию в 1952 году, положено свойство веществ распределяться между неподвижной фазой (н.ф.) (жидкость) и подвижной (п.ф.) (газ или жидкость) в соответствии с их коэффициентом распределения:

$$K = \frac{c(\text{н. ф.})}{c(\text{п. ф.})}$$

В качестве инертного носителя используют специальную фильтровальную бумагу. Вода, будучи полярным веществом, прочно сорбируется на целлюлозе и служит неподвижной фазой. Подвижной фазой обычно является бутанол (или другой малополярный растворитель). Гидрофобные аминокислоты, лучше растворяющиеся в неполярном растворителе, движутся от точки старта с большей скоростью, чем гидрофильные аминокислоты. В результате смесь аминокислот разделяется на отдельные компоненты, которые обнаруживают с помощью нингидриновой реакции и идентифицируют с применением аминокислот – «свидетелей».

Скорость перемещения отдельных аминокислот определяется посредством коэффициента распределения (R_f):

$$R_f = \frac{\text{Путь, пройденный аминокислотой (до середины пятна)}}{\text{Путь, пройденный растворителем (до фронта растворителя)}}$$

Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, сорт бумаги, температура и др.).

Различают одномерные, двумерные, круговые, колоночные и электрофоретические хроматограммы (рис. 10).

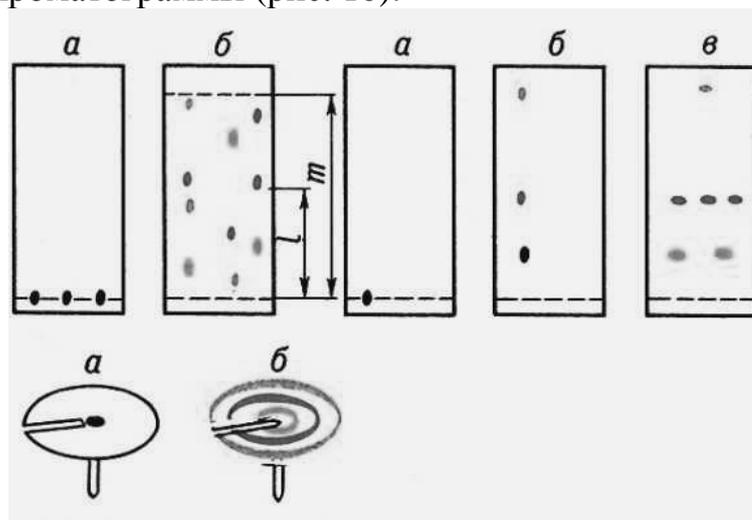


Рис. 10. Виды хроматографии; а – до разделения; б, в – после первого и второго разделений смесей веществ

Радиальную (круговую) распределительную хроматографию на бумаге проводят в чашке Петри. В центр бумажного диска пипеткой наносят исследуемый раствор, а затем несколько капель растворителя (подвижная фаза). Диффундируя, растворитель захватывает анализируемое вещество, разделяемые компоненты распределяются концентрическими кругами.

Полученную хроматограмму можно разрезать на отдельные секторы, каждый из которых подвергнуть проявлению различными проявителями.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) по механизму разделения относится к распределительной (носитель целлюлоза) или адсорбционной (носитель силикагель, оксид алюминия) хроматографии, по технике выполнения –

к плоскостной. Подвижная фаза такая же, как и при использовании бумажной хроматографии.

В методе ТСХ разделение обеспечивается движением подвижной фазы через нанесённый на подложку тонкий слой сорбента. В качестве сорбентов чаще всего применяют диоксид кремния – силикагель SiO_2 и оксид алюминия – Al_2O_3 , а также другие материалы (активированный уголь, сахарозу, карбонат кальция, тальк и др.). Важнейшей характеристикой сорбента является его активность, т.е. способность сорбировать (удерживать) компоненты разделяемой смеси. Выбор растворителя (подвижной фазы) определяется природой сорбента и свойствами разделяемых веществ. Продвижение органического растворителя по пластине так же, как и в бумажной хроматографии, обеспечивается капиллярными силами.

Тонкослойная хроматография была открыта еще в 1889 году, получила существенное развитие в середине XX века и до настоящего времени широко используется в медицине, фармации.

Ионообменная хроматография – метод разделения, анализа и физико-химического исследования веществ, основой которого является эквивалентный обмен ионов раствора на ионы твердой фазы (ионообменная смола – ионообменник). Заряженные молекулы обратимо адсорбируются ионообменником, так что молекулы могут связываться и элюироваться в зависимости от pH и ионного состава среды.

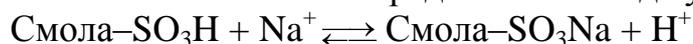
Неподвижная фаза в ионообменной хроматографии обычно представляет собой трехмерную структуру (матрицу), содержащую ковалентно связанные с ней заряженные группы. Матрицу можно изготовить из различных материалов. Чаще всего применяются декстран, целлюлоза, сополимер стирола и дивинилбензола и силикагель. Силикагель представляет собой высушенный гель, образующийся из перенасыщенных растворов кремниевых кислот – $n\text{SiO}_2 \cdot m\text{H}_2\text{O}$.

В зависимости от знака заряда функциональных групп ионообменные смолы разделяются на катиониты и аниониты.

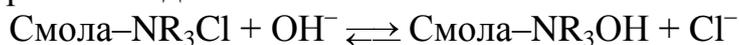
Катиониты содержат функциональные кислотные группы: $-\text{SO}_3^-$; $-\text{COO}^-$; $-\text{PO}_3^-$; $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2$. Функциональными группами каркаса анионитов являются четвертичные $-\text{NR}_3^+$, третичные $-\text{NR}_2\text{H}^{++}$ или первичные $-\text{NH}_3^+$ аммониевые, пиридиновые и другие основания.

Промышленные катиониты обычно поставляются в H^+ -форме или Na^+ -форме, а аниониты – в OH^- -форме или Cl^- -форме.

Механизм катионного обмена можно представить в виде уравнения:



Аналогично уравнение для анионного обмена:



В качестве *подвижной фазы* используют водные растворы солей, кислот и оснований, имеющих достаточно высокое значение диэлектрической

проницаемости и способность ионизировать соединения. При необходимости в подвижную фазу добавляют небольшое количество смешивающихся с водой органических растворителей – метанола, этанола, ацетонитрила, тетрагидрофурана.

Буферные растворы (чаще всего ацетатный, фосфатный, цитратный, формиатный, аммиачный и боратный) подбирают таким образом, чтобы молекула образца была полностью ионизирована. Так как буферы сами по себе состоят из ионов и принимают участие в ионном обмене, принято правило: катионные буферы используются с анионитами, анионные буферы – с катионитами.

Общая емкость ионообменника определяется его способностью связывать обмениваемые ионы и выражается в миллиэквивалентах обменивающихся групп на 1 мг сухого сорбента. Эта величина имеет существенное значение, так как при *перегрузке* колонки ионы анализируемого образца будут проходить через колонку без связывания.

Перегрузка колонки выражается уширением и искажением формы пика, а также зависимостью удерживания от вводимого количества вещества.

Ионообменную хроматографию можно применять для разделения любых соединений, которые могут быть каким-либо образом ионизированы. Данный вид хроматографии позволяет идентифицировать и разделять практически любые заряженные молекулы и лежит в основе аминокислотных анализаторов, позволяющих автоматизировать почти все стадии анализа, за исключением подготовки пробы (рис. 11).

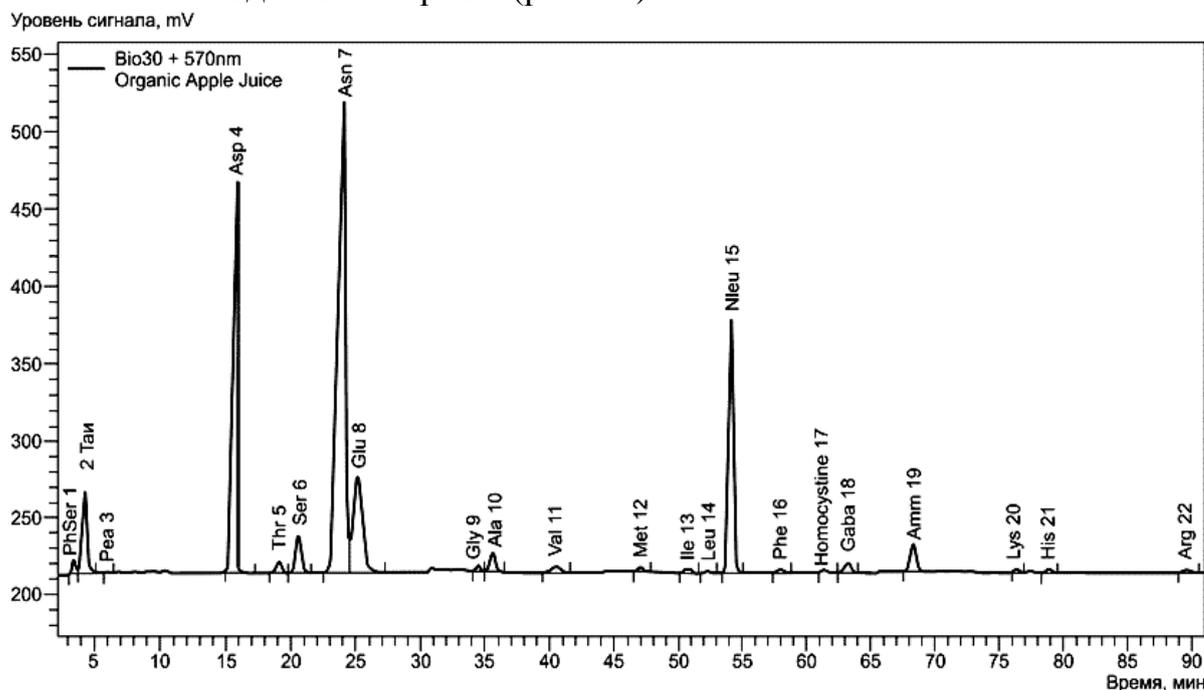


Рис. 11. Ионообменная хроматограмма свободных аминокислот в яблочном соке (из учебника Литвиновой Т.Н., Хорунжего В.В. «Химия. Основы химии для студентов медицинских вузов»)

В экспериментальном отношении ионообменная хроматография – один из самых трудных видов хроматографии, так как имеется много параметров, которые необходимо учитывать и контролировать.

Методом хроматографии и электрофореза на бумаге исследуют аминокислотный состав мозга в норме и при патологических процессах в мозге (в частности, образовании опухолей).

В настоящее время интенсивно развивается наиболее чувствительный и высокоспецифический метод флюоресцентного количественного анализа аминокислот, позволяющий определять их не только в гидролизатах белков, но и непосредственно в различных жидкостях организма (кровь, моча и др.). Метод основан на реакции α -аминокислот с *o*-фталевым диальдегидом в присутствии меркаптоэтанола с образованием флюоресцирующих продуктов (реакция Циммермана).

§ 5. Обучающие и контролирующие материалы

5.1 Задачи с решением

Задача 1

Смесь глицина, аланина, лизина, аргинина, серина и глутаминовой кислоты разделяли методом электрофореза при $pH = 6$. Определите направление движения аминокислот при электрофорезе, если изоэлектрические точки этих аминокислот соответственно равны значениям pI : 6,0; 6,0; 9,8; 10,8; 5,7 и 3,2.

Решение:

В изоэлектрической точке ($pI \approx pH$) суммарный заряд α -аминокислоты равен нулю. В данных условиях такое соотношение выполняется для аланина, глицина и серина и эти аминокислоты в электрическом поле перемещаться не будут.

При $pH > pI$ преобладает анионная форма и аминокислота (в данном случае глутаминовая кислота) будет перемещаться к аноду.

В случае, когда $pH < pI$ в растворе преобладает катионная форма, поэтому лизин и аргинин будут перемещаться к катоду.

Задача 2

Даны три аминокислоты: аспарагиновая, лизин и глицин. Определите, в какой среде – кислой, нейтральной или щелочной – будут находиться изоэлектрические точки (ИЭТ) этих кислот по сравнению с глицином, для которого $pI = 6$.

Решение:

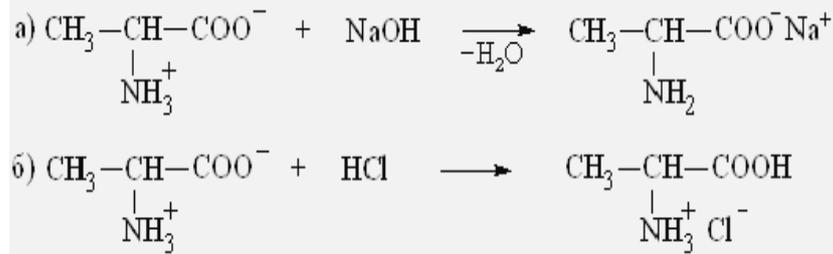
У аспарагиновой кислоты pI будет находиться в более кислой среде, чем у глицина, так как для подавления диссоциации второй карбоксильной группы требуется дополнительное количество ионов H^+ .

У лизина pI будет находиться в более щелочной среде, чем у глицина, так как для предотвращения образования второй NH_3^+ группы требуется дополнительное количество ионов OH^- .

Задача 3

Написать уравнения реакций аланина, характеризующие его амфотерные свойства.

Решение:

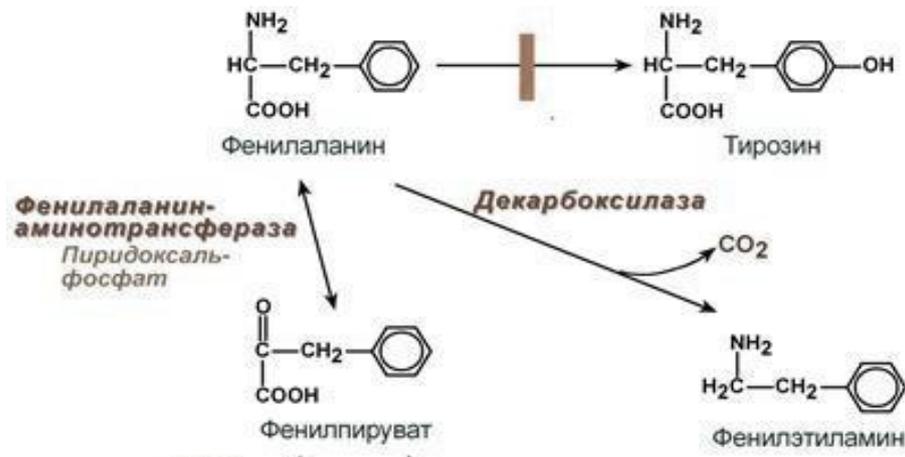


Задача 4

У ребёнка замедленно нервно-психическое развитие, судорожный синдром. С мочой выделяется больше количество фенилпировиноградной кислоты (1-2 г), в то же время в крови наблюдается накопление фенилаланина (600 мг/л, а в норме – 15 мг/л), ощущается «мышинный запах». Что это за заболевание и какова причина?

Решение:

Это фенилпировиноградная олигофрения (фенилкетонурия). Это заболевание относится к энзимопатиям, причина которого – мутация гена, ответственного за синтез фермента гидроксилазы, катализирующего превращение фенилаланина в тирозин. В отсутствие этого фермента или при его недостаточной активности в организме накапливается фенилаланин. При его дезаминировании (удаление азотсодержащей функциональной группы) получается оксокислота – фенилпировиноградная кислота, которая и вызывает токсический эффект:



В то же время наблюдается в крови дефицит тирозина. Побочный продукт фенилуксусная кислота – причина «мышинного запаха».

5.2. Вопросы и задачи для самостоятельного выполнения

Контрольные вопросы

1. Что такое аминокислоты? Приведите классификацию природных α -аминокислот по радикалу, по количеству амино- и карбоксильных групп. Приведите примеры.
2. Какие другие функциональные группы, кроме амино- и карбоксильных, могут входить в состав природных α -аминокислот, являющихся мономерами белков? Напишите формулы соответствующих представителей.
3. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Перечислите незаменимые для человека аминокислоты.
4. В какие реакции вступают аминокислоты по карбоксильной группе? Приведите примеры.
5. В какие реакции вступают аминокислоты по аминогруппе. Приведите примеры.
6. Перечислите основные пути обмена глицина, серина, метионина.
7. Какое вещество получается при декарбоксилировании L-серина? Назовите полученный продукт и укажите в состав каких важных органических веществ он входит?
8. Напишите уравнение реакции окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты с помощью кофермента НАД⁺. Какой фермент катализирует данную реакцию? Какое вещество образуется на первой стадии процесса? Может ли эта реакция протекать в обратном направлении? Если да, то как она называется?
9. Напишите строение трипептида Вал-Фен-Лей. Укажите пептидные связи, С- и N-концевые аминокислоты.
10. Как, используя электрофорез, можно разделить смесь двух аминокислот, изоэлектрические точки которых равны, соответственно, 5,68 и 9,74?
11. Напишите катионную и анионную формы аланина. К каким электродам будут перемещаться эти ионы в электрическом поле?
12. Почему изоэлектрическая точка (ИЭТ) аминокислот, содержащих равное количество амино- и карбоксильных групп (в частности, глицина) не равна 7, а находится в слабокислом диапазоне рН?
13. Напишите этапы ионизации аспарагиновой кислоты и лизина. Учитывая, что для кислых α -аминокислот $pI < 7$, а для основных $pI > 7$, определите в какой форме (катионной или анионной) находятся эти кислоты *in vivo*.
14. Охарактеризуйте специфические реакции аминокислот, имеющие аналитическое значение.
15. Какова «судьба» аминокислот фенилаланина, тирозина, аргинина в организме человека?

Задачи для самостоятельного выполнения

1. Даны три аминокислоты: аспарагиновая, лизин и глицин. Определите, в какой среде – кислой, нейтральной или щелочной – будут находиться изоэлектрические точки (ИЭТ, pI) этих кислот по сравнению с глицином, для которого $pI = 6$.

2. Смесь аминокислот, содержащая валин, лейцин, аспарагиновую кислоту, лизин, гистидин, серин была подвергнута фракционированию методом электрофореза на бумаге при $pH = 6,2$. Как аминокислоты будут перемещаться в электрическом поле: к катоду, аноду или останутся на линии старта?

3. В сильнокислом растворе аминокислота существует в виде катиона и содержит две кислотные группы: $-NH_3^+$ и $-COOH$.—Учитывая, что константы кислотности (K_a) для $-NH_3^+$ и $-COOH$ групп соответственно равны $1,6 \cdot 10^{-10}$ и $4 \cdot 10^{-3}$, определите, какая из этих групп будет более кислой и какая из них будет легче отдавать протон при прибавлении к исходному раствору щелочи. Какое соединение при этом образуется?

4. В сильнощелочном растворе аминокислота существует в виде аниона $R-CH-COO^-$ и содержит две основные группы: NH_2 и $-COO^-$.

Учитывая, что константы основности (K_b) для NH_2 -группы и карбоксилат-аниона $R-COO^-$, соответственно, равны $6,3 \cdot 10^{-5}$ и $2,5 \cdot 10^{-12}$, определите, какая из этих групп будет более основной, и к какой группе будет предпочтительно присоединяться протон при прибавлении к раствору кислоты. Какое соединение при этом образуется?

5. У ребёнка отмечается альбинизм, расстройство зрения, отсутствие пигментов в коже, волосах, сетчатке. С нарушением обмена какой аминокислоты связано это явление?

6. Заболевание фенилкетонурия связано с нарушением синтеза тирозина из фенилаланина и накоплением в организме токсичных продуктов дезаминирования фенилаланина. Какое соединение получается в результате окислительного дезаминирования фенилаланина?

5.3. Тестовые задания

1. Незаменимые для человека аминокислоты:

- а) фенилаланин
- б) тирозин
- в) триптофан
- г) треонин
- д) метионин

2. Аминотрансферазы содержат кофермент:

- а) $НАД^+$
- б) ФАД
- в) пиридоксальфосфат

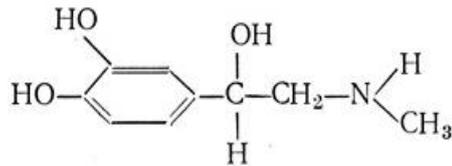
- г) тиаминдифосфат
 - д) биотин
- 3. Положительным зарядом в радикальной части обладают аминокислоты:**
- а) аспарагин
 - б) глутамин
 - в) лизин
 - г) глутамат
 - д) гистидин
- 4. В реакциях дезаминирования аминокислот участвуют:**
- а) гистидиндекарбоксилазы
 - б) глутаминаминотрансферазы
 - в) глутаматдегидрогеназы
 - г) пируваткарбоксилазы
 - д) аспартатаминотрансферазы
- 5. Серосодержащие аминокислоты:**
- а) метионин
 - б) лизин
 - в) валин
 - г) цистеин
 - д) аргинин
- 6. Продуктом дезаминирования аминокислот является:**
- а) ацетил-КоА;
 - б) аммиак;
 - в) цитрат;
 - г) мочевины;
 - д) биогенный амин.
- 7. Донор метильных групп:**
- а) валин;
 - б) лейцин;
 - в) метионин;
 - г) аргинин;
 - д) треонин.
- 8. Аминокислоты – производные пропионовой кислоты:**
- а) аланин;
 - б) серин;
 - в) цистеин;
 - г) треонин;
 - д) фенилаланин.
- 9. Аминокислоты с отрицательным зарядом в радикале:**
- а) аспарагин;
 - б) глутамин;

- в) глутамат;
- г) аргинин;
- д) аспаргат.

10. Гидрофобная аминокислота:

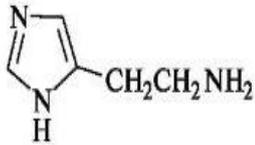
- а) серин;
- б) лейцин;
- в) глутамин;
- г) цистеин;
- д) лизин.

11. Представленное соединение – это:



- а) гистамин;
- б) адреналин;
- в) дофамин;
- г) тироксин;
- д) тирозин.

12. Представленное соединение – это:



- а) адреналин;
- б) гистамин;
- в) меланин;
- г) дофамин;
- д) тироксин.

13. Гистамин является:

- а) пищеварительным гормоном;
- б) противовоспалительным веществом;
- в) сосудосуживающим веществом;
- г) тормозным медиатором нервной системы;
- д) противоаллергическим препаратом.

14. Аминокислота – производное глутаровой кислоты:

- а) аспарагиновая кислота;
- б) глутаминовая кислота;
- в) аргинин;
- г) лизин;
- д) гистидин.

15. Гистамин образуется в результате реакции:

- а) трансаминирования аминокислоты;
 - б) трансметилирования;
 - в) декарбоксилирования аминокислоты;
 - г) гидроксирования аминокислоты;
 - д) дезаминирования аминокислоты.
- 16. γ -аминомасляная кислота образуется из:**
- а) гистидина;
 - б) аспарагиновой кислоты;
 - в) глутаминовой кислоты;
 - г) глутамина;
 - д) аспарагина.
- 17. Положительную реакцию Фоля дает:**
- а) триптофан;
 - б) гистидин;
 - в) тирозин;
 - г) треонин;
 - д) цистеин.
- 18. Положительную ксантопротеиновую реакцию дают:**
- а) фенилаланин;
 - б) метионин;
 - в) триптофан;
 - г) аргинин;
 - д) аспарагин.
- 19. Укажите аминокислоту, радикалы которой имеют при $\text{pH} = 7.0$ отрицательный заряд:**
- а) лизин;
 - б) серин;
 - в) треонин;
 - г) глутаминовая кислота;
 - д) аргинин;
 - е) аспарагин.
- 20. Гидрофильными аминокислотами являются:**
- а) фенилаланин;
 - б) лейцин;
 - в) треонин;
 - г) серин;
 - д) аланин.
- 21. В процессе восстановительного аминирования α -кетоглутаровой кислоты участвует:**
- а) НАДФ⁺;
 - б) НАДФН(Н⁺);
 - в) ФАДН₂;

5.4. Ответы на тестовые задания

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1.	а, в, г, д	11.	б	21.	б
2.	в	12.	б	22.	а
3.	в, д	13.	а	23.	а, б, г, д
4.	в	14.	б	24.	б, в
5.	а, г	15.	в	25.	1-д 2-б 3-в
6.	б	16.	в	26.	1-а 2-в 3-г
7.	в	17.	д	27.	1-д 2-в 3-а
8.	а, б, в, д	18.	а, в	28.	1,6-б 2,5-в 3,4-а
9.	в, д	19.	г	29.	1-а,б,г 2-б 3-в,д
10.	б	20.	в, г	30.	1-г; 2-б 3-в;4-г 5-а; 6-в

Глава 2 БЕЛКИ, ПОЛИПЕПТИДЫ

После изучения темы студент должен

Знать:

- Химический состав белков, строение, биологическая роль.
- Виды химических связей в молекулах белков. Уровни структурной организации белков.
- Классификации белков. Семейства белков: шапероны, иммуноглобулины.
- Физико-химические свойства белков.
- Простые белки. Сложные белки. Строение, биологическая роль.

Уметь:

- Классифицировать белки, выделять классификационные признаки.
- Изображать образование связей в белковых молекулах.
- Строить пептиды, называть их.
- Производить осаждение белков разными способами.
- Разделять белки методами бумажной хроматографии, электрофореза.
- Выполнять качественные реакции на белки.

Краткая теоретическая часть

§ 1. Основные понятия. Классификации белков, полипептидов

1.1 Основные понятия

В единстве живой природы важнейшую роль играют белки. Белки или протеины, получили свое название от лат. Protos – первые или важнейшие. В настоящее время известно 10^{10} – 10^{12} различных белков, которые содержатся примерно в 10^6 видах организмов.

В организме человека в среднем 45% белков от сухой массы тела; больше всего в селезенке (84%), меньше всего в жировой ткани (14%).

Элементный состав белков представлен:

50-55% углерода, 19-24 % кислорода, 13-19% азота, 6-7,3 % водорода, 0-4% серы. В большинстве белков содержание азота постоянно и составляет 16 %. Это позволяет по азоту определить количество белка в изучаемой ткани (метод Кьельдаля). В пересчете на сухую массу в селезенке 84%, в легких – 82%, мышцах – 80%, костях – 24-28% белка.

Молекулярная масса белков варьирует от 6000 до 1 000 000 Да и выше. Масса одного атома ^{12}C равна 12 дальтонам (Да), а 1 дальтон равен $1,661 \cdot 10^{-24}$ г.

Структурной единицей белков являются аминокислоты.

Белки – высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, построенные из остатков протеиногенных аминокислот.

Начало химическому исследованию белков было положено итальянским ученым *Я.Б. Беккари*. В 1754 г. он опубликовал отчет о работе, выполненной в 1728 г. Он выделил из пшеничной муки клейкую массу — клейковину.

Голландский химик и врач *Г. Я. Мульдер*, исходя из исследований элементного состава, пришел к выводу, что все белки содержат одну или несколько групп (радикалов) $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$, соединенных с серой или фосфором или с тем и другим вместе. Он предложил для обозначения этой группы термин «протеин».

Русский ученый-биохимик *А.Я. Данилевский* на основании своих опытов в 1888 г. впервые высказал гипотезу о пептидной связи между остатками аминокислот в белковой молекуле.

В конце 19 века в результате работ немецкого химика-органика *Э. Фишера* (1852-1919) стало ясно, что белки представляют собой линейные полимеры α -аминокислот, соединенных друг с другом амидной (пептидной) связью, а все многообразие представителей этого класса соединений могло быть объяснено различиями аминокислотного состава и порядка чередования разных аминокислот в цепи полимера. За основополагающие исследования по химии белков. Э Фишер был удостоен Нобелевской премии (1902).

В 1950-х гг. была доказана трехуровневая организация белковых молекул — наличие у них первичной, вторичной и третичной структуры; создается автоматический анализатор аминокислот (*С. Мур, У. Х. Стайн*, 1950).

В 1955 г. английскому биохимику *Ф. Сенгеру* с сотрудниками удалось полностью расшифровать первичную структуру одного из белков – гормона инсулина, имеющего молекулярную массу около 6000 Да.

С 60-х годов XX века ведутся работы по химическому синтезу белков, совершенствуются методы исследования этих важнейших полимеров. В последние годы значительные успехи достигнуты в изучении сложных белков: сократительных, транспортных, защитных, мембранных, рецепторных и регуляторов матричного синтеза биополимеров.

Научно-обоснованной номенклатуры белков, за исключением белков-ферментов, не существует. Названия белкам дают по случайным признакам, учитывая преимущественный источник выделения (авидин – белок яйца, инсулин – от слова *insulla*, означающее островок, миозин – белок мышц и т.д.) или какие-то особенности растворимости, формы молекул и т.п.

Полипептиды – соединения, состоящие из аминокислот, связанных между собой не только пептидными связями, но и связями других типов, а также содержащие в своей структуре не только протеиногенные аминокислоты, но и не встречающиеся в белках.

1.2. Классификации белков

Единая рациональная классификация белков на научной основе отсутствует. Имеется ряд классификаций, основанных на различных, условно выбранных признаках (критериях).

1. Классификация по форме белковых молекул (по степени асимметрии – отношению длинной оси молекулы к короткой):

1. Глобулярные белки (степень асимметрии от 1 до 10)
2. Фибриллярные белки (степень асимметрии больше десяти)

2. Классификация по электрохимическим признакам:

1. Кислые белки (полианионные)

2. Основные белки (поликатионные)
3. Нейтральные белки.

3. Классификация по полярным признакам:

1. Полярные белки (гидрофильные)
2. Неполярные белки (гидрофобные)
3. Амфипатические белки (амфифильные).

4. Классификация по структурным признакам:

Простые белки – белки, структура которых представлена только полипептидной цепью (белки, которые при гидролизе расщепляются исключительно на аминокислоты).

К *простым* белкам относятся:

1. Альбумины – водорастворимые белки, осаждаются сульфатом аммония при 100% насыщения. Поддерживают онкотическое давление, осуществляют транспорт многих веществ, в том числе ксенобиотиков.

2. Глобулины – растворимы в слабых растворах нейтральных солей, осаждаются сульфатом аммония при 50% насыщения. В воде нерастворимы. Участвуют в гуморальном иммунитете (иммуноглобулины), участвуют в транспорте липидов и др.

3. Протамины – белки с высоким содержанием аргинина, проявляющие основные свойства, очень хорошо растворимы в воде, нерастворимы в разбавленных растворах аммиака, не коагулируют при нагревании, образуют хроматин, комплексы с нуклеиновыми кислотами.

4. Гистоны – щелочные белки, растворимы в воде, в слабых кислотах, нерастворимы в разбавленном аммиаке, не денатурируют при нагревании, не содержат триптофана, цистеина, цистина, входят в состав хроматина.

5. Проламины – нерастворимы в воде, растворах солей и абсолютном спирте, но хорошо растворимы в 60-80% этаноле, входят в состав злаков.

6. Глютелины – нерастворимы в воде, но растворимы в разбавленных растворах кислот и щелочей, содержатся в семенах злаков и зеленых частях растений.

7. Протеиноиды — это белки опорных тканей – костей, хрящей, связок, сухожилий, ногтей, волос, рогов, копыт и т.д. Все эти белки относятся к фибриллярным белкам (фиброин, коллаген, эластин, кератин). Они не растворимы в воде и солевых растворах, ограниченно растворимы в специальных растворителях.

Сложные белки – это белки, в состав которых наряду с белком входит также небелковая, простетическая группа (белки, которые при гидролизе расщепляются не только на аминокислоты, но и небелковую часть или продукты ее распада).

Сложные белки делятся на шесть основных групп.

1. *Фосфопротеины* – белки, в состав которых входит остаток фосфорной кислоты, которая освобождается при гидролизе наряду с аминокислота-

ми. Фосфорная кислота обычно связана сложноэфирной связью с гидроксильной группой либо серина, либо треонина. К важнейшим фосфопротеинам следует отнести такие ферменты, как фосфоглюкомутаза, фосфорилаза, пепсин. К этой группе относится белок молока – казеиноген, имеющий молекулярную массу 56000. Белки яичного желтка — вителлин, вителлинин, фосфитин также являются фосфопротеинами. Из этих белков наиболее богат фосфором фосфитин.

2. *Хромопротеины* – это белки, включающие окрашенные (греч. chroma – краска) простетические группы. Они участвуют в таких важнейших процессах жизнедеятельности, как фотосинтез, дыхание клеток и целостного организма, транспорт кислорода и оксида углерода(IV), окислительно-восстановительные реакции и др. Хромопротеины делятся на гемсодержащие, магнийпорфирины (хлорофилл) и флавопротеины. Простетическая группа гема содержит металл – железо или медь. Среди гемсодержащих хромопротеинов жизненно важны гемоглобин и миоглобин.

3. *Металлопротеины* – это белки, в состав которых входят металлы, связанные с белком координационными связями. К этой группе относятся уже упомянутые гемсодержащие белки, а также олигомеры, стабилизированные ионами переходных металлов, например гексамер инсулина, стабилизированный двумя ионами Zn^{2+} . К металлопротеинам относятся ферритин (депонирует железо), церулоплазмин (содержит в своем составе ион меди и участвует в процессах антиоксидантной защиты), кальмодулин (универсальный Ca^{2+} -связывающий белок) и др.

4. *Гликопротеины* – это белки, простетические группы которых представляют собой остатки углеводов, полисахаридов, производных углеводов – глюкуроновой кислоты, идуроновой кислоты, гексозаминов. К гликопротеинам, встречающимся в различных тканях, особенно в хрящах, костной ткани, роговице глаза, а также в составе пищеварительных жидкостей, являются муцины и мукоиды. Гликопротеины могут содержать до 50% углеводов, но, как правило, в молекуле преобладает белковая часть. К типичным гликопротеинам относят большинство белковых гормонов, мембранные сложные белки, все антитела, интерфероны, рецепторные белки и др.

5. *Липопротеины* – это белки, простетические группы которых представлены холестерином, фосфатидами, свободными жирными кислотами, нейтральным жиром. В отличие от липидов липопротеины растворимы в воде и нерастворимы в органических растворителях. Липиды, ковалентно связанные с белком, служат «якорем», с помощью которого белки прикрепляются к липидным мембранам.

6. *Нуклеопротеины* – сложные белки, открытые в 1869 г. Ф. Мишером (1844-1895; швейцарский гистолог, физиолог) в ядрах клеток. Нуклеопротеины состоят из белка и простетической группы – РНК, ДНК. С химической точки зрения нуклеопротеины представляют собой солеобразные соединения

между основными белками гистонами или протаминами и кислыми нуклеиновыми кислотами.

5. Классификация на основе биологической ценности белков

1. Полноценные белки, содержат 10 незаменимых аминокислот в оптимальной пропорции для обеспечения нормального роста, например, яичный белок, казеин молока.

2. Частично полноценные белки содержат пониженное количество одной или более незаменимых аминокислот, поэтому могут обеспечить только умеренный рост, например, белок пшеницы, риса. Известно правило, что скорость синтеза белка зависит от той незаменимой кислоты, концентрация которой наименьшая.

3. Неполюценные белки содержат пониженное количество одной или более незаменимых аминокислот, поэтому не могут обеспечить нормальный рост, например, желатин.

Это интересно! Биологическая ценность белков определяется сбалансированностью аминокислотного состава и атакуемостью белков ферментами пищеварительного тракта. Аминокислотный состав «идеального» белка указан в аминокислотной шкале Комитета ФАО /ВОЗ. Животные и растительные белки усваиваются организмом не одинаково. Белки молока, молочных продуктов, яиц усваиваются на 96 %; белки мяса, рыбы – на 93–95 %; белки хлеба на 62–86 %; белки овощей – на 70–80 %. Суточная потребность взрослого человека в белках разных видов составляет 1–1,5 г белка на 1 кг массы тела (у детей 1,5–4 г), т. е. примерно 85–100 г. Доля животных белков должна составлять 55 % от общего их количества в рационе.

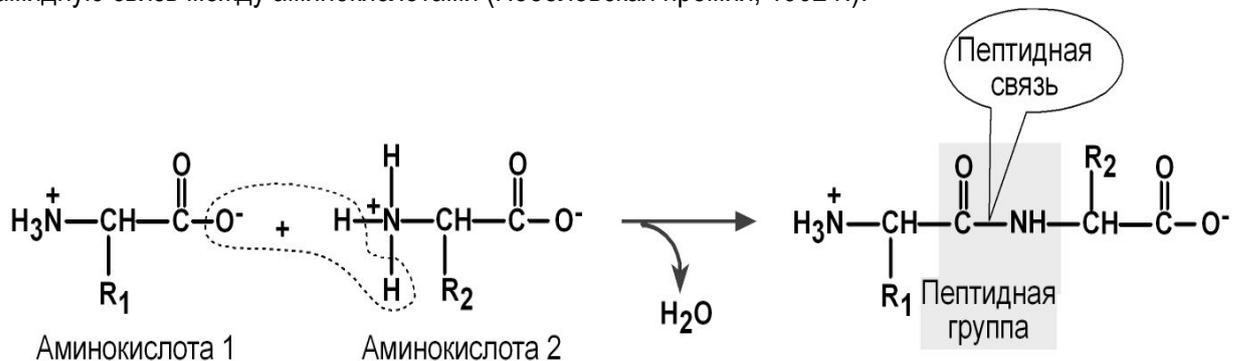
6. Классификация по функциям (см. подраздел 1.3.).

1.3 Классификации полипептидов

Среди производных α -аминокислот важнейшими являются амиды, где замещенная аминогруппа представляет собой остаток 2-й аминокислоты.

Амиды такого типа называют пептидами.

Еще в 1906 году немецкий химик-органик *Эмиль Фишер* определил пептидную связь как амидную связь между аминокислотами (Нобелевская премия, 1902 г.).



Пептиды – это природные или синтетические вещества, построенные из остатков аминокислот, соединенных амидными (пептидными) связями.

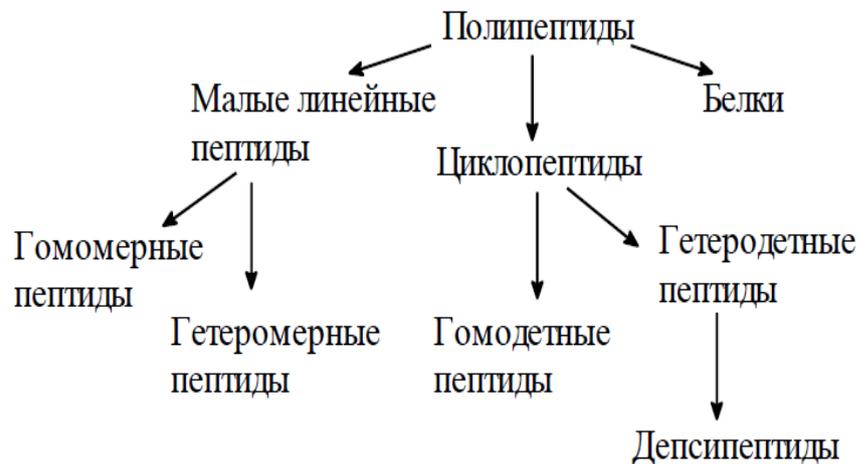
Пептид, образованный двумя аминокислотами, называется дипептид, тремя – трипептид и т.д.

Количество аминокислот в составе пептидов может сильно варьировать. Пептиды, содержащие до 10 аминокислотных остатков, называют *олигопептидами*. Часто в названии таких молекул указывают число аминокислот, входящих в состав данного олигопептида: дипептид, трипептид, тетрапептид, октапептид и т.д.

Пептиды, содержащие более 10 аминокислот, называют *полипептидами*. А полипептиды, содержащие более 50 аминокислотных остатков, обычно называют белками. Однако такие градации весьма условны.

Таким образом, пептиды различаются по аминокислотному составу, количеству и порядку соединения аминокислот.

Все полипептиды по химическому строению делятся на следующие группы:



(Схема из кн. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособие. Ч.1./ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климовичкин.– Самара, Самар. гос. техн. ун-т.–2007.-110 с.)

Малые линейные пептиды содержат до 50 аминокислотных остатков и имеют молекулярную массу не более 5000 Да.

Малые линейные пептиды делятся на низкомолекулярные (до 10-12 аминокислотных остатков в цепи) и высокомолекулярные (12-50 аминокислотных остатков в цепи).

Малые линейные пептиды подразделяют на *гомомерные* и *гетеромерные*.

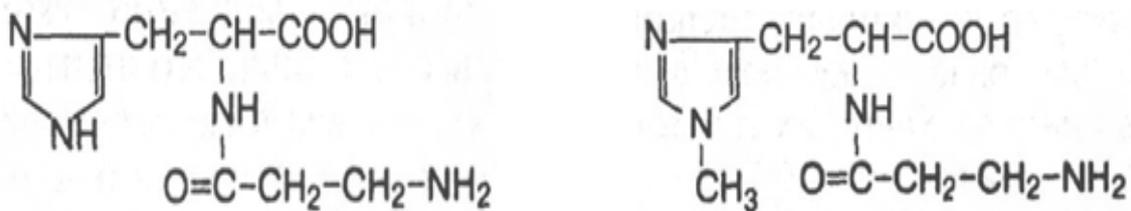
Гомомерные линейные пептиды построены только из α -L-аминокислот и содержат только α -пептидную связь (белковоподобные пептиды). Малые гомомерные линейные пептиды в природе встречаются так же часто, как и белки, и прежде всего в организмах животных.

По биологическим свойствам эта группа пептидов делится на три основные группы: нейромедиаторы, пептидные гормоны, нейротоксины некоторых животных.

Гетеромерные линейные пептиды представляют собой любые линейные пептиды, строение которых отличается от строения гомомерных пептидов.

Появление различных аминокислот небелковой природы в составе полипептидов весьма распространено в живой природе, особенно среди микроорганизмов. Образование гетеромерных пептидов возможно в результате распада белков после посттрансляционной модификации или путем биосинтеза.

К гетеролинейным полипептидам относятся карнозин и ансерин (выделены российским ученым биохимиком *В.С. Гулевицем* в 1900 г.).



Карнозин (β -аланил-L-гистидин) Ансерин (N-метилкарнозин)

Карнозин и ансерин содержатся в различных количественных соотношениях во всех мышцах млекопитающих и птиц. Установлено, что карнозин благоприятно влияет на гликолиз и окислительное фосфорилирование, увеличивая количество образующегося АТФ; увеличивает эффективность активного транспорта ионов K^+ и Na^+ через плазматическую мембрану; препятствует пероксидному окислению липидов и др.

Биологическая роль ансерина (анзерина) подробно не изучена. Установлено благоприятное влияние его на сохранение структуры митохондрий и окислительное фосфорилирование в измельченных грудных мышцах голубя.

Интересно, что полипептиды-антибиотики часто содержат в своей структуре остатки D-аминокислот. Например, линейные грамицидины А, В, С.

1.4 Биологические функции полипептидов, белков

Природные олигопептиды, содержащие 2-50 аминокислотных остатков, обнаруживаются практически во всех формах живых организмов. Их функции настолько многообразны, что в настоящее время трудно судить, в реализации каких жизненно важных процессов они не участвуют.

В самом общем виде низкомолекулярные пептиды называют регуляторными.

Они функционируют во всех регуляторных системах: нервной, эндокринной, иммунной.

Известно более 6000 олигопептидов, образующихся рибосомальным синтезом.

У бактерий и грибов значительное их количество образуется нерибосомальным синтезом. Так, бактериальных пептидов с высоким содержанием аминокислотной кислоты (пентаболы) известно более 300.

Биологические функции пептидов чрезвычайно разнообразны. Среди биологических функций пептидов можно выделить следующие:

- 1) токсигенная;
- 2) лекарственная;
- 3) регуляторная;
- 4) антиоксидантная.

В группу пептидов, выполняющих токсигенную функцию, относятся многие нейротоксины микроорганизмов, грибов, пчел, змей, скорпионов и морских рыб. Например, ботулинический токсин, выделяется анаэробными микроорганизмами *Clostridium botulinum*. Он является сильнейшим из ныне известных нейротропных ядов. Яд представляет собой 5-компонентную смесь протеинов с молекулярной массой, равной 90000 – 150000 и по молекулярной массе должен быть отнесен к белкам. Установлено, что в основе его токсического действия лежит торможение передачи нервного импульса.

Это интересно! Первым в медицинской практике ботулотоксин в конце 70-х годов XX века применил американский офтальмолог Алан Скотт. Он вводил очищенный токсин в микродозах в орбитальную мышцу глаза для лечения блефароспазма.

В современной практике препараты на основе ботулотоксина (Ботокс, Релатокс, Ксеомин и др.) используются для лечения гиперактивности поперечно-полосатой мускулатуры и мышц сфинктеров, гиперфункции экзокринных желез, различных болевых синдромов спастического характера, для купирования мигреней. В косметологии токсин применяется для разглаживания мимических морщин.

Яды змей – сложная смесь биологически активных полипептидов, состоящих из 59-62 аминокислот.

Одним из чрезвычайно опасных растительных токсинов полипептидной природы является рицин, выделенный из клещевины. В семенах клещевины содержится до 3 % данного токсина, относящегося к группе токсальбуминов. Рицин вызывает гемолиз эритроцитов, является мощным ингибитором синтеза белков.

Носителями лекарственной функции являются антибиотики пептидной природы, например, различные грамицидины (грамицидины А, В, С, S). Обычно это короткие пептиды. Так, грамицидин С – циклический декапептид, вырабатываемый палочкой *Bacillus brevis*.

К пептидным антибиотикам, вырабатываемых микроорганизмами, относятся актиноксантин, цефалоспорины, тироцидиновые и другие.

Спектр пептидов, выполняющих регуляторную функцию, достаточно широк.

В организме человека вырабатывается много пептидов, участвующих в регуляции различных биологических процессов и обладающих высокой физиологической активностью.

Функции пептидов зависят от их первичной структуры. Например, в гипоталамусе вырабатываются окситоцин и вазопрессин, которые очень близки по строению, состоят из 9 аминокислотных остатков, но разница в аминокислотах в положении 3 и 8 приводит к разному физиологическому действию. Окситоцин выделяется в кровь во время кормления ребенка, стимулирует выработку молока, сокращение гладкой мускулатуры матки во время родов, а вазопрессин увеличивает реабсорбцию воды в почках при уменьшении артериального давления или объема крови, а также вызывает сужение кровеносных сосудов.

К группе регуляторных пептидов следует отнести нейропептиды, включающие более 150 разнообразных по строению химических соединений, рилизинг-факторы, а также множество гормонов пептидной природы.

Нейропептиды – различные по структуре небольшие пептиды, обладающие свойствами физиологических передатчиков, например, играют важнейшую роль в передаче болевых ощущений. Некоторые из пептидов данной группы не присутствуют постоянно в мозговой ткани, а синтезируются лишь в связи с определенным стимулом.

Метионин-энкефалин (Тир-Гли-Гли-Фен-Мет) и лейцин-энкефалин (Тир-Гли-Гли-Фен-Лей) – пентапептиды, относятся к классу опиоидных нейропептидов, которые образуются в *мозге* и оказывают на ЦНС действие, сходное с действием морфина (обезболивание, возникновение чувства удовлетворения, снижение других эмоций).

Комплекс пептидов эпифиза обладают выраженным геропротекторным (замедляющим старение) действием.

К настоящему времени изучено более 300 биологически активных пептидов и их аналогов.

Регуляторные пептиды играют ключевую роль в поддержании гомеостаза (постоянства внутренней среды), так как именно они в первую очередь определяют основные параметры формирования комплекса компенсаторно-приспособительных реакций организма на стрессорное воздействие и нарушения гомеостатического баланса.

Активно изучается защитная функция пептидов. Так, показано, что пептиды участвуют в защите от патогенных бактерий и грибов.

В настоящее время антимикробные пептиды эукариот определяются как полипептидные соединения длиной не более чем 100 аминокислотных остатков.

У растений обнаружено 9 классов защитных пептидов, включающих от 20 до 90 аминокислотных остатков.

В настоящее время известно большое число природных антимикробных пептидов, выделенных из различных органов животных.

Природные антимикробные пептиды обнаруживаются практически во всех формах живых организмов.

Синтезированы искусственные пептиды из D-аминокислот. Они также обладают антимикробной активностью, но устойчивы к действию протеаз.

Антиоксидантную функцию можно рассматривать как одно из проявлений защитной функции пептидов.

Важнейшим антиоксидантом пептидной природы является трипептид *глутатион* – низкомолекулярный компонент антиоксидантной системы аэробного организма, который взаимодействует с различными кислородсодержащими радикалами, подавляя их токсическое действие.

Карнозин (β-Ала-Гис) и ансерин (β-Ала-N-метил-Гис) – гистидиновые дипептиды, которые синтезируются в мышцах и головном мозге. Содержание гистидиновых пептидов в гладкой и сердечной мускулатуре во много раз ниже, чем в скелетной. Карнозин и ансерин (ансерин) обладают антиоксидантной активностью, замедляют процессы старения человека.

Пептиды, среди которых обнаруживаются яды, антибиотики, гормоны, в основном, построены из тех же аминокислот, что и белки, жизненно необходимые для человека.

Белки выполняют множество самых разнообразных функций, характерных для живых организмов.

Каталитическая функция. К 1995 г. было идентифицировано более 3400 биологических катализаторов – ферментов. Все ферменты являются белками, хотя имеются экспериментальные данные о существовании рибозимов, т.е. рибонуклеиновой кислоты, обладающей каталитической активностью.

Транспортная функция проявляется в переносе веществ в крови: гемоглобин эритроцитов переносит кислород, липопротеины – жир, гаптоглобин транспортирует гем, трансферрин – переносчик железа; перенос ионов натрия и калия *через мембраны* идет при участии Na^+ , K^+ -АТФазы, а Ca^{2+} -АТФаза осуществляет выкачивание ионов кальция из клетки.

Защитная функция. Основную функцию защиты в организме выполняет иммунная система (иммуноглобулины крови), которая обеспечивает синтез специфических защитных белков-антител в ответ на поступление бактерий, токсинов, вирусов или чужеродных белков.

Защиту организма осуществляют факторы системы *комплемента* (пропердин), при повреждении тканей работают белки *свертывающей* системы крови, например, фибриноген, протромбин, антигемофильный глобулин. Механическую защиту слизистых и кожи осуществляют коллаген и протеогликаны.

К защитной функции также можно отнести поддержание постоянства *коллоидно-осмотического* давления крови, интерстиция и внутриклеточных пространств. Белковая буферная система участвует в регуляции *кислотно-щелочного* равновесия.

Сократительная функция. В процессе мышечного сокращения и расслабления участвует множество белков, но главную роль в этих жизненно важных процессах играют актин и миозин – специфические белки мышечной ткани. Сократительная функция присуща не только белкам мышц, но и белкам цитоскелета, что обеспечивает тонкие процессы жизнедеятельности клеток, например, расхождение хромосом в процессе митоза.

Структурная функция. Белки, выполняющие структурную (опорную) функцию, занимают по количеству первое место среди других белков тела человека. Среди них важнейшую роль играют фибриллярные белки *коллаген, эластин, кератин* в соединительной ткани, коже, в волосах, ногтях, в сосудистой стенке и др.

Межклеточное пространство формируют *протеогликаны, коллаген, эластин*.

Большое значение имеют комплексы белков с углеводами в формировании ряда секретов: мукоидов, муцина и т.д. Белково-липидные комплексы участвуют в образовании биомембран клеток.

Гормональная функция. Обмен в организме регулируется разнообразными механизмами, в том числе гормонами, которые синтезируются не только в железах внутренней секреции, но и других клетках. *Инсулин и глюкогон* являются белками, все гормоны гипофиза являются пептидами или небольшими белками. Некоторые гормоны являются производными аминокислот.

Рецепторная функция проявляется в избирательном связывании гормонов, биологически активных веществ и медиаторов на поверхности мембран или внутри клеток.

Резервная (питательная) функция. Производство и накопление в яйце яичного альбумина выполняет роль депо для развития цыпленка. У животных и человека таких специализированных депо нет, но при длительном голодании в качестве депо выступают белки мышц, лимфоидных органов, эпителиальных тканей и печени. Белки грудного молока необходимы для вскармливания ребенка.

Способность белков к специфическим взаимодействиям.

Такое специфическое взаимодействие возможно, если у белковой молекулы и вещества, с которым она взаимодействует, имеются на поверхности функциональные группы, способные образовать связи между собой. Это могут быть ионные, водородные связи, силы гидрофобного взаимодействия. Поверхности, имеющие функциональные группы, которые соответствуют друг другу, называются *комплементарными*.

При этом важной особенностью белков является также их способность изменять свою конформацию, «подстраиваться к «партнеру». Высокая специфичность белков проявляется при взаимодействии ферментов с субстратами, антител с антигенами, транспортных белков крови с переносимыми молекулами веществ, гормонов с рецепторами, при образовании сложных белков: нуклео-, липо-, гликопротеинов и др. Это взаимодействие основано на принципе биоспецифического узнавания.

§ 2. Строение полипептидов и белков

Белок – это последовательность аминокислот, связанных друг с другом *пептидными связями*. Если количество аминокислот не превышает 10, то такое соединение называется *пептидом*; если от 10 до 50 аминокислот – *полипептидом*, если более 50 аминокислот – *белок*. Линейная молекула белка, образующаяся при соединении аминокислот в цепь при помощи пептидных связей, является **первичной структурой**.

Под первичной структурой белка понимается *число и последовательность аминокислотных остатков*, соединенных между собой ковалентными пептидными связями.

Строение аминокислот, их последовательность и соотношение в **первичной** структуре определяет дальнейшее поведение молекулы: ее способность изгибаться, сворачиваться, формировать те или иные связи внутри себя.

Поскольку пептидная цепь неразветвлена, она имеет два разных конца – *N-конец* со свободной α -аминогруппой первой аминокислоты и *C-конец*, несущий α -карбоксильную группу последней аминокислоты. В биохимии формулы полипептидов принято писать, начиная с N-конца.

Для того чтобы назвать конкретный полипептид, достаточно перечислить (начиная с N-конца) последовательность входящих в его состав аминокислотных остатков в трехбуквенном или однобуквенном коде. Например, аминокислотная последовательность (первичная структура) пептидного гормона ангиотензина II читается следующим образом:

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe или соответственно DRVYIHPF.

Определение первичной структуры белков сложная задача, поэтому только в 1955 г. английскому биохимику *Фредерику Сенгеру* с сотрудниками удалось полностью расшифровать первичную структуру одного из белков – гормона инсулина, имеющего молекулярную массу около 6000 Да.

Изучение первичной структуры белков показало, что, в отличие от других классов полипептидов, все аминокислоты, встречающиеся в белках всех организмов, принадлежат к L-ряду и связи между остатками аминокислот в белковой цепи исключительно пептидные (рис. 12).

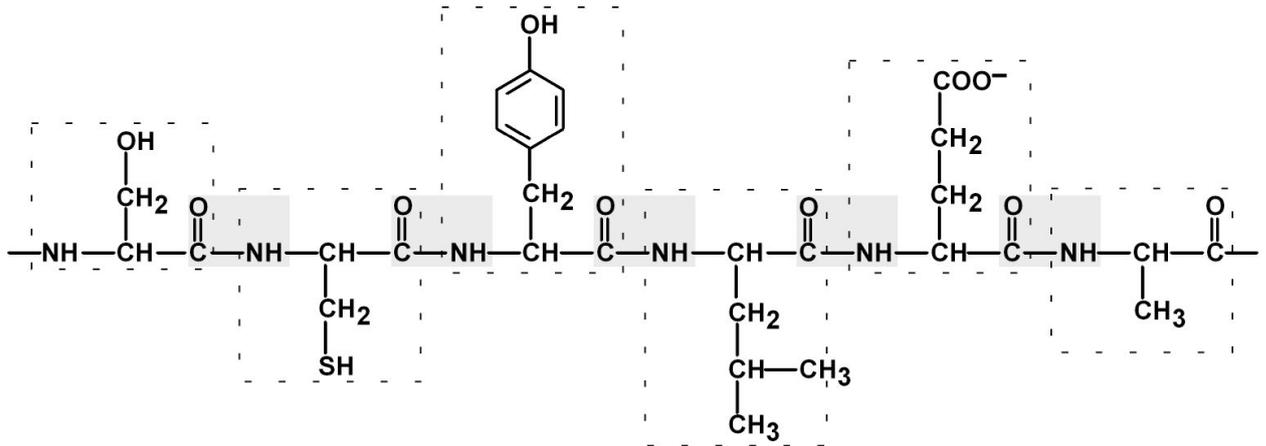


Рис. 12. Расположение аминокислот в первичной структуре белка (Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018г), www.biokhimija.ru)

Учитывая, что в синтезе белков принимает участие 20 аминокислот и средний белок содержит 500 аминокислотных остатков, то количество потенциально возможных белков огромно.

В организме человека обнаружено около 100 тысяч различных белков.

Первичная структура белков задается последовательностью нуклеотидов в ДНК. Выпадение, вставка, замена нуклеотида приводит к изменению аминокислотного состава и, следовательно, структуры синтезируемого белка.

Обратите внимание, при серповидноклеточной анемии в 6 положении β -цепи гемоглобина происходит замена Глу на Вал. Это приводит к синтезу такого гемоглобина, который в дезоксиформе полимеризуется и образует кристаллы. В результате эритроциты деформируются, приобретают форму серпа, теряют эластичность и при прохождении через капилляры разрушаются. Это приводит к анемии, гипоксии тканей и даже их некрозу.

Последовательность и соотношение аминокислот в первичной структуре определяет формирование *вторичной, третичной и четвертичной* структур.

Вторичная структура – способ свертывания, скручивания (складывание, упаковка) полипептидной цепи в спиральную или какую-либо другую конформацию. Процесс укладки происходит не хаотично, а в соответствии с программой, заложенной в первичной структуре.

Формирование вторичной структуры вызвано стремлением пептида принять конформацию с наибольшим количеством водородных связей между пептидными группами. Вторичная структура определяется:

- устойчивостью пептидной связи;
- подвижностью C–C связи;
- размером аминокислотного радикала.

Эти параметры в сочетании с аминокислотной последовательностью приводит к строго определенной конфигурации белка.

Выделяют два возможных варианта вторичной структуры: α -спираль (α -структура) и β -структура (β -складчатый слой). Вторичная структура образуется при участии только водородных связей между пептидными группами: атом кислорода одной группы реагирует с атомом водорода следующей, одновременно кислород этой пептидной группы связывается с водородом еще одной и т.д. В одном белке, как правило, одновременно присутствуют α -спираль и β -структура. В **глобулярных** белках преобладает α -спираль, в **фибрилярных** – β -складчатый слой.

Правозакрученная α -спираль, образуется при помощи водородных связей между пептидными группами 1-го и 4-го, 4-го и 7-го, 7-го и 10-го и так далее аминокислотных остатков(рис. 13).

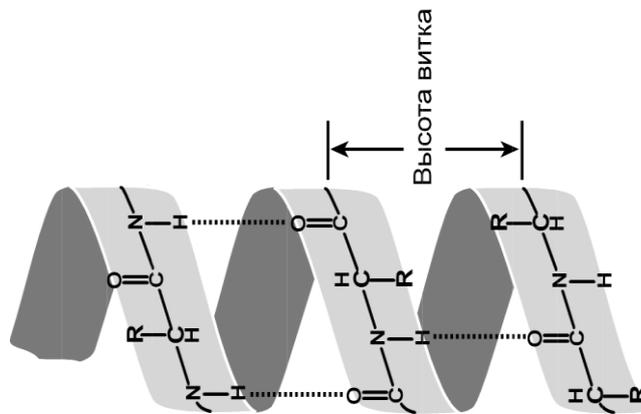


Рис. 13. Укладка белка в виде α -спирали
(Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018г), www.biokhimija.ru)

Высота витка составляет 0,54 нм и соответствует 3,6 аминокислотных остатков, 5 полных витков соответствуют 18 аминокислотам и занимают 2,7 нм.

Формированию спирали препятствуют пролин и гидроксипролин, которые обуславливают «перелом» цепи, ее резкий изгиб.

При формировании β -структуры аминокислоты одной белковой цепи взаимодействуют друг с другом при помощи водородных связей между пептидными группами. В этом способе укладки белковая молекула лежит «змейкой», удаленные отрезки цепи оказываются поблизости друг от друга. В результате пептидные группы ранее удаленных аминокислот белковой цепи оказываются рядом и способны взаимодействовать при помощи водородных связей.

Ориентация реагирующих участков может быть параллельна (когда соседние цепи идут в одном направлении) или антипараллельна (цепи идут в противоположном направлении). Таких взаимодействующих друг с другом участков одного белка может быть от двух до пяти (рис. 14).

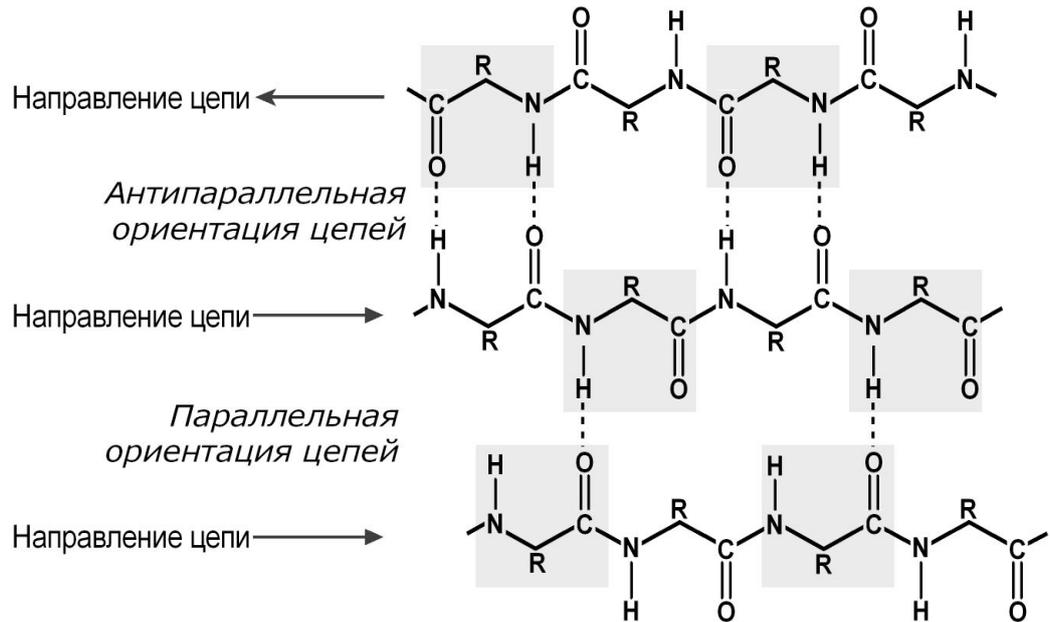


Рис. 14. Укладка белка в виде β -складчатого слоя
(Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018г), www.biokhimija.ru)

Выяснение закономерностей свертывания полипептидных цепей является одной из важнейших задач биохимии. Возможность предсказания нативной структуры белка с учетом первичной структуры и свойств окружающей среды позволила бы получать белки с заданными свойствами.

Лайнус Карл Поллинг – американский физик и химик. Основные работы посвящены изучению строения молекул и природы химической связи. Разработал представления о вторичной структуре полипептидной цепи в белках. Впервые дал описание полипептидной α -спирали (1951 г., совместно с американским биохимиком *Р.Кори*. Нобелевская премия, 1954 г.).

Итак, под вторичной структурой понимают *участки полипептидной цепи с упорядоченной конформацией, стабилизированной водородными связями между пептидными фрагментами.*

Третичная структура белка. Под этим термином понимают *полную укладку в пространстве всей полипептидной цепи, т.е. трехмерную функционально активную конформацию белка.*

Установлено, что большинство белков в нативном состоянии имеет компактную свернутую структуру, которая является высокоспецифичной и уникальной. Это подтверждается, например, тем, что ферментативная активность, крайне чувствительна к любым изменениям в третичной структуре белка.

Наряду с α -спиралью и β -структурой в третичной структуре обнаруживается так называемая **неупорядоченная** конформация (участки белковой молекулы, не относящиеся к спиральным или складчатым структурам), которая может занимать значительную часть молекулы (рис. 15).

В разных белках наблюдается разное соотношение типов структур. Например, **инсулин** содержит 52% α -спирали и 6% β -структуры, **трипсин** – 14% α -спирали и 45% β -структуры.

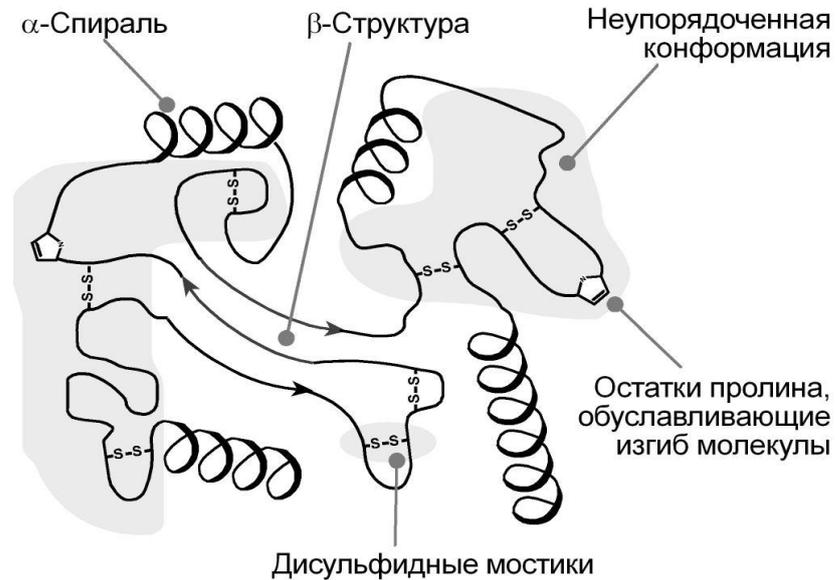


Рис. 15. Схема строения третичной структуры белка
(Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018г), www.biokhimija.ru)

Если первичная структура белка содержит более 200 аминокислотных остатков, то в **третичной** структуре могут выделяться самостоятельные участки – **домены**. Домен – фрагмент полипептидной цепи, сходный по свойствам с самостоятельным глобулярным белком. Домену всегда соответствует непрерывный участок полипептидной цепи, который формирует компактное глобулярное образование, обладающее самостоятельными функциями. Между собой домены соединяются мало структурированными полипептидными участками. Так, неколлагеновый белок межклеточного вещества соединительной ткани фибронектин состоит из нескольких доменов, каждый из которых имеет центры связывания с другими молекулами (коллагеном, гликозаминогликанами, интегрином, другими молекулами фибронектина).

Выделено четыре типа внутримолекулярных взаимодействий, характерных для всех белков, ответственных за поддержание третичной структуры белка:

- 1) водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков;
- 2) водородные связи между боковыми цепями и пептидными группами;
- 3) ионные связи;
- 4) гидрофобные взаимодействия (рис. 16).

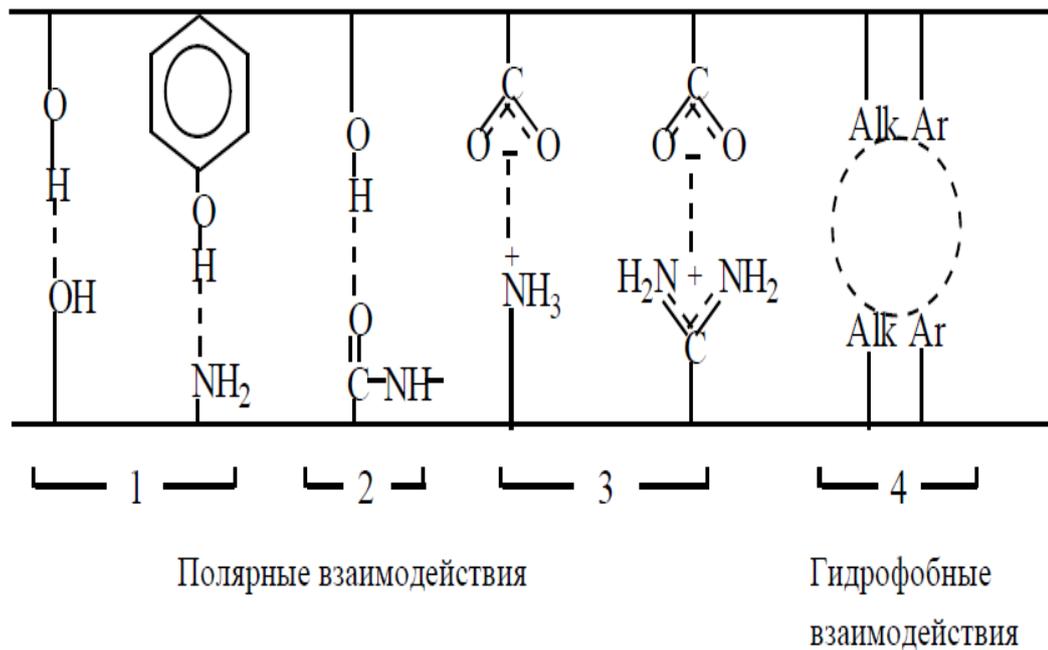


Рис. 16. Типы внутримолекулярных взаимодействий белков (Аминокислоты и полипептиды: учеб.пособие.Ч.1. / В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин.– Самара, Самар. гос. техн. ун-т.–2007.-110 с.)

Отмечают также наличие *псевдопептидных связей* между дополнительными COOH-группами глутамата и аспартата и дополнительными NH₂-группами лизина и аргинина (рис. 17).

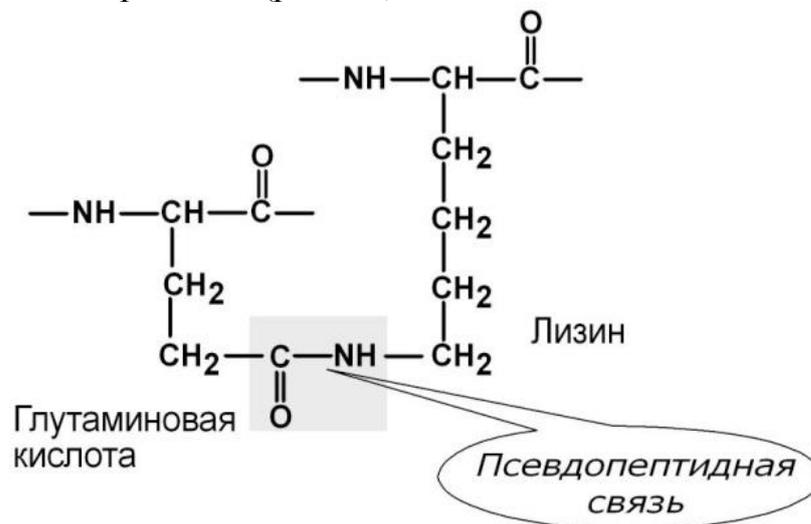


Рис. 17. Образование псевдопептидной связи (Тимин О.А. Лекции по общей биохимии (2018г), www.biokhimija.ru)

Четвертичная структура белка. Молекулы многих белков состоят из нескольких индивидуальных полипептидных цепей, связанных одна с другой нековалентными связями. При этом каждая из индивидуальных цепей может иметь как одинаковые первичную, вторичную и третичную структуры, так и разные. Одинаковые полипептидные цепи часто образуют симметрично по-

строенные комплексы, стабилизированные за счет нековалентных взаимодействий. Симметрично построенные комплексы называются *олигомерами*. Составные единицы белковых комплексов называются протомерами, мономерами или *субъединицами*. Взаимодействие протомеров друг с другом осуществляется по принципу *комплементарности*, т.е. их поверхность подходит друг другу по геометрической форме и по функциональным группам аминокислот (возникновение ионных и водородных связей).

Субъединицы в олигомерах тесно взаимодействуют между собой, поэтому любое изменение конформации одной субъединицы обязательно влечет за собой изменение других субъединиц. Этот эффект называется *кооперативное взаимодействие*.

Четвертичную структуру имеет молекула гемоглобина, которая состоит из четырех полипептидных цепей – двух α - и двух β -субъединиц с молекулярными массами около 16 кДа каждая.

Типы связей, участвующих в структурной организации пептидов и белков, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика связей, участвующих в структурной организации пептидов и белков

Уровень организации	Тип связей и их прочность	Разновидность связей
Первичная полипептидная цепь	Ковалентные (прочные)	Пептидная связь – между α -амино- и α -карбоксылными группами аминокислот
Вторичная (α -спираль, β -структура)	Слабые	Водородные – между каждой первой и четвертой пептидными группами или аминокислотными остатками N ₁ и N ₅ одной полипептидной цепи (α -спираль) или между пептидными группами соседних полипептидных цепей (β -структура)
Третичная (глобулярная, фибриллярная)	Ковалентные (прочные)	Дисульфидные, изопептидные, сложноэфирные – между боковыми радикалами аминокислот разных участков полипептидной цепи
	Слабые	<i>Водородные</i> – между боковыми радикалами аминокислот разных участков полипептидной цепи; <i>Ионные</i> – между противоположно заряженными группами боковых радикалов аминокислот полипептидной цепи; <i>Ван-дер-Ваальсовы</i> (гидрофобные) – между неполярными боковыми радикалами аминокислот полипептидной цепи <i>Псевдопептидные</i> – между дополнитель-

		ными СООН-группами глутамата и аспартата и дополнительными NH ₂ -группами лизина и аргинина.
Четвертичная (глобулярная, фибрилярная)	Слабые	<i>Водородные</i> – между боковыми радикалами аминокислотных остатков, расположенных на поверхности контактирующих участков субъединиц <i>Ионные</i> – между противоположно заряженными группами боковых радикалов аминокислот каждой из субъединиц

Вторичные, третичные и четвертичные структуры многих белков образуются в растворе самопроизвольно в течение нескольких минут. Этот процесс называется *свертыванием белков*.

Фолдинг (от англ. *fold*ing - «сворачивание») – это процесс формирования «правильной» третичной структуры из полипептидной цепочки. В клетках происходит отбор из множества стericески возможных состояний одной-единственной стабильной и биологически активной конформации, определяемой, вероятнее всего, первичной структурой.

Фолдинг протекает в несколько стадий. Сначала *быстро* образуется вторичная структура за счет водородных связей и затем тоже быстро – третичная структура. После этого – медленная стадия образования специфической конформации, главным образом, за счет гидрофобных взаимодействий. В процессе фолдинга возможны ошибки, поэтому в клетке имеются специальные белки – **шапероны**, которые обеспечивают правильное свертывание вновь синтезируемых белков.

Шапероны (от французского «шаперонэ» – гувернантка) отслеживают конформационное состояние белка на всем протяжении жизни его молекулы, начиная с трансляции, помогают вновь синтезированной полипептидной цепи найти правильную форму, контролируют и ускоряют процесс *фолдинга* – образование нативной конформации.

Шапероны стабилизируют частично денатурированные молекулы белка, сортируя то, что еще можно спасти, переносят белки через мембраны, помогают в сборке олигомерных белков, участвуют в переключении конформации белков с неактивной на активную.

Рефолдинг ненативных (нефункциональных) полипептидов, представляющих собой как цепи, новообразованные в процессе биосинтеза, так и денатурированные формы белков, возникшие в результате клеточного стресса, осуществляется с помощью *шаперониновой системы*.

Шаперонины – сложные белки, состоящие из многих субъединиц, похожи на бочки с крышками. Шаперон приносит белок в полость бочки. После правильного сворачивания, крышка открывается, и готовая функциональная молекула белка покидает шаперонин.

Шапероны и шаперонины могут исправлять поврежденную структуру белка. Если исправить не удастся, белок должен быть разрушен в *протеасоме* – это тоже сложный белок, образующий полость.

При нарушении фолдинга белков возникают **конформационные болезни**, например, болезнь Альцгеймера, куриная слепота, злокачественные опухоли.

§ 3. Кислотно-основные свойства белков

3.1 Изоэлектрическая точка белков

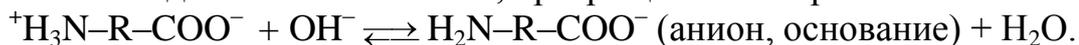
Высокомолекулярные электролиты или полиэлектролиты содержат ионогенные группы, по которым могут проходить процессы электролитической диссоциации. Белковые молекулы, как продукты конденсации аминокислот, содержат основные группы $-\text{NH}_2$ и кислотные $-\text{COOH}$. Такие соединения называются амфолитами, т.е. они способны диссоциировать и по кислотному, и по основному типу в зависимости от pH среды. В водном растворе аминокислоты и белки находятся преимущественно в виде биполярных ионов (внутренних солей):



В кислой среде, когда в результате избытка водородных ионов подавлена ионизация карбоксильных групп, молекула белка ведет себя как основание, приобретая положительный заряд и превращаясь в сопряженную кислоту:



В щелочной среде, наоборот, подавлена ионизация аминогрупп, и молекула белка ведет себя как кислота, превращаясь в сопряженное основание:

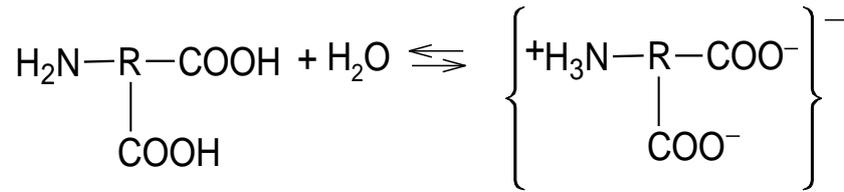


Однако при определенной величине pH степень диссоциации амино- и карбоксильных групп приобретает одинаковое значение, и тогда макромолекулы белка становятся электронейтральными. Подобное состояние белковой молекулы называют **изоэлектрическим (ИЭС)**.

Значение pH, при котором наступает изоэлектрическое состояние белков, называют **изоэлектрической точкой (ИЭТ, pI)**. У разных белков изоэлектрическая точка соответствует различным значениям pH.

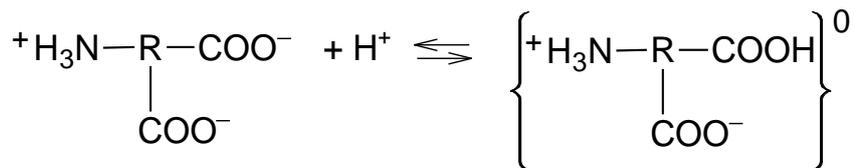
ИЭТ может быть измерена с помощью электрофореза, поскольку в этой точке подвижность макромолекул становится равной нулю. Для определения ИЭТ могут быть использованы данные по набуханию полиамфолитов в растворах с различными значениями pH.

Кислотно-основные свойства белков определяются не только значением pH среды, но также их строением. Так, **кислые белки** в своем составе содержат больше дикарбоновых кислот, поэтому количество свободных карбоксильных групп преобладает над аминогруппами:



Анион, основание

Если в воду добавить немного протонов водорода и создать слабокислую среду, то кислый белок перейдет в изоэлектрическое состояние (ИЭС):

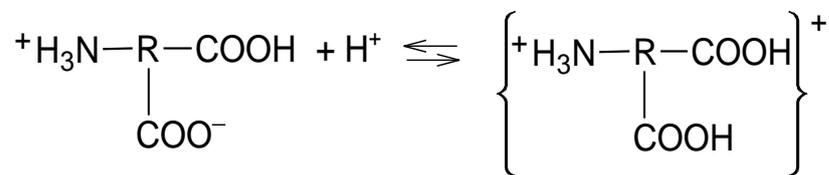


pI, полиамфолит

pI для таких белков находится в кислой среде.

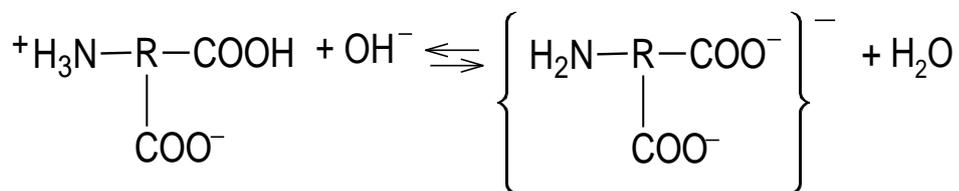
Отметим, что для большинства природных белков изоэлектрическая точка находится в диапазоне *pH* 4,8-5,4, что свидетельствует о преобладании в их составе глутаминовой и аспарагиновой аминокислот.

При дальнейшем подкислении в кислой среде подавляется диссоциация карбоксильных групп:



Катион, кислота

В щелочной среде подавляется диссоциация аминогрупп:



pI

Анион, основание

Основные белки содержат в своем составе диаминомонокарбоновые кислоты (лизин, аргинин) в таком количестве, что количество свободных аминогрупп преобладает над карбоксильными. В зависимости от реакции среды основные белки ведут себя в растворе и как основание, и как кислота.

Для таких белков pI находится преимущественно в слабощелочной среде. При $pH < pI$, белок приобретает положительный заряд, при $pH > pI$ – отрицательный заряд.

За счет наличия амино- и карбоксильных групп белки обладают **буферными свойствами**, участвуют в поддержании кислотно-щелочного баланса организма на постоянном уровне.

Белки – важнейшие компоненты плазмы крови, цитоплазмы клетки. Поэтому важно знать, что в ИЭС свойства белковых растворов резко меняются: уменьшается вязкость, снижается растворимость белка, изменяется даже форма макромолекул. Изoeлектрическое состояние белковой молекулы приводит к резкому снижению устойчивости и подвижности белковых коллоидных частиц. Такие частицы обладают минимальной адсорбционной способностью, плохо набухают. В результате в ИЭТ наблюдаются слипание частиц, коагуляция и разрушение коллоидной системы, что в конечном итоге сказывается на обменных процессах в клетке.

С практической стороны наличие амфотерности позволяет разделять белки **по заряду** (электрофорез) или использовать изменение величины pH раствора для **осаждения** какого-либо известного белка. Наличие как положительных, так и отрицательных зарядов в белке обуславливает их способность к обратимому осаждению – **высаливанию**, что важно для выделения белков с сохранением нативной конформации.

§ 4. Коллоидные свойства белков

Свойства белковых растворов определяются большими размерами молекул (1-100 нм), т.е. белки являются коллоидными частицами и образуют **коллоидные** растворы. К свойствам коллоидных растворов относятся:

- рассеивание луча света, проходящего через белковый раствор, и образование **светящегося конуса** – эффект Тиндаля;

- малая скорость **диффузии**;

- неспособность белковых частиц проникать через **полупроницаемые** мембраны (целлофан), т.к. их поры меньше диаметра белков. Это используется в **диализе** – очистке белковых препаратов от посторонних примесей и лежит в основе работы «искусственной почки» для лечения острой почечной недостаточности;

- создание **онкотического** давления, как части осмотического, что проявляется, например, возникновением отеков при повышении проницаемости сосудистой стенки и снижении концентрации белка крови;

- высокая **вязкость** в результате сил сцепления между крупными молекулами, что проявляется, например, при образовании гелей и студней.

Подробнее остановимся на следующих свойствах белков.

4.1 Растворимость

Так как большинство белков несет много заряженных групп, то в целом они **водорастворимы**. Растворимость объясняется:

- наличием **заряда** и взаимным отталкиванием заряженных молекул белка,
- наличием **гидратной оболочки** – чем больше полярных и (или) заряженных аминокислот в белке, тем больше гидратная оболочка (например, 100 г белка альбумина связывает 30-50 г воды).

В растворах белков, являющихся поверхностно-активными веществами (ПАВ) при определенной концентрации, называемой *критической концентрацией мицеллообразования (ККМ)*, могут самопроизвольно образоваться мицеллы – агрегаты из ориентированных молекул.

Мицеллообразование надо рассматривать как процесс, аналогичный фазовому переходу от истинного раствора ПАВ к ассоциированному состоянию в мицеллах; при этом мицеллообразование идет самопроизвольно. В области ККМ резко меняются поверхностные и объемные свойства растворов.

Различные стадии мицеллообразования ПАВ представлены на рис. 18.

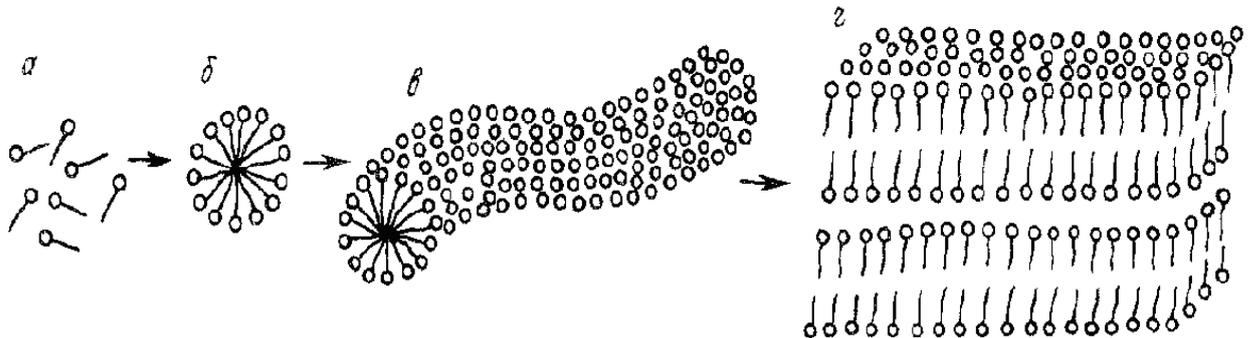


Рис. 18. Различные стадии мицеллообразования в растворе ПАВ:

a – мономеры; *б* – сферическая мицелла; *в* – цилиндрическая мицелла; *z* – пластинчатая мицелла

Растворы белков в организме человека – это лиофильные коллоидные системы.

Мицеллы белковых ПАВ не проходят через поры животных и растительных мембран. Поэтому очистка таких растворов от ионов и молекул низкомолекулярных веществ осуществляется методом диализа или электродиализа.

4.2 Устойчивость белков как лиофильных коллоидов

Устойчивость лиофильных коллоидных растворов обусловлена сильным взаимодействием дисперсной фазы и дисперсионной среды. Эти систе-

мы термодинамически устойчивы, не склонны к самопроизвольному разрушению, не требуют специального стабилизатора.

Потеря устойчивости лиофильных коллоидных растворов связана с десольватацией мицелл под действием электролитов или других веществ, связывающих дисперсионную среду – растворитель. Для разрушения лиофильных коллоидных растворов требуется достаточно большое количество электролита, который должен оттягивать на себя не только свободный растворитель, но и связанный растворитель сольватных оболочек мицелл.

4.2.1 Высаливание

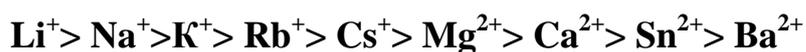
Высаливание – потеря устойчивости, разрушение лиофильных коллоидных растворов за счет десольватации мицелл. При этом ПАВ или ВМС выделяются в виде хлопьев.

Можно дать и другое определение процессу высаливания:

Высаливание – обратимое разрушение лиофильной системы, выделение в осадок растворенного вещества, вызываемое добавкой к раствору больших количеств нейтральных солей.

Высаливание наступает вследствие нарушения сольватной связи между макромолекулами ВМС и растворителем, т. е. вследствие *десольватации частиц*. Это приводит к постепенному понижению растворимости ВМС и в конечном итоге к выпадению его в осадок. Высаливающее действие электролита проявляется тем сильнее, чем больше степень сольватации его ионов, т. е. чем выше его способность десольватировать макромолекулы ВМС. Коагуляцию растворов ВМС вызывают оба иона прибавленного электролита. Высаливающим действием обладают не только соли, но также все вещества, способные взаимодействовать с растворителем и понижать растворимость ВМС. Например, хорошо высаливают желатин из водных растворов ацетон и спирт, так как они легко связываются с водой и тем самым дегидратируют частицы желатина.

Высаливающее действие на лиофильные коллоидные системы оказывают все ионы, независимо от знака их заряда, а также от знака заряда поверхности ассоциатов из ПАВ или ВМС. По высаливающему действию, т.е. способностью к сольватации, ионы располагают в лиотропные ряды:



ослабление высаливающего действия




Концентрацию электролита, при которой наступает быстрое осаждение полимера, называют *порогом высаливания* ВМС. Между величиной водной

оболочки белковых молекул и концентрацией солей существует прямая зависимость: чем меньше гидратная оболочка, тем меньше требуется солей.

Способность ВМС «высаливаться» из растворителя возрастает с увеличением молярной массы полимера. На этом основано фракционирование полидисперсного ВМС по молярной массе, которое используется для разделения смеси белков различной молярной массы.

Высаливание, как *обратимое осаждение белков*, предполагает выпадение белка в осадок под действием солей щелочных и щелочноземельных металлов, после удаления которых методами диализа или гельхроматографии он вновь возвращается в свое исходное (нативное) состояние. Наиболее часто в практике используют сульфат натрия и аммония. Механизм высаливания заключается во взаимодействии анионов (SO_4^{2-}) и катионов (Na^+ , NH_4^+) с зарядами белка (группы NH_3^+ и COO^-). В результате заряд исчезает, и соответственно, исчезает взаимоотталкивание молекул. Одновременно резко уменьшается гидратная оболочка. Все это приводит к "слипанию" молекул и осаждению.

Высаливанием белков обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения и удаления балластных белков или выделения исследуемого фермента. Различные белки высаливаются из растворов при разных концентрациях нейтральных растворов сульфата аммония. Поэтому метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок при 50% насыщении) и альбуминов (выпадают при 100% насыщении).

На величину высаливания белков оказывают влияние не только природа и концентрация соли, но и рН среды и температура, а также ионная сила раствора.

Более тонкое разделение белков плазмы крови человека на фракции достигается при использовании различных концентраций этанола при низкой температуре (от -3 до -5°C) по методу Кона. В этих условиях белки сохраняют свои нативные свойства. Указанным методом часто пользуются для получения отдельных фракций крови, используемых в качестве кровезаменителей.

Часто осаждение полимера проводят, приливая к раствору жидкость, в которой он менее растворим («осадитель» или «нерастворитель»). Чем ниже растворимость ВМС в данном растворителе, тем быстрее и полнее происходит высаливание. У одного и того же полимера растворимость зависит от длины макромолекул. Чем больше их длина и молекулярная масса, тем меньше растворимость и легче происходит высаливание частиц. Это свойство используют при анализе *полидисперсных систем*. Постепенно прибавляя к раствору возрастающие количества осадителя, можно выделить из раствора отдельные фракции частиц.

Природные белки наделены определенной, строго заданной пространственной конфигурацией, и обладают рядом характерных физико-химических и биологических свойств при физиологических значениях температуры и рН среды.

Под влиянием различных физических и химических факторов белки подвергаются свертыванию и выпадают в осадок, теряя нативные свойства.

4.2.2 Денатурация

Денатурация белков – сложный процесс, при котором под влиянием внешних факторов (температуры, механического воздействия, действия химических агентов, ультразвука) происходит разрушение вторичной, третичной и четвертичной структуры белковой макромолекулы, т. е. ее нативной пространственной структуры (рис. 19). При этом первичная структура, а, следовательно, и химический состав белка не меняются.

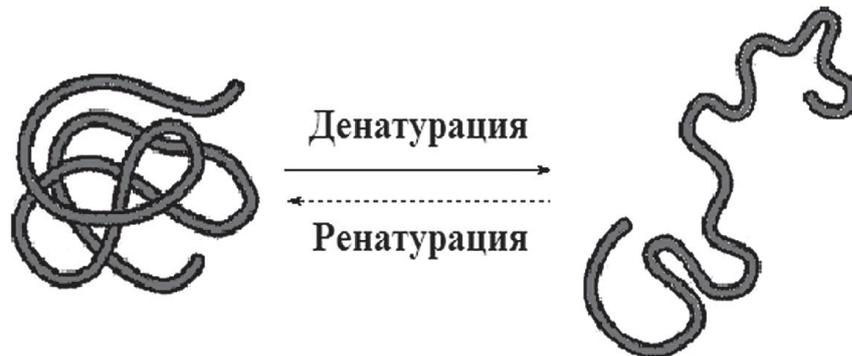


Рис. 19. Схема денатурации белка

(из кн. Жеребцов Н.А., Попова Т.Н., Артюхов В. Г. Биохимия: учебник. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. – 696с.

Среди химических веществ, вызывающих денатурацию, следует выделить органические растворители, мочевины, алкалоиды, минеральные кислоты и щелочи, бромистый литий, сульфат аммония, соли тяжелых металлов.

Явление денатурации характерно только для молекул, имеющих сложную пространственную организацию. Низкомолекулярные природные и синтетические пептиды неспособны к денатурации.

Денатурация приводит к потере характерных для белка свойств (растворимость, электрофоретическая подвижность, биологическая активность и др.).

Ренатурация – это восстановление утраченных свойств, после устранения денатурирующего фактора. Не все белки способны ренатурировать. У большинства белков денатурация необратима. Группа австралийских и американских химиков нашла способ с помощью использования мочевины и центрифугирования за несколько минут ренатурировать вареное в течении 20 минут куриное яйцо. Иногда денатурированный белок в подходящих условиях вновь спонтанно приобретает свою нативную структуру. Ренатурация по-

казывает, что третичная структура белка полностью определяется его первичной структурой и что сборка биологических объектов может осуществляться на основе немногих общих принципов.

Большинство белков денатурирует при нагревании их растворов выше 50–60°C. Денатурацию могут также вызвать концентрированные кислоты и щелочи, дубильные вещества, дегидратанты (ацетон, этанол, мочевины), ионы тяжелых металлов, алкалоиды, детергенты, облучение УФ, рентгеновские лучи, изменение pH и ионной силы раствора.

Механизмы денатурирующего действия химических веществ зависят от их физико-химических свойств. Однако общий принцип денатурирующего действия – ослабление факторов, повышающих устойчивость структуры белка, среди которых важнейшими являются гидратная оболочка, водородные и дисульфидные связи.

Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, особенно в ИЭТ (рI), повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (каталитической, антигенной или гормональной). При денатурации белка, вызванной раствором с концентрацией мочевины 8 моль/л или другим агентом, разрушаются в основном не ковалентные связи, в частности, гидрофобные взаимодействия и водородные связи. Дисульфидные мостики в присутствии восстанавливающего агента меркаптоэтанола разрываются, в то время как пептидные связи самого остова полипептидной цепи не затрагиваются. В этих условиях разворачиваются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры.

Денатурация белков происходит в желудке, где имеется сильноокислая среда (pH 0,5-1,5), и это способствует расщеплению белков протеолитическими ферментами.

Отравление ионами тяжелых металлов основано на денатурации белков-ферментов. В тоже время, денатурация белков положена в основу лечения отравлений тяжелыми металлами, когда больной принимает per os («через рот») молоко или сырые яйца для того, чтобы ионы металлов, денатурируя белки молока или яиц, адсорбировались на их поверхности и не действовали на белки слизистой оболочки желудка и кишечника, а также не всасывались в кровь.

Денатурация происходит при кулинарной обработке пищи, что облегчает ее переваривание в ЖКТ.

§ 5. Методы анализа белков

5.1. Качественные реакции

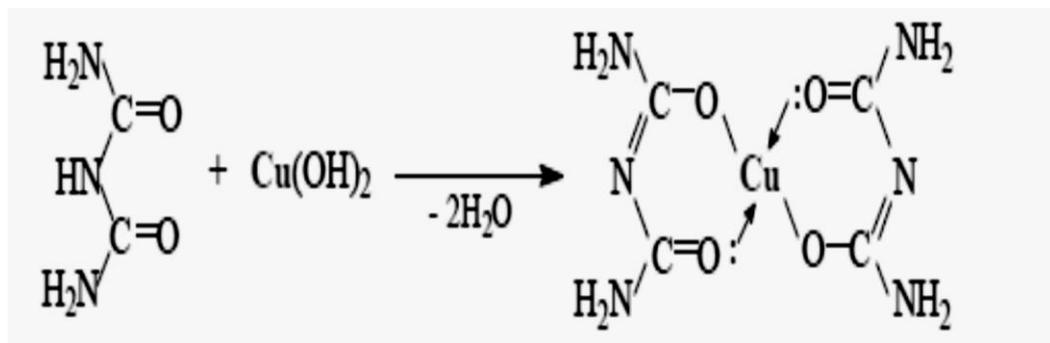
Цветные, основанные на открытии пептидной связи или функциональных групп аминокислот (см. гл.1, подраздел 2.3.6.)

Выделяют два типа цветных реакций: 1) универсальные – биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все α -аминокислоты и белки); 2) специфические – только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах отдельных аминокислот (реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу, реакция Миллона на тирозин, реакция Сакагучи на аргинин и т.д.).

Биуретовая реакция (Пиотровского) доказывает наличие пептидной связи. Эту реакцию дают как биурет ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$), содержащий пептидную связь, так и белки, что также является доказательством наличия в белках аналогичных связей.

Это качественная реакция на все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза, которые содержат не менее двух пептидных связей.

При нагревании, биурета, белков или пептидов в щелочном растворе с сульфатом меди(II) появляется сине-фиолетовая окраска за счет образования солеобразных комплексов:



биурет

Биуретовую реакцию дают также некоторые небелковые вещества, например, оксамид ($\text{NH}_2\text{CO-CO-NH}_2$), некоторые аминокислоты (гистидин, серин, треонин, аспарагин).

2. Осадочные, обусловленные физико-химическими свойствами белков. Такие реакции бывают обратимыми (высаливание) и необратимыми (денатурация).

5.2. Методы количественного определения белка в биологическом материале

В настоящее время на практике используется несколько методов количественного определения белка.

Биуретовый метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса катиона Cu^{2+} с пептидными фрагмен-

тами белковой молекулы. Существуют две разновидности этого метода: при одной из них определяют от 2 до 10 мг белка в пробе, чувствительность другой (микрометод) – 0,1-2 мг.

Для определения белка биуретовым методом к 1 мл раствора, содержащего от 2 до 10 мг белка, добавляют 4 мл биуретового реактива. Пробы перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут, после чего определяют оптическую плотность ($\lambda = 540$ нм). Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику.

Метод Лоури основан на образовании окрашенных соединений ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10–100 мкг белка в пробе).

Определение белка по азоту. Метод Кьельдаля основан на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может быть принято равным ≈ 16 %. По количеству экспериментально определенного азота рассчитывают количество белка в пробе. Для определения общего азота органическое вещество подвергают минерализации под действием концентрированной серной кислоты, разлагая его до CO_2 и H_2O . Азот органического вещества при этом переходит в $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Для количественного определения белка в водных растворах широко используются методы, основанные на оптических свойствах белков: нефелометрический, рефрактометрический, УФ-спектроскопии, спектрофотометрии в видимой области и фотоэлектроколориметрии.

Все эти методы позволяют определить *суммарное количество белков* в исследуемом материале.

Для количественного определения *индивидуальных белков* используют методы на основе их биологических свойств (специфичности взаимодействия): это *иммунорадиометрический и иммуноферментный*.

5.2.1. Электрофорез

Электрофорез – это движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля. В растворе белки находятся в виде заряженных частиц. Заряд на поверхности белков возникает в результате диссоциации группировок, находящихся в боковых радикалах аминокислот (карбоксильных, амино-, имидазольных и др. групп), а также при связывании ионов. Для каждого белка существует изоэлектрическая точка, pI , когда положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей белковой молекулы равен нулю.

При $pH \neq pI$ молекулы белка приобретают заряд и под действием электрического поля перемещаются к противоположно заряженному электроду – катоду (–) или аноду (+).

Для электрофоретического разделения оптимально такое значение рН рабочего буфера, которое обуславливает максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь, а не их максимальный заряд. Обычно электрофорез проводят в среде (буфере) со значением рН, на 3-4 единицы отличающимся от среднего значения рI для белков данного типа. Это позволяет добиться хорошей электрофоретической подвижности и сохранить заметные различия молекул по заряду.

Электрофорез проводят в однородном электрическом поле, то есть поле, напряженность E которого во всех точках одинакова.

Электрофорез проводят на носителях: бумаге, геле и др. При электрофорезе на бумаге скорость миграции белка зависит от заряда, в геле – от молекулярной массы.

Для обнаружения белковых фракций бумагу или гель обрабатывают красителем. Окрашенный комплекс белков выявляет расположение различных фракций на носителе.

Результатом проведения электрофореза является электрофореграмма - картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления (рис. 20).

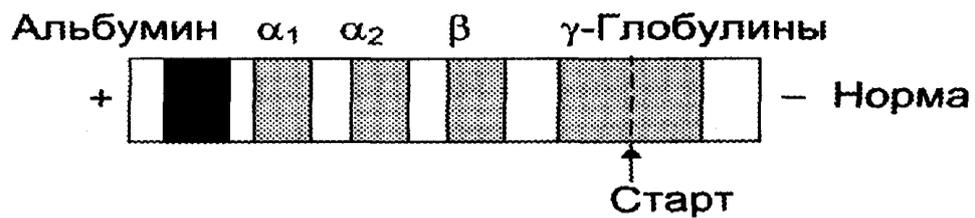


Рис. 20. Электрофорез белков сыворотки крови здорового человека на бумаге

Электрофореграмма белков биологических жидкостей человека (сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.) позволяет врачам получить важную информацию для диагностики. Например, у здорового человека относительное содержание белковых фракций при определении их в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге, следующее: альбумины 55-65%, α_1 -глобулины 3-6%, α_2 -глобулины 7-10%, β -глобулины - 7-12%, γ -глобулины - 13-19%. При многих заболеваниях наблюдается изменение соотношения фракций, тогда как общее количество белка обычно мало изменяется. Выявление этих изменений с помощью метода электрофореза широко используется в диагностических целях. Электрофореграммы белков-ферментов (зимограммы) позволяют изучать изменения активности и изоферментного спектра таких белков под действием внешних и внутренних факторов, как у человека, так и у других организмов.

Метод электрофореза, предложенный еще в начале XX века, в настоящее время широко используют в биологии и медицине для разделения белков в исследовательских и клинических целях. С помощью электрофореза можно

установить молекулярную массу белка или его субъединиц, подтвердить чистоту выделенного белка.

В настоящее время актуальным является способ разделения белков электрофорез в сочетании с иммунопреципитацией (иммуноэлектрофорез). Этот метод представляет собой комбинацию электрофоретического и иммунологического методов анализа белков. При этом электрофоретическое разделение белков сочетается со специфической серологической реакцией антиген-антитело. В буферную среду помещают анализируемую белковую смесь, например, сыворотку, и соответствующую ей антисыворотку. В этом случае с помощью серологической реакции преципитации достигается значительное повышение аналитической чувствительности электрофоретического метода. При помощи этого метода было показано, что электрофоретически однородные белковые фракции могут состоять из нескольких белков, различающихся по иммунологическим свойствам. Например, именно так удалось провести глубокое фракционирование белков плазмы крови человека.

5.2.2 Хроматография

Для анализа белков и крупных пептидов широко используется гель-фильтрация.

Гель-фильтрация – фракционирование смеси белков, пептидов по размерам молекул путем их прохождения через гели с определенной величиной пор. Раствор, содержащий смесь веществ, отличающихся по размеру молекул, вносят в колонку, заполненную гелем с сетчатой структурой и уравновешенную буферным раствором. В качестве неподвижной фазы используют высоко профильные декстраны с поперечными «сшивками» (сефадексы) или полиакриламидные гели (биогели). Они хорошо набухают в воде и после набухания действуют подобно молекулярному сити.

Существует более 20 типов сефадексов и более 30 типов биогелей, различающихся частотой поперечных сшивок и размером гранул.

Наибольшей скоростью продвижения по колонке обладают компоненты раствора, размеры молекул которых больше пор геля. Такие компоненты не проникают в гранулы гелевой фазы и выходят из колонки первыми. Более мелкие молекулы, способные проникать внутрь геля, непрерывно обмениваются между жидкими фазами внутри и вне геля и продвигаются по колонке значительно медленнее. Находящиеся в растворе самые маленькие частицы (например, неорганические соли) выходят из колонки последними. На этом принципе основаны методы фракционирования белков, их обессоливания, определения молекулярной массы (рис. 21).

Для первичного фракционирования смесей белков и пептидов используется *ионообменная хроматография* (см. гл. 1, подраздел 4.3.)

Высокоспецифичным и высокоэффективным методом выделения и очистки белков является *аффинная хроматография*.

Аффинная хроматография представляет собой метод выделения вещества или группы веществ с использованием их сродства к какому-либо лиганду, и это сродство отражает биологические функции исследуемого вещества.

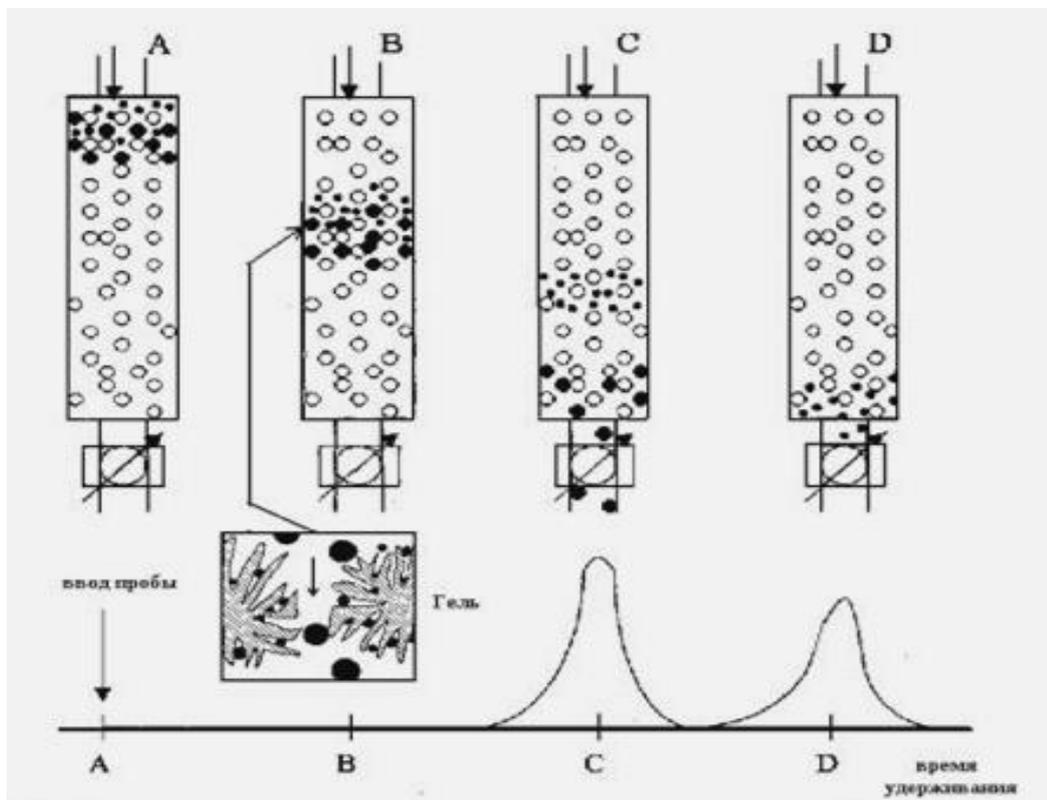


Рис. 21. Принцип разделения при гель-хроматографии. А-ввод образца, В – разделение по размерам; С – выход крупных макромолекул; D – выход мелких макромолекул (из презентации Рыскиной Е.А. Методы биохимических исследований белковых молекул: (<http://www.myshared.ru/slide/941241/>))

При аффинной хроматографии выделение пептидов и белков осуществляется в результате специфического и обратимого связывания с сорбентом. Благодаря этому пептиды и белки можно концентрировать из большого объема, а также многократно использовать хроматографическую колонку. Обычно при аффинной хроматографии используют иммуносорбенты.

В современной препаративной биохимии аффинная хроматография успешно используется для разделения гомологичных белков, например изоферментов. С помощью данного метода, например, были выделены изоферменты карбоангидразы.

§ 6. Применение растворов белков и пептидов, а также белковых гидролизатов в медицине

Белки используются для создания сложных многокомпонентных лекарственных средств, где они выполняют как вспомогательные, так и самостоя-

тельную терапевтическую функцию с перспективой применения для коррекции иммунодефицитных состояний и лечения онкологических заболеваний.

Создан противоопухолевый препарат на основе белка *α-фетопротейна* в комбинации с противоопухолевым антибиотиком доксорубицином.

Эксперименты последних лет показали, что природные пептидные препараты и синтетические регуляторные пептиды участвуют в активации хроматина и нормализуют процесс белкового синтеза в культуре тканей.

Разработка новых синтетических пептидных биорегуляторов и изучение механизмов их действия является актуальной теоретической и практической задачей.

Активное изучение регуляторных пептидов позволило установить, что во многих случаях воздействие на физиологические процессы оказывают не целые молекулы, а их небольшие фрагменты – олигопептиды. Эти фрагменты обладают определенной направленностью действия, специфичностью и активностью.

К настоящему времени синтезировано много коротких пептидов, наиболее изученными из которых являются тимоген, вилон и эпиталон.

Тимоген – синтетический дипептид Glu-Trp, представляющий собой аналог вещества, выделенного из тимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обнаружена способность тимогена ингибировать спонтанный и индуцированный радионуклидами канцерогенез, повышать резистентность организма к микробным и грибковым инфекциям за счет стимуляции функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов.

Тимоген нашел широкое применение в клинической практике при лечении острой и хронической пневмонии, абсцессе легкого, гнойном плеврите, эмфиземе легких, диффузном пневмосклерозе, ишемической болезни сердца.

Вилон – дипептид Lys-Glu, получен синтетическим путем на основе анализа аминокислотного состава комплексного препарата тимуса – тималина. Как и тимоген, вилон стимулирует клеточные механизмы усиления иммунитета, включает активацию Т-лимфоцитов. Обнаружено стимулирующее действие вилона на процессы регенерации поврежденной печени, а также выраженное репаративное действие при лечении животных с интенсивными инфекционными посттравматическими осложнениями.

Эпиталон – тетрапептид Ala-Glu-Asp-Gly, снижает двигательную активность, подавляет перекисные процессы в головном мозге и печени, угнетает развитие спонтанных новообразований.

В качестве перспективных лекарственных препаратов рассматриваются короткие пептиды, выделенные из спинного мозга свиньи – нейрокинины:

Нейрокинин А: His - Lys - Thr - Asp - Ser - Phe - Val - Gly - Leu - Met - NH₂, оказывает воздействие на гладкую мускулатуру сосудов, вызывая приток крови.

Нейрокинин В: Asp - Met - His - Asp - Phe - Phe - Val - Gly - Leu - Met - NH₂. Нейрокины А и В контролируют перистальтику кишечника.

Структура пептидных опиоидов такова, что они могут взаимодействовать с рецепторами различных классов, расположенных на наружной мембране клеток практически всех органов, в том числе, с рецепторами нейронов.

Метионин-энкефалин (Тир-Гли-Гли-Фен-Мет) и лейцин-энкефалин (Тир-Гли-Гли-Фен-Лей) – пентапептиды, относятся к классу опиоидных нейропептидов, которые образуются в мозге и оказывают на ЦНС действие, сходное с действием морфина (обезболивание, возникновения чувства удовлетворения, снижение других эмоций).

Таким образом, быстрыми темпами расширяются как арсенал лекарственных средств пептидной природы, так и область их применения.

Препараты гидролизатов белков представляют собой смеси аминокислот, полученных путем кислотного или ферментативного гидролиза белков, и используются для парентерального (внутривенного) питания.

К ним относятся гидролизин, гидролизат казеина, аминокислотный гидролизат, церебролизин, аминокровин, фибриносол.

Эти препараты компенсируют белковое голодание организма, обеспечивают азотистое равновесие у больных после операций на желудочно-кишечном тракте, с нарушениями переваривания белков и всасывания аминокислот, при тяжелых ожогах.

Препарат церебролизин представляет собой освобожденный от белка гидролизат мозгового вещества и содержит 18 аминокислот. Препарат применяют при заболеваниях, сопровождающихся нарушениями функций центральной нервной системы: после травм мозга и операций на головном мозге, после перенесенных кровоизлияний или воспалительных процессов, как вспомогательное средство в наркологии.

Растворы белков также активно используются в качестве лекарственных средств.

Цитохром с успешно применяется для лечения дистрофических изменений миокарда.

Новым перспективным направлением в исследованиях белковых растворов в медицинской практике является разработка препаратов для внутривенного введения, в частности, препаратов иммуноглобулинов. Препараты иммуноглобулина человека для внутривенного введения являются иммуноглобулинами класса IgG, выделенными из плазмы крови человека. За рубежом выпускается более 30 препаратов на основе IgG, которые активно используются как в терапевтической практике взрослых, так и в педиатрии.

Препараты иммуноглобулина обладают неспецифической активностью, проявляющейся в повышении резистентности организма путем усиления фагоцитарной активности лейкоцитов.

Препараты иммуноглобулина содержат различные противовирусные, антибактериальные, антитоксические антитела, обладают не только замещающим, но и иммуномодулирующим действием.

Показана высокая эффективность препаратов иммуноглобулина как у детей, так и взрослых при:

- 1) посттравматическом шоке для коррекции выраженной иммунной депрессии;
- 2) у онкогематологических больных для профилактики инфекционных осложнений;
- 3) при тяжелых вирусных и бактериальных инфекциях: улучшает состояние больных с бактериальными инфекциями при лечении антибиотиками и др.

В педиатрической практике иммуноглобулин используется для профилактики и лечения септических заболеваний недоношенных детей, профилактики тяжелых бактериальных инфекций у детей, инфицированных ВИЧ.

Помимо препаратов иммуноглобулинов с широкими иммуномодулирующими свойствами, разработаны препараты иммуноглобулинов узконаправленного действия.

Так, разработан противодифтерийный иммуноглобулин человека, представляющий собой иммунологически активную фракцию белка IgG, выделенную из плазмы крови доноров, иммунизированных в плановом порядке дифтерийным анатоксином.

Препарат иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита для внутривенного введения является иммунологически активной фракцией человеческой сыворотки, содержащей антитела к вирусу клещевого энцефалита. При клещевом энцефалите иммуноглобулины служат практически единственным лечебным средством.

Область применения иммуноглобулинов в медицинской практике в настоящее время постепенно расширяется. Иммуноглобулины находят применение как в качестве профилактических, так и лечебных средств.

Также традиционной областью использования растворов белков и их неполных гидролизатов является их применение как препаратов для парентерального питания при тяжелых формах дистрофии, ожоговой и лучевой болезни.

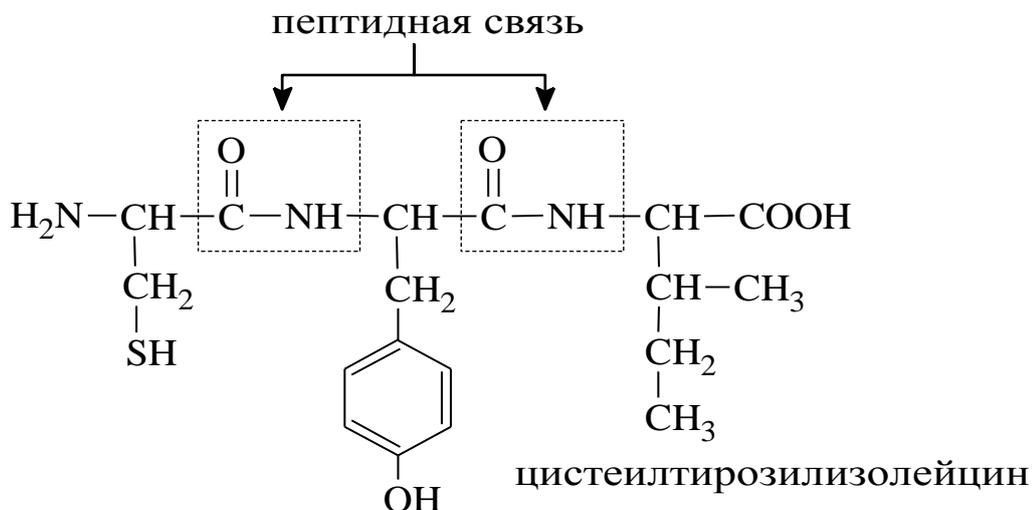
§ 7. Обучающие и контролирующие материалы

7.1 Задания с решением

Задача 1.

Фрагментом гормона окситоцина является трипептид цис-тир-иле. Напишите строение этого пептида, выделите пептидные связи и дайте полное название данного пептида.

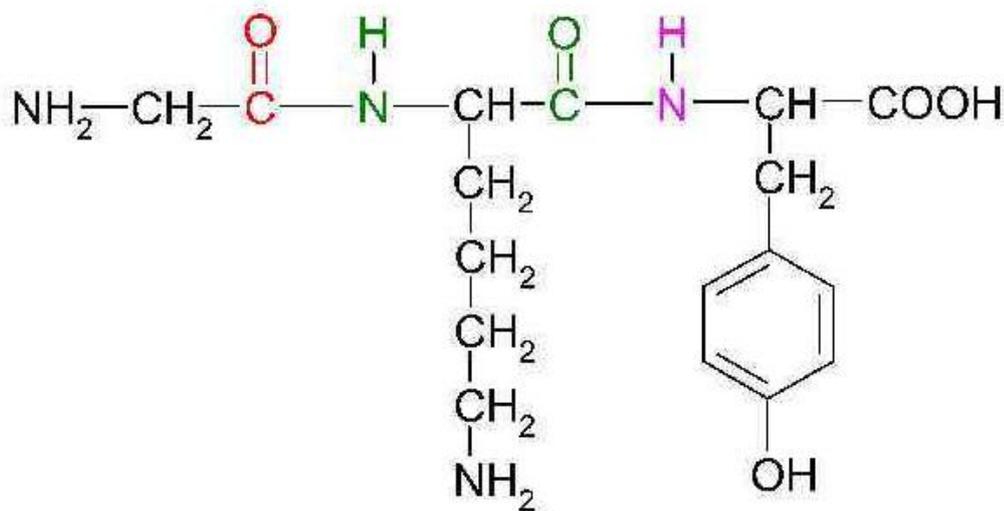
Решение:



Задача 2.

Определите область значений рН, в которой находится изоэлектрическая точка (рI) трипептида глициллизилтирозин (ГЛИ-ЛИЗ-ТИР). Укажите, какой заряд имеет трипептид в растворе с рН 4,5 и к какому электроду в этом случае он будет перемещаться при электрофорезе.

Решение:



Глицил-лизил-тирозин

В нейтральной среде положительный заряд на аминогруппе N-концевой аминокислоты нивелируется отрицательным зарядом на карбоксильной группе С-концевой аминокислоты. Поэтому в нейтральной среде заряд пептида равен сумме зарядов боковых цепей аминокислот.

Боковой радикал глицина не заряжен, лизина – имеет положительный заряд, тирозина – отрицательный заряд. Суммарный заряд пептида равен

нулю. Это пептид нейтрального характера. Таким образом, pI находится в нейтральной среде ($pI \approx 6,8$).

В кислой среде при pH 4,5 по принципу Ле Шателье диссоциация карбоксильной группы и фенольного гидроксила подавляется, а протонирование аминокрупп усиливается, поэтому данный трипептид заряжен положительно. При электрофорезе он будет перемещаться к отрицательно заряженному электроду – катоду.

Задача 3.

При $pH = 6$ инсулин при электрофорезе остается на старте. К какому электроду инсулин будет перемещаться при электрофорезе в растворе HCl с концентрацией хлороводородной кислоты равной 0,1 моль/л?

Решение:

Так как при $pH = 6,0$ инсулин остается на старте при электрофорезе, следовательно, его $pI = 6,0$. Определяем pH раствора соляной кислоты:

$pH = -\lg a(H^+) = \lg \gamma \cdot c(HCl)$, где γ – коэффициент активности, равный 0,76 (справочные данные, следовательно, $pH = \lg(0,76 \cdot 0,1) = 1,12$).

pH раствора HCl меньше pI , поэтому молекула инсулина в растворе соляной кислоты приобретает положительный заряд, и в электрическом поле будет перемещаться к катоду.

Задача 4

Почему белок молока (казеин) сворачивается (т.е. выпадает в осадок), если молоко кислое?

Решение:

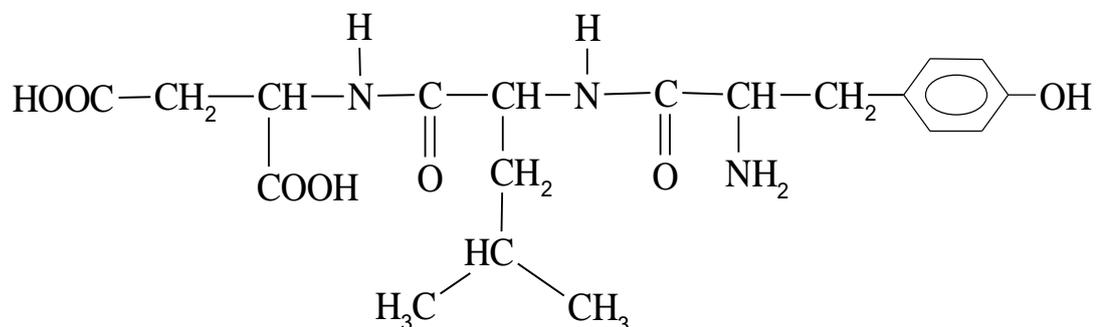
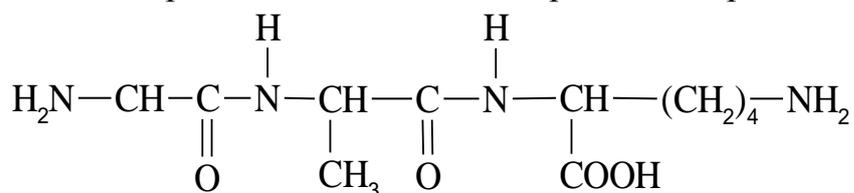
В результате потери двух факторов устойчивости белка в растворе – заряда (изоэлектрическая точка белков молока ниже $pH=7,0$) и гидратной оболочки.

7.2 Вопросы и задачи для самостоятельного выполнения

Контрольные вопросы

1. Что такое первичная структура белка, пептида? Какими параметрами она характеризуется? Возможна ли ее расшифровка?
2. Что такое вторичная структура белка? Какими типами связи она поддерживается?
3. Покажите схематично возникновение водородной связи между Ала и Тре (с написанием их формул) в пептиде.
4. Приведите пример образования дисульфидного мостика, стабилизирующего третичную структуру белковой молекулы. Биологическая роль шаперонов.
5. В каких случаях имеют место гидрофобные взаимодействия между остатками аминокислот? Приведите примеры.

6. Что такое денатурация белков? Какие факторы могут её вызвать?
7. Какие уровни структурной организации повреждаются при денатурации?
8. Возможно ли восстановление пространственной структуры молекулы белка после денатурации? Поясните.
1. Почему при добавлении к водному раствору белка нейтральных солей в высокой концентрации белок выпадает осадок? Поясните.
2. Почему возникает суммарный заряд на белковой молекуле? Почему его величина не остается неизменной при изменении рН? Что представляет собой изоэлектрическое состояние, изоэлектрическая точка (рI)? приведите примеры.
3. В какой последовательности будут выходить из колонки при гель-фильтрации на сефадексе белки со следующими молекулярными массами: 1) иммуноглобулин А – 500 000; 2) фибриноген 330 000; 3) трансферрин – 75 000; 4) ретинол-связывающий белок – 24 000; 5) транскортин – 55 000?
4. Назовите данные трипептиды и напишите реакции образования каждого:



5. Приведите примеры применения растворов белков и пептидов в медицинской практике.
6. Перечислите методы анализа белков.

Задачи для самостоятельного выполнения

1. Найдите, в какой зоне рН (нейтральной, кислой или щелочной) лежит ИЭТ полипептида, состоящего из следующих аминокислотных остатков: арг-гис-глу-цис. В каком направлении будет двигаться данный пептид при разделении пептидов методом электрофореза в буферном растворе с нейтральным значением рН? Как изменится заряд и направление движения пептида в электрическом поле, если в составе пептида аргинин заменить лейцином?

2. Напишите тетрапептид арг-ала-лиз-мет. В какой области рН данный пептид будет находиться в изоэлектрическом состоянии?

3. Напишите формулу трипептида гис-лиз-три. Дайте полное название этого трипептида, укажите пептидные связи, N- и C-концевые аминокислоты. Определите, в какой области рН находится изоэлектрическая точка данного пептида.

4. К какому электроду будет перемещаться при электрофорезе β -лактоглобулин в буферном растворе, содержащем равные концентрации гидрофосфат- и дигидрофосфат-ионов, если при рН = 5,2 белок остается на старте (рI)? Рассчитанный по уравнению Гендерсона-Гассельбаха рН_(буф.р-ра) равен 7,21.

5. В растворе содержится смесь белков: глобулина (рI=7,0), альбумина (рI=4,9) и коллагена (рI=4,0). При каком значении рН можно электрофоретически разделить эти белки?

7.3 Тестовые задания

(Выберите один или несколько правильных ответов)

1. **Белками называются:**

- а) полимеры, состоящие из α -L-аминокислот, связанных сложноэфирными связями;
- б) полимеры, состоящие из α -L-аминокислот, связанных пептидными связями;
- в) полимеры, состоящие из мононуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями;
- г) низкомолекулярные соединения, состоящие из α -L-аминокислот, связанных пептидными связями;
- д) полимеры, состоящие из α -L-аминокислот, связанных гликозидными связями.

2. **Белками являются:**

- а) миозин;
- б) миоглобин;
- в) глутатион;
- г) инсулин;
- д) вазопрессин.

3. **Белки:**

- а) полипептиды;
- б) имеют первичную структуру, закодированную в ДНК;
- в) имеют стабильную конформацию;
- г) подвержены гидролизу при низких значениях рН;
- д) функционируют при взаимодействии со специфическим лигандом.

4. **Сложные белки:**

- а) обладают сложной супервторичной структурой;

- б) имеют несколько активных центров;
- в) содержат более двух полипептидных цепей;
- г) участвуют в сложных химических реакциях;
- д) имеют небелковую часть.

5. Какова особенность кислых белков?

- а) преобладание дикарбоновых аминокислот;
- б) равное соотношение диаминомонокрбоновых и моноаминодикарбоновых аминокислот;
- в) преобладание диаминомонокрбоновых кислот;
- г) белок состоит из моноамино- и монокрбоновых кислот;

6. Первичной структурой белка является:

- а) способ укладки молекулы белка в пространстве;
- б) линейная последовательность аминокислот;
- в) объединение нескольких полипептидных цепей с образованием функционально активного белка;
- г) объединение молекулы белка с небелковыми компонентами;
- д) взаимодействие нескольких разных молекул белка.

7. Вторичная структура белка – это:

- а) линейная последовательность аминокислот в полипептидной цепи;
- б) пространственное расположение молекулы белка по отношению к другим белковым молекулам;
- в) пространственное расположение атомов главной цепи молекулы белка на отдельных ее участках;
- г) пространственную структуру, образующуюся за счет взаимодействия между радикалами аминокислот, располагающихся на значительном расстоянии друг от друга;
- д) пространственное размещение взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепями.

8. В формировании вторичной структуры белка участвуют:

- а) межпептидные водородные связи;
- б) водородные связи между гидрофильными радикалами аминокислот;
- в) дисульфидные связи;
- г) гидрофобные взаимодействия между радикалами гидрофобных аминокислот;
- д) ионные связи.

9. Денатурация – это:

- а) процесс гидролитического распада молекулы белка;
- б) утрата биологической активности белка;
- в) процесс сворачивания полипептидной цепи в функционально активную молекулу;
- г) нарушение первичной структуры белка;
- д) нарушение вторичной и третичной структуры белковой молекулы.

- 10. В формировании третичной структуры белка участвуют связи:**
- а) пептидные;
 - б) водородные;
 - в) дисульфидные;
 - г) ионные;
 - д) гидрофильные.
- 11. Четвертичная структура – это:**
- а) пространственная укладка протомера;
 - б) пространственная укладка нескольких протомеров;
 - в) α -спираль и β -структура;
 - г) образование доменов.
- 12. Нативные свойства олигомерных белков проявляются при формировании:**
- а) α -спирали;
 - б) четвертичной ступени организации;
 - в) β -структуры;
 - г) третичной ступени организации.
- 13. Необратимое осаждение белков из растворов происходит под действием:**
- а) концентрированной азотной кислоты;
 - б) растворов солей тяжелых металлов;
 - в) растворов солей щелочных и щелочноземельных металлов;
 - г) ультразвука;
 - д) трихлоруксусной кислоты.
- 14. Для выделения белков из растворов методом высаливания используют:**
- а) высококонцентрированные растворы сульфата аммония;
 - б) высококонцентрированные растворы сульфата магния;
 - в) высококонцентрированные растворы хлорида натрия;
 - г) высококонцентрированные растворы хлорида кальция;
 - д) высококонцентрированные растворы сульфата меди.
- 15. Изoeлектрической точкой белка называется:**
- а) значение рН среды, при котором заряд белковой молекулы равен нулю;
 - б) значение рН среды, при котором белковая молекула находится в виде катиона;
 - в) значение рН среды, при котором белковая молекула находится в виде аниона;
 - г) значение рН среды, при котором в молекуле белка количество положительно заряженных групп равно количеству отрицательно заряженных групп;

- д) значение рН среды, при котором в молекуле белка сумма положительно и отрицательно заряженных групп положительна.
- 16. Для разделения белковых смесей на индивидуальные компоненты используются следующие физико-химические методы:**
- а) распределительная хроматография;
 - б) гель-хроматография;
 - в) электрофорез;
 - г) диализ;
 - д) ионообменная хроматография.
- 17. Конформация белка – это:**
- а) аминокислотная последовательность полипептидной цепи;
 - б) взаиморасположение α -спиралей и β -структур;
 - в) количество полипептидных цепей в белке;
 - г) пространственная структура белка;
 - д) способность белка к небольшим изменениям.
- 18. Простетической группой белка называют:**
- а) органическую часть белка;
 - б) неорганическую часть белка;
 - в) лиганд, присоединяемый к белку при функционировании;
 - г) экзогенный лиганд;
 - д) небелковую часть, прочно связанную с активным центром белка.
- 19. Метод разделения белков по молекулярной массе:**
- а) диализ;
 - б) высаливание;
 - в) электрофорез;
 - г) аффинная хроматография;
 - д) гель-фильтрация.
- 20. Электрофорез на бумаге делит белки по разнице в:**
- а) молекулярных массах;
 - б) зарядах;
 - в) растворимости в воде;
 - г) устойчивости к нагреванию;
 - д) сродству к лигандам.
- 21. Роль ковалентных связей белков:**
- а) стабилизируют третичную структуру белка;
 - б) поддерживают α -спиральную конфигурацию полипептидной цепи;
 - в) используются при соединении аминокислот в первичной структуре белка.
- 22. Характерные для белков свойства:**
- а) коллоидные;
 - б) термостабильность;
 - в) устойчивость к изменениям рН;

- г) амфотерность;
д) денатурация.
- 23. Метод, используемый для отделения низкомолекулярных веществ от белков:**
- а) ультрацентрифугирование;
б) ионообменная хроматография;
в) аффинная хроматография;
г) диализ;
д) электрофорез.
- 24. Укажите направление движения пептида лиз-гли-ала-лей в процессе электрофореза на бумаге при pH = 7.0:**
- а) к катоду;
б) к аноду;
в) останется на старте.
- 25. О чём позволяет судить биуретовая реакция:**
- а) о наличии белков в биологической жидкости;
б) о первичной структуре белка;
в) о наличии аминокислот в белке;
г) о функциях белков.
- 26. Какие из перечисленных факторов могут изменять конформацию белковой молекулы:**
- А – регулировать биологическую активность белков;
Б – вызывать денатурацию белка.
1. Изменение температуры от 0⁰ до 40⁰С.
 2. Повышение температуры от 50⁰ до 100⁰С.
 3. Взаимодействие с природными лигандами.
 4. Действие солей тяжелых металлов.
 5. Действие солей щелочно-земельных металлов.
- 27. Установите соответствие.**
- | | |
|-----------------|---|
| Пептиды: | Свойства: |
| 1. Ала-Иле-Три. | а) в электрическом поле движется к аноду; |
| 2. Асп-Арг-Гис. | б) в электрическом поле движется к катоду; |
| 3. Сер-Глн-Цис | в) плохо растворим в воде; |
| | г) имеет в составе аминокислоту с тиольной группой; |
| | д) содержит на С-конце иминокислоту. |
- 28. Установите соответствие.**
- | | |
|--------------------|--------------------------------------|
| Трипептиды: | Свойства: |
| 1. Цис-Лиз-Глн. | а) плохо растворим в воде; |
| 2. Вал-Мет-Фен. | б) на N-конце содержит иминокислоту; |

3. Тре-Тир-Про.

- в) имеет суммарный положительный заряд;
- г) на N-конце содержит гидроксиаминокислоту;
- д) имеет суммарный отрицательный заряд.

29. Установите соответствие.

Белки:

1. Мономерный белок.
2. Олигомерный белок.
3. Доменный белок.

Имеют:

- а) один одинаковый центр;
- б) небелковую часть;
- в) несколько полипептидных цепей;
- г) одну пептидную цепь, но несколько относительно независимых областей;
- д) несколько различных лигандов, связывающихся одним активным центром.

30. Установите соответствие.

Уровни структурной организации белков:

1. Первичная структура.
2. Вторичная структура.
3. Третичная структура.

Определение:

- а) пространственная укладка полипептидной цепи;
- б) порядок чередования аминокислот;
- в) структура, образованная межрадикальными взаимодействиями;
- г) пространственная укладка пептидного остова;
- д) специфический порядок расположения вторичных структур.

7.4 Ответы на тестовые задания

Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ	Номер вопроса	Правильный ответ
1.	б	11.	б	21.	а, в
2.	а, б, г	12.	б	22.	а, г, д
3.	а, б, д	13.	а, б, д	23.	в
4.	д	14.	а, б, в, г	24.	а
5.	а	15.	а, г	25.	а
6.	б	16.	б, в, д	26.	А-1,3,5 Б-2,4
7.	в	17.	б, г, д	27.	1-в 2-а 3-г
8.	а	18.	б, д	28.	1-в 2-а 3-г
9.	б, д	19.	д	29.	1-а 2-в 3-г
10.	б, в, г, д	20.	б	30	1-б 2-г 3-в

Использованная литература

1. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособ. Ч. I./ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климовичкин. – Самара : Самар. гос. техн. ун-т., 2007. – 110 с.
2. Банк вопросов и тестов к итоговому занятию по биоорганической химии «Биологически важные классы биоорганических соединений. Биополимеры и их структурные компоненты» для медицинского факультета/ О.В. Смирнова А.В. Мельник.– Винница : Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова.– 2016.– 32 с.
3. Биоорганическая химия. Часть 3. Биополимеры и их структурные компоненты : Учебное пособие для студентов I курса специальности: 31.05.02 Педиатрия. – / И.П. Степанова, И.В. Ганзина, О.В. Атавина, З.А. Мендубаева, В.В. Мугак, Т.В. Постнова.– Омск : Изд-во ОмГМУ, 2016. – 146 с.
4. Биохимия: [учеб. пособие]. В 2 ч. Ч. 1. Основные питательные вещества человека / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева; [науч. ред. Ю. Ю. Моржерин]; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. Ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2016. – 140 с.
5. Биохимия: Учебник для вузов / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов.– Воронеж : Гос. ун-т, 2002. – 693 с.
6. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С. Северина. – 2-е изд., испр. – Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 784 с.
7. Биохимия человека: учебно-методическое пособие для студентов направления 020400.62 Биология, 034300.62 Физическая культура / В.Н. Дубровский, О.В. Фролова, Д.Н. Кыров, Е.А. Силиванова. – Тюмень : Изд-во Тюменского государственного университета, 2011. – 84 с.
8. Биохимия. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие /Т. Н. Замай, Н. М. Титова, Е. И. Елсукова, А. В. Еремеев. – Электрон. дан.(3 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008.
9. Братцева, И.А., Биоорганическая химия. Учебное пособие / И.А. Братцева, В.И. Гончаров. – Ставрополь : Изд.: СГМА, 2010. – 196 с.
10. Глухарева, Т. В. Биохимия : [учеб. пособие]. В 2 ч. Ч. 1. Основные питательные вещества человека / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева; [науч. ред.Ю. Ю. Моржерин]; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. Ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2016. – 140 с.
11. Коневалова, Н.Ю. Б 63 Биохимия : пособие / Н.Ю. Коневалова, И.Н. Гребенников, Козловская С.П., Куликов В.А., Л.Г. Орлова, С.С. Осочук, Г.Н. Фомченко, В.В. Яцкевич / Под ред. Н.Ю. Коневаловой. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 690 с. (4-е издание)
12. Корочанская, С.П. Статика белков, витамины, ферменты, гормоны, обмен углеводов / Учебно-методическое пособие по биологической химии / С.П. Корочанская, П.Г. Сторожук, И.М. Быков. – Краснодар : КубГМУ, 2015. – 81 с.
13. Лекции кафедры общей и биоорганической химии МГСМУ: URL Режим доступа: <http://old.msmsu.ru/page/subfaculty/single/68/page1398678253>
14. Липатова, Н.А. Тестовые задания по биологической химии / Методические разработки для студентов, обучающихся по специальности 060101 «Лечебное дело».

Часть I. / Н.А. Липатова, Т.Ф. Атянина, Л.Я. Лабзина – Мордовский гос. университет им. Н.П. Огарева. – Саранск, 2010. – 97с.

15. Литвинова, М.Г. Основы биоорганической химии / Учебно-методическое пособие. / М.Г. Литвинова. – Краснодар : ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, 2017. – 156 с.

16. Литвинова, Т.Н. Химия. Основы химии для студентов медицинских вузов: Учебник. / Т.Н. Литвинова, В.В. Хорунжий – Санкт-Петербург : Издательство «Лань», 2019. – 524 с.

17. Литвинова, Т.Н. Общая химия: задачи с медико-биологической направленностью / Т.Н. Литвинова.– Ростов н/Д: Феникс, 2014. – 319 с.

18. Лысенкова, А. В. Тексты лекций по биоорганической химии для иностранных студентов 1 курса медицинских вузов, обучающихся на русском языке / А. В. Лысенкова, В. А. Филиппова. — Гомель: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2007 – 208 с.

19. Методическое пособие к малому практикуму по биохимии. 6-е изд., перераб. и доп. / Сост. С.А. Коннова, А.А. Галицкая, Е.В. Плешакова, М.В. Каневский, Ю.П. Федоненко. – Саратов : СГУ, 2017. – 75 с.

20. Рыскина, Е.А. Презентация на тему: «Методы биохимических исследований белковых молекул». – <http://www.myshared.ru/slide/941241/>

21. Сборник методических материалов по курсу «Химия биомолекул и наносистем» для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов и студентов-лечебников медико-биологического факультета РНИМУ/ Под ред. зав. кафедрой, проф. Негребецкого В.В. Москва, РНИМУ, 2012. – 81 с.

22. Сборник задач и упражнений по биологической химии / Сост. С.Д. Жамсаранова, З.А. Пластинина.– Улан-Уде: Издательство ВСГТУ, 2006. – 60 с.

23. Сборник тестов и упражнений по биохимии. / Сост. Е.И. Ерлыкина, Т.И. Шлапакова и др. – Нижний Новгород: издательство Нижегородской государственной медицинской академии (издание 4-е, дополненное), 2009. – 124 с.

24. Слесарев, В.И. Химия: Основы химии живого: Учебник для вузов. – Санкт-Петербург : Химииздат, 2015(2017). – 768 с.

25. Статическая биохимия: Метод. пособие / Сост. Т.Е. Панасюк, В.В. Люленова Д.П. Фалюта. – Приднестровский гос. университет им. Т. Г. Шевченко. – Тирасполь, 2016. – 119 с.

26. Стручкова, И.В. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле: Электронное учебно-методическое пособие / И.В. Стручкова, Е.А. Кальясова. – Нижегородский госуниверситет, Нижний Новгород, 2012. – 60 с.

27. Учебно-методическое пособие «Основы коллоидной химии: Поверхностные явления. Коллоидные растворы. Растворы ВМС» / Сост. Т.Н. Литвинова, Н.К. Выскубова, Т.А. Слинькова, О.В. Балачевская. – Краснодар, КубГМУ, 2009. – 202 с.

28. Тимин О.А. Лекции по общей биохимии, 2018: [http:// www.biokhimija.ru](http://www.biokhimija.ru)

29. Чиркин, А.А. Биохимия: Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Мед. лит., 2010. – 624 с.

30. Шугалей, И. В. Химия белка: учебное пособие / И. В. Шугалей, А. В. Гарабджиу, И. В. Целинский. – Санкт-Петербург : издательство Проспект Науки, 2010. – 200 с.
31. Яровая, М.А. Тестовые задания для самостоятельной работы студентов по «Биологической химии. Биохимия полости рта» / М.А. Яровая. – Орел : ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева». – 2017. –80 с.

Электронные образовательные ресурсы

Базы данных, информационно-справочные и поисковые системы:

1. Электронно-библиотечная система «КнигаФонд»: <http://www.knigafund.ru>;
2. ЭБС «Консультант студента. Электронная библиотека медицинского вуза» <http://www.studmedlib.ru>;
3. Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru/defaultx.asp>;
4. База данных Scopus: <http://www.scopus.com>.
5. <https://www.biochemistry.pro>
6. <https://www.xumuk.ru/>
7. <http://www.college.ru/chemistry/>
8. <http://www.chem21.info>
6. <http://www.alhimik.ru>
9. <http://www.hij.ru>
10. <http://chemistry.narod.ru>
11. <http://www.chem.msu.su/>
12. <http://www.chemPort.ru>
13. <http://biologylib.ru/books>

Приложение

Таблица 1. Аминокислоты, входящие в состав белков

Формула	Название/ обозначение	pK	Формула	Название/ обозначение	pK
<i>Алифатические</i>			<i>Алифатические, содержащие OH-группу</i>		
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Глицин Гли-Gly	2,60 9,80	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2-\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Серин Сер-Ser	2,19 9,21
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Аланин Ала-Ala	2,35 9,87	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}-\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_3	Треонин* Тре-Thr	2,09 9,11
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{H}_3\text{C}-\text{CH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_3	Валин* Вал-Val	2,29 9,40	<i>Алифатические, содержащие серу</i>		
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ $\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}$	Лейцин* Лей-Leu	2,33 9,74	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	Метионин* Мет-Met	2,13 9,28
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{H}_3\text{C}-\text{CH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_2 CH_3	Изолейцин* Иле-Ile	2,32 9,76	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2-\text{SH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Цистеин*** Цис-Cys	1,92 8,35 10,46
<i>Алифатические, содержащие COOH-группу</i>			$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ S S CH_2 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH}$	Цистин ЦисS-SЦис/ CysS-SCys	1,90 10,40
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_2 COOH	Глутаминовая Глу-Glu	2,10 4,07 9,47	<i>Алифатические, содержащие NH₂-группу</i>		
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_2 $\text{C}=\text{O}$ NH_2	Глутамин Глн-Gln	2,17 9,13	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_2 CH_2 NH_2	Орнитин Орн-Orn	1,94 8,65 10,76
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ COOH	Аспарагиновая Асп-Asp	1,99 3,90 9,90	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2-\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Лизин* Лиз-Lis	2,16 9,18 10,79
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ $\text{C}=\text{O}$ NH_2	Аспарагин Асп-Asn	2,10 8,84	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ CH_2 CH_2 NH $\text{C}=\text{NH}$ NH_2	Аргинин** Арг-Arg	1,82 8,99 2,48

Формула	Название/ обозначение	pK	Формула	Название/ обозначение	pK
<i>Ароматические</i>					
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Фенилаланин* Фен-Phe	2,16 9,18	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Тирозин*** Тир-Tyr	2,20 9,11 10,13
<i>Гетероциклические</i>					
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$	Триптофан* Три-Trp	2,43 9,44	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2 \end{array}$	Гистидин** Гис-His	1,80 6,04 9,35
$\begin{array}{c} \text{HN}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_7\text{N} \end{array}$	Пролин Про-Pro	1,95 10,64	$\begin{array}{c} \text{HN}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_7\text{NO} \end{array}$	Гидрокси-ролин НО-Про – НО-Pro	1,99 10,66

Таблица 2. Специфические реакции, используемые для идентификации и количественного анализа α -аминокислот и белков

Реактивы	Определяемые аминокислоты	Наблюдаемое проявление
Ксантопротеиновая реакция Концентрированная азотная кислота	Тирозин Фенилаланин Триптофан	Желтая окраска
Реакция Миллона Нитрат ртути (I) + азотная кислота	Тирозин	Красный осадок
Реакция Гопкинса – Кола Глиоксиловая + концентрированная серная кислота	Триптофан	Сине-фиолетовая окраска
Реакция Эрлиха <i>n</i> -Диметиламинобензальдегид + концентрированная хлористоводородная кислота	Триптофан	Пурпурно-синяя окраска
Реакция Сакагучи α -Нафтол + гипобромит натрия	Аргинин	Красная окраска
Нитропруссидная реакция Нитропруссид натрия + разбавленный водный аммиак	Цистеин	Красно-фиолетовая окраска
Реакция Фоля Ацетат свинца + едкий натр	Цистеин Метионин	Черный осадок
Фармакопейная реакция 1. Резорцин + концентрированная серная кислота 2. Раствор аммиака	Глутаминовая кислота Глутамин	Красно-фиолетовая окраска

Реактивы	Определяемые аминокислоты	Наблюдаемое проявление
Реакция Паули Диазореактив из сульфаниловой кислоты + едкий натр	Гистидин Тирозин	Красная окраска
Реакция Фолина-Чиокалтеу Фосфомолибдодвольфрамовая кислота	Тирозин	Синяя

Таблица 3. Изоэлектрическая точка белков

Белок	Изоэлектрическая точка
Пепсин желудочного сока	2,00
Пепсиноген	3,70
Химотрипсин сока поджелудочной железы	8,60
Альбумин сыворотки крови	4,70
Инсулин	5,40
Гемоглобин	6,68
Миоглобин	7,00
Оксигемоглобин	6,87
α-глобулин крови	4,80
β- глобулин крови	5,20
γ -глобулин крови	6,40
β- лактоглобулин	5,20
Фибриноген крови	5,40
Карбоксипептидаза	6,00
Желатин	4,70
Казеин	4,70
Миозин	5,50

