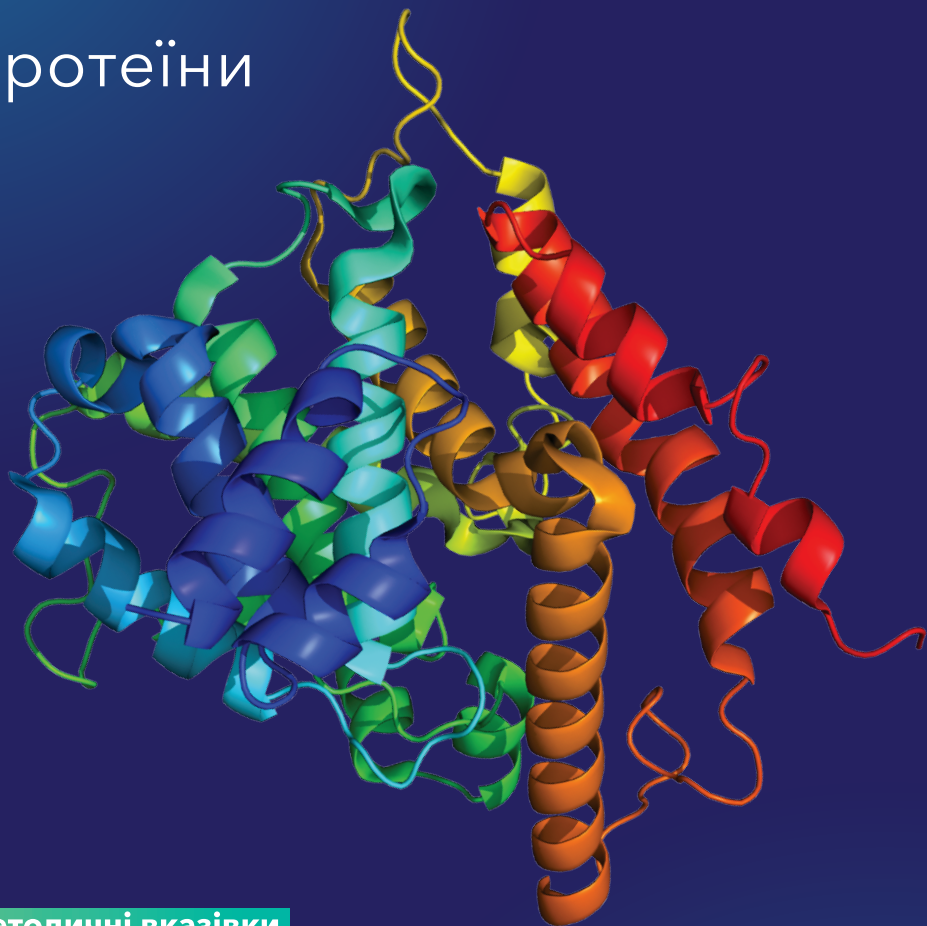


Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр «Мала академія наук України»

ОСНОВИ БІОХІМІЇ

Протеїни



**Методичні вказівки
до виконання
лабораторних
робіт**

Київ
2023

Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр «Мала академія наук України»

ОСНОВИ БІОХІМІЇ. ПРОТЕЇНИ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних
робіт

Київ
Національний центр
«Мала академія наук України»
2023

Укладачі:

О. Л. Толстов – старший науковий співробітник Інституту хімії високомолекулярних сполук НАН України, канд. хім. наук;

І. М. Бей – наукова співробітниця Інституту хімії високомолекулярних сполук НАН України, канд. хім. наук

Редакційна колегія:

Т. М. Крекотіна, методистка відділу змісту та якості освіти НЦ «МАНУ»;

О. М. Косьмій, методистка відділу змісту та якості освіти НЦ «МАНУ»,
канд. політ. наук, доцентка

Рецензенти:

О. М. Маланчук – старша наукова співробітниця відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, канд. біол. наук;

Д. В. Кулеши – старший науковий співробітник відділу полімерів медичного призначення Інституту хімії високомолекулярних сполук НАН України, канд. біол. наук

*Рекомендовано науково-методичною радою
Національного центру «Мала академія наук України»
(протокол № 2 від 16 червня 2021 р.)*

Основи біохімії. Протеїни : методичні вказівки до виконання лабораторних робіт /
О-75 уклад.: О. Л. Толстов, І. М. Бей ; [відп. за вип.: Т. В. Пещеріна, А. М. Буткевич]. – Київ :
Національний центр «Мала академія наук України», 2023. – 120 с.

Навчально-методичне видання призначене для поглиблення знань і проведення лабораторних робіт за темою «Основи біохімії. Протеїни». У ньому узагальнено сучасні теоретичні знання про будову та функції амінокислот і їх полімерів – протеїнів у живих організмах. Надано практичні рекомендації щодо виділення, ідентифікації і дослідження протеїнів у вигляді лабораторних робіт.

Матеріали навчального видання можуть бути використані педагогами під час проведення лабораторних робіт, розроблення дослідницьких проєктів у закладах загальної середньої і позашкільної освіти, організації роботи з дітьми та учнівською молоддю в академічних установах і наукових центрах, а також вчителями хімії і біології як допоміжне видання для організації освітньої діяльності.

УДК 577(112+15):543(645.6+632.518)

© Толстов О. Л., Бей І. М., 2023

© Національний центр

«Мала академія наук України», 2023

ЗМІСТ

ВСТУП	5
ХІМІЧНІ РЕАКТИВИ І ПРАВИЛА РОБОТИ З НИМИ	7
ПРАВИЛА РОБОТИ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ В ЛАБОРАТОРІЇ	8
ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ НЕЩАСНИХ ВИПАДКАХ	12
ПРОТЕЇНИ. СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ	13
Амінокислоти	14
Властивості амінокислот	18
Послідовність амінокислот і форма молекул протеїнів.	
Первинна структура протеїнів	21
Вторинна структура протеїнів (α -спіралі та β -структури)	25
Третинна структура протеїнів	29
Еволюція протеїнів	31
Четвертинна структура протеїнів. Будова протеїнів великого розміру	33
Протеїни зі структурою довгих спіральних ниток	36
Фібрилярні (волоконноподібні) протеїни	37
Особливості хімічної будови екстрацелюлярних протеїнів	38
Основні функції протеїнів	39
Протеїни як частини масивних надмолекулярних структур	40

ВИДІЛЕННЯ, ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ	45
Лабораторна робота 1. Протеїни рослинного і тваринного походження. Методи виділення та приготування зразків для досліджень	45
Лабораторна робота 2. Елементний аналіз протеїнів	51
Лабораторна робота 3. Якісні реакції протеїнів	53
Лабораторна робота 4. Хімічні властивості протеїнів	65
Лабораторна робота 5. Кількісне визначення вмісту протеїнів методом фотометрії	72
Лабораторна робота 6. Визначення констант дисоціації та ізоелектричної точки амінокислот і протеїнів методом титриметрії	83
ФЕРМЕНТАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ	88
Лабораторна робота 1. Ферментативна коагуляція казеїну	90
Лабораторна робота 2. Ферментативна деструкція протеїнів під дією рослинних ферментів	100
Лабораторна робота 3. Властивості протеїнів як каталізаторів. Процес ферментації	104
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	114
СПИСОК ІЛЮСТРАЦІЙ	115

ВСТУП

Світ, що нас оточує, складається з безлічі різноманітних маленьких частинок – атомів і молекул. Вони безперервно рухаються та перетворюються, взаємодіють і руйнуються. Проте так чи інакше існування цих «цеглинок» підкорюється законам і правилам, що є основою існування Всесвіту від його виникнення. Завдяки взаємодії між атомами і молекулами, їх безперервним перетворенням вони постійно ускладнювалися й урізноманітнювалися, що сприяло виникненню життя на нашій неповторній планеті.

Уявіть різницю між простою сумішшю молекул (чи то повітря, чи то приготований вами розчин соди або цукру, чи навіть морська вода з багатьма розчиненими неорганічними солями, органічними сполуками, газами повітря, зваженими частинками мінералів) і будь-якою маленькою живою клітиною з її шаленим різноманіттям хімічних сполук – кожна з них виконує певну, іноді неповторну функцію (харчову, дихальну, захисну, сигнальну, репродуктивну тощо), і поєднані вони однією спільною метою: підтримувати життя та належне функціонування цієї маленької одиниці життя. Саме складність процесів, що забезпечують життя організмів, зумовила відокремлення нової науки, що міцно поєднує біологію і хімію.

Отже, ми наблизилися до розуміння того, чому присвячена наука, що має дивну назву, яка об'єднує хімію і біологію, – **біохімія**, або **біологічна хімія**, кому як зручно. Із назви стає зрозуміло, що **біохімія** – це наука, яка вивчає будову хімічних речовин, що входять до складу організмів, і хімічні реакції, а також перетворення, що відбуваються за участю таких речовин і є невід'ємними від процесів життєдіяльності. Перелік таких речовин дуже великий – від найпростіших, як-от кисень, вода, іони металів, до надзвичайно складних, якими є протеїни. І неважливих або незначущих тут немає – кожна речовина має свої функції і невпинно їх виконує.

Розглянути їх усі в цьому збірнику неможливо, бо він перетвориться на багатотомне видання. Ми пропонуємо зупинитися на найбільш складних, але й найбільш цікавих об'єктах, які вивчає біохімія, – протеїнах, їх відокремлен-

ні від інших речовин, аналізі та вивченні їх будови, властивостей і функцій, які протеїни виконують у живих організмах.

Навчальне видання «Основи біохімії. Протеїни» складається з теоретичної і практичної частин. У теоретичній частині зібрано загальні сучасні відомості про склад, хімічну будову, надмолекулярну структуру, основні властивості та функції протеїнів.

Практична частина містить дев'ять лабораторних робіт, виконання яких дасть змогу набути практичних навичок проведення хімічного експерименту, а також підтвердити отримані теоретичні знання про протеїни, детально ознайомитися з основними способами виділення, ідентифікації та вивчення будови протеїнів, перевірити їх хімічні та ферментативні властивості.

Слід розуміти, що будь-яка лабораторна робота не передбачає механічного набору дій, що обов'язково зумовлюють незвичайні ефекти: неочікувані зміни кольорів, появу пухирців газів, випадіння осадів та інші «вау!». Це не висновок за експериментом! Основна увага експериментатора має бути приділена пізнавальному значенню кожного досліду – умінню спостерігати особливості реакцій, відзначати значні й незначні зміни, їх послідовність і розуміти, чому ці зміни все ж таки відбулися і які їх причини.

Перш ніж опановувати сучасні знання про протеїни, для впевненого та свідомого виконання лабораторних робіт, наведених у цьому виданні, необхідно переконливо оволодіти базовими знаннями щодо періодичного закону, будови неорганічних і органічних сполук, типів хімічного зв'язку, основних класів хімічних сполук, видів та умов перебігу хімічних реакцій.

До початку виконання лабораторних робіт обов'язково потрібно ознайомитися з правилами роботи в хімічній лабораторії для безпечного проведення експериментів, розуміння головних небезпек досліду, запланованого до проведення, а також з основними правилами надання першої домедичної допомоги.

У виданні використовуються сучасні хімічні термінологія і номенклатура, система позначень, рекомендовані Міжнародним союзом фундаментальної і прикладної хімії (IUPAC), Українською національною комісією з хімічної термінології і номенклатури.

Видання розраховане на учнів – членів Малої академії наук України й учнів закладів загальної середньої освіти, в яких хімія є предметом поглибленого вивчення.

Матеріали навчального видання можуть бути використані педагогами під час проведення лабораторних робіт, розроблення дослідницьких проєктів у закладах загальної середньої і позашкільної освіти, організації роботи з дітьми та учнівською молоддю в академічних установах і наукових центрах, а також вчителями хімії і біології як допомога для організації освітньої діяльності.

ХІМІЧНІ РЕАКТИВИ І ПРАВИЛА РОБОТИ З НИМИ

Хімічними реактивами називають речовини, що їх використовують для проведення хімічних реакцій, аналізу і синтезу речовин.

Залежно від ступеня чистоти хімічні реактиви класифікують на технічні («тех.»), чисті («ч.»), чисті для аналізу («ч.д.а.»), хімічно чисті («х.ч.»), особливо чисті («ос.ч.»). Чистоту хімічних реактивів і кількість домішок регламентують Державні стандарти (ДСТ) і технічні умови (ТУ) їх одержання. Для більшості хімічних експериментів використовують реактиви кваліфікації «ч.», «ч.д.а.» або «х.ч.».

Під час роботи з хімічними реактивами необхідно дотримуватися таких правил:

- реактиви зберігати в закритих кришками склянках, щоб запобігти їх забрудненню;
- для проведення дослідів розчини і тверді речовини брати в таких кількостях, яких вимагає методика експерименту;
- тверді реактиви обережно відбирати шпателем; розчини або реактиви, що перебувають у рідкому стані, – піпетками або крапельними дозаторами;
- надлишок реактиву не висипати і не виливати в посуд, з якого його взято, щоб уникнути забруднення реактивів;
- концентровані розчини кислот і лугів, токсичних речовин тримати у витяжній шафі, там само з ними і працювати.

Під час роботи в хімічній лабораторії необхідно дотримуватися правил і вимог техніки безпеки.

ПРАВИЛА РОБОТИ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ В ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні положення

1. У хімічній лабораторії **категорично забороняється вживати їжу і напої**.

2. Перед початком роботи слід перевірити справність лабораторного обладнання і допоміжного приладдя, цілісність хімічного посуду, наявність засобів індивідуального захисту. **Категорично забороняється працювати з несправним обладнанням.**

3. Перед початком кожного заняття в лабораторії з'ясувати мету роботи, ознайомитися з її теоретичним обґрунтуванням і порядком проведення. Розпочинати виконувати практичну роботу лише після дозволу викладача.

4. Під час роботи в лабораторії підтримувати чистоту і порядок на робочому місці, а також дотримувати правил техніки безпеки. Безладдя, неохайність під час виконання операцій під час хімічного експерименту часто призводять до нещасних випадків, пошкодження обладнання, реактивів та одягу, необхідності повторення експерименту.

5. Роботу організовувати так, щоб під час виконання тривалих операцій одночасно можна було виконувати іншу супутню роботу, передбачену порядком проведення експерименту.

6. Основні правила роботи в хімічній лабораторії

6.1. Хімічні реактиви, дистильовану воду, газ, електричну енергію в лабораторії використовувати економно.

6.2. Під час користування обладнанням дотримуватися відповідних інструкцій з експлуатації.

6.3. Під час роботи зі скляним хімічним посудом і обладнанням бути обережними, не докладати надмірної сили.

6.4. Не нагрівати пробірки з розчинами речовин, що реагують, безпосередньо на відкритому полум'ї пальника, щоб уникнути розбризкування рідини, адже це може спричинити нещасні випадки і втрату досліджуваного розчину. Пробірки нагрівати на водяній бані, спрямовуючи отвори в бік від себе й інших осіб. Не заглядати в пробірку з рідиною, яку нагрівають.

6.5. Коли потрібно перевірити запах речовин у пробірках або склянках, у яких зберігають рідини, легким рухом долоні спрямувати потік повітря від посуду з реактивом до себе й обережно понюхати.

6.6. Усі роботи з речовинами, під час взаємодії яких утворюються шкідливі для організму гази, речовини з неприємним запахом, виконувати у витяжній шафі. **Категорично заборонено працювати із зазначеними речовинами на робочому місці.**

6.7. Відпрацьовані розчини кислот, лугів тощо зливати у спеціально призначений посуд. Розчини, що містять сполуки срібла, ртуті, церію, свинцю, інших важких, розсіяних і благородних металів, зливати в окремий посуд для їх подальшої регенерації.

6.8. Пам'ятати, що більшість реакцій відбувається лише за створення відповідних умов. Тому реактив додавати лише до спеціально підготовленого досліджуваного розчину (створене необхідне середовище, досягнута потрібна температура тощо). Якщо реакція перебігає в кислому чи лужному середовищі, не додавати до досліджуваного розчину неконтрольований об'єм розчину кислоти чи лугу. Рідину ретельно перемішати і краплями додавати розчин кислоти або лугу, щоразу перемішуючи суміш скляною паличкою, контролювати рН середовища, торкаючись нею індикаторного папірця.

6.9. Якщо необхідно перевірити можливість утворення осаду, додати до пробірки дві-три краплі аналізованого розчину і дві-три краплі реактиву.

6.10. Щоб забезпечити повноту осадження, після додавання реактиву й утворення осаду перевіряти повноту осадження в окремій порції фільтрату. Якщо в контрольній пробі триває утворення осаду, осаджувач додати до основного реакційного середовища і ввести додаткову порцію осаджувача. За повного осадження контрольна проба фільтрату не має давати позитивну реакцію з осаджувачем.

6.11. Як правило, осаджування проводять за нагріванням, що забезпечує утворення частинок осаду більшого розміру, які легко відокремлюються від розчину.

7. Робота з кислотами і лугами

7.1. Під час роботи з концентрованими кислотами і лугами бути обережними, стежити, щоб вони не потрапили в очі, на шкіру й одяг.

7.2. Під час розведення концентрованої сульфатної кислоти **обережно маленькими порціями приливати кислоту до води, а НЕ НАВПАКИ.** Це зумовлено тим, що під час розведення H_2SO_4 виділяється велика кількість тепла, розчин може закипіти, почати розбризкуватися і заподіяти шкоди.

7.3. Під час переливання великих об'ємів концентрованих кислот і лугів:

- вдягати гумові рукавички, фартух і захисні окуляри;
- великі ємності з рідинами помістити на підставку, а потім поволі нахилити і переливати крізь лійку в добре вимиті й висушені склянки;
- об'єми розчинів кислот і лугів відмірювати піпеткою, користуючись гумовим балончиком (грушею) або мірним циліндром;
- тверді луги і кислоти набирати за допомогою шпателя; під час роботи з ними очі мають бути захищені спеціальними окулярами.

8. Робота зі шкідливими й отруйними речовинами

8.1. Під час роботи зі шкідливими й отруйними речовинами (ціаніди, солі барію, ртуті, свинцю, арсену, міді, металічна ртуть тощо) стежити за тим, щоб вони не потрапили в організм (крізь шкіру, дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт).

8.2. Після роботи з такими речовинами ретельно вимити руки.

8.3. Заповнені ртуттю прилади розміщувати на спеціальних підставках-піддонах, щоб у разі пошкодження приладів основна маса ртуті потрапила на підставку, а не на робочий стіл чи підлогу. Якщо ртуть розлилася, швидко й обережно зібрати її за допомогою очищеного мідного дроту або пластинки, а потім засипати сіркою чи залити розчином FeCl_3 .

9. Робота з горючими та легкозаймистими речовинами

9.1. У лабораторії, де проводять роботи з горючими та легкозаймистими речовинами, забороняється використовувати відкрите полум'я. Горючі, легкозаймісті та леткі речовини не можна зберігати близько від джерел полум'я чи нагрітих електричних приладів (термостати, електричні печі тощо). У лабораторії такі речовини слід зберігати в щільно закритих склянках невеликого об'єму.

9.2. Під час роботи з вуглеводнями, спиртами, етерами, естерами й іншими легкозаймистими речовинами нагрівати їх у витяжній шафі на водяній бані в колбі зі зворотним холодильником.

9.3. Лужні метали спалахують у разі контакту з водою. Їх обов'язково зберігати під шаром гасу або спеціальної олії. Під час роботи з металічними натрієм або калієм уникати їх контакту з водою. Після закінчення роботи залишки цих металів перенести у спеціально призначені склянки.

10. Робота з речовинами, що утворюють вибухові суміші

10.1. Необхідно пам'ятати, що деякі гази (водень, етин, карбон(II) оксид тощо), а також леткі речовини (вуглеводні, спирти, сірковуглець та інші) під час випаровування утворюють із повітрям (киснем) вибухові суміші. Тому перед початком роботи з ними вмикати витяжну вентиляцію, щоб запобігти накопиченню у приміщенні лабораторії парів вибухонебезпечних речовин.

10.2. Забороняється ці речовини нагрівати, ударяти або зберігати з іншими речовинами, що утворюють вибухові суміші (хлорати, перхлорати, персульфати та інші окисники).

11. Ліквідація осередків займання в лабораторії

У разі виникнення пожежі в лабораторії негайно вимкнути всі електричні прилади, перекрити подачу газу. Місце пожежі засипати піском або накрити протипожежною ковдрою і загасити вогонь за допомогою вогнегасника. Воду для гасіння пожежі в лабораторії застосовувати обережно, бо в деяких випадках вона сприяє посиленню пожежі.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ НЕЩАСНИХ ВИПАДКАХ

Суворе дотримання інструкцій з охорони праці та правил техніки безпеки в хімічній лабораторії, обережне поводження з хімічними реактивами, посудом та обладнанням дають змогу запобігти нещасним випадкам (опіки, поранення, отруєння тощо).

Якщо нещасний випадок все-таки стався, потерпілому необхідно надати першу долікарську допомогу:

1. У разі потрапляння кислоти на шкіру пошкоджене місце інтенсивно промити чистою холодною водою, а потім обробити 1% розчином питної соди (NaHCO_3), щоб нейтралізувати залишки кислоти.
2. У разі потрапляння на шкіру розчинів лугів пошкоджене місце промити чистою холодною водою, а потім – розбавленим розчином оцтової чи лимонної кислоти, насиченим розчином борної кислоти.
3. У разі потрапляння на шкіру фенолу, бром у і подібних агресивних речовин негайно промити пошкоджене місце відповідними органічними розчинниками (спирти, естери тощо).
4. У разі отруєння хлором, бромом, оксидами нітрогену дати потерпілому вдихати пари розведеного розчину амоніаку, а потім випити молоко.
5. У разі термічних опіків шкіри на пошкоджену ділянку накласти стерильну пов'язку й доставити постраждалого до лікарні.
6. У разі порізів обережно промити рану 3% водним розчином гідроген пероксиду (перекису водню) або обробити шкіру навколо рани спиртовим розчином йоду і накласти стерильну пов'язку.
7. За потреби після надання першої долікарської допомоги доставити постраждалого до лікарні.

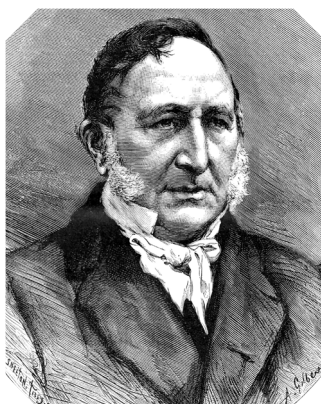
ПРОТЕЇНИ. СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ

Термін *протеїни* походить від грецького слова *πρωτα*, що означає «першочерговий». Відомий шведський учений Єнс Берцеліус відкрив цей тип сполук у 1838 році й запропонував таку назву для групи органічних сполук, що є найважливішими для життя. Пізніше того самого року німецький хімік Герріт Мюлдер використав термін «протеїни» для високомолекулярних збагачених азотом сполук, які можна знайти в будь-якому живому організмі – тварині чи рослині.



Єнс Якоб Берцеліус
(1779–1848)
Шведський хімік,
один з «батьків» хімії

Відкрив елементи Ce, Se, Th; отримав прості речовини Si, Ti, Ta, Zr; визначив атомну масу 46 хімічних елементів, визначив формули оцтової, тартратної та сукцинатної кислот.



Герріт Ян Мюлдер
(1802–1880)
Німецький хімік

Вивчав протеїни, розробив способи виділення протеїнів з рослин і тварин, винайшов брутто-формулу протеїнів.

Насправді протеїни за своєю будовою та функціональним призначенням є найбільш складними молекулами в живих організмах і природі загалом. Це не дивно, коли зрозумієш, що хімічну структуру кожної молекули протеїну природа «створювала», «відшліфовувала», «тестувала» і «впроваджувала» упродовж кількох сотень мільйонів років еволюції.

Та перш ніж розглядати загадкові й унікальні особливості таких великих за розміром полімерних (так, саме полімерних!) молекул, слід познайомитися з окремими «цеглинками», з яких побудовані протеїни. Вони називаються амінокислотами.

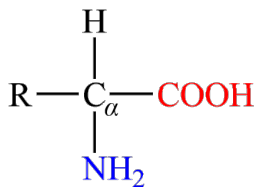
Чому це важливо? Тому що саме послідовність розташування кожної амінокислоти в довгому ланцюжку хімічно зв'язаних амінокислот, що утворюють протеїни, визначає тривимірну форму молекули протеїну і її призначення в клітинах живих організмів.

Амінокислоти

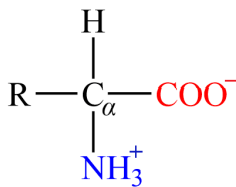
Амінокислоти – це органічні сполуки, що містять одночасно щонайменше одну органічну кислотну (карбоксильну, $-\text{COOH}$) і одну основну (аміно-, $-\text{NH}_2$) групи. На сьогодні серед безлічі органічних сполук відомо близько 300 амінокислот. Однак не всі з них слугують для побудови молекул протеїнів. Еволюційний відбір подолали трохи більше ніж 20 амінокислот – саме ті, в будові молекул яких $-\text{COOH}$ і $-\text{NH}_2$ групи приєднані до атома карбону (позначеного грецькою літерою « α »).

Молекули амінокислот, що мають таку будову, отримали назву **α -амінокислоти**. Літерою R у структурі амінокислоти позначений органічний радикал, що наділяє специфічними ознаками кожну амінокислоту, зокрема хімічні властивості, структуроутворювальну функцію у протеїні, його біологічну роль.

Різні способи зображення α -амінокислот



неіонізована
(формальна)

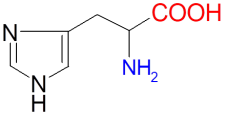
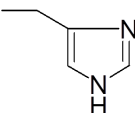
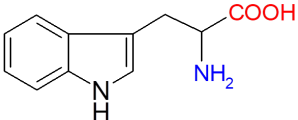
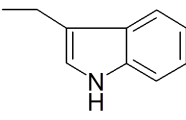
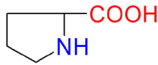
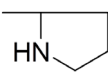
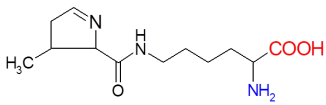
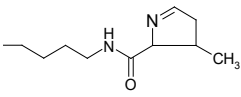


іонізована
(дійсна)

α -Амінокислоти завжди існують в іонізованій формі. Якщо аміногрупа має заряд (+), молекула є катіоном. Якщо карбоксильна група має заряд (-), молекула перетворюється на аніон. Якщо обидві групи відповідно заряджені, молекула стає цвітер-іоном. У таблиці 1 представлені всі α -амінокислоти, з яких природа будує великі молекули пептидів.

Таблиця 1
Амінокислоти, що трапляються в молекулах протеїнів

Назва	Позначення	Хімічна структура	Група R
Гліцин	Глі, Gly, G	$\text{H}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{H}$
Аланін	Ала, Ala, A	$\text{H}_3\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}_3$
Валін	Вал, Val, V	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Лейцин	Лей, Leu, L	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Ізолейцин	Іле, Ile, I	$\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$
Серин	Сер, Ser, S	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}_2\text{OH}$
Треонін	Тре, Thr, T	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
Цистеїн	Цис, Cys, C	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}_2\text{SH}$
Цистин	–	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \quad \quad \quad \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \quad \quad \text{S} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Метіонін	Мет, Met, M	$\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-(\text{CH}_2)_2\text{SCH}_3$
Аспарагінова кислота	Асп, Asp, D	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}_2\text{COOH}$
Аспарагін	Асн, Asn, N	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-\text{CH}_2\text{CONH}_2$
Глутамінова кислота	Глу, Glu, E	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Глутамін	Глн, Gln, Q	$\text{H}_2\text{NCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-(\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$
Лізин	Ліз, Lys, K	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Аргінін	Арг, Arg, R	$\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	$-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$

Назва	Позначення	Хімічна структура	Група R
Гістидин	Гіс, His, H		
Фенілаланін	Фен, Phe, F	$C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$	$-CH_2C_6H_5$
Тирозин	Тир, Tyr, Y	$HOC_6H_4CH_2CH(NH_2)COOH$	$-CH_2C_6H_4OH$
Триптофан	Трп, Trp, W		
Пролін	Про, Pro, P		
Селеноцистеїн	Sec, U	$HSeCH_2CH(NH_2)COOH$	$-CH_2SeH$
		Нещодавно відкрита. Присутня у деяких ферментах	
Піролізин	Pyl, O		
		Міститься у ферментах метанофільних організмів	

Увесь набір α -амінокислот, що трапляються у складі протеїнів, за хімічною будовою і властивостями можна розподілити за їх ознаками на кілька класів. Окремі представники таких сполук дещо різняться за хімічною будовою і хімічними властивостями. Тому одна амінокислота може належати до кількох різних груп.

Розглянемо різні **типи класифікації основних α -амінокислот**, щоб визначити різницю й особливості окремих «цеглинок» протеїнів.

1. За хімічною будовою:

а) **амінокислоти з алифатичним замісником R**. Вони є найпростіші за хімічною будовою амінокислоти – гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин. Останні три мають вуглеводневий замісник з розгалуженою структурою;

б) **амінокислоти з ароматичним замісником R**. До цієї групи належать фенілаланін і тирозин (обидві мають у структурі бензенове кільце), триптофан (ароматична індольна біциклічна група) і гістидин (імідазольне ароматичне кільце);

в) **гідроксилвмісні амінокислоти**. Гідроксильну групу (спиртову або фенольну) містять у своїй структурі серин, треонін, тирозин;

г) **сульфуровмісні амінокислоти**. Це цистеїн (тіольна група $-SH$), метіонін (тіоетерна група $-S-$) і цистин (дисульфідна група $-S-S-$);

г) **гетероциклічні амінокислоти**. Гістидин, триптофан, пролін і піролізин мають у хімічній структурі гетероциклічні фрагменти;

д) **імінокислоти**. Єдиною амінокислотою, що замість первинної аміногрупи $-NH_2$ містить вторинну аміногрупу $>NH$, є пролін. Тому його більш правильно називати α -імінокислотою.

2. За кислотно-основними властивостями:

а) **амінокислоти з вираженими кислотними властивостями**. До цієї групи належать амінокислоти з двома карбоксильними $-COOH$ групами. Наприклад, аспарагінова і глутамінова кислоти, а також їх амідні похідні – аспарагін і глутамін;

б) **амінокислоти з основними властивостями**. Три амінокислоти – лізин (з додатковою аміногрупою), аргінін (з гуанідиноювою групою) і гістидин (з імідазольною групою) – мають достатньо сильні основні властивості.

3. За полярністю молекул (полярність – здатність утворювати диполь із чітким розділенням зарядів (+) і (-) у межах однієї молекули, як у звичайній батарейці). Ця властивість амінокислот істотно впливає на форму та функціональність молекул протеїнів, до складу яких вони входять:

а) **неполярні** амінокислоти із замісником R, що не має заряду. Ці амінокислоти також називаються гідрофобними («бояться» води або «відштовхують» воду). До цієї групи належать аланін, лейцин, ізолейцин, валін, метіонін, фенілаланін, триптофан і пролін;

б) **полярні** амінокислоти із замісником R, що не має заряду, але у структурі радикалу є атоми з підвищеною електронегативністю (O, N або S, або R = H). До цієї групи належать гліцин, серин, треонін, цистеїн, глутамін, аспарагін, тирозин;

в) **полярні** амінокислоти з позитивно зарядженим замісником R. Лише три амінокислоти мають таку особливість – лізин, аргінін і гістидин;

г) **полярні** амінокислоти з негативно зарядженим замісником R. До них належать амінокислоти з двома карбоксильними групами – аспарагінова та глутамінова кислоти.

4. За споживчою цінністю. α -Амінокислоти беруть участь у біосинтезі протеїнів та інших біологічних процесах. Потребу в деяких амінокислотах організм людини може задовольнити власними силами, тобто синтезувати самостійно. Проте інші необхідні для існування амінокислоти людський організм синтезувати не здатен і отримати їх може лише ззовні – разом з їжею. За цим критерієм амінокислоти поділяють на незамінні (важливі) і замінні (неважливі):

А. Незамінні амінокислоти організм людини не здатний синтезувати, тож потребує їх *обов'язкового* отримання з їжею (протеїновмісні продукти, що містять ці амінокислоти). Вони необхідні людині для запобігання численним захворюванням, патологічним відхиленням і неправильному розвитку, що пов'язані з неповноцінним харчуванням і в дитячому, і в дорослому віці. До цієї групи належать 10 амінокислот: аргінін, валін, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан. Дві із зазначених амінокислот – аргінін і гістидин – умовно незамінні. Вони можуть синтезуватися лише в організмі дорослої людини. Діти *обов'язково* мають їх отримувати з їжею!

Б. Замінні амінокислоти – гліцин, аланін, серин, цистеїн, аспарагінова кислота й аспарагін, глютамінова кислота і глютамін, тирозин і пролін. Організм людини здатен синтезувати ці амінокислоти для власних потреб. Тому немає *обов'язкової* потреби вживати ці амінокислоти (протеїни, що їх містять). Проте бажано!

5. За напрямом метаболізму (перетворення в організмі). Живі організми можуть використовувати карбоновий ланцюг амінокислот як сировину для синтезу інших речовин:

а) **глікогенні амінокислоти.** Організм людини використовує ці сполуки для синтезу глюкози та глікогену. Серед них – аланін, аспарагінова кислота, гліцин, метіонін;

б) **кетогенні амінокислоти.** Вони беруть участь винятково в ендогенних (усередині клітин) процесах синтезу жирів. До цієї групи належать лейцин і лізин;

в) **гліко-кетогенними (універсальними)** є чотири амінокислоти – ізолейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин.

Властивості амінокислот

І фізичні, і хімічні амінокислоти природно пов'язані з особливостями їх хімічної будови.

Фізичні властивості

Розчинність. Завдяки існуванню в іонізованому стані амінокислоти добре розчиняються у воді, але майже нерозчинні в більшості органічних розчинників.

Температура плавлення. Через іонну природу молекул амінокислоти переходять у рідкий стан за підвищеної температури. Для більшості амінокислот температура плавлення становить близько 200 °С або більше.

Смак. Смакові рецептори людини дають змогу розрізнити амінокислоти на смак. Солодкуватий присмак мають гліцин, аланін, валін. Не має смаку лейцин. Солонуватий присмак в ізолейцину і натрієвої солі глутамінової кислоти. До речі, цю сполуку ви добре знаєте як модифікатор смаку глутамат (глутамат) натрію. Його зазвичай додають до м'ясних, грибних і рибних страв для посилення смаку. Ним зловживають ресторани китайської кухні. У деяких людей низька засвоюваність цієї сполуки, тому її вживання супроводжується швидким розладом кишківника. Ці «несподіванки» для деяких відвідувачів закладів китайської кухні називають «синдромом китайських ресторанів».

Хімічні властивості

Хімічні властивості амінокислот залежать від наявності в їх структурі карбоксильних, амінних та інших функціональних груп.

Загальні властивості

Кислотно-основні властивості. Завдяки одночасній наявності кислотної й основної функціональних груп амінокислоти проявляють властивості і кислот, і основ. Саме тому молекули амінокислот майже не існують у незарядженому стані. За низьких значень рН (у кислому середовищі) в іонізованому стані перебувають аміногрупи, а молекули амінокислоти мають позитивний (+) заряд. Натомість у лужному середовищі ($\text{pH} > 7$) іонізації піддаються карбоксильні групи, молекули амінокислот стають аніонами та набувають негативного (–) заряду. Однак за індивідуального значення рН для кожної амінокислоти молекули мають одночасно і позитивно заряджені $-\text{NH}_3^+$ групи, і негативно заряджені $-\text{COO}^-$ групи. Тобто молекули амінокислот існують у біполярному стані – у вигляді **цвітер-іонів** (з нім. *zwitter*, що означає «гібридний»). У цьому стані, попри наявність іонізованих (заряджених) груп, сумарний заряд молекули дорівнює 0, молекула є електронейтральна, а значення рН, за якого досягається цей стан, має назву **ізоелектрична точка (pI)** амінокислоти. Наприклад, молекули лейцину стають електронейтральними за $\text{pH} = 6,0$ (тобто для лейцину $\text{pI} = 6,0$).

Ізоелектричну точку можна визначити як середнє арифметичне констант дисоціації (виражених від'ємним десятковим логарифмом) карбоксильної й аміногрупи амінокислоти.

Константа дисоціації -COO^- груп лейцину $K_{\partial 1} = 4,0 \times 10^{-3}$.

Відповідно, $pK_{\partial 1(\text{-COO}^-)} = -\log(4,0 \times 10^{-3}) = 2,4$.

Константа дисоціації -NH_3^+ груп лейцину, $K_{\partial 2} = 2,5 \times 10^{-10}$.

Відповідно, $pK_{\partial 2(\text{-NH}_3^+)} = -\log(2,5 \times 10^{-10}) = 9,6$.

$$pI = \frac{pK_{\partial 1(\text{-COO}^-)} + pK_{\partial 2(\text{-NH}_3^+)}}{2} = \frac{2,4 + 9,6}{2} = 6,0.$$

Якщо в амінокислоті є кілька груп, здатних до іонізації, усі значення їх pK мають бути враховані.

Підсумовуючи вищезазначене, можна передбачити, що під час титрування амінокислоти поведуться як багатоосновні сполуки.

Властивості, пов'язані винятково з -COOH групами:

а) **реакція нейтралізації.** У разі взаємодії з основами утворюють солі (-COONa);

б) **реакція естерифікації.** У разі взаємодії зі спиртами утворюють естери (-COOCH_3);

в) взаємодія з амоніаком й амінами, залежно від умов, призводить до утворення солей та амідів (-COONH_4 , -CONH_2 , -CONHR);

г) **реакція декарбоксилювання.** Завдяки цій реакції в клітинах утворюються різноманітні біологічно активні аміни, наприклад гістамін з гістидину, тирамін з тирозину, γ -амінобутанова кислота з глютамінової кислоти. Усі ці сполуки відіграють важливу роль у життєдіяльності клітин.

Властивості, пов'язані винятково з -NH_2 групами:

а) **реакція нейтралізації.** У разі взаємодії з кислотами утворюють солі ($\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$);

б) **реакція амідізації.** У разі взаємодії з карбоновими кислотами утворюють аміди (-NHCOR);

в) **реакція трансамінування.** Каталітична реакція перенесення аміногруп з амінокислот на інші сполуки відіграє значну роль у процесі їх метаболізму в клітинах;

г) **окислювальне деамінування.** Внаслідок цієї реакції утворюються іон амонію -NH_4^+ та О-вмісні похідні кислот.

Послідовність амінокислот і форма молекул протеїнів. Первинна структура протеїнів

Як відомо, протеїни зазвичай складаються із 20 різних амінокислот, кожна з яких має власні специфічні властивості. Кожна амінокислота з'єднується із сусідньою за допомогою міцного ковалентного **пептидного (амідного)** $-\text{CO}-\text{NH}-$ зв'язку (рис. 1).

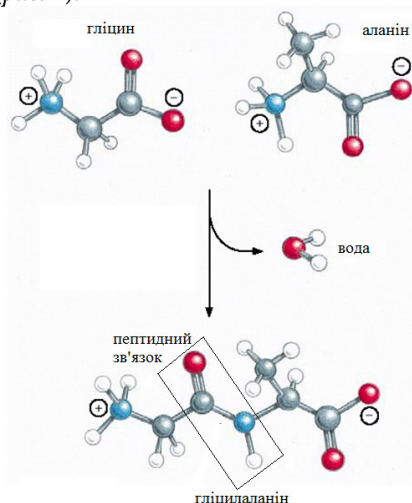


Рис. 1.
Схема утворення
пептидного зв'язку

Цей ковалентний зв'язок утворюється під час взаємодії карбоксильної групи однієї амінокислоти з аміногрупою іншої амінокислоти. Внаслідок такої реакції, що має загальну назву **конденсація**, втрачається молекула води й утворюється пептидний зв'язок. В органічній хімії така реакція точно повторює реакцію **амідізації**, тобто взаємодії між карбоновими кислотами й органічними амінами з утворенням нового класу органічних сполук – **амідів**. Її широко використовують для промислового синтезу окремого класу полімерів – **поліамідів**. Із них виготовляють корпуси приладів, капронові нитки, тканини, навіть штучну оболонку ковбасних виробів. Завдяки назві зв'язку «пептидний» молекули протеїнів іноді називають поліпептидами («полі» означає «багато»). Кожен протеїн має унікальну послідовність амінокислот, що точно відтворюється в кожній його молекулі. Нині відомі тисячі протеїнів, кожен з яких має свою «особливу» послідовність амінокислот, як відбиток пальців у людини.

Повторювана послідовність атомів уздовж молекули поліпептиду має назву **основний**, або **поліпептидний, ланцюг**. До такої регулярної послідовності атомів поліпептидного ланцюга приєднані ті частини амінокислот (бокові групи чи фрагменти), які не беруть участі в утворенні пептидного зв'язку, але надають кожній амінокислоті свої унікальні властивості (різноманіття цих бокових груп звичайно дорівнює кількості амінокислот). Деякі з бокових груп, як відомо, можуть бути неполярними чи полярними, гідрофільними чи гідрофобними, незарядженими чи зарядженими (позитивно і негативно), нереакційними чи реакційноздатними тощо (див. таблицю 1 і класифікацію амінокислот). Кожна молекула протеїну вирізняється послідовністю й кількістю амінокислот. Відповідно, це послідовність хімічно різних бокових груп. У скороченій формі процес утворення ланцюга молекули протеїну можна побачити на *рис. 2*.

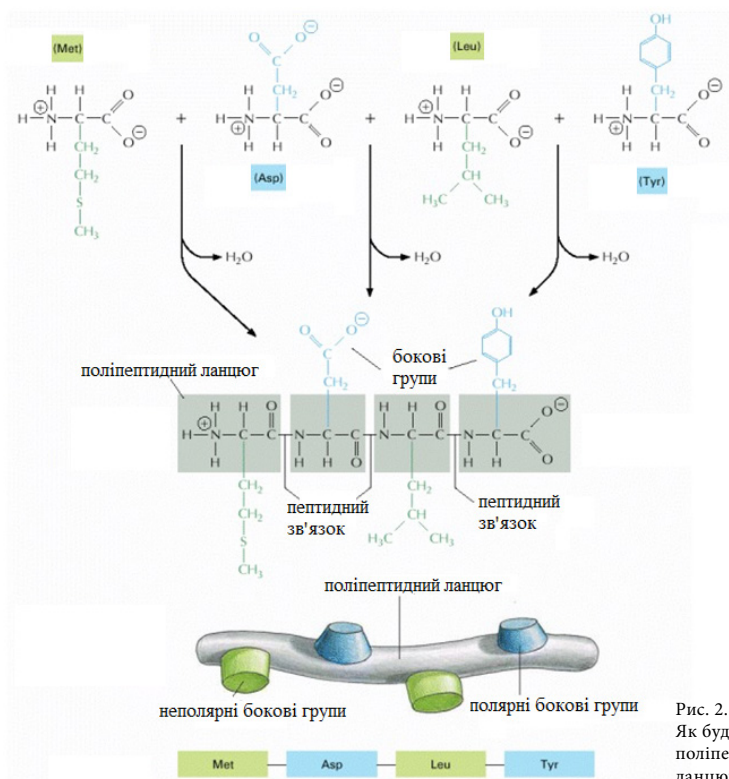


Рис. 2.
Як будується
поліпептидний
ланцюг

Відповідно до теорії будови атомів і молекул усі атоми поведуться майже так, нібито вони є твердими кулями (сферами) з певним радіусом (ван дер Ваальсовий радіус). Сили відштовхування, відсутність взаємного перекриття простору двох окремих атомів значно обмежують можливі кути зв'язку в поліпептидному ланцюгу.

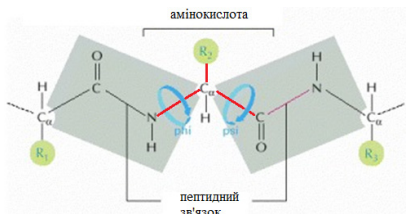


Рис. 3.
Просторова
будова фрагмента
поліпептидного
ланцюга

Просторова будова поліпептидного ланцюга залежить від трьох основних зв'язків (на рис. 3 позначені червоним кольором) кожної амінокислоти. Пептидний зв'язок має плоску будову (на рис. 3 позначені сірим кольором), і групи C=O та NH не здатні обертатися навколо осі цього зв'язку.

Ці та інші просторові (*стеричні*) обмеження суттєво звужують різноманіття можливих розташувань атомів у молекулі протеїну. Та попри перешкоди довгий гнучкий поліпептидний ланцюг молекул протеїнів все одно може обрати будь-який з інших багатьох можливих способів складання.

Додаткові обмеження просторового розміщення ланцюга молекули протеїну зумовлюють безліч нековалентних зв'язків, що утворюються між окремими фрагментами різних частин ланцюга. Такі зв'язки можуть з'являтися як між атомами в основному ланцюгу поліпептиду, так і між атомами бокових фрагментів амінокислот.

До нековалентних зв'язків, що можуть утворюватися в молекулах протеїнів, належать:

- водневі зв'язки (між атомом H, ковалентно зв'язаним з електронегативним атомом, та іншим електронегативним атомом);
- іонні або диполь-дипольні зв'язки (між групами – носіями заряду);
- фізичні ван дер Ваальсові зв'язки (сили ван дер Ваальсового притягання).

Здебільшого нековалентні зв'язки у 30–300 разів слабші, ніж ковалентні зв'язки. Проте їх велика кількість і різноманіття компенсують таку «слабкість» і допомагають міцно утримувати сусідні частини поліпептидного ланцюга в просторі. Отже, стійкість структури кожної складеної частини молекули протеїну визначається загальною міцністю великої кількості таких слабких зв'язків (рис. 4).

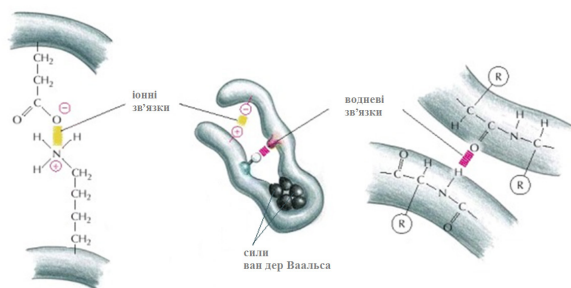


Рис. 4.
Вплив нековалентних зв'язків у формуванні просторової будови молекули протеїну

Гідрофобні взаємодії є ще одним впливовим фактором, що відіграє визначальну роль у просторовій формі молекули протеїну. Гідрофобні частини молекул, зокрема неполярні бокові групи деяких амінокислот, у водному середовищі тримаються разом, щоб мінімізувати руйнівну сольватуючу дію молекул води на водневі, іонні та диполь-дипольні зв'язки між різними частинами поліпептидного ланцюга. Тому дуже важливим фактором, що регулює просторову форму молекули будь-якого протеїну, є розподіл полярних і неполярних амінокислот уздовж усього поліпептидного ланцюга (рис. 5).

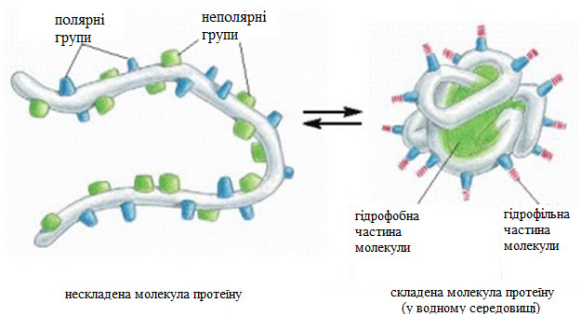


Рис. 5.
Послідовність амінокислотних залишків і форма молекули протеїну

Неполярні (гідрофобні) бокові групи, що входять до складу таких амінокислот, як: фенілаланін, лейцин, валін і триптофан, у складі протеїнів мають тенденцію до групування у внутрішній частині молекули протеїну. Вони утворюють щільно упаковане гідрофобне «ядро» (так само, як маленькі крапельки гідрофобної олії суміщаються одна з одною у воді, утворюючи одну велику краплю). Така особливість дає їм змогу уникати контакту з водою, яка оточує молекули протеїнів, що перебувають усередині біологічного середовища клітини. На відміну від цього полярні бокові групи, що містяться в аргініні, глутаміні, гістидині, розташовуються переважно на зовнішній

частині великої молекули протеїну. Вони утворюють водневі й іонні зв'язки з молекулами води та іншими полярними молекулами, що містяться у водних біологічних середовищах.

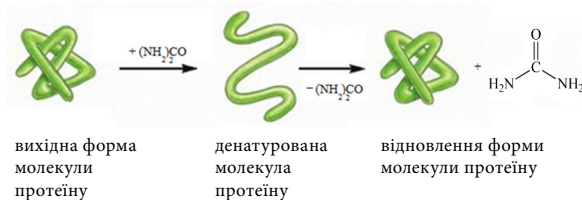
Якщо полярні групи амінокислот розташовані у внутрішньому просторі молекули протеїну, вони зазвичай утворюють водневі зв'язки з полярними групами інших амінокислот або пептидними групами основного ланцюга протеїну, забезпечуючи великій молекулі чітку просторову форму.

Вторинна структура протеїнів (α -спіралі та β -структури)

Унаслідок всіх можливих взаємодій кожен протеїн набуває особливої тривимірної (3D) структури, що визначається порядком амінокислот у його молекулі. Кінцева просторова структура (або **конформація**), якої набув будь-який поліпептидний ланцюг, зазвичай має мінімальну поверхневу енергію¹.

Закономірності складання молекул дослідники вивчали в пробірці з використанням спеціально очищених протеїнів. Найбільш властиву форму молекул протеїнів можна змінити (розгорнути) обробленням розчинниками або іншими сполуками, що здатні зруйнувати нековалентні зв'язки, які утримують складений ланцюг (рис. 6). Таке оброблення призводить до втрати природної форми і перетворює молекулу протеїну на більш гнучкий поліпептидний ланцюг (так звана **денатурація**).

Варто зазначити, що просторова форма молекули протеїну безпосередньо пов'язана з його функціональністю, тому втрата природної форми молекули зумовлює втрату протеїном корисних функцій. Після видалення речовини, що денатурує, поліпептидний ланцюг може «перескладатися», а молекула протеїну здатна знову набутися властивої їй природної форми (це явище має назву **ренатурація**). Така поведінка свідчить про те, що вся «інформація», необхідна протеїну для визначення власної просторової будови, міститься в послідовності розташування залишків амінокислот у його молекулі.



¹ Це означає, що молекула набула найвигіднішої просторової будови (складена найбільш акуратно та зручно відповідно до її амінокислотного складу); для зміни цієї форми потрібно надати молекулі максимальну кількість енергії ззовні (наприклад, нагріти).

Хоча поліпептидний ланцюг може скластися до властивій йому форми (**конформації**) без сторонньої допомоги, в живій клітині в процесі згортання молекули протеїну часто допомагають інші «спеціалізовані» протеїни, що називаються молекулярні **шаперони** (з англ. *chaperon* – супровід). Ці протеїни нековалентно зв'язуються із частково складеними поліпептидними ланцюгами і допомагають їм набути енергетично вигідної форми. Протеїни-шаперони є дуже важливими «помічниками» протеїнів у цитоплазмі клітин, переповненій безліччю різноманітних сполук. Основна функція шаперонів – запобігання безконтрольному з'єднанню тимчасово незв'язаних гідрофобних груп амінокислот щойно синтезованих поліпептидних ланцюгів з утворенням непотрібних агрегатів молекул протеїнів. Оскільки необхідна просторова будова молекул протеїнів визначається лише послідовністю амінокислот, завдяки протеїнам-шаперонам процес складання протеїнів є більш надійним.

Як відомо, молекули протеїнів мають найрізноманітніші форми і містять від 50 до 2000 залишків амінокислот. Великі за розміром молекули протеїнів зазвичай складаються з кількох різних менших за розміром поліпептидних ланцюгів, які іноді можуть синтезуватися незалежно один від одного. Структура будь-якого протеїну достатньо складна, тому для спрощення винайшли кілька різних способів її відображення, кожен з яких підкреслює різні особливості будови протеїну.

Різницю в зображенні особливостей складання поліпептидних ланцюгів протеїнів у тривимірні структури (цей тип структурної організації молекул протеїнів має назву **вторинна структура**) можна побачити на прикладі протеїну триозофосфатізомерази. Цей фермент складається з восьми спіралеподібних конструкцій (**α -спіралей**), розташованих на зовнішній поверхні молекули, і восьми паралельних плоских структур (**β -структур**) у внутрішній частині молекули. Така структура молекули протеїну має назву **$\alpha\beta$ -барель** (від англ. *barrel* – діжка). На *рис. 7* – кілька способів зображення молекул протеїнів:

- ліворуч – «паличкова» модель із зображенням усіх атомів і зв'язків між ними (атоми кожного елемента забарвлені окремим кольором);
- усередині – «спіральна» модель із зображенням елементів вторинної структури – α -спіралей і β -структур (кольором виділені окремі елементи вторинної структури);
- праворуч – «кульова» модель, що ґрунтується на побудові зображення на основі ван дер Ваальсових радіусів атомів.

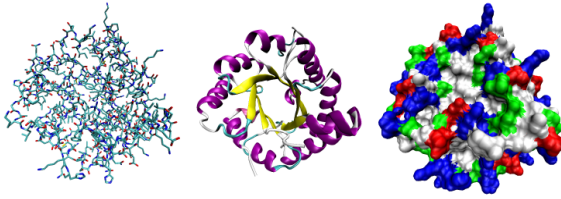


Рис. 7.
Різні способи зображення
просторової будови
молекул протеїнів

Якщо порівняти тривимірну структуру різних молекул протеїнів, стає зрозуміло, що загальна конформація кожного протеїну є унікальною, але в деяких їх частинах зазвичай трапляються обидва типи вторинної структури. Уперше ці особливості помітили під час дослідження протеїнів волосся і шовку.

Перша складчаста структура, яку було відкрито, дістала назву α -спіраль. Цю структуру виявили в будові протеїну α -кератину, який міститься в зовнішньому шарі шкіри (епідермісі) і її похідних, зокрема волосся, нігті і рога. Незабаром після відкриття α -спіралі в протеїні фіброїн, головній складовій шовку, виявили другу складчасту структуру, яку назвали β -структурою. Такі два способи складання поліпептидного ланцюга є найбільш поширеними, оскільки вони утворюються за допомогою водневих зв'язків між групами N-H і C=O поліпептидного ланцюга, не залучаючи бокові полярні групи амінокислот до такого процесу. У результаті α -спіралі та β -структури можуть утворюватися незалежно від порядку розташування і природи амінокислот у молекулі протеїну (рис. 8).

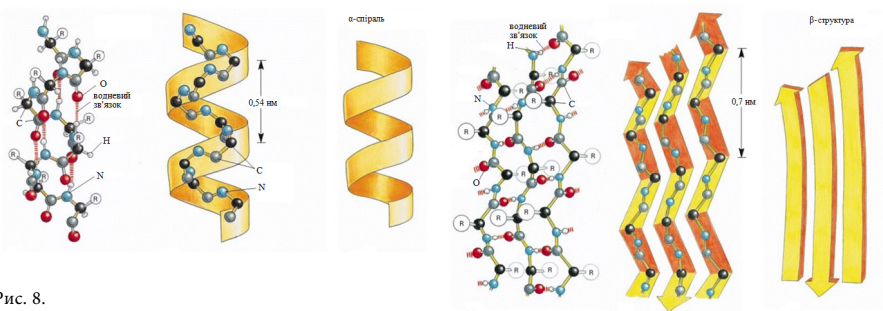


Рис. 8.
Типи структурної організації
поліпептидного ланцюга

Внутрішня частина багатьох протеїнів містить великі ділянки конформації типу β -структури. Як показано на рис. 9, конформація β -структура може утворюватися або із сусідніх поліпептидних ланцюгів, що мають однакову орієнтацію (паралельні ланцюги), або з поліпептидного ланцюга, який згортається назад-вперед подібно до гармошки. Кожна ділянка ланцюга орієнтована в напрямку, протилежному до своїх найближчих «сусідів» (антипаралельні ланцюги). Обидва типи β -структур утворюють дуже жорстку структуру, що складається із сусідніх поліпептидних ланцюгів, з'єднаних водневими зв'язками.

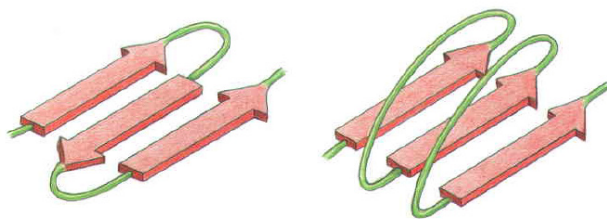


Рис. 9.
Просторова орієнтація
 β -структур у молекулах
протеїнів

Конформація типу α -спіраль утворюється, коли один поліпептидний ланцюг скручується навколо себе, відтворюючи структуру, подібну до жорсткого циліндра (рис. 8). У такому типі складання водневий зв'язок утворюється між кожним четвертим -NH-CO- зв'язком, з'єднуючи C=O групу одного пептидного зв'язку з N-H групою іншого. Механізм з'єднання створює звичайну спіраль, повне коло якої складається із 3,6 амінокислоти (або, якщо перетворити на звичні нам «цілі» молекули – 5 повних витків спіралі утворюються 18 залишками амінокислот). Протеїни, збагачені структурами типу α -спіраль, містяться в клітинних мембранах і є транспортними протеїнами або рецепторами. Наприклад, трансмембранний протеїн перетинає подвійний ліпідний шар мембрани клітини частиною, що має конформацію α -спіралі і складається переважно з амінокислот з неполярними боковими групами. За такої умови гідрофільний поліпептидний ланцюг за допомогою водневих зв'язків сам себе «скручує» в α -спіраль, добре захищену від гідрофобного ліпідного шару навколо протеїну власними неполярними боковими групами.

У деяких інших протеїнах α -спіралі обертаються одна навколо одної, утворюючи стійку структуру, відому як **подвійна спіраль**. Ця структура може утворюватися, коли дві (іноді три) α -спіралі мають більшу частину неполярних бокових груп на одному боці, що сприяє їх скручуванню навколо однієї осі з орієнтацією бокових гідрофобних груп усередину нової складної спіралі (рис. 10).

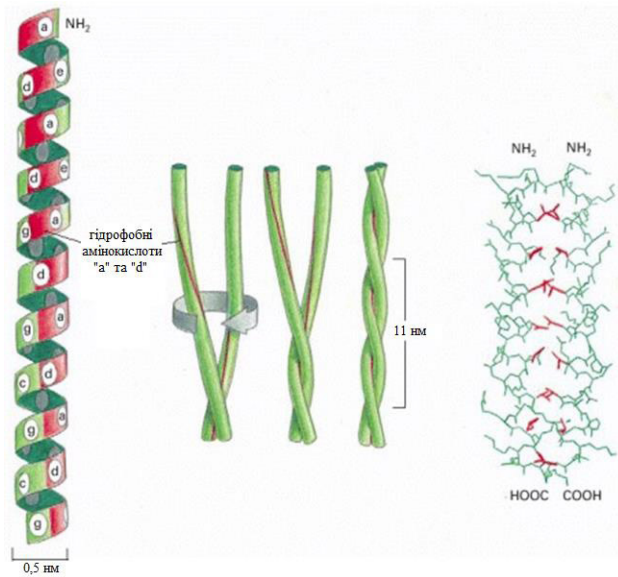


Рис. 10.
Утворення подвійної спіралі з α -спіралей у деяких молекулах протеїнів

Утворені в такий спосіб подвійні спіралі створюють жорстку основу для багатьох протеїнів зі зменшеною жорсткістю поліпептидних ланцюгів. Яскравими прикладами є α -кератин, що утворює внутрішньоклітинні волокноподібні агрегати, які зміцнюють зовнішній шар шкіри та її утворень, і молекули протеїну міозину, які відповідають за скорочення м'язів і надають їм міцності.

Третинна структура протеїнів

Навіть невелика молекула протеїну побудована з тисяч атомів, з'єднаних між собою ковалентними і нековалентними зв'язками, точно орієнтованими в просторі. Таку складну структуру майже неможливо відобразити без тривимірного способу зображення. Сучасні уявлення дають змогу розрізнити чотири рівні структурної організації молекул протеїнів. Про деякі з них ми вже знаємо.

Послідовність амінокислот, з'єднаних між собою поліпептидними зв'язками, відома як **первинна структура** протеїну. Утворення α -спіралей і β -структур окремими ділянками поліпептидного ланцюга є **вторинною структурою** протеїну.

Переходячи на новий рівень розуміння просторової будови протеїнів, маємо знати, що просторова організація всього поліпептидного ланцюга молекули протеїну називається **третинна структура** протеїну. Дослідження конформації, функціональності й еволюції протеїнів виявили ще одну структурну одиницю. Вона розкриває особливість будови певної частини молекули протеїну і перебуває окремо від зазначених типів структурної організації. Така структурна одиниця має назву **домен**. Її може утворювати будь-яка частина поліпептидного ланцюга, здатна самостійно складатися в компакту стійку структуру незалежно від інших частин поліпептидного ланцюга цієї молекули. Домен зазвичай містить від 40 до 350 залишків амінокислот і є модульною одиницею, з якої можна побудувати багато інших протеїнів. Або: модульна одиниця – частина конструктора, що є основним елементом конструкції різних іграшок (рис. 11). Ну що, так простіше?

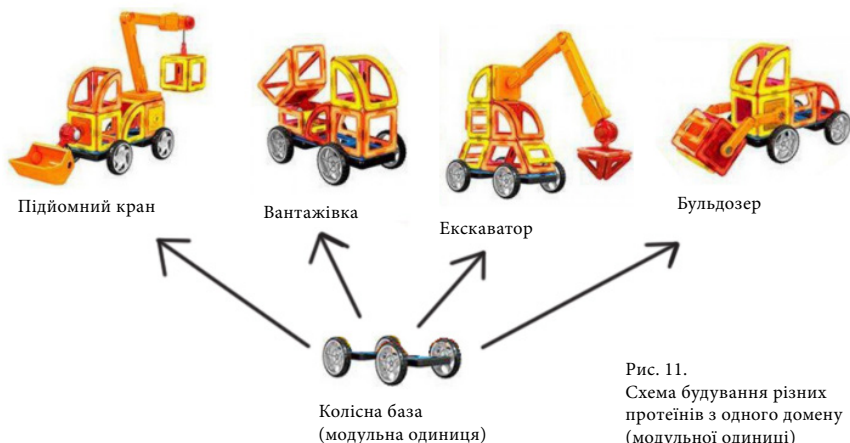


Рис. 11.
Схема будування різних
протеїнів з одного домену
(модульної одиниці)

Різні домени протеїну часто виконують різні функції. Наприклад, структура протеїнкінази (фермент, що приєднує залишок ортофосфатної кислоти до інших протеїнів) містить чотири домени. Великий і малий домени протеїнкінази мають каталітичну активність, а домени SH2 і SH3 виконують регуляторну роль – впливають на каталітичну активність (підвищують або знижують її у разі потреби) перших двох доменів ферменту (рис. 12).

Невеликі за розміром протеїни містять лише один домен. Великі протеїни можуть містити десятки доменів, з'єднаних один з одним переважно короткими і майже неструктурованими ділянками поліпептидного ланцюга. На рис. 13 – приклади будови трьох різних доменів. Центральне ядро домену

протеїну може бути побудоване з α -спіралей, β -структур або їх комбінацій. Нині детально вивчено майже 1000 комбінацій доменних структур протеїнів, що утворюють близько 10 000 різнофункціональних протеїнів.

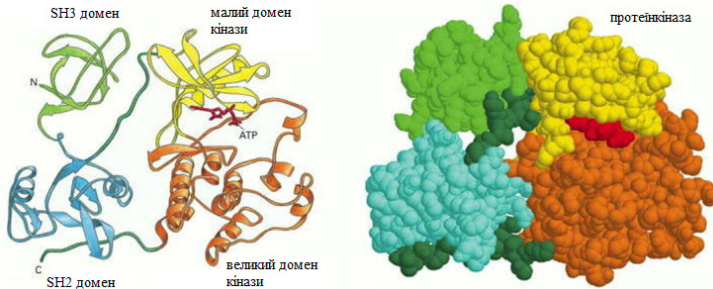


Рис. 12.
Доменна
структура
протеїну
кінрази

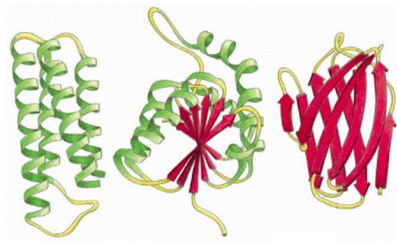


Рис. 13.
Просторова будова
різних доменів

Еволюція протеїнів

Як ми вже знаємо, для побудови протеїнів слугує 20 амінокислот. Кожна з них має власну будову і властивості. Безліч протеїнів створюється великою кількістю варіантів поєднання таких амінокислот в одній поліпептидній молекулі. Наприклад, для побудованого лише із чотирьох амінокислот пептидного ланцюга можливі 160 000 (20^4) різних комбінацій послідовності амінокислот. Коли поліпептидний ланцюг складається з n -ї кількості амінокислот, можливі 20^n комбінацій. Молекула «типового» протеїну містить близько 300 залишків амінокислот. Тому теоретична кількість комбінацій послідовностей амінокислот, якими може бути побудований такий протеїн, є 20^{300} .

Якщо маєте бажання, можете спробувати відобразити таке число в зошиті. Проте не марнуйте час і зусилля! На утворення всіх варіантів молекул такого протеїну не вистачить атомів у Всесвіті!

Реалізація всіх можливих варіантів з огляду на практичне значення не потрібна. Лише крихітна частина від великої кількості поліпептидних ланцюгів може набувати стабільних тривимірних конформацій (за деякими підрахунками – менше ніж одна з мільярда). Водночас усі конформації матимуть зовсім різні хімічні властивості. Отже, всі протеїни, що є в клітинах, унікальні й кожен з них має одну стабільну конформацію.

За якої умови це можливо? Відповідь дає відпрацьований механізм еволюції – природний відбір. Не потрібні глибокі знання, щоб зрозуміти, що протеїни з їх непередбачуваною структурою й хімічною активністю не допоможуть функціонувати та виживати такому складному природному об'єкту, як жива клітина. Ці протеїни усуваються природним відбором.

Унаслідок тривалого процесу еволюції молекула протеїну отримала таку послідовність амінокислот, яка дає змогу ланцюгу набувати лише одну стійку конформацію. Завдяки їй протеїн виконує чітко визначені каталітичні, структурні та інші «обов'язки» всередині клітини. Протеїни побудовані настільки ідеально, що зміна навіть кількох атомів в одній амінокислоті може призвести до руйнування структури протеїну та втрати властивостей.

Отже, кожен протеїн має стійку тривимірну структуру, характерні властивості. Та це не означає, що процес «розвитку» молекули протеїну завершений. Упродовж подальшої еволюції його структура і властивості далі можуть частково змінюватися й набувати нових функцій, якщо це потрібно для кращого функціонування живої клітини. У минулому такий процес відбувався доволі часто, тому на сьогодні існує багато протеїнів, які поєднують у родини, де кожен протеїн має схожі і послідовність амінокислот, і тривимірну структуру.

Для кращого розуміння розглянемо велику родину протеїнів – серинові протеази. Ця група протеолітичних (таких, що розщеплюють) протеїнів охоплює травні ферменти хімотрипсин, трипсин, еластазу і кілька протеаз, що беруть участь у процесі зсідання крові. Порівнюючи будь-які із цих ферментів, виявляємо, що деякі ділянки їх амінокислотних послідовностей збігаються. Схожість їх тривимірних конформацій ще більше вражає – більшість складок і поворотів у поліпептидних ланцюгах, що містять кілька сотень амінокислотних залишків, практично однакові (рис. 14). Утім, всі ці протеази мають різні хімічні властивості (ферментативну активність), розщеплюють різні протеїни або пептидні зв'язки між різними амінокислотами. Тому кожен фермент виконує в організмі власну функцію.

Цей яскравий приклад – не виняток. Те саме повторюється для сотень інших родин протеїнів. У багатьох випадках у послідовності амінокислот може бути значно більша різниця. Тому, щоб дійти остаточного висновку про приналежність протеїну до родини, потрібно порівнювати їх тривимірну структуру.

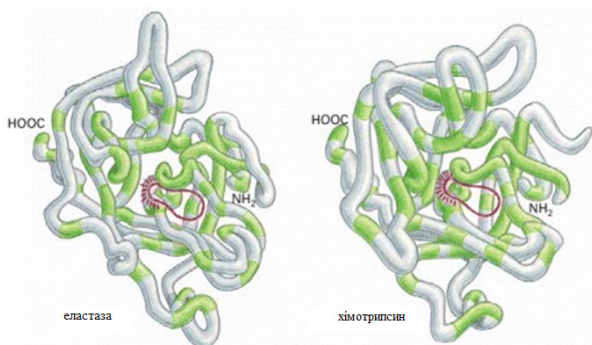


Рис. 14.
Просторова будова протеїнів
різної функціональності

Різні члени великих родин протеїнів часто виконують різні функції. Зміни у структурі або послідовності амінокислот, через які члени однієї родини іноді бувають несхожі, є наслідком еволюції, що корисно змінила їх біохімічну активність. Однак багато інших подібних змін виявилися і не корисними, і не шкідливими для структури та властивостей протеїнів. Варто пам'ятати, що зміна структури протеїнів, яку називають мутацією, є процесом випадковим. Упродовж тривалої еволюції мало статися й багато шкідливих змін, що небажано змінювали тривимірну структуру молекул протеїнів. Такі «пошкоджені» протеїни ставали непридатними для виконання потрібних клітині функцій, і клітина «видаляла» їх із життєвого циклу як непотрібні.

Четвертинна структура протеїнів. Будова протеїнів великого розміру

Слабкі нековалентні зв'язки, завдяки яким поліпептидний ланцюг складається в потрібну тривимірну конформацію, також дають змогу протеїнам з'єднуватися між собою й утворювати масивні клітинні комплекси. Будь-яка ділянка поверхні молекули протеїну, що може взаємодіяти й міцно з'єднуватися з іншою молекулою за допомогою нековалентних зв'язків, називається **сайт зв'язування**. Протеїн може містити сайти зв'язування і для великих, і для малих молекул. Якщо сайт зв'язування розпізнає поверхню іншого протеїну, міцне зв'язування цих двох поліпептидних ланцюгів утворює більшу за розміром молекулу нового протеїну з точно визначеною формою. Кожен поліпептидний ланцюг у такому протеїні має назву **протеїнова субодинаця**. Отже, якщо молекула протеїну утворена більш ніж одним поліпептидним ланцюгом, це **четвертинна структура** протеїну.

У найпростішому випадку два однакових з'єднаних між собою поліпептидних ланцюги розташовані один відносно одного за схемою «**голова до голови**», або «**гвбаабвг**». Так утворюється **димер** – симетричний комплекс із двох протеїнових субодиниць, що міцно тримаються разом завдяки взаємодії між двома однаковими сайтами зв'язування. **Сро-репресор** (**репресорний** – такий, що пригнічує) – протеїн, що зв'язується з ДНК, – має саме таку димерну будову. Це один з багатьох інших симетричних комплексів протеїнів такого типу, утворених із безлічі копій поліпептидного ланцюга певного типу, що зазвичай містяться в кожній живій клітині.

Фермент нейрамінідаза складається із чотирьох однакових протеїнових субодиниць. Кожна з'єднана з наступною за схемою «**голова до хвоста**» («**абвгабвг**»), створюючи замкнене кільце. Багато протеїнів у клітинах містять два або більше типів поліпептидних ланцюгів.

Гемоглобін – протеїн, що виконує функцію носія O_2 в клітинах крові еритроцитах, є добре вивченим прикладом таких протеїнових комплексів. Він складається із двох однакових субодиниць α -глобіну і двох однакових субодиниць β -глобіну, симетрично розташованих одна до одної. Такі протеїни, що містять кілька різних субодиниць, дуже поширені в клітинах і можуть бути великими за розмірами. На *рис. 15* наведені описані вище приклади протеїнів, що містять кілька субодиниць.

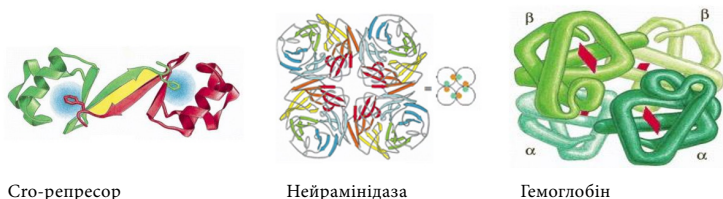


Рис. 15.
Протеїни,
побудовані
з декількох
субодиниць

Далі зображені декілька прикладів протеїнів, точні просторові структури яких уже добре відомі. Можна порівняти їх розміри, форму та складність структури (*рис. 16*). Спробуємо визначити важливість кожного з протеїнів, що, можливо, ще не відомі вам.

SH2 домен – частина вже відомого нам ферменту протеїнкінази (*рис. 12*).

Лізоцим – фермент, що має сильні антимікробні властивості, адже здатен руйнувати пептидоглікан – основну складову стінок деяких грам-позитивних патогенних бактерій.

Каталаза – фермент, який каталізує реакцію розкладу гідроген пероксиду (на H_2O й O_2), що утворюється в процесі біологічного окиснення. Він також окиснює низькомолекулярні спирти й іони NO_2^- за наявності H_2O_2 .

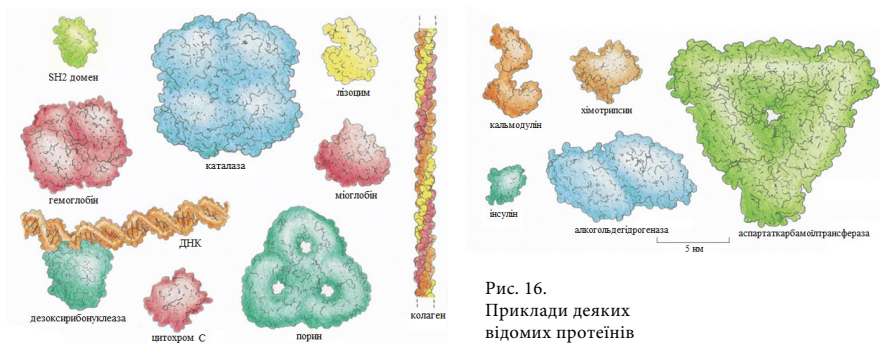


Рис. 16.
Приклади деяких
відомих протеїнів

Гемоглобін – протеїн червоних клітин крові – еритроцитів. Зв’язує молекули O_2 в легенях, переносить їх до тканин організму, транспортує молекули CO_2 у зворотний бік – від тканин до легень для їх видалення.

Міоглобін – протеїн скелетних і серцевих м’язів, що зв’язує й утримує O_2 , створюючи запаси і вивільняючи його за умови тимчасової нестачі.

Дезоксирибонуклеаза – фермент, що гідролізує фосфодіестерні зв’язки в молекулі ДНК.

Колаген – основна складова з’єднувальної тканини. Надає їй міцності й еластичності.

Цитохром С – носій електрона в окисно-відновних процесах дихання клітин. У разі потреби здатен активувати **апоптоз** (програмовану загибель) клітин.

Порин – мембранний протеїн, що утворює в мембрані клітини пороподібні структури, крізь які в клітину можуть потрапляти різні молекули, необхідні для її життєдіяльності.

Кальмодулін – один із протеїнів-носіїв іонів Ca^{2+} . Він не має власної каталітичної активності, але як субодиниця входить до складу багатьох ферментів, зокрема протеїнкінази.

Хімотрипсин – фермент, що каталізує реакцію гідролізу пептидних зв’язків у молекулах протеїнів. Найбільш ефективно розриває зв’язки поблизу ароматичних амінокислот – тирозину, триптофану, фенілаланіну.

Інсулін – гормон-протеїн, що активує ферменти, відповідальні за перетворення цукру та зниження рівня глюкози в крові.

Алкогольдегідрогеназа – фермент, що каталізує реакцію окиснення спиртів й ацеталей до альдегідів і кетонів.

Аспартаткарбомойлтрансфераза – каталізує одну з реакцій синтезу піримідинових нуклеотидів, що є складовими для синтезу ДНК.

Протеїни зі структурою довгих спіральних ниток

Деякі молекули протеїнів здатні з'єднуватися, утворюючи ниткоподібні структури, що можуть простягатися уздовж усієї клітини. Найпростіше довгий ланцюг з однакових молекул протеїну може бути побудований, якщо кожна молекула має щонайменше два сайти зв'язування з різних боків молекули, що є комплементарними один до одного (взаємно доповнюють один одного), як елементи пазла (рис. 17).

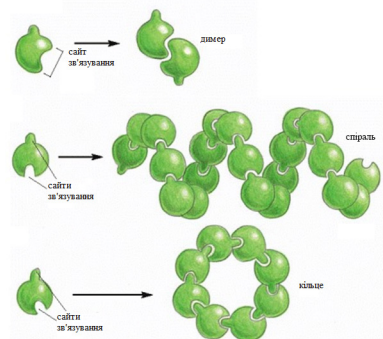


Рис. 17.
Утворення комплексів протеїнів
за участю сайтів зв'язування

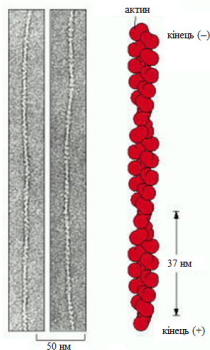


Рис. 18.
Структурування
волокон актину



Рис. 19.
Лівобічна і правобічна
спіралі протеїнів

Прикладом є актинова нитка, зображена на рис. 18. Це довга спіральна структура, яка утворюється з багатьох молекул протеїну актину – одного з протеїнів клітин еукаріотів, що виконує зміцнювальну функцію в цитоскелеті.

Чому саме структура спіралі так поширена в природі?

Як бачимо, біологічні структури часто утворюються шляхом з'єднання дуже схожих елементів – амінокислот або молекул протеїнів – у довгі ланцюги з елементів, що повторюються. Якщо всі елементи «конструктора» подібні, сусідні структурні елементи в ланцюзі з'єднуються так, щоб максимально зменшити вільну енергію між ними. Внаслідок чого кожна наступна структурна одиниця розміщується вздовж усього ланцюга точно так само щодо попередньої. Оскільки такі елементи дуже рідко з'єднуються прямою лінією, вони зазвичай розміщуються у формі спіралі. Залежно від напрямку обертання витків спіраль може бути лівою або правою (рис. 19). Усі відомі α -спіралі протеїнів є правими. Кількість елементів спіралі, що утворюють повний виток, може відрізнятися, бо залежить від структурних особливостей «цеглинок» (розмірів, щільності з'єднання).

Спіральні структури поширені в біологічних системах. Вони можуть утворюватися невеликими молекулами, зв'язаними ковалентними зв'язками (амінокислоти в α -спіралі протеїну) і великими молекулами протеїнів, з'єднаними нековалентними взаємодіями (молекули актину в актинових нитках). І це не дивно! Спіраль – це типова структура, що утворюється завдяки розміщенню багатьох подібних за структурою фрагментів у чітко повторюваному порядку.

Фібрилярні (волоконноподібні) протеїни

Переважна більшість протеїнів, з якими ми ознайомилися, є **глобулярними** (кулькоподібними). У них поліпептидний ланцюг складений у компактну сферичну структуру з неправильною (дуже нерівною) поверхнею. Ферменти зазвичай є глобулярними протеїнами і мають форму сфери, попри те, що іноді мають великі розміри і складну будову з багатьма субодинаціями (рис. 16). Деякі протеїни, що виконують інші функції і потребують постійної міграції в межах живої клітини, мають простішу видовжену тривимірну структуру. Їх позначають терміном **фібрилярні протеїни**.

До однієї з великих родин внутрішньоклітинних фібрилярних протеїнів належить α -кератин і подібний до нього, але менш відомий, колаген. Кератинові фібрили надзвичайно стійкі. Вони є головною складовою в протеїновмісних структурах «тривалої експлуатації» – волосся, рогах, нігтях. Молекула α -кератину – це димер двох однакових субодинаць, довгі α -спіралі яких обгорнуті одна навколо одної. Із кінців ця подвійна спіраль обмежена глобулярними доменами, що містять вільний сайт зв'язування. Завдяки цьому кератин збирається у великі за розміром агрегати, за формою схожі на мотузку, – важливу складову цитоскелета клітин, що надає їм форму і дає змогу її зберігати.

Фібрилярні протеїни найбільш поширені поза межами живих клітин, де є основним компонентом желеподібного екстрацелюлярного (з англ. *extracellular* – позаклітинний) матриксу, що зв'язує різні клітини до купи, утворюючи живі тканини. Екстрацелюлярні протеїни продукуються клітинами і виділяються в позаклітинне біологічне середовище, де часто збираються в пластинкоподібні агрегати чи довгі волокна.

Колаген – найбільш поширений з таких протеїнів у тканинах тварин. Молекула колагену складається з трьох довгих поліпептидних ланцюгів, у кожній третій позиції амінокислотної послідовності яких міститься неполярна амінокислота гліцин. Така регулярна структура дає змогу обертатися ланцюгам один навколо одного, утворюючи довгу потрійну спіраль правильної структури (рис. 20). Велика кількість молекул колагену потім з'єднується між собою боковими і торцевими частинами й утворює дов-

гі, надзвичайно жорсткі структури. Вони називаються колагеновими фібрилами й відповідають за міцність живих тканин.

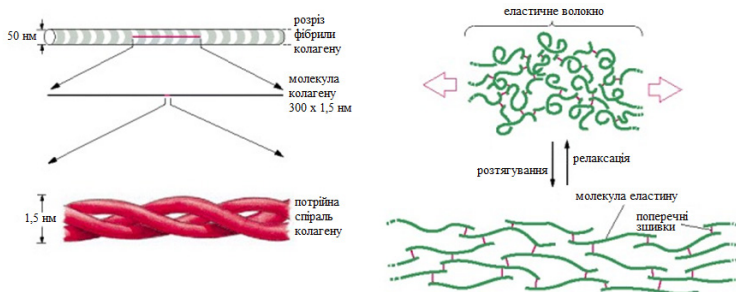


Рис. 20.

Приклади деяких фібрилярних протеїнів екстрацелюлярного матриксу

Згадаємо про ще один фібрилярний протеїн екстрацелюлярного матриксу – еластин. Молекули еластину утворюються з відносно неструктурованих поліпептидних ланцюгів, які ковалентно зв'язуються в гумоподібну еластичну сітку (рис. 20). На відміну від більшості інших протеїнів ланцюги еластину майже не мають однозначно визначеної структури, але здатні зворотно змінювати конформацію. Ці еластичні волокна дають змогу шкірі та іншим тканинам (артерій, легенів) розтягуватися і стискатися без незворотних пошкоджень (розривів).

Особливості хімічної будови екстрацелюлярних протеїнів

Більшість екстрацелюлярних протеїнів або приєднані до зовнішньої частини плазматичної мембрани клітини, або **секретуються** (виділяються) в екстрацелюлярний матрикс. На всі такі протеїни впливають умови екстрацелюлярного матриксу. Для підтримувannya стабільності тривимірної структури поліпептидні ланцюги таких протеїнів часто стабілізовані ковалентними поперечними зв'язками. Такі зв'язки можуть або зв'язувати дві амінокислоти в одному поліпептидному ланцюгу, або з'єднувати поліпептидні ланцюги окремих субодиниць протеїну. У протеїнах найбільш поширеними поперечними зв'язками є ковалентні дисульфідні S-S-зв'язки (рис. 21). Вони утворюються, коли протеїн вже готовий до вивільнення в позаклітинний простір. Дисульфідні зв'язки утворюються під час з'єднання двох бокових -SH груп цистеїну за рахунок реакції, яку каталізує спеціальний фермент в ендоплазматичному ретикулумі клітини.

Дисульфідні зв'язки не змінюють конформацію молекули протеїну, але забезпечують зміцнення тривимірної структури його молекули. Наприклад, лізоцим – фермент, що міститься в слизах і розчиняє клітинну стінку бacte-

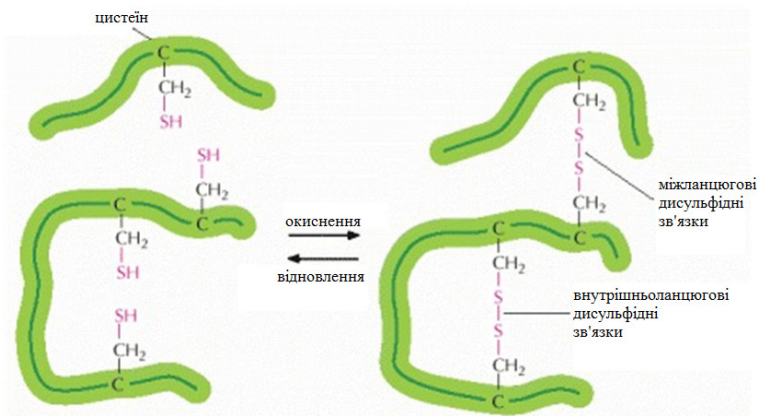


Рис. 21.
Принципи стабілізації структури екстрацелюлярних протеїнів

рій, здатен тривалий час зберігати власну протимікробну активність унаслідок стабілізації структури молекули дисульфідними поперечними зв'язками.

Дисульфідні зв'язки зазвичай не утворюються в клітинному цитозолі. Цьому перешкоджає висока концентрація відновлювальних речовин, що здатні перетворювати S-S-зв'язки на тиольні (-SH) групи цистеїну. Можна припустити, що молекулам протеїнів не потрібне додаткове зміцнення просторової будови усередині клітини, де вони захищені від впливу зовнішнього середовища.

Основні функції протеїнів

Протеїни виконують багато різних функцій, кожна з яких є важливою для правильного функціонування живих клітин і організму. Спробуємо визначити основні функції, що їх виконує численна кількість типів протеїнів, які безперервно допомагають нам у складних процесах життєдіяльності.

1. **Структурна** – деякі протеїни беруть участь в утворенні багатьох клітинних складових. Разом з ліпідами входять до складу клітинних мембран.

2. **Каталітична** – усі біокатализатори-ферменти за будовою є протеїнами.

3. **Транспортна** – гемоглобін і міоглобін у складі клітин крові транспортують кисень у різних тканинах. Інші транспортні протеїни утворюють комплекси з ліпідами і переносять їх кров'ю і лімфою.

4. **Механохімічна** – м'язова робота в організмі виконується за участю спеціальних скорочувальних протеїнів (актин, міозин) з використанням енергії хімічних зв'язків, яку накопичує організм (АТФ).

5. **Регуляторна** – гормони та інші біологічно активні речовини (інсулін, адренокортикотропний гормон) за своєю хімічною природою є протеїнами.

6. **Захисна** – антитіла (імуноглобуліни) є протеїнами. До складу шкіри входить протеїн колаген, волосся – кератин. Шкіра, волосся захищають внутрішнє середовище організму від зовнішнього небажаного впливу. До складу слизу й синовіальної рідини (густа еластична маса, що заповнює порожнину суглобів) входять мукопротеїди.

7. **Опорна** – сухожилля, поверхня суглобів, з'єднання кісток переважно утворені протеїнами (колаген, еластин).

8. **Енергетична** – амінокислоти протеїнів можуть брати участь у реакції гліколізу, що забезпечує клітини енергією.

9. **Сигнальна** – багато протеїнів беруть участь у процесах вибіркового впізнавання, тобто під дією зовнішнього впливу (хімічного, температурного, електричного тощо) ці протеїни зворотно змінюють власну третинну структуру, що сприймається клітиною як сигнал діяти.

Протеїни як частини масивних надмолекулярних структур

Ті самі принципи, що дають змогу окремим ділянкам молекули протеїну асоціюватися, утворюючи глобулярні або фібрилярні структури, діють також під час створення набагато більших за розміром клітинних об'єктів – надмолекулярних структур. Це, зокрема, ферментні комплекси, рибосоми, протеїнові фібрили, мембрани, віруси. Ці гігантські, порівняно з атомами й молекулами, об'єкти не зібрані як одна велика конструкція з ковалентно зв'язаних окремих молекул. Вони утворюються складанням багатьох різних протеїнових молекул-субодиниць в єдину конструкцію завдяки міжмолекулярним нековалентним зв'язкам (принцип **самоорганізації**). Використання невеликих субодиниць протеїнів для побудови великих структур має низку переваг:

1. Велика структура, побудована з однієї або кількох повторюваних менших субодиниць, потребує зберігання невеликої кількості генетичної інформації.

2. Деякі зворотні процеси можуть легко керувати і збиранням, і розбиранням такої структури, оскільки субодиниці з'єднані за допомогою зв'язків низької енергії.

3. Помилки у будівництві великої структури можна легко уникнути власними механізмами, що прибирають дефектні субодиниці в процесі збирання складної структури з багатьох молекул.

Проте як зміна будови чи поява дефектів у субодиницях впливає на кінцевий результат? Подивимося на *рис. 22*. Деякі субодиниці протеїну

збираються в плоскі структури, в яких субодиниці-глобули розташовані у структури гексагональної форми. У ліпідних шарах спеціалізовані мембранні протеїни іноді розташовані саме в такий спосіб. За незначної зміни геометрії окремих субодиниць планарні структури, зібрані із шестикутних елементів, можуть перетворюватися на трубчасті структури. За більшої кількості змін – на порожню сферу.

Щось нагадує така форма? Трубчасті і сферичні структури здатні обгорта-ти та зв'язувати специфічні молекули РНК і ДНК, утворювати оболонки відомих нам вірусоподібних частинок і вірусів.

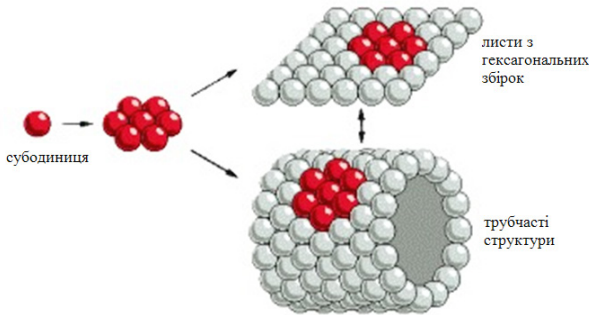


Рис. 22.
Самоорганізація протеїнів
у надмолекулярні
структури

Утворення таких закритих молекулярних конструкцій, як кільця, трубки чи сфери забезпечує додаткову стабілізацію просторової структури внаслідок збільшення кількості зв'язків між протеїновими субодиницями. Та оскільки структура створюється винятково взаємозалежними спільними взаємодіями між субодиницями, її можна спонукати до збирання чи розбирання порівняно невеликими зусиллями, впливаючи на кожну субодиницю окремо.

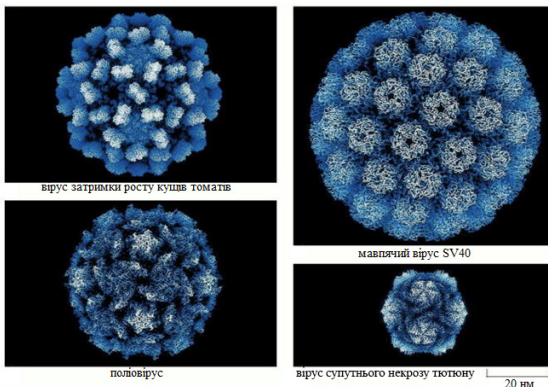


Рис. 23.
Зображення різних
вірусних частинок

Ці принципи самоорганізації молекул яскраво проілюстровані в протеїно-вій оболонці (капсиді) багатьох простих вірусів, що мають форму порожньої сфери (рис. 23). Капсид часто складається з багатьох однакових протеїнових субодиниць, що вкривають і захищають нуклеїнову кислоту вірусу (рис. 24). Протеїни в такому капсиді повинні мати особливо пристосовану структуру, завдяки якій спроможні:

- створювати кілька різних видів зв'язків для побудови сферичної оболонки;
- надавати конструкції властивість вивільняти нуклеїнову кислоту та інші складові вірусної частинки, щоб ініціювати реплікацію вірусу (про-дукування власних копій), щойно вірус потрапить у клітину-мішень.

У багатьох вірусів ідентичні протеїнові субодиниці збираються разом, щоб створити сферичну оболонку, яка закриває власний вірусний геном, складений з РНК або ДНК. Із геометричних міркувань для точного відтворення симетричної оболонки потрібно зібрати разом не більше ніж 60 однакових субодиниць. Якщо допустити невеликі дефекти у структурі, можна використати більшу кількість субодиниць і побудувати більший капсид. Наприклад, вірус затримання росту кущів томатів (TBSV), показаний на рис. 23, має сферичну форму з діаметром близько 33 нм. Він утворюється з 180 однакових капсид-

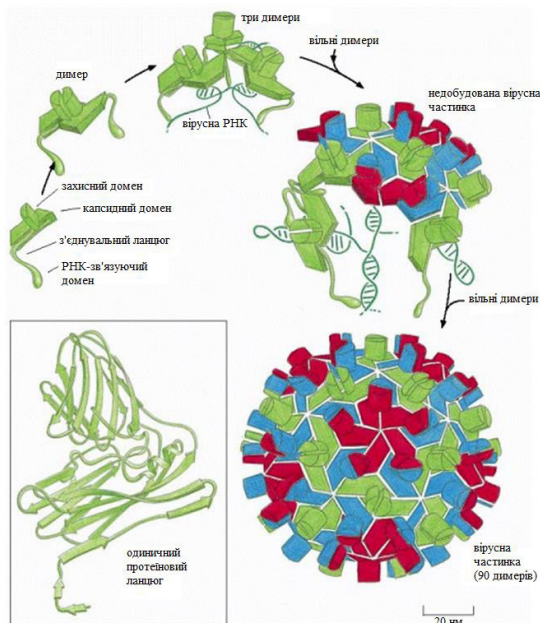


Рис. 24.
«Конструювання» вірусної частинки з протеїнових субодиниць

них протеїнових субодиниць, кожна з яких містить 386 амінокислот, і геному РНК, побудованого із 4500 нуклеотидів. Щоб сконструювати такий великий капсид, кожен протеїн повинен мати таку структуру, щоби вбудовуватися в різні ділянки поверхневого шару капсиду (на *рис. 24* ці три форми субодиниці забарвлені різними кольорами).

Наостанок розглянемо загальну будову горезвісного вірусу SARS-CoV2, що спричинив спалах пандемії COVID-19 наприкінці 2019 року. Структура цього вірусу містить багато різноманітних протеїнів, кожен з яких виконує певну функцію, забезпечує швидке проникнення в клітину та розмноження. На *рис. 25* зображена фотографія вірусу SARS-CoV2, зроблена за допомогою електронного мікроскопа (ліворуч), схематичне зображення його будови (праворуч) і фотографія моменту проникнення вірусів крізь клітинну мембрану.

З яких протеїнів складається SARS-CoV2? [3; 5–6]

Глікопротеїн S, що є тримером за будовою, складається з трьох поліпептидних ланцюгів, має форму грибків на поверхні вірусної частинки та відповідає за його зв'язування з клітиною-мішенню.

Мембранний протеїн М складається з трьох трансмембранних доменів, відповідає за збереження форми та кривизни поверхні вірусної частинки,

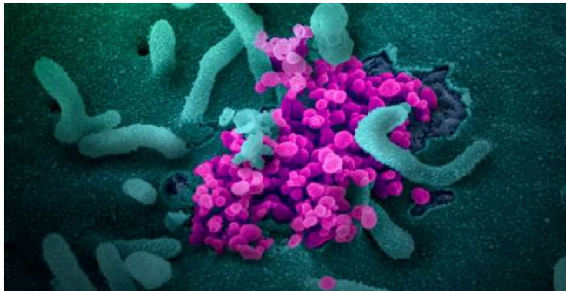
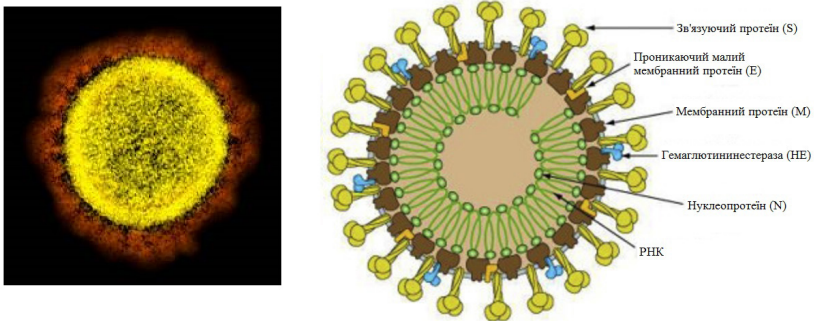


Рис. 25.
Мікрофотографія
(верх, ліворуч), будова
(верх, праворуч) і момент
проникнення в клітину
вірусу SARS-CoV2

а також підтримує внутрішню структуру вірусу за допомогою нековалентних зв'язків.

Малий мембранний протеїн Е теж виконує структуроутворювальну функцію в капсиді, бере участь у проникненні крізь мембрану клітини-мішені.

Нуклеопротеїн N складається із двох доменів, кожен з яких зв'язаний з РНК вірусу. Разом з мембранним протеїном М забезпечує просторову будову внутрішньої частини вірусу.

Отже, малі вірусні частинки зібрані з багатьох молекул, переважно протеїнової природи. Їхня хімічна структура забезпечує неповторний спосіб їх збирання та подальшого функціонування, завдяки чому це невидиме для неозброєного ока творіння природи стає унікальним.

Протеїни заслужено отримали свою назву, адже на них покладено першочергові функції забезпечення існування життя. І хоча на сьогодні ми знаємо практично все про хімічний склад, особливості будови молекул і надмолекулярних структур, хімічні властивості, а також функції протеїнів, створити будь-який з добре вивчених протеїнів за допомогою методів традиційної хімії, якими людина впевнено володіє уже багато років, досі неможливо. І це вкотре підтверджують недосяжний рівень розвитку природи й унікальність об'єктів, які вона створює!

Для укладання розділу використані матеріали з таких джерел:

1. Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. 4-th edition. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
2. STAT's most memorable photos of 2020. URL: <https://www.statnews.com/2020> (дата звернення: 21.09.2020).
3. Mousavizadeh L., Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2021. Vol. 54. Iss. 2. Pp. 159–163.
4. Experts discuss COVID-19 and ways to prevent spread of disease. URL: <https://hub.jhu.edu/2020/03/17/coronavirus-virology-vaccine-social-distancing-update> (дата звернення: 23.09.2020).
5. Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 2020. Vol. 92. Iss. 4. P. 418–423.
6. Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19) / M. Cascella et al. Florida : StatPearls Publishing, 2020. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> (дата звернення: 23.09.2020).

ВИДІЛЕННЯ, ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ

Лабораторна робота 1

Протеїни рослинного і тваринного походження. Методи виділення та приготування зразків для досліджень

Важливо!

Розчини протеїнів є нестабільні і можуть зберігатися протягом двох-трьох днів. Найбільш нестійкими є розчини протеїнів м'яса.

Термін зберігання розчинів можна подовжити на один-два дні, додавши одну краплю метилбензолу.

Розчини міозину (глобуліну м'яса) і казеїну є найбільш концентрованими, а розчини протеїнів рослин і водорозчинних протеїнів молока – найбільш розведеними.

Для деяких досліджень лужні розчини протеїнів потрібно нейтралізувати до появи опалесценції або слабокислої реакції розчину.

А. Альбумін курячого яйця

Посуд і обладнання:

Колба конічна 500 мл з корком	1 шт.
Колба конічна 200 мл	1 шт.
Стакан хімічний 50 або 100 мл	2 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Полотняна тканина 10 × 10 см	

Реактиви:

Куряче яйце
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Обережно відокремити білок від жовтка.
2. Білок одного курячого яйця (приблизно 25 мл) помістити в колбу на 500 мл, додати 100 мл дистильованої води, закрити корком і ретельно перемішати, енергійно струшуючи колбу.
3. Отриману суміш відфільтрувати крізь полотняну тканину (тканина має бути чистою, без будь-яких забруднень).

4. Унаслідок фільтрування отримуєте фільтрат – розчин яєчного альбуміну з невеликими домішками глобуліну, що має легку опалесценцію. На фільтрі залишиться основна частина яєчного глобуліну, а також згустки та плівки.
5. Фільтрат, що містить альбумін курячого яйця, далі використовують для проведення експериментів.

Б. Протеїни м'яса

1. Альбумін м'яса

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	1 шт.
Стакан хімічний 100 мл	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	

Реактиви:

Свіже нежирне м'ясо, подрібнене на м'ясорубці
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Зважити у стакані 25 г добре подрібненого свіжого м'яса (фаршу).
2. Додати 50 мл дистильованої води.
3. Витримати суміш 20–30 хв, час від часу перемішуючи скляною паличкою.
4. Відфільтрувати суміш за допомогою паперового фільтра.
5. Отриманий фільтрат містить альбумін з невеликими домішками глобуліну. Присутність пігментів крові надає фільтрату червоного кольору, який не заважатиме подальшим дослідженням.

2. Глобулін м'яса

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	1 шт.
Стакан хімічний 100 мл	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	

Реактиви:

Свіже нежирне м'ясо, подрібнене на м'ясорубці
Амоній хлорид, NH_4Cl , 15% р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. М'ясо, залишене на фільтрі після попереднього дослід, двічі-тричі промити дистильованою водою порціями по 10–15 мл.
2. Залишок на фільтрі (м'язові волокна) добре віджати. Отримані висвітлені м'язові волокна перенести у стакан і додати 60–70 мл 15% водного розчину амоній хлориду NH_4Cl .

3. Суміш залишити на 30–40 хв, час від часу перемішувати скляною паличкою.
4. Профільтрувати суміш крізь сухий складчастий фільтр. Фільтрування відбувається достатньо повільно.
5. Отриманий фільтрат містить глобулін м'яса – міозин. Розчин міозину далі використовують для досліджень.

Розчин не можна розводити водою! У разі розведення він мутніє, міозин випадає в осад.

3. Желатин

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	1 шт.
Стакан хімічний 100 мл	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Скальпель	
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	

Реактиви:

Свиняча шкірка
Сульфатна кислота, H_2SO_4 , 0,05 М р-н
Натрій гідроксид, NaOH , 0,1 М р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Зважити в хімічному стакані 15–20 г подрібненої свинячої шкірки.
2. Залити її сумішшю 5 мл 0,05 М розчину H_2SO_4 і 40 мл дистильованої води, кип'ятити протягом 4 год.
3. Постійно спостерігати за вмістом стакана, додавати дистильовану воду кожні 20 хв, підтримуючи вміст рідини на постійному рівні.
4. Гарячий розчин профільтрувати за допомогою складчастого фільтра.
5. Фільтрат, що є розчином желатину, нейтралізувати додаванням крапельми 0,1 М розчину NaOH до $\text{pH} = 5-7$, контролюючи значення pH за допомогою універсального індикаторного паперу або pH -метра.

В. Протеїни молока

1. Альбумін молока

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	1 шт.
Стакан хімічний 200 мл	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	

Реактиви:

Свіже молоко
Амоній сульфат, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
насичений р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. До 50 мл свіжого молока додати 50 мл насиченого розчину амоній сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
2. За 5–10 хв профільтрувати отриману суміш крізь складчастий паперовий фільтр.
3. На фільтрі залишається осад нерозчинних казеїну та глобуліну, які захоплюють краплі жиру.
4. Прозорий фільтрат, що є розчином альбуміну, можна використовувати для досліджень.

2. Казеїн

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	2 шт.
Ступка з товчачиком	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Піпетки Пастера	
Електронні ваги	
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	

Реактиви:

Свіже молоко або кисломолочний сир
Натрій гідроксид NaOH, 5 М р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Залишок на фільтрі після відокремлення альбуміну містить переважно суміш казеїну з жиром. Щоб одержати розчин казеїну, сметаноподібний осад із фільтра перенести в ступку (або можна зважити 5–6 г сиру, розтерти його в ступці з 10–15 мл води).
2. Додати в ступку 1,5 мл 5 М розчину NaOH і знову розтерти, поступово додаючи 15 мл води.
3. Суміш профільтрувати крізь добре змочений водою складчастий паперовий фільтр.
4. Перші мутні порції фільтрату повторно пропустити крізь той самий фільтр. При цьому краплі жиру залишаються на фільтрі.
5. Отриманий фільтрат є лужним розчином казеїну.

3. Суміш альбуміну та глобуліну молока

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	1 шт.
Стакан хімічний 200 мл	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Піпетки Пастера	
Скляна паличка	
Полотняна тканина 10 × 10 см	

Реактиви:

Свіже молоко
Оцтова кислота CH_3COOH , конц.
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. 50 мл молока змішати з 50 мл дистильованої води.
2. До отриманої суміші додати краплями 0,2–0,5 мл концентрованої оцтової кислоти CH_3COOH до утворення згустків.
3. За 5–10 хв відфільтрувати суміш крізь чисту полотняну тканину (див. розділ А. Альбумін курячого яйця).
4. Фільтрування відбувається доволі швидко. Перші порції каламутного фільтрату слід повторно відфільтрувати крізь той самий тканинний фільтр.
5. Отриманий прозорий розчин містить альбумін, частину глобуліну, а також молочний цукор – лактозу, що не заважає проведенню подальших досліджень.

Г. Рослинний альбумін лейкозин

Посуд і обладнання:

Колба конічна 100 мл	1 шт.
Стакан хімічний 200 мл	1 шт.
Лійка для фільтрування	1 шт.
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	

Реактиви:

Борошно пшеничне
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У стакані змішати 25 г пшеничного борошна і 100 мл води.
2. Витримати суміш упродовж 30–40 хв, періодично перемішуючи скляною паличкою.
3. Відфільтрувати суміш за допомогою паперового фільтра. Перші каламутні порції фільтрату пропустити крізь фільтр повторно.
4. Фільтрування відбувається доволі швидко. Отриманий фільтрат містить переважно альбумін пшеничного зерна – лейкозин.

Г. Суміш протеїнів рослин

Посуд і обладнання:

Колба конічна 50 мл	1 шт.
Пробірки центрифужні 15 мл	
Лійка для фільтрування	1 шт.
Ступка з товкачиком	1 шт.
Піпетки Пастера	
Скляна паличка	
Фільтрувальний папір	
Центрифуга	

Реактиви:

Сухі рослини
Натрій гідроксид NaOH 0,1 М р-н
Оцтова кислота CH_3COOH 0,5 М р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Наважку 3 г сухої рослинної сировини розтерти в ступці з 30 мл 0,1 М розчину NaOH.
2. Залишити суміш на 2 год, час від часу перетираючи вміст ступки.
3. Отриману суміш профільтрувати крізь складчастий паперовий фільтр та осадити суміш протеїнів додаванням розчину CH_3COOH до рН = 4,0–4,5.
4. Осад двічі-тричі промити розведеним розчином CH_3COOH з рН = 4,0, центрифугувати за 3000 об/хв упродовж 15 хв.

Для проведення досліджень суміш протеїнів розчинити у воді з додаванням невеликої кількості розведеного розчину NaOH.

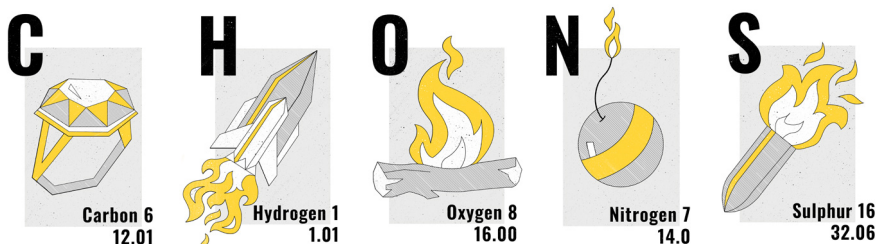
Контрольні запитання

1. Поясніть, завдяки якій хімічній особливості молекул протеїнів для їх екстракції потрібно використовувати дистильовану воду?
2. З якою метою під час виділення протеїнів суміш природної сировини та дистильованої води витримують деякий час перед проведенням подальшої обробки? Чи пов'язане це з особливостями будови молекул протеїнів? Дайте розгорнуту відповідь.

Лабораторна робота 2

Елементний аналіз протеїнів

Молекули протеїнів складаються переважно з п'ятьох основних хімічних елементів:



- Карбон, C, масова частка якого дорівнює близько 50%;
- Гідроген, H, вміст якого – близько 7%;
- Оксиген, O, вміст якого зазвичай не перевищує 23%;
- Нітроген, N, вміст – 16%;
- Сульфур, S, масова частка може коливатися від 0 до 3%.

Найпростішим способом перевірки елементного складу зразка протеїну є його піроліз і подальша ідентифікація продуктів деструкції. Під час нагрівання досліджуваного зразка протеїну в умовах обмеженого доступу повітря відбуваються хімічні перетворення. Основними продуктами деструкції молекул протеїну, що утворені залишками амінокислот, є:

- амоніак NH_3 , що свідчить про наявність у хімічній структурі протеїнів Нітрогену та Гідрогену;
- вода H_2O як свідчення наявності Оксигену та Гідрогену;
- вугілля, поява якого є наслідком високого вмісту Карбону;
- гідроген сульфід H_2S , що свідчить про наявність Сульфуру та Гідрогену.

Зазвичай для кількісного елементного аналізу застосовують високоточні апаратні методи, що потребують складного лабораторного приладдя і серйозного досвіду роботи в лабораторії. Проте якісний елементний склад протеїнів можна визначити й за допомогою характерних хімічних перетворень, зробити які може кожен.

Посуд і обладнання:

Пробірки
Тримач для пробірок
Піпетки Пастера
Газовий пальник або
спиртівка

Реактиви:

Зразок протеїну
Кобальт(II) хлорид CoCl_2 , 10% р-н
Плюмбум(II) ацетат $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 5% р-н
Універсальний індикаторний папір
Дистильована вода

Перебіг роботи:

Увага! Проводити аналіз за умови наявності достатньої кількості зразка протеїну.

1. Наважку протеїну 0,5–1,0 г помістити в суху пробірку з термостійкого скла й нагрівати на полум'ї газового пальника або спиртівки.
2. Незабаром можна побачити видимі зміни зразка протеїну та виділення продуктів деструкції його молекул.
3. Ідентифікувати продукти деструкції протеїну й елементний склад згідно з таблицею 2.

Таблиця 2

Елемент	Сполука, яку ідентифікують	Спосіб ідентифікації	Спостереження
N, H	NH_3	Вологий універсальний індикаторний папір	Зміна кольору: оранжевий → зелений / блакитний
			Власні спостереження:
O, H	H_2O	Візуальний	Поява крапель прозорої рідини на холодних стінках пробірки
		Фільтрувальний папір, просочений розчином CoCl_2 та висушений	Зміна кольору: синій → рожевий
S, H	H_2S	Фільтрувальний папір, просочений розчином $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Поява чорного забарвлення на папері
			Власні спостереження:

Елемент	Сполука, яку ідентифікують	Спосіб ідентифікації	Спостереження
С	Вугілля	Візуальний	Вуглецевий залишок чорного кольору після піролізу протеїну на дні пробірки
			Власні спостереження:

Контрольні запитання

1. Поясніть з хімічної точки зору, чому нагрівання дає змогу швидко визначити елементний склад протеїнів.
2. Чи можна без використання хімічних реагентів, а тільки за допомогою власних органів чуття визначити в суміші продуктів термічного розкладу протеїнів наявність окремих сполук, що є ідентифікаторами елементного складу молекул протеїнів? Дайте ґрунтовну відповідь.

Лабораторна робота 3

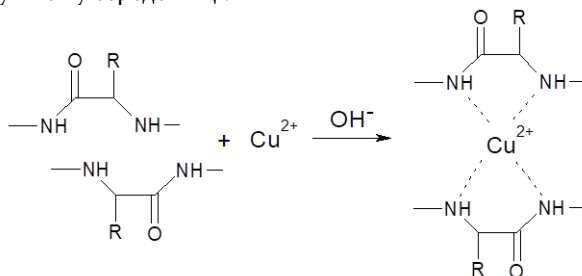
Якісні реакції протеїнів

Великі за розміром молекули протеїнів мають складну хімічну будову. Наявність у їх структурі деяких функціональних груп: карбоксильних ($-\text{COOH}$), аміногруп ($-\text{NH}_2$ або $>\text{NH}$), амідних або пептидних ($-\text{NH}-\text{CO}-$) та інших, а також більших за розміром функціональних фрагментів (ароматичних кілець, $-\text{C}_6\text{H}_5$, індольних фрагментів тощо) надає протеїнам, що їх містять, специфічні хімічні властивості. За допомогою характерних хімічних реакцій (так званих якісних реакцій), у яких беруть участь такі функціональні групи і фрагменти молекул, можна не лише ідентифікувати протеїни в досліджуваних зразках, а й визначити їх хімічну будову.

Дослід 1. Біуретова реакція

Біуретова реакція – загальний метод ідентифікації протеїнів. Свою назву отримала за продуктом конденсації сечовини (англ. *urea*) – біуретом $\text{H}_2\text{NCONHCONH}_2$, аміногрупи якого утворюють з катіонами Купрум(II) комплексну сполуку яскравого фіолетового кольору. Подібний комплекс червоно-фіолетового або фіолетового кольору утворюється катіонами Cu^{2+}

зі сполуками², що мають у своїй структурі пептидні —NH—CO— функціональні групи, в лужному середовищі:



Здатність до комплексоутворення мають лише поліпептиди, в молекулі яких є щонайменше два пептидних зв'язки, тобто вільні амінокислоти та їх димери не дають біуретової реакції. Інтенсивність забарвлення пропорційна до кількості пептидних зв'язків, що беруть участь в утворенні комплексу. Тому реакцію також використовують для кількісного визначення загального вмісту протеїнів у розчині за допомогою колориметричного аналізу.

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера

Реактиви:

Розчини протеїнів
Розчин амінокислоти
Натрій гідроксид NaOH, 3 М р-н
Купрум(II) сульфат CuSO_4 , 0,1 М р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У три окремі пробірки налити 1 мл розчину амінокислоти, відомого протеїну й невідомого зразка. Пробірки підписати.
2. Додати в кожен пробірку 1–2 мл 3 М розчину NaOH.
3. Обережно перемішати вміст пробірки, додати по одній краплі (не більше!) розчину CuSO_4 . Спостерігати зміни кольору, що відбуваються в кожній пробірці. Незначне забарвлення розчину протеїну не заважатиме.
4. **Увага! За низького вмісту протеїну (розчини рослинних протеїнів, молочного альбуміну) або недостатньо яскравого та чіткого забарвлення цей дослід треба провести інакше: в окремій пробірці змішати 2 мл роз-**

² Є ще кілька сполук, що також мають аналогічну реакцію з іонами Cu^{2+} , наприклад оксамід або діамід оксалоїдної кислоти, $\text{H}_2\text{NCOCONH}_2$.

чину протеїну з рівним йому об'ємом розчину лугу. Нахилити пробірку й обережно по стінці з піпетки додати 0,5–1 мл розчину CuSO_4 так, щоб він утворив у пробірниці верхній шар, не змішавшись з іншою рідиною. У цьому випадку на межі шарів розчинів з'являється чітке прозоре фіолетове кільце.

5. Усі результати спостережень записати в таблиці 3.

Таблиця 3

№ пробірки	Амінокислота або зразок протеїну	Кількість 3 М розчину NaOH	Кількість 0,1 М розчину CuSO_4	Спостереження
1				
2				
3				
4				

Контрольні запитання

1. З якою хімічною особливістю молекул протеїнів пов'язана поява фіолетового забарвлення після додавання іонів Cu^{2+} до розчину протеїну в лужному середовищі? Чи спостерігається подібний ефект з іншими речовинами, що за будовою не є протеїнами?
2. Поясніть, чому біуретову реакцію можна використовувати як для якісного, так і кількісного аналізу протеїнів?

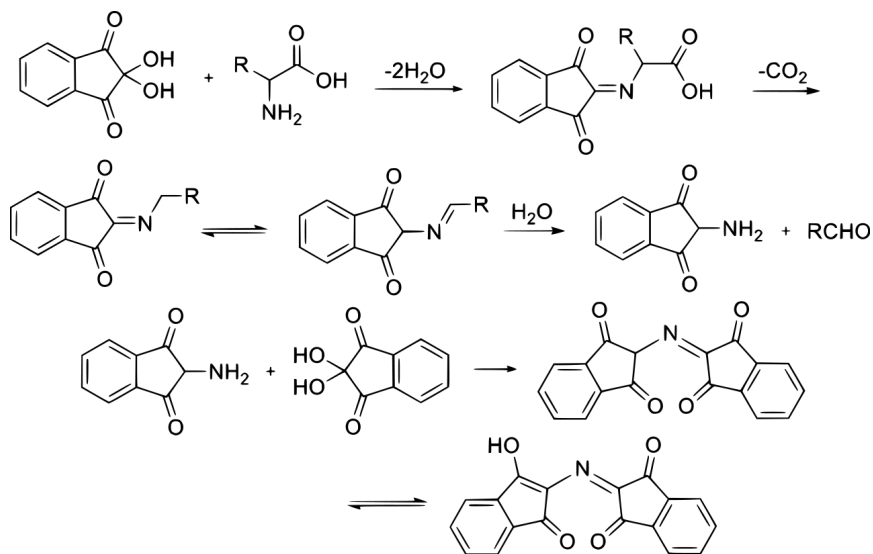
Дослід 2. Нінгідриновий тест

Нінгідрин, або трикетогідринденгідрат – органічна сполука, що належить одночасно до класу кетонів, спиртів і конденсованих карбоциклічних сполук, має сильні окисні властивості. Активно реагує з первинними і вторинними амінами, амінокислотами, протеїнами, пептидами й аміаком, утво-

рюючи яскраво забарвлені сполуки. Кольорові продукти взаємодії утворюються внаслідок реакції, яку подаємо далі.

Нінгідрин розкладає амінокислоту на альдегід, амоніак і CO_2 через низку реакцій, унаслідок чого нінгідрин частково відновлюється до гідриндантіну. На наступній стадії нінгідрин взаємодіє з амоніаком і гідриндантіном, утворюючи сполуки інтенсивного кольору.

Амоніак, первинні аміни, амінокислоти, протеїни утворюють продукти, забарвлені в синьо-фіолетовий колір. Такі сполуки, відомі як барвник «фіолетовий Руемана», були відкриті на початку XX сторіччя (вперше було звернуто увагу на забарвлення шкіри рук нінгідрином) і названі на честь їх винахідника.



Вторинні аміни й амінокислоти, які мають вторинні аміногрупи (пролін, гідроксипролін), під час взаємодії з нінгідрином утворюють продукти жовтого кольору.

Реакцію протеїнів з нінгідрином активно використовують у криміналістиці для ідентифікації відбитків пальців і слідів поту на різних поверхнях (особливо пористих).

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера
Водяна баня
Електроплитка

Реактиви:

Розчини протеїнів
Нінгідрин, 0,2% р-н в етанолі
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У пробірку налити 1 мл розчину протеїну, додати 5 крапель розчину нінгідрину.
2. Ретельно перемішати вміст пробірки, помістити її у водяну баню, що кипить, на 2 хв.
3. За наявності в досліджуваному розчині α -амінокислот або протеїнів розчин набуває синьо-фіолетового забарвлення.
4. Усі результати спостережень записати в таблиці 4.

Таблиця 4

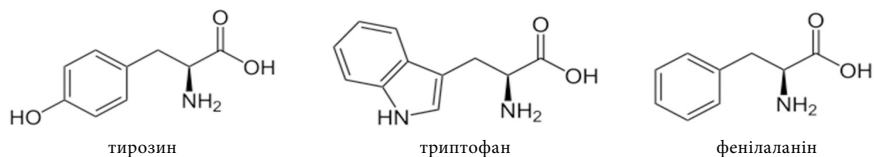
№ пробірки	Зразок протеїну	Кількість розчину нінгідрину	Спостереження
1			
2			
3			
4			

Контрольні запитання

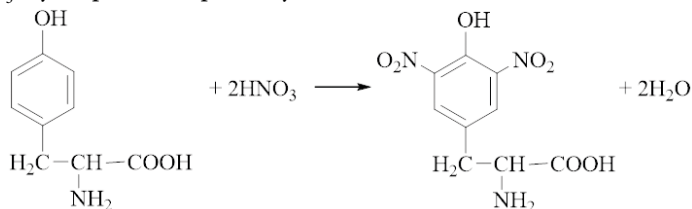
1. Які властивості нінгідрину як речовини дають змогу використовувати його для ідентифікації протеїнів, амінокислот та інших аміновмісних сполук?
2. Чому нінгідрин після потрапляння на шкіру забарвлює її, і як цю його властивість використовують із практичною метою?

Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція

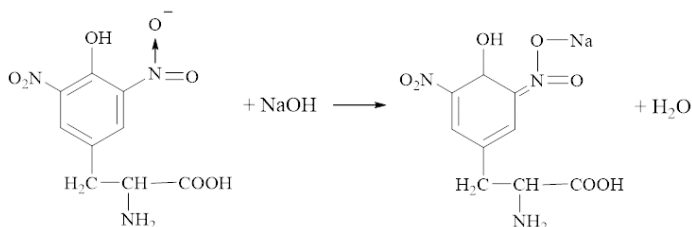
Ксантопротеїнова реакція (із грец. *xanthos* – жовтий) слугує для ідентифікації ароматичних амінокислот і протеїнів, що їх містять. Амінокислоти, що містять ароматичні структури (бензенове кільце $-C_6H_5$), з хімічної точки зору можна розглядати як похідні бензену:



Таким амінокислотам притаманні деякі властивості ароматичних вуглеводнів – аренів. Наприклад, взаємодія з нітратною кислотою – реакція нітрування. Характерне жовте забарвлення з'являється внаслідок нітрування цих ядер HNO_3 й утворення нітросполук:



Зміна забарвлення на жовтогаряче в лужному середовищі зумовлена утворенням більш інтенсивно забарвлених аніонів:



Саме ці схеми відображають перебіг ксантопротеїнової реакції. Амінокислоти тирозин і триптофан, вільні або в складі протеїнів, є саме такими амінокислотами з ароматичними фрагментами у структурі молекул, що легко піддаються нітруванню у «м'яких» умовах.

Та є й інша амінокислота – фенілаланін, молекула якої теж містить бензенове кільце. Однак його наявність не надає фенілаланіну здатності реагувати

з нітратною кислотою за звичайних умов. Як гадаєте, що є причиною такої «особливої» поведінки?

Річ у тім, що ароматичне кільце в тирозині і триптофані активоване $-OH$ і $-NH$ групами, приєднаними безпосередньо до бензенового кільця (див. вище), що надає йому підвищеної реакційної здатності, зокрема в реакції нітрування. Навпаки, ароматичне кільце фенілаланіну не містить аналогічних активаторів, тому піддається нітруванню в доволі жорстких умовах. Нітрування такої амінокислоти чи її фрагментів у складі протеїнів неможливе за умов проведення ксантопротеїнової реакції.

Отже, протеїни, у складі яких немає тирозину або триптофану, зокрема желатин, не спричиняють ксантопротеїнову реакцію.

Саме перебігом ксантопротеїнової реакції пояснюється поява на шкірі жовтих плям (рис. 26), коли на неї потрапляє концентрована HNO_3 . Протеї-



Рис. 26.
Прояв ксантопротеїнової реакції в разі опіку
шкіри нітратною кислотою

ни шкіри містять тирозин і триптофан, які легко піддаються нітруванню і забарвлюють прилеглі тканини в жовтий колір. Слід пам'ятати, що таке забарвлення шкіри є не єдиним наслідком потрапляння кислоти на шкіру. Концентрована нітратна кислота може спричинити дуже прикрі наслідки! Вона призводить до глибокого руйнування протеїнових молекул, живих тканин і шкіри, яка є основною захисною системою нашого організму. Тому працювати з кислотами слід обережно, користуючись відповідними захисними засобами!

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера
Водяна баня
Електроплитка

Реактиви:

Розчини протеїнів
Нітратна кислота, HNO_3 , конц.
Натрій гідроксид $NaOH$, 3 М р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

Увага! Цей експеримент потрібно виконувати у витяжній шафі!

1. У пробірку налити 1 мл розчину протеїну, додати 0,3 мл (10 крапель) концентрованої HNO_3 . При цьому розчин стає каламутним або з'являється білий осад унаслідок денатурації протеїнів.
2. Обережно нагріти отриману суміш до кипіння, прокип'ятити 1–2 хв. При цьому осад набуває яскраво-жовтого забарвлення. Під час кип'ятіння осад може частково розчинитися внаслідок руйнування (гідролізу) молекул протеїнів, однак жовте забарвлення розчину зберігається.
3. Після охолодження суміші обережно, краплями, додати надлишок (1,5–2 мл) концентрованого розчину лугу. Утворюються нітропохідні, що в надлишку лугу дають яскравий жовтогоарячий розчин.
4. Усі результати спостережень записати в таблиці 5.

Таблиця 5

№ пробірки	Зразок протеїну	Кількість конц. HNO_3	Кількість 3 М розчину NaOH	Спостереження
1				
2				
3				
4				

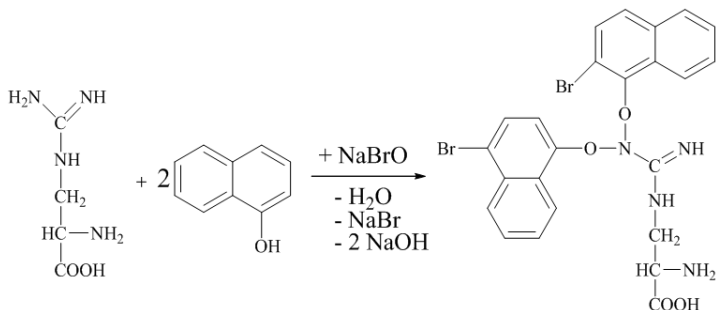
Контрольні запитання

1. Поясніть хімічну природу ксантопротеїнової реакції. Де подібна реакція використовується в промисловості і які продукти одержують за її допомогою?
2. Яка ще реакція може відбуватися під час ксантопротеїнового тесту, але не спричиняє появу чи зміну інтенсивності забарвлення?

Дослід 4. Реакція Сакагучі

Ця якісна реакція є специфічною для виявлення гуанідинової групи, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$, в органічних сполуках³. Єдиною амінокислотою, що містить гуанідинову групу, є аргінін, отже, позитивна реакція свідчить про наявність у досліджуваному зразку аргініну або його залишку в молекулі протеїну.

Вільний аргінін або залишок аргініну в протеїні реагує з α -нафтолом й окисником типу натрій гіпохлориту NaClO або натрій гіпоброміту NaBrO в лужному середовищі з утворенням сполуки червоного кольору.



Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера

Реактиви:

Розчини протеїнів
Натрій гідроксид NaOH , 10% р-н
 α -Нафтол, 1% р-н в етанолі
Натрій гіпохлорит NaClO , або натрій гіпоброміт NaBrO , 2-5% р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У пробірку налити 1 мл досліджуваного розчину протеїну, додати 0,5 мл 10% розчину натрій гідроксиду і 0,5 мл 1% спиртового розчину α -нафтолу.
2. Вміст пробірки ретельно перемішати.
3. Додати до суміші 0,3 мл розчину NaClO (або NaBrO). Якщо досліджуваний розчин набуде червоного кольору, це свідчатиме про присутність у ньому вільного або хімічно зв'язаного аргініну.

³ Похідні гуанідину використовують у виробництві полімерів, зокрема іонообмінних смол, косметичних засобів, ракетного палива, вибухових речовин, протимікробних домішок, а також компонентів, що підвищують вогнестійкість тканин та інших горючих матеріалів.

4. Усі результати спостережень записати в таблиці 6.

Таблиця 6

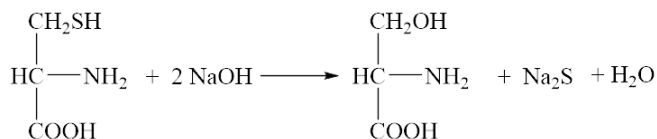
№ пробірки	Зразок протеїну	Кількість розчину NaOH	Кількість розчину α-нафтолу	Кількість розчину NaClO (NaBrO)	Спостереження
1					
2					
3					
4					

Контрольні запитання

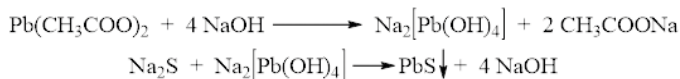
1. Чому реакція Сакагучі є специфічною пробою на наявність у протеїнах амінокислоти аргініну?
2. Чи можна використовувати цю реакцію для аналізу інших органічних сполук, крім аргініну й аргінінвмісних протеїнів? Яких саме?

Дослід 5. Реакція Фоля

Реакція Фоля – якісна реакція на наявність у молекулі протеїну сульфуровмісних амінокислот, що в лужному середовищі під час кип'ятіння гідролізуються, утворюючи сульфід-іони й іншу амінокислоту. Далі подано схему перетворення цистеїну на серин і Na₂S під дією NaOH:



Натрій сульфід далі взаємодіє із плюмбум(II) ацетатом, Pb(CH₃COO)₂, утворюючи чорно-коричневий осад плюмбум(II) сульфїду PbS:



Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера
Водяна баня
Електроплитка

Реактиви:

Розчини протеїнів
Натрій гідроксид NaOH, 10% р-н
Плюмбум(II) ацетат $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 5% р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У пробірку налити 1 мл досліджуваного розчину протеїну, додати 2 мл 10% розчину NaOH. Вміст пробірки обережно прокип'ятити впродовж 3 хв.
2. До отриманого розчину додати одну краплю розчину $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.
3. Утворення чорно-коричневого осаду PbS свідчить про наявність у молекулі протеїну сульфідних груп.
4. Усі результати спостережень записати в таблиці 7.

Таблиця 7

№ пробірки	Зразок протеїну	Кількість розчину NaOH	Кількість розчину $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Спостереження
1				
2				
3				
4				

Контрольні запитання

1. Для ідентифікації Сульфур у за методом Фоля після обробки лугом використовують розчин солі Плюмбуму. Які ще реагенти замість Pb^{2+} можна застосувати для якісного визначення Сульфур у протеїнах?

2. Подумайте, чому одним з найкращих реагентів у методі Фоля вважають саме Pb^{2+} і чому не використовують, наприклад, Cu^{2+} або Zn^{2+} ?

Дослід 6. Реакція Акрі – Розенгайма

Ця реакція специфічна для індольних груп, які містить лише одна амінокислота – триптофан. У разі взаємодії триптофану, який утворюється внаслідок гідролізу протеїнів під дією сильних кислот (наприклад, сульфатної кислоти H_2SO_4 , з формальдегідом), утворюється продукт конденсації – карболін фіолетового кольору.

Отже, ця реакція дає можливість визначити наявність залишків триптофану в молекулах протеїнів.

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера
Водяна баня
Електроплитка

Реактиви:

Розчини протеїнів
Формальдегід $HCHO$, 35% р-н
Ферум(III) хлорид $FeCl_3$, 2% р-н
Сульфатна кислота H_2SO_4 , конц.
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Налити в пробірку 0,5 мл розчину протеїну.
2. Додати 2–3 краплі розчину формальдегіду і 2 краплі розчину $FeCl_3$.
3. Вміст пробірки інтенсивно перемішати.
4. По стінці пробірки обережно додати 4–5 крапель концентрованої H_2SO_4 так, щоб утворилося два шари рідини.
5. За умови наявності триптофану у складі протеїну на межі поділу двох шарів утворюється фіолетове кільце.
6. Усі результати спостережень записати в таблиці 8.

Таблиця 8

№ пробірки	Зразок протеїну	Кількість розчину $HCHO$	Кількість розчину $FeCl_3$	Кількість конц. H_2SO_4	Спостереження
1					
2					

№ пробірки	Зразок протеїну	Кількість розчину HCHO	Кількість розчину FeCl ₃	Кількість конц. H ₂ SO ₄	Спостереження
3					
4					

Контрольні запитання

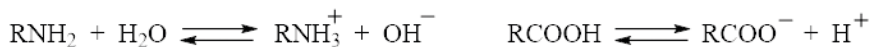
1. Чи дасть змогу, на вашу думку, реакція Акрі – Розенгайма ідентифікувати інші, схожі на триптофан, сполуки, як-от індол в олії жасмину чи індоліл-ацетатну кислоту в засобах регуляції росту рослин?
2. Як ви гадаєте, яку роль відіграє сульфатна кислота в такій і більшості інших реакцій, у яких беруть участь альдегіди?

Лабораторна робота 4

Хімічні властивості протеїнів

Кислотно-основні властивості

Протеїни за своєю природою є колоїдними амфотерними полімерними електролітами. Їх основні властивості зумовлені наявністю аміногруп ($-\text{NH}_2$ і $>\text{NH}$), а кислотні властивості – присутністю карбоксильних $-\text{COOH}$ груп.

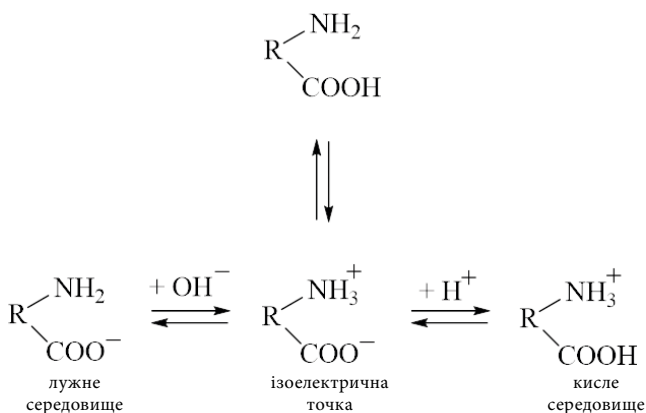


Для більшості протеїнів константа дисоціації, K_d , протеїну як кислоти, дещо вища за K_d того самого протеїну як основи. Тому молекули протеїнів у водному розчині зазвичай мають негативний заряд.

За умови поступового додавання кислоти до такого розчину протеїну ступінь його кислотної дисоціації знижується через вплив надлишку іонів H^+ , а ступінь дисоціації як основи зростає. Тобто негативний заряд молекул протеїну зменшується і врешті повністю зникає.

Втрачаючи заряд, колоїдний розчин протеїну стає найменш стійким, і його молекули легко коагулюють – злипаються, утворюючи великі за роз-

міром агрегати і навіть осад. Значення рН, за якого спостерігається коагуляція молекул, є характерною величиною для кожного протеїну і має назву **ізоелектрична точка**. Додавання надлишку кислоти, тобто подальше зниження рН нижче за ізоелектричну точку, посилює дисоціацію протеїну як основи, молекули протеїну заряджаються позитивно, і колоїдний розчин знову стабілізується. У лужному середовищі також підвищується стійкість негативно заряджених молекул протеїну.



Дослід 1. Взаємодія протеїнів з лугами і кислотами

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера
Водяна баня
Електроплитка

Реактиви:

Розчини протеїнів
Оцтова кислота CH_3COOH , конц.
Натрій гідроксид NaOH , 0,1 М р-н
Амоній сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У дві пробірки налити по 2–3 мл розчину протеїну.
2. Пробірку № 1 нагріти до кипіння. Більшість протеїнів денатурує й утворює осад.
3. У пробірку № 2 додати краплями, постійно перемішуючи, концентровану CH_3COOH . Під час додавання кислоти (крім розчину желатину) розчин спочатку стає каламутним або в ньому випадає осад. У разі подальшого додавання кислоти осад знову розчиняється.

- Отриманий прозорий кислий розчин протеїну розділити на дві пробірки (№ 2 і № 3).
- Пробірку № 2 нагріти до кипіння. Чи зсідается протеїн у ній? Чому?
- У пробірку № 3 додати краплями розведений розчин лугу. Що відбувається? Записати всі спостереження.
- Після утворення прозорого лужного розчину протеїну в пробірці № 3 вміст пробірки нагріти до кипіння. Що відбувається? Чому?

Зразок протеїну _____

Додавання конц. CH_3COOH _____

Нагрівання _____

Додавання NaOH до кисл. розчину _____

Нагрівання _____

Контрольні запитання

- Завдяки якій структурній особливості молекули протеїнів здатні розчинятись у воді?
- За яких умов протеїни розчиняються у воді, а за яких – стають нерозчинними і здатними утворювати осад?

Дослід 2. Буферні властивості протеїнів

Завдяки своїм амфотерним властивостям протеїни в розчині виявляють буферні властивості, тобто можуть зв'язувати іони H^+ як надлишкові, знижуючи кислотність середовища, так і OH^- -іони, знижуючи лужність системи.

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера
Водяна баня
Електроплитка

Реактиви:

Розчини протеїнів (отримані без додавання кислот або лугів)
Хлоридна кислота HCl , 0,1 М р-н
Натрій гідроксид NaOH , 0,1 М р-н
Універсальний індикатор
Фенолфталеїн
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У пробірку налити 3 мл дистильованої води і додати краплю розчину HCl.
2. Краплю отриманого розчину змішати з 2 мл води.
3. Якщо до отриманого розбавленого розчину кислоти додати 1–2 краплі розчину універсального індикатора, він демонструє слабкі кислотні властивості (набуває рожевого кольору).
4. Отриманий рожевий розчин поступово невеликими порціями прилити до 2–3 мл розчину протеїну, спостерігати зміну забарвлення.
5. Аналогічно приготувати розбавлений розчин лугу, дослідити буферні властивості протеїну, користуючись фенолфталеїном як індикатором.

Зразок протеїну _____

Колір розчину HCl (унів. індикатор) _____

Колір розчину HCl + протеїн (унів. індикатор) _____

Колір розчину NaOH (фенолфталеїн) _____

Колір розчину NaOH + протеїн (фенолфталеїн) _____

Контрольні запитання

1. Що таке буферні властивості і завдяки чому їх проявляють молекули протеїнів?
2. Поміркуйте над тим, яку користь живим організмам приносять буферні властивості протеїнів.

Висадження протеїнів

Молекули протеїнів у розчині стабілізовані не лише зарядом (позитивним або негативним), а й наявністю гідратних оболонок – шаром молекул води, орієнтованих за зарядом молекули протеїну (переважно атомами Н, якщо заряд негативний, або переважно атомами О, якщо заряд позитивний).

Наявність гідратних оболонок перешкоджає зближенню молекул протеїну, їх агрегації (злипання) і випадінню в осад (рис. 27). Для висадження

протеїнів із розчину необхідно зруйнувати обидва фактори, що забезпечують стабілізацію, – поверхневий заряд і гідратні оболонки. Залежно від використаних реагентів або впливу зовнішніх факторів осадження (денатурація) протеїнів може бути зворотним і незворотним.

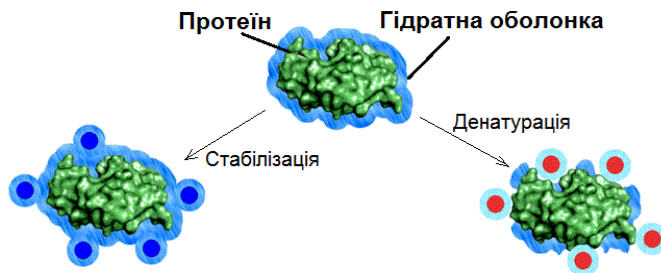


Рис. 27.
Візуалізація процесу
денатурації протеїнів

Дослід 3. Висолювання протеїнів

Солі лужних металів, а також амонію і магнію за достатньої концентрації осаджують («висолюють») більшість протеїнів з їх розчинів. До основних причин такої поведінки молекул протеїнів відносять:

- зняття електричного заряду колоїдних частинок за рахунок адсорбції на їх поверхні протилежно заряджених іонів солі;
- руйнування гідратних оболонок гідрофільних молекул протеїну, оскільки іони солі, доданої в достатній кількості, мають вищу здатність до гідратації, порівняно з молекулами протеїну.

Обидва фактори зменшують стабільність колоїдного розчину протеїну, оскільки полегшують злипання й укрупнення (коагуляцію) молекул, унаслідок чого протеїн випадає в осад.

Найбільш виражену здатність до висолювання протеїнів має амоній сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Він здатен висаджувати протеїни в кислому і нейтральному середовищах. За використання інших солей для більш повного висолювання протеїнів необхідно додатково підкислювати середовище.

Осадження солями лужних металів і магнію не спричинює зміни структури молекул протеїнів, тому таке осадження / висолювання є зворотним процесом. Утворені осади не втрачають здатності розчинятися внаслідок додавання надлишку води.

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера

Реактиви:

Розчини протеїнів
Амоній сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40% р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У пробірку налити 2 мл розчину протеїну, додати 2 мл розчину $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, трохи перемішати вміст пробірки. Унаслідок висолювання розчин стає каламутним або утворюється осад протеїну.
2. Відібрати 1 мл утвореної суміші в окрему пробірку, додати 2–3 мл дистильованої води. Під час перемішування утворений осад знову розчиняється.

Зразок протеїну _____

Додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ _____

Додавання H_2O до осаду _____

Контрольні запитання

1. Які причини призводять до втрати стабільності водних розчинів протеїнів і їх осадження?
2. Чому осадження протеїнів солями лужних металів, магнію й амонію є зворотним (утворений осад протеїнів знову легко перетворити на розчин)?
3. Солі лужних металів, магнію, амонію є ефективними осаджувачами протеїнів у слабокислому, а іноді в нейтральному середовищі. Чому деякі з них не здатні осаджувати протеїни в лужному середовищі? Дайте аргументовану відповідь.

Дослід 4. Висадження протеїнів солями важких металів

Солі важких металів (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Tl^+ , Cd^{2+} тощо) навіть за низьких концентрацій осаджують протеїни внаслідок взаємодії з карбоксильними ($-\text{COOH}$) і тиольними ($-\text{SH}$) групами. Завдяки цьому утворюються солеподібні сполуки, що не розчиняються у воді. Тому продукти з високим вмістом

протеїнів (молоко, яйця тощо) застосовують як протиотруту в разі отруєння солями важких металів, зокрема ртуті.

Осадження протеїнів важкими металами є незворотним. Однак деякі осади, зокрема утворені солями купруму або плюмбуму, здатні розчинятися в надлишку таких солей унаслідок пептизації.

Посуд і обладнання:

Пробірки
Піпетки Пастера

Реактиви:

Розчини білків
Купрум(II) сульфат CuSO_4 , 10% р-н
Плюмбум(II) ацетат $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 10% р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. У дві пробірки налити по 2 мл досліджуваного розчину і краплями додати в одну з них, постійно перемішуючи, розчин CuSO_4 (пробірка № 1), у другу – розчин $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (пробірка № 2). Розчини солей вводити, доки не утвориться осад або розчин стане каламутним.
2. Розділити вміст кожної пробірки на дві частини:
– пробірка № 1 $\rightarrow$ пробірка № 1-1 + пробірка № 1-2;
– пробірка № 2 $\rightarrow$ пробірка № 2-1 + пробірка № 2-2.
3. Додати до пробірок № 1-1 і № 2-1 по 2-3 мл води. Відзначити, що відбувається з розчином.
4. До пробірок № 1-2 та № 2-2 продовжити повільно додавати краплями розчин відповідної солі, постійно перемішуючи. Що відбувається з вмістом пробірки?

Зразок протеїну _____

Додавання CuSO_4 _____

Додавання H_2O _____

Додавання надл. CuSO_4 _____

Додавання $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ _____

Додавання H_2O _____

Додавання надл. $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ _____

Контрольні запитання

1. Яка хімічна особливість протеїнів спричинює осадження їх молекул за наявності в розчині важких металів?
2. Чому потрапляння іонів важких металів у живий організм спричиняє важке отруєння? Дайте розгорнуту відповідь.
3. Іони важких металів легко осаджують протеїни з розчинів, а їх надлишок викликає пептизацію і повторне розчинення осаду протеїнів. Спробуйте пояснити, чому ж тоді розчини солей важких металів не можуть бути протиотрутою в разі отруєння живого організму важкими металами?

Лабораторна робота 5

Кількісне визначення вмісту протеїнів методом фотометрії

Загальні відомості про метод фотометрії

Усі речовини здатні поглинати й відбивати електромагнітне випромінювання – інфрачервоне, ультрафіолетове, видиме світло тощо. Здатність речовин поглинати випромінювання зумовлена особливостями хімічної будови їх молекул. Унаслідок поглинання кожна сполука має свій «особистий» спектр поглинання електромагнітного випромінювання. За створення відповідних умов вміст цієї сполуки можна доволі легко визначити навіть за наявності інших сполук.

Метод кількісної спектрофотометрії заснований на здатності молекул сполук поглинати електромагнітне випромінювання різної енергії в кількості, що пропорційна до їх кількості, або, інакше кажучи, до вмісту цієї сполуки.

Цю закономірність відбиває закон Бугера – Ламберта – Бера (*The Lambert – Beer – Law*), відкритий і детально вивчений французьким ученим П. Бугером і німецькими науковцями Й. Ламбертом та А. Бером у XVIII–XIX століттях. У сучасному вигляді цей закон застосовують у кількісному спектрофотометричному аналізі для визначення вмісту окремої сполуки в розчині. Математично він має вигляд співвідношення між поглинанням (*абсорбцією*) електромагнітного випромінювання (світла) окремою речовиною та її концентрацією в розчині:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C,$$

де

A – поглинання (безрозмірна величина);

ϵ^4 – коефіцієнт молярного поглинання ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

l – довжина оптичного шляху світла (товщина шару розчину речовини, з якою взаємодіє світло; см).

Для розуміння фізичної суті A її можна представити так:

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0},$$

де

T – пропускання (безрозмірна величина; відображає частку випромінювання, що проходить крізь розчин невідомої сполуки);

I – інтенсивність випромінювання, що пройшло крізь шар розчину сполуки;

I_0 – вихідна інтенсивність випромінювання (до взаємодії з розчином сполуки).

На жаль, здебільшого молярний коефіцієнт поглинання ϵ невідомий або може суттєво відрізнятися через складність відтворення аналогічних умов експерименту. Тому зазвичай на практиці перш ніж аналізувати досліджуваний зразок, проводять калібрувальний експеримент, використовуючи підготовлені розчини тієї самої речовини з відомою концентрацією (стандартні розчини). Вимірюючи поглинання стандартних розчинів сполуки, будують калібрувальний графік залежності поглинання розчинів від концентрації розчиненої речовини, як це показано на *рис. 28*. Оскільки закон Бугера – Ламберта – Бера відображає лінійну залежність між поглинанням розчину і концентрацією розчиненої речовини, застосовуючи метод найменших квадратів до визначених унаслідок експерименту даних поглинання стандартних розчинів, можна отримати математичне рівняння, що пов'язує поглинання розчину та концентрацію розчиненої речовини. Визначати концентрацію (вміст) речовини в досліджуваних розчинах можна за допомогою як графіка залежності поглинання розчину від його концентрації, так і отриманого на його основі рівняння (*рис. 28*).

⁴ Для кожної речовини молярний коефіцієнт поглинання ϵ за дотримання тих самих умов експерименту (складу розчину, типу розчинника, додаткових складових, температури тощо) є постійною величиною. Існують таблиці з показниками ϵ , якими можна користуватися. Однак це зазвичай виняток, а не правило.

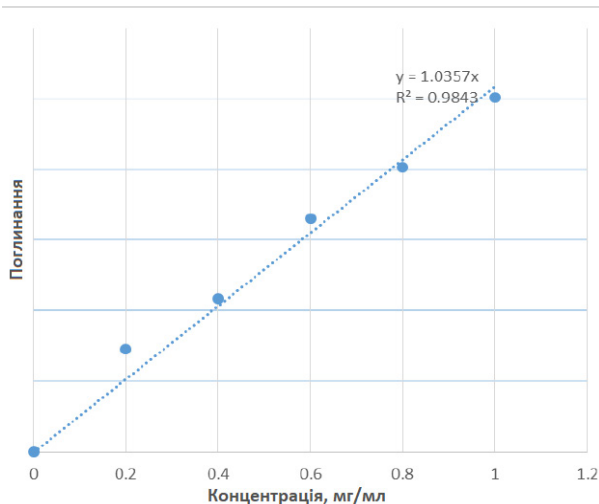


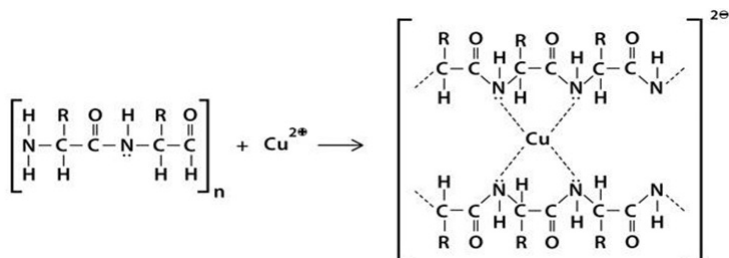
Рис. 28.
Як будувати
калібрувальний
графік, проводячи
фотометричний
аналіз

Контрольні запитання

1. На якому явищі ґрунтується принцип фотометричного аналізу?
2. Які два методи застосовуються для кількісного фотометричного аналізу речовин?
3. Уважно ознайомтеся з основними закономірностями фотометрії і спробуйте визначити дві найбільш важливі властивості, яким має відповідати досліджуваний зразок.

Біуретовий метод

Біуретовий метод є найпростішим і найпоширенішим способом фотометричного визначення загального вмісту протеїнів у розчині. Хімічна сутність цього методу ґрунтується на здатності іонів Cu^{2+} в лужному середовищі утворювати координаційні сполуки з амідними (пептидними) $-\text{NH}-\text{CO}-$ зв'язками молекул протеїнів. Згідно з комплексоутворювальною активністю іонів Купруму(II) потрібно щонайменше два $-\text{NH}-\text{CO}-$ зв'язки на взаємодію з кожним іоном Cu^{2+} . Унаслідок взаємодії утворюється комплексна сполука червоно-фіолетового кольору, якій притаманне інтенсивне поглинання випромінювання (світла) в діапазоні довжин хвиль 540–575 нм. Утворення комплексу можна схематично зобразити так:



протеїн

Іони
міді

Комплекс Cu^{2+} -протеїн
червоно-фіолетового кольору

Прилади та матеріали:

Стакани хімічні 50, 100 та 400 мл
Колби мірні 250, 500 мл
Пробірки з корками
Штатив для пробірок
Флакони для розчинів 10 мл
Піпетки мірні 5 мл
Піпет-дозатор 0,1–1 мл з насадками
Кювети скляні 5 мл
Спектрофотометр (або фотометр із фільтром 572 нм)
Фільтрувальний папір

Реагенти:

Натрій гідроксид NaOH, 6 М р-н
Купрум(II) сульфат пентагідрат $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Калій-натрій тартрат $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Калій йодид KI
Натрій азид NaN_3 , 0,0015 М р-н
Альбумін
Дистильована вода

Перебіг роботи

Приготування розчинів

- А. 6 М розчин NaOH. Наважку 60 г NaOH розчинити в мірній колбі в 100 мл дистильованої води і довести об'єм дистильованою водою до 250 мл. Зберігати в щільно закритому поліетиленовому посуді.
- Б. Біуретовий реагент. Наважку 1,50 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ розчинити у 250 мл дистильованої води, додати 4,5 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ і 2,5 г KI. Коли розчиняться всі складові, додати 50 мл 6 М розчину NaOH, ретельно перемішати, довести загальний об'єм дистильованою водою до 500 мл. Розчин можна зберігати в щільно закритому поліетиленовому посуді впродовж шести місяців.
- В. Розчин-порівняння. Приготувати розчин за методикою (Б) без використання $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Г. 0,0015 М розчин NaN_3 . Наважку 0,05 г натрій азиду розчинити у 250 мл дистильованої води, довести об'єм до 500 мл.

- Г. *Розчин протеїну*. Наважку 3,0 г альбуміну розчинити у 20 мл 0,0015 М розчину NaN_3 і довести об'єм до 30 мл, доливши розчин натрій азиду.
- Д. *Стандартні розчини протеїну*. Методом розведення з розчину (Д) приготувати по 10 мл стандартних розчинів протеїну з концентрацією 20, 40, 60, 80 і 100 г/л відповідно до співвідношень, поданих у таблиці 9.

Таблиця 9

Концентрація протеїну, г/л	Об'єм розчину протеїну (розчин Д), мл	Об'єм води, мл
20	2	8
40	4	6
60	6	4
80	8	2
100	10	0

Приготування калібрувальних розчинів і розчинів порівняння та проведення вимірювань

Калібрувальні розчини

1. Пронумерувати сім пробірок номерами від 1 до 7. У кожную пробірку за допомогою мірної піпетки влити по 5 мл біуретового реагенту (Б).
2. Приготувати **нульовий зразок**, додавши 100 мкл дистильованої води в пробірку № 1.
3. Додати в пробірки №№ 2–6 по 100 мкл стандартних розчинів протеїну різної концентрації (розчин Е). Підписати кожную пробірку.
4. Приготувати досліджуваний зразок, додавши 100 мкл розчину протеїну невідомої концентрації в пробірку № 7, підписати її.
5. Закрити пробірки корком та обережно перемішати вміст, кілька разів перевернувши пробірку догори дном. Уникати втрат вмісту.

Розчини порівняння

1. Пронумерувати сім пробірок номерами від 11 до 17. За допомогою мірної піпетки додати в кожную пробірку по 5 мл розчину-порівняння (В).
2. Приготувати **нульовий зразок**, додавши 100 мкл дистильованої води в пробірку № 11. Підписати пробірку.
3. Додати в пробірки №№ 12–16 по 100 мкл стандартних розчинів протеїну різної концентрації (розчин Е). Підписати кожную пробірку.
4. Приготувати досліджуваний зразок-порівняння, додавши 100 мкл розчину протеїну невідомої концентрації в пробірку № 17, підписати її.

- Закрити пробірки корком та обережно перемішати їх вміст, кілька разів перевернувши пробірку догори дном. Уникати втрат.

Проведення вимірювань

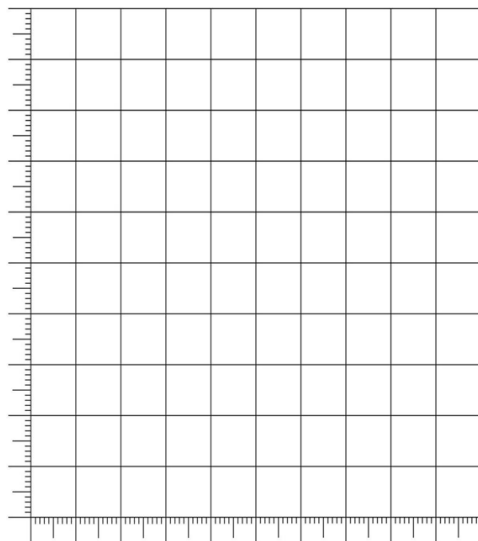
- Увімкнути спектрофотометр за 20–30 хв до використання.
- Підготувати скляну кювету для проведення вимірювань.
- Встановити довжину хвилі спектрофотометра на позначку 560 нм (або світлофільтр – 572 нм).
- Знову перемішати отримані *калібрувальні розчини*, перш ніж розпочати вимірювання.
- Використовуючи **нульовий зразок** *калібрувальних розчинів* (пробірка № 1), встановити показник поглинання на нульову позначку ($A = 0,000$; $\lambda = 560/572$ нм).
- Виміряти поглинання *калібрувальних розчинів* (пробірки №№ 2–6 і № 7), записати показники до стовпчика A_0 у *таблиці 10*.
- Повторно перемішати отримані *розчини порівняння* перед вимірюванням.
- Використовуючи **нульовий зразок** *розчинів порівняння* (пробірка № 11), встановити показник поглинання на нульову позначку ($A = 0,000$; $\lambda = 560/572$ нм).
- Виміряти поглинання *розчинів порівняння* (пробірки №№ 12–16 і № 17), записати показники до стовпчика A_1 у *таблиці 10*.
- Обчислити дійсне поглинання розчинів за рівнянням $A = A_1 - A_0$, записати значення в *таблиці 10*.
- Побудувати графік залежності дійсного поглинання від концентрації протеїну.
- Користуючись методом найменших квадратів, розрахувати концентрацію протеїну в невідомому зразку.

Таблиця 10

Калібрувальні розчини			Розчини порівняння			Поглинання
№ про-бірки	Вміст протеїну, г/л	Поглинання A_1	№ про-бірки	Вміст протеїну, г/л	Поглинання A_0	$A = A_1 - A_0$
1	0	0,000	11	0	0,000	0,000
2	20		12	20		

Калібрувальні розчини			Розчини порівняння			Поглинання
№ про- бірки	Вміст протеїну, г/л	Поглинання A_1	№ про- бірки	Вміст протеїну, г/л	Поглинання A_0	$A = A_1 - A_0$
3	40		13	40		
4	60		14	60		
5	80		15	80		
6	100		16	100		
7	—		17	—		

Калібрувальний графік (Біуретовий метод)



Контрольні запитання

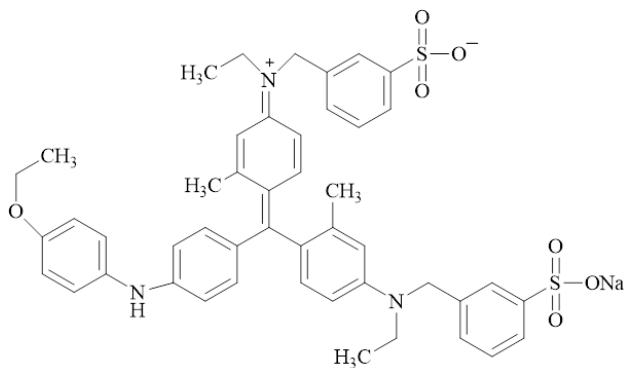
1. Подумайте, чи можна за допомогою цього методу і без додаткової обробки визначити вміст незворотно денатурованих протеїнів у досліджуваному зразку.

2. Як ви гадаєте, чи дає змогу біуретовий метод визначити вміст протеїнів у кислому середовищі? Чому?
3. З якою метою будують калібрувальний графік при використанні кількісного фотометричного аналізу?

Метод Бредфорда

Кількісний аналіз протеїнів за методом Бредфорда є дуже швидким, точним і потребує мінімальної кількості зразка, що іноді стає критичним фактором під час аналізу клітинних протеїнів, ферментів, визначення концентрації протеїнів для гель-електрофорезу тощо. Зазвичай метод дає змогу визначати кількість протеїнів у межах 5–200 мкг, але цей показник залежить від якості та вмісту реагенту-барвника.

Аналіз за методом Бредфорда заснований на взаємодії молекул протеїнів з розчином реагенту-барвника Кумассі діамантовий синій G-250 (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) у кислому середовищі. Унаслідок взаємодії утворюється продукт блакитного кольору з максимальним поглинанням випромінювання з довжиною хвилі 595 нм (вихідний розчин барвника має максимум поглинання за 465 нм).



Кумассі діамантовий синій G-250

Завдяки специфічній хімічній структурі молекули барвника його взаємодія з протеїнами відбувається паралельно за двома механізмами: (i) гідрофобних взаємодій – ароматичні кільця барвника за рахунок спорідненості з'єднуються з ароматичними фрагментами тирозину, триптофану, фенілаланіну; (ii) іонних взаємодій – негативно заряджені сульфонатні $-SO_3^-$ групи барвника взаємодіють із позитивно зарядженими в кислому середовищі молекулами протеїну. Внаслідок утворення комплексу про-

теїн-барвник зумовлює зміну спектра поглинання і, відповідно, кольору розчину.

Висока точність вимірювання концентрації протеїнів цим методом⁵ пояснюється тим, що молярний коефіцієнт поглинання продукту взаємодії барвника з досліджуваною речовиною залишається стабільним у 10-кратному діапазоні концентрацій.

Прилади та матеріали:

Стакани хімічні 50, 100 мл
Колба мірна 200 і 1000 мл
Лійка для фільтрування
Флакони для розчинів 10 мл
Піпетка мірна 5 мл
Піпет-дозатор 0,1–1 мл
Мірний циліндр 50/100 мл
Кювети скляні або пластикові 1 мл
Спектрофотометр (або фотометр із фільтром 572/595 нм)
Фільтрувальний папір

Реагенти:

Натрій гідроксид NaOH, 1 М р-н
Кумассі діамантовий синій G-250
Етиловий спирт
Ортофосфатна кислота H_3PO_4 ,
85% р-н
Альбумін
Дистильована вода

Перебіг роботи

Приготування розчину реагенту Бредфорда

Розчинити 0,1 г барвника Кумассі діамантового синього G-250 у 50 мл 95% етилового спирту, додати 100 мл 85% H_3PO_4 . Після повного розчинення барвника дистильованою водою довести об'єм розчину до 1 л. Перш ніж використовувати, розчин реагенту Бредфорда бажано профільтрувати.

1. Ввімкнути спектрофотометр за 20–30 хв до використання.
2. Підготувати (розвести) розчини невідомого протеїну, щоб отримати зразок із приблизним вмістом протеїну в межах 0,05–1 мг.
3. За потреби⁶ додати рівний об'єм 1 М розчину NaOH до кожного зразка розчину протеїну, ретельно перемішати.
4. Приготувати калібрувальні розчини протеїну (альбумін або гамма-глобулін найбільш придатні для калібрування) об'ємом 1 мл із вмістом

⁵ Барвник Кумассі діамантовий синій G-250 реагує здебільшого із залишками аргініну, а також гістидину, лізину, тирозину, триптофану та фенілаланіну. Отже, такий метод більш чутливий до альбумінів і глобулінів. Для суміші протеїнів точність методу знижується удвічі. Окрім того, точність знижується щодо сильно основних і кислих протеїнів.

⁶ Додавання 1 М розчину NaOH запропоновано Stoschecky в 1990 році для стабілізації протеїнів клітинних мембран і зменшення впливу взаємодії між молекулами протеїнів на показник поглинання досліджуваних розчинів.

протеїну від 0 до 1 мг/мл. Якщо для приготування досліджуваного зразка використовували NaOH, до калібрувальних розчинів протеїну також необхідно додати такий самий об'єм 1 М розчину NaOH.

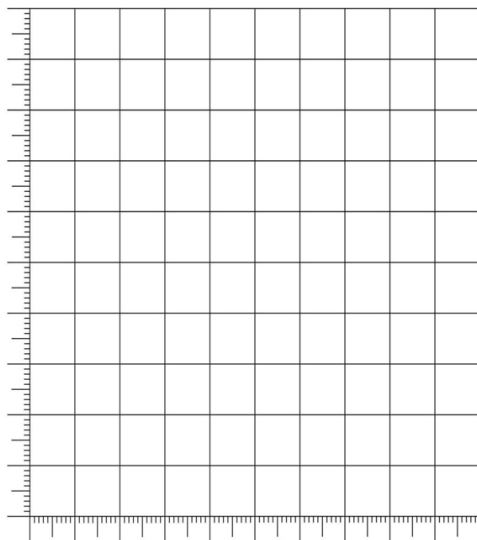
5. Додати до кожного зразка по 5 мл розчину реагенту-барвника, перемішати, витримати 5 хв.
6. Кювету заповнити **нульовим зразком** (вміст протеїну 0 мг у 1 мл) і встановити поглинання спектрофотометра за довжини хвилі 572 або 595 нм на позначку $A = 0,000$.
7. Виміряти калібрувальні розчини протеїнів з ненульовим вмістом протеїну за довжини хвилі 572 або 595 нм. Записати показники в *таблиці 11*.
8. Ретельно промити та висушити вимірювальну кювету.
9. Побудувати графік залежності поглинання від вмісту протеїну в зразку.
10. Виміряти поглинання невідомого зразка протеїну. Якщо показник A перебуває в діапазоні поглинання калібрувальних зразків, за допомогою калібрувального графіка (або методом найменших квадратів) визначити вміст протеїну в зразку.
11. Якщо поглинання перевищує показники A відомих зразків протеїнів, розвести досліджуваний зразок і повторити вимірювання⁷.

Таблиця 11

№ зразка	Вміст протеїну, мг/мл	Поглинання A	№ зразка	Вміст протеїну, мг/мл	Поглинання A
1	0	0,000	8		
2	0,2		9		
3	0,4		10		
4	0,6		11		
5	0,8		12		
6	1		13		
7	—		14		

⁷ Для деяких зразків протеїнів процедуру розведення / вимірювання потрібно повторювати кілька разів, щоб отримати правильний результат.

Калібрувальний графік (метод Бредфорда)

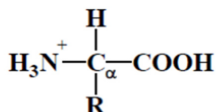


Контрольні запитання

1. Пригадавши хімічну будову протеїнів та уважно роздивившись будову молекули барвника Кумассі G-250, спробуйте запропонувати можливі варіанти взаємодії між барвником і протеїнами, що дають змогу використовувати цей метод для кількісного аналізу протеїнів.
2. Яка структурна особливість барвника Кумассі дає змогу використовувати його для аналізу в кислому середовищі (розчин ортофосфатної кислоти)? Відповідь поясніть.

Лабораторна робота 6**Визначення констант дисоціації та ізоелектричної точки амінокислот і протеїнів методом титриметрії**

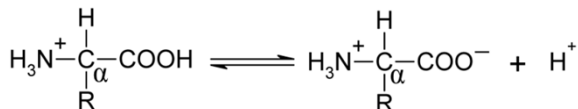
Кожна амінокислота містить у своєму складі щонайменше дві групи, здатні до іонізації: α -аміно- й α -карбоксильну групи. У кислому середовищі молекули амінокислоти протонуються за аміногрупою і мають загальну структуру:



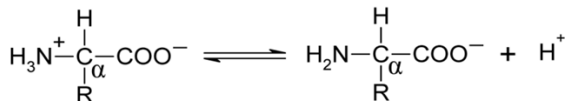
Під час титрування сильною основою протонованої форми амінокислоти вони поведуться як двоосновні кислоти, тобто можуть віддавати два протони – H^+ протонованої форми аміногрупи та H^+ карбоксильної групи. Основність амінокислоти може бути більше ніж два, якщо в бічному ланцюзі ($-\text{R}$) присутні інші функціональні групи, здатні до іонізації.

Надалі ми зосередимося на найпоширенішому випадку – амінокислотах як двоосновних кислотах. Іонізація такої двоосновної кислоти відбувається у дві стадії.

На стадії (I) у разі підвищення рН відбувається депротонування карбоксильної групи катіонної форми амінокислоти з утворенням електронейтральної молекули із двома осередками протилежних зарядів:



На стадії (II) ця «двоіонна» форма амінокислоти депротонується і перетворюється на аніон:



Атом Н, зв'язаний з атомом С, не здатний до дисоціації через неіонну природу зв'язку С–Н.

Послідовність процесів дисоціації залежить від кислотності протонів. Першим дисоціює більш «кислий» протон за реакцією з нижчим значенням величини pK_a . Тому в молекулі амінокислоти протон α -COOH групи (pK_{a1}) дисоціюватиме раніше, ніж H^+ α -NH₃-групи (pK_{a2}).

За такої умови крива титрування – залежність рН розчину амінокислоти від ступеня її нейтралізації сильною основою – має характерний вигляд із двома плато: ділянки кривої із суттєво повільною зміною рН за збільшення кількості доданого титранту (рис. 29). За наявності у структурі молекули амінокислоти додаткових функціональних груп, здатних до іонізації (–COOH та/або –NH₂ груп), кількість плато може збільшуватися.

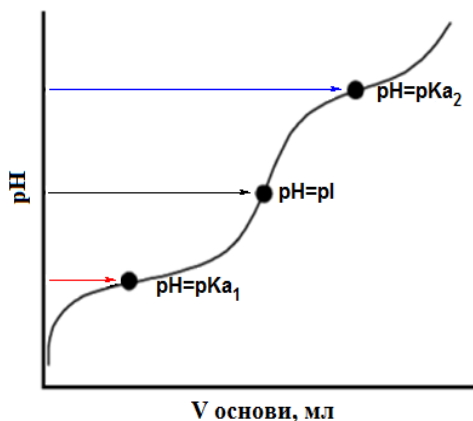


Рис. 29. Крива кислотно-основного титрування

Наявність плато поблизу значень pK_{a1} і pK_{a2} свідчить про буферні властивості амінокислот у відповідних діапазонах рН. Крива титрування окрім величин pK_{a1} і pK_{a2} дає змогу визначити ще одну важливу характеристику амінокислоти – значення рН, за якого дисоціація протонів карбоксильних груп вже майже завершилася, а депротонування аміногруп ще не розпочалося. Молекула амінокислоти перебуває в іонізованій формі, однак сумарний заряд молекули дорівнює нулю. Така іонізована форма молекул має назву цвітер-іонів, а відповідне значення рН називається ізоелектричною точкою (pI). Величину pI можна визначити за експериментальною кривою як точку перегину кривої в області між pK_{a1} і pK_{a2} . Її теоретичне значення також можна розрахувати як середнє арифметичне значень pK_{a1} і pK_{a2} .

Посуд і обладнання:

Бюретка 25 мл 2 шт.
Піпетка 25 мл 1 шт.
Колба конічна 150–250 мл 2 шт.
рН-метр
Магнітна мішалка
Штатив

Реактиви:

Розчин амінокислоти 0,2 М
Хлоридна кислота HCl, 1 М р-н
Натрій гідроксид NaOH, 1 М р-н
Дистильована вода

За наведеною методикою можна також титрувати протеїни, визначити відповідні характеристики. Для цього використовують більш розбавлені розчини титрантів – з концентрацією 0,1 М. Після додавання кожної порції титранту ретельно перемішують реакційне середовище. Інтервал між додаванням кожної нової порції титранту має бути не меншим ніж 30 с.

Перебіг роботи

Частина 1. Побудова кривої титрування

А. Титрування амінокислоти 1,0 М розчином HCl

1. Заповнити бюретку розчином титранту – 1 М розчином хлоридної кислоти.
2. За допомогою піпетки відібрати 25 мл 0,2 М розчину амінокислоти в конічну колбу (хімічний стакан). У ємність із титрантом занурити магнітний стержень, помістити його на мішалку, опустити електрод рН-метра в досліджуваний розчин, закріпити його в штативі.
3. Виміряти вихідне значення рН розчину амінокислоти, записати дані в таблиці 12.
4. За допомогою бюретки додати до досліджуваного розчину 0,5 мл титранту. Перемішати вміст колби магнітною мішалкою. Після цього виміряти значення рН розчину. Записати об'єм доданого титранту і відповідне значення рН у таблиці 12.
5. Повторити процедуру, описану в пункті 4, додаючи титрант фіксованими порціями та вимірюючи рН після кожної порції титранту. Продовжити титрування, поки значення рН не наблизиться до 1,5.

Із першими порціями титранту значення рН змінюватиметься суттєво. За наближення до pK_a зміна рН відбуватиметься повільніше. За такої умови порцію титранту можна збільшити до 1 мл.

Б. Титрування розчину амінокислоти 1 М розчином NaOH

- Повторити процедуру, описану в розділі (А), використовуючи свіжу порцію досліджуваного розчину та 1 М розчин натрій гідроксиду як титрант. Титрувати, доки значення рН не наблизиться до 13.

Частина 2. Визначення значень pK_a та pI

- За допомогою програмного забезпечення (MSExcel або іншої програми) за отриманими експериментальними значеннями побудувати графік залежності рН від кількості доданих титрантів, як показано на рис. 30.
- На отриманому графіку позначити буферні зони, pK_a і pI . Визначити величини pK_a іонних груп і pI амінокислоти.

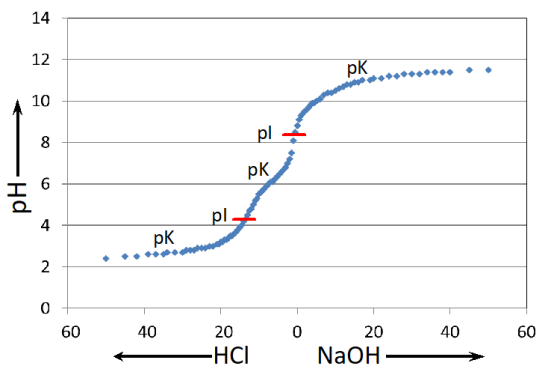


Рис. 30. Криві кислотно-основного титрування цвіттер-іонної форми амінокислоти

Таблиця 12

1 М HCl				1 М NaOH			
V, ml	pH	V, ml	pH	V, ml	pH	V, ml	pH

1 M HCl				1 M NaOH			
<i>V, ml</i>	<i>pH</i>	<i>V, ml</i>	<i>pH</i>	<i>V, ml</i>	<i>pH</i>	<i>V, ml</i>	<i>pH</i>

Контрольні запитання

1. Чи різняться криві титрування сильною основою розчину сильної кислоти і кислого розчину амінокислоти? Із чим це пов'язано?
2. Використовуючи отриману криву титрування та структурну формулу молекули амінокислоти, поясніть хімічні перетворення, що відбуваються з амінокислотою за умови зміни pH середовища, і їх відповідність знайденим значенням pK і pI .
3. Чи буде різнитися графік залежності $pH(V_{\text{титр}})$ для гліцину і глютамінової кислоти? Чому?

ФЕРМЕНТАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ

Протеїни є важливим класом полімерних біомолекул, що виконують різноманітні функції в живих організмах. Окреме місце посідають специфічні протеїни – **ферменти** (або **ензими**). Основна роль ферментів – прискорювати різноманітні хімічні реакції, що відбуваються в живих організмах. Отже, ферменти є своєрідними біокаталізаторами.

Ферментам притаманні всі фізико-хімічні й хімічні властивості протеїнів: висока молекулярна маса, здатність розщеплюватися на амінокислоти під час гідролізу, утворювати колоїдоподібні розчини, слабка стійкість до впливу підвищених температур, здатність осаджуватися солями важких металів тощо.

Залежно від хімічного складу ферменти поділяють на прості і складні. Прості ферменти – протеїни, побудовані лише із залишків амінокислот. Складні ферменти – великі молекули складної будови, поліпептидний ланцюг яких додатково з'єднаний з іншими молекулами непротеїнової будови, які називаються **коферментами** (**коензимами**). Зазвичай кофермент з'єднується із протеїновою частиною ферменту (апоферментом) слабким нековалентним зв'язком, що здатен легко розщеплюватися. Іноді вони з'єднуються міцним ковалентним зв'язком, утворюючи **простетичні групи**, що залишаються приєднаними до молекули протеїну впродовж усієї каталітичної реакції. Функції коферментів часто виконують вітаміни.

Прискорення хімічних перетворень речовин під дією ферментів пояснюється зменшенням кількості енергії (енергії активації), яку необхідно надати молекулам, щоб вони стали здатними до реакції. Наприклад, для розриву 1 моль зв'язків C–N у лабораторних умовах потрібно витратити близько 210 кДж. У природі завдяки ферментам-каталізаторам на цей процес витрачається лише 42–50 кДж.

Між біокаталізаторами (ферментами) і звичайними каталізаторами неорганічної природи, що створені людьми, існують спільні й відмінні ознаки.

Спільним є те, що вони:

- можуть каталізувати лише термодинамічно можливі реакції і прискорюють ті реакції, що можуть відбуватися і без них, але більш повільно;
- не витрачаються під час реакції і не входять до складу кінцевих продуктів;
- не змішують хімічної рівноваги, а лише прискорюють її настання.

Для ферментів характерні деякі специфічні властивості, яких не мають неорганічні каталізатори. Ферменти:

- більш ефективні, ніж звичайні небіологічні каталізатори; кожна молекула ферменту може виконувати від 10^3 до 10^7 «операцій» за 1 с і прискорювати реакції в 10^5 до 10^{10} разів;
- чутливі до температури; максимальна ефективність більшості ферментів спостерігається за температури 37–40 °C; з підвищенням температури активність ферментів знижується і згодом зовсім зникає; за температури 80 °C ферменти незворотно втрачають активність і руйнуються; за зниження температури активність ферментів теж падає; коли температура опускається нижче за 0 °C, ферменти втрачають активність, але не руйнуються і можуть набути активності після обережного нагрівання до потрібної температури;
- рН-чутливі, тобто виявляють свою активність за певної концентрації іонів H^+ ; оптимальна активність більшості ферментів спостерігається в середовищі, близькому до нейтрального (рН від 6 до 8);
- характеризуються високою специфічністю (селективністю); кожен фермент діє лише на окрему речовину (субстрат) і каталізує лише одну «свою» реакцію; вибірковість дії ферментів визначається їх протеїновою складовою;
- є каталізаторами з регульованою активністю. Активність може суттєво змінюватися під впливом деяких хімічних сполук, що прискорюють або уповільнюють реакцію. Як активатори-прискорювачі діють деякі катіони металів, аніони кислот, органічні речовини. Інгібіторами можуть бути катіони важких металів, деякі органічні сполуки.

Усі ферментативні реакції є зворотними, що обумовлено здатністю ферментів каталізувати як пряму, так і зворотну реакцію. Наприклад, фермент ліпаза за певних умов може розщепити жир до гліцерину і жирних кислот, а також каталізувати синтез жирів із зазначених продуктів розпаду.

Ферментативні реакції поділяються на анаболічні (реакції синтезу) і катаболічні (реакції розпаду). Сукупність усіх цих процесів у живому організмі називається метаболізмом.

За типом ферментативних реакцій усі ферменти поділяють на шість класів:

- **оксидоредуктази** – каталізують окисно-відновні реакції (перенесення електронів і атомів водню від одних субстратів на інші);
- **трансферази** – прискорюють реакції трансферації (перенесення хімічних груп від одних субстратів на інші);
- **гідролази** – прискорюють реакції гідролізу (розщеплення субстратів за участю H_2O);
- **ліази** – каталізують реакції негідролітичного та неокисного розпаду (розщеплення зв'язків C–C, C–O, C–N, C–S тощо; розриву й утворення подвійних зв'язків) різних молекул без участі H_2O і без використання енергії АТФ;
- **ізомераз**и – впливають на швидкість реакцій ізомеризації (внутрішньо-молекулярне переміщення різних хімічних груп);
- **лігази** – каталізують реакції синтезу (поєднання молекул з використанням енергії АТФ та утворенням нових зв'язків);
- **транслокази** – беруть участь у перенесенні іонів та нейтральних молекул крізь клітинну мембрану або активують процес розподілу цих «цеглинок» у мембранах клітин.

Ферменти відіграють важливу роль у всіх процесах життєдіяльності, спрямовуючи та регулюючи обмін речовин живих організмів. Їх широко використовує людина в харчовій (виноробство, сироваріння, виготовлення продуктів швидкого приготування тощо), легкій (виробництво шкіряних виробів), хімічній (біохімічні технології, пральні засоби), фармацевтичній і косметичній (ферментні препарати, косметичні засоби) промисловості, сільському господарстві (виготовлення кормів) і високих технологіях (генна інженерія).

Лабораторна робота 1

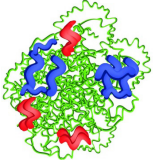
Ферментативна коагуляція казеїну

Однією з найважливіших особливостей ферментів як каталізаторів є висока активність і специфічність. Серед розмаїття протолітичних ферментів, що беруть участь у розщепленні протеїнів, деякі ферменти здатні каталізувати руйнування пептидного ($-NH-CO-$) зв'язку лише між певними амінокислотними залишками (таблиця 13). Зокрема, зазначене стосується основних ферментів, що їх виробляють шлункові залози в організмі людини і деяких тварин. Ці ферменти – пепсин і хімозин – відповідають за розщеплення протеїнів у процесі травлення. Незважаючи на подібність «місії» і «місця робо-

ти» таких ферментів, вони відрізняються за специфічністю дії і роллю, що виконують. Так, пепсин, який каталізує гідроліз $-NH-CO-$ зв'язків протеїнів, особливо ефективний щодо пептидних зв'язків, утворених залишками ароматичних амінокислот фенілаланіну і тирозину.

Пепсин розщеплює майже всі природні протеїни, за винятком кератину і колагену. Протолітична активність пепсину спостерігається в області $pH < 6$, сягаючи максимуму в інтервалі $pH = 1,5-2$. Фермент є високоактивним – 1 грам пепсину здатний розщепити близько 50 кг яєчного альбуміну за дві години.

Таблиця 13

Назва	Тип		
	Шлунковий фермент		Фермент підшлункової залози
	Пепсин	Хімозин (ренін)	Трипсин
Будова			
Молекулярна маса ⁸	~34500	~36000	~24000
Кількість залишків амінокислот	340	323	223
Ізoeлектрична точка (або втрата активності)	> 6,5	> 7	10,8
pH максимальної активності	1,9–3,9	3–5	7,8–8

Шлунковий сік немовлят, а також секрет четвертого відділу шлунка телят та інших жуйних тварин містять інший, відмінний від пепсину фермент – ренін (хімозин). Це перший фермент, що був виділений у хімічний спосіб. Данський учений Крістіан Хансен виділив його з висушеного шлунка теляти за допомогою екстракції сольовим розчином. Відділ шлунка жуйних тварин,

⁸ Молекулярна маса ферментів залежить від джерела їх отримання.

в якому ренін виробляється, називається сичутом. Тому фермент отримав свою побутову назву – сичужний фермент.

На відміну від пепсину ренін є більш специфічним (вузькоспеціалізованим) ферментом. Основним його субстратом є протеїн молока – казеїноген. Водночас ренін є слабшим протеолітом порівняно з пепсином, оскільки розщеплює лише незначну кількість пептидних зв'язків протеїну казеїногену.

Оптимальною кислотністю середовища для реніну є значення рН у межах 3–5. Під дією ферменту розчинний казеїноген перетворюється на нерозчинний казеїн – відбувається згурджування молока. Механізм цього процесу детально не вивчений. Вважають, що під дією ферменту розчинний казеїноген молока перетворюється на параказеїн, що разом з наявними в молоці іонами Ca^{2+} утворює нерозчинну сіль і випадає в осад (утворює гель).

Наявність реніну в шлунковому соку немовлят має важливе фізіологічне значення, оскільки після зсідання молока – основного продукту харчування дітей цього віку – різко уповільнюється його проходження шлунково-кишковим трактом. Як наслідок, воно довше перебуває під впливом ферментів протеїназ (інакше кажучи – повніше перетравлюється).

Окрім фізіологічних потреб сичужні ферменти мають ще й іншу значущість для людини. Їх широко використовують у сироварінні. Основним джерелом сичужних ферментів є шлунки молодих телят (віком до 10 днів). Проте цей фермент, що дістав назву «мікробіальний ренін», також можна отримати з деяких штамів грибів. Останнім часом завдяки досягненням біотехнологій і генної інженерії з'явилися технології отримання рекомбінантного реніну, синтезованого бактеріями, з перенесеним до бактерій геном реніну телят.

Ферментативна коагуляція казеїну молока в процесі виробництва сирів потребує забезпечення всіх необхідних умов роботи реніну – оптимальної кислотності молока й достатнього вмісту іонів Ca^{2+} , а також дотримання необхідного температурного режиму гелеутворення (денатурації протеїнів молока). Під час виробництва сиру очевидною стає роль іонів кальцію в утворенні осаду (гелю) казеїну. З молока з низьким вмістом катіонів Ca^{2+} , наприклад від корів, яких годують бідними на кальцій кормами, або через зв'язування катіонів Ca^{2+} внаслідок пастеризації осад протеїнів (гель) не утворюється.

Частина 1. Ферментація молока

Посуд і обладнання:

Стакан хімічний 100 мл 3 шт.
Чашки Петрі 5 см 3 шт.
Піпетки Пастера
Скляні палички
Скальпель
Електроплитка
Термометр

Реактиви:

Зразки молока для дослідження
(свіже, непастеризоване)
Цитратна кислота, 5% р-н
Кальцій хлорид CaCl_2 , 0,5% р-н
Мікробіальний фермент ренін, 0,05% р-н
Етиловий спирт
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Налити в стакан 60 мл холодного молока (температура не має перевищувати 14–15 °С), додати 1,5 мл розчину цитратної кислоти. Ретельно перемішати.
2. Помістити два інші стакани в термошафу, нагріту до температури 34–35 °С.
3. Обережно нагріти молоко до температури 32 °С, постійно перемішуючи. Розділити молоко на три рівні порції по 20 мл, розлити в попередньо підігріті стакани.

Усі подальші операції необхідно проводити швидко, щоб температура молока не знизилася. Для цього стакани можна помістити у водяну баню, нагріту до потрібної температури, або тримати в термошафі з необхідним температурним режимом.

4. Один стакан з молоком закрити чашкою Петрі, поставити знову в термошафу з температурою 34–35 °С.
5. У другий стакан додати 0,5 мл 0,5% розчину CaCl_2 , перемішати й додати 1 мл розчину ферменту реніну. Швидко перемішати, накрити і помістити стакан у термошафу.
6. У третій стакан додати 1 мл розчину ферменту реніну, швидко перемішати, накрити й помістити в термошафу.
7. Витримати зразки за температури 34–35 °С упродовж 10–15 хв. Потім перевірити консистенцію зразків, порівняти отримані результати, пояснити результати.
8. Отримані гелі казеїну обережно порізати в стакани на прямокутні шматки, нагріти на водяній бані за температури 70–80 °С протягом 30–40 хв для дегідратації гелю.
9. Злити маточний розчин з осаду казеїну й порівняти результат для кожного зразка (кількість первинного гелю, кількість дегідратованого казеїну, кількість сироватки, що утворилася під час нагрівання).

10. Зразок з найбільш міцним і щільним гелем та осадом казеїну використати для подальших досліджень.
11. Для видалення жирів, що зазвичай осаджуються разом з казеїном, додати до осаду протеїну 10–15 мл етилового спирту, перемішати, залишити на 10 хв.
12. Злити шар спирту з осаду протеїну, повторити процедуру з новою порцією етилового спирту.
13. Отриманий знежирений протеїн обережно відчавити шпателем від залишків розчинника, висушити на повітрі чи в термошафі за температури 50–60 °С до постійної ваги.
14. Сухий казеїн зважити й розрахувати його вміст w (%) у молоці за рівнянням:

$$w = \frac{m_{cas}}{m_{milk}} \times 100\%,$$

де

m_{cas} – маса сухого зразка казеїну (г);

m_{milk} – маса порції молока, з якого висаджено казеїн (г; густина $\rho = 1,028$ г/см³).

15. Усі дані про результати спостереження записати в таблиці 14.

Таблиця 14

Показник	Зразок № 1	Зразок № 2	Зразок № 3
Наявність гелю			
Умовна міцність гелю			
Поведінка під час нагрівання			
Кількість осаду казеїну			
Кількість видаленої сироватки			
Маса сухого казеїну, г			
Вміст казеїну в молоці, %			

Контрольні запитання

1. До яких сполук належать ферменти за своєю хімічною будовою? Яка функція ферментів у живих організмах?
2. До якого типу ферментів належать пепсин, трипсин і хімосин? Яку реакцію вони прискорюють і яку функцію виконують?
3. Які головні умови ферментативної коагуляції протеїну? Спробуйте пояснити, чому зазначені умови впливають на процес осадження казеїну.
4. Чому наявність ферменту реніну в шлунковому соку немовлят є надзвичайно важливою? Дайте розгорнуту відповідь.

Частина 2. Кислотний гідроліз казеїну⁹

Посуд і обладнання:

Пробірка
Піпетки Пастера
Шпатель
Електроплитка
Водяна баня
Термометр

Реактиви:

Зразок казеїну
Хлоридна кислота HCl, конц.
Натрій гідроксид, NaOH, 20% р-н
Універсальний індикаторний папір
Дистильована вода

Перебіг роботи

1. Наважку 0,2 г сухого казеїну помістити в пробірку з пробкою і вертикальною скляною газовідвідною трубкою, додати 2 мл концентрованої HCl і 1 мл дистильованої води.
2. Суміш добре перемішати, щоб зразок протеїну повністю просочився кислотою.
3. Пробірку нагріти на водяній бані за температури 90–95 °C до повного розчинення зразка казеїну (не перемішувати).
4. Постійно нагріваючи, витримати реакційну суміш у таких умовах упродовж 24 год. Нагрівати можна з перервами, але загальний час нагрівання має бути не менше 24 год.
5. Отриманий гідролізат казеїну нейтралізують 20% розчином NaOH до pH = 7 (універсальний індикатор).

⁹ Для дослідження можна обрати зразок будь-якого протеїну.

Контрольні запитання

1. Що таке реакція гідролізу? Які види реакцій гідролізу за їх механізмом ви знаєте? Які сполуки беруть участь у такій реакції? Наведіть приклади сполук, що піддаються гідролізу.
2. Завдяки якій структурній особливості молекули казеїну здатні брати участь у реакції гідролізу?
3. Які продукти утворюються внаслідок перебігу реакції часткового і повного гідролізу казеїну? Відповідь поясніть.

Частина 3. Визначення амінокислотного складу казеїну методом паперової тонкошарової хроматографії

Посуд і обладнання:

Стакан хімічний 100, 500 мл
Мірний циліндр 50 мл
Піпетки Пастера
Капілярні піпетки
Хроматографічний папір
Олівець
Лінійка
Офісний папір А4
Степлер
Біндери канцелярські
Електроплитка
Фольга алюмінієва
Латексні рукавички
Фен

Реактиви:

Амінокислоти, 5% р-ни
Зразок гідролізату протеїну
Бутан-1-ол
Оцтова кислота CH_3COOH
Нінгідрин, 0,5% р-н в етанолі
Дистильована вода

Перебіг роботи

Приготування елюенту

Змішати 40 мл бутан-1-олу і 10 мл CH_3COOH . До 45 мл отриманої суміші додавати краплями дистильовану воду, ретельно перемішуючи суміш, до появи легкої опалесценції (помутніння). До отриманої суміші, перемішуючи, краплями додати декілька крапель вихідної суміші розчинників до зникнення каламуті й отримання прозорого розчину.

Виконання експерименту

1. Усі роботи з хроматографічним папером проводити винятково в латексних рукавичках! Чому це обов'язкова умова?
2. Підготувати аркуш хроматографічного паперу розміром $13 \times 18,5$ см. **Увага! Тримати аркуш можна лише за одну з довгих (18,5 см) сторін, яка буде «верхньою» частиною аркуша. Розмістити хроматографічний папір на чистому аркуші білого паперу А4 (не класти хроматографічний папір на стіл!).**
3. Намалювати олівцем лінію на відстані 1,5 см від нижнього краю. Це буде «лінія старту». Із протилежного боку аналогічно провести «лінію фінішу» (коли фронт розчинника торкнеться або наблизиться до цієї лінії, процес хроматографування зупиняють).
4. Уздовж лінії старту зробити невеликі вертикальні позначки, як зображено на *рис. 31*. Позначки зразків для хроматографування можна зробити олівцем у верхній частині хроматографічного паперу.
5. Для нанесення розчинів зразків користуватися невеликими капілярними трубочками. Для кожного зразка потрібно брати окремий капіляр.
6. Серед зразків мають бути гідролізат невідомого протеїну і розчини окремих амінокислот – речовини-«свідки», за допомогою яких можна дійти висновків про амінокислотний склад протеїну.
7. Дотримуючись позначок на лінії та підписів зразків у верхній частині аркуша, нанести кожен зразок на хроматографічний папір. Для цього обережно торкнутися капіляром зі зразком розчину визначеного місця на поверхні хроматографічного паперу. Розмір плями розчину має бути діаметром приблизно 2–3 мм.
8. Зачекати, поки нанесена проба повністю висохне, після цього процедуру повторити кілька разів (оптимально: 7–10 разів).

Увага! Дочекайтеся повного висихання проби, перш ніж наносити нову порцію зразка. Сушіння можна прискорити за допомогою звичайного побутового вентилятора або фена.

9. Після нанесення всіх досліджуваних зразків на визначені місця на хроматографічному папері залишити його на 5–10 хв для повного висихання.
10. Згорнути папір у циліндр так, щоб нанесені зразки і «стартова лінія» були на зовнішньому боці циліндра. Скріпити його степлером так, щоб краї паперу не перетиналися й не торкалися один одного, як показано на *рис. 32*.

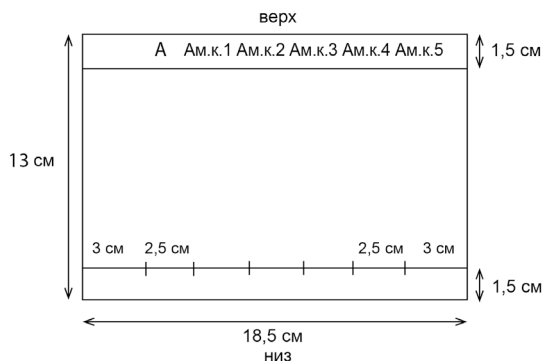


Рис. 31.
Схема нанесення зразків при аналізі
амінокислотного складу казеїну методом паперової ТШХ

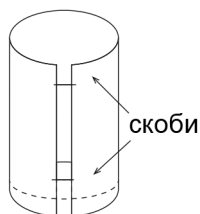


Рис. 32.
Підготовка хроматографічного
паперу зі зразками до процедури
хроматографування

11. Налити в хроматографічну камеру (високий стакан на 500 мл) 50 мл елюенту – суміші бутан-1-ол/ CH_3COOH = 4:1 (об.), насиченої водою.
12. Помістити циліндр із хроматографічного паперу всередину склянки так, щоб його нижній край занурився в розчинник на 3–5 мм.
13. Упевнитися, що папір не торкається стінок камери.
14. Щільно закрити горловину камери шматком алюмінієвої фольги.
15. Процес хроматографування триває 60–75 хв. **Протягом цього часу НЕ МОЖНА ТОРКАТИСЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ КАМЕРИ і ПЕРЕСУВАТИ її. Можна лише спостерігати за рухом розчинника папером.**
16. Після завершення хроматографування паперовий циліндр вийняти із хроматографічної камери, позначити олівцем лінію розчинника (якщо не збігається з «лінією фінішу»).
17. Розмістити циліндр на чистому аркуші білого паперу, залишити до повного висихання.
18. Після повного висихання хроматограми зняти скоби, підвісити її за допомогою біндерів у витяжній шафі або на відкритому повітрі.
19. За допомогою пульверизатора рівномірно нанести розчин нінгідрину на поверхню хроматограми, уникаючи її намокання.
20. Помістити хроматограму на 5 хв у термошафу, нагріту до 80 °С.
21. Обвести олівцем плями всіх амінокислот, виміряти відстань від «лінії старту» до центра кожної плями (l) і відстань від «лінії старту» до лінії фронту розчинника (L) (лінія фінішу). Розрахувати коефіцієнт рухомості R_f для кожної амінокислоти:

$$R_f = \frac{l}{L}.$$

22. Згідно з отриманими даними розшифрувати амінокислотний склад казеїну, записати результати в таблиці 15.

Таблиця 15

Коефіцієнт рухомості R_f			Амінокислота
Гідролізат 1 _____	Гідролізат 2 _____	Гідролізат 3 _____	

Контрольні запитання

1. Подумайте, чому метод тонкошарової і паперової хроматографії є одним з найбільш вживаних методів аналізу сумішей сполук?
2. Який хімічний реагент дає змогу визначити місця розташування окремих амінокислот на хроматограмі? Поясніть це з хімічної точки зору.
3. Чи можливо ідентифікувати окремі амінокислоти у складі казеїну реакцією з нінгідрином чи іншими реагентами без попереднього гідролізу молекул протеїну? Дайте розширене пояснення.

Лабораторна робота 2

Ферментативна деструкція протеїнів під дією рослинних ферментів

Протеїни є важливим «будівельним» матеріалом для нашого організму – від компонентів клітин до важливих біологічно активних молекул. Наш організм самотужки синтезує все розмаїття необхідних йому протеїнів з відповідних амінокислот.

Основним джерелом цих «цеглинок» є протеїни продуктів харчування, що ми споживаємо. Це важливе джерело незамінних амінокислот, які наш організм не здатний синтезувати самостійно. Щоб використовувати «заховані» у протеїнах амінокислоти, організму спершу потрібно «розібрати» на окремі складові амінокислотні ланцюги протеїнів, що потрапили з їжею. Дуже важливо, щоб організм перетворив цю «сировину» саме на необхідні для синтезу «реагенти» – амінокислоти.

На допомогу організму приходять ферменти – високоспецифічні біокаталізатори, що належать до групи протолітичних ферментів (протеаз), які розщеплюють пептидні --NH--CO-- зв'язки між залишками амінокислот у молекулі протеїну та перетворюють їх на вільні амінокислоти, або олігопептиди (невеликі за розміром молекули, що складаються з кількох амінокислотних залишків).

До групи протеаз входять різноманітні ферменти, що відрізняються будовою каталітично активної частини молекули і здатні «працювати» по-різному. Так, протолітичні ферменти залежно від принципів роботи поділяють на пептидази (екзопептидази, які розщеплюють переважно зовнішні --NH--CO-- зв'язки протеїнів) і протеїнази (ендопептидази, що розщеплюють внутрішні --NH--CO-- зв'язки в молекулі протеїнів). Деякі протеїнази також відрізняються субстратною селективністю – здатністю гідролізувати зв'язки між залишками деяких амінокислот.

Препарати протолітичних ферментів застосовують у лабораторіях, щоб визначати будову протеїнів і пептидів, у харчовій (для пом'якшення м'яса, у сироварінні) і легкій (видалення вовни зі шкур, пом'якшення шкіри) промисловості, медицині (розсмоктування тромбів, видалення катаракти, лікування розладів травної системи).

Сировиною для отримання ферментів є різноманітний біологічний матеріал – мікроорганізми, тканини рослин і тварин. Деякі протолітичні ферменти, здатні гідролізувати --NH--CO-- зв'язки колагену, можна знайти у ві-

домих нам рослинах. Препарати, виготовлені на основі рослинної сировини, широко використовують у харчовій промисловості для пом'якшення м'яса. Продукти з високим вмістом протеаз також входять до складу рецептів різноманітних маринадів для м'яса, якими користуються в домашніх умовах.

Найвідомішими рослинними протеазами, доступними для домашнього використання, є:

- *бромелайн*, що міститься в рослинах родини бромелієвих, представником яких є ананас;
- *панайн*, що міститься в плодах динного дерева папайя;
- *актинідин*, що міститься в рослинах родини актинідієвих, представником якої є усім відомий ківі.

Посуд і обладнання:

Хімічний стакан 50 мл	3 шт.
Мірна колба 200 мл	
Мірний циліндр 10 мл	
Пробірки з корками	5 шт.
Лійка для фільтрування	
Піпетки Пастера	
Магнітна мішалка зі стержнем	
Фільтрувальний папір	
Тертка	
Лінійка	
Водяна баня	
Електроплитка	

Реактиви:

Желатин швидко розчинний
Агар
Білок курячого яйця
Свіже м'ясо
Ківі
Дистильована вода

Перебіг роботи

А. Приготування 5% гелю желатину (гель необхідно приготувати напередодні виконання роботи)

1. У хімічному стакані зважити 0,25 г желатину. Відміряти 5 мл дистильованої води, влити невеликими порціями (по 1–2 мл) до наважки желатину. Перш ніж додавати наступну порцію води, упевнитися, що желатин увібрав усю попередню порцію води. Після додавання всього об'єму води (5 мл) отриману гелеподібну суміш повільно нагріти до повного розчинення желатину й утворення прозорого розчину. Не допускати перегрівання розчину до температури понад 60–70 °С.
2. Розлити отриманий розчин у дві пробірки. Поставити в холодне місце, щоб гель застиг.

Б. Приготування гелю агару (для роботи знадобиться розчин з масовою концентрацією агару 1,5%)

1. У хімічний стакан необхідного об'єму помістити наважку 0,15 г агару, додати 10 мл дистильованої води, витримати протягом 20–30 хв, поки полімер набухне. Отриману суміш нагріти до температури 90–95 °С і витримати, постійно перемішуючи, до повного розчинення агару з утворенням прозорого в'язкого розчину.
2. У пробірку за допомогою піпетки Пастера відібрати 2 мл *гарячого* розчину агару, розмістити її в прохолодному місці для утворення гелю.

В. Приготування проби яєчного білка

1. Обережно відокремити білок від жовтка. Невелику порцію білка (близько 2 мл) помістити в пробірку, витримати у водяній бані, що кипить, до завершення теплової денатурації білка й утворення щільного білого згустка (приблизно 5–7 хв).

Г. Приготування розчинів ферменту (Ферм і Ферм*)

1. Для отримання екстракту половину очищеного від шкірки плода ківі ретельно подрібнити. До кашки додати 10–15 мл дистильованої води, перемішати, відфільтрувати сік, який знадобиться для подальших експериментів (*Ферм*).

Примітка. Якщо ви плануєте використовувати готові очищені ферменти (у вільному продажу можна знайти ферменти рослинного походження – бромелайн, актинідин, папаїн, або специфічні ферменти протеази, виділені з бактерій або грибів), приготуйте їх розчин з концентрацією в межах 1–5 мг/мл шляхом тривалого інтенсивного перемішування наважки ферменту в дистильованій воді за кімнатної температури. Щоб поліпшити розчинення й посилити активність, можете додати CH_3COOH , розведenu до $\text{pH} = 5\text{--}6$. Щоб перевірити активність ферменту, знадобиться не більше ніж 20 мл його розчину.

2. Щоб визначити вплив термічної обробки на активність ферменту, 10 мл свіжого соку ківі прогріти протягом 10 хв за температури 60 °С, а потім охолодити. Активність отриманого термообробленого ферменту (*Ферм**) перевіряють на 5% гелі желатину.

Г. Проведення експерименту

1. На кожній пробірці з гелем або зразком денатурованого яєчного білка тонким маркером позначити верхню межу зони гелю (за нижнім меніском!).

Якщо визначити меніск складно, можна виконати цю процедуру відразу після додавання робочих розчинів (див. п. 2).

2. Шматочок свіжого м'яса (приблизно 1 см × 1 см) зважити, помістити в пробірку. Такий самий шматочок м'яса зважити і зберігати в холодильнику в закритому посуді – це буде контрольний зразок. Результати зважувань записати.
3. В одну з пробірок з гелем желатину, а також у пробірки з агаром, денатурованим яєчним білком і шматочком м'яса, налити по 2 мл свіжого розчину ферменту. В іншу пробірку з гелем желатину налити 2 мл термообробленого екстракту ферменту. Додатково промаркувати пробірки (позначити середовище).
4. За окремі проміжки часу відзначати зміни, що відбуваються в пробірках. Дані про спостереження записати в таблиці 16.

Вплив ферменту на гелі можна помітити за зсувом межі між поверхнею гелю і шаром екстракту порівняно з вихідним маркуванням.

Вплив ферменту на м'ясо визначають, порівнюючи консистенцію та щільність зразка, що піддали впливу ферменту, з контрольним зразком, а також за зміною маси досліджуваного зразка.

Таблиця 16

Пробірка / зразок	Час експерименту і результати спостережень				
	1 год	2 год	4 год	6 год	24 год
1					
2					
3					
4					
5					

Контрольні запитання

1. Що є спільного й відмінного між двома групами ферментів: (1) пепсин, трипсин і (2) бромелаїн, актинідин?
2. Поміркуйте і дайте розгорнуту відповідь на питання, у чому полягає користь великої групи протолітичних ферментів. Спробуйте розглянути це питання як з наукової, так і з практичної для людини точок зору.
3. Грунтуючись на власних знаннях, спробуйте визначити, які функції в рослинах можуть виконувати власні протолітичні ферменти?
4. Чому деякі протолітичні ферменти не впливають на молекули протеїнів і здатні залишати їх у первинному стані?

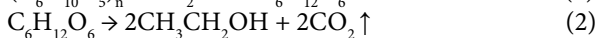
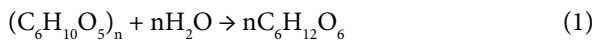
Лабораторна робота 3¹⁰

Властивості протеїнів як каталізаторів. Процес ферментації

Ферментація – загальна назва біохімічних процесів перетворення однієї органічної сполуки на іншу під дією високоактивних природних каталізаторів – протеїнів. Не всі протеїни є каталітично активними. Однак ті, що виявляють каталітичну активність, є надзвичайно ефективними каталізаторами, що перевершують усі відомі каталізатори, створені людиною.

Упродовж кількох тисячоліть людство використовує каталітичну активність протеїнів для власних потреб. Донедавна не уявляли, що забезпечує потрібний результат у деяких звичайних процесах, наприклад, під час випікання хліба, приготування напоїв тощо. Лише за останні 100–150 років людство отримало знання, що дали можливість дослідити такі відомі і звичні процеси, створювати нові технології, щоб покращити й удосконалити сучасне життя.

Із найбільш відомих процесів, у яких протеїни виконують функцію біологічних каталізаторів, виокремимо ферментативний гідроліз полісахариду крохмалю, $(C_6H_{10}O_5)_n$ (рівняння 1) і спиртове бродіння моносахариду глюкози, $C_6H_{12}O_6$ (рівняння 2):



Каталізатором реакції (1) є фермент-протеїн амілаза (рис. 33). Існує кілька типів амілаз, зокрема α -, β - і γ -амілаза, що вирізняються здатністю прискорювати розрив хімічного зв'язку певного типу між молекулами глюкози в її полімерній формі – крохмалі. Цей фермент є в слині людини, деяких тварин, багатьох рослинах і їх насінинах, грибах.

Реакція (2) каталізується дією зимази – суміші різноманітних ферментів-протеїнів, що разом сприяють перетворенню $C_6H_{12}O_6$ і деяких інших вуглеводів на етиловий спирт і CO_2 . Цей процес називається **спиртове бродіння**. Він відомий людству з давніх часів. Багато народів світу використовували його для виготовлення хліба, приготування напоїв для релігійних обрядів.

¹⁰ Конкурсні матеріали 11-ї Міжнародної молодіжної наукової олімпіади, 2–11 грудня 2014 року, Мендоза, Аргентина.

Спиртове бродіння – низка біохімічних реакцій поступового перетворення глюкози (також фруктози, відомої як виноградний цукор, і сахарози – звичайного білого цукру) на етиловий спирт і вуглекислий газ. Як не дивно, і C_2H_5OH , і CO_2 є побічними продуктами такої реакції, але продуктом процесу, що відбувається в клітинах живих організмів, є енергія.

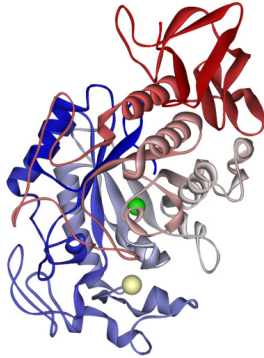


Рис. 33¹¹.
Просторова будова
амілази

Окрім суттєвого практичного значення процесу спиртового бродіння, його важливою ознакою є те, що перебіг такої складної реакції можна дослідити. Адже CO_2 , що утворюється в процесі каталітичної деструкції $C_6H_{12}O_6$, можна виміряти за допомогою доволі простого лабораторного устаткування. Виділити зимазу з природної сировини дуже складно, але можна використати її носій – *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 34), більше відомий нам як дріжджі¹². Цей природний об'єкт бере участь у ферментативному перетворенні вуглеводів в анаеробних умовах (тобто за відсутності кисню).

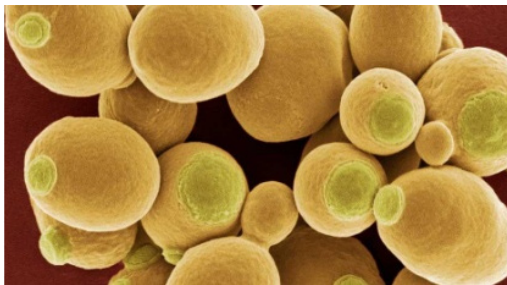


Рис. 34.
Мікрофотографія клітин
дріжджів (*Saccharomyces
cerevisiae*)

¹¹ Жовта кулька на малюнку – це катіон Ca^{2+} , а зелена – аніон Cl^- .

¹² Дріжджі – одноклітинні мікроорганізми з родини грибів, що втратили міцеліальну будову завдяки переважному існуванню в рідких і напіврідких середовищах, збагачених органічними сполуками. Клітини розміром 5–10 мкм мають сферичну або еліптичну форму.

Процес спиртового бродіння є одним з найбільш важливих процесів сучасної біотехнології і використовується для виробництва:

- етанолу, з якого надалі одержують біопаливо;
- хлібобулочних виробів у харчовій промисловості;
- алкогольних напоїв (пиво, вино, горілчані вироби).

Отже, в процесі, який ми моделюємо, замість окремих ферментів скористаємося живими сховищами необхідних протеїнів-ферментів – дріжджами.

Ефективність процесу ферментації (і, відповідно, протеїнів-ферментів, у яких вони беруть участь) можна визначити, вимірюючи об'єм вуглекислого газу, що виділяється в процесі хімічної трансформації глюкози. На основі вимірної кількості CO_2 можна розрахувати кількість $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, що утворився внаслідок ферментації глюкози, а також кількість $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, що взяла участь у цьому процесі.

Посуд і обладнання:

Кристалізатор 1000 мл
Мірний циліндр на 1000 мл
Стакан хімічний 250 мл 2 шт.
Стакан хімічний 1000 мл
Колба Бюхнера 500 мл з корком
Гумова трубка
Скляна паличка
Штатив з лапкою
Гумовий килимок 15 × 15 см
Затискач
Термометр
Годинник

Реактиви:

Глюкоза $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Дріжджі
Індикатор бромтимоловий
синій, 0,1% р-н
Кальцій гідроксид $\text{Ca}(\text{OH})_2$,
насич. р-н
Дистильована вода

Перебіг роботи

А. Збирання вимірювального пристрою (рис. 35)

1. Налити воду в кристалізатор до половини його повного об'єму.
2. Наповнити водою мірний циліндр.
3. Щільно притиснути гумовий килимок до горла циліндра, перекинути його догори дном, постійно тримати циліндр закритим, щоб вода не виливалася. Занурити горло циліндра в кристалізатор нижче за рівень води, прибрати гумовий килимок. **Уникати потрапляння повітря в циліндр.**
4. Закріпити у штативі занурений у воду циліндр. Горло циліндра, заповненого водою, має бути занурене у воду вище ~2 см від дна кристалізатора.

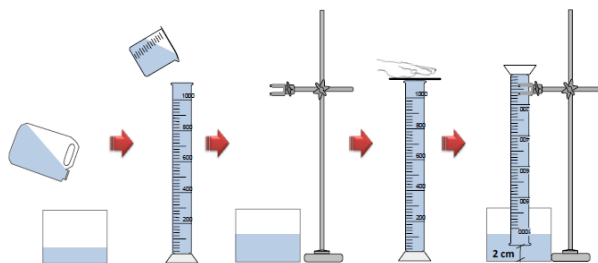


Рис. 35.
Підготування
газовимірювального
циліндра

Б. Збирання реактора для ферментації (рис. 36)

1. Нагріти 700–750 мл води в літровому стакані до температури 35–40 °С. Виміряти точну температуру за допомогою термометра, записати значення в таблиці 17.
2. Підписати обидва стакани на 250 мл літрами «А» і «Б» відповідно.
3. Приготувати Суміш «А» і Розчин «Б», використовуючи підіпріту у великому стакані воду.

Суміш «А»: у стакані, маркованому «А», змішати за допомогою скляної палички 50 г дріжджів і 150 мл теплої (35–40 °С) води. Теплою водою довести об'єм суміші до 250 мл.

Розчин «Б»: у стакані, маркованому «Б», розчинити 4 г глюкози $C_6H_{12}O_6$ у 150 мл теплої (35–40 °С) води. Теплою водою довести об'єм розчину до 250 мл.

4. Перелити в реакційну колбу (колбу Бюхнера) вміст стакану «А». Якщо на стінках або дні стакану будуть помітні залишки суміші «А», обережно сполоснути стакан розчином «Б» і вилити увесь вміст стакану «Б» у реакційну колбу.

Суміш «А» потрібно перенести повністю! Не можна залишати рештки в стаканах «А» і «Б» чи змивати їх вміст теплою водою додатково!

5. Перемішати вміст реакційної колби коловими рухами, щоб рівномірно розподілити складові суміші «А» і розчину «Б». Помістити реакційну колбу на гумовий килимок.
6. Виміряти температуру середовища реакційної колби й записати в таблиці 17.
7. Щільно закрити реакційну колбу гумовим корком.

В. Ферментація глюкози (рис. 37)

1. Обережно вставити вільний кінець гумової трубки в перекинутий вимірювальний циліндр. Кінець трубки має перебувати у верхній частині мірного циліндра.

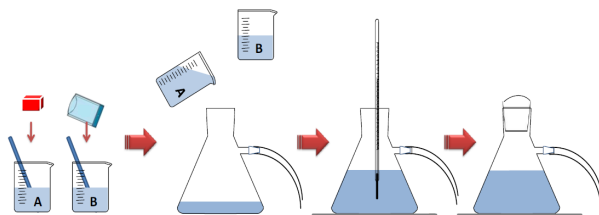


Рис. 36.
Приготування
реакційної
суміші

2. Ретельно перемішати коловими рухами вміст реакційної колби, щоб видалити повітря, яке могло залишитися в гумовій трубці.
3. Записати показник рівня води в циліндрі в *таблиці 17*. Це значення є нульовою точкою для підрахунку об'єму газу, що виділятиметься під час реакції ферментації.
4. Запустити секундомір (це час початку реакції).
5. Протягом усього часу спостереження щохвилини потрібно ретельно перемішувати реакційну колбу коловими рухами впродовж 5 с. Під час перемішування стежити, щоб гумова трубка завжди залишалася у вимірювальному циліндрі.
6. Унаслідок бродіння виділяється газоподібний продукт, більша частина якого гумовою трубкою потраплятиме до градуйованого циліндра. Збільшення кількості газоподібного продукту можна буде бачити за зниженням рівня води в мірному циліндрі.
7. Зміну показників об'єму газу, що виділяється, записувати кожні дві хвилини в *таблиці 17* упродовж 40 хв вимірювань.

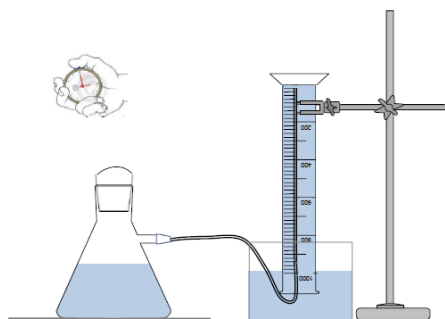


Рис. 37.
Схема проведення
вимірювань

Таблиця 17

Температура води перед приготуванням Суміші «А» і Розчину «Б»: _____ °С		
Температура суміші «А» і «Б» в реакційній колбі _____ °С		
Час, хв	Об'єм газу, що виділився, V, мл	Швидкість виділення газу, F, мл/хв
0		
2		
4		
6		
8		
10		
12		
14		
16		
18		
20		
22		
25		
26		
28		
30		
32		
34		
36		
38		
40		

8. За 40 хв після початку вимірювань перекрити гумову трубку затискачем, щоби припинити подальше надходження газу в мірний циліндр.
9. Вийняти гумовий корок з реакційної пляшки. **Стежити, щоб гумова трубка залишалася в циліндрі.**
10. Додати другу порцію (4 г) сухої $C_6H_{12}O_6$ у реакційну колбу, міцно закрити її гумовим корком.

- Зняти затискач з гумової трубки для відновлення потоку газу до мірного циліндра.
- Перемішати реакційну колбу коловими рухами протягом 30 с для повного розчинення глюкози.

Якщо мірний циліндр заповнений газом менше ніж наполовину, можна продовжувати експеримент. Якщо мірний циліндр заповнений газом більше ніж наполовину, потрібно повністю заповнити його водою, як це зазначено на початку експерименту.

- Продовжити експеримент і вимірювання, щохвилини перемішуючи вміст реакційної колби протягом 5 с.
- Об'єм газу, що виділяється в процесі експерименту, вимірювати щодві хвилини упродовж наступного 10-хвилинного періоду, записуючи результати в таблиці 18.

Таблиця 18

Час, хв	Об'єм газу, що виділився, V , мл	Швидкість виділення газу, $F(t)$, мл/хв
42		
44		
46		
48		
50		

Г. Ідентифікація газоподібного продукту реакцією з $\text{Ca}(\text{OH})_2$

- Після 10 хв вимірювання виїняти гумову трубку з циліндра й занурити її в стакан, заповнений 10–15 мл насиченого розчину $\text{Ca}(\text{OH})_2$.
- Перемішуючи реакційну колбу впродовж 60 с, пропускати газ крізь розчин $\text{Ca}(\text{OH})_2$, спостерігаючи за змінами, що відбуваються в розчині.

Г. Реакція з індикатором бромтимоловим синім

- Виїняти гумову трубку з розчину $\text{Ca}(\text{OH})_2$, занурити її в розчин індикатора бромтимолового синього. Перемішувати вміст реакційної колби протягом 60 с і спостерігати за змінами, що відбуваються з індикатором.
- Розрахувати швидкість виділення газу, F (мл/хв), за рівнянням:

$$F = \frac{V_i - V_{i-1}}{\Delta t},$$

де

V_i – об'єм газу, що виділився за час t (мл);

V_{i-1} – об'єм газу, зафіксований під час попереднього вимірювання (мл);

Δt – часовий проміжок між вимірюваннями (2 хв).

3. Побудувати експериментальні залежності на підставі даних із таблиці 17 і таблиці 18:

Графік А: залежність об'єму газу, що виділився, V (мл), від часу реакції t (хв).

Графік Б: залежність швидкості виділення газу, F (мл/хв), від часу реакції t (хв).

4. Користуючись результатами вимірювань і хімічним рівнянням ферментації, розрахувати масу $C_6H_{12}O_6$, яка перетворилася на CO_2 й етанол упродовж перших 40 хв процесу ферментації. Для розрахунків скористатися такими даними: $Ar_C = 12,00$; $Ar_H = 1,01$; $Ar_O = 16,00$; молярний об'єм газів за нормальних умов – 22,4 л/моль.
5. Розрахувати кількість залишкової глюкози, що не взяла участі в процесі ферментації впродовж перших 40 хв реакції. Це можна зробити так:
 - 5.1. Визначити на *Графіку Б* часові інтервали різних стадій ферментації в межах 0–40 хв від початку ферментації:
 - стадія а – збільшення швидкості газоутворення;
 - стадія б – зменшення швидкості утворення газу;
 - стадія в – постійна швидкість газоутворення.

Для цього на *Графіку Б* на побудованій залежності поставити позначки, що відповідають кожній стадії, і підписати кожен етап.

- 5.2. Розрахувати натуральний логарифм швидкості утворення газу ($\ln F$) на стадії, що характеризується зменшенням швидкості газоутворення (стадія б, *Графік Б*), записати отримані результати в таблиці 19.

Таблиця 19

Час від початку ферментації, хв	Швидкість виділення газу, F , мл/хв	$\ln (F)$

- 5.3. За допомогою даних у *таблиці 19* побудувати графік залежності $\ln F$ від часу реакції (хв) (*Графік В*).
- 5.4. Провести на *Графіку В* пряму, яка максимально наближена до нанесених точок (лінія тренду, показана на рисунку оранжевим кольором).
- 5.5. Розрахувати тангенс кута нахилу лінії тренду (A), знайти точку її перетину з віссю Y (*точка В*) на *Графіку В*. Записати отримані значення в *таблиці 20*.
- 5.6. Скласти лінійне рівняння залежності швидкості газоутворення на *стадії б* від часу реакції (*рис. 38*).

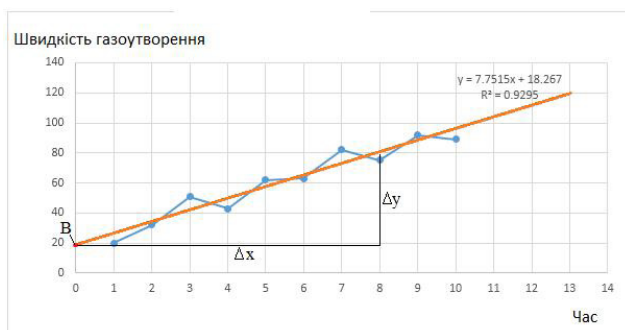


Рис. 38.
Схематичний
графік залежності
швидкості
газоутворення
від часу реакції

Таблиця 20

Параметр	Значення	Результат
Тангенс кута нахилу прямої (A)	$A = \Delta y \div \Delta x$	$A =$
Точка перетину прямої з віссю Y (B)	B	$B =$
Лінійне рівняння	$\ln F = A \times t + B$	$\ln F =$

- 5.7. Теоретичний об'єм CO_2 V_m , що відповідає кількості $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, яка не брала участі в реакції ферментації впродовж 40 хв, можна розрахувати за рівнянням:

$$V_m = \frac{e^{(A \times t + B)}}{A},$$

де

V_m – теоретичний об'єм CO_2 (мл);

A – тангенс кута нахилу лінії тренду на *Графіку В*;

B – точка перетину прямої з віссю Y на *Графіку В*.

6. Обчислити стехіометричну масу $C_6H_{12}O_6$, що відповідає розрахованому значенню $V_t CO_2$. Це кількість глюкози, що залишилася в реакційній колбі. $m_{глюк\ загл} = \underline{\hspace{2cm}}$ г.
7. Обчислити масу $C_6H_{12}O_6$, що зазнала ферментації впродовж перших 40 хв експерименту. $m_{глюк\ ферм\ 40\ хв} = \underline{\hspace{2cm}}$ г.
8. Обчислити загальну масу CO_2 , що виділився під час ферментації глюкози за весь період спостереження. $m_{CO_2\ заг} = \underline{\hspace{2cm}}$ г.
9. Обчислити масу CO_2 , який зібрався в мірному циліндрі за перші 40 хв ферментації. $m_{CO_2\ ферм\ 40\ хв} = \underline{\hspace{2cm}}$ г.
10. Обчислити масу CO_2 , розчиненого в реакційній колбі, за умови, що у воді, яка заповнює мірний циліндр, CO_2 не розчиняється. $m_{CO_2\ розч} = \underline{\hspace{2cm}}$ г.
11. Обчислити розчинність CO_2 в реакційній колбі. $x_{CO_2} = \underline{\hspace{2cm}}$ г/л.
12. На підставі отриманих даних обчислити кількість C_2H_5OH , що утворився впродовж перших 40 хв ферментації. $n_{C_2H_5OH\ ферм\ 40\ хв} = \underline{\hspace{2cm}}$ моль.
13. Обчислити концентрацію C_2H_5OH у реакційній колбі за 40 хв від початку експерименту. $C_{C_2H_5OH\ ферм\ 40\ хв} = \underline{\hspace{2cm}}$ г/100 мл.
14. Швидкість газоутворення уповільнюється на стадії б (Графік Б), що можна пояснити кількома причинами. Одна з них – токсична дія етанолу на дріжджі. Порівняйте розраховану концентрацію C_2H_5OH з порогом токсичності етанолу для дріжджів (14 г/100 мл), оцініть її вплив на уповільнення процесу ферментації.

Контрольні запитання

1. Яка основна мета ферментативної реакції спиртового бродіння, що відбувається в живому організмі?
2. Чому таку реакцію найчастіше використовують у лабораторії для вивчення закономірностей ферментативних реакцій?
3. Чому через деякий час за наявності надлишку вихідних реагентів ферментативна реакція бродіння зупиняється?
4. Спробуйте пояснити, чому для реакції спиртового бродіння крім глюкози можна використовувати крохмаль? За якими ознаками, не знаючи складу реакційного середовища, можна визначити, глюкоза чи крохмаль були використані як вихідний реагент?

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пивоваренко В. Г. Основи біоорганічної хімії : підручник для учнів 11 класів загальноосвітніх шкіл з поглибленим вивченням хімії. Київ : Освіта, 1998. 176 с.
2. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Amsterdam : Elsevier, 2013. 1789 p.
3. Британське Королівське хімічне товариство. Електронні навчальні ресурси з різних розділів хімічної та суміжних наук. URL: <https://edu.rsc.org/resources> (дата звернення: 16.09.2020).
4. Американське хімічне товариство. Електронні навчальні ресурси з різних розділів хімічної та суміжних наук. URL: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/resources.html> (дата звернення: 16.09.2020).
5. База даних монографій, книжок, навчальних матеріалів та додаткові ресурси з хімії провідних університетів світу та освітніх товариств. URL: <http://www.freebookcentre.net/Chemistry/BioChemistry-Books-Download.html> (дата звернення: 16.09.2020).

СПИСОК ІЛЮСТРАЦІЙ

- C. 13 Ліве фото: Єнс Якоб Берцеліус. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/J%C3%B6ns_Jakob_Berzelius#/media/Datei:J%C3%B6ns_Jakob_Berzelius.jpeg
Праве фото: Герріт Ян Мюлдер. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Gerardus_Johannes_Mulder#/media/File:Dr._G.J._Mulder.jpg
- C. 21 Рис. 1. Оригінальне зображення: Figure 3–1. A peptide bond.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 22 Рис. 2. Оригінальне зображення: Figure 3–2. The structural components of a protein.
Molecular Cell Biology (4th Red) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 23 Рис. 3. Оригінальне зображення: Figure 3–4. Steric limitations on the bond angles in a polypeptide chain.
Molecular Cell Biology (4th Red) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 24 Рис. 4. Оригінальне зображення: Figure 3–5. Three types of noncovalent bonds that help proteins fold.
Molecular Cell Biology (4th Red) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 24 Рис. 5. Оригінальне зображення: Figure 3–6. How a protein folds into a compact conformation.
Molecular Cell Biology (4th Red) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 25 Рис. 6. Оригінальне зображення: Figure 3–8. The refolding of a denatured protein.
Molecular biology of cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.

- C. 27 Рис. 7. Приклади зображення тривимірної структури білків або їхніх фрагментів. URL: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%96%D0%BB%D0%BA%D0%B8#/media/%D0%A4%D0%B0%D0%B9%D0%BB:Views-1tim.png>
- C. 27 Рис. 8. Оригінальне зображення: Figure 3–9. The regular conformation of the polypeptide backbone observed in the α helix and the β sheet.
Molecular biology of cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 28 Рис. 9. Оригінальне зображення: Figure 3–10. Two types of β sheet structures.
Molecular biology of cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 29 Рис. 10. Оригінальне зображення: Figure 3–11. The structure of a coiled-coil.
Molecular biology of cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 30 Рис. 11. Конструктор магнітний Magnetic Sheet. Будтехніка.
URL: <https://content.rozetka.com.ua/goods/images/original/21979132.jpg>
- C. 31 Рис. 12. Оригінальне зображення: Figure 3–12. A protein formed from four domains.
Molecular Cell Biology (4th Red) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 31 Рис. 13. Оригінальне зображення: Figure 3–13. Ribbon models of three different protein domains.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 33 Рис. 14. Оригінальне зображення: Figure 3–14. The conformations of two serine proteases compared.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.

- C. 34 Рис. 15. *Cro-репресор*. Оригінальне зображення: Figure 3–21. Two identical protein subunits binding together to form a symmetric protein dimer.
Нейрамінідаза. Оригінальне зображення: Figure 3–22. A protein molecule containing multiple copies of a single protein subunit.
Гемоглобін. Оригінальне зображення: Figure 3–23. A protein formed as a symmetric assembly of two different subunits.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 35 Рис. 16. Оригінальне зображення: Figure 3–24. A collection of protein molecules, shown at the same scale.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 36 Рис. 17. Оригінальне зображення: Figure 3–25. Protein assemblies.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 36 Рис. 18. Оригінальне зображення: Figure 3–26. Actin filaments.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 36 Рис. 19. Оригінальне зображення: Figure 3–27. Some properties of a helix.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 38 Рис. 20. Оригінальне зображення: Figure 3–28. Collagen and elastin.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 39 Рис. 21. Оригінальне зображення: Figure 3–29. Disulfide bonds.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
- C. 41 Рис. 22. Оригінальне зображення: Figure 3–30. An example of single protein subunit assembly requiring multiple protein-protein contacts.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.

- C. 41 Рис. 23. Оригінальне зображення: Figure 3–31. The capsids of some viruses, all shown at the same scale.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
Original image: Periodic Table of Chemical Elements. URL: https://ae01.alicdn.com/kf/H014911980da2442bbadc4df6e0cd1702M/TAKE-PIPE-BOY.jpg_q50.jpg
- C. 42 Рис. 24. Оригінальне зображення: Figure 3–32. The structure of a spherical virus.
Molecular biology of the cell (4th ed.) / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. New York : Garland Science, 2002. 1616 p.
Ninhydrin reaction mechanism. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Ninhydrin#/media/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg
- C. 43 Рис. 25. Ліве фото: фотографія вірусу SARS-CoV2, зроблена за допомогою електронного мікроскопа. URL: https://www.ucsf.edu/sites/default/files/styles/half_image/public/2020-04/Coronavirus-particle.jpg
Праве фото: схематичне зображення вірусу SARS-CoV2. URL: https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1684118220300827-gr1_lrg.jpg
Фотографія моменту проникнення вірусів крізь клітинну мембрану. URL: https://plus.tagesspiegel.de/images/495577857578efab228620jpg/alternates/BASE_16_9_W1400/495577857578efab228620jpg.jpeg
- C. 51 П'ять основних хімічних елементів (авторка: Євгенія Горлач).
- C. 56 Механізм реакції нінгідрину. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Ninhydrin#/media/File:Ninhydrin_Reaction_Mechanism.svg
- C. 59 Рис. 26. Ксантопротеїнова реакція на шкірі. URL: <https://img.brainkart.com/extra2/hNdJxjl.jpg>
- C. 69 Рис. 27. Висадження протеїнів. URL: https://pubs.acs.org/na102/home/readonly/publisher/achs/journals/content/jpcbfbk/2016/jpcbfbk.2016.120.issue-43/acs.jpcb.6b10119/20161028/images/medium/jp-2016-10119u_0009.gif
- C. 74 Рис. 28. Як будувати калібрувальний графік, проводячи фотометричний аналіз (автор: Олександр Толстов).

- C. 84 Рис. 29. Крива кислотно-основного титрування (авторка: Ірина Бей).
- C. 86 Рис. 30. Криві кислотно-основного титрування цвіттер-іонної форми амінокислоти (авторка: Ірина Бей).
- C. 91 Пепсин. URL: <https://www.creative-enzymes.com/images/Pepsin-1.png>
Хімосин (ренін). URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BD#/media/%D0%A4%D0%B0%D0%B9%D0%BB:CHYMOSIN_COMPLEX_WITH_THE_INHIBITOR_CP-113972.jpg
Трипсин. URL: <http://analytuniversal.ru/wp-content/uploads/2020/07/tri.jpg>
- C. 98 Рис. 31. Схема нанесення зразків при аналізі амінокислотного складу казеїну методом паперової ТШХ (авторка: Євгенія Горлач).
- C. 98 Рис. 32. Підготовка хроматографічного паперу зі зразками до процедури хроматографування (авторка: Євгенія Горлач).
- C. 105 Рис. 33. Структура амілази слини. URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D1%96%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%B8#/media/%D0%A4%D0%B0%D0%B9%D0%BB:Salivary_alpha-amylase_1SMD.png
- C. 105 Рис. 34. *Saccharomyces cerevisiae*. URL: <https://www.creative-biolabs.com/vaccine/images/GMP-grade-Antigen-Production-for-Vaccine-Development-3.jpg>
- C. 107 Рис. 35. Figure 2. Page 8. URL: http://www.ijsoweb.org/qna2014/ijso2014_experimental_questions.pdf
- C. 108 Рис. 36. Figure 3. Page 9. URL: http://www.ijsoweb.org/qna2014/ijso2014_experimental_questions.pdf
- C. 108 Рис. 37. Figure 4. Page 10. URL: http://www.ijsoweb.org/qna2014/ijso2014_experimental_questions.pdf
- C. 112 Рис. 38. Figure 6. Page 17. URL: http://www.ijsoweb.org/qna2014/ijso2014_experimental_questions.pdf

Навчальне видання

ОСНОВИ БІОХІМІЇ. ПРОТЕЇНИ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт

Відповідальні за випуск: *Т. В. Пещеріна, А. М. Буткевич*
Коректура *І. В. Браташук, З. В. Пономаренко*
Верстання *О. А. Жупанська*
Дизайн обкладинки *О. А. Чекановська*

Формат 60×84 1/16. Папір офс. 80 г/м².
Друк цифровий. Ум. друк. арк. 6,98.
Наклад 300 прим.

Видавництво: Національний центр «Мала академія наук України»,
Кловський узвіз, буд. 8, м. Київ, 01021

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
ДК № 6999 від 04.12.2019

