(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Wirtschaftspatent

ISSN 0433-6461 (11) 0154 190

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes zum Patentgesetz

Int.Cl.³ 3(51) A 23 J 1/20

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP A 23 J/ 225 071 (22) 10.11.80 (44) 03.03.82

(71) ADW DER DDR, 1199 BERLIN-ADLERSHOF;DD;
(72) BEHNKE, ULRICH,DR., DIPL.-CHEM.;FRIEDRICH, MANFRED,DR., DIPL.-CHEM.;
RUTTLOFF, HEINZ,PROF. DR., DIPL.-CHEM.;MOOZ, REINFRIED,DIPL.-CHEM.;DD;
NOACK, RUDOLF,DR. MED. SC. PROF.;DD;
(73) siehe (72)
(74) ADW DER DDR, ZI FUER ERNAEHRUNG, PATENTBUERO, 1505 BERGHOLZ-REHBRUECKE, ARTHUR-SCHEUNERT-ALLEE 114/116

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PROTEIN-PARTIALHYDROLYSATEN FUER DIAETNAHRUNGEN

(57)Die Erfindung bezieht sich auf die enzymatische Herstellung von Protein-Partialhydrolysaten fuer Elementardiaeten. Ziel der Erfindung ist die vereinfachte Herstellung von Protein -Partialhydrolysaten, d. h. Peptidgemischen ohne zusaetzliche Reinigungsoperationen. Es besteht daher die Aufgabe, die Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, um ernaehrungsphysiologisch vollwertige Proteine durch Einsatz einer Protease zu einem Gemisch niedermolekularer Peptide so abzubauen,daß sie aus dem Darmlumen ohne weitere Verdauung absorbiert werden koennen.Das Wesen der Erfindung besteht im Einsatz der sehr unspezifisch wirkenden Thermitase, einer Endopeptidase aus Thermoactinomyces vulgaris. Zur Partialhydrolyse wird eine 2 - 15 %ige Proteinloesung bei pH 6,0 - 8,5 waehrend 4 - 8 h mit 35000 - 60000 TE Thermitase/kg Protein behandelt. Danach wird das Hydrolysat zur Inaktivierung des Enzyms einige min auf 95 - 100 °C erhitzt, nach dem Abkuehlen filtriert oder separiert und anschließend sprueh- oder gefriergetrocknet. Das Anwendungsgebiet der Protein-Partialhydrolysate erstreckt sich vorwiegend auf Elementardiäten und Sondennahrungen fuer Patienten mit Verdauungsstoerungen.

Erfinder: Dr. Ulrich Behnke
Dr. Manfred Friedrich
Prof. Dr. Heinz Ruttloff
Reinfried Mooz
Prof. Dr. Rudolf Noack

Verfahren zur Herstellung von Protein-Partialhydrolysaten für Diätnahrungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Protein-Partialhydrolysaten, die im wesentlichen aus niedermolekularen Peptiden bestehen und praktisch frei von trichloressigsäure fällbaren hochmolekularen Anteilen sind.
Das Anwendungsgebiet dieser Protein-Partialhydrolysate erstreckt sich vorwiegend auf Elementardiäten und Sondennahrungen für Patienten mit Verdauungsstörungen z. B. Maldigestion,Malabsorption, entzündliche Magen-, Pankreas- oder Darmerkrankungen, prea- und postoperative Zustände des Gastro-Intestinaltraktes sowie für Frühgeborene und Säuglinge.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei der Beurteilung der bekannten Verfahren zur Gewinnung von Protein-Partialhydrolysaten ist das vorgesehene An-

wendungsgebiet zu berücksichtigen.
Es sind verschiedene ballaststoffarme oder-freie, bilanzierte, orale Diäten bekannt, die aus ernährungsphysiologischen Gründen abgebautes Protein enthalten und z. B. bei Störungen im Gastro-Intestinaltrakt eingesetzt werden. Ziel dieser Ernährungsform ist eine vollständige Absorption der aufgenommenen Nahrung, wozu eine verminderte oder nicht mehr notwendige enzymatische Verdauungsleistung beiträgt. In der Mehrzahl der Fälle werden hierfür Protein-Totalhydrolysate eingesetzt, wobei zur Hydrolyse Salz- oder Schwefelsäure verwendet wird. Sofern sie nur freie Aminosäuren und keine Peptide enthalten, können sie auch für die parenterale Ernährung eingesetzt werden. Für die meisten Indikationen ist es jedoch nicht erforderlich, Protein-Totalhydrolysate oder Aminosäuremischungen zur Deckung des Aminosäurebedarfes einzusetzen.

Die Herstellung und Anwendung von enzymatischen Proteinpartialhydrolysaten wird im GB-Pat. 1 338 936 beschrieben. Danach wird Kasein mit Papain 18 h bei pH 6,7 vorhydrolysiert und danach mit Nierenhomogenat (1 Teil Nierenstickstoff pro 25 Teile Kaseinstickstoff) 24 h bei pH 8,0 unter Zusatz einer kleinen Menge $MnCl_2$ bebrütet. Das Präparat wird für Patienten mit Maldigestion, cystischer Fibrose, Niereninsuffizienz, Magengeschwüren und ähnlichen Symptomen empfohlen. Als Vorteil wird hierbei ein hoher Gehalt an freien Aminosäuren (etwa 50 % des Stickstoffs liegen in dialysierbarer Form vor) sowie eine nur sehr geringe Bitterkeit angegeben. Als Nachteile sind die sehr langen Hydrolysezeiten sowie die Einbeziehung einer relativ großen Menge Nierenhomogenat als zusätzliche Enzymquelle zu nennen.

Durch einen Zusatz von Gelatine zu anderen Proteinen, insbesondere Molkenprotein, im Verhältnis 1 : 10 bis 10 : 1 und Hydrolyse mit Pankreatin wird nach DD-AP 118 519 ein leicht lösliches, nicht bitteres Hydrolysat erhalten, das u. a. als Zusatz für Kindernährmittel, diätetische Lebens-

mittel und für Arzneimittel geeignet ist. Die Gelatine soll dabei zu Peptidbruchstücken aus 30 - 40 Aminosäureresten gespalten werden. Für den vorgesehenen Zweck sind Diäten mit Peptiden solcher Molekülgröße kaum geeignet.

Im DD-AP 120 791 wird ein trockenes emulgierfähiges bzw. als Emulsion vorliegendes, ernährungsphysiologisch vollwertiges Diätnahrungspräparat beschrieben, dessen Aminosäureanteil in Form eines enzymatischen Proteinhydrolysates mit Molekulargewichten der Peptide zwischen 400 und 1000 (maximal 2000) vorliegt. Der Gehalt an freien Aminoräuren soll vorzugsweise zwischen 0 und 1,5 % liegen und wird z. T. in Form freier essentieller Aminosäuren zugesetzt.

Zur Herstellung eines Proteinhydrolysats wird nach DE-OS 2 521 814 Fischproteinkonzentrat mit Pankreatin während 15 h hydrolysiert und danach filtriert, wobei das im System vorliegende Kalziumphosphat - $Ca(OH)_2$ und H_3PO_4 werden zur pH-Einstellung verwendet - als Filterhilfsmittel dient. Nach Behandlung mit Tierkohle wird sprühgetrocknet. Das Produkt ergibt eine farblose Lösung ohne feststellbaren Geschmack.

Im US-Patent 3 969 540 wird die Herstellung von salzfreien, unlöslichen Metallproteinaten angegeben. Hierbei erfolgt zunächst eine Hydrolyse von proteinreichen tierischen Geweben (Muskel, Herz, Leber, Thymus, Gehirn, Milz, Niere, Duodenun, Pankreas und Hoden) mit Protease (z. B. Pepsin, Pankreatin, Trypsin, Papain, Bromelin, Bakterienprotease, Pilzprotease) im Verlauf von 2 h bis 5 Tagen, danach wird das jeweilige Metallsalz zugegeben und das unlösliche Chelat gewaschen.

Ein Nährpräparat aus mit bekannten Proteasen hydrolysiertem tierischem Kollagen (vorzugsweise Haut von Schweinemägen) und Zusätzen von Tryptophan, Citronensäure, Sorbit, künstlichen Süßungsmitteln, Glycerin, Farbstoffen, Geschmacksmitteln und Konservierungsmitteln sowie gegebenenfalls

eines festen Trägers (z. B. Dikalziumphosphat, Mannit) wird in der DD-OS 2 621 000 beschrieben. Es wird als wohlschmeckende Zusatzkost zur Verhinderung von Ernährungsmängeln verschiedener Genese, z. B. nach chirurgischen Eingriffen und insbesondere bei der Krebstherapie, empfohlen. Für die vorgesehenen Zwecke ist das Kollagenhydrolysat trotz der Tryptophanergänzung auf Grund mangelnder essentieller Aminosäuren sowie der nicht angegebenen Peptidgröße nicht geeignet.

Die genannten Beispiele von bekannten Verfahren zur Herstellung von enzymatischen Protein-Partialhydrolysaten für diätetische Zwecke, insbesondere für Elementardiäten, verdeutlichen die noch bestehenden Mängel.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in einer vereinfachten Verfahrensweise ohne zusätzliche Reinigungsoperationen ein Proteinpartialhydrolysat herzustellen, das frei von höhermolekularen Peptidanteilen und für eine Verwendung in Elementardiäten und Sondennahrungen geeignet ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, bei denen als Reaktionsprodukt unter Vermeidung eines nachträglichen Zusatz essentieller Aminosäuren eine hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung ernährungsphysiologisch vollwertige Mischung niedermolekularer Peptide entsteht. Aufwendige Reinigungsoperationen sollen wegfallen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein reines Protein für die Hydrolyse herangezogen, das frei von unerwünschten, löslichen Bestandteilen ist und alle notwendigen, insbesondere essentiellen Aminosäuren, enthält. Als Protein kommt vorzugsweise Kasein in Betracht, das in der milchverarbeitenden Industrie rein anfällt. Ebenfalls geeignet sind auch andere vorgereinigte Proteine oder Pro-

teinmischungen, die den genannten Kriterien entsprechen, z. B. Leguminosenproteinisolate, gegebenenfalls im Gemisch mit Kasein. Die enzymatische Proteinhydrolyse wird bis zum vollständigen Abbau der Proteine zu niedermolekularen Peptiden durchgeführt.

Erfindungsgemäß wird zur Partialhydrolyse der eingesetzten Proteine die gegenüber Peptidbindungen sehr unspezifische Endopeptidase "Thermitase" aus Thermoactinomyces vulgaris (Herstellung der Thermitase vgl. DD-WP 112 662 und DD-WP 117 083) zur Einwirkung gebracht.

Thermitase spaltet Proteine in ein Gemisch, das überwiegend aus Di- und Tripeptiden sowie geringen Anteilen freier Aminosäuren besteht.

Nach neuesten physiologischen Erkenntnissen können Peptide dieser Größe aus dem Darmlumen intakt, also ohne zusätzliche peptidatische Spaltung, absorbiert werden. Diese Befunde lassen sich durch in-situ-Perfusion des Rattendünndarms mit thermitatischen Proteinhydrolysaten bestätigen. Sie zeigen weiterhin, daß thermitatische Proteinhydrolysate mit mindestens gleicher Geschwindigkeit wie äquimolare Gemische freier Aminosäuren aufgenommen werden und, daß das Absorptionsprofil der aufgenommenen Aminosäuren gleichmäßiger als nach Absorption von Aminosäuregemischen ist. Entsprechende Resultate wurden nach kontinuierlicher Perfusion jejunaler Darmabschnitte von darmgesunden und darmgeschädigten Säuglingen erhalten.

Die hohe Unspezifität und damit unvorhersehbar günstige Eignung dieser Protease geht z. B. aus einem Vergleich der Spaltbarkeit von Peptidbindungen der oxydierten Insulin-B-Kette durch verschiedene Endpeptidasen hervor:

Protease	Anzahl der spaltbaren Bindungen
Trypsin	2
Chymotrypsin	4
Alcalase (alkalische Bac.licheniformis-Protease; Subtilesin Carlsberg)	5

Neutrase (neutrale Bac. subtilis-Protease)	6
Bac. megaterium	7
Pepsin	10
Papain	10
Cytophaga-Protease	11
Thermitase	15

Erfindungsgemäß wird eine 2 - 15 %ige Proteinlösung, vorzugsweise 10 %ige Lösung eines alle notwendigen, insbesondere essentielle Aminosäuren enthaltenden Proteins mit Natronlauge auf pH 6,0 - 8,5, vorzugsweise pH 8 eingestellt und auf 50 - 60 °C erwärmt. Zur Hydrolyse werden je kg Protein 35 000 - 60 000 TE Thermitase (1 TE = Aktivität, die in 1 min bei 55 °C und Kasein als Substrat 1 mol Tyrosin freisetzt) zugesetzt und unter den genannten Bedingungen 4 bis 8 h, vorzugsweise 5 bis 7 h, bebrütet.

Zur besseren Ausnutzung der Wirksamkeit des Enzyms ist es zweckmäßig, während der Hydrolyse den pH-Wert durch kontinuierliche (pH-Stat) oder diskontinuierliche Zugabe von Natronlauge konstant zu halten. Zur Verhinderung des Anstiegs der Keimzahlen läßt sich gewünschtenfalls ein geeignetes Bakteriostatikum (z. B. 0,1 - 0,3 % Toluol oder Chloroform) zusetzen, das bei der Aufarbeitung des Präparates wieder entfernt wird.

Nach der erreichten Partialhydrolyse wird zur Inaktivierung des Enzyms für etwa 5 min auf 95 - 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird - gegebenenfalls nach Einengen im Vakuum - filtriert oder separiert und sprüh- oder gefriergetrocknet. Man erhält ein farbloses, leicht lösliches Pulver, das in seiner Aminosäurezusammensetzung derjenigen des Ausgangsproteins entspricht. Der Hydrolysegrad des Präparates liegt bei 20 - 40 %, d. h. von 100 Peptidbindungen z. B. des Kaseins, sind 30 - 40 gespalten. Die mittlere Peptidkettenlänge beträgt dann

$$\frac{100}{\text{Hydrolysegrad}}$$

und liegt bei 2,5 - 3,3.

Die Bestimmung des Hydrolysegrades erfolgt z. B. durch Messung der freien NH_2-Gruppen mit Trinitrobenolsulfonsäure (TNBS).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch das nachfolgende Beispiel erläutert.

Beispiel 1

1 kg Kasein (mit Schwefelsäure gefällt; Proteingehalt 86,0 %) wird in 10 l Wasser suspendiert und mit 5 N Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt. Hierzu sind 190 ml erforderlich. Die Lösung wird auf 55 °C erhitzt und zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums mit 25 ml Chloroform versetzt. Danach wird eine Lösung von 50 000 TE Thermitase in 200 ml Wasser zugegeben und zur Hydrolyse des Proteins 6 h bei 55 °C gerührt. Zunächst wird alle 10 min, nach 1 h alle 30 min und ab 2 h alle 60 min der pH-Wert mit 5 N Natronlauge auf pH 8,0 nachgestellt.
Nach Ablauf der Hydrolysezeit wird zur Inaktivierung des Enzyms auf 95 - 100 °C erhitzt und etwa 5 min bei dieser Temperatur belassen. Die Hydrolysatlösung wird danach auf Raumtemperatur abgekühlt und klar filtriert. Das Filtrat wird sprühgetrocknet und das weiße Pulver besitzt folgende Kennzahlen: Ausbeute 0,91 kg; Peptidgehalt (N . 6,37) 81,2 %; Hydrolysegrad 34,1 %; mittlere Kettenlänge der Peptide 2,9.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Protein-Partialhydrolysaten für Diätnahrungen durch enzymatische Hydrolyse von Proteinen, die alle notwendigen, insbesondere essentielle Aminosäuren enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß als Enzym Thermitase, eine Protease aus Thermoactinomyces vulgaris, als einziges Enzympräparat eingesetzt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine 2 bis 15 %ige, vorzugsweise 10 %ige Proteinlösung, zur Partialhydrolyse verwendet wird.

3. Verfahren nach Punkt 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteinlösung auf pH-Werte zwischen 6,0 und 8,5, vorzugsweise auf pH 8,0, eingestellt wird.

4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert von vorzugsweise 8,0 während der Hydrolyse durch kontinuierliche oder diskontinuierliche Zugabe von Natronlauge während der Hydrolyse beibehalten wird.

5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Hydrolyse je kg Protein 35 000 bis 60 000 TE Thermitase, vorzugsweise 50 000 TE Thermitase, eingesetzt werden.

6. Verfahren nach Punkt 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrolysedauer 4 bis 8 h, vorzugsweise 5 bis 7 h beträgt.

7. Verfahren nach Punkt 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Inaktivierung des Enzyms das Partialhydrolysat nach der Hydrolyse für etwa 5 min auf 95 bis 100 °C erhitzt wird.

8. Verfahren nach Punkt 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Partialhydrolysat nach Abkühlung filtriert oder separiert und anschließend sprüh- oder gefriergetrocknet wird.