

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 575 927 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **93109846.1**

(51) Int. Cl.⁵: **C14C 1/06**

(22) Anmeldetag: **21.06.93**

(30) Priorität: **25.06.92 DE 4220838**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
29.12.93 Patentblatt 93/52

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

(71) Anmelder: **RÖHM GMBH**
Kirschenallee
D-64293 Darmstadt(DE)

(72) Erfinder: **Christner, Jürgen, Dr.**
Tannenstrasse 7B
D-6104 Seeheim-Jugenheim(DE)
Erfinder: **Taeger, Tilman, Dr.**
Breslauer Strasse 35
D-6104 Seeheim-Jugenheim(DE)
Erfinder: **Wick, Gertrud**
Aumühlenweg 36
D-6100 Darmstadt 12(DE)

(54) **Verfahren zum Äschern von Häuten und Fellen.**

(57) Die Erfindung betrifft Verfahren zum Äschern von Häuten und Fellen unter Verwendung proteolytischer Enzyme in wässrig-alkalischer Flotte, wobei die Äscherflotte mit einem pH-Wert im Bereich 10 - 14 gleichzeitig Thioharnstoffdioxid und alkalische Proteasen mit Elastaseaktivität enthält.

EP 0 575 927 A2

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Äschern von Häuten und Fellen, wobei die wäßrige Äscherflotte alkalische Proteasen gleichzeitig mit Thioharnstoffdioxid enthält.

5

Stand der Technik

Im Verlauf der sogenannten Wasserwerkstatt bei der Herstellung von Leder wird meist eine alkalische Verfahrensstufe, der Äscher, angewendet, der die Voraussetzungen für die Enthaarung schafft und den notwendigen Hautaufschluß bewirkt (Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 1st Ed., Vol. 8, 291 - 296, Interscience; Ullmann's Encyclopädie der Techn. Chemie, 3. Aufl. Bd. 11, S. 560, 4. Auflage Bd. 16, S. 118 - 119; F. Stather, Gerbereichemie und Gerbereitechnologie, Akademie-Verlag, Berlin 1967). In der Praxis arbeitet man durchweg mit sogenannten angeschärften Äschern, überwiegend einer Kombination von Calciumhydroxid und Natriumsulfid. Die Durchführung des Verfahrens im einzelnen richtet sich danach ob die Haare zerstört oder erhalten werden sollen. Den Gefahren, die der Umgang insbesondere mit anorganischem Sulfid mit sich bringt, versuchte man auf verschiedenen Wegen auszuweichen. Abgesehen von der Vermeidung von Bedingungen, unter denen Schwefelwasserstoff freigesetzt werden kann, hat sich das Interesse in jüngerer Zeit den enzymatisch gestützten Äscherverfahren zugewandt. (Vgl. E. Pfeleiderer u.R. Reiner in H.J. Rehm & G. Reed Ed., Biotechnology Vol. 6b, pg. 730 - 743, VCH, Weinheim 1988). Dabei kommen hauptsächlich proteolytische Enzyme [E.C.3.4] daneben noch Lipasen [E.C.3.1.1.3] und Amylasen [E.C.3.2.1] zur Anwendung.

Aufgabe und Lösung

Um den Gehalt an dem potentiell gefährlichen Sulfid im Abwasser zu senken, wurde die anteilige Verwendung von Thioverbindungen, Aminen und Hydrotropica vorgeschlagen. Mit Thioverbindungen alleine kann z.B. eine Enthaarung durchgeführt werden. Diese Tatsache bedeutet jedoch nicht die Lösung der Probleme, belasten doch auch diese Stoffe das Abwasser und führen zu Geruchsbelästigungen. Die enzymatische Enthaarung hat nach wie vor nur begrenzte Bedeutung, hauptsächlich bei Kleintierfellen und der Wollgewinnung wegen. Nicht durchgesetzt hat sich dagegen die enzymatische Enthaarung bei Großviehhäuten, in erster Linie wegen z.T. unvollkommener Enthaarungswirkung und wegen Schädigung der Kollagen-Narbenmembran bzw. wegen zu starken Hautsubstanzabbaus. Auch die anteilige Verwendung alkalischer Proteasen im Äscher zusammen mit geringen Mengen an Sulfiden ist nicht unbedenklich. So kann zwar der Sulfidanteil durch die Enzymverwendung deutlich gesenkt werden und man erhält sehr gute Flächenausbeuten mit wenig Narbenzug, jedoch tendieren die Leder zur Losnarbigkeit, zu loser Flämenstruktur und einem groben, z.T. nubukierten Narbenbild.

Vor einiger Zeit wurde die Verwendung von Thioharnstoffdioxid (THDO) bzw. Formamidinsulfinsäure als Sulfidersatz vorgeschlagen (AT-PS 381 952, EP 197 918). Diese Verbindung besitzt ein sehr hohes Reduktionspotential gegenüber Cystein, so daß sich in Dosierungen von 0,1 - 1 Gew.-% zusammen mit Calciumoxid bzw. Calciumcarbonat eine einwandfreie Enthaarung herbeiführen läßt. Die Verbindung ist weitgehend geruchlos und der Erhaltungsgrad der Haare ist deutlich besser als bei einem reinen Sulfidä-scher. Außerdem weist die Verbindung eine geringe Abwassertoxizität auf, da gute biologische Abbaubarkeit besteht. Diesen Vorzügen steht ein relativ hoher Preis gegenüber und der Befund, daß die so hergestellten Leder nicht die optimale Weichheit der im herkömmlichen Äscher behandelten Produkte besitzen. Diese Gründe sind wohl dafür verantwortlich, daß sich Thioharnstoffdioxid in alleiniger Anwendung bislang nicht durchgesetzt hat. Neuere Vorschläge laufen daher darauf hinaus, THDO zusammen mit hydrotropen und quellungsdämpfenden Substanzen, z.B. Aminen einzusetzen um bei entsprechender Alkalimenge den gewünschten Hautaufschluß zu erreichen (EP 306 474). Teilweise wird THDO ohne weitere Zusätze wegen seiner bleichenden Wirkung im Nachä-scher eingesetzt, gewöhnlich in Mengen von 0,3 bis 0,4 Gew.-% bezogen auf das Blößengewicht.

Es bestand angesichts des geschilderten Standes der Technik Bedarf an einem Verfahren, das die Vorzüge des traditionellen Äscherverfahrens mit den positiven Effekten der Anwendung von Thioharnstoffdioxid vereinigt. Insbesondere war auf oekologische Verträglichkeit des Verfahrens und der dabei eingesetzten Wirkprinzipien zu achten.

Es wurde nun gefunden, daß das erfindungsgemäße Äscherverfahren diesen Forderungen weitgehend entspricht.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum Äschern von Häuten und Fellen, wobei die wäßrige Äscherflotten mit einem pH-Wert im Bereich 10 - 14, vorzugsweise 12 - 14, Thioharnstoffdioxid und

alkalische Proteasen AP mit Elastaseaktivität enthalten.

Vorzugsweise enthalten die Äscherflotten 0,3 bis 2 Gew.-%, insbesondere 0,5 - 1 Gew.-% Thioharnstoffdioxid zusammen mit einer wirksamen Menge an einer oder mehreren alkalischen Proteasen AP. Unter dem Äscherverfahren im Sinne der vorliegenden Erfindung sei die Haarlockerung, die eigentliche Äscherung, der Hautaufschluß und gegebenenfalls der Nachäsker zusammengefaßt.

Wichtig ist, daß beim erfindungsgemäßen Verfahren auf die Anwesenheit anorganischen Sulfids bzw. von Sulfidionen und unter den Reaktionsbedingungen Sulfid entwickelnder Agentien verzichtet werden kann. Die erfindungsgemäße Kombination aus THDO und alkalischen Proteasen ist somit ausgezeichnet geeignet für sulfidfreie Äscher und/oder Nachäsker als auch für sulfidarme Äscher/Nachäsker.

Die alkalischen Proteasen AP mit Elastaseaktivität

Zur Charakterisierung von Elastasen [E.C.3.4.21.11] wird deren Fähigkeit herangezogen, Elastinfasern der Aorta zu hydrolysieren (W. Appel in H.U. Bergmeyer Ed. Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Bd. I., S. 1081 - 1085 Verlag Chemie 1974; J. Mandel in S.P. Cholowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. V, S. 665, Academic Press 1962).

Elastase-Praeparationen auch in kristallisierter Form müssen von vorneherein als uneinheitlich betrachtet werden; auch die reinsten Praeparate enthalten noch einen Teil proteolytischer, nichtelastolytischer Aktivität. In Struktur und spezifischer Aktivität scheinen die Elastasen dem Trypsin und dem Chymotrypsin zu ähneln.

Die quantitativen Bestimmungen basieren auf dem (sowohl proteolytischen als mucolytischen) Abbau des Elastins. Als Bestimmungsmethode wird hauptsächlich der Abbau von Elastin herangezogen, das mit Farbstoffen wie Orcin (bzw. Kongorot, Dimethylaminonaphthalinsulfonsäure) oder Fluorescein beladen ist.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden alkalischen Proteasen AP mit Elastaseaktivität sind durch ein Wirkungsoptimum im alkalischen pH-Bereich, in der Regel im Bereich pH 12 $\pm$ 2 charakterisiert.

Obschon andere Quellen nicht ausgeschlossen werden sollen, stellen Mikroorganismen insbesondere vom Typ der Bakterien, speziell der Bacillen derzeit die bevorzugten Ausgangsmaterialien dar.

Genannt seien daneben z.B. *Flavobacterium elastolyticum*, *Chlorotridium histolyticum*, *Staph. epidermis*. Bei Praeparationen alkalischer Proteasen aus *Bacillus*-Typen erhält man - als Anhalt - Anteile von 30 - 60 Gew.-% alkalische Protease, 0,002 - 2 Gew.-% Elastase neben neutraler Proteinase und Collagenase (vgl. USSR-PS 802 909, Chem. Abstr 94, 148 340x).

Neuerdings sind auch alkal. Elastasen als Produkte genetischer Manipulation hergestellt worden, z.B. durch Klonierung des alkalischen Elastasegens aus alkalophilem *Bacillus* und Expression in *Bacillus subtilis* (Vgl. JP-OS 90 76 586, Chem. Abstr. 115, 249 561c; Y.Ch. Tsai et al. Biochim. Biophys. Acta 1986, 883(3), 439 - 47, Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54(12) 3156 - 61; Chem. Abstr. 110,, 110 535a; R. Kaneko et al. Japan. J. Bacteriol. 171 (9) 5232-36 (1989)). In letzterer Arbeit wird die Isolierung einer alkal. Elastase YaB die von dem alkalophilen *Bacillus* sp. YaB extracellulär produziert wird und Expression des Gens in *B. subtilis* berichtet. Alkal. Proteasen mit ca. 59 % Elastaseaktivität wurden auch aus einem *Aspergillus* (*A. versicolor* 837) gewonnen (Vgl. Chem. Abstr. 100, 6 6 560x). Andere Quellen sind *Pseudomonas*-Typen, z.B. *P. aeruginosa* (vgl. A. Lazdunski et al. Biochimie 1990, 72(2-3) 147 - 56).

Die Bestimmung der Elastase-Aktivität wird für die Zwecke der vorliegenden Erfindung nach dem im experimentellen Teil angegebenen Verfahren vorgenommen. Die auf die dort angegebene Weise bestimmten Einheiten der Elastase-Wirksamkeit werden im folgenden als Elastase-Einheiten E.U.gly bezeichnet. Dabei gilt als Definition:

Einer Elastase-Einheit (E.U.gly) entspricht die Extinktion eines μ Mols Glycin per Trinitrobenzolsulfonsäure-Bestimmung; Analysenbedingungen: Substrat ist Elastin, in Puffer pH 8 und bei 37 Grad C wobei der Extinktionsanstieg pro Minute ausgewertet wird.

Die Aktivitäten der wirksamen Enzyme in den Enzympräparaten AP stehen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in einem bestimmten Verhältnis. Dieses Verhältnis sei rechnerisch wie folgt definiert: Die Proteaseaktivität der alkal. Protease [in Löhlein-Volhard-Einheiten (LVE)] geteilt durch Tausend mal einem Faktor F ergibt zahlenmäßig die Elastase-Aktivität in den für die Zwecke der vorliegenden Erfindung gewählten Einheiten E.U.gly (Vgl. Experimenteller Teil).

Der Faktor F liegt erfindungsgemäß zwischen 0,6 und 20, vorzugsweise 1 bis 5.

Die in den erfindungsgemäß einsetzbaren Enzympräparaten AP anwesenden alkalischen Proteasen [E.C.3.4.21] sind in der üblichen Weise charakterisiert. (Vgl. Kirk-Othmer 3rd. Ed. Vol. 9, pp. 199 - 202, J. Wiley 1980; Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Vol. A9, pp. 409 - 414, VCH 1987; L. Keay in "Process Biochemistry 17 - 21 (1971). Diese Proteasen, die meist dem Serin-Typ angehören, entfalten ihr Wirkungsoptimum gewöhnlich in einem pH-Bereich von etwa 8 - 13. Genannt seien insbesondere Bakte-

rienproteasen, speziell von Bacillus Stämmen, vorteilhaft solchen, welche die Elastase-Aktivitäten von ihrem Ursprung her mitbringen. Es können jedoch auch alkalische Proteasen verschiedenen Ursprungs miteinander kombiniert werden, wobei die Elastase-Aktivität durch entsprechenden Zusatz einzubringen ist.

Als solche alkalische Proteasen seien vor allem die aus Bacillus-Stämmen gewonnenen, speziell B.subtilis, aber auch B.formus, B.licheniformis, B.alcalophilus, B.polymixa, B.mesentericus, ferner aus Streptomyces-Stämmen wie S.alcalophilus genannt.

Die günstigste Arbeitstemperatur mit alkalischen Bakterien-Proteasen (die aber im vorliegenden Falle deutlich unterschritten werden muß) liegt im allgemeinen bei 40 - 60 Grad C, bei Pilzproteasen eher bei 20 - 40 Grad C.

Als alkalische Pilzproteasen seien solche aus Aspergillus-Stämmen wie A.oryzae, aus Penicillium-Stämmen wie P.cyanofulvum oder Paecilomyces persicinus genannt. Die Aktivität der alkalischen Pilzproteasen liegt vorwiegend im pH-Bereich 8,0 - 11,0.

Die proteolytische Wirksamkeit der alkal. Proteasen wird gebräuchlicherweise nach der Anson-Hämoglobin-Methode (vgl. M.L. Anson J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939) bzw. nach der Löhlein-Volhard-Methode (modifiziert nach TEGEWA, vgl. Das Leder, 22, 121 - 126 1971) bestimmt.

Dabei entspricht eine Löhlein-Volhard-Einheit derjenigen Enzymmenge, die in 20 ml Casein-Filtrat einen Anstieg an Hydrolyseprodukt entsprechend einem Äquivalent von $5,75 \times 10^{-3}$ ml 0,1 n NaOH hervorruft. Die anzuwendende Protease-Aktivität liegt im allgemeinen zwischen 1 000 und 60 000 LVE pro kg Haut, vorzugsweise zwischen 2 000 und 14 000 LVE pro kg Haut.

Je nach Aktivität kommt man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren gewöhnlich mit Proteasemengen zwischen 0,05 bis 0,8 Gew.-%, vorzugsweise mit etwa 0,1 bis 0,3 Gew.-%, als Faustregel bei Verwendung einer alkalischen Bakterienprotease (Bacillus alcalophilus) mit 4 000 LVE bezogen auf das Gewicht der eingesetzten Häute und Felle aus.

Zusammen mit den proteolytischen Enzymen AP werden erfindungsgemäß 0,3 - 2 Gew.-%, vorzugsweise 0,5 - 1 Gew.-% Thioharnstoffdioxid eingesetzt. Die Flottenlänge beträgt in der Regel 100 bis 120 Gew.-% bezogen auf das Gewicht der eingesetzten Häute und Felle.

Die Einstellung des pH-Bereichs der Flotte geschieht vorteilhaft mittels Kalkhydrat, anteilig können jedoch auch Natronlauge und/oder Soda verwendet werden.

Zur weiteren Verbesserung des Hautaufschlusses können an sich bekannte Agentien wie z.B. organische Amine, beispielsweise Diethanolamin und/oder hydrotrope Substanzen wie z.B. Harnstoff mitverwendet werden.

Durchführung des Verfahrens

Wie üblich geht man von frischer oder gesalzener Rohware aus. Im allgemeinen führt man zur Vorbehandlung eine Schmutzweiche und eine Hauptweiche durch (US-PS 4 344 762). Die Hauptweiche wird wie betriebsüblich gewöhnlich unter Anwendung von geeigneten Proteasen und/oder von Tensiden bei einem pH von 9 - 10 über 4 - 6 Stunden durchgeführt.

Die Flotte der Hauptweiche wird üblicherweise abgelassen und es wird mit einem neuen Bad fortgefahren.

Im allgemeinen führt man die enzymatische Reaktion im Temperaturbereich 20 - 28 Grad C, vorzugsweise bei 26 Grad C durch. Die auf einen alkalischen pH, speziell im Bereich 10 - 13 eingestellte, die Enzyme und das Thioharnstoffdioxid enthaltende Flotte läßt man in einem üblichen Reaktionsgefäß, beispielsweise einem Mischer, Gerbfaß usw. unter Bewegen beispielsweise über einen ausreichenden Zeitraum, als Faustregel seien ca. 90 Minuten genannt, auf die Häute und Felle einwirken, bis diese weitgehend haarfrei sind.

Dann kann mit etwas Alkali, beispielsweise 0,2 Gew.-% einer 50 %-igen Natronlauge nachalkalisiert werden, wobei vorzugsweise etwa 30 Minuten bewegt wird. Daran schließt sich eine längere Behandlungsphase, zweckmäßig mit kurzfristigem Bewegen/längerem Ruhen, etwa im Turnus: 1 Minute bewegen, 59 Minuten ruhen an, die beispielsweise über 18 Stunden durchgeführt wird. Anschließend wird die Flotte abgelassen.

Die Haare erweisen sich als weniger zerstört als bei Anwendung eines konventionellen Sulfid-Kalkäschers. Man wäscht vorteilhaft nach, beispielsweise zweimal mit je 200 % Wasser von 25 Grad C über 15 Minuten.

Die Weiterverarbeitung kann in an sich üblicher Weise, z.B. in der Abfolge Beize/Entkalkung/Pickel/Chromgerbung, erfolgen.

Vorteilhafte Wirkungen

Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet die Herstellung bemerkenswert weicher Leder, wobei besonders hervorzuheben ist, daß trotz der Verwendung abbauender Enzyme in der Regel ein völlig

intaktes Narbenbild vorliegt. Insgesamt ist das Ergebnis als sehr überraschend zu betrachten, tritt doch die bei Enzymanwendung im Äscher zu erwartende Nubukierung sowenig ein, wie die erwartete Losnarbigkeit in den Flämen.

Durch die Enzymanwendung im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens läßt sich die benötigte Einsatzmenge an Thioharnstoffdioxid deutlich reduzieren. Die Kombination von Thioharnstoffdioxid und alkalischer Protease im Äscher ermöglicht somit ein oekologisch äußerst günstiges Äscherverfahren, welches hohe Lederqualität mit genügender Anwendungssicherheit verbindet. Der oekologische Vorteil liegt primär in der guten Haarerhaltung und der dadurch geringeren CSB-Belastung im Abwasser als auch in der Vermeidung jeglichen Einsatzes von Sulfid.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

BEISPIELE

Beispiele 1 - 4:

15

Rohware:

1 t gesalzene bzw. frische Rindshäute, Gewichtsklasse 30 - 39 kg (schwarzbunt).

20 Vorbehandlung:

Schmutzweiche, Hauptweiche erfolgt betriebsüblich durch Anwendung von Tensiden bei pH 9 - 10 für 4 - 6 Stunden. Die Flotten der Hauptweiche werden abgelassen und in allen Beispielen wird in einem neuen Bad weitergearbeitet.

25 Sämtliche Prozentangaben stellen Gew.-% bezogen auf das Salz- bzw. Grüngewicht der Häute dar.

Beispiel 1:

Rohware:

30

1 t gesalzene Rindshäute

Äscher:

35 150,0 % Wasser, 26 Grad C

3,5 % Kalk

0,8 % Thioharnstoffdioxid

0,3 % proteolytisches Enzym, z.B. aus *Bacillus alcalophilus*, pH-Wirkungsoptimum

pH 10 - 13, 4 000 LVE-Einheiten, Elastasewert 6,4 (F = 1,6)

40 90 Min. bewegen bis Häute weitgehend haarfrei

0,2 % Natronlauge 50 %ig

30 Min. bewegen

anschließend weitere 18 Stunden behandeln (1 Min. bewegen, 59 Min. ruhen).

Flotte ablassen (Haare sind geringer zerstört als bei konventionellem Sulfid/Kalk-Äscher)

45 2 x waschen mit je 200 % Wasser, 25 Grad C, 15 Min.

betriebsübliche Weiterarbeit mit Beize/Entkalkung/Pickel/Chromgerbung.

Beispiel 2

50 Rohware:

1 t frische Rindshäute

Äscher (haarerhaltend):

55

100,0 % Wasser, 26 Grad C

1,0 % Kalk, 90 Min. bewegen, pH 12 - 12,5

1,0 % Thioharnstoffdioxid

EP 0 575 927 A2

0,3 % proteolytisches alkalistabiles Enzym (z.B. aus *Bacillus alcalophilus*)
pH-Wirkungsoptimum pH 10 - 13, 4 000 LVE, Elastasewert 6,0 (F = 1,5)
90 Min. bewegen, pH 12 - 13, Häute sind haarfrei und gut in ihrer Struktur erhalten;
Haar kann durch Umpumpen der Flotte über ein Sieb abgetrennt werden.

- 5 + 50,0 % Wasser, 26 Grad C
2,5 % Kalkhydrat
10 Min. bewegen
0,2 % Natronlauge 50 %ig
weitere 15 Stunden behandeln (Automatik: 2 Min. bewegen, 58 Min. ruhen): Flotte ablassen
10 2 x waschen mit je 250 % Wasser, 26 Grad C, 15 Min.
Weiterarbeit betriebsüblich.

Beispiel 3

- 15 Rohware:

1 t gesalzene Rindshäute

Sulfidarmer Äscher:

- 20 150,0 % Wasser, 26 Grad C
3,5 % Kalkhydrat
0,4 % Natriumsulphhydrat, 72 %ig
30 Min. bewegen
25 0,4 % Thioharnstoffdioxid
0,1 % proteolytisches, alkalistabiles Enzym (z.B. aus *Bacillus alcalophilus*), 4 000 LVE, Elastasewert 6,8 (F = 1,7)
60 Min. bewegen bis Häute haarfrei
+ 0,3 % Natronlauge, 50 %ig
30 weitere 18 Stunden bewegen (Automatik: 2 Min bewegen, 58 Min. ruhen).
Flotte ablassen
2 x waschen mit je 150 % Wasser, 25 Grad C, 15 Min.
Weiterarbeit betriebsüblich.

- 35 Beispiel 4

Konventioneller Sulfid/Kalk-Äscher und Nachäscher mit erfindungsgemäßer Wirkstoffkombination zur Herstellung z.B. besonders weicher Möbelleider mit hoher Farbegalität.

- 40 Rohware:

1 t gesalzene Rindshäute

Äscher:

- 45 150,0 % Wasser, 26 Grad C
2,0 % Kalkhydrat
0,9 % Natriumsulphhydrat
20 - 30 Min. bewegen
50 1,0 % Kalkhydrat, 20 Min. bewegen
0,4 % Natriumsulfid, 60 %ig
30 Min. bewegen
dann Automatik: 2 Min. bewegen, 58 Min. ruhen insgesamt 15 Stunden
Flotte ablassen, 2 x waschen, Häute entfleischen und spalten auf 1,8 - 2 mm.

55

Nachäscher:

150,0 % Wasser, 26 Grad C

1,0 % Kalkhydrat

5 0,3 % Thioharnstoffdioxid

0,1 % proteolytisches, alkalistabiles Enzym (z.B. aus Bac.alcalophilus), 4 000 LVE, Elastasewert 9,2 (F = 2,3)

20 Min. bewegen, dann weitere 6 Stunden: 2 Min. bewegen, 58 Min. ruhen.

Flotte ablassen, waschen und betriebsüblich weiterarbeiten.

10 Bestimmung der Elastase-Aktivität der erfindungsgemäß eingesetzten Enzyme.

Prinzip:

15 Eine Elastinsuspension von pH = 8 wird bei 37 Grad C 2 Stunden mit Enzym inkubiert, durch Abfiltrieren von Substrat abgebrochen, mit TNBS angefärbt und bei 420 nm gemessen.

Definition:

20 1 Unit Elastase entspricht der Enzymmenge, die pro Minute in einer Elastinsuspension unter den angegebenen Standardbedingungen eine Anfärbung mit TNBS hervorruft, die 1 μ mol Glycin äquivalent ist.

Reagentien:

Elastin (Sigma Lot 71 F-8020; No. E-1625)

25 Borsäure p.a. (= pro analyse)

Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)

Glycin

Geräte:

30

Schüttelthermostat: 37 Grad C

Wasserbad: 50 Grad C

Lösungen:

35

1. 0,1 m Boratpuffer, pH = 8,0

Eine Lösung aus 6,2 g Borsäure p.a. wird mit 1 n NaOH auf pH = 8,0 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

40

2. TNBS-Reagenz

Ca. 800 ml dest. Wasser werden mit 6,2 g Borsäure p.a. unter Rühren versetzt und auf pH = 8,0 mit 1 n NaOH eingestellt. Dazu gibt man 240 mg TNBS, stellt den pH gegebenenfalls nach und füllt mit dest.

45

Wasser auf 1 l auf.

Das TNBS-Reagenz wird zweckmäßig in einer braunen Flasche aufbewahrt und ist täglich neu anzusetzen.

Reaktion:

50

Hauptwert:

250 mg Elastin werden in einem 50 ml Enghals-Erlenmeyer-Kolben mit Schliffstöpsel eingewogen und mit 10 ml 0,1 m Boratpuffer versetzt. Den Kolben temperiert man im Schüttelthermostaten 10 min vor. Nach Zugabe von 1 ml Enzymlösung wird gut gemischt und der Kolben in den Schüttel-Thermostaten zurückgegeben. Temperatur: 37 Grad C.

55

Man stoppt die Reaktion ab, indem man nach genau 2 Stunden das Reaktionsgemisch durch einen Faltenfilter filtriert. Es folgt unmittelbar die Anfärbung der Bruchstücke nach der TNBS-Methode.

TNBS:Reaktion:

Zu 8 ml TNBS-Reagenz gibt man 100 µl der Probe und läßt das Reagenzglas 25 min. in einem Wasserbad bei 50 Grad C stehen. Nach genau 25 min. wird das Reagenzglas 5 min. in Eiswasser gestellt und gleich anschließend die Extinktion bei 420 nm gemessen.

Blindwert:

Man gibt hier die Enzymlösung erst nach Ablauf der zweiten Stunde der Reaktionszeit zu. Die Weiterbehandlung erfolgt wie beim Hauptwert, beginnt also mit dem Abstoppen.

Erstellung einer Eichkurve mit Glycin:

Es wird die Anfärbung von Glycin mit TNBS gemessen und dazu µmol Glycin gegen O.D. aufgetragen.

Vorgehensweise:

3,75 g Glycin werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, davon 250 ml entnommen und auf 500 ml verdünnt. Davon werden 100 µl entnommen und nach der TNBS-Methode angefärbt. Die Messung erfolgt bei 420 nm. Entsprechend werden weitere Einwaagen gewählt. Ein Beispiel für eine Eichkurve gibt die folgende Tabelle:

Einwaagen (g)	µmol/ml	O.D. bei 420 nm
3,75/100 - 0,25/500	0,25	0,30
3,75/100 - 0,25/250	0,5	0,058
3,75/100 - 0,50/250	1,0	0,110
3,75/100 - 1,00/250	2,0	0,232
3,75/100 - 1,00/200	2,5	0,313
3,75/100 - 1,50/200	3,75	0,496

Der Blindwert (O.D. von TNBS-Reagenz + 10 µl dest. Wasser) wurde vorher von allen Glycinwerten subtrahiert.

Berechnung der Aktivität:

Die Extinktionsdifferenz der Aktivitätsbestimmung (Hauptwert minus Blindwert) wird aus der Eichkurve in µmol Glycin umgerechnet, daraus ergeben sich die Elastase-Einheiten

$$\text{Elastase-Einheit/mg} = \frac{\mu\text{mol Glycin auf Eichkurve abgelesen} \times 11 \times 100}{120 \text{ min} \times \text{konz. Enzym (C) in mg}}$$

$$\text{Elastase Einheit/mg} = \frac{\mu\text{mol Glycin (auf Eichkurve abgelesen)} \times 91,7}{C \text{ in mg}}$$

Beispiel:

Einwaage Enzym (g)	0,5/50 - 5/50
daraus Konzentration/ml	1 mg/ml
Hauptwert (420 nm)	0,408
Blindwert	0,053
Extinktion	0,355

Aus der Glycin-Eichkurve: Eine O.D. von 0,355 entspricht 2,79 mol Glycin.

$$\text{Elastase-Einheiten/mg} = \frac{2,79 \times 91,7}{1} = \underline{\underline{255,8}}$$

Patentansprüche

1. Verfahren zum Äschen von Häuten und Fellen unter Verwendung proteolytischer Enzyme in wäßrigalkalischer Flotte,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Äscherflotte mit einem pH-Wert im Bereich 10 - 14 gleichzeitig Thioharnstoffdioxid und alkalische Proteasen AP mit Elastaseaktivität enthält.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Äscherflotte 0,3 bis 2 Gew.-% Thioharnstoffdioxid enthält.
3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Äscherflotte einen wirksamen Anteil an alkalischer Elastase [E.C.3.4.21.11] neben alkalischer Protease [E.C.3.4.21] enthält.
4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Äscherflotte keinen Sulfidzusatz enthält.
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die alkalische Protease eine Bakterienprotease ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die alkalische Bakterienprotease aus *Bacillus alcalophilus* gewonnen wurde.