



ПЕПТИДИ И БЕЛЪЧНИ ВЕЩЕСТВА (ПРОТЕИНИ)

Биологични (протеиногенни) α -аминокиселини. Принципи при синтеза на полипептиди (пример: карбобензокси-метод). Класификация и строеж на белтъчните вещества (протеините).

1. Аминокиселини – класификация и номенклатура

Видове. Според отдалечеността на аминогрупата спрямо карбоксилната група те са: α -аминокиселини, β -аминокиселини, γ -аминокиселини и т. н. Биологичните (протеиногенните) аминокиселини спадат към реда на α -аминокиселините. Обикновено се използват техните тривиални наименования и съответните трибуквени съкращения. Наименованията им по *IUPAC* се съставят по правилата на заместителната номенклатура. В Таблица 1 са изброени най-важните аминокиселини и техните наименования¹.

2. Синтез на аминокиселини

(1) **Рацемични α -аминокиселини.** Получават се от α -халогенирани карбоксилни киселини с амоняк или по метода на *Габриел* с калиев фталимид (Схема 1). И двете реакции на схемата представляват нуклеофилно заместване на халоген. Синтезът на оптично активни α -аминокиселини е твърде сложен и се основава на превръщане на рацемата в диастереоизомерна смес и следващо разделяне на тази смес до чисти диастереомери.

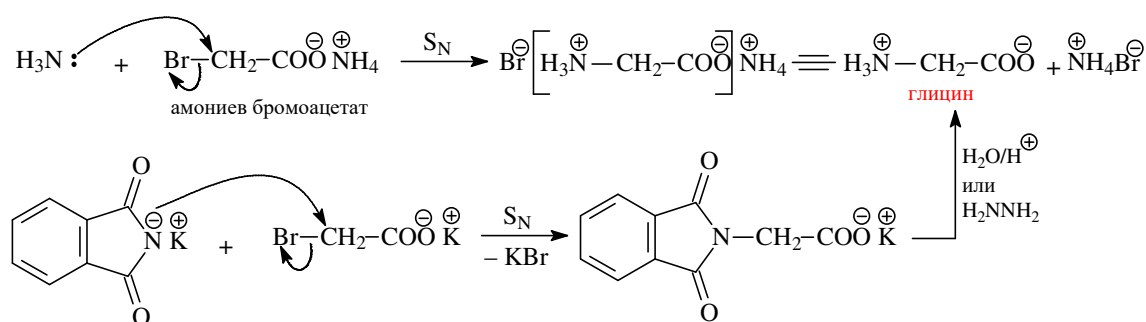
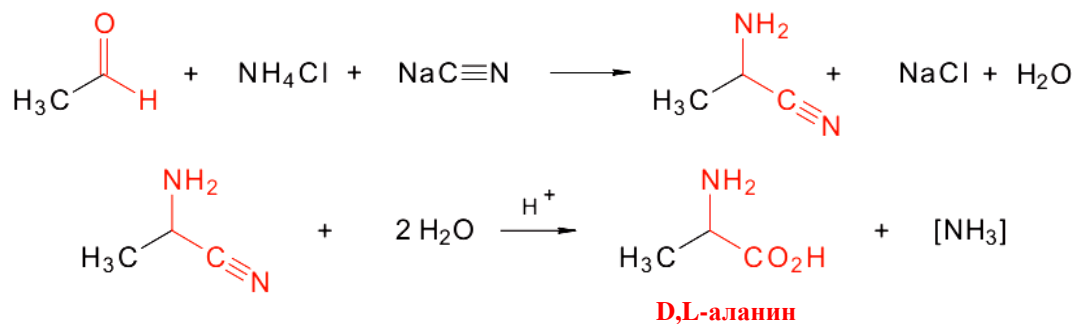


Схема 1

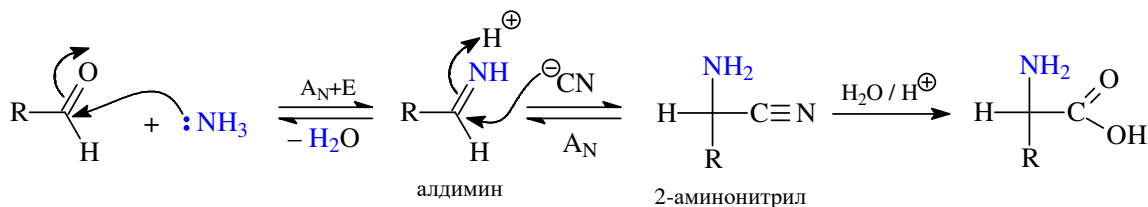
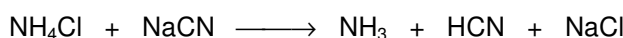
¹ Аминокиселините бяха отчасти разгледани в един предишен раздел успоредно с aminoalkoholi и aminoфеноли: <http://ochemist.losttribesource.org/orgchem/pdf/aminoalcoh.pdf>; за справки вж. също: https://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid

Ще припомним, че α -халогенирани мастни киселини се добиват по метода на Хел-Фолхард-Зелински (с бром и червен фосфор²).

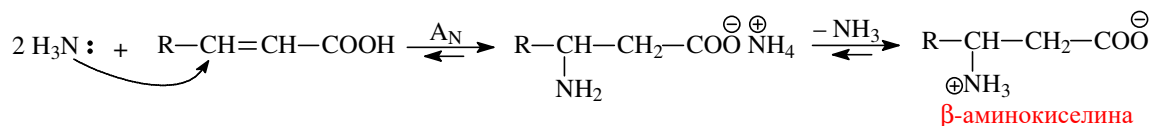
(2) Синтез на Щрекер³ (Strecker). От алдехиди с алкален цианид и амониев хлорид:



Механизъм. В най-общия случай първоначално чрез познатата ни реакция присъединяване-елиминирание (A_N+E) с участието на амоняк алдеhidът се превръща в алдимин (азотен аналог на алдехида). Към него се присъединява циановодород (A_N). Полученият α -аминонитрил след хидролиза се превръща в съответната α -аминокиселина (в случая от ацеталдеhid се синтезира D,L-аланин)



(3) β -Аминокиселини. Чрез спрегнато нуклеофилно присъединяване (A_N) на амоняк към α,β -ненаситени карбоксилни киселини; реакцията е обратима:

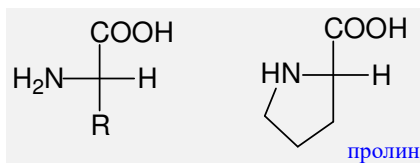


3. Физични свойства. Аминокиселините обикновено са разтворими във вода и неразтворими в неполярни органични разтворители. Глицинът и аланинът имат сла-

² Вж. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/hell-volhard-zelinsky-reaction.shtm>

³ Adolph Strecker (1822–1871): германски химик, роден в Дармщат. Бил е професор в Гийсен, Тюбинген и Вюрцбург (Германия), но също и в Университета на гр. Осло в Норвегия. Получаването на α -аминокиселини е публикувано през 1854 г.

дък вкус, валинът и левцинът са горчиви. Аспарагиновата и глутаминовата киселина имат т. нар. „умами“ вкус. Комбинацията от аминокиселини е определяща за



Фиг. 1

вкуса на храната, а моносодиевият глутамат е универсален вкусов подобрител.

Протеиногенните α -аминокиселини, с изключение на глицина, имат хирални молекули и следователно са оптично активни. При това в белтъчните молекули се срещат само съответните L-енантиомери (фишерови проекционни формули – Фиг. 1). Те имат същата пространствена конфигурация както L(-)-глицералдехида (вж. при монозахариди). Според правилото на *Кан-Инголд-Прелог* всички биологични хирални α -аминокиселини, с изключение на цистеина, имат S-конфигурация.

Дванадесет от всичко 21 α -аминокиселини, намиращи се в човешките белтъчини, могат да се синтезират в организма. Останалите девет [валин (Val), изолевцин (Ile), левцин (Leu), лизин (Lys), метионин (Met), треонин (Thr), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe) и хистидин (His)] са наречени *есенциални* или *незаменими* α -аминокиселини и могат да се доставят само с храната (месо, риба, яйца).

4. Химични свойства

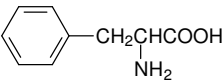
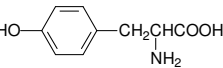
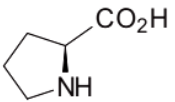
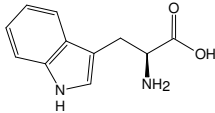
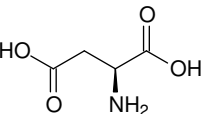
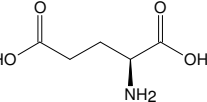
(1) **Киселинно-основни взаимодействия.** α -Аминокиселините и полипептидите, притежавайки в рамките на една молекула както базични ($-\text{NH}_2$), така и киселинни групи ($-\text{COOH}$), са амфотерни съединения и дават водоразтворими соли както в алкална, така и в кисела среда. При определени стойности на рН те образуват биполярни (двуполусни) вътрешномолекулни соли, наречени *цвитер-йони*⁴.



Тази стойност на рН, при която всички молекули са във формата на цвитер-йони, се нарича *изоелектрична точка* (**pI**) и тогава разтворимостта на съответната аминокиселина във вода е най-ниска.

⁴ От немски: der **Zwitter** = хермафродит.

Таблица 1. По-важни аминокиселини и техните наименования⁵

№	Структурна формула	Тривиално наименование (съкращение)	Рационално наименование	Систематично наименование по IUPAC
Протеиногенни α-аминокиселини				
1	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	глицин (Gly)	аминооцетна киселина	аминоетанова киселина
2	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	аланин (Ala)	α -аминопропионова киселина	2-аминопропанова киселина
3		фенилаланин (Phe)	α -амино- β -фенилпропионова киселина	2-амино-3-фенилпропанова киселина
4		тирозин (Tyr)	α -амино- β -(<i>p</i> -хидроксифенил)пропионова киселина	2-амино-3-(4-хидроксифенил)пропанова киселина
5	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	серин (Ser)	α -амино- β -хидроксипропионова киселина	2-амино-3-хидроксипропанова киселина
6	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	цистеин (Cys)	α -амино- β -меркаптопропионова киселина	2-амино-3-меркаптопропанова киселина
7		пролин ⁶ (Pro)	2-пирролидинкарбоксилна киселина	азолидин-2-карбоксилна киселина
8		триптофан (Trp)	β -индолилаланин	2-амино-3-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)пропанова киселина
9		аспарагинова киселина ⁷ (Asp)	α -аминояantarна киселина	2-аминобутандиова киселина
10		глутаминова киселина ⁸ (Glu)	α -аминоглутарова киселина	2-аминопентандиова киселина

⁵ Пълен списък на протеиногенните α -аминокиселини може да се види тук: https://en.wikipedia.org/wiki/Proteinogenic_amino_acid

⁶ **Пролинът** е единствената протеиногенна α -аминокиселина с *вторична* аминогрупа.

⁷ Англ. **aspartic acid** – дикарбоксилна киселина. Соли и естери: **аспартами**. Съдържа се в молекулата на изкуствения подсладител **аспартам** заедно с фенилаланина.

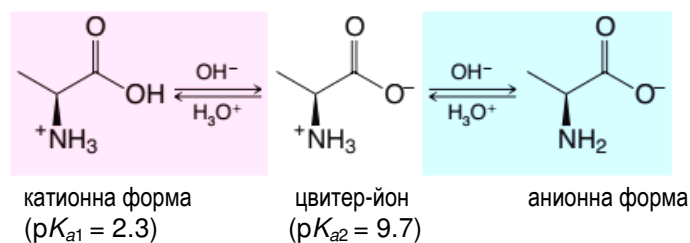
⁸ **Глутаминовата киселина** също е дикарбоксилна. *Мононатриевият глутамат* (monosodium glutamate = MSG) е най-широко използваният в кулинарната вкусов подобрител.

11		лизин (Lys)	α, ϵ -диаминокапронова киселина	2,6-диаминохексанова киселина
12		хистидин (His)	–	2-амино-3-(1 <i>H</i> -имидазол-4-ил)пропанова киселина

Други по-важни аминокиселини

1	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	β -аланин	β -аминопропионова киселина	3-аминопропанова киселина
2		(GABA) ⁹	γ -аминомаслена киселина	4-аминобутанова киселина
3		хипурова киселина	<i>N</i> -бензоилглицин	<i>N</i> -бензоиламиноетанова киселина

За всяка аминокиселина pI е специфична характеристика, например за глицин $pI = 5.97$, за аланин $pI = 6.00$, за серин $pI = 5.68$ и т. н. Трябва да се има предвид също така, че при наличие на две или повече киселинни ($-\text{COOH}$) и базични ($-\text{NH}_2$) групи, всяка една от тях се характеризира с определена стойност на pK_a . Така например аланинът притежава две pK_a -величини:

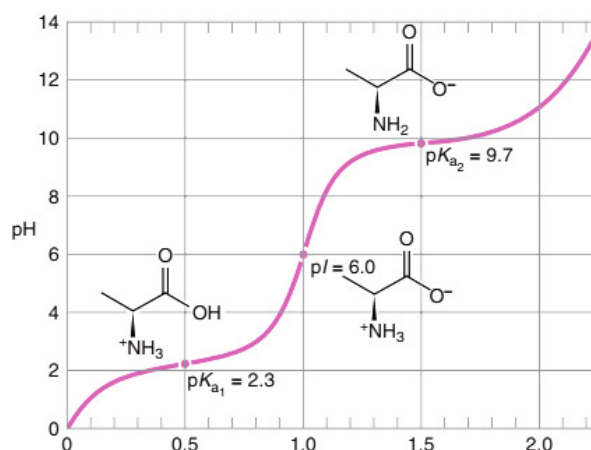


Изоелектричната точка (pI) на аланина може да се пресметне като средно аритметично от сумата на двете pK_a -стойности:

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2.3 + 9.7}{2} = 6.0$$

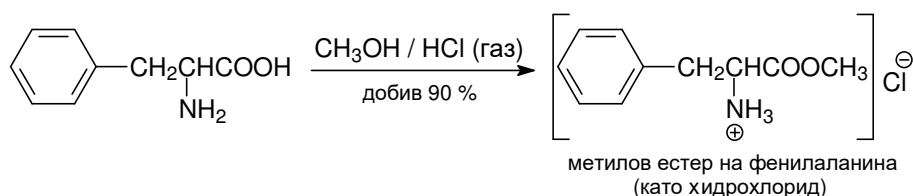
Една добра представа за тези киселинно-основни взаимоотношения дава титрувалната крива на Фиг. 2.

⁹ GABA (GammaAminoButyric Acid) – биогенна γ -аминокиселина, инхибиторен невротрансмитер, потиска възбудимостта на нервната система при бозайниците. Предлага се в аптеките като хранителна добавка.

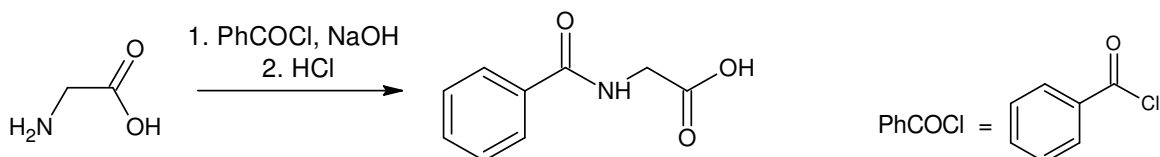


Фиг. 2: Титрувална крива на аланин във водна среда.

(2) **Естерификация.** При тази реакция се засягат разбира се С-крайните (карбоксилните) групи на α -аминокиселините или полипептидите:

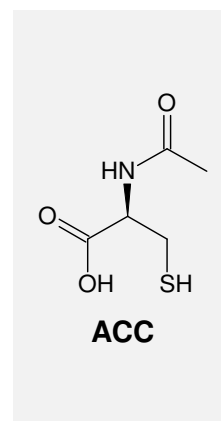


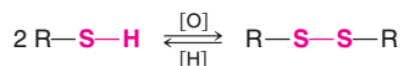
(3) **N-Ацилиране** → киселинни амиди. С киселинни анхидриди или халогениди се въвежда ацилен остатък в N-крайната аминогрупа на α -аминокиселините или полипептидите. Така например с помощта на бензоилхлорид (Ph-COCl) от глицин може да се синтезира **хипурова киселина** (N-бензоилглицин; Схема 2), която е била изолирана доста отдавна от конска урина.



Подобна N-ацилирана аминокиселина е **N-ацетилцистеинът**, лекарствено вещество, което под името ACC (или NAC) се използва за втечняване на секрета и улесняване на отхрачването при заболявания на дихателната система.

(4) Създаване на **дисулфидни мостове**. От химията на тиолите е известно, че при окисление те лесно преминават в диалкилдисулфиди. Реакцията е обратима:





Това се случва също и с 2-амино-3-меркаптопропановата киселина, наречена **цистеин** (Cys), която преминава в друга известна протеиногенна α -аминокиселина – **цистин** (Cys-Cys).

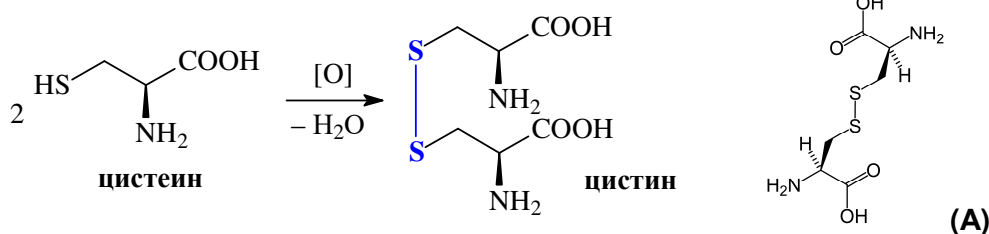
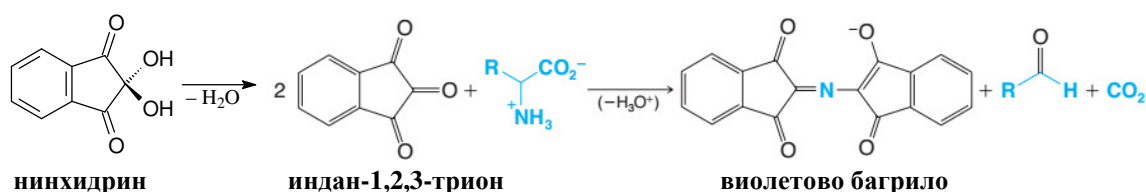


Схема 3: Окисление на цистеин (Cys) ; (A) – конфигурация на цистина (Cys-Cys).

Тези т. нар. **дисулфидни мостове** се образуват също така и между биополимерните полипептидни вериги при изграждане на вторичната и третичната структура на белтъчните макромолекули.

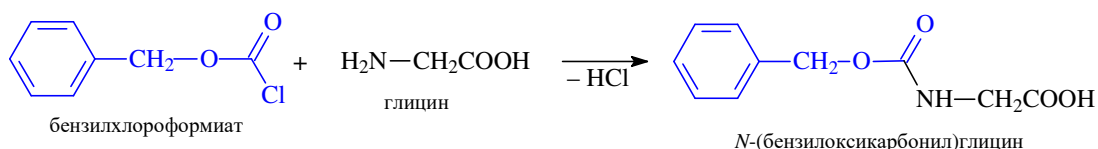
(5) **Реакция с нинхидрин** – използва се в качествения анализ за доказване на α -аминокиселини. Често се прилага при тънкослойна и хартиена хроматография, както и при електрофореза, за визуализация на зоните. При обработка на α -аминокиселини с нинхидрин се получава интензивно пурпурно-виолетово багрило:



Нинхидринът е хидрат на индан-1,2,3-трион. Пролинът, бидейки вторичен амин, не дава тази реакция. Обърнете внимание – само азотният атом от аминокиселината се включва в молекулата на багрилото. Механизмът е твърде сложен и няма да бъде обсъждан тук.

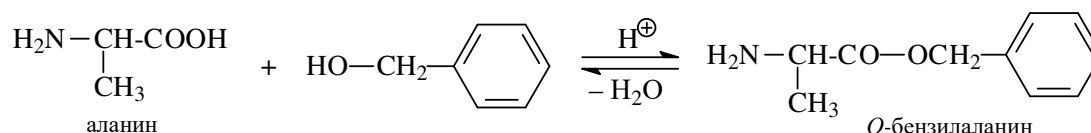
Още химични свойства като поведение при нагряване – получаване на 2,5-диоксопиперазини, на β - γ - δ - ϵ -лактами, на полиамиди и др. бяха разгледани по-рано в друг раздел¹.

5. Строеж на полипептидите. Те са линейни полимери, съставени от α -аминокиселинни остатъци. Характерна за полипептидната верига е амидната група (–CONH–),



Бензилоксикарбонилният остатък [C₆H₅CH₂OCO-] традиционно се съкращава **Cbz** (от carboxybenzyl), така че *N*-защитеният глицин ще се означава накратко като Cbz-NHCH₂COOH.

Другата аминокиселина обратно – трябва да има свободна аминогрупа, но блокирана карбоксилна група (C-край). Това се постига чрез пряка естерификация с бензилов алкохол. Например ако за втори аминокиселинен компонент се вземе аланин, от него ще се получи **бензилов естер** на аланина:



Следва свързването на двете защитени аминокиселини в дипептид (Схема 4). Като обезводняващ реагент остроумно се използва **дициклохексилкарбодимид (DCC)**, който способства директното образуване на пептидна връзка, а с отделящата се вода се превръща в **дициклохексилкарбамид (DCU)**¹¹:

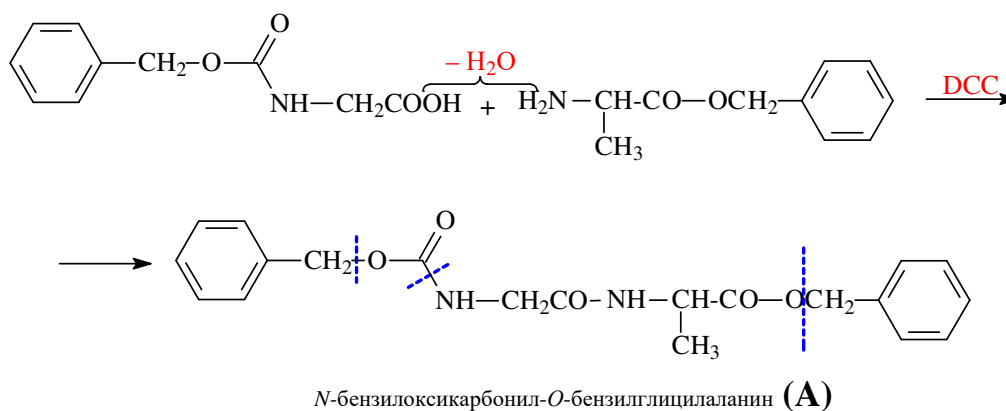
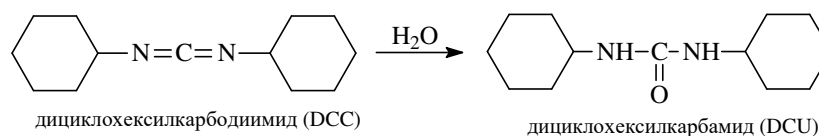


Схема 4



Като последен етап от синтеза на дипептида Gly-Ala се извършва деблокиране на защитените *N*- и *C*-крайни групи в междинния продукт (**A**) от Схема 4. Това се по-

¹¹ Механизмът на тази дехидратация е доста сложен и няма да бъде разглеждан тук.

синтез¹². Реакциите се извършват на повърхността на гранулирана полимерна смола. Свободната карбоксилна (С-край) или аминокгрупа (N-край) се свързва с твърдата фаза. За тази цел малките порьозни гранули се модифицират с функционални групи ("линкъри"), върху които могат да бъдат изградени пептидните вериги. Пептидът по този начин се имобилизира върху твърдата фаза и се запазва по време на филтрирането (елуирането), а чрез подвижната течна фаза се отмиват реагентите и страничните продукти от синтеза. Пептидите остават ковалентно прикрепени към твърдата фаза дотогава, докато бъдат отделени от нея с подходящ реагент (безводен HF или CF₃COOH).

7. Строеж на белтъчните вещества (протеините)

Протеините са високомолекулни полипептиди, обикновено с биологичен произход, и притежават биологична активност. Протеините са важен компонент на храната за всички живи същества. Строежът (структурата) на протеините има четири йерархични нива на организация. Възприето е те да се означават като първична, вторична, третична и четвъртична структура.

Първична структура се нарича последователността на аминокиселинните остатъци в един полипептид или протеин (Фиг. 4). Полипептидите са линейни биополимери. Най-простият трипептид, състоящ се от три аминокиселини може да съществува като шест различни подредби, а даден тетрапептид може да има вече 24 различни последователности. Ако един протеин съдържа 20 аминокиселини във верига от 100 аминокиселинни остатъка, тогава броят на възможностите за различни последователности възлиза на около 10¹³⁰. Очевидно една от най-важните задачи пред изследователите е да се определи аминокиселинната последователност, т. е. първичната структура на даден протеин.

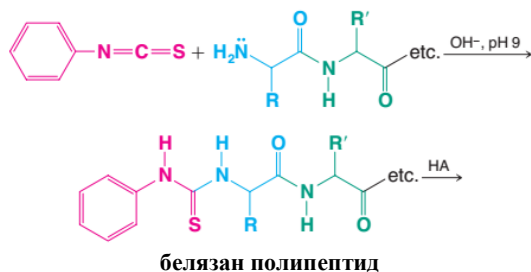
Ile-Gly-Asp-Leu-Tyr-Ala-Ala-Phe-Asp-Glu-Met-Arg-Gln-Ser-Val
 Met-Gly-Gln-Leu-Ala-Glu-Ser-Leu-Arg-His-Met-Gln-Gly-Glu-Leu
 Met-Gly-Asp-Leu-Ala-Gln-Ser-Val-Ser-His-Met-Gln-Arg-Ser-Leu

Фиг. 4: Първична структура на белтъчната молекула – последователността на аминокиселините в полипептидната верига.

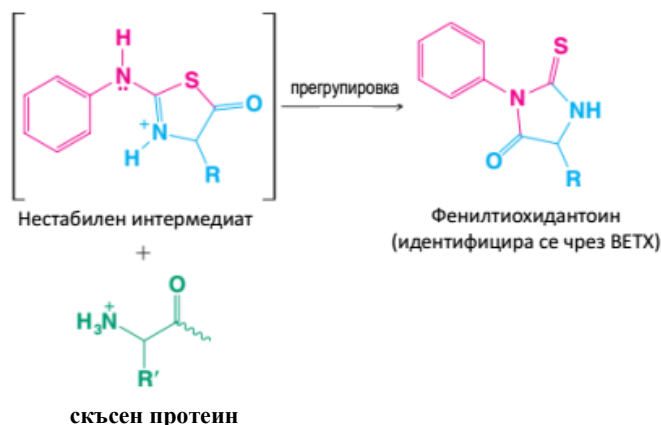
Определянето на първичната структура се основава на постепенното разграждане на полипептидната верига чрез химични методи. Най-често се прилага методът за

¹² Solid-phase peptide synthesis (SPPS): <https://youtu.be/wtUTcehgpZ0>

определяне на N-крайната аминокиселина, наречен **разграждане по Едман**. Той се състои в обработка на протеина с фенилизотиоцианат (Ph-N=C=S). Първичната аминогрупа се присъединява към него и се превръща в заместен тиокарбамид – т. нар. **белязан полипептид**.



Така белязаният полипептид по-нататък се обработва с киселина (НА), при което N-крайната аминокиселина се откъсва като заместен фенилтиохидантоин, който се идентифицира, а остатъчният протеин – вече с една аминокиселина по-малко – се отделя и се подлага по-нататък на същата процедура.

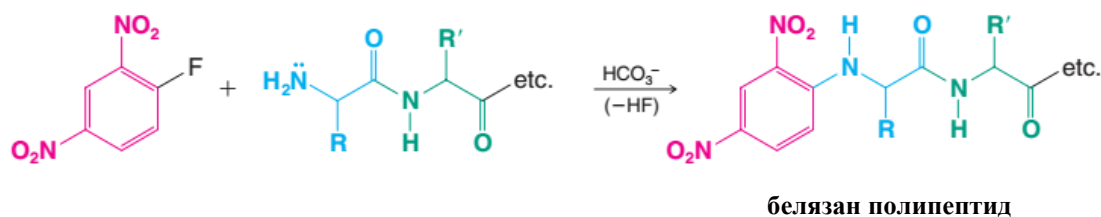


Така изолираните като фенилтиохидантоини аминокиселини се подлагат последователно на идентифициране чрез високоефективна течна хроматография (ВЕТХ¹³), мас-спектрометрия или други инструментални методи. Съществуват съвременни уреди, наречени **аминокиселинни анализатори** (*amino acid sequencers*), които могат автоматично да определят последователността на аминокиселинните остатъци.

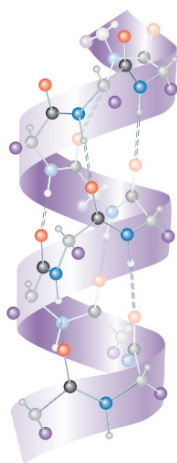
Другият метод за определяне на N-крайната аминокиселина е известен като **N-краен анализ по Сангър**¹⁴. Реактивът, който се използва, е 2,4-динитрофлуоробензен.

¹³ На английски: *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

¹⁴ *Frederick Sanger* (1918–2013) – английски биохимик, носител на две нобелови награди за химия. Той пръв е определил първичната структура на инсулина.



Реакцията е нуклеофилно заместване в ароматно ядро (S_N -arom.). Полученият белязан полипептид се подлага на киселинна хидролиза и се превръща в белязана с 2,4-динитрофенилов остатък N-крайна аминокиселина, която се идентифицира чрез спектрални и други методи. Останалата част от полипептида се хидролизира до смес от α -аминокиселини:

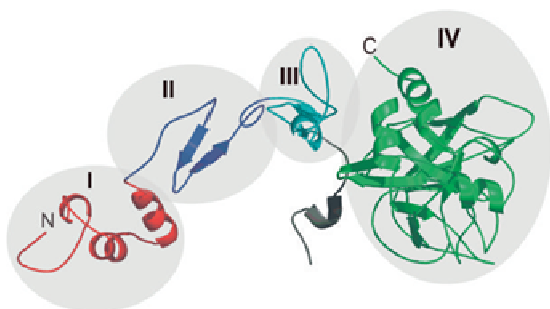


Вторична структура. Полипептидната верига спонтанно се нагъва и усуква, като при това образува различни пространствени форми. На дадения на Фиг. 5 пример е обяснено как благодарение на водородни връзки от типа $>NH \cdots O=C<$ веригата добива формата на спирала. В някои участъци се създават и дисулфидни мостове.

← **Фиг. 5:** Вторична структура на белтъчна молекула: α -спирала. С пунктир са посочени водородните връзки $>NH \cdots O=C<$, които скрепят отделните витки на спиралата.

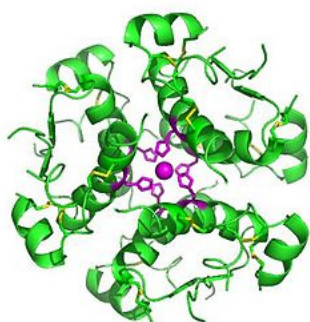
Третичната структура (Фиг. 6) на белтъчната молекула отразява цялостната триизмерна форма, която възниква от възможните вторични структури на полипептидната верига. Третичната структура може да бъде **глобуларна** (кълбовидна, напр. *хемоглобин*, *инсулин*) или **фибриларна** (нишковидна, напр. *кератин*, *колаген*). При подходящи условия на средата възниква специфичната третична структура за даден протеин, която е в пряка връзка с неговата биологична функция. Различни сили и взаимодействия, включително дисулфидни мостове, са отговорни за стабилизацията на третичните структури. Така например във водна среда обикновено полярните (хидрофилните) групи са от външната страна на макромолекулата, за да са достъп-

ни за солватиране от водните молекули, докато във вътрешността е включен максимален брой неполярни (хидрофобни) групи.



Фиг. 6: Третична структура на белтъчна молекула. Участъците I, II, III и IV играят различна биологична роля.

Например пептидният хормон **инсулин** е кълбовиден, т. е. глобуларен протеин, който съдържа три полипептидни субединици (Фиг. 7). Всяка една от тях е съставена от две полипептидни вериги, които се държат заедно чрез водородни връзки и дисулфидни мостове. Глобуларните белтъци лесно дават колоидни разтвори във вода, докато фибриларните (кератин, колаген) са неразтворими във вода и изграждат структурата на различните видове биотъкани като косми, кожа, кости, рога, сухожилия и т. н. Такъв е също **фиброинът**, протеинът на коприната.



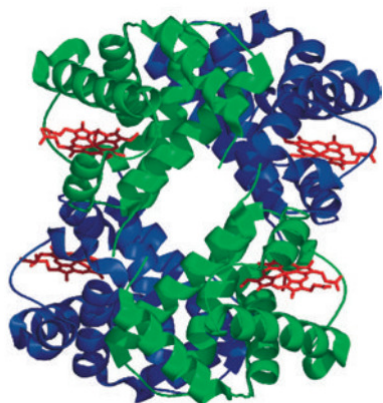
Фиг. 7: Третична и четвъртична структура на инсулина.

Четвъртична структура. Това е най-висшата степен на организация на белтъчните молекули. Редица протеини съществуват като стабилни агрегати от по няколко полипептидни вериги – субединици, без ковалентни връзки между тях. Така например хемоглобинът се състои от четири субединици (Фиг. 8), между тях са включени и четири хеминови молекули.

Биологичните катализатори – **ензимите** са протеини, които притежават комплексна четвъртична структура и имат свойството да ускоряват някои органични реакции 10^6 до 10^{12} пъти. При това реакциите протичат в относително меките условия на живата клетка: приблизително неутрално рН и температури под $35\text{ }^\circ\text{C}$. Ензимите са строго специфични както спрямо вида реакция, така и спрямо съответните субстрати. Само за пример – ензимният синтез на полипептиди, изградени от над 1000 аминокиселинни остатъка, се осъществява в клетката практически без грешка!

Освен това катализираните от ензими реакции протичат *стереоспецифично*, тъй като самите ензими са хирални. Така например при въглехидратната обмяна ензимите метаболизират само D-захарите. Други ензими в клетките пък успешно синтезират белтъчни полипептидни вериги само от L- α -аминокиселини и т. н.

Денатурация. При определено въздействие на висока температура, крайни стойности на рН, облъчване с УВ-светлина или на химични агенти настъпват драстични промени във вторичната, третичната и четвъртичната структура на белтъците. Процесът се нарича денатурация. При това се променят не само физикохимичните, но и биологичните свойства, например се губи каталитичната активност на ензимите. Най-популярен пример е коагулацията на яйчения белтък при варене или друг вид термична обработка (вж. фигурата вляво от заглавието).



Фиг. 8: Четвъртична структура на хемоглобина. С червено са отбелязани хемините¹⁵ участъци..

Ясно е, че от сварено яйце не може да се излюпи пиленце – тоест при денатурацията са изчезнали биологичните свойства на белтъците. Подобен е също ефектът на пресичане на прясното мляко при добавяне на киселина (лимонена, винена или оцетна). Денатурацията в някои случаи е обратима, възможна е т. нар. *ренатурация* и съответно възстановяване на биологичните свойства. Не всички белтъчни вещества обаче се поддават на денатурация, такива са например фибриларните колаген, кератин, еластин и др.

Всички по-висши нива на организация на белтъчната молекула са пряко следствие от първичната структура. С други думи от аминокиселинната последователност зависи как биополимерната верига ще се нагъне и усуче, как и къде ще се образуват агрегати, водородни и бисулфидни мостове и как ще търпи други взаимодействия с вътрешни или външни молекулни фактори. Ето защо от най-голямо значение за познаването и разбирането на протеиновата структура и функция си остава аминокиселинната последователност.

¹⁵ Хем, хемин, хемоглобин – припомнете си ги от раздела „Фуран, тиофен и пирол“.