

Warszawa, dnia 22 lutego 1951 r.

C07g 7/026



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ OPIS PATENTOWY

Nr 34021

Kl. 30 h, 2/04

Novo Therapeutisk Laboratorium A/S.
(Kopenhaga, Dania)

Sposób przeróbki trzustek ssaków, zwłaszcza bydła rogatego i świń

Zgłoszono 6 listopada 1946 r.

Udzielono 4 lutego 1950 r.

Pierwszeństwo: 4 czerwca 1943 r. (Dania)

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania proteolitycznych enzymów, które poniżej nazywa się wprost enzymami, z trzustek ssaków, zwłaszcza bydła rogatego i świń, oraz otrzymywanie insuliny z tych samych gruczołów.

Otrzymywanie insuliny z gruczołów trzustkowych ssaków, zwłaszcza bydła rogatego i świń, przeprowadza się w ten sposób, że rozdrobnione gruczoły traktuje się odpowiednimi środkami ekstrahującymi, zdolnymi do rozpuszczania insuliny w warunkach, w których enzymy obecne w trzustkach nie powodują przechodzenia insuliny w stan nieczynny. Jako odpowiednie środki ekstrahujące znane są woda, alkohol etylowy i metylowy, w dalszym ciągu opisu zwane wprost alkoholami, aceton lub mieszaniny tych substancji z dodatkiem lub bez dodatku kwasów, alkaliów lub soli.

W gruczołach wyjętych ze zwierząt natychmiast po zarznięciu enzymy są nieczynne. Enzymy te jednak przechodzą szybko w stan czynny, o ile gruczoły nie zostaną zamrożone do tempe-

ratury poniżej 0°C. Do otrzymywania więc możliwie największej wydajności insuliny stosuje się zawsze świeże lub dobrze zakonserwowane gruczoły, to jest gruczoły szybko zamrożone, w których enzymy są w stanie całkowicie lub prawie całkowicie nieczynnym.

Dotychczas uważano powszechnie, że alkohol lub aceton opóźnia działanie enzymów, a nawet iż niszczy enzymy. Wobec tego pozostałość oddzieloną przy otrzymywaniu insuliny uważano jako nie nadającą się do otrzymywania enzymów z gruczołów trzustkowych.

Wynalazek opiera się na nowym spostrzeżeniu, iż enzymy nie ulegają zniszczeniu podczas traktowania ich alkoholem lub acetonem użytymi do otrzymywania insuliny, lecz że zostają osadzone, co jest zależne od stężenia użytego alkoholu lub acetonu. To osadzanie się zależy jednak również od stosunku ilości cieczy do ilości substancji podlegającej ekstrakcji (stosunek ekstrakcji). Zależnie od stosunku ekstrakcji należy stosować stężenie alkoholu lub acetonu od

20 — 60% objętościowych, przy czym 20% objętościowych stosuje się przy małym stosunku ekstrakcji, a 60% objętościowych przy dużym stosunku ekstrakcji. Przy zachowaniu tych warunków w pozostałości oddzielonej przy otrzymywaniu insuliny wykryto rzeczywiście enzymy. Wśród licznych substancji oddzielonych przy oczyszczaniu insuliny enzymów nie wykryto. Ten wynik zadowolający należy przypisać oczywiście tej okoliczności, iż użyto rozpuszczalnika, który w warunkach powyższych działa jednocześnie jako środek osadzający enzymy. Te ostatnie wskutek tego pozostają w stanie nierozpuszczonym w pozostałości oddzielonej przy otrzymywaniu insuliny i nie można ich zaktywować dopóki gruczoły te nie zostaną przerobione ponownie.

W celu otrzymania czynnego preparatu enzymowego z pozostałości otrzymanej po ekstrakcji insuliny należy więc, w myśl wynalazku niniejszego, tylko rozpuścić enzymy.

Zgodnie z powyższym pozostałości gromadzące się podczas znanego wytwarzania insuliny z rozdrobnionych świeżych lub konserwowanych gruczołów przez traktowanie tych ostatnich zakwaszonym alkoholem lub acetonem, po oddzieleniu cieczy poddaje się ekstrakcji enzymowej za pomocą wodnego ośrodka, przy czym w cieczy ekstrahującej powstałej ze zmieszania wodnego ośrodka z alkoholem lub acetonem, pozostałym w gruczołach po ekstrakcji insuliny, stężenie alkoholu lub acetonu winno być mniejsze od 60% objętościowych, najkorzystniej mniejsze od 20% objętościowych. Alkohol lub aceton o stężeniu mniejszym od stosowanego przy wyciąganiu insuliny jest środkiem rozpuszczającym enzymy i przeprowadzającym je w stan czynny.

W celu dalszego wyjaśnienia wpływu stężenia alkoholu lub acetonu należy zaznaczyć, iż przy użyciu alkoholu etylowego przy stosunku ekstrakcji 7 : 1 osadzanie enzymów zaczyna się w przybliżeniu przy 30% objętościowych alkoholu. Ilości dające się w praktyce zmierzyć otrzymuje się przy około 40% objętościowych alkoholu. W tym przypadku podczas ekstrakcji insuliny trzeba stosować stężenie alkoholu etylowego równe około 40% objętościowych, podczas gdy przy ekstrakcji enzymów stężenie alkoholu winno być niższe od 30% objętościowych.

Wydajność enzymów zależy w pierwszym rzędzie od stężenia alkoholu lub acetonu. Przy stężeniu równym 20 — 60% objętościowych alkoholu lub acetonu i większym zależnie od stosunku ekstrakcji enzymy pozostają w stanie nierozpuszczonym, poniżej zaś wspomnianego stężenia enzymy zaczynają się rozpuszczać. Ogólnie biorąc wydajność enzymów wzrasta bardzo

w miarę zmniejszenia się stężenia alkoholu lub acetonu. Również czas ekstrakcji odgrywa rolę, to jest przy skróconym czasie otrzymuje się zmniejszoną wydajność.

Dobrze jest stosować jako rozpuszczalnik enzymów wodę, przy czym wykryto, że ekstrakcja za pomocą wody w ciągu 24 godzin daje dobre wydajności enzymów przy stosunku ekstrakcji 7 : 1.

Korzystnie jest po ekstrakcji insuliny usunąć część alkoholu lub acetonu zawartego w pozostałości, np. przez odciskanie, a później poddać pozostałość ekstrakcji enzymowej. W ten sposób osiąga się bardziej stężone roztwory enzymowe i lepsze warunki odzyskania użytego alkoholu lub acetonu.

Gdy do ekstrakcji insuliny stosuje się roztwór kwasu w alkoholu, np. kwasu chlorowodorowego, fosforowego, mlekowego lub octowego, wówczas enzymy wyciąga się z pozostałości gruczołów za pomocą wody.

Gdy do ekstrakcji insuliny stosuje się dodatek kwasu siarkowego, stwierdzono, że nie można wyciągać enzymów bezpośrednio nawet wówczas, gdy stężenie alkoholu lub acetonu wynosi około 0%, gdyż czas trwania ekstrakcji jest wtedy zbyt długi i ilość środka ekstrahującego jest zbyt wielka. W tym przypadku ekstrakcja daje dobre wyniki, gdy stosuje się jako środek ekstrahujący roztwór mocznika, powyżej 50% kwas octowy, 85% kwas mrówkowy lub ciekły fenol. Wykryto, że można również stosować zwykłą ekstrakcję za pomocą wody, jeśli pozostałość podczas wyciągania enzymów poddaje się ogrzewaniu w ciągu krótkiego czasu do temperatury, np. 100°C.

Podczas ekstrakcji enzymów należy stosować roztwór o wartości $pH = 1 - 7$, najkorzystniej 1 — 4.

Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku.

Przykład I. 1 kg świeżych dobrze zakonserwowanych trzustek rozdrabnia się i wyciąga w ciągu 3 godzin za pomocą 4 litrów 80%owego alkoholu etylowego, do którego dodano 30 cm³ stężonego kwasu chlorowodorowego. Przesącz przerabia się dalej na insulinę w sposób zwykły, podczas gdy pozostałość poddaje się ekstrakcji enzymowej w ciągu 24 godzin za pomocą 7 litrów wody, po czym ciecz odwirowuje się i otrzymuje z niej enzymy. Otrzymuje się wydajność równą 10 milionom jednostek Fuld-Gross'a.

Przykład II. 1 kg świeżych lub dobrze zakonserwowanych trzustek rozdrabnia się i wyciąga w ciągu 4 godzin za pomocą 6 litrów 80%-

wego acetonu, do którego dodano 35 cm³ stężonego kwasu chlorowodorowego. Przesącz przera-
bia się dalej na insulinę w sposób zwykły. Po-
zostałość poddaje się ekstrakcji enzymowej w
ciągu 24 godzin za pomocą 7 litrów wody, po
czym odwirowuje się i z cieczy tej otrzymuje en-
zymy. Osiąga się wydajność około 10 milionów
jednostek Fuld-Gross'a.

Przykład III. 1 kg świeżych lub dobrze
zakonserwowanych trzustek rozdrabnia się i wy-
ciąga w ciągu 3 godzin za pomocą 2 litrów 80%-
wego alkoholu etylowego, do którego dodano 10
cm³ stężonego kwasu siarkowego. Ciecz odwirowu-
je się i przerabia w sposób zwykły na insu-
linę, podczas gdy pozostałość poddaje się ekstrak-
cji enzymowej za pomocą 3 litrów 33%-wego
wodnego roztworu mocznika w ciągu 2 godzin.
Po odwirowaniu cieczy otrzymuje się z niej en-
zymy.

Przykład IV. 1 kg świeżych lub dobrze
zakonserwowanych trzustek rozdrabnia się i wy-
ciąga w ciągu 8 godzin za pomocą 6 litrów
80%-wego alkoholu etylowego, do którego doda-
no 10 cm³ kwasu siarkowego. Ciecz odwirowuje
się i przerabia na insulinę w sposób zwykły,
podczas gdy pozostałość po odcisnięciu, miesza
się z 4 litrami wody, do której dodano 20 cm³
stężonego kwasu chlorowodorowego, ogrzewa
szybko do 100°C i natychmiast potem ochładza.
Po odwirowaniu cieczy otrzymuje się z niej en-
zymy. Osiąga się wydajność w przybliżeniu wy-
noszącą około 9 milionów jednostek Fuld-Gross'a.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób przeróbki trzustek ssaków, zwsz-
acza bydła rogatego i świń, znamieny tym,
że z rozdrobnionych świeżych lub dobrze za-
konserwowanych gruczołów wyciąga się przy

pomocy alkoholu lub acetonu w sposób znany
insulinę, a pozostałości gruczołów poddaje
się ekstrakcji enzymowej za pomocą wodnego
ośrodka, którego ilość dobiera się tak, aby w
cieczy ekstrahującej, powstałej ze zmieszania
wodnego ośrodka z alkoholem lub acetonem
pozostałym w gruczołach po ekstrakcji insu-
liny, stężenie alkoholu lub acetonu było mniej-
sze od 60% objętościowych, najkorzystniej
mniejsze od 20% objętościowych.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że
część alkoholu lub acetonu, zawartego w po-
zostałości, usuwa się z niej przed ekstrakcją
enzymową, np. przez odciskanie.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2, znamieny tym,
że jako środek wyciągający enzymy stosu-
je się wodę zakwaszoną.
4. Sposób według zastrz. 1 — 3, znamieny tym,
że w przypadku stosowania do ekstrakcji in-
suliny alkoholu lub acetonu, zawierającego
kwas siarkowy, pozostałość podczas wycią-
gania enzymów poddaje się ogrzewaniu w
ciągu krótkiego czasu.
5. Sposób według zastrz. 1, 2, znamieny tym,
że w przypadku stosowania do ekstrakcji in-
suliny alkoholu lub acetonu, zawierającego
kwas siarkowy, enzymy wyciąga się z pozo-
stałości za pomocą stężonego wodnego roz-
tworu mocznika, stężonego kwasu octowego,
stężonego kwasu mrówkowego lub ciekłego
fenolu.
6. Sposób według zastrz. 1 — 4, znamieny tym,
że do ekstrakcji enzymów stosuje się roztwór
o wartości $pH = 1 - 7$, najkorzystniej 1—4.

Novo Therapeutisk
Laboratorium A/S.

Zastępca: inż. W. Zakrzewski
rzecznik patentowy