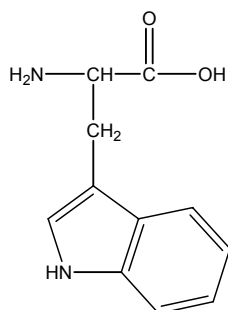
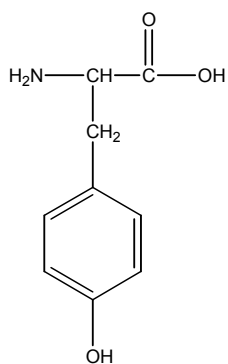


Избранные главы из курса "Органическая химия" Я

АМИНОКИСЛОТЫ

Я



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

я
я
я
я
я
я
я
я

Избранные главы из курса «Органическая химия»

АМИНОКИСЛОТЫ

Пособие для студентов специализаций «ХИМИЯ» и «ЭКОЛОГИЯ»

III и IV семестры

Новосибирск
1999

Составители:

Проф. В. А. Резников
Проф. В. Д. Штейнгарц

Рецензент канд. хим. наук К. Ю. Колтунов

Пособие представляет собой часть курса лекций «Органическая химия», читаемого студентам второго курса специализаций «химия» и «экология», рекомендуется также студентам отделения «биология и медбиология» и другим студентам, изучающим органическую химию.

© Новосибирский государственный университет, 1999

СОДЕРЖАНИЕ

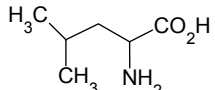
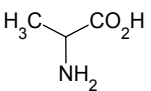
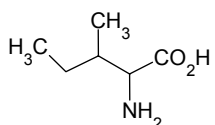
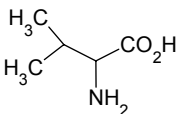
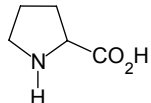
| | |
|--|----|
| α -Аминокислоты | 4 |
| Синтез алифатических аминокислот. Синтез α -аминокислот | 7 |
| Синтез других алифатических аминокислот | 16 |
| Свойства аминокислот. | |
| Стереохимия | 21 |
| Кислотно-основные свойства | 22 |
| Реакции аминокислот | 25 |
| Реакции аминокислот <i>in vivo</i> | 30 |
| Ароматические аминокислоты | 34 |
| Пептиды и белки | 38 |
| Синтез пептидов | 39 |
| Анализ пептидов | 46 |
| Пространственное строение белков | 49 |

АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты, как видно из названия, – это любые органические кислоты, в состав молекулы которых входит аминогруппа, хотя чаще всего под этим названием подразумевают α -аминокислоты вследствие их исключительного значения как составляющей части биополимеров – белков. Белки имеют очень важное и разнообразное значение в функционировании живого организма – они являются питательными веществами, регулируют обмен веществ, являются основой мышечной ткани, участвуют в передаче генетической информации и т. д.

α -АМИНОКИСЛОТЫ

В природе встречается более 70 аминокислот, почти все они за исключением пролина и оксипролина имеют структуру типа $RCH(NH_2)CO_2H$. Структурные формулы и названия наиболее распространенных α -аминокислот приведены в таблице.

| Название (сокращение) | Структурная формула | Изоэлектрическая точка (pI) | Название (сокращение) | Структурная формула | Изоэлектрическая точка (pI) |
|-----------------------|---|-----------------------------|-----------------------|---|-----------------------------|
| Глицин (gly) | $H_2NCH_2CO_2H$ | 5,97 | Лейцин (leu) |  | 5,98 |
| Аланин (ala) |  | 6,02 | Изолейцин (ile) |  | 6,02 |
| Валин (val) |  | 5,97 | Пролин (pro) |  | 6,10 |

| Название (сокращение) | Структурная формула | Изоэлектрическая точка (pI) | Название (сокращение) | Структурная формула | Изоэлектрическая точка (pI) |
|--------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| Оксипролин (hpro) | | 5,78 | Метионин (met) | $\text{H}_3\text{CSH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 5,75 |
| Фенилаланин (phe) | $\text{PhH}_2\text{C}-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 5,88 | Аспарагиновая кислота (asp) | $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 2,87 |
| Триптофан (try) | | 5,88 | Аспарагин (asp(NH ₂)) | $\text{H}_2\text{NCCH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 5,41 |
| Глутаминовая кислота (glu) | $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 3,22 | Гистидин (his) | | 7,58 |
| Глутамин (gluNH ₂) | $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 5,65 | Серин (ser) | $\text{HOH}_2\text{C}-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 5,68 |
| Лизин (lys) | $\text{HO}_2\text{C}-\text{C}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ | 9,74 | Треонин (thr) | $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{OH})(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 6,53 |
| Аргинин (arg) | $\text{HO}_2\text{C}-\text{C}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{C}(=\text{N})$ | 10,76 | Тирозин (tyr) | | 5,65 |
| Цистеин (cysH) | $\text{HSH}_2\text{C}-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ | 5,02 | Цистин (cyS-Scy) | $2(-\text{SH}_2\text{C}-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H})$ | 5,06 |

Незаменимыми называются α -аминокислоты, которые не могут быть синтезированы организмом из веществ, поступающих с пищей в количествах, необходимых для поддержания жизнедеятельности. К незаменимым для человека аминокислотам относятся лейцин, изолейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. Кроме того, бывают заболевания, при которых организм не способен вырабатывать еще какие-либо аминокислоты, в результате чего они становятся индивидуально незаменимыми. Примером является фенилкетонурия – генетическое заболевание, приводящее, в частности, к нарушению умственной деятельности и связанное с нарушением обмена веществ. Люди, страдающие этим заболеванием, нуждаются в тирозине, который не вырабатывается их организмом.

СИНТЕЗ АЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

Синтез α -аминокислот

Почти все природные α -аминокислоты имеют в составе молекулы асимметрический атом углерода, связанный с аминогруппой. Учитывая, что в их синтезе участвуют ферменты – сложные оптически активные органические соединения, природные аминокислоты также являются оптически активными и относятся к L-ряду. Более того, организм может оперировать только тем оптическим изомером, который ему характерен, противоположный энантиомер в обмене веществ не участвует. Учитывая сложность синтеза оптически активных соединений *in vitro* (“в пробирке”), в лабораторных условиях и вообще

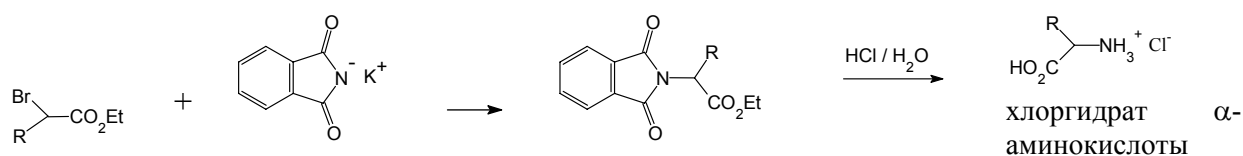
химическим путем синтезируют рацемические аминокислоты, которые далее могут быть разделены на энантиомеры уже известными вам методами. Сначала мы рассмотрим именно эти методы синтеза.

В качестве исходных соединений в синтезе α -аминокислот могут быть использованы α -галогидкарбоновые кислоты, синтез которых проводят по методу *Гелля-Фольгарда-Зелинского* действием брома в присутствии красного фосфора или каталитического количества пиридина на карбоновые кислоты. При взаимодействии α -бромкарбоновых кислот с избытком аммиака образуются соответствующие аминокислоты.

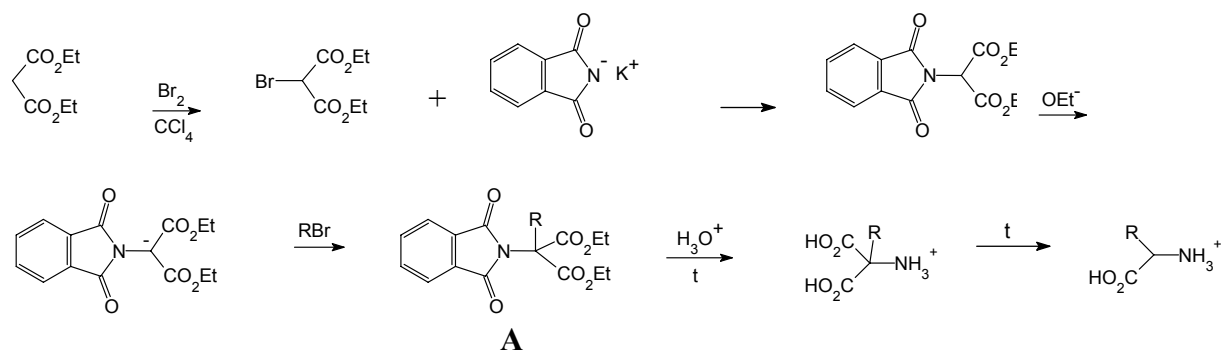


Почему в синтезе α -аминокислот из галогидкарбоновых кислот необходимо использовать избыток аммиака? К какому типу относится эта реакция, какие побочные продукты могут в ней образовываться?

Как вы помните, аммонолиз алкилгалогенидов является не лучшим методом синтеза аминов. Для селективного синтеза первичных аминов предпочтительным является метод *Габриэля*, заключающийся во взаимодействии алкилгалогенидов с фталимидом калия и последующем гидролизе фталимидного производного. Этот метод неприменим к галогидкарбоновым кислотам (*почему?*), однако в реакцию можно вводить α -галогидзамещенные эфиры карбоновых кислот или галогидзамещенные малоновые эфиры.

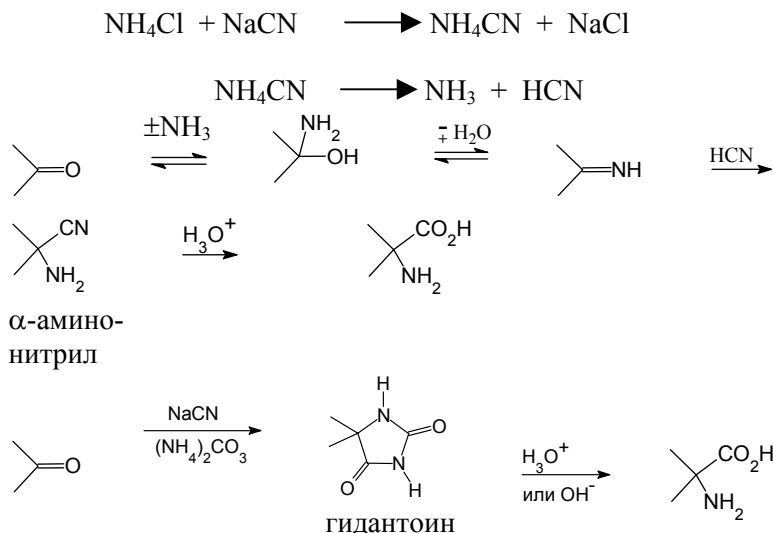


Броммалоновые эфиры получают бромированием малоновых эфиров бромом в неполярном органическом растворителе. При взаимодействии броммалонowego эфира с фталимидом калия образуется фталимидное производное. При этом один из “кислых” атомов водорода малонowego эфира остается незамещенным, и, следовательно, полученное фталимидное производное является СН-кислотой, которая образует анион при действии сильного основания, например этилата натрия. Алкилирование этого аниона приводит к замещенному малонowому эфиру **A**, кислотный гидролиз которого затрагивает как фталимидную, так и обе сложноэфирные группы, и завершается образованием аминокислоты. Являясь производным малоновой кислоты, это соединение легко декарбоксилируется при нагревании с образованием аминокислоты в виде хлоргидрата.

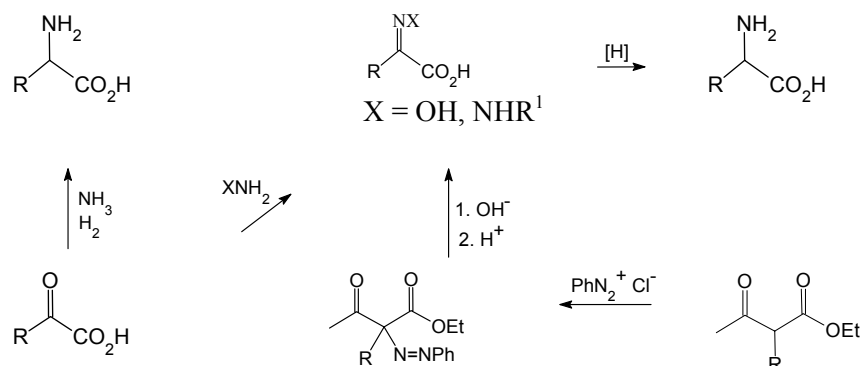


При использовании броммалонowego эфира может быть синтезирован фенилаланин с выходом 60%. Напишите последовательность необходимых для этого реакций. Предложите механизм каждой из стадий реакции.

Историческое значение имеет синтез аминокислот по методу *Штрекера*, основанному на взаимодействии карбонильных соединений с цианистым натрием и хлоридом аммония. При взаимодействии неорганических компонент образуется цианистый водород и аммиак. Первая стадия реакции – образование имина в результате реакции присоединения-отщепления аммиака с карбонильным соединением. Цианистый водород присоединяется по связи C=N с образованием геминального аминонитрила (α -аминонитрила), последующий гидролиз нитрильной группы завершается образованием аминокислоты.



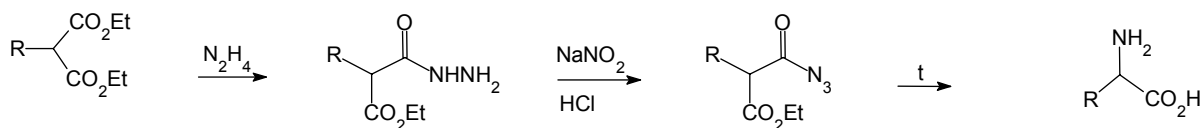
Интересной модификацией этого метода является взаимодействие карбонильных соединений с цианистым натрием и карбонатом аммония в качестве донора аммиака. При этом образуется гетероциклическое соединение, которое называется гидантоином. Гидролиз гидантоина в кислой или щелочной среде легко приводит к аминокислоте с высоким выходом.



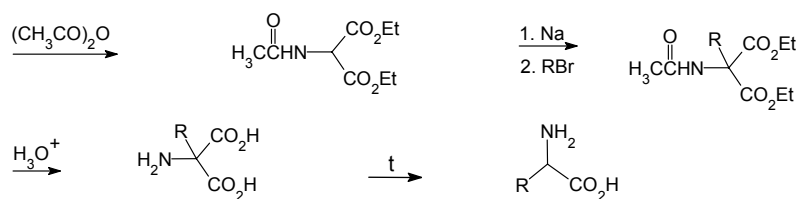
α -Аминокислоты могут быть получены из кетокислот или их производных – гидразонов и оксимов. Для получения аминокислот из кетокислот используют реакцию восстановительного аминирования. Оксимы и гидразоны кетокислот образуют аминокислоты при восстановлении.

Фенилгидразоны α -кетокислот могут быть получены из ацетоуксусных эфиров при взаимодействии с солями фенилдиазония. Последующее расщепление образующихся азосоединений в щелочной среде и нейтрализация приводят к фенилгидразонам. **Предложите механизм этого превращения.**

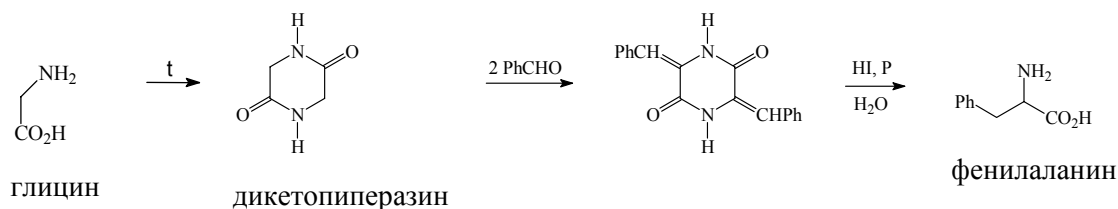
Для синтеза α -аминокислот используется также малоновый эфир. По одному из методов на замещенный малоновый эфир действуют одним молем гидразина. При этом образуется моногидразид малоновой кислоты. Это соединение действием азотистой кислоты превращают в азид, который далее при нагревании претерпевает перегруппировку *Курциуса* с образованием эфира α -аминокислоты.



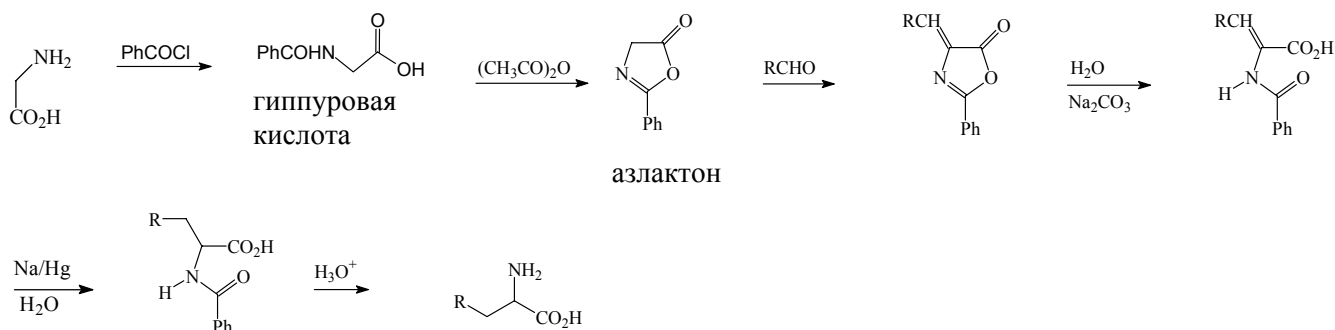
Другой возможностью использования малонового эфира в синтезе α -аминокислот является реакция нитрозирования, которая приводит к оксиму. Оксимная группа может быть восстановлена в аминогруппу с сохранением сложноэфирных групп водородом на никелевом катализаторе. Полученный эфир аминомалоновой кислоты ацилируют по аминогруппе уксусным ангидридом. Образующееся ацетамидное производное способно депротонироваться под действием металлического натрия с образованием натриевой соли, которая реагирует с галоидными алкилами. Таким образом, получается замещенный ацетамидомалоновый эфир. Последующий гидролиз ацетамидной и сложноэфирных групп дает аминомалоновую кислоту, которая декарбоксилируется при нагревании как и всякая β -дикислота.



Существуют методы синтеза различных аминокислот исходя из простейшей – аминокислоты (глицина). Один из них это превращение глицина в дикетопиперазин (подробнее об этом изложено в разделе, посвященном химическим свойствам аминокислот), который способен вступать во взаимодействие с ароматическими альдегидами с образованием продуктов конденсации кротонового типа. Последующее расщепление полученного продукта конденсации действием йодистоводородной кислоты в присутствии фосфора с высоким выходом приводит к другой аминокислоте. Ниже приведена схема синтеза фенилаланина этим методом.



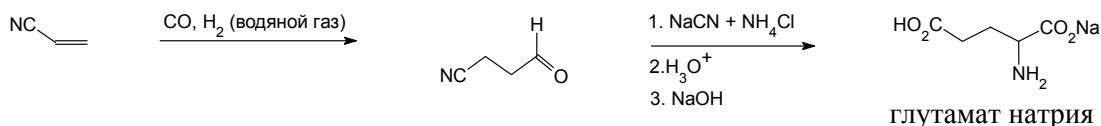
Азлактонный метод синтеза аминокислот заключается в конденсации гиппуровой кислоты с альдегидами в уксусном ангидриде. Исходное соединение – гиппуровая кислота - легко может быть получено при взаимодействии глицина с хлористым бензоилом.



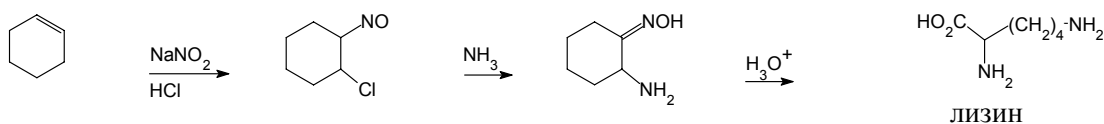
Вначале гиппуровая кислота под действием уксусного ангидрида превращается в азлактон. В составе молекулы этого соединения содержится активная метиленовая группа, вследствие чего оно

способно вступать в реакцию конденсации с альдегидами (*предложите механизм этой реакции; примечание: вспомните конденсацию Перкина*). Продукт конденсации восстанавливают амальгамой натрия и получают N-безоильное производное другой аминокислоты, которое превращается в аминокислоту в результате кислотно-катализируемого гидролиза.

В промышленном масштабе рацемические аминокислоты обычно не синтезируют химическим путем, а используют микробиологические технологии с применением геной инженерии и выделяют аминокислоты из белковых молекул, продуцируемых специально выведенными микроорганизмами. Исключение составляют лишь несколько аминокислот, которые производятся в промышленности химическим путем. Например, десятками тысяч тонн в год производится L-глутамат натрия – соль глутаминовой кислоты. Синтез осуществляется по следующей схеме:



Один из перспективных методов синтеза лизина основан на использовании в качестве исходного соединения доступного и дешевого циклогексена. Синтез проводят по следующей схеме:

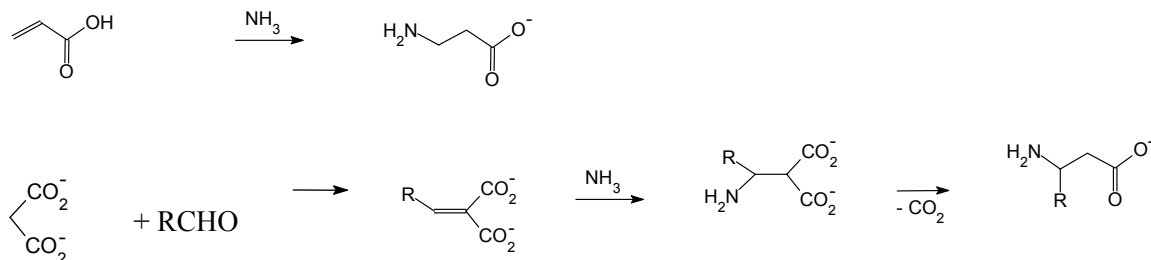


По механизму реакции последняя стадия процесса сходна с перегруппировкой Бекмана. Предложите ее механизм.

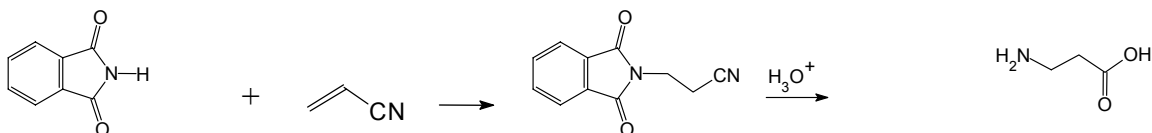
Интересно отметить, что при пропускании электрического разряда через смесь метана, аммиака, воды и водорода наряду с другими продуктами образуются различные аминокислоты. Поскольку полагают, что аналогичные условия могли существовать на древней Земле, то нельзя исключить, что именно таким путем на нашей планете возникли первые аминокислоты – основа будущей белковой жизни.

СИНТЕЗ ДРУГИХ АЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

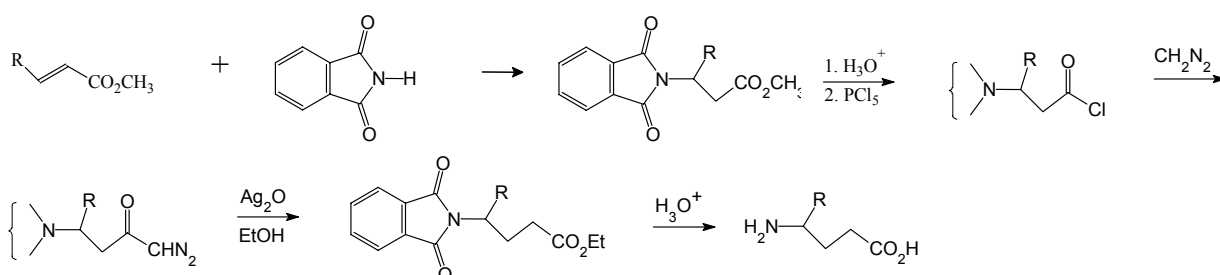
В этом разделе рассматриваются методы синтеза аминокислот с иным, нежели в α-аминокислотах расположением аминогруппы. β-Аминокислоты синтезируют главным образом из α,β-ненасыщенных карбоновых кислот при взаимодействии их с аммиаком. Модификацией этого метода является взаимодействие малоновой кислоты с альдегидами и аммиаком, которое можно рассматривать как последовательное образование α,β-ненасыщенной дикислоты, затем присоединение аммиака по связи C=C и декарбоксилирование, завершающееся образованием аминокислоты.



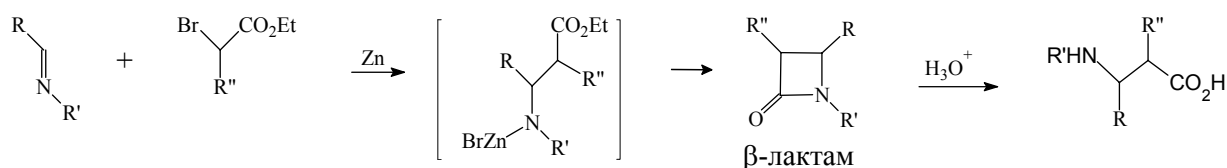
Вместо аммиака в реакции присоединения к α,β-ненасыщенным кислотам или их производным можно использовать фталимид в присутствии каталитических количеств основания. При этом образуется фталимидное производное, которое легко может быть гидролизировано в β-аминокислоту.



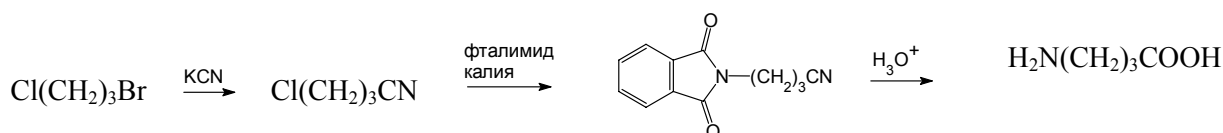
Кроме того, фталиimidное производное может быть использовано для синтеза других аминокислот с большим расстоянием между аминогруппой и карбоксильной группой гомологизацией по реакции *Арндта-Айстерта*. Это превращение можно, разумеется, осуществлять многократно, однако для синтеза соединений с большим удалением аминогруппы и карбоксильной группы лучше использовать другие методы.



β -Аминокислоты могут быть также получены по реакции, аналогичной реакции Фаворского – взаимодействием иминов с эфирами α -бромкарбоновых кислот и цинком. Образующийся на первой стадии аддукт самопроизвольно циклизуется, давая β -лактам, гидролиз которого в щелочной или кислой среде завершается образованием β -аминокислоты.

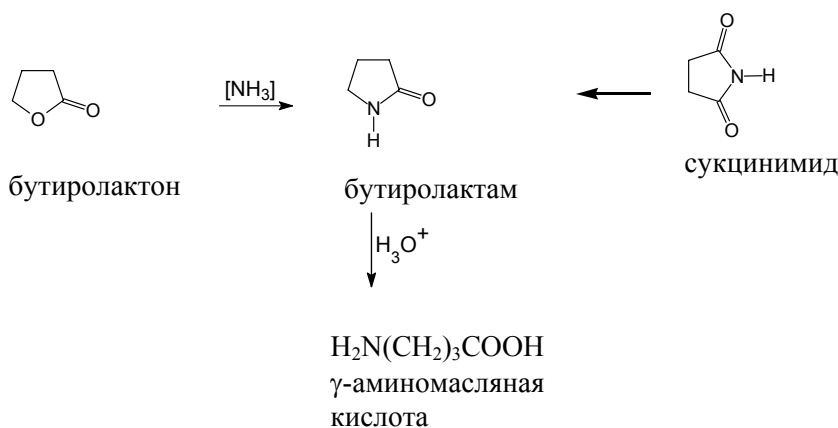


γ -Аминокислоты, например γ -аминомасляную кислоту, синтезируют из 1,3-дигалогенпропанов по следующей схеме:

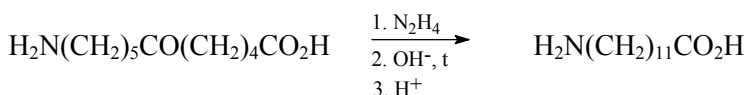
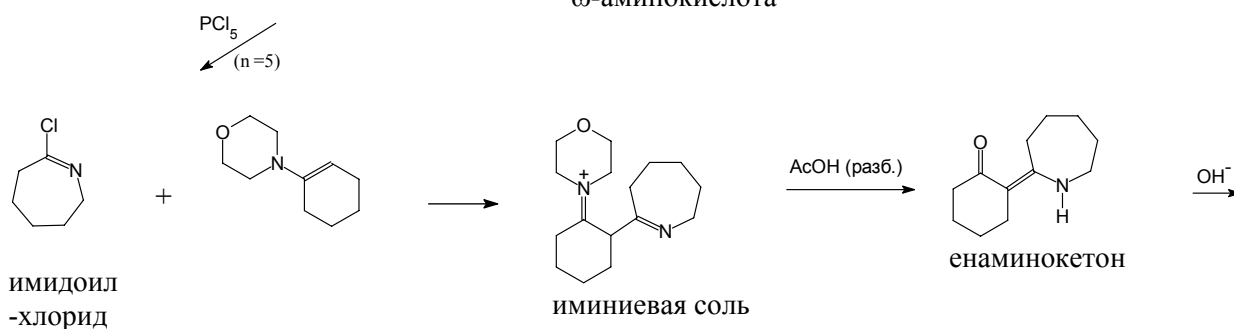
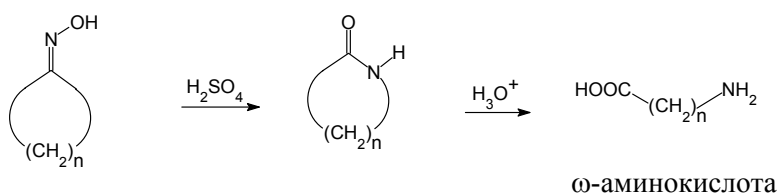


Предложите метод синтеза 1-бром-3-хлорпропана.

Иной метод синтеза γ -аминомасляной кислоты – гидролиз γ -бутиролактама, который может быть получен либо взаимодействием γ -бутиролактона с аммиаком, либо электрохимическим восстановлением сукцинимида.



Одним из общих методов синтеза ω -аминокислот, аминогруппа в которых находится на конце цепи, заключается в гидролизе соответствующих лактамов, которые получают по бекмановской перегруппировке циклических кетонов. Таким способом в промышленности из оксима циклогексанона получают капролакта́м - исходное соединение в синтезе капрона и ϵ -аминокапроновую кислоту ($n = 5$).

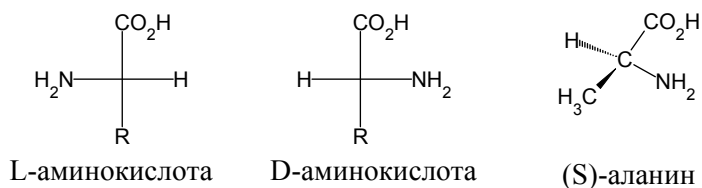


Для синтеза аминокислот с большим расстоянием между карбоксильной и аминогруппой в качестве исходных соединений используются лактамы. Выше на примере капролактама приведена реализуемая при этом последовательность реакций. При взаимодействии капролактама с пентахлоридом фосфора образуется имидоилхлорид – циклический аналог хлорангидрида карбоновой кислоты, соответствующий тому, что атом кислорода заменен атомом азота. Обладая реакционной способностью, близкой к реакционной способности хлорангидридов, соединения этого типа реагируют с енаминами с образованием иминиевой соли, гидролиз которой разбавленной уксусной кислотой приводит к енаминокетону. Енаминокетоны – соединения близкие по реакционной способности к β -дикетонам и поэтому, способные при взаимодействии с концентрированными щелочами вступать в обратную реакцию *Кляйзена*, в результате чего в данном случае углеводородная цепь аминокислоты удлиняется на шесть углеродных атомов, которые ранее находились в циклогексановом кольце используемого енамина.

СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ.

СТЕРЕОХИМИЯ

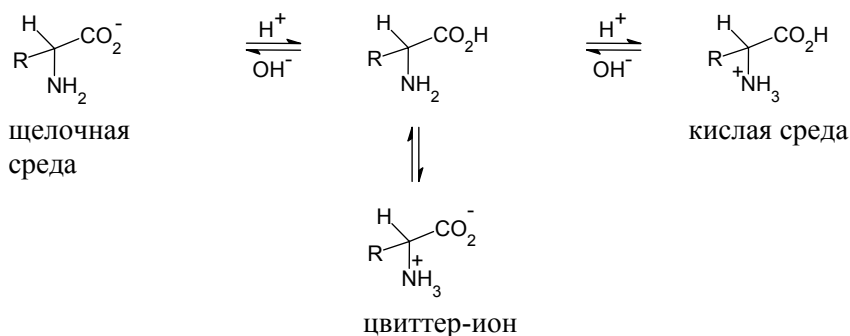
Как уже отмечалось ранее, практически все природные α -аминокислоты оптически активны (за исключением глицина) и относятся к L-ряду. Это означает, что в проекции **Фишера**, если внизу расположить заместитель, а сверху карбоксильную группу, то аминогруппа будет находиться слева.



Это, разумеется, не означает, что все природные аминокислоты вращают плоскость поляризованного света в одну и ту же сторону, поскольку направление вращения определяется свойствами всей молекулы, а не конфигурацией его асимметрического атома углерода. Большая часть природных аминокислот имеет S-конфигурацию (в том случае, когда в ее состав входит один асимметрический атом углерода). Некоторые микроорганизмы синтезируют аминокислоты D-ряда. Такие аминокислоты называют “неприродными”.

КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

Аминокислоты – амфотерные соединения, поскольку в состав их молекулы входит как кислотная – карбоксильная группа, так и основная – аминогруппа. В сильнокислой среде карбоксильная группа полностью недиссоциирована, а аминогруппа протонирована. Наоборот, в сильнощелочной среде аминогруппа находится в виде свободного основания, а карбоксильная группа – в виде карбоксилат-аниона. В кристаллическом же состоянии аминокислоты существуют в виде **цвиттер-иона** (или **бетаина**), где протон с карбоксильной группы перенесен на аминогруппу.

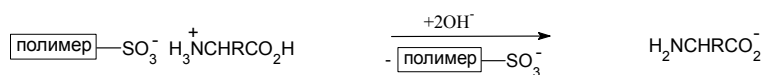
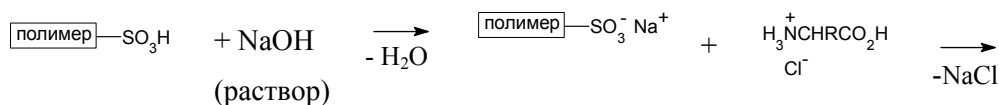


Если через водный раствор аминокислоты пропускать электрический ток, то в зависимости от pH среды молекулы аминокислоты будут двигаться либо к аноду, либо к катоду в соответствии с их степенью протонирования-депротонирования. Если величина pH такова, что аминокислота существует преимущественно в виде цвиттер-иона, а концентрации протонированной и депротонированной форм равны, то она не будет перемещаться ни к аноду, ни к катоду. Это, разумеется, не обязательно должно происходить при pH = 7, поскольку константа диссоциации карбоксильной группы чаще всего не совпадает с константой протонирования аминогруппы (или константой диссоциации аммониевой группы). Такое значение pH среды является характеристичным для каждой аминокислоты и называется ее **изоэлектрической точкой** (pI).

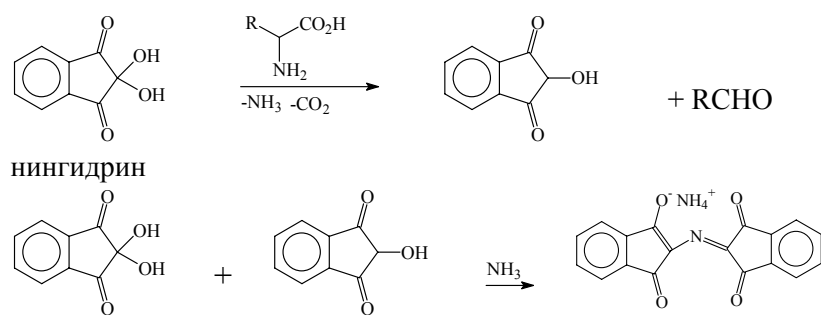
При пропускании постоянного тока через раствор смеси аминокислот последние будут перемещаться к аноду или к катоду с различными скоростями, зависящими от величины pH среды. Разделение и анализ смесей аминокислот, основанный на этом явлении, называется электрофорезом.

Используя кислотно-основные равновесия аминокислот, можно проводить их разделение на ионообменных колонках. Для этого колонку, наполненную адсорбентом (полимером, содержащим в составе макромолекулы, привитые кислотные группы, обычно сульфогруппы), промывают раствором щелочи. При этом кислотные группы переходят в анионную форму. После этого в колонку вносят смесь

аминокислот в протонированной форме (кислый раствор). Вследствие солеобразования аминокислоты связываются с сульфогруппами адсорбента. Далее колонку начинают промывать (элюировать) буферным раствором, постепенно увеличивая величину pH. При этом различные аминокислоты начинают переходить в анионную форму и смываться с колонки при различных значениях pH. Пропуская выходящий из колонки раствор через детектор, количественно определяют содержание индивидуальных аминокислот в исследуемой смеси.



Обычно детекторы определяют количество вещества, находящегося в растворе, по величине поглощения света, однако растворы аминокислот, как правило, не поглощают свет ни в видимой, ни в ультрафиолетовой области. Для того чтобы обнаружить присутствие аминокислоты в растворе, проводят реакцию с нингидрином.

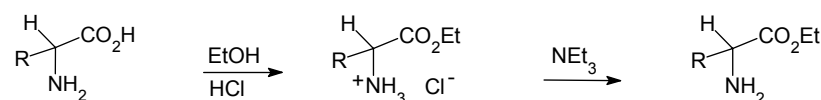


Как видно из представленной выше схемы, независимо от структуры аминокислоты при взаимодействии с нингидрином образуется одно и то же соединение, обладающее интенсивной синеволетовой окраской, концентрация которого зависит от концентрации аминокислоты в исследуемом растворе и легко может быть измерена по величине поглощения света, проходящего через раствор.

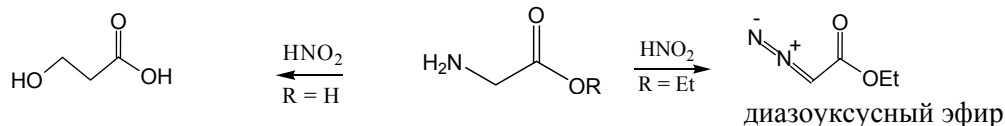
Некоторые из природных аминокислот не образуют синего окрашивания при обработке нингидрином. Как вы думаете, какие это аминокислоты?

РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Химические свойства α -аминокислот определяются наличием в составе их молекулы двух функциональных групп – аминогруппы и карбоксильной группы. Например, для них характерно образование сложных эфиров, которое происходит при пропускании хлористого водорода через раствор аминокислоты в спирте. При этом, разумеется, образуется хлоридат сложного эфира, свободное основание можно получить действием на соль триэтиламино или оксидом серебра. Другим способом получения метиловых эфиров аминокислот является реакция с диазометаном, которая происходит по карбоксильной группе.

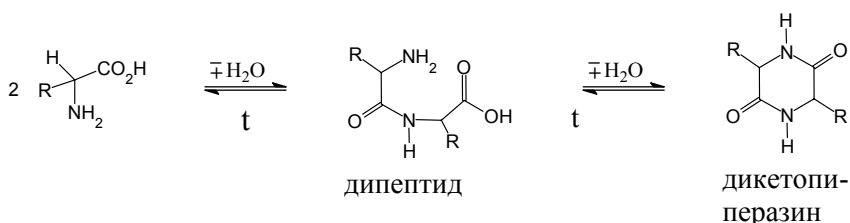


В отличие от этого реакция с галоидными алкилами происходит по аминогруппе. Например, при взаимодействии избытка йодистого метила с глицином в присутствии бикарбоната натрия происходит образование четвертичной соли, от которой при действии избытка основания отщепляется молекула



Почему не могут существовать диазокислоты?

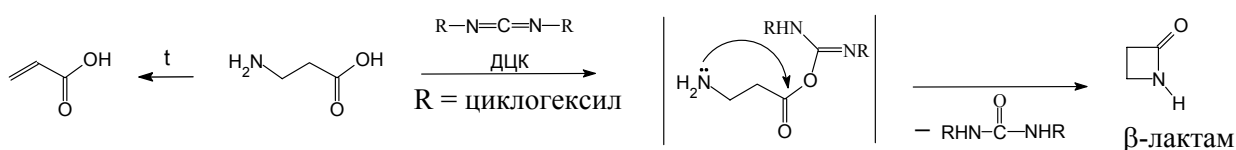
Интересной особенностью аминокислот является реакция их самоацилирования, которая может происходить при их нагревании и имеет сходство с реакциями, протекающими при нагревании оксикислот. Так, при нагревании α -аминокислот происходит их бимолекулярная циклизация с образованием дикетопиперазинов – соединений родственных по строению лактидам. Аналогичная реакция происходит и с эфирами α -аминокислот в более мягких условиях.



Эфиры аминокислот образуют дикетопиперазины в более мягких условиях, чем сами аминокислоты. Объясните причину этого явления.

При нагревании дикетопиперазинов в кислой (или щелочной) среде происходит размыкание цикла и образуется *дипептид* – ациклический димер аминокислоты, который в дальнейшем может быть превращен в две молекулы исходной аминокислоты. При нагревании дипептида возможно замыкание цикла с образованием дикетопиперазина. Другое возможное направление реакции – взаимодействие дипептида с еще одной молекулой аминокислоты и так далее, что может привести к полимерному полиамиду – полипептиду. Отметим, что в данном случае это направление реакции имеет меньшее значение, хотя сами полипептиды исключительно важные соединения и будут обсуждены ниже.

β -Аминокислоты при нагревании или при действии кислот подобно β -оксикислотам, превращаются в α,β -непредельные кислоты, а замыкания четырехчленного цикла в результате внутримолекулярного образования амида при этом не происходит. При взаимодействии же β -аминокислот с дициклогексилкарбодиимидом (ДЦК) происходит образование четырехчленного циклического амида – β -лактама. Причиной этого является реакция ДЦК с карбоксильной группой, приводящая к ее активации в результате превращения плохо уходящей группы OH в хорошо уходящую группу, и последующее внутримолекулярное ацилирование.



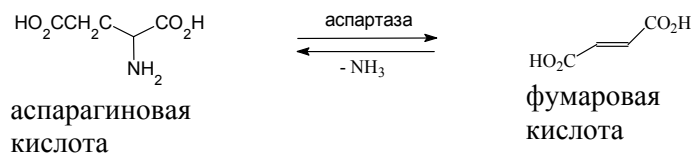
ДЦК является широко распространенным конденсирующим реагентом в синтезе пептидов, и с механизмом его действия вы уже ознакомились в разделе, посвященном карбоновым кислотам.

β -Лактамы весьма неустойчивые соединения и легко гидролизуются с образованием исходных аминокислот. β -Лактамный фрагмент входит в состав пенициллина. γ -Лактамы легко образуются при нагревании γ -аминокислот. Лактамы с большим размером цикла получают бекмановской перегруппировкой оксимов циклических кетонов.

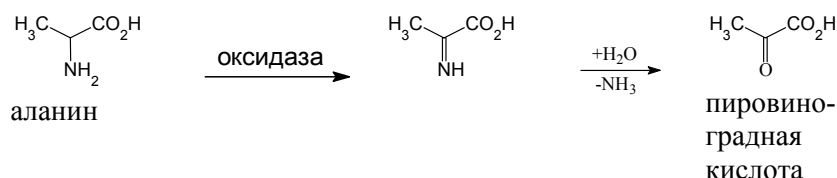


РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ *IN VIVO*

Аминокислоты в организме участвуют не только в синтезе белков, но и в некоторых других превращениях. Эти превращения являются экзотермическими и снабжают организм энергией. Три основных типа превращений аминокислот в организме – дезаминирование, переаминирование и декарбоксилирование. Дезаминирование может происходить окислительным и неокислительным путем. Неокислительное дезаминирование встречается в основном у бактерий и грибов. Например, аспарагиновая кислота превращается в фумаровую кислоту под действием фермента аспартазы.



Для протекания окислительного дезаминирования наряду с ферментом (оксидазой) необходим окислитель – акцептор водорода, в качестве которого обычно выступает флавинадениндинуклеотид (ФАД). Эта реакция протекает через стадию образования иминокислоты, которая далее гидролизуется в кетокислоту. Примером такой реакции является превращение аланина в пировиноградную кислоту.

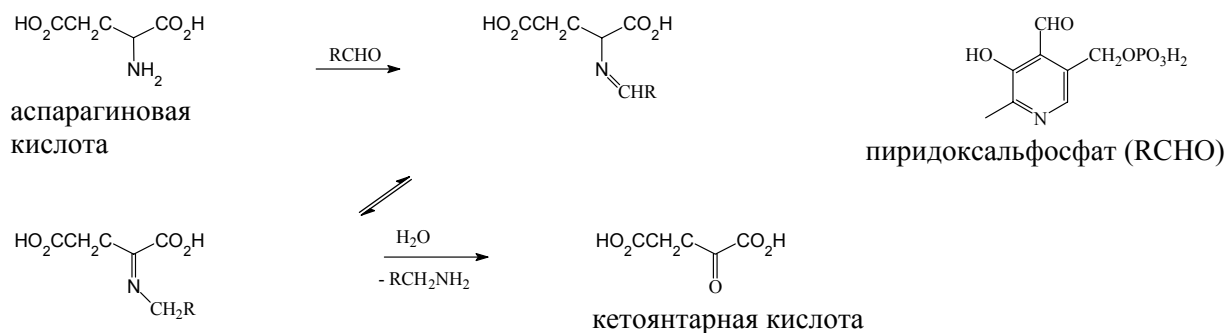


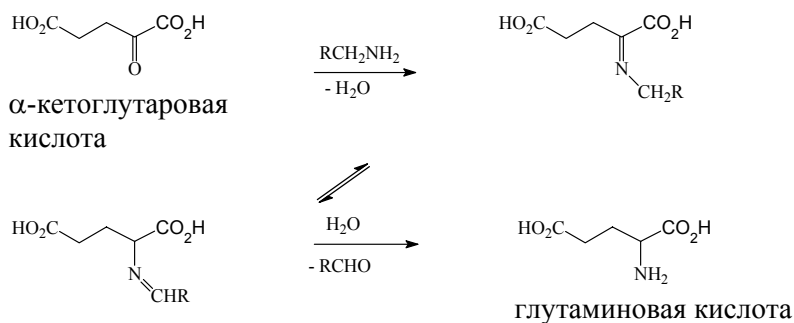
Реакция дезаминирования, удаляя из организма избыток аминокислот, приводит к накоплению в нем аммиака и аминов. Эти соединения часто являются токсичными для организма и их также необходимо удалять. Организмы, обитающие в воде, выделяют аммиак непосредственно в окружающую среду. Наземные животные используют для этой цели главным образом мочевины (млекопитающие) и мочевую кислоту (пресмыкающиеся и птицы). В организме взрослого человека мочевая кислота вырабатывается в качестве побочного продукта в количестве около 0,5 г/сутки. Увеличение концентрации этого соединения приводит к мочекаменной болезни или подагре.



Эти соединения часто являются токсичными для организма и их также необходимо удалять. Организмы, обитающие в воде, выделяют аммиак непосредственно в окружающую среду. Наземные животные используют для этой цели главным образом мочевины (млекопитающие) и мочевую кислоту (пресмыкающиеся и птицы). В организме взрослого человека мочевая кислота вырабатывается в качестве побочного продукта в количестве около 0,5 г/сутки. Увеличение концентрации этого соединения приводит к мочекаменной болезни или подагре.

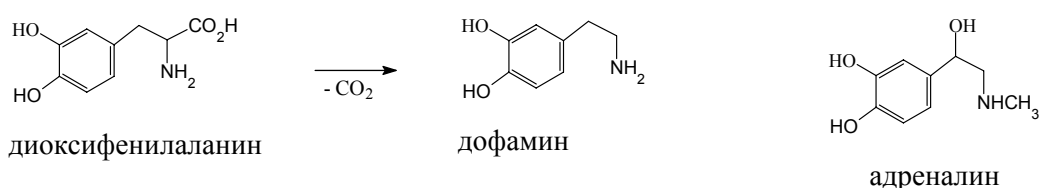
Реакция переаминирования заключается во взаимопревращении аминокислот и кетокислот и происходит под действием ферментов трансминаз. Эта реакция служит не только для разрушения аминокислот, но и для их биосинтеза. Например, аспарат- α -кетоглутараттрансминаза катализирует взаимопревращение аспарагиновой и α -кетоглутаровой кислот в кетоянтарную и глутаминовую кислоты. Такое превращение помимо фермента требует участия пиридоксальфосфата, роль которого заключается в окислении исходной молекулы аминокислоты, переносе молекулы аммиака к кетокислоте и последующем ее восстановлении. Отметим, что в этом процессе пиридоксальфосфат (RCHO) вначале превращается в пиридоксаминофосфат (RCH₂NH₂), а затем вновь регенерируется.



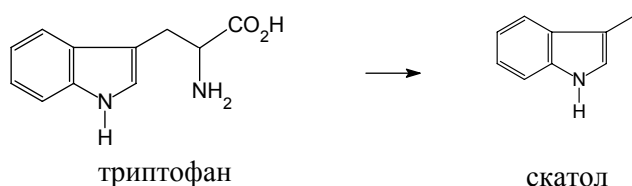


Реакции переаминирования, протекающие в организме, позволяют регулировать аминокислотный баланс – синтезировать аминокислоты, поступающие с пищей в недостатке (кроме незаменимых аминокислот!).

Декарбоксилирование аминокислот в организме происходит при действии ферментов, называемых декарбоксилазами. Некоторые из образующихся в результате реакции аминов, обладают биологической активностью. Особенно существенным является образование дофамина при декарбоксилировании диоксифенилаланина, поскольку дофамин является предшественником адреналина.

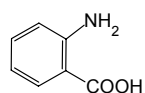


Подобные превращения могут протекать также при действии ферментов, функционирующих в бактериях, участвующих в процессе пищеварения человека. Под действием таких ферментов протекает, например, превращение триптофана в скатол (3-метилиндол) – вещество с сильным специфическим запахом, во многом определяющим запах экскрементов, применяемое, впрочем, в парфюмерии в качестве сенсбилизатора обонятельных рецепторов.

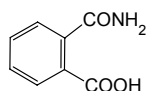
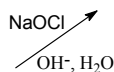
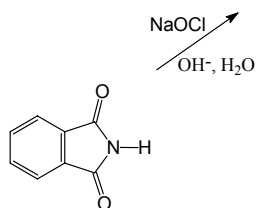


АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Ароматические аминокислоты можно синтезировать из нитробензойных кислот восстановлением нитрогруппы, либо в условиях каталитического гидрирования, либо взаимодействием с гидразином в присутствии никеля Ренея (восстановление диимидом). По этой схеме в промышленности получают *мета*- и *пара*-аминобензойные кислоты. *орто*-Аминобензойную (антраниловую) кислоту получают при действии гипохлорита натрия на фталимид либо на фталиминовую кислоту – моноамид фталевой кислоты, являющуюся, по-видимому, промежуточным соединением к *орто*-аминобензойной кислоте от фталимида (перегруппировка *Гофмана*).



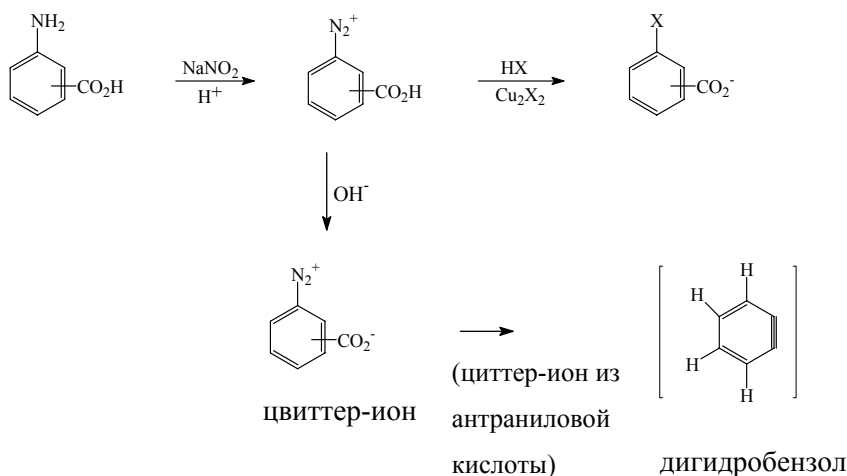
антраниловая кислота



фталиминовая кислота

Напишите механизм превращения фталимида в орто-аминобензойную кислоту.

Аминобензойные кислоты имеют меньшую температуру плавления, чем алифатические аминокислоты, и значительно лучше растворяются в органических растворителях. Это связано с тем, что они в значительной мере не являются цвиттер-ионными соединениями. Причина этого – меньшая основность аминогруппы, связанной с ароматическим кольцом (сравните основность анилина и циклогексиламина). Все три изомерные аминобензойные кислоты имеют сходные химические свойства, сочетающие реакционную способность как ароматических аминов, так и ароматических кислот. Так, при взаимодействии этих соединений с азотистой кислотой образуются соли диазония, которые в нейтральной среде могут существовать в виде внутренних солей (цвиттер-ионов). Соли диазония, полученные из аминобензойных кислот, могут быть использованы в превращениях, характерных для всех солей диазония, в частности, вступать в реакцию **Зандмейера**.



Перечислите заместители X, которые могут быть введены в состав молекулы вместо диазониесвой группировки. В каких условиях происходят эти реакции?

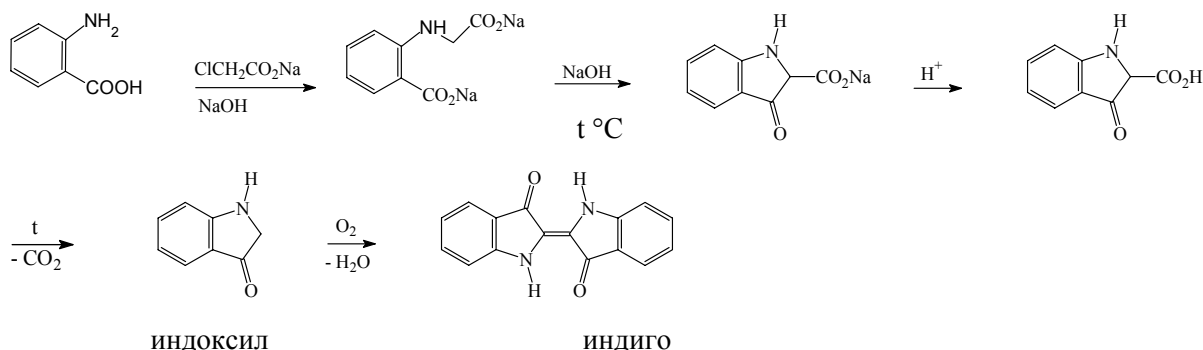
Отличительной особенностью соли диазония, полученной из антраниловой кислоты в среде органического растворителя при действии алкилнитритов, является легкость ее разложения при фотолизе или термоллизе с образованием дегидробензола. Дегидробензол является исключительно реакционноспособным соединением, и может вступать в различные превращения, например в реакцию **Дильса-Альдера** в качестве диенофила.

В каких еще реакциях возможно образование дегидро-бензола?

Изобразите структуру продукта взаимодействия де-гидробензола с антраценом.

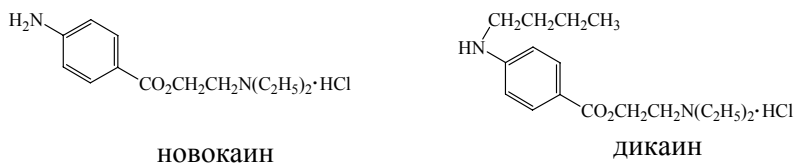
В случае фотохимического генерирования дегидробензола возможна его димеризация. Изобразите структуру димера дегидробензола. Возможна ли эта реакция в условиях термического генерирования дегидробензола?

Антралиловая кислота используется в качестве промежуточного соединения в синтезе азокрасителей в качестве диазосоставляющей, а также как исходное соединение в синтезе индиго – синего красителя, используемого с незапамятных времен. Ранее предшественник индиго выделяли из сока тропических растений вида *Indigofera*, теперь его получают из антралиловой кислоты по схеме, представленной ниже.



Предложите механизм реакции циклизации в схеме синтеза индиго, представленной выше.

para-Аминобензойная кислота используется в синтезе некоторых анестезирующих средств – анестезина (этиловый эфир *para*-аминобензойной кислоты), новокаина и дикаина.

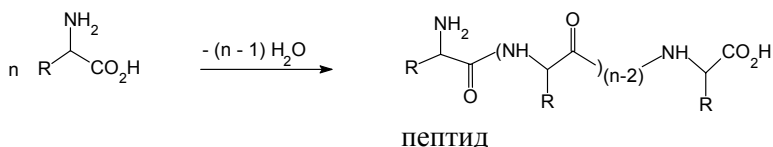


para-Аминобензойная кислота является фактором роста многих микроорганизмов (витамин Н). Антимикробное действие сульфамидных препаратов основано на том, что они “подменяют” необходимую для жизни бактерий *para*-аминобензойную кислоту в ее биохимических превращениях, образуя чужеродные для микроорганизмов продукты. По тому же принципу действует *para*-аминосалициловая кислота, являющаяся важным противотуберкулезным препаратом.

Предложите метод синтеза *para*-аминосалициловой кислоты.

ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

Наличие двух функциональных групп в составе молекулы аминокислоты – аминогруппы и карбоксильной группы – обуславливает возможность их межмолекулярного взаимодействия с образованием амида (сравни 26). Образующаяся при этом амидная связь называется пептидной, а образующиеся по этому принципу амиды называют пептидами или полипептидами. Соответственно, пептид, образованный из двух молекул аминокислоты, называется дипептидом, из трех молекул – трипептидом и так далее. Разумеется, цепь полипептида может быть образована как какой-нибудь одной, так и различными аминокислотами.

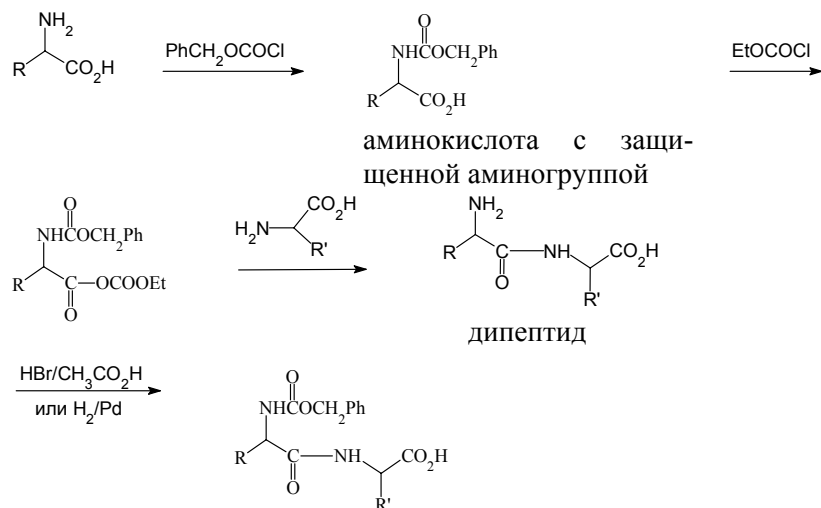


Природные биологически активные полипептиды - это сложные гетерополимеры, различающиеся последовательностью аминокислотных фрагментов, и даже небольшие изменения этой последовательности приводят к изменению их биологической активности. Мы не будем останавливаться здесь на функциях пептидов в живом организме, поскольку они рассматриваются в курсе “Биохимия”. Отметим только, что практически все ферменты являются полипептидами. Белки – тоже полипептиды,

молекулярная масса которых не ниже определенной величины, например 5000. Возможно, различия между белками и иными полипептидами заключены не в химическом, а в пространственном строении молекулы. Для каждого белка гибкая цепь полипептида имеет характерную трехмерную пространственную структуру (супрамолекулярную структуру), например в виде клубка с определенным образом устроенной поверхностью, на которой имеются выступы или впадины. Причем функции белков в организме обуславливаются в значительной степени именно этой трехмерной структурой.

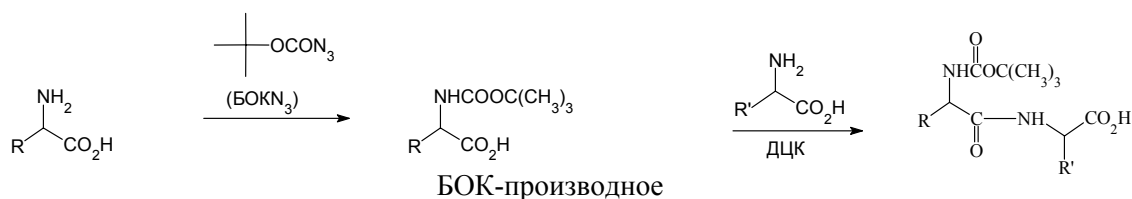
СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

Проблемы, возникающие при синтезе низкомолекулярных пептидов определенного строения, являются следствием бифункциональности исходных соединений и, следовательно, возможности неконтролируемого образования разнообразных пептидных связей как между различными, так и между одинаковыми молекулами аминокислот. Для того чтобы избежать этих осложнений, приходится защищать аминогруппу и активировать карбоксильную. Защищать карбоксильную группу нет необходимости, поскольку она сама по себе обладает достаточно низкой реакционной способностью и способна реагировать с аминогруппой только в весьма жестких условиях. Защитная группа должна устанавливаться селективно именно по защищаемой группе и удаляться в таких условиях, в которых не будут затрагиваться остальные функциональные группы в составе молекулы. Кроме того, когда речь идет об использовании защитных групп в синтезе таких сложных молекул как полипептиды, необходимо, чтобы защита ставилась и снималась с высоким выходом. Например, один из способов защиты (блокировки) аминогруппы заключается во взаимодействии аминокислоты с бензилхлорформиатом. Это соединение получают по реакции эквимолярных количеств бензилового спирта и фосгена. Следует отметить, что бензилхлорформиат быстрее реагирует с аминогруппой, нежели с карбоксильной группой аминокислоты. Впрочем, если даже реакция произойдет и по карбоксильной группе, то в результате образуется смешанный ангидрид, который является активным ацилирующим реагентом по незащищенной аминогруппе другой молекулы аминокислоты (см. ниже).



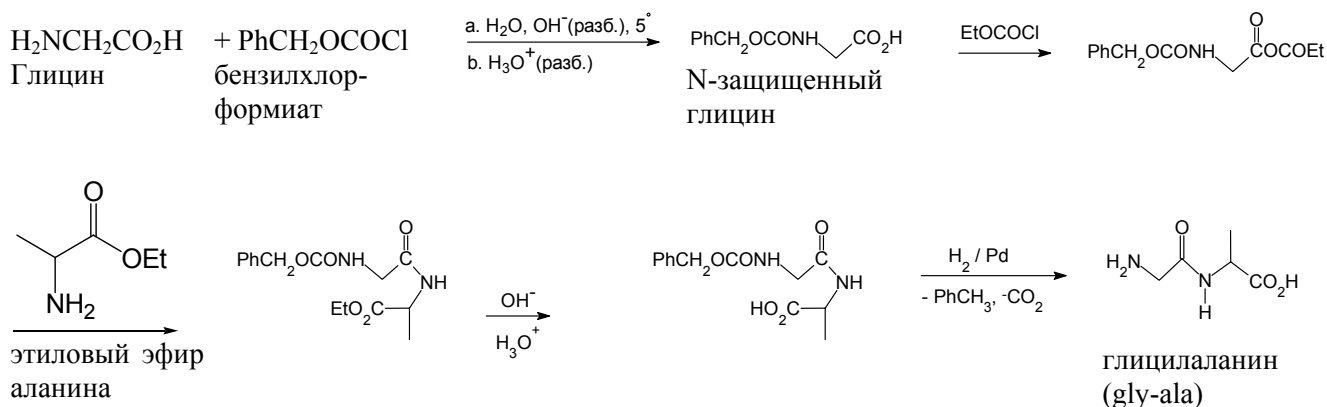
Далее необходимо активировать кислоту с защищенной аминогруппой превращением карбоксильной группы в более активную ацилирующую функцию. Для этого ранее использовали этилхлорформиат, который превращает карбоксильную группу в смешанный ангидрид. Полученная в результате таких превращений молекула способна реагировать только с аминогруппой другой молекулы аминокислоты с образованием дипептида с защищенной концевой аминогруппой. В полученной молекуле содержатся две амидные группы, и для того чтобы получить дипептид необходимо селективно гидролизовать одну из них, то есть снять защитную группу с концевой аминогруппы так, чтобы сформированная пептидная связь осталась незатронутой. Для этого используют либо взаимодействие с раствором бромистого водорода в уксусной кислоте при охлаждении, либо каталитический

гидрогенолиз. При этом если в синтезе использовались оптически активные аминокислоты, их рацемизация не происходит. Очевидно, что вовлекая в приведенную выше последовательность реакций дипептид с защищенной аминогруппой, можно синтезировать трипептид, тетрапептид, и так далее, варьируя структуру вводимых в реакцию аминокислот, и получить полипептид необходимой длины и структуры. Более совершенный метод синтеза основан на защите аминогруппы третбутоксикарбонильной группой, а для активации карбоксильной группы используется дициклогексилкарбодиимид (ДЦК). Для модификации аминогруппы в составе молекулы аминокислоты с образованием третбутоксикарбонильного производного (БОК-производного), ее обрабатывают третбутоксикарбозидом. Возникающая при этом защитная группа снимается в более мягких условиях, чем бензилокси-карбонильная – при действии раствора хлористого водорода в уксусной кислоте. ДЦК, как отмечалось выше (26), превращает карбоксильную группу в активное производное, которое образует пептидную связь при взаимодействии с аминами в исключительно мягких условиях.



Предложите механизм реакции гидролиза БОК-производного в кислой среде. С чем связана большая легкость протекания реакции по сравнению с бензилоксикарбонильным производным?

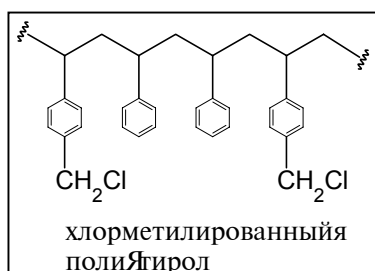
В заключение отметим, что в синтезе пептидов по любому из описанных выше методов для ацилирования обычно используют не саму аминокислоту, а ее эфир, что сводит к минимуму образование побочных продуктов. Ниже приведена классическая схема синтеза дипептида, являющегося аланином, ацилированным по аминогруппе остатком глицина – глицилаланина (gly-ala).



Аналогичным образом глицилаланин может быть синтезирован с применением третбутилкарбозазида для защиты аминогруппы и ДЦК для активации карбоксильной группы. Выходы продуктов на каждой стадии реакции достаточно высоки и нет принципиального запрета на синтез сколь угодно длинной пептидной цепи с применением этой последовательности реакций. Однако совершенно ясно, что даже если выход на каждой стадии составит более 90%, то при синтезе пептида, включающего, например, 100 аминокислотных фрагментов, в итоге выход конечного продукта составит миллионные доли процента! Поэтому синтез достаточно сложного пептида с использованием этой методологии практически нереален – очень велики затраты времени и очень низок выход целевого продукта. Несколько упрощает дело то обстоятельство, что в природных пептидах встречаются повторяющиеся звенья из нескольких аминокислотных остатков. Это означает, что в синтезе вместо двух аминокислот могут быть использованы два пептида, в одном из которых защищена концевая аминогруппа и активирована карбоксильная группа, а в другом - аминогруппа не защищена, а карбоксильная группа превращена в сложный эфир. Иными словами, синтез более рационально вести не по схеме $1 + 1 \Rightarrow 2 + 1$

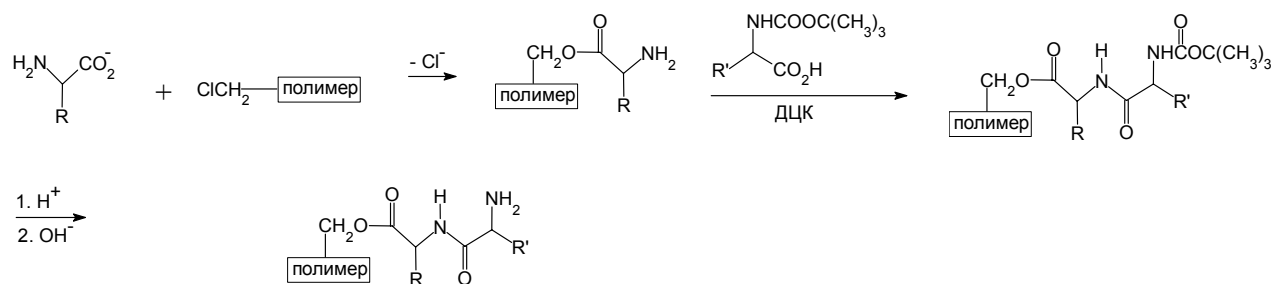
$\Rightarrow 3 + 1 \dots$, а, например следующим образом $1 + 1 \Rightarrow 2 + 2 \Rightarrow 4 + 4 \Rightarrow 8$. Количество стадий сократится, а выход конечного продукта при этом будет соответственно заметно выше.

Еще более удобен так называемый твердофазный синтез пептидов. Для этой цели аминокислоту, которая в итоге даст концевую карбоксильную группу, превращают в сложный эфир при взаимодействии ее соли с неким полимером, в составе которого присутствуют активные алкилирующие группы. В качестве такого полимера используют, например, хлорметилированный полистирол, который получают

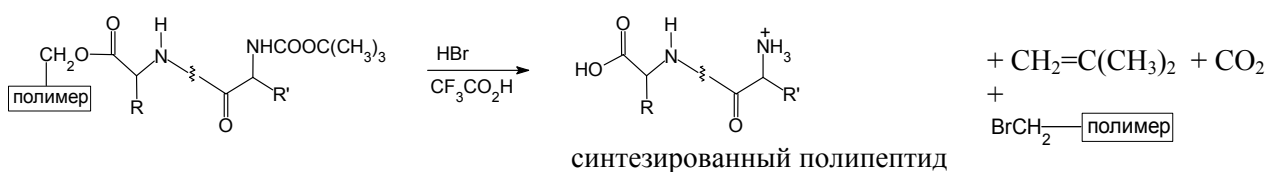


хлорметилированием полистирола таким образом, что содержание хлорметильных групп составляет не более 1-2% от числа фенольных групп. Важное значение имеет размер пор в полимере: они должны быть сопоставимы по величине с размером молекулы пептида - 20÷70 мкм. При этом доступная для реакции поверхность полимерной матрицы обеспечивает наибольшую степень ее использования для связывания с ней молекул аминокислоты.

Итак, первая стадия реакции - образование сложного эфира аминокислоты при взаимодействии ее с полимерной матрицей. Затем свободную аминогруппу этого сложного эфира ацилируют другой аминокислотой, аминогруппа которой защищена, а карбоксильная группа - активирована дициклогексилкарбо-диимидом. После снятия защиты с аминогруппы и подщелачивания образуется дипептид со свободной аминогруппой, привитый на полимерную матрицу. Следовательно, описанную процедуру ацилирования можно повторить и получить трипептид, и так до тех пор, пока не образуется пептид желаемого строения, связанный с полимерной матрицей.



На последней стадии полученный полимер, включающий связанный полипептид, обрабатывают смесью бромистого водорода и трифторуксусной кислоты, в результате чего снимается защита с концевой аминогруппы и одновременно происходит гидролиз сложноэфирной связи, соединяющей полипептид с матрицей, и он выделяется в свободном состоянии.



Зная состав продуктов реакции на последней стадии синтеза пептида, предложите ее механизм.

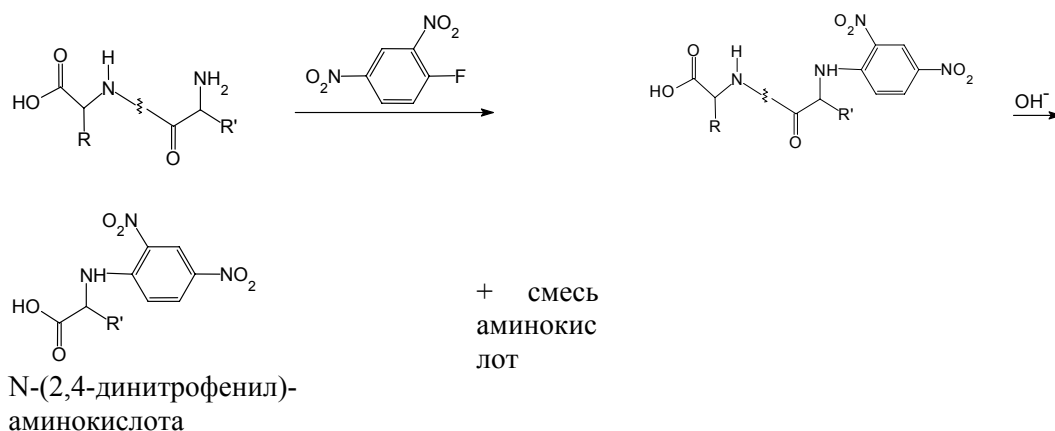
Твердофазный метод синтеза пептидов обладает следующими преимуществами. Во-первых, поскольку продукт на каждой стадии является полимером, то он обладает очень низкой растворимостью и, следовательно, может быть легко отделен (отмыт) от не вступивших в реакцию исходных соединений и побочных продуктов, являющихся мономерами. Во-вторых, и это главное следствие первого преимущества, такая схема синтеза позволяет автоматизировать пептидный синтез. На этой основе созданы автоматы, синтезирующие пептиды с заданной аминокислотной последовательностью. Эти приборы сами вводят необходимые реагенты в нужной последовательности, обеспечивают необходимое время и условия реакции, осуществляют отмывку полимера на каждой стадии. С использованием этих автоматов были синтезированы такие полипептиды (белки), как инсулин и фермент рибонуклеаза,

пептидная цепь которой состоит из 124 фрагментов аминокислот. Рутинный автомат для синтеза пептидов за одни сутки соединяет в цепь шесть аминокислот.

АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ

Пептиды, как и любые другие амиды, можно гидролизовать водным раствором кислоты или щелочи. При этом образуется смесь аминокислот. После этого с использованием аминокислотного анализатора можно установить качественный и количественный аминокислотный состав исследуемого пептида, но не последовательность, в которой были соединены аминокислоты в нем. Последнее достигается с помощью специфических методов селективного гидролиза пептидов с использованием ферментов, которые рассматриваются в соответствующих разделах курса биохимии. Мы же остановимся на чисто химических методах анализа.

Пептиды способны реагировать с 2,4-динитрофторбензолом по концевой аминогруппе. В результате гидролиза модифицированного таким образом пептида образуется смесь аминокислот, из которых только та, что была концевым фрагментом пептида и содержала свободную аминогруппу, оказывается арилированной по атому азота и поэтому легко может быть выделена и идентифицирована.

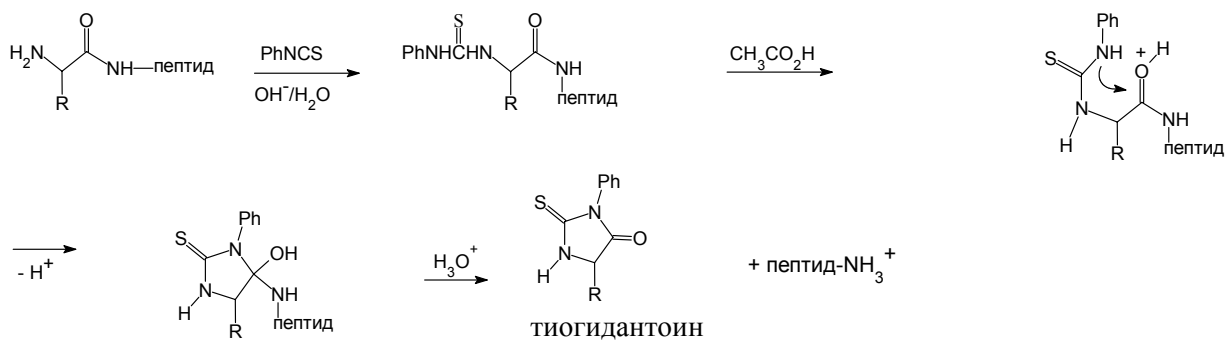


Взаимодействие аминокислоты с 2,4-динитрофтор-бензолом можно рассматривать как реакцию ароматического нуклеофильного замещения. Предложите механизм этой реакции, объясните, с чем связана необходимая для данного случая легкость ее протекания и почему гидролиз ариламиногруппы не происходит в процессе гидролиза пептида.

Для того чтобы установить последовательность аминокислот в изучаемом пептиде, можно провести его неполный гидролиз. При этом могут быть выделены как отдельные аминокислоты, так и ди-, три- или полипептиды большей длины, соответствующие фрагментам исходного пептида. Из этих фрагментов, установив предварительно строение каждого из них, можно, как из элементов мозаики, воспроизвести строение исходного пептида.

Другая возможность установления строения пептида заключается в последовательном отщеплении концевых аминокислотных фрагментов. Для этого используют так называемые карбоксипептидазы - ферменты, способные катализировать гидролиз только С-концевой пептидной связи (то есть пептидной связи, образованной аминокислотой со свободной карбоксильной группой). При этом невозможно остановить реакцию после отщепления только одной аминокислоты от исходного пептида, зато можно проследить зависимость концентрации каждой образующейся аминокислоты от продолжительности гидролиза и по этой зависимости судить о последовательности аминокислотных фрагментов.

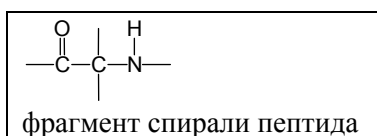
Еще одна возможность селективной фрагментации пептида заключается в его взаимодействии с фенилизотиоцианатом, который реагирует только с концевой аминогруппой (*деградация по Эдману*).



Таким образом, удается отщепить только концевую аминокислоту, поскольку расщепление пептидной связи по сути дела происходит в две стадии. Указанную последовательность реакций можно осуществить многократно и установить аминокислотную последовательность сколь угодно длинного полипептида, то есть его *первичную структуру*. Учитывая, однако, что природные полипептиды могут включать и зачастую включают сотни аминокислотных фрагментов, можно сказать, что установление их первичной структуры любым способом является исключительно сложной и трудоемкой задачей. Неудивительно, поэтому, что в 1958 г Сэнгер был удостоен Нобелевской премии за установление структуры *инсулина* – пептида, в состав которого “входит всего лишь” 51 аминокислотный фрагмент.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКОВ

Как уже отмечалось, последовательность аминокислотных фрагментов в пептидной цепи белка называется его *первичной* структурой. Практически этим не заканчивается описание структуры белковой молекулы, поскольку белок обладает сложной макроструктурой, которая собственно и обеспечивает его функционирование в живом организме. Выделяют различные уровни организации белковой молекулы,



определяемой в конечном счете ее *первичной структурой*. Так, под *вторичной и третичной структурами* белковой молекулы понимают ее пространственное строение. Благодаря наличию большого числа связей N-H в молекуле полипептида образуются многочисленные водородные связи, в которых в качестве донорных центров выступают атомы кислорода карбонильных групп. При этом по пространственным

соображениям энергетически выгодным оказывается образование водородных связей между атомами кислорода и водорода амидных групп, разделенных тремя аминокислотными остатками. Это приводит к тому, что молекула полипептида принимает форму правовращающей α -спирали. Очевидно, что эта спираль сама по себе является хиральной, а потому оптически активной.

Любая пептидная спираль состоит из практически одинаковых повторяющихся фрагментов, и, следовательно, ее геометрические параметры примерно одинаковы для всех белков. Линейное расстояние между двумя топологически однородными атомами (шаг спирали) составляет 1,5 Å. Угол между перпендикуляром к оси спирали и плоскостью, в которой располагается аминокислотный остаток, составляет 26°. Один виток спирали включает 3,6 аминокислотных остатка, что соответствует линейному расстоянию между соседними витками вдоль оси спирали (шагу), равному 5,4 Å.

Если бы все белки были устроены таким образом, то они были бы жесткими цилиндрическими структурами, однако практически это не так. Причин этого явления довольно много, и одна из них – наличие в пептидной цепи фрагментов таких аминокислот, как пролин, оксипролин и валин. В первых двух аминокислотах аминогруппа является вторичной (см. таблицу), и после образования пептидной связи при атоме азота не остается атома водорода. Следовательно, этот атом азота не может участвовать в формировании α -спирали. В случае валина образованию водородной связи, по-видимому, препятствует объемная изопропильная группа у α -углеродного атома.

Другим типом организации вторичной структуры является так называемая *складчатая β -структура*. При этом пептидные цепи располагаются параллельно (*параллельная складчатая β -структура*) или антипараллельно (*антипараллельная складчатая β -структура*)

Для удобства описания структур белковых молекул их делят на две группы – *фибриллярные* и *глобулярные*. Любая молекула занимает в пространстве некоторый объем, и если отношение длины к ширине белковой молекулы больше 10, то ее считают *фибриллярной*, в противоположном случае – *глобулярной*. Эти термины относятся к *третичной структуре* белков. *Фиброин* шелка и β -форма (развернутая форма) *кератина* относятся к группе фибриллярных белков, у которых полипептидные цепи организованы в складчатую структуру. В состав *коллагена* – другого фибриллярного белка – входит много фрагментов глицина и пролина, вследствие чего он не способен образовывать ни α -спираль, ни складчатую β -структуру. Этот белок построен из трех спиралей, каждая из которых левовращающая, навитых друг на друга в правовращающую спираль. Две из трех полипептидных цепей коллагена имеют одинаковую первичную структуру. Коллаген – наиболее распространенный белок позвоночных животных, на его долю приходится около половины сухого веса хрящей и около 30% твердого вещества кости. В биологических системах коллаген встречается обычно в виде пучков линейных волокон исключительно высокой прочности.

Практически все превращения органических молекул в живом организме происходят при участии биологических катализаторов - ферментов, которые представляют собой глобулярные белки. Высокая селективность химических превращений, катализируемых ферментами, связана с их уникальной и очень сложной макроструктурой. Архитектура молекулы фермента определяется не только наличием водородных связей, но и дополнительных химических связей, – например, дисульфидных связей между фрагментами цистина из разных пептидных цепей, электростатических взаимодействий между протонированными аминогруппами и карбоксилат-анионами. Кроме того, на геометрию столь сложной и большой молекулы, которую она принимает в биологической среде, влияет гидрофобность или гидрофильность ее отдельных фрагментов.

И, наконец, для того чтобы фермент мог выполнять свои функции в качестве катализатора, зачастую требуется не один, а несколько белков, образующих комплекс. В этом случае любой из входящих в него белков (белковых субъединиц) можно рассматривать как мономер, а способ организации этих “мономеров” в биологически активный комплекс называется *четвертичной структурой* белка.

Учитывая сложность четвертичной структуры белка, многочисленность формирующих ее довольно слабых взаимодействий, таких, например, как сольватационные эффекты (взаимодействие с молекулами растворителя), можно сделать вывод, что полная структура белка, включая все уровни организации, за исключением первичной структуры, жестко определяется условиями, в которых она формируется. При малейшем изменении условий все уровни организации, кроме первичной структуры, изменяются или полностью разрушаются. Полное разрушение называется *денатурацией*. Например, при варке яиц происходит тепловая денатурация яичного белка – альбумина. Вообще денатурация может происходить под влиянием различных факторов – повышения температуры, изменения pH среды, действия окислителей или восстановителей, разрушающих дисульфидные связи, детергентов (поверхностно-активных веществ), которые изменяют величину поверхностного натяжения и могут нарушить гидрофильные и гидрофобные взаимодействия между отдельными фрагментами молекулы белка или взаимодействие молекулы в целом с окружающей водной средой. Денатурация происходит также при действии веществ, способных к образованию сильных водородных связей (например, мочевины), и даже в результате механического воздействия (ультразвук). Таким образом, чтобы установить полную структуру белка (а не первичную структуру одной из его субъединиц), с молекулой белка приходится работать в исключительно мягких условиях, близких к биологическим и естественным для данного белка. Практически единственным удовлетворяющим этим требованиям методом установления структуры нативного (природного) белка является метод рентгеноструктурного анализа. Для этого белок необходимо получить в виде монокристалла. Это работа исключительно сложная, но выполнимая.