



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 237 522 A1

4(51) C 12 N 9/28
C 12 N 9/56

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 276 561 3	(22)	21.05.85	(44)	16.07.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Institut für Technische Mikrobiologie, 1017 Berlin, Alt-Stralau 62, DD
(72)	Balfanz, Friedhelm, Dr. Dipl.-Chem.; Hirsch, Silvia; Winter, Barbara, DD

(54)	Verfahren zur Reinigung von Enzymkonzentraten
------	---

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Enzymkonzentraten, insbesondere von Amylasen und Proteasen. Ziel der Erfindung ist es, ein für den technischen Maßstab geeignetes und ökonomisch günstiges Verfahren zur Reinigung von Enzymkonzentraten zu entwickeln. Erfindungsgemäß werden die die Trübung, den Geruch und die Farbe von Enzymkonzentraten beeinflussenden Stoffe durch Zusatz von synthetischen Gerbstoffen ausgefällt. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigten Konzentrate sind klar, weisen keinen Geruch nach Eiweißzersetzungsprodukten auf und sind gleichzeitig keimreduziert. Die gereinigten Konzentrate von alkalischer Protease und von α -Amylase eignen sich besonders für den Einsatz in Waschmitteln.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Reinigung von Enzymkonzentraten, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus den Konzentraten die die Trübung, die Farbe und den Geruch beeinflussenden Substanzen durch Zusatz von synthetischen Gerbstoffen ausgefällt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den synthetischen Gerbstoffen um Kondensationsprodukte ein- und mehrwertiger Phenole, Phenolcarbonsäuren, Phenolsulfonsäuren, Ligninsulfonsäuren sowie Phenolsulfonamiden handelt, die im Molekül Kohlenstoff-, Sulfon-, Sulfoxy- und Sulfonimidbrücken enthalten.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der synthetischen Gerbstoffe in den Enzymkonzentraten 0,1 bis 10% vorzugsweise 0,5 bis 5% beträgt.
4. Verfahren nach den Punkten 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH-Wert des ungereinigten und des gereinigten Enzymkonzentrates annähernd gleich gehalten wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Enzymkonzentraten, insbesondere von Proteasen und α -Amylasen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Herstellung von Enzymkonzentraten gelangen im technischen Maßstab im wesentlichen die Einengung durch thermische Konzentrierung, durch Ultrafiltration, durch Salzfällung oder durch Kombination dieser Methoden zur Anwendung. Sowohl die thermische Konzentrierung als auch die Ultrafiltration (UF) können jedoch nicht verhindern, daß die im Kulturfiltrat vorhandenen Begleitsubstanzen bzw. bei der UF der entsprechende makromolekulare Anteil mit in das Enzymkonzentrat gelangen. Bei der üblichen Salzfällung wird mit einer Salzkonzentration von ca. 25% gearbeitet, die zwar zu einer teilweisen Reinigung des Endproduktes führt, doch die Umwelt durch hohe Salzkonzentrationen belastet. Die Filtration von Enzymkonzentraten verläuft bei so geringen Durchsätzen und verursacht erhebliche Enzymverluste, daß sie für die technische Anwendung ohne Bedeutung ist.

In den DD-WP 67 685, 75 053 und 87 754 wird die Herstellung von Enzymkonzentraten bzw. -trockenpräparaten unter Einsatz synthetischer Gerbstoffe (Syntane) beschrieben. Diese Verfahren, die gegenüber der Salzfällung einen wesentlich geringeren Anteil an Fällungsmittel voraussetzen, haben jedoch den Nachteil, daß zur Abtrennung des Fällungsmittels aus dem Enzym-Syntankomplex eine Extraktion mittels organischer Lösungsmittel notwendig ist. Diese Extraktion hat zudem bevorzugt in der Kälte zwischen 0 und +10°C zu erfolgen, um Aktivitätsverluste zu vermeiden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein für den technischen Maßstab geeignetes und ökonomisch günstiges Verfahren zur Reinigung von Enzymkonzentraten zu entwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Enzymkonzentrate so unter Einsatz geeigneter Stoffe zu reinigen, daß Klärungsgrad, Geruch und Farbqualität wesentlich verbessert werden. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß aus den durch thermische Einengung und/oder Ultrafiltration der Kulturfiltrate gewonnenen Enzymkonzentraten die die Trübung, den Geruch und die Farbe beeinflussenden Substanzen durch Zusatz von synthetischem Gerbstoff ausgefällt werden.

Bei den synthetischen Gerbstoffen handelt es sich um Kondensationsprodukte ein- und mehrwertiger Phenole, Phenolcarbonsäuren, Phenolsulfonsäuren, Ligninsulfonsäuren sowie Phenolsulfonamiden und aromatischen Aminen, die im Molekül Kohlenstoff-, Sulfon-, Sulfoxy-, Sulfonimidbrücken enthalten.

Der Gerbstoffanteil im Enzymkonzentrat wird so bemessen, daß seine Konzentration von 0,1 bis 10%, vorzugsweise im Bereich zwischen 0,5 und 5% liegt. Die Fällung kann bei Raumtemperatur erfolgen. Zur Abtrennung der ausgefallenen Begleitsubstanzen eignen sich beispielsweise Separation und Filtration. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, daß der pH-Wert der ungereinigten und der gereinigten Enzymkonzentrate annähernd gleich gehalten wird.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigten Konzentrate sind klar und weisen keinen Geruch nach Eiweißzersetzungsprodukten auf.

Die Möglichkeit der Anwendung von synthetischen Gerbstoffen zur Abtrennung von unerwünschten Begleitsubstanzen aus Enzymkonzentraten ist insofern überraschend, da aus den Kulturfiltraten nach dem bekannten Stand der Technik nicht die Begleitsubstanzen, sondern die Enzyme selbst gefällt werden.

Die Vorteile der Erfindung bestehen darin, daß klare, nicht nach Eiweißzersetzungsprodukten riechende und gleichzeitig keimzahlreduzierte Enzymkonzentrate erhalten werden und die Umweltbelastung durch den verbleibenden Anteil des Fällungsmittels im Endprodukt minimal ist.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigten Konzentrate von alkalischer Protease und von α -Amylase eignen sich besonders für den Einsatz in Waschmitteln.

ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll anhand von Beispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Für die Fällung wird ein Proteasekonzentrat, das durch Ultrafiltration und thermische Einengung aus Kulturfiltrat von *Bacillus thuringiensis* hergestellt wurde, verwendet. Zu 400 ml dieses Konzentrates mit einem pH-Wert von 7,0 wird im Verlauf einer Stunde unter Rühren die Lösung des synthetischen Gerbstoffes gegeben, so daß deren Konzentration im Konzentrat 4 % beträgt. Danach wird der pH-Wert erneut auf 7,0 eingestellt. Der Niederschlag wird mittels Zentrifuge abgetrennt. Im erhaltenen Konzentrat ist die Trockensubstanz auf 17,0 gegenüber 21,5 % gefallen und die Aktivität auf 4200 gegenüber 3780 TE_{Hb}/g Trockensubstanz im Ausgangsmedium gestiegen. Die Aktivitätsausbeute beträgt 99,1 %.

Beispiel 2

Für die Fällung einer α -Amylase aus *Bacillus subtilis* wurde ein durch thermische Einengung gewonnenes Konzentrat verwendet. Zu 100 ml des α -Amylase-Konzentrates wurde im Verlauf einer Stunde unter Rühren so viel synthetischer Gerbstoff zugesetzt, daß dessen Konzentration am Ende 3 % betrug. Der ausgefällte Anteil an Begleitsubstanzen entspricht einer Trockensubstanzreduzierung von 4,8 %. Während in dem Ausgangskonzentrat eine α -Amylase-Aktivität von 35280 IE/ml vorlag, konnte nach der Abtrennung der ausgefällten Substanzen eine Aktivität von 35150 IE/ml nachgewiesen werden. Das entspricht einer Aktivitätsausbeute von 99,6 %.
