

OTRZYMYWANIE ODŻYWKI AMINOKWASOWEJ POZBAWIONEJ FENYLOALANINY

H. ŚWITEK, W. SŁOWIŃSKI, Z. PORDĄB, Z. PAZOŁA

Centralne Laboratorium Przemysłu Koncentratów Spożywczych, Poznań

WSTĘP

Odżywka aminokwasowa pozbawiona fenyloalaniny stosowana jest w przypadku fenyloketonurii — choroby dziecięcej spowodowanej defektem metabolitycznym, polegającym na braku czynności układu enzymatycznego, warunkującego prawidłową przemianę fenyloalaniny. Choroba pociąga za sobą upośledzenie psychiczne i fizyczne dziecka wskutek zatrucia organizmu produktami nieprawidłowymi metabolizmu.

Na podstawie dotychczasowych badań klinicznych (2, 4) stwierdzono, że przypadki fenyloketonurii można leczyć dietą ubogą w fenyloalaninę, co przy obecnym stanie wiedzy można urzeczywistnić jedynie drogą otrzymywania hydrolizatów białka pozbawionych fenyloalaniny. Założeniem diety jest, że zasadniczym białkiem wprowadzonym do organizmu będzie białko hydrolizatu. Założenie wynika stąd, że wszystkie naturalne białka zarówno zwierzęce, jak roślinne będące składnikami artykułów spożywczych zawierają zbyt dużą ilość fenyloalaniny.

Podjęcie pracy nad otrzymywaniem odżywki aminokwasowej pozbawionej fenyloalaniny nastąpiło z inspiracji rektora O. Szczepkiego oraz dr M. Goncerzewiczowej z Akademii Medycznej w Poznaniu, którzy wobec braku w kraju odpowiedniego środka leczniczego zgłosili zapotrzebowanie na tego typu preparat aminokwasowy.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

I. Metody oznaczania

1. Oznaczanie fenyloalaniny. Oznaczanie fenyloalaniny w doświadczalnych preparatach aminokwasowych przeprowadzono metodą kolorymetryczną według Hassa i Sullivana z późniejszymi modyfi-

kacjami (1, 3, 9). Oznaczeń dokonywano na uniwersalnym spektrofotometrze Zeissa przy długości fali 500 m μ .

2. Określenie składu aminokwasowego metodą chromatograficzną. Do określania składu aminokwasowego preparatów aminokwasowych bez fenyloalaniny zastosowano metodę dwukierunkowej chromatografii wstępującej (5) na bibule Whatman nr 3. Jako fazę rozwijającą stosowano: a) fenol:woda 7:3; b) n-propanol:woda 7:3.

II. Otrzymywanie preparatu aminokwasowego

Zasada otrzymywania preparatu aminokwasowego pozbawionego fenyloalaniny polega na zhydrolizowaniu kazeiny z udziałem kwasu solnego, zaadsorbowanego kwasu solnego z hydrolizatu na wymiennikach jonowych oraz adsorpcji fenyloalaniny na węglu aktywnym.

1. Hydroliza kazeiny. Hydrolizę kazeiny przeprowadzono według wcześniej ustalonych optymalnych warunków hydrolizy (6) stosując kwas solny i prowadząc hydrolizę ciśnieniową.

Uzyskany hydrolizat wstępnie odbarwiano dodając 1,8% węgla aktywnego w stosunku do ciężaru hydrolizatu. Wstępny dodatek węgla pozwalał zaadsorbować większość humin tworzących się podczas hydrolizy, zapobiegając późniejszemu ich odkładaniu się na złożu jonitu.

2. Sorpcja kwasu solnego na wymiennikach jonowych. Biorąc pod uwagę, że lecznicza odżywka aminokwasowa jest spożywana w ilości 2,0—2,5 g na 1 kg ciężaru ciała na dobę, przeprowadzono sorpcję kwasu solnego ażeby wyeliminować tworzenie się nadmiaru soli kuchennej przy neutralizacji. W tym celu wstępnie odbarwiony hydrolizat przepuszczono przez złożę anionitu. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wybrano do sorpcji anionit średniozasadowy Wofatyt L-150 produkcji NRD oraz anionit słabozasadowy Amberlit ID-45 produkcji USA. W obydwu przypadkach stosowano samodzielną szybkość przepływu hydrolizatu przez jonit. Przepuszczanie hydrolizatu przez jonit kontynuowano aż do momentu, gdy wypływający wyciek posiadał pH około 1, w tym czasie wyciek w całej swej masie wykazywał pH 4. W momencie wysycenia anionitu kwaśny hydrolizat znajdujący się wśród złoża wymiennika wypierano wodą destylowaną. Uzyskany stąd wyciek o dodczynie silnie kwaśnym w części odbierano i powtórnie przepuszczano przez anionit w celu zaadsorbowania kwasu solnego.

Do adsorpcji kwasu solnego z 1 kg typowego hydrolizatu potrzeba było (zakładając jedno napełnienie jonitu) 0,6 l anionitu Wofatyt L-150 albo 0,8 l anionitu Amberlit IR-45.

3. Adsorpcja fenyloalaniny. Próby sorpcji fenyloalaniny z odkwaszonego hydrolizatu przeprowadzono na żywicach odbarwiających Asmit 259, Asmit 173, Wofatyt E oraz na szeregu typów węgla aktywowanego. Stwierdzono, że sorpcja fenoloalaniny na żywicach odbarwiających zachodzi przeciętnie w 40%.

Najlepsze wyniki uzyskano w przypadku sorpcji na węglu aktywnym Carbopol N-ekstra oraz 0,2, przy czym stwierdzono, że optimum sorpcji zachodziło przy pH 4,5.

Ostatecznie przyjęto następujący tok postępowania:

a) do wycieku po sorpcji kwasu dodaje się węgiel aktywny N-ekstra w ilości 4,8 g na 1 g azotu, doprowadza do pH 4,5 przy pomocy roztworu NaOH lub sody kalcynowanej, podgrzewa do 80° i sączy po upływie jednej doby;

b) do otrzymanego powyżej przesączu dodaje się dalsze 1,6 g węgla aktywnego na 1 g azotu wycieku przed pierwszą sorpcją i postępuje jak wyżej.

Przy dwustopniowej sorpcji z łączną ilością 6,4 g węgla aktywnego na 1 g azotu przy pH 4,5 uzyskiwano bardzo odtwarzalne wyniki, przy czym zawartość fenyloalaniny po adsorpcji była bardzo mała i wynosiła w suchym preparacie tylko 0,025%. By otrzymać preparat aminokwasowy, praktycznie wolny od fenyloalaniny, stosowano z dobrym wynikiem trzystopniową sorpcję z dodatkiem kolejno 4,8, 1,6 i 1,8 g tj. łącznie 8 g węgla aktywnego na 1 g azotu wycieku po sorpcji kwasu solnego.

4. Suszenie preparatu. Suszenie preparatu pozbawionego fenyloalaniny przeprowadzono na suszarni rozpyłowej. Przed wysuszeniem roztwór doprowadzano do pH 5,5—5,7 i pasteryzowano przy 90° przez 20 min. Uzyskany preparat aminokwasowy po wysuszeniu w przypadku dwustopniowej sorpcji na węglu zawierał:

fenyloalaniny	0,025 %
azotu ogólnego	11,7 %
białka (N × 6,25)	91,7 %
s. masy	96,6 %

W przypadku trzystopniowej sorpcji odpowiednio:

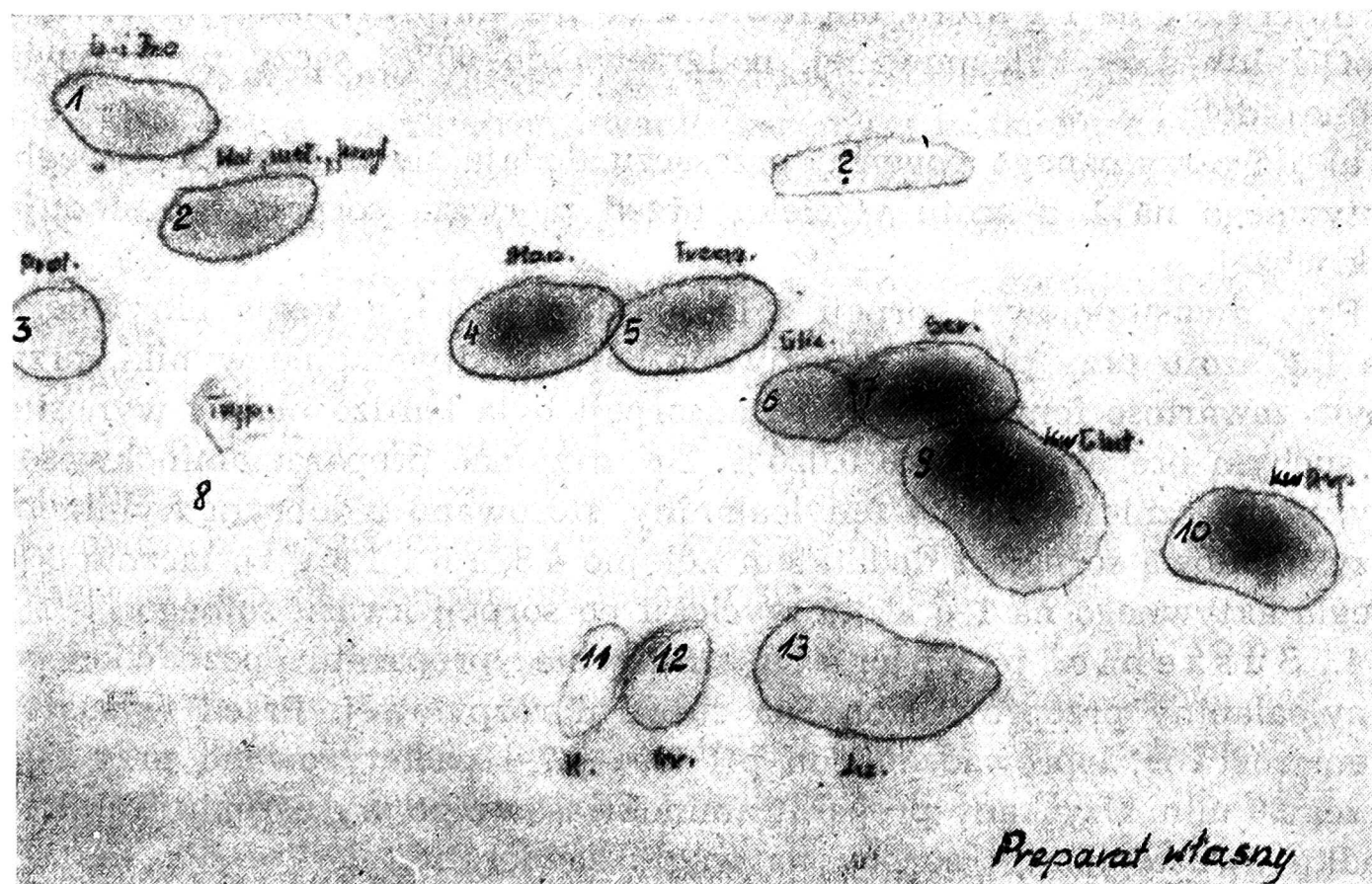
fenyloalaniny	ślady
azotu ogólnego	14,2 %
białka (N × 6,25)	88,9 %
s. masy	96,6 %

Wydajność preparatu aminokwasowego zawierającego 0,025% fenyloalaniny (dwustopniowa sorpcja na węglu) obliczona na podstawie bilansu azotu ogólnego wynosiła około 40%. Dla preparatu zawierającego ślady

fenyloalaniny (trzystopniowa sorpcja na węglu) wydajność wynosiła odpowiednio 34%.

W celu przeprowadzenia lepszej oceny otrzymanego preparatu określano chromatograficznie aminokwasy leczniczej odżywki angielskiej p. n. „Cymogran” oraz własnego preparatu aminokwasowego pozbawionego fenyloalaniny.⁹

Na bibułę naniesiono te same ilości preparatów w przeliczeniu na azot ogólny; umożliwiło to również przeprowadzenie porównania ilościowego. Dla zobrazowania podano poniżej zdjęcia wym. chromatogramów:



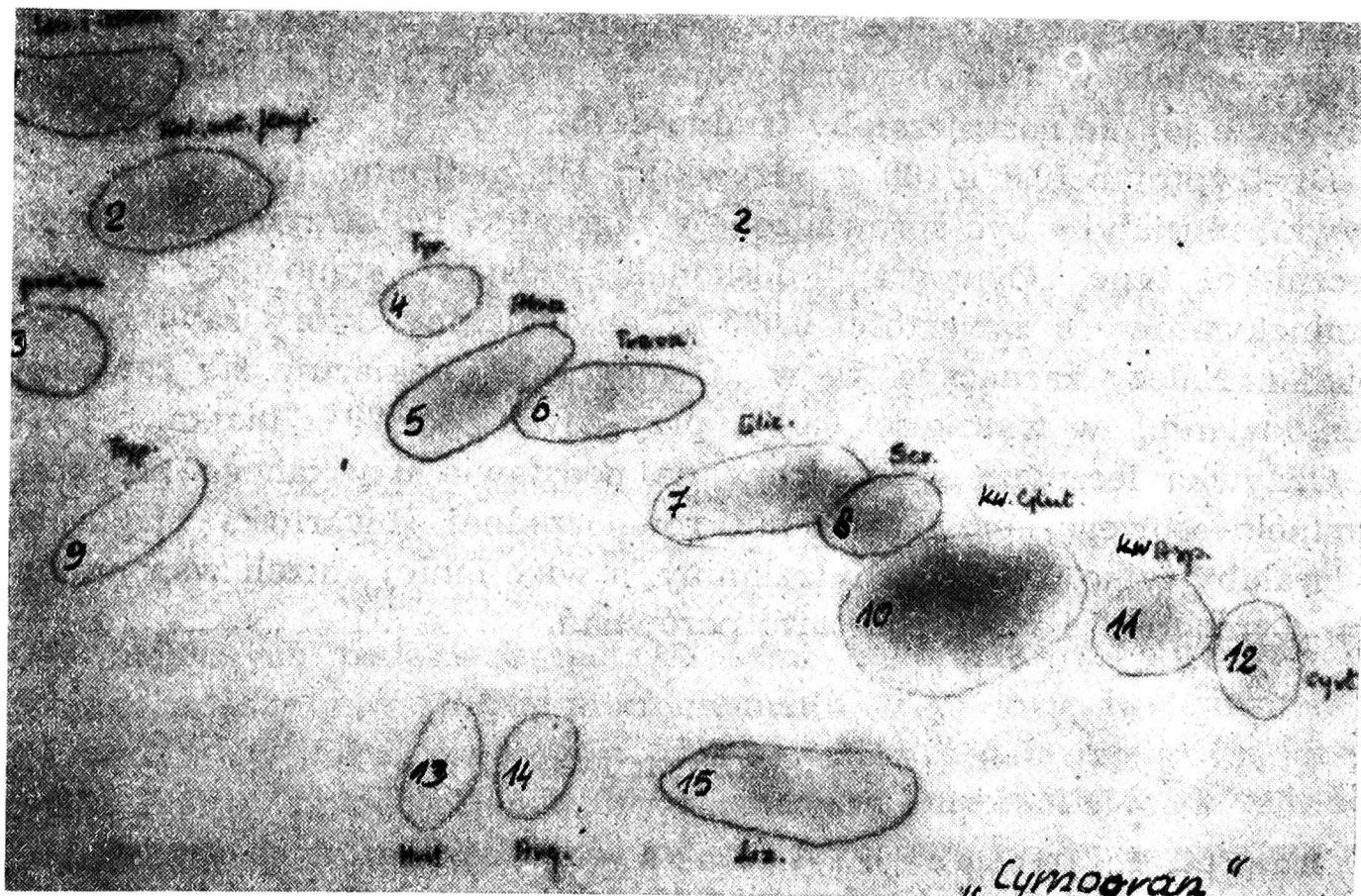
Rys. 1. Chromatogram własnego preparatu aminokwasowego o śladowej zawartości fenyloalaniny: 1 — leucyna i izoleucyna, 2 — walina, metionina, fenyloalanina, 3 — prolina, 4 — alanina, 5 — treonina, 6 — glicyna, 7 — seryna, 8 — tryptofan, 9 — kwas asparaginowy, 11 — histydyna, 12 — arginina, 13 — lizyna

Jak wynika z chromatogramów różnica polega na zawartości tryptofanu, tyrozyny i cystyny, które nie występują w otrzymanym preparacie (tryptofan znajduje się tam w śladowych ilościach).

Wnioskując z intensywności i wielkości wspólnej plamy dla waliny, metioniny i fenyloalaniny (fenyloalanina była oznaczana kolorymetrycznie) można stwierdzić, że w otrzymanym preparacie nie ma również metioniny.

Wiadomo na podstawie prospektu leku „Cymogran”, że DL-tryptofan, DL-metionina i L-tyrozyna zostały dodane do podstawowego preparatu

aminokwasowego otrzymanego z hydrolizatu kazeinowego. Istotna więc różnica polega jedynie na braku cystyny w naszym preparacie. Brak cystyny nie ma jednak istotnego znaczenia ponieważ cystyna nie jest aminokwasem egzogennym i nie wymaga uzupełnienia. Natomiast uzupełnić należy (podobnie jak w „Cymogranie”), tryptofan, metioninę i tyrozynę. Należy tu wyjaśnić, że wprawdzie tyrozyna także nie jest amino-



Rys. 2. Chromatogram leczniczej odżywki angielskiej pn.: „Cymogran”: 1 — leucyna i izoleucyna, 2 — walina, metionina, fenyloalanina, 3 — prolina, 4 — tyrozyna, 5 — alanina, 6 — treonina, 7 — glicyna, 8 — seryna, 9 — tryptofan, 10 — kwas glutaminowy, 11 — kwas asparaginowy, 12 — cystyna, 13 — histydyna, 14 — arginina, 15 — lizyna

kwasem egzogennym, lecz w tym układzie gdy brak jest fenyloalaniny, wyeliminowana jest możliwość powstawania jej w organizmie z tego aminokwasu. Tyrozyna więc w tych warunkach staje się automatycznie aminokwasem egzogennym.

U w a g i k o ń c o w e

Uzyskany preparat aminokwasowy bez fenyloalaniny został pozytywnie oceniony przez II Klinikę Akademii Medycznej w Poznaniu. Przesłano go również do II Kliniki Akademii Medycznej w Krakowie i Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie celem wykorzystania w leczeniu przypadków fenyloketonurii.

Preparat stanowi bazę do otrzymania gotowej odżywki leczniczej analogicznej do angielskiego „Cymogranu”, będącej podstawą diety przy leczeniu fenyloketonurii.

Biorąc pod uwagę skład gotowej odżywki leczniczej tj. „Cymogranu” (7) do otrzymanego przez nas preparatu aminokwasowego bez fenyloalaniny należało by prócz soli, węglowodanów, witamin i tłuszczów dodać tyrozynę, tryptofan i metioninę, które traci się w czasie przerobu. Jeśli chodzi o tyrozynę to metoda otrzymywania jej z odpadów po hydrolizie białka została w 1957 r. opracowana w naszym laboratorium i otrzymywanie jej nie nastęrczałoby trudności (8).

DL-tryptofan (0,8 g/100 g odżywki) i DL-metionina (0,5 g/100 g odżywki) musiałyby być sprowadzone z zagranicy. Do otrzymania odżywki leczniczej typu „Cymogran” doskonałą podstawę stanowiłby preparat aminokwasowy o zawartości 0,025% fenyloalaniny, który zawiera 92% białka. Należy zaznaczyć, że w „Cymogranie” deklaruje się zawartość fenyloalaniny w wysokości 0,01% przy zawartości 29% białka.

Odżywka lecznicza sporządzona na podstawie uzyskanego preparatu aminokwasowego, przy założeniu równorzędnej zawartości białka zawierałaby tylko 0,008% fenyloalaniny, a więc mniej aniżeli wspomniany tu „Cymogran” będący podstawą porównań.

PIŚMIENNICTWO

1. Beer C. T., Dickens F., Salmony D.: *Biochem. J.*, **49**, 700 (1951).
2. Goncerzewicz M.: *Badania nad fenyloketonurią*, A. M. Poznań 1962 r.
3. Hass W. C., Sullivan M.: *Archiv. Biochem.*, **5**, 165 (1944).
4. Meister A.: *Biochemistry of the Amino Acid*. N. York 1957.
5. Praca zbiorowa „Chromatografia”, Warszawa 1957.
6. Pazola Z., Świerczyński A., Reinhercs, Świtek H., Wojtkowiak S.: *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Roln. i Spoż.* (1956) nr 3, s. 55.
7. Prospekt leku „Cymogran” — *Cymogran in the Management of Phenylketonuria* Allen a. Hunburys Ltd. London.
8. Świtek H., Pazola Z., Świerczyński A.: *Wykorzystanie odpadów po hydrolizie białka — dokumentacja z pracy badawczej*. Centralne Lab. Przemysłu Koncentratów Spożywczych, Poznań.
9. Zalta J. P., Khuovine: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 937 (1952).