

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В. Н. Леонтьев

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Электронный курс лекций
для студентов специальности 1-48 02 02
«Технология лекарственных препаратов»
специализации 1-48 02 02 01
«Промышленная технология лекарственных препаратов»

Минск 2014

УДК 547.22:615.2(0.034)
ББК 28.072+35.66я75
Л47

Рассмотрено и рекомендовано редакционно-издательским советом
Белорусского государственного технологического университета

Рецензенты:

профессор кафедры высокомолекулярных соединений
Белорусского государственного университета,
доктор биологических наук, профессор
В. М. Шкуматов;

заведующий лабораторией химии клеточных и субклеточных
процессов ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
доктор химических наук, профессор
П. А. Киселев

Леонтьев, В. Н.

Л47 Химия и технология биологически активных веществ : электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1-48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов» / В. Н. Леонтьев. – Минск : БГТУ, 2014. – 94 с.

Электронный курс лекций посвящен химии и технологиям получения биологически активных веществ (аминокислот, пептидов, нуклеотидов, углеводов, липидов, витаминов и стероидов), используемых в производстве лекарственных средств или фарм субстанций. Рассмотрены методы химического, химико-ферментативного и микробиологического синтезов, а также технологии получения биологически активных веществ из сырья растительного и животного происхождения.

УДК 547.22;615.2(0.034)
ББК 28.072+35.66я75

© УО «Белорусский государственный
технологический университет», 2014
© Леонтьев В. Н., 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Тема 1. Структура, функции и технологии получения аминокислот и пептидов.....	5
Тема 2. Структура, функции и технологии получения нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов	32
Тема 3. Структура, функции и технологии получения углеводов	41
Тема 4. Структура, функции и технологии получения липидов	54
Тема 5. Структура, функции и технологии получения витаминов	68
Тема 6. Структура, функции и технологии получения стероидов	79
Список литературы	93

ВВЕДЕНИЕ

Химия и технология биологически активных веществ – область науки, изучающая структуру, свойства и способы получения органических веществ, обладающих биологической активностью. Причем способы получения ориентированы на технологии промышленного производства этих соединений с целью применения в различных областях человеческой деятельности.

В настоящее время производится широкий ассортимент биологически активных веществ фармацевтического, пищевого, сельскохозяйственного назначения (антибиотики, гормоны, ферменты, кормовые и пищевые добавки, средства защиты растений и др.).

Среди разнообразия биологически активных веществ в курсе *«Химия и технология биологически активных веществ»* рассмотрены структура и функции соединений (аминокислот, пептидов, нуклеотидов, углеводов, липидов, витаминов и стероидов), используемых в качестве лекарственных средств или фармсубстанций.

Курс базируется на знаниях органической химии, биотехнологии, биохимии и посвящен получению биологически активных веществ с применением химического, химико-ферментативного и микробиологического синтезов.

Большое внимание также уделено технологиям получения лекарственных средств из растительного сырья (фитопрепаратов). Преимуществом фитопрепаратов является их малая токсичность, комплексность воздействия и возможность длительного применения без существенных побочных явлений. Необходимо отметить, что ряд ценных лекарственных средств получают только из растений.

Ассортимент растительных лекарственных средств постоянно расширяется как за счет применения новых растений или их сочетаний, так и за счет появления новых лекарственных форм (аэрозоли, пластыри, суппозитории и др.).

Представлены также технологии получения биологически активных веществ из сырья животного происхождения.

Рассмотренные в курсе лекций *«Химия и технология биологически активных веществ»* технологии получения лекарственных средств применяются на фармацевтических предприятиях Республики Беларусь.

ТЕМА 1

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

1.1. Структура и функции аминокислот и пептидов

Аминокислоты – органические соединения, молекулы которых содержат одновременно аминогруппу и карбоксильную группу. В зависимости от взаимного расположения обеих функциональных групп различают α -, β -, γ -аминокислоты.

Общая структурная формула α -аминокислот представлена на рис. 1.1.

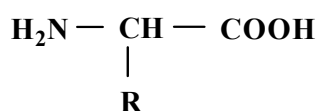


Рис. 1.1. Общая структурная формула α -аминокислот

В водных растворах все аминокислоты представляют собой биполярные соединения – **цвиттер-ионы**. Степень ионизации амино- и карбоксильной групп аминокислот зависит от pH раствора.

Свойства α -аминокислот определяются структурой радикала R. Только одна α -аминокислота не имеет радикала R – глицин.

В зависимости от радикала R все α -аминокислоты можно разделить на следующие группы:

1. α -аминокислоты с алифатическими боковыми цепями (аланин, валин, лейцин, изолейцин);
2. α -аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (фенилаланин, тирозин, триптофан);
3. α -аминокислоты – кислоты и их амиды (глутаминовая кислота, глутамин, аспарагиновая кислота, аспарагин);
4. α -аминокислоты – спирты (серин, треонин);
5. α -аминокислоты с основными боковыми цепями (лизин, аргинин, гистидин);
6. α -аминокислоты с серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин);
7. α -иминокислоты (пролин, оксипролин).

Основной биологической функцией α -аминокислот является участие в биосинтезе пептидов и белков.

Биологическая активность α -аминокислот имеет широкий спектр проявлений, в связи с чем многие из них находят применение в качестве лекарственных средств (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Лекарственные средства на основе аминокислот

Торговое название лекарственного средства	Действующее вещество (аминокислота)
<i>D, L</i> -метионин	Метионин
<i>L</i> -метионин	Метионин
<i>L</i> -аргинин	Аргинин
<i>L</i> -аспарагиновая кислота	<i>L</i> -аспарагиновая кислота
<i>L</i> -валин	Валин
<i>L</i> -лизина ацетат	Лизин
<i>L</i> -пролин	Пролин
<i>L</i> -треонин	Треонин
<i>L</i> -фенилаланин	Фенилаланин
<i>L</i> -цистин	Цистин
Глицин Озон	Глицин
Глицин форте	Глицин
Глицин-Био	Глицин
Глутаргин	Аргинина глутамат
Глутаминовая кислота	Глутаминовая кислота

Пептиды представляют собой органические соединения, построенные из остатков α -аминокислот, соединенных между собой пептидными связями (рис. 1.2).

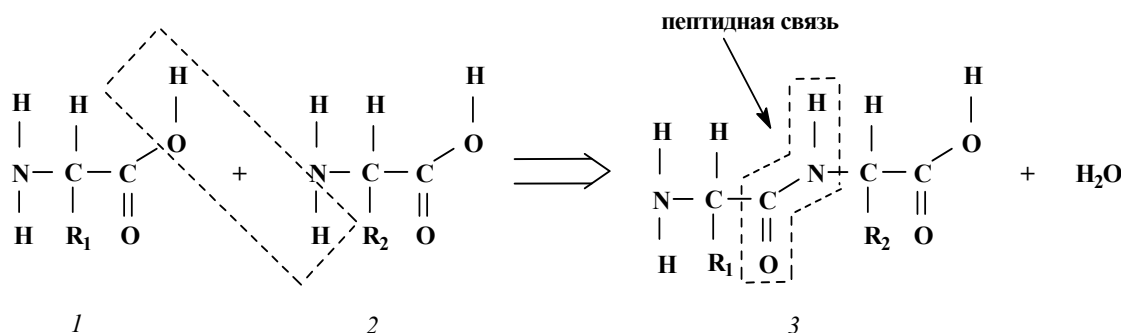


Рис. 1.2. Формальная схема образования пептидной связи:
1 – аминокислота; 2 – аминокислота; 3 – дипептид

Пептиды, в молекулах которых меньше десяти аминокислотных остатков, относятся к олигопептидам, пептиды, построенные из большего числа аминокислотных остатков (до 100), – к полипептидам.

Важнейшие группы пептидов представлены на рис. 1.3.

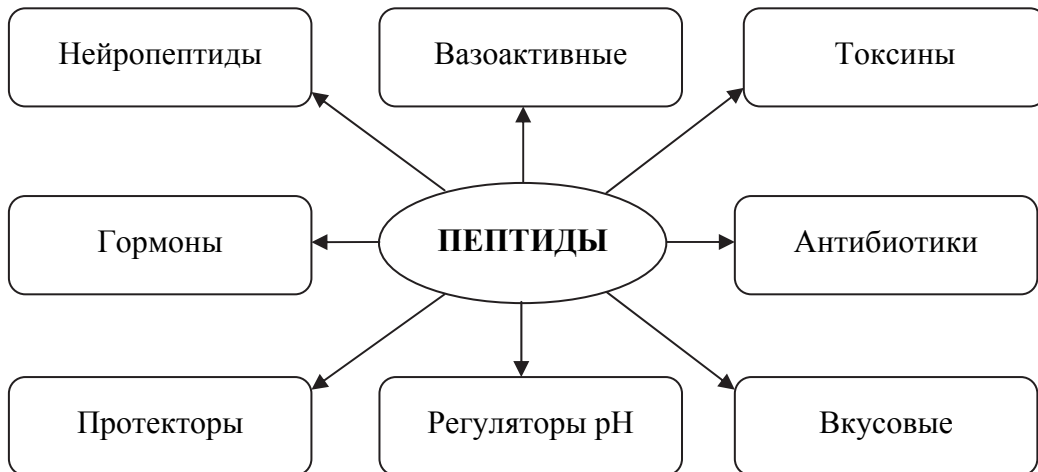


Рис. 1.3. Важнейшие группы пептидов

Нейропептидами называются вещества, обнаруженные в мозге позвоночных и беспозвоночных животных и способные влиять на функции центральной нервной системы. Биологическое действие этих пептидов связано с регуляцией болевых ощущений, эмоционального поведения, памяти, обучаемости.

Вазоактивные пептиды. К группе пептидов, оказывающих влияние на тонус сосудов, относятся брадикинин, каллидин и ангиотензин. Все они синтезируются из неактивных белковых предшественников в результате процесса посттрансляционной модификации.

Пептидные токсины. Пептидную природу имеет ряд токсинов, вырабатываемых микроорганизмами, ядовитыми грибами, пчелами, змеями, морскими моллюсками и скорпионами. Идентифицировано 5 энтеротоксинов, продуцируемых бактериями *Staphylococcus aureus*, и 7 нейротоксинов, вырабатываемых бактериями *Clostridium botulinum*.

Энтеротоксины могут вырабатываться и бактериями *Salmonella* и *Clostridium perfringens*, являясь при этом причиной расстройства работы кишечника, обморочных состояний и лихорадки (брюшного тифа). Продуцируются энтеротоксины чаще в продуктах животного происхождения (говядина, птица, сыр, рыба), чем растительного (фасоль, оливы).

Наиболее хорошо изучен энтеротоксин *C. perfringens* с молекулярной массой 36 кД и изоэлектрической точкой 4,3. Токсин содержит 19 остатков аминокислот, среди которых преобладают аспарагиновая кислота, лейцин и глутаминовая кислота. Ухудшая транспорт

электролитов и глюкозы, данный токсин вызывает гибель клеток кишечника.

Ядовитый гриб бледная поганка содержит около 10 циклических пептидов с молекулярной массой около 1000. Типичным представителем является особо ядовитый токсин α -аманитин.

К токсичным компонентам яда пчел, оказывающим сильное влияние на ЦНС, относится апамин, состоящий из 18 аминокислотных остатков, а морских моллюсков – конотоксин, содержащий 13 остатков.

Пептиды-антибиотики. Представителями данной группы пептидов являются грамицидин С – циклический антибиотик, синтезируемый бактериями *Bacillus brevis*, и сурфактин – поверхностно-активный (содержащий сложноэфирную связь) антибиотик, синтезируемый бактериями *Bacillus subtilis*. Оба антибиотика эффективны при борьбе с инфекционными заболеваниями, вызываемыми стрептококками и пневмококками.

Структурной основой антибиотиков, выделяемых плесневыми грибами *Penicillium*, является дипептид, построенный из остатков D-валина и цистина.

Вкусовые пептиды. Наиболее важными соединениями этой группы являются сладкие и горькие пептиды. В производстве мороженого и кремов в качестве подсластителей или усилителей вкуса используется аспартам, представляющий собой метиловый эфир L- α -аспартил-L-фенилаланина. Аспартам слаще сахарозы в 180 раз, однако, при длительном хранении и тепловой обработке сладость уменьшается.

Пептиды горького вкуса образуются при распаде белков в сырах и молоке при участии протеаз молочнокислых бактерий. Они представляют собой низкомолекулярные гидрофобные соединения, содержащие от 2 до 8 остатков аминокислот полипептидных цепей α_5 -казеина и β -казеина. Многие из горьких пептидов содержат N-концевую циклизированную глутаминовую кислоту. По мере гидролиза пептидов горький вкус таких соединений обычно исчезает.

Пептиды-регуляторы рН. В мышцах различных животных и человека обнаружены дипептиды – карнозин и ансерин, выполняющие буферные функции за счет входящего в их состав имидазольного кольца гистидина. Отличительной особенностью пептидов является присутствие в них остатка β -аланина.

Протекторные пептиды. Одним из наиболее распространенных соединений с протекторными свойствами является трипептид глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин). Глутатион содержится во всех

животных, растениях, бактериях, однако наибольшее его количество встречается в дрожжах и зародыше пшеницы. Вступая в окислительно-восстановительные реакции, глутатион выполняет функцию протектора, предохраняющего свободные SH-группы от окисления. Он принимает на себя действие окислителя, «защищая» тем самым белки или, например, аскорбиновую кислоту. При окислении глутатиона образуется межмолекулярная дисульфидная связь.

Глутатион принимает участие в транспорте аминокислот через мембраны клеток, обезвреживает соединения ртути, ароматические углеводороды, перекисные соединения, предотвращает заболевание костного мозга и развитие катаракты глаз.

Пептиды-гормоны. Гормоны – вещества органической природы, вырабатываемые клетками желез внутренней секреции и поступающие в кровь для регуляции деятельности отдельных органов и организма в целом. Гормоны окситоцин и вазопрессин выделяются задней долей гипофиза. Они содержат по 9 аминокислотных остатков, одну дисульфидную связь и на С-конце – амидную группу $-CONH_2$.

Регуляторная функция обоих гормонов заключается в стимуляции сокращения гладкой мускулатуры организма и секреции молока молочными железами.

Гормоны гипоталамуса, в котором эндокринный аппарат взаимодействует с высшими отделами ЦНС, являются низкомолекулярными пептидами. Так, тиролиберин представлен трипептидом, состоящим из пироглутаминовой (циклической) кислоты, гистидина и пролинамида, люлиберин является декапептидом, а соматостатин – циклическим тетрадекапептидом.

Гипоталамические гормоны участвуют в процессе высвобождения гормонов передней доли гипофиза. Тиролиберин, например, контролирует освобождение тиротропина – гормона, принимающего участие в регуляции деятельности щитовидной железы, соматостатин регулирует активность гормона роста (соматропина), а люлиберин участвует в регуляции выделения лютропина – гормона, влияющего на деятельность половых органов. Многие из гормонов (окситоцин, тиролиберин, пролактин – гормон передней доли гипофиза и гонадолиберин – гормон гипоталамуса) присутствуют в молоке жвачных животных и кормящих матерей.

Известен пептидный гормон меланотропин (МСГ), выделяемый в кровь промежуточной долей гипофиза. Одноцепочный пептид стимулирует образование пигмента, обуславливающего цвет глаз, кожи, волос. Различают две разновидности МСГ: α -МСГ, состоящий из

13 остатков аминокислот, и β -МСГ, в состав которого у человека входит 22 аминокислотных остатка.

Панкреатический глюкагон, выделенный в 1948 г. в кристаллическом состоянии из поджелудочной железы человека, состоит из 29 остатков аминокислот. Он обладает двойным действием: ускоряет распад гликогена (гликогенолиз) и ингибирует синтез его из УДФ-глюкозы. Гормон активирует липазу, стимулируя процесс образования жирных кислот в печени.

1.2. Технологии получения аминокислот

Методы получения аминокислот в промышленных масштабах представлены на рис. 1.4.

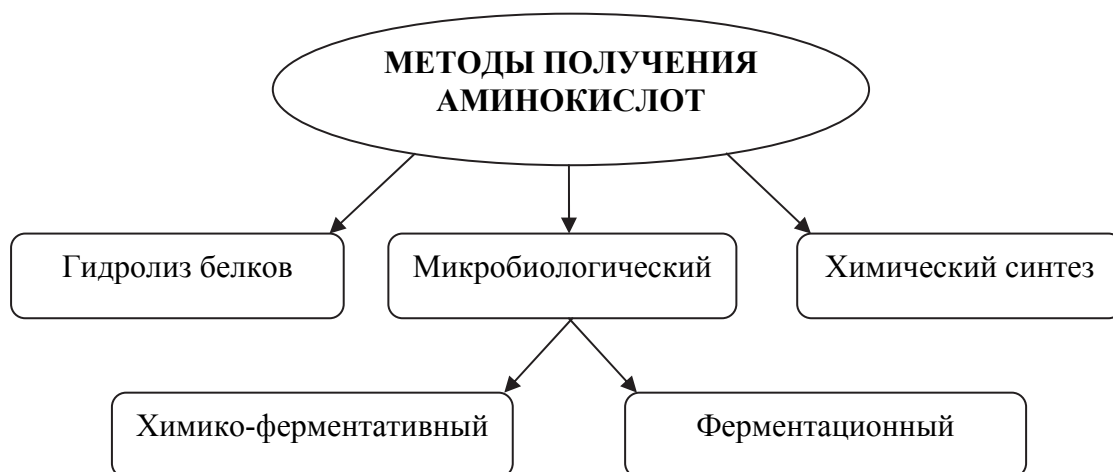


Рис. 1.4. Методы получения аминокислот в промышленных масштабах

При *гидролизе* белоксодержащее сырье (отходы пищевой и молочной промышленности) нагревают с растворами кислот или щелочей при температуре 100–105°C в течение 20–48 ч.

Чаще всего используют 20% раствор соляной кислоты, обеспечивающий глубокий гидролиз белка. Кроме того, для ускорения реакции гидролиза белков используют иммобилизованные протеолитические ферменты и ионообменные смолы.

В ходе кислотного гидролиза белков происходят рацемизация и разрушение некоторых составляющих их аминокислот. При кислотном гидролизе полностью разрушается триптофан и достаточно значительны потери цистеина, метионина и тирозина (10–30%). Лучшим способом уменьшения потерь аминокислот при гидролизе является проведение его в вакууме или в атмосфере инертного газа, а также со-

блюдение высокого соотношения количества кислоты, взятой для гидролиза, и массы белка (200:1).

Основным недостатком *химического синтеза* является получение смеси аминокислот, состоящей из *D*- и *L*-изомеров, тогда как биологической активностью в организме человека и животных обладают главным образом *L*-изомеры, а *D*-изомеры аминокислот не метаболизируются их ферментными системами. Кроме того, некоторые *D*-изомеры токсичны для человека и животных. Исключением в этом отношении является метионин, у которого биологически активными являются как *D*-, так и *L*-изомеры, в связи с чем данная аминокислота производится преимущественно путем химического синтеза (рис. 1.5).

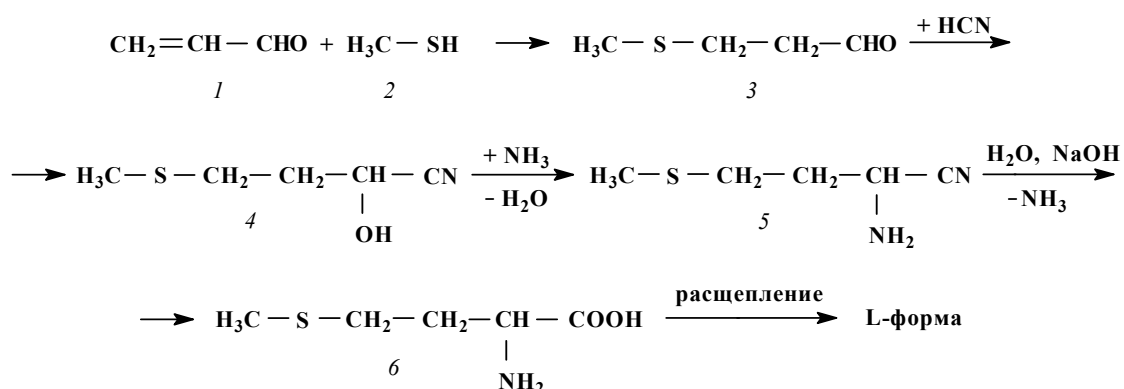


Рис. 1.5. Химический синтез метионина:

1 – акролеин; 2 – метилмеркаптан; 3 – метилтиопропаналь; 4 – циангидрин;
5 – геминальный аминитрил; 6 – рацемический метионин

Метионин получают из акролеина (1) и метилмеркаптана (2). Реакция присоединения метилмеркаптана по С=С связи акролеина дает метилтиопропаналь (3). Последний по реакции Штреккера легко цианируется по карбонильной группе с образованием циангидрина (4), в котором затем аммиак нуклеофильно замещает ОН-группу. На следующей стадии образовавшийся таким образом геминальный аминитрил (5) гидролизуют в щелочной среде до рацемического метионина (6). Его *L*-форму выделяют ферментативным путем или раскристаллизацией с оптически активными соединениями.

Наиболее перспективен и экономически выгоден *микробиологический синтез* аминокислот. Более 60% всех производимых в настоящее время высокоочищенных препаратов аминокислот получают именно этим способом, главное преимущество которого в сравнении с методами химического синтеза состоит в возможности получения *L*-аминокислот из возобновляемого сырья (рис. 1.6).



Рис. 1.6. Общая схема получения аминокислот микробиологическим методом

Процесс получения аминокислот *химико-ферментативным методом* заключается в химическом синтезе предшественника аминокислоты и последующей его трансформации в целевую аминокислоту с использованием микроорганизмов, лизатов клеток или индивидуальных ферментов (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Примеры получения аминокислот химико-ферментативным методом

Предшественники	Фермент	Аминокислота
Фумарат аммония	Аспартаза	L-аспарагиновая кислота
Коричная кислота	Фенилаланинаммиакиаза	L-фенилаланин
Фенол, серин	Тирозинфеноллияза	L-тирозин
Индол, серин	Триптофаниндолияза	L-триптофан
Глицин, метанол	Сериндегидраза	L-серин

Процесс получения аминокислот **ферментационным методом** основан на способности некоторых микроорганизмов синтезировать *L*-аминокислоты, а в определенных условиях – обеспечивать их сверхсинтез. Основное отличие микробиологической ферментации от химико-ферментативного метода заключается в отсутствии стадии химического синтеза предшественника, а также в использовании живых клеток микроорганизмов.

Продуцентами аминокислот в биосинтезе являются бактерии родов *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, субстратом – углеводное сырье (меласса, гидролизаты крахмала и целлюлозы), этанол, уксусная или другие органические кислоты, а также углеводороды. В качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты.

На основе культивирования микроорганизмов для получения чистых препаратов аминокислот применяют промышленные технологии, включающие одно- и двухступенчатый синтез аминокислот.

При **одноступенчатом синтезе** в промышленных культиваторах выращивают ауксотрофные регуляторные мутанты, являющиеся сверхпродуцентами аминокислот. После завершения рабочего цикла их выращивания культуральную жидкость отделяют от клеток микроорганизмов, сгущают и получают товарный продукт с высокой концентрацией целевой аминокислоты.

В процессе **двухступенчатого синтеза** вначале с помощью одного штамма микроорганизмов получают предшественник, а затем с помощью другого штамма превращают предшественник в целевую *L*-аминокислоту.

1.2.1. Получение глутаминовой кислоты

***L*-глутаминовая кислота** (α -аминоглутаровая кислота) является одной из важнейших аминокислот растительных и животных белков (рис. 1.7).

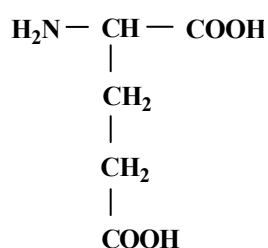


Рис. 1.7. Структурная формула *L*-глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота служит основой для биосинтеза многих биологически активных соединений, необходимых для нормальной жизнедеятельности человеческого организма.

Глутаминовая кислота защищает печень и почки при различных отравлениях, усиливает фармакологическое действие одних и ослабляет токсичность других лекарственных средств.

В настоящее время производство глутаминовой кислоты является крупнотоннажным биотехнологическим производством ($\approx 400\ 000$ т/г). Ведущими странами-производителями глутаминовой кислоты являются Япония и США.

Известно несколько способов получения **глутаминовой кислоты**: гидролиз белков, химический и микробиологический синтезы.

Для выработки глутаминовой кислоты методом *гидролиза* используют животные и растительные белки: казеин молока, отходы мясокOMBинатов, клейковина пшеницы, кукурузный глютен и др.

Среди методов **химического синтеза** глутаминовой кислоты наиболее распространенным является метод, основанный на использовании в качестве исходного сырья акрилонитрила(1), который гидрокарбонилируют в присутствии катализаторов (триарилфосфинкарбонилы кобальта или рения) до нитрилальдегида (2). Последний превращают по методу Штреккера в аминодинитрилглутаровой кислоты (3), который затем омыляют в присутствии щелочи при 100°C в D,L-динатрийглутамат (рис. 1.8). Расщепление рацемата на индивидуальные энантиомеры осуществляют кристаллизацией его раствора в присутствии L-глутаминовой кислоты (L-форма соли при этом выпадает в осадок).

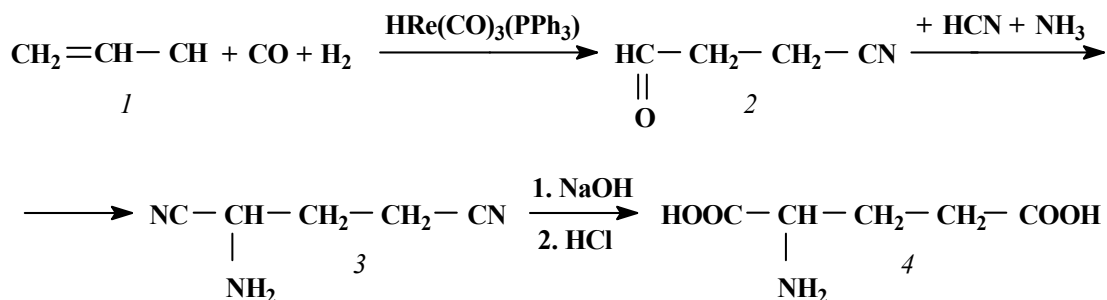


Рис. 1.8. Химический синтез D,L-глутаминовой кислоты:
1 – акрилонитрил; 2 – нитрилальдегид; 3 – аминодинитрилглутаровой кислоты;
4 – D, L-глутаминовая кислота

Микробиологический синтез. Глутаминовая кислота синтезируется в цикле трикарбоновых кислот (рис. 1.9) в результате восстано-

вительного аминирования α -кетоглутаровой кислоты НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназой; α -кетоглутаровая кислота образуется из изолимонной кислоты под воздействием изоцитратдегидрогеназы. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется в процессе окисления изолимонной кислоты в α -кетоглутаровую.

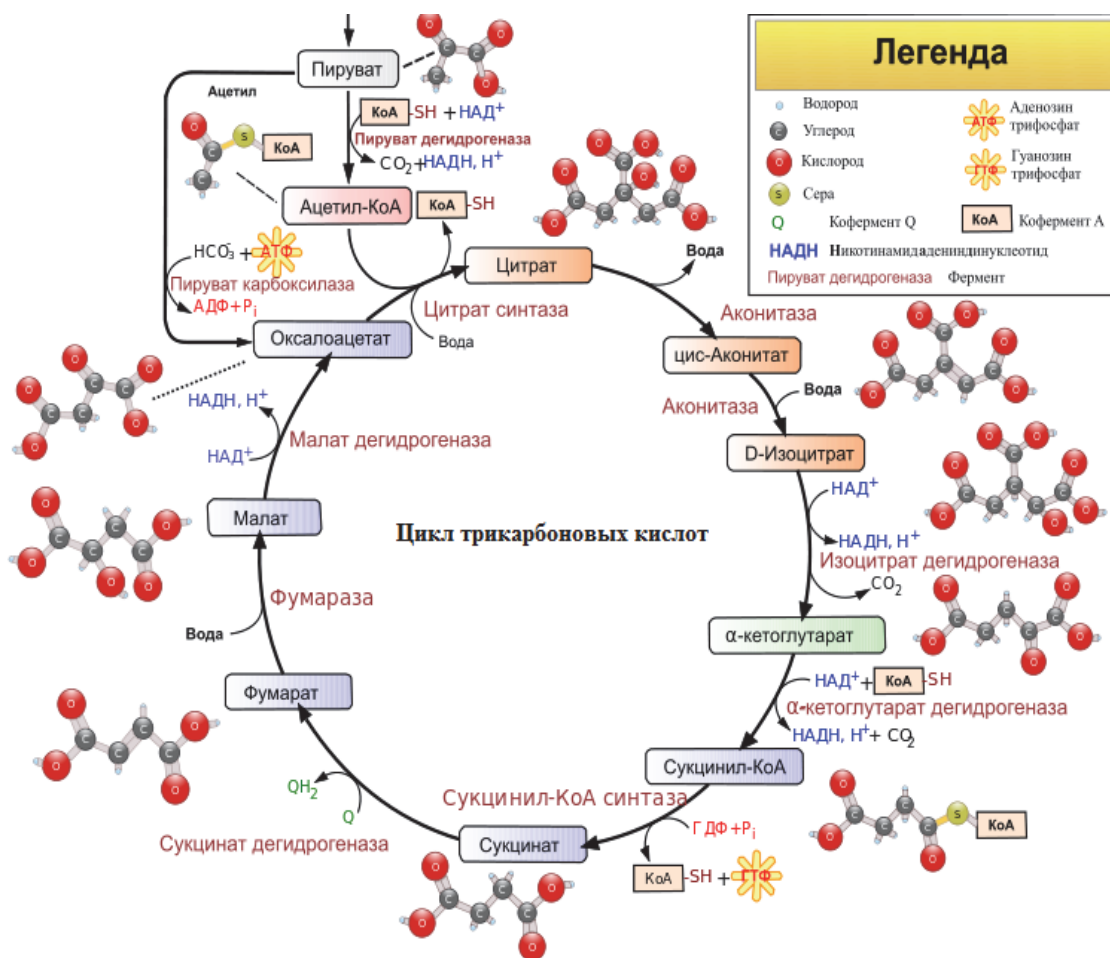


Рис. 1.9. Цикл трикарбоновых кислот

При **двухступенчатом микробиологическом синтезе** в качестве продуцентов α -кетоглутаровой кислоты могут быть использованы *Pseudomonas* и *Escherichia*. При культивировании продуцента *Kluyverd citrophila* α -кетоглутаровая кислота была получена с 57% выходом. Дрожжи рода *Candida* при выращивании на н-парафинах продуцируют α -кетоглутаровую кислоту совместно с пировиноградной в соотношении 6:1. Экономический коэффициент процесса биосинтеза достигает 90% от количества потребленных углеводов.

Вторую стадию микробиологического синтеза – восстановительное аминирование – можно осуществить с помощью бактерий рода *Pseudomonas* или *Aeromonas* (при использовании *Pseudomonas ovalis* выход L-глутаминовой кислоты составляет 60%).

Наиболее перспективным и широко используемым способом производства глутаминовой кислоты является **одноступенчатый микробиологический синтез**.

Продуцировать глутаминовую кислоту способны дрожжи, микроскопические грибы, бактерии. Бактерии обеспечивают наибольший выход по отношению к использованному углеродному субстрату. Промышленное значение имеют такие бактериальные культуры, как *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*. Сверхсинтез кислоты у диких штаммов возможен в специальных физиологических условиях при торможении скорости роста и увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Такие условия обеспечивает определенная концентрация биотина в среде (1–5 мкг/л) и присутствие некоторых антибиотиков. Внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты снижается в результате экскреции продукта во внешнюю среду, поэтому регуляция синтеза конечным продуктом ослабевает. Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана и с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием или дефектом α -кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту.

Технологические стадии производства глутаминовой кислоты:

1. Приготовление питательной среды. Питательная среда содержит 5% сахарозы, 1% мочевины, 1,5% мелассы и по 0,1% сульфата магния, одно- и двухзамещенного фосфата калия; рН 6,8–7,5; температура 30°C. Инкубация на каждой стадии длится 24 ч. Инокулят готовят в аэробных условиях на среде такого же состава в ферментаторах объемом 200 л и 5 м³ до получения 6–8 г/л сухой биомассы.

2. Производственное культивирование. Инокулят в количестве 5–6% переносят в главный ферментатор объемом 50 м³, 70% общего объема которого занимает питательная среда следующего состава: 8,5–10% сахарозы, 1,2% мелассы, 0,5% мочевины, по 0,1% одно- и двухзамещенного фосфата калия, по 0,01% сульфата марганца и сульфата цинка. Интенсивность аэрации – 40–45 мг О₂/л/мин, рН 7,8–8,0, температура – 30°C. Ферментация длится 2 сут. За это время в среде накапливается глутаминовой кислоты до 50 г/л.

3. Освобождение целевого продукта из биомассы методом центрифугирования. Фильтрат осветляют активированным углем.

4. Концентрирование культуральной жидкости в выпарном аппарате до 40–50% абсолютно сухого вещества при температуре не выше 70°C.

5. Кристаллизация и последующее подкисление целевого продукта до pH 3,2 и охлаждение его до 15°C до тех пор, пока в маточном растворе остается не более 20–30 г глутаминовой кислоты.

Глутаминовая кислота используется как лекарственное средство, поэтому получают ее в высокоочищенном виде. Для этого на первом этапе обработки культуральной жидкости в нее добавляют негашеную известь или известковое молоко, затем избыток ионов Ca^{2+} осаждают фосфорной кислотой, осадок удаляют центрифугированием.

Полученный супернатант осветляют активированным углем. Глутаминовую кислоту выделяют на ионообменных смолах. Элюаты обессоливают и концентрируют под вакуумом на роторном испарителе при 40–60°C.

Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят соляной кислотой в изоэлектрической точке (pH 3,2 при 4–15°C). В результате нескольких переосаждений чистота продукта достигает 99,6%. Кристаллы кислоты отделяют от маточника центрифугированием, промывают холодным раствором соляной кислоты (pH 3,2) и сушат. При дополнительном извлечении из маточников выход конечного продукта достигает 87%.

1.2.2. Получение лизина

L-лизин – алифатическая незаменимая аминокислота (рис.1.10).

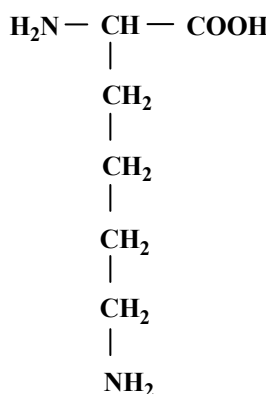


Рис. 1.10. Структурная формула *L*-лизина

Лизин относится к числу соединений, которые живые организмы не производят самостоятельно, а должны получать в готовом виде для синтеза собственных структурных и функциональных белков. Источником лизина являются микроорганизмы и растения. Лизин в организме высших животных и человека определяет биологическую ценность перевариваемого белка. Установлено, что лизин в организме является не только структурным элементом белка. Данная аминокислота выполняет и другие важные биохимические функции – является предшественником карнитина и оксилизина, способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту ионов кальция (стронция) в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме.

Синтез *L*-лизина у микроорганизмов осуществляется разными путями. Дрожжи, грибы и микроводоросли синтезируют лизин из α -кетоглутаровой кислоты через α -аминоадипиновую кислоту. Получение мутантов – суперпродуцентов лизина – через аминокадипиновый путь представляется проблематичным. Высшие растения и бактерии синтезируют лизин по другой схеме через α -диаминопимелиновую кислоту. По этой разветвленной схеме биосинтеза лизина (диаминопимелиновый путь) синтез начинается с аспарагиновой кислоты и проходит через диаминопимелиновую кислоту.

Наиболее распространенным способом получения лизина является ***одноступенчатый микробиологический синтез***, который включает промышленное культивирование ауксотрофных мутантов бактерий рода *Corynebacterium*.

В клетках бактерий лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты через ряд промежуточных этапов, связанных с образованием полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидропиколиновой кислоты и α,ϵ -диаминопимелиновой кислоты, являющейся непосредственным предшественником лизина (рис. 1.11). Полуальдегид аспарагиновой кислоты является также одним из предшественников в синтезе аминокислот – треонина, метионина и изолейцина. Процесс синтеза аминокислот (лизина, треонина, метионина, изолейцина) начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с участием аллостерического фермента аспараткиназы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот – лизина и треонина, если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации.

Если понизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда эта аминокислота накапливается в довольно высокой концентрации.

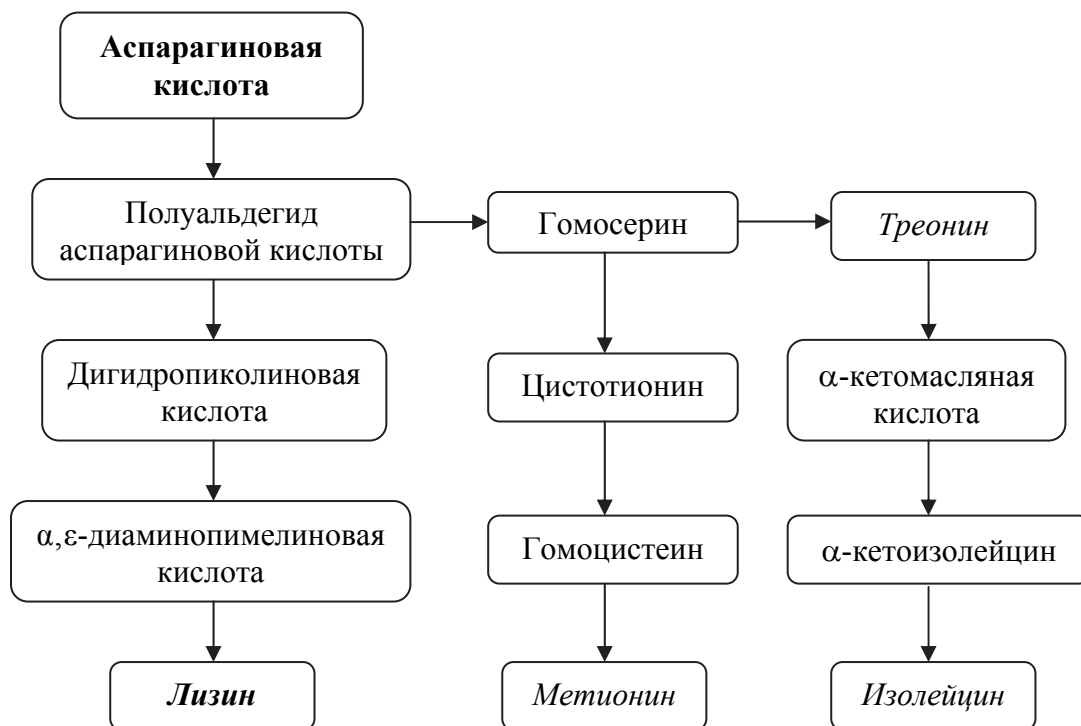


Рис. 1.11. Схема одноступенчатого микробиологического синтеза *L*-лизина

Для снятия регуляции синтеза лизина необходимо прекратить образование треонина на стадии превращения полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, катализируемое гомосериндегидрогеназой, что достигается путем мутагенеза. Опыты показывают, что мутантные клетки, не образующие гомосериндегидрогеназы, при их культивировании на искусственной питательной среде обеспечивают высокий выход лизина. Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками (гомосерин, треонин, метионин), вводятся в состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

В процессе приготовления питательной среды для культивирования производственных штаммов ауксотрофных мутантов, обладающих способностью к сверхсинтезу лизина, в качестве источника углерода используют смеси, включающие уксусную кислоту и свекловичную мелассу, небольшие добавки сахара в среду (около 1%) повышают выход лизина на 30–50%; в качестве источника азота – соли аммония, мочевины, кукурузный экстракт в качестве источника биологически активных веществ (1,2–1,5% по содержанию сухих веществ), гидролизаты дрожжей. Кроме дефицитных аминокислот, которые не синтезируются клетками мутантов, в питательную среду также добав-

ляют необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов микро- и макроэлементы, витамины (биотин и др.). Среда должна содержать (в л): 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина. Соотношение углерода и азота в среде оптимально как 11:1.

В процессе культивирования микроорганизмов обеспечивается подача стерильного воздуха с помощью специальных турбинных мешалок, для предотвращения вспенивания субстрата и клеточной суспензии в среду культивирования добавляют пеногасители.

Посевной материал вначале выращивается в посевных аппаратах при 28–32°C, pH 7–7,2 в течение 18–24 ч, а затем полученная суспензия клеток подается в производственные ферментаторы, в которых поддерживается постоянный режим аэрации, избыточное давление 20–30 кПа, непрерывное перемешивание. Культивирование осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре. Время ферментации составляет 55–72 ч. Накопление в культуральной жидкости лизина начинается через 25–30 ч после начала выращивания промышленной культуры и к концу ферментации достигает 40–50 г/л.

Культуральную жидкость отделяют от культуры клеток продуцента фильтрованием и используют для получения лизина. На основе промышленной культуры бактерий, синтезирующих лизин, организовано производство нескольких видов товарной продукции: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), высококонцентрированные кормовые и высокоочищенные препараты кристаллического лизина.

ЖКЛ получают выпариванием культуральной жидкости на вакуум-выпарной установке до концентрации 40%. Для предотвращения деградации лизина при нагревании в культуральную жидкость добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до pH 4,5–5,0, в результате образуется соль – монохлоргидрат лизина. Готовый препарат – ЖКЛ не замерзает при температуре до –18°C и сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев.

Для получения **сухого ККЛ** жидкий концентрат сушат горячим воздухом на распылительной сушилке при 90°C до влажности 4–8%. Высушенный препарат содержит 15–20% монохлоргидрата лизина, 15–17% белков, 14% аминокислот, витамины группы В, минеральные вещества. В целях снижения гигроскопичности препарата в него вводят наполнители: мясокостную муку, негашеную известь, бентонит, пшеничные отруби. Полученную пасту высушивают на вальцово-ленточной сушилке и гранулируют. Гранулированный препарат ККЛ негигроскопичен, содержит 7–10% лизина.

Для получения **высокоочищенного препарата кристаллического лизина** культуральную жидкость после фильтрования подкисляют соляной кислотой до pH 1,6–2. Образовавшийся в результате взаимодействия с соляной кислотой раствор моногидрохлорида лизина направляют на колонки с катионитом, где происходит связывание аминокислоты. Затем проводят десорбцию аминокислоты элюированием 0,5–5% раствором аммиака. Элюат выпаривают под вакуумом при 60°C до концентрации 30–50%, после подкисленный соляной кислотой раствор моногидрохлорид высушивают. Путем перекристаллизации полученной соли можно получить препараты с содержанием моногидрохлоридлизина в количестве 97–98%.

В ряде стран (Японии, США и др.) для получения лизина применяется **химико-ферментативный метод**, позволяющий создать высокоэффективные технологии, сочетающие в себе достоинства химического и микробиологического синтеза. Эти технологии основаны на ферментативной конверсии в лизин α -амино- ϵ -капролактама, который получают химическим методом из циклогексена.

Рацемат *D, L*- α -амино- ϵ -капролактама используют в качестве субстрата, который под действием фермента *L*- α -амино- ϵ -капролактама-гидролазы (лактамаза) превращается в *L*-лизин, а оставшаяся непрореагировавшая его часть (*D*-форма) переводится при воздействии рацемазы в смесь изомеров (рис. 1.12).

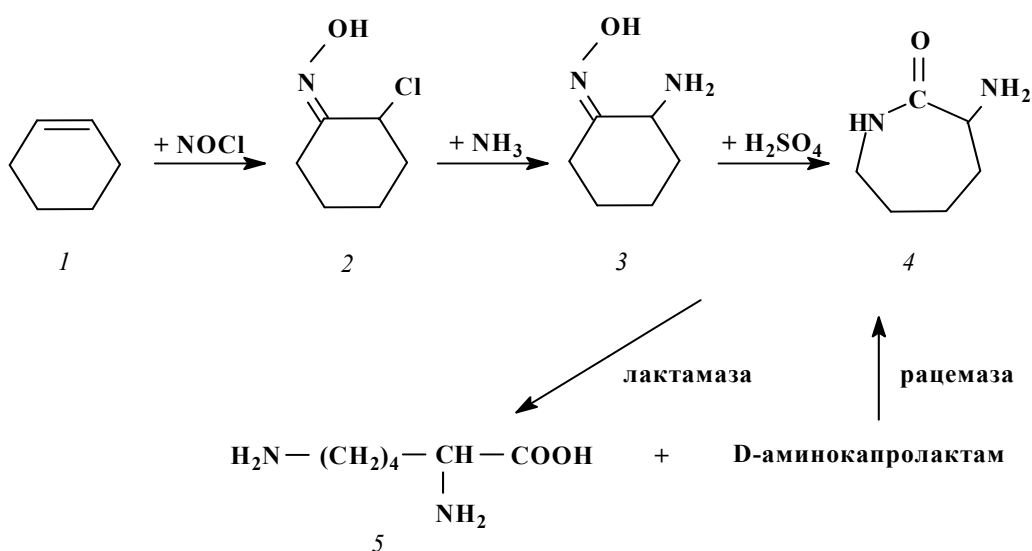


Рис. 1.12. Получение *L*-лизина химико-ферментативным методом:

1 – циклогексен; 2 – 2-хлор-циклогексанон-оксим;

3 – 2-амино-циклогексанон-оксим;

4 – *D, L*- α -амино- ϵ -капролактама; 5 – *L*-лизин

При такой технологии получения лизина его содержание в реакционной смеси по завершении рабочего цикла достигает свыше 150 г/л.

Продуценты гидролазы α -амино- ϵ -капролактама – некоторые штаммы дрожжей родов *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*, которые выращивают в щелочной оптимизированной для синтеза фермента питательной среде, содержащей активаторы – ионы магния, марганца и цинка. Для ферментативной реакции превращения капролактама в лизин может использоваться клеточная суспензия дрожжевых клеток с активным ферментом, клеточный экстракт (после разрушения и отделения клеток) или очищенный фермент. Продуценты рацемазы – бактерии *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.

Процессы изомеризации *D*-капролактама в *L*-изомер и превращение *L*-капролактама в лизин можно проводить одновременно. Для этого в водный раствор *D*, *L*-капролактама вводится необходимое количество дрожжевых и бактериальных клеток, задаются оптимальный температурный режим, рН, аэрация. На выходе из реактора образуется преимущественно один продукт – *L*-лизин, который выделяют из смеси, очищают и сушат.

1.2.3. Получение триптофана

Триптофан – ароматическая α -аминокислота (рис. 1.13).

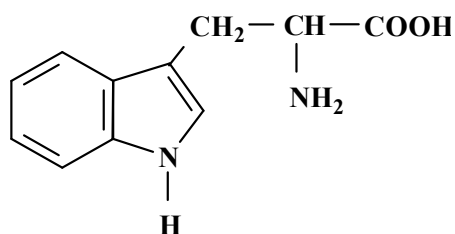


Рис. 1.13. Структурная формула триптофана

Отсутствие или дефицит триптофана в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (диабет, пеллагра и др.).

Химический синтез триптофана проводят аминотетилированием индола (1) по методу Манниха. Полученный при этом 3-(диметиламинометил)-индол (2) конденсируют с эфиром нитроуксусной кислоты. В ходе реакции метиленовая группа этого эфира отщепляет протон (как СН-кислота) и образовавшийся карбанион легко вытесняет диметиламиногруппу в индоле, что приводит к метиловому эфиру 3-индолилнитропропионовой кислоты (3). Далее восстанавливают

нитрогруппу до аминной и после щелочного гидролиза получают триптофан (4) или его натриевую соль (рис. 1.14).

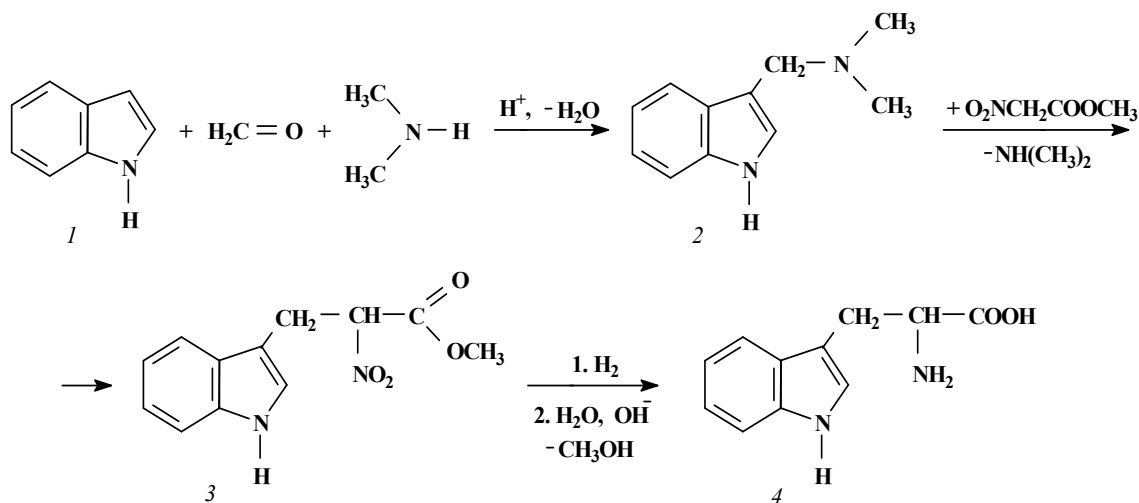


Рис. 1.14. Химический синтез триптофана:
 1 – индол; 2 – 3-(диметиламинометил)-индол; 3 – метиловый эфир
 3-индолилнитропропионовой кислоты; 4 – триптофан

Химико-ферментативный способ получения триптофана состоит в прямой конденсации индола, пировиноградной кислоты и аммиака (рис. 1.15):

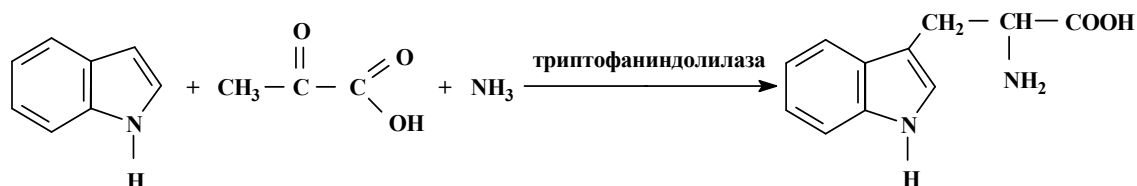


Рис. 1.15. Химико-ферментативный способ получения триптофана

Реакция катализируется пиридоксальзависимой триптофаниндолилазой (триптофаназой), которая обнаружена у бактерий *E. coli*, *Bacillus albei*, *Proteus rettgeri* и др. Добавление триптофана индуцирует образование фермента, а добавление индола ингибирует его синтез у бактерий, поэтому процесс получения триптофана ведут при избытке аммиака и пирувата.

Также распространен и другой способ получения триптофана: вначале химически синтезируют предшественник триптофана – антраниловую кислоту, которую затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в триптофан.

Биохимическое превращение антраниловой кислоты в триптофан происходит с участием фосфорибозилпирофосфата, при этом образуется аминокликозид-*N*-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота, которая в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбоксилирования превращается в индол-3-глицерофосфат. Затем под действием фермента триптофансинтетазы из индол-3-глицерофосфата и серина образуется триптофан. В связи с тем, что в качестве кофермента у триптофансинтетазы выступает пиридоксальфосфат, то скорость превращения антраниловой кислоты в триптофан зависит от концентрации кофермента. В качестве источника ферментов используют дрожжи.

Производственный процесс биохимического превращения антраниловой кислоты в триптофан начинается с наращивания биомассы дрожжей *Candida utilis*, являющихся продуцентами ферментов. Питательная среда для выращивания дрожжей готовится из свекловичной мелассы, мочевины, минеральных солей. Ферментация продолжается в течение 24 ч при 30°C. Затем в ферментатор начинают вводить 5% спиртовой раствор антраниловой кислоты и 50% раствор мочевины. Через 3–4 ч после добавления антраниловой кислоты в ферментатор дополнительно подается углеродный субстрат – меласса в виде 25% раствора. На последующих этапах ферментации периодически производится подача антраниловой кислоты и мочевины через каждые 6 ч и раствора мелассы – через каждые 12 ч. Длительность ферментации около 120 ч, а с учетом времени наращивания биомассы дрожжей – 144 ч. Содержание триптофана в культуральной жидкости составляет примерно 6 г/л.

Для производства триптофана применяют **одноступенчатый микробиологический синтез** с помощью бактериальных ауксотрофных мутантов с нарушенной регуляцией синтеза аминокислот.

У бактерий триптофан образуется из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпировиноградной кислоты через ряд последовательных реакций, включающих образование шикимовой и хоризмовой кислот, непосредственным предшественником триптофана является антраниловая кислота. Синтез триптофана аллостерически ингибируется конечными продуктами, которые действуют на ферменты, катализирующие начальные этапы превращений, связанные с образованием хоризмовой кислоты. Для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую, что достигается действием мутагенных факторов (рис. 1.16).

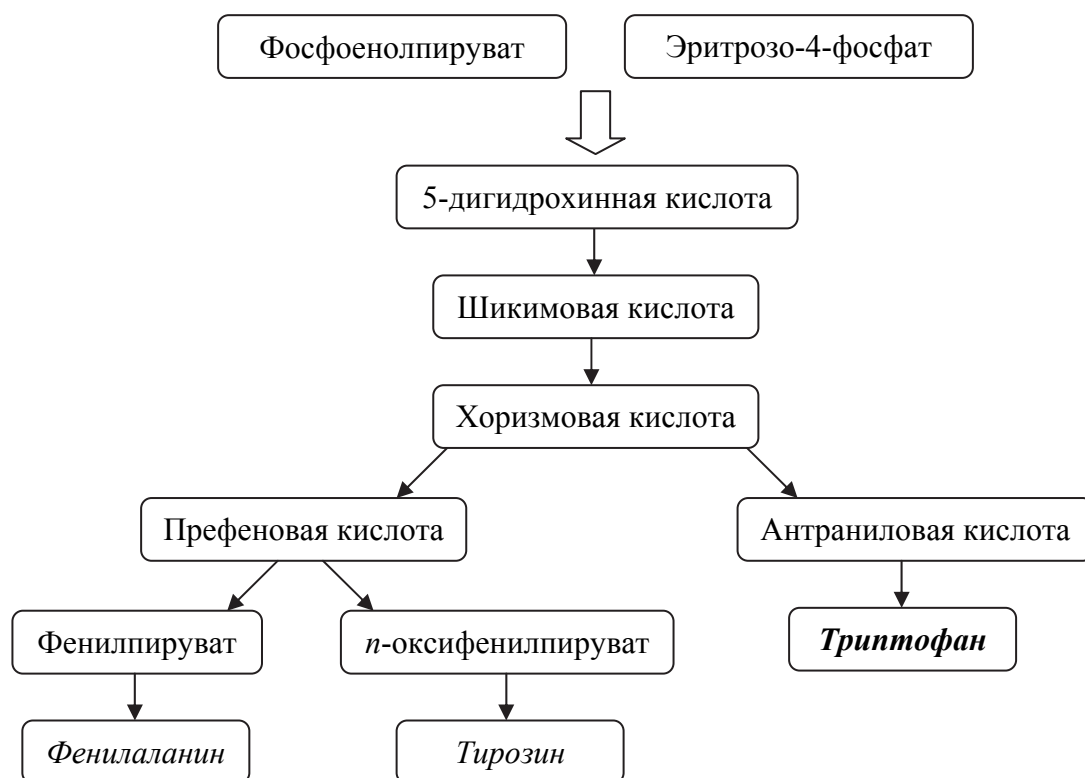


Рис. 1.16. Схема одноступенчатого микробиологического синтеза триптофана

Для промышленного получения триптофана разработаны технологии на основе использования ауксотрофных мутантов бактерий рода *Bacillus subtilis* с нарушенным синтезом фенилаланина и тирозина.

Все технологические процессы организованы по той же схеме, что и получение лизина. Ферментация длится 48 ч при 37°C, концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает 10 г/л.

После отделения культуральной жидкости от клеток бактерий она упаривается и высушивается при 110–120°C. Высушенный продукт называют **кормовым концентратом триптофана (ККТ)**.

При получении **высококонцентрированных препаратов триптофана** культуральную жидкость подвергают дополнительной очистке. Вначале ее подкисляют соляной кислотой до pH 1,0 и центрифугированием отделяют образовавшийся осадок. Далее супернатант, содержащий триптофан, пропускают через катионообменные колонки, в результате происходит связывание аминокислоты и ее отделение от культуральной жидкости. После промывки колонок производят десорбцию триптофана 5% раствором аммиака в смеси изопропанола и воды. Элюат направляют на вакуум-выпарной аппарат, после кристаллизуют аминокислоту при 4–8°C. Выделенную в кристаллическом

виде соль триптофана промывают этанолом и высушивают под вакуумом при 60°C. Высушенный кристаллический препарат содержит не менее 99% триптофана в виде гидрохлорида. Осадок после отделения культуральной жидкости, содержащий клетки бактерий, высушивают и используют как высокобелковую кормовую добавку.

1.3. Технологии получения пептидных антибиотиков

Среди многочисленных антибиотиков пептидной природы заслуживают внимания тиротрицин, грамицидин С и бацитрацины.

1.3.1. Получение тиротрицина

Тиротрицин обладает бактериостатическим и бактерицидным действием по отношению к грамположительным бактериям. Преимущество тиротрицина в том, что он действует на некоторые патогенные микроорганизмы (например, фекальный стрептококк), на которые не оказывают влияние ни пенициллин, ни сульфаниламидные препараты.

Тиротрицин в виде растворов и стойких эмульсий находит применение в медицинской практике преимущественно в качестве антисептического средства.

Структурная формула тиротрицина представлена на рис. 1.17.

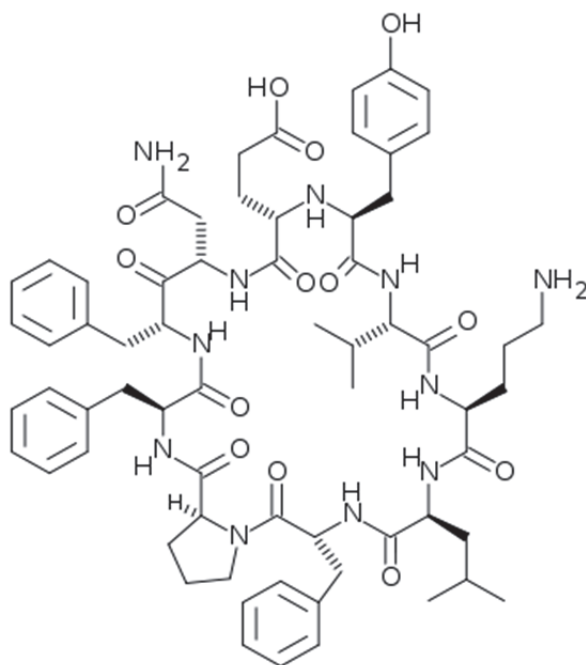


Рис. 1.17. Структурная формула тиротрицина

Для получения тиротрицина бактерии *Bacillus brevis* выращивают в течение 4–5 суток при 37°C на жидкой питательной среде (обычно мясопептонный бульон), разлитой тонким слоем в матрицы. В процессе развития культуры происходит образование антибиотика, который в небольшом количестве выделяется в окружающую среду, а основная масса тиротрицина находится в бактериальных клетках.

Культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до pH 4,5. При этом выпадает осадок, состоящий из бактерий и антибиотика. Фильтрованием отделяют осадок от жидкости и подвергают обработке спиртом в кислой среде в течение суток. За этот промежуток времени антибиотик извлекается из бактериальных клеток и переходит в спиртовой раствор, который отделяют от бактериальной массы центрифугированием. Экстракт упаривают при пониженном давлении, и остаток переносят в раствор NaCl. Тиротрицин при этом выпадает в виде хлопьевидного осадка. «Свободный» антибиотик, т.е. антибиотик, выделенный бактериями в окружающую среду, извлекают буферным раствором с нейтральным значением pH непосредственно из осадка, полученного при обработке HCl (рис. 1.18).



Рис. 1.18. Технологическая схема получения тиротрицина

Тиротрицин состоит из двух полипептидных фракций: тироцидина и грамицидина. При обработке тиротрицина смесью ацетона и эфи-

ра (1:1) в раствор переходит только грамицидин (15–20 масс. % от массы тиротрицина).

Тироцидин состоит из трех близких по аминокислотному составу полипептидов – тироцидинов А, В, С.

Грамицидиновая фракция разделяется на четыре полипептида – грамицидины А (85%), В (9%), С_D (6%) и D (следы).

1.3.2. Получение грамицидина С

Грамицидин С обладает высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Он находит применение в хирургии при первичной обработке ран, ожогов и других нагноительных процессов.

Структурная формула грамицидина С представлена на рис. 1.19.

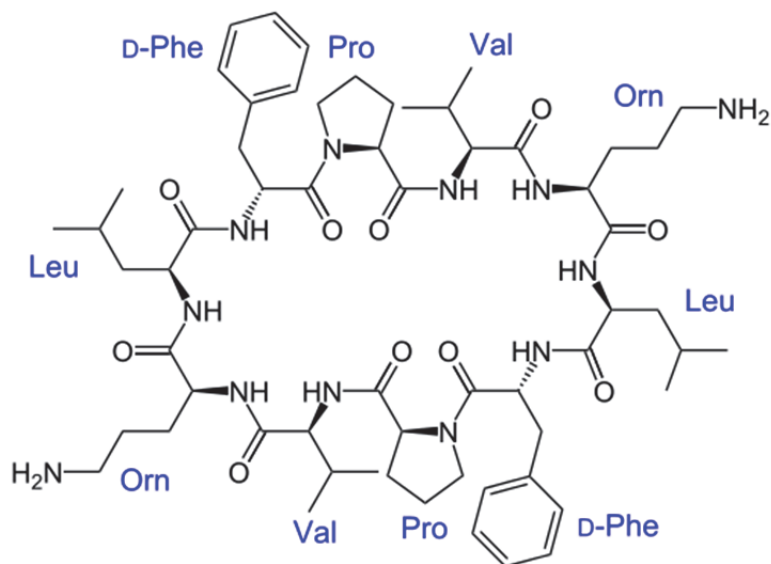


Рис. 1.19. Структурная формула грамицидина С

Как видно из структурной формулы грамицидина С, в нем имеется свободная аминная группа, представленная 5-аминогруппой орнитина. Изучение взаимосвязи между химической структурой грамицидина С и его биологической активностью показало, что наличие свободной аминной группы весьма важно для проявления антибиотической активности. Блокирование аминогруппы путем ацилирования или ее снятие путем дезаминирования приводит к значительному снижению, а в некоторых случаях к полному уничтожению антибиотической активности.

Уровень антибактериальной активности производных грамицидина С зависит не только от присутствия аминной группы, но и от ее положения в молекуле. Если удалить эти основные, биологически активные группы по отношению к циклопептидной части молекулы грамицидина на 2, 5 и 9 атомов углерода от положения их в природном антибиотике, происходит снижение биологической активности в 7 раз. При ацилировании δ -аминных групп орнитина антибиотическая активность грамицидина С уменьшается в 100–150 раз, и грамицидин в этом случае полностью теряет свойства антибиотика.

Замещение δ -аминной группы орнитина на карбоксильную группу приводит к полной потере биологической активности грамицидина С.

Все это указывает на то, что молекула грамицидина С, образующаяся в процессе биосинтеза, обладает оптимальной с точки зрения антибактериального действия структурой и определенной жесткостью конформации. С ослаблением жесткости конформации молекулы уменьшается или полностью исчезает антибиотическая активность.

Продуцент грамицидина С *Bacillus brevis* в процессе развития в жидкой питательной среде образует ряд форм, отличающихся морфологией колоний и другими свойствами при высеве их на твердые питательные среды с дрожжевым экстрактом. Образующиеся варианты представлены следующими формами: складчатая (R), гладкая (S) и две плоские (P^+ и P^-) формы. Образование разных форм зависит от условий культивирования. Образовывать грамицидин С могут лишь формы R и P^+ .

Образование грамицидина С происходит интенсивно (до 2500 мкг/мл) при культивировании продуцента на относительно простой синтетической среде (янтарнокислый аммоний – 0,5%, глицерин – 1,5%; $MgSO_4$ – 0,02%; K_2HPO_4 – 0,2%; вода дистиллированная; pH среды перед посевом 7,0–7,3) при температуре 28–40°C в течение 24–48 ч.

Для выделения грамицидина С культуральную жидкость подкисляют HCl до pH 4,5–5,0, образовавшийся осадок отделяют и растворяют в спирте. Полученный концентрат содержит до 4% грамицидина С. Грамицидин С синтезируется клетками *B. brevis* при участии двух ферментов (грамицидин-синтетазы I и II) в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} .

Компонент I осуществляет активацию четырех аминокислот, входящих в молекулу грамицидина С. Для каждой аминокислоты у этого фермента имеется свой активный центр. Процесс активации аминокислот происходит по следующей схеме: вначале идет образование аминокислотаденилатов, связанных с компонентом I, затем происходит отщепление АМФ, и аминокислоты переносятся на сульфгидрильные

группы фермента. Компонент II – рацемиза фенилаланина – активирует фенилаланин также в присутствии АТФ и Mg^{2+} , в результате чего образуется аминокислотаденилат, который переносится на сульфгидрильную группу компонента II с образованием тиоэфира *D*-фенилаланина.

Образование пептидных связей между активированными аминокислотами происходит с участием фосфопантетеина, ковалентно связанного с компонентом I. Перенос *D*-фенилаланина с компонента II на иминную группу *L*-пролина идет без участия фосфопантетеина. Биосинтез дипептида Phe-Pro – это первая стадия образования полипептидного антибиотика. Образовавшийся дипептид переносится на фосфопантетеин, с помощью которого осуществляется перенос этого дипептида на аминную группу *L*-валина. Образуется трипептид Phe-Pro-Val. Трипептид переносится на аминную группу орнитина с образованием тетрапептида Phe-Pro-Val-Orn, который тем же путем переносится на аминную группу лейцина с образованием пентапептида Phe-Pro-Val-Orn-Leu. Пентапептид затем циклизуется с образованием грамицидина С.

1.3.3. Получение бацитрацинов

Бацитрацины обладают высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий. В медицинской практике бацитрацины используются преимущественно при местном лечении некоторых гнойных процессов, а также для лечения кожных заболеваний, пневмонии, бациллярной дизентерии и др.

Бацитрацины получают при поверхностном или глубинном культивировании бактерий *Bacillus licheniformis* на средах, содержащих глюкозу, лактат аммония и неорганические соли или соевую муку и глюкозу. Процесс образования бацитрацина связан со спорообразованием культуры.

Получение посевного материала начинают с проращивания спор при температуре 30°C на среде, содержащей крахмал – 2%, лимонную кислоту – 0,03%, сульфат магния – 0,1%, соль Мора – 0,025%, сульфат марганца – 0,006%, хлориды калия и натрия – по 0,4%, фосфат калия однозамещенный – 0,45%. Продолжительность выращивания споровой культуры около 120 ч. Размножение производственной культуры осуществляют в колбах и посевных аппаратах при 30°C на среде, содержащей крахмал – 1,8%, муку соевую – 7,5%, карбонат кальция – 0,02%, сульфат аммония – 0,2%. Длительность процесса получения посевного материала на каждой стадии 16–18 ч.

Основную ферментацию глубинным способом проводят при 37°C в течение 30–40 ч на среде, содержащей крахмал – 2%; сульфат магния – 0,33%; муку соевую – 7,5%; карбонат кальция – 1%. В ходе культивирования осуществляют аэрацию (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин) и перемешивание с добавкой стерильного пеногасителя. На всех этапах процесса выращивания продуцента поддерживают pH на уровне 7,0.

В состав бацитрацина входит десять компонентов: А, А₁, В, С, D, Е, F₁, F₂, F₃ и G. Наиболее активный в отношении *Corynebacterium xerosis* **бацитрацин А** составляет основную часть (37 %) выделенных фракций. Установлено, что в его состав входят три остатка *L*-изолейцина и по одному – *L*-лейцина, *L*-цистеина, *L*-гистидина, *L*-лизина, *L*-аспарагиновой кислоты, *D*-фенилаланина, *D*-орнитина, *D*-аспарагиновой кислоты, *D*-глутаминовой кислоты (рис. 1.20).

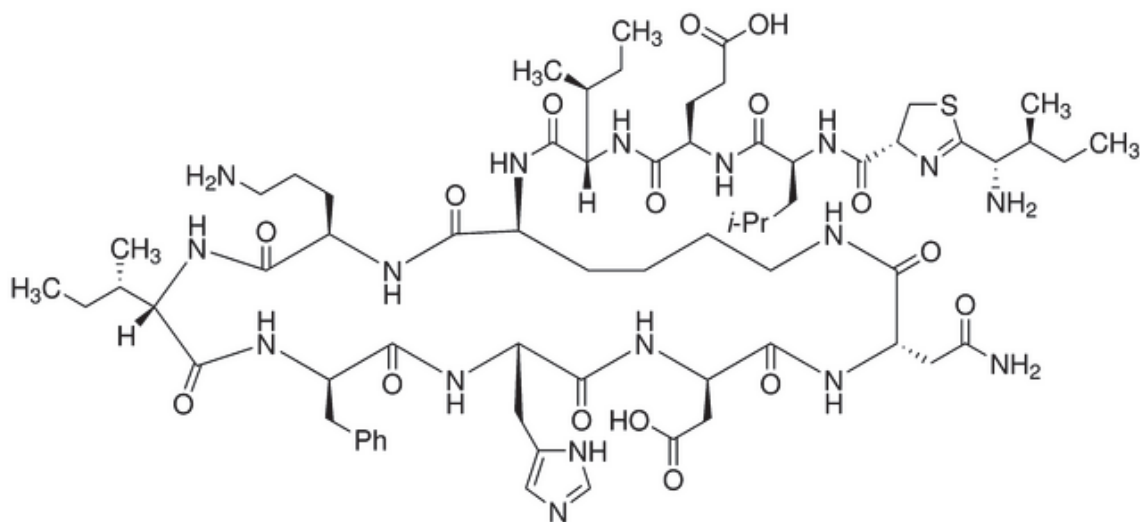


Рис. 1.20. Структурная формула бацитрацина А

Химическое строение других бацитрацинов изучено менее подробно. Молекулы всех бацитрацинов имеют в своем составе тиазолиновое кольцо.

ТЕМА 2

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕОЗИДОВ, НУКЛЕОТИДОВ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

2.1. Структура и функции нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов

Нуклеиновые кислоты – биополимеры, мономерами которых являются нуклеотиды. Существует два типа нуклеиновых кислот – **дезоксирибонуклеиновые (ДНК)** и **рибонуклеиновые (РНК)**. Их функция заключается в хранении, реализации и передаче генетической (наследственной) информации в живых организмах.

Нуклеотиды – сложные органические соединения, состоящие из азотистого основания, пятиуглеродного сахара и остатка фосфорной кислоты.

Компоненты нуклеотидов ДНК и РНК представлены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Компоненты нуклеотидов ДНК и РНК

Нуклеиновая кислота	Азотистые основания	Пятиуглеродный сахар	Остаток фосфорной кислоты
ДНК	Аденин, гуанин, цитозин, тимин	2-дезокси- <i>D</i> -рибоза	Остаток фосфорной кислоты
РНК	Аденин, гуанин, цитозин, урацил	<i>D</i> -рибоза	Остаток фосфорной кислоты

Функции нуклеотидов:

1) метаболическая: нуклеотиды являются мономерами нуклеиновых кислот, входят в состав коферментов;

2) энергетическая: АТФ является универсальным аккумулятором энергии. Энергия УТФ используется для синтеза гликогена, ЦТФ – для синтеза липидов, ГТФ – для движения рибосом в ходе трансляции (биосинтез белка) и передачи гормонального сигнала (*G*-белок);

3) регуляторная: нуклеотиды являются аллостерическими эффекторами многих ферментов.

Олигонуклеотиды – органические соединения, состоящие из небольшого числа остатков нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью.

Нуклеозиды – соединения пятиуглеродного сахара с азотистым основанием. Нуклеозиды выполняют метаболическую функцию.

2.2. Технологии получения нуклеозидов

В настоящее время в мировой клинической практике используется ряд средств, созданных на основе модифицированных нуклеозидов и обладающих широким спектром биологической активности – противоопухолевой, противовирусной, иммуносупрессорной.

Рассмотрим технологии получения некоторых лекарственных средств на основе нуклеозидов, широко применяемых для терапии вирусных заболеваний.

2.2.1. Получение ацикловира

Ацикловир – противовирусное средство, эффективное при лечении простого герпеса и опоясывающего герпеса (лишай).

Ацикловир является аналогом пуринового нуклеозида дезоксигуанидина, нормального компонента ДНК. После поступления в инфицированные клетки, содержащие вирусную тимидинкиназу, ацикловир фосфорилируется и превращается в ацикловира монофосфат, который под влиянием клеточной гуанилаткиназы преобразуется в дифосфат, и затем под действием нескольких клеточных ферментов – в трифосфат. Ацикловира трифосфат взаимодействует с вирусной ДНК-полимеразой, включается в цепочку вирусной ДНК, вызывает обрыв цепи и блокирует дальнейшую репликацию вирусной ДНК без повреждения клеток хозяина.

Химический синтез ацикловира может быть осуществлен разными путями. Классическим является метод синтеза из бензонитрила (1). Реакцией с кипящим этиленгликолем бензонитрил (1) образует этиленгликоля монобензоат (2). Последний хлорметируют формальдегидом и сухим HCl в метиленхлориде с образованием 1-бензоилокси-2-хлорметоксиэтана (3). Конденсацией соединения (3) с 2,6-дихлорпурином в присутствии триэтиламина в диметилформамиде образуется 2,6-дихлор-9-[(2-бензоилоксиэтокси)метил]-пурин (4), который аминируют с отщеплением бензильной группы обработкой аммиаком в метаноле при 95°C с образованием 2-хлор-9-[(2-гидрокси-этокси)метил]-аденина (5). Соединение (5) по реакции Зандмейера с нитратом натрия в уксусной кислоте превращается в 2-хлор-9-[(2-гидроксиэтокси)метил]-гипоксантин (6), который подвергают аминированию аммиаком в метаноле при 125°C с образованием 2-амино-9-[(2-гидроксиэтокси)метил]-гипоксантина (7), называемого ацикловиром и существующего в двух таутомерных формах (рис. 2.1).

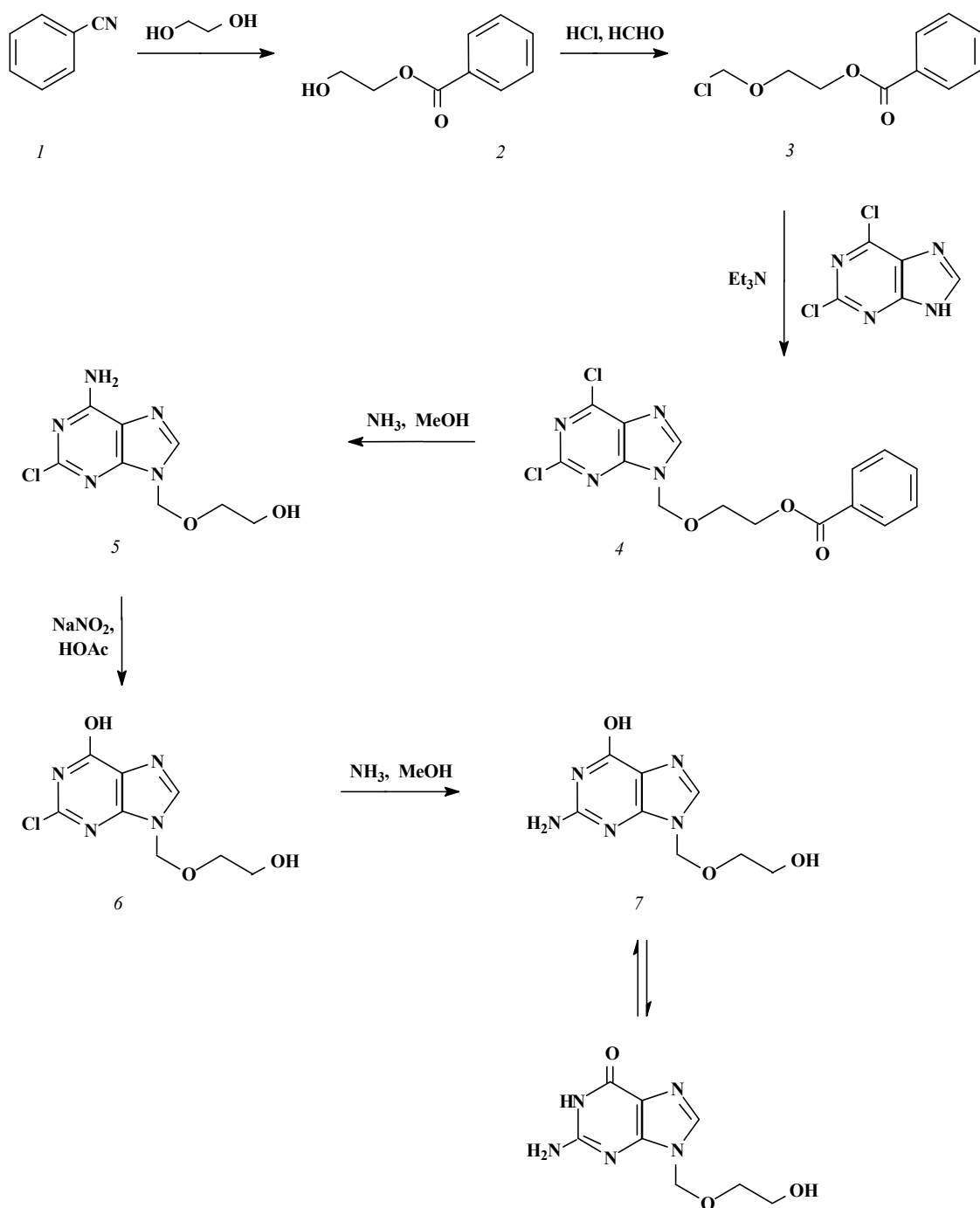


Рис. 2.1. Химический синтез ацикловира:

- 1 – бензонитрил;
- 2 – этиленгликолямнобензоат;
- 3 – 1-бензоилокси-2-хлормет-оксиэтан;
- 4 – 2,6-дихлор-9-[(2-бензоилоксиэтокси)метил]-пурин;
- 5 – 2-хлор-9-[(2-гидроксиэтокси)метил]-аденин;
- 6 – 2-хлор-9-[(2-гидрокси-этокси)метил]-гипоксантин;
- 7 – 2-амино-9-[(2-гидроксиэтокси)метил]-гипоксантин(ацикловир)

2.2.2. Получение рибавирина

Рибавирин – сильное противовирусное средство. Активен в отношении вирус герпеса, гепатита С, парагриппа, ньюкаслской болезни, эпидемического паротита, оспы, болезни Марека, онкогенных РНК-вирусов, реовирусов.

Действует рибавирин внутриклеточно, где подвергается фосфорилированию до метаболитов, которые выступают конкурентными ингибиторами инозинмонофосфатдегидрогеназы, РНК-полимеразы, гуанилилтрансферазы и РНК.

Это приводит к подавлению синтеза белка и вирусной РНК, снижению концентрации внутриклеточного гуанозинтрифосфата. Рибавирин выступает как ингибитор репликации вирионов и прекращает размножение вирусов.

Рибавирин получают как химическим, так и химико-ферментативным способами (рис. 2.2).

Химический синтез ведут из защищенной по 2,3-гидроксильным группам *D*-рибофуранозы (1) и гидразона цианоформидовой кислоты в муравьиной кислоте.

Образуется *N*1-(2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозил)-формамидазон (2), который циклизуется с триэтилортоформидом под действием бис(*p*-нитрофенил)фосфата (PNPP) с образованием 1-(2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбонитрила (3).

Аммонолизом нитрильной группы соединения (3) гидроксидом аммония в кипящем этаноле получают смесь α - и β -изомеров соответствующего карбоксамида.

Изомеры разделяют колоночной хроматографией. Из β -изомера (4) получают 1- β -*D*-рибофуранозил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирин) (5) путем снятия изопропилиденовой защиты 80% водной трихлоруксусной кислотой.

Химико-ферментативный синтез начинают химическим превращением метилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (6) с помощью водного гидроксида аммония в соответствующий 1,2,4-триазол-3-карбоксамид (7), который подвергают конденсации с *D*-ри-бофураноза-1-фосфатом (8) под действием нуклеозидфосфорилазы (из селезенки теленка) с образованием 1- β -*D*-рибофуранозил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамида (рибавирина) (5).

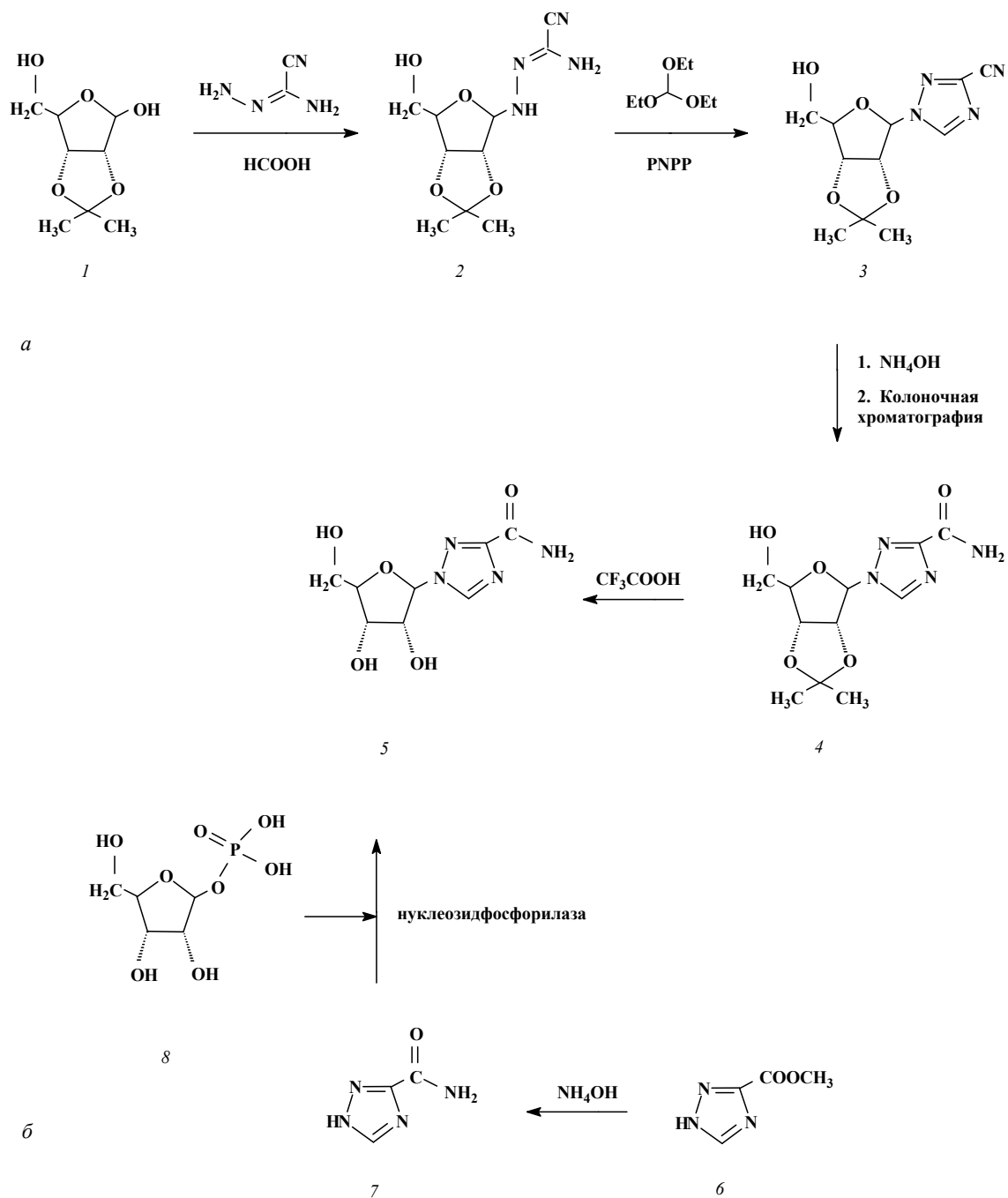


Рис. 2.2. Синтез рибавирина:

a – химический; *б* – химико-ферментативный;

1 – 2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофураноза;

2 – N1-(2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозил)-формаимидразон;

3 – 1-(2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбонитрил;

4 – 1-(2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид;

5 – 1-β-*D*-рибофуранозил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирин);

6 – метиловый эфир 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты;

7 – 1,2,4-триазол-3-карбоксамид; 8 – *D*-рибофураноза-1-фосфат

2.2.3. Получение зидовудина

Зидовудин – противовирусное средство, активное в отношении ретровирусов, включая вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).

Зидовудин, попадая в клетку (как в инфицированную, так и в интактную), при участии тимидинкиназы, тимидилаткиназы и неспецифической киназы фосфорилируется с образованием соответственно моно-, ди- и трифосфатного соединения. Зидовудин трифосфат является субстратом вирусной обратной транскриптазы, активность которой регулируется концентрацией субстрата. Включение зидовудин трифосфата, имеющего структурное сходство с тимидинтрифосфатом, в цепочку ДНК и последующий обрыв цепи блокируют дальнейшее образование ретровирусной ДНК.

Известны различные методы **химического синтеза** зидовудина из тимидина. Один из них представлен на рис. 2.3. Взаимодействием тимидина (1) с 1-хлор-1,2,2-дифтор-2-диэтиламиноэтаном (2) в диметилформамиде (DMF) получают 2,3'-ангидротимидин (3), который затем обрабатывают азидом натрия в водном DMF с образованием 3'-азидо-3'-дезокситимидина (зидовудина).

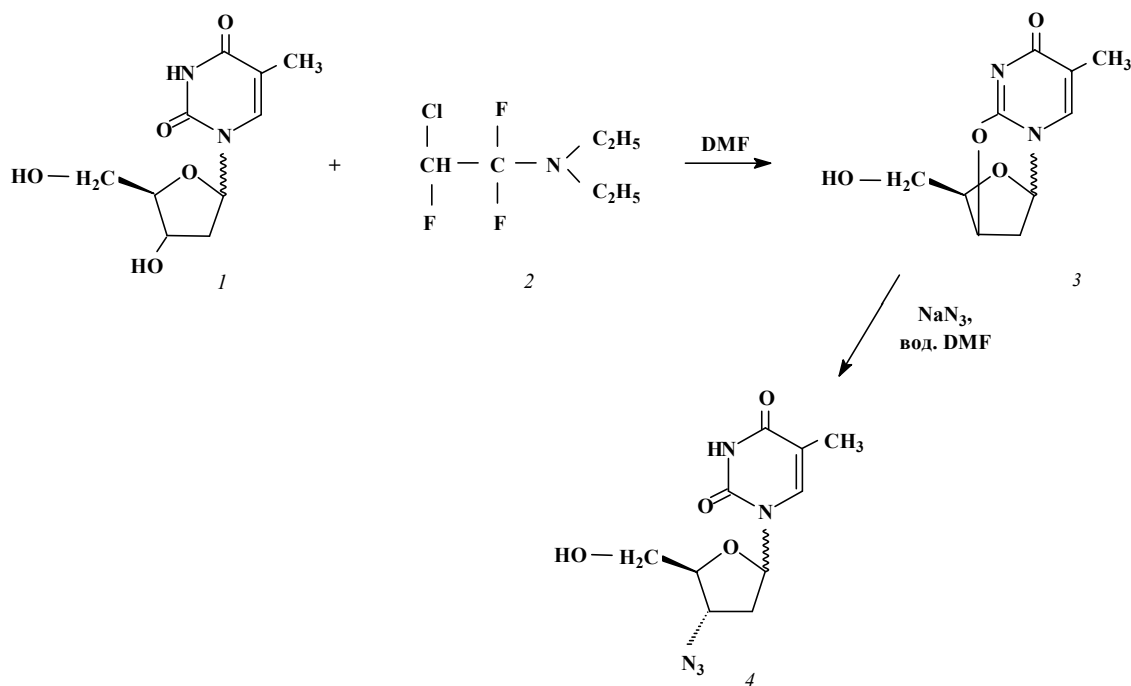


Рис. 2.3. Химический синтез зидовудина:

1 – тимидин;

2 – 1-хлор-1,2,2-дифтор-2-диэтиламиноэтан;

3 – 2,3'-ангидротимидин; 4 – 3'-азидо-3'-дезокситимидин (зидовудин)

Однако наиболее дешевым является классический метод получения зидовудина из маннитола (рис. 2.4).

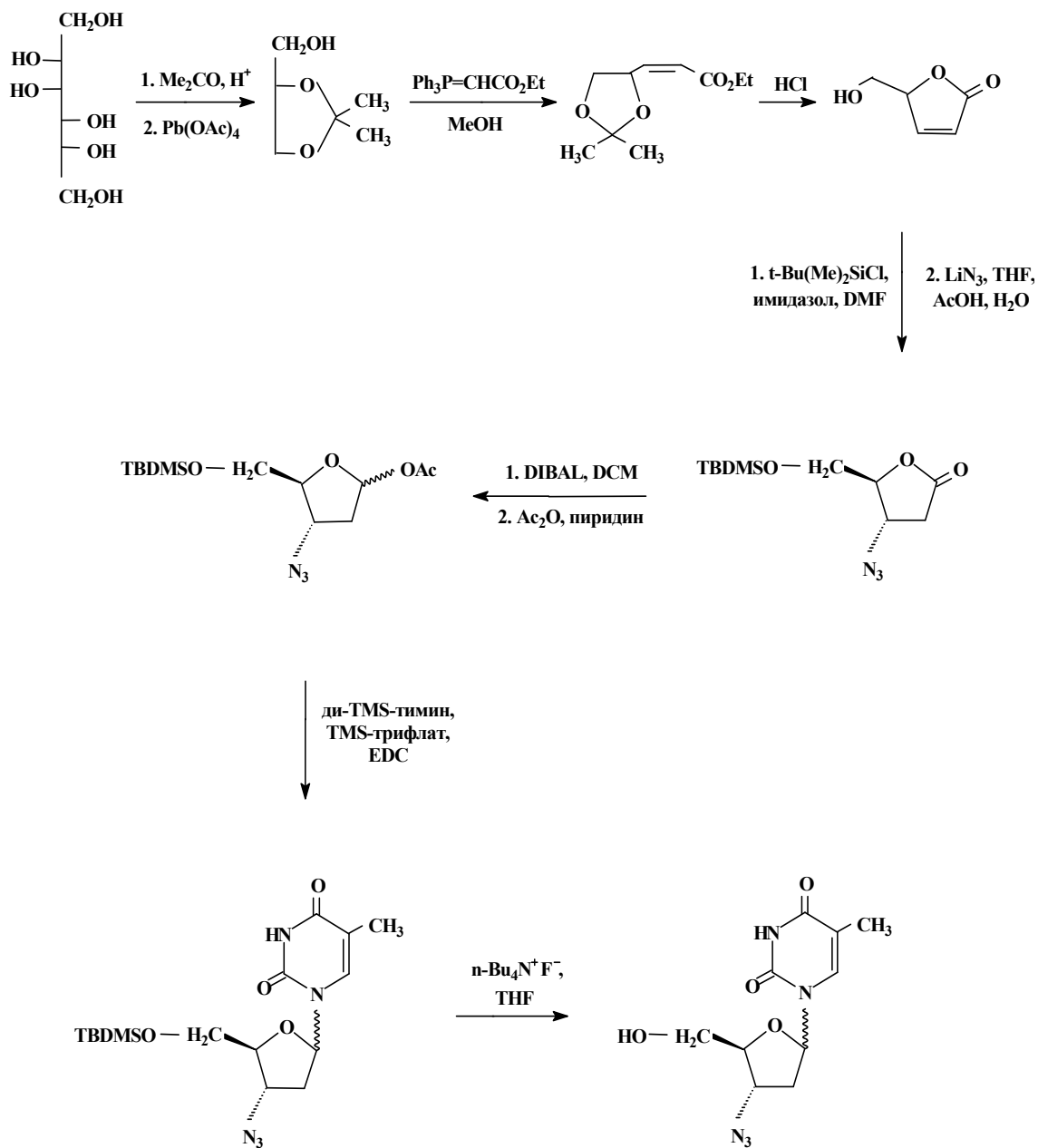


Рис. 2.4. Химический синтез зидовудина из маннитола:

DMF – диметилформаид;
 THF – тетрагидрофуран;
 TBDMS – трет-бутилдиметилсилил;
 DIBAL – диизобутилалюминий гидрид;
 DCM – дихлорметан;
 TMS – триметилсилил;
 EDC – 1,2-дихлорэтан

2.3. Технологии получения нуклеотидов и олигонуклеотидов

2.3.1. Получение фосфадена

Фосфаден (аденозин-5'-монофосфат) – метаболическое средство, обладающее сосудорасширяющим и антиагрегационным (препятствует тромбообразованию) действием.

Фосфаден получают взаимодействием аденозина (1) и трихлороксида фосфора (2) в присутствии триэтилфосфата (рис. 2.5).

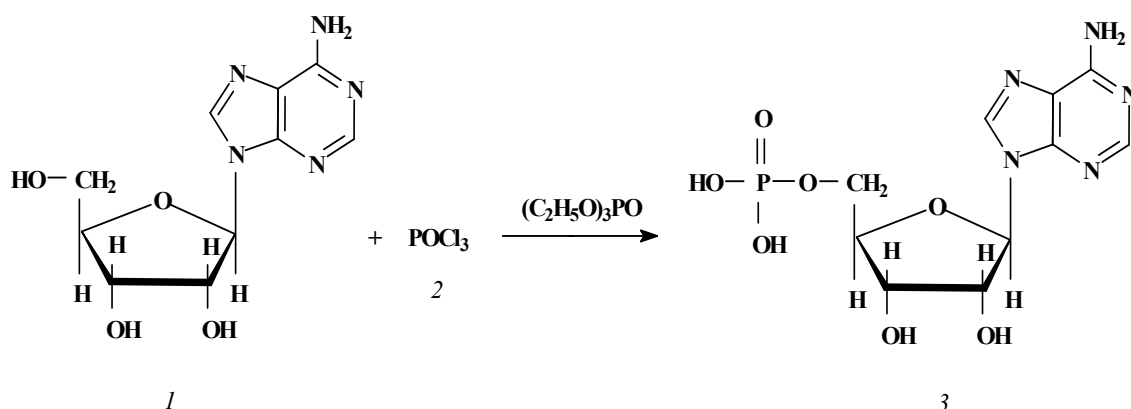


Рис. 2.5. Химический синтез фосфадена:

1 – аденозин; 2 – трихлороксид фосфора; 3 – аденозин-5'-монофосфат (фосфаден)

Затем проводят экстракцию смесью хлороформ/вода, после отделения верхнего слоя добавляют к нему 25% раствор аммиака до pH 1,8–1,95, промывают 50% водным этанолом и высушивают

2.3.2. Получение нуклеината натрия

Нуклеинат натрия – иммуномодулирующее средство. Способствует ускорению процессов регенерации, стимулирует деятельность костного мозга, вызывает лейкоцитарную реакцию (изменение числа лейкоцитов в крови), стимулирует лейкопоз (процесс образования лейкоцитов), а также естественные факторы иммунитета: миграцию и кооперацию T- и B-лимфоцитов (передвижение и объединение форменных элементов крови, ответственных за поддержание клеточных и тканевых защитных сил организма), фагоцитарную активность макрофагов и активность факторов неспецифической резистентности.

Технологическая схема получения нуклеината натрия (смесь натриевых солей нуклеиновых кислот) представлена на рис. 2.6.

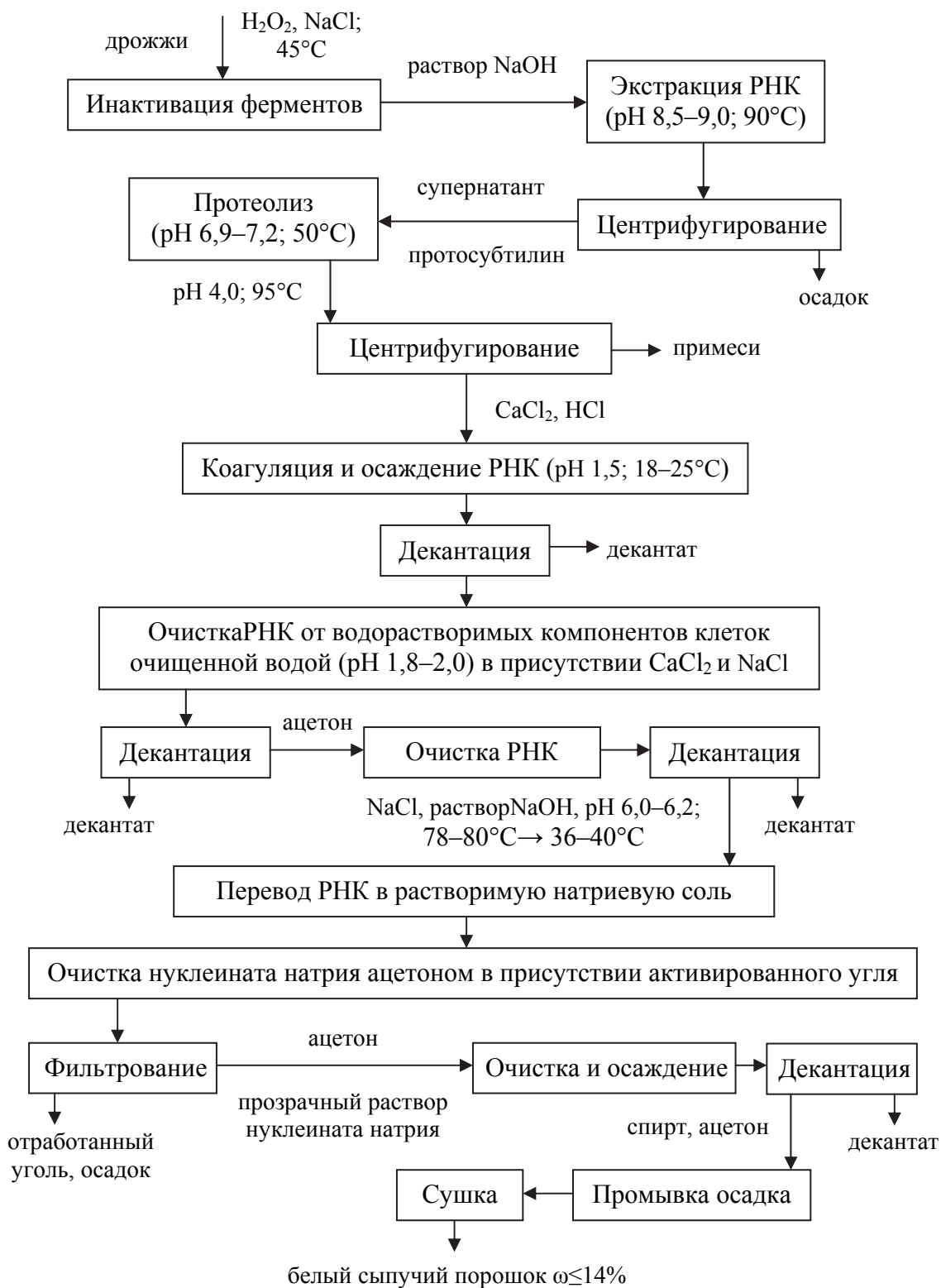


Рис. 2.6. Технологическая схема получения нуклеината натрия

Выход нуклеината натрия составляет 8–13% от теоретического.

ТЕМА 3

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УГЛЕВОДОВ

3.1. Структура и функции углеводов

Углеводы – органические соединения, состав которых выражается общей формулой $C_n(H_2O)_m$ (n и $m \geq 4$). Углеводы подразделяются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Некоторые важнейшие представители класса углеводов

Моносахариды	Олигосахариды	Полисахариды
Глюкоза $C_6H_{12}O_6$	Сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$	Целлюлоза $(C_6H_{10}O_5)_n$
Фруктоза $C_6H_{12}O_6$	Лактоза $C_{12}H_{22}O_{11}$	Крахмал $(C_6H_{10}O_5)_n$
Рибоза $C_5H_{10}O_5$	Раффиноза $C_{18}H_{32}O_{16}$	Гликоген $(C_6H_{10}O_5)_n$

Моносахариды представляют собой альдегиды или кетоны, содержащие две или более ОН-группы.

Полисахариды являются продуктами поликонденсации моносахаридов.

Олигосахариды составляют промежуточную группу между моно- и полисахаридами и содержат от двух до десяти моносахаридных остатков.

Олигомерные и полимерные углеводы часто встречаются в ковалентно связанном виде с липидами (*гликолипиды*) или белками (*гликопротеины*), входящими в состав клеточных мембран.

Функции углеводов:

1) энергетическая: углеводы служат источником энергии для организма (при окислении 1 г углеводов выделяется 17,6 кДж энергии);

2) строительная: целлюлоза входит в состав клеточных стенок растений, хитин обнаруживается в клеточной стенке грибов и в наружном скелете членистоногих, гликопротеины входят в состав хрящевой и костной ткани животных;

3) запасающая: резервным углеводом у животных и грибов является гликоген, у растений – крахмал, инулин;

4) защитная: пектины способны связывать некоторые токсины и радионуклиды, предотвращая попадание их в кровь; гепарин – ингибитор свертывания крови; слизи, выделяемые различными железами и богатые углеводами, предохраняют пищевод, кишечник, желудок,

бронхи от механических повреждений, препятствуют проникновению в организм бактерий и вирусов; камеди, выделяющиеся в местах повреждения стволов и ветвей, защищают деревья и кустарники от проникновения инфекций через раны.

3.2. Технологии получения углеводов

3.2.1. Получение глюкозы

Глюкоза – лекарственное средство углеводного питания, обладающее плазмозамещающим, гидратирующим, дезинтоксикационным и метаболическим действием.

Структурные формулы α - и β -глюкозы представлены на рис. 3.1.

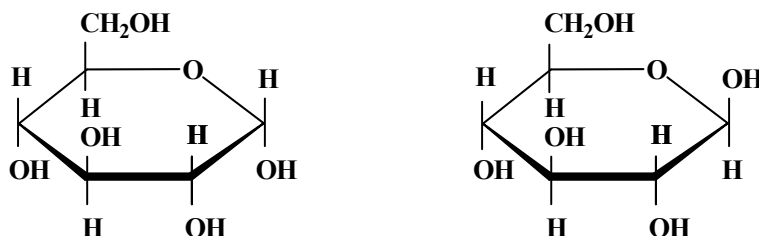


Рис. 3.1. Структурные формулы α - и β -глюкозы

Медицинской глюкозой называют рафинированную (дважды перекристаллизованную) кристаллическую глюкозу доброкачественностью не ниже 99,9%. В зависимости от условий перекристаллизации медицинскую глюкозу получают в ангидридной (для изготовления таблеток) и гидратной (для внутривенного введения) форме.

Технологическая схема получения медицинской глюкозы представлена на рис. 3.2.

В основе производства глюкозы лежит кислотный, кислотно-ферментативный или ферментативный гидролиз крахмала с получением глюкозных сиропов.

Для проведения **кислотного гидролиза** используют крахмальную суспензию концентрацией 22–25% сухих веществ (СВ) и соляную кислоту с расходом 0,5–0,65%.

Гидролиз ведут в непрерывном осаживателе при температуре 138–147°C и давлении 0,32–0,55 МПа в течение 25 мин. Полученный гидролизат имеет чистоту 89–91% и его нейтрализуют 16% раствором карбоната натрия до рН 4,7–5,0, при котором получается раствор с хорошей фильтруемостью.



Рис. 3.2. Технологическая схема получения медицинской глюкозы

Очистка глюкозных сиропов осуществляется фильтрованием и дальнейшим осветлением с использованием активированного угля. Очищенные жидкие сиропы подогревают до 90–95°C и для снижения интенсивности нарастания цветности подкисляют соляной кислотой до рН 4,4–4,5, после чего выпаривают в трехкорпусной выпарной установке под вакуумом до содержания СВ 55–57%. Густой сироп очищают активированным углем и подвергают фильтрованию, предварительно установив рН 5,0–5,4. Затем сироп снова подкисляют до рН 4,2–4,3 и уваривают в вакуум-аппарате до концентрации СВ 74–76%. Полученный глюкозный сироп чистотой 91–93% охлаждают в холодильнике до 48–50°C, фильтруют и заливают в кристаллизатор. В качестве затравки кристаллов вводят утфель предыдущей кристаллизации в количестве 30%. Сироп смешивают с затравкой в течение 12–24 ч; температура утфеля после смешивания должна быть 43–44°C. Процесс кристаллизации глюкозы идет 110–120 ч, и температура снижается до 25°C.

Полученный в результате кристаллизации утфель на центрифуге разделяют на кристаллы глюкозы и зеленую патоку с последующей промывкой слоя кристаллов дистиллированной водой и отделением белой патоки. При этом белую и часть зеленой патоки возвращают в производство на стадию осветления сиропа, а другую часть зеленой патоки используют для получения пищевой глюкозы.

Для проведения *ферментативного гидролиза* в суспензию крахмала (30–35% СВ) добавляют раствор карбоната натрия до рН 6,0–6,5 и раствор амилосубтилина Г10Х в количестве 0,02% к СВ субстрата. Смесь подогревают до 85°C, выдерживают 1,5 ч, а затем поднимают температуру до 140°C, при которой выдерживают раствор 5 мин. Далее смесь быстро охлаждают в циклоне-испарителе до 85°C и вводят вторую порцию амилосубтилина (0,05–0,07%), перемешивают и выдерживают при этой температуре до содержания редуцирующих веществ (РВ) около 20%.

Разжиженный крахмал охлаждают до 60°C и вводят ферментный препарат очищенной глюкоамилазы (глюкоаваморин Г20Х). При осахаривании контролируют рН (4–5,5) и содержание РВ. Продолжительность процесса составляет 60–90 ч (56–58°C). В результате осахаривания получают сироп с содержанием РВ 96–98%. Для инактивации фермента и стерилизации сиропа его выдерживают при 80°C в течение 20 мин. Затем для коагуляции белковых веществ рН сиропа доводят соляной кислотой до 4,8–5,0 и фильтруют. От-фильтрованный сироп обесцвечивают активированным углем (0,5% от массы СВ).

После отделения угля сироп выпаривают под вакуумом до содержания СВ 54–56%. Густой сироп еще раз обрабатывают активированным углем (0,5%), который затем отделяют, а раствор уваривают в вакуум-аппарате до содержания СВ 70–72,5%, охлаждают до 50°C и направляют в кристаллизаторы. Полученный утфель центрифугируют. Кристаллы промывают дистиллированной водой.

Глюкоза медицинская *гидратная* должна иметь влажность не более 9%, содержание сульфатной золы – не более 0,1%, хлоридов и сульфатов – не больше, чем в эталоне; наличие кальция, бария, мышьяка, солей тяжелых металлов исключается.

Для получения медицинской гидратной глюкозы используют кристаллы гидратной кристаллической глюкозы, которые растворяют в уваренной смеси зеленой и белой патоки (80–85°C), полученных при центрифугировании утфеля и промывании кристаллов медицинской глюкозы. Полученный сироп концентрацией 72,0–72,5% СВ после очистки активированным углем, фильтрования и охлаждения до 55°C помещают в кристаллизаторы. В качестве затравки используют утфель предыдущей кристаллизации в количестве 15% от вместимости кристаллизатора. По окончании кристаллизации межкристаллитный раствор (зеленая патока) отделяют, кристаллы промывают дистиллированной водой, сушат и просеивают; выделенную белую патоку уваривают вместе с зеленой в вакуум-аппарате до содержания СВ 59–60% и направляют для растворения кристаллической глюкозы.

Из сиропов высокой доброкачественности глюкоза легко кристаллизуется в безводной *ангидридной* форме. При этом скорость кристаллизации повышается в пять раз по сравнению с гидратной глюкозой, а получаемые кристаллы отличаются высокой степенью однородности, изометричностью и незначительной влажностью (менее 1%). Для получения ангидридной глюкозы также используют кристаллическую гидратную глюкозу, но сироп готовят с концентрацией СВ 55–60%. После очистки и фильтрования сироп подают в вакуум-аппарат, где уваривают до 82–84% СВ и вносят в качестве затравки кристаллы ангидридной глюкозы. Процесс наращивания кристаллов ангидридной глюкозы длится 6–8 ч, при этом в аппарат систематически подают сироп, чтобы обеспечить наращивание кристаллов и предотвратить образование новых кристаллов. Окончательное сгущение утфеля ведут до содержания в сиропе 88–90% СВ. Утфель спускают в кристаллизатор, а затем центрифугируют. Кристаллы промывают дистиллированной водой; влажные кристаллы сушат (90–110°C) и просеивают.

3.2.3. Получение инулина

Инулин – полимер *D*-фруктозы молекулярной массой 5000–6000 Да (30–35 остатков фруктозы и 1 остаток глюкозы), который содержится в лекарственных растениях, таких как артишок, чеснок, спаржа, девясил, лопух, одуванчик, скорцонера, цикорий, мать-и-мачеха, эхинацея и топинамбур.

Структурная формула инулина представлена на рис. 3.3.

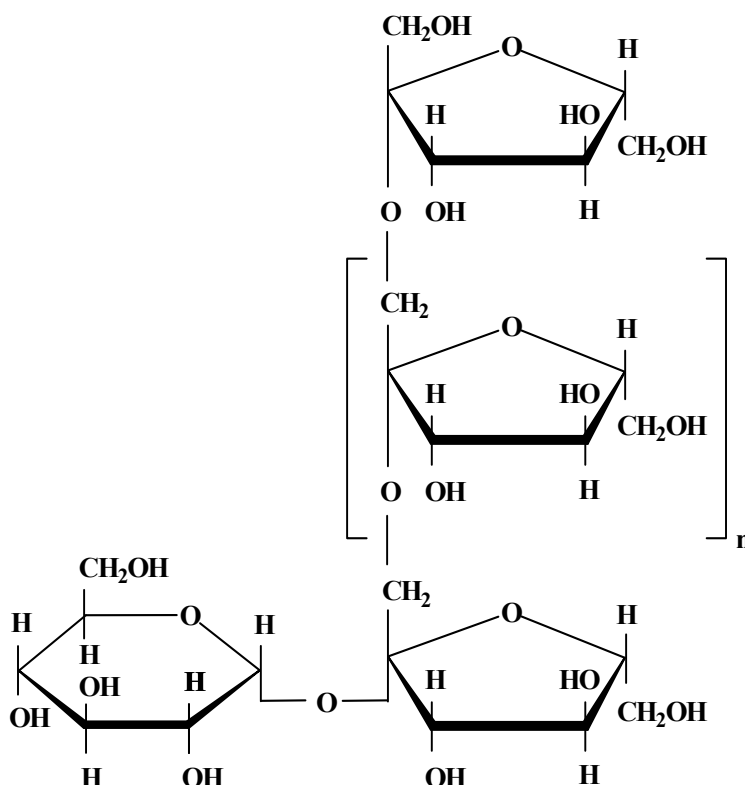


Рис. 3.3. Структурная формула инулина

Как лечебно-профилактический и диетический продукт инулин применяется при сахарном диабете I и II типа, атеросклерозе, ишемической болезни сердца, остеохондрозе, почечно-каменной и желчекаменной болезнях.

Технологическая схема получения инулина из топинамбура для медицинских целей включает следующие операции (рис. 3.4):

– измельчение сырых клубней топинамбура с одновременным добавлением 96% этанола в соотношении 2:1 для инактивации фермента инулазы. Полученное сырье используют как исходное для получения экстракта;

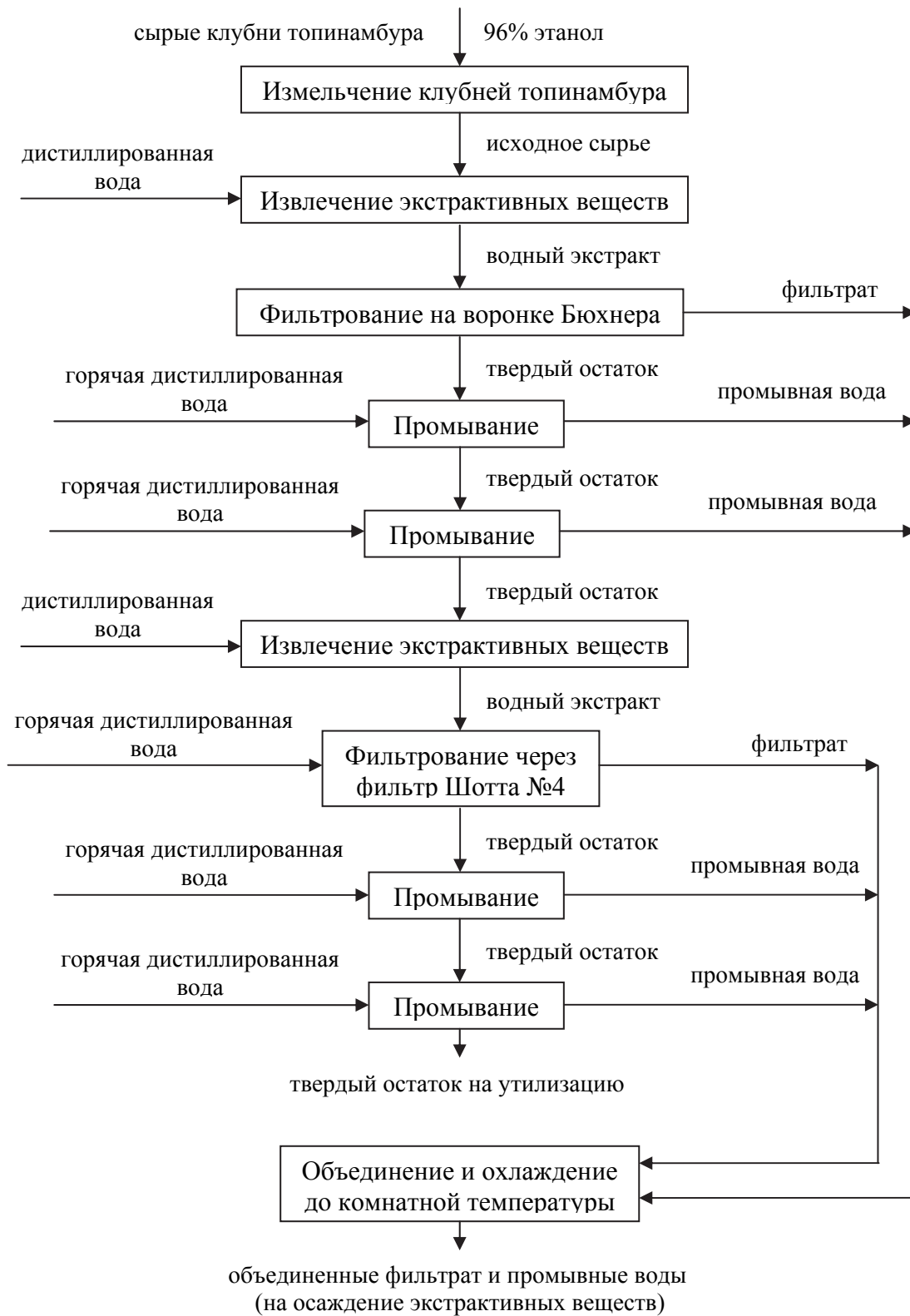


Рис. 3.4. Технологическая схема получения инулина из топинамбура для медицинских целей (продолжение и окончание см. на с. 48 и 49)

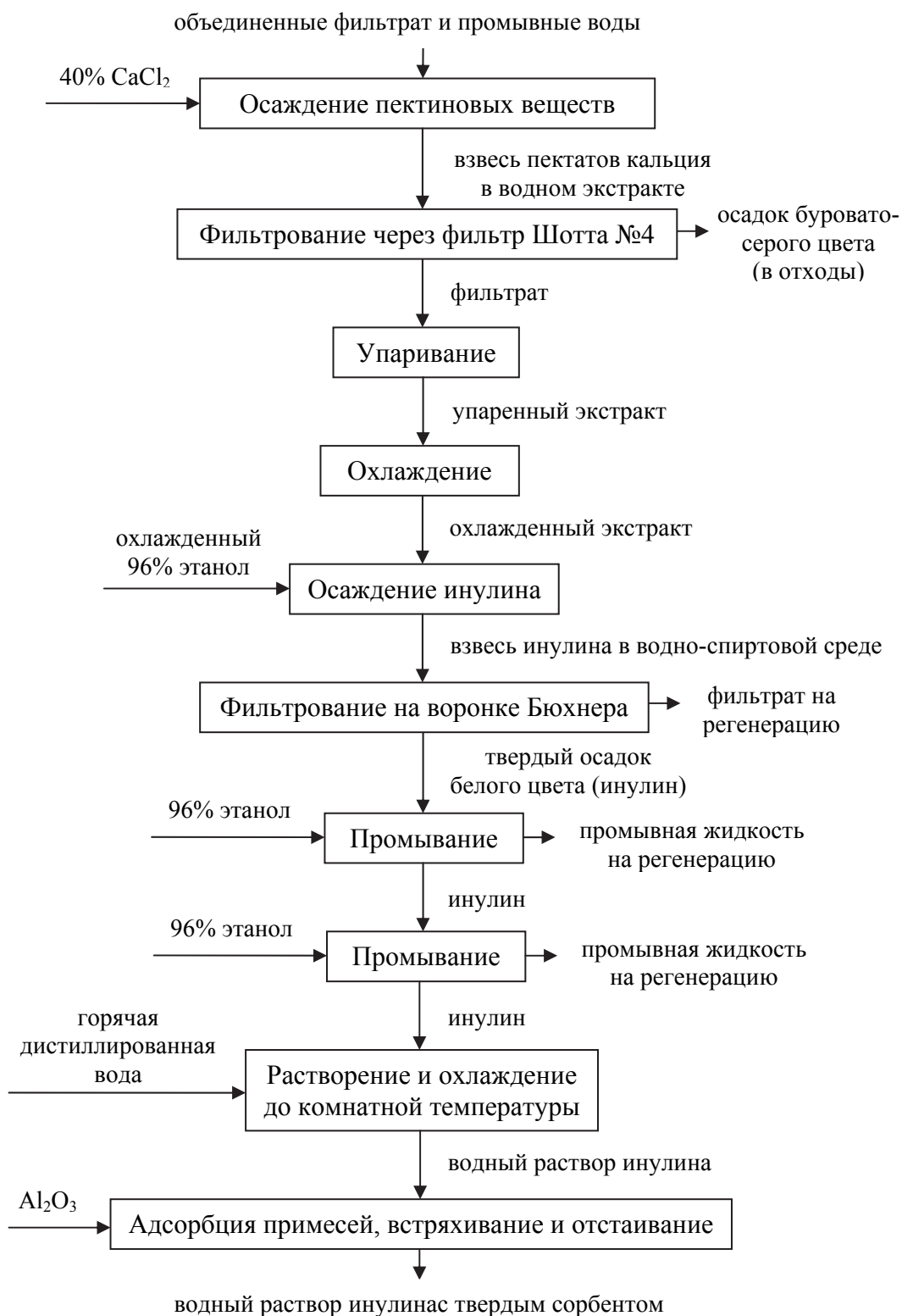


Рис. 3.4. Продолжение (начало см. на с. 47, окончание см. на с. 49)

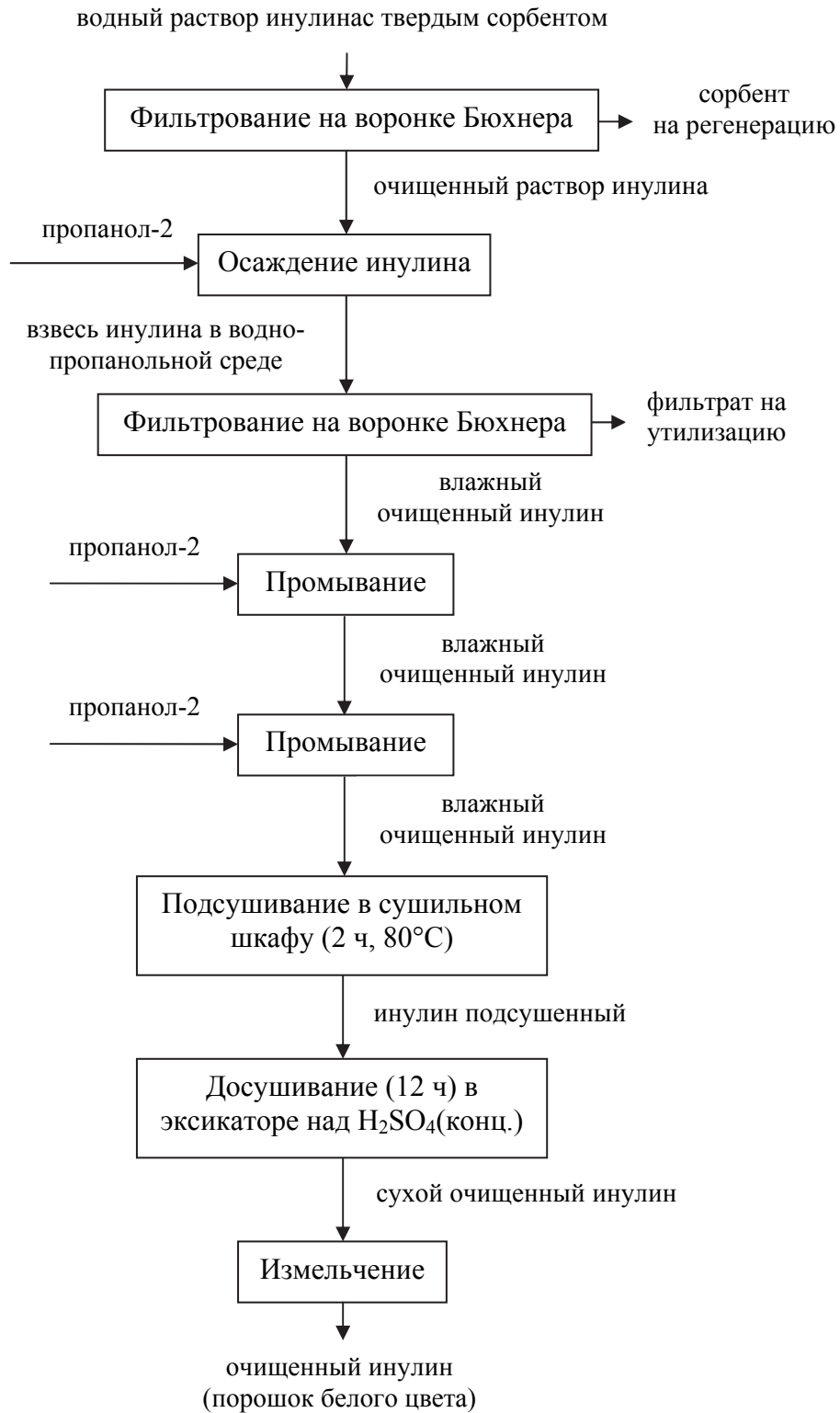


Рис. 3.4. Окончание (начало см. на с. 47, окончание см. на с. 48)

– извлечение экстрактивных веществ нагреванием на кипящей водяной бане исходного сырья с дистиллированной водой в соотношении 1:2,5 в течение 20 мин с последующим охлаждением водного экстракта до комнатной температуры;

– фильтрование полученного водного экстракта на воронке Бюхнера с применением плотного бумажного фильтра с последующим промыванием дважды небольшими порциями горячей дистиллированной воды с температурой 95°C твердого остатка на фильтре. Получают твердый остаток и фильтрат с промывной водой;

– повторное извлечение экстрактивных веществ нагреванием на кипящей водяной бане твердого остатка с дистиллированной водой в соотношении 1:5 в течение 20 мин с последующим охлаждением водного экстракта до комнатной температуры;

– фильтрование полученного водного экстракта через фильтр Шотта №4 с последующим промыванием дважды небольшими порциями горячей дистиллированной воды с температурой 95°C твердого остатка на фильтре. Получают твердый остаток и фильтрат с промывной водой;

– объединение обеих порций фильтрата с промывной водой и последующее охлаждение его до комнатной температуры;

– осаждение хлоридом кальция пектиновых веществ из фильтрата с промывной водой (водного экстракта) путем добавления в него 40% раствора хлорида кальция.

Получают буровато-серый осадок в водном экстракте – экстракционную смесь;

– фильтрование экстракционной смеси на фильтре Шотта №4. Получают фильтрат и буровато-серый осадок;

– упаривание фильтрата на водяной бане до объема первичного экстракта с последующим охлаждением до 5°C;

– осаждение инулина из охлажденного экстракта охлажденным 96% этанолом. Получают взвесь инулина в водно-спиртовой среде – экстракционную смесь;

– фильтрование экстракционной смеси на воронке Бюхнера. Получают твердый осадок белого цвета – инулин;

– промывание инулина (дважды) небольшими порциями 96% этанола;

– перевод инулина в водный раствор путем растворения его в горячей дистиллированной воде с температурой 95°C и последующее охлаждение водного раствора инулина до комнатной температуры;

– адсорбция примесей путем добавления оксида алюминия в водный раствор инулина с последующим встряхиванием и отстаиванием его в течение 20 мин;

– фильтрование водного раствора инулина с твердым сорбентом на воронке Бюхнера с отделением сорбента;

– осаждение инулина из водного раствора пятикратным объемом пропанола-2. Получают взвесь инулина в водно-пропанольной среде;

– фильтрование на воронке Бюхнера с отделением белого осадка – инулина, который дважды промывают небольшими порциями пропанола-2. Получают влажный очищенный инулин;

– подсушивание очищенного инулина в сушильном шкафу при 80°C в течение 2 ч;

– досушивание в эксикаторе над H₂SO₄(конц.) в течение 12 ч;

– измельчение продукта путем растирания в ступке. Получают порошок белого цвета – инулин.

Выход инулина составляет 58,1%.

3.2.4. Получение гепарина

Гепарин – антикоагулянт прямого действия (средство, препятствующее свертыванию крови).

Применяют для профилактики и терапии различных тромбоэмболических (связанных с закупоркой сосудов сгустком крови) заболеваний и их осложнений, для предотвращения или ограничения тромбообразования при остром инфаркте миокарда, при тромбозах (образовании сгустка крови в сосуде) и эмболиях (закупорке кровеносных сосудов) магистральных вен и артерий, сосудов мозга, глаза, при операциях на сердце и кровеносных сосудах, для поддержания жидкого состояния крови в аппаратах искусственного кровообращения и аппаратуре для гемодиализа (очистки крови).

Гепарин относится к семейству гликозаминогликанов; его молекула представлена несколькими полисахаридными цепями, связанными с общим белковым ядром. Белковое ядро включает в свой состав остатки двух аминокислот: серина и глицина. Приблизительно две трети сериновых остатков как раз и связывается с полисахаридными цепями. В основе последних лежит цепочка из повторяющихся дисахаридов – α-D-глюкозамин и уроновая кислоты, соединенные 1,4-гликозидными связями. Большинство остатков α-D-глюкозамина сульфатировано по амино- и гидроксильной группе; небольшая часть аминокрупп может быть ацетилирована. Звенья уроновой кислоты

представляют собой остатки *L*-идурановой кислоты или эимерные остатки *D*-глюкуроновой кислоты.

Формулы структурных компонентов гепарина представлены на рис. 3.5.

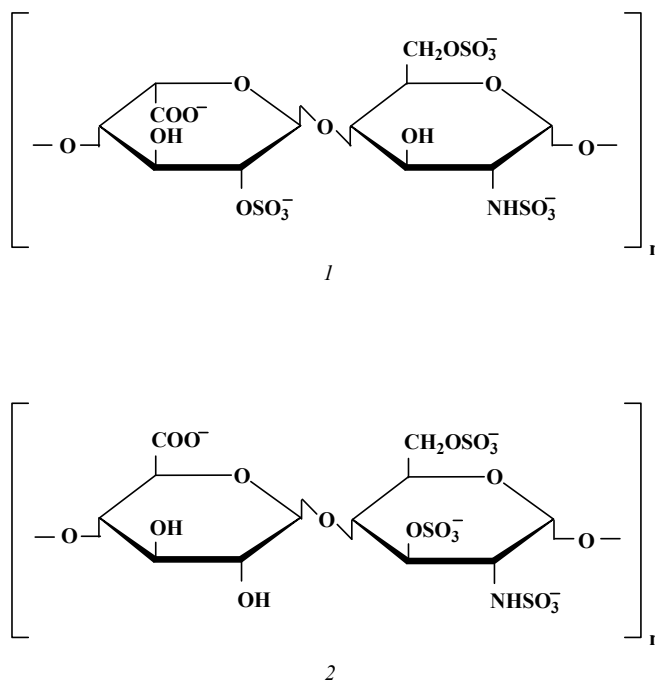


Рис. 3.5. Формулы структурных компонентов гепарина:

- 1 – полисахаридная цепь из *L*-идурановой кислоты и α -*D*-глюкозамина;
2 – полисахаридная цепь из *D*-глюкуроновой кислоты и α -*D*-глюкозамина

Технологическая схема получения гепарина натрия, являющегося действующим веществом лекарственных средств «Гепарин», «Гепарин-Ферейн», «Гепарин-Рихтер» и др. представлена на рис. 3.6.

Измельченное сырье – легкие крупного рогатого скота (КРС) – экстрагируют водно-солевым щелочным раствором (1,2 М NaCl, pH 8,8) при 60°C. Отличительной особенностью данной технологии является то, что полученный после первой экстракции экстракт используют в качестве экстрагента при последующей (второй) экстракции измельченных легких КРС. При этом в экстрагенте повышают содержание NaCl до 2,5 М, а также значение pH до 9,2 и экстракцию проводят при 80°C. После завершения процесса экстракции и отделения осадка к экстракту добавляют макропористый сильноосновный анионит в Cl-форме, выдерживают при периодическом перемешивании. Затем анионит отделяют, промывают дистиллированной водой, переносят в колонку и десорбируют гепарин 2,5 М раствором NaCl.

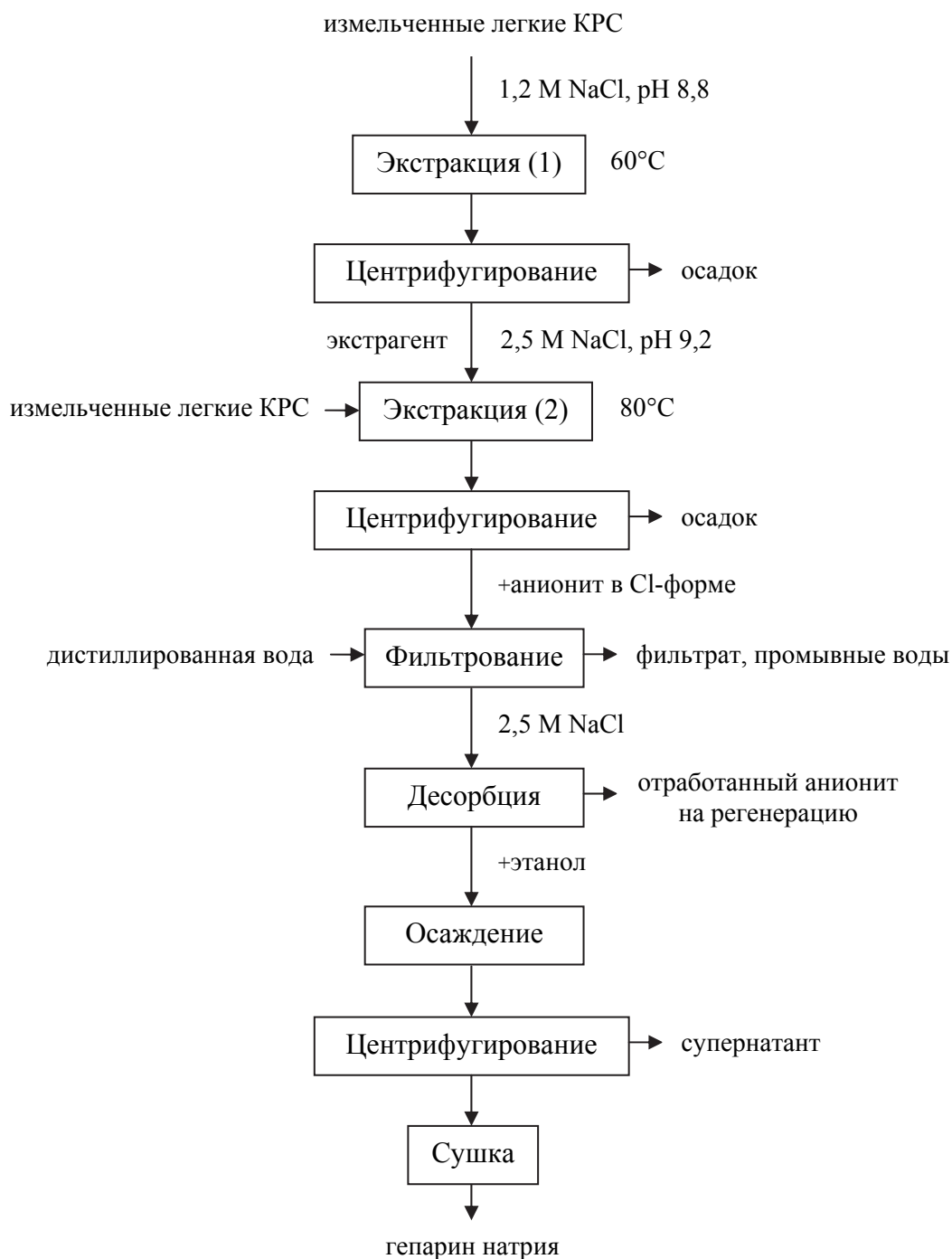


Рис. 3.6. Технологическая схема получения гепарина натрия

Гепарин натрия осаждают из элюата этанолом. Осадок отделяют центрифугированием и высушивают сначала на воздухе, а затем в вакуумном сушильном шкафу при температуре 50–60°C. В результате получают фармакопейный гепарин натрия.

ТЕМА 4 СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ

4.1. Структура и функции липидов

Липиды – гидрофобные соединения, экстрагируемые из биологического материала такими неполярными растворителями, как гексан, бензол, хлороформ и др.

Однако к истинным липидам относят сложные эфиры жирных кислот и трехатомного спирта – глицерина – или высшего алифатического аминспирта с ненасыщенной углеводородной цепью (C₁₈) – сфингозина.

Существует несколько классификаций липидов.

По степени полярности липиды делятся на **неполярные** и **полярные** (рис. 4.1).

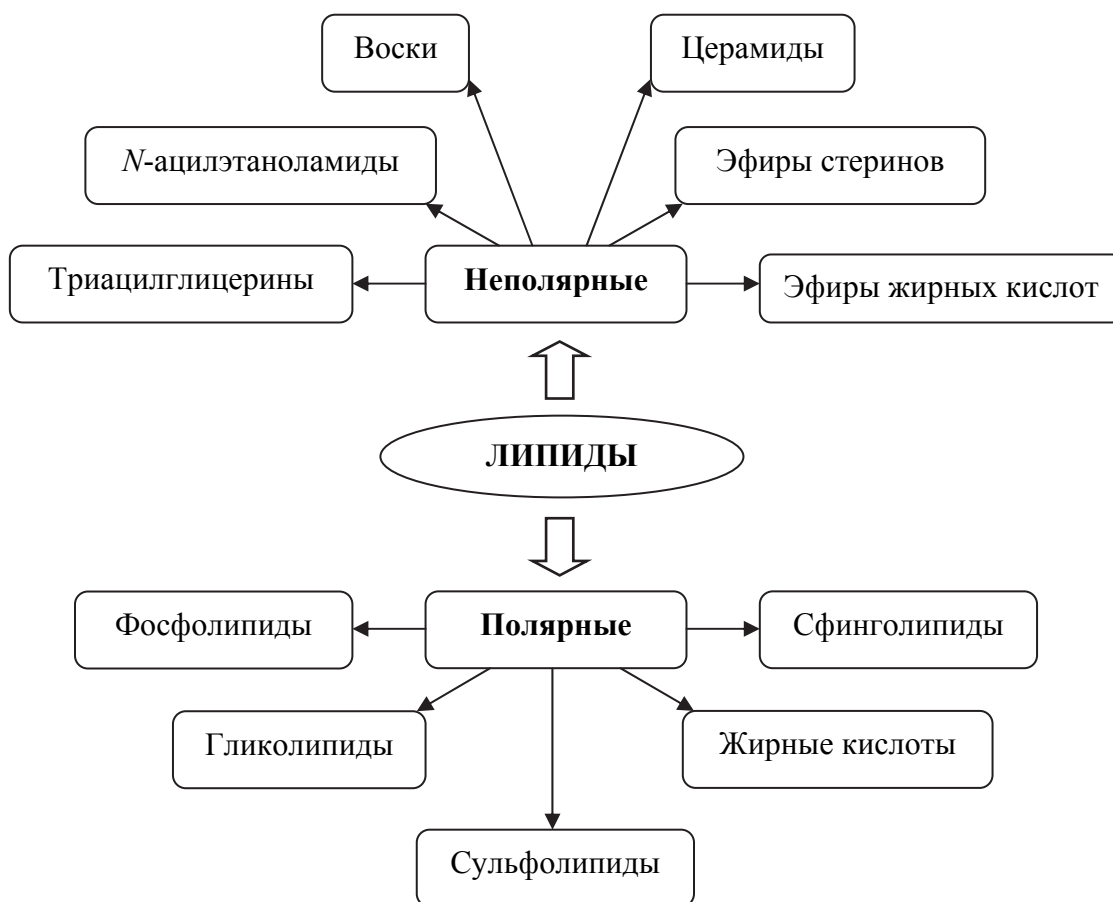


Рис. 4.1. Классификация липидов по степени полярности

Структурные формулы неполярных липидов представлены на рис. 4.2.

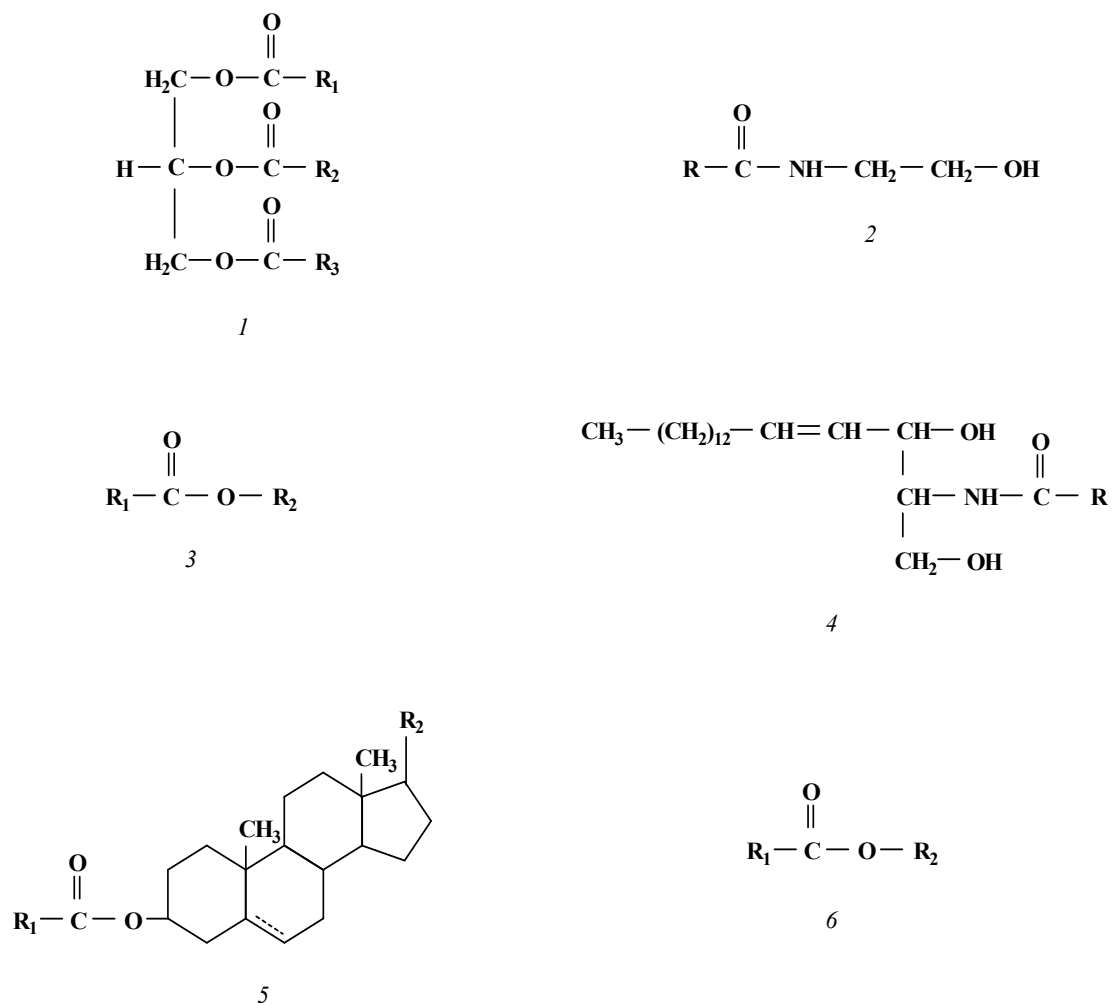


Рис. 4.2. Структурные формулы неполярных липидов:
 1 – триацилглицерины; 2 – *N*-ацилэтаноламиды; 3 – воски; 4 – церамиды;
 5 – эфиры стериннов; 6 – эфиры жирных кислот

Триацилглицерины – сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот (R_1 , R_2 и R_3 – остатки жирных кислот).

***N*-ацилэтаноламиды** – ацилированный высшими жирными кислотами по аминогруппе этаноламин (R – остаток жирной кислоты).

Воски – сложные эфиры высших жирных кислот и высших одно- или многоатомных спиртов (R_1 – остаток жирной кислоты, R_2 – остаток спирта).

Церамиды – ацилированный высшими жирными кислотами по аминогруппе сфингозин (R – остаток жирной кислоты).

Эфиры стероидов – ацилированные высшими жирными кислотами по гидроксильной группе стерина (R_1 – остаток жирной кислоты, R_2 – углеводородная цепь стерина).

Эфиры жирных кислот – этерифицированные низкомолекулярными спиртами жирные кислоты (R_1 – остаток жирной кислоты, R_2 – остаток низкомолекулярного спирта).

Структурные формулы полярных липидов представлены на рис. 4.3.

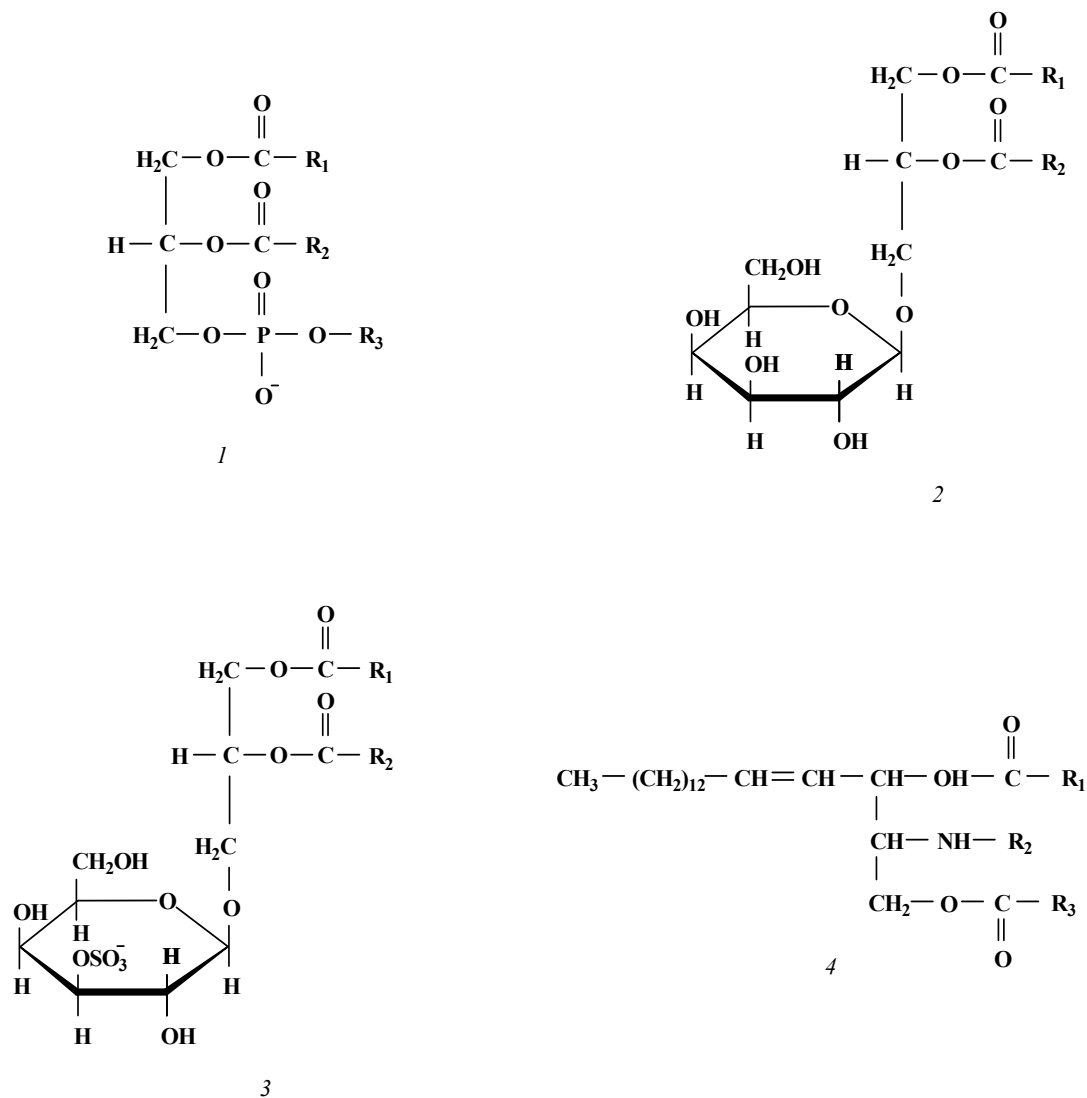


Рис. 4.3. Структурные формулы полярных липидов:
1 – фосфолипиды; 2 – гликолипиды; 3 – сульфолипиды; 4 – сфинголипиды

Фосфолипиды – сложные эфиры многоатомных спиртов и высших жирных кислот, содержащие остаток фосфорной кислоты, который соединен с полярным радикалом (R_1 и R_2 – остатки жирных кислот, R_3 –

полярный радикал, чаще всего остаток холина, этаноламина, серина и инозита).

Гликолипиды – соединения, построенные из липидного и углеводного фрагментов, соединенных ковалентной связью (R_1 и R_2 – остатки жирных кислот).

Сульфолипиды – гликолипиды, содержащие сульфированный углеводный остаток (R_1 и R_2 – остатки жирных кислот).

Жирные кислоты – алифатические монокарбоновые кислоты (C_{14} – C_{24}).

Сфинголипиды – сложные эфиры высших жирных кислот и сфингозина (R_1 и R_3 – остатки жирных кислот, R_2 – полярный радикал, чаще всего остаток холина, этаноламина, серина и инозита).

По степени ненасыщенности жирных кислот и их положению в триацилглицеринах липиды делятся на **растительные масла** и **животные жиры**.

В растительных маслах содержится много полиненасыщенных жирных кислот, благодаря чему они являются жидкими. Причем ненасыщенные жирные кислоты в маслах располагаются в положениях C_1 и C_3 , а насыщенные – в положении C_2 глицерина.

В животных жирах ненасыщенных жирных кислот меньше, которые локализуются в положениях C_2 и C_3 , а насыщенные – в положении C_1 .

Функции липидов:

1) энергетическая: при биологическом окислении 1 г липидов образуется 38,9 кДж энергии;

2) структурная: фосфолипиды составляют основу бислоя цитоплазматических мембран, холестерин – регулятор текучести мембран;

3) защитная и теплоизоляционная: накапливаясь в подкожной клетчатке и вокруг некоторых органов (почек, кишечника), жировой слой защищает организм животных и его отдельные органы от механических повреждений. Кроме того, благодаря низкой теплопроводности слой подкожного жира помогает сохранить тепло, что позволяет, например, многим животным обитать в условиях холодного климата. У китов он играет еще и другую роль – способствует плавучести;

4) смазывающая и водоотталкивающая: воск покрывает кожу, шерсть, перья, делает их более эластичными и предохраняет от влаги. Восковой налет имеют листья и плоды многих растений;

5) регуляторная: гормоны (стероиды, эйкозаноиды) и витамины (А, D, E, K), содержащиеся в липидах, регулируют обмен веществ.

4.2. Технологии получения липидов

4.2.1. Получение эссенциальных фосфолипидов

Эссенциальные фосфолипиды (ЭФЛ, лецитин) в естественных условиях представляют собой смесь различных фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилэтанолламин).

Структурные формулы ЭФЛ представлены на рис. 4.4, где R_1 и R_2 –остатки ненасыщенных жирных кислот (линолевая, линоленовая, олеиновая).

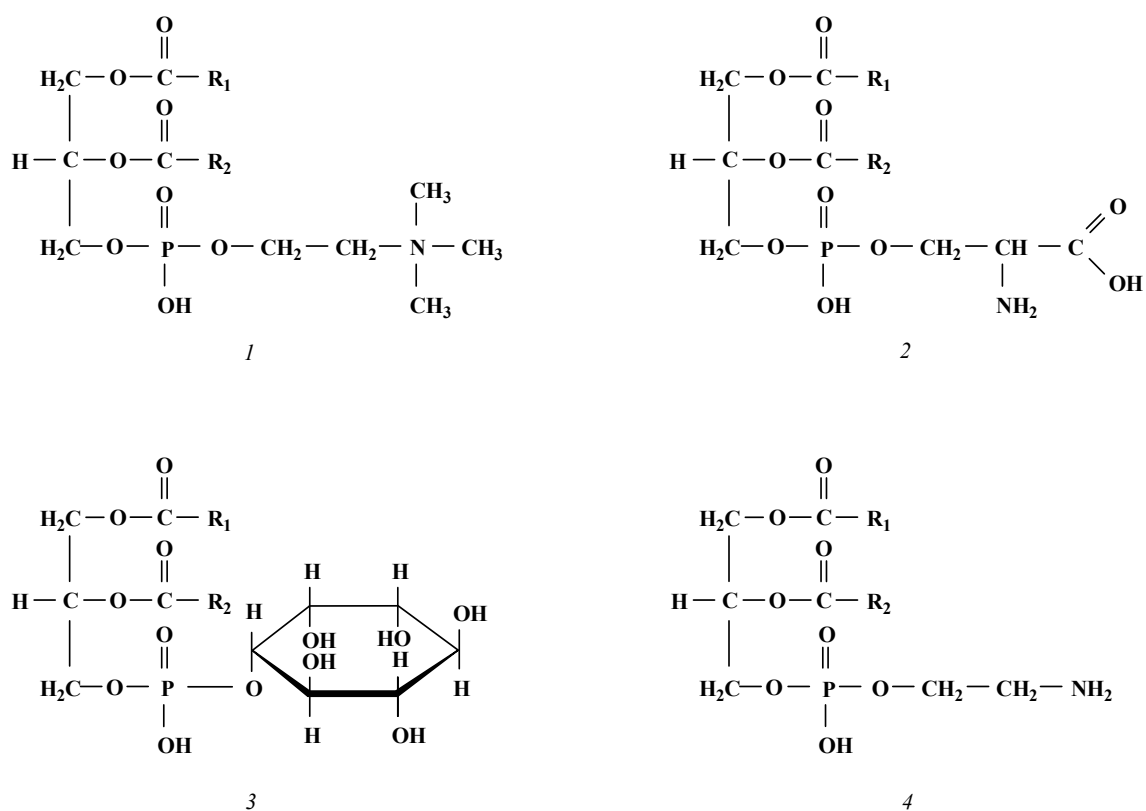


Рис. 4.4. Структурные формулы эссенциальных фосфолипидов:
1 – фосфатидилхолин; 2 – фосфатидилсерин; 3 – фосфатидилинозит;
4 – фосфатидилэтанолламин

Содержание фосфатидилхолина (ФХ), который рассматривается в качестве необходимого компонента пищевого рациона человека, в нативной смеси фосфолипидов составляет 13–20%.

Для профилактики и лечения заболеваний печени применяются специально разработанные лекарственные средства на основе ЭФЛ,

такие как «Эссенциале», «Эссенциале форте», «Эссливер форте», «Резалют Про» и др., очищенные от масел и нежелательных примесей, активное действующим веществом которых является ФХ. При этом содержание ФХ увеличивается в 4–5 раз по сравнению с содержанием в природном лецитине.

Мембраностабилизирующее и гепатопротективное действие ЭФЛ достигается путем непосредственного встраивания их молекул в фосфолипидную структуру поврежденных клеток печени, замещения дефектов и восстановления барьерной функции липидного бислоя мембран.

Ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов способствуют повышению активности и текучести мембран, в результате чего уменьшается плотность фосфолипидных структур, нормализуется их проницаемость.

Экзогенные фосфолипиды активируют расположенные в мембране фосфолипидзависимые ферменты. Это, в свою очередь, оказывает поддерживающее влияние на обменные процессы в клетках печени, повышая ее детоксикационный и экскреторный потенциал.

Гепатозащитное действие ЭФЛ основывается также на ингибировании процессов перекисного окисления липидов, которые рассматриваются как один из ведущих патогенетических механизмов развития поражений печени.

Технологическая схема получения лекарственных средств на основе ЭФЛ представлена на рис. 4.5.

Исходное сырье – соевые бобы (лецитин – 0,5%) – очищают и измельчают, затем проводят экстракцию липидов гексаном. Полученную смесь фильтруют. Высушенный осадок – соевая мука (побочный продукт) – используют в качестве корма для животных.

Из фильтрата при пониженном давлении выпаривают гексан и получают сырое соевое масло, которое нагревают до 60–80°C и смешивают с водой для набухания и осаждения лецитина. Последний отделяют центрифугированием с получением лецитинового осадка и рафинированного соевого масла.

Лецитиновый осадок от бледно-желтого до коричневатого цвета, содержащий 33% фосфолипидов, 12% масла и 55% воды, высушивают при пониженном давлении.

Получают сырой лецитин, из которого после очистки и фракционирования органическими растворителями выделяют лецитин с высоким содержанием ФХ. Последующим фракционированием с помощью этанола получают высокоочищенную фракцию ФХ.



Рис. 4.5. Технологическая схема получения лекарственных средств на основе ЭФЛ

4.2.2. Получение облепихового масла

Облепиха крушиновидная (*Hipporhae rhamnoides* L.) – ценное лекарственное растение.

Облепиховое масло из мякоти плодов имеет ярко-оранжевую окраску, из семян – желтоватую.

Физико-химические показатели масла из мякоти плодов и семян облепихи приведены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Физико-химические показатели масла из мякоти плодов и семян облепихи

Физико-химические показатели	Масло	
	из мякоти плодов	из семян
Плотность при 20°C, кг/м ³	913,70	959,00
Кислотное число	6,20	9,50
Число омыления	200,00	199,00
Йодное число	74,90	155,00
Родановое число	61,50	95,70
Общее содержание жирных кислот, %	95,30	95,60
Содержание летучих жирных кислот, %	0,69	–
Неомыляемые вещества, %	3,23	1,85
Содержание каротина, мг %	35,00	3,02
Содержание витамина Е, мг %	160,00	105,00
Содержание каротиноидов, мг %	250,00	–
Содержание насыщенных кислот, %	32,80	13,38
Содержание олеиновой кислоты, %	50,60	16,35
Содержание линолевой кислоты, %	15,60	47,61
Содержание линоленовой кислоты, %	–	18,35

Как видно из табл. 4.1, масло из семян облепихи содержит линолевую и линоленовую кислоты, что подтверждает биологическую ценность этого масла.

Масло из мякоти плодов облепихи состоит преимущественно из глицеридов олеиновой кислоты.

Облепиховое масло обладает выраженным регенерирующим, иммуностимулирующим, витаминизирующим, противоатеросклеротическим, противовоспалительным действием и широко применяется в самых различных областях медицины.

Облепиховое масло используют при лечении:

- 1) в дерматологии – нарывов, трофических язв, ожогов;
- 2) в гастроэнтерологии – при язвенной болезни желудка и кишечника, атонических запорах и гипокинезии пищеварительного тракта;
- 3) в хирургии – для лучшего заживления швов после оперативных вмешательств, при труднозаживающих ранах;
- 4) в отоларингологии – при фарингитах, гайморитах, тонзиллитах и ларингитах;
- 5) в офтальмологии – для терапии травм роговицы, кератитов, конъюнктивитов, ожогов глаз;
- 6) в стоматологии – для лечения стоматитов и гингивитов.

Ингаляции с облепиховым маслом помогают при простудных заболеваниях верхних дыхательных путей, уменьшая воспаление и активизируя иммунную систему.

Физико-химические показатели прессового масла из мякоти облепихи (масла прямого отжима) представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Физико-химические показатели прессового масла из мякоти облепихи

Физико-химические показатели	Значение
Плотность при 20°C, кг/м ³	921,00
Кислотное число	4,00–10,00
Йодное число	83,00
Число омыления	195,00
Эфирное число	185,00
Родановое число	62,50
Число Рейхерта-Мейссля	1,61
Неомыляемые вещества, %	3,20
Жирные кислоты, %	77,00
Свободные жирные кислоты, %	5,05
Глицерин, %	8,40

Технологическая схема комплексной переработки плодов облепихи включает следующие стадии получения (рис. 4.6):

- масла прямого отжима;
- сока;
- масла из мякоти плодов;
- масла из семян.

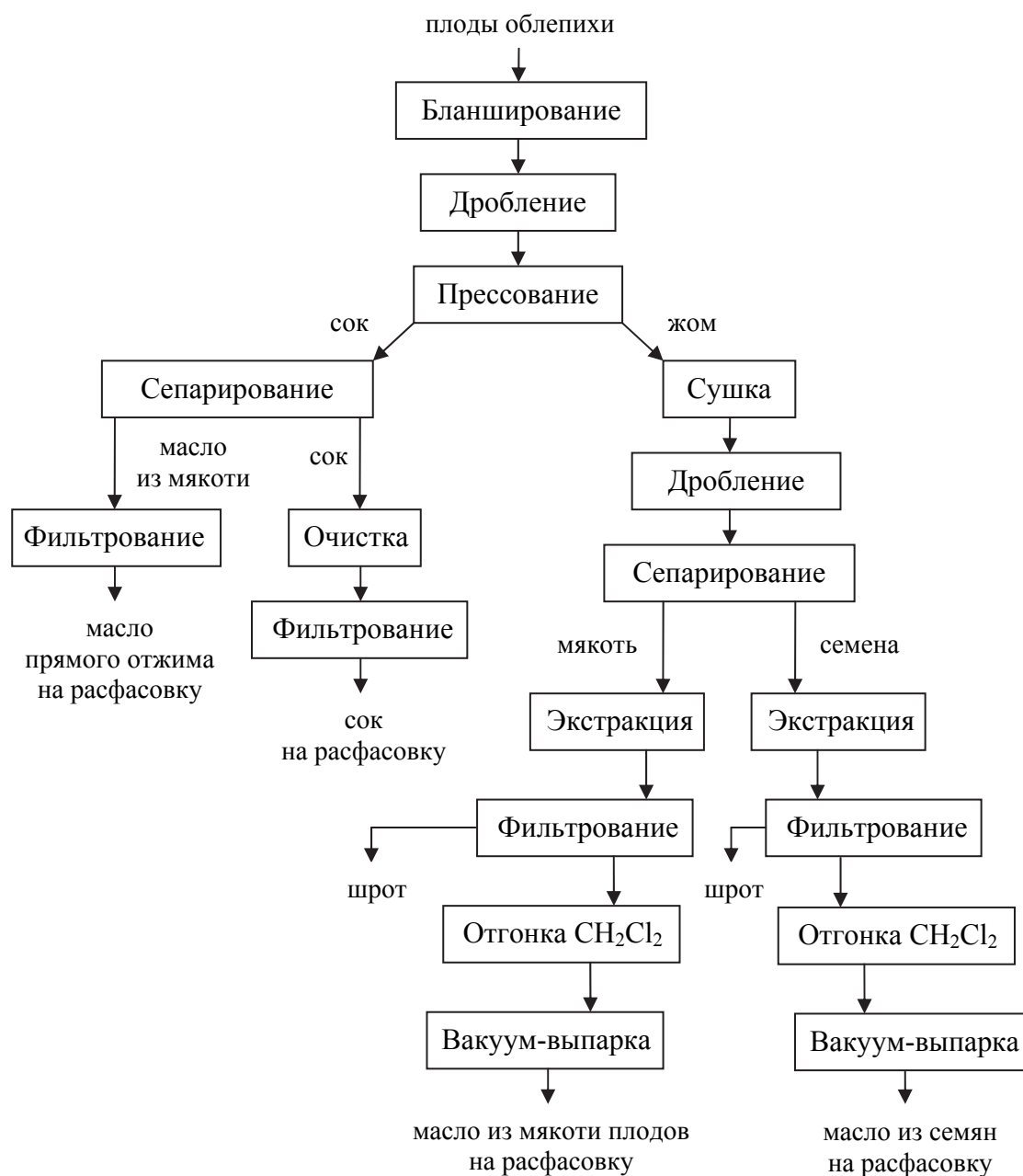


Рис. 4.6. Технологическая схема комплексной переработки плодов облепихи

Плоды (ягоды) облепихи бланшируют, подают в дробилку, а затем на пресс для отжима сока. Сок направляют в сепаратор для выделения масла. После фильтрования масло из мякоти облепихи разливают во флаконы. Сок из сепаратора подвергают очистке (обработка анионитом в количестве 5% к массе сока) и фильтрованию. Далее готовый продукт поступает на линию розлива сока. Анионит направляют на регенерацию.

Жом облепихи подается в сушилку для высушивания до содержания 90% сухих веществ. Сухой жом поступает в дробилку, а затем в сепаратор, где происходит отделение семян от высушенной мякоти.

Экстракцию масла из мякоти плодов проводят дихлорметаном при температуре около 40°C. Полученную смесь фильтруют. Осадок (шрот) отделяют, а из фильтрата отгоняют растворитель. Полученное таким образом масло направляют в вакуум-аппарат для отгонки в среде углекислоты остатков дихлорметана при добавлении небольшого количества воды (при пониженном давлении – 650–700 мм.рт.ст.) и далее на расфасовку.

Масло из семян облепихи получают аналогичным образом.

Остаточное количество растворителя из шрота мякоти плодов и семян удаляют под вакуумом. Шрот сушат и направляют на расфасовку.

Шрот – ценный источник биологически активных веществ – представляет собой коричнево-желтоватый порошок, жирный на ощупь, с характерным запахом облепихи. Применяется в пищевой промышленности в качестве добавки в кондитерские и хлебобулочные изделия, а также в животноводстве, особенно в птицеводстве, в качестве витаминизированной добавки к корму.

4.2.3. Получение рыбьего жира

Рыбий (медицинский) жир – прозрачная маслянистая жидкость светло-желтого цвета со слабым специфическим запахом и вкусом.

Химический состав рыбьего жира:

– олеиновая кислота (около 70%), способствующая снижению содержания холестерина и сахара в крови, а также снижающая риск развития онкологических заболеваний молочной железы;

– пальмитиновая кислота (не менее 25%), определяющая противовоспалительное действие рыбьего жира;

– жирные полиненасыщенные кислоты из группы омега-3 (линолевая, арахидоновая) и омега-6 (эйкозапентаеновая, докозагексаеновая) (около 5%), которые обуславливают главную биологическую ценность рыбьего жира и наиболее благотворно влияют на функциональное состояние сердца и кровеносных сосудов, головного мозга и опорно-двигательного аппарата, а также способствуют улучшению жирового обмена, повышают эффективность усвоения организмом кальция и магния, улучшают работу эндокринной, пищеварительной и репродуктивной систем.

В незначительном количестве в составе рыбьего жира присутствуют уксусная, стеариновая, валериановая, масляная, каприновая кислоты, а также холестерин. Обнаруживаются следовые количества брома, йода и серы.

Рыбий жир очень богат витаминами D, A и E.

Витамин D оказывает иммуномодулирующее действие и необходим для эффективного усвоения участвующих в формировании костной ткани кальция и фосфора (именно поэтому дефицит в организме витамина D часто приводит к развитию рахита и остеомалации костей у детей и остеопорозу у взрослых).

Витамин A оказывает противовоспалительное и выраженное ранозаживляющее действие, благотворно влияет на состояние кожи и слизистых оболочек, стимулирует естественный синтез коллагена и кератина, необходим для полноценного формирования костей и зубной эмали, а также играет важную роль в функционировании зрительного аппарата.

Витамин E участвует в процессе эмбриогенеза, необходим для полноценной работы репродуктивной системы и органов зрения, способствует повышению работоспособности и физической выносливости, предупреждает развитие анемии, рассеянного склероза и болезни Альцгеймера.

Технологическая схема получения рыбьего жира представлена на рис. 4.7. Медицинский рыбий жир получают только из печени свежей трески, пробывшей в садке не более суток.

Печень тщательно промывают и измельчают. Выделение жира из печени осуществляют в водной среде при нагревании (вытапливание). При этом водная среда предохраняет жир от перегрева (температура должна быть не выше 100°C) и обеспечивает его промывку, а образующийся пар создает паровое пространство между поверхностью жира и крышкой котла, что предотвращает окисление жира кислородом воздуха.

Вытопленный жир фильтруют. Граксу (отход, содержащий 55–70% влаги, 10–30% жира и 7–14% белка) удаляют. Жир-полуфабрикат нагревают до температуры 85–95°C и подают в сепаратор вместе с горячей водой для отделения примесей и белковых веществ.

Далее жир подвергают щелочной рафинации.

Химизм процесса заключается в нейтрализации свободных жирных кислот жира водным раствором NaOH.

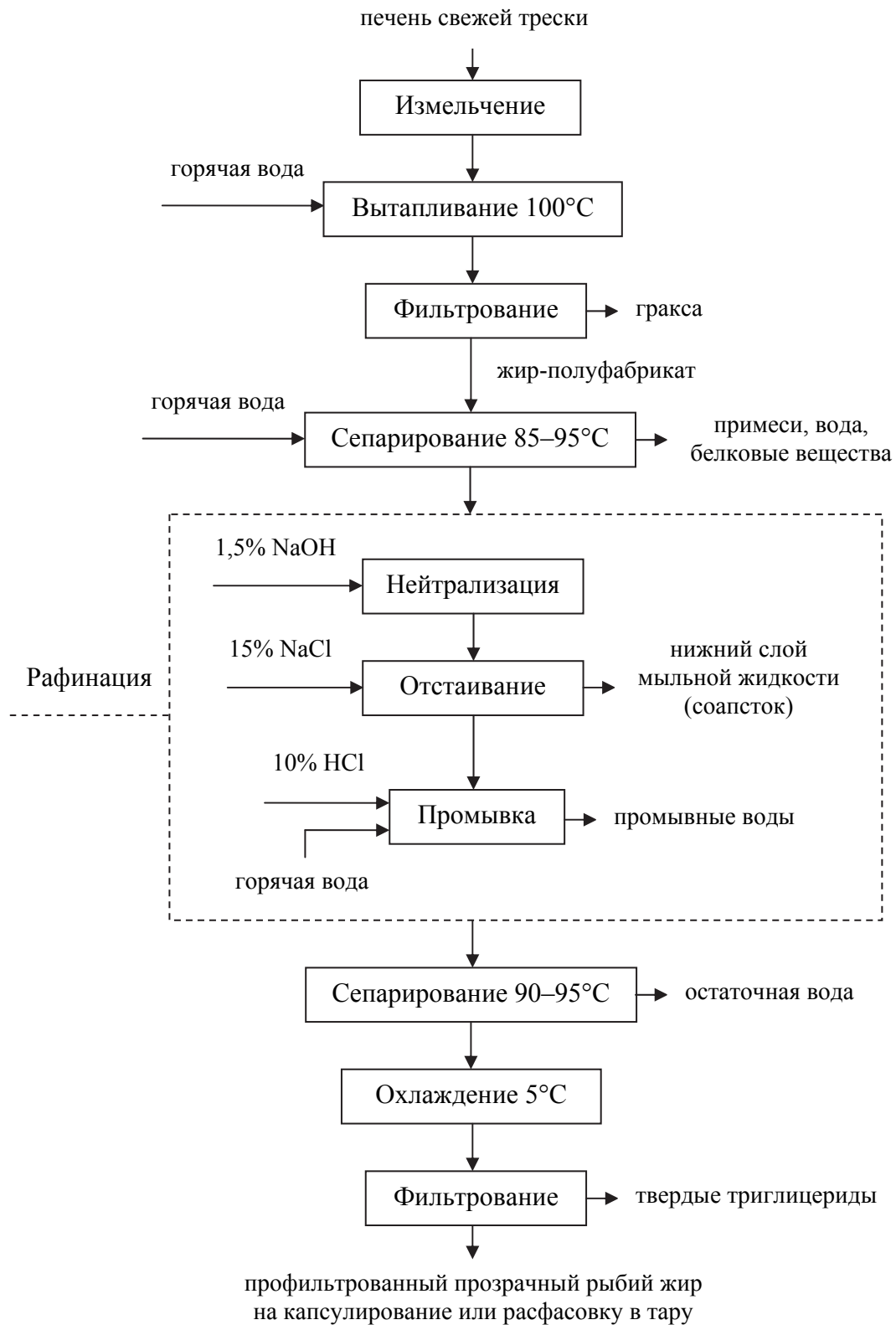


Рис. 4.7. Технологическая схема получения рыбьего (медицинского) жира

Нагретый до температуры 80–90°C раствор щелочи постепенно при перемешивании вводят в подогретый жир и доводят температуру массы до 90–92°C. После введения всей щелочи перемешивание продолжают в течение 20–45 мин. Затем смесь отстаивают. Для ускорения отстаивания по поверхности нейтрализованного жира разбрызгивают раствор поваренной соли. Отстоявшийся мыльный осадок (соапсток) отводят. Для освобождения нейтрализованного жира от остатков мыла и щелочи его промывают 2–3 раза горячим 10% раствором соляной кислоты, а затем не менее 3 раз – горячей водой.

Промытый жир нагревают до 90–95°C и пропускают через сепаратор, после чего производят очистку жира от твердых триглицеридов. Этот процесс включает операции охлаждения до 5°C и фильтрацию. Профильтрованный прозрачный жир направляют на капсулирование или расфасовку в тару.

ТЕМА 5 СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ

5.1. Структура и функции витаминов

Витамины – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, необходимые в небольших количествах для нормальной жизнедеятельности организма.

Классификация витаминов представлена на рис. 5.1.

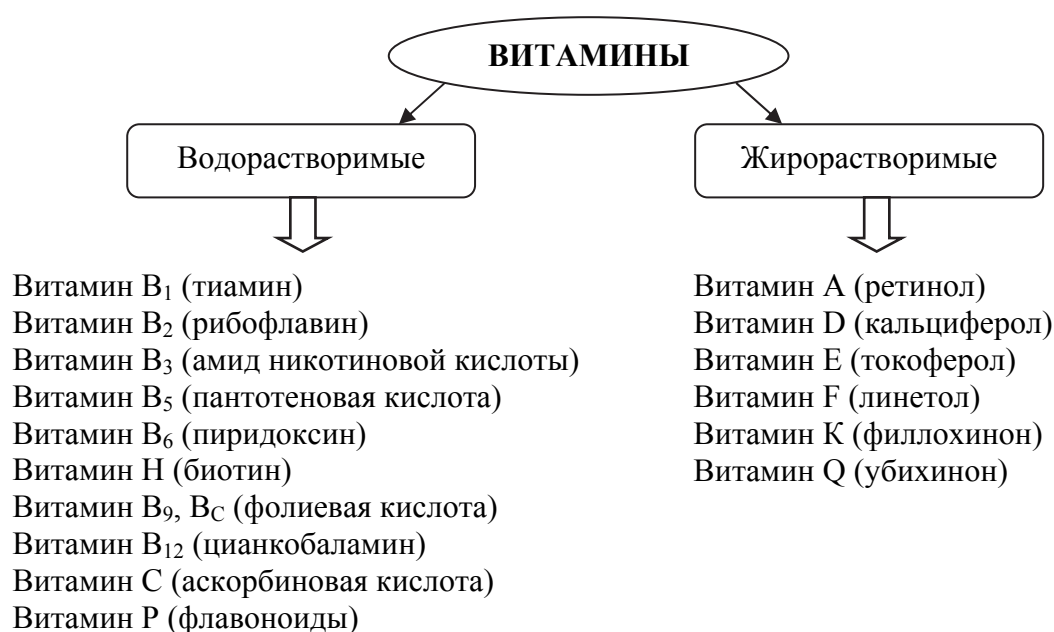


Рис. 5.1. Классификация витаминов

Большинство витаминов не синтезируются в организме человека, поэтому они должны регулярно и в достаточном количестве поступать в организм с пищей. Исключения составляют витамин D, который образуется в коже человека под действием ультрафиолетового света, витамин А, который может синтезироваться из предшественников, поступающих в организм с пищей, и витамин В₃, предшественником которого является аминокислота триптофан. Кроме того, витамин В₆ синтезируется в достаточном количестве бактериальной микрофлорой толстого кишечника человека.

Специфическая функция водорастворимых витаминов (кроме витамина С) в организме – образование коферментов и простетических групп ферментов. Так, тиамин в форме тиаминдифосфата – кофер-

мент пируватдегидрогеназы, кетоглутаратдегидрогеназы, транскетолазы и других ферментов; витамин В₆ – предшественник пиридоксальфосфата (кофермента трансаминаз и других ферментов азотистого обмена).

В виде коферментов витамины принимают участие во многих важнейших процессах обмена веществ: энергетическом обмене (витамины В₁, В₂ и В₃), биосинтезе и превращениях аминокислот (витамины В₆ и В₁₂), жирных кислот (витамин В₅) и др.

Некоторые жирорастворимые витамины также выполняют коферментные функции. Так, витамин А в форме ретиналя – протетическая группа зрительного белка родопсина, витамин К осуществляет коферментную функцию в реакции карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в молекуле препротромбина и ряда других белков, что придает им способность связывать ионы Са²⁺.

Кроме того, витамин Е стабилизирует и защищает ненасыщенные липиды биологических мембран от окисления; витамин D необходим для осуществления транспорта ионов Са²⁺ и остатков фосфорной кислоты через клеточные барьеры в процессах их всасывания в кишечнике, реабсорбции в почках и мобилизации из скелета.

В зависимости от степени обеспеченности организма тем или иным витамином различают несколько форм патологических состояний: *авитаминоз* (отсутствие витамина), *гиповитаминоз* (недостаток витамина) и *гипервитаминоз* (избыток витамина).

5.2. Технологии получения витаминов

5.2.1. Получение витамина В₂

Витамин В₂ (рибофлавин) – водорастворимый витамин. Рибофлавин является производным гетероциклического соединения изоаллоксазина, связанного с многоатомным спиртом рибитом (рис. 5.2).

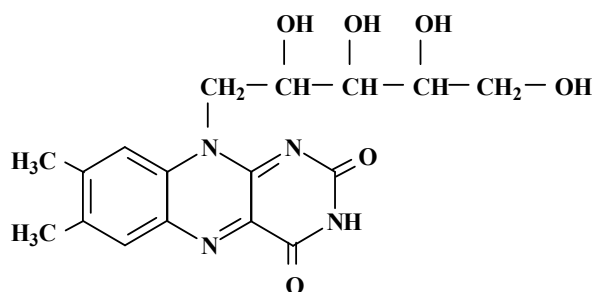


Рис. 5.2. Структурная формула витамина В₂

Продукты с наибольшим содержанием витамина В₂ (мг/100 г): печень (2,60), почки (1,8), сердце (0,75), миндаль (0,65), сыры (0,32–0,50), овсяная крупа (0,49), яйца (0,44), грибы (0,30–0,45), хлеб (0,25), говядина (0,23), соя (0,22).

Суточная потребность в витамине В₂ составляет 1,3–2,4 мг.

Лекарственные средства, содержащие рибофлавин, применяют при кожных заболеваниях, вяло заживающих ранах, заболеваниях глаз, нарушении функции желудочно-кишечного тракта, диабете, анемиях, циррозе печени.

Химический синтез витамина В₂ основан на конденсации 3,4-диметиланилина (1) с *D*-рибозой (2) (рис. 5.3).

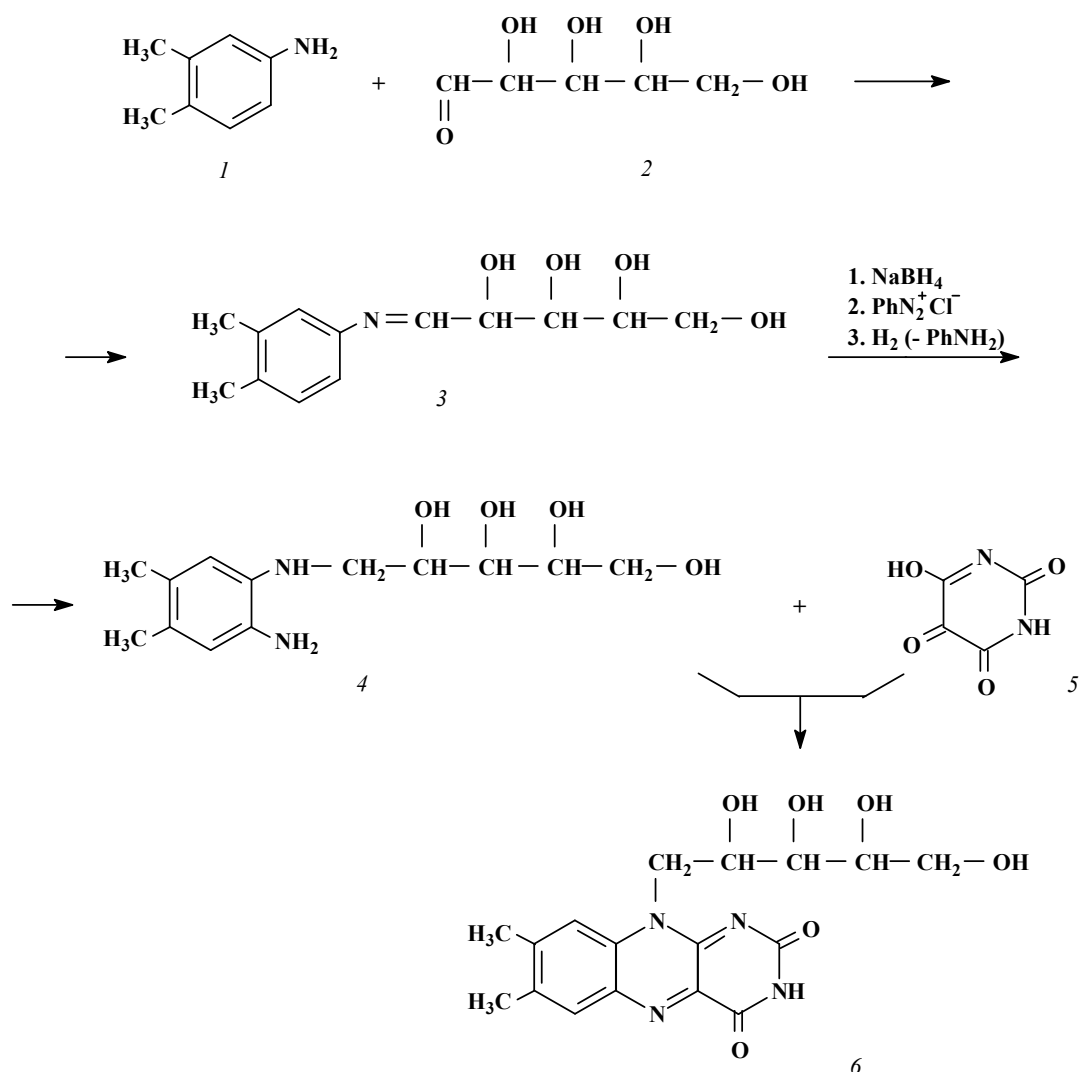


Рис. 5.3. Химический синтез витамина В₂:
1 – 3,4-диметиланилин; 2 – *D*-рибоза; 3 – имин;
4 – арилрибамина; 5 – аллоксан; 6 – рибофлавин

Образующийся имин (3) восстанавливают, вводят в реакцию азосочетания и после восстановления азогруппы получают арилриба-мин (4). Последний конденсируют с аллоксаном (5), что приводит к образованию рибофлавина (6).

Схема **микробиологического синтеза** рибофлавина для медицин-ских целей представлена на рис. 5.4.

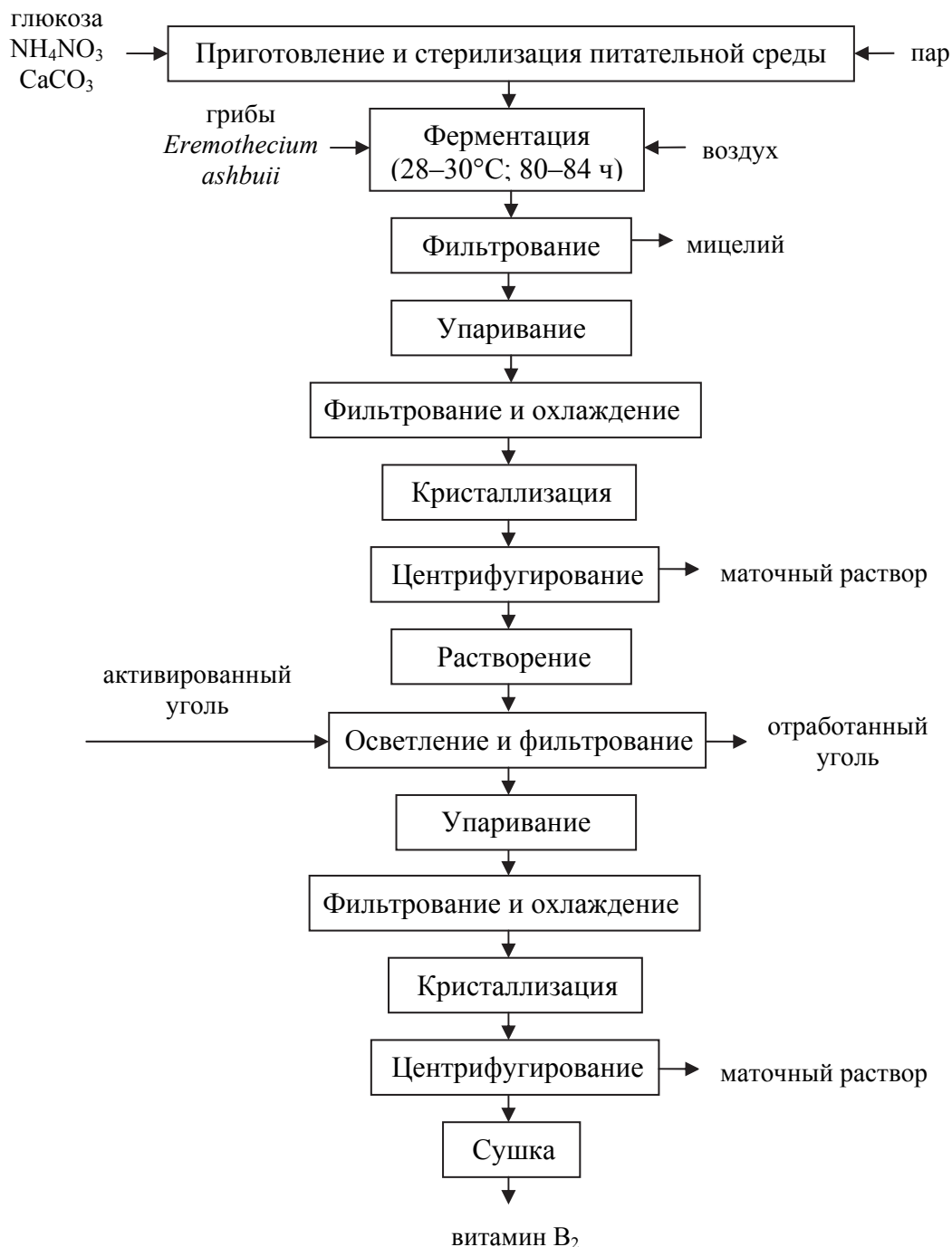


Рис. 5.4. Схема микробиологического синтеза рибофлавина

5.2.2. Получение витамина С

Витамин С (аскорбиновая кислота) – водорастворимый витамин, антиоксидант, противораковый витамин.

Впервые выделен в 1923 г. из лимонного сока.

Структурная формула аскорбиновой кислоты представлена на рис. 5.5.

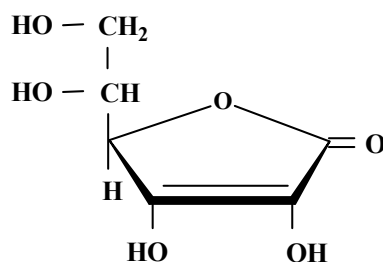


Рис. 5.5. Структурная формула аскорбиновой кислоты

Продукты с наибольшим содержанием витамина С (мг/100 г): шиповник свежий (650), перец красный сладкий (250), смородина черная (200), облепиха (200), перец зеленый сладкий (150), петрушка (150), укроп (100), капуста цветная (70), капуста белокочанная и краснокочанная (60), апельсины (60), земляника (60).

Суточная потребность в витамине С составляет 70–100 мг.

Аскорбиновая кислота участвует в регулировании окислительно-восстановительных процессов и обмена веществ, повышает сопротивляемость организма к инфекциям, нормализует проницаемость сосудов, оказывает детоксицирующее действие.

Химико-ферментативный синтез аскорбиновой кислоты основан на превращении *D*-глюкозы (1), которую на первой стадии восстанавливают каталитически (над никелем Ренеля) до *D*-сорбита (2). Шестиатомный спирт окисляют ферментативно, используя бактерии *Acetobacter suboxydans*, в *L*-сорбозу (3). После диизопропилиденовой защиты двух пар *цис*-расположенных гидроксильных групп в α -*L*-сорбофуранозе (4) проводят окисление 2,3,4,6-диизопропилиден-*L*-сорбозы (5) перманганатом калия и после снятия защиты получают смесь таутомеров. Затем 2-оксо-*L*-гулоновую кислоту (6) превращают путем кислотно-катализируемой циклодегидратации и енолизации через *L*-гулонолактон (7) в *L*-аскорбиновую кислоту (8) (рис. 5.6). Далее сырой продукт выделяют, очищают активированным углем и перекристаллизовывают из воды.

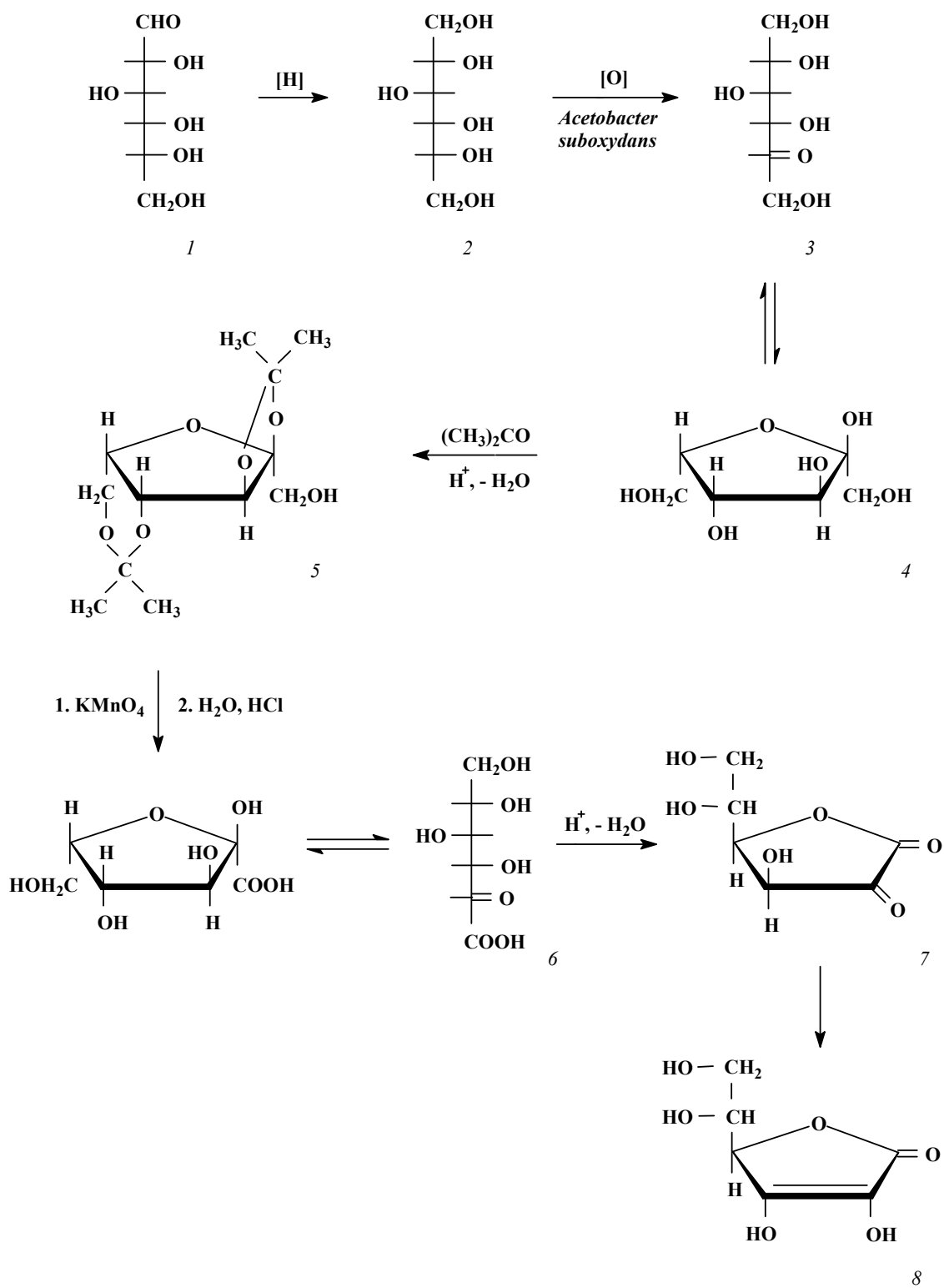


Рис. 5.6. Химико-ферментативный синтез аскорбиновой кислоты:
 1 – D-глюкоза; 2 – D-сорбит; 3 – L-сорбоза; 4 – α-L-сорбофураноза;
 5 – 2,3,4,6-диизопропилиден-L-сорбоза; 6 – 2-оксо-L-гулоновая кислота;
 7 – L-гулонолактон; 8 – L-аскорбиновая кислота

5.2.3. Получение витамина А (ретинол)

Витамин А – группа жирорастворимых соединений, самыми важными из которых являются (рис. 5.7):

- ретинол (истинный витамин А, витамин А-спирт, витамин А₁);
- ретиналь (ретилен, альдегид витамина А₁);
- ретиноевая кислота (кислота витамина А₁);
- дегидроретинол (витамин А₂).

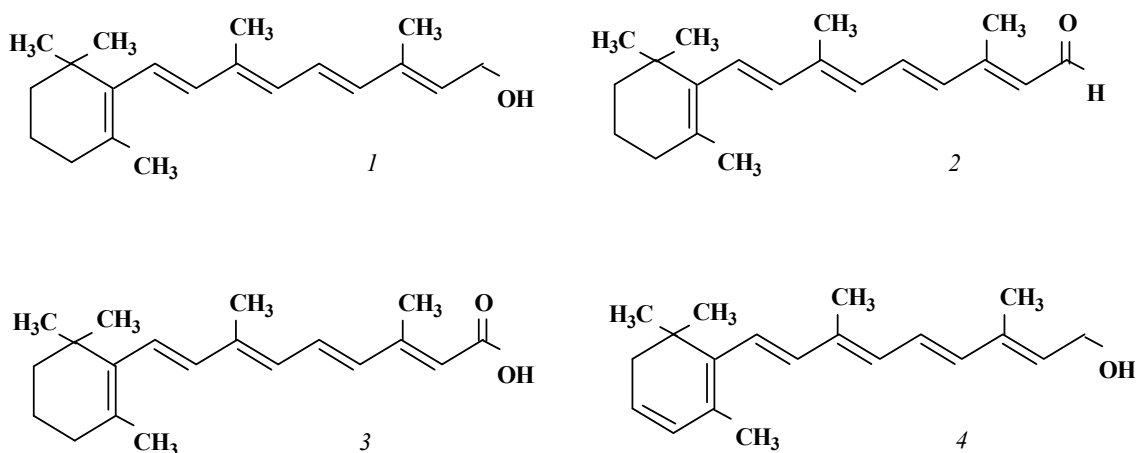


Рис. 5.7. Структурные формулы соединений группы витамина А:

- 1 – ретинол;
- 2 – ретиналь;
- 3 – ретиноевая кислота;
- 4 – дегидроретинол

Ретинол является структурным компонентом клеточных мембран, обеспечивает антиоксидантную защиту организма, ретиналь выполняет ключевую зрительную функцию, в форме ретиноевой кислоты витамин А стимулирует рост и развитие организма.

Ретинол присутствует только в продуктах животного происхождения, таких как рыбий жир из печени трески (25,0–30,0 мг/100 г), печень индейки (21,7), печень куриная (12,1), печень домашней утки (11,2), печень гусиная (9,3), печень говяжья (8,2), печень свиная (6,5), куриное мясо (4,3), масло сливочное (0,68).

В растительной пище витамин А находится в форме предшественников (провитаминов) – каротиноидов, которые расщепляются в организме, превращаясь в активный витамин (из 1 моля каротина в организме образуется 2 моля витамина А).

Самый известный провитамин А – **β -каротин** (рис. 5.8).

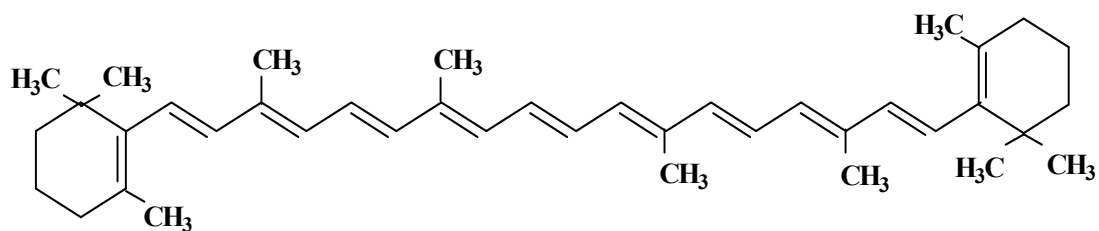


Рис. 5.8. Структурная формула β-каротина

Продукты с наибольшим содержанием β-каротина (мг/100г): морковь (12000), рябина красная (9000), петрушка (5700), укроп зелень (4500), щавель (2500), курага (3500), шиповник (2600), сладкий перец (1500).

Суточная потребность в витамине А составляет 0,9 мг, в β-каротине – 5 мг.

Лекарственные средства, содержащие витамин А (ретинола ацетат, ретинола пальмитат), применяют при различных заболеваниях глаз (пигментный ретинит, ксерофтальмия, экземазные поражения век, конъюнктивиты), кожи (ожоги, раны, пиодермия, ихтиоз, некоторые формы экземы), инфекционных заболеваниях (корь, дизентерия, трахеит, бронхит, пневмония), комплексной терапии рахита, гипотрофии, острых респираторных заболеваний, воспалительных и эрозивно-язвенных поражений кишечника, хронических гастритов, цирроза печени.

Химический синтез витамина А-ацетата представлен на рис. 5.9. При конденсации цитраля (1) и ацетона в присутствии щелочи получается псевдоионон (2), который под действием H_2SO_4 (конц.) циклизуется с изомеризацией в β-ионон (3).

Последний, взаимодействуя с хлоруксусным эфиром в присутствии метилата натрия, превращается в глицидный эфир (4), который после омыления и декарбоксилирования дает альдегид C_{14} (5).

Соединение (5) конденсируют с первичным ацетиленовым карбинолом по реакции Гриньяра с образованием ацетиленового гликоля C_{20} (6), который гидрируют в присутствии частично дезактивированного палладиевого катализатора. При этом гидрируется только ацетиленовая связь до этиленовой, другие непредельные связи в молекуле не затрагиваются.

Гликоль C_{20} (7) далее частично ацетилируют в присутствии пиридина и образующийся гликоль-моноацетат (8) дегидратируют хлоркислотой фосфора также в присутствии пиридина с образованием витамина А-ацетата (9).

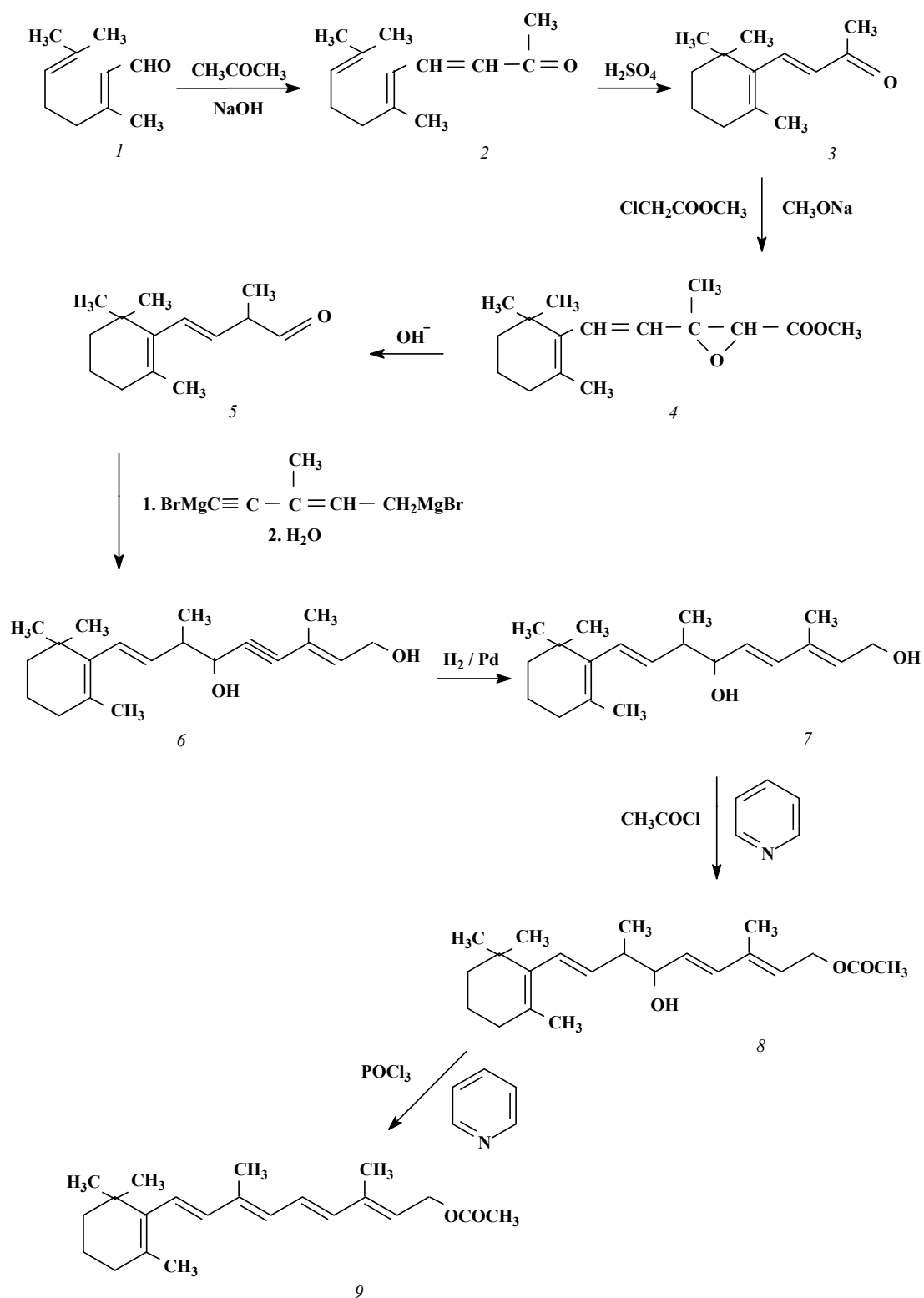


Рис. 5.9. Химический синтез витамина А-ацетата:
 1 – цитраль; 2 – псевдоионон; 3 – β -ионон; 4 – глицидный эфир; 5 – альдегид C_{14} ;
 6 – ацетиленовый гликоль C_{20} ; 7 – гликоль C_{20} ; 8 – гликольмоноацетат;
 9 – витамин А-ацетат

5.2.4. Получение витамина E

Витамин E – группа жирорастворимых соединений– токоферолов и токотриенолов.

Наибольшую биологическую активность проявляет α -токоферол, структурная формула которого представлена на рис. 5.10.

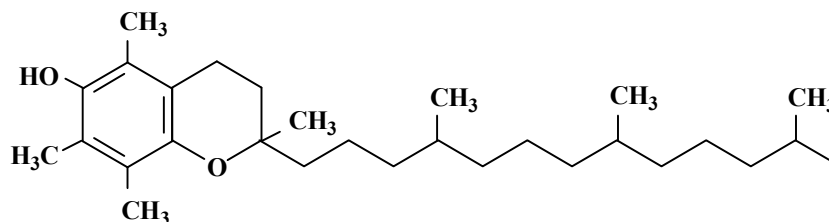


Рис. 5.10. Структурная формула α -токоферола

Продукты с наибольшим содержанием витамина E (мг/100 г): соевое масло (114), кукурузное масло (93), подсолнечное масло (56), миндаль (24,6), фундук (20,4), соя (17,3), оливковое масло (13), кукуруза (5,5), курага (5,5), фасоль (3,84), креветки (2,27), яйца (2,0).

Суточная потребность в витамине E составляет 10–25 мг.

Витамин E, являясь мощным антиоксидантом, замедляет процессы старения в организме, а также улучшает репродуктивную функцию. Кроме того, α -токоферол необходим для нормального функционирования иммунной системы, улучшает питание клеток, благоприятно влияет на периферическое кровообращение, предотвращает образование тромбов и укрепляет стенки сосудов, необходим для регенерации тканей, снижая возможность образования шрамов, обеспечивает нормальную свертываемость крови, снижает кровяное давление, предотвращает анемию, облегчает болезнь Альцгеймера и диабет.

В качестве лекарственного средства применяют α -токоферилацетат, **химический синтез** которого представлен на рис. 5.11. При метилировании м-крезола (1) образуется 2,3,6-триметилфенол (2), который окисляют до 2,3,5-триметилхинона (3). Восстановление соединения (3) дает 2,3,5-триметилгидрохинон (4). Конденсация соединения (4) с изофитолом (5) в присутствии катализатора $ZnCl_2$ приводит к образованию α -токоферола (6), который в дальнейшем ацетилируют уксусным ангидридом в α -токоферилацетат (7).

Фармакопейный α -токоферилацетат получают фракционной вакуумной перегонкой технического продукта. Отбирают фракцию, кипящую при температуре 205–208°C и остаточном давлении 0,3 мм.рт.ст.

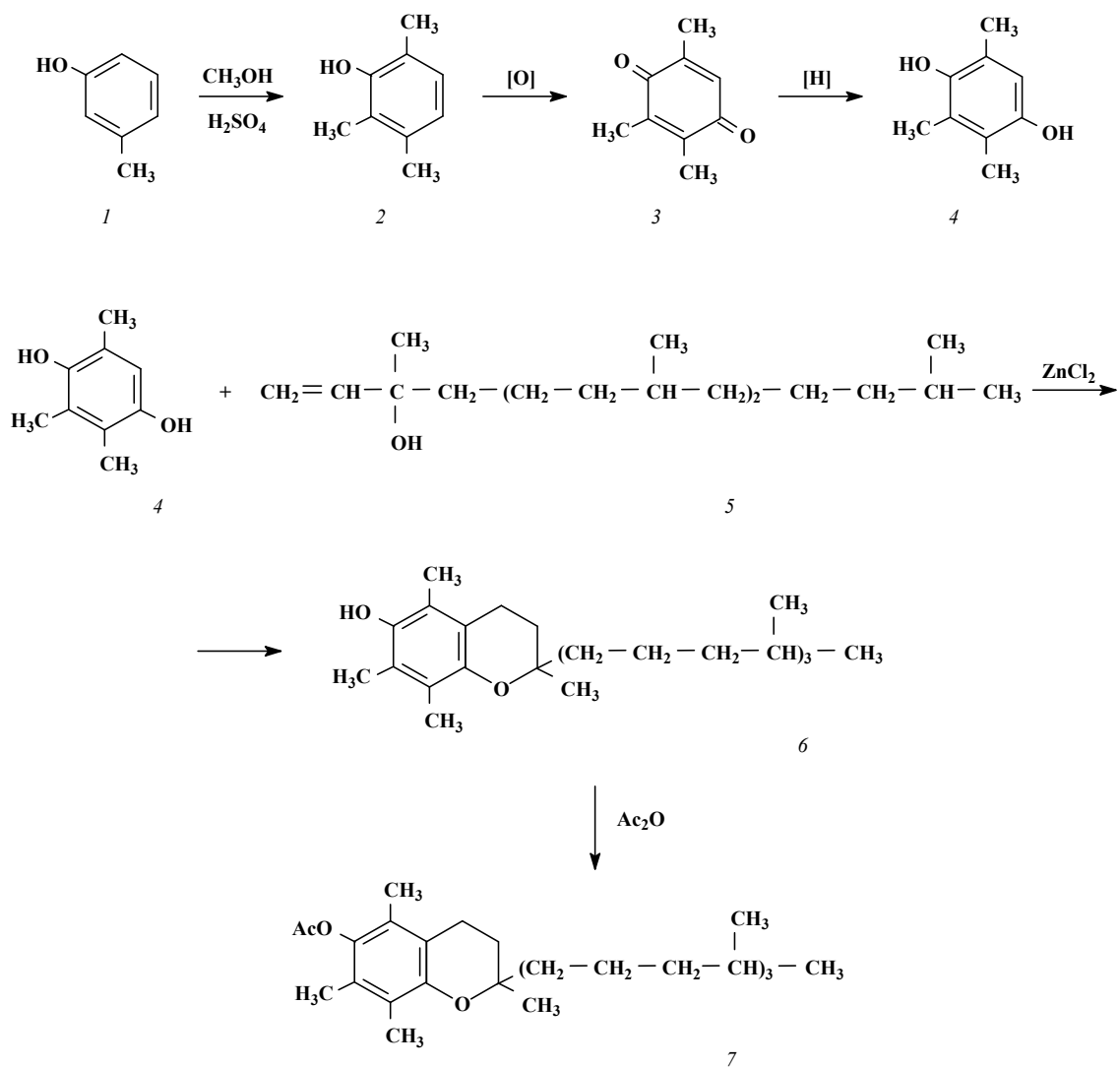


Рис. 5.11. Химический синтез α -токоферилацетата:
 1 – м-крезол; 2 – 2,3,6-триметилфенол; 3 – 2,3,5-триметилхинон;
 4 – 2,3,5-триметилгидрохинон; 5 – изофитол; 6 – α -токоферол;
 7 – α -токоферилацетат

ТЕМА 6 СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СТЕРОИДОВ

6.1. Структура и функции стероидов

Стероиды – широкий класс соединений, являющихся производными конденсированного карбоциклического углеводорода стерана (циклопентанпергидрофенантрена).

Общая структурная формула стероидов представлена на рис. 6.1.

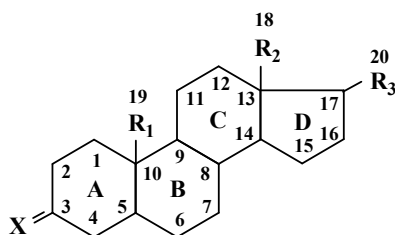


Рис. 6.1. Общая структурная формула стероидов:
А, В и С – циклогесановые кольца; D – циклопентановое кольцо;
R₁, R₂ и R₃ – углеродсодержащие заместители;
X – гидроксильная или кетонная группа

У некоторых представителей класса стероидов R₁ может отсутствовать, а R₃ – быть гидроксильной или кетонной группой.

Классификация стероидов представлена на рис. 6.2.

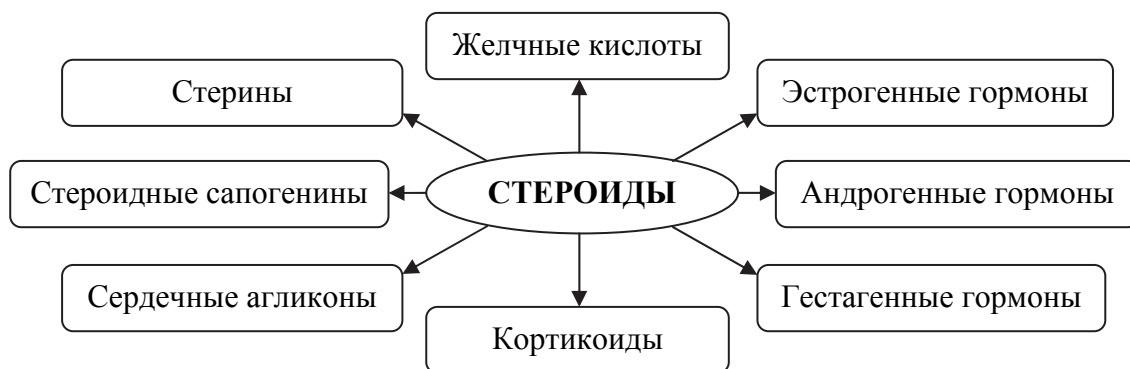


Рис. 6.2. Классификация стероидов

Стерины отличаются наличием β-гидроксильной группы в положении C₃, имеют две ангулярные метильные группы (R₁ и R₂), боковую алифатическую цепь, содержащую 8, 9 или 10 углеродных атомов, и часто одну или несколько двойных связей.

Наиболее важным стеринном является холестерин, содержащийся во всех тканях животного организма. Особенно много холестерина в центральной и периферической нервных системах, почках. Среди других стериннов следует отметить ситостерин, имеющий растительное происхождение (соевое масло, зародыши пшеницы), а также выделенный из дрожжей эргостерин (рис. 6.3).

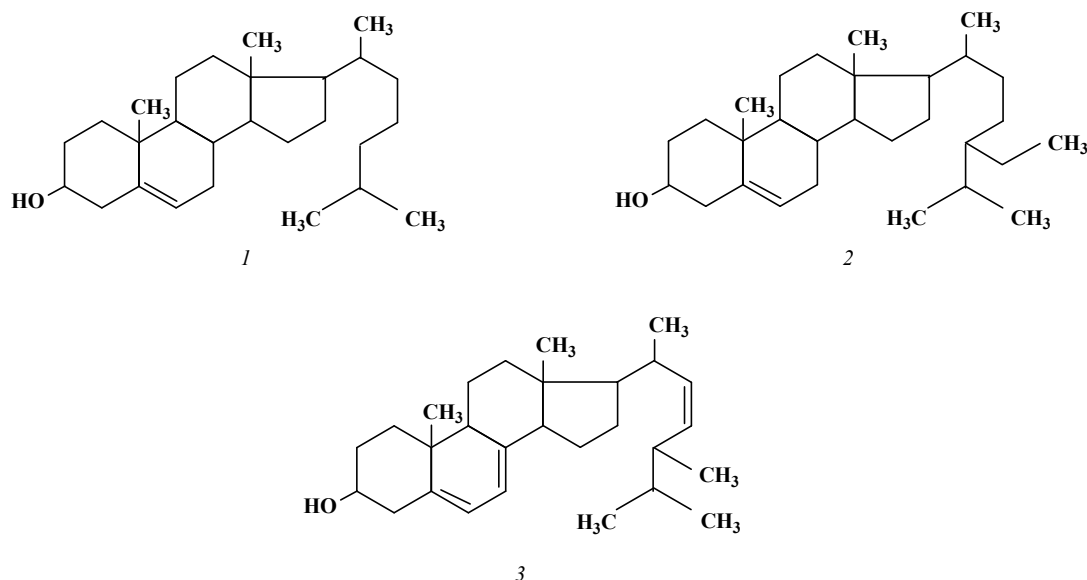


Рис. 6.3. Структурные формулы стериннов:
1 – холестерин; 2 – ситостерин; 3 – эргостерин

Стерины – биосинтетические предшественники многих стероидных биорегуляторов, основные структурные компоненты клеточных мембран.

Желчные кислоты отличаются цис-сочетанием колец А и В, имеют 3 α -ОН-группу, большинство – боковую цепь из пяти углеродных атомов с карбоксильной группой на конце и иногда дополнительные гидроксильные или кетогруппы в положениях C₆, C₇ и C₁₂.

Важнейшей желчной кислотой является холевая (3 α ,7 α ,12 α -триоксихолановая кислота), находящаяся в желчи в виде амидов глицина и таурина. Близкая к ней по строению дезоксихолевая кислота также содержится в желчи (в количествах, в четыре раза меньших по сравнению с холевой кислотой) (рис. 6.4).

Желчные кислоты играют первостепенную роль в усвоении питательных веществ организмом. Они переводят в растворимое состояние жиры и другие нерастворимые гидрофобные соединения и делают возможным абсорбцию липоидов слизистыми стенками кишечника.

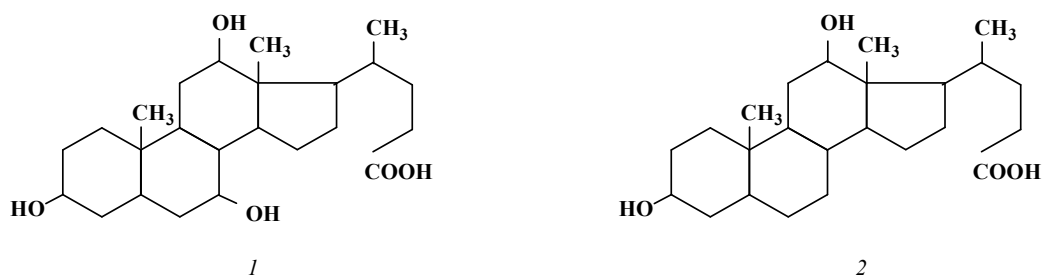


Рис. 6.4. Структурные формулы желчных кислот:
1 – холевая кислота; 2 – дезоксихолевая кислота

Эстрогенные гормоны отличаются отсутствием 19-ангулярной метильной группы, наличием ароматического кольца А, 3-ОН-группы и окси- или кетогруппы в положении С₁₇.

Структурные формулы эстрогенных гормонов представлены на рис. 6.5.

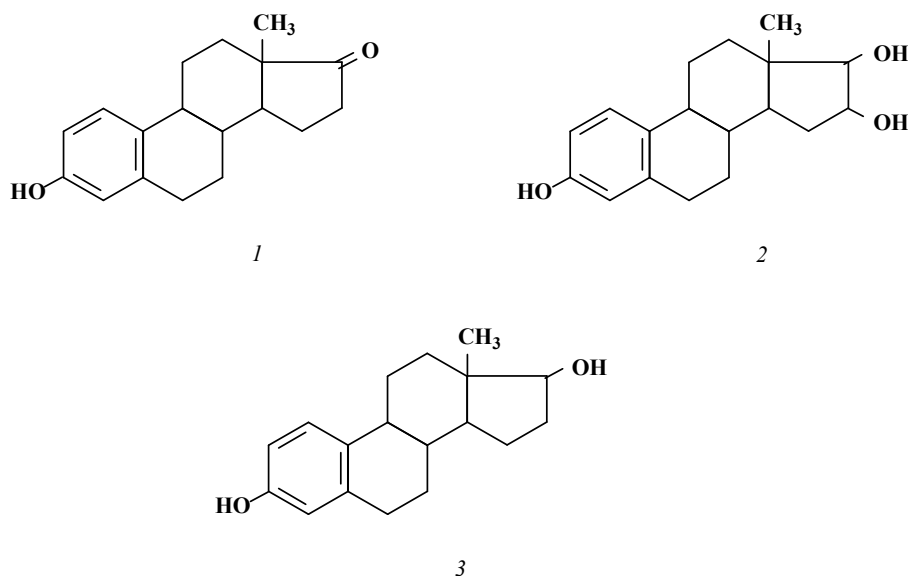


Рис. 6.5. Структурные формулы эстрогенных гормонов:
1 – эстрон; 2 – эстриол; 3 – эстрадиол

Эстрон, эстриол и эстрадиол являются женскими половыми гормонами, необходимыми для нормального развития и функционирования половых органов, развития вторичных половых признаков и продолжения жизни.

Андрогенные гормоны. Для них характерно наличие гидроксильной или кетонной групп в положениях С₃ и С₁₇.

Структурные формулы андрогенных гормонов представлены на рис. 6.6.

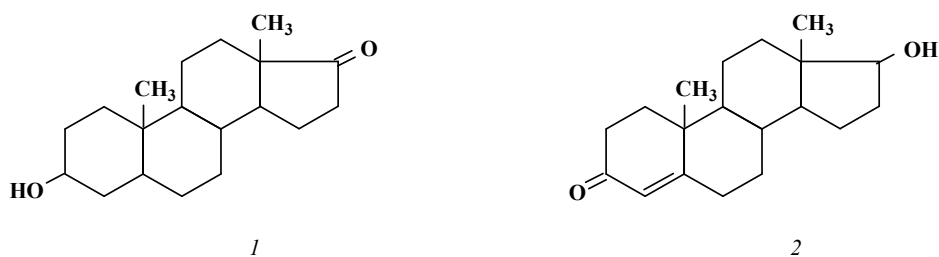


Рис. 6.6. Структурные формулы андрогенных гормонов:
1 – андростерон; 2 – тестостерон

Андростерон и тестостерон обеспечивают нормальное развитие мужских половых органов и вторичных половых признаков.

Гестагенные гормоны. К ним относится прогестерон, необходимый для зачатия и нормального протекания беременности.

Структурная формула прогестерона представлена на рис. 6.7.

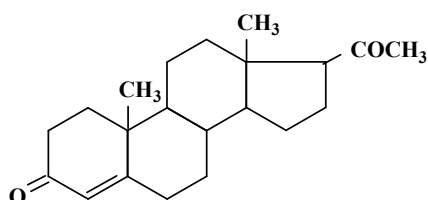


Рис. 6.7. Структурная формула прогестерона

Гормоны коры надпочечников (кортикоиды). Для этих соединений характерно прежде всего наличие Δ^4 -3-кетонной группировки и оксиацетонной или диоксиацетонной цепи в положении C_{17} . Некоторые из них (наиболее активные) имеют 11-ОН- или кетогруппу.

По физиологическому действию кортикоидные гормоны подразделяют на глюкокортикоиды (кортикостерон, кортизон и др.) и минералокортикоиды (дезоксикортикостерон и др.). Первые участвуют в регуляции углеводного обмена, вторые – в регуляции водного и ионного обмена.

Структурная формула дезоксикортикостерона представлена на рис. 6.8.

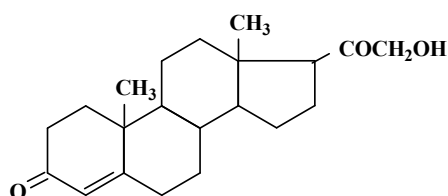


Рис. 6.8. Структурная формула дезоксикортикостерона

Структурные формулы глюкокортикоидов представлены на рис. 6.9.

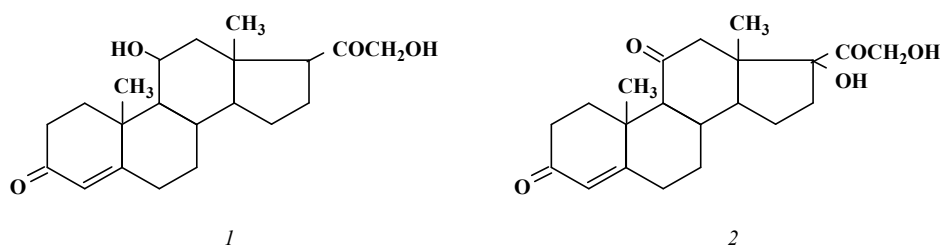


Рис. 6.9. Структурные формулы глюкокортикоидов:
1 – кортикостерон; 2 – кортизон

Стероидные сапогенины имеют 3-ОН-группу, кислородную функцию в положении C_{16} и иногда в положениях C_1 , C_2 и C_{12} . Большинство из них обладает спирокетальной группировкой за счет окисленной боковой цепи из восьми углеродных атомов и 16-ОН-группы.

Структурные формулы стероидных сапогенинов представлены на рис. 6.10.

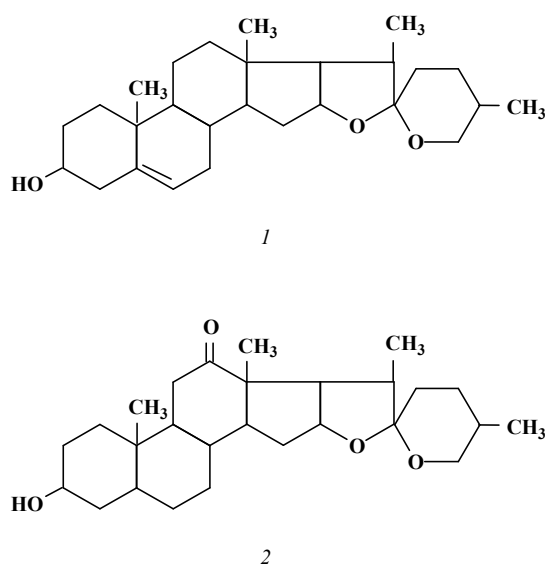


Рис. 6.10. Структурные формулы стероидных сапогенинов:
1 – диосгенин; 2 – гекогенин

Диосгенин и гекогенин являются важными исходными соединениями для промышленного синтеза стероидных гормонов.

Сердечные агликоны (генины) содержат 3-ОН- и 14-ОН-группы. У многих генинов имеется также 5-ОН-группа и кислородсодержащий заместитель при C_{10} . В отличие от прочих стероидов кольца C и D

в генинах всегда сочленены в цис-положении. У некоторых представителей имеются гидроксильные группы в положениях C₁₁ и C₁₆. Характерным для всех генинов является наличие в положении C₁₇ непредельного γ-лактонного кольца.

Структурные формулы сердечных агликонов представлены на рис. 6.11.

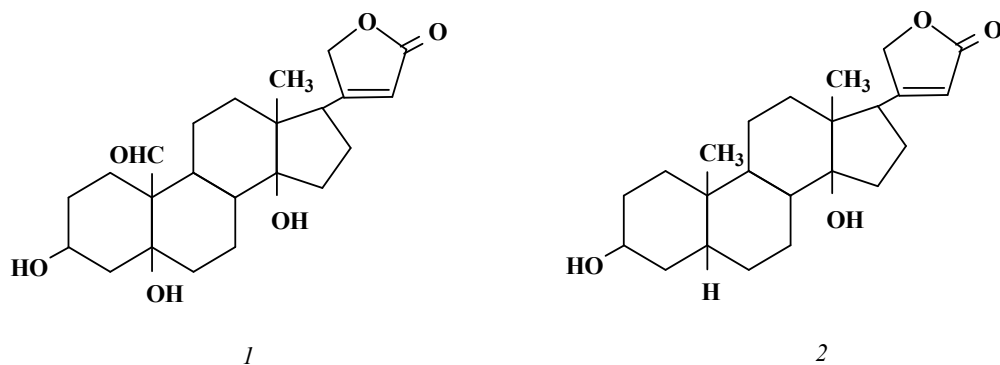


Рис. 6.11. Структурные формулы сердечных агликонов:
1 – строфантин; 2 – дигитоксигенин

Сердечные агликоны встречаются в виде гликозидов в некоторых растениях. Эти гликозиды оказывают стимулирующее действие на сердечную мышцу.

6.2. Технологии получения стероидов

6.2.1. Получение преднизолона

Преднизолон – глюкокортикоидное лекарственное средство, синтетический аналог выделяемых корой надпочечника гормонов – кортизона и гидрокортизона.

Преднизолон в 4–5 раз более активен по сравнению с кортизоном и в 3–4 раза по сравнению с гидрокортизоном при применении внутрь. В отличие от кортизона и гидрокортизона преднизолон не вызывает заметной задержки натрия и воды и лишь незначительно повышает выделение калия.

Преднизолон оказывает выраженное противовоспалительное, антиаллергическое, антиэкссудативное, противошоковое, антитоксическое действие.

Преднизолон применяют при ревматизме, полиартрите, бронхиальной астме, нейродермитах, экземе.

Химический синтез преднизолона осуществляют исходя из 21-ацетокси-11 β ,17 α -дигидрокси-5 α -прегнан-3,20-диона (1), который подвергают бромированию молекулярным бромом в уксусной кислоте в положения C₂ и C₄. Полученный дибромид (2) дегидробромируют нагреванием в коллидине, и затем, не выделяя промежуточного продукта, проводят щелочной гидролиз в присутствии КНСО₃ с образованием преднизолона (3) (рис. 6.12).

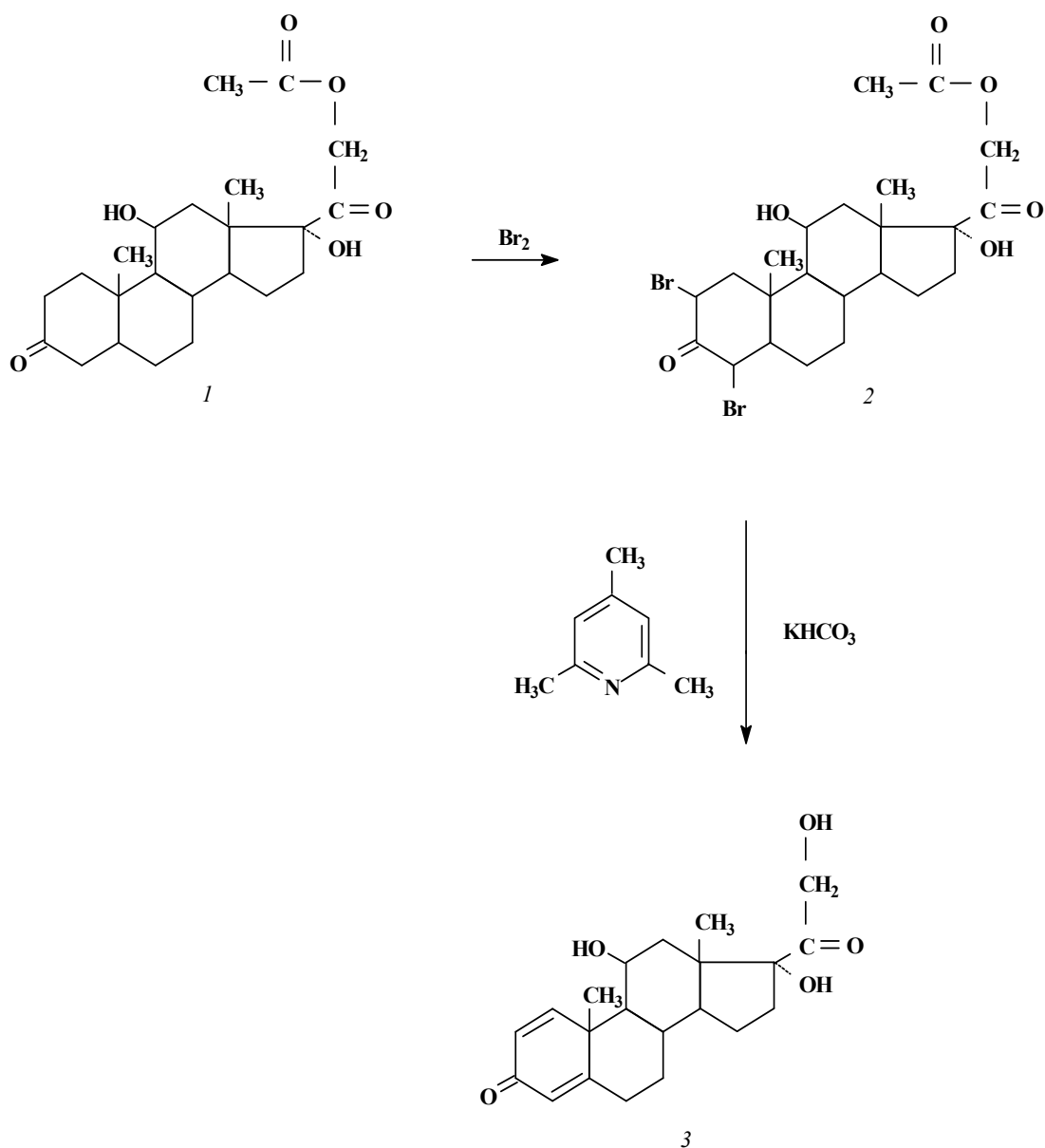


Рис. 6.12. Химический синтез преднизолона:
 1 – 21-ацетокси-11 β ,17 α -дигидрокси-5 α -прегнан-3,20-дион;
 2 – 2,4-дибром-21-ацетокси-11 β ,17 α -дигидрокси-5 α -прегнан-3,20-дион;
 3 – 11 β ,17 α ,21-тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)

6.2.2. Получение дексаметазона

Дексаметазон –синтетический глюкокортикостероидный гормон, обладающий сильным антиаллергическим и противовоспалительным действием (в 35 раз активнее кортизона).

Применяют при циркуляторном коллапсе (шок во время или после хирургической операции, травма, потеря крови, инфаркт миокарда, ожоги), при тяжелых инфекциях (дифтерия, брюшной тиф, пневмония, грипп, перитонит), а также при экстренных аллергических состояниях (астматический статус, ларингеальный отек, дерматоз, острая анафилактическая реакция на лекарственные средства, пирогенные реакции).

Характерным отличительным признаком дексаметазона является наличие в его молекуле атома фтора при C_9 стероидного кольца.

Химико-ферментативный синтез дексаметазона осуществляют, исходя из 3α -ацетокси-16-прегнен-11,20-диона (1), взаимодействием которого с метилмагнийбромидом в присутствии бромида лития получают 3α -гидрокси-16 α -метилпрегнан-11,20-дион (2). Далее осуществляют введение 17α -гидроксильной группы. С этой целью взаимодействием с уксусным ангидридом в присутствии *n*-толуолсульфокислоты получают 3-ацетокси-17-енолацетат (3), который эпоксируют надбензойной кислотой в соединение (4). Далее продукт (4) гидролизуют щелочью с получением оксикетона (5).

Введение второй гидроксильной группы при C_{21} осуществляют последовательным бромированием метильной группы молекулярным бромом, обменом атома брома на йод и взаимодействием йодида с ацетатом калия с получением соответствующего ацетоксикетона (6). Гидроксильную группу при C_3 в последнем окисляют до карбонильной оксидом шестивалентного хрома в пиридине с получением 3,11,20-трикетона (7), который вновь подвергают бромированию молекулярным бромом, но уже в положение C_4 . Дегидрогалогенирование последнего осуществляют с помощью семикарбазида, в результате чего образуется ненасыщенный трикетон (8). Во избежание образования семикарбазонов по кетогруппам в положениях C_3 и C_{20} конечный продукт обрабатывают пировиноградной кислотой. Далее специально получают семикарбазоны по кетогруппам в положениях C_3 и C_{20} , и не вступающую в реакцию образования семикарбазона кетогруппу в положении C_{11} восстанавливают до спиртовой с помощью боргидрида натрия (рис. 6.13).

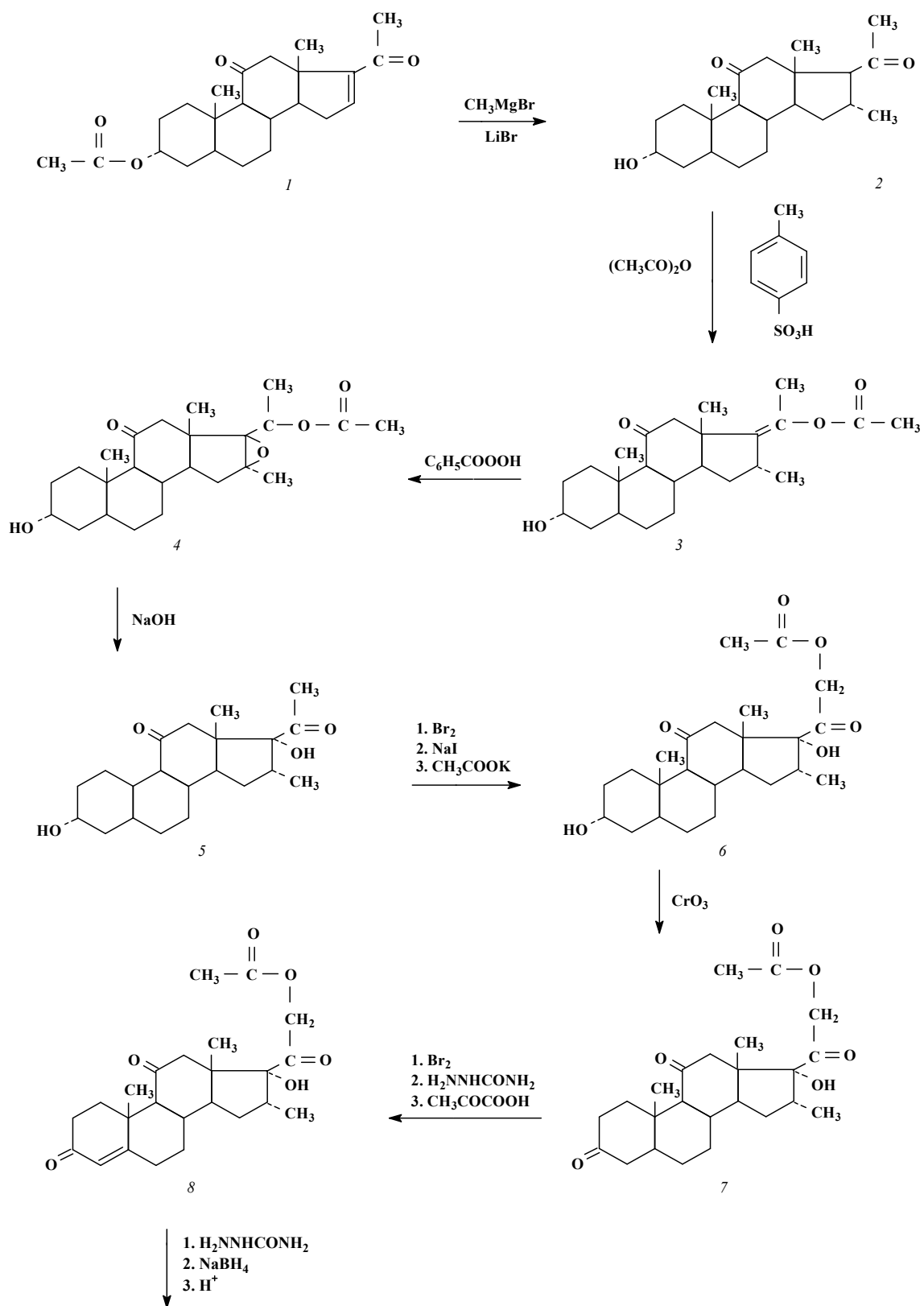


Рис. 6.13. Химико-ферментативный синтез дексаметазона (окончание см. на с. 88)

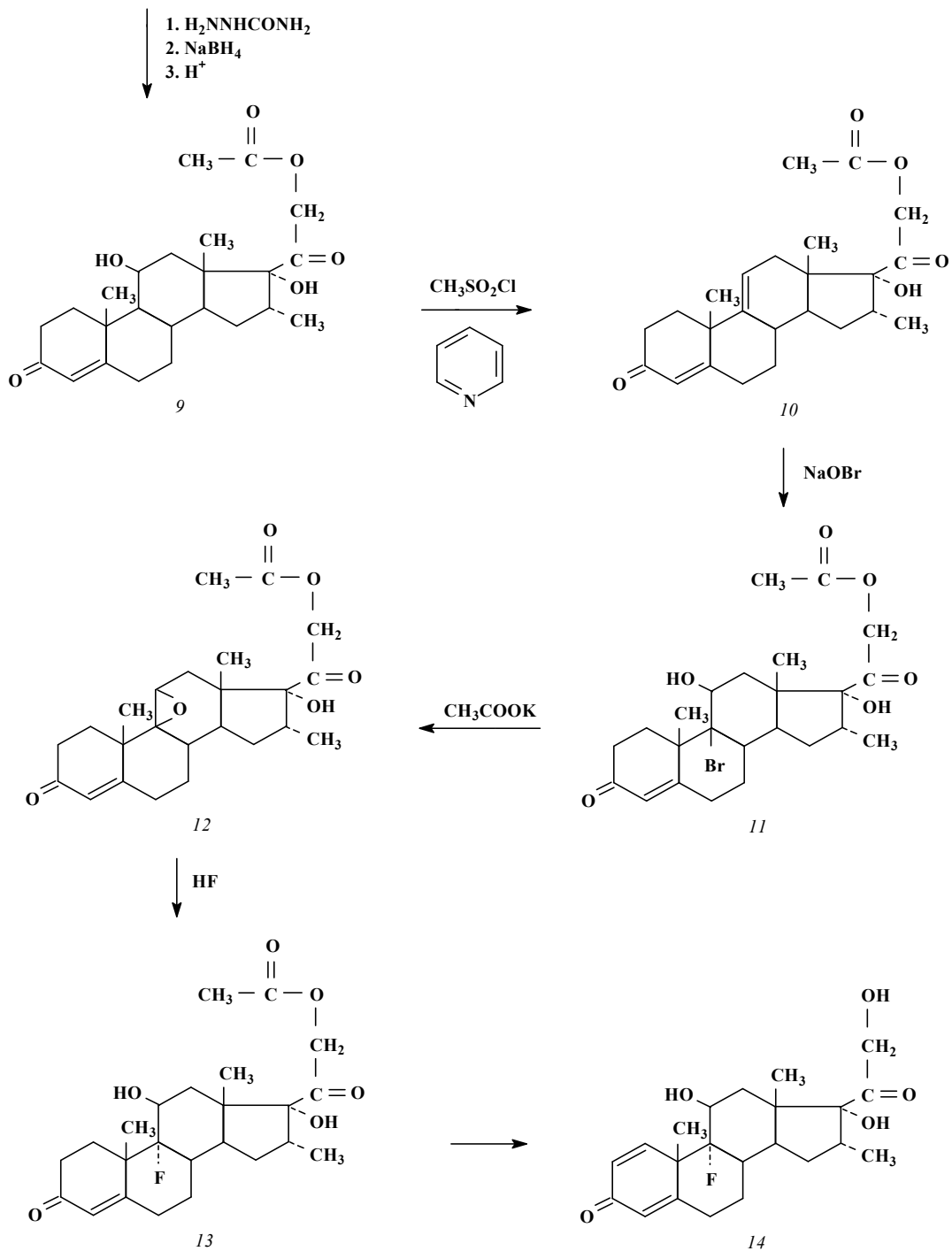


Рис. 6.13. Окончание (начало см. на с. 87):

- 1 – 3α-ацетокси-16-прегнен-11,20-дион;
 2 – 3α-гидрокси-16α-метилпрегнан-11,20-дион; 3 – 3-ацетокси-17-енолацетат;
 4 – эпоксид; 5 – оксикетон; 6 – ацетоксикетон; 7 – 3,11,20-трикетон;
 8 – ненасыщенный 3,11,20-трикетон; 9 – 21-О-ацетокси-16β-метилгидрокортизон;
 10 – соединение с двойной связью в положении C₉-C₁₁;
 11 – бромгидрин; 12 – эпоксид; 13 – фторгидрин; 14 – дексаметазон

После снятия защитных семикарбазонных групп получают 21-О-ацетокси-16β-метил-гидрокортизон (9), который подвергают дегидратации путем последовательной трансформации в мезилат и дальнейшим отщеплением метансульфокислоты с использованием метансульфохлаорида в пиридине. Полученное при этом соединение (10) содержит двойную связь в положении С₉–С₁₁.

Взаимодействием последнего с гипобромной кислотой получают бромгидрин (11). Действием ацетата калия последний трансформируют в эпоксид (12). Далее взаимодействием с фтористоводородной кислотой осуществляют раскрытие эпоксидного кольца, при котором образуется фторгидрин (13). Микробиологическим дегидрированием последнего по связи С₁–С₂ и одновременным деацетилированием получают дексаметазон (14).

6.2.3. Получение строфантина К

Строфантин К – сердечный гликозид. Строфантин К оказывает кардиотоническое действие, повышает силу и скорость сокращения миокарда, снижает частоту сердечных сокращений, уменьшает атрио-вентрикулярную проводимость.

При сердечной недостаточности увеличивает ударный и минутный объем сердца, улучшает опорожнение желудочков, что приводит к уменьшению размеров сердца и понижению потребности миокарда в кислороде.

Строфантин К представляет собой смесь гликозидов – К-строфантина-β и К-строфантозида (рис. 6.14 и 6.15).

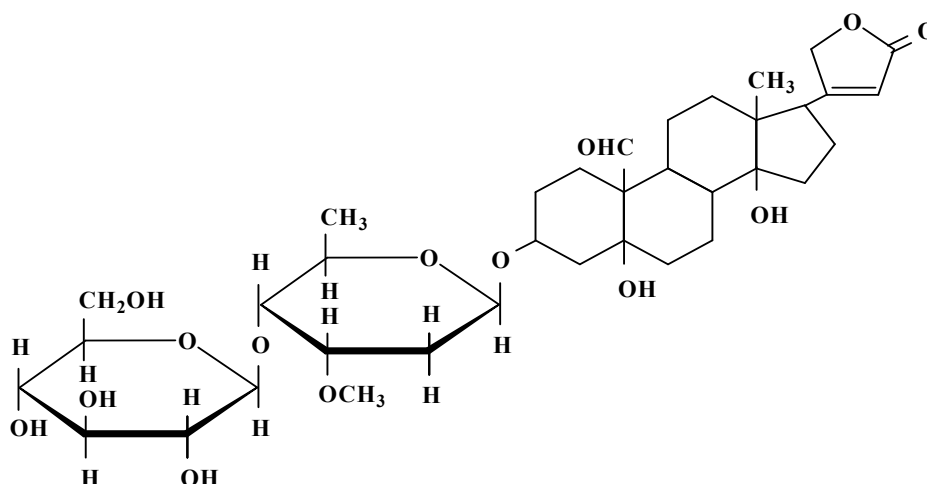


Рис. 6.14. Структурная формула К-строфантина-β

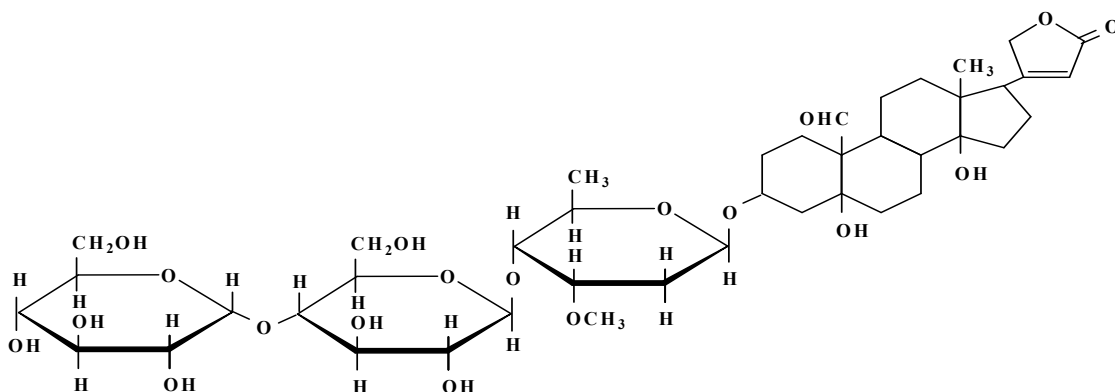


Рис. 6.15. Структурная формула К-строфантозида

Технологическая схема получения строфантина К представлена на рис. 6.16.



Рис. 6.16. Технологическая схема получения строфантина К (окончание см. на с. 91)

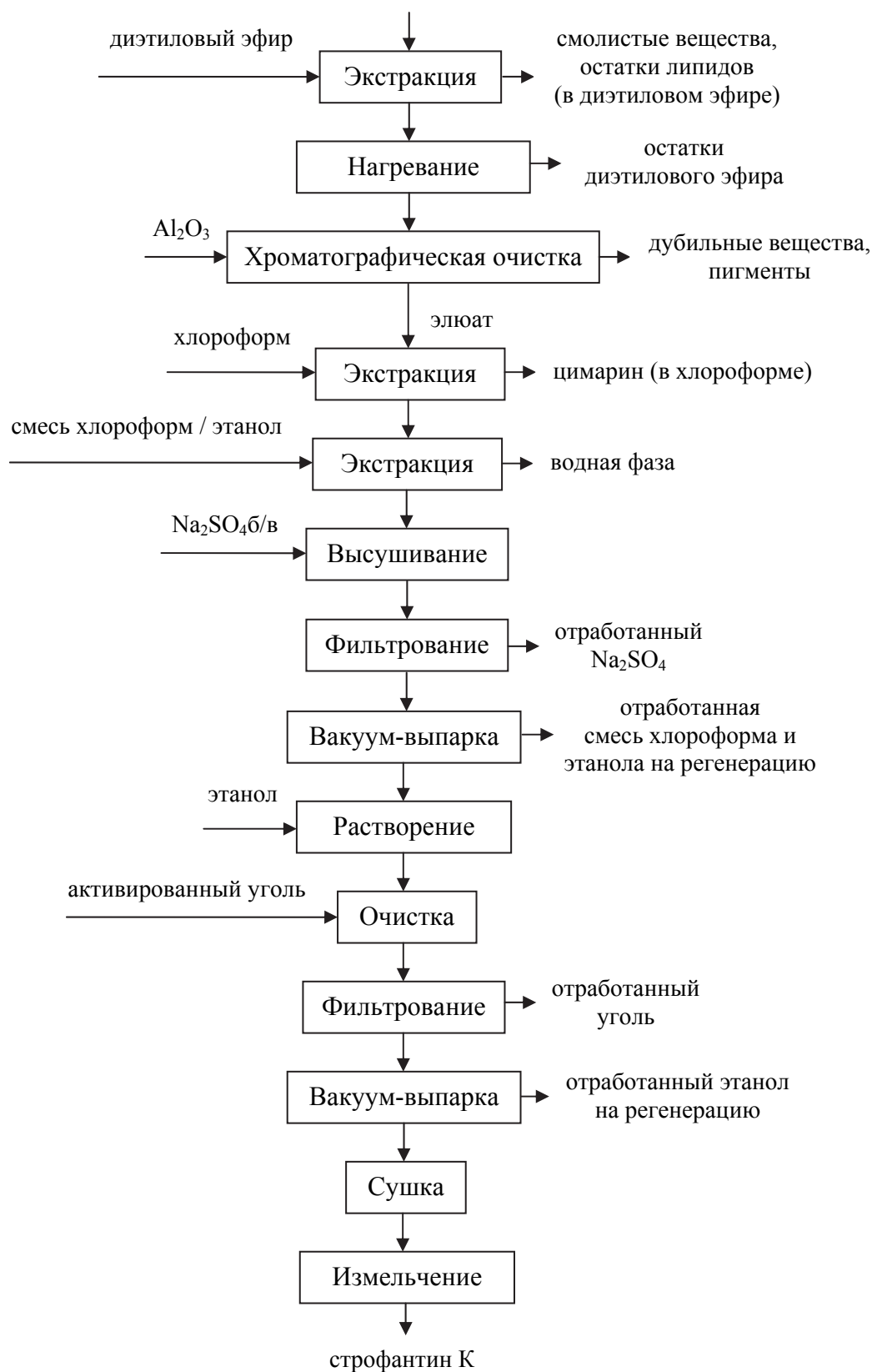


Рис. 6.16. Окончание (начало см. на с. 90)

Сырьем для производства строфантина К являются семена многолетней лианы *Strophanthus kombe*.

Семена измельчают на дробилках до крупности основной массы частиц 0,5–0,8 мм и обезжиривают хлороформом. Остатки растворителя из семян отдувают инертным газом.

Экстракцию гликозидов из обезжиренных семян проводят смесью хлороформа с этанолом (2:1). Под вакуумом отгоняют экстрагент, остаток упаривают досуха. Далее сухой остаток растворяют в кипящей воде.

Водный раствор охлаждают до комнатной температуры и обрабатывают диэтиловым эфиром для удаления смолистых веществ и остатков липидов.

Очищенный водный раствор нагревают для полного удаления эфира, затем охлаждают и подвергают хроматографической очистке, пропуская через небольшую колонку с оксидом алюминия для удаления дубильных веществ и пигментов. Элюат обрабатывают хлороформом для удаления цимарина из водного раствора гликозидов.

Строфантин К извлекают из водного раствора смесью хлороформа с этанолом (2:1). Хлороформ-спиртовое извлечение высушивают безводным сульфатом натрия, затем фильтруют. Экстрагент отгоняют в вакуум-выпарном аппарате, остаток растворяют в этаноле.

Спиртовой раствор строфантина К обрабатывают активированным углем для удаления следов дубильных веществ и пигментов, а затем фильтруют. Этанол отгоняют под вакуумом, остаток сушат и измельчают.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
2. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. – М.: Дрофа, 2005. – 544 с.
3. Мокрушин, В. С. Основы химии и технологии биоорганических и синтетических лекарственных веществ: учеб. пособие / В. С. Мокрушин, Г. А. Вавилов. – СПб.: Проспект Науки, 2009. – 496 с.
4. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М.: МГУ; Наука, 2004. – 528 с.
5. Технология крахмала и крахмалопродуктов / Н. Н. Трегубов [и др.]; под ред. Н. Н. Трегубова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 472 с.
6. Граник, В. Г. Основы медицинской химии / В. Г. Граник. – М.: Вузовская книга, 2001. – 384 с.
7. Вартамян, Р. С. Синтез основных лекарственных средств / Р. С. Вартамян. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 845 с.
8. Солдатенков, А. Т. Основы органической химии лекарственных веществ / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. – 191 с.
9. Шнайдман, Л. О. Производство витаминов / Л.О. Шнайдман. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 439 с.
10. Ахрем, А. А. Полный синтез стероидов / А. А. Ахрем, Ю. А. Титов. – М.: Наука, 1967. – 323 с.
11. Минина, С. А. Химия и технология фитопрепаратов: учеб. пособие / С. А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
12. Кочетков, Н. К. Химия природных соединений / Н. К.Кочетков, И. В.Торгов, М. М. Ботвиник. – М.: АН СССР, 1961. – 561 с.

Учебное издание

Леонтьев Виктор Николаевич

**ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Электронный курс лекций

Редактор *Л. А. Черевко*
Компьютерная верстка *Л. А. Черевко*
Корректор *Л. А. Черевко*

Издатель:

УО «Белорусский государственный технологический университет».

Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/227 от 20.03.2014.

Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.