



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **281 417 A5**5(51) C 12 P 21/06
G 03 C 11/24

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 P / 311 477 5

(22) 28.12.87

(44) 08.08.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Sawistowsky, Joachim, Dr. rer. nat.; Thiem, Matthias, Dipl.-Biochem.; Heinritz, Brigitte, Prof. Dr. sc. nat.;
Hedlich, Rolf, Dr. rer. nat., DD

(73) siehe (71)

(54) Verfahren zur enzymatischen Gelatinespaltung

(55) Gelatinespaltung; Fermentation; Silberrückgewinnung; Filmmaterial; Bacillusstämmen; Enzym; Protease; Thermophilie; Thermoaktivität; Thermostabilität

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Spaltung von Gelatine von Filmmaterialien und Abfällen der photographischen Industrie. Das Verfahren dient der Rückgewinnung von Silber und Filmträgermaterial. Durch den Einsatz thermostabiler Protease, die aus thermophilen Bacillusstämmen gewonnen wurde, wird das Verfahren der Filmaufbereitung ökonomischer gestaltet. Die neue thermostabile Protease kann im Temperaturbereich von 40–80 Grad Celsius verwendet werden. Zur Spaltung der Gelatine kann entweder eine reine Enzymlösung oder das Fermentationsmedium selbst eingesetzt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur enzymatischen Gelatinespaltung von Filmen und Abfällen der photochemischen Industrie zur Rückgewinnung des Silbers und des Trägermaterials, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Gelatinespaltung thermoaktive Protease verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß thermoaktive Protease verwendet wird, die aus thermophilen Bacillusstämmen gewonnen wurde.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von thermoaktiver Protease, die aus dem thermophilen Bacillusstamm ZIMET 11093 gewonnen wurde.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von thermoaktiver Protease, die aus dem thermophilen Bacillusstamm ZIMET 11262 gewonnen wurde.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von thermophiler Protease, die aus dem thermophilen Bacillusstamm ZIMET 11227 gewonnen wurde.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und einem der Ansprüche 3 bis 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Behandlung des Filmmaterials bei Temperaturen von 40–80°C, vorzugsweise von 60–70°C und im pH-Bereich von 5–8, vorzugsweise von 6–7 erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Züchtung der Mikroorganismen in Anwesenheit der zu spaltenden Gelatine durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung kann insbesondere zur Spaltung von Gelatine aus Filmmaterialien und Abfällen der photochemischen Industrie verwendet werden. Sie dient zur Rückgewinnung des Silbers und des Trägermaterials.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die meisten Verfahren zur Rückgewinnung des Silbers aus der Gelatineemulsion von Filmmaterialien sehen im ersten Schritt eine Verflüssigung der Gelatine vor. Eine Ausnahme bildet die komplette Verbrennung der Filme und die Weiterverarbeitung der Asche. Aus den Lösungen der verflüssigten Gelatine wird das Silber nach bekannten Methoden gewonnen. Wurde die Gelatine vom Filmmaterial abgelöst, so kann der Filmträger nach entsprechenden Waschprozessen ebenfalls einer Weiterverwendung zugeführt werden.

In der Art und Weise der Lösung der Gelatine gibt es zwischen den einzelnen Verfahren große Unterschiede.

Gemäß den Patenten US 3,928,253 und DD-WP 79923 werden die Trägerschichten durch spezielle, sehr selektiv wirkende Lösungsmittel in Lösung gebracht und dadurch die Trennung der Emulsionsschicht vom Träger erreicht.

Ein großer Nachteil dieser Verfahren ist, daß hierfür große Mengen an flüchtigen und brennbaren Lösungsmitteln benötigt werden, so daß ein hoher sicherheitstechnischer Aufwand erforderlich ist.

Weit verbreitet sind Verfahren, die den Einsatz von Enzymen, speziell Proteasen, zur Lösung der Gelatine vorsehen.

In der DE-OS 2552928 wird lediglich der Einsatz von Bakterienprotease ohne weitere Angaben vorgeschlagen.

Zur mikrobiellen Herstellung von Bakterienproteasen werden in der Literatur eine Vielzahl von Verfahren angegeben. So wird in der DE-OS 2506806 vorgeschlagen, Peptinase aus Stämmen von *Cladosporium* sp. zu gewinnen. In der DE-OS 2813247 wird ein Verfahren zur Herstellung eines Gemisches von Peptinasen aus Schimmelpilzen, z. B. *Aspergillus oryzae* beschrieben. Eine andere Peptinase, die zur Gelatineverflüssigung geeignet ist und aus Stäbchenbakterien gewonnen wird, ist in der DE-AS 2343963 enthalten. Auch Stämme von *Pseudomonas fluorescens* als Peptinasebildner sind, z. B. in der DE-OS 2620307, genannt.

Es wurde bereits vorgeschlagen (WP C 12 N/ 2985 841.1), die enzymbildenden Mikroorganismen gemeinsam mit den Filmmaterialien zu kultivieren und dabei die Gelatinespaltprodukte als C-Quelle für den mikrobiellen Wachstumsprozeß zu nutzen. Als geeignete Bakterienstämme werden hierfür *Pseudomonas* spez. sowie *Serratia marcescens* genannt.

Allen beschriebenen enzymatischen Verfahren ist es gemeinsam, daß der Löseprozeß der Gelatine mit Enzymen mesophiler Mikroorganismen bei Temperaturen bis maximal 55°C erfolgt. Daraus resultieren jedoch erhebliche Lösezeiten, die je nach der speziellen Präparation der Gelatine bzw. der Zwischenschicht bis zu 20 Stunden betragen können. Durch diese langen Lösezeiten wird die Ökonomie dieser enzymatischen Aufbereitungsverfahren erheblich belastet.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch die Verkürzung der Behandlungszeit für die Lösung der Gelatine vom Filmmaterial eine Verbesserung der Ökonomie des Verfahrens zur Silberrückgewinnung zu erreichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein spezielles Enzym für den Gelatinelösungsprozeß einzusetzen, welches einen Temperaturbereich bis zu 75°C für den Gelatinelösungsprozeß realisieren läßt. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch den Einsatz einer hochspezifischen thermostabilen Protease gelöst. Hierzu besonders geeignete thermostabile Proteasen werden durch aerobe Kultivierung von thermophilen Bakterienstämmen der Gattung *Bacillus*, insbesondere der Stämme ZIMET 11093, ZIMET 11262 oder ZIMET 11227, die in der Kultursammlung des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der AdW der DDR hinterlegt wurden, gewonnen. Die Kultivierung der genannten Stämme erfolgt durch aerobe Kultivierung im Temperaturbereich von 66–68°C und im pH-Bereich von 6 bis 7. Als Kohlenstoffquelle werden kohlenhydrathaltige Substrate wie Glucose oder Saccharose verwendet. Die aus dem Fermentorablauf gewonnene proteasehaltige Lösung oder der Fermentorablauf selbst, der noch Mikroorganismen enthält, oder ein aus dem Fermentorablauf durch Wasserentzug hergestelltes Trockenrohenzym wird bei einer Temperatur von 70°C mit zerkleinertem Filmmaterial unter Rühren vermischt. Bereits nach wenigen Minuten löst sich die Gelatine vom Filmträgermaterial. Nach spätestens 10 Minuten kann die proteasehaltige Lösung mit der gelösten, gespaltenen Gelatine von den Filmschnitzeln abgelassen und für einen erneuten Löseprozeß eingesetzt werden. Eine proteasehaltige Lösung mit einer Aktivität von 15 PE/ml kann innerhalb von einer Stunde bei 70°C bei sechs Lösevorgängen von insgesamt 3 kg Röntgenfilm die Gelatine ablösen (eine proteolytische Einheit PE ist die Enzymmenge, die unter den Testbedingungen 100 µg Acocasein pro Minute zu trichloressiglichen Spaltprodukten hydrolysiert). In einem gesonderten dreistufigen Waschprozeß werden Reste der Enzymlösung vom Filmmaterial abgewaschen, wonach dann das Filmmaterial einer weiteren Verwendung zugeführt werden kann. Die Hauptmenge des Silbers oder des Silberbromids befindet sich in der Enzymlösung und im ersten Waschwasser, aus der es nach bekannten Verfahren gewonnen werden kann. Eine andere Möglichkeit der Durchführung des Gelatinelösungsverfahrens besteht darin, daß der Löseprozeß mit dem Fermentationsprozeß in einer Stufe erfolgt. Im Falle der Ablösung der Gelatine von Filmen ist es erforderlich, durch an sich bekannte technische Vorrichtungen die Verweilzeit der Filmschnitzel unabhängig von der Verweilzeit der Flüssigphase im Fermentor einzustellen. Der Vorteil der erfindungsgemäßen Verfahrensweise besteht in dem Einsatz einer hochspezifischen Protease, die im Verlaufe der Abbaureaktionen zu hochmolekularen Spaltprodukten der Gelatine führt und in dem die erhöhte Temperatur die physikalischen Vorgänge der Diffusion und der Ablösung der Spaltprodukte begünstigt. Die Erfindung wird durch folgende Beispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Die Kultur *Bacillus* sp. ZIMET 11262 wird bei einer Temperatur von 67°C und einem pH-Wert von 6,5 auf Saccharose im kontinuierlichen Prozeß unter Rühren und Belüften bei einer Durchflußrate von $D = 0,4$ /h gezüchtet. Zur pH-Regelung wird 2,5%iges Ammoniakwasser verwendet. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Saccharose	12 g/l
Phosphorsäure 85%ig	930 mg/l
Mangansulfat ($\times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	360 mg/l
Kaliumsulfat	450 mg/l
Kalziumchlorid ($\times 6 \text{ H}_2\text{O}$)	110 mg/l
Eisensulfat ($\times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	6,5 mg/l
Natriumchlorid	3,5 mg/l
Mangansulfat ($\times 4 \text{ H}_2\text{O}$)	2,8 mg/l
Kupfersulfat ($\times 5 \text{ H}_2\text{O}$)	1,6 mg/l
Zinksulfat ($\times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	1,3 mg/l
Borsäure	1,1 mg/l
Kobaltsulfat ($\times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	0,4 mg/l

Im ablaufenden Fermentationsmedium beträgt die Biomassekonzentration 3,5 g/l und die proteolytische Aktivität 13,5 PE/ml. Vom Fermentorablauf wird durch Zentrifugation die Biomasse abgetrennt. 500 ml der so erhaltenen klaren, proteasehaltigen Lösung werden in einem temperierbaren Rührgefäß von 1 l Inhalt mit 250 g zerschnittenen Röntgenfilmstücken vermischt. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 100 U/min und die Temperatur 70°C. Nach wenigen Minuten wird bereits an einzelnen Filmstücken visuell die Ablösung der Gelatineschicht erkennbar. Nach insgesamt 10 Minuten Einwirkzeit wird durch Abgießen der Enzymlösung die Reaktion beendet und die Filmstücke werden mit Wasser unter Rühren mehrmals gewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang bleibt das Waschwasser optisch klar. Die durch Abgießen erhaltenen 476 ml Enzymlösung werden mit dem ersten Waschwasser wieder auf 500 ml ergänzt und erneut zur Behandlung von 250 g frischen Röntgenfilmschnitzeln verwendet. Der Löseprozeß wird wieder unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und nach 15 Minuten beendet. Die Enzymlösung wird wieder abgegossen, mit 30 ml 1. Waschwasser ergänzt und erneut verwendet. Dieser Prozeß wird noch viermal wiederholt, so daß mit der eingesetzten Enzymlösung 6 Löseprozesse durchgeführt und insgesamt 1,5 kg Filmmaterial behandelt wurden. Die Enzymlösung wird mit allen Waschwässern vereinigt und zur Gewinnung des Silbers weiterbehandelt.

Beispiel 2

Der Löseprozeß wird genau wie nach Beispiel 1 durchgeführt, mit der Besonderheit, daß aus dem Fermentorablauf die Biomasse nicht abgetrennt wird und als Filmmaterial Schnitzel von Schwarzweißkinofilm eingesetzt wird. Die Lösezeiten betragen hier jeweils 15 Minuten. Mit einer eingesetzten Enzymlösung werden 5 Löseprozesse durchgeführt.

Beispiel 3

Gemäß Beispiel 2 werden 250 g zerschnittener Farb-Kino-Film bei 70°C mit 500 ml Fermentorablauf vermischt. Der Löseprozeß dauert 20 Minuten. Mit der eingesetzten Enzymlösung werden insgesamt 4 Löseprozesse durchgeführt.

Beispiel 4

250 g zerschnittener Farbkino film werden bei 70°C mit 500 ml Wasser und 4 g Trockenrohenzym, das aus 500 ml Fermentorablauf durch Wasserentzug hergestellt wurde, vermischt. Der Löseprozeß der Gelatine dauert 20 Minuten in dieser Enzymlösung, die für insgesamt 4 Löseprozesse benutzt wird.

Beispiel 5

In einem 12 l Laborfermentor (LFS 112 ZWG Mytron Heiligenstadt) wird ein Fermentationsprozeß gemäß Beispiel 1 betrieben. Parallel zu diesem Fermentor befindet sich ein 2-l-Rührbehälter, den das Fermentationsmedium im Außenkreislauf durchströmt.

Die Umlaufgeschwindigkeit beträgt 60 l/h. Der Rührbehälter wird mit 1 kg zerschnittenen Röntgenfilmstücken beschickt. Nach 10 Minuten werden die Filmschnitzel dem Reaktor entnommen und dreimal gewaschen. Der Reaktor wird anschließend wieder mit neuem Filmmaterial beschickt.