

## **БІОХІМІЯ** **З ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ**

### **ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС РОБОТИ У ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ**

Студенти допускаються до роботи в хімічній лабораторії **тільки в захисному одязі - халаті**.

Сумки та особисті речі потрібно залишити у відведеному для цього місці.

Під час виконання лабораторних робіт студентам необхідно бути максимально уважними і чітко дотримуватися методики виконання дослідів.

З реактивами слід працювати тільки на робочих столах, з концентрованими кислотами, лугами й леткими речовинами – у витяжній шафі, звідки їх категорично забороняється переносити.

Перш ніж використовувати реактиви, необхідно уважно ознайомитися з інформацією на етикетці.

Для досліду слід брати речовини в кількостях, вказаних в інструкціях до лабораторної роботи.

Сухі реактиви потрібно брати чистим шпателем або спеціальною ложечкою; розчини наливати в пробірки в невеликих кількостях (по краплях).

При нагріванні колби чи хімічного посуду на електричній плитці необхідно покласти товстий шар азбестової сітки.

Досліди з легкозаймистими речовинами слід проводити дуже обережно й подалі від вогню.

Під час нагрівання розчинів у пробірках слід використовувати тримачі із зажимами. Пробірку з рідиною при нагріванні необхідно тримати в нахиленому положенні так, щоб її отвір був спрямований в протилежний бік від себе та своїх сусідів.

Завжди потрібно наливати кислоту у воду, а не навпаки.

Працювати з їдкими лугами й концентрованими кислотами слід дуже обережно, уникаючи хімічних опіків і псування одягу.

Залишки концентрованих кислот, основ, солей важких металів, цінних реактивів (наприклад, аргентум нітрат) необхідно зливати тільки в спеціально відведені для цього склянки.

Під час роботи забороняється відволікати увагу тих, хто працює.

Після закінчення роботи всі електронагрівальні прилади слід вимкнути та прибрати своє робоче місце.

У разі виникнення пожежі потрібно використовувати для її гасіння вогнегасники, щільну ковдру, пісок.

З метою уникнення травм, опіків, нещасних випадків **суворо забороняється:**

1) пити воду з хімічного посуду; пробувати хімічні речовини на смак; проливати й розсипати реактиви;

2) користуватися приладами та обладнанням без їх попередньої перевірки на справність та ознайомлення з інструкцією з експлуатації;

3) залишати без нагляду ввімкнені електронагрівальні прилади, палаючі спиртівки;

4) відміряти концентровані кислоти й луги, втягуючи їх ротом у піпетку;

5) зберігати леткі й легкозаймісті речовини поблизу джерел тепла, відкритого вогню, ввімкнених приладів;

6) торкатися руками неізольованих проводів;

7) вдихати пари отруйних речовин;

8) допускати потрапляння отруйних речовин на шкіру та одяг.

Під час роботи в лабораторії **студенти зобов'язані:**

- дотримуватися правил техніки безпеки та пожежної безпеки;

- чітко виконувати інструкції викладача (лаборанта).

- підтримувати в чистоті та порядку свої робочі місця.

### **Перша допомога**

Перев'язувальні матеріали (вата, бинти, серветки), необхідні розчини та медикаменти знаходяться в аптечці першої медичної допомоги, якою забезпечена кожна лабораторія.

У разі поранень, отруєнь, опіків та інших нещасних випадків потерпілому на місці слід надати першу долікарську допомогу і за необхідності направити його до медичної установи. У разі потреби викликати лікаря на місце пригоди.

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути всі газові та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймісті рідини. Якщо осередок пожежі невеликий, загоряння можна спробувати ліквідувати первинними засобами пожежогасіння: засипати піском або накрити щільною тканиною чи ковдрою, шматком азбесту або ж залити тетрахлорметаном. Для припинення інтенсивного горіння слід скористатися вогнегасником. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою.

Якщо загорівся одяг, потерпілого необхідно негайно повалити на підлогу та намагатися збити полум'я, накинувши на нього мокру тканину.

Дерев'яні предмети, охоплені полум'ям, потрібно гасити водою або вогнегасником.

Під час роботи в хімічній лабораторії найбільш можливими є порізи склом, термічні та хімічні опіки, а також інгаляційне ураження парами токсичних речовин.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2%-го калій манганату або етанолу, а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити відповідним розчинником речовину, яка стала їх причиною, а потім обробити уражену ділянку етанолом і змазати маззю від опіків.

При опіках кислотами уражену ділянку насамперед треба промити сильним струменем проточної води, а потім обробити 3%-им розчином натрій гідрогенкарбонату; при опіках їдкими лугами – промити водою, обробити 3%-им розчином оцтової або борної кислоти, а потім знову обполоснути водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 3%-му розчині натрій гідрогенкарбонату, і знову промити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 3%-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього потрібно негайно звернутися до лікаря.

При порізах насамперед необхідно пінцетом, попередньо обробленим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, промити рану дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етанолі, після чого змастити 5%-им спиртовим розчином йоду й забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

## ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ З АВТОМАТИЧНИМИ ПІПЕТКАМИ

На сьогодні в усіх лабораторіях для відмірювання відомої кількості речовини використовують механічні, електронні автоматичні піпетки (рис. 1, 2) – пристрої з пневматичним механізмом, дія яких ґрунтується на витісненні рідини повітрям.

Автоматичні піпетки бувають різних видів: починаючи з піпеток із фіксованим об'ємом (самплери) і закінчуючи піпетками з електронним контролем дозування. Ці піпетки мають різні межі дозування – від 1 мкл (0,001 мл) до 50 мл.

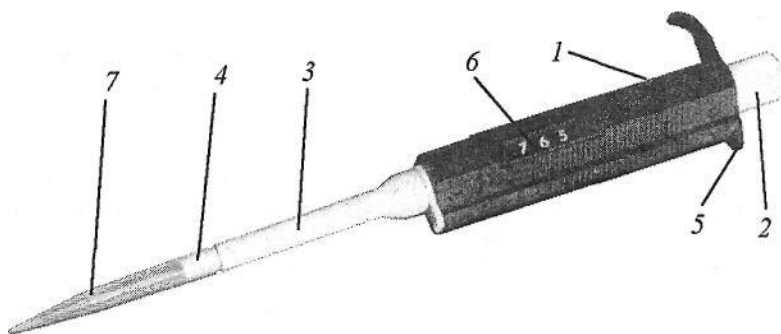


Рисунок 1 – Механічна одноканальна піпетка зі змінним об'ємом (фірма «Лабсистемс», Фінляндія): 1 – рукоятка з гачком, 2 – головка плунжера, 3 – стволова частина; 4 – нижня частина стволової частини, 5 – видаляч наконечника; 6 – віконце цифрового індикатора, 7 – змінний наконечник

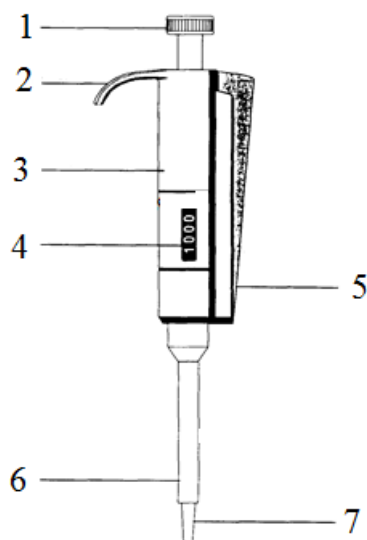


Рисунок 2 – Електронна одноканальна піпетка зі змінним об'ємом (фірма «Лабсистемс», Фінляндія): 1 – операційна кнопка; 2 – упор; 3 – рукоятка; 4 – цифровий дисплей; 5 – штовхач видаляча наконечника; 6 – видаляч наконечників; 7 – конус наконечника

На кінчик кожної піпетки вдягається одноразовий наконечник, через який набирається відповідна речовина (за винятком концентрованих кислот).

Автоматичні піпетки мають суттєві переваги, порівняно зі скляними, завдяки вищій швидкості відбору, удосконаленому механізму регулювання об'єму рідини, точності та відтворюваності, зручності у використанні.

Однак автоматичні піпетки не позбавлені недоліків. Наприклад, більшість цих пристроїв не призначені для відбирання агресивних речовин (концентрованих кислот, лугів, розчинників тощо). Під час роботи з такими речовинами відбувається псування механізму для дозування, що робить піпетку непридатною для подальшого використання

Розрізняють такі автоматичні піпетки:

- 1) механічні та електронні;
- 2) одноканальні та багатоканальні;
- 3) фіксованого та змінного об'єму.

Механічні та електронні піпетки можуть бути одноканальними, багатоканальними, фіксованого та змінного об'єму.

Механічні автопіпетки мають пружинний механізм та пристрій, який дозує об'єм рідини – мікрометричний гвинт (налагоджують вручну). В електронних – пневматичний механізм приводиться в дію електромотором, який управляється мікрокомп'ютером з електроживленням від акумуляторів. Якщо автопіпеткою не користуються, її встановлюють у тримач, який одночасно є живильним пристроєм для її акумуляторів. Тримач підключають до електромережі.

Одноканальні автопіпетки – це універсальні прилади, які використовуються в біохімічних лабораторіях.

Обсяги виробництва багатоканальних автопіпеток значно перевищують одноканальні, але сфера їх використання обмежується вузькоспеціалізованою апаратурою. Наприклад, дев'ятиканальна піпетка для автоаналізаторів «Фінпіпет» фірми «Лабсистемс» (Фінляндія); багатоканальні автопіпетки для імунологічних досліджень, які розраховані на роботу з планшетами визначених параметрів.

Автопіпетки фіксованого об'єму використовуються для вимірювання тільки одного суворо визначеного об'єму рідини.

Автопіпетки змінного об'єму використовуються для вимірювання об'ємів рідини в більшому діапазоні. Наприклад, піпетки фірми «Лабсистемс» (Фінляндія) розраховані на вимірювання об'ємів рідини від 5 до 5000 мкл (0,005 до 5 мл відповідно). Комплект містить автопіпетки для вимірювання об'ємів рідини від 5 до 40 мкл, від 40 до 200 мкл, від 200 до 1000 мкл, від 1000 до 5000 мкл. Такі автопіпетки є найбільш практичними.

Автоматична піпетка: механічна одноканальна автопіпетка зі змінним об'ємом (фірма «Лабсистемс», Фінляндія) виготовляється з механічно пружних і хімічно інертних пластмас. Складається вона з корпусу та пневматичного механізму, який міститься всередині нього (рис. 1). Будова корпусу: рукоятка з гачком у верхній частині 1, головка плунжера 2, стволова частина 3, нижня частина стволової частини 4, видаляч наконечника 5, на рукоятці піпетки є віконце цифрового індикатора об'єму рідини 6. Пневматичний механізм складається з пружини та мікрометричного гвинта, крок якого відповідає суворо визначеному об'єму рідини. Мікрометричний гвинт приводиться в рух обертанням головки плунжера. При цьому у віконці цифрового індикатора позначається об'єм рідини. Кожна автопіпетка має набір змінюваних

наконечників. Вони виготовлені з прозорого поліпропілену. Використовуються 3 типи наконечників залежно від об'єму, який вимірюють піпеткою.

### **Правила роботи з автопіпеткою.**

1. На піпетці встановлюють необхідний об'єм рідини для вимірювання. Це досягається обертанням головки плунжера за годинниковою стрілкою (зменшення об'єму) або проти годинникової стрілки (збільшення об'єму). Кожний крок обертання головки плунжера супроводжується клацанням. Обраний об'єм фіксується у віконці цифрового індикатора. Цифри мають бути на індикаторі автопіпетки.

2. Рукоятку піпетки вкладають в долоню («рукоятка кинджала»), вушко рукоятки навішують на вказівний палець. Цим забезпечується мінімальне напруження кисті руки при роботі з піпеткою. На нижню частину ствольової частини піпетки щільно насаджують відповідний наконечник. Під час роботи автопіпетка повинна знаходитися у **вертикальному положенні**. Відбір і дозування рідини проводять, використовуючи плунжер. За ходом руху плунжера є два натискання.

3. Піпетування можна проводити двома способами – прямим і зворотним. При прямому способі пікетування надавлюють на головку плунжера великим пальцем до першого натискання. Опускають наконечник піпетки в розчин, повільно вивільняючи плунжер. У наконечник набирається необхідний об'єм рідини. Для того щоб злити рідину, повторно надавлюють на головку плунжера, але тепер уже до другого натискання, тобто до упору. При цьому із наконечника видаляють усі залишки рідини. Потім палець піднімають, і плунжер повертається у вихідне положення.

При зворотному способі пікетування натискають на головку плунжера великим пальцем до упору. Опускають наконечник піпетки в розчин а повільно вивільнюють плунжер. Набирається об'єм рідини, але дещо більший від необхідного. Для дозування визначеного об'єму надавлюють на головку плунжера тільки до першого натискання. Частина рідини, яка залишилася в наконечнику, не входить у вимірюваний об'єм. Її необхідно видалити. Для цього повторно натискають на плунжер до упору. Потім піднімають палець, і плунжер повертається у вихідне положення. Зворотний спосіб зручний при дозуванні в'язких рідин і рідин, які легко утворюють піну.

Для того щоб зняти наконечник, натискають на видаляч до упору, після чого він самостійно від'єднується від кінця піпетки. Використаний наконечник потрібно опустити в 6%-й розчин гідроген пероксиду для кращого очищення та знезараження. Після миття та просушування наконечник можна використовувати повторно.

Порядок роботи з механічними багатоканальними автопіпетками аналогічний описаному вище для одноканальних. Багатоканальні піпетки комплектуються відповідними для їх конфігурації змінними блоками наконечників. Точність відтворювання вимірювань, які проводять за допомогою автопіпеток, коливається в межах від  $\pm 0,5\%$  до  $\pm 3\%$  залежно від їх типу.

## ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ З ФОТОЕЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРОМ (КФК-2)

Колориметр фотоелектричний концентраційний (КФК-3) (рис. 3) призначений для вимірювання в окремих діапазонах довжин хвиль (315-980 нм), які виділяються світлофільтрами, визначення коефіцієнта пропускання та оптичної щільності рідких розчинів, твердих тіл, а також концентрації речовин у розчинах методом побудови градуювальних графіків.

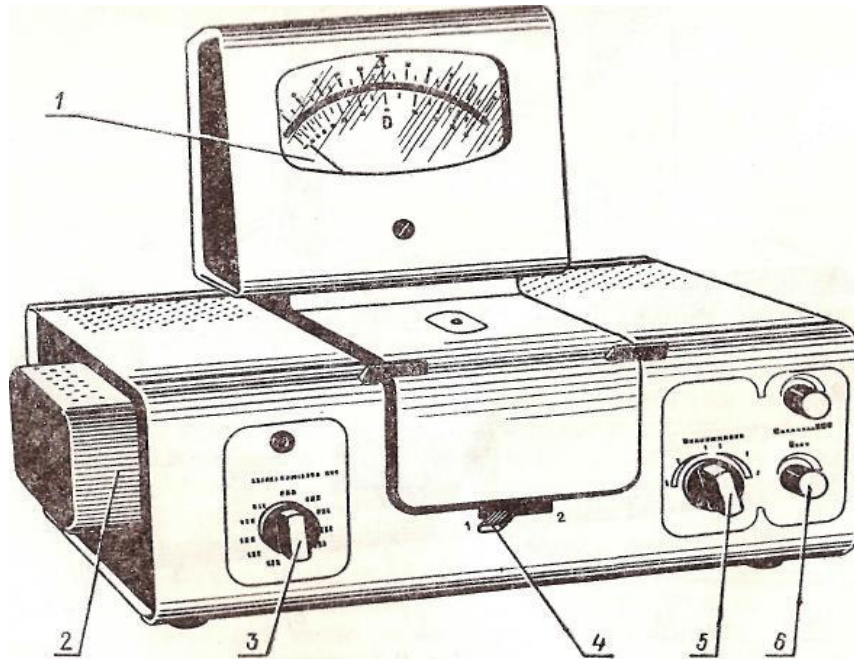


Рисунок 3 – Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2:  
1 – мікроамперметр, 2 – джерело світла, 3 – ручка для введення світлофільтра у світловий пучок, 4 – ручка для переведення кювет у світловому пучку, 5 – включення фотоприймача, 6 – чутливість

### Правила експлуатації

1. Якщо колориметр було внесено до приміщення з морозу, тоді його розпакування та розконсервація повинні проводитися не раніше ніж через 12 год..

Після довгого зберігання колориметр необхідно включити та провести тренування протягом 2-5 год.

2. Вимірювання на колориметрі слід проводити при температурі повітря від 10 до 35 °С.

3. При вимірюванні зі світлофільтрами 315, 364, 400, 440, 490, 540 нм, які відмічені на передній панелі колориметра чорним кольором, ручку ЧУТЛИВІСТЬ встановлюють в одне із трьох положень («1», «2», «3»), так само позначених чорним кольором.

При вимірюванні зі світлофільтрами 590, 670, 750, 870, 980 нм, які відмічені на передній панелі колориметра червоним кольором, ручку

ЧУТЛИВІСТЬ встановлюють в одне із трьох положень («1», «2», «3»), так само позначених червоним кольором.

4. Робочі поверхні кювет (рис. 4) перед кожним вимірюванням необхідно протирати спиртово-ефірною сумішшю. При установці кювет у кюветотримач торкатися пальцями робочих установок поверхонь (нижче від рівня рідини в кюветі) забороняється.



Рисунок 4 – Різновиди кювет

Наявність забруднень або крапель розчину на робочих поверхнях кювети призводить до отримання недостовірних результатів вимірювань.

Рідину в кювету необхідно наливати по бічній стінці. Рідина в обмеженому об'ємі кювети в деяких випадках утворює меніск. За капілярами, особливо по кутах кювети, рідина піднімається на значну висоту (на 4-6 мм).

Не треба нахилити кювету з рідиною при установці в кюветотримач.

5. Після зміни світлофільтра вимірювання починають проводити після 5-хвилинного засвічення фотоприймача.

6. При переключенні світлофільтрів ЧУТЛИВІСТЬ повинна знаходитися в положенні «1», а ручка 6 – УСТАНОВКА 100 ГРУБО – у крайньому лівому положенні (мінімальна чутливість). Це дозволяє запобігти перевантаженню приладу, який реєструє дані, та його псуванню.

#### **Вказівки щодо заходів безпеки**

1. Робота на колориметрі повинна проводитися в чистому приміщенні, в якому немає пилу, парів кислот і лугів.

2. Поблизу колориметра не повинні знаходитися громіздкі вироби, що перешкоджають роботі оператора.

3. Роботи, пов'язанні з проникненням усередину колориметра (заміна ламп, несправних деталей тощо), повинні проводитися після від'єднання колориметра від електромережі.

4. При експлуатації колориметр має бути надійно заземлений.

#### **Визначення концентрації речовини в розчині**

При визначенні концентрації речовини в розчині необхідно дотримуватися такої послідовності: вибір світлофільтра; вибір кювети;



побудова градувальної кривої для речовини; вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину та визначення концентрації речовини в розчині.

### 1. Вибір світлофільтра.

Наявність у колориметрі наборів світлофільтрів і кювет дозволяє підібрати оптимальне їх поєднання, при якому похибка у визначенні концентрації буде мінімальною.

Вибір світлофільтра проводять таким чином: наливають розчин у кювету і визначають оптичну густину для всіх світлофільтрів.

За отриманими даними будують криву, відкладаючи по осі абсцис (x) довжини хвиль, які відповідають максимуму коефіцієнта пропускання світлофільтрів, а по осі ординат (y) відповідні значення оптичної густини розчину. Відмічають ту ділянку кривої, де:

- оптична густина має максимальну величину;
- хід кривої приблизно паралельний осі абсцис, тобто оптична густина мало залежить від довжини хвиль.

Світлофільтр для роботи обирають так, щоб довжина хвилі відповідала максимуму коефіцієнта пропускання і знаходилася на відміченій вище ділянці спектральної кривої досліджуваного розчину.

2. Вибір кювети. Абсолютна похибка вимірювання коефіцієнта пропускання не перевищує 1%. Відносна похибка визначення концентрації розчину буде різною при роботі на різних шкалах колориметра, досягаючи мінімуму при значенні оптичної густини 0,4. Тому при роботі на колориметрі рекомендується шляхом відповідного вибору кювет працювати, наближаючись до вказаного значення оптичної густини.

Попередній вибір кювет проводять візуально відповідно до інтенсивності забарвлення розчину. Якщо розчин інтенсивно забарвлений (темний), слід користуватися кюветами з малою робочою довжиною. У випадку слабозабарвленого розчину рекомендується працювати з кюветами з більшою робочою довжиною.

У попередньо обрану кювету наливають розчин і вимірюють його оптичну густину, вводячи у хід променів відповідний для даного розчину світлофільтр.

При вимірюванні певної кількості розчинів кювету заповнюють розчином середньої концентрації. Якщо отримане значення оптичної густини становить приблизно 0,3-0,5 – обирають відповідну кювету, призначену для роботи саме з цим розчином. Якщо вказана вище умова не виконується, потрібно перевірити іншу кювету. Якщо величина оптичної густини, яку визначили, перевищує 0,5-0,6, обирають кювету з меншою робочою довжиною. Якщо величина оптичної густини менше 0,2-0,3, обирають кювету з більшою робочою довжиною.

### 3. Побудова калібрувальної кривої для даної речовини.

Побудова калібрувальної кривої виконується в такій послідовності:

1) Готують розчини визначуваної речовини з відомими концентраціями таким чином, щоб охопити діапазон можливих змін концентрацій у досліджуваному розчині.

2) Вимірюють оптичні густини всіх розчинів.

3) Будують калібрувальну криву, відкладаючи по осі абсцис (x) відомі концентрації, а по осі ординат (y) – відповідні значення екстинкції (або оптичної густини).

4. Визначення концентрації речовини в розчині. За калібрувальною кривою визначають невідому концентрацію речовини в досліджуваному розчині. Для цього розчин наливають у ту саму кювету, для якої побудована калібрувальна крива, вводять той самий світлофільтр і визначають оптичну густину розчину. Потім за калібрувальною кривою знаходять концентрацію, що відповідає значенню оптичної густини (рис. 5); можна використовувати градуювальні таблиці, що складаються за даними калібрувальної кривої. Калібрувальну криву час від часу необхідно перевіряти.

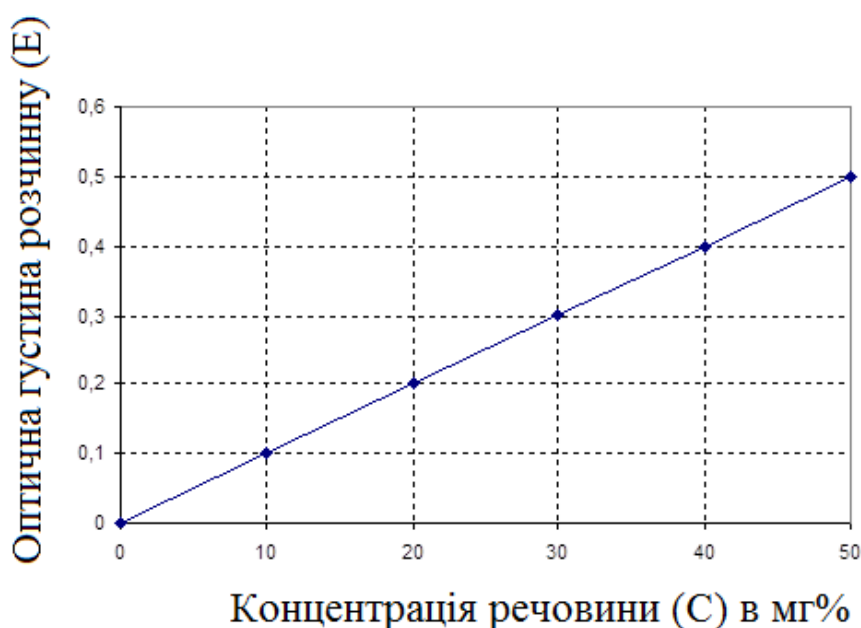


Рисунок 5 – Градуювальний графік залежності оптичної густини розчину (E – екстинкції) від концентрації речовини (C) у мг%

### ? Питання для самоконтролю

1. Сформулюйте правила техніки безпеки в біохімічній лабораторії.
2. Охарактеризуйте особливості роботи з механічними й автоматичними піпетками.
3. Охарактеризуйте особливості роботи із фотоелектроколориметром.

**Тема 1**  
**ВСТУП ДО БІОХІМІЇ.**  
**КЛІТИНА – ОСНОВА СТРУКТУРИ ЖИВИХ СИСТЕМ**

*«У живих організмах є багато різних молекул, серед яких головну роль відіграють білки, ферменти, нуклеїнові кислоти, вітаміни, гормони, вуглеводи й ліпіди, оскільки вони визначають особливості структури, функцій окремих клітин, тканин та органів».*

*Е.В. Румянцев*



**Біохімія (біологічна хімія)** – наука, яка вивчає хімічний склад і структуру хімічних речовин живої матерії, їх перетворення та фізико-хімічні процеси, що лежать в основі життєдіяльності.

Як самостійна наукова дисципліна біохімія сформувалася в другій половині ХІХ ст., коли в університетах були створені кафедри біохімії, написані підручники, почали виходити друком наукові журнали, та курс «Біохімія» став обов'язковою складовою навчальних планів підготовки фахівців природничого профілю.

Передумовою виділення біохімії в окрему науку стали значні успіхи, яких вдалося досягти в органічній хімії при вивченні численних природних сполук та фізіології при дослідженні процесів, які протікають у тваринних і рослинних організмах (фізіологічна хімія).

Особливо бурхливий розвиток біохімії відбувся в останні десятиліття ХХ ст. Цьому сприяло насамперед активне застосування в біохімічних дослідженнях нових фізико-хімічних методів. Виняткову роль у розширенні можливостей наукового пошуку в біохімії зіграло впровадження в практику біохімічних робіт рентгеноструктурного аналізу, електронної мікроскопії, газової, рідинної, гелевої, капілярної хроматографії, методу мічених атомів, інфрачервоної, ультрафіолетової спектрофотометрії, флуоресцентного та полярографічного аналізу, електрофорезу, методу молекулярних сит, мас-спектрометрії, поділу речовин у гравітаційному полі, ультрацентрифугування, методів електронного парамагнітного резонансу, ядерного магнітного резонансу тощо.

Запровадження нових методичних прийомів щоразу піднімало біохімічну науку на вищий щабель пізнання закономірностей життєдіяльності організмів, відкривало нові рівні дослідження живого. відмітною рисою розвитку біохімії стало широке застосування швидкісних методів аналізу в поєднанні з автоматичним контролем. Це дозволило значною мірою полегшити та прискорити виконання наукових програм.

На сьогодні повністю автоматизовано: кількісне визначення низки сполук – амінокислот у білкових гідролізатах, моно- і дисахаридів у

біологічних рідинах (кров, сеча тощо); визначення первинної структури пептидів, білків і нуклеїнових кислот; проведення досліджень кінетики ферментативного каталізу при серійних визначеннях ензиматичної активності; елементний аналіз природних сполук; синтез пептидів, олігонуклеотидів, білків; процедури хроматографічного та гел'фільтраційного фракціонування природних сполук; денситометрування хроматограм, електрофореграм тощо.

Залежно від підходу до вивчення живої матерії виокремлюють такі види біохімії:

- 1) **статична біохімія** – біохімія, що досліджує хімічний склад організмів;
- 2) **динамічна біохімія** – біохімія, що вивчає перетворення хімічних сполук, взаємопов'язані з ними перетворення енергії в процесі життєдіяльності;
- 3) **функціональна біохімія** – біохімія, що вивчає зв'язки між будовою хімічних сполук та процесами їх видозміни, функцією субклітинних частинок спеціалізованих клітин, тканин або органів.

Залежно від об'єкта або напрямків досліджень у сучасній біохімії виокремлюють такі самостійні розділи:

1) **загальна біохімія** – розділ біохімії, що вивчає закономірності будови, склад, перетворення в процесі життєдіяльності організмів хімічних сполук, характерних для живої матерії в цілому;

2) **біоорганічна хімія** – розділ біохімії, що досліджує фізико-хімічні основи функціонування найважливіших систем живої клітини, використовуючи ідеї, методи, прийоми, у тому числі структурний і стереохімічний аналіз, частковий і повний синтез природних сполук, їх аналогів, розробку препаративних природних речовин, їх хімічної модифікації в безпосередньому зв'язку з біологічною функцією;

3) **біонеорганічна хімія** – розділ біохімії, що досліджує структуру та функціональну активність комплексів неорганічних іонів з органічними молекулами (лігандами), їх участь у процесах життєдіяльності (вивчення можливості використання координаційних сполук як моделей біологічних систем);

4) **біохімія тварин, біохімія рослин, біохімія мікроорганізмів** – розділ біохімії, що вивчає склад цих організмів і перетворення в них речовин та енергії;

5) **медична біохімія, ветеринарна біохімія** – розділ біохімії, що досліджує склад, перетворення речовин, енергії в організмі людини, домашніх тварин у нормі та патології;

6) **квантова біохімія** – розділ біохімії, що зіставляє властивості, функції, шляхи перетворення в організмі речовин, які мають біологічне значення, з їх електронними характеристиками, отриманими за допомогою квантово-хімічних розрахунків;

7) **космічна біохімія** – розділ біохімії, що досліджує біохімічні проблеми, пов'язані з освоєнням людиною космічного простору.



**Клітина** – основна структурна та функціональна одиниця всіх живих організмів і систем. Клітини тваринних і рослинних організмів різні за розміром, формою, походженням, ступенем організації, а також за своїми функціями.

Незалежно від рівня організації спільним для всіх клітин є наявність білків, вуглеводів, ліпідів, ферментів, мінеральних сполук та води.

До складу тваринних і рослинних клітин входять як спільні, так і відмінні клітинні органели (рис. 6-7).

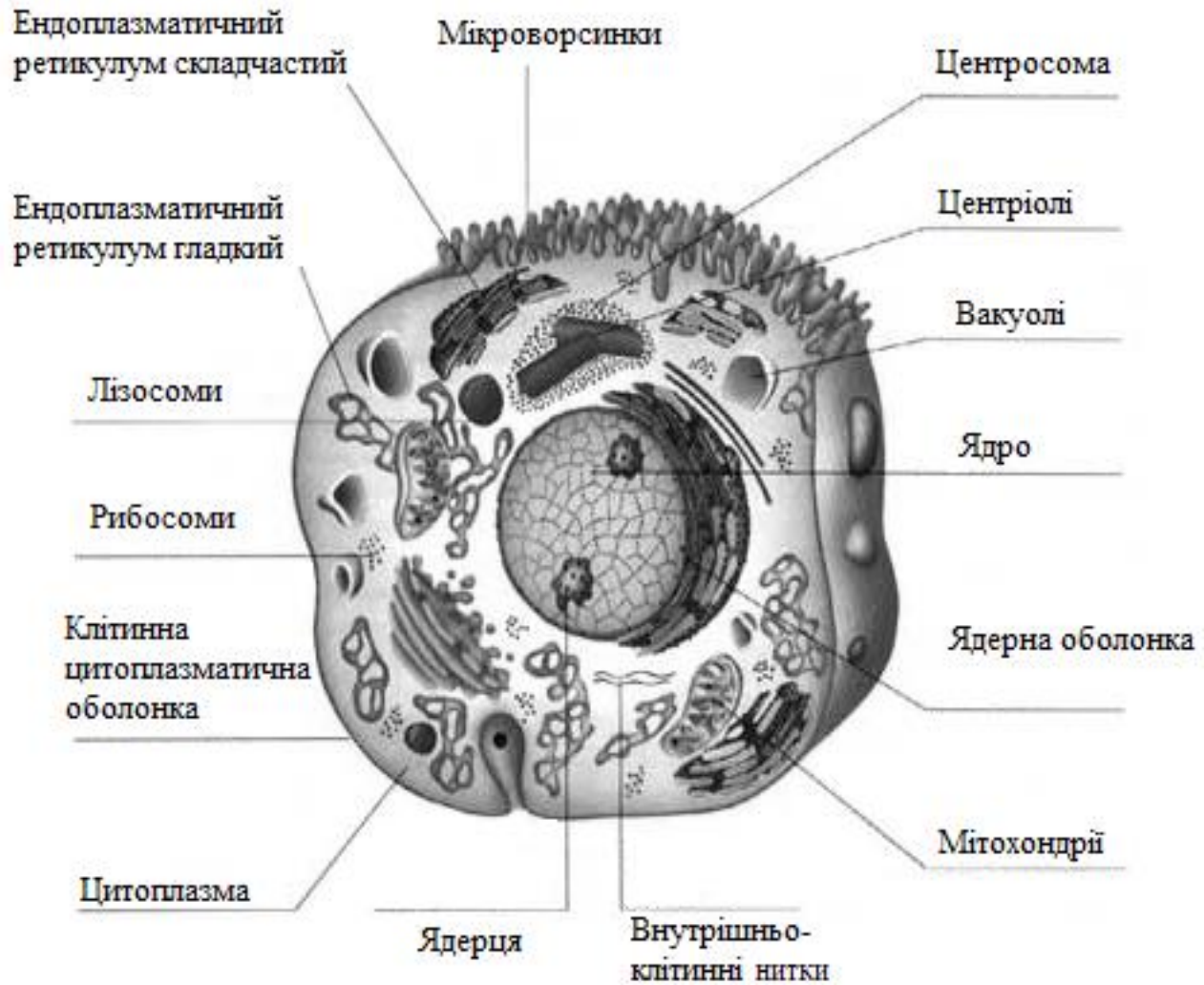


Рисунок 6 – Будова тваринної клітини

**Клітинні органели** – постійні складові частини клітини живого організму, що мають певну будову та виконують специфічні функції. Вони поділяються на мембранні та немембранні. Клітинні органели мають одну або дві мембрани.

Специфічними ознаками, характерними лише для рослинних клітин, є наявність у них пластид, вакуолей з клітинним соком і міцної целюлозно-пектинової оболонки.

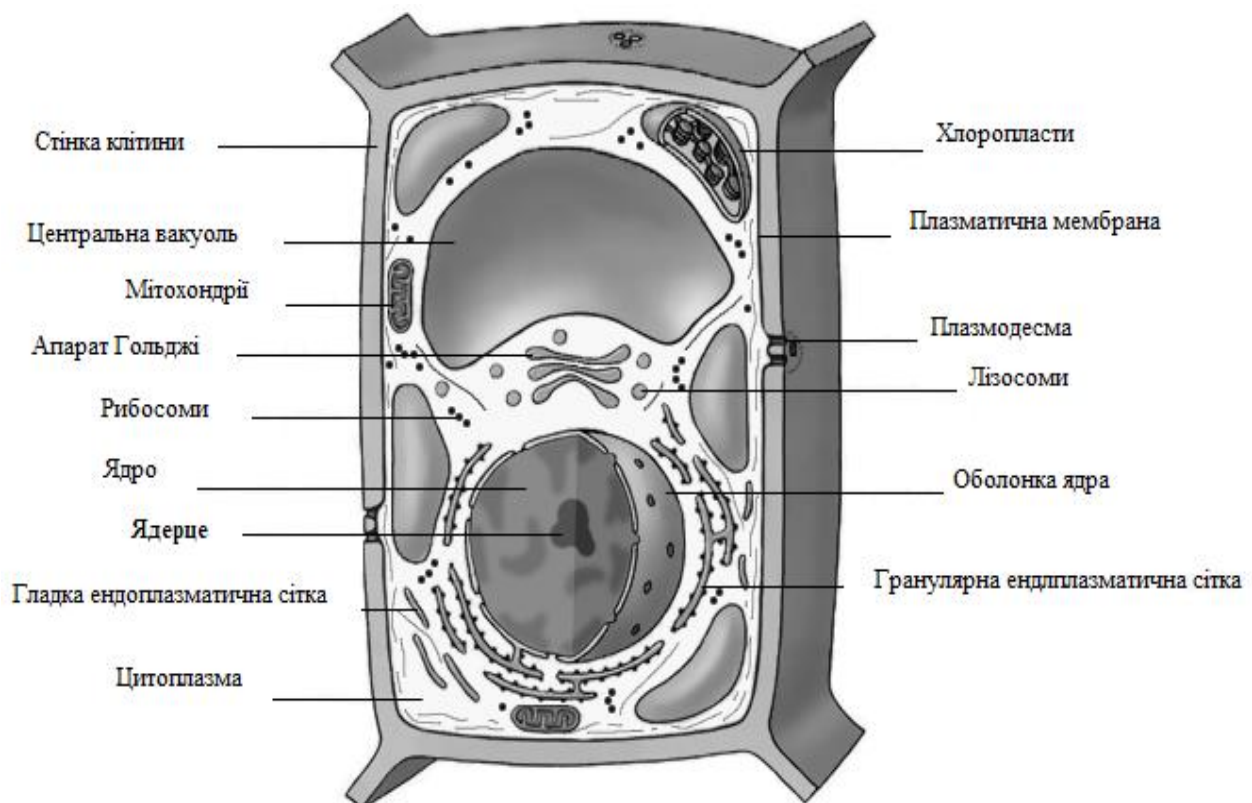


Рисунок 7 – Будова рослинної клітини

**Система мембран** – складний комплекс внутрішніх мембран, мембрани клітинних органел, зовнішня плазматична мембрана (рис. 8).

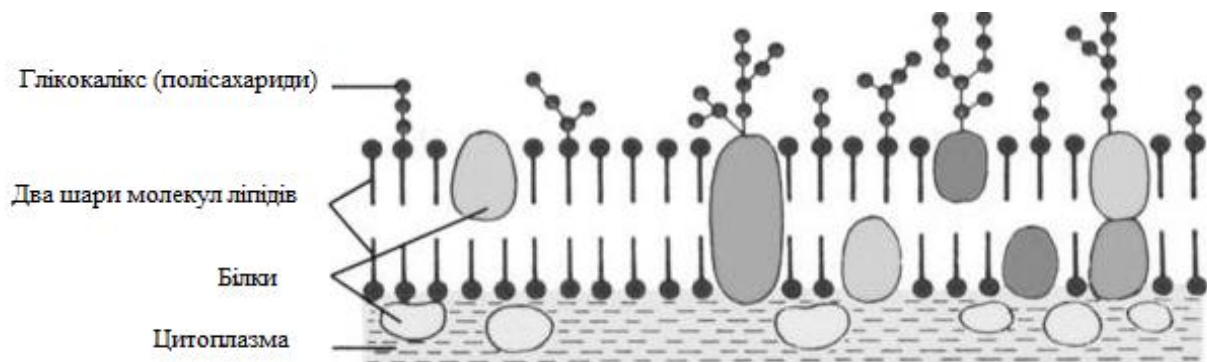


Рисунок 8 – Будова плазматичної мембрани

**Мембрана** – складне утворення з характерною для нього структурою та функціями. Товщина мембрани становить 6-12 нм. Мембрана має високу стійкість, міцність, гнучкість і лабільність.

Функції системи мембран:

- бере участь в утворенні компартментів клітини (ділянок з різною метаболічною активністю), у формуванні структури клітини, клітинних органел, в енергетичних процесах, у передачі нервових імпульсів.

- відіграє важливу роль у регуляції великої кількості метаболічних процесів;

- регулює транспорт молекул та іонів;

– забезпечує антигенну специфічність.

**Одномембранні органели клітини** – органели, поверхневий апарат яких складається з однієї мембрани.

До одномембранних органел належать ендоплазматична сітка, комплекс Гольджі, лізосоми й вакуолі.

**Ендоплазматична сітка (ЕПС) або ендоплазматичний ретикулум (ЕПР)** – система мембранних трубочок, каналців, їх потовщень (бульбашок), сполучених із зовнішньоцитоплазматичною мембраною та зовнішньою ядерною оболонкою (рис. 9). Мембрана ендоплазматичної сітки має численні складки, вигини й утворює одну безперервну поверхню, яка оточує замкнену порожнину. Мембрана ретикулуму безпосередньо переходить у зовнішню ядерну мембрану, утворюючи з нею єдине ціле.

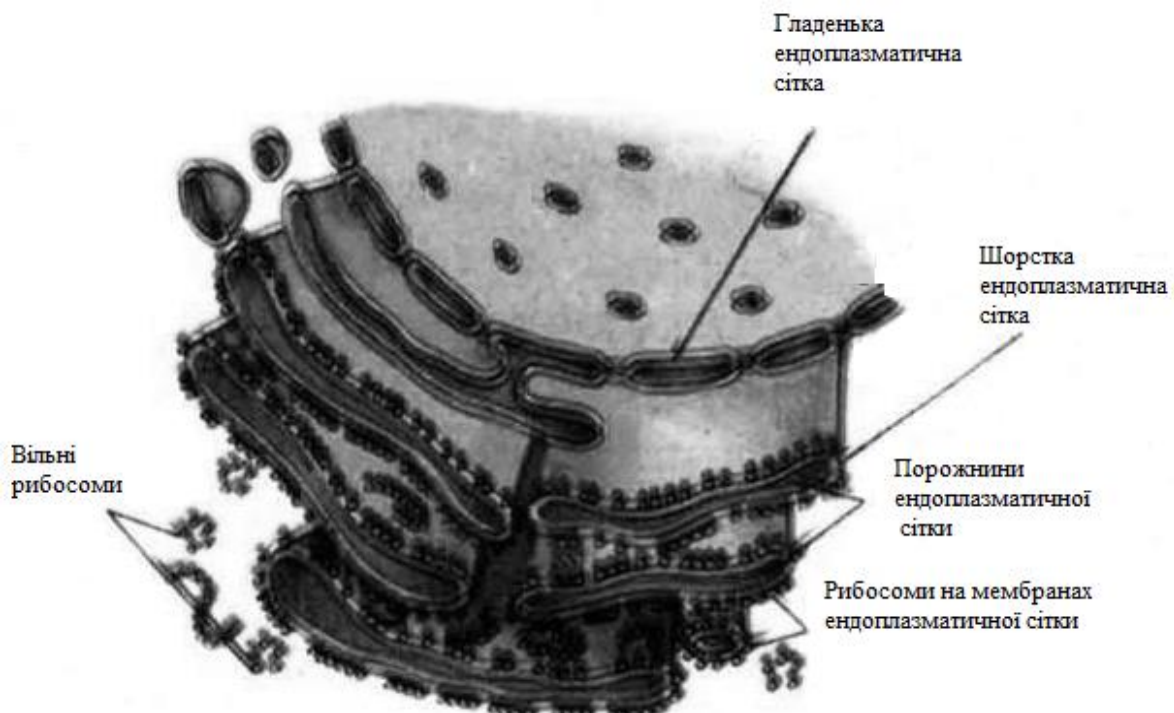


Рисунок 9 – Ендоплазматична сітка (ЕПС)

Відомі два типи ЕПС: 1) *гранулярна (шорстка)* – вкрита рибосомами, розташованими на зверненому до цитоплазми боці мембран; 2) *агранулярна (гладенька)* – частина тієї ж мембрани, але без рибосом.

Гранулярна ЕПС необхідна для транспортування макромолекул у різні ділянки клітини (лізосоми, апарат Гольджі), для синтезу структурних компонентів клітинних мембран (плазмолемі).

Агранулярна ЕПС бере участь у завершальних етапах синтезу ліпідів і деяких внутрішньоклітинних полісахаридів. Агранулярна ЕПС добре розвинена також у м'язових волокнах, оскільки здатна поглинати іони  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозоллю, що зумовлює розслаблення м'язів під час кожного акту м'язового скорочення.

ЕПС – транспортна сітка клітини, що сполучає між собою основні її органели і, крім того, розділяє цитоплазму на компартменти, в яких відбуваються різноманітні метаболічні процеси.

Функції ендоплазматичної сітки:

- синтез білків (на шорсткій ЕПС);
- дозрівання та накопичення білків;
- синтез ліпідів, гормонів ліпідної природи, вуглеводів, обмін глікогену (на гладенькій ЕПС);
- перенесення поживних речовин у клітину завдяки транспортуванню;
- розщеплення токсинів – на мембранах гладенької ЕПС клітин печінки;
- розслаблення міофібрил при м'язовому скороченні – гладенька ЕПС м'язових клітин поглинає іони  $Ca^{2+}$  з цитоплазми.

**Апарат Гольджі (комплекс Гольджі)** – це група мембранних мішечків (цистерн) та система пухирців (пухирців Гольджі), локалізованих поблизу клітинного ядра (рис. 10).

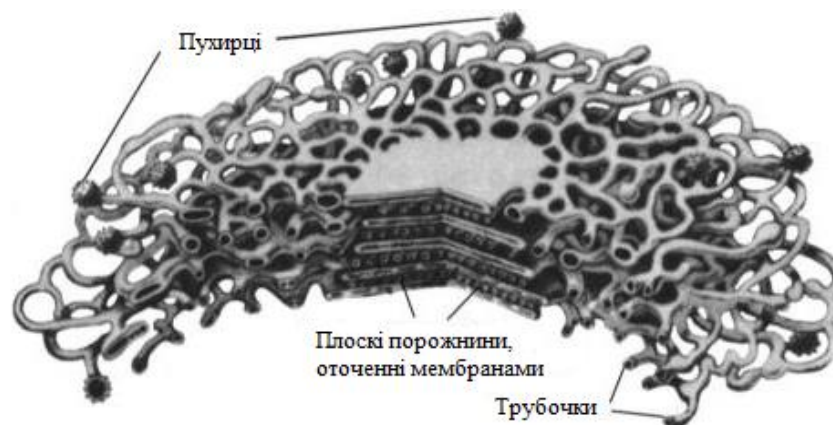


Рисунок 10 – Апарат Гольджі

**Комплекс Гольджі** – найбільш рухлива органела, що складається із мембранних мішечків (диктіосом – 3-12), поєднаних із ними трубочок із пухирцями на кінцях. Диктіосоми полярні – від одного із полюсів постійно надходять пухирці з ендоплазматичної сітки і містять речовини, що в ній утворилися, а від іншого полюса відходять уже дозрілі пухирці, які транспортуються в інші ділянки клітини та виводяться з неї. Кількість диктіосом у клітині варіюється від однієї до десятків, сотень залежно від типу клітини та фази її розвитку. Комплекс Гольджі міститься навколо клітинного ядра.

**Функції комплексу Гольджі:**

- бере участь у накопиченні та дозріванні речовин метаболізму, що синтезуються в ЕПС, їх перерозподілі у клітині й виведенні; у постачанні хімічних компонентів для побудови клітинної стінки в рослин; в утворенні первинних лізосом і вакуолей; у концентрації речовин, які надходять до клітини ззовні та повинні бути виведені з неї (наприклад, барвники).

**Лізосоми** – похідні комплексу Гольджі. Дрібні сферичні органели клітини, близько 1 мкм у діаметрі, обмежені щільною плазматичною мембраною. Усередині містять однорідну речовину та приблизно 40 ферментів, які розщеплюють білки, жири, вуглеводи, нуклеїнові кислоти. Всі вони – гідролітичні ферменти (кислі гідролази) із найбільшою активністю при  $pH = 5$ . Кисле середовище необхідне для оптимальної активності ферментів. За нормальних умов мембрана лізосом непроникна для ферментів. В організмі під впливом ферментів відбувається травлення двох типів – внутрішньоклітинне й



порожнинне (у шлунку). Лізосоми виявлені тільки у клітинах тварин і грибів. У кожній клітині є кілька десятків лізосом. Мембрана дає можливість кінцевим продуктам розщеплення макромолекул легко виходити назовні. Вони можуть потім або виділятися з клітини, або використовуватися всередині неї.

Лізосомальні ферменти синтезуються на шорсткій ЕПС і транспортуються до апарату Гольджі. Потім від апарату Гольджі відгалужуються пухирці, які й перетворюються на лізосоми. Такі первинні лізосоми зливаються з вакуолями, що утворилися під час ендоцитозу. При цьому формується вторинна лізосома. Лізосомальні ферменти перетравлюють вміст вакуолі, а неперетравлені рештки виводяться шляхом екзоцитозу. Дуже важливо, що мембрана лізосом стійка до дії цих ферментів.

Типи лізосом:

- первинні лізосоми, які утворюються за участі комплексу Гольджі;
- вторинні лізосоми, які утворюються з первинних, шляхом злиття із фагоцитозними й піноцитозними пухирцями;
- аутолізосоми беруть участь у перетравленні окремих компонентів клітини, цілих клітин або їх груп (знищення дефективних органел, мертвих клітин, хвоста у пуголовків тощо).

Функції лізосом:

- беруть участь у розщепленні білків, жирів, вуглеводів за допомогою комплексу ферментів; у перетравленні частинок, які потрапили до клітини за рахунок фагоцитозу та піноцитозу; у видаленні відмерлих органів, клітин та органел;
- лізосоми є дуже ефективним засобом знищення антигенів – хвороботворних мікроорганізмів, які фагоцитуються макрофагами. Деякі мікроорганізми уникають злиття з лізосомами (туберкульозна бацила) або виявляються стійкими до лізосомного руйнування (збудник лепри (прокази)). Інші уникають руйнування, розщеплюючи мембрану лізосом за допомогою ендотоксинів.

**Вакуолі** – клітинні «резервуари води», в яких містяться розчинені речовини; виконують різні фізіологічні функції. Вони утворюються із пухирчастих розширень ендоплазматичної сітки (у рослин) або із пухирців комплексу Гольджі (у тварин).

У рослинних клітинах є центральна крупна вакуоля, що становить до 90% об'єму клітини та заповнена клітинним соком. Клітинний сік – консервований водний розчин органічних і неорганічних сполук, зокрема продуктів обміну речовин (пігментів, танінів, алкалоїдів, отруйних речовин, кінцевих продуктів життєдіяльності клітини).

У тваринних клітинах – вакуолі тимчасові (травні, скоротливі, видільні); становлять до 5% об'єму. Спостерігаються рідко, переважно у найпростіших і тільки в деяких клітинах хордових тварин (у клітинах печінки).

Травні вакуолі (вторинні лізосоми) заповнені ферментами; виконують травну функцію (у клітинах найпростіших і безхребетних тварин). Травні вакуолі є в особливих клітинах вищих тварин – фагоцитах.

Скоротливі вакуолі регулюють (у клітині) осмотичний тиск, беруть участь у виведенні з неї деяких розчинених продуктів обміну, сприяють надходженню до клітини води з киснем.

Функції центральної вакуолі рослинних клітин:

- накопичувальний простір для вмісту проміжних продуктів обміну;
- місце для відокремлення кінцевих продуктів обміну;
- осмотичний простір, що створює осмотично обумовлений тургорний тиск;
- постачає воду, необхідну для фотосинтезу.

Ендоплазматична сітка, комплекс Гольджі, лізосоми, вакуолі утворюють єдину вакуолярну систему клітини.

**Двомембранні органели клітини** – органели, поверхневий апарат яких складається з двох мембран.

До двомембранних органел належать ядро, мітохондрії, пластиди. Між їхніми мембранами – міжмембранний простір. Просторово мембрани цих органел не пов'язані з іншими органелами.

**Ядро** (від лат. *nucleus* – ядро) – клітинна органела еукаріотів, що містить ядерні гени, які становлять більшу частину генетичного матеріалу. Ядро виконує дві первинні функції: керування хімічними реакціями в межах цитоплазми та збереження інформації, потрібної для поділу клітини.

У ядрі містяться білки, які регулюють зчитування генетичної інформації. Зчитування гена на ядерному рівні залучає складні процеси транскрипції, обробки первинної мРНК і експорт зрілої мРНК до цитоплазми. Ядро звичайно має розмір 8-25 мкм у діаметрі. Воно оточено подвійною мембраною, яка називається ядерною оболонкою. Крізь внутрішню та зовнішню мембрани проходять ядерні пори. Ядерна оболонка регулює та полегшує процес транспортування між ядром і цитоплазмою, виокремлюючи хімічні реакції, що відбуваються в цитоплазмі або в межах ядра.

Внутрішня частина ядра містить одне або декілька ядерець, оточених матрицею, яка називається **нуклеоплазмою**. Нуклеоплазма (каріолімфа, ядерний сік, каріоплазма) являє собою гелеподібну рідину (подібну до цитоплазми), в якій розчинено багато речовин. Ці речовини включають нуклеотидтрифосфати, сигнальні молекули, ДНК, РНК і білки.

Генетичний матеріал наявний у ядрі у вигляді хроматину або комплексу білка та ДНК. Є два види хроматину – еухроматин і гетерохроматин.

**Ядерце** – маленьке щільне тільце шароподібної форми діаметром 1-5 мкм. Формування ядерця відбувається на специфічній ділянці хромосоми. Найчастіше це буває на вторинних перетяжках хромосом, де розташовані гени, які кодують синтез рибосомальних РНК. Ядерце є найбільш щільною частиною ядра, яка добре забарвлюється основними барвниками.

Функції ядерець:

- синтез рРНК;
- утворення субодиниць рибосом;
- синтез ядерних білків (гістонів).

**Мітохондрія** (від грец. *mitos* – нитка та *khondrion* – гранула) – двомембранна органела клітини (рис. 11). Мітохондрії називають «клітинними електростанціями», оскільки вони перетворюють молекули поживних речовин на енергію у вигляді аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) унаслідок процесу,

відомого як окиснювальне фосфорилування. Еукариотична клітина містить близько 2 тис. мітохондрій, які займають приблизно 1/5 її повного об'єму. Мітохондрії містять мітохондріальну ДНК, незалежну від ДНК, розташованої у ядрі клітини. Мітохондрія оточена внутрішньою та зовнішньою мембранами, що складаються з подвійного шару фосфоліпідів і білків. Ці дві мембрани мають різні властивості. Зовнішня мембрана гладенька, вона не утворює ніяких складок і виростів. Внутрішня мембрана утворює численні складки – кристи, спрямовані в порожнину мітохондрії. Внутрішній простір заповнений напіврідкою речовиною – **матриксом**. Розмір мітохондрій коливається в межах має від 1 до 10 мікрон.

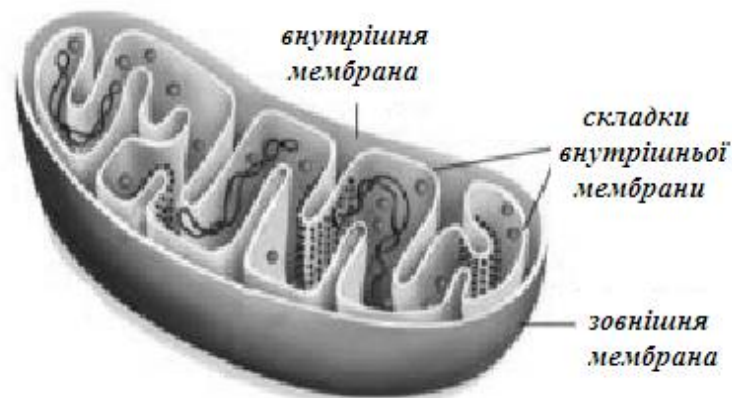


Рисунок 11 – Схема будови мітохондрії за даними електронного мікроскопа

**Пластиди** (від грец. *plastos* – утворений, оформлений) – основні органели рослин і водоростей. Вони покриті подвійною мембраною та мають у своєму складі багато копій кільцевої ДНК. Пластиди відповідають за фотосинтез, забарвлення частин рослин та зберігання харчових запасів. Залежно від виконуваної у клітині функції пластиди диференціюються на:

**лейкопласти** – незабарвлені пластиди (від грец. *leicos* – білий), що виконують функцію запасання речовин. Наприклад, у лейкопластах бульб картоплі накопичується крохмаль;

**хромопласти** – пластиди, забарвлені в жовтий, червоний або оранжевий колір (грец. *chromos* – забарвлений). Забарвлення хромопластів пов'язане з накопиченням у них каротиноїдів. Хромопласти визначають забарвлення осіннього листя, пелюсток квітів, коренеплодів, дозрілих плодів. Форма хромопластів різна: куляста, тригранна, колоподібна;

**хлоропласти** (від грец. *chloros* – зелений) – пластиди, що містять фотосинтезуючі пігменти (хлорофіли). Для них характерне зелене забарвлення та складна внутрішня структура. Мають вигляд двоопуклої, рідше плоско-опуклої лінзи діаметром 5-8 мкм. Ззовні хлоропласт оточений гладкою ліпопротеїновою мембраною. Внутрішня оболонка утворює систему паралельних вгинів. Між ними знаходиться внутрішній простір – строма, в якій містяться тилакоїди (від грец. *tylos* – здуття і *eidos* – вигляд). Вони являють собою замкнуті сплюснені мішечки. Великі тилакоїди розташовані поодинокі, а дрібні зібрані у грані, що

нагадують купку монет. На мембрані тилакоїдів є АТФ-соми – структури, до складу яких входять ферменти, що забезпечують синтез молекул АТФ.

**Немембранні органели клітини** – органели, поверхневий апарат яких не містить жодної мембрани.

До немембранних органел належать рибосоми, клітинний центр, мікротрубочки, мікрофіламенти, органели руху.

**Рибосоми** – сферичні тільця діаметром приблизно 20 нм, які беруть участь у синтезі білків у клітині (рис. 12). Вони складаються з двох різних за розміром субодиниць – великої та малої. Кожна з них містить рРНК, білки, що взаємодіють між собою.

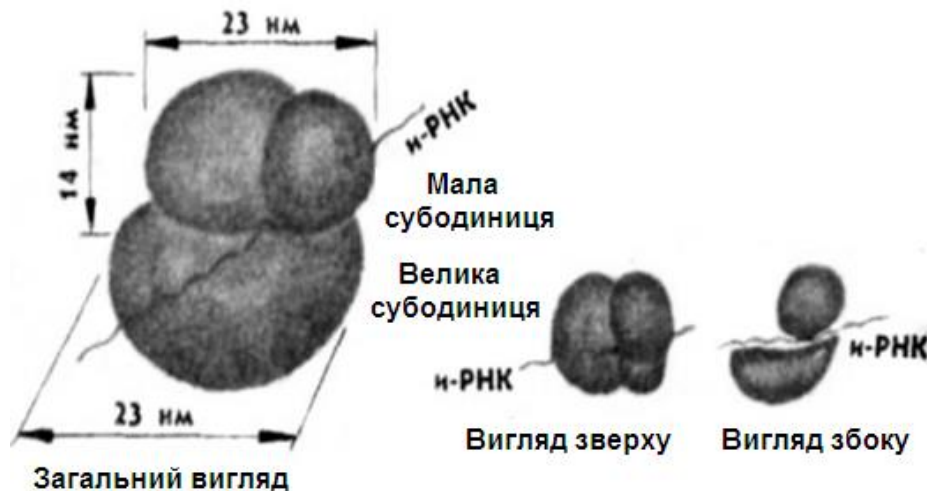


Рисунок 12 – Схема структури рибосоми

Субодиниці рибосом можуть роз'єднуватися після завершення синтезу білкової молекули та знову сполучатися між собою у місцях синтезу білків.

Структурні компоненти рибосом утворюються в ядрі. Кількість рибосом у клітині залежить від інтенсивності процесу біосинтезу білків. Наприклад, у хребтних тварин найбільше рибосом відзначається у клітинах печінки, червоного кісткового мозку.

До складу клітинного центру входять дві центріолі, розташовані в ділянці цитоплазми, від якої радіально розходяться мікронитки. Центріолі мають вигляд порожнього циліндра, який складається з мікротрубочок.

Центріолі беруть участь у формуванні веретена поділу. Вони розходяться до полюсів клітини, і між ними натягуються нитки з мікротрубочок. Після поділу материнської клітини в кожен з дочірніх потрапляє по одній центріолі. В період між двома поділами клітини ці структури подвоюються.

Центріолі беруть участь у формуванні мікротрубочок цитоплазми, веретена поділу клітини, джгутиків і війок.

До органел руху клітини належать псевдоподії, або несправжні ніжки, джгутики, війки.

**Псевдоподії** – непостійні вирости цитоплазми клітин деяких одноклітинних (амеб) або багатоклітинних тварин (лейкоцити). Структура псевдоподій та їх форма можуть бути різноманітними. Вони утворюються

завдяки руху цитоплазми, яка перетікає в певну ділянку клітини, формуючи виріст. Псевдоподії не лише забезпечують пересування клітини, а й захоплення твердих часточок (процес фагоцитозу).

Джгутики, війки мають вигляд тоненьких виростів цитоплазми діаметром приблизно 0,25 мкм. Вони вкриті плазматичною мембраною. Всередині цих органел розташована складна система з мікротрубочок. Джгутики й війки є у деяких одноклітинних організмів (евглена, інфузорії, хламідомонада), деяких типів клітин багатоклітинних (вищі спорові рослини, епітелій дихальних шляхів ссавців, сперматозоїди тварин тощо).

Рухи війок у цілому нагадують роботу весел і, як правило, скоординовані (інфузорії). Для джгутиків характерний гвинтоподібний або хвилеподібний рух. Джгутики, війки рухаються завдяки енергії, що вивільняється під час розщеплення молекул АТФ. Ці органели забезпечують пересування клітин, надходження часточок їжі до них (рух джгутиків травних клітин гідри). Вони можуть також виконувати чутливу (у війчастих червів) і захисну (війки епітелію носової порожнини) функції.

### **? Питання для самоконтролю**

1. Назвіть та охарактеризуйте види біохімії.
2. Розкрийте історію розвитку біохімії.
3. Охарактеризуйте особливості будови тваринної та рослинної клітин.
4. Охарактеризуйте особливості будови та функції органел тваринної клітини.

Під час самостійного вивчення теми №1 необхідно ознайомитися з історією розвитку біохімії (проаналізувати чотири основні етапи), основними відкриттями в біохімії, усвідомити їх значення; розглянути особливості будови одномембранних, двомембранних і немембранних органел та засвоїти їх основні функції.

## Тема 2 АМІНОКИСЛОТИ ТА БІЛКИ

*«У всіх живих організмах міститься речовина, яка, безсумнівно, є найбільш важливою з усіх відомих речовин живої природи і без якої життя на нашій планеті було б неможливим. Цю речовину я назвав протейном».*

Г. Мульдер



Амінокислоти – речовини, які є мономерами білків. Їх можна розглядати як похідні карбонових кислот; молекула яких містить карбоксильну групу (-COOH) та аміногрупу (-NH<sub>2</sub>) біля α-атома Карбону (рис. 13).

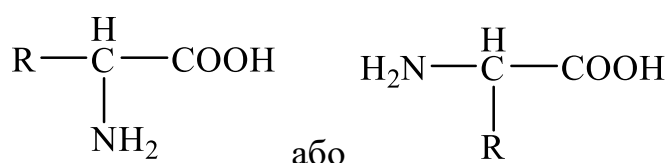


Рисунок 13 – Загальна формула структури α-амінокислот, де R – радикал (-H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; структури гліцину, аланіну, фенілаланіну відповідно)

У природі налічується близько 150 амінокислот, серед них 20 (22) α-амінокислот входять до складу білків (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн, цистин, метіонін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, аспарагін, глутамін, лізин, аргінін, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин, пролін, оксипролін). Амінокислоти відіграють важливу роль в обміні нітрогеновмісних сполук у живих організмах. З них утворюються необхідні для життєдіяльності речовини: білки, пептиди, ферменти, гормони тощо.

Види класифікації амінокислот:

**1. За кількістю аміногруп і карбоксильних груп у структурі амінокислот:**

1.1 моноаміномонокарбонові амінокислоти (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин);

1.2 моноамінодикарбонові амінокислоти (аспарагінова кислота, глутамінова кислота);

1.3 діаміномонокарбонові амінокислоти (лізин, аргінін);

1.4 діамінодикарбонові амінокислоти.

**2. За особливостями будови радикала (R) у структурі амінокислот (хімічна класифікація):**

2.1 ациклічні (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн, цистин, метіонін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, аспарагін, глутамін, лізин, аргінін);

2.2 циклічні

2.2.1 ароматичні (карбоциклічні) (фенілаланін, тирозин);

2.2.2 гетероциклічні

2.2.2.1 амінокислоти з первинною  $-NH_2$  групою в бічному ланцюзі (триптофан, гістидин);

2.2.2.2 імінокислоти (пролін, оксипролін).

### 3. За властивостями радикала (R) у структурі амінокислот:

#### 3.1 на основі полярності радикала (R)

3.1.1 полярні (гідрофільні) амінокислоти: іоногенні (тирозин, цистеїн, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, аргінін, гістидин); неіоногенні (серин, треонін, аспарагін, глутамін);

3.1.2 неполярні (гідрофобні) амінокислоти (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін);

#### 3.2 на основі кислотності радикала (R)

3.2.1 кислі (негативно заряджені амінокислоти): аспарагінова кислота, глутамінова кислота;

3.2.2 основні (позитивно заряджені амінокислоти): аргінін, лізин, гістидин.

### 4. За можливістю синтезу та відсутністю синтезу в організмі людини (біологічна класифікація):

4.1 **замінні** – амінокислоти, які можуть синтезуватися в організмі тварин та людини з інших амінокислот або небілкових компонентів (гліцин, аланін, серин, цистеїн, аспарагін, глутамін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, тирозин, пролін);

4.2 **незамінні («есенціальні»)** – амінокислоти, які не синтезуються в організмі людини та повинні обов'язково надходити з їжею (валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, треонін, лізин, фенілаланін, триптофан).

Аргінін, гістидин належать до **частково незамінних**.

Амінокислоти – це безбарвні нелеткі кристалічні речовини з високими температурами плавлення ( $220-315\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), розчинні у воді, оптично активні (крім гліцину, який не має асиметричного атома Карбону), належать до L-ряду. L-Амінокислоти мають солодкий смак, D-амінокислоти не мають смаку або гіркі. Амінокислоти D-ряду – складові елементи деяких антибіотиків і білків оболонки мікроорганізмів (рис. 14).

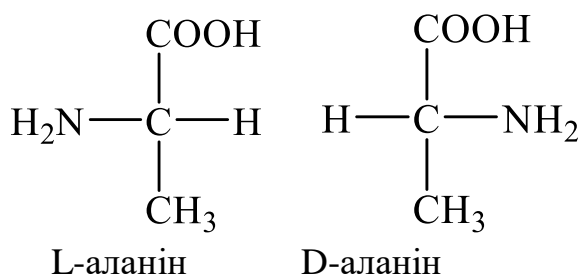


Рисунок 14 – Структура L-аланіну, D-аланіну

Амінокислоти здатні утворювати біполярний іон – цвітер-іон (рис. 15).

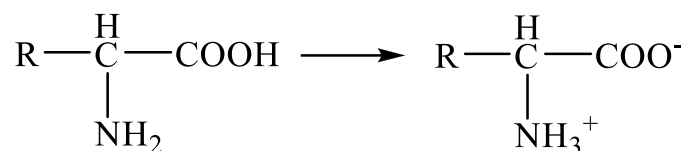


Рисунок 15 – Схема утворення біполярного іона (цвітер-іона) амінокислоти

Залежно від рН середовища вони можуть мати кислі чи основні властивості; мають сумарний нульовий, позитивний або негативний заряд.

**Амінокислоти** – амфотерні сполуки, які містять дві протилежні за властивостями функціональні групи; амінокислоти можуть утворювати різні солі, реагуючи як з основами, так і з кислотами (рис. 16).

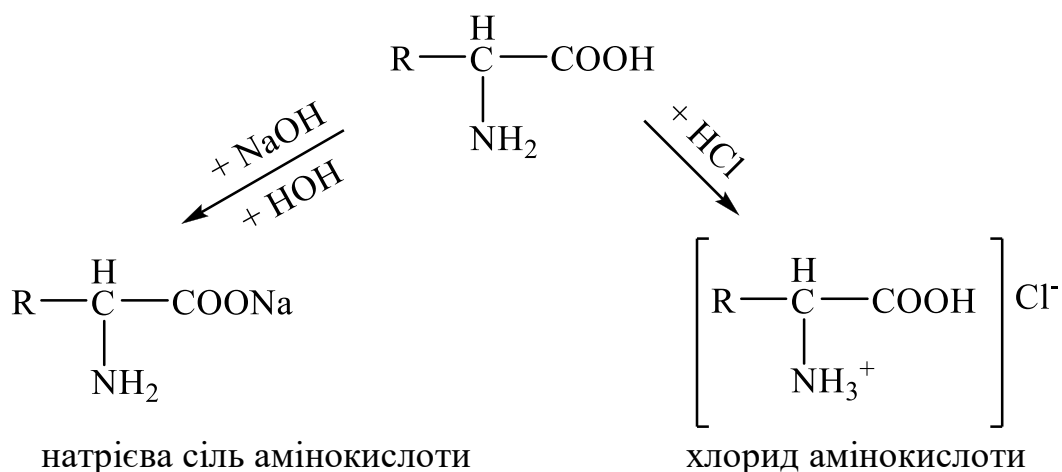


Рисунок 16 – Схема утворення натрієвої солі амінокислоти, хлориду амінокислоти

Амфотерні властивості амінокислот використовуються при їх розподілі та ідентифікації за методом іонообмінної хроматографії та електрофорезу.

Значення рН, при якому сумарний заряд амінокислоти дорівнює нулю та амінокислоти не здатні рухатися в електричному полі ні до анода, ні до катода, називається **ізоелектричною точкою (ІЕТ)** та позначається рІ.

Ізоелектричну точку амінокислоти (рІ) можна знайти із співвідношення: якщо ми знаємо значення рК<sub>2</sub> зарядженої амінокислоти (звичайно в межах від 1 до 3) та значення рК<sub>1</sub> біполярного іона (значення знаходиться в межах 9-10):

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Наприклад, у глутамінової кислоти рІ = 3,2; у аланіну рІ = 6,02; у валіну рІ = 5,95; у лізину рІ = 9,8.

В інтервалі рН від 4 до 9 майже всі амінокислоти існують переважно у формі цвітер-іонів з протонованою аміногрупою та дисоційованою карбоксильною групою.



Ізоелектрична точка білка залежить від кількості та природи заряджених груп у молекулі. Білкова молекула заряджена позитивно, якщо рН середовища нижче від рІ, та негативно, якщо рН середовища вище від рІ.

**Білки** – високомолекулярні полімерні природні сполуки; мономерами яких є α-амінокислоти. Білки синтезуються на рибосомах з α-амінокислот і транспортних РНК (тРНК). Цей комплекс називається «аміноацил-тРНК».

Існують 4 рівні організації білка (структури білка):

**Первинна структура білка** – лінійна послідовність залишків α-амінокислот у ланцюзі, зв'язаних між собою пептидним (амідним ковалентним) зв'язком (рис. 17), утвореним при взаємодії карбоксильної групи однієї α-амінокислоти й аміногрупи іншої α-амінокислоти (лінійний поліпептидний ланцюг).

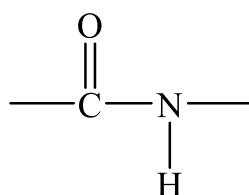


Рисунок 17 – Пептидний зв'язок (амідний ковалентний зв'язок)

Залежно від числа з'єднаних пептидним зв'язком α-амінокислот розрізняють дипептиди, трипептиди і т.д. та поліпептиди. На одному кінці поліпептидного ланцюга є вільна аміногрупа (N-кінець), а на іншому – вільна карбоксильна група (C-кінець) (рис. 18).

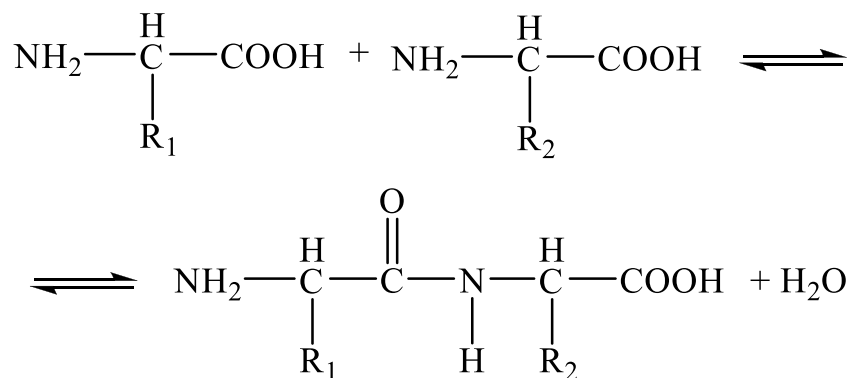


Рисунок 18 – Схема утворення дипептиду на прикладі 2-х амінокислот

Приклади білків, які мають первинну структуру: глутатіон, інсулін, окситоцин, вазопресин, рибонуклеаза тощо.

**Вторинна структура білка** – впорядкована просторова конформація поліпептидного ланцюга. Вона утворюється за рахунок водневих зв'язків між пептидними групами в одному поліпептидному ланцюзі або між сусідніми поліпептидними ланцюгами. При цьому конформація може набувати вигляду α-спіральних, β-складчастих і нерегулярних (змішаних) структур (рис. 19 а, б).

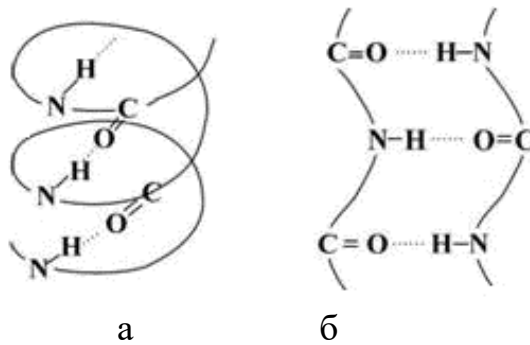


Рисунок 19 – Схематичне зображення вторинної структури білка: а –  $\alpha$ -спіраль (правозакручена), б –  $\beta$ -складчаста структура

У природних білках виявлено тільки правозакручені  $\alpha$ -спіралі.

Приклади білків, які мають вторинну структуру: фіброїн (білок шовку),  $\beta$ -кератин (білок сполучної тканини), хімотрипсин тощо.

**Третинна структура білка** – просторове розташування вторинних структур білка, або форма упаковки білкової молекули у просторі (рис. 20). Третинна структура стабілізується завдяки взаємодіям між залишками амінокислот.

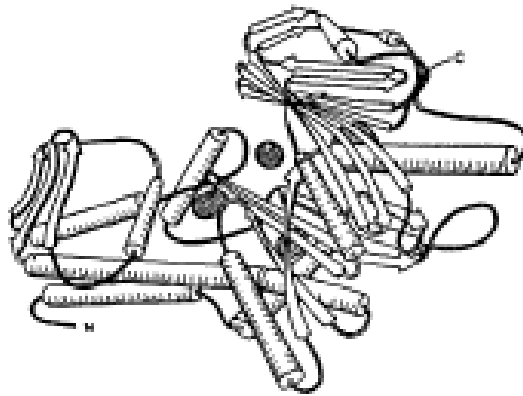


Рисунок 20 – Схематичне зображення третинної структури білка (ферменту гексакінази)

У формуванні просторової структури білків, окрім ковалентних зв'язків (пептидних і дисульфідних), основну роль відіграють нековалентні зв'язки: водневі, іонні, вандерваальсові сили, гідрофобна взаємодія тощо.

Для всіх білків із третинною структурою характерна «мозаїчна будова поверхні білка». Поверхня білка в основному гідрофільна, але містить невеликі неполярні ділянки. Саме через мозаїчну структуру поверхні білка зв'язування ферменту з його субстратом або коферментом завжди відбувається за допомогою невеликої гідрофобної ділянки на поверхні білка. Ця ділянка негідратована та створює умови для виникнення гідрофобної взаємодії.

За формою третинної структури білки поділяють на **глобулярні** (альбуміни, глобуліни, гістони) та **фібрилярні** (колаген, еластин,  $\alpha$ -кератин). Глобулярні білки мають еліпсоїдну форму, а фібрилярні – видовжену (палички, нитки). Більшість білків у нативному стані має компактну структуру.

Кератини – білки волосся та шерсті, які за третинною структурою належать до фібрилярних білків, мають фібрилярну конформацію четвертинної структури.

Для вивчення третинної структури білка найчастіше застосовують метод рентгеноструктурного аналізу та електронної мікроскопії.

Приклади білків, які мають третинну структуру: гексокіназа,  $\alpha$ -кератин опорних тканин тощо.

**Четвертинна структура білка** – спосіб об'єднання та взаємного розташування у просторі кількох (найчастіше чотирьох) молекул білка або поліпептидних ланцюгів (рис. 21). Четвертинна структура є вищим рівнем організації.

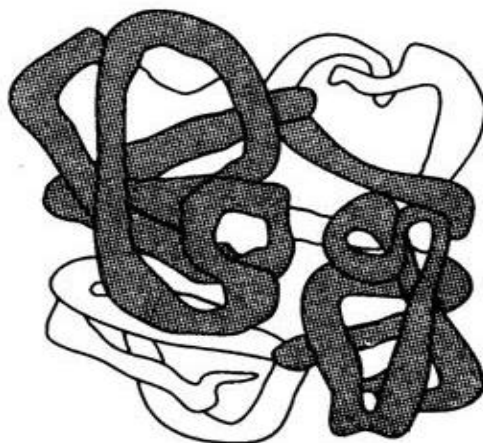


Рисунок 21 – Схематичне зображення четвертинної структури білка

Четвертинна структура стабілізується та підтримується в нативному стані в основному за рахунок слабких нековалентних зв'язків (іонних і водневих) та гідрофобних взаємодій, які виникають між різними функціональними групами, розташованими на поверхні субодиниць.

Білки, які мають четвертинну структуру, називаються **олігомерними**.

Кожний окремий поліпептидний ланцюг у складі олігомерного білка називається **протомером** (або **субодиницею**). Він може бути представлений як одним протомером, так і декількома. Наприклад, у білка із чотирьох однакових субодиниць (A<sub>4</sub>) протомером є мономер А, а білок із двох типів субодиниць (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) має 2 протомери складу АВ.

Олігомерні білки найчастіше складаються з парної кількості протомерів – від 2 до 4 (димери, тетрамери), рідше від 6 до 8, 10, 12 і більше з молекулярною масою в межах від декількох тисяч до 100000 дальтон.

**Дальтон** – одиниця вимірювання маси атомів, молекул, а також вірусів, клітин та їх структур (хромосом, рибосом, мітохондрій тощо), що дорівнює 1/12 маси атома Карбону (<sup>12</sup>C), або 1,661 10<sup>-24</sup> м.

Приклад білка, який має четвертинну структуру: гемоглобін.

**Гемоглобін** – білок, який складається із чотирьох субодиниць. Кожна із субодиниць – глобулярний білок.

4 структури білка наглядно представлено на рис. 22 а, б, в, г:

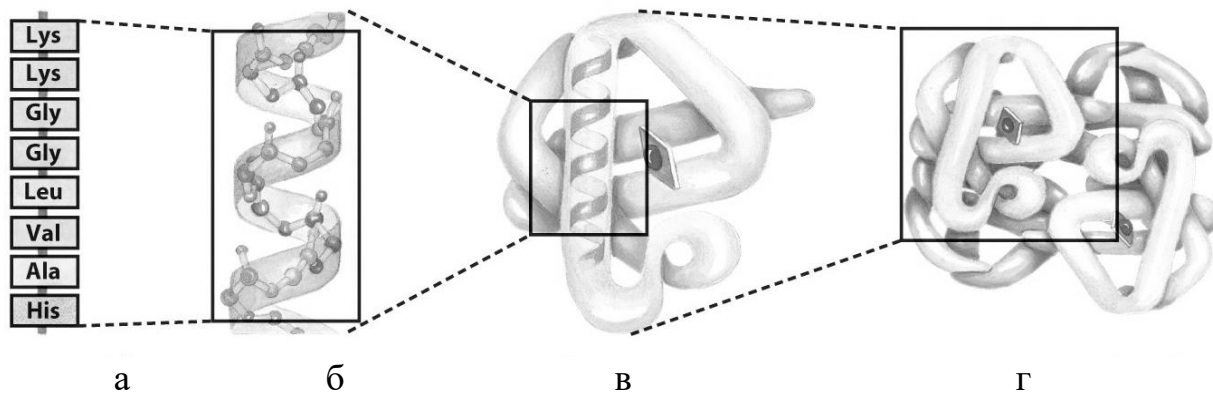


Рисунок 22 – Структури білка: а – первинна (залишки  $\alpha$ -амінокислот); б – вторинна ( $\alpha$ -спіраль); в – третинна (глобула); г – четвертинна (протомери або субодиниці)

### Класифікація білків

Залежно від особливостей будови розрізняють: 1) **прості білки (протеїни)**, які містять тільки залишки  $\alpha$ -амінокислот; 2) **складні білки (протеїди)**, які містять, окрім залишків  $\alpha$ -амінокислот, ще і простетичну групу.

До простих білків (протеїнів) можна віднести: альбуміни, глобуліни, гістони, протаміни, колаген, еластин, кератин.

До складних білків (протеїдів) можна віднести: глікопротеїди (імуноглобулін G); ліпопротеїди (ліпопротеїд крові), фосфопротеїди (казеїн молока), нуклеопротеїди, гемопротеїди (гемоглобін), металопротеїди (феритин, алкогольдегідрогеназа, кальмодулін, динітрогеназа), флавопротеїди (сукцинатдегідрогеназа).

### Функції білків

Функції білків:

1) **енергетична** – при розкладанні білка виділяється енергія (1 г білка утворює 17 кДж);

2) **каталітична** – усі біологічні каталізатори – ферменти (глобулярні білки); вони визначають швидкість хімічних реакцій у біологічних системах. Наприклад, рибонуклеаза, трипсин;

3) **запасна** – резервні білки виконують функцію живлення, є джерелом розвитку плоду. Наприклад, білок молока (казеїн), гліадин (пшениця), яєчний овальбумін (яйце), феритин;

4) **захисна** – функцію захисту в організмі виконує імунна система, яка забезпечує синтез специфічних захисних білків-антитіл у відповідь на потрапляння в організм бактерій, токсинів або вірусів. Наприклад, антитіла, фібриноген, тромбін, ботулінічний токсин, дифтерійний токсин, зміїна отрута, рицин;

5) **скорочувальна** – у акті м'язового скорочення та розслаблення беруть участь білкові речовини. Наприклад, актин, міозин, тубулін, динеїн;

6) **структурна** – найважливішу роль відіграє колаген у сполучній тканині, кератин – у волоссі, нігтях, шкірі, еластин – у судинній стінці та ін. Наприклад, кератин, фіброїн, колаген, еластин, протеоглікани, мукопротеїни;

7) **гормональна** – обмін речовин в організмі регулюється різноманітними механізмами. У цій регуляції важливе значення мають гормони (білкової чи пептидної природи), які виробляються залозами внутрішньої секреції. Наприклад, інсулін, гормон росту, кортикотропін;

8) **сигнальна** – через білки передаються сигнали та спрямовуються у внутрішньоклітинні центри. При цьому подразники (хімічні чи механічні) обумовлюють певні зміни у структурі білків, що є своєрідною реакцією на зовнішнє подразнення (принцип діяльності нервової системи). Наприклад, родопсин;

9) **транспортна** – дихальна функція крові, зокрема перенесення кисню, здійснюється молекулами гемоглобіну. У транспортуванні ліпідів бере участь альбумін сироватки крові. Наприклад, гемоглобін, сироватковий альбумін, міоглобін,  $\beta_1$ -ліпопротеїн.

### **Якісні (кольорові) реакції**

Наявність білка в досліджуваному матеріалі можна виявити за допомогою кольорових реакцій. Ці реакції можна розподілити на дві групи: 1) *загальні*, що обумовлені наявністю пептидного зв'язку, вільних  $\alpha$ -амінних груп; 2) *специфічні*, що обумовлені наявністю у білках окремих амінокислот, здатних давати кольорові реакції (див. лабораторну роботу №1).

Індивідуальні білки розрізняються за фізико-хімічними властивостями, такими як: форма молекули; молекулярна маса; сумарний заряд, величина якого залежить від співвідношення аніонних і катіонних груп амінокислот; співвідношення полярних і неполярних радикалів амінокислот на поверхні молекул; ступінь стійкості до впливу різних агентів, що викликають денатурацію.

Розчинність білків залежить: від указаних вище властивостей білків; від складу середовища, в якому білок розчиняється (значення рН, сольового складу, температури, наявності інших органічних речовин, здатних взаємодіяти з білком).

### **Реакції осадження білків**

**Висолювання білків** – це зворотний процес коагуляції та осадження білків іонами солей лужних і лужноземельних металів. Використовують NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>. Різні білки випадають в осад при різній концентрації солі в розчині. Поступово підвищуючи концентрацію солі, можна отримати низку окремих фракцій із вмістом білка. Білки з найменшою розчинністю випадають в осад при невеликій концентрації солей.

У водному розчині білкові молекули заряджені та гідратовані, що забезпечує стійкість білкових розчинів. При високій концентрації солей, іони яких також гідратовані, відбувається руйнування водних оболонки білкових молекул у результаті конкуренції за воду іонів солей. Окрім того, іони солей з протилежним, ніж у білка, зарядом адсорбуються на поверхні білкової молекули, внаслідок чого частинки білка стають електронейтральними, що знижує їх стійкість у розчині. При розбавленні водою білкових розчинів, які коагулювали під впливом солей лужних металів, отримані за допомогою

висолювання, можуть бути знову розчинені після зменшення концентрації солей. Отже, висолювання білків є **оборотним процесом**.

Метод висолювання широко застосовується для фракціонування суміші білків, коли треба відокремити один білок від іншого (наприклад, альбуміни від глобулінів). Грубодисперсні білки – глобуліни – висолюються значно легше, ніж альбуміни, напівнасиченим розчином амоній сульфату, тоді як альбуміни – насиченим розчином амоній сульфату.

**Денатурація білків** – це незворотний процес коагуляції та осадження білків. Найчастіше всього використовують ацетон, етанол, хлороформ. Денатурація супроводжується руйнуванням четвертинної, третинної, а іноді і вторинної структури білкової молекули, що виникає при руйнуванні дисульфідних і слабких типів зв'язків, які беруть участь в утворенні цих структур. Первинна структура при цьому зберігається, оскільки вона сформована міцними ковалентними зв'язками. Руйнування первинної структури може відбутися тільки в результаті гідролізу білкової молекули тривалим кип'ятінням у розчині кислоти чи луку.

Денатурацію білків зумовлюють фізичні та хімічні чинники.:

**Фізичні чинники:**

1) високі температури: для різних білків характерна різна чутливість до теплового впливу. Частина білків піддається денатурації вже при 40-50 °С. Такі білки називають **термолабільними**. Інші білки денатурують при набагато вищих температурах, вони є **термостабільними**;

2) механічний вплив (вібрація);

3) рентгенівське, радіоактивне опромінення;

4) ультразвук;

5) ультрафіолетове опромінення.

**Хімічні чинники:**

1) концентровані кислоти: трихлороцтова кислота, нітратна кислота, хлоридна кислота; луги.

2) органічні розчинники (ацетон, етанол, хлороформ);

3) рослинні алкалоїди;

4) сечовина у високих концентраціях;

5) солі важких металів (купрум сульфат, плюмбум ацетат).

**Величина заряду білків** – чинник, що підвищує розчинність білків. При втраті заряду в ізоелектричній точці білки легше агрегують і випадають в осад, що особливо характерно для денатурованих білків, у яких на поверхні з'являються гідрофобні радикали амінокислот.

На поверхні білкової молекули є як позитивно, так і негативно заряджені радикали амінокислот. Кількість цих груп, а також сумарний заряд білків залежить від рН середовища, тобто зі співвідношення концентрації  $H^+$  та  $OH^-$  груп.

У кислому середовищі збільшення концентрації  $H^+$  призводить до пригнічення дисоціації карбоксильних груп  $COO^- + H^+ \rightarrow COOH$  і зменшення негативного заряду білків.

У лужному середовищі зв'язування надлишку  $\text{OH}^-$  із протонами, які утворюються при дисоціації аміногруп  $-\text{NH}_3^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$  з утворенням води, обумовлює зменшення позитивного заряду білків.

**Білки кислого характеру** (альбуміни, глобуліни) у водному розчині несуть негативний заряд; **білки основного характеру** (протаміни, гістони) – позитивний заряд. Наявність заряду на макромолекулі білка стабілізує його в розчині, тому перешкоджає злипанню білкових часток та випаданню їх в осад.

Для збереження нативності білкової молекули її заряд можна усунути тільки одним способом: наблизити рН середовища до ізоелектричної точки білка (ІЕТ), яка для більшості білків організму людини знаходиться у слабкокислому середовищі.

**Ізоелектрична точка (ІЕТ)** – значення рН, при якому білок має сумарний нульовий заряд, тобто є електронейтральним. В ІЕТ кількість позитивно та негативно заряджених груп однакова, тобто білок знаходиться в ізоелектричному стані.

### ? Питання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте особливості будови амінокислот та наведіть їх класифікацію.
2. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості амінокислот.
3. Охарактеризуйте первинну, вторинну, третинну, четвертинну структуру білків. Перелічіть характерні для них типи зв'язків. Наведіть приклади білків. Напишіть реакцію утворення дипептиду на прикладі двох різних амінокислот, дайте назву пептиду.
4. Наведіть класифікацію білків і перелічіть їх функції.
5. Опишіть методики якісних реакцій на амінокислоти.
6. Опишіть методику проведення висолювання білка, денатурації білка.
7. Опишіть методику визначення ізоелектричної точки білка.

### Тема 3

## ВИДІЛЕННЯ, ОЧИСТКА, РОЗДІЛЕННЯ АМІНОКИСЛОТ І БІЛКІВ

*«Світ найбільш складного – життя».*

*М.М. Семенов*



Для дослідження фізико-хімічних, біологічних властивостей білків, вивчення їх хімічного складу, структури необхідною умовою є отримання білків у хімічно чистому, гомогенному стані.

Послідовність операцій із виділення білків:

- 1) подрібнення біологічного матеріалу (гомогенізація);
- 2) виділення білків з гомогенату (перехід їх у розчинений стан);
- 3) виділення досліджуваного білка із суміші інших (очистка та розділення індивідуального білка).

Операції із виділення білків проводять у «м'яких» умовах при низькій температурі (не вище 4 °С). При підвищенні температури білки піддаються денатурації (втрачають нативні властивості, зокрема розчинність і біологічну активність).

Виділення індивідуальних білків є ступінчастим процесом, тому на перших етапах очистки фракції містять безліч домішок. На кожному етапі поділу має утворюватися фракція, яка містить більшу кількість необхідної речовини, ніж попередня. Такий процес називається **фракціонуванням**.

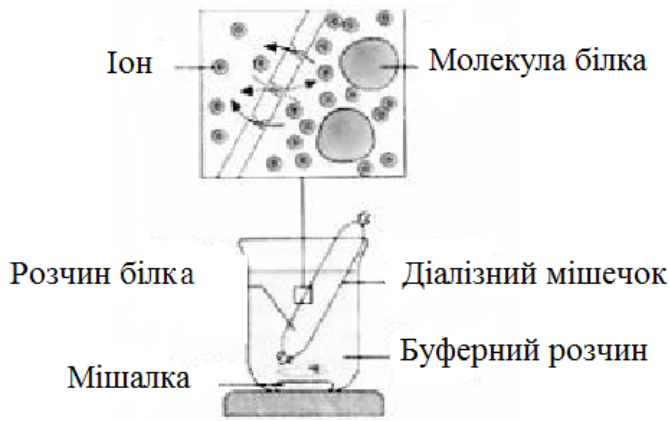
На кожній стадії розділення білок повинен перебувати або у вигляді розчину, або у вигляді осаду.

Для осадження за допомогою дегідратації необхідно знизити розчинність білка. Вона залежить від здатності білків до гідратації. У глобулярних водорозчинних білках високий рівень гідратації забезпечується розміщенням гідрофільних груп на поверхні. Додавання органічних розчинників знижує ступінь гідратації та зумовлює осадження білка. Як розчинник використовують ацетон. Осаджують білки також за допомогою солей (наприклад, амоній сульфату). Цей метод ґрунтується на тому, що при підвищенні концентрації солі в розчині відбувається стиснення іонних атмосфер, утворених противоіонами білка, що сприяє зближенню їх до критичної відстані. Це зумовлює злипання білкових частинок та їх випадання в осад.

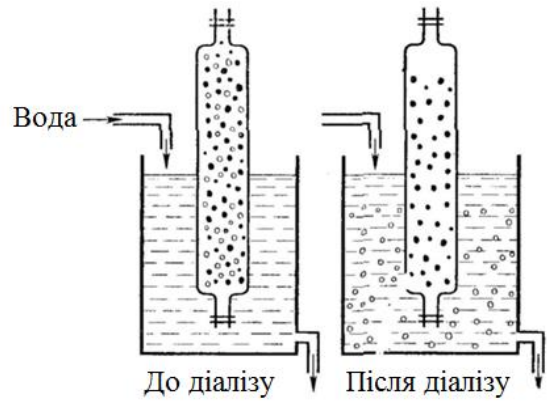
**Діаліз** – метод очистки білків від низькомолекулярних домішок (солей). Він ґрунтується на використанні мембран, проникних для води та низькомолекулярних речовин (солей), але непроникних для білків. Найчастіше з цією метою використовують плівки з целофану – нітрат целюлозу (рис. 23 а).

Розчин білка поміщають у мішок з целофану та занурюють у посуд з водою (рис. 23 б). Безперервний струм води пропускають крізь посуд з білком. Білок залишається всередині целофанового мішечка, а домішки – в буферному розчині.





а



б

Рисунок 23 – Діаліз: а – схема діалізу; б – особливості процесу очистки розчину білка до і після діалізу

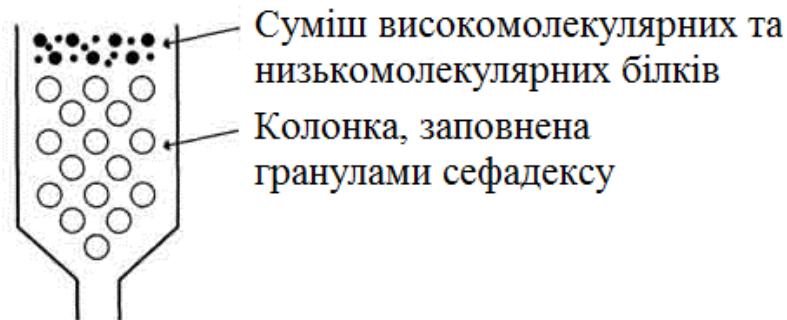
**Гель-фільтрація** – метод молекулярного просіювання молекул білка крізь гранули сефадексу, що збільшуються в об’ємі (тримірні полісахаридні ланцюги декстрану, які мають пори).

Швидкість проходження білків крізь колонку, заповнену сефадексом, залежатиме від їх молекулярної маси (рис. 24 а, б, в).

Через колонку, заповнену гранулами сефадексу, пропускають суміш високомолекулярних і низькомолекулярних білків (рис. 24 а).

Низькомолекулярні білки проникають у гранули сефадексу, висомолекулярні проходять між гранулами. Крупні молекули білка не проникають усередину гранул (рис. 24 б).

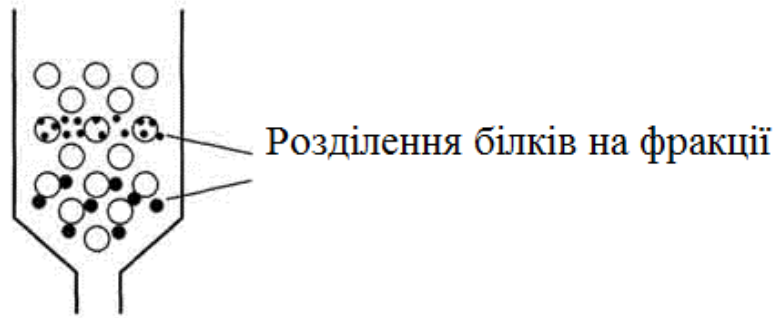
На останньому етапі відбувається розділення білків на фракції (рис. 24 в).



а



б



в

Рисунок 24 – Гель-фільтрація на колонці із сефадексом: а – I етап; б – II етап; в – III етап

**Центрифугування** – метод розділення білків за молекулярною масою фракцій білків під час центрифугування (рис. 25).

При обертанні ротора центрифуги швидкість зсідання білків пропорційна їх молекулярній масі: більш важкі білки утворюють фракції на дні пробірки, більш легкі – на поверхні.

При центрифугуванні осад білка, який випав, можна виділити фільтруванням.

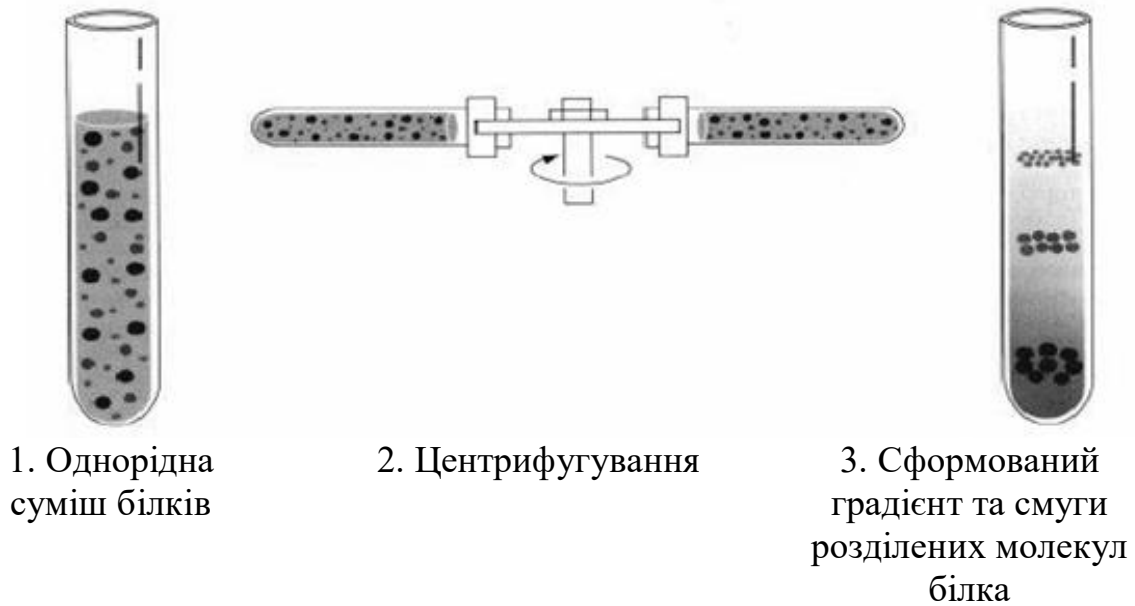


Рисунок 25 – Центрифугування суміші білків

**Електрофорез** – метод, в основі якого лежить різниця у швидкості руху білків в електричному полі. Електрофорез білків проводять на папері (швидкість руху білків пропорційна тільки їх заряду) або в поліакриламідному гелі, що має пори певного розміру (швидкість руху білків пропорційна їх заряду та молекулярній масі) (рис. 26).



Амінокислоти, які розчиняються в органічному розчиннику краще, просуваються вздовж хроматографічного паперу далі; ті ж, які розчиняються в ньому гірше, проходять від місця нанесення коротший шлях.

Для кожної амінокислоти характерний свій коефіцієнт швидкості руху –  $R_f$ , який легко визначити практично за формулою:

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

де  $a$  – відстань від лінії старту до середини плями (мм);

$b$  – відстань від лінії старту до лінії фінішу (мм).

$R_f$  постійний для цих умов досліду; використовується при ідентифікації речовин. Для цього порівнюють  $R_f$  амінокислот суміші, що досліджують, з  $R_f$  відомих стандартних амінокислот. Наприклад, значення  $R_f$  для гліцину ( $R_f = 0,23$ ), аланіну ( $R_f = 0,3$ ), валіну ( $R_f = 0,51$ ), лейцину ( $R_f = 0,7$ ).

**Іонно-обмінна хроматографія** – метод фракціонування, що ґрунтується на зв'язуванні іонізованих груп білків з протилежно зарядженими групами іонно-обмінних нерозчинних полімерів (рис. 28). Міцність зв'язування білка зі смолою пропорційна його заряду. Білки, адсорбовані на іонно-обмінному полімері, можливо змивати концентраціями NaCl, які збільшуються. Чим менший заряд білка, тим менша концентрація NaCl необхідна, щоб змити білок, прикріплений до іоногенних груп смоли.

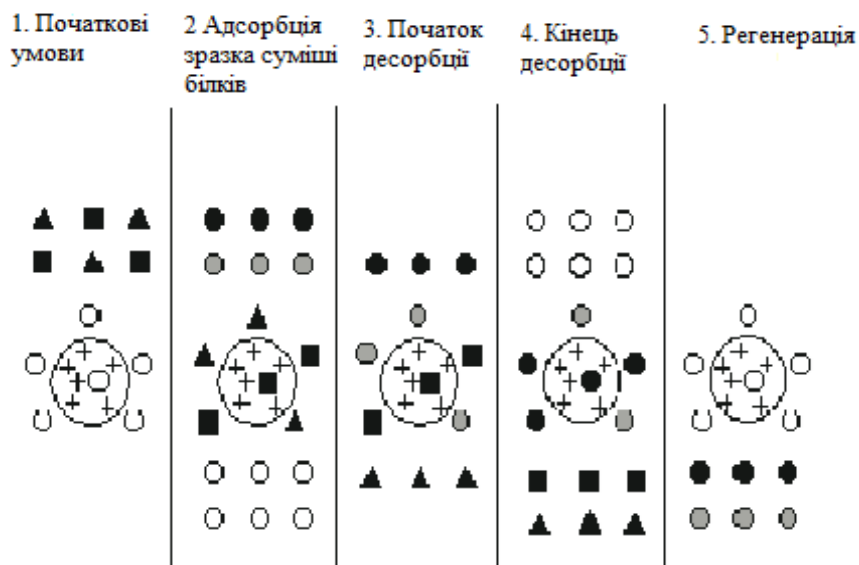


Рисунок 28 – Іонно-обмінна хроматографія: прозорі кружечки – початкові буферні протіюни; чорні квадратики та чорні трикутники – суміш білків, яку розділяють; чорні та сірі кружечки – градієнт-іони; 1-5 – етапи іонно-обмінної хроматографії

**Афінна хроматографія** – специфічний метод виділення індивідуальних білків. До інертного полімеру ковалентно приєднується ліганд будь-якого білка (рис. 29). При пропусканні розчину білків крізь колонку з полімером

за рахунок комплементарного зв'язування білка з лігандом на колонці адсорбується тільки специфічний для цього ліганду білок.



Рисунок 29 – Афінна хроматографія

### ? Питання для самоконтролю

1. Назвіть і охарактеризуйте методи виділення білків.
2. Назвіть і охарактеризуйте методи очистки білків.
3. Назвіть і охарактеризуйте методи розділення амінокислот і білків.

Під час самостійного вивчення теми №3 необхідно ознайомитися із класифікацією білків, їх будовою та властивостями; детально розглянути методи визначення структури білків (аналіз N- та C-кінцевих амінокислотних залишків, фрагментація поліпептидного ланцюга й розділення пептидних фрагментів, визначення амінокислотних послідовностей у пептидах); акцентувати увагу на процесах виділення та фракціонування білків; розглянути хроматографічні методи розділення суміші білків та амінокислот; засвоїти принципи кількісного визначення концентрації білка біуретовим методом, методом Лоурі, методом Бредфорда.

## Тема 4 БІОХІМІЯ ФЕРМЕНТІВ

«Сучасна біологія говорить мовою ензимології».

О.Є. Браунштейн



**Ферменти** – специфічні органічні каталізатори, що синтезуються живими клітинами і прискорюють протікання біохімічних реакцій в організмі. Вони є білками (Дж. Самнер, 1926) з різними молекулярними масами: від 9 кДа (АОМ) до 1000 кДа. Кожен фермент каталізує певну хімічну реакцію.

Ферменти синтезуються клітинами організму, що можуть містити до 1000 різних ферментів; виявляють високу ефективність і специфічність; діють у звичайних умовах ( $t = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$ , але є деякі винятки).

Ферменти містяться в ядрі, у внутрішній мембрані мітохондрій, лізосомах, цитоплазмі, матриксі мітохондрій, плазматичній мембрані.

За своєю хімічною природою ферменти бувають *простими* та *складними*.

Прості ферменти складаються тільки з білкової частини – *апоферменту*.

Складні ферменти складаються з білкової частини – *апоферменту* та небілкової частини – *коферменту* (вітаміни, нуклеотиди, залізопорфіринові структури та ін.); складні ферменти називаються *холоферментами*.

Коферменти можуть бути переносниками Гідрогену й електронів; переносниками угруповань; речовинами, які беруть участь у синтезі та розриві карбон-карбонових зв'язків (C–C).

У структурі ферменту виділяють такі центри:

1) **активний центр ферменту** – центр, утворений із залишків амінокислот, що знаходяться у складі різних ділянок поліпептидного ланцюга або різних поліпептидних ланцюгів, просторово зближених (рис. 46). Утворюється на рівні третинної структури білка-ферменту.

Активний центр має у своїй структурі *субстратний (адсорбційний)* та *каталітичний центри*. Відповідно визначає специфічність ферменту й каталітичну активність.

**Субстратний (адсорбційний) центр ферменту** – область активного центру ферменту, що безпосередньо бере участь у процесах зв'язування субстрату з ферментом та передачі цього комплексу в зручному положенні на каталітичний центр (рис. 30).

**Субстрат** – речовина, на яку діє фермент. Субстрат прикріплюється до ферменту за рахунок слабких типів зв'язків між певними бічними радикалами амінокислотних залишків і відповідними групами молекули субстрату, тому реакція є *зворотною*.

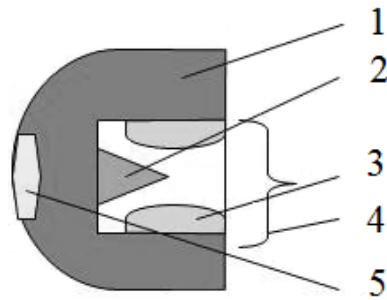


Рисунок 30 – Будова ферменту: 1 – апофермент; 2 – каталітичний центр; 3 – субстратний центр; 4 – активний центр; 5 – алостеричний центр

Структура субстратного (адсорбційного) центра визначає *субстратну специфічність ферменту*.

**Каталітичний центр ферменту** – область активного центру ферменту, що безпосередньо бере участь у хімічних перетвореннях субстрату (рис. 46). Формується каталітичний центр за рахунок радикалів 2-х або 3-х амінокислот, розташованих у різних місцях поліпептидного ланцюга ферменту, але просторово зближених між собою за рахунок вигинів цього ланцюга.

2) **алостеричний центр ферменту** – область ферменту, яка знаходиться поза активним центром ферменту і де відбувається зв'язування слабкими типами зв'язків (зворотно) з тією чи іншою речовиною. Це зв'язування зумовлює конформаційну перебудову молекули ферменту, що поширюється й на активний центр, полегшуючи чи ускладнюючи (сповільнюючи) його роботу. Відповідно такі речовини називаються *алостеричними активаторами* або *алостеричними інгібіторами* даного ферменту.

Алостеричні центри знайдені не у всіх ферментів. Вони є у ферментах, робота яких може змінюватися під дією гормонів, медіаторів та інших біологічно активних речовин.

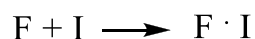
**Інгібітори** – речовини, що знижують активність ферментів і сповільнюють хімічні реакції.

Розрізняють *оборотне* та *необоротне інгібування*.

Якщо інгібітор зв'язується з молекулою ферменту слабкими зв'язками, то такий інгібітор можна легко відділити; активність ферменту відновлюється:



Якщо інгібітор зв'язується з молекулою ферменту міцними ковалентними зв'язками, то відбувається необоротне пригнічення активності ферменту; активність ферменту не відновлюється:



Необоротне інгібування відбувається при денатурації ферментів-білків під дією концентрованих кислот, лугів, солей важких металів, ультрафіолетового випромінювання.

Деякі інгібітори утворюють міцні зв'язки, що не дисоціюють, з функціональними групами в активних центрах ферментів. Наприклад, ціаніди

зв'язуються із Ферумом у ферментах-гемопротеїнах. Фосфороорганічні отрути (зарин, табун) утворюють міцні зв'язки із залишками серину, треоніну, що входять до складу багатьох ферментів.

Оборотне інгібування буває *конкурентне* та *неконкурентне*.

**Конкурентне інгібування** відбувається в присутності речовини, яка структурно подібна до субстрату та взаємодіє з активним центром ферменту.

Наприклад, малонова кислота є конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази, оскільки подібна до бурштинової кислоти (також містить дві карбоксильні групи); тому малонова кислота легко зв'язується з активним центром сукцинатдегідрогенази, витісняючи звідти субстрат – бурштинову кислоту. Однак фермент не здатний це зробити з малоною кислотою, яка коротша на 1 атом Карбону. Якщо додати малонову кислоту в концентрації, що перевищує концентрацію бурштинової кислоти, реакція припиниться, оскільки малонат блокує активний центр сукцинатдегідрогенази.

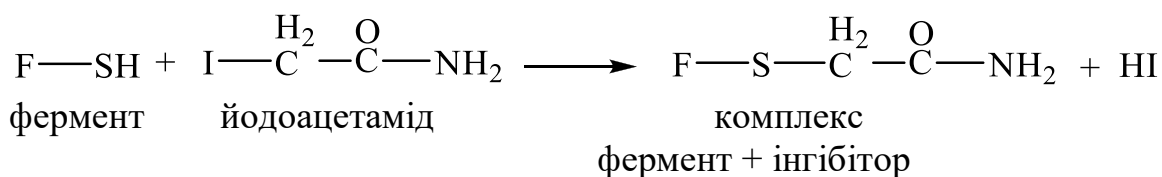
Конкурентні інгібітори досить часто використовують як лікарські засоби.

Наприклад, антимікробні препарати сульфаніламідів є структурними аналогами *p*-амінобензенової кислоти, з якої мікроорганізми синтезують необхідний їм для розмноження вітамін В<sub>9</sub> (фолієву кислоту). Багато антибіотиків конкурентно пригнічують синтез білка мікроорганізмами чи реплікацію ДНК. Протипухлинні препарати (метотрексат, антагоніст вітаміну В<sub>9</sub>) блокують реплікацію ДНК у пухлинних клітинах.

**Неконкурентні інгібітори** не мають структурної подібності із субстратом і приєднуються не до активного центру, а до інших частин ферменту (наприклад, до алостеричного центру). Інгібування відбувається внаслідок руйнування або необоротної хімічної модифікації функціональних груп ферментів.

Наприклад,

а) алкілюючі агенти (йодоацетамід) необоротно реагують з SH-групами ферментів:



б) препарати фосфорорганічних сполук – це високотоксичні отрути для комах і теплокровних тварин. Вони взаємодіють з гідроксигрупою серину в активному центрі ферменту ацетилхолінестерази.

в) тетурам – інгібітор ацетальдегіддегідрогенази, використовується при лікуванні алкоголізму.

Отже, розрізняють такі види інгібування (рис. 31).



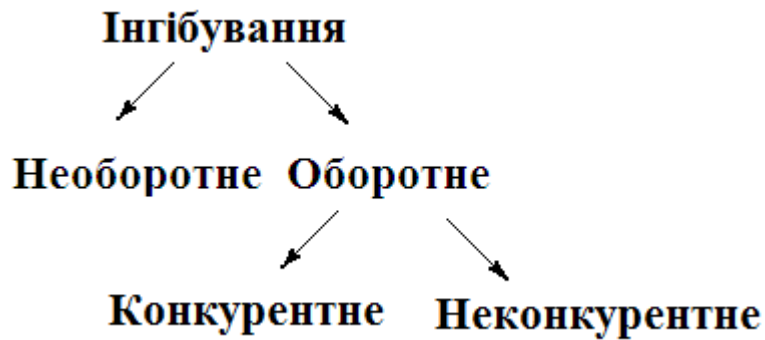


Рисунок 31 – Види інгібування активності ферментів

### Механізм дії ферментів та основні етапи ферментативної реакції

Схематичне зображення механізму дії ферментів та основних етапів ферментативної реакції подано на рис. 32.

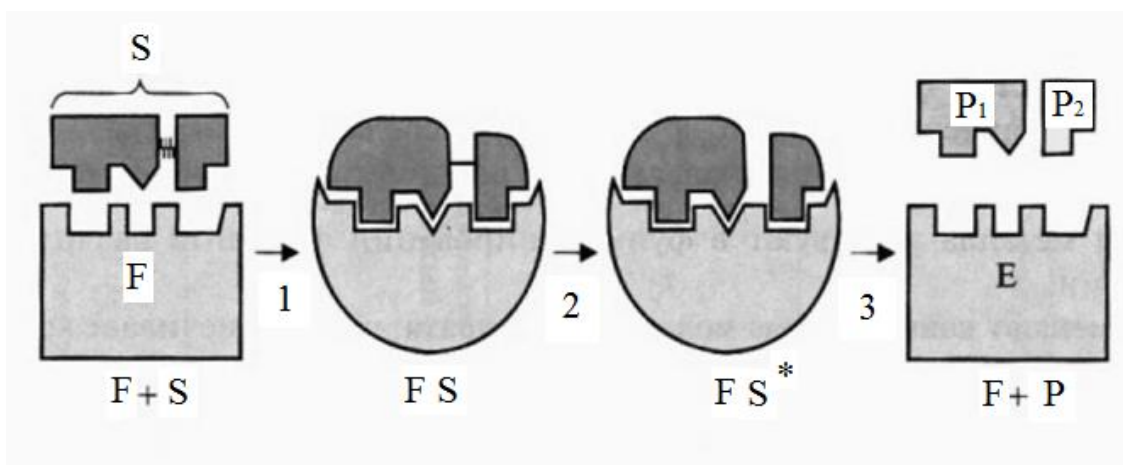


Рисунок 32 – Схематичне зображення механізму дії ферментів та основних етапів ферментативної реакції (1, 2, 3 етапи)

1) На 1-му етапі відбувається сорбція субстрату на субстратному (адсорбційному) центрі ферменту, що супроводжується утворенням зворотного фермент-субстратного комплексу ( $F \cdot S$ ) (рис. 48).

Субстрат піддається конформаційній перебудові, що відбувається за рахунок виникнення слабких типів зв'язків між субстратом і субстратним (адсорбційним) центром ферменту. У результаті цього молекула субстрату подається на каталітичний центр у найбільш зручному для нього положенні.

Кінетична характеристика 1-го етапу ферментативного каталізу – константа Міхаеліса ( $K_m$ ).

2) На 2-му етапі відбуваються хімічні перетворення молекули субстрату у складі фермент-субстратного комплексу ( $F \cdot S$ ) з утворенням комплексу ферменту з хімічно перетвореним субстратом ( $F \cdot S^*$ ).

На 2-му етапі розриваються одні ковалентні зв'язки й утворюються нові. Цей етап протікає значно повільніше, ніж 1-й і 3-й. Швидкість 2-го етапу визначає швидкість усієї ферментативної реакції. Швидкість ферментативного процесу в цілому характеризується величиною  $k_{+2}$ , що майже завжди є найменшою з усіх констант швидкостей. Цей етап незворотний. Кінетична

характеристика 2-го етапу ферментативного каталізу – максимальна швидкість ( $V_{max}$ ).

3) На 3-му етапі відбувається десорбція продукту реакції та вивільнення ферменту в незмінному вигляді. Цей етап протікає легше, ніж 2-й і так само є незворотним.

### Кінетика ферментативної реакції (ферментативного каталізу)

Етапи й кінетику ферментативної реакції (ферментативного каталізу) подано на рис. 49.

Кожен етап взаємодії субстрату з ферментом характеризується своїми константами швидкості як прямої, так і зворотної реакції (рис. 33).

Будь-яка біохімічна реакція характеризується швидкістю процесу.

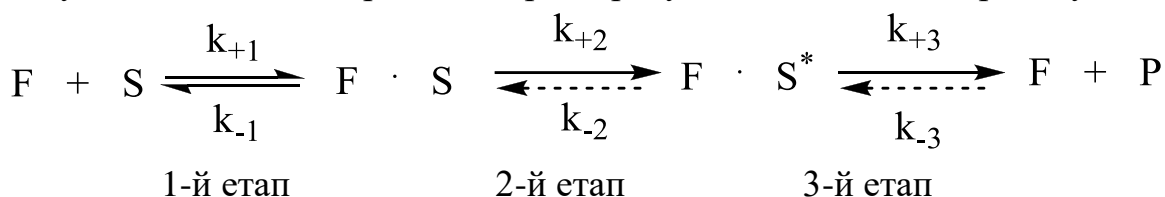


Рисунок 33 – Етапи й кінетика ферментативної реакції (ферментативного каталізу): F – фермент; S – субстрат; F · S – фермент-субстратний комплекс; F · S\* – активний фермент-субстратний комплекс; P – продукт;  $k_{+1}$ ,  $k_{+2}$ ,  $k_{+3}$  – константи швидкості 1, 2, 3 етапів прямої реакції;  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ ,  $k_{-3}$  – константи швидкості 1, 2, 3 етапів зворотної реакції

Швидкість хімічної реакції пропорційна концентрації речовин, що реагують (закон діючих мас). Цей закон також застосовують і для ферментативних реакцій, але з певними обмеженнями.

Зі збільшенням концентрації субстрату [S] зростає швидкість (V) ферментативної реакції (рис. 34).

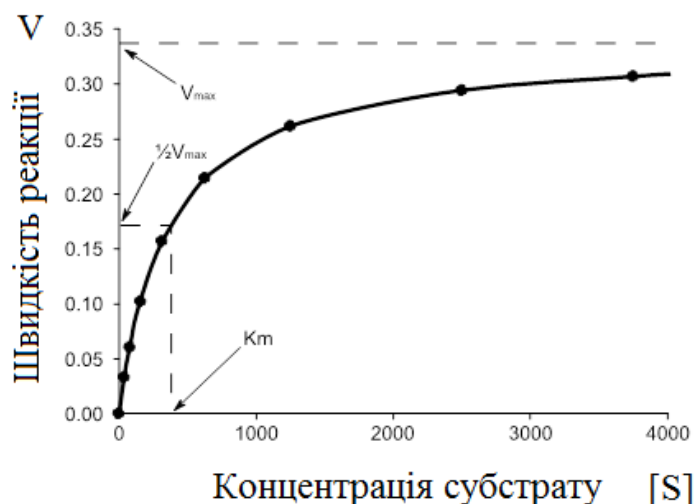


Рисунок 34 – Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату (крива Міхаеліса)

При постійних кількостях ферменту швидкість реакції дійсно пропорційна концентрації субстрату, але тільки в зонах низьких концентрацій.

При високих концентраціях субстрату відбувається *насичення ферменту субстратом*, тобто настає момент, коли всі молекули ферменту задіяні в каталітичному процесі та приросту швидкості реакції не відбувається.

Швидкість реакції виходить на максимальний рівень ( $V_{\max}$ ) і надалі вже не залежить від концентрації субстрату. Залежність швидкості реакції від концентрації субстрату необхідно визначати в частині кривої, нижчій від  $V_{\max}$ . Технічно легше визначити не максимальну швидкість, а  $\frac{1}{2} V_{\max}$ . Цей параметр є головною характеристикою ферментативної реакції, він дає можливість визначити константу Міхаеліса ( $K_m$ ) (рис. 34).

Рівняння залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату має вигляд:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad (1)$$

де  $V$  – швидкість реакції;  $V_{\max}$  – максимальна швидкість;  $K_m$  – константа Міхаеліса;  $S$  – концентрація субстрату

$$V = k_{+1} \cdot [F] \cdot [S] \quad (2)$$

**Константа Міхаеліса ( $K_m$ )** – відношення суми констант швидкості розкладу фермент-субстратного комплексу до константи швидкості утворення фермент-субстратного комплексу.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (3)$$

$$K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s \quad (4)$$

Ця константа визначає спорідненість ферменту із субстратом. Чим нижча константа Міхаеліса-Ментена, тим вища спорідненість ферменту із субстратом і тим вища швидкість ферментативної реакції. За величиною  $K_m$  каталітичні реакції можна розподілити на *швидкі* ( $K_m$   $10^{-6}$  моль/л та менше) та *повільні* ( $K_m$   $10^{-2}$  до  $10^{-6}$  моль/л).

Константа Міхаеліса ( $K_m$ ) прирівнюється до константи дисоціації ( $K_s$ ).

Розрізняють субстратну специфічність і специфічність дії.

**Субстратна специфічність** – здатність ферменту взаємодіяти лише з одним або декількома певними субстратами.

1) *абсолютна субстратна специфічність* – здатність ферменту каталізувати перетворення тільки одного, строго визначеного субстрату (лактаза, сахараза, мальтоза, уреаза);

2) *відносна субстратна специфічність* – здатність ферменту каталізувати перетворення декількох субстратів, подібних за будовою (пептидаза, естераза, глікозидаза);

3) *стереоспецифічність* – здатність ферменту каталізувати перетворення визначених стереоізомерів субстрату (лактатдегідрогеназа).

**Специфічність дії** – це здатність ферменту каталізувати тільки визначений тип хімічної реакції.

### **Вплив чинників (температури, рН середовища) на кінетику ферментативної реакції**

Зі збільшенням температури каталітична активність ферменту зростає (рис. 35). Максимальна каталітична активність відзначається при  $t = 37-38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (оптимум температури для більшості ферментів). Досягнувши  $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , каталітична активність знижується.

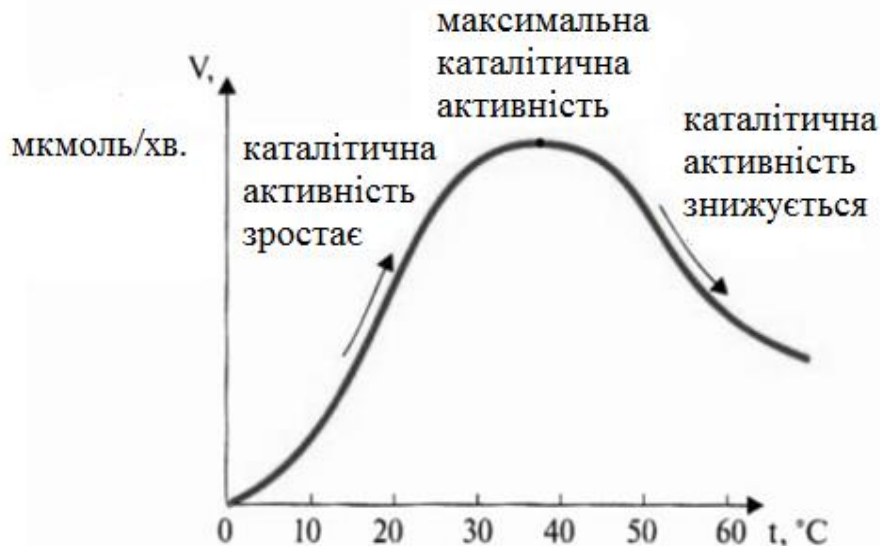


Рисунок 35 – Залежність швидкості ферментативної реакції від температури

Залежність активності ферментів від температури називається **термолабільністю**. Ферменти краще зберігаються при низьких температурах: їх активність знижується, але денатурація не відбувається. Ця властивість використовується в медицині для виробництва препаратів ферментів. При деяких операціях необхідно знизити швидкість обміну речовин, тоді проводять охолодження органів (наприклад, при пересадці нирок, серця та інших органів).

Для різних ферментів характерне певне рН середовища, в якому відбувається ферментативна реакція (рис. 36).

Наприклад, для пепсину (оптимум рН = 1,5-2); для трипсину (оптимум рН = 7); для лужної фосфатази (оптимум рН = 10).

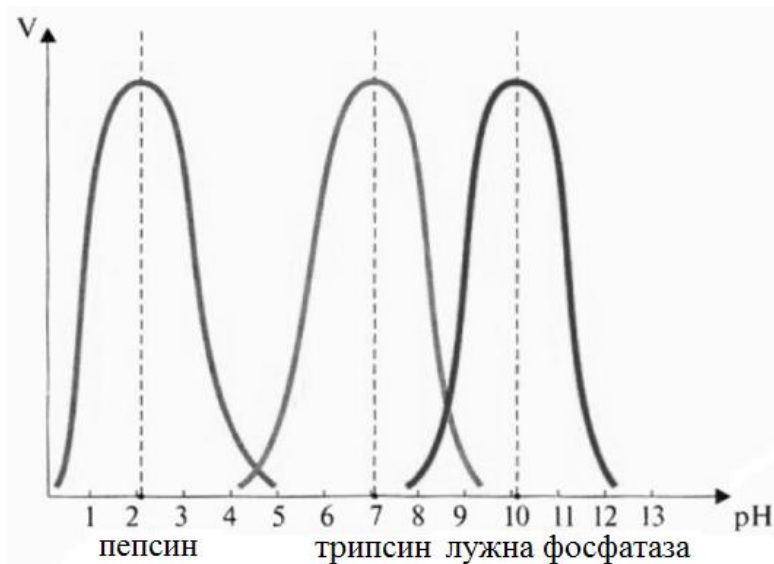


Рисунок 36 – Залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища

**Активність ферменту** – це умовна величина, що прямо пропорційна швидкості біохімічної реакції, яку каталізує певний фермент.

Швидкість ферментативної реакції можна визначити або за кількістю субстрату, що перетворився за певний проміжок часу, або за кількістю накопиченого за цей час продукту реакції (P).

У біохімічній практиці для кількісної характеристики реакцій, які каталізуються ферментами, використовують умовні величини – одиниці ферменту.

Загальноживаними є такі одиниці ферменту:

1) **юніт** (англ. *unit*, U) – це кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв. 1 Юніт (1 U) = 16,67 нкатал.

$$1 \text{ U} = 1 \text{ мкмоль S} / \text{хв}$$

2) **катал** (кат) – це кількість ферменту, що необхідна для каталітичного перетворення 1 моля субстрату за 1 с.

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль S} / \text{с}$$

3) **питома активність ферменту** – одиниця активності ферменту, що визначається кількістю одиниць ферментної активності, які припадають на 1 мг субстрату в біологічному об'єкті.

#### Номенклатура ферментів

Розрізняють систематичну, робочу та тривіальну номенклатуру ферментів:

1) *систематична номенклатура*. Назва ферменту включає хімічну назву субстрату; тип хімічної реакції (відповідно до Міжнародної класифікації ферментів); суфікс *-аза*.

Наприклад, L-Лактат: НАД<sup>+</sup>-оксидоредуктаза;

2) *робоча номенклатура*. Назва ферменту утворюється від хімічної назви субстрату з додаванням суфікса *-аза*.

Наприклад, фермент, що каталізує перетворення жиру, – ліпаза.

3) *тривіальна номенклатура*. Не дає уявлення про субстрат або тип хімічного перетворення.

Наприклад, пепсин, ренін, трипсин, тромбін.

Ферменти поділяються на 6 класів відповідно до типу реакції, яку вони каталізують (Комісія Міжнародного біохімічного союзу, 1961).

**1-й клас. Оксидоредуктази** – ферменти, які каталізують окисно-відновні реакції різних типів.

До оксидоредуктаз належать дегідрогенази – ферменти, які каталізують реакції дегідрування; оксидази та оксигенази, які окиснюють субстрати шляхом приєднання кисню; цитохроми – переносники електронів тощо.

**2-й клас. Трансферази** – ферменти, які каталізують реакції міжмолекулярного перенесення хімічних груп.

Розрізняють аминотрансферази, метилтрансферази, ацилтрансферази, фосфотрансферази, глікозилтрансферази – ферменти, які переносять амінні-, метильні-, ацильні-, фосфато-, глікозидні групи відповідно. До трансфераз належать також кінази, зокрема протейнінази – ферменти, які каталізують фосфорилування субстратів та інших білків за рахунок фосфатного залишку АТФ.

**3-й клас. Гідролази** – ферменти, які каталізують реакції гідролізу, тобто розкладання субстратів за участю молекули води. Гідролази здатні розщеплювати складноєфірні, пептидні, глікозидні та інші зв'язки – естерази, пептидази та протеази, глікозидази.

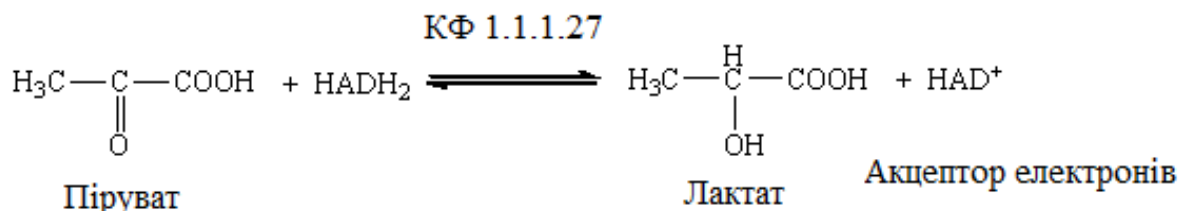
**4-й клас. Ліази** – ферменти, які каталізують реакції розриву ковалентних зв'язків між атомами С, О, N, S негідролітичним шляхом. До ліаз належать декарбоксилази – ферменти, які відщеплюють від органічних кислот карбоксильну групу у вигляді CO<sub>2</sub>; альдолази, які розщеплюють Карбон-Карбонові зв'язки з утворенням альдегідів; дегідратази, які відщеплюють від субстратів молекулу води з утворенням подвійного зв'язку.

**5-й клас. Ізомерази** – ферменти, які каталізують реакції ізомеризації субстратів (рацемізації, епімеризації, внутрішньомолекулярної оксидоредукції тощо) – рацемази, епімерази тощо.

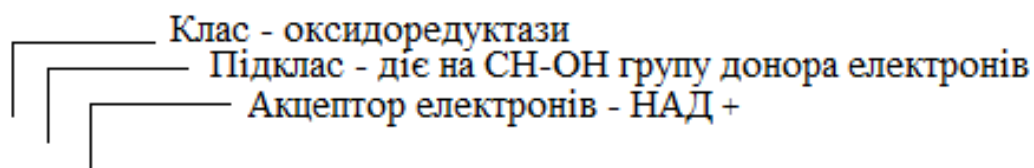
**6-й клас. Лігази (синтетази)** – ферменти, що каталізують реакції синтезу біомолекул, тобто утворення нових хімічних зв'язків за рахунок енергії АТФ.

Класи ферментів поділяються на підкласи, а ті своєю чергою – на підпідкласи, у складі яких кожному ферменту відповідає певний номер.

Наприклад, реакція відновлення пірувату до лактату.



Донор електронів



КФ 1.1.1.27 ————— Порядковий номер у підпідкласі

## **? Питання для самоконтролю**

1. Дайте визначення таких понять, як фермент, субстрат, каталіз. Наведіть приклади ферментів.
2. Наведіть класифікацію ферментів. Охарактеризуйте особливості будови простих і складних ферментів.
3. Охарактеризуйте активний (субстратний, каталітичний) та алостеричний центри ферменту.
4. Дайте визначення таких понять, як кофермент, апофермент, ізофермент. Охарактеризуйте їх роль.
5. Розкрийте механізм дії ферментів та перелічіть основні етапи ферментативної реакції.
6. Розкрийте сутність кінетики ферментативної реакції.
7. Дайте визначення поняття «активність ферменту». Що таке юніт, катал, питома активність ферменту?
8. Назвіть види специфічності ферментів.
9. Поясніть вплив чинників (температура, рН середовище) на кінетику та швидкість ферментативної реакції. Розкрийте механізм дії активаторів та інгібіторів ферментів, наведіть приклади. Охарактеризуйте види інгібування.
10. Наведіть номенклатуру ферментів.
11. Охарактеризуйте класи ферментів (оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази, лігази).

Під час самостійного вивчення теми № 4 необхідно отримати уявлення про каталіз, усвідомити його сутність; розглянути кінетику ферментативного каталізу; ознайомитися з видами оборотного й необоротного інгібування ферментів; визначити локалізацію ферментів у клітині; з'ясувати особливості класифікації ферментів.

## Тема 5 ПЕРЕТРАВЛЕННЯ БІЛКІВ ТА ЇХ ОБМІН



**Перетравлення білків** відбувається в такій послідовності:

– у ротовій порожнині немає протеїназ, відбувається механічна обробка білків;

– у шлунку при рН 1,5-2,5 гідрогенхлоридна кислота активує пепсин, пригнічує гнильні процеси; пепсин розщеплює приблизно 20% зв'язків, залишається нерозщеплена частина білка, високомолекулярні пептиди й небагато вільних амінокислот;

– у тонкому кишечнику при рН = 7,0-8,7 гідрогенхлоридна кислота взаємодіє з натрій гідрогенкарбонатом, у результаті чого утворюється натрій хлорид та гідрогенкарбонатна кислота; діють ферменти протеїнази: трипсин, хімотрипсин, карбоксипептидази панкреатичного соку, аміно- та дипептидази кишкового соку; трипсин розщеплює приблизно 30% зв'язків, у результаті чого утворюються високомолекулярні пептиди, дипептиди та вільні амінокислоти; хімотрипсин розщеплює приблизно 50% зв'язків, у результаті чого залишається небагато пептидів, дипептидів та вільні амінокислоти; карбокси-, аміно- та дипептидази розщеплюють інші пептидні зв'язки;

– у товстому кишечнику діють аеробні та анаеробні мікроорганізми, найпростіші та ферменти бактеріального походження; відбувається «гниття» розщепленого білка, тобто гідроліз білка, декарбоксілювання, дезамінування та переамінування. Кінцеві продукти гниття отруйні, мають неприємний запах (фенол, крезол, індол, скатол та ін.). Частина цих речовин інактивується в печінці за участю специфічних ферментів.

Харчові амінокислоти, які утворюються при перетравленні білків з кров'ю, транспортуються до різних органів і тканин, де використовуються для синтезу білків. Наприклад, в організмі дорослої людини щодоби синтезується 1,3 г білка на 1 кг маси (в середньому 90-100 г). Харчові амінокислоти становлять лише 1/4 частину. Це свідчить про те, що в тканинах організму білки піддаються постійному оновленню.

Різні білки оновлюються з різною швидкістю (наприклад, активність інсуліну становить 20-30 хв, білків слизової кишечника – 2-4 доби, гемоглобін – 100-120 діб, колагену – 6-8 місяців).

Молекули білків піддаються дії тканинних пептидогідролаз і руйнуються до вільних амінокислот за схемою: білок → високомолекулярні поліпептиди → низькомолекулярні поліпептиди → амінокислоти. Останні всмоктуються в кров і транспортуються до всіх клітин тканин. Білковий обмін координує та інтегрує більшість хімічних перетворень в організмі.

Процеси обміну білків в організмі людини регулюються за участю певних гормонів. Наприклад, соматропін підсилює синтетичні процеси білка; тироксин підвищує швидкість біосинтезу білків; інсулін забезпечує домінування синтезу білків над їх розкладом; адреналін підвищує швидкість розщеплення білків у



тканинах та виділення нітрогеновмісних продуктів обміну із сечею; кортизон гальмує синтез білків, посилює їх розклад та виділення нітрогеновмісних продуктів обміну із сечею; тестостерон стимулює біосинтез білка в м'язовій тканині, зумовлюючи накопичення в організмі нітрогену.

До кетогенних амінокислот належать: Лей, Ліз.

До глюкогенних амінокислот належать: Глі, Ала, Вал, Сер, Тре, Про, Цис, Асп, Глу, Мет, Арг, Гіс.

У результаті обміну білків частина амінокислот піддається розкладу, тобто відбувається дезамінування або переамінування.

При розкладі амінокислот утворюються три кінцеві продукти:  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ .  $H_2O$  і  $CO_2$  безпечні для клітин та організму в цілому, а  $NH_3$  має токсичну дію (у людини і тварин він вражає нервовому систему).

В організмі є декілька шляхів знешкодження амоніаку:

1) синтез сечовини (орнітиновий цикл) – основний шлях знешкодження  $NH_3$  в присутності амінокислоти – орнітин;

2) синтез амідів аспарагінової та глютамінової кислот – додатковий шлях знешкодження  $NH_3$ ; особливо активний у нервовій та м'язовій тканинах, а також у нирках;

3) утворення амонійних солей – у тканинах нирок  $NH_3$  з органічними та неорганічними кислотами утворює нейтральні та кислі солі, що виділяються із сечовиною.

Таким чином, продуктами розкладу білків та амінокислот є небілкові нітрогеновмісні сполуки: сечовина, деякі амінокислоти та солі амонію.

### **? Питання для самоконтролю**

1. Як відбувається перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті? Поясніть дію протеолітичних ферментів, їх специфічність. Що зумовлює активацію ферментів?

2. Які гормони беруть участь у регуляції процесів обміну білків в організмі?

3. Охарактеризуйте загальні шляхи розкладання амінокислот в організмі (дезамінування, декарбоксілювання, переамінування). Наведіть приклади реакцій.

4. Розкрийте сутність орнітинового циклу. Укажіть послідовність процесів циклу сечовини. Які ферменти беруть у ньому участь?

5. Назвіть шляхи перенесення амоніаку в печінку та нирки з периферичних тканин і м'язів. Поясніть, яким чином відбувається виведення амінного азоту з організму.

6. Надайте класифікацію живих організмів за виведенням амінного азоту.

Під час самостійного вивчення теми № 5 необхідно отримати уявлення про перетравлення білків та їх обмін, усвідомити його сутність; розглянути сутність орнітинового циклу; ознайомитися з класифікацією живих організмів за виведенням амінного азоту.