



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

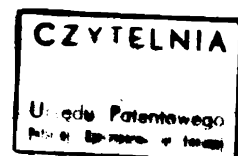
Zgłoszono: 85 05 28 (P. 253661)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 86 12 02

Opis patentowy opublikowano: 89 10 31

Int. Cl.⁴ C07C 101/08



Twórcy wynalazku: Ryszard Heropolitański, Maria Stasiak, Zdzisław Majer,
Julianna Kominiak, Waldemar Szymański

Uprawniony z patentu: Instytut Chemii Przemysłowej, Warszawa;
Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfarm”,
Kutno (Polska)

Sposób usuwania fenyloalaniny z mieszaniny aminokwasów

Przedmiotem wynalazku jest sposób usuwania fenyloalaniny z mieszaniny aminokwasów uzyskanych przez hydrolizę białek, zwłaszcza hydrolizę kazeiny, przy czym wydzielanie fenyloalaniny przeprowadza się metodą sorpcji tego związku na sorbentach.

Metody sorpcyjne rozdziału różnych substancji chemicznych są szeroko rozpowszechnione. Znane są sorbenty o różnym charakterze i działające na odmiennych zasadach. W literaturze podaje się, że prowadzono prace nad rozdzielaniem aminokwasów przy pomocy nieroganicznych i syntetycznych wymienników jonowych, tzn. związków posiadających grupy funkcyjne. Rozdzielanie polega na tym, że odpowiednie grupy funkcyjne jonitów wychwytyją selektywnie niektóre aminokwasy na zasadzie większej lub mniejszej ich kwasowości, przy czym tylko kationity o grupach funkcyjnych obsadzonych wodorem lub anionity obsadzone grupą wodorotlenową są zdolne do tworzenia soli z aminokwasami, podczas gdy inne grupy funkcyjne jonitów nie mają takiej właściwości.

Znane są także sorbenty niejonowe, niepolarne, nie posiadające grup funkcyjnych, przy użyciu niektórych rozdzielanie związków chemicznych oparte jest na innych zasadach, między innymi na zasadzie sił van der Waalsa, powstawanie mostków wodorowych. W każdym przypadku rozdzielania konkretnej mieszaniny dla zachowania prawidłowego przebiegu procesu, konieczny jest dobór parametrów rozdziału oraz dobór właściwych sorbentów, co przy mnogości różnych środków jest sprawą skomplikowaną.

Celem wynalazku było usunięcie fenyloalaniny z mieszaniny aminokwasów powstałej przez hydrolizę białka, zwłaszcza kazeiny, która jest białkiem z grupy fosforoproteidów wytworzonym w gruczole mlecznym i zawierającym 18 aminokwasów niezbędnych dla organizmu człowieka. Aminokwasy te są bardzo łatwo przyswajalne przez organizm człowieka i stanowią wysokowartościowe

odżywkę na przykład dla sportowców lub kosmonautów. Stosowane są również w medycynie jako odżywkę w pewnych stanach chorobowych.

W wyniku hydrolizy kazeiny uzyskuje się mieszaninę aminokwasów zawierających między innymi fenyloalaninę w ilości około 7%.

W pewnych stanach chorobowych organizmu zwanych fenyloketonurią, aminokwas ten nie ulega przemianie. Fenyloketonuria jest wrodzoną wadą ustroju polegającą na gromadzeniu fenyloalaniny w płynie mózgowo-rdzeniowym, we krwi, moczu i pocie. Przejawem tego jest niedorozwój umysłowy określany mianem debilizmu. Wczesne wykrycie schorzenia i leczenie przez ograniczenie podawania fenyloalaniny rokuje niedopuszczenie do upośledzenia umysłowego. Leczenie tego schorzenia polega głównie na ograniczeniu w pożywieniu chorego białek i podawania mu hydrolizatów białkowych, z których usunięto fenyloalaninę całkowicie bądź częściowo.

Główna metoda usuwania fenyloalaniny z mieszaniny aminokwasów, uzyskiwanych w wyniku hydrolizy białek w skali przemysłowej polega na adsorpcji tego aminokwasu na węglu aktywnym. Po przeprowadzeniu hydrolizy i odfiltrowaniu cieczy, uzyskuje się wodny, około 20% roztwór aminokwasów, o zabarwieniu herbaty i specyficznym zapachu. Roztwór ten najczęściej wychładza się w celu wydzielenia krystalicznej tyrozyny, po czym dodaje węgiel aktywny i po wymieszaniu odsącza. Na węglu aktywnym zostaje adsorbowana fenyloalanina. Operację dodawania węgla powtarza się najczęściej 2-3 razy. W efekcie uzyskuje się roztwór pozbawiony fenyloalaniny bądź zawierający jej niewielkie ilości dopuszczalne w normie. Metoda ta daje bardzo dobre wyniki, jednakże poza fenyloalaniną na węglu sorbuje się również i inne aminokwasy. Po ostatecznej obróbce, straty suchej masy aminokwasów sięgają nawet do 40%. Niektóre aminokwasy adsorbowane są w ilościach bardzo znacznych i w celu zachowania odpowiedniej wartości odżywczej, muszą być uzupełnione, co podraża koszt tej metody.

Nieoczekiwanie okazało się, że można uzyskać metodą sorpcji selektywne oddzielenie fenyloalaniny z mieszaniny aminokwasów, stanowiących hydrolizaty białkowe, zwłaszcza kazeinowe, sposobem według wynalazku, jeżeli zastosuje się makroporowate, syntetyczne sorbenty niejonowe o charakterze niepolarnym lub średniopolarnym. W sposobie według wynalazku, po hydrolizie białka i wstępnym oczyszczeniu przez odfiltrowanie lub odbarwienie, wodny roztwór aminokwasów, o stężeniu do 30% suchej masy, doprowadza się do pH 9,5 — 11 roztworem substancji alkalicznej, najkorzystniej wodnym roztworem amoniaku lub wodorotlenku sodowego. Następnie roztwór aminokwasów przepuszcza się od góry przez kolumnę lub kolumny wypełnione sorbentem, przy czym wysokość złoża sorbentu wynosi co najmniej 2 m. Prędkość przepływu nie powinna być większa niż 2–3 objętości sorbentu na godzinę. Od dołu kolumny odbiera się wyciek nie zawierający fenyloalaniny. W miarę dalszego przepuszczania roztworu w wycieku zaczyna pokazywać się fenyloalanina. Moment przerwania procesu zależy od tego jaką ilość fenyloalaniny może zawierać produkt finalny, co jest zależne od przeznaczenia tego produktu.

W celu zwiększenia efektu rozdziału należy zwiększyć wysokość słupa sorbentu. Po przerwaniu procesu usuwania fenyloalaniny przez złożę sorbentu przepuszcza się wodę. W celu zregenerowania sorbentu i usunięcia z jego powierzchni zasorbowanej fenyloalaniny, substancji smolistych należy go przemyć wodnym roztworem acetonu I lub alkoholi C₁ do C₃ i następnie wodą. Wodny roztwór rozpuszczalnika organicznego najkorzystniej jest zakwasić kwasem mineralnym.

Sposób według wynalazku umożliwia uzyskanie dobrych wyników w skali przemysłowej z niewielkimi tylko stratami innych aminokwasów nie przekraczających 6–12% suchej masy.

Przykład I. W przykładzie użyto uzyskany przez enzymatyczną hydrolizę kazeiny wodny roztwór aminokwasów, o zawartości około 8% suchej masy i następującym składzie aminokwasów: histydyna — 0,202%, lizyna — 0,994%, arginina — 0,398%, kwas asparaginowy — 0,156%, treonina — 0,246%, seryna — 0,297%, kwas glutaminowy — 0,424%, prolina — 0,187%, glicyna — 0,081%, alanina — 0,246%, walina — 0,294%, izoleucyna — 0,323%, leucyna — 0,892%, tyrozyna — 0,035%, fenyloalanina — 0,401%, cystyna — 0,021%. Roztwór ten doprowadzony do pH 8,7 przez dodawanie wodnego roztworu amoniaku.

Klarowny roztwór dozowano od góry na kolumnę wypełnioną syntetycznym, niejonowym, makroporowatym sorbentem syntetycznym o charakterze niepolarnym typu Amberlit XAD-4; wysokość słupa sorbentu na kolumnie wynosiła 2800 mm. Ciecz dozowano na kolumnę z prędkoś-

cią 2,5 objętości na objętość sorbentu na godzinę. Od dołu kolumny odbierano wyciek nie zawierający fenyloalaniny. Po przepuszczeniu 4 objętości roztworu na kolumnę dozowano wodę. W tym samym czasie w wycieku stwierdzono fenyloalaninę w ilości 0,05%. Po odebraniu następnych 0,5 objętości wycieku sorbent przemywano 60% wodnym roztworem acetonu zakwaszonym kwasem solnym do pH 1,2 w ilości 1,5 objętości, a następnie wodą do zaniku zapachu acetonu. W ten sposób przeprowadzono regenerację sorbentu i uzdatniono go do następnego cyklu sorpcji.

Ogółem w przykładzie tym uzyskano roztwór aminokwasów w ilości 4 objętości w stosunku do ilości sorbentu. Cała ilość roztworu po wymieszaniu zawierała 0,01% fenyloalaniny. Całkowita strata suchej masy wynosiła 9,5%.

Przykład II. W przykładzie użyto uzyskany przez hydrolizę kazeiny wodny roztwór aminokwasów o zawartości 17,5% suchej masy. Ilość fenyloalaniny w tym roztworze wynosiła 0,972%. Roztwór zalkalizowano amoniakiem do pH 10,1. Klarowny roztwór kierowano na kolumnę podobnie jak w przykładzie I z tą różnicą, że była ona wypełniona makroporowatym, niejonowym sorbentem syntetycznym o charakterze niepolarnym typu Diaion HP-20 o wysokości słupa złoża 4200 cm. Roztwór aminokwasów dozowano na kolumnę podobnie jak w przykładzie I. Po przepuszczeniu 2,5 objętości roztworu na kolumnę podano 5% wodny roztwór kwasu siarkowego. Po przepuszczeniu około 0,6 objętości kwasu wyciek z kolumny kierowano do osobnego zbiornika. Wyciek ten zawierał niewielkie ilości aminokwasów i użyto go zamiast wody przy hydrolizie kazeiny. Tym sposobem zmniejszono straty aminokwasów. Po przepuszczeniu kwasu przez sorbent puszczono dwie objętości 70% wodnego roztworu metanolu zakwaszonego kwasem siarkowym do pH 0,9, a następnie odmyto go do zaniku zapachu metanolu. Uzyskano 2,8 objętości roztworu aminokwasów o średniej zawartości 0,02% fenyloalaniny. Całkowita strata suchej masy wynosiła 10,3% z czego około 3,5% znajdowało się w wodnym roztworze kierowanym do hydrolizy.

Przykład III. W przykładzie użyto roztwór aminokwasów taki sam jak w przykładzie II. Roztwór ten zalkalizowano do pH 8,5 wodnym roztworem NaOH i przepuszczano przez kolumnę wypełnioną mikroporowatym syntetycznym sorbentem niejonowym o charakterze średniopolarnym typu Amberlit XAD-7, wysokość słupa sorbentu wynosiła 3000 cm. Przez kolumnę przepuszczono 1,5 objętości roztworu wyjściowego. Po ukazaniu się w wycieku aminokwasów rozpoczęto odbierać frakcję właściwą. Po odebraniu 1 objętości frakcji aminokwasów, na kolumnę dozowano wodę w ilości 0,5 objętości, a następnie 5% roztwór wodny kwasu solnego. Po przepuszczeniu 0,5 objętości kwasu przez kolumnę przepuszczono 1,5 objętości 40% roztworu acetonu. Po przepuszczeniu acetonu sorbent przemyto wodą do zaniku zapachu acetonu. Uzyskano 2 objętości roztworu aminokwasów o zawartości 0,01% fenyloalaniny.

Przykład IV. W przykładzie użyto wodny roztwór aminokwasów uzyskany przez hydrolizę kazeiny o zawartości 15,2% suchej masy. Ilość fenyloalaniny w tym roztworze wynosiła 0,838%. Roztwór ten zalkalizowano do pH 9,2 wodnym roztworem amoniaku. Następnie usuwanie fenyloalaniny prowadzono w sposób podobny jak w przykładzie I. Po przepuszczeniu 2,0 objętości roztworu aminokwasów na kolumnę dozowano wodę w ilości 0,5 objętości, a następnie 3% roztwór wodny kwasu siarkowego. Z chwilą rozpoczęcia dozowania kwasu wyciek z kolumny odbierano osobno i kierowano do hydrolizy kazeiny. Po przepuszczeniu 1 objętości kwasu na kolumnę dozowano wodę aż do odmycia kwasu. Następnie przeprowadzono regenerację sorbentu przemywając go 70% wodnym roztworem alkoholu izopropylowego w ilości 1,5 objętości, a następnie odmyto go wodą. W omawianym przykładzie w cyklu pierwszym uzyskano 2,5 objętości roztworu aminokwasów o zawartości 0,02% fenyloalaniny. Strata suchej masy wynosiła 9,6%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób usuwania fenyloalaniny z mieszaniny aminokwasów, uzyskanych przez hydrolizę białek, na drodze sorpcji, **znamienny tym**, że wodny roztwór tych aminokwasów o stężeniu do 30%

suchej masy alkalizuje się do pH 8,5–11, po czym przepuszcza się przez złożę o wysokości powyżej 2 m makroporowatego, syntetycznego sorbentu niejonowego o charakterze niepolarnym lub średniopolarnym z prędkością 2–3 objętości na objętość złoża, następnie sorbent z zasorbowaną fenyloalaniną przemywa się wodą.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wodny roztwór aminokwasów alkalizuje się wodnym roztworem amoniaku lub wodorotlenku sodowego.