



11

635 366

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

21 Gesuchsnummer: 5644/77

73 Inhaber:
A. Nattermann & Cie. GmbH, Köln 30 (DE)

22 Anmeldungsdatum: 05.05.1977

72 Erfinder:
Dr. Klaus Peter Müller, Bergheim (DE)

24 Patent erteilt: 31.03.1983

74 Vertreter:
Brühwiler & Co., Zürich

54 Verfahren zur Herstellung eines lipasereichen Enzympräparates.

57 Ein lipasereiches Enzympräparat wird aus zerkleinertem Pankreasgewebe hergestellt. Das zerkleinert Pankreasgewebe wird mit einem organischen Lösungsmittelgemisch aus 80 bis 95 Vol.-% Halogenkohlenwasserstoff und 5 bis 20 Vol.-% eines mit Wasser nicht mischbaren Alkohols versetzt und bei 15 bis 20°C 12 bis 40 Stunden einwirken gelassen. Der Halogenkohlenwasserstoff hat einen Kochpunkt bei Normaldruck zwischen 47 und 130°C und eine Dichte von >1,3. Der Alkohol ist mit Wasser nicht mischbar und weist 4 bis 6 Kohlenstoffatome auf. Nach der oben angegebenen Einwirkungszeit wird die entstandene mittlere gewebewasserhaltige Emulsionsphase von der oberen und unteren Phase abgetrennt und aus ihr wird das Trockenenzympräparat gewonnen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von lipasereichen Enzympräparaten aus Pankreasgewebe durch Autolysieren und Entfetten des zerkleinerten Gewebes mittels eines Lösungsmittelgemisches aus Halogenkohlenwasserstoff und Alkohol sowie Ausfällung des Enzyms aus wässriger Phase durch Zugabe von Aceton und Trocknen der Fällung, dadurch gekennzeichnet, dass man das zerkleinerte Pankreasgewebe in einem organischen Lösungsmittelgemisch aus 80–95 Vol.-% Halogenkohlenwasserstoff, dessen Kochpunkt bei Normaldruck zwischen 47 und 130 °C liegt und dessen Dichte über 1,3 beträgt sowie 5–20 Vol.-% eines mit Wasser nicht mischbaren Alkohols mit 4–6 C-Atomen versetzt und bei 15–20 °C 12 bis 40 Stunden lang einwirken lässt, die entstandene mittlere gewebewasserhaltige Emulsionsphase von der oberen und unteren Phase abtrennt und aus ihr das Trockenenzympräparat gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man nach 12 bis 15 Stunden langer Einwirkung des Lösungsmittelgemisches die untere fetthaltige Lösungsmittelphase abzieht und erneut frisches Lösungsmittelgemisch hinzufügt, dann etwa 1 Stunde bei 25–35 °C gerührt wird, worauf man absitzen lässt und die mittlere Emulsionsphase aufarbeitet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Emulsionsphase mit dem Aceton überschichtet und dann so rasch vermischt, dass ein grobkörniges Enzymkonzentrat ausfällt.

4. Verfahren zur Herstellung von lipasereichen Enzympräparaten aus Pankreasgewebe durch Autolysieren und Entfetten des zerkleinerten Gewebes mittels eines Lösungsmittelgemisches aus einem aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoff und Alkoholen oder Alkoholen/Aceton sowie Ausfällung des Enzyms aus wässriger Phase durch Zugabe von Aceton und Trocknen der Fällung, dadurch gekennzeichnet, dass man das zerkleinerte Pankreasgewebe in einem organischen Lösungsmittelgemisch aus einem aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoff mit Alkoholen oder mit Alkoholen und Aceton versetzt und bei 15 bis 20 °C 4 Stunden lang einwirken lässt, die entstandene mittlere gewebewasserhaltige Emulsionsphase von der oberen und unteren Phase abtrennt und aus ihr das Trockenenzympräparat gewinnt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die Entfettung und Autolyse bei 15 °C vornimmt.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Emulsionsphase mit dem Aceton überschichtet und dann so rasch vermischt, dass ein grobkörniges Enzymkonzentrat ausfällt.

Zur Behandlung der Insuffizienz der Verdauungssäfte im Magen- und Darmtrakt sowie bei Verdauungsstörungen werden Fermentpräparate mit hoher Aktivität an Verdauungsenzymen, insbesondere Lipaseaktivität, benötigt. Als Ausgangsmaterial dient hierbei frisches oder tiefgefrorenes Gewebe der Pankreasdrüsen, insbesondere von Schweinepankreas. Um die Belastung des Organismus mit unwirksamen Bestandteilen in den Präparaten möglichst gering zu halten, soll die Fermentaktivität der für die Herstellung der Arzneimittel erforderlichen Produkte möglichst hoch sein. In der deutschen Patentschrift 24 08 379 ist ein Verfahren zur Herstellung eines lipasereichen Enzympräparats beschrieben, bei dem das zerkleinerte Pankreasgewebe zunächst mit einer Mischung aus 9 Volumenteilen Chloroform und 1 Volumenteil Butanol teilweise entfettet wird, worauf durch Stehenlassen des partiell entfetteten Gewebematerials bei 0 bis 4 °C über 24 bis 26 Stunden autolysiert wird, dann durch Behandlung mit Aceton weiter entfettet wird, worauf die Enzymaktivität mit 5%iger wässriger Äthanollösung extrahiert

und aus dem Extrakt durch Versetzen mit Aceton eine Fällung erhalten wird, die nach dem Trocknen ein Präparat mit hoher Lipaseaktivität darstellt. Nach einem älteren Vorschlag, wie er in der DE-Patentanmeldung P 25 05 887.1 niedergelegt wurde, kann man den durch Extraktion mit der wässrigen Äthanollösung erhaltenen Wirkstoffextrakt auch durch Lyophilisieren unmittelbar in ein trockenes Enzympräparat überführen. Wenn auch diese Produkte hinsichtlich ihrer Aktivität besser als die vorbekannten Lipasepräparate sind, so muss doch immer danach getrachtet werden, sowohl das Herstellungsverfahren zu vereinfachen, als auch die Enzymausbeute aus dem Drüsenmaterial und insbesondere die Aktivität der erhaltenen Produkte weiter zu steigern.

Überraschenderweise wurde nun festgestellt, dass die notwendige Hauptentfettung des zerkleinerten Pankreasgewebes und die Massnahme der Autolyse in eine Stufe zusammengelegt werden kann, wobei die Dauer der Autolyse sich auch wesentlich verkürzen lässt. Erfindungsgemäß wird zu dem zerkleinerten Pankreasgewebe ein organisches Lösungsmittelgemisch aus 80 bis 95 Vol.-% Halogenkohlenwasserstoff, dessen Kochpunkt bei Normaldruck zwischen 47 und 130 °C liegt und dessen Dichte über 1,3 beträgt, sowie 5 bis 20 Vol.-% eines mit Wasser nicht mischbaren Alkohols mit 4 bis 6 C-Atomen unter Rühren in einer solchen Menge hinzugefügt, bis eine bewegliche Suspension entstanden ist. Die so erhaltene Gewebesuspension wird nun bei 15 bis 20 °C 12 bis 40 Stunden, vorzugsweise 14 bis 16 Stunden lang stehengelasen, wobei die Suspension gegebenenfalls einige Male aufgerührt werden kann. Bei dieser Autolyse geben die Drüsenzellen ihren wässrigen Zellinhalt frei, der mit dem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittelgemisch dann eine Emulsion bildet. Beim ruhigen Stehenlassen bilden sich drei Schichten, worauf die mittlere Phase, die aus der Emulsion der eiweißhaltigen Gewebeflüssigkeit der Pankreasdrüsen und dem Lösungsmittelgemisch besteht, von der unteren und oberen Phase in üblicher Weise abgetrennt wird. Die obere Phase besteht hierbei im wesentlichen aus den entfetteten Gewebefasern, während die untere Phase im wesentlichen aus dem fetthaltigen Lösungsmittel besteht. Durch Auspressen der isolierten oberen Faserschicht oder durch Zentrifugieren lässt sich auch noch die Ausbeute an emulgiertem Gewebeflüssigkeit bis zu 10% erhöhen. Die vereinigten Emulsionen werden im allgemeinen durch Zugabe von Aceton gebrochen, wobei ein lipasereicher Niederschlag ausfällt. Nach dem Fällen lässt man das Enzymkonzentrat absitzen, dekantiert die Lösung ab und wäscht das Endprodukt mehrfach durch Aufrühren in Aceton. Das Produkt kann mit Hilfe einer Siebeinrichtung oder einer Zentrifuge abgetrennt, anschliessend noch im Vakuum getrocknet und von Lösungsmittelresten befreit werden. Die Korngrößenverteilung der Fällung und damit das Schüttgewicht des Enzympräparates lässt sich durch die Geschwindigkeit des Vermischens von Emulsion mit dem Aceton innerhalb gewisser Grenzen überraschenderweise beeinflussen. Zur Erzielung eines grobkörnigen Materials überschichtet man zunächst die Emulsion mit der zur Fällung notwendigen Acetonmenge und verröhrt anschliessend beide Schichten rasch miteinander. Ein sehr feinteiliges Korn lässt sich dagegen dadurch erzielen, dass man Aceton langsam unter Rühren zusetzt.

Als halogenierter Kohlenwasserstoff eignen sich u.a. das Trichlortrifluoräthan, das bei ca. 47 °C siedet, sowie die Chlor-kohlenwasserstoffe mit Siedpunkt bis 121 °C bzw. Gemische von Halogenkohlenwasserstoffen.

Im erfindungsgemäß zu verwendenden organischen Lösungsmittelgemisch hat sich besonders das Trichloräthylen als vorteilhaft erwiesen, weil die Verwendung dieses Chlorkohlenwasserstoffs nicht nur zu einer besonders hohen Aktivität des erhaltenen Präparats führt, sondern weil darüber hinaus das nach Durchführung des verfahrens erhaltene Flüssigkeitsgemisch aus Halogenkohlenwasserstoff, Alkohol, Aceton und

Wasser sich wieder leicht durch Destillation aufzutrennen lässt. Die Rückgewinnung eingesetzter Lösungsmittel stellt gerade bei einem grossen technischen Verfahren eine wichtige wirtschaftliche Komponente dar. Insbesondere durch Acetropbildung können manche Lösungsmittelgemische bekanntlich beim Destillieren nur schwer aufgetrennt und in reiner Substanz wiedergewonnen werden.

Die Verwendung eines Chlorkohlenwasserstoffs mit einer Dichte über 1,3 ist deshalb von Bedeutung, weil dadurch die Trennung der Suspension in die drei gewünschten Phasen bei der Durchführung des Präparates erleichtert bzw. ermöglicht wird. Die Anwesenheit einer geringen Menge Aceton in dem organischen Lösungsmittelgemisch hat sich für die Ausbildung der drei Schichten als vorteilhaft erwiesen.

Als im wesentlichen nicht mit Wasser mischbarer Alkohol eignet sich insbesondere das Normalbutanol, jedoch sind auch Amylalkohol und Hexylalkohol geeignet. Diese Alkohole unterstützen die Freilegung der beim erfindungsgemässen Verfahren in der mittleren Phase anfallenden Enzymaktivität.

Die Autolyse unter entfettenden Bedingungen und die Freilegung der Enzymaktivität aus dem Zellgewebe kann durch eine leichte Erwärmung gefördert werden. Daher wird bei einer bevorzugten Durchführungsform des Verfahrens die Autolyse zweistufig durchgeführt. Hierbei wird das zerkleinerte Pankreasgewebe zunächst mit dem Lösungsmittelgemisch in einer Menge von 1–2 l/kg Drüsenmaterial versetzt und bei ca. 15 °C 14 bis 16 Stunden lang behandelt. Dann trennt man das sich absetzende fetthaltige Lösungsmittel, d.h. die untere Schicht, möglichst weitgehend ab und versetzt den Rückstand erneut mit 1–2 l Lösungsmittelgemisch je kg Gewebematerial, worauf die Temperatur auf 25–35 °C, vorzugsweise 25–30 °C, erhöht wird. Nach ca. 1 Stunde langem Rühren, bei dem eine kräftige Nachautolyse erfolgt, wird wie beschrieben aufgearbeitet, d.h. es wird stehengelassen und die mittlere Emulsionsschicht aufgearbeitet.

Das erfindungsgemässen Verfahren führt nicht nur zu einer wesentlichen Vereinfachung des Herstellungsverfahrens, sondern auch zu Präparaten mit gesteigerter Enzymaktivität. Die Kombination von Entfettung und Autolyse mit dem organischen Lösungsmittelgemisch lässt die Enzymaktivität der Zellgewebe in Form einer hochkonzentrierten Emulsion anfallen, aus der unmittelbar das Enzym ausgefällt werden kann. Dadurch entfallen die sonst erforderlichen Extraktionsmassnahmen, bei denen spezielle Lösungsmittel, z.B. wässriger Alkohol oder dgl. verwendet werden. Die Art der Fällung mit dem Aceton ermöglicht es auch, dass hierbei dem Enzympulver bereits der gewünschte Granulationsgrad verliehen wird, so dass die nachträgliche Granulation zu grösseren Teilchen, wenn diese gewünscht werden, nicht mehr notwendig ist. Die erfindungsgemäss zu verwendenden Lösungsmittel ermöglichen auch deren einfache Trennung und Wiedergewinnung, was für den grossen technischen Betrieb von Bedeutung ist.

Erfindungsgemäss wird auch anstelle des Halogenkohlenwasserstoffs ein aromatischer Kohlenwasserstoff wie Toluol oder ein paraffinischer Kohlenwasserstoff wie Hexan verwendet und im Gemisch mit Alkohol oder Alkohol und Aceton eingesetzt. Der Vorteil dieser Verfahrensweise liegt darin, dass durch die Verwendung des anderen Lösungsmittels eine wesentliche Verkürzung der Autolyse und Entfettungszeit verbunden mit einer Automatisierung und damit insgesamt eine vereinfachte Gewinnung des Pankreas-Enzymkonzentrats im grossen technischen Verfahren ermöglicht wird. So lässt sich beispielsweise die Entfettung und Autolyse bei 15 °C in 4 Stunden vornehmen. Eine besondere Vereinfachung liegt in der einfacheren Abscheidung der Feststoffe mit Hilfe eines Zentrifugaldekanters.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele noch näher erläutert.

Beispiel 1

150 kg tiefgefrorenes Pankreas werden im Schneidmischer auf Reiskorn- bis Linsengrösse zerkleinert und in einen Doppelmantelbehälter mit Rührwerk gegeben. Der Mantel des Behälters wird von Kühlwasser von 15 °C durchflossen.

Man versetzt den Feststoff mit 150 l Trichloräthylen, das bis zu 0,6 Gew.-% Aceton enthalten darf und 25 l Butanol (1) und vermischt Feststoff und Lösungsmittel mit Hilfe des Rührwerkes. Nach etwa 1 h ist der Feststoff aufgetaut. Man deckt den Behälter ab und lässt das Rührwerk 15 h laufen. Danach stellt man das Rührwerk ab, der Feststoff schwimmt auf und die darunter stehende gelbe, fetthaltige Lösung wird abgelassen. Man 10 ersetzt das den Behälter durchströmende Kühlwasser durch Warmwasser von 30–32 °C, versetzt den Feststoff erneut mit 165 l

15 Entfettungsgemisch und röhrt die Mischung 1 h. Die Mischung erreicht während dieser Zeit eine Endtemperatur von 28–30 °C. Man stellt den Rührmotor ab und lässt Emulsion und Feststoff aufschwimmen. Zunächst zieht man einen Teil der Lösungsmittel als klare gelbliche Lösung ab, die zur Lösungsmittelrückgewinnung gegeben wird. Die daran anschliessend ablaufende braune Emulsion wird aufgefangen. Der gegen Ablaufende austretende Dickschlamm wird auf einer Siebschneckenpresse über einem Siebkasten ausgepresst. Der Pressenablauf wird der Emulsion zugesetzt.

20 25 Man gibt die Emulsion zurück in den Rührbehälter, überschichtet sie mit 1 bis 1,5 l Aceton/kg Pankreas, wobei das Aceton mit bis zu 3 Gew.-% Trichloräthylen, aber mit weniger als 1% Wasser verunreinigt sein darf, und vermischt beide Phasen durch Anstellen des Rührwerkes. Nach 15 min wird das Rührwerk abgestellt. Das Produkt sinkt als Feststoff auf den Boden des Rührbehälters. Man saugt die überstehende Lösung ab, suspendiert den Feststoff zum Waschen in 0,3–0,5 l Aceton/kg Pankreas, röhrt 5 min, lässt erneut absitzen und saugt die Lösung ab. Der Waschvorgang wird insgesamt 4–5 mal durchgeführt,

30 35 wobei bei Verwendung einer Zentrifuge zum Abtrennen des Pankreatins auf den Absitzvorgang in der letzten Wäsche verzichtet werden kann. Man kann auch den Feststoffbrei in einen Siebkorb ablassen, wobei naturgemäß die Acetonverluste grösser werden. Das Feuchtgut wird anschliessend im Vakuumtrockenschrank bei 45–50 °C Heiztemperatur und 30 Torr oder im Wirbelschichttrockner bei 50 °C Luftfeintritts- und 40 °C Luftaustrittstemperatur getrocknet. Man kann das Material durch Absieben in diverse Kornklassen zerlegen. Feinstkorn kann in einer Sprühgranulation agglomeriert, Grobkorn durch Schrotzen 40 45 zerkleinert werden. Die Ergebnisse der Versuche bei Verwendung von Drüsen gleicher Provenienz zeigt nachfolgende Tabelle.

Tabelle 1

Vergleich von Ausbeute und Lipaseaktivität von Pankreatin, das nach dem Stand der Technik und dieser Anmeldung hergestellt wurde

55 Drüsenger- kunft	Ausbeute	Lipaseaktivität (FIP-E./g) *	Herstellverfahren
A	7,3	96 200	Stand der Technik
A	10,1	100 000	diese Anmeldung
B	6,3	71 000	Stand der Technik
B	7,4	86 000	diese Anmeldung
C	7,8	106 000	Stand der Technik
C	10,1	119 000	diese Anmeldung
C	9,2	120 000	diese Anmeldung

* FIP-E./g = Fédération Internationale des Pharmacie Einheiten je Gramm (Substrat).

Tabelle 2
Vergleich des Schüttgewichtes und der Korngrößenverteilung von Pankreatin aus Drüsen gleicher Provenienz bei Anwendung verschiedener Verfahren der Acetonzugabe bei der Fällung

Ausbeute (%)	Schütt- gewicht (g/l)	Lipaseaktivität (FIP-E./g)	Art der Acetonzugabe bei der Fällung	Korngrößenverteilung (Seite 6)		
				0,315 (%)	0,315–0,800 (%)	0,800 (%)
9,4	360	84 000	langsam unter Rühren	—	—	—
10,1	417	93 000		98,1	1,2	0,7
11,5	440	76 000		97,5	2,1	0,4
9,8	463	93 000				
13,7	460	76 500	Verfahren mit Über- schichten	46,4	52,6	1,0
12,9	514	81 500		—	—	—
9,1	521	83 000		—	—	—
14,6	482	79 200		8,0	42,9	49,1

Beispiel 2

150 kg tiefgefrorenes Pankreas werden im Schneidmischer wie in Beispiel 1 zerkleinert und in einen Doppelmantelbehälter mit Rührwerk gegeben. Der Mantel des Behälters wird von Kühlwasser von 15 °C durchflossen. Der Feststoff wird mit 150 l Methylenechlorid und 15 l Butanol (1) versetzt und unter Rühren 15 h entfettet. Man gibt zur Mischung weitere 100 l Methylenchlorid, röhrt gut durch und stellt das Rührwerk ab. Die klare Unterphase wird abgelassen. Man gibt erneut 150 l Methylenchlorid und 15 l Butanol (1) hinzu, erwärmt die Mischung auf 30 °C (1 h) und trennt die klare Lösungsschicht und die Faserschicht ab.

Nach Auspressen der Faser erhält man 140 l Emulsion, die auf 15 °C abgekühlt und mit 140 l Aceton überschichtet wird. Man vermischt Emulsion und Aceton, dekantiert vom abgesetzten Pankreatin und erhält entsprechend Beispiel 1 eine Ausbeute an Enzymkonzentrat von 9,3%, bezogen auf eingesetztes Pankreas.

Lipaseaktivität des Enzymkonzentrats: 86 500 FIP-E./g.

Beispiel 3

150 kg tiefgefrorenes Pankreas werden nach Beispiel 1 zerkleinert und in einen auf 15 °C abgekühlten Rührbehälter gegeben. Dazu werden 150 l Tetrachlorkohlenstoff und 15 l n-Amylalkohol gegeben und das Pankreas bei 15 °C (15 h) entfettet. Man setzt 75 l CCl_4 und 100 l Aceton zu, stellt das Rührwerk ab und trennt die fetthaltige Unterphase ab. Dann erwärmt man die Mischung auf 29 °C auf, setzt erneut 15 l Amylalkohol und 150 l CCl_4 hinzu, röhrt 1 h und trennt wie in Beispiel 1 100 l Emulsion ab. Man überschichtet die Emulsion mit 100 l Aceton und fällt das Enzymkonzentrat aus. Nach Waschen und Trocknen wer-

den 10,1% Enzymkonzentrat mit 91 000 FIP-E./g Lipaseaktivität erhalten.

Beispiel 4

150 kg tiefgefrorenes Pankreas werden wie in Beispiel 1 zerkleinert und in einen auf 15 °C gekühlten Rührbehälter gegeben. Man setzt 15 l Butanol-(1) und 150 l 1,1,1-Trichloräthan hinzu und führt bei 15 °C (15 h) die Entfettung unter Rühren durch. Dann gibt man 75 l Aceton hinzu und trennt die fetthaltige Lösung ab. Man setzt erneut 150 l 1,1,1-Trichloräthan hinzu, erwärmt auf 25 °C und trennt nach 1 h 100 l Emulsion ab. Man überschichtet die Emulsion mit 100 l Aceton und fällt das Enzymkonzentrat aus. Nach Waschen und Trocknen werden 9,8% Ausbeute eines Produktes mit 88 500 FIP-E./g Lipaseaktivität erhalten.

Beispiel 5–13

150 kg tiefgefrorenes Pankreas werden entsprechend Beispiel 1–5 zerkleinert und entfettet. Art und verwendete Menge an Entfettungslösung gibt Tabelle 3 an. Ebenso ist ein eventueller Acetonzusatz V_1 nach der 1. Entfettung vor der ersten Trennung zwischen Faserstoff und klarer Fettlösung in Tabelle 3 verzeichnet.

Zum Rückstand werden jeweils 50 l Halogenkohlenwasserstoff und 15 l Alkohol gegeben, die Mischung 1 h bei 15 °C gehalten und V_2 l Emulsion entsprechend Beispiel 1 gewonnen. Die Emulsion wird auf 15 °C abgekühlt, mit V_3 l Aceton überschichtet und vermischt. Nach Waschen mit Aceton – entsprechend Beispiel 1 – und Trocknen werden A % Ausbeute an Enzymkonzentrat mit einem Lipasegehalt von B FIP-E./g erhalten. Alle Zahlenangaben enthält Tabelle 3.

Tabelle 3
Einsatz verschiedener Entfettungsgemische zur Gewinnung von Pankreatin hoher Lipaseaktivität

Bei- spiel Nr.	Entfettungsgemisch	Acetonzusatz am Ende der 1. Entfettung	Temperatur bei Nach- entfettung	Emul- sions- Menge	Menge an Pankrea- tin		Lipase- aktivität
					V ₂ (l)	V ₃ (l)	
5	150 l CCl ₄ 15 l Butanol (1)	0	31	185	305	10,2	90 000
6	150 l Trichloräthylen 15 l n-Hexanol	100	30	165	185	9,7	86 000
7	150 l Trichloräthylen 15 l Butanol (1)	0	28	145	160	9,9	88 000
8	150 l Trichloräthylen 15 l n Amylalkohol	90	30	150	150	10,5	87 500
9	150 l Trichloräthylen 30 l n-Butanol	0	28	150	150	10,8	90 500
10	150 l Chloroform 15 l n-Butanol	80	29	150	180	9,9	86 500
11	150 l Trichloräthylen 7,5 l n-Butanol	60	28	145	155	10,7	91 000
12	150 l Trichloräthan 15 l n-Hexanol	100	29	110	120	10,3	87 000
13	150 l Tetrachloräthylen 15 l n-Butanol	0	30	120	130	10,1	89 000

Beispiel 14

100 kg tiefgefrorenes Pankreas werden auf Linsengrösse zerkleinert, mit 75 l Toluol und 25 l n-Butanol versetzt und 4 h unter Röhren in einem von Wasser mit 15 °C umspülten Rührbehälter entfettet. Die entstehende Suspension wird einem Zentrifugaldekanter zugeführt und der Feststoff abgeschieden.

Das Dekantat ist eine weisse Milch, die mit Aceton gefällt wird. Der Niederschlag wird gewaschen und getrocknet. Ausbeute an Enzymkonzentrat: 10,0% bezogen auf Pankreas Lipaseaktivität: 81 000 FIP-E/g
Restfettgehalt: 0,052%
Schüttgewicht: 530 g/l

Beispiel 15

100 kg tiefgefrorenes Pankreas werden auf Linsengrösse zerkleinert, mit 75 l Toluol oder Hexan, 15 l Aceton und 20 l n-Butanol versetzt und 4 h unter Röhren bei Erwärmen auf 15 °C entfettet. Das Gemisch wird mit Hilfe eines Zentrifugaldekanters von Feststoffen befreit. Das milchige Dekantat wird mit Aceton gefällt. Der Niederschlag wird gewaschen und getrocknet. Ausbeute an Enzymkonzentrat: 11,8% bezogen auf Pankreas
40 Lipaseaktivität: 77 000 FIP-E/g
Restfettgehalt: 0,022%
Schüttgewicht: 490 g/l.