

Verfahren zur Gewinnung von Leucin aus Proteinhydrolysaten

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Leucin aus Proteinhydrolysaten, bei welchem nach Neutralisation der Hydrolysate eine fraktionierte Filtration zu verschiedenen Zeiten durchgeführt wird.

Für die Gewinnung von L-Aminosäuren werden verschiedene pflanzliche oder tierische Proteine längere Zeit mit Salzsäure oder Schwefelsäure erhitzt und aus den Hydrolysaten die gewünschten Aminosäuren auf verschiedene Weise isoliert.

Für die Gewinnung bestimmter Aminosäuren werden oft Rohstoffe mit optimaler Aminosäurezusammensetzung verwendet. Bekannt ist die Verwendung von keratinhaltigen Rohstoffen wie Haare, Federn oder Borsten für die Gewinnung von Cystin, die Verwendung von Hämoglobin oder Maiskleber für die Herstellung von L-Leucin, die Verwendung von Kaseinhydrolysaten für die Isolierung von L-Tyrosin oder die Verwendung von Eialbumin für die Herstellung von L-Phenylalanin (S. Greenstein and Winitz, »Chemistry of the amino acids«).

Der Begriff »optimale Aminosäurezusammensetzung« bezieht sich auf den Gehalt an einer bestimmten Aminosäure, welche aus dem Protein isoliert werden soll. So hat z. B. das Kasein einen sehr hohen Tyrosingehalt von 8,1% und das Eialbumin hat wiederum einen sehr hohen Phenylalaningehalt von 7,7%. Ein optimales Protein für die Gewinnung von L-Leucin ist das Zein im Maiskleber. Dieses Protein hat einen Leucingehalt von 23,7%, während nur 0,9% Cystin vorhanden sind.

Diese ausgewählten Rohstoffe enthalten die zu isolierende Aminosäure in hohen Konzentrationen, und der Gehalt an störenden Begleit-Aminosäuren ist gering. So kann aus diesen Spezialhydrolysaten die gewünschte Aminosäure sehr oft auf eine relativ einfache Methode ausgefällt werden. Nach FR-A-2 409 981 wird das Hydrolysat von Haaren neutralisiert und das ausgefallte Rohcystin mit geringen Verunreinigungen abfiltriert. Nach FR-A-856 379 wird aus einem Hydrolysat von Maiskleber bei pH 6 ein Gemisch von Leucin und Tyrosin ausgefällt. Aus dieser Mischung wird dann bei einem pH von 2,4 erneut Tyrosin gefällt und das in Lösung verbliebene Leucin durch Eindampfen der Mutterlauge von der Tyrosinfällung gewonnen. Nach FR-A-853 173 wird aus einem Maiskleberhydrolysat Tyrosin bei pH 2,4 und Leucin bei pH 0,9 bis 1,0 ausgefällt und nach dreimaliger Umkristallisation Leucin mit 90% Reinheit gewonnen.

Nach den US-A-2 929 840 wird aus einem Hydrolysat von Weizenkleber durch Neutralisation eine Mischung von Cystin, Tyrosin und Leucin ausgefällt. Aus dieser Mischung wird dann bei pH 2,4 Cystin und Tyrosin gefällt, während das Leucin in Lösung bleibt.

Nachteile dieser Methoden sind die Abhän-

gigkeit von bestimmten ausgewählten Rohstoffen bei einer Gewinnung der Aminosäuren, und außerdem ist die Reinheit der so gewonnenen L-Aminosäuren für bestimmte Verwendungszwecke nicht ausreichend. Bei der heutigen umfangreichen Verwendung von L-Aminosäuren in Infusionslösungen für die parenterale Ernährung werden sehr hohe Anforderungen an die Qualität gestellt. So müssen diese Aminosäuren eine Reinheit von 99% aufweisen.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist eine Gewinnung von L-Leucin sehr hoher Reinheit aus Proteinhydrolysaten verschiedenster Herkunft, welche Gewinnung einfacher ist und eine gute Ausbeute mit weniger Aufwand ermöglicht, d. h. industriell verwendbar ist.

Zu diesem Zweck ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Leucin aus Proteinhydrolysaten, bei welchem nach Neutralisation der Hydrolysate eine fraktionierte Filtration zu verschiedenen Zeiten durchgeführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß durch die fraktionierte Filtration eine an Cystin und Tyrosin und eine an Leucin angereicherte Fraktion erhalten, die leucinreiche Fraktion in Säure gelöst, der Gehalt an Isoleucin in der Lösung auf 1,0–1,5% eingestellt, durch Zusatz von Oxydationsmitteln Methionin oxydiert, ein Rohleucin bei einem in Abhängigkeit des Tyrosingehaltes eingestellten pH-Wert von 1,0 bis 2,0 ausgefällt und durch Wiederholung des Fällungsvorganges im gleichen pH-Bereich das Leucin weiter gereinigt wird.

So kann das zur Durchführung des vorliegenden Verfahrens zu verwendende Ausgangsmaterial aus den verschiedensten Proteinquellen wie z. B. Oeltrester, Mikroorganismen, insbesondere Hefen oder Getreidekeim erhalten werden.

Bei der Isolierung von L-Leucin aus normalen Proteinhydrolysaten stört u. a. die Anwesenheit von Cystein und Tyrosin, da diese beiden Aminosäuren am schwersten löslich sind und auch bei pH-Werten von 0,9–1,0 gemeinsam mit dem Leucin auskristallisieren. Es wurde nun gefunden, daß während der Durchführung einer an sich bekannten fraktionierten Filtration nach Neutralisation der Hydrolysate die schwerlöslichen Aminosäuren mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten auskristallisieren.

Die erste Fraktion, welche unmittelbar nach der Neutralisation ausfällt, enthält die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin und Valin neben geringen Mengen an Tyrosin. Die zweite Fraktion, welche erst nach einer längeren Kristallisationsdauer ausfällt, ist an Tyrosin und Cystin angereichert. Durch diese Vortrennung der Aminosäuren in zwei Gruppen können Hydrolysate verschiedenster Herkunft für die Gewinnung von Leucin verwendet werden. Dies bedeutet eine größere Freiheit bei der Auswahl der Rohstoffe für die Aminosäuregewinnung.

Die erste Fraktion, die weiter oben sowie nachfolgend die leucinreiche Fraktion genannt wird, enthält also die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Valin mit geringen Anteilen an Tyrosin. Die beiden isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin weisen sehr ähnliche physikalische Eigenschaften auf und sind deshalb schwer zu trennen.

Es wurde gefunden, daß beim Übergang von der dipolaren zur Kationenform in einem ganz bestimmten pH-Bereich die Löslichkeit von Isoleucin gegenüber Leucin rascher ansteigt. In einer gesättigten Kochsalzlösung sind bei einem pH-Wert von 6,0 0,4% Leucin und 0,5% Isoleucin gelöst. Bei einem pH-Wert von 1,5 sind 1,1% Leucin und 1,7% Isoleucin gelöst. Durch Einstellen der Lösung auf eine definierte Isoleucin-Konzentration kann im pH-Bereich von 1,0 bis 2,0 Leucin ausgefällt und von Isoleucin getrennt werden. Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich bei Anwesenheit von Methionin, da diese Aminosäure in allen pH-Bereichen mit Leucin Copräzipitate bildet. Deshalb wird das Methionin vor der Fällung des Leucins durch Oxydation in lösliches Methioninsulfoxid überführt.

Was den Gehalt an Isoleucin in der Lösung anbelangt, so kann dieser durch Zusatz von Wasser auf 1,0 bis 1,5% eingestellt werden.

Der genaue pH-Wert im Bereich von 1,0 bis 2,0 wird als Funktion des Tyrosingehaltes gewählt. Bei höheren Tyrosingehalten wird der pH-Wert erniedrigt, und bei niedrigeren Tyrosingehalten wird der pH-Wert erhöht. Nach Abtrennung des Leucins wird dieser Fällungsvorgang im gleichen pH-Bereich wiederholt und das Leucin weiter gereinigt.

Beispiel

Nach Neutralisation eines sauren Proteinhydrolysates werden die ausgefällten schwer löslichen Aminosäuren als leucinreiche erste Fraktion abgetrennt. Diese Aminosäuremischung wird bei einem pH-Wert von 0,5 gelöst und durch Zusatz von Wasser die Isoleucinkonzentration auf ca 1,5% eingestellt. Nach Ermittlung des Methioningehaltes wird durch Zusatz der äquimolaren Menge Wasserstoffperoxyd das Methionin bei 90°C oxidiert. Anschließend wird die Lösung nach Zusatz von Aktivkohle filtriert, der pH-Wert mit verdünnter Natronlauge auf 1,0 bis 1,5 eingestellt und nach dem Abkühlen das auskristallisierte Rohleucin abgetrennt. Das Rohleucin wird erneut bei pH 0,5 gelöst und durch Fällung bei 1,0 bis 2,0 weiter gereinigt. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Reinheit des L-Leucins erreicht ist.

Die Auswahl des pH-Wertes im Bereich 1,0 bis 2,0 richtet sich nach dem Tyrosingehalt in der Lösung. Für 0,65; 0,8; 1,0 und 1,2% Tyrosin in der

Lösung werden die pH-Werte von 1,8; 1,65; 1,52 und 1,42 gewählt.

5 Patentanspruch

Verfahren zur Gewinnung von Leucin aus Proteinhydrolysaten, bei welchem nach Neutralisation der Hydrolysate eine fraktionierte Filtration zu verschiedenen Zeiten durchgeführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß durch die fraktionierte Filtration eine an Cystein und Tyrosin und eine an Leucin angereicherte Fraktion erhalten, die leucinreiche Fraktion in Säure gelöst, der Gehalt an Isoleucin in der Lösung auf 1,0 – 1,5% eingestellt, durch Zusatz von Oxydationsmitteln Methionin oxidiert, ein Rohleucin bei einem in Abhängigkeit des Tyrosingehaltes eingestellten pH-Wert von 1,0 bis 2,0 ausgefällt und durch Wiederholung des Fällungsvorganges im gleichen pH-Bereich das Leucin weiter gereinigt wird.

25 Claim

A process for recovering leucine from protein hydrolysates, in which a fractional filtration is carried out at different times after neutralisation of the hydrolysates, characterised in that a tyrosine- and cystine-rich fraction as well as a leucine-rich fraction are obtained by the fractional filtration, the leucine-rich fraction is dissolved in acid, the isoleucine content of the solution is adjusted to between 1.0 and 1.5%, the methionine is oxidised by the addition of oxidising agents, a crude leucine is precipitated at a pH-value adjusted to between 1.0 and 2.0 in dependence upon the tyrosine content, and the leucine is further purified by repeating the precipitation process in the same pH-range.

Revendication

Procédé d'obtention d'acides aminés à partir d'hydrolysats de protéines, dans lequel on réalise une filtration fractionnée dans différents délais après neutralisation des hydrolysats, caractérisé par le fait que l'on obtient par la filtration fractionnée une fraction riche en cystine et en tyrosine et une fraction riche en leucine, on dissout la fraction riche en leucine dans l'acide, on ajuste la teneur en isoleucine de la solution à 1,0 – 1,5%, on oxyde la méthionine par addition d'un moyen d'oxydation, on obtient une leucine brute par précipitation à un pH ajusté entre 1,0 et 2,0 en fonction de la teneur en tyrosine, et l'on purifie la leucine par répétition du processus de précipitation dans le même domaine de pH.

Die erste Fraktion, die weiter oben sowie nachfolgend die leucinreiche Fraktion genannt wird, enthält also die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Valin mit geringen Anteilen an Tyrosin. Die beiden isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin weisen sehr ähnliche physikalische Eigenschaften auf und sind deshalb schwer zu trennen.

Es wurde gefunden, daß beim Übergang von der dipolaren zur Kationenform in einem ganz bestimmten pH-Bereich die Löslichkeit von Isoleucin gegenüber Leucin rascher ansteigt. In einer gesättigten Kochsalzlösung sind bei einem pH-Wert von 6,0 0,4% Leucin und 0,5% Isoleucin gelöst. Bei einem pH-Wert von 1,5 sind 1,1% Leucin und 1,7% Isoleucin gelöst. Durch Einstellen der Lösung auf eine definierte Isoleucin-Konzentration kann im pH-Bereich von 1,0 bis 2,0 Leucin ausgefällt und von Isoleucin getrennt werden. Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich bei Anwesenheit von Methionin, da diese Aminosäure in allen pH-Bereichen mit Leucin Copräzipitate bildet. Deshalb wird das Methionin vor der Fällung des Leucins durch Oxydation in lösliches Methioninsulfoxyd überführt.

Was den Gehalt an Isoleucin in der Lösung anbelangt, so kann dieser durch Zusatz von Wasser auf 1,0 bis 1,5% eingestellt werden.

Der genaue pH-Wert im Bereich von 1,0 bis 2,0 wird als Funktion des Tyrosingehaltes gewählt. Bei höheren Tyrosingehalten wird der pH-Wert erniedrigt, und bei niedrigeren Tyrosingehalten wird der pH-Wert erhöht. Nach Abtrennung des Leucins wird dieser Fällungsvorgang im gleichen pH-Bereich wiederholt und das Leucin weiter gereinigt.

Beispiel

Nach Neutralisation eines sauren Proteinhydrolysates werden die ausgefällten schwer löslichen Aminosäuren als leucinreiche erste Fraktion abgetrennt. Diese Aminosäuremischung wird bei einem pH-Wert von 0,5 gelöst und durch Zusatz von Wasser die Isoleucinkonzentration auf ca 1,5% eingestellt. Nach Ermittlung des Methioningehaltes wird durch Zusatz der äquimolaren Menge Wasserstoffperoxyd das Methionin bei 90°C oxidiert. Anschließend wird die Lösung nach Zusatz von Aktivkohle filtriert, der pH-Wert mit verdünnter Natronlauge auf 1,0 bis 1,5 eingestellt und nach dem Abkühlen das auskristallisierte Rohleucin abgetrennt. Das Rohleucin wird erneut bei pH 0,5 gelöst und durch Fällung bei 1,0 bis 2,0 weiter gereinigt. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Reinheit des L-Leucins erreicht ist.

Die Auswahl des pH-Wertes im Bereich 1,0 bis 2,0 richtet sich nach dem Tyrosingehalt in der Lösung. Für 0,65; 0,8; 1,0 und 1,2% Tyrosin in der

Lösung werden die pH-Werte von 1,8; 1,65; 1,52 und 1,42 gewählt.

5 Patentanspruch

Verfahren zur Gewinnung von Leucin aus Proteinhydrolysaten, bei welchem nach Neutralisation der Hydrolysate eine fraktionierte Filtration zu verschiedenen Zeiten durchgeführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß durch die fraktionierte Filtration eine an Cystein und Tyrosin und eine an Leucin angereicherte Fraktion erhalten, die leucinreiche Fraktion in Säure gelöst, der Gehalt an Isoleucin in der Lösung auf 1,0–1,5% eingestellt, durch Zusatz von Oxydationsmitteln Methionin oxidiert, ein Rohleucin bei einem in Abhängigkeit des Tyrosingehaltes eingestellten pH-Wert von 1,0 bis 2,0 ausgefällt und durch Wiederholung des Fällungsvorganges im gleichen pH-Bereich das Leucin weiter gereinigt wird.

25 Claim

A process for recovering leucine from protein hydrolysates, in which a fractional filtration is carried out at different times after neutralisation of the hydrolysates, characterised in that a tyrosine- and cystine-rich fraction as well as a leucine-rich fraction are obtained by the fractional filtration, the leucine-rich fraction is dissolved in acid, the isoleucine content of the solution is adjusted to between 1.0 and 1.5%, the methionine is oxidised by the addition of oxidising agents, a crude leucine is precipitated at a pH-value adjusted to between 1.0 and 2.0 in dependence upon the tyrosine content, and the leucine is further purified by repeating the precipitation process in the same pH-range.

Revendication

Procédé d'obtention d'acides aminés à partir d'hydrolysats de protéines, dans lequel on réalise une filtration fractionnée dans différents délais après neutralisation des hydrolysats, caractérisé par le fait que l'on obtient par la filtration fractionnée une fraction riche en cystine et en tyrosine et une fraction riche en leucine, on dissout la fraction riche en leucine dans l'acide, on ajuste la teneur en isoleucine de la solution à 1,0–1,5%, on oxyde la méthionine par addition d'un moyen d'oxydation, on obtient une leucine brute par précipitation à un pH ajusté entre 1,0 et 2,0 en fonction de la teneur en tyrosine, et l'on purifie la leucine par répétition du processus de précipitation dans le même domaine de pH.

65

3

