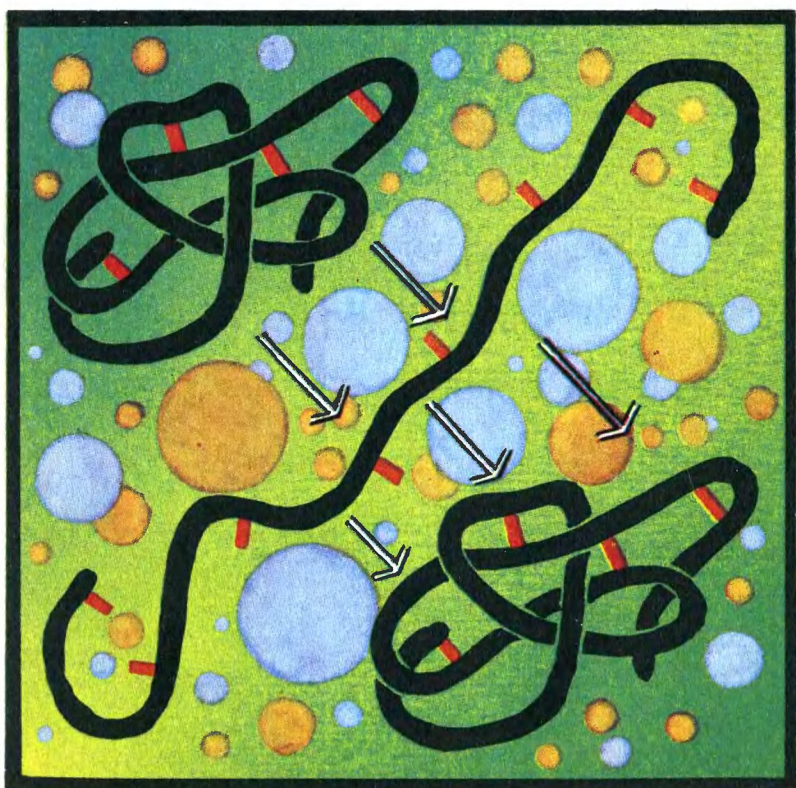


Мир знаний

О.С.КОМАРОВ, А.А.ТЕРЕНТЬЕВ

Химия белка



МИР ЗНАНИЙ

О.С.КОМАРОВ, А.А.ТЕРЕНТЬЕВ

Химия белка

*Книга для внеклассного чтения
учащихся 10 класса*

МОСКВА «ПРОСВЕЩЕНИЕ» 1984

ББК 28.072
К63

Рецензенты:

доктор медицинских наук *Л. Ф. Панченко*;
заведующий кабинетом биологии МГИУУ *А. А. Клепикова*

Комаров О. С., Терентьев А. А.

К63 Химия белка: Кн. для внеклас. чтения учащихся 10 кл.— М.: Просвещение, 1984.— 144 с., ил.— (Мир знаний).

Книга предназначена для учащихся старших классов. В ней подробно рассматривается строение белка, основные свойства белковых молекул, роль белков в организме. Большое внимание уделено биологическим катализаторам — ферментам. Учащиеся ознакомятся с основными методами изучения белков, с их превращением в организме и синтезом искусственного белка. Авторы при изложении материала основываются на знаниях, полученных учащимися на уроках химии и биологии.

К 4306020000—702
103(03)—84 242-84

ББК 28.072
57.04

Введение

В числе основных задач XXVI съезд КПСС призвал сосредоточить усилия на разработке биотехнологических процессов для производства продукции, используемой в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. Особое значение приобретают эти задачи в свете решений майского (1982 г.) Пленума ЦК КПСС, разработавшего Продовольственную программу. В ней говорится и об индустриальном производстве белковых веществ, кормовых дрожжей, содержащих более 50 % белка. Их можно получить из отходов целлюлозно-бумажной, спиртовой и деревообрабатывающей промышленности, из отходов переработки растительного сырья (кукурузы, соломы, камыша). Применение кормового белка в животноводстве ведет к быстрым привесам, снижению расхода кормов, т. е. повышается эффективность промышленного производства животноводческой продукции.

Путь, пройденный белковой химией до промышленного производства белка и искусственного синтеза белковых препаратов с заданной последовательностью аминокислот, был непростым.

Уже в XVI в. знали, что химические вещества способны влиять на деятельность живого организма. Это послужило дальнейшему развитию химии. Однако препятствием к развитию биологической химии как науки были философские воззрения того времени.

Философская основа имеет огромное значение в становлении и развитии каждой науки. Важно не только накопление новых фактов и данных, но и их толкование и использование, способ мышления исследователя.

В XIX в. развитие химии перешло на качественно новый

уровень. Началось изучение химической структуры живого организма и химических превращений, происходящих в нем, появилась новая отрасль химии — биологическая, изучающая, в частности, и обмен белка. Биологическая химия связана с биологией, физикой, генетикой, физиологией, медициной, сельским хозяйством. Без них развитие биологической химии было бы невозможным.

В основе развития биологической химии лежит победа материалистического образа мышления над идеализмом. Еще М. В. Ломоносов говорил, что закон сохранения энергии одинаково характерен как для живой, так и для неживой природы. Но еще долго считалось, что вещества, составляющие живой организм, могут быть синтезированы им только при обязательном участии особой «жизненной силы», т. е. материю живого не отождествляли с материей неживого.

Первый удар по идеализму в химии был нанесен опытами Ф. Велера, который в 1828 г. получил мочевины (продукт жизнедеятельности организмов) из неорганических веществ. Ф. Велер писал: «Я должен сказать вам, что могу приготовить мочевины, не нуждаясь для этого ни в почке, ни в животном организме вообще, будь то организм человека или собаки».

Уже к середине XIX столетия органическая химия начала бурное развитие благодаря двум мощным факторам: теоретической борьбе различных направлений с установлением теории химического строения органических веществ и быстро растущим потребностям в производстве новых органических соединений: красителей, фармацевтических препаратов, материалов органической природы. Вторая половина прошлого столетия характеризуется началом бурного периода синтеза новых органических молекул.

Работы Л. Пастера по изучению процессов брожения привлекли внимание к биологическим катализаторам — ферментам, которые могут действовать как внутри организма, так и вне его. Изучению пищеварительных ферментов были посвящены классические работы И. П. Павлова в начале нашего столетия. В этот же период были открыты необходимые организму витамины, часто входящие в структуру сложного белка.

Революционный переворот в методах изучения химических процессов организма произошел после того, как

было предложено применять для исследований радиоактивные изотопы.

Изучение особенностей синтеза белка привело ученых к расшифровке аминокислотного кода. Они доказали, что химическая структура нуклеиновых кислот определяет структуру белка. На этом этапе развития химии уже недостаточно определить свойства нового вещества. Особенностью веществ, составляющих живой организм, являются их постоянные изменения, участие в обмене веществ, в процессах жизнедеятельности. Поэтому необходимо выяснить, каким изменениям подвергается белок в том органе или в той части клетки, где он находится, как он ведет себя в единстве со средой. Например, выделив из организма белки актин и миозин и изучив их свойства, мы все-таки не узнаем главного до тех пор, пока не изучим их взаимодействие. Только их совместное действие обуславливает величайшее свойство — явление сокращения.

Наибольших успехов достигла химическая наука в последние десятилетия, когда она заглянула в клетку, разработала биохимические основы взаимодействия макромолекул. Появилось направление, называемое физико-химической биологией, сформировалась генетическая инженерия. Специалисты научились управлять геномным аппаратом, вводить в наследственный аппарат новые гены и получать по ним белки с заданными свойствами. Были созданы десятки искусственных микроорганизмов, обогатилась новыми достижениями науки микробиологическая промышленность, родился термин «биотехнология».

Новые направления биотехнологии решают современные задачи медицины. На них в значительной мере возложено и решение продовольственной проблемы. У нас в стране и в развитых капиталистических странах налажено производство микробного белка и белково-витаминных концентратов для нужд сельского хозяйства.

Основная цель генетической инженерии — получать белки, которые крайне необходимы, например, в медицине. Для лечения диабета применяют белок — гормон инсулин, выделенный из организма животных. Но многие больные невосприимчивы к этому инсулину из-за некоторых его структурных особенностей. В США, ФРГ и КНР инсулин был синтезирован, но стоил он очень дорого и практически был недоступен. Генная инженерия решила эту задачу. Была получена форма бактерий, произво-

дящих проинсулин, из которого легко образуется инсулин. Аналогичным образом был осуществлен синтез соматотропина — гормона роста человека, состоящего из 191 аминокислоты. Он применяется при лечении переломов, ожогов, карликовости и т. д.

Ведется работа по получению таким же путем белка интерферона — универсального противовирусного средства. Так как интерферон, выделенный из животных, не может быть использован для человека, необходимы сконструированные при помощи генной инженерии бактерии, производящие этот белок. Это одна из проблем, над которой сегодня успешно работают наши ученые.

Значительным этапом в развитии органической и биологической химии были успехи в установлении строения белков, а затем попытки синтеза сначала отдельных фрагментов и наконец полный синтез некоторых молекул белков. Однако установление строения молекул и даже их искусственный синтез еще не означают, что проблема получения «живой» материи уже решена.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ

Почему из всех молекул, известных химикам, наиболее приспособленными для выполнения разнообразных функций оказались биологические макромолекулы? Как они образовались? Почему из многих известных нам химических элементов в состав живых организмов входит лишь несколько? Как синтезировались первые биологические макромолекулы? Эти вопросы волновали не только специалистов — химиков, биологов, физиков, философов, но и всех, кто задумывался над истоками жизни на Земле.

Действительно, большинство живых организмов построено в основном из четырех элементов: водорода, кислорода, углерода и азота. Эти элементы составляют около 99 % массы всего живого. В неживой природе чаще встречаются совсем другие элементы: кремний, алюминий, кальций или другие металлы. Значит, в живом организме содержатся не самые распространенные элементы, а наиболее важные для реализации биологических функций. Атом углерода в этом отношении незаменим. Для завершения наружной электронной оболочки ему необходимо четыре электрона. Он способен образовывать ковалентные связи как с другими атомами, так и друг с другом, давая каркасы многочисленным органическим молекулам. Углерод, водород, азот и кислород самые легкие из тех атомов, которые способны образовывать прочные ковалентные связи, активно реагируя друг с другом.

Предполагают, что первые живые организмы появились на Земле 3,5 млрд. лет назад. Палеонтологические доказательства этому есть — бактерии, похожие на со-

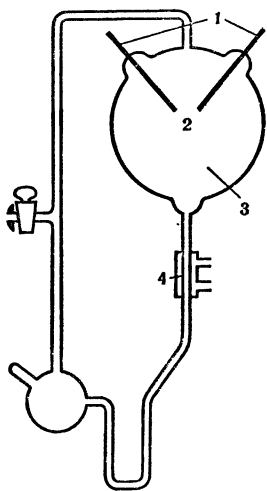
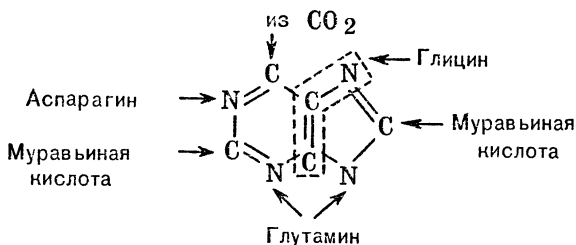


Рис. 1. Прибор для синтеза первичных органических соединений: 1 — электроды; 2 — искровой промежуток; 3 — смесь газов (NH_3 , CH_4 , H_2O , H_2); 4 — приспособление для охлаждения.

временные. Большое влияние на формирование представлений о происхождении жизни на Земле оказала теория советского биохимика А. И. Опарина, который предположил, что физико-химические превращения, происходившие в атмосфере тех далеких от нас эпох, могли приводить к образованию простейших примитивных органических соединений из неорганических: аммиака, воды и, по-видимому, метана. Эти молекулы реагировали между собой под влиянием грозových разрядов и солнечных лучей. И температура «молодой» Земли была, вероятно, выше. Первичные органические молекулы растворялись в теплом океане, взаимодействовали друг с другом, образуя из века в век новые молекулярные формы. А. И. Опарин считал, что первые живые клетки появились в теплом «бульоне» первичного океана, жизнь «вышла из воды».

Однако во время создания этой теории (20-е годы) фактов, доказывающих или опровергающих это предположение, не было. Экспериментальное подтверждение теории возникновения жизни было осуществлено в 1953 г. П. Миллером. Он подвергал в колбе воздействию электрических разрядов смесь аммиака, водяных паров, водорода, а также и метана. После конденсации продуктов реакции получилась смесь органических веществ: глицина, аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. В смеси находились также уксусная, молочная и пропионовая кислоты, мочевина и другие продукты (рис. 1). Органические соединения образовывались из тех же газов не только при действии электрических разрядов, но и при продолжительном облучении ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами, светом, обработке ультразвуком. Видимо, из огромного числа вариантов молекул в эволюции были «отобраны» универсальные «строительные» блоки, которые обеспечивали клетке выживаемость.

Сейчас считают, что к таким первичным молекулам можно отнести всего лишь 29 соединений: 20 аминокислот, 5 азотистых оснований, жирную кислоту, сахар, глицерин и холин, а все остальные синтезированы на базе этих ключевых молекул. В последние годы было доказано, что и между этими соединениями существует связь. Методом меченых атомов установили, что атомы из одних молекул в результате ряда химических превращений веществ в организме включаются в состав других молекул. Например, атомы пуринового кольца, составляющего основу азотистых оснований, ранее входили в более простые химические соединения:



Есть много и других примеров взаимопревращений основных биомолекул в организмах, которые почти всегда катализируются специфическими ферментами.

Если из организмов растительного, животного или бактериального происхождения выделить отдельные молекулы, то окажется, что сами по себе эти молекулы не обладают свойствами живых организмов. Они будут подчиняться всем химическим и физическим законам, применимым к молекулам, выделенным из руд или полученным «в пробирке» химическими способами. Это утверждение относится и к макромолекулам, таким, как полисахариды, нуклеиновые кислоты и белки. Иными словами, для ряда объектов провести грань между веществом и существом бывает не просто.

Но у живых организмов есть и отличительные свойства, которые выделяют их из минерального мира. Все живые организмы: а) в химическом отношении довольно сложны; б) содержат в пределах своей системы химические соединения, принадлежащие к различным классам веществ; в) имеют определенные участки системы, специализирующиеся на выполнении какой-нибудь особой

функции; г) способны использовать внешнюю энергию и преобразовывать ее; д) и, что особенно важно, воспроизводят себя и передают информацию о себе из поколения в поколение.

В последнее время выделились более конкретные химические науки, изучающие строение, свойства и превращение соединений, составляющих химическую основу живых организмов. И среди них — быстро развивающаяся биохимия. По выражению одного из специалистов, биохимия сегодня — «это своего рода суперхимия», т. е. химия, включающая в себя органическую, физическую, неорганическую и другие области химии, но на более высоком теоретическом и практическом уровне.

Часто не только в специальных научных журналах, но и в книгах для широкого круга читателей и в популярной периодической литературе встречается слово «биомолекулы». Это прежде всего сложные органические соединения с большой молекулярной массой, входящие в состав животных и растительных организмов. В нашей книге будет рассмотрен только один вид таких биологических молекул — белки. Для того чтобы попытаться представить себе весь класс этих соединений, обратимся к некоторым цифрам, взятым из специальной литературы. Например, в одной клетке бактерии кишечной палочки содержится примерно 5000 отдельных молекул различных органических соединений, из которых около 3000 приходится на разнообразные белки, а около 1000 — на нуклеиновые кислоты. В организме человека встречается уже более 5 млн. белков, причем различных, не похожих не только на упомянутые белки бактерий, но даже и между собой. Расшифровать и тем более синтезировать такое число белков практически невозможно.

Однако, несмотря на сложность строения и многообразие, они построены всего из 20 аминокислот, а другие сложнейшие биомолекулы — нуклеиновые кислоты — состоят только из 5 различных азотистых оснований. Это можно сравнить в какой-то степени со строительством огромного числа сооружений из нескольких типов кирпича. Только в природе такое разнообразие выражается еще более невообразимо громадными цифрами.

Важнейшую роль среди органических соединений, входящих в клетку, играют белки. И не только потому, что на их долю приходится около 50 % массы клетки

в расчете на сухой остаток. Ведь без белков невозможно представить основные проявления жизни: движение, способность расти и размножаться, сократимость, пищеварение, раздражимость.

Слово «белок» знакомо нам с раннего детского возраста. Так называем все мы ту часть куриного яйца, которая приобретает белый цвет после свертывания в процессе кулинарной термической обработки.

Давно обнаружили, что и внутриклеточное содержимое, и сыворотка крови напоминают белок куриного яйца. Характерные реакции на белок дают не только продукты животного происхождения, но и клетки растений.

Иногда наряду с термином «белок» встречается термин «протеин». Это одно и то же, но второе название подчеркивает первостепенную роль этих веществ и их биологическое значение (по греч. «протос» — *первый, важнейший*).

На основании химического анализа сделали вывод, что характерные реакции на белки дают и органические белковоподобные вещества костной ткани, хряща, волос, рогов, перьев и пр. Эти вещества в отличие от белков яйца, мышечной плазмы, сыворотки крови в воде не растворяются.

Химики знают, что для изучения свойств веществ их необходимо получить в химически чистом виде из смеси или синтезировать из других веществ. Но попытки выделения белков из внутриклеточных смесей традиционными химическими методами оказываются безуспешными: они не переносят нагревания, кристаллизации из горячих растворов, кипячения и ряда других воздействий. Поэтому в начале изучения белков занимались не исследованием их структуры, а устанавливали, из каких элементов состоят белки, выделенные из разных органов, тканей, организмов.

Независимо от источников получения белков (сначала неочищенных препаратов) исследователи обнаружили в них следующие элементы: углерод, кислород, водород, азот и небольшие количества серы. Оказалось, что азота в различных белках содержится всегда примерно одинаково — около 16 %. Зная эту цифру, легко установить количество белка в разных биологических объектах:

$$m = \frac{m_1 \cdot 100}{16},$$

где m — масса белка, m_1 — масса азота.

Содержание белков можно определить и более точными современными методами, но они значительно сложнее. Существуют и способы отдельного определения количества разных белков.

Содержание других элементов в составе белка подвержено некоторым колебаниям в зависимости от присутствия тех или иных аминокислот или включения в макромолекулу небелковых участков: S — 0,3—2,5 %, P — 0,1—2,0 %. В состав некоторых белков входят в незначительных количествах (иногда лишь один атом на макромолекулу белка) медь, железо, кальций, цинк, бром, иод или другие элементы.

Количество белков в различных тканях человека неодинаково. Если орган или ткань обезводить, а затем определить в них массу белка, то окажется, что она весьма значительна. Так, мышцы содержат до 80 % белка, а селезенка, кровь и легкие немного больше, почки — 72 %, кожа — 63 %, печень — 57 %, мозг — 45 %. Даже такие ткани, как жировая, а также кости и зубы содержат от 14 до 28 % белковой массы.

Свежие ткани растений также содержат белки. В семенах растений белков 10—15 %, в стеблях, корнях и листьях — 3 %, в плодах — 1—2 %.

Если учесть универсальную распространенность белков в животном, растительном и бактериальном мире и их значительные количества, можно с уверенностью сказать, что мы приступаем к рассмотрению интереснейшего и важнейшего класса химических соединений.

АМИНОКИСЛОТЫ — СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ БЕЛКОВ

Способы выделения аминокислот из белков

В состав белков входят аминокислоты, которые можно выделить при гидролизе (кислотном или щелочном) или при действии протеолитических ферментов.

Кислотный гидролиз проводят кипячением белка с крепкими растворами соляной или серной кислоты в течение 10—20 ч. Этот способ получения из белка смеси аминокислот относительно прост, но имеет существенный недостаток. При таком гидролизе природного белка, содержащего всегда примеси других органических соединений, в частности углеводов, образуется смесь побочных продуктов коричневого цвета, связывающих часть освободившихся из белка аминокислот. Кроме того, при кислотном гидролизе не удастся полностью выделить аминокислоту триптофан, так как она разрушается.

При щелочном разложении белков часть L-аминокислот переходит в D-аминокислоты (о стереоизомерии аминокислот см. с. 16), а некоторые из них разрушаются. Чаще всего этот способ гидролиза применяют для получения из белка триптофана, который не может быть получен кислотным гидролизом.

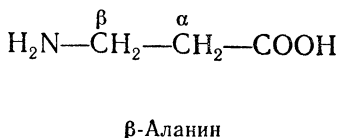
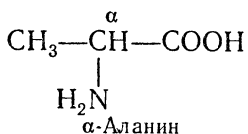
Можно гидролизовать белки при оптимальной температуре с помощью ферментов — пептидаз. Аминокислоты при этом не разрушаются, но осуществить полный гидролиз и отщепить все аминокислоты в свободном виде не удастся.

Если для гидролиза брать белки из живых организмов как животного, так и растительного происхождения, а также белки из различных органов и тканей, то все равно получается смесь одинаковых аминокислот. Оказывается, в гидролизатах любых белков содержится

только двадцать аминокислот, но каждая из них может встречаться в одном белке несколько раз в различных участках макромолекулы.

Свойства аминокислот

Кроме аминокислот, входящих в структуру белков, известно еще более ста аминокислот, которые встречаются в отдельных пептидах, гормонах, антибиотиках или просто находятся в свободном состоянии. Например, α -аминопропионовая кислота (α -аланин) — это одна из двадцати «белковых аминокислот», β -аминопропионовая кислота (β -аланин) в белках отсутствует, но встречается в растениях и клетках животных в свободном виде:



Эти аминокислоты отличаются местом расположения аминогруппы: в одном она находится в α -положении по отношению к карбоксильной группе, в другом — в β -положении.

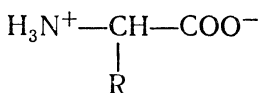
Замечено, что в состав белков входят только α -аминокислоты. Основными функциональными группами их яв-

ляются $-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, >NH , способные

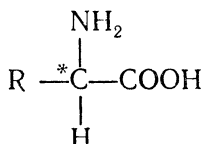
к диссоциации. При растворении белков или отдельных аминокислот в воде образуются растворы кислого или основного характера. Этот факт объясняется еще и тем, что в белках могут содержаться такие аминокислоты, как аспарагиновая и глутаминовая, имеющие две COOH -группы. Тогда белок приобретает кислотные свойства. В других белках преобладают аргинин, лизин или гистидин, имеющие две NH_2 -группы, что сообщает белкам основные свойства.

В широком интервале рН аминокислоты существуют преимущественно в виде биполярных ионов как молеку-

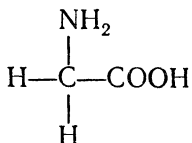
лы с диссоциированной карбоксильной группой и протонированной аминогруппой:



Для α-аминокислот, входящих в состав белков, характерна оптическая изомерия. Оптическая активность органических веществ обусловлена отсутствием центра симметрии в молекуле. Выявить такие соединения можно, если определить, есть ли в молекуле асимметричный атом углерода¹, т. е. атом, все четыре валентности которого насыщены различными радикалами:



Если в указанном примере вместо радикала поставить атом водорода, то получится аминокислота глицин:



В молекуле этой аминокислоты у углерода уже две валентности заняты одинаковыми атомами — водородом, а значит, углеродный атом теперь не будет считаться асимметричным. Действительно, глицин — единственная из природных аминокислот, не обладающая оптической активностью. Обнаружить оптическую активность можно, если направить поляризованный луч света на раствор какой-либо аминокислоты: если луч отклоняется вправо, аминокислоту обозначают знаком (+), если влево — знаком (—). Остальные физические и химические свойства оптических изомеров одинаковы.

¹ Асимметричный атом углерода обозначен звездочкой.

Стереохимические изомеры аминокислот в отличие от разобранных выше оптических изомеров обозначают буквами L или D.

Если при асимметричном атоме углерода аминогруппа расположена справа, это D-аминокислота, если слева — L-аминокислота:

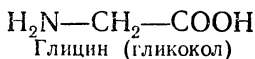


В белках животных встречаются только α-L-аминокислоты. Их и называют природными. Незначительные количества D-аминокислот обнаружены только у микроорганизмов. D-Аминокислоты не усваиваются животными и растениями, у которых нет ферментов, способных катализировать превращения веществ D-ряда.

Состав аминокислот

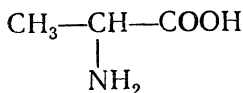
Аминокислоты можно сгруппировать в зависимости от особенностей их строения. Перечислим основные аминокислоты.

Моноаминомонокарбоновые имеют одну амино- и одну карбоксильную группы в молекуле:



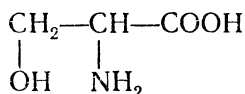
Глицин не имеет асимметричного углерода, оптически неактивен, является аминопроизводным уксусной кислоты.

Сходное строение у аминокислоты аланина:

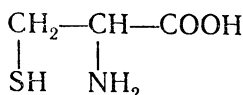


Наличие у серина OH-группы увеличивает его реакционную способность. Свободная OH-группа серина в

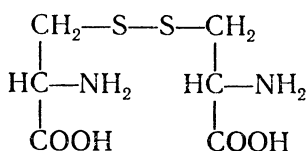
составе белка позволяет увеличить реакционную способность белковой молекулы:



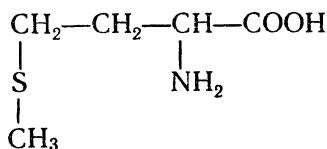
Присутствие SH-группы у цистеина сообщает ему особые свойства:



Из двух молекул цистеина может образоваться новая аминокислота — цистин. Сульфгидрильные группы цистеина при этом превратятся в дисульфидный мостик цистина:

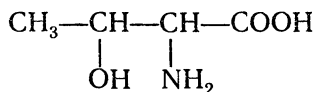


Сера содержится еще в одной важной для обмена веществ аминокислоте:

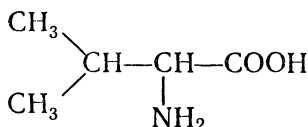


Метионин

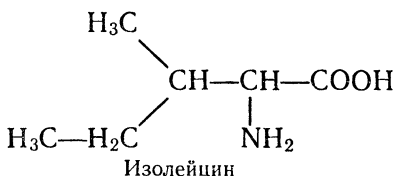
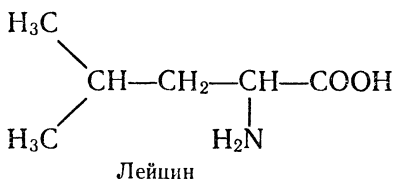
У аминокислоты треонина следующее строение молекулы:



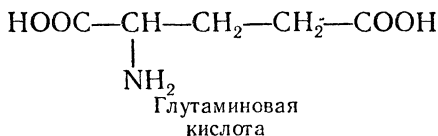
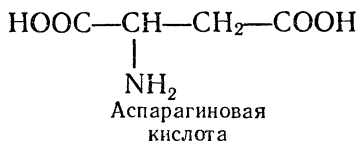
Производным изовалериановой кислоты является валин:



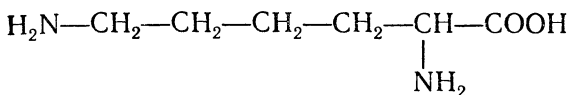
Производными капроновой кислоты являются лейцин и изолейцин:



Моноаминодикарбоновые кислоты имеют кислый характер, а в составе белковой молекулы придают кислый характер белку за счет диссоциации свободных карбоксильных групп:

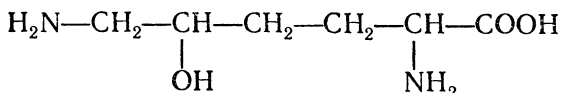


Диаминомонокарбоновые аминокислоты содержат на одну карбоксильную группу две аминогруппы:



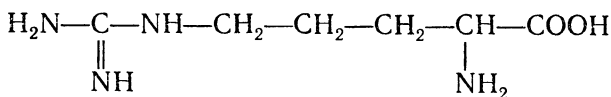
Лизин

В некоторых белках обнаружено гидроксильное производное этой аминокислоты:



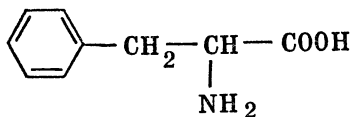
Оксилизин

Важной диаминомонокарбоновой кислотой является аргинин:

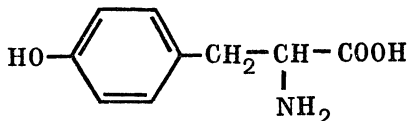


Включение в состав белка лизина, аргинина или оксилизина придает ему щелочные свойства.

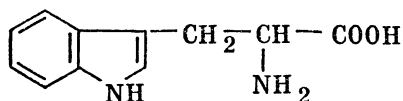
Среди *аминокислот*, входящих в белки, есть такие, в радикал которых входят *циклические структуры*. Например, если один водород в аланине заменить фенильным радикалом, то получится аминокислота фенилаланин:



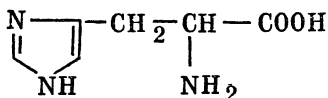
И в структурном, и в функциональном отношении к фенилаланину близка другая аминокислота — тирозин:



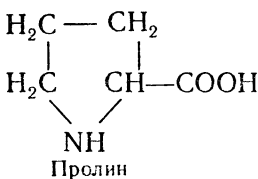
Иной циклический радикал имеет аминокислота триптофан:



Следующая аминокислота — гистидин — имеет щелочную реакцию, так как содержит две основные группы, т. е. —NH_2 и =NH: :

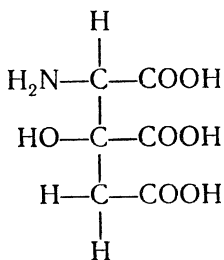


Еще две аминокислоты были обнаружены в белках, хотя их не совсем правомерно называть аминокислотами. Они содержат не аминогруппу —NH_2 , а иминогруппу =NH: :



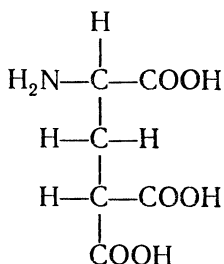
Оксипролин и оксилизин чаще встречаются в белках, выделенных из соединительной ткани, например в коллагене.

В последнее время появились сообщения об обнаружении в белках новой — двадцать первой — аминокислоты — аминолимонной:



От всех других аминокислот, встречающихся в белках, ее отличает наличие трех карбоксильных групп, высокий отрицательный заряд. Она обнаружена в различных тканях человека, животных и некоторых бактерий. О функции этой аминокислоты пока ничего не известно.

Так же мало известно и еще об одной — двадцать второй, недавно открытой в рибосомах аминокислоте — карбоксиаспарагиновой:

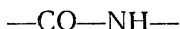


Ее молекулы тоже обладают необычно большим отрицательным зарядом.

КАК ПОСТРОЕН БЕЛОК

Как связаны аминокислоты в молекуле белка

С накоплением сведений о структуре белка возник вопрос о том, как связаны между собой аминокислоты в макромолекуле. В разработке этой проблемы значительная роль принадлежит профессору Харьковского университета А. Я. Данилевскому, который предположил в 1888 г., что аминокислоты в белке связаны амидной связью:



В последние годы выделены сотни белковых веществ. У некоторых из них детально выяснена *химическая структура*. Оказалось, что, несмотря на разнообразие функций молекул, в структуре белков имеется много общего. Основной связью в молекуле белка является так называемая *пептидная*, т. е. связь, образованная α -карбоксильными и α -аминогруппами разных (соседних) аминокислот (рис. 2). В зависимости от числа аминокислот, входящих в состав пептида, различают дипептиды (два остатка аминокислот), тетрапептиды (четыре остатка) и т. д. Полипептидами принято называть полимеры, состоящие из 20 или более остатков аминокислот. Впервые подтверждение того, что белковая молекула представляет собой полипептид, было сделано Э. Фишером. Он провел прямой синтез пептидов из отдельных аминокислот и назвал их полипептидами.

В составе белков, выделенных из животных, растений и микроорганизмов, содержится несколько сотен, а иногда и несколько тысяч различных повторений 20 основ-

ных аминокислот. Порядок чередования их может быть самым разнообразным. Это дает возможность существовать огромному числу отличающихся друг от друга молекул белка. Например, для белка очень простого строения, состоящего всего лишь из 20 остатков аминокислот, теоретически возможно около $2 \cdot 10^{18}$ вариантов, отличающихся чередованием, а значит, и свойствами различных белковых молекул. Это огромное количество могло бы дать столько же разных изомеров белка.

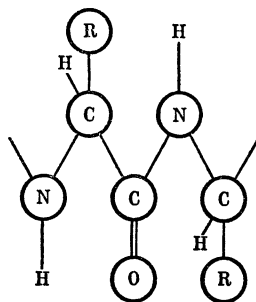
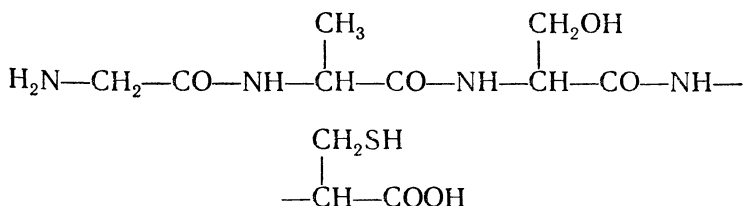


Рис. 2. Фрагмент первичной структуры белка.

Названия пептидов условились обозначать следующим образом: первой называют аминокислоту, у которой свободна α -аминогруппа, а карбоксильная группа участвует в образовании пептидной связи. Эта аминокислота и последующие перечисляются с изменением окончания на *-ил*, кроме последней. Последняя аминокислота, у которой остается незатронутой α -карбоксильная группа, сохраняет свое название неизменным и произносится в названии пептида последней. Например, тетрапептид, состоящий из остатков глицина, аланина, серина и цистеина, называется глицилаланилсерилцистеином:



Нельзя представить структуру белка как нечто застывшее, навсегда данное, неизменное. При функционировании белковая молекула может претерпеть динамические превращения, отличающиеся не порядком расположения аминокислот (этот порядок сохраняется всегда), а способами упаковки белковой нити в клубок (глобулу). Структура белка зависит от количества и качества ионов в растворе, от кислотности среды, а также от многих других факторов. Часто в белки входит не-

сколько полипептидных нитей, каждую из которых называют субъединицей. В качестве примера приводят обычно структуру знакомого всем белка — гемоглобина, состоящего из четырех субъединиц.

Первичная структура белка

Строго определенную последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи белковой молекулы называют *первичной структурой* белка.

Именно с выяснения вопроса о последовательности чередования остатков аминокислот исследователи начинают изучать химическую структуру белка. Работы А. Я. Данилевского и пептидная теория строения Э. Фишера были мощным стимулом для изучения структуры белка в начале XX в. То, что некоторые из полученных синтетическим путем пептидов оказались идентичными с имеющимися в природе, воодушевило ученых.

В разных странах исследователями в 1897—1906 гг. были выделены циклические структуры при гидролизе белков. Эти находки положили начало дикетопиперазиновой теории строения белка. Оставался невыясненным вопрос о том, имеются ли эти циклические структуры в нативном (природном) белке или они образуются в процессе его гидролиза. П. Каррер синтезировал соединения, содержащие циклические структуры, а затем доказал, что они могут расщепляться гидролитическим путем в кислой среде. Но циклических соединений, состоящих из остатков аминокислот, исследователь получить не смог. Просуществовав около сорока лет, дикетопиперазиновая теория была оставлена из-за отсутствия достоверных экспериментальных доказательств.

То, что первичная структура белка действительно представляет собой полипептидную цепь, доказывается рядом фактов. Во-первых, молекулы разных белков содержат небольшое число свободных амино- и карбоксильных групп. Следовательно, почти все остальные эти группы заняты в пептидных связях. При гидролизе же белка количество свободных амино- и карбоксильных групп значительно возрастает. Во-вторых, правильность нашего представления о полипептидной структуре белка доказывают успехи искусственного синтеза белков и высокая активность таких синтезированных искусственно макромолекул.

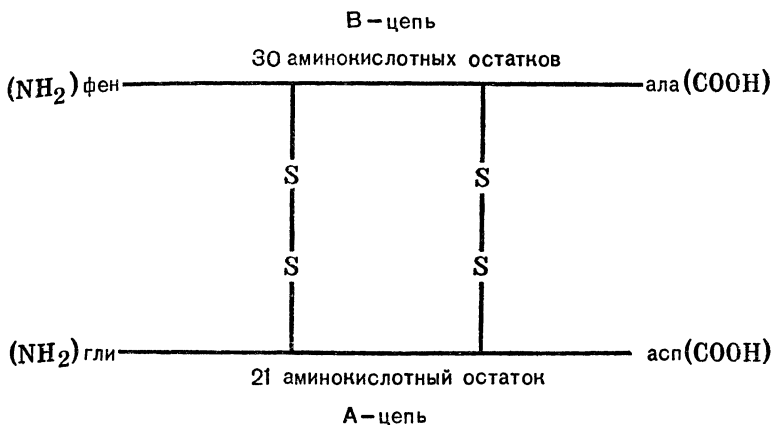


Рис. 3. Схема строения инсулина.

Большие успехи в установлении структуры белков принадлежат Ф. Сенгеру из Кембриджского университета (Англия). Всемирную известность ему принесли работы по выяснению структуры инсулина — гормона поджелудочной железы. Объект исследования был удобен, так как его относительная молекулярная масса невелика — около 12 000. Ученый предложил следующий метод определения первичной структуры, т. е. порядка чередования аминокислот в инсулине. Он использовал реакцию взаимодействия динитрофенола с концевой аминогруппой белка. При гидролизе такого белка образуется смесь аминокислот, одна из которых будет динитрофениламинокислотой. После определения этой аминокислоты определяли следующие. Так установили порядок их чередования в инсулине. Выяснилось, что инсулин состоит из 51 аминокислоты и имеет двунитчатое строение: 21 аминокислота в одной полипептидной цепочке и 30 — в другой.

Сходный метод определения аминокислотной последовательности был разработан П. Эдманом. Если подействовать на белок фенилизотиоционатом, то этот реактив будет реагировать со свободной аминогруппой. Если теперь обработать белок соляной кислотой в нитрометане, можно отщепить концевые аминокислоты. Есть и другие методы определения аминокислотной последо-

вательности в белках, например обработка белков ферментами, их разрушающими: аминопептидазы отщепляют аминокислоты с N-конца, карбоксипептидазы — от карбоксильного С-конца.

Однако, чтобы разобраться в аминокислотной последовательности, т. е. чтобы установить первичную структуру белка, нужно разрушить пространственную конфигурацию молекулы, превратить белок в нить. Для этого необходимо разрушить дисульфидные и водородные связи, поддерживающие определенную структуру макромолекулы. При этом —S—S-связи или окисляются, или восстанавливаются. Например, в молекуле инсулина имеются две дисульфидные связи, фиксирующие полипептидные цепи А и В. Третья дисульфидная связь находится только в А-цепи между остатками цистеина и в фиксации параллельной цепочки аминокислот не участвует (рис. 3).

Кроме пептидной, дисульфидной (—S—S—) и водородной связи, в молекулах белка существуют ионные и неполярные (рис. 4). Дисульфидные мостики образуются, как мы уже говорили, из сульфгидрильных групп —SH аминокислоты цистеина путем отщепления водорода при

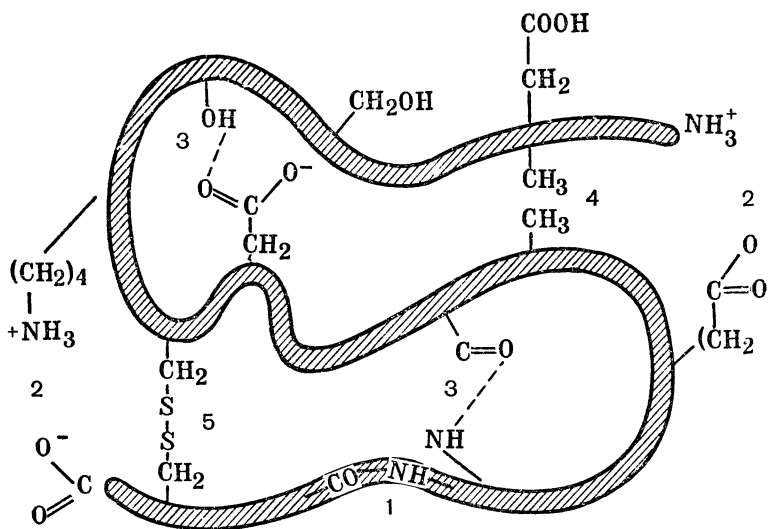


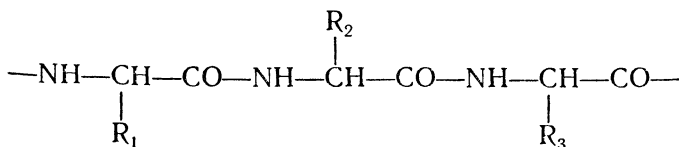
Рис. 4. Химические связи, встречающиеся в белках: 1 — пептидные; 2 — ионные; 3 — водородные; 4 — неполярные; 5 — дисульфидные.

окислении. Ионные связи возникают в молекулах белка, как правило, между кислыми и основными группами аминокислот. В их образовании принимают участие чаще всего диаминомонокарбоновые аминокислоты, с одной стороны, и моноаминодикарбоновые аминокислоты — с другой.

Вторичная структура белка

Огромное значение в поддержании специфических структур белка имеют многочисленные водородные связи. Как известно, водородная связь возникает между молекулами, в состав которых входят водород и сильно электроотрицательный элемент, в частности кислород или азот. Водородная связь намного слабее ковалентной, примерно в 15—20 раз. Несмотря на это, ее роль в формировании и поддержании структур белка чрезвычайно велика. Это объясняется тем, что в молекулах аминокислот имеются многочисленные поляризованные СО- и NH-группы, способные образовывать между собой водородные связи. Интересно, что в белке водородные связи образуются между остатками разных молекул аминокислот, и такие связи можно считать межмолекулярными. В то же время эти связи образуются в пределах одной полипептидной нити, одной макромолекулы белка; и в этом случае водородную связь следует считать внутримолекулярной.

На основании данных рентгеноструктурного анализа и кропотливых исследований и расчетов Л. Полинг, Р. Кори и другие ученые доказали, что только спиральная структура полипептидной цепи, стабилизированная множеством водородных связей, обеспечивает максимальную стабильность молекулы белка. Дело в том, что в образовании пептидной связи не принимают участие радикалы аминокислот. Они выступают в разные стороны в периодически повторяющихся одинаковых фрагментах:



Если бы полипептидная нить состояла из α -, β - и других аминокислот, то это нарушало бы периодичность и сделало бы невозможным образование четкой спирализованной структуры. Эти периодически повторяющиеся структуры имеют также периодическую повторяемость углов и длин связей между атомами. Такой способ организации полипептидной цепи носит название *вторичной структуры* белка.

Водородные связи в спирали образуются между СО-группами одного аминокислотного остатка и NH-группами другого остатка аминокислоты, расположенного над или под первым. Один виток спирали состоит из 3,6 аминокислотного остатка.

Хотя радикалы аминокислот не принимают участия в построении спирали и в образовании пептидной связи, они все же оказывают влияние на вторичную структуру. Если два близко расположенных радикала окажутся положительно заряженными, то они будут отталкиваться друг от друга. Это приведет к тому, что в месте встречи таких аминокислот нарушается правильность построения спирали и она образует изгиб. Примером могут служить радикалы в молекуле лизина, которые при нейтральных значениях pH несут положительные заряды. Аминокислота пролин тоже нарушает спираль. В каком бы месте белковой молекулы ни находился пролин, он влечет за собой петлю или изгиб спиральной структуры белка, прерывая монотонность спирали. Таким же свойством обладают глицин и аспарагин.

Аминокислоты, такие, как аланин, лейцин, глутаминовая кислота, благоприятствуют образованию α -спирали, особенно если эти аминокислоты находятся рядом в полипептидной цепи.

Однако α -спираль не единственная конфигурация, которую принимает полипептидная нить, оторвавшись от рибосомы. Некоторые фибриллярные белки (фибронин шелка, белки волос, шерсти и др.) имеют иную вторичную структуру. Полипептидные нити этих белков значительно растянуты, а водородные связи устанавливаются не между витками одной цепи, как в α -спиралях (рис. 5), а между СО- и NH-группами разных нитей белка. Такая зигзагообразная структура полипептидной цепи называется β -конформацией или структурой типа складчатого слоя (рис. 6). Процент таких белков относительно невелик.

В природе преобладают белки, вторичная структура которых представляет собой α -спираль. У одного из типов фиброина каждой второй аминокислотой является глицин. Поэтому все R-группы, расположенные по одну сторону слоя, представлены атомами водорода. Но у большинства типов фиброина преобладает аланин, поэтому R-группами на другой стороне слоя являются метильные группы. Этот тип структуры обладает высокой стабильностью.

В кератинах, также находящихся в волосах, шерсти, шелке, содержатся аминокислоты с R-группами различных размеров, в том числе одинаково заряженные и довольно крупные, поэтому стабильное существование структур типа складчатого слоя для кератинов невозможно из-за взаимного отталкивания R-групп. Именно по этой причине растянутые формы белков волос, шерсти, шелка неустойчивы и самопроизвольно переходят из β - в α -спиральную форму. В настоящее время хорошо известно, что такие аминокислоты, как метионин, валин и изолейцин, при определенном их расположении в молекуле белка способствуют образованию β -структур.

Следует сказать, что между α -кератинами и фиброином имеются еще два различия. В α -кератинах все пептидные цепи направлены в одну сторону, тогда как в фиброине соседние пептидные цепи — в противоположные стороны. Кроме того, в α -кератине содержится много остатков цистеина, расположенных таким образом, что между соседними пептидными цепями образуются межцепочечные S—S-связи. Эти связи придают α -кератинам значительную стабильность и прочность. Разрушение дисульфидных связей в этих белках лежит в основе химической завивки волос (перманент). Для этого используют какое-либо серосодержащее

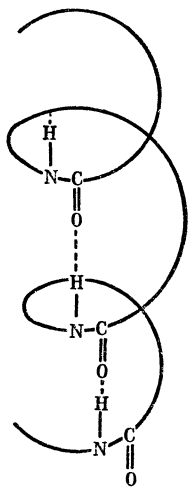


Рис. 5. α -Структура полипептида.

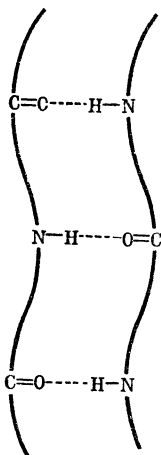


Рис. 6. β -Структура полипептида.

соединение, под действием которого временно разрываются поперечные дисульфидные связи. После окисления волос воздухом образуются новые поперечные дисульфидные связи, стабилизирующие прическу. В фиброине же дисульфидные связи отсутствуют.

Упаковка полипептидной цепи

Когда мы говорим о белковой молекуле, то представляем себе часто именно белковую глобулу — компактное тело без пустот внутри. Многими методами, в том числе и методом рентгеноструктурного анализа, было показано, что в белковой глобуле атомы соприкасающихся цепей сближены на расстояния, соответствующие суммам их радиусов, т. е. плотность упаковки достаточно велика. При этом не следует смешивать плотную укладку атомов внутри молекулы белка с рыхлой упаковкой самих белковых молекул во влажном белковом кристалле. Например, искусственно синтезированная полипептидная цепочка со случайным чередованием аминокислотных остатков и случайным чередованием R-групп в растворе имеет вид неплотного и нестабильного образования. Поэтому, когда говорят, что пространственная структура белка определяется последовательностью аминокислотных остатков в его полипептидной цепи или его первичной структурой, необходимо всегда помнить, что речь идет не просто о произвольной первичной структуре, а о последовательности аминокислот, эволюционно закрепленной за каждым белком. Именно генетически заданная последовательность аминокислотных остатков решающим образом определяет все те взаимодействия между различными участками полипептидной цепи, которые приводят к самосвертыванию цепи в компактную глобулу и стабилизируют полученную структуру. Этот процесс самоорганизации присущ и многим другим, более высоким уровням организации биологических систем. Возможность образования компактной белковой глобулы, устойчивой и неповторимой для каждого белка, подготовлена всем процессом эволюции, своего рода естественным отбором на уровне первичной структуры.

Способ укладки спиральных структур в глобулярных белках называют *третичной структурой* белка (рис. 7).

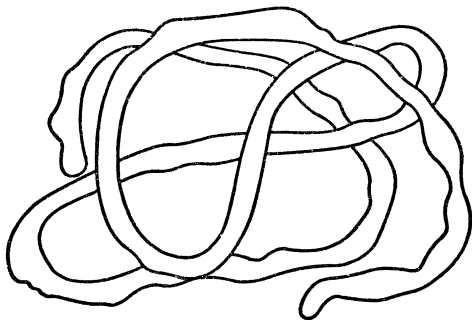


Рис. 7. Третичная структура белка.

То, что спиралевидная полипептидная цепь должна быть каким-то образом упакована, свернута, уплотнена,—факт очевидный. Ведь трудно себе представить, чтобы спиралевидная палочка, например, у пептидной нити альбулина, в которой длина больше толщины в 60 раз, могла бы находиться в прямолинейном, несвернутом состоянии. У многих белковых молекул эти соотношения еще больше. А опыт показывает, что в упакованном состоянии молекулы большинства известных белков имеют эллипсоидную форму, в которой толщина относится к длине, как 1:3 или 1:4. В образовании третичной структуры начинают играть большую роль радикалы аминокислот, которые (как мы уже упоминали) не принимали прямого участия в образовании первичной и вторичной структур. Основными связями, стабилизирующими третичную структуру, являются дисульфидные мостики, сложноэфирные, водородные и амидные связи.

Как влияет состав белка на его структуру

Зная состав белка, можно прогнозировать его строение, форму, свойства и роль в клетке.

Стремление каждой полипептидной цепи к образованию стабильной α -спиральной конфигурации определяется природой и последовательностью радикалов (R-групп) аминокислот в цепи. Для выяснения этого были проделаны опыты на синтетических полипептидах, в ко-

торых использовали полипептиды, состоящие из какой-нибудь одной аминокислоты. Оказалось, что полиаланин, R-группы которого малы и не имеют заряда, самопроизвольно образует α -спиральные структуры в водном нейтральном растворе. Такой полипептид выглядит как столбик, состоящий из одной α -спирали. Полилизин при таких же условиях находится в виде беспорядочного клубка. Это объясняется тем, что все R-группы полилизина несут положительный заряд, так как к азоту аминокислотной группы присоединяется протон по типу донорно-акцепторной связи и вся группа приобретает положительный заряд. В этом случае близко расположенные положительно заряженные R-группы отталкиваются друг от друга, причем сила этого отталкивания превышает стремление к образованию внутрицепочечных водородных связей, стабилизирующих α -спираль. Если же среда станет щелочной, то недостаток протонов вызовет диссоциацию аминокислотной группы и она превратится в нейтральную. Поэтому в щелочной среде полилизин будет спонтанно образовывать α -спираль. Полиглутаминовая кислота, подобно полилизину, также представляет собой при нейтральном pH беспорядочный клубок. Причина этого состоит в том, что в R-группах полиглутаминовой кислоты содержатся свободные карбоксильные группы, которые в нейтральной и щелочной среде отдают в раствор свой протон и приобретают отрицательный заряд, а одноименные заряженные аминокислотные группы, отталкиваясь друг от друга, препятствуют образованию α -спиральной структуры. Если же довести pH среды до 2, то избыток протонов нейтрализует карбоксильные группы и полиглутаминовая кислота образует α -спираль.

Некоторые полиаминокислоты не могут образовывать α -спирали по другим причинам. Так, в состав R-группы полиизолейцина входит объемистый, разветвленный заместитель, который, располагаясь рядом с α -углеродным атомом, служит стерической помехой образованию спирали. Полисерин имеет в R-группе гидроксильную группу, которая сама может участвовать в формировании водородных связей. Поэтому полисерин образует спиральную структуру, отличную от α -спирали. Полиглицин в принципе способен образовывать α -спираль, но он стремится принять конформацию другого типа, так называемую β -структуру, при которой цепи находятся в относительно растянутом состоянии. В такой структуре на один

виток приходится гораздо больше остатков глицина, чем в α -спирали.

Особенно интересно строение полипролина. В его молекуле атом азота входит в состав жесткого кольца, что исключает возможность какого-то ни было вращения вокруг C—N-связи. Кроме того, в полипролине нет внутримолекулярных водородных связей, стабилизирующих α -спираль, так как атомы азота в нем не связаны с атомами водорода. Поэтому для полипролина характерна не α -спираль, а спираль другого типа. Она напоминает по своей периодичности спираль, обнаруженную в фибриллярном белке коллагене, входящем в состав соединительной ткани животных и человека. Когда же пролин или оксипролин входит в состав обычных природных белков, то, в каком бы месте они не находились, они неизменно нарушают α -спираль, так возникает петля или изгиб.

Если бы все аминокислоты способствовали образованию α -спирали, то белковая молекула не могла бы свернуться в глобулу, а представляла бы собой столбик. Компактность молекулы белка (глобула) определяется во многом ее взаимодействием с водной средой. Неполлярные (гидрофобные) остатки этой молекулы отталкиваются от молекул воды и стремятся собраться внутри белковой молекулы, притягиваясь силами Ван-дер-Ваальса, а полярные (гидрофильные) почти все находятся на поверхности белковой глобулы. Все это стабилизирует глобулу. Чтобы свертывание в глобулу было возможным, необходима определенная первичная структура, что ясно указывает на закономерный, эволюционно выработанный характер первичной структуры.

Фактором, стабилизирующим структуры белка, служат и водородные связи. Образование водородных связей между группами остова полипептидной цепи определяет тот или иной тип вторичной структуры. Кроме того, в образовании водородных связей, как правило, участвуют еще и R-группы остатков серина, треонина, тирозина и гистидина. Возможность возникновения таких водородных связей как бы заранее предусмотрена при образовании определенной третичной (пространственной) структуры.

Существенным фактором стабилизации структуры служат дисульфидные связи между остатками цистеина. Они играют большую роль в поддержании структуры

таких белков, как инсулин, рибонуклеаза и др. Дисульфидные мостики как бы сшивают с помощью ковалентных связей и закрепляют в определенном положении сформировавшуюся третичную структуру. Если молекула белка содержит много дисульфидных связей, то для ее денатурации требуется сначала разрушить дисульфидные мостики, чего достигают чаще всего путем их восстановления до сульфгидрильных групп. Молекулу фермента рибонуклеазы можно денатурировать и затем снова восстановить ее активность, если в мягких условиях окислить образовавшиеся сульфгидрильные группы. Этот эксперимент доказал, что вся информация для образования третичной структуры содержится в самой последовательности аминокислот в полипептидной цепи, т. е. в первичной структуре, а дисульфидные мостики только закрепляют возникшую третичную структуру как окончательную упаковку полипептидной цепи в пространстве.

Высшая организация белковых молекул

Содержащийся в эритроцитах белок гемоглобин играет важнейшую роль, осуществляя дыхательную функцию крови. Он переносит кислород от легких к тканям и углекислый газ от тканей к легким. Гемоглобин — сложный белок, состоящий из собственно белковой части — глобина и небелкового участка — гема. В гемоглобине человека и животных гем имеет одинаковое строение, а белковые части несколько отличаются. В результате 25-летних исследований М. Перутц и его сотрудники установили точную структуру гемоглобина. Они выяснили, что молекула этого белка состоит из четырех отдельных полипептидных цепей: две цепи имели по 141 аминокислотному остатку каждая, а две другие — по 146 остатков. Каждая пептидная цепь связана с одним гемом, т. е. в одной молекуле гемоглобина имеется четыре гема. Каждая пептидная цепь свернута в клубок и очень напоминает своей третичной структурой другой белок — миоглобин (рис. 7).

Такое сходство дает основание предположить, что биологическая функция этих разных белков — связывание кислорода — обусловлена сходством химической структуры.

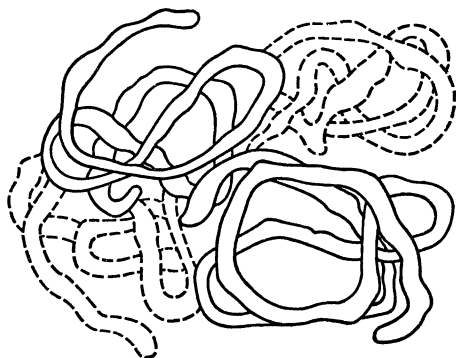


Рис. 8. Четвертичная структура белка.

Для некоторых белков (это относится прежде всего к гемоглобину) характерно более сложное строение, чем то, которое определяется как третичная структура. Четыре полипептидные нити гемоглобина объединяются в более сложную глобулу, которую и называют *четвертичной структурой* белка (рис. 8). При определенных условиях «кирпичики» четвертичной структуры, т. е. полипептидные нити, могут диссоциировать, распадаться на составляющие глобулу субъединицы — полипептидные цепи. При изменении условий полипептидные нити соединяются, и четвертичная структура восстанавливается.

При соединении кислорода с гемоглобином четвертичная структура этого белка меняется, расстояние между цепями уменьшается, создается впечатление сжатия глобулы. Таким образом, в процессе выполнения своей функции — переноса кислорода — гемоглобин сам претерпевает изменения: молекула сжимается при связывании с кислородом и расправляется при отдаче его. Этот феномен академик В. А. Энгельгардт сравнил с дыханием, когда сжимается и расправляется грудная клетка.

Замечено, что большинство глобулярных белков, молекулярная масса которых близка к 50 000,— это белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей, или субъединиц, т. е. они уже имеют четвертичную структуру. К таким белкам, для которых доказано существование четвертичной структуры, относятся амилаза, вирус табачной мозаики, пепсин, лактоглобулин, инсулин и др.

Но для большинства белков понятия «субъединица» и «полипептидная цепь» не совпадают, т. е. в одну субъединицу может входить несколько полипептидных цепей. Например, четвертичная структура фермента глутамат-дегидрогеназы состоит из восьми субъединиц. Общая относительная молекулярная масса всего фермента 2,2 млн., молекулярная масса одной субъединицы — 280 000, а полипептидной цепи — около 50 000. Следовательно, каждая субъединица состоит из нескольких цепей.

Установлено, что для белков, имеющих четвертичную структуру, ферментативная активность теряется при распаде белка на субъединицы, т. е. такой белок активен только при наличии четвертичной структуры. Какое же значение имеет четвертичная структура, в чем биологическая роль субъединиц в таком агрегированном белке?

Предполагают, что если белок, например, с молекулярной массой около 100 000 состоит только из одной нити, то случайное включение хотя бы одной ошибочной аминокислоты приводит к «браку» всей огромной молекулы белка. Если же белок, имея ту же молекулярную массу, состоит из десяти полипептидных нитей, то такая случайная ошибка коснется только одной из десяти цепей, а остальные соединятся между собой и возьмут «неотбракованную» десятую субъединицу. Такой вариант сохранит белок для выполнения предназначенной ему функции. Эксперименты подтверждают это предположение: если в одной субъединице есть ошибка в аминокислотном составе, то такая дефектная частица не подходит к соседним субъединицам и они находят в растворе для себя правильную небракованную субъединицу. Только после этого происходит самосборка крупной молекулы белка с четвертичной структурой.

Так как во многих белках отдельные цепи идентичны, т. е. состоят из одинаковых аминокислот, значит, их синтез может кодироваться только одним участком ДНК. Это приводит к значительной экономии участков ДНК и информационной РНК (*мРНК*), т. е. к экономии генетического материала. Ведь если бы белок составляли не несколько отдельных цепей, а одна длинная, состоящая из такого же числа аминокислот, что и сумма аминокислот во всех субъединицах, то для кодирования такого белка потребовалась бы ДНК, в несколько раз

превышающая по длине ту ДНК, которая достаточна для кодирования одной более короткой полипептидной цепи.

Таким образом, четвертичная структура белка определяется первичной структурой, т. е. аминокислотной последовательностью каждой субъединицы. Такие отдельные субъединицы способны к самосборке в более крупные белки, и это дает ряд преимуществ перед одноцепочечными молекулами белка: сводятся к минимуму последствия ошибок при синтезе белков, а также экономится генетический материал.

СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Молекулярная масса белков

Ученых, изучающих свойства белков, прежде всего интересовали вопросы: каковы размеры белковых молекул, какова их форма, молекулярная масса? Ответы на них получить было не просто. Определять относительную молекулярную массу по повышению температуры кипения белковых растворов, как это принято для других веществ, невозможно из-за того, что белки нельзя кипятить. Определение этого показателя по понижению температуры замерзания дает неточные результаты. К тому же белки никогда не встречаются в чистом виде. Они связаны с химическими соединениями других классов, в том числе и с солями, от которых трудно полностью избавиться. А присутствие солей значительно искажает результаты определения молекулярных масс традиционными методами. И все же методами, разработанными в конце прошлого века и в начале нашего столетия, было доказано, что молекулярная масса белков колеблется в больших пределах — от 14 000 до 45 000 и более. С такими необычными молекулами химики ранее не работали.

Принципиально новый и достаточно точный метод определения молекулярной массы предложил Т. Сведберг. Под действием силы инерции, развивающейся в ультрацентрифугах, белки осаждаются в зависимости от размера и массы их молекул. Центрифуга — это аппарат, основной частью которого является вращающийся ротор с вставленными в него пробирками с исследуемыми белковыми растворами. Ультрацентрифуги дают 70 000 и более оборотов в минуту. Скорость оседания частиц белка при этом значительно увеличивается.

А зная скорость, можно по специальным формулам вычислить относительные молекулярные массы белков. О значительных различиях молекулярных масс свидетельствуют следующие цифры: белок-фермент рибонуклеаза имеет массу 13 700, яичный альбумин — 45 000, γ -глобулин сыворотки крови — 160 000, а один из растительных белков — вирус помидора — 10 млн. За нижний предел молекулярной массы белков принято значение 6000. О числе атомов в составе белков можно судить по элементарному составу, например, лактоглобулина: $C_{1864} H_{3012} N_{68} S_{21}$.

При растворении в воде белки дают коллоидные растворы, частицы в которых довольно крупные — от 0,1 до 0,001 мкм. Для этих растворов характерен эффект Тиндаля. Эффект заключается в том, что при пропускании пучка света через раствор коллоидных частиц свет рассеивается и становится хорошо заметным в сосуде с раствором.

На разнице в молекулярных массах белков и других низкомолекулярных частиц основан метод очистки белков от примеси. Для этого раствор белка наливают в мешочек из целлофана или пергаменты и помещают его в чистый растворитель (воду). Молекулы низкомолекулярных веществ, которые находятся с белком в мешочке и загрязняют его, переходят постепенно через поры целлофана или пергаменты в растворитель, а белок остается. Если несколько раз сменить воду, окружающую мешочек, то белковый раствор можно полностью освободить от солей и других сопутствующих низкомолекулярных веществ. Такой метод очистки белков называют диализом.

Растворимость белков

В аминокислотах, входящих в состав белков, содержатся полярные функциональные группы, обладающие сродством к воде. Поэтому белки растворяются в воде хорошо, образуя коллоидные растворы. В то же время из-за большого размера молекул растворы белков оказываются неустойчивыми. Под влиянием различных водоотнимающих веществ (спирт, ацетон, соли и т. д.) белки выпадают в осадок. Действительно, если отнять воду от белка, от его полярных функциональных групп,

то огромные молекулы не смогут уже держаться в растворителе и будут, сталкиваясь друг с другом, осаждаться. Количество воды, которое может связать белок, довольно велико. Например, белки некоторых тканей могут образовывать своеобразный каркас, который способен удерживать в своих ячейках до 99 % воды. Именно такое количество воды содержится, например, у медуз за счет своеобразной структуры их тел.

Одним из важных свойств белка является его фракционное высаливание, т. е. выделение белка из раствора после прибавления растворов солей различных концентраций. Так, для выделения из сыворотки крови глобулинов добавляют к ней сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ до полунасыщения. После отделения белков глобулинов можно взять ту же соль, но более насыщенной концентрации, и осадить альбумины. Разделив таким образом две эти фракции, можно избавиться от соли диализом и получить отдельно альбумины и глобулины. Высаливание не приводит к инаktivации белка. Он сохраняет все свои природные свойства и может быть опять при необходимости растворен в воде. Такое же действие оказывает на растворы белков этиловый спирт, действующий как мощный водоотнимающий фактор. Но действие спирта должно быть непродолжительным, иначе белок потеряет активность и способность опять растворяться в воде.

Кроме нейтральных солей, осаждение белков вызывают соли тяжелых металлов (Hg, Zn, Ag, Pb и др.) уже в небольших концентрациях. Они образуют комплексы с функциональными группами белков, изменяют структуру белков, которые в связи с этим теряют устойчивость в растворе и осаждаются. В ряде случаев осаждение солями тяжелых металлов приводит к потере природных свойств белка и представляет необратимый процесс. Такие белки теряют способность растворяться в воде, а ферменты не способны катализировать реакции.

Большое практическое применение получил метод осаждения белков органическими кислотами, в частности трихлоруксусной кислотой CCl_3COOH . Она осаждает только белки и не осаждает полипептиды. Это очень важно в медицине: когда хотят определить небелковый азот крови, предварительно осаждают белок трихлоруксусной кислотой, а с надосадочной жидкостью проводят необходимые исследования.

Денатурация

Потеря натуральных свойств белка, которая происходит при его осаждении тяжелыми металлами, носит название *денатурации*. Она может происходить и под влиянием других физических или химических факторов. В этом случае происходят внутримолекулярные изменения, приводящие чаще всего к потере способности белков растворяться. Денатурация подразумевает различные превращения молекулы белка, но не разрыв полипептидной цепочки, т. е. она не затрагивает первичную структуру белка.

О том, что произошла денатурация белка, можно судить по ряду признаков: а) уменьшается растворимость белка; б) изменяются форма и размеры молекулы; в) теряется ферментативная активность; г) изменяются оптические свойства белка и т. д. У различных белков это проявляется по-разному.

В результате денатурации часто оказывается, что в белке появились какие-то новые, «дополнительные» функциональные группы. Это произошло потому, что при разворачивании молекулы обнажаются замаскированные внутри молекулы SH-, OH-группы и другие, доступные для реакций.

Кроме указанных причин, денатурация может быть вызвана нагреванием белка. При этом происходит увеличение теплового движения отдельных участков полипептидной нити, водородные связи разрываются, белок разворачивается и приобретает необычную, неприродную форму, водородные связи (и др.) устанавливаются в несвойственных данной молекуле местах и конфигурация молекулы меняется. Гидратная оболочка вокруг такого белка нарушается, отдельные молекулы белка соединяются между собой в более крупные частицы, слипаются и уже не могут держаться в растворе — начинается процесс осаждения денатурированного белка. Процесс восстановления структуры белка после денатурации называют *ренатурацией* (рис. 9). Иногда денатурированный белок не выпадает из раствора, так как он имеет большое число зарядов, препятствующих сближению и слипанию отдельных частиц. Если эти заряды снять или уменьшить, добавив в раствор ионы с противоположным знаком, то взвешенные частички начнут слипаться и выпадать в осадок.

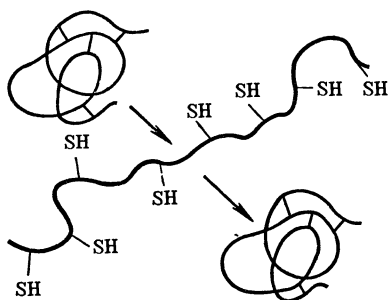


Рис. 9. Схема обратимой денатурации белка.

Какое практическое значение может иметь денатурированный белок? Всегда ли нужно препятствовать процессу денатурации? На все эти вопросы нельзя дать однозначный ответ. Кулинарная обработка мяса, яиц и других белоксодержащих продуктов приводит к денатурации белка. Денатурация в этом случае готовит молекулы белка к воздействию пищеварительных фермен-

тов, содержащихся в желудочном и кишечном соке. Денатурацию используют при отравлении как лечебную процедуру. Например, при отравлении солями тяжелых металлов больному дают молоко или большое количество сырого яичного белка. Белки связывают тяжелые металлы. Образуются нерастворимые комплексы, удерживающие соли тяжелых металлов, которые не могут всосаться из желудка в кровь. Ядовитое действие металлов нейтрализовано. Если после этого у больного вызвать рвоту, яд будет удален из организма.

Однако в ряде случаев с денатурацией необходимо бороться, прежде всего при получении в чистом виде белков, ферментов, гормонов, чтобы сохранить их активность и другие природные свойства, уберечь от повреждения.

При выделении белков из биологического материала (из печени животных, мышц, сыворотки крови и т. д.) часто прибегают к различным физико-химическим приемам: нагреванию, замораживанию с последующим оттаиванием, действию органических и неорганических веществ, ионизирующего излучения, ультразвука. Многие из этих приемов, особенно при продолжительном воздействии, могут вызвать денатурацию. Например, разрушение мембран клеток и субклеточных частиц для последующего извлечения из них белка осуществляют действием ультразвука или чередованием замораживания-оттаивания. Но при этом могут быть повреждены (денатурированы) содержащиеся в клетках белки. Поэтому выделение белков проводят при охлаждении, чтобы ис-

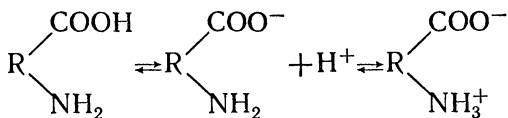
ключить тепловую денатурацию, при определенных значениях кислотности, в присутствии веществ, тормозящих денатурацию.

Денатурация может быть обратимой. Многие вещества действуют на белок до тех пор, пока они находятся в растворе; при их удалении структура и свойства белка восстанавливаются. Однако продолжительное действие денатурирующего агента или сильные денатурирующие факторы приводят к глубоким необратимым изменениям структуры и свойств белка.

Необходимо отметить, что денатурация не приводит к разрушению ковалентных связей. Любые изменения, в результате которых происходит выделение из белка аммиака или других веществ, расщепление до пептидов и другие превращения, связанные с отщеплением части белка, уже не считаются денатурацией.

Белки-электролиты. Изоэлектрическая точка

Аминокислоты, составляющие белки, относятся к амфотерным веществам, обладающим одновременно свойствами и кислот, и оснований. Это объясняется тем, что не все amino- и карбоксильные группы аминокислот заняты в образовании пептидных связей. В молекулах ди-аминокислот остаются свободными аминогруппы, а в молекулах моноаминодикарбоновых кислот — карбоксильные группы. Например, при растворении белка в воде от карбоксильных групп отщепляются протоны, и белок приобретает свойства слабой кислоты:



Появляющиеся в растворе протоны тотчас же присоединяются к NH_2 -группам, имеющим основной характер, вследствие чего они переходят в ионизированную форму — NH_3^+ .

Таким образом, белок несет положительные и отрицательные заряды, т. е. является диполярным ионом (рис. 10).

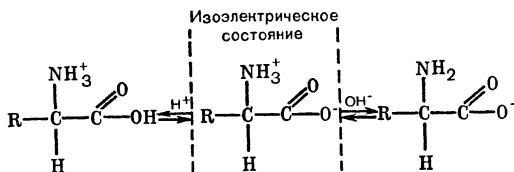


Рис. 10. Как образуются заряды у аминокислоты.

Белки могут изменять свои заряды в зависимости от кислотности растворов. В кислой среде они обычно движутся к катоду, в щелочной — к аноду.

Амфотерность белков определяется не только присутствием свободных карбоксильных или аминогрупп в белке, но и наличием других функциональных группировок. Слабо выраженными кислотными свойствами обладают SH-группа цистеина и OH-группа тирозина.

Если заряд белковой молекулы изменяется при изменении pH, значит, должна существовать такая точка, в которой белок не несет в избытке положительный и отрицательный заряд. Такое значение pH, когда заряд белка равен нулю, называется *изоэлектрической точкой*. Изоэлектрические точки некоторых белков представлены в таблице:

Белок	pH	Белок	pH
Пепсин	1,0	Химотрипсин	8,1
Лактоглобулин	5,1	Рибонуклеаза	9,4
Фосфоорилаза	5,8	Лизоцим	10,5
Гемоглобин	6,7	Цитохром	10,65

В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы. Поэтому для более полного осаждения белка необходимы два условия: устранение гидратной оболочки какими-либо водоотнимающими веществами и снятие избыточного электрического заряда. Для этого осаждение белка рекомендуют проводить при определенных значениях pH, т. е. подкисляют или подщелачивают раствор.

Если белок находится в растворе при значениях pH выше изоэлектрической точки, то он обладает суммарным

отрицательным зарядом и движется в электрическом поле к аноду. От присутствия в растворах некоторых даже нейтральных солей белки могут существенно смещать значение своей изоэлектрической точки. Соли влияют на степень ионизации многочисленных боковых функциональных групп в макромолекуле белка. Белок может просто связывать некоторые ионы растворов, например ионы кальция, магния, хлора, фосфаты. После такого связывания изоэлектрическая точка белка существенно меняется.

Таким образом, природа среды, в которой растворен белок, в значительной степени влияет на его изоэлектрическую точку.

Наличие зарядов у белковых молекул позволяет проводить тонкое разделение различных белковых фракций путем электрофореза в зависимости от значения и знака заряда. Этот метод широко используется на практике для изучения состава белков крови. Такие данные дают большую информацию для диагностики заболеваний и контроля за эффективностью проводимого лечения. Большое значение имеет этот метод для биологии и сельского хозяйства.

КАКИЕ БЫВАЮТ БЕЛКИ

Принципы классификации белков

В настоящее время из органов и тканей человека, животных, растений и микроорганизмов выделено много разнообразных белковых препаратов. Выделены также препараты белков из отдельных частей клетки (например, из ядер, рибосом и т. д.), из неклеточного вещества (сыворотки крови, белка куриного яйца). Полученные препараты имеют различные названия. Однако для систематического изучения белки необходимо распределить по группам т. е. классифицировать. Но это встречает определенные трудности. Если в органической химии вещества классифицируют на основании их химического строения, то в биологической химии строение большинства белков во всех деталях еще не изучено. Кроме того, классифицировать белки на основании только их химического строения очень сложно. Также невозможно дать достаточно обоснованную классификацию белков по их функциям в организме. Очень часто белки, близкие по строению, обладают совершенно различными биологическими функциями (например, гемоглобин и такие ферменты, как каталаза, пероксидаза и цитохромы).

Несколько бóльшие возможности для классификации белков предоставляются при изучении физико-химических свойств белковых веществ. Неодинаковая растворимость белков в воде и других растворителях, различные концентрации солей, необходимые для высаливания белков, — вот обычно те признаки, которые позволяют классифицировать ряд белков. Одновременно принимаются к сведению и некоторые уже известные особенности в химическом строении белков и, наконец, их происхождение и роль в организме.

Весь обширный класс белковых веществ принято разделять на две большие группы: простые белки, или *протеины*, и сложные белки, или *протеиды*. Простые белки при гидролизе распадаются только на аминокислоты, а сложные наряду с аминокислотами дают соединения другого типа, например: углеводы, липиды, гем и т. д. Таким образом, сложные белки, или протеиды, состоят из собственно белкового вещества (белковой части или простого белка) в сочетании с другими небелковыми веществами.

К простым белкам, или протеинам, относят протамины, гистоны, альбумины, глобулины, проламины, глютелины, протеиноиды и другие белки, не принадлежащие ни к одной из перечисленных групп, например многие белки-ферменты, мышечный белок — миозин и др. Группу сложных белков, или протеидов, обычно также подразделяют на несколько подгрупп в зависимости от характера содержащихся в них небелковых компонентов.

Однако подобная классификация имеет весьма относительную ценность. Новейшими исследованиями установлено, что многие простые белки в действительности связаны с небольшим количеством тех или иных небелковых соединений. Так, некоторые протеины можно было бы отнести к группе сложных белков, поскольку они, как оказалось, связаны с небольшим количеством углеводов, иногда липидов, пигментов и т. д. В то же время довольно трудно точно охарактеризовать с химической точки зрения и некоторые сложные белки. Так, например, липопротеиды в некоторых случаях представляют настолько непрочные комплексы, что их можно было бы рассматривать скорее как адсорбционные соединения простых белков с липидами, чем как индивидуальные химические вещества.

Простые белки

Наиболее простыми белками являются *протамины* и *гистоны*. Они имеют слабоосновной характер, в то время как абсолютное большинство других — кислый. Основной характер протаминов и гистонов обусловлен тем, что в состав их молекул входит большое количество диаминомонокрбонновых аминокислот, таких, как лизин и аргинин. У этих кислот одна α -аминогруппа связана пептидной связью с карбоксилем, а другая остается сво-

бодной. Она и обуславливает слабощелочную среду растворов белков. В соответствии со своим основным характером гистоны и протамины обнаруживают ряд особых, не встречающихся у других белков свойств. Так, эти белки находятся в изоэлектрической точке при щелочной реакции среды. Вот почему протамины и гистоны «свертываются» при кипячении лишь при добавлении щелочи.

Протамины, впервые выделенные Ф. Мишером, содержатся в большом количестве в сперматозоидах рыб. Они характеризуются очень высоким содержанием основных аминокислот (до 80 %), особенно аргинина. Кроме того, в протаминах отсутствуют такие аминокислоты, как триптофан, метионин, цистеин, а в большинстве протаминов также и тирозин, и фенилаланин. Протамины — относительно небольшие белки. Они имеют молекулярную массу от 2000 до 12 000. Из ядер мышечных клеток их выделить не удалось.

Гистоны обладают менее основными свойствами, чем протамины. В них содержится лишь 20—30 % диамино-монокарбоновых кислот. Аминокислотный состав гистонов значительно более разнообразен, чем протаминов, однако в них также отсутствует триптофан или его имеется очень небольшое количество. В состав гистонов входят также модифицированные, измененные аминокислотные остатки, например: О-фосфосерин, метилированные производные аргинина и лизина, ацетилированные по свободной аминокруппе производные лизина.

Много гистонов содержится в зубной железе, ядрах клеток железистых тканей. Гистоны не являются однородными белками и могут быть разделены на ряд фракций, отличающихся по химическому составу и биологическим свойствам друг от друга. Классификация гистонов основана на относительных количествах лизина и аргинина. Гистон H1 очень богат лизином. Для гистона H2 характерно умеренное содержание этой аминокислоты, причем существует два типа этого гистона — H2A и H2B. Гистон H3 умеренно богат аргинином и содержит цистеин. Гистон H4 богат аргинином и глицином.

Гистоны одного и того же типа, полученные из различных животных и растений, имеют очень сходные аминокислотные последовательности. Такой консерватизм в эволюции, по-видимому, служит сохранению последовательности, обеспечивающей существенные и специфич-

ческие функции. Это лучше всего подтверждается тем фактом, что аминокислотные последовательности гистона H4 из проростков гороха и тимуса быка отличаются только двумя из 102 аминокислотных остатков, присутствующих в молекуле.

Благодаря наличию большого количества свободных аминогрупп протамины и гистоны образуют ионные связи с остатками фосфорной кислоты, входящей в состав ДНК, и способствуют компактной укладке двойной спирали ДНК в образованном комплексе ДНК с данными белками. Комплекс ДНК с гистонами — хроматин содержит ДНК и гистоны в примерно равном количественном отношении.

Кроме взаимодействия с ДНК, гистоны также реагируют друг с другом. Экстракцией хлоридом натрия из хроматина был выделен тетрамер, состоящий из двух молекул гистона H3 и двух молекул гистона H4. В этих же условиях гистоны H2A и H2B могут быть выделены вместе в виде димера. Современная модель структуры хроматина предполагает, что один тетрамер и два димера взаимодействуют с 200 парами оснований ДНК, что составляет примерно участок длиной около 70 нм. При этом образуется сферическая структура диаметром 11 нм. Считается, что хроматин представляет собой подвижную цепь, составленную из таких единиц. Эта предположительная модель подтверждается различными методами исследования.

Альбумины и глобулины являются хорошо изученными белками, входящими в состав всех животных тканей. Основная масса белков, находящихся в плазме крови, в сыворотке молока, в яичном белке и др., состоит из альбуминов и глобулинов. Их соотношение в различных тканях удерживается в определенных границах.

Альбумины и глобулины отличаются друг от друга по физико-химическим свойствам. Одним из распространенных методов разделения альбуминов и глобулинов является их высаливание с помощью сульфата аммония. Если к раствору белка добавить такое количество сульфата аммония, которое содержится в том же объеме разведенного пополам насыщенного раствора этой соли, из раствора выделяются глобулины. Если их отфильтровать и к фильтрату продолжать добавлять кристаллический сульфат аммония до полного насыщения, в осадок выпадает альбумин. Таким образом, глобулины осаждаются в

полунасыщенном растворе сульфата аммония, в то время как альбумины — в насыщенном растворе.

Изучение альбуминов и глобулинов обнаружило и другие различия в их физико-химических свойствах. Оказалось, что альбумины способны растворяться в дистиллированной воде, в то время как для растворения глобулинов к воде нужно добавить небольшое количество соли. На основании этого возможно отделение глобулинов от альбуминов путем диализа белкового раствора. Для этого раствор белка, помещенный в мешочек из полупроницаемого материала, например целлофана, опускают в дистиллированную воду. Раствор белка постепенно обессоливается, а глобулины выпадают в осадок. Их отделяют от оставшихся в растворе альбуминов. Глобулины можно осадить и насыщенным раствором сульфата натрия, в то время как альбумины растворяются в нем.

В больших количествах альбумины и глобулины выделяются с лечебными целями из крови доноров. Препараты альбумина крови человека используются для введения больным, потерявшим много крови, как кровезаменители. Препараты γ -глобулина используется как для профилактики, так и для лечения некоторых инфекционных заболеваний. В настоящее время для выделения препаратов альбуминов и глобулинов из крови доноров разработаны методы раздельного осаждения этих белков, основанные на их различной растворимости в растворах, содержащих этиловый спирт в различных концентрациях, на холоде. Таким методом получают высокоочищенные препараты альбумина и разных фракций глобулинов, в дальнейшем используемых в лечебных целях.

Среди простых белков растительного происхождения вызывают интерес *глутелины и проламины*. Они содержатся в семенах злаков, образуя основную массу клейковины. Клейковина может быть выделена в виде клейкой массы путем растирания муки с водой и постепенного отмывания крахмала медленным током воды. Клеящие свойства крахмального клейстера зависят от наличия в нем клейковины. Чем больше клейковины содержится в зерне злаков, тем более ценным считается это зерно. К глутелинам относятся, например, оризенин, получаемый из риса, и глутенин, получаемый из пшеницы.

Одним из важнейших проламинов и наиболее характерным белком эндоспермы пшеничного зерна является

глютадин. Глютадин нерастворим в воде и солевых растворах, но в отличие от других белков растворяется в растворе спирта (70 %) и с его помощью извлекается из зерна. Из других представителей проламинов можно назвать гордеин, получаемый из ячменя, и зеин — из кукурузы. Эти белки, подобно глютадину, экстрагируются из клейковины раствором спирта (70—80 %). Все проламины характеризуются относительно высоким содержанием пролина.

Отличительной особенностью белков опорных тканей является их полная нерастворимость в воде, солевых растворах, разведенных кислотах и щелочах. Их объединили под общим названием *протеиноидов*, что значит белковоподобные. Эти белки относятся к фибриллярным, или волокнистым, белкам, частицы которых имеют форму более или менее вытянутых волокон или нитей. Вследствие нерастворимости протеиноидов в воде на них не действуют ферменты пищеварительных соков. Протеиноиды, как правило, непригодны для питания. К ним относятся, например, белки рогов, копыт, шерсти, волос и др. В то же время ряд белков опорных тканей способен перевариваться пищеварительными соками. Это белки костной ткани, сухожилий, хрящей.

Из отдельных представителей протеиноидов большой интерес представляет коллаген, входящий в состав соединительной ткани (рис. 11). Простейшим методом его получения является обработка костей разведенной соляной кислотой. При этом минеральные вещества переходят в раствор, а коллаген остается. Биологическим предшественником коллагена является проколлаген. Он наряду с коллагеном найден в коже и других тканях. Этот белок удалось выделить в кристаллическом виде. От коллагена он отличается как своим аминокислотным составом (в нем много содержится аминокислоты пролин, в то время как в коллагене — гидроксипролин), так и тем, что расщепляется всеми ферментами, гидролизующими белки.

Белковое вещество сухожилий и связок носит название эластина. Этот протеиноид несколько легче поддается действию пищеварительных соков, чем коллаген.

Кератины являются характерными протеиноидами волос, рогов, ногтей, эпидермиса и шерсти. В их состав входит относительно большое количество цистеина и цистина.

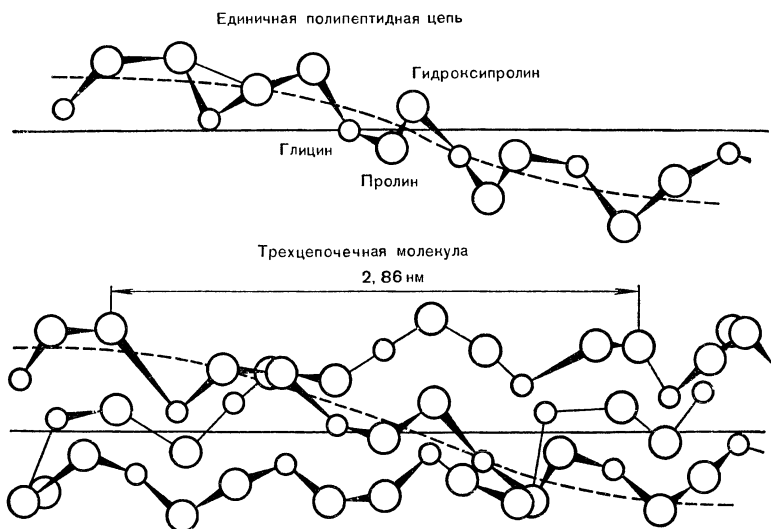


Рис. 11. Схема структуры коллагена.

Фиброины являются протеиноидами, вырабатываемыми в придильных железах насекомых: пауков, гусениц некоторых бабочек (шелкопрядов) и др. Фиброин шелка, составляющий основную массу шелковой нити, выделяется в жидком виде, но затем быстро затвердевает. Шелковые нити, идущие на изготовление тканей, представляют собой фиброин, освобожденный от клея серицина.

Сложные белки

Важнейшими сложными белками являются *нуклеопротеиды, хромопротеиды, гликопротеиды, фосфопротеиды, липопротеиды*. К группе сложных белков относятся белки, в состав которых, помимо белковой части, входит та или иная небелковая группа — *простетическая группа*. Она освобождается при гидролизе протеидов наряду с продуктами гидролитического расщепления белковой молекулы — аминокислотами. Так, нуклеопротеиды дают при гидролизе нуклеиновые кислоты и продукты их распада, гликопротеиды — углеводы и близкие к углеводам вещества, фосфопротеиды — фосфорную кислоту, хромопроте-

иды — окрашенную группировку, чаще всего гем, липопротеиды — различные липиды. Сложные белки-ферменты можно также расщепить на белковую часть и небелковую простетическую группу. Все эти простетические группы, более или менее прочно связанные с белковым компонентом сложного белка, в большинстве случаев хорошо изучены с химической точки зрения.

Среди сложных белков очень большой интерес представляют *нуклеопротеиды*. Значение нуклеопротеидов определяется прежде всего тем, что из этих белков, как показывает их название, состоит основная масса чрезвычайно важной части клетки — клеточного ядра. Ядро является центром управления жизнедеятельности клетки. Такие процессы, как деление клетки, передача наследственной информации, управление биосинтезом белков, осуществляются при участии ядерных структур. Нуклеопротеиды, а точнее дезоксирибонуклеопротеиды, могут быть выделены из зобной железы, селезенки, из сперматозоидов, ядерных эритроцитов птиц и некоторых других тканей. В их составе, помимо белковой части, находится дезоксирибонуклеиновая кислота, ответственная за хранение и передачу наследственной информации.

В то же время другой тип нуклеопротеидов — рибонуклеопротеиды входят в состав по преимуществу цитоплазмы клеток, принимая непосредственное участие в образовании важнейших биологических систем, в первую очередь системы биосинтеза белка. В клетке рибонуклеопротеиды являются составной частью клеточной органеллы — рибосомы.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) входит в хроматин — сложный нуклеопротеид, из которого состоят хромосомы. Кроме того, в клетке существует несколько типов рибонуклеиновой кислоты (РНК). Есть информационная РНК (*иРНК*), которая синтезируется при считывании информации с ДНК и на которой потом синтезируется полипептидная цепь; транспортная РНК (*тРНК*), доставляющая аминокислоты к *иРНК*, и рибосомальная РНК (*рРНК*), входящая в состав клеточных органелл — рибосом, которые образуют комплексы с *иРНК*. В этих комплексах при участии всех трех типов РНК и аминокислот происходит синтез белка.

Нуклеиновые кислоты, находящиеся в составе нуклеотидов, представляют огромный интерес и как компоненты вирусов, занимающих промежуточное место между моле-

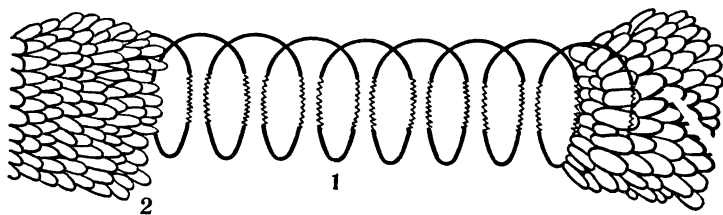


Рис. 12. Вирус мозаичной болезни табака: 1 — спираль РНК; 2 — субъединицы белка, образующие защитный футляр.

кулами сложных белков и самыми мелкими болезнетворными микроорганизмами. Многие вирусы могут быть получены в кристаллической форме. Эти кристаллы представляют собой совокупность вирусных частиц, а те в свою очередь состоят из белкового «футляра» и находящейся внутри него спирализованной молекулы нуклеиновой кислоты (рис. 12). Белковый «футляр» (оболочка вируса) построен из большого количества субъединиц — молекул белка, соединенных между собой с помощью ионных и гидрофобных связей. Причем связь между белковой оболочкой и нуклеиновой кислотой у вирусных частиц весьма непрочна. При проникновении некоторых вирусов в клетку белковая оболочка остается на поверхности, нуклеиновая кислота внедряется в клетку и заражает ее. При участии этой нуклеиновой кислоты в клетке синтезируются белки вируса и вирусная нуклеиновая кислота, что приводит в конечном итоге к образованию большого количества новых вирусных частиц и гибели зараженной клетки. Все это позволяет считать вирусную частицу — гигантскую молекулу сложного белка-нуклеопротеида — своеобразной сверхмолекулярной структурой. Вирусы — это промежуточное звено между химическими веществами и сложными биологическими системами. Вирусы, как нуклеопротеиды, как бы заполняют разрыв между «химией» и «биологией», между веществом и существом.

Белковыми компонентами сложных белков клеточного ядра, помимо уже известных нам белков основного характера, гистонов и протаминов, являются и некоторые кислые белки, так называемые негистоновые белки хроматина, основной функцией которых является регуляция

активности дезоксирибонуклеиновой кислоты, как основного хранителя генетической информации.

Хромопротеиды — сложные белки, которые состоят из простого белка и связанного с ним окрашенного химического соединения. Это соединение может принадлежать к самым различным типам химических веществ, однако чаще всего такое органическое соединение образует еще и комплекс с металлом — железом, магнием, кобальтом.

К хромопротеидам относятся такие важные белки, как гемоглобины, при помощи которых осуществляется перенос кислорода с кровью в ткани, и миоглобин — белок мышечных клеток позвоночных и беспозвоночных. Миоглобин в четыре раза меньше, чем гемоглобин. Он забирает кислород у гемоглобина и снабжает им мышечные волокна. Кроме того, к хромопротеидам относится гемоцианин, переносящий кислород у многих беспозвоночных. Этот гигантский по размерам молекулы белок содержит медь вместо железа, как в гемоглобине, и потому имеет голубой цвет. Поэтому кровь ракообразных, кальмаров, осьминогов голубая в отличие от красной крови животных.

В растениях содержится хромопротеид зеленого цвета — хлорофилл. Его небелковая часть очень напоминает небелковую часть гемоглобина, только вместо железа она содержит магний. С помощью хлорофилла растения фиксируют энергию солнечных лучей и используют ее для фотосинтеза.

Фосфопротеиды — это сложные белки, при гидролизе которых наряду с аминокислотами получается более или менее значительное количество фосфорной кислоты. Важнейшим представителем этой группы белков является казеиноген молока. Помимо казеиногена, к группе фосфопротеидов относятся ововителлин — белок, выделенный из яиц, ихтулин — белок, полученный из рыбьей икры, и некоторые другие. Большой интерес представляют фосфопротеиды, обнаруженные в клетках мозга. Установлено, что фосфор этих белков обладает очень высокой скоростью обновления.

Гликопротеиды — сложные белки, небелковая группа которых является производным углеводов. Отделение углеводного компонента от гликопротеидов часто сопровождается полным или частичным гидролизом гликопротеида. Таким образом, при гидролизе различных гликопротеидов

получаются наряду с аминокислотами и продукты гидролиза углеводной группы: манноза, галактоза, фукоза, гексозамины, глюкуроновая, нейраминная кислоты и др. В составе простетической группы различных гликопротеидов обычно находятся не все перечисленные вещества. У некоторых гликопротеидов углеводная часть непрочна связана с белковым компонентом и легко от него отделяется. Простетические группы некоторых гликопротеидов, известные под общим названием мукополисахаридов (более современное название — гликозаминогликаны), встречаются в тканях и в свободном виде. Такими важнейшими мукополисахаридами являются гиалуроновая и хондронтинсерная кислоты, входящие в состав соединительной ткани.

Гликопротеиды входят в состав всех тканей и носят соответственно названия: хондромукоиды (из хряща), остеоомукоиды (из костей), овомукоиды (из яичного белка), муцин (в слюне). Они присутствуют также в связках и сухожилиях и имеют большое значение. Например, высокая вязкость слюны, связанная с наличием в ней муцина, облегчает проскальзывание пищи в желудок, защищая слизистую оболочку полости рта от механических повреждений и раздражений химическими веществами.

В настоящее время принято разделять все гликопротеиды на две большие группы: собственно гликопротеиды и полисахарид-белковые комплексы. Первые имеют небольшое число разных моносахаридных остатков, лишенных повторяющегося звена и присоединенных ковалентно к полипептидной цепи. Большинство сывороточных белков является гликопротеидами. Полагают, что эти гетерополисахаридные цепочки являются для сывороточных белков как бы почтовыми открытками, по которым белки распознаются теми или иными тканями. В то же время гетерополисахаридные цепочки, находящиеся на поверхности клеток, являются адресами, по которым эти белки следуют, чтобы попасть в клетки именно той ткани, а не другой.

Полисахарид-белковые комплексы имеют большое количество углеводных остатков в полисахаридной части, и в ней всегда можно выделить повторяющиеся звенья. В одних случаях связь белок — углевод бывает ковалентная, в других — электростатическая. Из полисахарид-белковых комплексов большую роль играют протео-

гликаны. Они образуют внеклеточную основу соединительной ткани и могут составлять до 30 % сухой массы ткани. Это вещества, содержащие большое количество отрицательно заряженных группировок, множество различных гетерополисахаридных боковых цепей, ковалентно связанных с полипептидным остовом. В отличие от обычных гликопротеидов, которые содержат несколько процентов углеводов, в протеогликанах до 95 % и более углеводов. По своим физико-химическим свойствам они больше напоминают полисахариды, чем белки. Полисахаридные группы протеогликанов можно получить с хорошим выходом после обработки их протеолитическими ферментами. Протеогликаны выполняют несколько биологических функций: во-первых, механическую, так как они защищают суставные поверхности и служат смазочным материалом; во-вторых, являются ситом, задерживающим крупномолекулярные частицы, и способствуют проникновению через протеогликановый барьер только низкомолекулярных частиц; в-третьих, связывают катионы, причем настолько прочно, что даже катионы K^+ и Na^+ , связанные с протеогликанами, почти не диссоциируют и их ионные свойства не проявляются. Катионы же Ca^{2+} не просто связываются протеогликанами, а и способствуют объединению их молекул.

В клеточных оболочках микроорганизмов содержатся полисахарид-белковые комплексы еще более прочные. В этих комплексах вместо белков находятся пептиды, и поэтому они носят название пептидогликанов. Практически вся клеточная оболочка представляет собой одну гигантскую макромолекулу мешковидного типа — пептидогликан, причем его структура может несколько варьировать в зависимости от вида бактерии. Если углеводная часть пептидогликана у бактерий разного вида практически одинакова, то в белковой части происходит варьирование как аминокислот, так и их последовательности в зависимости от вида бактерий. Связи между углеводами и пептидами в пептидогликанах ковалентные и очень прочные.

Сложные белки *липопротеиды* состоят из белковой части и связанной с ней в различных соотношениях липидной — жировой части. Липопротеиды обычно нерастворимы в эфире, бензоле, хлороформе и других органических растворителях. Однако известны соединения липидов с белками, которые по своим физико-химическим

свойствам стоят уже ближе к типичным липидам и липоидам, т. е. жироподобным веществам, чем к белкам. Такие вещества называются протеолипидами.

Способностью соединяться с липидами с образованием более или менее прочных комплексов обладает целый ряд белков: альбумины, некоторые фракции глобулинов, белки клеточных мембран и некоторых микроструктур клетки. В живом организме с различными липидами и липоидами могут быть связаны простые белки. Чаще всего связь между белком и липидом в таких случаях нековалентная, но тем не менее она прочная, и даже при обработке органическими растворителями в мягких условиях липиды не отделяются от белка. Это возможно только при денатурации белковой части.

Липопротеиды играют важную роль в образовании структурных компонентов клетки, особенно в формировании разнообразных мембран клетки: митохондриальной, микросомальной и т. д. Очень много липопротеидов входит в состав нервной ткани. Они выделены и из белого, и из серого вещества головного мозга. В крови человека и животных также имеются липопротеиды.

Среди белков, наделенных каталитическими функциями,— ферментов можно также встретить не только простые, но и сложные белки, состоящие из белкового компонента и небелковой группы. К таким протеидам относятся ферменты, катализирующие различные окислительно-восстановительные процессы. Небелковые группы некоторых из них близки по строению и свойствам к небелковым группам гемоглобина — гему и обладают выраженной окраской, что позволяет их отнести к группе хромопротеидов. Существует целый ряд белков-ферментов, которые содержат атомы того или иного металла (железа, меди, цинка и др.), непосредственно связанные с белковой структурой. Эти сложные белки-ферменты называют *металлопротеидами*.

К железосодержащим белкам относятся ферритин, трансферрин, гемосидерин. Трансферрин — растворимый в воде железопротеид с молекулярной массой около 90 000, находящийся главным образом в сыворотке крови во фракции β -глобулинов. Белок содержит 0,13 % железа; это примерно в 150 раз меньше, чем в ферритине. Железо соединяется с белком с помощью гидроксильных групп тирозина. Трансферрин — физиологический переносчик железа в организме.

Известен ряд ферментов, активность которых зависит от присутствия металлов в составе белковой молекулы. Это алкогольдегидрогеназа, содержащая цинк, фосфогидролазы, включающие магний, цитохромоксидаза, содержащая медь, и другие ферменты.

Кроме перечисленных групп белков, можно выделить и более сложные надмолекулярные комплексы, в составе которых одновременно присутствуют белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты. В мозговой ткани, например, содержатся липонуклеопротеиды, липогликопротеиды, липогликонуклеопротеиды.

РОЛЬ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ

Функции белков в организме разнообразны. Они в значительной мере обусловлены сложностью и разнообразием форм и состава самих белков.

Одной из важнейших функций белковых молекул является *пластическая*. Белки — незаменимый строительный материал. Все клеточные мембраны и мембраны субклеточных структур содержат белок, роль которого здесь многообразна. Количество белка в мембранах составляет более половины массы. Это различные по составу белки, которые могут быть разделены электрофорезом или другими методами. Белки мембран трудновыделимы потому, что при нейтральных значениях pH они нерастворимы в воде. Их молекулярные массы колеблются в пределах от 23 000 до 60 000. Из большого разнообразия структурных белков, кроме уже упомянутых мембранных, приведем несколько примеров, часть из которых, может быть, уже знакома читателю: α -кератины являются структурными компонентами кожи, перьев, копыт; коллаген входит в состав соединительной ткани и составляет основу сухожилий, хрящей; фиброин — обязательный компонент шелка; эластин входит в структуру эластичной соединительной ткани — связок. Но, пожалуй, самую большую группу структурных белков составляют ферменты с *каталитической* функцией. Их описанию и роли посвящен отдельный раздел.

Многие белки обладают *сократительной функцией*. Это прежде всего белки актин и миозин, входящие в мышечные волокна высших организмов (у простейших сократительную функцию выполняет белок динеин). Мышечные волокна — миофибриллы — представляют собой

длинные тонкие нити, состоящие из многочисленных параллельных более тонких мышечных нитей, окруженных внутриклеточной жидкостью. В ней растворены аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), необходимая для осуществления сокращения, гликоген — питательное вещество, неорганические соли и многие другие вещества, в частности кальций.

Электрический импульс, возникший в двигательном нерве, вызывает резкое увеличение проницаемости мембран, освобождает ионы кальция. Катионы Ca^{2+} активируют распад АТФ, которая служит непосредственным источником энергии для функции сократительных белков. Акт мышечного сокращения заключается в следующем: актин и миозин в мышечных волокнах расположены параллельно и только частично перекрываются в состоянии покоя. При сокращении происходит более глубокое проникновение актина в миозин, т. е. скольжение нитей одного белка вдоль другого, без изменения их собственной длины (рис. 13). Правильность такой схемы мышечного сокращения подтверждена электронно-микроскопическими наблюдениями и экспериментально. Для этого искусственные актомиозиновые нити помещали в чистую воду. Белок приобретал консистенцию рыхлого геля. Если же к этому раствору добавляли раствор соли кальция и АТФ, то белок резко сжимался. Ученые подсчитали, что сила мышечного сокращения составляет 3,5 кг на 1 см² поперечного сечения мышцы.

Велика роль белков в *транспорте веществ* в организме. Имея различные функциональные группы и сложное строение макромолекулы, белки связывают и переносят с током крови многие соединения. Это прежде всего гемоглобин, переносящий кислород из легких к клеткам. У некоторых беспозвоночных такую же роль играет сходный по действию белок гемоцианин. В мышцах эту функцию берет на себя еще один транспортный белок — миоглобин. Белки сыворотки крови — альбумины — способствуют переносу жирных кислот, а β -липопротеид переносит липиды. Металлопротеиды содержат железо (глобулин, гемоглобин), медь (церуплазмин). Железо необходимо организму для роста, кровоснабжения. Всего в организме человека около 2,5 г железа, а суточная его потребность составляет 1—2 мг.

Депонируется, т. е. откладывается про запас, железо в селезенке в виде комплекса с белком ферритином. И это

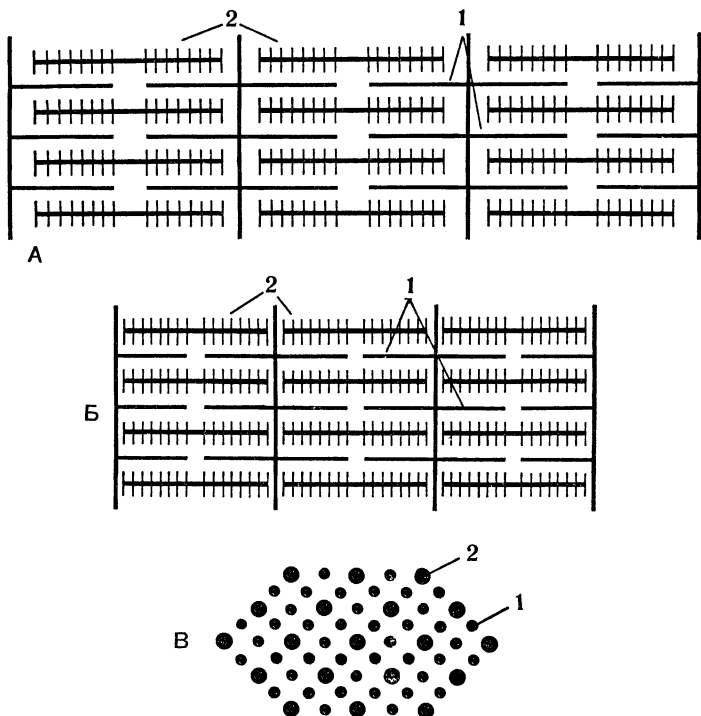


Рис. 13. Схема строения мышцы: *A* — растяжение (расслабление); *Б* — сокращение; *В* — поперечный разрез; 1 — актин, 2 — миозин.

свидетельствует еще об одной функции белка — *запасной*. Интересно, что при постоянном распаде гемоглобина железо не выводится из организма, а сохраняется в виде ферритина. Железа в ферритине может содержаться огромное количество — до 23 %. По мере необходимости для синтеза нового гемоглобина железо берется из этого своеобразного депо.

Кроме ферритина, к запасным белкам относят овальбумин — белок яйца, казеин — белок молока, зеин — белок семян кукурузы и некоторые другие растительные белки.

Важная роль принадлежит белкам-гормонам. Значение этой *регуляторной функции* белков трудно переоценить. Гормоны — это биологически активные вещества,

которые оказывают влияние на обмен веществ. Гормоны выделяются в ничтожно малых количествах, но их действия всегда точно направлены и высокоэффективны.

Действие гормонов может осуществляться различными путями: они или влияют на активность ферментов, тем самым ускоряя или замедляя обменные процессы, или изменяют проницаемость мембран для тех или иных веществ, или регулируют скорости синтеза ферментов. Гормоны поддерживают постоянные концентрации веществ в крови и клетках, участвуют в росте, размножении и других жизненно важных процессах.

Многие гормоны являются белками, полипептидами или отдельными аминокислотами. Их выделяют в кровь специальные (эндокринные) железы: гипофиз, щитовидная железа, поджелудочная железа, надпочечники, эпифиз.

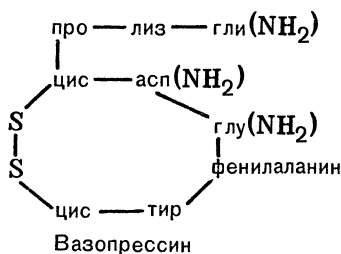
Одним из наиболее известных белков-гормонов является инсулин. Этот простой белок состоит только из аминокислот. Его первичная и другие структуры расшифрованы и хорошо изучены. Функциональная роль инсулина многопланова. Он снижает содержание сахара в крови путем повышения проницаемости клеточных мембран для глюкозы, т. е. способствует ее переходу из крови в клетку. В связи с нормальной работой инсулина уровень сахара в крови поддерживается постоянным. При недостатке инсулина содержание сахара в крови увеличивается, сахар выделяется с мочой — развивается сахарный диабет. У инсулина есть и другие функции: он способствует синтезу гликогена в печени и мышцах, увеличивает образование жиров из углеводов, активирует фермент глюкокиназу, влияет на обмен фосфора, обогащает клетки калием.

Кроме инсулина, регуляторной функцией обладают белковые гормоны гипофиза — железы внутренней секреции, связанной с одним из отделов головного мозга. Эта совсем небольшая гороховидная железа выделяет сразу несколько гормонов белковой или полипептидной природы. Некоторые из них оказывают воздействие не на органы и ткани живого организма, а на другие эндокринные железы, заставляя их работать интенсивнее или ограничивая их функцию. Гипофиз выделяет гормон роста, при отсутствии которого развивается карликовость. Введение его опытным животным в больших дозах при-

водит к значительному увеличению массы. Этот гормон представляет собой белок с молекулярной массой от 27 000 до 46 000 в зависимости от того, из какого животного он выделен. Избыточная секреция этого гормона у людей может привести к увеличению роста до 2,5 м, массы тела — до 150 кг. Наблюдается усиленный рост пальцев, носа, языка, нижней челюсти. Такое заболевание носит название акромегалии, что в переводе с греческого языка означает «большая конечность».

Средняя доля гипофиза выделяет еще один гормон — интермедин, представляющий собой полипептид. Он регулирует пигментацию. У лягушек и некоторых рыб выделение интермедина приводит к изменению пигментных клеток кожи, отвечающих за приспособление окраски тела к окраске окружающей среды. Следовательно, для некоторых организмов достаточное или недостаточное количество этого гормона — вопрос жизни или смерти.

Одним из важных и интересных в химическом отношении гормонов является вазопрессин. Он подавляет мочеобразование и повышает кровяное давление. Это октапептид циклического строения с боковой цепью:



В зависимости от вида животного в структуре молекулы может быть заменена одна аминокислота на другую.

Гипофиз выделяет и другие гормоны, представляющие собой простые или сложные белки, а также пептиды.

Регуляторную функцию выполняют и белки, содержащиеся в щитовидной железе — тиреоглобулины, молекулярная масса которых около 600 000. Эти белки содержат в своем составе иод. При недоразвитии железы нарушается обмен веществ. В некоторых местностях, где пища

и вода бедны иодом, возникала болезнь — эндемический зоб: щитовидная железа разрасталась, ее ткань пыталась вылавливать из поступающих продуктов иод. В настоящее время в таких местностях к питьевой воде добавляют иод, а к поваренной соли — иодид калия.

Перечисление гормонов белковой или пептидной природы можно было бы продолжить. Они играют большую роль в регуляции углеводного, жирового и других видов обмена. Без них невозможны сбалансированные химические процессы организма, да и сама жизнь.

Описание функций белков и их роли в живом организме было бы далеко не полным, если не остановиться на *защитной функции* белка. Давно известно, что жизненно важные органы и ткани покрыты плотным жировым слоем. Жир обладает свойством теплоизолятора, защитника от механических повреждений органа, питательного вещества, аккумулировавшего большую энергию. Оказалось, что в ряде случаев на уровне клетки сходными функциями наделен белок. Известно, что нуклеиновая кислота вирусной частицы окружена плотной белковой оболочкой. Функции этого белка многообразны, но защита генетического материала вирусной частицы от повреждений, мутаций, действия ферментов — одна из самых главных. Белок окружает вирусную нуклеиновую кислоту до тех пор, пока она не проникнет в клетку. После этого в защитной роли белка уже нет необходимости (см. рис. 12).

Интересна роль белков и в других нуклеопротеидах — комплексах нуклеиновых кислот с белками. С ДНК в хромосомах связаны гистоны — сильноосновные белки, имеющие молекулярные массы от 10 000 до 21 000 и положительный заряд. Это делает комплекс ДНК с белком особенно прочным.

В последнее время наши представления о защитной роли белков существенно расширились, и отрасль знаний, изучающая защитную реакцию организма от всего чужеродного, названа *иммунологией*.

Человек, перенесший оспу, приобретает иммунитет, т. е. он не заболевает оспой до конца своей жизни. Это происходит потому, что в организме на вирус оспы выработались специальные белки — антитела, способные защитить организм именно от этого заболевания. Антитела представляют собой белки с защитными функциями, относящиеся к фракции γ -глобулинов сыворотки крови.

А чужеродные белки, вирусы или полисахариды, вызывающие при попадании в организм образование антител, называют антигенами. Люди научились стимулировать образование антител для защиты организма от возможных инфекций. Для этого в кровь вводят ослабленные или мертвые культуры болезнетворного начала, т. е. делают прививки. Иммунологическая защита, видимо, возникла в эволюции относительно недавно, так как она имеется только у позвоночных.

Наличие иммунитета, защищающего организм от чужеродных молекул, иногда является препятствием для медицины. Врачи не могут вводить целый ряд препаратов потому, что в желудочно-кишечном тракте они переварятся и потеряют свои лечебные свойства, а вводить их прямо в кровь нельзя, так как на эти лекарственные вещества вырабатываются антитела, т. е. они являются антигенами. Нежелательно образование антител и при пересадке органов. Ведь пересаженный орган состоит из чужеродных молекул, на которые начинают вырабатываться белки — антитела, что приводит к отторжению этого органа. Для борьбы с этим явлением разрабатываются специальные вещества, подавляющие иммунитет, — иммунодепрессанты.

Антитела имеют молекулярную массу около 150 000 и состоят из четырех субъединиц, т. е. четырех полипептидных цепей. В них есть особые специфические участки, способные к связыванию с антигеном, с какими-то структурными его группировками. Антитела высокоспецифичны в отношении чужеродных веществ. Они не образуют комплекс антиген — антитело с другими белками. Даже одинаковые в функциональном отношении и очень близкие по молекулярной массе и особенностям структуры белки, например гемоглобины разных животных, не идентичны в иммунологическом отношении. Например, антитела, выработанные на введение гемоглобина лошади, не образуют или образуют в значительно меньшей степени комплексы с гемоглобинами других позвоночных. При этом степень связывания антигена с антителом выше у родственных видов, в нашем примере — с гемоглобинами зебры, коровы, но не с гемоглобинами птиц или грызунов.

Сегодня уровень образования антител определяется у больных для уточнения диагноза заболевания и назначения целенаправленного лечения.

Для некоторых белков характерна *токсичная функция*. Токсические белки обнаружены в яде змей, насекомых, в растениях, у микроорганизмов. Наиболее изучены белковые токсины ядов азиатской, лесной, африканской, индийской, египетской и других змей. Они, как правило, состоят из 60 аминокислотных остатков и имеют массу около 7000.

Токсины скорпиона похожи на них по аминокислотному составу и массе. Они, как и токсины змей, являются нейротоксинами, т. е. препятствуют передаче нервного импульса, взаимодействуя со специфическими белками нервной ткани.

При сравнительном рассмотрении разных токсических белков выяснилось их общее свойство — наличие многих дисульфидных мостиков в третичной структуре молекулы. Но есть и токсины, молекулярные массы, аминокислотный состав и третичная структура которых существенно отличаются от перечисленных. Это дифтерийный, столбнячный, холерный и другие белковые токсины. Например, токсин ботулизма имеет массу около 150 000. Было установлено, что, несмотря на большую молекулярную массу этих белков, токсическими свойствами обладают сравнительно небольшие фрагменты их молекул.

В последнее время в особую группу выделены белки с *рецепторной функцией*. Какова же их роль в организме? Есть доказательства, что многие гормоны, активно влияющие на обмен веществ, не проникают в клетку, а связываются со специфическими белками, находящимися на поверхности клеточных мембран. Это способствует передаче гормонального влияния внутрь клетки. Такие белковые рецепторы обнаружены для ряда гормонов: инсулина, глюкагона, адреналина и др. Считается, что белок-рецептор, находящийся на наружной мембране, одним концом контактирует (связывается) с гормоном, а другим — с ферментом на внутренней мембране. После связывания с гормоном конформация рецепторного белка изменяется. Это изменение снаружи является сигналом для включения фермента внутри клетки, переводя его из неактивного в активное состояние. Не исключено, что гормон может проникать в клетку в виде гормон-белкового комплекса, связавшись предварительно с белком-рецептором. Количество рецепторных белков на поверхности клеток велико. Например, на жировой клетке содержится около 160 000 рецепторных участков для ин-

сулина. Это соответствует 21 рецептору на 1 мкм² поверхности клетки.

Рецепторные белки обнаружены и у растений, и у низших организмов.

Особый интерес представляют рецепторы, которые поглощают энергию (например, звуковую или световую), преобразовывают ее особыми белковыми молекулами и передают в центральную нервную систему. Фоторецепторным белком, преобразующим световую энергию, является опсин. При взаимодействии с альдегидом ретиналем белок опсин превращается в родопсин. При поглощении света родопсин меняет свою конформацию и возбуждает нервный импульс. Таков упрощенный механизм зрительного акта.

Из вкусовых рецепторных белков наиболее изучен сладкочувствительный белок. Он имеет молекулярную массу около 150 000 и содержит большой процент дикарбоновых аминокислот. Этот белок способен связывать моно- и дисахариды, передавая информацию о них в центральную нервную систему.

Следует упомянуть и о существовании белковых веществ, тормозящих действие ферментов. Такие белки обладают *ингибиторными функциями*. При взаимодействии с этими белками фермент образует комплекс и теряет свою активность полностью или частично. Многие белки — ингибиторы ферментов — выделены в чистом виде и хорошо изучены. Их молекулярные массы колеблются в широких пределах; часто они относятся к сложным белкам — гликопротеидам, вторым компонентом которых является углевод.

Если белки классифицировать только по их функциям, то такую систематизацию нельзя было бы считать завершенной, так как новые исследования дают много фактов, позволяющих выделять новые группы белков с новыми функциями. Среди них уникальные, недавно обнаруженные вещества — нейропептиды. Они регулируют важнейшие жизненные процессы: памяти, сна, боли, чувства страха, тревоги. Некоторые из нейропептидов уже выделены, их строение установлено, они даже получены синтетическим путем.

Функции отдельных белков до настоящего времени не выяснены, хотя есть веские основания говорить об их важнейшей роли в жизнедеятельности организмов. α -Фетопротеин является эмбриональным белком, т. е. он

присутствует в крови плода человека и животных. Причем на ранних стадиях эмбриогенеза он является преобладающим белком по количеству, что дало основание предположить, что α -фетопротейн выполняет функцию эмбрионального альбумина. Молекулярная масса этого белка около 70 000. Его синтез резко угнетается после рождения, и у взрослого человека α -фетопротейна содержится всего 5 мкг на 1 л крови. При раке печени синтез этого белка резко увеличивается. Это явление было открыто советскими учеными Г. И. Абелевым и Ю. С. Татариновым и легло в основу ранней диагностики данного заболевания. Результаты открытия используются сейчас во всем мире для проведения массовых анализов с целью раннего выявления болезни.

Разбирая те или иные функции белков, мы приводим примеры какого-либо одного белка одной определенной функции. В органе, ткани или отдельной клетке функции белков взаимосвязаны. Одни и те же белки могут выполнять несколько функций, что дает основание говорить о функциях целой ткани или о роли белков в такой, например, биологической жидкости, как плазма крови. Рассмотрим ее функции более подробно.

Плазма — жидкая часть крови, в состав которой входят химические соединения разных классов, но 85 % ее сухой массы составляют белки. Их количество зависит в основном от вида и возраста живых организмов, режима питания и физиологического состояния.

Химический состав белков плазмы крови начали изучать в 30-х годах прошлого столетия, но исследование их физико-химических свойств, структуры и физиологических функций стало возможно только в начале XX в. С развитием аналитических и препаративных методов белковой химии углублялись знания в области химии белков крови. Удалось показать, что в плазме содержится около ста индивидуальных белков, различающихся между собой.

Белки плазмы крови, которые обладают одинаковой подвижностью в электрическом поле и потому не разделяются путем электрофореза, могут отличаться по иным физико-химическим свойствам: молекулярной массе, скорости осаждения или диффузии, изоэлектрическим точкам, хроматографическим характеристикам и другим показателям.

Поэтому для разделения и аналитического опреде-

ления белков крови используют комплекс различных методов.

Содержание некоторых белков плазмы

Белковая фракция	Содержание белков в %
Альбумины	55—65
α^1 -Глобулины	3,5—7,5
α^2 -Глобулины	7—10
Церулоплазмин	0,2—0,5
β -Глобулины	10—15
Липопротенды	5
Трансферрин	5—6,5
Фибриноген	3—5
γ -Глобулины	15—20
Гликопротеиды	0,5—0,7

Кроме белков, постоянно присутствующих в плазме, в крови находят белки, появление которых объясняется повреждением тканей и выходом тканевых белков в кровяное русло или изменением клеточной проницаемости белков. Такое явление наблюдается при некоторых заболеваниях: поражении печени, инфаркте миокарда и др. В этих случаях состав плазмы крови — показатель состояния органа, ткани или организма, необходимый для диагностики болезни и контроля за эффективностью проводимого лечения.

Одна из основных функций белков плазмы крови — перенос продуктов обмена веществ, попадающих в кровеносное русло. Наиболее важную роль в транспортных процессах играет альбумин, который вступает в соединение с различными веществами. В его молекуле большое количество SH-групп, аминокрупп лизина и других реакционноспособных участков. Поэтому он легко присоединяет многочисленные продукты обмена, а также ионы меди, цинка, марганца, хлора, йода. Альбумин соединяется с гормонами, токсинами, различными лекарственными веществами. Эти соединения непрочные, что особенно необходимо для выполнения альбумином транспортной функции. Они легко диссоциируют, и освобожденный альбумин переходит обратно из органа или ткани в кровеносное русло.

Транспортными белками плазмы крови являются гло-

булины, избирательно взаимодействующие с тироксином, стероидными гормонами, ионами железа. Важную группу белков плазмы крови составляют углеводно-полипептидные комплексы — мукоиды, содержащие от 40 до 70 % сахаров. К этой группе относятся вещества, определяющие принадлежность крови к определенной группе. Наличие углеводного компонента стабилизирует белок. Некоторые гликопротеиды сохраняют стабильность и оказываются активными после нагревания плазмы до 100 °С.

Большая группа белков плазмы крови представлена липопротеидами, функцией которых является связывание и транспорт жиров, перенос жирорастворимых веществ, некоторых витаминов. Потенциальная способность белков крови к связыванию веществ настолько велика, что практически в нормальных условиях используется только небольшая часть их реакционных групп. Остальные группы — необходимый резерв для компенсации изменений в обмене веществ или на случай болезни.

Количественный и качественный состав плазменных белков определяет перераспределение воды между кровеносным руслом и тканями, активно влияет на кровяное давление и проницаемость сосудов. От содержания и состава плазменных белков зависит вязкость крови. Наибольшее влияние на вязкость оказывают фибриноген и макроглобулин — высокомолекулярные белки.

Регуляторные функции белков плазмы крови на этом не исчерпываются. Особо следует остановиться на вопросе о роли ферментов крови. Их делят на две группы. Одну группу представляют ферменты, присутствующие в крови постоянно. Это ферменты свертывающей и противосвертывающей систем крови, липаза, каталаза и т. д. Другую группу составляют ферменты, поступающие в кровяное русло из органов и тканей при распаде клеток или при нарушении проницаемости клеточных мембран.

Ферменты первой группы выполняют строго определенные функции, регулируя обмен жиров, процессы окисления, свертывания и другие жизненно важные реакции. Ферменты второй группы в большинстве случаев не принимают непосредственного участия в реакциях крови. Они в норме не должны содержаться в крови, или их концентрации незначительны. Но их обнаружение в плазме представляет огромный интерес, так как свидетельствует о поражении того или иного органа или ткани. Появление в кровотоке некоторых ферментов помогает устано-

вить диагноз заболевания, рассказать о глубине поражения органа или ткани, т. е. о стадии болезни. Для этой цели в клиниках в настоящее время определяют более 40 различных ферментов. Наибольшее значение имеет исследование активности трансаминаз, фосфатаз, дегидрогеназ, а также их изоферментов. Такие анализы позволяют более четко выявить, откуда в кровь поступил фермент, и, следовательно, установить локализацию поражения.

Количество белков плазмы крови значительно превышает тот уровень, который нужен для выполнения транспортных, регуляторных и защитных функций. Этот «избыток» белков крови не случаен. Он создает резервный фонд белков, который всегда может быть использован при нарушении обмена веществ. Эти белки также расходуются при синтезе тканевых белков, гормонов, ферментов, в случаях голодания, когда азотистые вещества с пищевыми продуктами не поступают. Отсутствие в пище незаменимых аминокислот также могут компенсировать белки плазмы крови. Именно из них берутся для организма эти дефицитные строительные блоки. Таким образом, белковый резерв плазмы крови дает возможность длительно поддерживать обменные процессы в органах и тканях в экстремальных состояниях.

О защитной функции белков плазмы крови мы уже упоминали. Рассмотрим теперь некоторые аспекты этого вопроса более подробно. Удивительным свойством белков плазмы крови — иммуноглобулинов — является способность избирательно взаимодействовать только с определенными антигенами (бактериями, вирусами, токсинами, чужеродными белками). Чем же обусловлена такая избирательность иммуноглобулинов к антигенам? Было установлено, что в реакции между антигеном и антителом принимает участие не вся молекула иммуноглобулина, а небольшой участок (менее 1 % по массе), активный центр. Защитные белки — иммуноглобулины — синтезируются особыми иммунокомпетентными клетками. Снижение их синтеза ведет к резкому понижению сопротивляемости организма инфекциям. Чрезмерный неконтролируемый синтез иммунологически неактивных иммуноглобулинов также ведет к тяжелым последствиям. Такие явления наблюдаются, например, при ревматизме, когда в плазме появляются высокие концентрации определенно-го белка.

Кроме антител, в плазме содержатся некоторые вещества белковой природы, не относящиеся к иммуноглобулинам, но обладающие свойствами защиты организма от инфекций.

Большую роль играют белки плазмы крови в функционировании свертывающей и противосвертывающей систем. Без них невозможно было бы поддерживать постоянный объем циркулирующей крови и нормальное кровоснабжение ею органов и тканей.

При свертывании крови фибриноген плазмы превращается в нерастворимый белок — фибрин. И образующееся при этом переплетение нитей фибрина закрывает поврежденный сосуд, предотвращая кровопотерю. Процесс свертывания крови достаточно сложен. В нем участвует много компонентов. Все они, кроме ионов кальция, являются белками.

В нормальных условиях — внутри сосудистого русла — кровь не свертывается из-за неактивного состояния свертывающей системы и наличия антисвертывающей системы. В предотвращении свертывания главную роль играют гепарин, фибринолизин и другие антикоагуляционные вещества. Роль белка фибринолизина состоит в том, чтобы растворить сгустки фибрина в кровеносном русле и предотвратить закупорку сосудов — тромбообразование.

Несмотря на то что белки крови достаточно хорошо изучены, в этом разделе белковой химии еще много проблем. Не выяснена связь между структурой и функцией некоторых белков плазмы, а также физиологическая роль ряда протеинов. Разрабатываются новые пути выделения белковых препаратов, используемых в качестве лечебных средств. Внедряются новые методы диагностики и лечения заболеваний на основе изучения химии белков плазмы крови.

История развития науки о ферментах

В основе всех жизненных процессов лежат тысячи химических реакций. Они идут в организме без применения высокой температуры и давления, т. е. в мягких условиях. Вещества, которые окисляются в клетках человека и животных, сгорают быстро и эффективно, обогащая организм энергией и строительным материалом. Но те же вещества могут годами храниться как в консервированном (изолированном от воздуха) виде, так и на воздухе в присутствии кислорода. Например, мясные и рыбные консервы, пастеризованное молоко, сахар, крупы не разлагаются при довольно длительном хранении. Возможность быстрого переваривания продуктов в живом организме осуществляется благодаря присутствию в клетках особых биологических катализаторов — ферментов.

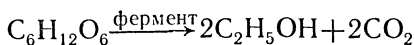
Ферменты — это специфические белки, входящие в состав всех клеток и тканей живых организмов, играющие роль биологических катализаторов. О ферментах люди узнали давно. Еще в начале прошлого века в Петербурге К. С. Кирхгоф выяснил, что проросший ячмень способен превращать полисахарид крахмал в дисахарид мальтозу, а экстракт дрожжей расщеплял свекловичный сахар на моносахариды — глюкозу и фруктозу. Это были первые исследования в ферментологии. А практическое применение ферментативных процессов было известно с незапамятных времен. Это и сбраживание винограда, и закваска при приготовлении хлеба, и сыроварение, и многое другое.

Сейчас в разных учебниках, пособиях и в научной литературе применяются два понятия: «ферменты» и «эн-

зимы». Эти названия идентичны. Они обозначают одно и то же — биологические катализаторы. Первое слово переводится как «закваска», второе — «в дрожжах».

Долгое время не представляли, что же происходит в дрожжах, какая сила, присутствующая в них, заставляет вещества разрушаться и превращаться в более простые. И только после изобретения микроскопа было установлено, что дрожжи — это скопление большого количества микроорганизмов, которые используют сахар в качестве своего основного питательного вещества. Иными словами, каждая дрожжевая клетка «начинена» ферментами, способными разлагать сахар. Но в то же время были известны и другие биологические катализаторы, не заключенные в живую клетку, а свободно «обитающие» вне ее. Например, они были найдены в составе желудочных соков, клеточных экстрактов. В связи с этим в прошлом различали два типа катализаторов: считалось, что собственно ферменты неотделимы от клетки и вне ее не могут функционировать, т. е. они «организованы». А «неорганизованные» катализаторы, которые могут работать вне клетки, называли энзимами. Такое противопоставление «живых» ферментов и «неживых» энзимов объяснялось влиянием виталистов, борьбой материализма и идеализма в естествознании. Точки зрения ученых разделились. Основоположник микробиологии Л. Пастер утверждал, что деятельность ферментов определяется жизнью клетки. Если клетку разрушить, то прекратится и действие фермента. Химики во главе с Ю. Либихом развивали чисто химическую теорию брожения, доказывая, что активность ферментов не зависит от существования клетки.

В 1871 г. русский врач М. М. Манассеина разрушила дрожжевые клетки, растирая их с речным песком. Клеточный сок, отделенный от остатков клеток, сохранял свою способность сбраживать сахар. Этот простой и убедительный опыт русского врача остался без должного внимания в царской России. Через четверть века немецкий ученый Э. Бухнер получил бесклеточный сок прессованием живых дрожжей под давлением до $5 \cdot 10^6$ Па. Этот сок, подобно живым дрожжам, сбраживал сахар с образованием спирта и оксида углерода (IV):



Работы А. Н. Лебедева по исследованию дрожжевых клеток и труды других ученых положили конец виталистическим представлениям в теории биологического катализа, а термины «фермент» и «энзим» стали применять как равнозначные.

В наши дни ферментология — это самостоятельная наука. Выделено и изучено около 2000 ферментов. Вклад в эту науку внесли советские ученые — наши современники А. Е. Браунштейн, В. Н. Орехович, В. А. Энгельгард, А. А. Покровский и др.

Химическая природа ферментов

В конце прошлого века было высказано предположение, что ферменты — это белки или какие-то вещества, очень похожие на белки. Потеря активности фермента при нагревании очень напоминает тепловую денатурацию белка. Диапазон температур при денатурации и при инактивации¹ одинаков. Как известно, денатурация белка может быть вызвана не только нагреванием, но и действием кислот, солей тяжелых металлов, щелочей, длительным облучением ультрафиолетовыми лучами. Эти же химические и физические факторы приводят к потере активности фермента.

В растворах ферменты, как и белки, ведут себя под действием электрического тока сходным образом: молекулы движутся к катоду или аноду. Изменение концентрации водородных ионов в растворах белков или ферментов приводит к накоплению ими положительного или отрицательного заряда. Это доказывает амфотерный характер ферментов и тоже подтверждает их белковую природу. Еще одно свидетельство белковой природы ферментов — они не проходят через полупроницаемые мембраны. Это также доказывает их большую молекулярную массу. Но если ферменты — это белки, то при дегидратации их активность не должна уменьшаться. Опыты подтверждают правильность такого предположения.

Интересный опыт был проведен в лаборатории И. П. Павлова. Получая желудочный сок через фистулу у собак, сотрудники обнаружили, что, чем больше белка в соке, тем больше его активность, т. е. определяемый белок и есть фермент желудочного сока.

¹ Инактивация — потеря активности.

Таким образом, явления денатурации и подвижности в электрическом поле, амфотерность молекул, высокомолекулярная природа, способность осаждаться из раствора при действии водоотнимающих средств (ацетон или спирт) доказывают белковую природу ферментов.

К настоящему времени этот факт установлен многими, еще более тонкими физическими, химическими или биологическими методами.

Мы уже знаем, что белки бывают очень разные по составу и прежде всего они могут быть простыми или сложными. К каким же белкам относятся известные ныне ферменты?

Ученые различных стран установили, что многие ферменты — это простые белки. Это значит, что при гидролизе молекулы этих ферментов распадаются только до аминокислот. Ничего, кроме аминокислот, в гидролизате таких белков-ферментов обнаружить не удастся. К простым ферментам относятся пепсин — фермент, переваривающий белки в желудке и содержащийся в желудочном соке, трипсин — фермент поджелудочного сока, папаин — растительный фермент, уреазы и др.

В сложные ферменты входят, кроме аминокислот, вещества, имеющие небелковую природу. Например, окислительно-восстановительные ферменты, встроенные в митохондрию, содержат, кроме белковой части, атомы железа, меди и другие термостабильные группы. Небелковой частью фермента могут быть и более сложные вещества: витамины, нуклеотиды (мономеры нуклеиновых кислот), нуклеотиды с тремя фосфорными остатками и т. д. Условились называть в таких сложных белках небелковую часть — кофермент, а белковую — апофермент.

Отличие ферментов от небιологических катализаторов

В школьных учебниках и пособиях по химии подробно разбирается действие катализаторов, дается представление об энергетическом барьере, энергии активации. Напомним только, что роль катализаторов заключается в их способности активировать молекулы веществ, вступающих в реакцию. Это приводит к снижению энергии активации. Реакция идет не в один, а в несколько этапов с образованием промежуточных соединений. Катализаторы не изменяют направление реакции, а только влияют

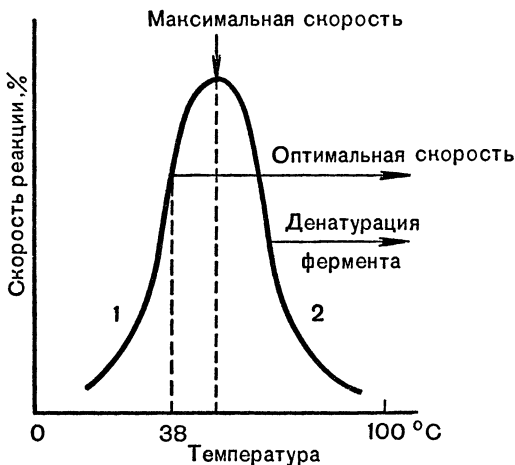


Рис. 14. Влияние температуры на активность ферментов: 1 — увеличение скорости реакции, 2 — уменьшение скорости реакции.

на скорость достижения состояния химического равновесия. В катализируемой реакции всегда затрачивается меньше энергии по сравнению с некатализируемой. В ходе реакции фермент меняет свою упаковку, «напрягается» и по окончании реакции принимает исходную структуру, возвращается к первоначальной форме.

Ферменты те же катализаторы. Им свойственны все законы катализа. Но ферменты — белки, и это сообщает им особые свойства. Что же общего у ферментов с привычными для нас катализаторами, например платиной, оксидом ванадия (V) и другими неорганическими ускорителями реакций, а что их отличает?

Один и тот же неорганический катализатор может применяться в разных производствах. А фермент катализирует только одну реакцию или один вид реакции, т. е. он более специфичен, чем неорганический катализатор.

Температура всегда влияет на скорости химических реакций. Большинство реакций с неорганическими катализаторами идет при очень высоких температурах. При повышении температуры скорость реакции, как правило, увеличивается (рис. 14, 1). Для ферментативных реакций это увеличение ограничено определенной температурой

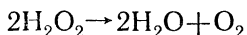
(температурный оптимум). Дальнейшее повышение температуры вызывает изменения в молекуле фермента, приводящие к уменьшению скорости реакции (рис. 14, 2). Но некоторые ферменты, например ферменты микроорганизмов, обнаруженных в воде горячих природных источников, не только выдерживают температуры, близкие к точке кипения воды, но и даже проявляют свою максимальную активность. Для большинства же ферментов температурный оптимум близок к 35—45 °С. При более высоких температурах их активность уменьшается, а затем происходит полная тепловая денатурация.

Многие неорганические катализаторы проявляют свою максимальную эффективность в сильноокислой или сильнощелочной среде. В отличие от них ферменты активны только при физиологических значениях кислотности раствора, только при такой концентрации ионов водорода, которая совместима с жизнью и нормальным функционированием клетки, органа или системы.

Реакции с участием неорганических катализаторов протекают, как правило, при высоких давлениях, а ферменты работают при нормальном (атмосферном) давлении.

И самым удивительным отличием фермента от других катализаторов является то, что скорость реакций, катализируемых ферментами, в десятки тысяч, а иногда и в миллионы раз выше той, которая может быть достигнута при участии неорганических катализаторов.

Известный всем пероксид водорода, применяемый в быту как отбеливающее и дезинфицирующее вещество, без катализаторов разлагается медленно:



В присутствии неорганического катализатора (солей железа) эта реакция идет несколько быстрее. А каталаза (фермент, присутствующий практически во всех клетках) разрушает пероксид водорода с невообразимой скоростью: одна молекула каталазы расщепляет в одну минуту более 5 млн. молекул H_2O_2 .

Универсальное распространение каталазы в клетках всех органов аэробных организмов и высокая активность этого фермента объясняются тем, что пероксид водорода — это мощный клеточный яд. Он получается в клетках

как побочный продукт, многих реакций, но на страже стоит фермент каталаза, который сейчас же разрушает пероксид водорода на безвредные кислород и воду.

Активный центр фермента

Обязательным этапом в катализируемой реакции является взаимодействие фермента с тем веществом, превращение которого он катализирует, — с субстратом: образуется фермент-субстратный комплекс. В приведенном выше примере пероксид водорода — это субстрат для действия каталазы.

Интересным оказывается то, что в ферментативных реакциях молекула субстрата во много раз меньше, чем молекула белка-фермента. Следовательно, субстрат не может контактировать со всей огромной молекулой фермента, а только с каким-то ее небольшим участком или даже отдельной группой, атомом. Для подтверждения этого предположения ученые отщепляли от фермента одну или несколько аминокислот, и это не влияло или почти не влияло на скорость катализируемой реакции. Но отщепление отдельных определенных аминокислот или группы приводило к полной потере каталитических свойств фермента. Так сформировалось представление об активном центре фермента.

Активный центр — это такой участок белковой молекулы, который обеспечивает соединение фермента с субстратом и дает возможность для дальнейших превращений субстрата. Были изучены некоторые активные центры разных ферментов. Это или функциональная группа (например, ОН-группа серина), или отдельная аминокислота. Иногда для обеспечения каталитического действия нужно несколько аминокислот в определенном порядке.

В составе активного центра выделяют различные по своим функциям участки. Одни участки активного центра обеспечивают сцепление с субстратом, прочный контакт с ним. Поэтому их называют якорными или контактными участками. Другие выполняют собственно каталитическую функцию, активируют субстрат — каталитические участки. Такое условное разделение активного центра помогает более точно представить механизм каталитической реакции.

Тип химической связи в фермент-субстратных комплексах тоже изучался. Вещество (субстрат) удерживается

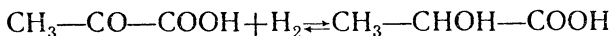
на ферменте при участии самых различных типов связей: водородных мостиков, ионных, ковалентных, донорно-акцепторных связей, ван-дер-ваальсовых сил сцепления.

Деформация молекул фермента в растворе приводит к появлению его изомеров, отличающихся третичной структурой. Иными словами, фермент ориентирует свои функциональные группы, входящие в активный центр, так, чтобы проявилась наибольшая каталитическая активность. Но и молекулы субстрата также могут деформироваться, «напрягаться» при взаимодействии с ферментом. Эти современные представления о фермент-субстратном взаимодействии отличаются от господствовавшей ранее теории Э. Фишера, который считал, что молекула субстрата точно соответствует активному центру фермента и подходит к нему как ключ к замку.

Свойства ферментов

Важнейшим свойством ферментов является преимущественное ускорение одной из нескольких теоретически возможных реакций. Это позволяет субстратам выбрать наиболее выгодные для организма цепочки превращений из целого ряда возможных путей.

В зависимости от условий ферменты способны катализировать как прямую, так и обратную реакции. Например, пировиноградная кислота под влиянием фермента лактатдегидрогеназы превращается в конечный продукт брожения — молочную кислоту. Этот же фермент катализует и обратную реакцию, и само название он получил не по прямой, а по обратной реакции. Обе реакции происходят в организме при разных условиях:



Это свойство ферментов имеет большое практическое значение.

Другое важное свойство ферментов — термолабильность, т. е. высокая чувствительность к изменениям температуры. Мы уже говорили, что ферменты являются белками. Для большинства из них температура выше 70 °С приводит к денатурации и потере активности. Из курса химии известно, что повышение температуры на 10 °С приводит к увеличению скорости реакции в 2—3

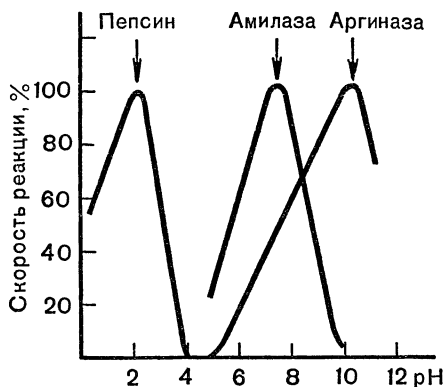


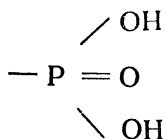
Рис. 15. Влияние pH на активность ферментов.

раза, что характерно и для ферментативных реакций, но до определенного предела. При температурах, близких к 0°C , скорость ферментативных реакций замедляется до минимума. Это свойство широко используется в различных отраслях народного хозяйства, особенно в сельском хозяйстве и медицине. Например, все существующие сейчас способы консервации почки перед ее пересадкой больному включают охлаждение этого органа, чтобы снизить интенсивность биохимических реакций и продлить время жизни почки до ее пересадки человеку. Такой прием сохранил здоровье и спас жизнь десяткам тысяч людей в мире.

Одним из важнейших свойств белков-ферментов является их чувствительность к реакции среды, концентрации водородных ионов или гидроксид-ионов. Ферменты активны только в узком интервале кислотности или щелочности среды (pH). Например, активность пепсина в полости желудка максимальна при pH около 1—1,5. Снижение кислотности приводит к глубокому нарушению пищеварительного акта, недоперевариванию пищи и тяжелым осложнениям. Из курса биологии вам известно, что пищеварение начинается уже в ротовой полости, где присутствует амилаза слюны. Оптимальное значение pH для нее 6,8—7,4. Для разных ферментов пищеварительного тракта характерны большие различия в оптимуме pH (рис. 15). Изменение реакции среды приводит к изменению зарядов на молекуле фермента или даже

в его активном центре, вызывая снижение или полную потерю активности.

Следующим важным свойством является специфичность действия фермента. Каталаза расщепляет только пероксид водорода, уреазы — только мочевины $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$, т. е. фермент катализирует превращение только одного субстрата, только его молекулу он «узнает». Такая специфичность считается абсолютной. Если фермент катализирует превращение нескольких субстратов, имеющих одинаковую функциональную группу, то такая специфичность называется групповой. Например, фосфатаза катализирует отщепление остатка фосфорной кислоты:



Разновидностью специфичности является чувствительность фермента только к одному изомеру — стереохимическая специфичность.

Ферменты влияют на скорость превращения различных веществ. Но и на ферменты влияют некоторые вещества, резко изменяя их активность. Вещества, которые повышают активность ферментов, активизируют их, называются *активаторами*, а угнетающие их — *ингибиторами*. Ингибиторы могут действовать на фермент необратимо. После их действия фермент уже никогда не может катализировать свою реакцию, так как его структура будет сильно изменена. Так действуют на фермент соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи. Обратимый ингибитор может быть удален из раствора, и фермент вновь приобретает активность. Такое обратимое ингибирование часто протекает по конкурентному типу, т. е. за активный центр борются субстрат и похожий на него ингибитор. Снять такое ингибирование можно, если увеличить концентрацию субстрата и вытеснить ингибитор с активного центра субстратом.

Важным свойством многих ферментов является то, что они находятся в тканях и клетках в неактивной форме (рис. 16). Неактивная форма ферментов называется проферментом. Классическими его примерами являются неактивные формы пепсина или трипсина. Существова-

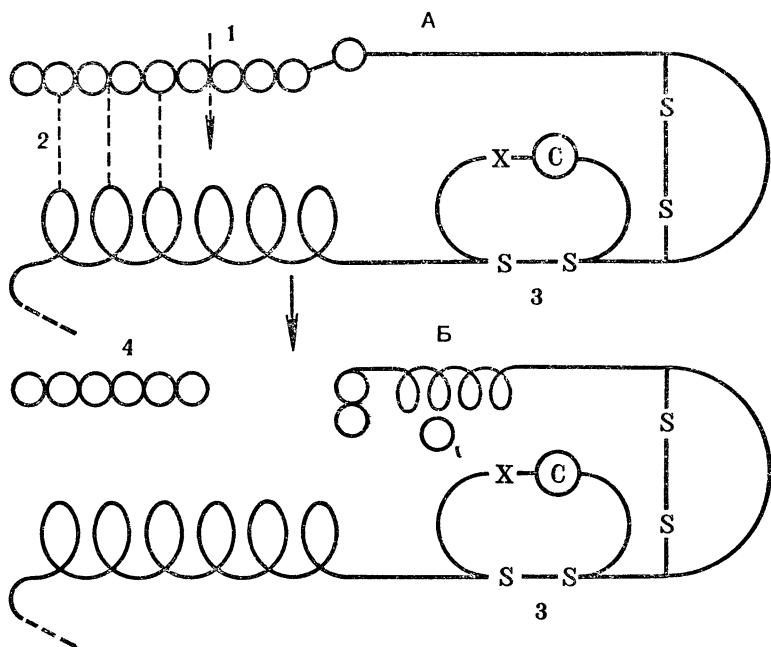


Рис. 16. Схема превращения трипсиногена в активный трипсин: А — трипсиноген; Б — трипсин; 1 — место отрыва пептида; 2 — водородные связи; 3 — дисульфидный мостик; 4 — пептид, отщепленный при активации.

ние неактивных форм ферментов имеет большое биологическое значение. Если бы пепсин или трипсин вырабатывались сразу в активной форме, то это приводило бы к тому, что, например, пепсин «переваривал» стенку желудка, т. е. желудок «переваривал» сам себя. Такого не происходит потому, что пепсин или трипсин становятся активными только после попадания в полость желудка или в тонкий кишечник: от пепсина под действием соляной кислоты, содержащейся в желудочном соке, отщепляется несколько аминокислот, и он приобретает способность расщеплять белки. А сам желудок предохранен теперь от действия пищеварительных ферментов слизистой оболочкой, выстилающей его полость.

Процесс активации фермента идет, как правило, одним из четырех путей, представленных на рисунке 17. В первом случае отщепление пептида от неактивного фермента «открывает» активный центр и делает фермент активным.

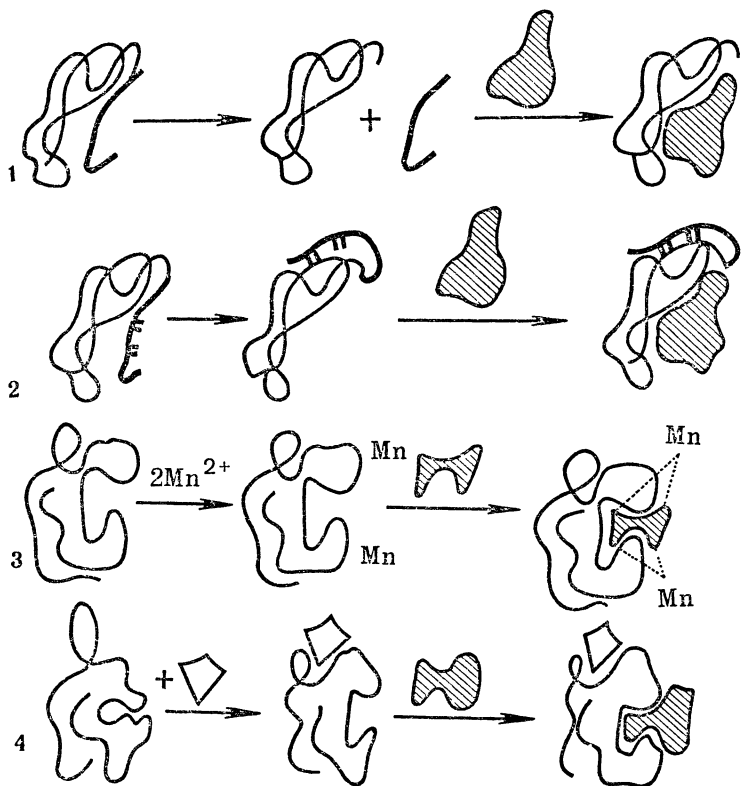


Рис. 17 Пути активации ферментов (штриховкой отмечена молекула субстрата) 1 — отщепление от профермента небольшого участка (пептида) и превращение неактивного профермента в активный фермент; 2 — образование дисульфидных связей из SH-групп, освобождающее активный центр, 3 — образование комплекса белка с металлами, активирующее фермент; 4 — образование комплекса фермента с каким-нибудь веществом (при этом освобождается доступ к активному центру)

Второй путь представляет собой образование дисульфидных S—S-мостиков, делающих доступным активный центр. В третьем случае присутствие металла активирует фермент, который может работать только в комплексе с этим металлом. Четвертый путь иллюстрирует активацию каким-то веществом, которое связывается с периферическим участком белковой молекулы и деформирует фермент таким образом, чтобы облегчить доступ субстрата к активному центру.

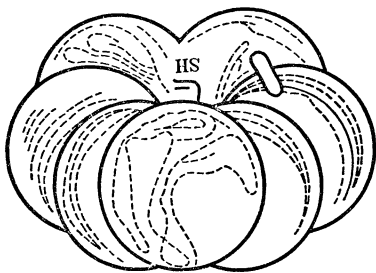


Рис. 18. Предполагаемая структура мультиферментного комплекса, синтезирующего жирные кислоты (семь ферментных субъединиц отвечают за семь химических реакций).

В последние годы обнаружен еще один способ регуляции активности ферментов. Выяснилось, что один фермент, например лактатдегидрогеназа, может находиться в нескольких молекулярных формах, отличающихся между собой, хотя они все катализируют одну реакцию. Такие различные по составу молекулы фермента, которые катализируют одну и ту же реакцию, встречаются даже внутри одной и той же клетки. Их называют *изоферментами*, т. е. изомерами фермента.

У названной уже лактатдегидрогеназы найдено пять различных изоферментов. Какова роль нескольких форм одного фермента? Видимо, организм «подстраховывает» некоторые особенно важные реакции, когда при изменении условий в клетке работает то одна, то другая форма изофермента, и обеспечивает необходимую скорость и направление течения процесса.

И еще одно важное свойство ферментов. Часто они функционируют в клетке не отдельно друг от друга, а организованы в виде комплексов — ферментных систем (рис. 18): продукт предыдущей реакции — субстрат для последующей. Эти системы встроены в клеточные мембраны и обеспечивают быстрое направленное окисление вещества, «перебрасывая» его от фермента к ферменту. Синтетические процессы в клетке идут в подобных же ферментных системах.

Классификация ферментов

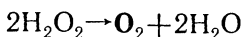
Круг вопросов, изучаемых ферментологией, широк. Количество ферментов, применяемых в здравоохранении, сельском хозяйстве, микробиологии и других отраслях науки и практики, велико. Это создавало трудность при характеристике ферментативных реакций, так как один и тот же фермент можно назвать или по субстрату, или по типу катализируемых реакций, или старым термином,

прочно вошедшим в литературу, например: пепсин, трипсин, каталаза.

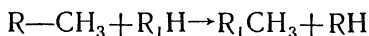
Поэтому в 1961 г. Международный биохимический съезд в Москве утвердил классификацию ферментов, в основу которой положен тип реакции, катализируемой данным ферментом. В названии фермента обязательно присутствует название субстрата, т. е. того соединения, на которое воздействует данный фермент, и окончание *-аза*. Например, *аргиназа* катализирует гидролиз аргинина.

По этому принципу все ферменты были разделены на шесть классов.

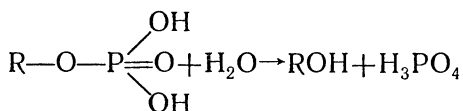
1. Оксидоредуктазы — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, например каталаза:



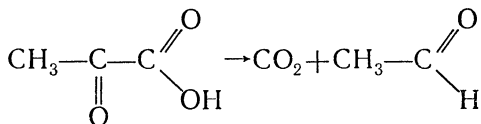
2. Трансферазы — ферменты, катализирующие перенос атомов или радикалов, например метилтрансферазы, переносящие CH_3 -группу:



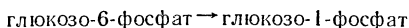
3. Гидролазы — ферменты, разрывающие внутримолекулярные связи путем присоединения молекул воды, например фосфатаза:



4. Лиазы — ферменты, отщепляющие от субстрата ту или иную группу без присоединения воды, негидролитическим путем, например отщепление карбоксильной группы декарбоксилазой:



5. Изомеразы — ферменты, катализирующие превращение одного изомера в другой:



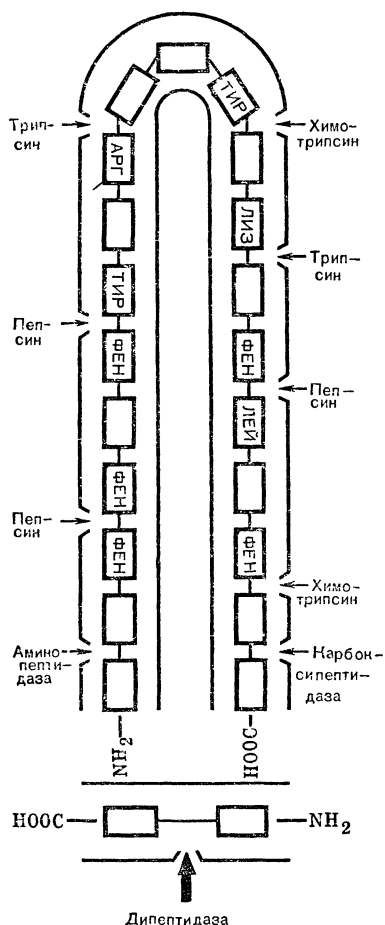


Рис. 19. Расщепление пептидных связей различными протеолитическими ферментами.

Так получается его код — 3.4.4.1. Точки приложения действия ферментов класса гидролаз показаны на рисунке 19.

6. Ферменты, катализирующие реакции синтеза, например синтез пептидов из аминокислот. Этот класс ферментов носит название синтетаз.

Каждый фермент предложили закодировать шифром из четырех цифр, где первая из них обозначает номер класса, а остальные три характеризуют более подробно свойства фермента, его подкласс и индивидуальный номер в каталоге.

В качестве примера классификации ферментов приведем четырехзначный код, присвоенный пепсину, — 3.4.4.1. Цифра 3 обозначает класс фермента — гидролазы. Следующая цифра 4 кодирует подкласс пептидгидролаз, т. е. тех ферментов, которые гидролизуют именно пептидные связи. Еще одна цифра 4 обозначает подподкласс, называемый пептидилпептидгидролазами. В этот подподкласс входят уже индивидуальные ферменты, и первым в нем значится пепсин, которому и присвоен порядковый номер 1.

Действие ферментов

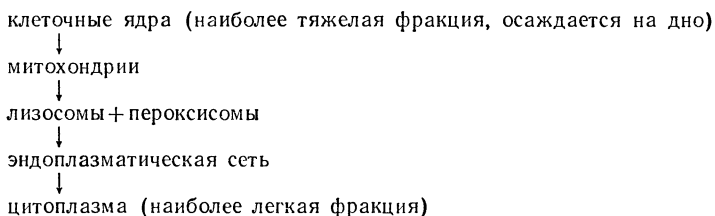
Обычно ферменты выделяют из различных объектов животного, растительного или микробного происхождения и изучают их действие вне клетки и организма. Эти исследования очень важны для понимания механизма действия ферментов, изучения их состава, особенностей катализируемых ими реакций. Но полученные таким образом сведения нельзя механически непосредственно переносить на деятельность ферментов в живой клетке. Вне клетки трудно воспроизвести те условия, в которых работает фермент, например в митохондриях или лизосоме. К тому же не всегда известно, сколько из имеющихся молекул фермента участвует в реакции — все или только какая-то их часть.

Почти всегда оказывается, что клетка содержит тот или иной фермент, по содержанию превышающий в несколько десятков раз необходимое количество для осуществления нормального обмена веществ. Обмен веществ различен по интенсивности в разные периоды жизни клетки, однако ферментов в ней значительно больше, чем того требовал бы самый максимальный уровень обмена веществ. Например, в состав клеток сердечной мышцы входит столько цитохрома *c*, которое могло бы осуществить окисление, в 20 раз большее, чем максимальное потребление кислорода сердечной мышцей. Позднее были обнаружены вещества, которые могут «выключать» часть молекул ферментов. Это так называемые тормозящие факторы. Для понимания механизма действия ферментов важно и то, что в клетке они находятся не просто в растворе, а встроены в структуру клетки. Сейчас уже известно, какие ферменты вмонтированы в наружную мембрану митохондрий, какие встроены во внутреннюю, какие связаны с ядром, лизосомами и другими субклеточными структурами.

Близкое «территориальное» расположение фермента, катализирующего первую реакцию, к ферментам, катализирующим вторую, третью и последующие реакции, сильно влияет на суммарный результат их действия. Например, в митохондриях вмонтирована цепь ферментов, передающих электроны на кислород, — цитохромная система. Она катализирует окисление субстратов с образованием энергии, которая аккумулируется в АТФ.

При извлечении ферментов из клетки слаженность их совместной работы нарушается. Поэтому изучать работу ферментов стараются без разрушения тех структур, в которые встроены их молекулы. Например, если срез ткани подержать в растворе субстрата, а затем обработать реактивом, который с продуктами реакции даст окрашенный комплекс, то в микроскопе будут четко видны окрашенные участки клетки: в этих участках был локализован (расположен) фермент, который расщеплял субстрат. Так было установлено, в каких именно клетках желудка содержится пепсиноген, из которого получается фермент пепсин.

Сейчас широко распространен другой метод, который позволяет установить локализацию ферментов,— раздельное центрифугирование. Для этого исследуемую ткань (например, кусочки печени лабораторных животных) измельчают, а затем готовят из нее кашицу в растворе сахарозы. Смесь переносят в пробирки и вращают их с большими скоростями в центрифугах. Различные клеточные элементы в зависимости от их массы и размеров распределяются в плотном растворе сахарозы при вращении примерно следующим образом:



Для получения тяжелых ядер требуется относительно небольшое ускорение (меньшее число оборотов). После отделения ядер, увеличив число оборотов, последовательно осаждают митохондрии, микросомы, получают цитоплазму. Теперь активность ферментов можно изучать в каждой из выделенных фракций. Оказывается, что большинство из известных ферментов локализованы преимущественно в той или иной фракции. Например, фермент альдолаза локализован в цитоплазме, а фермент, окисляющий капроновую кислоту,— преимущественно в митохондриях.

При повреждении мембраны, в которую встроены фер-

менты, комплексные взаимосвязанные процессы не протекают, т. е. каждый фермент может действовать только сам по себе.

Клетки растений и микроорганизмов, как и клетки животных, содержат очень похожие клеточные фракции. Например, пластиды растений по ферментному набору напоминают митохондрии. В микроорганизмах обнаружены зерна, напоминающие рибосомы и тоже содержащие большие количества рибонуклеиновой кислоты. Ферменты, входящие в состав животных, растительных и микробных клеток, обладают сходным действием. Например, гиалуронидаза облегчает микробам проникновение в организм, способствуя разрушению клеточной стенки. Этот же фермент обнаружен в различных тканях животных организмов.

Получение и применение ферментов

Ферменты находятся во всех тканях животных и растений. Однако количество одного и того же фермента в разных тканях и прочность связи фермента с тканью неодинаковы. Поэтому практически его получение не всегда оправдано.

Источником получения ферментов могут быть пищеварительные соки человека и животных. В соках относительно мало посторонних примесей, клеточных элементов и других компонентов, от которых надо избавляться при получении чистого препарата. Это почти чистые растворы ферментов.

Из тканей получить фермент труднее. Для этого ткань измельчают, клеточные структуры разрушают, растирая измельченную ткань с песком, или обрабатывают ультразвуком. При этом ферменты «вываливаются» из клеток и мембранных структур. Их теперь очищают и отделяют друг от друга. Для очистки используют различную способность ферментов разделяться на хроматографических колонках, неодинаковую их подвижность в электрическом поле, осаждение их спиртом, солями, ацетоном и другие методы. Так как большинство ферментов связано с ядром, митохондриями, рибосомами или другими субклеточными структурами, сначала выделяют центрифугированием эту фракцию, а затем из нее извлекают фермент

Разработка новых методов очистки позволила получить ряд кристаллических ферментов в очень чистом виде, которые могут храниться годами.

Сейчас уже невозможно установить, когда люди впервые применили фермент, но можно с большой уверенностью утверждать, что это был фермент растительного происхождения. Люди давно обратили внимание на полезность того или иного растения не только как пищевого продукта. Например, аборигены Антильских островов издавна использовали сок дынного дерева для лечения язв и других кожных заболеваний.

Рассмотрим более подробно особенности получения и отрасли применения ферментов на примере одного из хорошо известных ныне растительных биокатализаторов — папаина. Этот фермент содержится в млечном соке во всех частях тропического плодового дерева папайи — гигантской древовидной травы, достигающей 10 м. Ее плоды похожи по форме и вкусу на дыню и содержат большое количество фермента папаина. Еще в начале XVI в. испанские мореплаватели обнаружили это растение в естественных условиях в Центральной Америке. Затем его завезли в Индию, а оттуда во все тропические страны. Васко да Гама, увидевший папайю в Индии, назвал ее золотым деревом жизни, а Марко Поло сказал, что папайя — это «дыня, вскарабкавшаяся на дерево». Мореплаватели знали, что плоды дерева спасают от цинги и дизентерии.

В нашей стране папайя растет на Черноморском побережье Кавказа, в ботаническом саду Академии наук СССР в специальных теплицах. Сырье для фермента — млечный сок — получают из надрезов на кожице плода. Затем сок сушат в лаборатории в вакуумных сушильных шкафах при невысоких температурах (не более 80 °C). Высушенный продукт растирают и хранят в стерильной упаковке, залитой парафином. Это уже достаточно активный препарат. Ферментативную активность его можно оценить по количеству расщепленного за единицу времени белка казеина. За одну биологическую единицу активности папаина принимают такое количество фермента, которого при введении в кровь достаточно для появления симптома «свисания ушей» у кролика массой 1 кг. Этот феномен происходит потому, что папаин начинает действовать на коллагеновые белковые нити в ушах кролика.

Папаин обладает целым спектром свойств: протеолитическим, противовоспалительным, антикоагуляционным (препятствующим свертыванию крови), дегидратационным, болеутоляющим и бактерицидным. Он разрушает белки до полипептидов и аминокислот. Причем это расщепление идет глубже, чем при действии других ферментов животного и бактериального происхождения. Особенностью папаина является его способность быть активным в широком интервале рН и при больших колебаниях температуры, что особенно важно и удобно для широкого применения этого фермента. А если к тому же учесть, что для получения ферментов, сходных по действию с папаином (пепсин, трипсин, лидаза), требуются кровь, печень, мышцы или другие ткани животных, то преимущество и экономическая эффективность растительного фермента папаина несомненны.

Области применения папаина очень разнообразны. В медицине он используется для обработки ран, где способствует расщеплению белков поврежденных тканей и очищает раневую поверхность. Незаменим папаин при лечении различных заболеваний глаз. Он вызывает рассасывание помутневших структур органа зрения, делая их прозрачными. Известно положительное действие фермента при заболеваниях органов пищеварения. Хорошие результаты получены при применении папаина для лечения кожных болезней, ожогов, а также в невропатологии, урологии и других отраслях медицины.

Кроме медицины, большое количество этого фермента расходуется в виноделии и пивоварении. Папаин увеличивает сроки хранения напитков. При обработке папаином мясо становится мягким и быстроусваиваемым, сроки хранения продуктов резко увеличиваются. Шерсть, идущая в текстильную промышленность, после обработки папаином не скручивается и не сопровождается усадкой. Недавно папаин начали применять в кожевенном производстве. Кожаные изделия после обработки ферментом становятся мягкими, эластичными, более прочными и долговечными.

Тщательное изучение некоторых неизлечимых ранее болезней привело к необходимости вводить в организм недостающие ферменты для замены тех, активность которых снижена. Можно было бы ввести в организм необходимое количество недостающих ферментов или «добавить» молекулы тех ферментов, которые в органе или

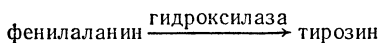
ткани снизили свою каталитическую активность. Но на эти ферменты организм реагирует как на чужеродные белки, отторгает их, вырабатывает на них антитела, что в конце концов приводит к быстрому распаду введенных белков. Ожидаемого терапевтического эффекта не будет. Вводить ферменты с пищей тоже нельзя, так как пищеварительные соки их «переварят» и они потеряют свою активность, распадутся до аминокислот, не дойдя до клеток и тканей. Введение ферментов прямо в кровоток приводит их к разрушению тканевыми протеазами. Устранить эти трудности удастся, применяя иммобилизованные ферменты. В основе принципа иммобилизации лежит способность ферментов «привязываться» к стабильному носителю органической или неорганической природы. Примером химического связывания фермента с матрицей (носителем) является образование прочных ковалентных связей между их функциональными группами. Матрицей может быть, например, пористое стекло, содержащее функциональные аминогруппы, к которым химически «привязывают» фермент.

При применении ферментов часто возникает необходимость сравнивать их активности. Как узнать более активный фермент? Как рассчитать активность разных очищенных препаратов? Условились за активность фермента принимать количество субстрата, которое за одну минуту может превратить 1 г ткани, содержащий этот фермент, при 25 °С. Чем больше субстрата переработал фермент, тем он активнее. Активность одного и того же фермента меняется в связи с возрастом, полом, временем суток, состоянием организма, а также зависит от желез внутренней секреции, вырабатывающих гормоны.

Природа почти не ошибается, производя одинаковые белки в течение всей жизни организма и передавая эту строгую информацию о производстве тех же белков из поколения в поколение. Однако иногда в организме появляется измененный белок, в составе которого встречается одна или несколько «лишних» аминокислот или, наоборот, они утрачены. В настоящее время известно много таких молекулярных ошибок. Они объясняются разными причинами и могут вызвать болезненные изменения в организме. Такие болезни, в появлении которых повинны ненормальные молекулы белка, получили в медицине название молекулярных. Например, гемоглобин

здорового человека, состоящий из двух полипептидных цепей (α и β), и гемоглобин больного серповидно-клеточной анемией (эритроцит имеет форму серпа) отличаются только тем, что у больных в β -цепи глутаминовая кислота заменена валином. Серповидно-клеточная анемия — это наследственная болезнь. Изменения гемоглобина передаются от родителей потомству.

Болезни, возникающие при изменении активности ферментов, называются *ферментопатиями*. Они, как правило, наследуются, передаются от родителей детям. Например, при врожденной фенилкетонурии нарушается следующее превращение:



При недостатке фермента фенилаланингидроксилазы фенилаланин не превращается в тирозин, а накапливается, что вызывает расстройство нормальной функции ряда органов, в первую очередь расстройство функции центральной нервной системы. Болезнь развивается с первых дней жизни ребенка, и к шести-семи месяцам жизни появляются ее первые симптомы. В крови и моче таких больных можно обнаружить огромные по сравнению с нормой количества фенилаланина. Своевременное выявление такой патологии и уменьшение приема той пищи, которая содержит много фенилаланина, оказывает положительное лечебное действие.

Другой пример: отсутствие у детей фермента, превращающего галактозу в глюкозу, приводит к накоплению в организме галактозы, которая в больших количествах накапливается в тканях и поражает печень, почки, глаза. Если отсутствие фермента обнаружено своевременно, то ребенка переводят на диету, не содержащую галактозу. Это ведет к исчезновению признаков заболевания.

Благодаря существованию ферментных препаратов расшифровывают структуру белков и нуклеиновых кислот. Без них невозможны производство антибиотиков, виноделие, хлебопечение, синтез витаминов. В сельском хозяйстве применяются стимуляторы роста, которые оказывают действие на активирование ферментативных процессов. Таким же свойством обладают многие лекарст-

венные препараты, которые подавляют или активируют в организме деятельность ферментов.

Без ферментов невозможно представить себе развитие таких перспективных направлений, как воспроизводство химических процессов, происходящих в клетке, и создания на этой основе современной промышленной биотехнологии. Пока еще ни один современный химический завод не способен соперничать с обычным листком растения, в клетках которого с участием ферментов и солнечных лучей из воды и углекислого газа синтезируется огромное число разнообразных сложных органических веществ. При этом в атмосферу выделяется в большом количестве столь необходимый нам для жизни кислород.

Ферментология — молодая и перспективная наука, отделившаяся от биологии и химии и обещающая много удивительных открытий всем, кто решит заняться ею всерьез.

ПРЕВРАЩЕНИЕ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ

Биологическое значение белков

В процессе обмена веществ благодаря своему поистине всеобъемлющему участию в жизненно важных процессах белок непрерывно расходуется. Следовательно, для обеспечения важнейших физиологических функций организма человека и животных, их жизнедеятельности необходимо доставлять белок с пищей. Белок является чрезвычайно важной и обязательной составной частью пищи. Для определения его роли в питании существенно также и то, что ни в функциональном отношении, ни как пластический материал белок не может быть заменен другими пищевыми веществами. В то же время белок может в довольно широких пределах замещать собой жиры и углеводы, т. е. идти на синтез этих соединений в организме.

Организм часто испытывает недостаток или дефицит белка. Эксперты Всемирной организации здравоохранения считают, что примерно половина населения земного шара находится в состоянии белкового голодания, а мировая нехватка пищевого белка составляет около 15 млн. т в год. Выраженная белковая недостаточность — явление обычное в слаборазвитых странах. Особенно широко распространена скрытая, т. е. еще не приводящая к болезни, так называемая субклиническая, белковая недостаточность. Она встречается во всех возрастных группах, но чаще всего наблюдается у детей в период грудного вскармливания и первые годы жизни. Заболевание детей вследствие белковой недостаточности получило название квашиоркора, что в переводе с одного из африканских языков означает «отнятый от груди». Причем на каждый случай заболевания приходится около ста

случаев скрытой формы белковой недостаточности. Помимо детей, другой чрезвычайно уязвимой группой в отношении нарушений, вызываемых низким потреблением белка, являются беременные женщины и кормящие матери.

Белковая недостаточность чаще всего возникает при общем недостатке пищи. При этом понижается количество белка в крови, понижается осмотическое давление крови, кровь начинает хуже отбирать воду у тканей, возникают так называемые голодные отеки. Дефицит белка на фоне общего недоедания приводит к состоянию, носящему название алиментарной (пищевой) дистрофии.

Различные пищевые вещества содержат неодинаковое количество белка. Его больше всего в мясе, рыбе, сыре, яйцах, сое, орехах, горохе. Большинство других пищевых веществ содержит мало белка. В то же время для организма человека и животных крайне важно достаточное поступление белка. И дело здесь даже не в том, какое количество энергии может получиться при распаде белков. Эту энергию вполне могут компенсировать жиры и углеводы. Важнее другое: недостаточное поступление белка с пищей приводит к серьезным нарушениям в организме, а безбелковое питание неизбежно кончается смертью подопытных животных.

В организме постоянно, хотя и с различной скоростью, происходит обновление и разрушение клеток, внеклеточного вещества и других структурных компонентов, в состав которых входят белки. Это постоянное обновление организма и требует непрерывного поступления белков или аминокислот. Поэтому пластическая роль белков в отличие от энергетической просто незаменима. К тому же, как известно из предыдущих разделов, без белков и аминокислот невозможно обновление таких важных для живого организма веществ, как гормоны и ферменты.

Основная масса азота в пищевых продуктах приходится на белки. Если введенного в организм с пищевыми продуктами азота больше, чем выведенного в виде конечных продуктов, то происходит накопление белков в организме. Это наблюдается в молодом растущем организме, при восстановлении организма после болезни, во время беременности. В случае избыточного выведения азотистых продуктов в сравнении с количеством посту-

пившего азота можно говорить о распаде белков, что происходит при заболевании или белковом голодании.

Важным для организма является не только количество белка, потребляемого с пищей, но и его качество. Например, для компенсации распавшегося в организме белка необходимо, чтобы с пищей поступил 1 г аминокислоты метионина. В одних продуктах такое количество метионина содержится в 50 г белка, в других — в 200 г белка, т. е. биологическая ценность первого белка выше, его требуется меньше для покрытия потребностей организма в метионине. Наиболее нужными для человека являются белки мяса, молока, яиц, картофеля. Некоторые белки имеют полноценный аминокислотный состав, но они плохо расщепляются в пищеварительном тракте. Это белки шерсти, перьев, волос и пр.

Неодинаково значение различных аминокислот в белке. Если исключить некоторые аминокислоты из пищи, то организм «не заметит» их отсутствия, т. е. они могут синтезироваться в организме из других соединений: углеводов, жиров, кетокислот. Недостаток же других аминокислот приводит к нарушению синтеза белка, расстройству нервной системы, болевым явлениям, потере массы и трудоспособности.

К 1915 г. выяснили, что белок зеин, основной белок кукурузы, не способствует росту, и животные погибали, если их кормили только этим белком. Если же к зеину добавлять аминокислоту триптофан, то животные жили гораздо дольше, хотя и этого не было достаточно для их нормального роста. Если же к зеину добавить, помимо триптофана, еще одну аминокислоту — лизин, то животные нормально росли и развивались. Такие эксперименты доказали, что питательная ценность белка зависит от его аминокислотного состава.

Не все аминокислоты, входящие в состав белковой молекулы, являются равноценными. Оказалось, что часть из них не может быть синтезирована в организме человека и они должны обязательно поступать в организм с пищей. Эти аминокислоты принято называть *незаменимыми*. К ним относятся валин, лейцин, изолейцин, лизин, триптофан, треонин, фенилаланин, метионин. Для детей необходимы также аргинин и гистидин. Следовательно, организму требуются белки, содержащие необходимое количество незаменимых аминокислот. Боль-

шинство аминокислот, встречающихся в пищевых белках, могут синтезироваться в теле человека. К ним относятся аланин, гликокол, глутаминовая кислота, серин, тирозин, цистеин и др. Они получили название *заменимых*. Однако нельзя недооценивать их роли в организме, так как они входят непременно компонентами в состав белков нашего организма. Отсутствие или недостаточность заменимых аминокислот в пище ведет к необходимости их синтеза в организме, причем нужный для этих целей азот черпается в таком случае из незаменимых аминокислот, поступающих с пищей. Наилучшим соотношением заменимых и незаменимых аминокислот для человека отличается белок куриных яиц. Он считается эталонным, т. е. содержит полный достаточный набор аминокислот. В других белках может быть меньшее по сравнению с эталонным относительное количество той или иной незаменимой аминокислоты.

Чаще всего не хватает следующих аминокислот: триптофана, лизина, реже метионина. Поэтому организму требуется эталонного белка меньше всего, а других белков больше. И чем хуже соотношение аминокислот, тем больше требуется белка. Если же в белке не хватает какой-нибудь незаменимой аминокислоты (хотя бы одной), то покрыть потребности организма он не может, сколько бы его ни поступало. Так, нехватка одной незаменимой аминокислоты приведет к тому, что в организме не смогут синтезироваться молекулы белков, в составе которых содержится эта незаменимая аминокислота.

В настоящее время считается, что для взрослого человека нужно в сутки около 115 г белка. Если же использовать белок куриного яйца, то достаточно 40 г, а смеси незаменимых аминокислот — 13 г. Зная примерный аминокислотный состав различных пищевых продуктов, специалисты помогают составить диету таким образом, чтобы компенсировать недостаток аминокислот в одних продуктах за счет высокого содержания этих аминокислот в других.

Опыты на животных показали, что при белковом голодании не все органы уменьшают свою массу равномерно. Белки мышц, печени, плазмы крови расходуются при белковом голодании в первую очередь. Эти белки выполняют многообразные жизненные функции, но в критический период голодания они становятся белковыми источ-

никами для жизненно наиболее важных органов: мозга, сердца, эндокринных желез. Особенно большим колебаниям в концентрации белка подвержена плазма крови: в случае уменьшения поступления белка с пищей уменьшается и количество белка в крови, при хорошем белковом питании идет быстрое восстановление содержания белка в плазме.

Распад белков в организме до аминокислот

Белки различных органов, тканей и тем более организмов очень отличаются друг от друга по молекулярной массе, аминокислотному составу, заряду, форме макромолекулы и многим другим параметрам. В связи с этим белок одного организма является чужим для другого. Поэтому пищевой белок никогда не используется организмом в нерасщепленном виде. К тому же на чужеродные белки, если они как-то попали в клетку в неизменном виде, выработались бы антитела, иммунитет лишил бы их видовой специфичности, т. е. попытался расщепить. Организм использует для питания клеток не сам белок, а аминокислоты, его составляющие.

Мы уже знаем из предыдущих разделов, что для получения из белка смеси аминокислот необходимо их продолжительно кипятить с кислотами или щелочами. В организме же процесс гидролиза белка идет под действием пищеварительных протеолитических ферментов при невысоких температурах. Все протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта действуют на пептидную связь —CO—NH— , но каждый из ферментов выбирает «свои» связи, образованные определенными аминокислотами. Например, пепсин быстрее разрывает связи между двумя остатками аланина или между аланином и серином, а трипсин «узнает» группы аргинина и лизина (см. рис. 19).

В отличие от углеводов белки в ротовой полости не подвергаются никаким изменениям, так как слюна не содержит ферментов, расщепляющих белки. Разрушение их начинается в желудке под действием двух мощных факторов: сильно кислой реакции желудочного сока и активного фермента пепсина. pH желудочного сока — 1,5—2,5. Это очень кислая среда, в которой пепсин наиболее активен. Кислотность желудочного сока создает

соляная кислота, роль которой многообразна: она стимулирует превращение неактивного пепсиногена в активный пепсин, создает оптимальную концентрацию H^+ для действия пепсина, вызывает денатурацию и набухание белков и предотвращает гниение в желудке.

Превращение неактивного пепсиногена в пепсин, как и в случае с трипсином, происходит при отщеплении части молекул полипептида с молекулярной массой около 7000. Об активности пепсина можно судить по скорости переваривания яичного белка или нитей фибрина. Пепсин разрывает в белке преимущественно внутренние связи, хотя находят и небольшое количество отдельных аминокислот, полученных при гидролизе концевых участков белковой нити. Однако основными продуктами гидролиза белка после обработки пепсином являются крупные обломки белковой молекулы — пептоны. Это все еще высокомолекулярные соединения. Они не всасываются в желудке, а поступают в двенадцатиперстную кишку. Здесь происходит дальнейшее превращение этих веществ под действием кишечного сока, в котором находится несколько разных ферментов: трипсин, химотрипсин, различные пептидазы.

Трипсин, как и пепсин в желудке, выделяется в неактивной форме, затем от него отщепляется небольшой пептид, что делает трипсин активным. Выделение пищеварительных ферментов в неактивной форме имеет очень важное значение: ведь в кишечном соке есть много других белков-ферментов, которые трипсин сразу же переварил бы, если бы он выделялся в активной форме. Трипсин гидролизует тоже не все пептидные связи в белке, а примерно $1/3$ общего их количества. Он воздействует также на целые белковые молекулы, которые почему-то не расщепились в желудке.

Химотрипсин расщепляет те связи, на которые не действует трипсин, прежде всего связи, образованные тирозином, фенилаланином, триптофаном и метионином. После обработки химотрипсином гидролизованными оказываются больше половины пептидных связей. Химотрипсин может воздействовать (как и трипсин) на негидролизованные пепсином белки. Поэтому операция полного удаления желудка не исключает возможности усвоения белков пищи.

Дальнейший распад белков происходит под действием ферментов пептидаз в тонком кишечнике. Они вы-

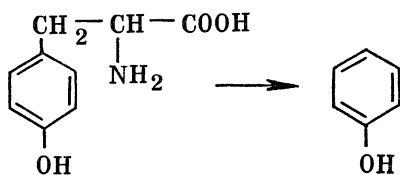
деляются стенкой кишечника тоже в неактивной форме. Карбоксипептидазы отщепляют аминокислоты от обрывков белковой молекулы с COOH -конца, аминопептидазы — с того конца, где имеется свободная NH_2 -группа. Дипептидазы расщепляют дипептиды на свободные аминокислоты.

Таким образом, совместное действие группы ферментов в различных отделах желудочно-кишечного тракта приводит к полному распаду белков пищи до свободных аминокислот.

Пути превращения аминокислот

Аминокислоты, образовавшиеся при гидролизе белка в желудке и кишечнике, всасываются через стенки капилляров и попадают в кровь. Ранее считали, что частично могут всасываться и нерасщепленные белки. Эксперименты опровергли эти предположения. Для проверки в кровь вводили чужеродный белок. На него вырабатывались антитела и шли реакции, направленные на уничтожение такого белка. Всасывание белка в кишечнике возможно при приеме большого количества сырого белка (например, яичного белка). При этом белок появляется даже в моче. Но такой опыт сопровождается явлениями отравления, т. е. всасывание белка — ненормальное физиологическое состояние.

Аминокислоты же не только хорошо всасываются, но их можно прямо вводить в кровь. Этот прием используется, когда больной не в состоянии какое-то время нормально питаться, например при операциях на пищеводе. Часть аминокислот не всасывается в кишечнике, а используется там же в качестве питания микроорганизмами, которые всегда населяют кишечник. Микроорганизмы нижних отделов кишечника участвуют в процессе гниения белков. Среди ядовитых продуктов гниения белков можно назвать фенол, который образуется из аминокислоты фенилаланина:



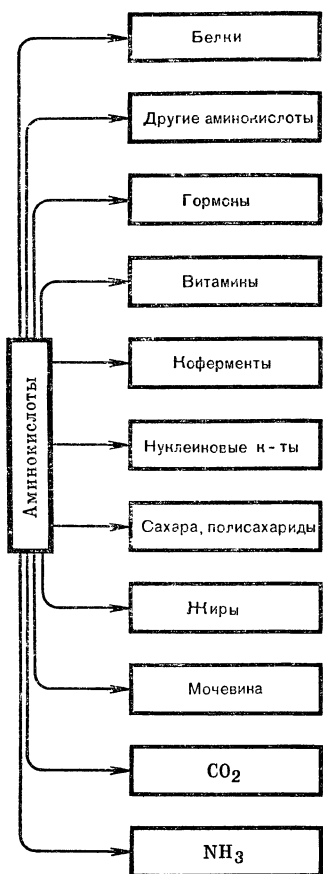


Рис. 20. Пути превращения аминокислот в организме.

Количество веществ, получающихся из белков при гниении в кишечнике, велико и разнообразно по химическом составу.

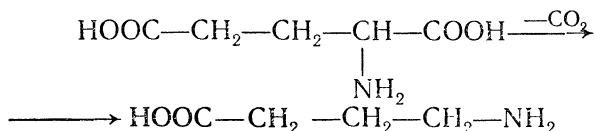
Аминокислоты, всосавшиеся в кровь через стенку кишечника, попадают в печень, где они претерпевают различные превращения, а также идут на синтез белка.

Значительная часть аминокислот разносится кровью дальше ко всем органам и тканям. В клетках из них строятся белки, специфические для данной ткани.

Общая схема путей превращения аминокислот дана на рисунке 20.

Основные реакции, по которым идет распад аминокислот,— декарбоксилирование, дезаминирование, переаминирование.

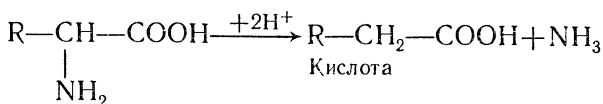
Декарбоксилирование, связанное с отщеплением карбоксильной группы от аминокислоты, приводит к образованию аминов:



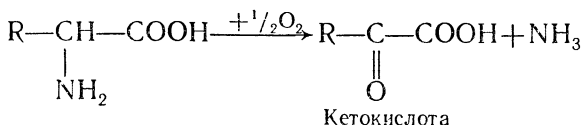
Ферменты, которые катализируют этот процесс, называются декарбоксилазами.

При различных видах дезаминирования получаются кислоты, кетокислоты, гидроксикислоты и отщепляется аммиак.

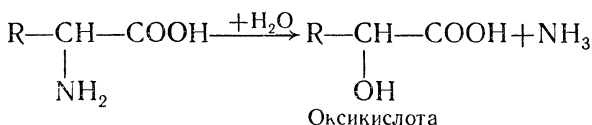
1. Восстановительное дезаминирование:



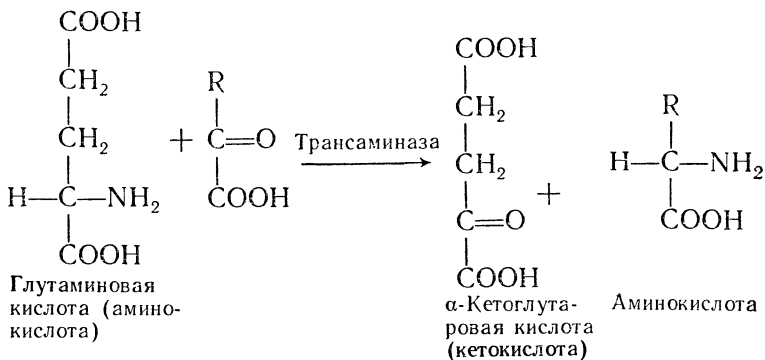
2. Окислительное дезаминирование:



3. Гидролитическое дезаминирование:



В 1937 г. советские ученые А. Е. Браунштейн и М. Г. Крицман открыли реакцию переаминирования, в результате которой под действием ферментов трансаминаз из одних аминокислот в организме могут быть получены другие аминокислоты путем переноса аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту:

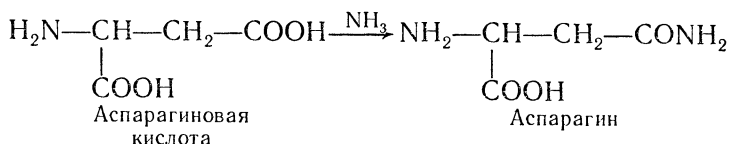


В тканях животных есть набор ферментов, расщепляющих белки прямо в клетках. Эти ферменты назы-

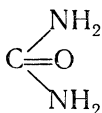
вают тканевыми *протеазами*. Они наиболее активны в слабокислой среде. По своему действию эти ферменты соответствуют пепсину, трипсину, пептидазам. Многие из них локализованы в лизосомах, субклеточных частицах, которые в клетках отвечают за переваривание белков. Лизосомальные мембраны нестабильны. Под влиянием различных факторов они разрываются, а гидролазы, находящиеся в них, выходят в клетку и аутолизуют¹ ее содержимое.

Та часть аминокислот, которая не была использована организмом для синтеза белка, ферментов, новых аминокислот или гормонов, распадается и выводится из организма. Конечными, продуктами распада аминокислот являются аммиак, оксид углерода (IV), вода, мочеви́на.

Аммиак образуется из аминсодержащих соединений при дезаминировании. В свободном виде он токсичен, и поэтому организм научился его обезвреживать. Наиболее восприимчивы и чувствительны к аммиаку клетки головного и спинного мозга, а также другие нервные ткани. В нормальных (неповрежденных) клетках за обезвреживание аммиака в какой-то степени отвечают прежде всего глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, имеющие по две карбоксильные группы. Они поглощают аммиак и образуют безвредные амиды. Этот путь обезвреживания NH_3 особенно важен для растений:



У человека и высших млекопитающих распад аминокислот идет через ряд реакций, и из аммиака и оксида углерода (IV) в несколько стадий с участием АТФ синтезируется мочеви́на:

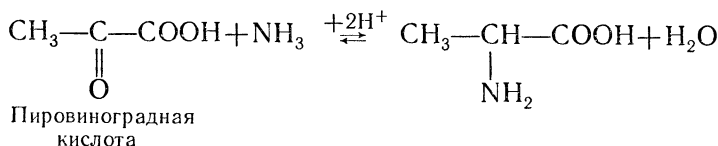


¹ Аутолиз — саморастворение.

Это конечный продукт, выделяющий аммиак в безвредной форме с мочой.

Беглый обзор путей превращения аминокислот был бы неполным, если, рассказав об основных путях распада, не остановиться на синтезе аминокислот в клетках. Как мы уже говорили (с. 99), синтезироваться могут не все, а только заменимые аминокислоты. У растений же все аминокислоты могут синтезироваться из аммиака, нитратов и оксида углерода (IV).

Один из путей синтеза новых аминокислот мы уже приводили — это переаминирование. Другой путь — прямое аминирование кетокислот. Углеродный скелет для таких аминокислот чаще всего берется из продуктов неполного распада углеводов или жирных кислот. Например, аминокислота аланин легко получается из продукта углеводного обмена — пировиноградной кислоты:



Как видно из этого примера, нельзя проводить резкие границы между обменах аминокислот, жиров и углеводов. Продукты распада одного класса веществ могут служить исходным материалом для синтеза другой группы соединений.

Еще один путь внутриклеточного синтеза аминокислот у человека и животных — превращение незаменимых аминокислот в заменимые. Например, гликокол может образоваться из треонина и серина. Этот путь подтвержден опытами с использованием меченых атомов.

Строго говоря, незаменимые аминокислоты тоже в какой-то степени могут образовываться. Но это лишь в том случае, если в организме есть соответствующие им кетокислоты. Тогда из них путем прямого аминирования могли бы получиться аминокислоты. Таких соединений в клетке мало, к тому же они чаще всего образуются из незаменимых аминокислот.

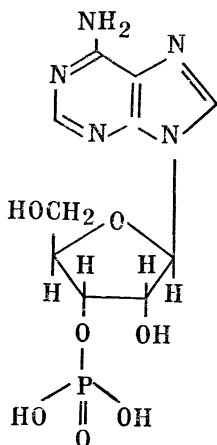
Биосинтез белка в клетке

Механизмы внутриклеточного связывания аминокислот в белки были выяснены только после того, как в области синтеза белка применили метод меченых атомов. До этого считалось, что в клетке сначала синтезируются короткие пептиды, которые затем каким-то образом связываются между собой в длинные полипептиды. Современными методами установили, что все белки обновляются с разной скоростью. Белки органов и тканей с высоким уровнем обмена веществ, например печень, обновляются за несколько дней, белки волос, рогов, ногтей — в несколько месяцев. Ученые выяснили основные этапы синтеза белка и компоненты, необходимые для осуществления этого процесса. Определили, что включение аминокислот в белок и синтез макромолекулы осуществляется в клетке за несколько секунд. На искусственный синтез даже самого простого белка в лаборатории уходят многие месяцы кропотливой работы.

Как же осуществляется синтез? Какие вещества необходимы для проведения всех его стадий? Откуда берет энергию для этого химического процесса?

Исследователи предположили, что высокая скорость синтеза белка может быть обеспечена наличием шаблона или модели (матрицы), с которой считывается информация. Большая точность воспроизводства совершенно одинаковых молекул любого белка тоже подтверждает гипотезу существования матрицы. В настоящее время последовательность основных этапов логической цепи белкового синтеза известна. Четко доказана роль ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты): если разрушить ДНК в клеточном ядре, то синтез белка прекратится. В других опытах ДНК из одного штамма микроорганизмов, внедренная в клетки другого штамма, вынуждает его синтезировать некоторые белки, характерные только для первого. Значит, в ДНК заложена информация о специфических белках, которые могут синтезироваться в новых клетках по «старой» ДНК. Это только один из многих примеров, подтверждающих роль ДНК в хранении информации для синтеза совершенно определенных белков. Классическим примером является поражение бактериальной клетки вирусом. Вирус прикрепляется к оболочке бактерии и впрыскивает внутрь ее свою ДНК. В клетке бактерии начинается синтез чужих вирусных

белков. Считывание информации о синтезе необходимого клетке белка начинается с расплетения на определенном участке двойной спирали ДНК. Напомним, что ДНК представляет собой две цепочки, построенные из нуклеотидов, состоящих из трех компонентов: азотсодержащего основания, дезоксирибозы, фосфорной кислоты. Например, адениловый нуклеотид выглядит так:



Такие трехкомпонентные нуклеотиды являются мономерами одной нити ДНК. Они упакованы друг над другом в виде столбика из монет. Параллельно первой нити в ДНК имеется другая, отличающаяся азотистыми основаниями. Между двумя такими нитями устанавливаются водородные связи, которые и поддерживают всю молекулу ДНК в двунитчатом спирализованном состоянии.

Важную роль в синтезе белка играют различные типы уже упоминавшихся нами РНК (рибонуклеиновых кислот, с. 53). Например, крупная информационная (матричная) РНК (*мРНК*) имеет относительную молекулярную массу 1 млн. Предполагается, что каждая *мРНК* соответствует одному белку. Это значит, что клетка, содержащая 2500 различных белков, должна иметь столько же разновидностей *мРНК*, а каждая из них — тысячи нуклеотидов, чтобы «записать» информацию о составе белка, который на ней должен быть синтезирован.

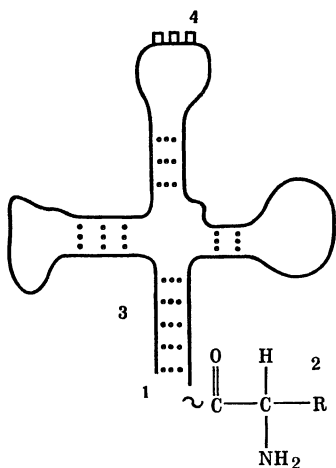


Рис. 21. Структура транспортных РНК: 1 — участок РНК, связывающий аминокислоту; 2 — аминокислота; 3 — участки двойной спирализации РНК; 4 — антикодон (участок РНК, соответствующий определенному участку информационной РНК — кодону).

Другой тип рибонуклеиновых кислот — транспортные (тРНК). Они отличаются от информационных прежде всего низкой молекулярной массой (30 000—35 000). Транспортные нуклеиновые кислоты не связаны с белками. Они находятся в растворимой части клеток в свободном виде и потому нередко называются еще растворимыми. Считают, что видов тРНК не меньше, чем разновидностей аминокислот, т. е. каждая аминокислота имеет свою тРНК. Для прикрепления аминокислоты в тРНК имеется определенный участок (рис. 21). Доказано, что все тРНК построены однотипно, имеют и другие характерные участки и напоминают по форме кленовый лист.

Около 90 % всех РНК содержится в рибосомах. Их так и называют — рибосомальные РНК. Они наиболее высокомолекулярны (около 2 млн.), всегда связаны с белками. Тело рибосомы состоит из комплекса РНК+белок, а сама рибосома по форме представляет собой грибовидное образование, состоящее из двух субъединиц: шляпки и ножки разной массы.

Каким же образом взаимодействуют между собой РНК в системе синтеза белка? Роль их доказана такими же убедительными опытами, как и для ДНК. Если РНК обработать ферментом рибонуклеазой, т. е. разрушить ее, то синтез белка в клетке прекращается. Если рибосомы обработать рибонуклеазой, то синтез белка в таких рибосомах тоже не идет. Это же подтверждается исследованиями, проведенными на вирусах. Многие вирусы содержат не ДНК, а РНК, окруженную белковой оболочкой — капсулой. Известно, что при внедрении такого вируса в клетку идет синтез белка, заданный вирусной РНК. Если извлечь РНК из вируса, обработать ее химически-

ми методами и изменить нуклеотидный состав, а затем измененную РНК ввести в клетку, то изменится и аминокислотный состав белка, синтезируемого в клетке. Этот изящный, но достаточно трудоемкий опыт доказывает неопровержимо, что РНК каким-то образом диктует, какой белок и какого состава должен синтезироваться в данный момент в клетке.

В настоящее время выяснено, что ДНК в ядре клетки расплетается на значительном участке и получают две одиночные цепи. На одной из этих расплетенных цепей из нуклеотидов, имеющих в растворимой части клетки, синтезируется полинуклеотидная цепь. Она полностью считывает информацию с одиночной нити ДНК и образует при участии фермента полимеразы иРНК, т. е. РНК, считавшую информацию с ДНК. После синтеза иРНК освобождается от ДНК и выходит из ядра в цитоплазму — растворимую часть клетки.

В настоящее время механизм синтеза белка представляют следующим образом. Аминокислоты, растворенные в клеточном содержимом, вовлекаются в синтез белка не прямо, а после предварительной активации. Активация заключается в том, что к карбоксильной группе аминокислоты присоединяется АТФ. Теперь аминокислота способна преодолеть энергетический барьер в процессе синтеза белка, т. е. она переходит на более высокий энергетический уровень. Запасенной энергии будет достаточно для образования пептидной связи. Активация идет при обязательном участии активирующих ферментов — синтетаз, индивидуальных для каждой аминокислоты.

Следующий этап синтеза белка — взаимодействие активированной аминокислоты с растворенными в цитоплазме тРНК. В каждой из них есть участки, которые «узнают» свою аминокислоту. Например, тРНК, которая переносит валин, может столкнуться с активированным аланином, или метионином, или еще какой-то аминокислотой, но результативного взаимодействия не получится. Это объясняется не только специфическим отношением РНК именно к валину, но и существованием отдельных ферментов, катализирующих перенос определенной активированной аминокислоты на определенную тРНК. Таким образом, на 20 разновидностей аминокислот необходимо не менее 20 различных транспортных РНК и 20 специфических ферментов.

Далее было установлено, что, несмотря на различные нуклеотиды в составе тРНК, за прикрепление к активированной аминокислоте отвечает один и тот же триплет (три нуклеотида): цитозин — цитозин — аденозин, соединенные через остатки фосфорной кислоты. Этот концевой участок (ЦЦА) обнаружен у всех тРНК. Отщепление его от рибонуклеиновой кислоты делает прикрепление активированной молекулы аминокислоты к тРНК невозможным. Свойство же различать именно свою аминокислоту зависит от других участков молекул РНК.

Следующий этап синтеза белка — перенос тРНК с прикрепленной к ней активной аминокислотой на рибосомы. Рибосомы считаются основным местом синтеза белка в клетке. Эти частицы, состоящие из двух субъединиц, могут диссоциировать в клетке на тяжелую и легкую субъединицы и соединяться вновь вместе. Часто рибосомы образуют агрегаты из двух, трех и более рибосом. Полимеры, образованные многими рибосомами, называли тяжелыми рибосомами, или *полисомами*. Если в клетке снизить концентрацию ионов Mg^{2+} , то рибосомы начинают распадаться на субъединицы, а если концентрацию этих ионов увеличить, то рибосомы начинают объединяться в пары. Ученые выделили рибосомы из клеток различных органов и тканей животного и растительного происхождения. Найдены рибосомы и в клетках бактерий. В основном в клетке рибосомы локализованы в цитоплазме, но их находят и в митохондриях, и в ядрах, и в пластидах, и в других субклеточных структурах. Такая универсальная распространенность рибосом подтверждает их жизненно важную биологическую функцию — синтез белка. Процессы синтеза белка идут и в ядре, где необходимы специфические ядерные белки, и в митохондриях, где можно найти много белков-ферментов. Если выделить рибосомы в тот момент, когда в них идет синтез белка, то можно обнаружить, что полипептидная нить синтезируемого белка связана с рибосомой до тех пор, пока к полипептиду не присоединится последняя аминокислота. Тогда вновь образованный белок освобождается от рибосомы, синтез одной нити закончен и рибосома готова начать синтез следующей полипептидной цепи.

Каков же механизм самого процесса синтеза белка? иРНК, которая была синтезирована в ядре на ДНК как

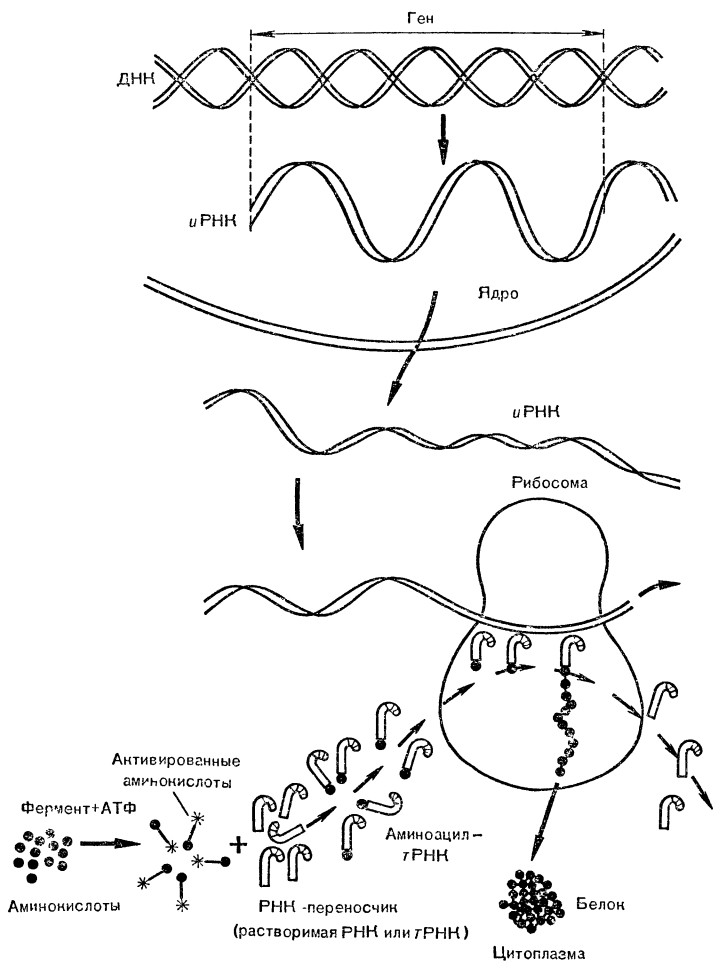


Рис. 22. Схема биологического синтеза белка.

на матрице, несет всю закодированную в нуклеотидной последовательности информацию из ядра в цитоплазму, а точнее к рибосоме (рис. 22). Чтобы начался синтез белка в рибосоме, необходимо несколько условий, главные из которых таковы: рибосома должна присоединиться к *u*РНК; в окружающей среде должны быть РНК, связанные с активными аминокислотами; в растворе должны быть ионы Mg^{2+} и некоторые другие ионы (K^+ , NH_4^+) и определенные белки-ферменты.

иРНК как лента транспортера или магнитофонная лента протаскивается через рибосому или полисомы. Каждые три нуклеотида на *иРНК* соответствуют присоединению одной аминокислоты; например триплет, состоящий из трех цитозинов (ЦЦЦ), кодирует включение в белковую цепь аминокислоты пролина. А на *тРНК*, несущей к месту синтеза белка аминокислоту пролин, есть участок — антикодон, который «узнает» свое место в *иРНК*, т. е. триплет ЦЦЦ. После отдачи аминокислоты *тРНК* освобождается из рибосомы, оторвавшись от *иРНК*, готова опять связаться с пролином, находящимся в цитоплазме, и нести его в рибосому, дожидаясь нового участка *иРНК*, кодирующего пролин, т. е. ЦЦЦ.

В каждый момент времени в рибосоме, синтезирующей белок, находятся две молекулы *тРНК*: одна только что вошла в рибосому и прикрепилась своим антикодонным к кодону (*иРНК*), зашифровавшему очередную аминокислоту, вторая *тРНК* пришла раньше первой и уже перебросила принесенную ею аминокислоту на растущую полипептидную цепь. При этом какой-то механизм (сравните с зубчатой шестеренкой) протянет *иРНК* на один триплет через рибосому, что приведет к освобождению предыдущей *тРНК* и выходу ее из рибосомы, а аминокислота, принесенная второй *тРНК*, приблизится к недостроенному белку, и установится пептидная связь за счет запасенной ранее от АТФ энергии. В *иРНК* есть кодоны, которые не кодируют какую-то определенную аминокислоту, а сообщают о конце синтеза белка. Получив такую информацию, рибосома прекращает синтез, и белок готов для выполнения предназначенной ему функции. Следовательно, в основные стадии синтеза белка в клетках на рибосомах входят: а) активирование аминокислот с помощью АТФ и специальных ферментов; б) связывание активных аминокислот с *тРНК*; в) перенос активных аминокислот на *иРНК* в рибосому к месту синтеза белка; г) синтез пептидных связей в рибосоме и удлинение полипептидной цепи еще на одну аминокислоту; д) отрыв готовой полипептидной цепи от рибосомы и формирование третичной структуры белка.

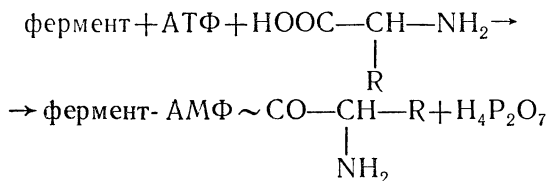
Рассказ о синтезе белка занимает гораздо больше времени, чем идет сам процесс. Если проследить за синтезом молекулы гемоглобина, то окажется, что все стадии от активации аминокислот до получения молекулы гемоглобина длятся около полутора минут. А если предста-

вить себе, сколько ферментов, гормонов белковой природы, структурных белков и полипептидов необходимо синтезировать в одно и то же время, то не может не удивить быстрота, слаженность и четкость прохождения сложнейших внутриклеточных реакций.

Интересно, что если исследователи вместо природной иРНК давали в систему синтеза белка синтетическую полинуклеотидную нить, то рибосома все равно синтезировала пептидную цепь по такой матрице. Этот факт подтверждает, что основные наши представления о пути синтеза белка в клетке соответствуют действительности.

Рассмотренная схема синтеза белка называется матричной потому, что безошибочное воспроизведение информации о первичной структуре белка происходит в клетке, как копирование текста с заготовленного заранее шаблона — матрицы. А локализация синтеза белка в рибосоме дала процессу другое название — рибосомальный синтез.

Наряду с общепризнанным путем синтеза белка доказано существование другого механизма синтеза, не связанного с нуклеиновыми кислотами, — мультиферментный путь. Принцип этой схемы состоит в следующем. В присутствии АТФ, ионов Mg^{2+} и набора аминокислот происходит активирование необходимых аминокислот — образование их аминокациладенилатов:



Образование пептидной связи между двумя очередными аминокислотами осуществляется комплексом, состоящим из нескольких ферментов, — мультиферментным комплексом. В переносе аминокацильных групп большую роль играют SH-группы ферментных субъединиц (см. рис. 18). Так синтезируются, например, антибиотики грамицидин, тироцидин, микобациллин, представляющие собой небольшие полипептиды. Так как мультиферментный путь синтеза белка в бактериях сосуществует с ри-

босомальным путем, считается, что в эволюции сначала был только мультиферментный механизм сборки полипептидов. Ф. Липман предложил объединить элементы матричного и мультиферментного пути синтеза белка в единую теорию.

Проблема получения пищевого белка

В настоящее время основным источником белка в питании населения земного шара являются зерновые продукты, и прежде всего пшеница, рис, кукуруза, за счет которых получается около 40 млн. т белка в год. 12 млн. т белка поступает за счет бобовых культур и 25 млн. т за счет животных белков. Но данного количества (77 млн. т) недостаточно для удовлетворения потребности населения в белке. Следовательно, проблему белкового питания, как и питания в целом, нельзя считать решенной. Особую остроту она имеет в отсталых и развивающихся странах Африки, Азии и Латинской Америки. Однако дефицит питания, иногда граничащий с голоданием, существует среди необеспеченных слоев населения и в таких экономически развитых странах, как Англия и США.

Основной путь решения данной проблемы — развитие сельского хозяйства на высокой научной и технической основе, использование земель, не вовлеченных в процесс сельскохозяйственного производства, повышение урожайности, интенсификация и рационализация всех отраслей сельского хозяйства. Равным образом необходимо развитие отраслей промышленности, связанных с переработкой пищевых продуктов, их хранением и транспортировкой. Важное значение при этом приобретает реализация научных достижений, полученных в разных областях науки. Некоторые из них, например промышленное производство белка и других питательных веществ, открывают новые перспективы, дающие основания надеяться на радикальное решение извечной задачи человечества — обеспечение достаточным и рациональным питанием.

Хотя основным поставщиком белка в настоящее время являются зерновые, известно, что в качественном отношении белки, содержащиеся в них, значительно уступают белкам животного происхождения. Они довольно далеки по составу незаменимых аминокислот от идеала,

т. е. от белка, принятого за эталон. Высокая биологическая ценность животных белков, сочетающаяся с лучшим вкусом, стимулирует развитие животноводческой отрасли сельского хозяйства. Меры к этому принимаются в большинстве стран мира, а доля продуктов этой отрасли в пищевом балансе постепенно повышается. Однако следует учитывать такой экономический фактор, как высокая себестоимость производства большинства продуктов животноводства: мяса, яиц и пр., что создает трудности для быстрого развития этой отрасли сельского хозяйства. Большая питательная ценность белков животного происхождения и их дефицитность диктуют необходимость особо бережного к ним отношения и рационального использования.

Большие потенциальные возможности получения белков высокого качества заключены в промысле рыб и других обитателей морей и океанов. В большинстве стран в годовом рыбном рационе одного человека содержится пока только не более 2 кг белка.

Биологическая неполноценность белков зерновых продуктов выдвинула важную научно-практическую задачу — разработку способов исправления их аминокислотного состава. Улучшение зерновых белков, доведение их качества по аминокислотному составу до уровня белков животного происхождения открыли бы возможности тем же количеством продуктов удовлетворить потребность гораздо большего числа людей. Можно сразу сказать, что решение подобной задачи при современном уровне наших знаний возможно не только в научном аспекте, но и в практическом. Несколько путей ведут к практической реализации этих задач. Так, исследования, проведенные по анализу биологической ценности различных растительных белков, показали высокую ценность белков ржи, риса, овса, гречихи. Использование этих и подобных им растений является одним из способов решения задач улучшения белкового питания.

Другой важный путь, ведущий к этой цели, заключается в селекции и выведении сортов растений с наилучшим аминокислотным составом белков. Эта задача вполне реальна, так как среди имеющихся сортов растений, например пшеницы, есть сорта, белки которых лучше сбалансированы по составу аминокислот по сравнению с другими. К настоящему времени выведены сорта кукурузы, чрезвычайно богатые триптофаном и лизином, а

также сорта высоколизиновой пшеницы. Есть все основания полагать, что агрохимики могут вывести и внедрить сорта с лучшим соотношением аминокислот, т. е. с более высококачественным белком, учитывая, что на аминокислотный состав растительных белков влияют условия выращивания: почва, удобрения, количество осадков и т. д.

Улучшение качества белка хлебных изделий возможно за счет добавки при их выпечке отходов молочной промышленности или их обогащения дефицитными аминокислотами.

В настоящее время из отходов нефтяной промышленности производится синтез микробного белка, который используется на корм скоту, что значительно снижает себестоимость производства продуктов животноводства. Бурный прогресс химической науки позволил осуществить дешевый синтез лизина. В настоящее время химики работают над разработкой дешевого способа производства триптофана. Для производства различных аминокислот, в том числе и незаменимых, широко применяется метод их микробиологического синтеза, для которого выводятся специальные штаммы микроорганизмов, усиленно синтезирующие ту или иную аминокислоту.

КАК ИЗУЧАЮТ БЕЛКИ

Для изучения любого процесса, происходящего в клетках, субклеточных структурах (например, в митохондриях) или тканях, необходимо выделить компоненты, которые обеспечивают протекание химических реакций. Для этого следует разрушить клетки или клеточные органеллы физическими методами. Животные клетки разрушаются довольно легко, а бактериальные и растительные клетки — с трудом, так как они имеют прочную стенку.

Весь процесс выделения белков и изучения их современными методами можно представить следующей упрощенной схемой:

- а) разрушение клеток или внутриклеточных структур;
- б) выделение из клеток нужных органелл или частиц;
- в) разделение компонентов органелл и их выделение, например белков;
- г) изучение химических и физических свойств различными способами (хроматография, электрофорез, спектральные, радиоизотопные и другие методы).

Рассмотрим эти этапы.

Разрушение клеток

Сначала клетки разрушали, растирая их с песком в ступке. Однако в наше время применяют более эффективные методы, хотя и традиционным еще пользуются при работе с растительными и бактериальными клетками. Разновидностью этого метода является продавливание клеток, смешанных с кристалликами льда или другими острыми частичками, через пресс. Очень часто разрушение

клеток производят при вращении острых лопастей в цилиндре аппарата, похожего на миксер (гомогенизатор), или при движении плотно прилегающего вращающегося поршня вверх и вниз в сосуде с суспензией клеток. Суспензию клеток можно обработать ультразвуком, что тоже приводит к разрушению клеток. Но этот метод имеет существенный недостаток: в процессе обработки ультразвуком выделяется теплота, которая может повредить структуры, особенно белковые.

К другим методам разрушения тканей и клеток относятся последовательное замораживание и оттаивание, обработка ферментами, переваривающими клеточную стенку. Например, при обработке клеток бактерий лизоцимом ускоряется гидролиз клеточной стенки, освобождается внутриклеточная жидкость, содержащая необходимые белки. А метод «азотной бомбы» основан на интересном принципе. Клетки при высоком давлении насыщают газообразным азотом. Давление азота внутри клетки и давление вне ее становятся близкими по значению. После этого внешнее давление сбрасывают, а азот, находящийся внутри клетки, разрушает клеточную оболочку, «взрывает» ее.

Для выделения той или иной фракции выбирают определенную ткань. Например, печень животных — идеальный объект для выделения фракции митохондрий, где их особенно много, а тимус (зобная или вилочковая железа) — ядер и ядерных белков.

Из ткани, выбранной для получения белка или другого компонента, готовят однородную массу — гомогенат, от которого отделяют внутриклеточную жидкость. Для устранения местного нагревания, возникающего в процессе гомогенизации, все процедуры разрушения клеток и выделения белка проводят при пониженных температурах. Сосуды с гомогенатом помещают в холодильные камеры. Исследования проводят в комнатах-холодильниках, подготовку материала осуществляют на льду. Это необходимо потому, что белки при действии теплоты подвергаются денатурации, а ферменты могут потерять свою активность в процессе выделения — инактивироваться. Так как для выделения белков берут ткани, различные по плотности, количеству в них сосудов и соединительнотканых включений, воды, жира и т. д., необходимо тщательно контролировать условия разрушения клеток: продолжительность гомогенизации, температуру,

скорость разрушения. Этот тонкий процесс, как считают специалисты, не только наука, но и искусство.

Разделение частиц путем центрифугирования

Следующий этап выделения биологических структур после разрушения клеток — центрифугирование. Этот метод уже встречался нам, когда говорилось о размерах и массе биологических макромолекул (с. 38). Таким способом можно также выделять определенный биологический материал из гомогената для последующих исследований. Это препаративное центрифугирование, т. е. направленное на выделение какого-то препарата из гомогенной массы, например препарата митохондрий или микросом. Гомогенат центрифугируют в пробирках при определенном числе оборотов. В результате нескольких циклов можно получить сначала самые тяжелые части-

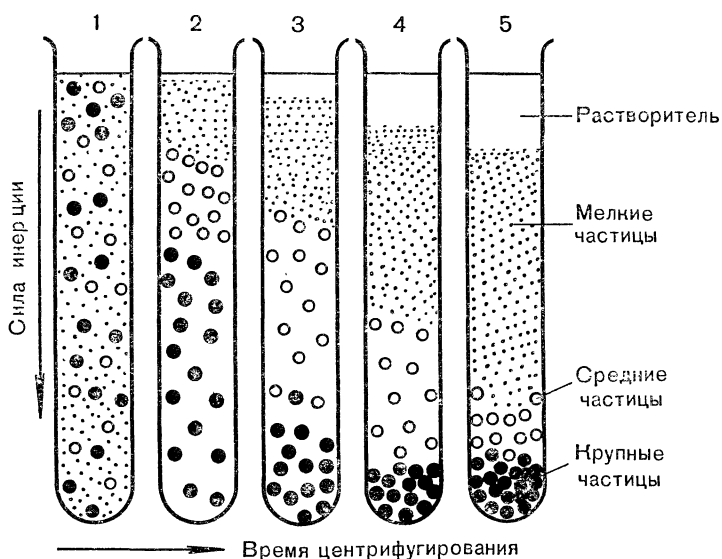


Рис. 23. Разделительное центрифугирование: 1 — хаотическое распределение в пробирке разделяемых частиц; 2—4 — промежуточные стадии центрифугирования; 5 — осаждение в конце центрифугирования в зависимости от размеров и форм частиц.

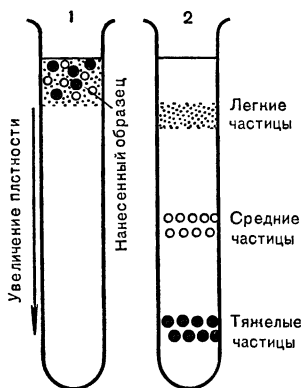


Рис. 24. Центрифугирование веществ согласно их плотности (пробирка наполнялась жидкостью так, что внизу плотность жидкости значительно больше, чем вверху): 1 — начало центрифугирования; 2 — после центрифугирования.

цы (например, ядра). После их отделения гомогенат центрифугируют при большем числе оборотов и получают новый осадок из частиц, которые легче первого осадка, но тяжелее тех, которые остались в суспензии над ним. Затем из более легких фракций выделяют макромолекулы, специфические для этого осадка, например митохондриальные белки. Принцип дифференциального центрифугирования показан на рисунке 23.

Поэтому, когда говорят о ядерных белках или о ферментах лизосом, всегда предполагается, что сначала были выведены сами препараты ядер и лизосом методом дифференциального (разделительного) центрифугирования, а уже за-

тем проводилась работа с белками этих фракций.

Препаративное центрифугирование имеет несколько модификаций, одной из которых является равновесное центрифугирование. Его принцип заключается в том, что белок, ДНК или липопротеид смешивают в пробирке с концентрированным раствором сахарозы или другого вещества, обладающего большой плотностью. В процессе центрифугирования молекулы исследуемого вещества окажутся в той зоне пробирки, где будет одинаковая с ними по плотности зона сахарозы. Этим методом были разделены и затем изучены различные фракции липопротеидов плазмы крови человека (рис. 24).

Извлечение отдельных фракций из пробирок проводят разными приемами, в частности используют полиэтиленовые пробирки, которые после окончания центрифугирования прокалывают в основании иглой и отбирают по каплям каждую фракцию в отдельные стаканы.

Центрифугирование применяется очень широко. Оно используется (кроме уже перечисленных примеров) для оценки чистоты белков, вирусов, препаратов ДНК. О чистоте препарата судят по характеру границы между

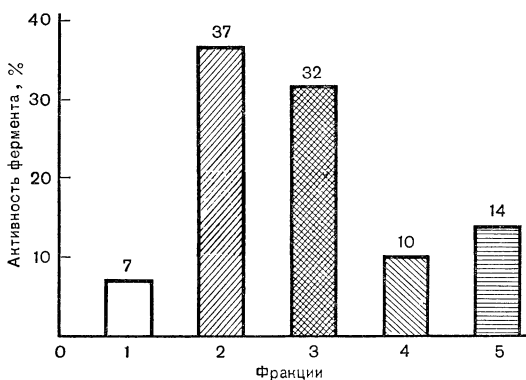


Рис. 25. Зависимость активности фермента глицерофосфатазы от его местонахождения в клетках печени: 1 — в ядре; 2 — в митохондриях; 3 — в лизосоме; 4 — в эндоплазматической сети; 5 — в цитоплазме (за 100 % принята активность фермента в целой клетке).

фракциями при центрифугировании: чистый препарат дает одну резко очерченную границу.

Центрифугирование помогает следить за изменением конформации белков, распадом белков на субъединицы, образованием комплекса фермента с субстратом, приведшим к изменению формы и размера белка.

На рисунке 25 показано, как меняется активность фермента глицерофосфатазы от его местонахождения. Такой график дает возможность визуально оценить, в какой фракции было большее количество белка-фермента.

Несколько слов следует сказать о центрифугах. Различают центрифуги общего назначения, скоростные центрифуги и ультрацентрифуги. Центрифуги общего назначения дают максимальную скорость 6000 об/мин, их роторы крепятся жестко на моторе, емкость центрифужных пробирок или стаканов достаточно велика.

Скоростные центрифуги отличаются тем, что дают предельную скорость до 25 000 об/мин и снабжены системой охлаждения, которая предотвращает нагревание ротора и биологического материала в нем при вращении. Ультрацентрифуги дают предельную скорость до 75 000 об/мин. Такие центрифуги снабжены не толь-

ко системой охлаждения, но и вакуумной установкой, чтобы предотвратить перегрев ротора за счет трения его о воздух.

Хроматографические методы

Одним из наиболее удобных методов разделения биологических соединений является *хроматография*. Разнообразие ее видов и модификаций позволяет сделать выбор, который зависит от природы выделяемого материала.

С помощью хроматографических методов можно разделить как большие, так и малые количества биологического материала (несколько пикограммов)¹.

Хроматографическая система состоит из двух фаз: неподвижной и подвижной, которая течет по неподвижной или пропускается через нее. Разделение веществ между фазами может происходить за счет адсорбции (адсорбционная или распределительная хроматография), равновесного распределения (хроматография на бумаге), ионообменного равновесия и других модификаций хроматографического метода. Рассмотрим принципы некоторых из этих модификаций.

Адсорбционная (распределительная) хроматография была применена М. Цветом в 1903 г. для разделения окрашенных веществ. Колонка для хроматографии представляет собой стеклянную трубку, заполненную адсорбентом. В нее вносят смесь, которую требуется разделить, после чего начинают пропускать растворитель. Вещества, входящие в смесь, продвигаются по колонке с разными скоростями. В случае окрашенных компонентов разделение легко обнаружить по отдельным цветным зонам. Зоны — участки адсорбента — извлекают из колонки, отделяют подвижную фазу от неподвижной и анализируют вещество.

Связавшиеся с адсорбентом вещества можно отделить от него, пропуская через колонку растворители разной полярности: гексан, бензол, эфир, хлороформ, бутанол, ацетон или их определенную смесь.

Очень интересная и важная разновидность распределительной хроматографии — хроматография на бумаге

¹ 1 пг (пикограмм) = 10^{-12} г.

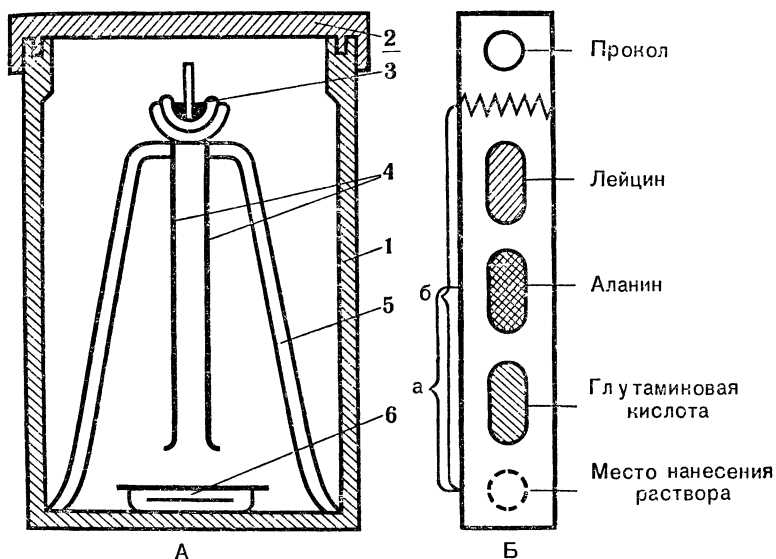


Рис. 26. Распределительная хроматография: А — прибор для хроматографии: 1 — камера; 2 — крышка; 3 — лодочка с растворителями; 4 — полоски хроматограммы; 5 — подставка для лодочки; 6 — кювета с растворителями для насыщения камеры; Б — бумажная полоска-хроматограмма с окрашенными веществами: а — путь, пройденный веществом, б — путь, пройденный растворителем.

(рис. 26). Пористая бумага способна поглощать воду и удерживать ее между волокнами целлюлозы. Это неподвижная фаза. Если по такой бумаге движется неводный растворитель, он увлекает за собой молекулы вещества, нанесенные на бумагу. Разделение зависит от сродства компонентов нанесенной смеси к тому или иному растворителю: чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем быстрее и дальше оно продвинется от места нанесения образца вместе с растворителем. Таким образом разделяют, например, смесь аминокислот и определяют, какие из них и в каком количестве входят в образец.

В зависимости от строения отдельных аминокислот, от их способности лучше растворяться в подвижной или

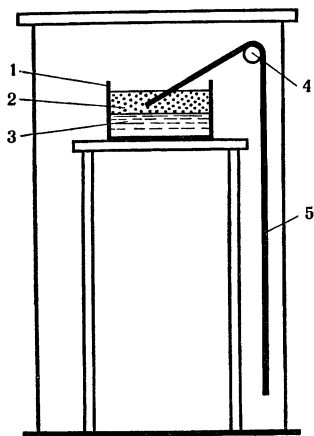


Рис. 27 Прибор для хроматографии на бумаге: 1 — лодочка с растворителями; 2 — органический растворитель; 3 — вода; 4 — стеклянный кронштейн; 5 — хроматографическая бумага.

неподвижной фазе можно вычислить отношение для каждой аминокислоты — R_f :

$$R_f = \frac{a}{b},$$

где a — расстояние, пройденное аминокислотой; b — расстояние, пройденное растворителем от точки нанесения образца.

R_f — постоянен для каждой аминокислоты и является характерным показателем при стандартных условиях опыта. Чтобы растворитель не испарялся, хроматографию проводят в закрытых камерах специального назначения. На рисунке 27 показан прибор для получения нисходящей хроматограммы. Несколько более усложненным вариантом хроматографического метода является проведение двумерной

хроматографии. После разделения смеси на хроматографической бумаге в паре растворителей, например фенол — аммиак (рис. 28), хроматограмму поворачивают на 90° и продолжают разделение смеси уже в другом направлении и в других растворителях, например в бутанол-муравьиной кислоте. Такая модификация метода позволяет разделить даже те вещества, которые обладают сходными хроматографическими характеристиками и потому движутся на хроматограмме совсем рядом.

На рисунке 29 представлена радиальная хроматограмма на бумаге, где в смеси были только три аминокислоты. Чтобы разделить смесь на отдельные аминокислоты, определить, выделить в чистом виде и выявить их количество, поступают следующим образом. Из хроматографической бумаги вырезают круг, делят его на четыре сектора, на один из которых близко к центру наносят смесь, подлежащую разделению, на остальные три сектора наносят в таких же местах у центра эталонные растворы чистых индивидуальных аминокислот. В центре круга вырезают отверстие. В него вставляют небольшую бумажную ножку и опускают ее нижний конец

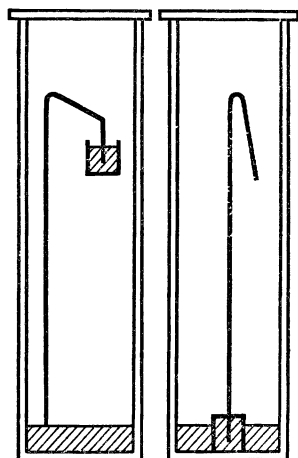
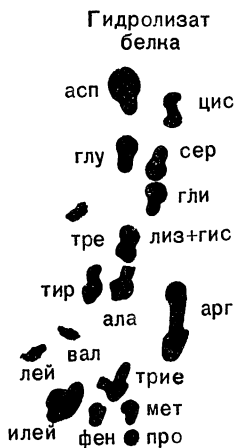


Рис. 28. Двумерная хроматография аминокислот.

Нисходящая хроматография
Восходящая хроматография

в растворитель. Растворитель поднимается по ножке, достигает центра круга и по радиусам распространяется к периферии круга, увлекая аминокислоты. Через определенное время хроматограмму снимают и помещают в шкаф при температуре около 100°C для фиксации аминокислот и испарения растворителя. После этого хроматограмму проявляют специальным раствором, окрашивающим и выявляющим аминокислоты, и пятна аминокислот вырезают. Чтобы снять аминокислоту, бумагу опускают в стаканчик с растворителем. Чем выше будет интенсивность окраски раствора, тем больше в нем аминокислоты. На специальных приборах можно точно устано-

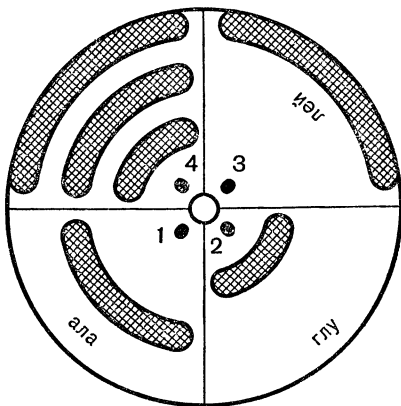


Рис. 29. Радиальная хроматограмма. Цифрами обозначены точки нанесения эталонных аминокислот (1, 2, 3) и определяемой смеси (4).

вить количество аминокислот по оптической плотности их растворов. Аминокислоты затем выделяют из растворов и используют в дальнейшей работе.

О том, какое пятно из сектора, где наносилась смесь, соответствует той или иной аминокислоте, судят по величине R_f , которую сравнивают с эталонными образцами, расположенными в соседних секторах. Таким простым методом или незначительно отличающимся по технике исполнения легко разделить аминокислоты, полученные при гидролизе белка, содержащиеся в сыворотке крови или моче больных.

Определение количества свободных аминокислот в крови очень важно для суждения об обмене белков. Например, в норме в сутки выделяется около 0,5 г аминокислот. При усиленном распаде белков, а также при некоторых заболеваниях печени, почек, при нарушении процессов дезаминирования или переаминирования в сыворотке крови и моче отмечаются изменения в количестве и составе аминокислот. Эти знания помогают своевременно и правильно назначить необходимое лечение.

Важнейшим и широко применяемым видом хроматографического метода является проникающая хроматография. Она отличается принципиально от других видов хроматографического анализа. Метод основан на свойствах многих пористых материалов пропускать небольшие молекулы и не пропускать крупные, т. е. действует принцип молекулярного сита. Такими пористыми материалами являются полисахаридные гели (декстраны), полистиролы, пористые стеклянные шарики со строго определенным размером пор.

Рассмотрим конкретный пример с применением проникающей хроматографии, которую еще называют гель-фильтрацией. Представим, что необходимо отделить белковые молекулы от аминокислот, солей и других низкомолекулярных соединений, находящихся в общей смеси. Для этого стеклянную хроматографическую колонку наполняют пористым гелем — сефадексом, закрепляют ее вертикально в штативе и наносят сверху смесь, подлежащую разделению. Опускаясь вниз, частички этой смеси проникают в пористые гранулы, которыми наполнена колонка, задерживаются там или переходят в следующие нижние слои. Так происходит с мелкими частицами смеси, размеры которых позволяют им проникать через поры внутрь гранул. Поэтому путь мелких частиц к выходу

из колонки довольно длинный.

Крупные же частицы вместе с током растворителя быстро продвигаются к выходу из колонки между гранул.

Таким образом гель-фильтрацию можно называть фильтрованием наоборот; крупные частицы проскакивают через молекулярное сито, а мелкие задерживаются, их путь длиннее (рис. 30).

При обычном фильтровании, как известно, через фильтр проходят мелкие частицы, а более крупные задерживаются. Такая разновидность хроматографии, как гель-фильтрация, позволяет очистить белки от низкомолекулярных соединений, дает возможность разделить и очистить вирусы, ферменты, гормоны, антитела, нуклеиновые кислоты.

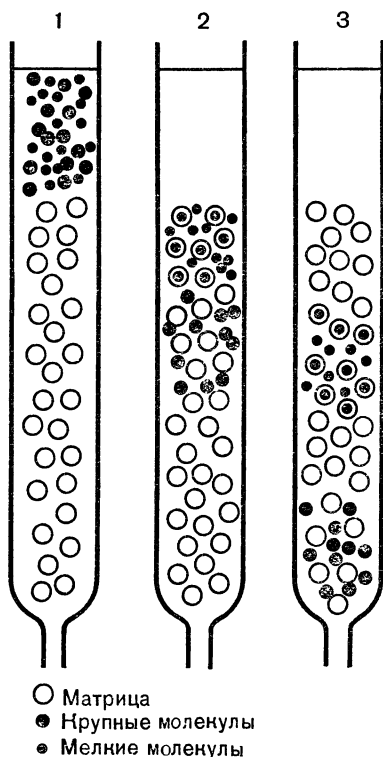


Рис. 30. Разделение веществ методом гель-фильтрации: 1, 2, 3 — последовательные стадии разделения. Крупные частицы не проникают в поры гранул матрицы и выходят раньше мелких из колонки.

Электрофорез

Как уже рассматривалось (с. 44), аминокислоты, пептиды, белки и другие молекулы, выделенные из живых организмов, содержат заряженные группы, поэтому в растворе они могут быть катионами или анионами. Частицы в зависимости от своего заряда перемещаются в электрическом поле. На этом основан принцип широко применяемого в белковой химии метода — *электрофореза*. Скорость движения заряженных молекул зависит от мно-

гих причин: а) движущей силы электрического поля; б) значения заряда частиц; в) размеров заряженных молекул; г) формы перемещающихся в электрическом поле частиц и некоторых других факторов. Так как у различных молекул эти параметры отличаются, можно разделить их смесь на фракции путем электрофореза.

Разделение заряженных частиц проводят в каком-нибудь однородном носителе. Это хроматографическая бумага, тонкие слои оксидов кремния (IV) или алюминия, крахмальные или другие гели. На всех носителях вещества распределяются в электрическом поле в виде зон, которые можно обнаружить и выделить, поэтому метод получил название зонального электрофореза. Общие закономерности электрофореза следующие:

1) подвижность частиц возрастает с увеличением суммарного заряда;

2) чем больше размеры молекул, тем меньше их подвижность;

3) глобулярные и фибриллярные белки обладают разной подвижностью, обусловленной силой трения при перемещении;

4) скорость перемещения веществ прямо пропорциональна силе тока, а длина пройденного частицами пути прямо пропорциональна времени пропускания тока;

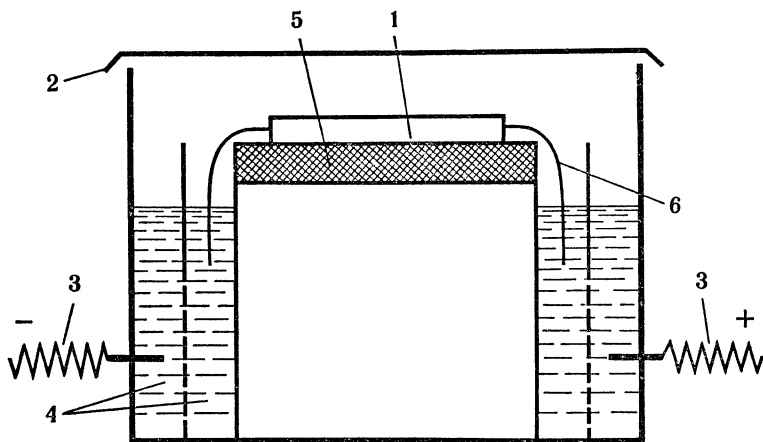


Рис. 31. Прибор для электрофореза: 1 — носитель; 2 — крышка; 3 — электроды; 4 — буферный раствор; 5 — изолятор; 6 — фитиль.

Рис. 32. Электрофорез на бумаге: 1 — полоска бумаги для электрофореза с нанесенным образцом для разделения; 2 — та же полоска бумаги, окрашенная после электрофореза.

5) чем больше сопротивление, тем меньше скорость продвижения частиц в электрическом поле;

6) на подвижность частиц влияет состав растворителя, его концентрация и pH;

7) скорость перемещения зависит от химического состава носителя и его отношения к разделяемым частицам.

Для проведения электрофореза применяется несложное оборудование, состоящее из источника питания и электрофоретической камеры, в которой смонтированы электроды, опоры для носителя и камеры для раствора (рис. 31). Смесь, подлежащую разделению, наносят примерно посередине или ближе к одному из электродов в зависимости от предполагаемого направления движения. Часто в состав разделяемой смеси включают какой-нибудь инертный краситель, чтобы можно было следить за ходом электрофореза (движением полос).

Так как большинство биологических соединений не окрашено, после окончания электро-

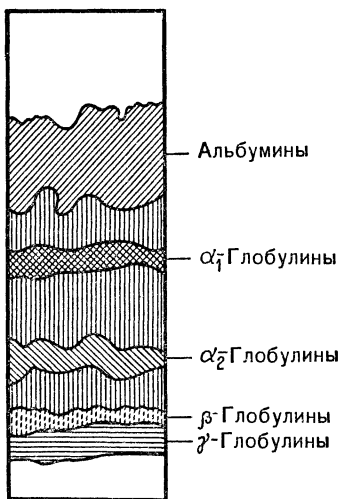
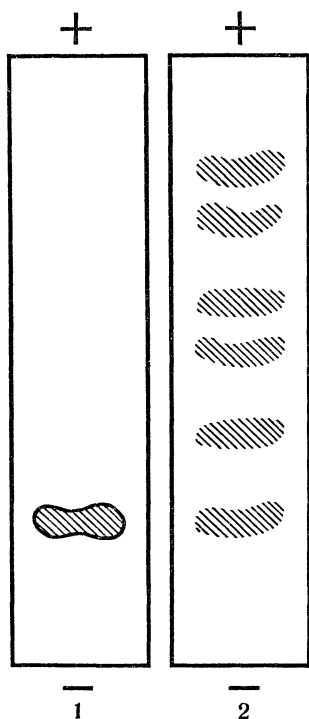


Рис. 33. Электрофореграмма сыворотки крови.

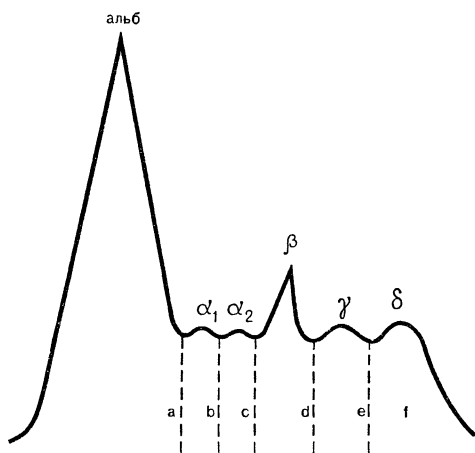


Рис. 34. Денситограмма плазмы крови человека: альб — альбумины; α_1 , α_2 — глобулины; β — глобулины; γ — глобулины; δ — солевой рубец. Общая концентрация белка соответствует площади:

$$S = a + b + c + d + e + f$$

Рисунок получен на денситометре — приборе, определяющем оптическую плотность полученных после электрофореза фракций.

форе́за электрофореграмму окрашивают так же, как и хроматограмму. Это делает видимыми различные компоненты разделяемого образца (рис. 32, 33). Окрашенные полосы можно или вырезать и исследовать, или поместить в специальный прибор — денситометр и по интенсивности окраски определить количество того или иного белка, пептида или другого компонента смеси (рис. 34)

Метод электрофореза применяется очень широко. Электрофорез на бумаге используется для разделения аминокислот, пептидов, белков, нуклеиновых кислот и заряженных производных углеводов. Низковольтный электрофорез на бумаге сопровождается значительной диффузией частиц, что приводит к нечеткому их разделению, к «размытости» границ. При высоковольтном электрофоретическом разделении время процесса сводится до минимума, и поэтому диффузия значительно уменьшается. Вместо бумаги при электрофорезе часто применяют в качестве носителя ацетат целлюлозы. Преимущество этого соединения в том, что оно имеет высокую чистоту, дает меньшую адсорбцию образца, способствует лучшему разделению

компонентов, обладает низким фоном окрашивания. Поэтому электрофорез на ацетате целлюлозы широко применяется в клинике для разделения белков сыворотки крови и гемоглобинов, а также сложных белков глико- и липопротеидов.

Концентрация аминокислот в плазме крови и моче при некоторых заболеваниях существенно отличается от нормы и может служить важным показателем при диагностике заболевания и контроле за эффективностью проводимого лечения. Приведем несколько примеров, имеющих большое клиническое значение.

При ревматизме в хронической стадии значительно увеличено количество α - и β -глобулинов в сыворотке крови. При инфекционных заболеваниях наблюдается увеличение у больных γ -глобулиновой фракции белков. При циррозе печени значительно снижено содержание в крови α - и β -глобулинов. Этот эффект становится понятным, если вспомнить, что синтез названных белков происходит именно в печени. Снижение уровня альбуминов и рост количества всех глобулиновых фракций отмечается при злокачественных опухолях. Существенно отличается от электрофореграммы здорового человека соотношение белковых фракций в крови почечного больного (рис. 35).

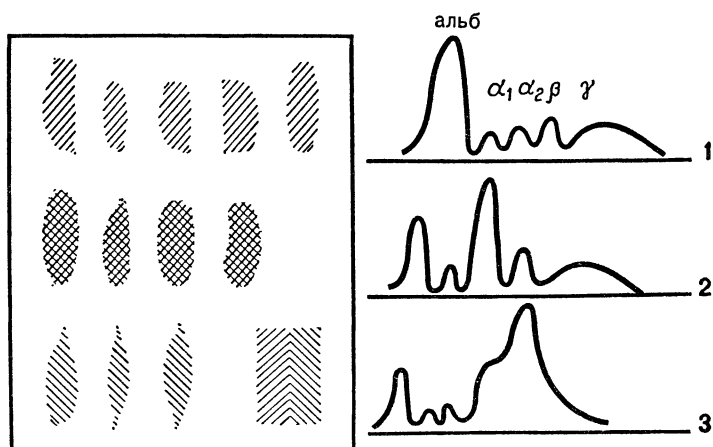


Рис. 35. Электрофореграмма сыворотки крови при патологических состояниях: 1 — нормальная сыворотка крови; 2 — нефроз — заболевание почек; 3 — цирроз печени.

Метод меченых атомов

В 30-х годах нашего столетия для исследования процессов обмена веществ предложили использовать меченые атомы. Для этого применяют радиоизотопы. При распаде они испускают частицы или излучение, которые можно зарегистрировать с помощью специальных приборов. Иногда о распределении радиоизотопов в объекте судят, используя метод радиоавтографии. Принцип его заключается в том, что при контакте фотопластинки с тканью, срезом, листом растений и т. д. в определенных местах пластинки происходит ее засвечивание, которое после проявления обнаруживается в виде затемнений. Метод позволяет следить за процессами, происходящими в исследуемом объекте.

Введение изотопных меток для исследования обмена веществ сыграло большую роль в развитии науки. Считалось, что белки и липиды клеточных мембран остаются в течение всей жизни клетки стабильными и неизменными и синтезируются только один раз. Именно метод меченых атомов помог разрушить эти представления, что привело к открытию факта постоянного и непрерывного обновления всех клеточных структур. Например, меченые аминокислоты включаются в белки печени с большой скоростью. Создается впечатление, что печень, синтезируя белок, должна расти, увеличиваться по массе, накапливать белки. Однако общее количество белка в печени не увеличивается. Это может быть только в том случае, если белки печени находятся в состоянии динамического равновесия, а высокая скорость синтеза компенсируется высокой скоростью распада белковых структур или синтезом белка «на экспорт» для других органов и тканей.

Основное преимущество применения радиоактивных меток перед другими химическими и физическими методами — высокая чувствительность. Это позволяет обнаружить в организме вещества, содержащиеся в очень малых количествах, когда другие способы оказываются неприменимыми. Другим преимуществом является то, что радиоактивную метку можно вводить в живой организм и следить за ней, не влияя на обмен веществ исследуемого объекта. Чтобы не вдаваться в детали и анализ многочисленных особенностей применения радиоактивных изотопов в медико-биологических исследованиях, и в частно-

сти в химии белка, рассмотрим упрощенную схему.

Сначала в организм, орган, ткань или модельную систему вводят меченое соединение, а затем в разные периоды времени отбирают пробы, извлекают из них продукты, которые направляют на хроматографический анализ.

После хроматографирования определяют радиоактивность каждой фракции и получают информацию о том, куда включилась радиоактивная метка.

Так можно проверить (подтвердить или опровергнуть) гипотезу о пути синтеза или распада любого соединения или о других путях превращения веществ. Например, было обнаружено, что часть атомов нуклеиновых кислот находилась раньше в составе аминокислот. Это неопровержимо свидетельствует, что при распаде белков часть аминокислот идет на синтез нуклеиновых кислот.

С помощью радиоизотопов можно определять скорости обмена соединений. Например, крысам вводили меченые аминокислоты, а затем через определенные промежутки времени определяли радиоактивность разных органов и тканей. Оказалось, что белки печени обновляются через 7—14 суток, кожи и мышц — через 8—12 недель, а коллаген за год обновляется менее чем на 10%.

Очень широко в настоящее время используются изотопы не только в научных исследованиях, но и в практической медицине.

Функцию щитовидной железы исследуют при помощи меченого йода ^{131}I . В клинике радиоизотопы используют для измерения времени жизни клеток крови, при диагностике заболеваний почек, легких, определении объема крови. Все это объясняется легкостью обнаружения радиоактивных изотопов и возможностью их количественного определения.

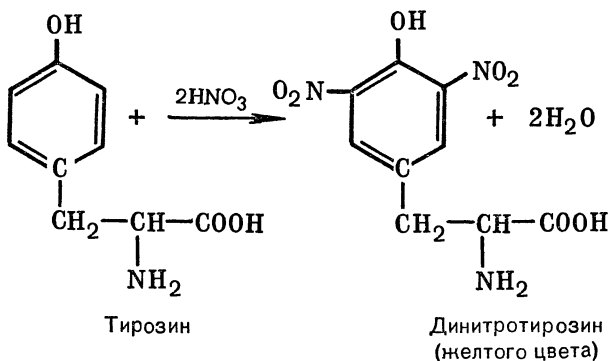
Стабильные изотопы тоже можно использовать в качестве метки или своеобразного индикатора, но обнаружить их можно только с помощью специального прибора — масс-спектрометра. Этот прибор позволяет измерять различия в массах отдельных атомов или групп атомов и «находить» таким образом отличающиеся по массе изотопы в смеси с другими атомами. Использование стабильных изотопов требует применения довольно сложного оборудования. Но так как масс-спектрометры позволяют различать отдельные химические группы, эти приборы

сыграли и играют важную роль в установлении структуры соединений, в изучении обмена аминокислот и в других исследованиях.

Цветные реакции на белки и аминокислоты

Белки можно определять по цветным реакциям, которые дают отдельные аминокислоты или белки с различными реактивами.

При взаимодействии концентрированной азотной кислоты с белками появляется желтое окрашивание. Эту реакцию называют ксантопротеиновой («ксантос» — *желтый*). Желтый цвет объясняется тем, что циклические аминокислоты, входящие в белок, образуют с азотной кислотой нитропроизводные желтого цвета. Именно поэтому при случайном попадании азотной кислоты на кожу, ногти, перья, шерсть ткани желтеют:



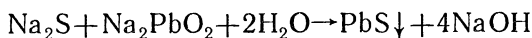
Тирозин (и только его) помогает открыть в белках также реактив Миллона, представляющий собой смесь солей ртути. В результате реакции образуется белый осадок, который при нагревании краснеет.

Биуретовая реакция выявляет не какую-то определенную аминокислоту, а пептидную связь. Это значит, что ее дают белки и пептиды, так как отдельные аминокислоты не содержат —CO—NH—группы. При добавлении сульфата меди (II) к щелочному раствору белка образуется комплексное соединение, окрашенное в сине-фиолетовый цвет. Если в растворе содержится не белок, а пептиды или

продукты гидролиза белка, то появляется розовая или красная окраска.

Химический реактив нингидрин дает синее окрашивание с аминогруппами аминокислот, находящимися в α -положении. При этом аминокислоты и пептиды окисляются нингидрином, подвергаются дезаминированию с образованием аммиака. Восстановленный нингидрин конденсируется с другой молекулой нингидрина при участии аммиака. Окисленная форма нингидрина бесцветна, продукты конденсации окрашены.

Присутствие в белках серосодержащих аминокислот цистина и цистеина можно открыть реакцией Фоля. Суть реакции состоит в том, что при кипячении белка со щелочью эти аминокислоты легко отщепляют серу. Образовавшийся сульфид натрия взаимодействует с плюмбитом натрия, и выпадает черный осадок сульфида свинца:



Метионин тоже содержит серу, но эта аминокислота не дает окрашивания с реактивом Фоля, потому что сера с ней связана довольно прочно. Степень окраски исследуемого раствора при этой реакции зависит, с одной стороны, от количества белка в пробе, с другой — от частоты встречаемости в белковой молекуле аминокислот цистина и цистеина.

Значение рассмотренных цветных реакций заключается в том, что они помогают установить, содержатся ли в исследуемых жидкостях, кусочках органа или ткани белковые вещества. На основании цветных реакций разработаны методы точного определения количества белка. Некоторые цветные реакции дают возможность выявить индивидуально ту или иную аминокислоту в пробах.

Другие методы исследования

Для количественных и качественных исследований широко применяются спектральные методы. Главное их преимущество заключается в том, что вещество в процессе изучения не разрушается и его необходимо ничтожно малое количество. Спектр характеризует зависимость количества поглощенной или излученной веществом энер-

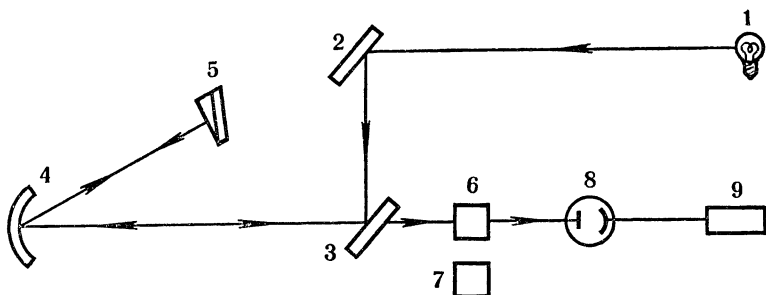


Рис. 36. Схема устройства спектрофотометра: 1 — лампа; 2, 3 — плоские зеркала; 4 — фокусирующее зеркало; 5 — отражающая призма; 6 — кювета с образцом; 7 — кювета сравнения (контрольная, без образца); 8 — фотоэлемент; 9 — устройство, записывающее результат.

гии от длины волны. Используется инфракрасный, видимый и ультрафиолетовый свет с длинами волн от 10^{-10} до 10^{-6} см.

При пропускании света через раствор вещества на некоторых длинах волн поглощается или ослабляется его интенсивность. В результате этого процесса получается спектр поглощения с одной или несколькими темными полосами, которые индивидуальны для каждого вещества.

Зная характерные зоны поглощения, можно определить вещество, а интенсивность поглощения свидетельствует о количестве его в растворе. Например, пероксид водорода H_2O_2 поглощает ультрафиолетовый свет определенной длины волны. Если к раствору пероксида водорода добавить фермент каталазу, то поглощение ультрафиолетовых лучей будет быстро уменьшаться. Это значит, что каталаза разрушает пероксид водорода. По изменению поглощения (разрушению H_2O_2) можно судить об активности каталазы: чем быстрее распался пероксид водорода, тем выше была активность фермента. Такие исследования проводят в специальных приборах — спектрофотометрах (рис. 36).

В биологических жидкостях, например в сыворотке крови, количество белков можно быстро и достаточно точно определить рефрактометрически по преломлению луча света при прохождении его через раствор белка.

Коэффициент преломления — это отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Степень рефракции находят с помощью специальных приборов — рефрактометров, в которых исследуемые растворы белка помещают между двумя призмами. Определив показатель преломления, вычисляют процент содержания белка в испытуемой пробе по таблицам или графикам.

Снижение концентрации белка сыворотки крови — важный показатель при ряде заболеваний желудочно-кишечного тракта, циррозе печени, при хронической недостаточности белка в питании. Значительные количества белка синтезируются в печени, поэтому при хронических заболеваниях печени синтез белка снижен и его концентрация в сыворотке крови тоже ниже нормы.

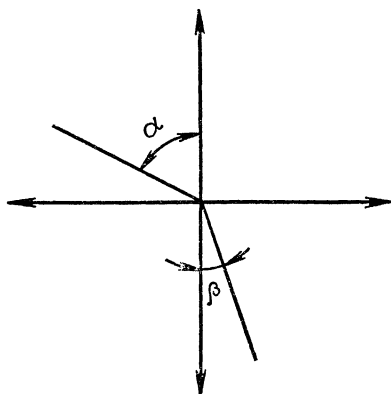


Рис. 37. Преломление луча света: α — угол падения; β — угол преломления.

Заключение

Оценивая перспективы использования наших знаний о белках в ближайшем будущем, можно с уверенностью сказать, что основными областями применения этих знаний по-прежнему будет сельское хозяйство и медицина.

Несмотря на значительное увеличение производительности труда в сельском хозяйстве и применение химических удобрений, этого недостаточно для решения проблем производства продовольствия в мировых масштабах. Ученые должны обратиться к разработке новых видов продуктов.

Это могут быть, например, одноклеточные водоросли с большим содержанием белка. Известно, что одноклеточная водоросль спирулина дает в год около 50 т белка с одного гектара. Это огромное количество.

В то же время начата разработка специальных оптимальных диет, особенно для жителей экономически развитых стран, где основными компонентами будут овощи и фрукты. Это объясняется тем, что большое количество животных белков и жиров в пище вредно для здоровья.

Исследуются возможности использования дрожжевых грибов в качестве источников пищевого белка. Белок научились получать из соевой и хлопковой муки.

Еще совсем недавно перспективным считался способ увеличения белковой массы сельскохозяйственных животных за счет добавления им в корм микроорганизмов, выросших на продуктах переработки нефти. Сейчас считается, что более перспективным будет путь создания сублимированных продуктов для человека в виде белковых масс, порошков, таблеток, содержащих необходимые компоненты в концентрированных формах. Такие

концентраты уже употребляются в технологии производства консервов, сухих супов и т. д.

Медицинские аспекты белковой химии разбирались нами во многих разделах. Перспективы развития этой области связаны с искусственным целенаправленным синтезом белков-ферментов, с разработкой и производством новых белковых препаратов и гормонов, с микробиологическим синтезом.

Достижения генной инженерии позволяет получать макромолекулы с заданными свойствами в необходимых количествах.

Все это углубит наши знания о белках и расширит области их применения.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Глава 1.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ (7)

Глава 2

АМИНОКИСЛОТЫ — СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ БЕЛКОВ (13)

Способы выделения аминокислот из белков (13) Свойства аминокислот (14) Состав аминокислот (16)

Глава 3.

КАК ПОСТРОЕН БЕЛОК(22)

Как связаны аминокислоты в молекуле белка (22) Первичная структура белка (24) Вторичная структура белка (27) Упаковка полипептидной цепи (30) Как влияет состав белка на его структуру (31) Высшая организация белковых молекул (34)

Глава 4.

СВОЙСТВА БЕЛКОВ (38)

Молекулярная масса белков (38) Растворимость белков (39) Денатурация (41) Белки-электролиты. Изoeлектрическая точка (43)

Глава 5.

КАКИЕ БЫВАЮТ БЕЛКИ (46)

Принципы классификации белков (46) Простые белки (47) Сложные белки (52)

Глава 6.

РОЛЬ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ (60)

Глава 7.

ФЕРМЕНТЫ (74)

История развития науки о ферментах (74) Химическая природа ферментов (76) Отличие ферментов от небиологических катализаторов (77) Активный центр фермента (80) Свойства ферментов (81) Классификация ферментов (86) Действие ферментов (89) Получение и применение ферментов (91)

Глава 8.

ПРЕВРАЩЕНИЕ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ (97)

Биологическое значение белков (97) Распад белков в организме до аминокислот (101) Пути превращения аминокислот (103) Биосинтез белка в клетке (108) Проблема получения пищевого белка (116)

Глава 9.

КАК ИЗУЧАЮТ БЕЛКИ (119)

**Разрушение клеток (119) Разделение частиц путем центрифугирования (121) Хроматографические методы (124) Электрофорез (129) Метод меченых атомов (134) Цветные реакции на белки и аминокислоты (136) Другие методы исследования (137)
Заключение (140)**

**Олег Самуилович Комаров
Александр Александрович Терентьев**

ХИМИЯ БЕЛКА

Зав. редакцией *Т. П. Крюкова*
Редактор *Л. И. Соколова*
Младший редактор *Е. Н. Хорошева*
Художник *Г. А. Шипов*
Художественный редактор *М. Я. Турбовской*
Технический редактор *Л. Б. Володина*
Корректоры *Е. Е. Абашкина, С. Ю. Фокина*
ИБ № 8067



Сдано в набор 27.10 83. Подписано к печати 24.08.84.
Формат 84×108¹/₃₂. Бумага книжно-журнальная Гарни-
тура литературная. Печать высокая с ФПФ. Усл. печ.
л. 7,56. Усл. кр.-отт 7,98 Уч.-изд л 6,94. Тираж 97 000 экз.
Заказ № 4135. Цена 20 коп.



Ордена Трудового Красного Знамени издательство
«Просвещение» Государственного комитета РСФСР по
делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
129846, Москва, 3-й проезд Марьиной рощи, 41.
Минский ордена Трудового Красного Знамени полиграф-
комбинат МППО им Я. Коласа. 220005, Минск,
Красная, 23.