



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 61611

(45)^C Patentti myönnetty 10 09 1932
Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ A 23 C 21/00, A 23 J 1/20

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	752935
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	21.10.75
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	21.10.75
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	23.04.76
(44) Nähtävöksiänon ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.05.82
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	22.10.74

Ranska-Frankrike(FR) 7435496
Toteennäytetty-Styrkt

- (71) UCALMA, Sottevast 50820 Brix (Manche), Ranska-Frankrike(FR)
(72) Jean-Marie Eustache, Martinvast (Manche), Ranska-Frankrike(FR)
(74) Leitzinger Oy
(54) Menetelmä N-asetyylineuramiinihapon talteenottamiseksi proteiinikonsentraatista - Förfarande för tillvaratagande av N-acetylneuraminsyra ur ett proteinkoncentrat

Oheisen keksinnön kohteena on menetelmä N-asetyylineuramiinihapon talteenottamiseksi proteiinikonsentraatista, joka on saatu käsittelemällä märehtijän maidosta juustoa valmistettaessa saatua heraa, joka ultrasuodatetaan.

Juuston valmistuksesta saatu hera on tunnetusti kellertävä neste, joka, sen jälkeen, kun siitä on poistettu sentrifugoimalla rasva-aineet, koostuu pääasiassa laktoosista, proteiineista ja mineraalisuoloista.

Juuston valmistuksesta saadun heran käsittelemiseksi on jo ehdotettu menetelmiä, joissa poistetaan sen epäpuhtauksia aiheuttavat ominaisuudet ja saadaan talteen sen sisältämät proteiinit. Heraa muodostuu nimittäin suuria määriä meijereissä, joissa juustoa valmistettaessa hera erotetaan maidosta entsymaattisen reaktion jälkeen ja erityisesti sen jälkeen, kun maito on tunnetulla tavalla juoksutettu juoksuttimella. Proteiinit on tällöin ehdotettu erotettavaksi herasta ultrasuodattamalla.

Tähän mennessä on kuitenkin ultrasuodatusta käytetty ainoastaan eräiden tiettyjen proteiinien tai muiden epäpuhtauksien, jotka sinänsä ovat erittäin mielenkiintoisia, erottamiseen ja talteenottamiseen.

Näin on laita esimerkiksi sialihapon kohdalla, jota kutsutaan myös neuramiinihapoksi (kts. esimerkiksi MERCK Index, 7. painos, sivu 715). Sialihappoa esiintyy tunnetusti eläimillä hiilihydraattiproteiini- ja lipoproteiini-kompleksissa. Näitä yhdisteitä valmistetaan nykyään luonnon raaka-aineista, kuten härkien alaleuan rauhasista, munista tai syntetisoimalla.

Tätä aluetta koskevana kirjallisuusviitttenä voidaan mainita N.W. Whitehouse'in ja F. Zilliken'in kirjoitus, "Isolation and Determination of Neuraminic (sialic) acids", s. 199-220 teoksessa "Methods of Biochemical Analysis" volyymi VII (1960) Interscience John Wiley Sons.

Nämä tunnetut sialihapon valmistusmenetelmät ovat erittäin kalliita, mikä vaikuttaa tämän tuotteen myyntihintaan kaupoissa.

Kirjallisuusviitteinä, jotka valaisevat sialihapon ja erityisesti N-asetyylineuramiinihapon (lyhennys NANA) käyttöä, voidaan mainita seuraavat kirjoitukset:

"Coagulation du lait par la présure: Aspects scientifiques et techniques"

GARNIER, MOCQUOT, RIBADEAU - DUMAS, MAUBOIS - ANN de Nutrition Alimentaire, 1968, 22, B 495 - B 552.

SVENNERHOLM L. Acta Soc. Med. Upsaliensis, 61, 75 (1956)

Akiv. Kemi., 10, 577 (1956)

WARREN L.J. Bil. Chem. 233, 1971 (1959)

WERNER, I. ja L. Odin, Acta Soc. Med. Upsaliensis 57, 230 (1952)

AMINOFF, D. (1961) BIOCHEM J. 8L, 384.

"Sensitivity of the Neuraminosidic Linkage in Mucosubstances towards Acid and towards Neuraminidase Gibbons"

Biochemistry journal (1963) 89, 380

"Structure studies on the Myxovirus Hemagglutination Inhibitor of Human Erythrocytes"

Ralph H. Kathan ja Richard J. Winzler.

Journal of Biological Chemistry (1963) Vol 238 N^o 1 s. 21
"Studies on the Neuraminidase of Influenza virus II additional
properties of the enzymes from the Asian and PR 8 Strains"
Max E Rafelson, J.R. Michael Schneir ja Wannie W. Wilson, J.R.
Archives of Biochemistry and Biophysics 103 (1963) 424-230.

Muita mahdollisia sialihapon käyttöaloja annetaan tätä yhdistettä
käsittelevässä kirjallisuudessa.

Sitä paitsi on glykoproteiinien valmistus mielenkiintoista, ottaen
huomioon, että niitä on mahdollista käyttää kosmeettisissa seoksissa.

Oheisen keksinnön tavoitteena on saada aikaan sellainen juuston val-
mistuksesta saadun heran käsittelymenetelmä, jonka avulla on mahdol-
lista saada hyvin halvalla N-asetyylineuramiinihappoa, yhdessä glyko-
peptidien ja glykoproteiineista muodostuvan proteiinifraktion kanssa.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, että
(a) herasta saostetaan muut proteiinit kuin sialiglykoproteiinit
pitämällä hera 30 min. noin 95°C:ssa tai pidemmän aikaa alhaisemmassa
lämpötilassa, ja erotetaan saostuneet proteiinit liuoksesta;
(b) ultrasuodatetaan saatu liuos membraanien läpi joiden huokoskoko
on 1000 - 15 000 ilmaistuna molekyylipainona;
(c) ultrasuodatuksessa saatu konsentraatti erotetaan ja hydrolysoi-
daan entsyymaattisesti tai emäksellä tai hapolla, jolloin muodostuu
sakka ja liuos, jotka erotetaan ja otetaan talteen;
(d) neutraloidaan vaiheessa (c) saatu liuos ja uutetaan sen sisältämä
N-asetyylineuramiinihappo johtamalla liuos kationinvaihtohartsin ja
anioninvaihtohartsin läpi, näin sidottu happo eluoidaan ja otetaan
talteen.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään märehtijän (lehmä, vuohi,
lammas, puhveli tai vastaava) tuottamaa maitoa, esimerkiksi lehmän-
tai lampaanmaitoa, joka on käsitelty entsyymaattisesti, esimerkiksi
juoksuttamalla juoksuttimella, jolloin saadaan mainittu juuston val-
mistuksessa saatu hera. Tämä nestemuotoinen hera voidaan saada lisää-
mällä vettä jauhemuotoiseen heraan. Eräänä keksinnön muunnoksena tulee
myös mainita, että keksinnön mukaista menetelmää sovellettaessa voi-
daan raaka-aineena käyttää ternimaitoa.

Keksinnön mukaisen menetelmän ensimmäisessä vaiheessa (vaihe "a") tapahtuu selektiivinen denaturointi termisesti saostamalla liukenevat proteiinit niin korkeassa lämpötilassa ja niin kauan, että tällainen saostuminen tapahtuu. Albumiinit ja globuliinit saostetaan ja pääliliuoksessa säilytetään peptoniproteaasit, jotka ovat glykoproteiineja. Lämmittäminen on tarkoituksenmukaista suorittaa suhteellisen korkeissa lämpötiloissa, joiden kuitenkin tulee olla alle 100°C , jotta vältettäisiin glykoproteiinien denaturoituminen. Kun lämpötilat ovat alhaisempia, tulee lämmittämisaikaa pidentää. Olosuhteet, jotka on havaittu sopiviksi käytännössä ja jotka sitä paitsi ovat tavallisia tämän tyyppisissä töissä, muodostuvat siitä, että lämmitetään 30 minuuttia 95°C :ssa. Vaiheessa "a" saadut saostetut proteiinit erotetaan jollain tavanomaisella menetelmällä, esimerkiksi sentrifugoimalla, ja otetaan sen jälkeen talteen. Pääliliuos otetaan talteen seuraavassa vaiheessa tapahtuvaa keksinnön mukaista käsittelyä varten.

Vaiheessa "b" liuos käsitellään ultrasuodattamalla membraanien läpi, joiden huokoskoko on noin 1000 - 15 000 ilmaistuna molekyypainona. Membraanit, joita voidaan käyttää, ovat tunnetun tyyppisiä orgaanisia tai epäorgaanisia tai jopa keraamisia tai metallisia edellyttäen, että niiden ominaisuudet vastaavat seuraavassa annettua haluttua huokoskokoa.

Esimerkiksi voidaan käyttää membraaneita, joita myy Rhone-Poulenc-yhtiö nimellä "IRIS", esimerkiksi membraania, jonka merkintä on "IRIS 3042", ja jonka huokoskoko on 15000, ultrasuodatuslaitteissa, joita mainittu yritys myös valmistaa. Voidaan käyttää myös membraaneja, joita myy AMICON (EUA) yhtiö nimellä "DIAFLO", esimerkiksi membraaneja, joiden merkintä on "DIAFLO PM 10 ja UM" (huokoskoko on 10000) ja "DIAFLO UM 2" (huokoskoko on 1000). Tarvittaessa voidaan löytää kaikki tarvittavat tiedot mainittujen membranien ominaisuuksista ja käyttötavoista valmistajien teknisistä esitteistä.

Ultrasuodatuksen olosuhteet ovat ammattimiehelle tuttuja. Suositeltavaa on, että nestettä kierrätetään ultrasuodatuslaitteesta sen saattamiseksi kosketukseen membraanin kanssa lämpötilassa lähellä huoneen lämpötilaa ja tietyssä paineessa, esimerkiksi 3 bar. Membraanin läpi kierrätetty tuote voidaan kierrättää takaisin useita kertoja, kunnes saadaan konsentraatti, joka sisältää glykoproteiineja ja NANA:n halutun pitoisuuden.

Tämä konsentraatti voidaan edelleen väkevöidä siten, että saadaan glykoproteiineja sisältävä, siirappimainen aine. Sialihapon uuttamiseksi käsitellään konsentraattia vaiheessa "c", joka muodostuu hydrolyysistä. Tämä voi olla hapanta, emäksinen tai entsymaattinen hydrolyysi. Hapanta hydrolyysiä pidetään kuitenkin parhaana. Hydrolyysinopeuden lisäämiseksi toimitaan parhaiten suhteellisen korkeassa lämpötilassa, mutta kaikissa olosuhteissa alle 98°C:ssa, esimerkiksi noin 90°C:ssa. Käytetyn hydrolyyttisen aineen pitoisuuden ei yleensä tulisi olla suurempi kuin 0,5 N. Käytetään edullisesti rikkihappoa, esimerkiksi 0,1 N rikkihappoa. Tämä muodostaa nimittäin sulfaatti-ioneja, jotka myöhemmin voidaan helposti erottaa. Suolahappo sopii huonommin, koska siitä muodostuu kloori-ioneja, jotka on vaikea myöhemmin poistaa. Seos, joka hydrolysoitaessa muodostuu, jäähdytetään, esimerkiksi jääkaapin lämpötilassa, joka on noin 4°C. Tämän jälkeen on helpompi tunnetuin menetelmin erottaa sakka ja pääliliuos, esimerkiksi sentrifugoimalla. Pääliliuos otetaan talteen ja hydrolyysissä muodostunut sakka käsitellään täydentävässä vaiheessa "d", joka mahdollistaa sialihapon uuttamisen, tarkemmin sanoen NANA:na.

Keksinnön mukaisesti käytetään juuston valmistuksesta saadun heran tässä käsittelyvaiheessa sialihapon tunnettuja valmistusmenetelmiä. Ensin neutraloidaan pääliliuos, minkä tarkoituksena on saada vielä pääliliuoksessa olevat vapaat happoionit saostumaan suoloina. Tämä toimenpide suoritetaan edullisesti lisäämällä ylimäärä bariumhydroksidia sulfaatti-ionien saostamiseksi, jos hydrolyysi on suoritettu rikkihapolla. Bariumioneja käytetään ylimäärää, kunnes pH on lähellä neutraalia reaktiota. Tämän jälkeen heitetään pois muodostuneet saostuneet suolat, esimerkiksi bariumsulfaatti, ja pääliliuos säilytetään. Mahdollisesti tämä väkevöidään ennen ioninvaihtopylväiden läpijohtamista. Pääliliuos saa ensin kulkea kationinvaihtohartsin läpi pääli-

liuksen demineralisoimiseksi. Käytetään esimerkiksi hartseja, joita on markkinoilla saatavissa nimellä "DOWEX", esimerkiksi tyyppiä AG 50 WX 8 H +. Kationinvaihtohartsin läpi kulkemisen jälkeen johdetaan tuotteet NANA:n sitomiseksi anioninpoistohartsia sisältävän pylvään läpi. Käytetään tarkoituksenmukaisesti hartsia, joka on markkinoilla kaupallisesti saatavissa nimellä "DOVEX", tyyppi AG 1 X 8 formiaattimuodossa. Sen jälkeen, kun pylväs on pesty tislatusella vedellä saadaan NANA mainitusta anioninvaihtohartsista eluoimalla, esimerkiksi muura- haishapolla, jos aikaisemmin on käytetty anioninvaihtohartsia formi- aattimuodossa, esimerkiksi 0,3 M muurahaishapolla. Lopuksi saadaan liuos, josta kylmäkuivaamalla saadaan puhdasta NANA-jauhetta.

Käsittelyvaiheen "d" muodostavat työvaiheet voivat olla erilaatuisia. Neutraloinnin, bariumsulfaatin erottamisen ja pääliliuoksen kirkasta- misen jälkeen tämä voidaan esimerkiksi haihduttaa. Saatu jauhe käsi- tellään tämän jälkeen liuotinuutolla, so. se sekoitetaan liuottimen tai liuotinten seosten kanssa, joihin NANA liukenee, esimerkiksi eta- nolin tai asetonin- vesi- seoksen kanssa. Uutettu NANA erotetaan tämän jälkeen liuottimen poistamisen jälkeen.

Eräissä menetelmän suositellussa suoritustavassa on myös mahdollista suorittaa vapaiden happoionien saostaminen hydrolyysin jälkeen, so. ennen sialihapottomien proteiinien poistamista. Tätä varten liuos, jonka lämpötila on hydrolyysin jälkeen noin 50 - 80°C ja mieluiten noin 70 - 80°C, esimerkiksi noin 80°C, neutraloidaan pH-arvoon 7-7,5.

Kuten edellä on jo mainittu, voidaan hydrolyysi suorittaa hapanta, emäksistä tai entsyymaattista tietä. Hapanta hydrolyysiä pidetään parhaana ja käytetään edullisesti rikkihappoa. Siinä tapauksessa, että käytetään viimeksi mainittua happoa, suoritetaan neutralointi bariumhydroksidin tai baryytin ylimäärällä.

Kirkastamisen, jonka tarkoitus on poistaa raskas bariumsulfaattisakka, jälkeen, käsitellään liuos ultrasuodatusvaiheessa johtamalla membraa- nin läpi, jonka huokoskoko on noin 500 - 15000.

Vaiheessa "d" voidaan liuos käsitellä tavalla, joka on kuvattu SF- patenttihakemuksessa 752934, so. johtamalla ensin kationinvaihtohart-

sin ja sen jälkeen anioninvaihtohartsin läpi.

Saatu ultrasuodos voidaan käsitellä vaiheen "d" mukaan, joka edellä on kuvattu valmistettaessa puhdasta sialihappoa, so. johtamalla ensin kationinvaihtohartsin ja sen jälkeen anioninvaihtohartsin läpi.

Keksinnön mukaisen menetelmän eräässä erityisessä suoritusmuodossa on myös mahdollista saada puhtaudeltaan alhaisempaa sialihappoa haihuttamalla liuos, joka on saatu kationinvaihtohartsin läpijohtamisen jälkeen.

Näin eristetty sialihappo, jonka valmistuskustannukset ovat alhaisemmat kuin puhtaan hapon, voi olla erityisen mielenkiintoinen tietyillä käyttöaloilla, esimerkiksi kosmeettisilla aloilla, joissa ei tarvita ehdotonta puhtautta.

Tällä tavoin saadun sialihapon puhtaus on noin 60 - 90 % ja voi olla esimerkiksi noin 70 %. Ammattimiehet tietävät, että tätä puhtausastetta on mahdollista muunnella vähintään kolmen parametrin funktiona, esimerkiksi:

- glykoproteiinien puhtausaste ensimmäisessä ultrasuodatuksessa,
- hydrolyysin olosuhteet,
- toisen ultrasuodatuksen membraanin ominaisuudet, jolloin käyttämällä pienempää huokoskokoa saadaan puhtaampaa ultrasuodosta.

Keksinnön mukaista menetelmää havainnollistetaan mukaanliitetyissä taulukoissa, jotka kahtena suoritusmuotona esittävät vaiheiden suoritusjärjestystä menetelmää käytännössä toteutettaessa ja aineiden kierättämistä. Nämä taulukot valaisevat selvästi menetelmää. On huomattava, että käyttökelpoisena lähtöaineena käytetään joko juuston valmistuksesta saatua heraa B tai heraa B, joka on regeneroitu jauhemaisesta herasta B' lisäämällä vettä, tai ternimaitoa A'. Menetelmässä saadut eri jakeet muodostuvat proteiineista, jotka on erotettu saostamisen 1 jälkeen, glykoproteiineista, jotka voidaan saada väkevöimällä konsentraatti 5, joka on muodostunut ultrasuodatuksessa 4, ja lopuksi eristetyistä NANA:sta, joko taulukon I kaavion mukaisesti hydrolysoimalla (6) konsentraatti, jäähdyttämällä (7) noin 4°C:een, neutraloimalla pääliliuos (9) ja johtamalla kirkastettu pääliliuos

kationinvaihtohartsin (14) ja anioninvaihtohartsin (15) läpi sekä kylmäkuivaamalla (18), tai taulukon II mukaisesti hydrolysoimalla konsentraatti, jäähdyttämällä noin 80°C:een, ultrasuodattamalla ja johtamalla ultrasuodos kationinvaihtohartsin läpi, sekä ottamalla taulukon I kaavion mukaisesti talteen puhtaudeltaan noin 40 %:sta NANA:a anioninvaihtohartsin läpijohtamisen jälkeen.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavin esimerkein:

Esimerkki 1

Tunnetulla tekniikalla juoksetettiin 1000 litraa lehmänmaitoa, jolloin saatiin 900 litraa nestemäistä heraa, jota kävttiin menetelmässä lähtöaineena.

900 litraa nestemäistä heraa lämmitettiin 95°C:ssa 30 minuuttia muiden proteiinien kuin sialiglykoproteiinien saostamiseksi, minkä jälkeen tällä tavoin saostetut proteiinit erotettiin sentrifugoimalla. Säilytettiin saostuksesta saatu pääliliuos, jonka tilavuus oli 95 % alkuperäisestä tilavuudesta ja joka sisälsi 173 g NANA.

Tämän jälkeen tämä pääliliuos johdettiin ultrasuodatuslaitteeseen, joka oli varustettu membraanilla, jonka huokoskoko oli 3000. Paine ultrasuodatuslaitteessa oli noin 3 bar. Näin saatiin konsentraatti, joka sisälsi kaikki glykoproteiinit ja 90 g NANA. Väkevöimällä tätä konsentraattia edelleen saatiin siirappimaista glykoproteiineista muodostuvaa ainetta, jota voitiin käyttää tässä muodossa.

Sialihapon uuttamiseksi käsiteltiin konsentraattia, mieluummin jatko- väkevöinnin jälkeen, happamalla hydrolyysillä lisäämällä 0,1 N rikkihappoa ja hydrolyysin olosuhteet säilytettiin tunnin ajan 90°C:ssa.

Saostumisen helpottamiseksi jäähdytettiin hydrolysoitu reaktioseos jääkaapin lämpötilaan, noin 4°C:een. Tämän jälkeen oli helppo erottaa poisheitettävä sakka pääliliuoksesta, joka erotettiin. Tämä sisälsi noin 80 g NANA. Tämän jälkeen pääliliuos käsiteltiin neutraloimalla se kyllästetyllä bariumhydroksidiliuoksella pH-arvoon 7, jolloin bariumsulfaatti saostui. Liuos kirkastettiin ja muodostunut barium-

sulfaatti heitettiin pois. Pääliliuos, joka sisälsi 80 g NANA, säilytettiin ja väkevöitiin sen jälkeen pyöröhaihduttimessa 45°C:ssa ja tyhjössä, jonka paine oli 20 - 30 mm Hg. Näin väkevöity pääliliuos johdettiin demineralisointia varten pylvääseen, joka oli täytetty kationinvaihtohartsilla "DOWEX", tyyppi AG 50 WX 8 H +. Kationinvaihtopylväästä poistuva tuote johdettiin sen jälkeen NANA:n sitomiseksi anioninvaihtohartsipylvään läpi, joka sisälsi "DOWEX"-hartsia, tyyppi AG 1 X 8 formaattimuodossa. Anioninvaihtohartsia sisältävä pylväs pestiin tämän jälkeen kahdesti tislatusella vedellä, minkä jälkeen NANA eluoitiin 0,3 M muurahaishapolla. Tällä tavoin saatiin talteen 70 % sitoutuneesta NANA:sta. Kylmäkuivaamalla muurahaishappoliuos saatiin 45 g jauhemaista puhdasta NANA:ta.

Esimerkki 2

Toimittiin samoissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1, mutta käytettiin 1000 litraa lampaanmaitoa. Tulokset olivat suurin piirtein samanlaiset.

Esimerkki 3

Toimittiin samalla tavoin kuin esimerkissä 1, mutta käytettiin nestemäistä heraa, joka oli saatu regeneroimalla jauhemaista heraa. Tätä tarkoitusta varten käytettiin 50 kg jauhemaista heraa, joka laimennettiin 900 litraksi nestemäistä heraa.

Esimerkki 4

Saostaminen suoritettiin lämmittämällä 1000 litraa nestemäistä heraa. Kirkas suodos, joka saatiin sentrifugoimalla ja suodattamalla, käsiteltiin ultrasuodattamalla membraanin läpi, jonka merkintä oli RP (IRIS 3042). Saatu konsentraatti (20 litraa) sisälsi 40 g/litra glykoproteiineja, jotka voitiin ottaa talteen kuivaamalla ja kylmäkuivaamalla.

Konsentraatti väkevöitiin 90°C:ssa ja 0,025 N rikkihapolla 25 minuutin aikana ja neutraloitiin tämän jälkeen 80°C:ssa ylimäärällä baryyttiä pH-arvoon 7-7,5.

Kirkastamisen jälkeen käsiteltiin liuos, josta bariumsulfaatti oli poistettu saostamalla, ultrasuodattamalla membraanin läpi, jonka huokoskoko oli 5000.

Saatu ultrasuodos väkevöitiin ja johdettiin tämän jälkeen kationinvaihtohartsin läpi. Saatu liuos voitiin kuivata niin, että saatiin 50 g sialihappoa (NANA) (puhtaus: 70 %), tai se käsiteltiin kromatograafisesti anioninvaihtohartsilla, eluoitiin ja kylmäkuivattiin, jolloin oli mahdollista saada 35 g puhdasta NANA:ta.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä N-asetyylineuramiinihapon talteenottamiseksi proteiini-konsentraatista, joka on saatu käsittelemällä märehtijän maidosta juustoa valmistettaessa saatua heraa, joka ultrasuodatetaan t u n n e t t u siitä, että

- (a) herasta saostetaan muut proteiinit kuin sialiglykoproteiinit pitämällä hera 30 min. noin 95°C:ssa tai pidemmän aikaa alhaisemmassa lämpötilassa ja erotetaan saostuneet proteiinit liuoksesta;
- (b) ultrasuodatetaan saatu liuos membraanien läpi joiden huokoskoko on 1000 - 15 000 ilmaistuna molekyylipainona;
- (c) ultasuodatuksessa saatu konsentraatti erotetaan ja hydrolysoidaan entsymaattisesti tai emäksellä tai hapolla, jolloin muodostuu sakka ja liuos, jotka erotetaan ja otetaan talteen;
- (d) neutraloidaan vaiheessa (c) saatu liuos ja uutetaan sen sisältämä N-asetyylineuramiinihappo johtamalla liuos kationinvaihtohartsin ja anioninvaihtohartsin läpi, näin sidottu happo eluoidaan ja otetaan talteen.

Patentkrav

1. Förfarande för tillvaratagande av N-acetylneuraminsyra ur ett proteinkoncentrat som erhållits genom behandling av vassla erhållen från mjölk av idisslare vid framställning av ost, vilken vassla ultrafiltreras, k ä n n e t e c k n a t därav, att

- (a) ur vasslan utfälls de övriga proteinerna förutom sialiglykoproteinerne genom att vasslan hålls i 30 min vid ca. 95°C eller en längre tid vid en lägre temperatur och de utfällda proteinerna avskiljs ur lösningen;
- (b) den erhållna lösningen ultrafiltreras genom membran med en porstorlek av 1000 - 15 000 angiven som molekylvikt;
- (c) det vid ultrafiltrering erhållna koncentratet avskiljs och hydrolyseras enzymatiskt eller med en bas eller syra, varvid en fällning och en lösning bildas, vilka avskiljs och tages tillvara;
- (d) den i steget (c) erhållna lösningen neutraliseras och dess innehåll av N-acetylneuraminsyra extraheras genom att leda lösningen genom katjonbytarharts och anjonbytarharts, den så bundna syran elueras och tages tillvara.

Viltejulkaisuja-Anförda publikationer

Chem. Tech. huhtikuu 1971, M.C. Porter et al., "Membrane ultrafiltration", p. 248-254.



