



Nederland

⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **9101869**

⑲ NL

- ⑤4 **Protease als taminecomplex bevattende enzympreparaten, de toepassing hiervan alsmede leder, bereid met behulp van deze preparaten.**
- ⑤1 Int.Cl.⁵: C12N 9/50, C12N 9/96, C14C 1/00.
- ⑦1 Aanvrager: Röhm GmbH te Darmstadt, Bondsrepubliek Duitsland.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.
Nederlandsch Octrooibureau
Scheveningseweg 82
2517 KZ 's-Gravenhage.
- ⑦2 Uitvinder(s): Jürgen Christner te Seeheim-Jugenheim, Bondsrepubliek Duitsland. Günter Partheil te Ober-Ramstadt, Bondsrepubliek Duitsland. Hermann Plainer te Reinheim, Bondsrepubliek Duitsland. Roland Reiner te Darmstadt, Bondsrepubliek Duitsland.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 9101869.
- ②2 Ingediend 8 november 1991.
- ③2 Voorrang ingeroepen vanaf 10 november 1990.
- ③3 Land van voorrang: Bondsrepubliek Duitsland (DE).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: P 4035839.
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 juni 1992.

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

Uittreksel

De uitvinding heeft betrekking op protease als werkzaam enzym bevattende, van oppervlakte-actieve stoffen vrij zijnde poedervormige of
5 gegranuleerde enzympreparaten, waarbij in de enzympreparaten EP de protease als tanninecomplex voorkomt, met dien verstande, dat de enzympreparaten EP voor ten minste 50 en ten hoogste 99,9 gew.% uit een of meer als versnijdingsmiddelen op zichzelf gebruikelijke zouten bestaan.

Protease als tanninecomplex bevattende enzympreparaten, de toepassing hiervan alsmede leder, bereid met behulp van deze preparaten.

5

Gebied van de uitvinding

De uitvinding heeft betrekking op protease als werkzame enzymen bevattende van oppervlakte-actieve stoffen vrij zijnde vaste enzympreparaten voor het weken, beitsen en ontharen van huiden bij de leerbereiding, die door precipitatie van tannine worden verkregen.

Stand van de techniek

De techniek van de precipitatie van tannine is reeds lange tijd een incidenteel toegepaste werkwijzevariant bij het isoleren van enzymen uit oplossingen, bijvoorbeeld uit plantesappen of waterige cultuurmedia. Hiervoor bestaat een relatief ruime stand der techniek (vergelijk bijvoorbeeld GB-C-1.156.900, DE-A-1.642.619). Het doel is daarbij gewoonlijk de zuivering van enzymen. Als ondersteunende maatregelen voor een goede precipitatie dienen de toevoeging van gelatine resp. het werken in een zuur pH-traject (pH 3-5). Daar tannine echter bij de verdere enzymwerking stoort - tenslotte vormt het immers een onoplosbaar complex met de enzymen, die daarmee kunnen worden geprecipiteerd - moet het weer worden verwijderd, hetgeen meestal plaatsvindt door een behandeling van het neerslag met organische oplosmiddelen, bijvoorbeeld met aceton of ethanol of door toevoeging van een oppervlakte-actieve stof (tenside) respectievelijk door verhoging van de pH bij de tannineprecipitatie: alle maatregelen die in het algemeen slechts op laboratoriumschaal zonder aanzienlijke complicaties kunnen worden verwezenlijkt.

De technische toepassing van de tanninecomplexen zelf is in slechts weinig gevallen beschreven. Zo zal een tanninecomplex samen met ondermelk door droging tot een stabiel α -amylasepreparaat worden verwerkt (CS 141.233). Voor medicinale toepassing is voorzien in een onoplosbaar pancreaspreparaat, dat door precipitatie van pancreas met behulp van looizuur werd bereid. Het preparaat is onoplosbaar in het zure maagsap, ontplooit echter de werking ervan in de alkalische delen van de darm (DE-C-128 419).

Verder worden in DE-A-2.143.945 "in water onoplosbare door de huid verdraaglijke gedroogde enzymadducten" o.a. in de vorm van tanninecomplexen beschreven. Voor de praktische toepassing beoogt men bijvoorbeeld

9 1 0 1 8 6 9

het bij de tannineprecipitatie gewonnen adduct van een bacterieproteïnase direct te verwerken in wasmiddelpoeder. Daar het tanninecomplex volledig werkzaam moet zijn tijdens het wassen moet dit op het tijdstip van toepassing d.w.z. in het wasbad "geïntegreerd" zijn.

5

Probleem en oplossing

Zoals blijkt uit de voorgaande weergave van de stand der techniek stelt de werkwijze van de tannineprecipitatie van enzymen uit waterig milieu weliswaar een bruikbare precipitatiemethode voor, echter scheen de
10 relatieve stabiliteit van deze neergeslagen enzym-tanninecomplexen een industrieel gebruik hiervan, afgezien van de genoemde uitzonderingen, tot nu toe in de weg te staan.

Voor de bereiding van vaste enzympreparaten bij de vervaardiging van leder, in het bijzonder van de proteïnase bevattende preparaten voor
15 toepassing als beits- en weekpreparaten werd tot nu toe voornamelijk de precipitatie met behulp van ammoniumsulfaat of natriumsulfaat uit pancreas-perssap of bacteriecultuursap toegepast (vergelijk Ullmans Encyclopädie der technischen Chemie, 4de druk, band 10, blz 475 tot 561, blz. 495 en volgende, Verlag Chemie, 1975, DE-A-2.234.412).

20 Deze wijze van werken is echter, in het bijzonder beschouwd vanuit ecologische gezichtspunten, geenszins ideaal, daar deze gewoonlijk een zeer aanzienlijke belasting van het afvalwater met zich meebrengt. Dit wordt duidelijk uit de gebruikelijke vuistregel, die zegt dat men op 100 l enzym bevattend sap voor het neerslaan 50 kg ammoniumsulfaat nodig
25 heeft. Een dergelijke zoutvracht is geheel in strijd met de huidige tendens in de afvalwaterhuishouding de sulfaatbelasting zoveel mogelijk te beperken. Na te streven zou meer een efficiënte precipitatiemethode van enzym zijn, waarbij de belasting van het afvalwater belangrijk geringer en tenslotte ook goedkoper zou zijn, speciaal met het oog op de onder
30 zeer bijzondere kostendruk werkende lederindustrie. Er werd nu gevonden dat de proteïnasepreparaten EP volgens de uitvinding zeer dicht bij de genoemde voorstellingen van de stand der techniek komen. De uitvinding betreft een protease als werkzaam enzym bevattend (in hoofdzaak) vrij van oppervlakte-actieve stoffen zijnd, vast, d.w.z. poedervormig of gegranu-
35 leerd enzympreparaat EP, dat is verkregen als tanninecomplex door precipitatie van de in waterig milieu voorkomende werkzame enzymen door toevoeging van tannine met dien verstande, dat het enzympreparaat voor ten minste 50 gew.%, bij voorkeur voor meer dan 90 gew.% en ten hoogste 99,9 gew.% uit een of meer als versnijdingsmiddelen gebruikelijke zouten

9101869

bestaat.

Onder "tanninen" in de zin van de onderhavige uitvinding moeten de onder deze naam samengevatte polyfenolen worden begrepen, gewoonlijk van natuurlijke aard, in het bijzonder de looizuren. Nauwkeuriger opgaven bevinden zich in Ullmann, Encyclopädie der Techn. Chemie, 3de druk, band 11, blz. 593 tot 594, Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 2de druk band 12, blz 319 tot 325, J. Wiley 1967, Zeichmeister Hersg. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, band 41, blz. 1-46, Springer Verlag).

Onder "proteasen" moeten de onder E.C.3.4. samengevatte enzymen worden begrepen.

(Vgl. Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 3de druk, band 9, blz. 173 tot 223, J. Wiley 1980, E. Pfeleiderer, R. Reiner in H.J. Rehm & G. Reed, Biotechnology, band 6b, 729-742, VCH 1988, K. Aunstrup in B. Spencer Ed. Industrial Aspects of Biochemistry, vol. 30 (I) blz. 23 tot 46, Noord Holland, 1974).

Er worden verschillende onderscheidingscriteria toegepast, waaronder de onderscheiding volgens herkomst:

a) Dierlijke herkomst, zoals bijvoorbeeld

α) Rennine (E.C.3.4.23.4)

β) Pancreas-proteasen

Pancreatine, in het bijzonder trypsine, chymotrypsine (pH-werkingstraject ca. 7-10), pepsine (E.C.3.4.23.1) (pH-werkingstraject ca. 1,5-4,0), kathepsine (E.C.3.4.23.5) werkingstraject ca. 4,0-5,0)

b) Plantaardige herkomst

α) Papaïne (E.C.3.4.22.1) pH-werkingstraject ca. 5,0-8,0

β) Ficine (E.C.3.4.22.3) pH-werkingstraject ca. 4,0-9,0.

γ) Bromelaïne (E.C.3.4.22.4) en 3.4.22.5) pH-werkingstraject ca. 5,0-7,0

c) Microbiële herkomst (volgens L. Keay in "Process Biochemistry" 1971; blz. 17 tot 21).

α) uit Bacillus-soorten

zoals B. subtilis, B. licheniformis, B. alkalophilus, B. cereus, B. natto, B. vulgatus, B. mycoïdes.

- β) uit streptococcus-soorten
- γ) uit streptomyces-soorten
zoals streptomyces fradiae, S. griseus, S. rectus
- δ) uit Aspergillus-soorten
5 zoals Aspergillus flavus-oryzae, A. niger, A. saitoi.
A. usamii
- ε) uit Mucor- en Rhizopus-soorten
zoals Mucor pusillus, M. miehei
- ζ) Endothia-soorten
10 zoals Endothia paratitica
- η) uit Trametes-soorten
zoals Trametes sanguinea

Behalve het onderscheid volgens herkomst vindt ook het onderscheid
15 volgens de plaats van aangrijpen (exo-versus endo-enzym) en op grond van
de "active site" van de proteasen (serine-proteasen, die door DFP geremd
worden, sulphydrylenzymen) toepassing.

Verder is van aanzienlijke praktische betekenis de pH-afhankelijk-
heid van de enzymactiviteit. Men onderscheidt derhalve in de eerste
20 plaats uit praktisch gezichtspunt:

- i) alkalische proteasen met een werkingsoptimum ongeveer in het pH-
traject van 7,5 tot 13, in het bijzonder alkalische bacterieprotea-
sen (E.C.3.4.21.) (die meestal behoren tot het serine-type) en
25 alkalische schimmelproteasen.
- ii) Neutrale proteasen met een werkingsoptimum in het pH-traject van
6,0 tot 9,0, in het bijzonder neutrale bacterieproteasen
(E.C.3.4.24) (die alle behoren tot de metallo-enzymen) en schimmel-
30 proteasen, bijvoorbeeld Bacillus-proteasen, Pseudomonas-proteasen,
Streptomyces-proteasen, Aspergillus-proteasen.
- iii) Zure proteasen met een werkingsoptimum in het pH-traject van 2,0
tot 5,0 (E.C.3.4.23), in het bijzonder schimmelproteasen, b.v. uit
35 Rhizopus spp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Mucor spp. en
Impex lacteus en Endothia parasitica.

Genoemd worden als alkalische proteasen in het bijzonder de subti-
lisinen, alkalische bacterie-proteïnasen van het serine-type, die in het

pH-traject 9-10 stabiel zijn en eniger mate ongevoelig zijn tegen perboraat.

De toepassing van proteolytische enzymen is sinds de invoering van de enzymatische beitsen (tryptische spijsverteringsenzymen van de al-
 5 vleesklier) in de OROPON®-beitsen door Dr. Otto Röhm (DE-C-2.005.19) ongeveer tachtig jaar geleden een vast bestanddeel bij de leerbereiding, in het bijzonder in het nathuis:

naast de toepassing in de beitsen (DE-C-927.464; DE-C-976.107; DE-C-941.811; DE-C-974.813; DE-C-975.095; DE-C-976.928; DE-C-1.120.066;
 10 DE-C-1.134.474; DE-C-1.219.620; DE-A-1.282.837; US-A-3.939.040; US-A-4.273.876) vinden enzympreparaten ook toepassing in het weekbad (DE-C-288.095; DE-C-976.662; DE-C-1.022.748; DE-C-1.034.317, DE-C-1.282.828; DE-C-2.059.453; US-A-4.278.432; US-A-4.344.762) en daarnaast bij het losmaken van het haar en de ontsluiting van de huid (US-A-4.294.087)

15 De proteolytische werkzaamheid van enzymen wordt gewoonlijk bepaald volgens de Anson-hemoglobine-methode (M.L. Anson J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939) resp. volgens de methode volgens Löhlein-Volhard (die Löhlein-Volhard'sche Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität. Gerbereichem. Taschenbuch. Dresden-Leipzig, 1955) als "LVE" (Löhlein-
 20 Volhard-eenheid). Onder een Löhlein-Volhard-eenheid wordt die hoeveelheid enzym begrepen, welke onder de specifieke omstandigheden van de methode 1,725 mg caseïne verteert. (Vergelijk R.J. Beynon, J.S. Bond, Proteolytic Enzymes IRL press).

Verder worden in het volgende voor de bepaling van de activiteit
 25 van de in het zure traject werkzame enzymen eenheden toegepast, die zijn afgeleid van de methode volgens Anson. Deze worden aangeduid als "Proteïnase-Units" "hemoglobine" U_{Hb} . Een U_{Hb} komt overeen met de hoeveelheid enzym, die de vrijmaking van in trichloorazijnzuur oplosbare breukstukken uit hemoglobine equivalent aan 1 μ mol tyrosine per minuut bij
 30 37°C (gemeten bij 280 nm) katalyseert. ($1 mU_{Hb} = 10^{-3} U_{Hb}$).

Zoals reeds vermeld vindt de bereiding van de proteïnasepreparaten EP volgens de uitvinding met voordeel direct uitgaande van waterige cultuurmedia resp. enzym bevattende sappen plaats. Een bijzonder belang heeft daarbij de winning van de preparaten EP uit pancreas.

35

A. Winning uit het complex van de pancreas

De maatregelen volgens de uitvinding kunnen gedeeltelijk aansluiten bij het isoleringsproces volgens de stand der techniek (vergelijk Ullman, 4de druk, band 10, loc.cit. blz. 536-537).

9101869

Het isoleren gaat met voordeel uit van pancreasklieren direct na de slacht, in hoofdzaak van varken of rund. Men kan bijvoorbeeld circa 100 - pancreasklieren in één keer verwerken doordat men direct na het slachten vet en bindweefsel zo goed mogelijk van de klieren verwijdt en dan het klierenweefsel homogeniseert, bijvoorbeeld met behulp van een vleesmolen. Direct hieropvolgend wordt doelmatig met ongeveer het dubbele volume (ca. 60 l) 0,25 n zwavelzuur bij 5°C 18 tot 24 uur geëxtraheerd. Na toevoeging van filtervlokken wordt, met voordeel via een pakmiddelpers, afgeperst. De persplaten kunnen worden weggegooid. Het zo gewonnen in hoge mate vetvrije perssap is het uitgangsmateriaal voor de winning van de proteïnase-preparaten.

B. Winning uit andere proteïnase bevattende waterige uitgangsextracten

In plaats van het pancreasperssap kunnen andere proteïnase bevattende cultuurvloeistoffen, bijvoorbeeld uit schimmel- of bacteriecultures worden toegepast (vergelijk de bovenstaande opgave over het voorkomen van enzymen alsmede Ullmann, 4de druk, band 10, blz. 518-522, H.J. Rehm, G. Reed Ed. Biotechnology, band 7a, blz. 156 tot 168, VCH 1987).

De cultuurvloeistoffen bevatten - als globaal houvast - tussen 0,01-3 gew.% proteïne. De winning van de proteasen volgens de uitvinding als werkzame enzymen bevattende, van oppervlakte-actieve stoffen vrije, vaste enzymprodukten EP in poedervorm of in de vorm van granulaat kan als volgt plaatsvinden:

Eerst is de juiste dosering van het precipitatiemiddel belangrijk gebleken. Bij toepassing van het tannine in ondermaat verkrijgt men een onvolledige precipitatie, bij toepassing van een overmaat ontsluit het gevormde tanninecomplex slechts nog moeilijk. Als doelmatige technische regel is gebleken juist zoveel precipitatiemiddel toe te passen dat in de bovenstaande vloeistof nog 0,5 tot 3% enzymreactiviteit wordt gevonden. Zo past men bijvoorbeeld bij de precipitatie uit pancreasperssap (dat ca. 2 gew.% actief proteïne bevat) met voordeel 4 gew.% Mimosa-looistof toe. In het algemeen ligt het proteïnegehalte in de tanninecomplexen bij 10 tot 80 gew.%.

In het bijzonder gaat men met voordeel zo te werk, dat men een lage pH-waarde van de waterige sappen instelt (waarbij natuurlijk ook acht moet worden geslagen op de stabiliteit van de betreffende proteasen). Als houvast wordt en pH-waarde van ca. 3-6 genoemd, cultuurvloeistoffen resp. pancreas hebben meestal met een pH-waarde van ca. 6. Een precipitatie boven een pH 7 is minder doelmatig. Van voordeel is in ieder geval de

toepassing van tamelijk lage temperaturen ($\leq 20^{\circ}\text{C}$). Verder is de toevoeging van in water onoplosbare oppervlakte-actieve stoffen met een HLB-waarde < 6 gunstig gebleken. Dergelijke oppervlakte-actieve stoffen zijn bijvoorbeeld gekozen uit de klasse van de esters met lange keten
 5 zoals bijvoorbeeld van de sorbitanvetzuuresters. Genoemd wordt bijvoorbeeld het sorbitan-monooctadecanaat en dergelijke. Oppervlakte-actieve stoffen van dit type zijn in de handel verkrijgbaar, vergelijk bijvoorbeeld produkten van de Fa. ATLAS Chemie, Essen van het type SPAN®.

Volgens de definitie wordt in een zoutgehalte van de enzympreparaten van ten minste 50 gew.% door een of meer als versnijdingsmiddelen
 10 gewoonlijk toegepaste zouten voorzien. Bij deze zouten gaat het bij voorkeur om ammoniumsulfaat of om natriumsulfaat.

Voordelige werkingen

15 Voordelige werkingen worden reeds uit het gezichtspunt van de bereiding en de hantering, niet in het laatst echter bij de toepassing van de enzympreparaten EP volgens de uitvinding geregistreerd.

De bereiding van de tanninecomplexen houdt een zeer goed benutten van de uitgangsprogramten in, daar het gaat om een zeer effectieve en
 20 tegelijkertijd selectieve precipitatiemethode. Te benadrukken is de belangrijk geringere milieubelasting door de "moederlogen" bijvoorbeeld vergeleken met de hoofdzakelijk uitgevoerde zoutprecipitaties. De enzympreparaten kunnen ook op het gebied van de arbeidshygiëne als "verbeterd" worden opgevat, daar zij niet stuiven en nauwelijks allergisch op de huid
 25 werken.

Uit toepassingsgezichtspunt kan als voordeel gelden dat de enzympreparaten volgens de uitvinding binnen de gebruikelijke technische wijze van werken kunnen worden toegepast, d.w.z. er is geen wezenlijke verandering van het procesverloop in de waterwerkplaats nodig. De toepassing van
 30 de enzympreparaten EP volgens de uitvinding is in het bijzonder in verband met het traditionele enzymatisch ondersteunde weken en van het beitsen geschikt gebleken. Daarbij is de aanwezigheid van een hoge toepassings-pH-waarde bijzonder gunstig ($\text{pH} > 8$), daar deze het "ontsluiten" van de tanninecomplexen begunstigt.

35

Toepassing: uitvoeren van het weken

Het weken van huidmateriaal, waarbij de bij het conserveren met zout optredende verharding van de huid teniet wordt gedaan, wordt gebruikelijk bij een $\text{pH} > 7,0$ tot 10,0 uitgevoerd. De gelijktijdige toepassing

van enzymen, in het bijzonder van proteolytische enzymen versnelt de wekende werking door "verteren" van de in water oplosbare en andere eiwitlichamen, die niet tot de uit collageen bestaande vezelstructuur van de huid behoren. In het algemeen worden bij het weken enzymen met een werkingstraject (respectievelijk pH-optimum van de proteolytische werking) bij een pH 7,0-10,0 toegepast. Met de verwijdering van de niet-collagene eiwitten wordt een snellere en intensievere bevochtiging van de huid gewaarborgd. Met voordeel wordt het weekwater alkalisch gemaakt (zie hiervoor) waarbij de pH-waarde echter steeds kleiner dan 12 moet blijven.

Bovendien zijn weekhulpmiddelen, zoals niet-ionogene en anionogene oppervlakte-actieve stoffen in combinatie met gesubstitueerde fenolen of dithiocarbamaten in de gebruikelijke concentratietrajecten (0,1-10 g/l) van voordeel. Als enzymatische toevoegsels voor de enzymformuleringen volgens de uitvinding komen bijvoorbeeld de hiervoor genoemde proteasen, in het bijzonder de onder c) genoemde proteasen in aanmerking: speciaal microbiële proteasen in het werkingstraject 7-11,0, in het bijzonder Bacillus-proteasen, Streptomyces-proteasen, alsmede schimmel-proteasen, bijvoorbeeld uit Aspergillussoorten zoals *A. saitoi* en *A. usarii*, verder zodanige uit *A. oryzae* met een pH-werkingstraject van 7,0 tot 9,5 verder uit *A. niger* en *A. flavus* met een pH-werkingstraject van 9,5 tot 11,0. In het algemeen ligt de concentratie van de proteolytische activiteiten van de toegepaste proteïnasen in het traject van 0,01-0,03 Anson-eenheden resp. 1000-3000 Löhlein-Volhard-eenheden per 1 weekvloei-stof. De toegepaste hoeveelheden enzympreparaat EP zullen derhalve afhankelijk van hun enzymgehalte overeenkomen met deze concentraties. Tenslotte kunnen de weekvloei-stoffen nog amylasen bevatten. De amylasen treden bijvoorbeeld op als begeleidendes enzymen van schimmelproteïnasen. Zij begunstigen de splitsing van glucosidische bindingen bij de proteoglucanen en glucoproteïnen van de huid. Op het weken volgt bij het doorlopen van het nathuis gewoonlijk het kalken, gevolgd door de ontkalking en het, in hoofdzaak enzymatische, beitsen.

Bij deze aansluitende trappen kunnen de enzympreparaten EP eveneens met voordeel worden toegepast.

35 De toepassing: beitsen

De ontkalking dient traditioneel om de alkaliteit van de bloten van pH-waarden van 13 tot 14 tot pH-waarden in het traject van 7 tot 8 te verminderen. Voor het ontkalken moeten bij voorkeur geen sterk gedissocieerde, maar zwakke organische zuren, bijvoorbeeld van het type van de

dicarbonzuren of zwak zure zouten worden toegepast. Bij het beitsen moeten epidermis-, haar- en pigmentresten worden verwijderd en bovendien een opensluiting van de huid worden bewerkstelligd. Bovendien worden niet-collagene eiwitbestanddelen verwijderd. (Vergelijk Ullmann, 4de druk, 5 band 16 loc.cit., blz. 119 tot 120). Bij het beitsen wordt conventioneel bij een pH 7,5 tot 8,5 gewerkt. Uit DE-A-3.108.428 is de toepassing van cyclische carbonaten bij het ontkalken bekend.

Tegelijkertijd kunnen bij het beitsen ook lipasen, bijvoorbeeld pancreas-lipasen met een werkingstraject bij een pH 7,0 tot 9,0 worden 10 toegepast. Ook amylasen volgens B), bijvoorbeeld pancreasamylasen met een werkingstraject bij een pH 5,5 tot 8,5, die de splitsing van glycosidische bindingen bij het beitsen begunstigen, zijn vooral als begeleidende enzymen van trypsine en chymotrypsine), van gunstige invloed op het beitsen.

15 De volgende voorbeelden dienen ter toelichting van de uitvinding.

Voorbeeld I

Bereiding van een preparaat uit pancreas

Aan 100 kg filtraat uit ontvette pancreasklieren, dat 1,4% proteïne 20 bevat, wordt onder roeren bij kamertemperatuur een oplossing van 5 kg looistof uit mimosa in 20 kg water toegevoegd. Het direct optredende precipitaat van het proteïne wordt nog 2 uur bij kamertemperatuur (20°C) geroerd en daarna gefiltreerd. De filterkoek wordt in een pakpers afgeperst en daarna enigszins klein gemaakt. Hierna wordt onder milde omstandigheden bij temperaturen van 60 tot 80°C gedroogd en in een verhouding 25 1:10 met ammoniumsulfaat gemengd. Het verkregen mengsel kan direct bij het weken of beitsen van leer, voor de ontharing en voor het losser maken van wetblues worden toegepast.

30 Voorbeeld II

Bereiding van een preparaat uit een A. oryzae-fermentatie

Uit een schimmelcultuur wordt door ultrafiltratie een proteïnase-concentraat gewonnen dat ca. 2% proteïne bevat en dit concentraat wordt tot +15°C gekoeld. Voor het verbeteren van de precipiteerbaarheid wordt 35 aan 100 kg van het concentraat 100 g SPAN®40 (produkt van Atlas Chemie, Essen) en vervolgens 4 kg Mimosa-looistof in 16 kg water toegevoegd. De precipitatie van het proteïne vangt direct aan. Na een uur rust wordt het mengsel onder toevoeging van 2 kg filtreerhulpmiddel op basis van perliet (DICALITE®4408, Fa. Dicalite, Neuss), gefiltreerd, (60 tot 80 l per uur

9101869

en m² filteroppervlak). De afgeperste filterkoek wordt voorzichtig gedroogd (60 tot 80°C) en in een verhouding 1:30 met een mengsel van natriumsulfaat en ammoniumsulfaat gemengd.

Het verkregen mengsel kan direct bij het weken of beitsen van leer,
5 voor de ontharing en voor het losmaken van wetblues worden toegepast.

Conclusies

1. Protease als werkzaam enzym bevattend, van oppervlakte-actieve stoffen vrij zijnd, poedervormig of gegranuleerd enzympreparaat, met het
5 kenmerk, dat in dit enzympreparaat EP het protease als tanninecomplex aanwezig is met dien verstande, dat het enzympreparaat EP voor ten minste 50 en ten hoogste 99,9 gew.% uit een of meer als versnijdingsmiddelen op zichzelf gebruikelijke zouten bestaat.

2. Enzympreparaat EP volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het
10 versnijdingsmiddel uit ammonium- of natriumsulfaat bestaat.

3. Toepassing van de enzympreparaten EP volgens conclusie 1 in het enzymatische weekbad.

4. Toepassing van de enzympreparaten EP volgens conclusie 1 in het enzymatische beitsbad.

15 5. Toepassing van de enzympreparaten EP volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat de aanvangs-pH-waarde ≥ 7 tot 11 bedraagt.

6. Toepassing van de enzympreparaten EP volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat de aanvangs-pH-waarde ≥ 8 tot 11 bedraagt.

20 7. Toepassing van de enzympreparaten EP volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat de aanvangs-pH-waarde ten minste > 5 tot 11 bedraagt.

8. Toepassing van de enzympreparaten EP volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de aanvangs-pH-waarde > 6 tot 9 bedraagt.

9. Leder, bereid met behulp van de enzympreparaten volgens conclusies 1 en 2 resp. verkregen onder toepassing van conclusies 3-8.

25

xxxxxxx