

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

88304

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 30.05.74 (P. 171537)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.05.75

Opis patentowy opublikowano: 31.05.1977

AC/k 23/00

MKP A61k 32/00
C07c 99/12

Int. Cl.² A61K 37/18
C07C 99/12



Twórcy wynalazku: Arnold Adamiec, Barbara Michalska, Barbara Łukaszewska, Karol Szymański, Jerzy Meller, Elżbieta Walczak

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania preparatów aminokwasowych z regulowaną zawartością fenyloalaniny na drodze enzymatycznej hydrolizy surowców białkowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatów aminokwasowych, zawierających regulowaną ilość fenyloalaniny, które wytwarza się na drodze enzymatycznej hydrolizy surowców białkowych.

Preparaty aminokwasowe z regulowaną zawartością fenyloalaniny są stosowane w leczeniu jako jedyny skuteczny środek, przeciwdziałający powstawaniu głębokich stanów upośledzenia umysłowego u dzieci z fenyloketonurią, wrodzoną wadą metaboliczną ustroju. Wada ta jest wynikiem braku w organizmie enzymu, przekształcającego fenyloalaninę w tyrozynę, wskutek czego gromadzi się w ustroju fenyloalanina oraz produkty jej wadliwego przekształcania, które niszczą tkankę mózgową i prowadzą do nieodwracalnych zmian w mózgu.

Niekorzystny nadmiar fenyloalaniny jest najczęściej wprowadzany do organizmu z wysokobiałkowym pożywieniem, w którym aminokwas fenyloalanina występuje w stosunkowo dużych ilościach, to znaczy w około 5%.

Dla zdrowego organizmu wystarczającą zawartość fenyloalaniny w dostarczonym pożywieniu stanowi ilość do 0,5%, a jej nadmiar w ustroju zostaje przy pomocy właściwego enzymu przekształcony w tyrozynę.

W przypadku fenyloketonurii nieodzwonne jest podawanie preparatów aminokwasowych o znacznie obniżonym poziomie fenyloalaniny, często aż do minimalnej ilości tego aminokwasu.

2

Preparaty aminokwasowe z regulowaną ilością fenyloalaniny stanowią dla chorych na fenyloketonurię niskobiałkowy pokarm naturalny.

Poziom fenyloalaniny w pokarmach białkowych może być obniżony wyłącznie po ich uprzedniej hydrolizie.

Hydrolizaty białkowe uzyskuje się według znanego sposobu, działając silnymi kwasami nieorganicznymi na surowiec białkowy. Sposób ten jest jednak niedogodny, gdyż w wyniku hydrolizy następuje całkowite lub częściowe przekształcenie niektórych, niezbędnych dla organizmu aminokwasów i wskutek tej reakcji tworzą się niepożądane produkty ich racemizacji.

Wiadomo, że preparaty aminokwasowe są podawane pacjentom przez wiele lat, to też produkty niekorzystnego przekształcenia białka, które powstały w czasie prowadzonego procesu hydrolizy i znajdują się wskutek tego w gotowych preparatach aminokwasowych, odkładają się następnie w tkankach i narządach organizmu pacjenta, zmniejszając aktywność fizjologiczną tych narządów.

W znanych metodach wytwarzania hydrolizatów białkowych z regulowaną zawartością fenyloalaniny na przykład według patentu NRD nr 70 096 otrzymane aminokwasy i peptydy z hydrolizy białka wydziela się dalej przez zagęszczenie roztworu i wytrącanie ich alkoholem, co stanowi dodatkową operację w wytwarzaniu preparatów aminokwasowych, wydłużającą czas trwania całego procesu.

Inny znany sposób hydrolizy białka, polegający na zastosowaniu enzymów proteolitycznych jest bardziej korzystny, gdyż nie powoduje przekształcenia i racemizacji aminokwasów. Niedogodnością tego sposobu jest jego długotrwałość, wynosząca 100 lub więcej godzin trwania procesu enzymatycznej hydrolizy białka.

Nieoczekiwanie okazało się, że czas hydrolizy białka można znacznie skrócić przy pomocy enzymów, zawartych w trzustce, nawet do 32 godzin, przy czym regulowanie czasu hydrolizy jest uzależnione od zamierzonego poziomu fenyloalaniny w preparatach aminokwasowych. Efekt skróconego czasu hydrolizy uzyskano przede wszystkim przez zastosowanie odpowiednio przygotowanej trzustki, której enzymy miały zdolność odszczepiania z cząsteczki białka aminokwasów aromatycznych, szczególnie fenyloalaniny, oddzielanej następnie z hydrolizatu białkowego przy pomocy węgla aktywnego.

Ustalając odpowiednio czas hydrolizy, ilość oraz sposób dodawania węgla aktywnego i stosując suszenie hydrolizatów znaną metodą, otrzymuje się w znacznie skróconym czasie i z wysoką wydajnością preparaty aminokwasowe o dowolnie regulowanej zawartości fenyloalaniny.

Na wydajne skrócenie czasu hydrolizy ma zasadniczy wpływ porcjowanie dodawanej trzustki w określonych ilościach i w odpowiednim czasie.

Jako surowiec wyjściowy do hydralizy stosuje się kazeinę lub białko z mleka, które było poddawane działaniu enzymów w czasie procesu fermentacji antybiotyków przy udziale szczepu *Streptococcus lactis*. Białko to stanowi produkt odpadkowy, uzyskany przy wydzielaniu nizyny z brzeczki pofermentacyjnej zgodnie z polskim opisem patentowym nr 68835.

Według wynalazku do zawiesiny białka takiego, jak kazeina lub białko z mleka, stanowiące produkt odpadkowy z procesu fermentacji antybiotyków, zwłaszcza nizyny, w stężeniu 10–20%, korzystnie 13–16%, w wodzie zalkalizowanej 10% roztworu wodorotlenku sodowego lub potasowego do wartości $\text{pH} = 7,0\text{--}7,5$ z dodatkiem środka antyseptycznego, zwłaszcza toluenu, dodaje się rozdrobnioną, aktywną trzustkę zawierającą o wartości $\text{pH} = 5,0\text{--}7,5$, korzystnie 5,5–6,5, rozmrożoną od temperatury -10°C do temperatury -2°C – $+5^\circ\text{C}$, korzystnie $+2^\circ\text{C}$ – $+4^\circ\text{C}$, w trzech porcjach wagowych 1:1:0,8 z tolerancją $\pm 10\%$, przy czym pierwszą porcję trzustki dodaje się na początku procesu hydrolizy białka, drugą w 1/3, a trzecią 2/5 czasu trwania procesu, prowadzonego w ciągu 32–80 godzin, korzystnie 65–72 godzin, następnie mieszaninę po hydrolizie ogrzewa się do temperatury 75°C – 98°C , nierozpuszczalne składniki odsąca się w podwyższonej temperaturze, najkorzystniej 85°C , przesącz hydrolizatu ochładza się do temperatury $+5^\circ\text{C}$ – 0°C , osad wytrąconej tyrozyny oddziela się, przesącz zadaje węglem aktywnym dwukrotnie lub trzykrotnie w zależności od zawartości fenyloalaniny w przesączu w porcjach wagowych 1:1 lub 2:1:1 w ciągu 3–5 godzin i w ilości 65–160% w stosunku do suchej masy białka, każdorazowo węgiel oddziela od przesączu, po czym otrzymany hydrolizat z obniżoną zawartością fenyloalaniny wzbogaca się oczyszczoną

tyrozyną, solami mineralnymi i innymi składnikami recepturowymi farmaceutycznie dopuszczalnymi oraz suszy w znany sposób.

Współzależność założonej zawartości fenyloalaniny w preparatach aminokwasowych, czasu trwania enzymatycznej hydrolizy surowca kazeiny, ilości węgla, potrzebnej do oczyszczania hydrolizatu białkowego, pozbawionego tyrozyny, i wydajności całego procesu wytwarzania preparatów aminokwasowych ilustruje poniższa tabela.

Założona ilość fenyloalaniny w mg/100 g preparatu aminokwasowego	Czas trwania hydrolizy w godzinach	Ilość węgla aktywnego na 1 kg suchej masy kazeiny	Wydajność w %
poniżej 20	80	950	60
150–200	80	750	70
450–500	80	650	75
poniżej 20	60	1100	55
150–200	60	900	65
450–500	60	750	70
poniżej 20	40	1400	48
150–200	40	1100	58
450–500	40	900	65

Zastosowanie białka z mleka, otrzymanego przy udziale szczepu *Streptococcus lactis* prowadzi do skrócenia czasu hydrolizy o około 20%.

Ponadto przedmiot wynalazku ilustrują przykłady:

Przykład I. Sposób otrzymywania preparatu aminokwasowego z kazeiny o obniżonym poziomie fenyloalaniny do 0,5%.

1,4 kg trzustki, zamrożonej do temperatury -10°C , rozdrobniono, jednocześnie rozmrażając ją do temperatury pomiędzy $+2^\circ\text{C}$ i $+4^\circ\text{C}$. Utrzymywano trzustkę w tej temperaturze przez 72 godziny, regulując pH rozmrożonej trzustki w granicach 6,0–6,5 przy pomocy 10% roztworu kwaśnego węglanu sodowego.

Osobno przygotowano 10% zawiesiny kazeiny, w wodzie, zalkalizowanej 10% roztworem wodorotlenku sodowego do $\text{pH} = 7,5$. Zawiesinę sporządzono z 3 kg kazeiny w trzech równych porcjach, dodawanych do alkalizowanej wody trzykrotnie w ciągu 2 godzin. Do gotowej zawiesiny kazeinowej zastosowano 200 ml toluenu jako środka antyseptycznego.

Do tak sporządzonej zawiesiny kazeinowej dodawano w trzech porcjach uprzednio przygotowaną trzustkę w stosunku wagowym 1:1:0,8, w kolejnych godzinach procesu enzymatycznej hydrolizy: w godzinie zerowej, 27 i 32. Hydrolizę prowadzono przez 80 godzin regulując pH mieszaniny w granicach 7,0–7,5 przy pomocy 10% roztworu wodorotlenku sodowego. Uzyskany hydrolizat białka podgrzano do temperatury 85°C i odsączono składniki stałe, a przesącz ochłodzono do temperatury 5°C – 0°C . W tej temperaturze wydziela się w przesączu osad tyrozyny, który odsączono, przeznaczając go do oczyszczenia.

Po oddzieleniu tyrozyny, zadawano hydrolizat białkowy węglem aktywnym, dwukrotnie porcjami.

w ciągu 5 godzin w ilościach 0,6 kg i 0,3 kg węgla na 1 kg suchej masy białkowej. Po każdym dodaniu porcji węgla, wymieszaniu jej z hydrolizatem i odsączeniu, węgiel oddzielano jako produkt odpadkowy.

Otrzymany wodny roztwór hydrolizatu białkowego wysuszono po dodaniu substancji uzupełniających takich, jak oczyszczona tyrozyna, sole mineralne i inne składniki określone recepturą. Uzyskano preparat aminokwasowy o zawartości 0,45—0,5% fenyloalaniny. Wydajność 75%.

Przykład II. Sposób otrzymywania preparatu aminokwasowego z kazeiny o obniżonym poziomie fenyloalaniny do 0,02%.

Przygotowano trzustkę i 10% zawiesinę kazeiny w alkalicznej wodzie oraz porcjowaną trzustkę, jak w przykładzie I, lecz proces enzymatycznej hydrolizy prowadzono w ciągu 40 godzin, podczas którego drugą i trzecią porcję trzustki dodawano w 13 i 16 godzinie hydrolizy.

Operację podgrzewania hydrolizatu, odsączenia składników stałych, ochładzania hydrolizatu i oddzielania tyrozyny prowadzono również analogicznie, jak w przykładzie I.

Hydrolizat, pozbawiony tyrozyny, zadano trzykrotnie węglem aktywnym w porcjach wagowych 2:1:1 o łącznej ilości 1,4 kg węgla na 1 kg suchej masy kazeiny w ciągu 5 godzin i każdorazowo węgiel oddzielono. Uzyskano wodny roztwór hydrolizatu białkowego, który po dodaniu tyrozyny i innych składników według receptury wysuszono. Otrzymano preparat aminokwasowy, zawierający 0,02% fenyloalaniny z wydajnością 48%.

Przykład III. Sposób otrzymywania preparatu aminokwasowego o obniżonym poziomie fenyloalaniny do 0,5%.

Aktywną trzustkę przygotowano analogicznie, jak w przykładzie I, natomiast zawiesinę kazeinową sporządzono w stężeniu 15% postępując, jak w przykładzie I z tym, że doprowadzono pH zawiesiny kazeinowej do wartości 7,5 przy pomocy 10% roztworu wodorotlenku potasowego. Do tak przygotowanej zawiesiny dodawano aktywną trzustkę w ilości 0,8 kg na 1 kg zawiesiny w trzech porcjach we wzajemnym stosunku wagowym 1:1:0,8 podczas 60 godzin procesu hydrolizy, to znaczy w godzinie zerowej, 20 i 24. W ciągu hydrolizy utrzymywano pH w granicach 7,0—7,5.

Otrzymaną mieszaninę po hydrolizie podgrzano do temperatury 87°C, następnie odsączono składniki stałe od hydrolizatu i ochłodzono go do temperatury pomiędzy 5°C i 0°C.

Wydzieloną w tej temperaturze tyrozynę odsączono, przeznaczając ją do oczyszczenia. Pozostały przesącz hydrolizatu zadawano dwukrotnie węglem aktywnym w dwu porcjach w ilościach 0,5 kg i 0,25 kg węgla na 1 kg kazeiny w czasie 5 godzin. Każdorazowo zużyty węgiel oddzielano.

Otrzymano wodny roztwór hydrolizatu, który po dodaniu tyrozyny, soli mineralnych oraz innych substancji uzupełniających według receptury — wysuszono.

Uzyskano suchy preparat aminokwasowy z za-

wartością 0,45—0,5% fenyloalaniny i z wydajnością 70%.

Przykład IV. Sposób otrzymywania preparatu aminokwasowego o poziomie fenyloalaniny poniżej 0,02%.

Przygotowano aktywną trzustkę, zawiesinę kazeiny, prowadzono hydrolizę, podgrzano mieszaninę po hydrolizie, odsączono hydrolizat, oziębiono przesącz hydrolizatu i odsączono tyrozynę w sposób, podany w przykładzie III.

Następnie zadano hydrolizat trzykrotnie węglem aktywnym w łącznej ilości 1,1 kg węgla na 1 kg kazeiny w trzech porcjach w wzajemnym stosunku wagowym 2:1:1 podczas 5 godzin. Każdorazowo zużyty węgiel oddzielano.

Wodny roztwór hydrolizatu, wzbogacony substancjami uzupełniającymi według receptury — wysuszono. Otrzymano suchy preparat aminokwasowy o zawartości fenyloalaniny poniżej 20 mg z wydajnością 33%.

Przykład V. Sposób otrzymywania preparatu aminokwasowego o obniżonym poziomie fenyloalaniny do 0,5%.

Przygotowano aktywną trzustkę w sposób, podany w przykładzie I. Do enzymatycznej hydrolizy zastosowano 10 kg białka z mleka, wydzielonego jako osad z brzojki pofermentacyjnej przy produkcji pizyny (opis patentowy polski nr 88 835). Początkowo sporządzono 13% zawiesinę białka z mleka w alkalicznym roztworze wodnym o pH = 7,5, który uzyskano przy pomocy 10% roztworu wodorotlenku sodowego. Do tak sporządzonej zawiesiny dodano przygotowaną uprzednio aktywną trzustkę w ilości 0,44 kg na 1 kg suchego białka. Po upływie 4 godzin uzupełniono wsad białka z mleka do stężenia 20%, doprowadzając ponownie pH do wartości 7,0—7,5 przy pomocy 10% roztworu wodorotlenku sodowego. Proces hydrolizy prowadzono w ciągu 32 godzin, podczas którego jeszcze dwukrotnie dodawano aktywną trzustkę w ilościach 0,44 kg i 0,35 kg na 1 kg suchej masy białka w 13 i 16 godzinie hydrolizy.

Mieszaninę hydrolizatu i składników nierozpuszczalnych ogrzano do temperatury 90°C i przesączono, po czym przesącz hydrolizatu oziębiono do temperatury +5°C—0°C. Z hydrolizatu wytrącono tyrozynę i odstawiono do oczyszczenia.

Hydrolizat, pozbawiony tyrozyny, zadawano dwukrotnie węglem aktywnym w porcjach 0,6 kg i 0,3 kg węgla na 1 kg suchej masy białka. Zużyty węgiel każdorazowo oddzielano.

Otrzymano wodny roztwór hydrolizatu, który po dodaniu tyrozyny i innych substancji uzupełniających według receptury — wysuszono.

Tak uzyskany preparat aminokwasowy zawiera 0,45—0,5% fenyloalaniny. Wydajność 63%.

Przykład VI. Sposób otrzymywania preparatu aminokwasowego o poziomie fenyloalaniny poniżej 0,02%.

Aktywną trzustkę przygotowano w sposób, podany w przykładzie I, natomiast do enzymatycznej hydrolizy zastosowano zawiesinę białka z mleka, sporządzoną, jak w przykładzie V z tym, że wodę alkalizowano 10% roztworem wodorotlenku potas-

wego do $\text{pH} = 7,5$. Proces hydrolizy prowadzono przez 64 godziny, podczas którego dodawano aktywną trzustkę w porcjach i ilościach, jak w przykładzie V, trzykrotnie w czasie hydrolizy w godzinach: 0, 24 i 30.

Uzyskaną mieszaninę hydrolizatu i składników nierozpuszczalnych podgrzano do temperatury 90°C i sączone w granicach temperatury 90°C — 85°C , po czym przesącz hydrolizatu oziębiono i wytrącono tyrozinę, jak w przykładzie V.

Hydrolizat, pozbawiony tyrozyny, zadawano węglem aktywnym w ilości łącznej 0,95 kg na 1 kg suchej masy białka z mleka w trzech porcjach w wzajemnym stosunku wagowym 2:1:1 podczas 5 godzin. Każdorazowo zużyty węgiel oddzielano.

Otrzymano wodny roztwór hydrolizatu, który uzupełniono tyroziną oraz innymi substancjami zgodnie z recepturą, po czym hydrolizat wysuszono.

Uzyskany w ten sposób preparat aminokwasowy zawiera poniżej 0,02% fenyloalaniny. Wydajność 60%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania preparatów aminokwasowych z regulowaną zawartością fenyloalaniny na drodze enzymatycznej hydrolizy surowców białkowych, oddzielenia składników nierozpuszczalnych od hydrolizatu, jego oczyszczenia, wzbogacenia go składnikami recepturowymi i wysuszenia, **znamienny tym**, że do zawiesiny białka takiego, jak kazeina lub białko z mleka, stanowiące produkt odpadkowy z procesu fermentacji antybiotyków,

zwłaszcza nizyny, w stężeniu 10—20%, korzystnie 13—16%, w wodzie, zalkalizowanej 10% roztworem wodorotlenku sodowego lub potasowego do wartości $\text{pH} = 7,0$ — $7,5$, z dodatkiem środka antyseptycznego, zwłaszcza toluenu, dodaje się rozdrobnioną, aktywną trzustkę zwierzęcą o wartości $\text{pH} = 5,0$ — $7,5$, korzystnie 5,5—6,5, rozmrożoną od temperatury -10° do temperatury -2° — $+5^{\circ}\text{C}$, korzystnie $+2^{\circ}\text{C}$, w trzech porcjach wagowych 1:1:0,8 z tolerancją $\pm 10\%$, przy czym pierwszą porcję trzustki dodaje się na początku procesu hydrolizy białka, drugą w 1/3, a trzecią w 2/5 czasu trwania procesu, prowadzonego w ciągu 32—80 godzin, korzystnie 65—72 godzin, następnie mieszaninę po hydrolizie ogrzewa się do temperatury 75° — 98°C , nierozpuszczalne składniki odsąca się w podwyższonej temperaturze, najkorzystniej 85°C , przesącz hydrolizatu ochładza do temperatury $+5$ — 0°C , osad wytrąconej tyrozyny oddziela się, przesącz zadaje węglem aktywnym dwukrotnie lub trzykrotnie w zależności od zawartości fenyloalaniny w przesączu w porcjach wagowych 1:1 lub 2:1:1 w ciągu 3—5 godzin i w ilości 65—160% w stosunku do suchej masy białka, każdorazowo węgiel oddziela się od przesączu, po czym otrzymany hydrolizat z obniżoną zawartością fenyloalaniny wzbogaca się oczyszczoną tyroziną, solami mineralnymi i innymi składnikami recepturowymi dopuszczalnymi farmaceutycznie oraz suszy w znany sposób.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się białka z mleka wydzielone z brzeczki pofermentacyjnej z procesu fermentacji antybiotyków przy udziale szczepu *Streptococcus lactis*.