

Abschlussbericht zum Projekt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Förderschwerpunkt Biotechnologie

**„Entwicklung einer innovativen und umweltentlastenden
Verfahrenstechnik zur kombinierten enzymatischen
Vorbehandlung von Baumwolle“**

AZ 13058

Verfasser:

K. Opwis, D. Knittel, E. Schollmeyer*

C. Dörfler, H. Bachus**

C. Bertoldo, G. Antranikian***

A. Köppe, U. Köppe****

* Deutsches Textilforschungszentrum Nord-West e.V., Krefeld; ** CHT R. Beitlich GmbH, Tübingen;

*** TUHH Technologie GmbH, Hamburg; **** Textilveredlung an der Wiese, Lörrach

Projektbeginn: 01.01.2002

Projektlaufzeit: 3 Jahre

Krefeld, 05.04.2005

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13058	Referat	32/0	Fördersumme	610.992,26 €
----	--------------	---------	-------------	-------------	---------------------

Antragstitel **Förderschwerpunkt** **Biotechnologie: Entwicklung einer innovativen und umweltentlastenden Verfahrenstechnik zur kombinierten enzymatischen Vorbehandlung von Baumwolle**

Stichworte Schwerpunkt Biotechnologie
Mikrobiologie, Verfahren, Umweltchemikalien, Textil

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
3 Jahre	01.01.2002	31.12.2004	

Zwischenberichte 31.12.2002, 31.12.2003

Bewilligungsempfänger	Deutsches Textilforschungszentrum Nord-West (DTNW) e. V. Institut an der Universität Duisburg-Essen Adlerstraße 1 47798 Krefeld	Tel	02151/843-205
		Fax	02151/843-143
		Projektleitung	Prof. Dr. Eckhard Schollmeyer
		Bearbeiter	Dr. Klaus Opwis, Dr. Dierk Knittel

Kooperationspartner

- CHT R. Beitlich GmbH, 72072 Tübingen
- TUHH-Technologie GmbH, 21079 Hamburg
- Textilveredlung an der Wiese GmbH, 79541 Lörrach

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Eine effektive Vorbehandlung von Baumwolle muss alle Stoffe entfernen, die nachfolgende Veredlungsschritte beeinträchtigen könnten. Dies geschieht bis heute zumeist in drei Stufen: Entschlichtung, alkalisches Abkochen und Bleiche. Dabei werden unter Einsatz hoher Energie-, Wasser- und Alkalimengen die in der Weberei applizierten Hilfsmittel und die natürlichen Faserbegleitstoffe unspezifisch entfernt, was mitunter zu einer Schädigung des cellulosischen Materials führt. Im Rahmen des F&E-Projektes sollte ein umfassendes enzymatisches Vorbehandlungskonzept zum Abbau der verschiedenen Baumwollbegleitsubstanzen und zur Weiterverwendung der nativen Stärkeschichten erarbeitet werden. Die drei konventionellen Teilprozesse sollten möglichst unter Verwendung von Enzymmischpräparaten in einem einzigen enzymatischen Gesamtprozess vereint werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Gemäß dem Projektantrag wurden verschiedene Arbeitsschritte von verschiedenen Projektpartnern durchgeführt. Bei der CHT wurden die in der ersten Projektphase ausgewählten technischen Enzympräparate in Verbindung mit den extremophilen Spezies der TUHH anhand einer statistischen Versuchsplanung in unterschiedlichsten Kombinationen bei konstanter Prozesstemperatur im leicht sauren und leicht alkalischen pH-Wert-Bereich auf ihre Fähigkeit untersucht, die Stärkeschichte und natürliche Baumwollbegleitsubstanzen in einer Flotte abzubauen zu können. Am DTNW wurden vergleichbare Versuche im Laborjigger durchgeführt, bei denen die Prozessführung (Verlauf der Reaktionstemperatur, pH-Wert-Änderung, Reaktionszeit, Zeitpunkt der Enzymzugabe etc.) im Vordergrund standen. Als Kriterien für eine gelungene enzymatische Vorbehandlung wurden bei beiden Partnern vor allem ein hoher Entschlichtungsgrad und eine ausreichende Benetzbarkeit herangezogen, die für eine Weiterverarbeitung unerlässlich sind. Darüber hinaus wurde die behandelte Baumwolle auf ihren Restwachs- und Restpektingehalt untersucht und mit Proben verglichen, die konventionell vorbehandelt wurden. An der TUHH wurde die Herstellung und Aufbereitung thermophiler Lipasen für den Abbau von Baumwollwachsen weiter vorangetrieben. Nachdem die optimalen Parameter für einen kombinierten Einsatz von Enzymen in der Baumwollvorbehandlung im Labormaßstab erarbeitet waren, wurden die Versuche im großtechnischen Maßstab bei der Textilveredlung an der Wiese nachgestellt und

anschließend unter den branchenüblichen Bedingungen gebleicht. Sowohl die jeweiligen Zwischenprodukte als auch die gebleichte Ware wurden einer betriebsinternen Materialprüfung unterzogen und mit konventionell vorbehandelter Ware verglichen. Darüber hinaus wurden Färbeversuche mit enzymatisch und konventionell behandelter Ware durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Im Verlaufe des dreijährigen Projektes konnte eine erfolgreiche Strategie zum kombinierten Einsatz von α -Amylase und Pektinase in der Baumwollvorbehandlung entwickelt werden. Dabei werden die pektinspaltenden Enzyme der Entschlichtungsflotte zugeführt, so dass die Entschlichtung stattfinden kann, während gleichzeitig die Entfernung unerwünschter Baumwollbegleitstoffe derartig vorbereitet wird, dass sie letztlich in einer Bleichstufe gänzlich mobilisiert und von der Baumwolle entfernt werden können. Die zunächst im Labor- und Technikumsmaßstab gesammelten Ergebnisse konnten in der letzten Projektphase erfolgreich auf den Einsatz im großtechnischen Maßstab übertragen werden. Dabei zeigte sich, dass die enzymatisch vorbehandelte Ware nach einer Bleiche die gleichen oder sogar bessere Qualitätsmerkmale aufweist als eine konventionell entschlichtete und alkalisch abgekochte Ware. Dies bedeutet, dass durch den kombinierten Einsatz von α -Amylasen und Pektinasen auf das alkalische Abkochen gänzlich verzichtet werden kann, ohne Kompromisse beim Vorbehandlungsergebnis in Kauf nehmen zu müssen. Weder das Benetzungsverhalten, noch der Weißgrad und die Anfärbbarkeit der gebleichten Ware sind schlechter als bei einer konventionell vorbehandelten Baumwolle, wobei es gleichzeitig zu einer deutlich geringeren Schädigung des Gewebes kommt. Die Einsparung eines Teilprozesses hat eine Einsparung von Zeit, Hilfschemikalien, Energie und vor allem von Brauchwasser zur Folge. Daraus ergeben sich sowohl ökonomische als auch ökologische Vorteile für den Anwender.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Gemäß den Richtlinien der DBU wurde am 29.04.2004 in Lörrach ein Statusseminar abgehalten. Im Frühjahr 2005 wird in Osnabrück ein Abschlussseminar zur Präsentation der erzielten Resultate stattfinden. Des Weiteren sollen die Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt in der einschlägigen Fachliteratur veröffentlicht werden.

Fazit

In dem dreijährigen von der DBU geförderten Forschungsvorhaben haben die Projektpartner DTNW, CHT, TUHH und TV a.d.W. gemäß der anfänglichen Zielsetzung eine Verfahrenstechnik zum kombinierten Einsatz von Enzymen in der Baumwollvorbehandlung entwickelt. Dabei wurde die Partnerstruktur im Vorfeld so gewählt, dass ein ausgewogenes Verhältnis aus Forschungseinrichtungen, Enzym- und Hilfsmittelherstellern sowie Anwendern vorhanden war, die die Umsetzung der Fragestellungen vom Labormaßstab in die industrielle Praxis gewährleistete. Gemäß dem Projektantrag wurden die Labor- und Technikumsversuche sowie die textilspezifischen Untersuchungen überwiegend am DTNW und bei der CHT durchgeführt. Die TUHH beschäftigte sich mit der Herstellung und Reinigung von extremophilen Lipasen. Die Überführung der gesammelten Ergebnisse in die großtechnische Praxis wurde in Absprache aller Projektpartner bei der TV a.d.W. durchgeführt. Die Zusammenarbeit der Partner erwies sich dabei als fruchtbar und die durchgeführte Vorgehensweise hat sich bewährt, so dass im Verlaufe des Projektes nahezu alle gesteckten Ziele erfüllt werden konnten. Das von den Projektpartnern entwickelte Verfahren ermöglicht einem textilveredelnden Betrieb die Einsparung eines kompletten ökologisch bedenklichen Arbeitsschrittes - dem alkalischen Abkochen in der Baumwollvorbehandlung - und ist mit einer Vielzahl von ökologischen aber auch ökonomischen Vorteilen verbunden. Aus dem erfolgreichen Projekt ergeben sich neue Aufgabenstellungen für die Zukunft, wie etwa die Einbeziehung der vorgeschalteten Entmineralisierung in den Entschlichtungsprozess durch den Einsatz von säureresistenten α -Amylasen sowie die Generierung potentieller Einsatzgebiete der von der TUHH entwickelten thermophilen Lipasen. Die richtungsweisenden Versuche zur selektiven Inhibierung von Einzelaktivitäten in Enzymmischungen sollten ebenfalls konkretisiert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	10
2	ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES	13
3	DARSTELLUNG DER ARBEITSSCHRITTE UND DER ANGEWANDTEN METHODEN	15
3.1	ARBEITSSCHRITTE	15
3.1.1	<i>DTNW</i>	<i>16</i>
3.1.2	<i>CHT</i>	<i>17</i>
3.1.3	<i>TUHH</i>	<i>18</i>
3.1.4	<i>TV a.d.W.</i>	<i>19</i>
3.2	FINANZIERUNG	20
3.3	EXPERIMENTELLES	22
3.3.1	<i>Herstellung, Reinigung und Charakterisierung von extremophilen Lipasen</i>	<i>22</i>
3.3.2	<i>Verwendete Enzyme zur Baumwollvorbehandlung</i>	<i>27</i>
3.3.3	<i>Baumwolle</i>	<i>28</i>
3.3.4	<i>Hilfschemikalien</i>	<i>29</i>
3.3.5	<i>Enzymatische Baumwollbehandlung im Labomat oder Linitester</i>	<i>29</i>
3.3.6	<i>Enzymatische Baumwollbehandlung im Jigger</i>	<i>30</i>
3.3.7	<i>Alkalisches Abkochen mit NaOH im Jigger</i>	<i>30</i>
3.3.8	<i>Bestimmung des Pektin gehaltes der Baumwolle</i>	<i>30</i>
3.3.9	<i>Bestimmung des Wachs gehaltes der Baumwolle</i>	<i>31</i>
3.3.10	<i>Bestimmung des Calcium- und Magnesium gehaltes der Baumwolle</i>	<i>31</i>
3.3.11	<i>Analysegerä te und -methoden</i>	<i>32</i>
3.3.12	<i>Praxisversuche im Industriemaßstab</i>	<i>33</i>
4	ERGEBNISSE	36
4.1	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG THERMOPHILER LIPASEN	36
4.1.1	<i>Lipase aus Thermoanaerobacter brockii</i>	<i>37</i>
4.1.2	<i>Lipase aus Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	<i>49</i>
4.1.3	<i>Klonierung und Expression von thermostabilen Lipasen aus anaeroben Bakterien</i>	<i>51</i>
4.2	ENZYMATISCHE BAUMWOLLVORBEHANDLUNG MIT ENZYMMISCHUNGEN IM LABOR-MAßSTAB	53
4.2.1	<i>Charakterisierung der Rohbaumwolle</i>	<i>54</i>
4.2.2	<i>Verwendete technische Enzyme</i>	<i>55</i>
4.2.3	<i>Variation der Enzymmischung bei konstantem pH-Wert und konstanter Temperatur - statistische Versuchsplanung</i>	<i>56</i>
4.2.4	<i>Untersuchungen an ungeschlichtetem Baumwollgarn im Linitester bei konstantem pH-Wert</i>	<i>61</i>
4.2.5	<i>Variation/Optimierung der Prozessführung</i>	<i>64</i>
4.2.6	<i>Enzymatische Weiterverwertung von glucosehaltigen Waschflotten aus der Entschlichtung</i>	<i>69</i>
4.3	PRAXISVERSUCHE IM INDUSTRIEMAßSTAB	73
4.3.1	<i>Kombination von Entschlichtung und der Entfernung von Baumwoll-begleitsubstanzen</i>	<i>74</i>
4.3.2	<i>Heißbleiche der enzymatisch behandelten Baumwolle</i>	<i>77</i>
4.3.3	<i>Färberei der enzymatisch behandelten Baumwolle</i>	<i>82</i>
5	VERGLEICH EINES ENZYMATISCHEN VERFAHRENS MIT EINER KONVENTIONELLEN BAUMWOLLVORBEHANDLUNG DURCH EINE ÖKONOMISCH-ÖKOLOGISCHE ANALYSE	84
6	DISKUSSION	87
7	ÖFFENTLICHKEITSARBEIT	90
8	FAZIT	91
9	LITERATUR	92

verwendete Abkürzungen

A	α -Amylase
ACP	α -Amylase/Cellulase/Pektinase in Mischung
AP	α -Amylase/Pektinase in Mischung
C	Cellulase
CLP	Cellulase/Lipase/Pektinase in Mischung
DMSO	Dimethylsulfoxid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (chromatographische Methode zur Proteintrennung)
GF	Grundflotte
GOD	Glucoseoxidase
HPAEC-PAD	Hochdruckanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
L	Lipase
n.b.	nicht bestimmt
p-NPP	para-Nitrophenylpalmitat
P	Pektinase
RT	Trocknung bei Raumtemperatur
SR	Trocknung im Spannrahmen

Abkürzungen zu speziellen Chemikalien werden in **Tabelle 5** gesondert angegeben.

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Lichtmikroskopische Darstellung von <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	37
2	Einfluss von Temperatur (links) und pH-Wert (rechts) auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	37
3	Kultivierung von <i>Thermoanaerobacter brockii</i> bei 60 °C und einem pH-Wert von 8,0.	38
4	SDS-Page der Reinigungsschritte der Lipase aus <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	41
5	Native Page der Lipase aus <i>Thermoanaerobacter brockii</i> nach der dreistufigen Reinigung.	42
6	Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Temperatur (photometrische Bestimmung mit p-NPP als Substrat).	43
7	Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH-Wert (photometrische Bestimmung mit p-NPP als Substrat).	43
8	Thermostabilität der Lipase.	44
9	Einfluss verschiedener Metallkationen auf die Lipaseaktivität.	46
10	Einfluss verschiedener Detergenzien auf die Lipaseaktivität.	47
11	Einfluss verschiedener Lösemittel auf die Lipaseaktivität.	48
12	Einfluss verschiedener organischer Hemmstoffe auf die Lipaseaktivität.	48
13	Einfluss verschiedener Chemikalien auf die Lipaseaktivität.	50
14	Reinigungsgele der rekombinanten Lipasen <i>C. thermohydrosulfuricum</i> (links) und <i>T. tencongensis</i> (rechts).	51
15	Abhängigkeit der Lipaseaktivitäten vom pH-Werten.	52
16	Einfluss von Lösemitteln auf die Lipaseaktivität	52
17	Statistische Versuchsplanung - Versuchsplan 1.	58
18	Statistische Versuchsplanung - Versuchsplan 2.	60
19	Prozessführung im Linitester - Behandlung von ungeschlichteten Baumwollstrümpfen.	61
20	Relative Gewichtsabnahme von ungeschlichteten Baumwollstrümpfen durch eine enzymatische Behandlung im Linitester.	62
21	Prozessführung I im Laborjigger - Behandlung von geschlichtetem Baumwollgewebe.	65

22	Prozessführung II im Laborjigger - Behandlung von geschlichtetem Baumwollgewebe.	67
23	Prozessführung III im Laborjigger - Behandlung von geschlichtetem Baumwollgewebe.	68
24	Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure und H_2O_2 mit GOD in der HPLC.	70
25	Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Oxidation von Glucose mit technischer GOD (ASA).	71
26	Enzymatischer Abbau von Wasserstoffperoxid mit Katalase in Gegenwart von Natriumazid.	73
27	Weißgrad (nach Stensby) von unterschiedlich behandelter Baumwolle nach einer Heißbleiche.	79
28	Polymerisationsgrad DP (nach DIN 54270-T3) und Festigkeit (nach DIN 53857 1, Streifenzugversuch) von unterschiedlich behandelter Baumwolle nach einer Heißbleiche.	81

Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Gesamtkosten und Fördersummen laut Projektantrag über die gesamte Projektlaufzeit.	20
2	Verteilung der Fördergelder auf die einzelnen Projektpartner.	21
3	Inhaltsstoffe des Mediums (1,0 l) zur Kultivierung von <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	22
4	Inhaltsstoffe des Medoiums (1,0 l) zur Kultivierunf von <i>Clostridium thermo- hydrosulfuricum</i> .	23
5	Verwendete aktivitätsbeeinflussende Chemikalien.	26
6	Zeitliche Abfolge der Arbeitsschritte bei der Baumwollbehandlung im KKV- Verfahren (je 400 m Ware mit einem Gewicht von 120 kg).	33
7	Konstante Parameter bei allen Versuchen im Industriejigger.	34
8	Zeitliche Abfolge der Arbeitsschritte bei der Baumwollbehandlung im Industriejigger.	34
9	Lipaseaktivität anaerober, thermophiler Bakterienstämme.	36
10	Einfluss unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (0,1 %) auf die Lipaseproduktion von <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	38
11	Prozentualer Anteil intrazellulärer, zellwandgebundener und extrazellulärer Aktivität der Lipase aus <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	39
12	Reinigung der Lipase aus <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	40
13	Reinigung der Lipase aus <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	40
14	Substratspezifische Aktivität der Lipase aus <i>Thermoanaerobacter brockii</i> .	45
15	Optimale Kultivierungsbedingungen für das Wachstum von <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> SOL 1.	49
16	Charakterisierung von Rohbaumwolle.	54
17	Temperatur- und pH-Wert-Optima der verwendeten Enzyme.	56
18	Ergebnisse Versuchsplan 1 (pH = 5).	57
19	Ergebnisse Versuchsplan 2 (pH = 8).	59
20	Enzymatische Behandlung von ungeschlichteter Baumwolle im Linitester.	63
21	Charakterisierung von Rohbaumwolle nach unterschiedlichen enzymatischen Behandlungen im Jigger (Prozessführung I).	65

22	Charakterisierung von Rohbaumwolle nach unterschiedlichen enzymatischen Behandlungen im Jigger und Vergleich der Prozessführungen I und II.	67
23	Charakterisierung von Rohbaumwolle nach einer enzymatischen Behandlung mit α -Amylase, Cellulase und Pektinase im Jigger im Vergleich zum Original und der konventionell vorbehandelten Probe (Prozessführung III).	69
24	Umsatz von 20 g/l Glucose mit verschiedenen Glucoseoxidasen (pH = 5, T = 38 °C, t = 3 h).	72
25	Entschlichtungsgrad (TEGEWA-Jodtest) von unterschiedlich im KKV-Verfahren behandelte Baumwolle.	74
26	Benetzbarkeit (TEGEWA-Tropftest) von unterschiedlich im KKV-Verfahren behandelte Baumwolle.	75
27	Entschlichtungsgrad (TEGEWA-Jodtest) von unterschiedlich im Jigger behandelte Baumwolle.	76
28	Benetzbarkeit (TEGEWA-Tropftest) von unterschiedlich im Jigger behandelte Baumwolle.	76
29	Entschlichtungsgrad von unterschiedlich behandelte Baumwolle (TEGEWA-Jodtest) nach einer Heißbleiche.	78
30	Benetzbarkeit (TEGEWA-Tropftest) von unterschiedlich behandelte Baumwolle nach einer Heißbleiche.	79
31	Flächengewichte von unterschiedlich behandelte Baumwolle nach der gesamten Vorbehandlung incl. der Heißbleiche.	80
32	Farbabstand ΔE von verschieden im KKV-Verfahren vorbehandelten Baumwollproben im Vergleich zur klassisch vorbehandelten Baumwolle nach der Färbung in einem Mittelgrauton.	82
33	Einsparpotential des enzymatischen Verfahrens.	86
34	Verschiedene Parameter von Baumwolle, die im KKV-Verfahren enzymatisch vorbehandelt wurde, im Vergleich zu klassisch entschlichteter und alkalisch abgekochter Ware (nach einer Heißbleiche).	87

1 Zusammenfassung

Im Verlaufe des von der DBU geförderten F&E-Projektes wurden die zunächst im Labor- und Technikumsmaßstab gesammelten Ergebnisse auf ein verfahrenstechnisches Gesamtkonzept zur enzymatischen Baumwollvorbehandlung übertragen.

Dabei wurden technische Enzympräparate, die durch ein intensives, systematisches Screening während der ersten Projektphase anhand verschiedener Gesichtspunkte (Aktivität, Kompatibilität mit den angestrebten Prozessparametern, Verfügbarkeit etc.) ausgewählt wurden, in Verbindung mit thermophilen Lipasen, die an der TUHH entwickelt wurden, eingesetzt. Anhand einer statistischen Versuchsplanung wurde in der zweiten Projektphase die Fähigkeit der Enzymmischungen untersucht, die Stärkeschlichte und natürliche Baumwollbegleitsubstanzen in unterschiedlichsten Enzymkombinationen und -konzentrationen bei konstanter Prozesstemperatur im leicht sauren und leicht alkalischen pH-Wert-Bereich in einer Flotte gleichzeitig abzubauen. Dabei stellte sich heraus, dass in der Prozessgestaltung ein pH-Wert-Wechsel von leicht sauer nach leicht alkalisch, eine modifizierte Temperaturführung und eine heiße Nachspülung vorteilhaft sein können. Die Enzyme wurden dabei in ihren jeweiligen pH-Wert- und Temperatur-optima der Flotte zugefügt. Allein mit technischen Enzympräparaten der Klassen α -Amylasen, Cellulasen und Pektinasen konnte durch die optimierte Prozessführung eine hohe Saugfähigkeit bei gleichzeitigem exzellenten Entschlichtungsgrad im Laborjigger erzielt werden. Die Tropfeneinsinkzeiten lagen deutlich unter 10 s, so dass die derart enzymatisch vorbehandelte Baumwolle für eine Weiterverarbeitung geeignet ist. Die im Labor- und Technikumsmaßstab erzielten Ergebnisse galten als übertragbar für eine großtechnische Anwendung, so dass entsprechende Versuche an der TV a.d.W. in der dritten Projektphase durchgeführt wurden.

Die großtechnischen Versuche ergaben, dass eine enzymatisch-katalysierte Baumwollvorbehandlung mit einer Kombination aus α -Amylase und Pektinase unter den erarbeiteten Konditionen keines alkalischen Abkochens mehr bedarf. Nach einer anschließenden Bleiche entsprechen alle textilspezifischen Parameter der Ware

wie Benetzbarkeit, Polymerisationsgrad, Reißfestigkeit oder Weißgrad denen einer konventionell behandelten Baumwolle. Darüber hinaus lässt sich die enzymatisch behandelte Ware ebenso gut färben. Das Wegfallen eines ganzen Arbeitsschrittes führt zu einer enormen Verkürzung des Gesamtprozesses und es können große Mengen an Brauch- und Abwasser, Energie und aggressiven Chemikalien (vor allem NaOH) eingespart werden, was einerseits die Umwelt entlastet, andererseits aber auch für den Textilveredler aus ökonomischer Sicht vorteilhaft ist.

An der TUHH wurden während der gesamten Projektlaufzeit Arbeiten zur Herstellung und Aufbereitung thermophiler Lipasen für den Abbau von Baumwollwachsen durchgeführt. Es konnten zwei Präparate mit hoher Aktivität bzgl. unterschiedlicher Fettspezies isoliert werden, die in einem weiten Temperatur- und pH-Wert-Bereich stabil sind. Wegen der aufwendigen Kultivierung der lipaseproduzierenden Stämme und der komplizierten Reinigung der extremophilen Enzyme standen die Lipasen allerdings nicht in genügend großen Mengen für Versuche im Industriemaßstab zur Verfügung. Des Weiteren zeigte sich, dass hohe Calcium- und Magnesiumkonzentrationen, wie sie auch in Entschlichtungsflotten auftreten, für die thermophilen Lipasen stark aktivitätsherabsetzend sind, so dass sie in realen Prozessen keine verbessernde Wirkung zeigen. Dennoch könnten die an der TUHH entwickelten Präparate zukünftig in anderen enzymatisch-katalysierten Prozessen von Interesse sein.

Der angestrebte Einsatz von technischen Glucoseoxidase-Präparaten zur Generierung von bleichaktivem Wasserstoffperoxid aus Glucose zur nachgeschalteten Bleiche der behandelten Baumwolle scheiterte an der zu hohen Katalasenebenaktivität in entsprechenden Formulierungen. Zwar wurden vielversprechende Versuche zur selektiven Inhibierung der Katalase im Zweikomponentensystem GOD/Katalase durchgeführt, die allerdings gegen Ende der zweiten Projektphase in Absprache mit der DBU eingestellt wurden, da eine befriedigende Lösung des Problems in der Projektrestlaufzeit für wenig wahrscheinlich angesehen wurde. Unabhängig von diesem DBU-Projekt wird das DTNW in der Zukunft weiterhin das Ziel verfolgen, die Aktivität einzelner Enzyme in Enzymmischungen selektiv zu unterdrücken.

Zusammenfassend wird das Projekt von den Partnern als äußerst erfolgreich bewertet, da das Hauptziel des Forschungsvorhabens, die Entwicklung einer innovativen und umweltentlastenden Verfahrenstechnik zur kombinierten enzymatischen Vorbehandlung von Baumwolle, erreicht wurde.

Durch die Substitution des alkalischen Abkochens durch den kombinierten Einsatz von α -Amylasen und Pektinasen in der Entschlichtungsstufe im KKV-Verfahren können bei gleicher Güte des Endproduktes in der Vorbehandlung ca. 6 l Brauch- und Abwasser pro kg verarbeiteter Baumwolle eingespart werden. Darüber hinaus entfällt der Energieeintrag für das Heizen der Abkochflotte und der folgenden Spülprozesse sowie der Eintrag großer Mengen Natronlauge in das Abwasser. Aus ökonomischer Sicht ergibt sich aus dem neuen Verfahren eine Einsparung von mehr als 0,20 €/kg Baumwolle.

2 Anlass und Zielsetzung des Projektes

Eine effektive Vorbehandlung von Baumwolle soll alle Stoffe entfernen, die nachfolgende Veredlungsschritte beeinträchtigen könnten. Dies geschieht bis heute zumeist in drei Stufen: Entschlichtung, alkalisches Abkochen und Bleiche. Dabei werden unter Einsatz hoher Energie-, Wasser- und Alkalimengen die in der Weberei applizierten Hilfsmittel und die natürlichen Faserbegleitstoffe unspezifisch entfernt, was mitunter zu einer Schädigung des cellulosischen Materials führt [1].

Die Anwendung enzymatisch-katalysierter Verfahren gewinnt im Bereich der Baumwollvorbehandlung zunehmend an Bedeutung. Die enzymatisch-katalysierten Reaktionen besitzen gegenüber konventionellen, chemischen zahlreiche Vorteile. So können die Enzyme zumeist bei moderaten Temperaturen in pH-Wert-Bereichen nahe dem Neutralpunkt verwendet werden. Des Weiteren müssen sie als Biokatalysatoren nicht in stöchiometrischen Verhältnissen eingesetzt werden, so dass oft kleine Mengen für einen genügend hohen Umsatz ausreichend sind. Ferner zeichnen sie sich durch eine hohe Substratselektivität aus, so dass empfindliche Substanzen im Reaktionsverlauf nicht angegriffen werden. Weitere Vorteile sind ihre biologische Abbaubarkeit und ihre zumeist gefahrlose und einfache Handhabung [2,3].

Enzymatische Prozesse haben sich in vielen Bereichen der Technik etabliert. In der Textilindustrie zählt die enzymatische Entschlichtung von Baumwolle mit α -Amylasen seit vielen Jahrzehnten zu den großtechnisch angewandten Verfahren [4,5]. Des Weiteren werden in der Baumwollveredlung u.a. Cellulasen, Pektinasen, Lipasen und Katalasen eingesetzt [6]. Auch bei anderen Naturfasern setzt man Enzyme zur Produktverbesserung ein. Beispiele sind das enzymatische Entbasten von Seide mit Sericinasen [7], die enzymatische Filzfrei-Ausrüstung von Wolle mit Proteasen [8] oder die Weichgriffverbesserung von Jute mit Cellulasen und Xylanasen [9]. In der Zukunft wird man sich vermehrt mit der Möglichkeit beschäftigen, auch Synthesefasern aus z.B. Polyester [10,11] oder Polyacrylnitril [12] enzymatisch zu modifizieren.

Im Rahmen des F&E-Projektes sollte ein umfassendes enzymatisches Vorbehandlungskonzept zum Abbau der verschiedenen Baumwollbegleitsubstanzen und zur

Weiterverwendung der nativen Stärkeschichten erarbeitet werden. Die drei konventionellen Teilprozesse sollten möglichst unter Verwendung von Enzymmischpräparaten in einem einzigen enzymatischen Gesamtprozess vereint werden, wobei das Hauptaugenmerk auf die Substitution des umweltbelastenden und kostenintensiven Alkalischen Abkochens gelegt wurde.

Am Ende des Projektes sollten Enzympräparate zur Verfügung stehen, welche unter Anwendung einer erarbeiteten Verfahrenstechnik eine entschlichtete Baumwolle liefern, die eine gute Saugfähigkeit und einen weichen Griff besitzt. Darüber hinaus soll die Ware nach der enzymatischen Behandlung gegenüber konventionellen Prozessen eine deutlich verminderte Schädigung aufweisen, so dass innerbetriebliche Retouren vermindert werden.

Aus ökologischer Sicht sollte die angestrebte Verfahrenstechnik zu einer Verminderung von Brauch- und Abwassermengen führen sowie mit einer Verringerung des Chemikalienbedarfs einhergehen. Durch die Senkung der Prozesstemperatur gegenüber konventionellen Verfahren wurde eine Verminderung des Energiebedarfs angestrebt.

3 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

3.1 Arbeitsschritte

In der ersten Projektphase wurde ein intensives Screening verschiedenster technischer Enzyme durchgeführt, die für einen Einsatz in der enzymatischen Baumwollvorbehandlung (Entfernung der applizierten Stärkeschichte und der natürlichen Baumwollbegleitsubstanzen) in Frage kamen. Einige wenige technische Enzyme der zu untersuchenden Enzymklassen α -Amylasen, Cellulasen und Pektinase wurden schließlich für weitere Untersuchungen ausgewählt, wobei die Auswahlkriterien u.a. Verfügbarkeit, Aktivität sowie die Einsetzbarkeit in den angestrebten pH-Wert- und Temperaturbereichen waren. Ferner einigten sich die Partner auf eine einheitliche Kombination von Textilhilfsmitteln, die die Benetzbarkeit der Baumwolle erhöht, ohne dabei die Aktivität der eingesetzten Enzyme zu beeinträchtigen. An der TUHH wurden extremophile Lipasen hergestellt.

Gemäß dem im Projektantrag vorgesehenen Arbeits- und Zeitplan wurden in der zweiten Projektphase die Ergebnisse der ersten Projektphase in ein verfahrenstechnisches Gesamtkonzept überführt, wobei die Abstimmung der Verfahrensparameter im Vordergrund stand. So wurden verschiedenste Kombinationen der Enzyme in unterschiedlichen Mengen bei variierenden Prozesstemperaturen und -pH-Werten auf ihre Wirkung bzgl. einer Entschlichtung und Hydrophilierung der Baumwollrohware untersucht. Zur Prozessoptimierung wurden u.a. computergestützte Verfahren der statistischen Versuchsplanung eingesetzt, um Interaktionen zwischen verschiedenen Enzympräparaten zu erkennen und um die Reproduzierbarkeit erzielter Ergebnisse zu überprüfen. Die Entwicklung und Charakterisierung extremophiler Lipasen wurde weiter vorangetrieben.

In der dritten Projektphase wurden konkrete Praxisversuche unter den im Labor entwickelten Parametern an geschlichteter Rohbaumwolle im Industriemaßstab bei dem Projektpartner Textilveredlung an der Wiese in Lörrach durchgeführt.

Gemäß dem Projektantrag wurden verschiedene Arbeitsschritte von verschiedenen Projektpartnern durchgeführt.

3.1.1 DTNW

Im ersten Jahr der Projektlaufzeit wurden am DTNW folgende Arbeiten verrichtet:

- Screening einsetzbarer Enzympräparate
- Aktivitätsbestimmungen von α -Amylasen, Amyloglucosidasen, Pektinasen, Lipasen, Cellulasen, Glucoseoxidasen und Katalasen
- Entschlichtung von geschlichteter Rohbaumwolle mit α -Amylasen und Amyloglucosidasen im Linitester und Jigger
- Versuche zur Entfernung der Baumwollbegleitsubstanzen von ungeschlichteter Rohbaumwolle mit o.g. Enzymen allein und in Mischungen im Vergleich zum konventionellen Abkochprozess im Linitester
- Versuche zur Glucoseoxidation mit GOD
- Bleichsimulationen mit den bisher erzielten Wasserstoffperoxidkonzentrationen im Linitester
- Versuche zur Inhibierung von Katalase mit verschiedenen komplexierend wirkenden Anionen

Dabei standen neben den Versuchen zur enzymatischen Entfernung unerwünschter Baumwollbegleitsubstanzen vor allem Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation des Stärkeabbauproduktes Glucose mit Glucoseoxidase im Vordergrund. Abweichend vom Projektantrag wurden zusätzliche Versuche an ungeschlichtetem Baumwollschussgarn durchgeführt, da so die Effekte der einzelnen Enzyme ohne die störende Schlichtefracht besser beurteilt werden konnten.

Im zweiten Jahr der Projektlaufzeit wurden am DTNW folgende Arbeiten durchgeführt, bei denen die Optimierung der Prozessführung über die Reaktionszeit im Vordergrund stand:

- Charakterisierung der geschlichteten und nicht geschlichteten Baumwollrohware (Benetzungsverhalten, Pektingehalt, Wachsanteil etc.)

- Enzymatische Einbadbehandlung von Rohbaumwolle im Linitester und Jigger
- Variation der Prozesstemperaturen und -pH-Werte
- Variation der Prozessführung mit wechselnden Temperaturen und pH-Werten
- Einfluss der Spültemperatur auf das Benetzungsverhalten
- Einfluss der Trocknungstemperatur auf das Benetzungsverhalten
- Charakterisierung der enzymatisch behandelten Proben
- Vergleich mit konventionell entschlichteten und alkalisch abgekochten Proben

Nach der Sichtung und Auswertung aller bisher erzielten Ergebnisse wurden im dritten Jahr der Projektlaufzeit in Zusammenarbeit mit den Partnern die Parameter für eine enzymatische Baumwollvorbehandlung im Industriemaßstab erarbeitet und schließlich in Praxisversuchen bei der Textilveredlung an der Wiese umgesetzt. Die Proben aus den Praxisversuchen wurden mit praxisrelevanten Analyseverfahren charakterisiert. In Absprache mit der DBU wurden keine weiteren Versuche mehr zur enzymatischen Weiterverwertung von Glucose aus der Entschlichtung mit Glucoseoxidase durchgeführt.

3.1.2 CHT

Im ersten Jahr der Projektlaufzeit wurden bei der CHT folgende Arbeiten verrichtet.

- Screening einsetzbarer Enzympräparate
- Aktivitätsbestimmungen von α -Amylasen, Amyloglucosidasen, Pektinasen, Lipasen und Cellulasen
- Entschlichtung von geschlichteter Rohbaumwolle mit α -Amylasen und Amyloglucosidasen im Labomaten
- Versuche zur Entfernung der Baumwollbegleitsubstanzen von ungeschlichteter Rohbaumwolle mit o.g. Enzymen allein und in Mischungen im Vergleich zum konventionellen Abkochprozess im Labomaten
- Versuche zur gleichzeitigen Entfernung der Schlichte und der Baumwollbegleitsubstanzen von geschlichteter Rohbaumwolle mit Enzymmischungen im Labomaten
- Optimierung des Einsatz von textilen Hilfsmitteln

Bei der CHT stand neben den Versuchen zur enzymatischen Entfernung unerwünschter Baumwollbegleitsubstanzen vor allem die Auswahl geeigneter textiler Hilfsmittel, deren mögliche Kombination und Konzentration im Vordergrund.

Im zweiten Jahr der Projektlaufzeit wurden bei der CHT folgende Arbeiten durchgeführt, wobei besonderer Wert auf eine statistische Versuchsdurchführung und -auswertung gelegt wurde:

- Enzymatische Einbadbehandlung von Rohbaumwolle im Labomat
- Breite Variation der Enzymgemischrezeptur bei konstanten Prozessbedingungen (statistische Versuchsplanung) und Charakterisierung der enzymatisch behandelten Proben
- Variation des pH-Wertes
- Computergestützte Auswertung der Ergebnisse

Nach der Sichtung und Auswertung aller bisher erzielten Ergebnisse wurden im dritten Jahr der Projektlaufzeit in Zusammenarbeit mit den Partnern die Parameter für eine enzymatische Baumwollvorbehandlung im Industriemaßstab erarbeitet und schließlich in Praxisversuchen bei der Textilveredlung an der Wiese umgesetzt.

3.1.3 TUHH

Im ersten Jahr der Projektlaufzeit wurden an der TUHH folgende Arbeiten durchgeführt.

- Screening einsetzbarer Enzympräparate
- Aktivitätsbestimmungen von α -Amylasen, Amyloglucosidasen Pektinasen, Lipasen und Cellulasen
- Entwicklung und Fermentierung von neuen, extremophilen Enzympräparaten (Pektinasen und Lipasen)

An der TUHH stand neben den Aktivitätsbestimmungen der vorgesehenen technischen Enzyme vor allem die Suche nach geeigneten extremophilen Enzymen im Vordergrund. Es konnten Pektinasen und Lipasen produziert werden, die in den

kommenden Projektphasen am DTNW und bei der CHT auf ihre Wirksamkeit bzgl. des Abbaus unerwünschter Baumwollbegleitsubstanzen untersucht wurden.

Im zweiten Jahr der Projektlaufzeit wurden an der TUHH folgende Arbeiten verrichtet, die sich vordergründlich mit der Charakterisierung der im ersten Jahr hergestellten extremophilen Lipasen beschäftigten:

- Kultivierung von zwei thermophilen Lipasen
- Bestimmung der optimalen Kultivierungsbedingungen
- Reinigung der Enzympräparate
- Aktivitätsbestimmung an verschiedenen Substraten
- Untersuchungen zur Aktivitätsbeeinflussung durch anorganische oder organische Additive

Im dritten Jahr der Projektlaufzeit wurden die Untersuchungen zu den an der TUHH hergestellten Enzymen weiter vorangetrieben und konkretisiert. Insbesondere wurden molekularbiologischen Arbeiten zur Klonierung und Expression von thermostabilen Lipasen aus anaeroben Mikroorganismen durchgeführt.

3.1.4 TV a.d.W.

Im ersten Jahr der Projektlaufzeit beschränkte sich die Arbeit der Textilveredlung an der Wiese auf die Beratung der Partner bzgl. praxisorientierter Fragestellungen.

Im zweiten Jahr der Projektlaufzeit wurden die ersten großtechnischen Versuche an der TV a.d.W. vorbereitet. In Absprache mit den Partnern wurden die maschinenspezifischen Parameter festgelegt. Auf eine konkrete Durchführung wurde allerdings noch verzichtet, da sich erst gegen Ende des abgelaufenen Jahres aus den Ergebnissen des DTNW und der CHT ein Versuchsplan für die großtechnische Umsetzung ergab. Wegen der großen Kosten der industriellen Versuche wurde davon abgesehen, unausgereifte, wenig Erfolg versprechende Konzepte zu realisieren, nur um den vorgesehenen Zeitplan abzuarbeiten. Für die Partner äußerst wichtig war dagegen die ständige Kommunikation mit der TV a.d.W., um die Güte der

bisher im halbtechnischen Maßstab erzielten Ergebnisse aus Sicht des Anwenders beurteilen zu können.

Im dritten Jahr der Projektlaufzeit wurden schließlich Praxisversuche an geschlichteter Rohbaumwolle unter Einsatz von technischen Enzymen (α -Amylase, Pektinase und Cellulase) durchgeführt. Dabei wurden sowohl Versuche nach dem Kalt-Klotz-Verweil-Verfahren (KKV) als auch im Jigger durchgeführt. Die Ware wurde anschließend gebleicht und gefärbt. Vergleichend wurden Versuche unter konventionellen Bedingungen vorgenommen.

3.2 Finanzierung

Aus dem Projektantrag ergeben sich die in **Tabelle 1** dargestellten Gesamtkosten für die gesamte Projektlaufzeit 2002 bis 2004.

	Kosten [€]	Förderquote [%]	Fördersumme [€]
DTNW	527.013,58	60,0	316.206,93
CHT	126.289,09	0	0,00
TU HH	467.939,43	50,0	233.685,95
TV a.d.W.	110.950,34	55,0	61.099,38
gesamt	1.232.192,44	49,6	610.992,26

Tabelle 1: Gesamtkosten und Fördersummen laut Projektantrag über die gesamte Projektlaufzeit.

Bis Ende 2004 wurden 560.992,26 € von der DBU für die Jahre 2002, 2003 und 2004 ausgezahlt und vom DTNW gemäß dem Förderplan auf die einzelnen Partner verteilt (**Tabelle 2**).

	Aufteilung [€]
DTNW	297.676,62
CHT	0,00
TU HH	218.535,95
TV a.d.W.	44.779,69
gesamt	560.992,26

Tabelle 2: Verteilung der Fördergelder auf die einzelnen Projektpartner.

Da die konkreten Abrechnungen der einzelnen Partner für 2004 der Verwaltung des DTNW noch nicht vorlegen, wird an dieser Stelle auf eine Aufstellung der bisher tatsächlich benötigten Gelder verzichtet.

Eine detaillierte Aufstellung der Arbeits- und Sachkosten geht bei der DBU gesondert über die Verwendungsnachweise des Haushaltsjahres 2004 ein.

3.3 Experimentelles

3.3.1 Herstellung, Reinigung und Charakterisierung von extremophilen Lipasen

Kultivierung

Die anaerobe Kultivierung von *Thermoanaerobacter brockii* zur Herstellung einer thermophilen Lipase erfolgte in einem Medium, das die in **Tabelle 3** aufgeführten Substanzen enthält.

NaCl	3,00 g
K ₂ HPO ₄	1,60 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,01 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g
Hefeextrakt	1,50 g
Pepton	0,50 g
Spurenelementlösung 141	1,00 ml
Vitaminlösung 141	1,00 ml
Resazurin	0,001 g

Tabelle 3: Inhaltstoffe des Mediums (1,0 l) zur Kultivierung von *Thermoanaerobacter brockii*.

Für die anaerobe Kultivierung von *Clostridium thermohydrosulfuricum* wurde das in **Tabelle 4** aufgeführte Medium verwendet.

NaCl	3,00 g
K ₂ HPO ₄	2,50 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,80 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,01 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g
Hefeextrakt	1,50 g
Pepton	0,50 g
Spurenelementlösung 141	1,00 ml
Vitaminlösung 141	1,00 ml
Resazurin	0,001 g

Tabelle 4: Inhaltstoffe des Mediums (1,0 l) zur Kultivierung von *Clostridium thermohydrosulfuricum*.

Die Medienbestandteile wurden jeweils in einem Liter dest. H₂O gelöst, 20-30 min gekocht und unter Biogon-Begasung (80% N₂/20% CO₂) abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden dem Medium Cystein (0,3 g) und NaHCO₃ (1,0 g) zugefügt, der pH-Wert mit 5 N NaOH auf pH 7,2-7,4 eingestellt und das Medium in zuvor mit Biogon begaste Kulturgefäße (Serumflaschen) abgefüllt. Die Sterilisation erfolgte bei 121°C über 20 min. Nach der Sterilisation wurden Na₂S x 9 H₂O (0,1 g/l), Na₂S₂O₃ (2,5 g/l) und Glucose (5,0 g/l) zugefügt. Der Stamm wurde anschließend 36 h auf einem Rotationsschüttler (160 U/min) bei 65 °C in 50 ml Serumflaschen mit je 20 ml des oben beschriebenen Mediums inkubiert.

Enzymaufbereitung/Reinigung

Die enzymhaltigen Medien wurden durch Zentrifugation vom Bakterienstamm getrennt. Der jeweilige Überstand wurde über Nacht gegen einen 25 mM Tris-HCl-

Puffer (pH 8,0), der 1 M KCl enthielt, dialysiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- *Reinigungsschritt 1: Phenylsepharose*

Die dialysierte Lösung wurde auf eine Phenylsepharose-Säule (20,0 cm x 2,6 cm, gepackt mit 60 ml 6F substituiertem Harz) gegeben, welche mit einem KCl (1 M) haltigen 25 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) konditioniert war. Die Säule wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen des Puffers mit einem linearen KCl-Gradienten von 1 M zu 0 M gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearer DMSO-Gradient (von 0 % zu 50 %) im Tris-HCl-Puffer eluiert (Gesamtvolumen 255 ml). Die Flussrate betrug 1,5 ml/l. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt.

- *Reinigungsschritt 2: Hydroxylapatit*

Die enzymhaltigen Fraktionen aus Schritt 1 wurden auf eine Hydroxylapatit-Säule (10,0 cm x 2,6 cm, konditioniert mit einem 10 mM Phosphat-Puffer pH 6,8) gegeben. Die Säule wurde mit dem doppelten Säulenvolumen gewaschen (s.o. Phosphat-Puffer). Gebundenes Protein wurde mit einem linearen Natriumphosphat-Gradienten von 10 mM zu 500 mM (pH 6,8) eluiert, welcher 10 % DMSO enthielt (Gesamtvolumen 150 ml). Die Flussrate war 0,8 ml/min. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt.

- *Reinigungsschritt 3: Gelchromatographie*

Die enzymhaltigen Fraktionen wurden auf einer Superdex 200-Säule (Pharmacia, 160 cm x 16 cm) mit einem 25 mM Tris-HCl-Puffer mit 100 mM NaCl und 10 % DMSO bei einer Flussrate von 1ml/min eluiert (FPLC). Das gereinigte Enzym wurden bei - 20 °C aufbewahrt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung von enzymhaltigen Proben wurde gemäß der Methode nach Bradford durchgeführt [13]. Als Proteinstandard diente Albumin aus Rinderserum.

Aktivitätsbestimmung der Lipase mit p-Nitrophenylpalmitat (p-NPP) als Substrat

Die enzymatische Hydrolyse von p-NPP wurde bei 70 °C in einem 0,025 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 nach der Methode von Winkler und Stuckmann verfolgt [14]. Eine p-NPP-Emulsion wurde für zwei Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt. Nach der Zugabe der Lipase wurde eine Blindabsorption bei 410 nm gemessen. Eine Unit der Lipaseaktivität wird definiert als die Enzymmenge, welche 1 mmol p-NPP pro Minute unter den Testbedingungen abbaut. Die Aktivität gegenüber anderen p-Nitrophenylestern wurde gleichermaßen bestimmt.

Aktivitätsbestimmung der Lipase mit Olivenöl als Substrat

Die oben beschriebene Methode für p-NPP wurde mit Olivenöl oder Mono- und Triglyzeriden durchgeführt, wobei die Absorption der Lösung abweichend bei 430 nm gemessen wurde.

Untersuchungen zur Lipaseaktivität in Gegenwart von aktivitätsbeeinflussenden Additiven

Die Aktivitätsänderung der thermophilen Lipasen durch die Gegenwart verschiedener Metallionen, Detergenzien, Lösemittel und organischer Hemmstoffe wurde untersucht, indem die enzymhaltige Lösung zunächst mit der jeweiligen Substanz inkubiert wurde. Anschließend wurde das Substrat p-Nitrophenylpalmitat für 15 min bei 70 °C mit dem Enzym umgesetzt. Die Aktivität wurde wie oben beschrieben bestimmt.

In **Tabelle 5** werden alle Chemikalien aufgeführt, die für die Untersuchungen zu deren Einfluss auf die Lipaseaktivität verwendet wurden. Alle Chemikalien wurden in der höchsten kommerziell erhältlichen Reinheitsstufe eingesetzt.

*Inkubation für Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii*:*

T = 30 °C, t = 30 min

- Metallkationen und Hemmstoffe je c = 10 mmol/l

- Detergenzien $c = 10 \text{ mmol/l}$ (für Polyvinylalkohol PVA und Triton X-100 mit nicht genau definierter Molmasse $c = 0,1 \text{ Vol.-%}$)
- Organische Lösemittel $c = 25 \text{ Vol.-%}$

Inkubation für Lipase aus Clostridium thermohydrosulfuricum:

$T = 30 \text{ °C}$, $t = 90 \text{ min}$

- Metallkationen, organische Lösemittel und Hemmstoffe je $c = 1 \text{ mmol/l}$
- Detergenzien $c = 1 \text{ mmol/l}$ (für Polyvinylalkohol PVA und Triton X-100 mit nicht genau definierter Molmasse $c = 0,01 \text{ Vol.-%}$)

Reagenz	Name	Formel/Abkürzung
Metallkationen (als Chloridsalze)	Natrium	Na^+
	Kalium	K^+
	Magnesium	Mg^{2+}
	Calcium	Ca^{2+}
	Eisen	Fe^{3+}
	Kobalt	Co^{2+}
	Mangan	Mn^{2+}
	Kupfer	Cu^{2+}
	Aluminium	Al^{3+}
Detergenzien	Polyvinylalkohol	PVA
	Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA
	Natriumdodecylsulfat	SDS
	Triton X-100®	-
	Tween® 20	-
	Tween® 80	-
	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat	CHAPS
Lösemittel	Methanol	CH_3OH
	Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
	Tert. Butylalkohol	$\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$
	Amylalkohol	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$
	Heptan	C_7H_{16}
	Hexadecan	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}$
	Heptadecan	$\text{C}_{17}\text{H}_{36}$
	Benzol	C_6H_6
Hemmstoffe	2-Mercaptoethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$
	Iodacetamid	$\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$
	α -Dithiothreitol	DTT
	Guanidinhydrochlorid	$\text{CH}_5\text{N}_3 \text{ HCl}$
	Harnstoff	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$
	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid	Pefablock
	p-Chlormercuribenzoat	PCMB
	Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF

Tabelle 5: Verwendete aktivitätsbeeinflussende Chemikalien.

Molekulargenetische Untersuchungen zur Klonierung und Expression von Lipasen

Zur Herstellung der rekombinanten Lipasen wurden die korrespondierenden Lipase-Gene aus der genomischen DNA der anaeroben Bakterien *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter brockii* und *Thermoanaerobacter tencongensis* mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert. Die vollständigen Gene wurden anschließend durch Inverse PCR erhalten.

3.3.2 Verwendete Enzyme zur Baumwollvorbehandlung

Für die folgenden Versuche wurden im zweiten und dritten Projektjahr die nach dem ersten Jahr ausgewählten, technischen Enzympräparate weiterhin eingesetzt. Wegen unterschiedlicher Fragestellungen, wurde die jeweilige Palette am DTNW und bei der CHT um wenige, von einander abweichende Enzyme erweitert:

DTNW:

Grundenzyme

- Beisol T 2090 (CHT), α -Amylase für den gesamten Temperaturbereich
- Beizym UL (CHT), Cellulase für den leicht sauren pH-Wert-Bereich
- Beisol DHP (CHT), Pektinase für den leicht sauren bis neutralen pH-Wert-Bereich
- Beisol DAP (CHT), Pektinase für den leicht alkalischen pH-Wert-Bereich
- thermophile Lipasen (TUHH)

zusätzlich am DTNW

- Glucoseoxidase (Serva), aus *Aspergillus niger*, GOD/Katalase-Verhältnis > 2000
- Glucoseoxidase G-29® (ASA), aus *Aspergillus niger*, GOD/Katalase-Verhältnis 10 : 1
- Katalase (Fluka), aus Rinderleber

CHT:

Grundenzyme

- Beisol T 2090 (CHT), α -Amylase für den gesamten Temperaturbereich
- Beizym UL (CHT), Cellulase für den leicht sauren pH-Wert-Bereich
- Beisol DHP (CHT), Pektinase für den leicht sauren bis neutralen pH-Wert-Bereich

- Beisol DAP (CHT), Pektinase für den leicht alkalischen pH-Wert-Bereich
- thermophile Lipasen (TUHH)

zusätzlich bei der CHT

- Rohapect S (AB Enzyms), Amyloglucosidase für den leicht sauren bis neutralen pH-Wert-Bereich
- Carezyme 4500 L (Novozymes), Cellulase für den leicht sauren bis neutralen pH-Wert-Bereich
- thermophile Pektinase (TUHH)

3.3.3 Baumwolle

geschlichtete Baumwollgewebe

- Baumwollgewebe Artikel 11.1269 (Hecking Söhne/Wendler), L 1:1, 24/24 - 28/28 Nm, 160 cm breit, Schlichteaufgabe ca. 8 Gew.-%, Schlichterezeptur: 9,0 kg E 4, 1,5 kg E 11 K, 0,3 kg Wachs auf 100 l.
- Baumwollgewebe Artikel 11.1217 (Hecking Söhne/Wendler), L 1:1, 35,5/32,5 - 60/60 Nm, 220 cm breit, Schlichteaufgabe ca. 8 Gew.-%, Schlichterezeptur: 11,0 kg E 4, 3,0 kg E 11 K, 1,5 kg Horsil NV/U, 0,3 kg Wachs auf 100 l.

Schlichtemittel

- Emsize E 4: Kartoffelstärkederivat (Emsland-Stärke)
- Emsize E 11 K: verethertes Polysaccharid (Emsland-Stärke)
- Horsil NV/P: Natriumcarboxymethylcellulose (Henkel)

ungeschlichtete Schussfäden

- Baumwoll-Rotorgarn Nm 28,1 (Hecking Söhne/Wendler)
- Baumwoll-Ringgarn Nm 60,1 (Hecking Söhne/Wendler)

Die ungeschlichteten Schussfäden wurden vor der enzymatischen Behandlung zu einem Endlosstrumpf gestrickt.

3.3.4 Hilfschemikalien

Es wurden folgende textile Hilfsmittel verwendet:

- Felosan Jet (CHT), nichtionisches Tensid, Wirkstoffgehalt 90 %
- Beixon NE (CHT), Komplexbildner, biologisch abbaubar
- Lufibrol KB (BASF), dispergierendes und komplexbildendes Extraktionsmittel
- Leophen U (BASF), Kombination aus nichtionischen und anionischen Tensiden

Zur Einstellung der pH-Werte der Behandlungsflotten wurden folgende Lösungen verwendet:

- sauer: Neutracid NVM (CHT), Puffer, nichtflüchtige organische Säuren
- alkalisch: $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Lösung (0,1 M/0,2 M)

3.3.5 Enzymatische Baumwollbehandlung im Labomat oder Linitester

Geschlichtete Rohbaumwolle oder gestrickte ungeschlichtete Schussgarne wurden im Labomat oder im Linitester bei einem Flottenverhältnis von 1 : 7,5 bis 1 : 10 mit verschiedenen Enzymen umgesetzt. Für die Flotte wurde weiches Wasser (3 °dH) verwendet, sie beinhaltete jeweils 1 g/l der textilen Hilfsmittel Felosan Jet und Beixon NE. Der pH-Wert wurde mit Neutracid NVM auf einen Wert von 5,5 oder mit einer Soda/ NaHCO_3 -Lösung (0,1 M/0,2 M) auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Die so hergestellte Flotte ohne Enzyme wird als *Grundflotte* (GF) definiert. Die Enzyme wurden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, die Behandlungszeiten und -temperaturen variierten ebenfalls (**s. Ergebnisteil**).

Nach der Behandlung wurden die Baumwollproben je 5 min heiß (mit der maximalen, vorherigen Behandlungstemperatur), dann 5 min bei 40 °C und anschließend noch zweimal 5 min kalt gewaschen. Die Proben wurden geschleudert, an der Luft bei Raumtemperatur über Nacht oder im Spannrahmen bei 120 °C über 30 s getrocknet und dann klimatisiert.

3.3.6 Enzymatische Baumwollbehandlung im Jigger

Die Baumwolle wurde in 20 cm Breite bei einem Flottenvolumen von 1,5 l eingesetzt. Das Flottenverhältnis war 1 : 10. Die Enzyme wurden in verschiedenen Mischungen eingesetzt, wobei deren Einzelkonzentration jeweils 4,0 ml/l betrug. Die Reaktionsbedingungen (Hilfsmittel, pH-Werte, Temperatur, Behandlungszeit, Flottenverhältnis etc.), die Spülung und die Trocknung entsprechen denen der Behandlung im Labomat bzw. Linitester (s. 3.3.5).

3.3.7 Alkalisches Abkochen mit NaOH im Jigger

Die alkalischen Abkochversuche wurden bei 95 °C, einem Flottenverhältnis von 1 : 30, einer NaOH-Konzentration von 5 g/l unter Zugabe von 3 g/l Lufibrol KB[®] und 1 g/l Leophen U[®] unter Flottenbewegung über 45 Minuten durchgeführt. Die Baumwollware wurde anschließend 10 min mit Wasser gewaschen und 2 h mit verdünnter wässriger Essigsäure (2 ml/l) gerührt. Danach wurde die Baumwolle noch zweimal je 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.3.8 Bestimmung des Pektingehaltes der Baumwolle

16 g Baumwolle wurden mit 192 ml 0,05 M Ammoniumoxalatlösung (FV 1 : 12) 1 h bei 90 °C gerührt. Anschließend ließ man den Ansatz bei Raumtemperatur abkühlen. Unter Eiswasserkühlung wurden 0,5 ml konz. Schwefelsäure hinzugefügt. Der Ansatz wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde der Überstand von ausgefallenem Pektin mit einer Pipette aufgenommen. Der Rückstand wurde 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde mit der Pipette entfernt und durch 4 - 5 ml Ethanol/Wasser (70:30) ersetzt. Es wurde erneut zentrifugiert, die Spüllösung wieder ersetzt und der Vorgang nochmals wiederholt. Das gereinigte Pektin wurde gesammelt. Dieselbe Baumwolle wurde mit frischer Ammoniumoxalatlösung (192 ml) versetzt und die gesamte Prozedur so oft wiederholt, bis kein Feststoff mehr aus der Extraktionslösung mehr ausfällt (nach Schwefelsäurezugabe und Kühlung über Nacht). Die Pektinrückstände wurden vereinigt, ca. 7 h im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und nach dem Auskühlen im Exsikkator gewogen.

3.3.9 Bestimmung des Wachsgehaltes der Baumwolle

16 g klimatisierte Baumwolle wurden mit 400 ml Chloroform im Soxhlet über 5 h (ca. 16 Umläufe) extrahiert. Das Extrakt wurde eingeeengt und der Rückstand ca. 7 h im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und nach dem Auskühlen im Exsikkator gewogen.

3.3.10 Bestimmung des Calcium- und Magnesiumgehaltes der Baumwolle

Material: mit Chloroform extrahierte Baumwolle

Ca. 8 g ungeschlichtete, extrahierte Baumwolle werden mit 160 ml 0,1 N Salzsäure 60 min bei 40 °C geschüttelt. Die Baumwolle wird abgequetscht und noch zweimal mit je 70 ml 0,1 N HCl für 1 min gespült. Die Extrakte werden vereinigt.

Extraktionslösung: 300 ml = 160 ml + 2 x 70 ml

Titration der Extraktionslösung:

50 ml der Extraktionslösung werden als Titrationsvorlage genommen. Die Lösung wird mit 3 ml 15 %-iger Natronlauge und 0,3 ml einer 0,4 %-igen methanolischen Calconcarbonsäurelösung versetzt. Es wird mit 0,01 M Titriplex® III-Lösung unter Rühren von violettrosa nach reinblau titriert.

1 ml 0,01M Titriplex® III-Lösung = 0,4008 mg Ca

Nach Zugabe von 1,5 ml 30 %-iger Wasserstoffperoxidlösung wird die Lösung bis zur Farblosigkeit erhitzt und in Eiswasser wieder abgekühlt. Der Magnesiumhydroxidniederschlag wird mit 20 %-iger Salzsäure gelöst (pH ca. 7) und nach Zugabe einer Indikator-Puffertablette und einiger Tropfen 16 %-iger Ammoniaklösung mit 0,01 M Titriplex® III-Lösung von rot nach grün unter Rühren titriert.

1 ml 0,01M Titriplex® III-Lösung = 0,2431 mg Mg

3.3.11 Analysegeräte und -methoden

TEGEWA-Tropftest

Die Saugfähigkeit der textilen Proben wurde durch Messung der Einsinkzeit einer wässrigen Farbstofflösung nach TEGEWA-Vorschrift bestimmt [15]. Bei diesem Test wird ein Tropfen definierten Volumens (0,05 ml einer 2 %-igen Lösung des Farbstoffs Amidoblau V-PW) aus einer Fallhöhe von 40 mm auf die Probe aufgetropft und die Zeit bis zum vollständigen Einsinken als „Einsinkzeit“ festgestellt.

TEGEWA-Jodtest

Der Entschlichtungsgrad eines mit einer Jodlösung angefärbten, stärkegeschlichteten Baumwollgewebes wird durch Vergleich mit einer Normfarbskala nach TEGEWA-Vorschrift bestimmt [16]. Demnach erhalten die Baumwollgewebe in Abhängigkeit von ihrer Blaufärbung eine Note von 1 bis 9. Die Note 1 bezeichnet dabei ein Gewebe mit hoher Stärkeauflage, mit steigender Note wächst die Güte der Entschlichtung. Bei einer Note von 6 oder mehr gilt die Ware als genügend entschlichtet.

Standardisierte Aktivitätsbestimmung der verwendeten technischen Enzyme

Die Aktivitäten der verwendeten technischen Enzyme wurden nach üblichen Methoden der Laborpraxis bestimmt. Dabei wurden die vom Hersteller angegebenen Aktivitäten bestätigt. Nach gewissen Lagerungszeiträumen wurden die Aktivitäten überprüft. Innerhalb der Anwendungszeiträume der Präparate war der Aktivitätsverlust dabei kleiner als 5 % und wurde vernachlässigt.

HPAEC-PAD zur Bestimmung der Reaktionsprodukte aus den enzymatischen Umsetzungen

Alle Analysen wurden mit einem HPLC-System der Fa. Dionex (Idstein) erstellt. Die Elution erfolgte in einer temperierten ($T = 35\text{ °C}$) Anionentauschersäule (Carbo Pac PA 1[®]) mit einer 0,15 M Natronlauge und einer Flussrate von 1 ml/min. Nach 5 min wird dem Eluenten über eine Mischvorrichtung eine kontinuierlich wachsende Natriumacetatmenge zugeführt, bis der Eluent nach 60 min eine Acetatkonzentration von 0,5 mol/l besitzt. Die quantitative Beurteilung des Glucose-, Gluconsäure- bzw. Wasserstoffperoxidgehalts der Proben erfolgte über Kalibrierung der amperome-

trischen Detektoranzeige mit Lösungen der drei Substanzen bekannter Konzentration und anschließender linearer Regression.

3.3.12 Praxisversuche im Industriemaßstab

Die industriellen Versuche wurden bei der Textilveredlung an der Wiese in Lörrach durchgeführt. Alle Verfahren entsprechen der üblichen betrieblichen Praxis. Im Einzelnen wurden Baumwollvorbehandlungen nach dem Kalt-Klotz-Verweilverfahren und im Jigger durchgeführt. Die behandelte Ware wurde einer Padroll-Heißbleiche unterzogen und anschließend gefärbt.

Kalt-Klotz-Verweil-Verfahren (KKV)

Im KKV-Verfahren wurden drei unterschiedliche Versuche durchgeführt, wobei nur bei der klassischen Vorbehandlung das alkalische Abkochen vollzogen wurde. Die Arbeitsschritte werden in **Tabelle 6** beschrieben.

Tabelle 6: Zeitliche Abfolge der Arbeitsschritte bei der Baumwollbehandlung im KKV-Verfahren (je 400 m Ware mit einem Gewicht von 120 kg).

1 klassisch	2 AP pH 5	3 ACP pH 5
Startflotte: 5 ml/l Felosan Jet 5 ml/l Beixon NE 7 ml/ Beisol T 2090	Startflotte: 5 ml/l Felosan Jet 5 ml/l Beixon NE 7 ml/ Beisol T 2090 4 ml/l Beisol DHP	Startflotte: 5 ml/l Felosan Jet 5 ml/l Beixon NE 7 ml/ Beisol T 2090 4 ml/l Beisol DHP 4 ml/l Beizym UL
Ware klotzen, Klotztemperatur 30 °C, Flottenaufnahme nahezu 100 %		
16 h Verweilen bei Raumtemperatur		
Auswaschen der Ware (rückwärts) mit 8 l/kg Baumwolle		
Badvorschärfen mit 15 l NaOH (50 %)	-	-
3 l Wasser/kg Ware, Dosierung von 100 ml NaOH (50 %) und 5 ml Hilfsmitteln pro kg Baumwolle	-	-
30 min Verweilen in der Dampfbox bei 99 °C	-	-
Auswaschen der Ware (rückwärts) mit 3 l/kg Baumwolle	-	-
Absäuern mit 5 ml/l Ameisensäure	-	-

Jigger

Im industriellen Jigger wurden fünf unterschiedliche Versuche durchgeführt. Die konstanten Parameter bzw. Bedingungen werden in der **Tabelle 7** aufgeführt:

Tabelle 7: Konstante Parameter bei allen Versuchen im Industriegigger.

Warengewicht	187 g/m ²
Warenlänge	200 m
Gesamtgewicht	60 kg
Flottenvolumen	300 l
Flottenverhältnis	1 : 5
Passagenzeit	~ 30 min
Hilfsmittel	1 ml/l Felosan Jet und 1 ml/l Beixon NE

Die Durchführung der industriellen Versuche im Jigger wird in **Tabelle 8** dargestellt.

Tabelle 8: Zeitliche Abfolge der Arbeitsschritte bei der Baumwollbehandlung im Industriegigger.

1 klassisch	2 a AP pH 5	2 b ACP pH 5	3 a AP pH 5 → pH 8	3 b ACP pH 5 → pH 8
Vorlage der Flotte				
Ware durch die Flotte fahren				
Einstellung des pH-Wertes auf 5 - 6 mit Neutracid NVM 200				
Zugabe von 4 ml/l Beisol T 2090				
-	Zugabe von 4 ml/l Beisol DHP		-	-
Jiggerstart und Aufheizen auf 70 °C (15 min)				
Behandlung bei 70 °C (30 min)		Behandlung ohne Heizung (30 min)	Behandlung bei 70 °C (30 min)	Behandlung ohne Heizung (30 min)
Flotte ablassen, Ware pendelt	-	Zugabe von 4 ml/l Beizym UL	-	Zugabe von 4 ml/l Beizym UL
Frisches Bad	-	Behandlung bei 50 °C (30 min)	-	Behandlung bei 50 °C (30 min)
Zugabe von 100 l NaOH (15 °BE)	-	-	Zugabe von 0,3 g/l Soda → pH-Wert 8	
Zugabe von 0,5 ml/l Cotoblanc	-	-	Zugabe von 4 ml/l Beisol DAP	
-	-	-	Behandlung bei 70 °C (30 min)	
Aufheizen auf 95 °C				
Behandlung bei 95 °C (30 min)				
Flotte ablassen, Ware pendelt				
Frisches Bad, Aufheizen auf 95 °C, 3 Passagen Waschen				
3 Passagen kalt in das Bad gespült				
Frisches Bad	Ware ausfahren			
Zugabe 0,67 ml/l CH ₃ COOH (60%)	-			
2 Passagen neutralisieren	-			
1 Passage spülen	-			
Ware ausfahren	-			

Heißbleiche

Teile der klassisch oder enzymatisch vorbehandelten Baumwollgewebe wurden aneinander genäht und gebleicht.

Die Padroll-Heißbleiche wurde durchgeführt mit:

- NaOH (50 %-ig) 3,5 ml/kg Ware
- Wasserglas 12,0 ml/l Flotte
- Wasserstoffperoxid 35,0 ml/kg Ware
- Felosan Jet 2,0 ml/kg Ware
- Bittersalz 0,8 ml/kg Ware
- Contavan TX 5 5,8 ml/kg Ware

Die Ware wurde imprägniert, definiert abgequetscht und in einer Dampfkammer bei 90 °C für 60 min verweilt und anschließend auf einer Breitwaschmaschine ausgewaschen.

Färberei

Die zuvor gebleichte Baumwolle wurde nach dem KKV-Verfahren in einem Grauton gefärbt. Die Farbstoffzusammensetzung war:

- Levafix blau CA 6,0 g/l
- Levafix gelb CA 3,4 g/l
- Levafix rot CA 1,8 g/l

Zusätzlich wurden verwendet:

- Rucowet RDA 2,5 g/l
- Sarabid LDR 4,0 g/l
- Natronwasserglas 50 g/l
- NaOH (50 %-ig) 11 g/l

Die Verweilzeit betrug 12 h. Anschließend wurde die Ware kochend auf einer Breitwaschmaschine geseift und auf dem Spannrahmen getrocknet.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung thermophiler Lipasen

An der TUHH wurden zahlreiche anaerobe, thermophile Bakterienstämme auf die Produktion von Lipase untersucht. In **Tabelle 9** sind die Lipaseaktivitäten der einzelnen Spezies aufgeführt. Die beiden Vertreter mit den höchsten Aktivitäten ihres Stammes *Thermoanaerobacter brockii subs brocki* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* SOL 1 wurden im weiteren genauer untersucht. Die Stämme *Fervidobacterium* und *Thermotoga* wiesen keine Lipaseaktivitäten auf.

	Stamm	Aktivität [U/ml x 10 ³]
<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>sp. B 11</i>	3,6
	<i>sp. B 12</i>	2,6
	<i>sp. 2KX1</i>	3,6
	<i>brockii subs brocki</i>	3,8
	<i>brockii subsp. Finii</i>	3,8
	<i>ethanolicus</i>	1,4
	<i>yonseii</i>	3,1
<i>Clostridium</i>	<i>fervidus</i>	1,2
	<i>thermocellum</i>	1,7
	<i>thermohydrosulfuricum SOL 1</i>	2,5
	<i>thermohydrosulfuricum VEL 1</i>	2,3
<i>Fervidobacterium</i>	<i>gondwanense</i>	0
	<i>islandicum</i>	0
	<i>pennivorans</i>	0
<i>Thermotoga</i>	<i>maritima</i>	0
	<i>neapolitana</i>	0
	<i>thermarum</i>	0

Tabelle 9: Lipaseaktivität anaerober, thermophiler Bakterienstämme.

4.1.1 Lipase aus *Thermoanaerobacter Brockii*

Thermoanaerobacter Brockii ist ein chemoorganotrophes, thermophiles Bakterium, welches in **Abbildung 1** lichtmikroskopisch dargestellt wird.

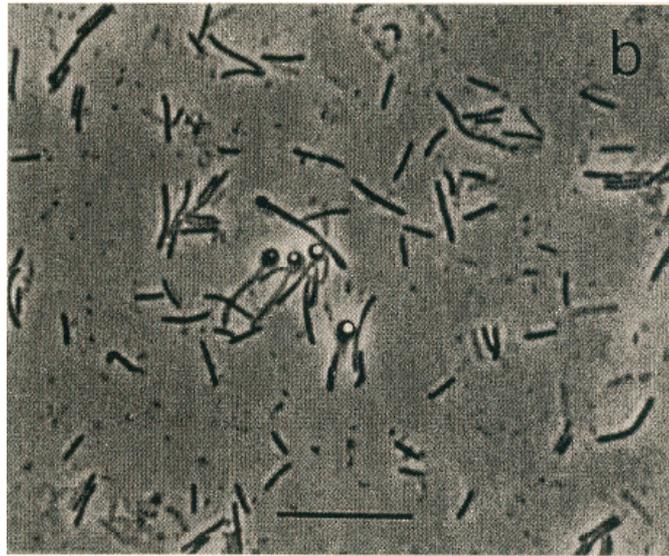


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Darstellung von *Thermoanaerobacter Brockii*.

Um zunächst die optimalen Wachstumsbedingungen des Bakteriums zu bestimmen, wurde das Wachstumsmedium unter unterschiedlichen Bedingungen beimpft. Die **Abbildung 2** veranschaulicht den Einfluss der Mediumtemperatur und des -pH-Wertes auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter Brockii*.

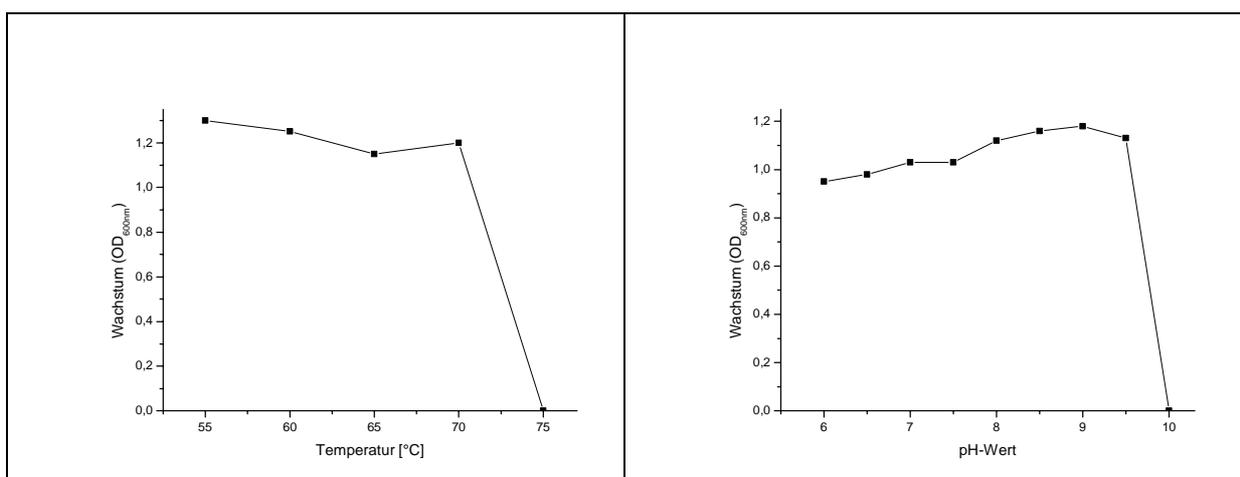


Abbildung 2: Einfluss von Temperatur (links) und pH-Wert (rechts) auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter Brockii*.

Daraus ergibt sich ein optimales Wachstum bei einer Temperatur von 55 - 60 °C und einem pH-Wert von 8,0 - 9,0. Für die Lipaseproduktion erwies sich Glucose als die beste Kohlenstoffquelle, wie **Tabelle 10** verdeutlicht.

Kohlenstoffquelle	Wachstum (OD _{600nm})	Aktivität [U/ml x 10 ³]
Ohne	0,22	0,6
Glucose	0,48	6,3
Triton-X-100	0,15	0
Tween 80	0,17	2,1
Soja-Pepton	0,28	1,1
Olivenöl	0,32	3,8

Tabelle 10: Einfluss unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (0,1 %) auf die Lipaseproduktion von *Thermoanaerobacter Brockii*.

Im Folgenden wurde das Bakterium über einen Zeitraum von 36 h unter den optimalen Bedingungen (T = 60 °C und pH = 8,0) mit einer Glucosestartkonzentration von 5,0 g/l kultiviert. Der Verlauf des Glucoseverbrauchs, des Wachstums und der Lipaseaktivität wurde über den Kultivierungszeitraum beobachtet (**Abbildung 3**).

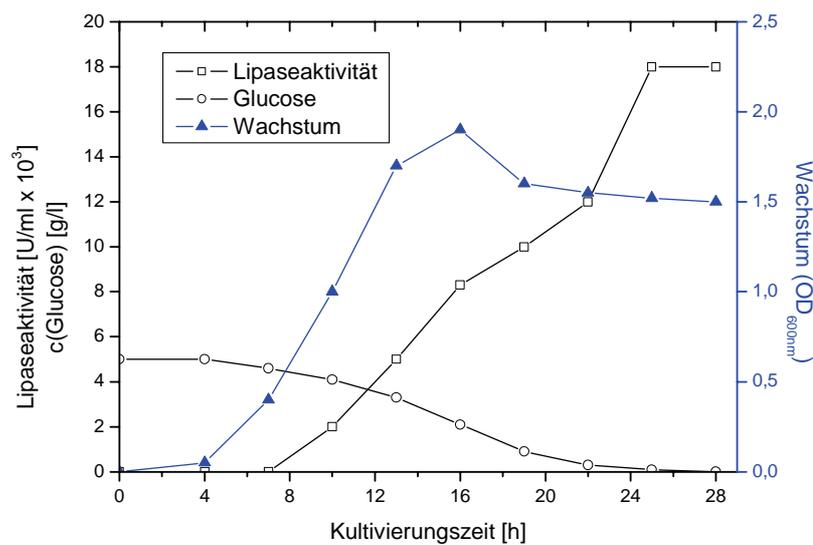


Abbildung 3: Kultivierung von *Thermoanaerobacter Brockii* bei 60 °C und einem pH-Wert von 8,0.

Während der ersten vier Stunden der Kultivierung wächst das Bakterium nahezu nicht. Gleichzeitig bleibt die Glucosekonzentration unverändert bei 5,0 g/l. Mit dem Einsetzen des Wachstums wird dann zunehmend Glucose als Kohlenstoffquelle verbraucht. Zeitversetzt produziert *Thermoanaerobacter brockii* nun Lipase, die sie an das Medium abgibt. Nach 16 Stunden erreicht das Wachstum sein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt wurde etwa die Hälfte des Glucoseangebots verbraucht. Nach 25 Stunden war die Glucose vollständig umgesetzt. Von nun an änderte sich auch die absolute Lipaseaktivität nicht mehr.

Lokalisierung der Lipase	12-stündige Kultivierung	24-stündige Kultivierung
intrazellulär	35,4 %	5,2 %
zellwandgebunden	19,1 %	11,9 %
extrazellulär	45,5 %	82,9 %

Tabelle 11: Prozentualer Anteil intrazellulärer, zellwandgebundener und extrazellulärer Aktivität der Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii*.

Wichtig für die Isolierung der Lipase ist die Ausscheidung des Proteins aus dem Bakterium. Die folgende **Tabelle 11** zeigt, dass das innerhalb der Zellen gebildete Enzym erst nach und nach aus der Zelle diffundiert und dann im Medium lokalisiert werden kann. Nach einer 24-stündigen Kultivierung wurden über 80 % der produzierten Lipase von der Zelle ausgeschieden.

Nach der Kultivierung wurde die proteinhaltige Lösung zunächst über Zentrifugation von der Bakterienkultur getrennt. Anschließend wurde der Überstand in mehreren Schritten gereinigt. Der hydrophobe Charakter der Enzymoberfläche macht bei der Reinigung über Phenylsepharose eine Desorption mit einem linearen DMSO-Gradienten nötig. Die Lipase eluiert bei einem DMSO-Anteil von 10 %. Auch die späteren Reinigungsstufen wurden in Gegenwart von 10 % DMSO durchgeführt. Ionentauscher konnten nicht zur Reinigung benutzt werden, da das Enzym irreversibel an kationische als auch anionische Tauscher gebunden wird. **Tabelle 12** und **Tabelle 13** beschreiben die unterschiedlichen Stadien der Reinigungsprozedur. Die gesamte Proteinmenge ergibt sich aus **Gleichung 1**. Die Gesamtaktivität lässt sich über **Gleichung 2** berechnen.

Gleichung 1: Gesamtprotein = Proteinmenge x Volumen

Gleichung 2: Gesamtaktivität = Aktivität x Volumen

Schritt	V [ml]	Protein [mg/ml x 10 ⁻³]	Gesamtprotein [mg x 10 ⁻³]	Aktivität [U/ml x 10 ³]	Gesamtaktivität [U x 10 ⁻³]	Ausbeute [%]
Überstand	390	394,74	153948,6	17,7	6903	100
Phenylsepharose	25	136,84	3421,0	204,0	5100	73,9
Hydroxylapatit	6	242,10	1452,6	673,0	4038,0	58,5
Gelfiltration	7	54,50	381,5	473,8	3316,6	48,0

Tabelle 12: Reinigung der Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii*.

Mit **Gleichung 1 und 2** gilt für die spezifische Aktivität **Gleichung 3**. Den Reinigungsfaktor der Lipase berechnet man mit **Gleichung 4**.

Gleichung 3: spezifische Aktivität = Gesamtaktivität : Gesamtprotein

Gleichung 4: Reinigungsfaktor = spez. Aktivität gereinigt : spez. Aktivität Überstand

Schritt	Spezifische Aktivität [U/mg x 10 ⁻³]	Reinigungsfaktor
Überstand	0,0448	1
Phenylsepharose	1,49	33,25
Hydroxylapatit	2,78	62,05
Gelfiltration	9,43	210,50

Tabelle 13: Reinigung der Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii*.

Durch die mehrstufige Reinigung des enzymhaltigen Überstandes des Kultivierungsansatzes lässt sich also bei einer vergleichsweise hohen Ausbeute von nahezu 50 % ein hochreines Lipaseprodukt mit einer mehr als 200-fach gesteigerten Aktivität gegenüber dem Überstand herstellen.

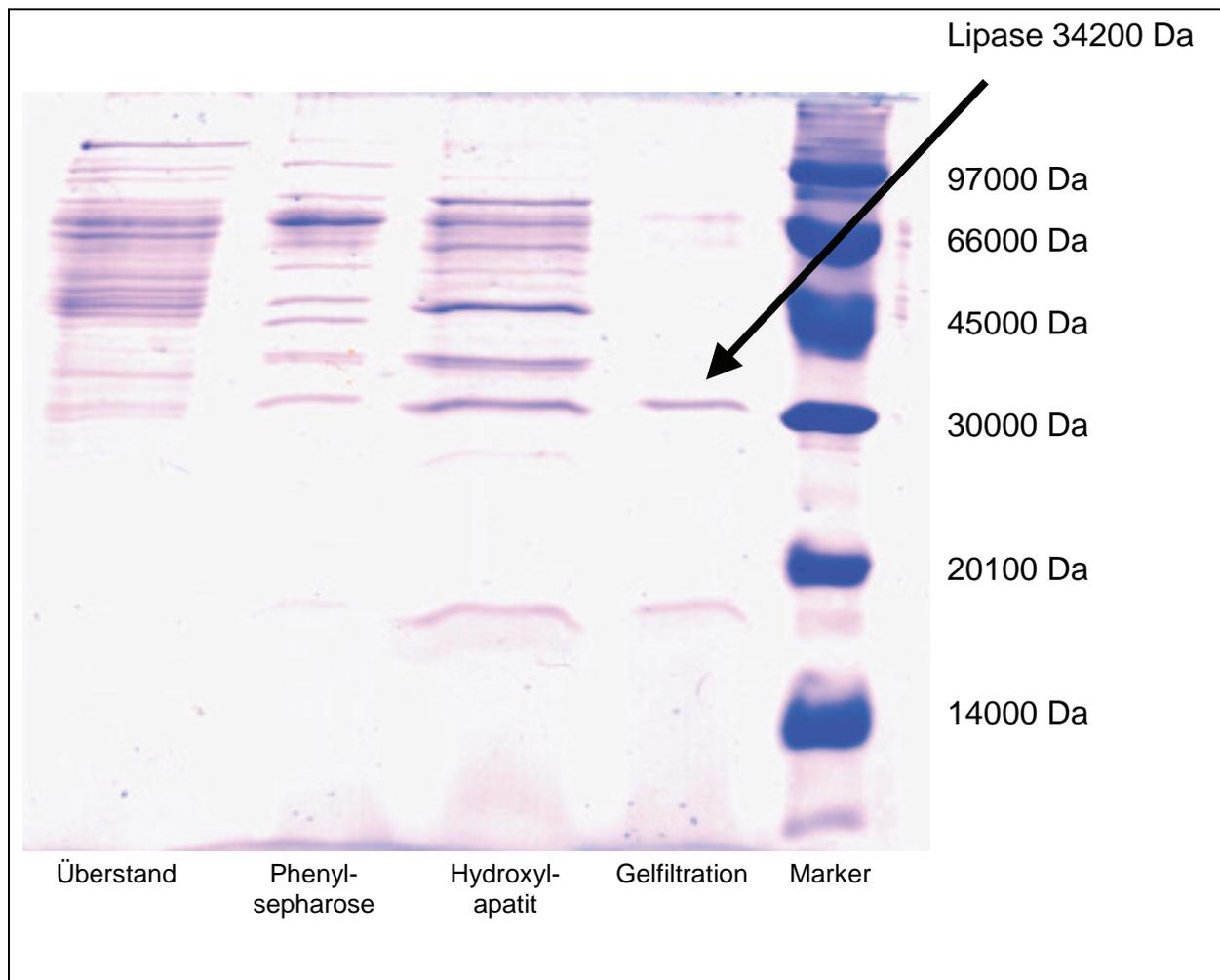


Abbildung 4: SDS-Page der Reinigungsschritte der Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii*.

Die **Abbildung 4** zeigt die SDS-Page der denaturierten Lipase nach unterschiedlichen Stufen der Reinigungsprozedur. In **Abbildung 5** sieht man die native Page nach der letzten Reinigungsstufe. Durch einen Vergleich mit einem Marker bekannter Molekulargewichte ergibt sich ein Molekulargewicht der denaturierten Lipase von 34,2 kDa und von 67 kDa der nativen Lipase.

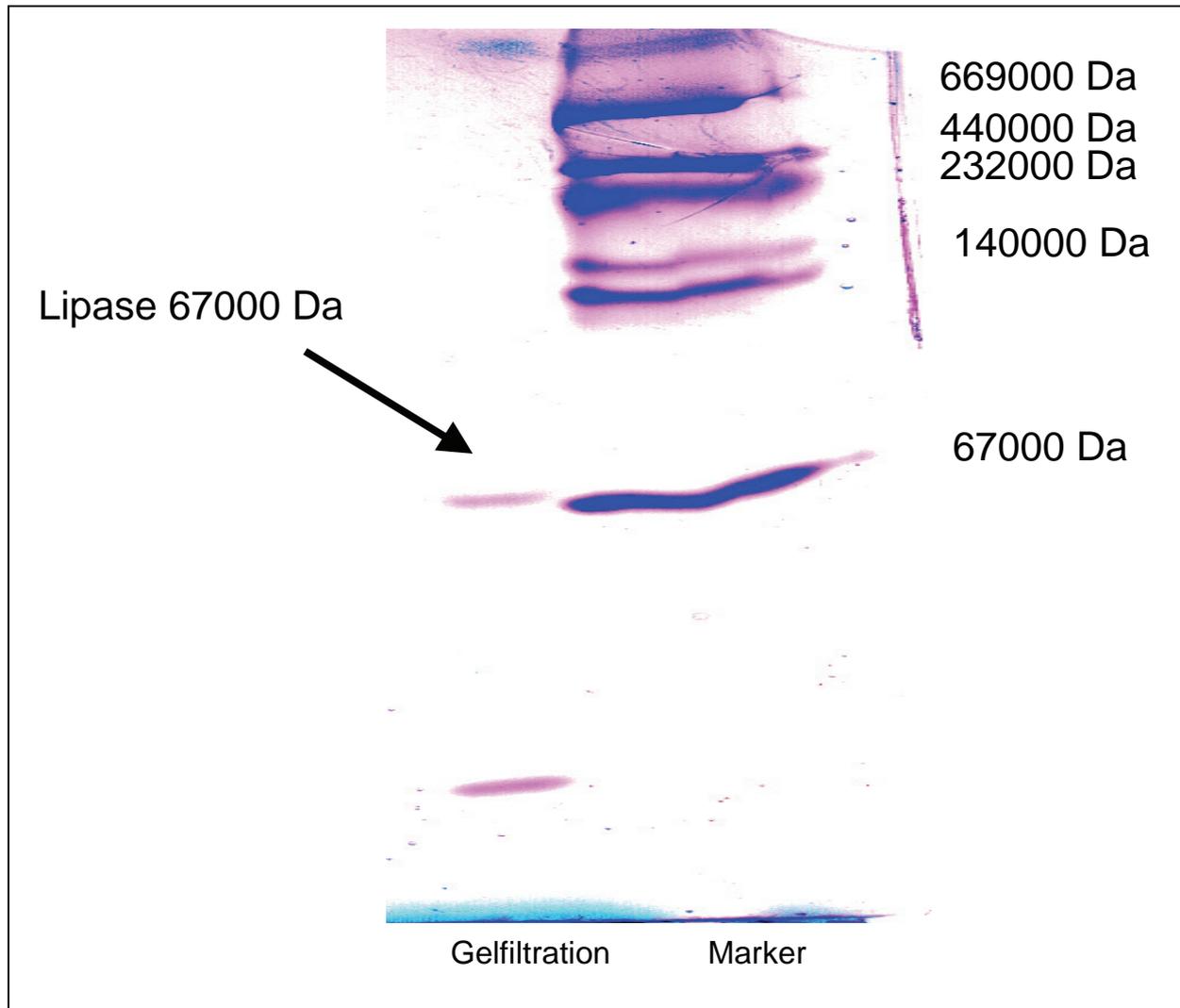


Abbildung 5: Native Page der Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii* nach der dreistufigen Reinigung.

Die derartig gereinigte Lipase wurde im Folgenden bzgl. ihrer Aktivität untersucht. In den **Abbildung 6** und **Abbildung 7** erkennt man den Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Enzymaktivität. Daraus ergibt sich eine maximale Lipaseaktivität bei 70 °C bis 80 °C. Das pH-Wert-Optimum erstreckt sich über einen breiten Bereich von 6 bis 9,5.

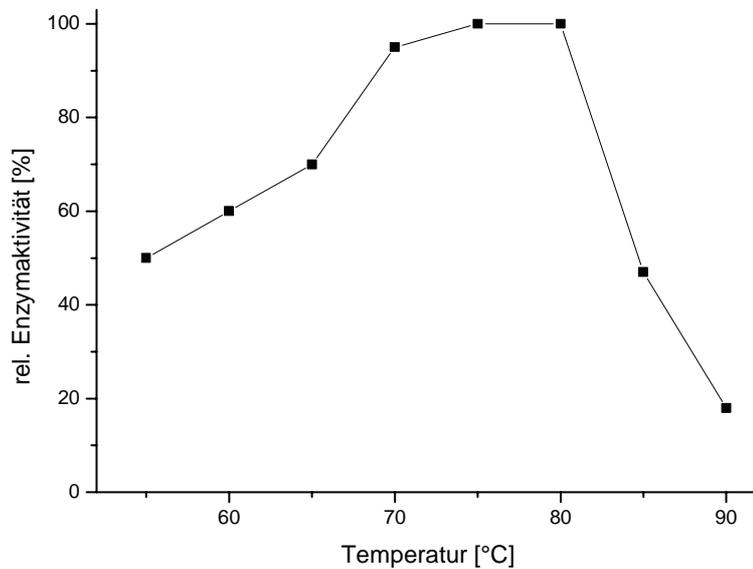


Abbildung 6: Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Temperatur (photometrische Bestimmung mit p-NPP als Substrat).

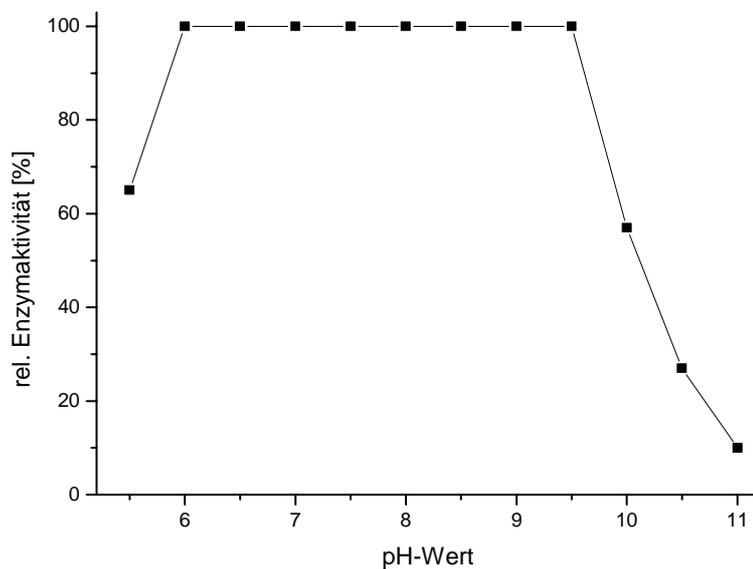


Abbildung 7: Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH-Wert (photometrische Bestimmung mit p-NPP als Substrat).

Die Stabilität der Lipase über einen längeren Zeitraum in Abhängigkeit von der Prozesstemperatur wird in **Abbildung 8** dargestellt. Während die Aktivität der Lipase bei Temperaturen von 85 °C oder darüber rasch abnimmt, wurde in ihrem Temperaturoptimum von 70 °C auch noch nach fünf Tagen kein Aktivitätsverlust

beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lipase aus *Thermoanaerobacter Brockii* in dem angestrebten Prozess zur enzymatischen Vorbehandlung von Baumwolle ohne weiteres integriert werden kann, da sowohl die beabsichtigte Temperatur- als auch die pH-Wert-Führung den Optima der thermophilen Lipase entsprechen.

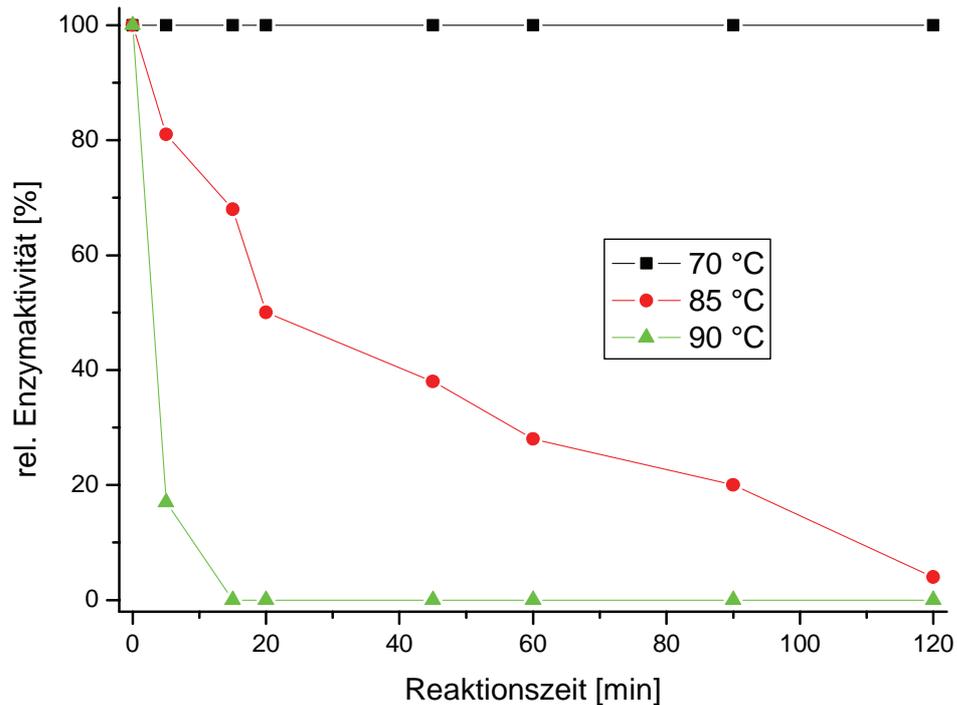


Abbildung 8: Thermostabilität der Lipase.

Die bisherigen Untersuchungen zur Lipaseaktivität wurden mit p-NPP als Substrat durchgeführt. Die Lipase aus *Thermoanaerobacter Brockii* besitzt darüber hinaus auch eine hohe Aktivität gegenüber Nitrophenylestern anderer Kettenlänge sowie gegenüber Mono- und Triglyzeriden. Bezogen auf p-Nitrophenylpalmitat und Olivenöl zeigt **Tabelle 14** die relativen Aktivitäten des Enzyms gegenüber den jeweiligen Substraten.

Bei den p-Nitrophenylestern erkennt man grundsätzlich die Tendenz, dass die relative Lipaseaktivität mit steigender Kettenlänge abnimmt. Bei den Mono- und Triglyzeriden sieht man bei Substraten mit gleicher Kettenlänge deutliche Unterschiede bzgl. der Aktivität. Für die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist hier also nicht nur die Kettenlänge der Glycerinsubstituenten, sondern auch deren Position bzw. die Gegenwart von Doppelbindungen maßgebend.

Substrat	Kettenlänge	rel. Aktivität [%]
p-Nitrophenylester	C4	223,4
	C6	228,9
	C8	286,8
	C 10	226,3
	C12	189,5
	C14	152,6
	C16	100
	C 18	57,9
Triglyceride	C 10	21,4
	C 12	52,8
	C 14	33,0
	C 16	35,8
	C 18 (Tristearin)	210,6
	C 18 (Triolein)	23,1
	Olivenöl	100
Monoglyzeride	C 16 (Glyzerin-1-palmitat)	16,4
	C 16 (Glyzerin-2-palmitat)	204,0

Tabelle 14: Substratspezifische Aktivität der Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii*.

Für einen Einsatz der Lipase in einem großtechnischen Prozess ist u.a. das Verhalten des Enzyms gegenüber anorganischen Metallkationen, organischen Tensiden oder Hemmstoffen relevant, da sie die Aktivität des Biokatalysators zum Teil empfindlich herabsetzen können. Daher wurde der Einfluss einer Vielzahl von Additiven auf die Aktivität untersucht. **Abbildung 9** zeigt, dass Alkalikationen keinen negativen Effekt zeigen, wohingegen die Erdalkalikationen Mg^{2+} und Ca^{2+} die Aktivität deutlich negativ beeinflussen. Eisenkationen senken die Aktivität noch deutlicher. Alle drei genannten Spezies liegen in praxisrelevanten Baumwollvorbehandlungsflotten in nicht unerheblichen Konzentrationen vor. Es ist davon auszugehen, dass diese Tatsache die Verwendung der thermophilen Lipase bzgl. des vorgesehenen Einsatzes in der Baumwollvorbehandlung stark einschränkt.

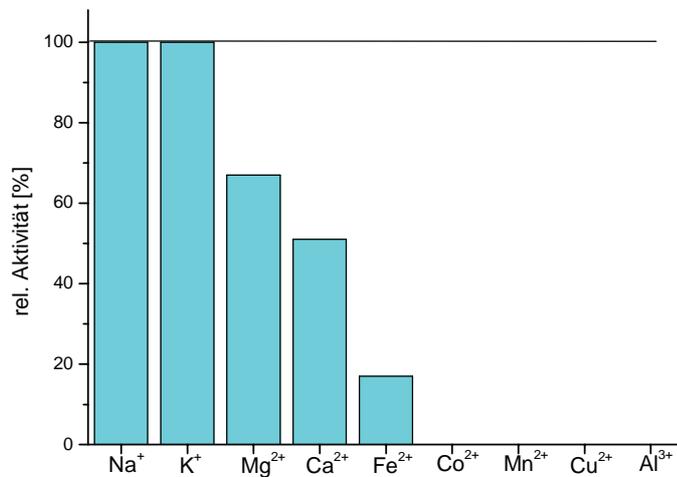


Abbildung 9: Einfluss verschiedener Metallkationen auf die Lipaseaktivität (Inkubation: 30 min bei 30 °C, $c = 10 \text{ mmol/l}$, Reaktion: 15 min bei 70 °C mit p-NPP als Substrat).

Die Baumwollvorbehandlung wird von zahlreichen Spül- und Waschprozessen begleitet, bei denen u.a. verschiedene ionische und nichtionische Tenside eingesetzt werden oder aber auch Detergenzien aus der Ware in die Flotte diffundieren können, die wiederum die Aktivität der Lipase beeinflussen können. **Abbildung 10** zeigt, dass vor allem anionische Tenside wie Natriumdodecylsulfat (SDS) die Aktivität der Lipase drastisch absenken. Da in enzymatischen Prozessen grundsätzlich wegen der bekannten Aktivitätsherabsetzung keine anionischen Tenside verwendet werden, stellt die Empfindlichkeit gegenüber SDS in der Praxis kein Problem dar. Die nichtionischen Tenside haben dagegen einen vergleichsweise geringen Effekt. Polyvinylalkohol (PVA), welches anteilig als Schlichtemittel neben der Stärkeschlichte vorliegen kann, hat keinen negativen Einfluss - im Gegenteil, es setzt die Aktivität des Enzyms sogar noch herauf.

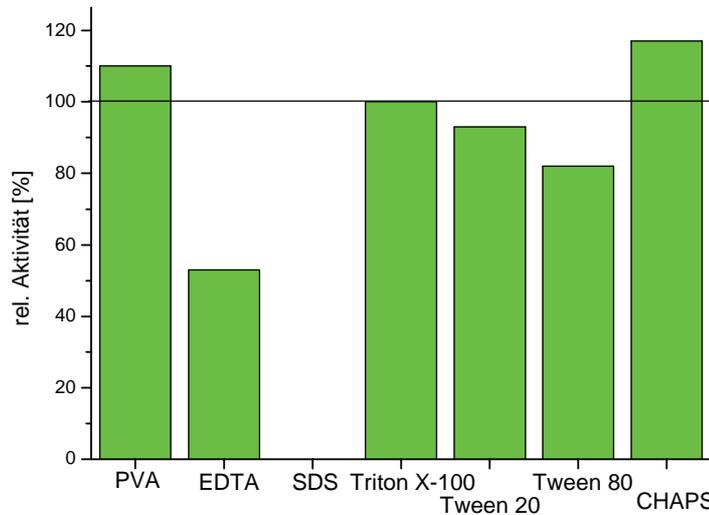


Abbildung 10: Einfluss verschiedener Detergenzien auf die Lipaseaktivität (Inkubation: 30 min bei 30 °C, c = 10 mmol/l, Reaktion: 15 min bei 70 °C mit p-NPP als Substrat).

Der Einfluss organischer Lösemittel auf die Lipaseaktivität hat für den Einsatz in der Baumwollvorbehandlung keine Relevanz, da sowohl die konventionellen als auch die enzymatischen Verfahren lösemittelfrei durchgeführt werden. Allerdings könnte ihr Einfluss dann von Interesse sein, wenn sie zur Aufbereitung oder Reinigung in der Herstellung eingesetzt werden sollen. Denkbar ist auch die Lagerung in lösemittelhaltigen Formulierungen. **Abbildung 11** zeigt, dass die Auswahl geeigneter Lösemittel durchaus entscheidend für die Aufrechterhaltung der Aktivität des Produktes sein kann. Senkt Ethanol die Aktivität unter den beschriebenen Bedingungen noch auf 0 %, so hat der kürzerkettige Alkohol Methanol sogar einen leicht aktivitätssteigernden Effekt.

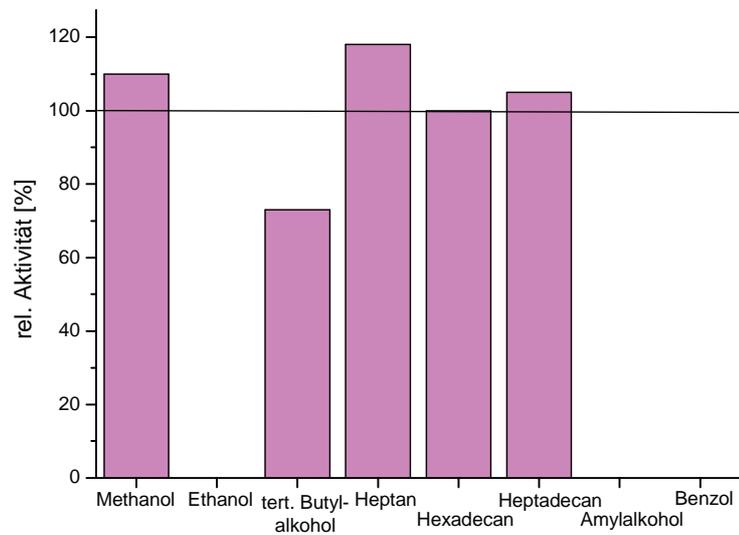


Abbildung 11: Einfluss verschiedener Lösemittel (25 Vol.-%) auf die Lipaseaktivität (Inkubation: 30 min bei 30 °C, Reaktion: 15 min bei 70 °C mit p-NPP als Substrat).

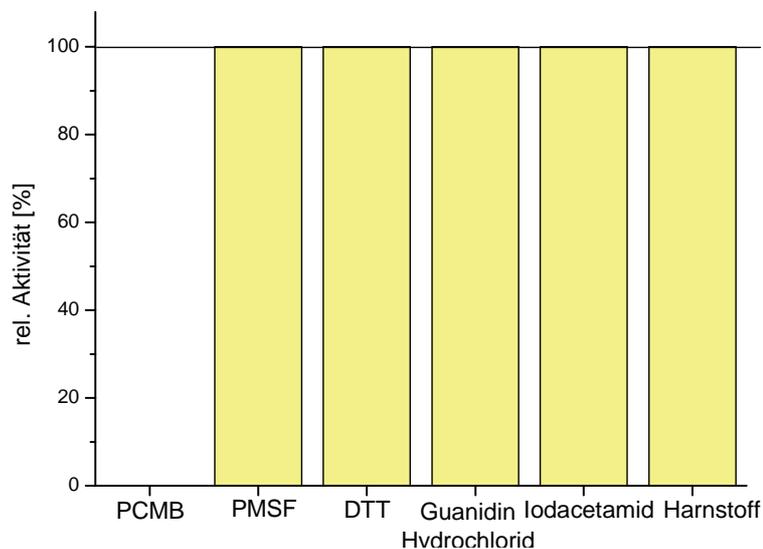


Abbildung 12: Einfluss verschiedener organischer Hemmstoffe auf die Lipaseaktivität (Inkubation: 30 min bei 30 °C, c = 10 mmol/l, Reaktion: 15 min bei 70 °C mit p-NPP als Substrat).

Des Weiteren wurde noch der Einfluss diverser organischer Hemmstoffe auf die Lipaseaktivität untersucht (**Abbildung 12**). Bis auf PCMB zeigt keine der untersuchten Chemikalien einen Effekt bzgl. der Aktivität des thermophilen Biokatalysators.

4.1.2 Lipase aus *Clostridium thermohydrosulfuricum*

Die Herstellung, Reinigung und Charakterisierung der zweiten thermophilen Lipase aus *Clostridium thermohydrosulfuricum* verlief im Wesentlichen wie unter 4.1.1. für die Lipase aus *Thermoanaerobacter brockii* beschrieben. Die optimalen Kultivierungsbedingungen für das zweite Enzym werden in der folgenden **Tabelle 15** zusammengefasst.

Parameter	Optimum
Temperatur	60 - 65 °C
pH-Wert	7,5 - 8,0
Zeit	32 h
Kohlenstoffquelle	Glucose

Tabelle 15: Optimale Kultivierungsbedingungen für das Wachstum von *Clostridium thermohydrosulfuricum* SOL 1.

Nach einer 32-stündigen Kultivierung wurden 89,5 % der Lipaseaktivität extrazellulär im Überstand lokalisiert. Die Reinigung erfolgte wieder dreistufig. Bei einem Reinigungsfaktor von 133,5 konnte nach der abschließenden Gelfiltration eine Ausbeute von lediglich 10,2 % erzielt werden. Das Molekulargewicht der denaturierten Lipase beträgt wieder 34,2 kDa, das der nativen 68,5 kDa. Die Lipase besitzt bei 70 °C - 75 °C und einem pH-Wert zwischen 7,5 und 9,0 ihr Aktivitätsmaximum, wobei sie bei einem pH-Wert von 11,0 immer noch nahezu 70 % ihrer maximalen Aktivität besitzt. Bis zu 70 °C ist das Enzym für mindestens drei Stunden thermostabil. Die rel. Restaktivität bei 75 °C beträgt nach drei Stunden noch ca. 80 %, bei 80 °C liegt sie dagegen bereits nach einer Stunde bei nur noch ca. 15 %.

Der Einfluss verschiedener chemischer Additive auf die Aktivität des Enzyms wird in **Abbildung 13** beschrieben. Diese Lipase erwies sich als besonders anfällig gegenüber Metallkationen, wobei vor allem der totale Aktivitätsverlust durch Magnesium- und die starke Aktivitätsbeeinträchtigung durch Calciumkationen hervorzuheben ist, da diese Spezies im verstärkten Maße in Baumwollbehandlungsflotten zugegen sind.

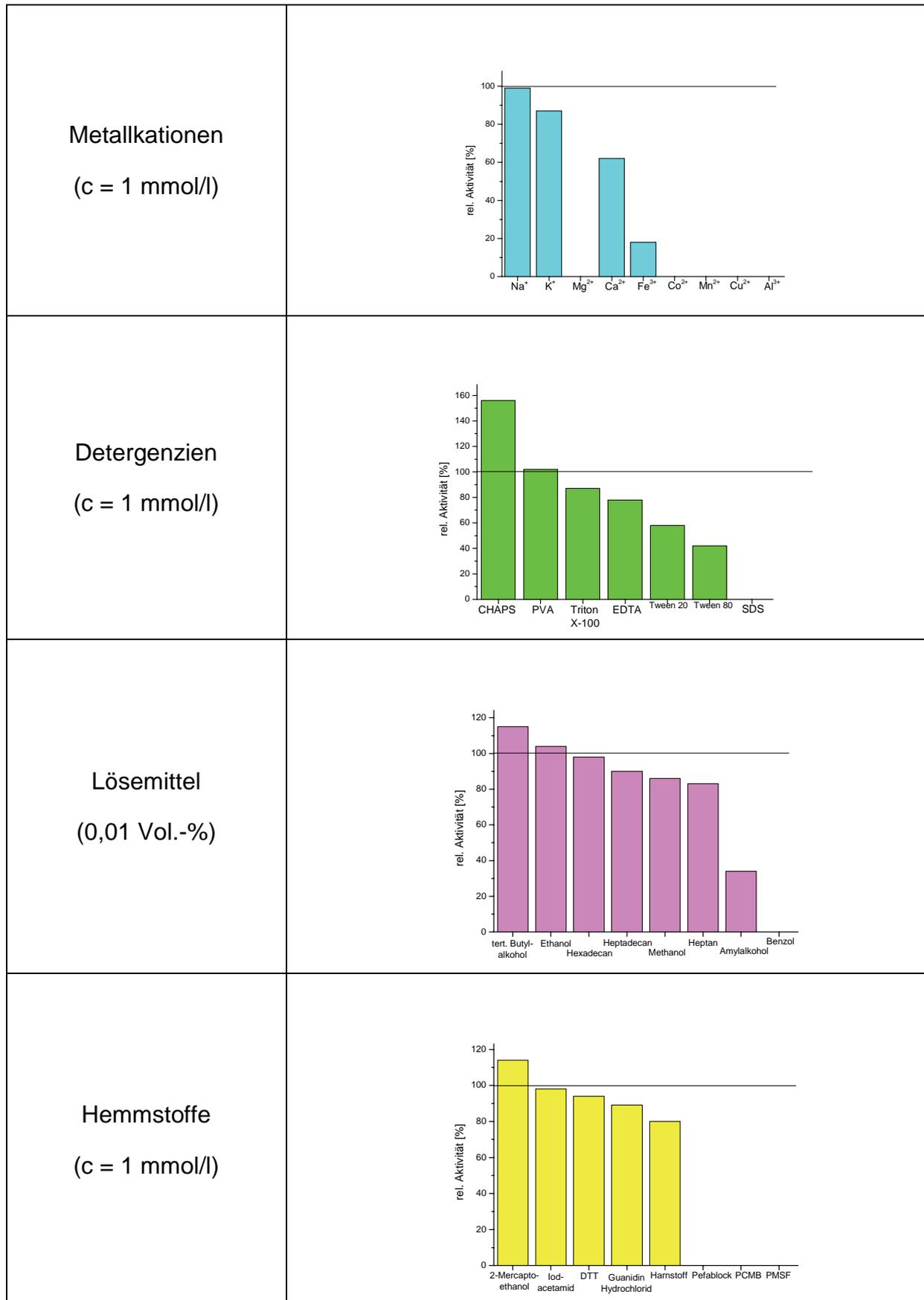


Abbildung 13: Einfluss verschiedener Chemikalien auf die Lipaseaktivität (Inkubation: 90 min bei 30 °C, Reaktion: 15 min bei 70 °C mit p-NPP).

4.1.3 Klonierung und Expression von thermostabilen Lipasen aus anaeroben Bakterien

Die Lipasegene aus *Clostridium thermohydrosulfuricum* (weitgehend identisch mit dem Lipasegen aus *Thermoanaerobacter brockii*) und *Thermoanaerobacter tengcongensis* wurden zur Expression in *E. coli* in den Vektor pETBlue-1 kloniert. Die thermostabilen Lipasen wurden unter der Kontrolle des T7/lac-Promotors intrazellulär exprimiert. Die rekombinanten Enzyme wurden durch eine hydrophobe Interaktions- und eine Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt und anschließend charakterisiert (**Abbildung 14**).

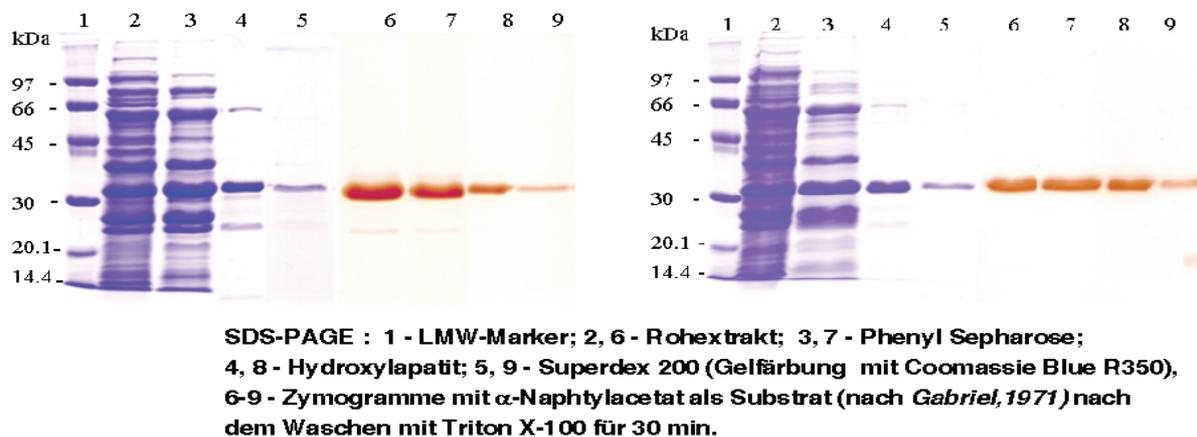


Abbildung 14: Reinigungsele der rekombinanten Lipasen *C. thermohydrosulfuricum* (links) und *T. tengcongensis* (rechts).

Die aufgereinigten rekombinanten Enzyme besaßen ein Temperaturoptimum von 75°C. Die Lipase aus *T. tengcongensis* war optimal aktiv bei einem pH-Wert von 7,0, die Lipase aus *C. thermohydrosulfuricum* war optimal aktiv bei einem pH-Wert von 8,0. Bis zu einer Temperatur von 75°C waren die Enzyme sehr stabil. Die Enzyme können als alkalische Lipasen bezeichnet werden, da sie bei der Inkubation in Lösungen mit hohen pH-Werten von 9,0 bis 11,0 stabil bleiben (**Abbildung 15**).

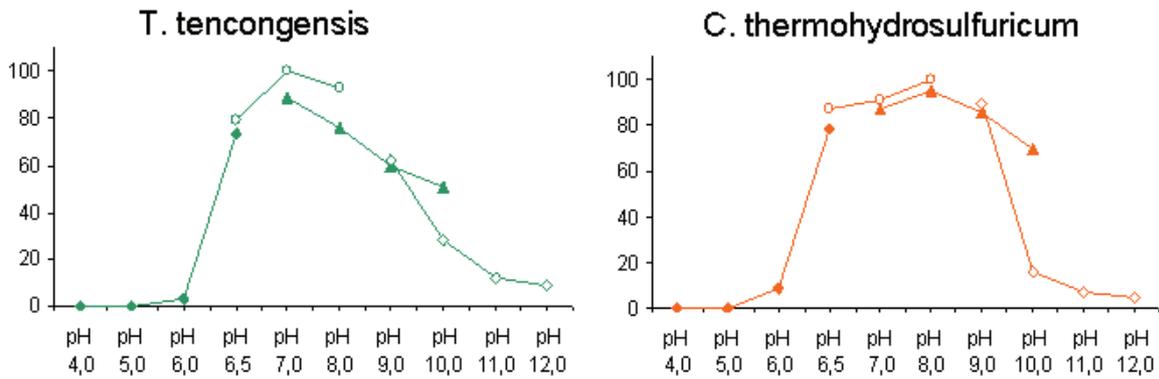


Abbildung 15: Abhängigkeit der Lipaseaktivitäten vom pH-Wert. Dargestellt ist die relative Aktivität der Lipase in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur Messung der Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH-Wert wurden die Substratlösungen für die Bestimmung der Lipaseaktivität mit *p*-NPP mit 20 mM Puffern unterschiedlicher pH-Werte von 4 bis 12,0 angesetzt. Gemessen wurde die relative Aktivität gegen einen für jeden pH-Wert mitgeführten Blindwert.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität der Lipasen wurde festgestellt, dass die Enzyme die Substrate mit der mittleren Acylkettenlänge bevorzugten. Die höchste Aktivität wurde im Test mit pNP-Caprato (C 10:0) und Tricaprylin (C 8:0) gemessen.

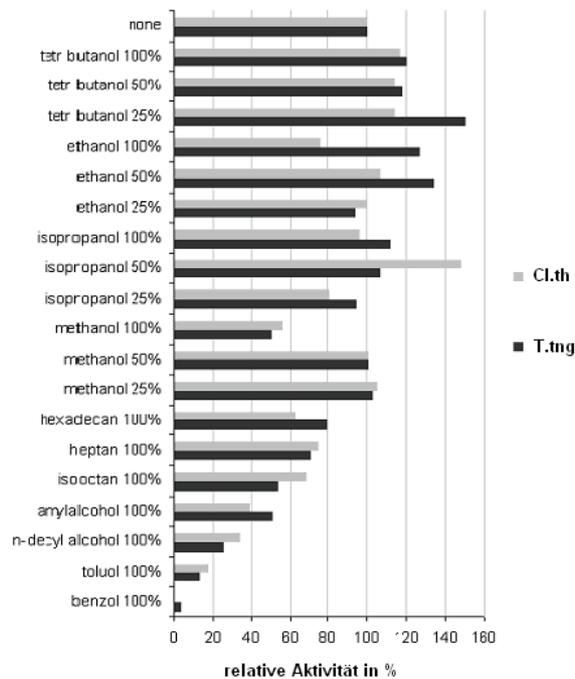


Abbildung 16: Einfluss von Lösemitteln auf die Lipaseaktivität. Getestet wurde die Aktivität (mit para-Nitrophenylpalmitat) der rekombinant produzierten Enzyme aus *C. thermohydrosulfuricum* (Cl. th.= hellgrau) und *T. tengcongensis* (T. tng = dunkelgrau).

Die rekombinanten Lipasen zeigten die gleichen Eigenschaften wie die Wildtyp-Enzyme. Auch hinsichtlich der Stabilität gegenüber zweiwertigen Metallionen konnten keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Somit kommen auch die rekombinanten Enzyme nicht für einen Einsatz unter den im Projekt gegebenen Bedingungen in Frage. Aus wissenschaftlicher Sicht bleibt aber festzuhalten, dass die thermostabilen Lipasen aus *C. thermohydrosulfuricum* und *T. tengcongensis* die ersten Lipase-kodierenden Gene aus thermophilen anaeroben Bakterien sind, die in *E. coli* in aktiver Form zur Expression gebracht werden konnten.

4.2 Enzymatische Baumwollvorbehandlung mit Enzymmischungen im Labormaßstab

Der beiden ersten Schritte der klassischen Vorbehandlung sind die enzymatische Entschlichtung mit α -Amylasen und das alkalische Abkochen, bei dem unter Einsatz von großen Alkalimengen bei Temperaturen nahe dem Kochpunkt störende Baumwollbegleitsubstanzen wie Pektine, Hemicellulosen und Fette unspezifisch von der Baumwolle entfernt werden. Dieser energieintensive, umweltbelastende Prozess geht immer mit einer gewissen Schädigung des cellulosischen Materials einher.

Bei der enzymatischen Entschlichtung wird die in der Weberei zum Schutz des Fadens applizierte Stärkeschichte mit Hilfe von α -Amylasen zu kleineren, wasserlöslichen Oligosacchariden hydrolysiert, die dann mit dem Waschwasser entsorgt werden. Eine Alternative zum Einsatz von α -Amylasen ist die Verwendung von Amyloglucosidasen, die einzelne Glucoseeinheiten vom nicht reduzierenden Ende der Amylopektin- bzw. Amyloseketten im Exomechanismus abspalten, so dass als einziges Abbauprodukt Glucose entsteht, die nach einer Umsetzung mit Glucoseoxidase in der Bleichstufe weiterverwendet werden kann [17,18]. Der Grad der Entschlichtung wird mit dem sogenannten TEGEWA-Jodtest bestimmt, bei dem mit einer Jodlösung angefärbte, stärkehaltige Baumwollproben mit einer Farbskala verglichen werden. Eine ausreichende Entschlichtung ist dann erfolgt, wenn die Ware eine TEGEWA-Note von mindestens 6 erhält [16].

Bei einer enzymatischen Alternative zum alkalischen Abkochen sollen die Baumwollbegleitsubstanzen spezifisch mit bestimmten Enzymen abgebaut werden. Dabei sollen neben den Pektinasen zur Pektinentfernung auch Lipasen zur Fett- und Wachsspaltung eingesetzt werden. Angestrebt ist der Einsatz von Enzymmischungen, die die vor der Weberei aufgebrauchte Stärkeschichte und die natürlichen Baumwollbegleitsubstanzen in einer Flotte entfernen, ohne sich dabei gegenseitig zu hindern. Vielmehr sollen bei derartigen Anwendungen synergetische Effekte ausgenutzt werden.

Durch die Entfernung der meist hydrophoben Begleitsubstanzen soll vor allem die Benetzbarkeit der Baumwolle deutlich erhöht werden, da dies für die weitere Veredlung der Ware unverzichtbar ist (z.B. für eine optimale Farbstoffaufnahme in der Färberei).

4.2.1 Charakterisierung der Rohbaumwolle

Um die Güte der enzymatischen Vorbehandlung der Baumwolle bewerten zu können, wurde zunächst das Rohmaterial charakterisiert. Um auch bei nicht geschlichtetem Material eine Aussage über die Benetzungseigenschaften machen zu können, wurde das vorhandene ungeschlichtete Baumwollgarn zu einem Endlosstrumpf gestrickt, auf dem man Tropfeneinsinkzeiten messen konnte.

In **Tabelle 16** werden die Ergebnisse zu den Messungen an geschlichtetem Baumwollgewebe und an ungeschlichtetem Baumwollgarn vorgestellt.

	Geschlichtetes Baumwollgewebe	Strumpf aus ungeschlichtetem Baumwollgarn
Ammoniumoxalat-Extraktion (Pektin)	1,56 Gew.-%	1,10 Gew.-%
Chloroform-Extraktion (Wachs)	0,83 Gew.-%	0,48 Gew.-%
Tropfeneinsinkzeit	> 600 s	> 600 s
Calciumgehalt	608 mg/kg = 15,2 mmol/kg	n.b.
Magnesiumgehalt	632 mg/kg = 26,0 mmol/kg	n.b.

Tabelle 16: Charakterisierung von Rohbaumwolle.

Die an der Baumwolle gemessenen Parameter entsprechen den üblichen, in der Literatur beschriebenen Werten. Die jeweils höheren Gewichtsanteile für die Extraktion auf Pektin bzw. auf Wachse an der geschlichteten Ware ergeben sich daraus, dass auch die Schlichte selbst teilweise extrahierbar ist.

Die Benetzbarkeit ist unabhängig von der Schlichteaufgabe gleichermaßen schlecht bei beiden Waren; die Tropfeneinsinkzeit ist jeweils größer als 5 Minuten, so dass diese Ware - auch entschlichtet - nicht zur Weiterverarbeitung geeignet ist.

Der Calciumgehalt der Baumwolle beträgt 608 mg/kg, der Gehalt an Magnesium 632 mg/kg. Bei einem Flottenverhältnis in der Baumwollvorbehandlung von maximal 10 : 1 ergibt sich bei einer vollständigen Mobilisierung der Erdalkalitionen allein durch den Eintrag durch die Ware in der Flotte eine Calciumionenkonzentration von 1,5 mmol/l und eine Magnesiumionenkonzentration von 2,6 mmol/l. Wie die Untersuchungen an den thermophilen Lipasen (s. 4.1) zeigen, sind diese Konzentrationen für die Aktivität der Lipasen als kritisch zu bewerten und könnten den Einsatz in realen Behandlungsflotten stark einschränken. Für die technischen Produkte (α -Amylasen, Cellulase, Pektinasen) stellen diese Konzentrationen keine Probleme dar.

4.2.2 Verwendete technische Enzyme

Bereits in der ersten Projektphase wurden die spezifischen Temperatur- und pH-Wert-Optima der verwendeten technischen Enzympräparate bestimmt. In der **Tabelle 17** werden die Ergebnisse für die im Folgenden verwendeten Enzyme aufgeführt.

Aufgrund der Kenntnis der aufgeführten Parameter einigten sich die Partner bzgl. der statistischen Versuchsplanung (s. 4.2.3) auf eine Prozesstemperatur von 60 °C und zwei pH-Wert-Bereiche (pH 5,5 und pH 8). Bei den Versuchen im Hinblick auf eine Optimierung der Prozessführung (s. 4.2.5) wurde der pH-Wert während der Behandlung von 5,5 auf 8,0 gesteigert, die Temperatur wurde schrittweise von 50 °C bis zu 95 °C gesteigert.

Enzym	Produktbezeichnung	pH-Wert-Optimum	T-Optimum [°C]
α -Amylase	Beisol T 2090 (CHT)	5 - 7	50 - 80
Amyloglucosidasen	Rohapect S (AB Enzyms)	5 - 6	50 - 70
Cellulasen	Beizym UL (CHT)	5	50 - 65
	Carezyme 4500 L	5 - 6	50 - 60
	Cellutex AL40	5 - 6	50 - 60
Lipasen	Lipase aus <i>T. brockii</i> (TUHH)	7 - 9	70 - 80
	Lipase aus <i>C. thermohydrosulfuricum</i>	7,5 - 9	70 - 75
Pektinasen	Beisol DHP (CHT)	5	50 - 90
	Beisol DAP (CHT)	8	50 - 80
	Pektinase (TUHH)	8	50 - 90

Tabelle 17: Temperatur- und pH-Wert-Optima der verwendeten Enzyme.

4.2.3 Variation der Enzymmischung bei konstantem pH-Wert und konstanter Temperatur - statistische Versuchsplanung

Zur statistischen Versuchsplanung

Die für die Baumwollvorbehandlung relevanten Enzyme sind α -Amylasen, Amyloglucosidasen, Cellulasen, Pektinasen und Lipasen. Durch eine Variation der Konzentrationen der einzelnen Spezies ergeben sich sehr viele verschiedene Möglichkeiten der Mischung, so dass die Ergebnisse der Versuche nur noch anhand von mathematischen Programmen sinnvoll interpretierbar sind. Als Messwerte wurden der Entschlichtungsgrad und die Tropfeneinsinkzeit (Benetzbarkeit) bestimmt. Mit der Methode der statistischen Versuchsplanung und der computergestützten Auswertung konnten so für unterschiedliche Enzymmischungen die jeweils optimalen Zusammensetzungen bestimmt werden, um entweder eine maximale Entschlichtung, eine maximale Benetzbarkeit oder einen bestmöglichen Kompromiss beider Messwerte zu erzielen. Ziel der folgenden Versuchsreihe ist, die Wirkung unterschiedlicher Mischungen der relevanten Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen bei konstanter Prozesstemperatur und konstantem pH-Wert (leicht sauer: 5,5 oder leicht alkalisch: 8,0) auf das Entschlichtungsergebnis und die Benetzbarkeit zu optimieren.

Behandlung von geschlichteter Baumwolle im Labomaten

Für die Untersuchungen zur enzymatischen Vorbehandlung von Rohbaumwolle wurden verschiedene Versuchspläne mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung erstellt, abgearbeitet und bewertet. Die Versuche wurden im Labomaten bei einer Flottentemperatur von 60 °C und einem Flottenverhältnis von 1 : 7,5 über 60 min durchgeführt. Insgesamt wurden acht verschiedene Enzymmischungen betrachtet. Im Folgenden werden exemplarisch zwei Beispiele vorgestellt, die stellvertretend für die Durchführung und Interpretation der Versuche stehen.

Versuchsplan 1:

Es wurden die Enzyme Beisol T2090 (α -Amylase, 0 - 5,0 ml/l), Rohapect S (Amyloglucosidase, 0 - 3,0 ml/l), Beizym UL (Cellulase, 0 - 3,0 ml/l), Beisol DHP (Pektinase, 0 - 3,0 ml/l) und die Lipase der TUHH (0 - 3,0 ml/l) bei einem pH-Wert von 5 eingesetzt.

Wirkung	Enzyme	Konz. [ml/l]	Entschlichtungsgrad	Tropfeneinsinkzeit [s]
maximaler Entschlichtungsgrad	Beisol T2090	2,17	8,8	24
	Rohapect S	3,00		
	Beizym UL	3,00		
	Beisol DHP	1,91		
	Lipase TUHH	1,15		
minimale Tropfeneinsinkzeit	Beisol T2090	0,00	1	11
	Rohapect S	0,06		
	Beizym UL	0,08		
	Beisol DHP	3,00		
	Lipase TUHH	0,13		
maximaler Entschlichtungsgrad & minimale Tropfeneinsinkzeit	Beisol T2090	2,56	7,8	17
	Rohapect S	0,01		
	Beizym UL	0,00		
	Beisol DHP	1,67		
	Lipase TUHH	2,19		

Tabelle 18: Ergebnisse Versuchsplan 1 (pH = 5).

In **Tabelle 18** werden die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst. Um einen maximalen Entschlichtungsgrad von 8,8 zu erzielen, benötigt man vor allem die stärkeabbauenden Enzyme α -Amylase und Amyloglucosidase. Ferner scheint auch die Cellulase einen positiven Effekt auf das Entschlichtungsergebnis zu haben. Für eine höchstmögliche Benetzbarkeit (Tropfeneinsinkzeit 11 s) zeigt sich einzig die Pektinase verantwortlich, wenngleich in dieser Mischung keine Entschlichtung stattfindet und die Benotung bei 1 verbleibt. Einen hohen Entschlichtungsgrad von 7,8 bei gleichzeitiger annehmbarer Benetzbarkeit (17 s) wird durch eine Mischung aus α -Amylase, die für den Stärkeabbau verantwortlich ist, sowie Pektinase und Lipase, die die hydrophobierend wirkenden Baumwollbegleitsubstanzen wie Pektine und Wachse entfernen, erzielt.

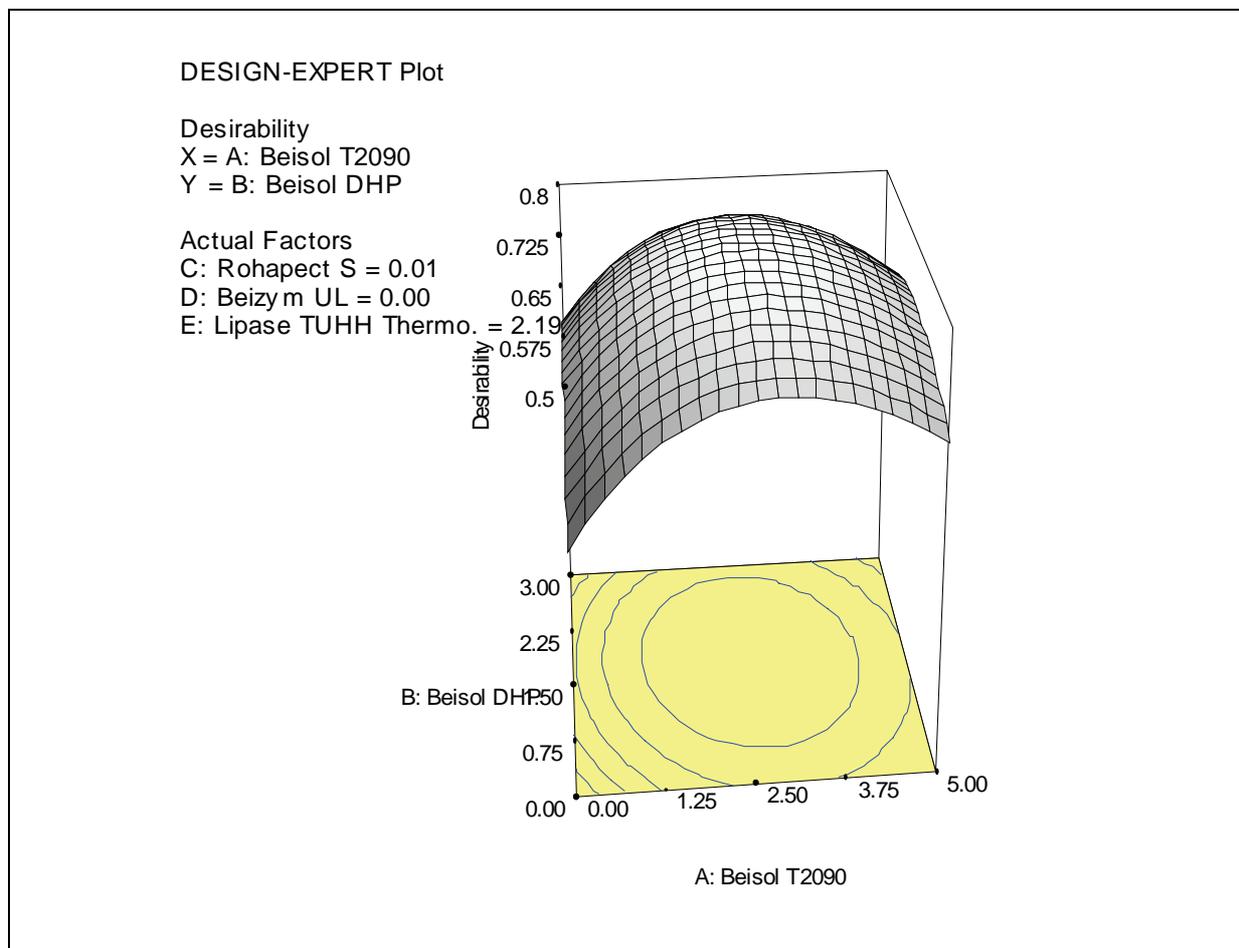


Abbildung 17: Statistische Versuchsplanung - Versuchsplan 1.

Abbildung 17 zeigt eine computergestützte Berechnung zur Maximierung des Effektes bei konstanter Rohapect S- (0,01 ml/l)), Beizym UL- (0,00 ml/l)) und Lipase-

konzentration (2,19 ml/l) in Abhängigkeit von der Beisol T2090- und Beisol DHP-Konzentration anhand der Ergebnisse der Laborversuche. Das Maximum zeigt sich bei den in **Tabelle 18** angegebenen Konzentrationen. Eine weitere Steigerung der jeweiligen Konzentrationen führt zu keiner Verbesserung, im Gegenteil, Entschlichtungsgrad und Benetzungsverhalten verschlechtern sich wieder.

Versuchsplan 2:

Es wurden die Enzyme Beisol T2090 (α -Amylase, 4,0 ml/l), Rohapect S (Amyloglucosidase, 0 - 4,0 ml/l), Beizym UL (Cellulase, 0 - 4,0 ml/l), Pektinase TUHH (0 - 4,0 ml/l) und die Lipase der TUHH (0 - 4,0 ml/l) bei einem pH-Wert von 8 eingesetzt. In **Tabelle 19** werden die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst.

Wirkung	Enzyme	Konz. [ml/l]	Entschlichtungsgrad	Tropfeneinsinkzeit [s]
maximaler Entschlichtungsgrad	Beisol T2090	4,00	6,0	
	Rohapect S	beliebig		
	Beizym UL	beliebig		
	PektinaseTUHH	beliebig		
	Lipase TUHH	beliebig		
minimale Tropfeneinsinkzeit	Beisol T2090	4,00		49
	Rohapect S	3,45		
	Beizym UL	2,44		
	PektinaseTUHH	0,14		
	Lipase TUHH	0,25		
maximaler Entschlichtungsgrad & minimale Tropfeneinsinkzeit	Beisol T2090	4,00	6,0	49
	Rohapect S	3,45		
	Beizym UL	2,44		
	PektinaseTUHH	0,14		
	Lipase TUHH	0,25		

Tabelle 19: Ergebnisse Versuchsplan 2 (pH = 8).

Bei einer konstanten α -Amylasekonzentration von 4,0 ml/l ergibt sich unabhängig von den Konzentrationen der anderen Enzyme ein Entschlichtungsgrad von 6,0. Die α -Amylase entfaltet bei einem pH-Wert von 8,0 nicht ihre volle Aktivität, so dass der Entschlichtungsgrad vergleichsweise schlecht ist, wenngleich er für eine Weiterverarbeitung der Baumwolle ausreichend wäre. Dem entsprechend ist der entscheidende Parameter für die Güte der Behandlung in diesem Fall einzig die Benetzbarkeit, die bei der in **Tabelle 19** angegebenen Mischung ihr Maximum mit einer minimalen Tropfeneinsinkzeit von 49 s erreicht. Grundsätzlich führt eine enzymatische Vorbehandlung von Rohbaumwolle bei einem konstanten pH-Wert von 8,0 nur zu unbefriedigenden Ergebnissen.

Abbildung 18 zeigt eine computergestützte Berechnung zur Maximierung des Effektes bei konstanter Beisol T2090- (4,00 ml/l) Rohapect S- (0,01 ml/l)), Beizym UL- (3,67 ml/l)) und Lipase TUHH-Konzentration (3,88 ml/l) in Abhängigkeit von der Rohapect S- und Pektinase TUHH-Konzentration anhand der Ergebnisse der Laborversuche. Im Bereich der in **Tabelle 19** angegebenen Konzentrationen ergibt sich ein Plateau, um das die jeweiligen Konzentrationen leicht variieren können, ohne dass sich das Ergebnis der Behandlung verschlechtert. Unter- und oberhalb dieses Konzentrationsfensters verschlechtern sich die Resultate wieder.

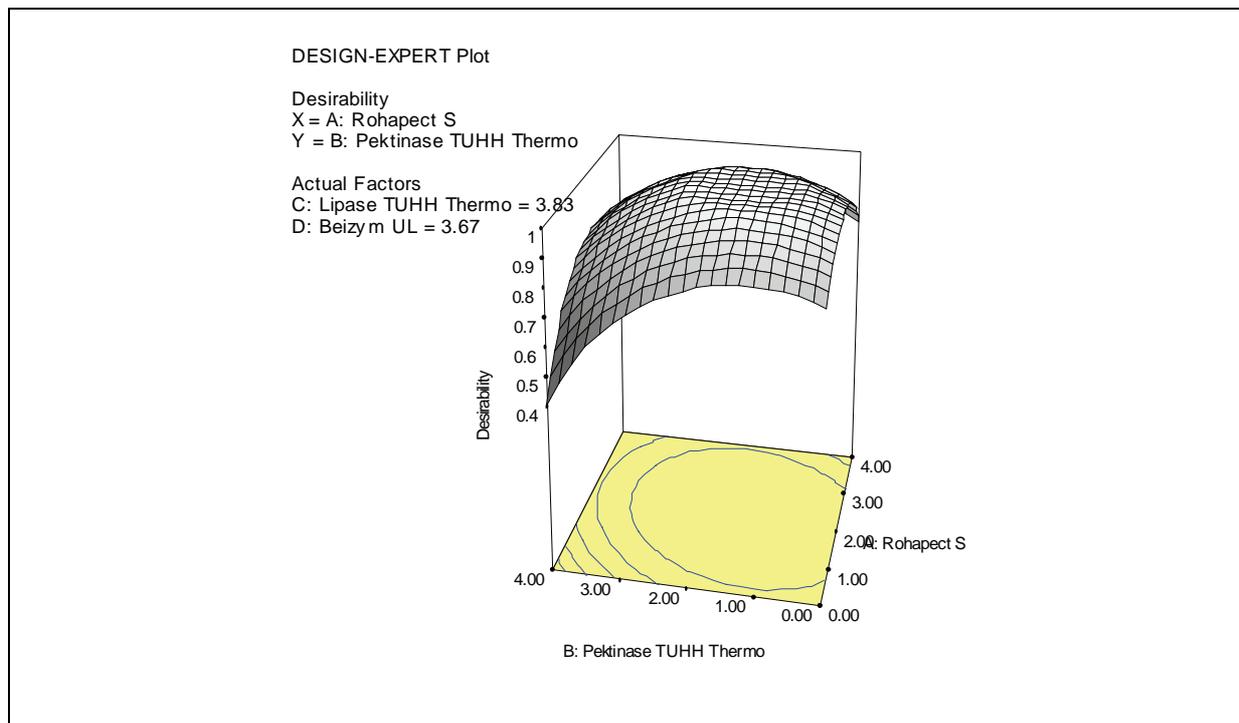


Abbildung 18: Statistische Versuchsplanung - Versuchsplan 2.

Die Untersuchungen, die unter den Gesichtspunkten der statistischen Versuchsplanung durchgeführt wurden, ermöglichen grundsätzlich eine Optimierung der jeweils betrachteten Enzymmischung. Gleichzeitig zeigte sich allerdings auch, dass für eine enzymatische Baumwollvorbehandlung, die gleichzeitig die Stärkeschlichte und die natürlichen Baumwollbegleitsubstanzen vom Rohgewebe entfernen soll, ein konstanter pH-Wert nicht optimal ist, da die unterschiedlichen Enzyme in unterschiedlichen pH-Wert-Bereichen ihre maximale Aktivität entfalten. Die Optimierung der Prozessführung mit einer Variation von pH-Wert und Temperatur *während* der enzymatischen Umsetzung wird im **Kapitel 4.2.5** behandelt.

4.2.4 Untersuchungen an ungeschlichtetem Baumwollgarn im Linitester bei konstantem pH-Wert

Um den Einfluss der für das BioScouring relevanten Enzyme Cellulase, Pektinase und Lipase auf das Behandlungsergebnis *ohne* die Entschlichtung mit α -Amylase besser beurteilen zu können, wurden ergänzend Versuche an ungeschlichtetem Baumwollgarn im Linitester durchgeführt. Das Garn wurde dabei zu einem Endlosstrumpf gestrickt, um ein Flächengebilde zu erhalten, dessen Benetzungseigenschaften mit Hilfe des Tropfeneinsinkttests bestimmt werden konnten.

Abbildung 19 zeigt die Temperaturführung über den Behandlungszeitraum. Alle Enzyme wurden zu Beginn der Behandlung der Grundflotte zugefügt. Die Versuche wurden bei einem konstanten pH-Wert von 5,5 oder 8,0 durchgeführt.

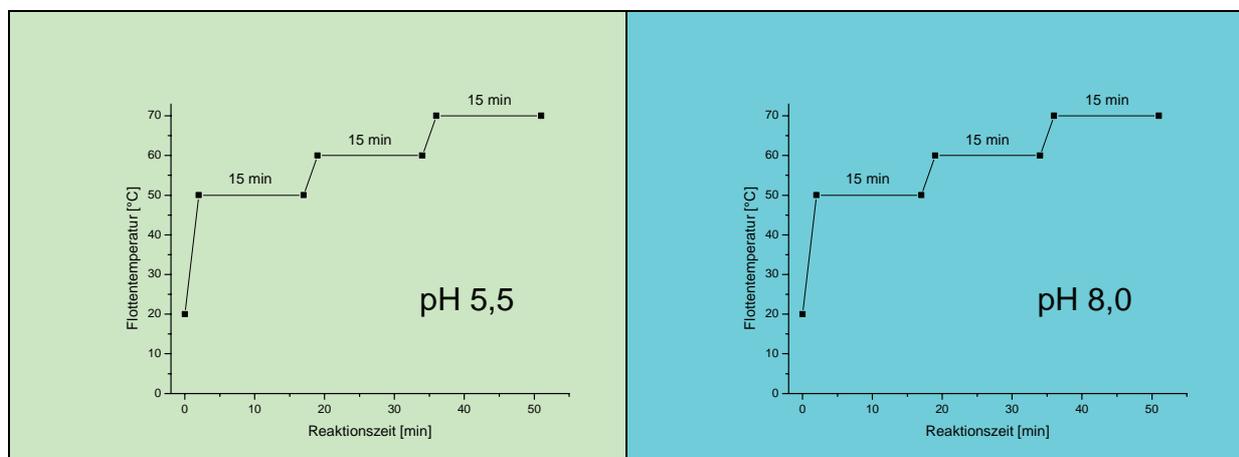


Abbildung 19: Prozessführung im Linitester - Behandlung von ungeschlichteten Baumwollstrümpfen.

Gemäß den pH-Wert-Optima wurden bei den unterschiedlichen pH-Werten die jeweils spezialisierten technischen Enzympräparate verwendet. Bei pH 5,5 waren dies die Cellulase Beizym UL und die Pektinase Beisol DHP, bei pH 8,0 die Cellulase Beizym NL 254 und die Pektinase Beisol DAP. Die Konzentration aller verwendeten Enzyme betrug jeweils 4,0 ml/l. **Abbildung 20** zeigt die relative Gewichtsabnahme der ungeschlichteten Baumwollstrümpfe nach der enzymatischen Behandlung. Grundsätzlich führt eine Umsetzung bei einem pH-Wert von 8,0 zu einer höheren Gewichtsabnahme, wobei der Einsatz der alkalischen Pektinase Beisol DAP am größten ist. Die Mischung aller drei Enzyme bei einem pH-Wert von 8,0 führt zu einem maximalen Gewichtsverlust der Ware.

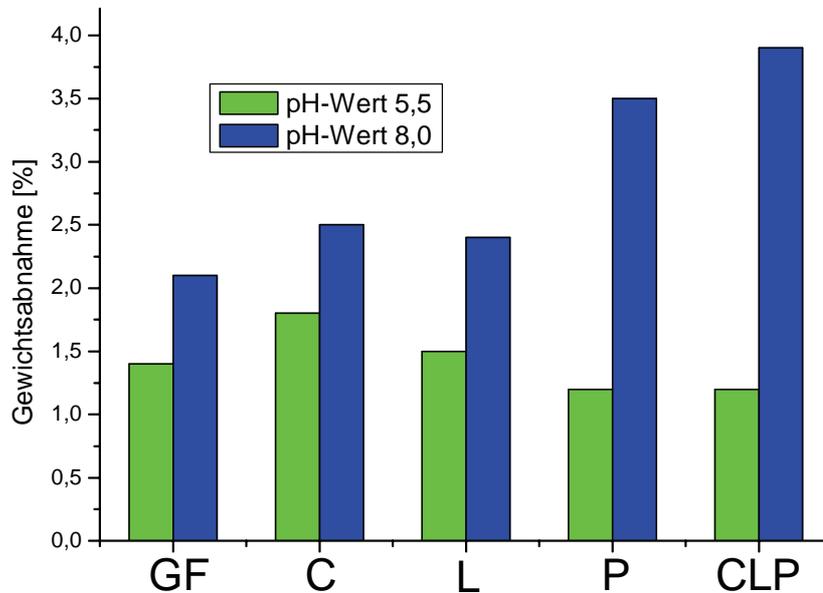


Abbildung 20: Relative Gewichtsabnahme von ungeschlichteten Baumwollstrümpfen durch eine enzymatische Behandlung im Linitester.

In **Tabelle 20** werden die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst. Bzgl. der Tropfeneinsinkzeit nach einer Trocknung bei Raumtemperatur liefert bei einem pH-Wert von 5,5 die saure Cellulase Beizym UL den besten Effekt, wohingegen die saure Pektinase Beisol DHP schlechter abschneidet. Umgekehrt sind die Effekte im leicht alkalischen Bereich mit einem pH-Wert von 8,0. Hier ergibt sich die beste Benetzbarkeit durch den Einsatz der alkalischen Pektinase Beisol DAP. Die alkalische Cellulase Beizym NL verbessert die Benetzbarkeit der ungeschlichteten Baumwolle dagegen nicht.

Enzyme				pH 5,5			pH 8,0		
GF	C	L	P	Δm	Tropfenein- sinkzeit [s] Trocknung 25 °C	Tropfenein- sinkzeit [s] Trocknung 120°C	Δm	Tropfenein- sinkzeit [s] Trocknung 25 °C	Tropfenein- sinkzeit [s] Trocknung 120°C
X				1,4	> 600	> 600	2,1	310	> 600
X	X			1,8	97	> 600	2,5	> 600	> 600
X		X		1,5	371	> 600	2,4	452	> 600
X			X	1,2	158	> 600	3,5	22	> 600
X	X	X	X	1,2	92	> 600	3,9	4	> 600

Tabelle 20: Enzymatische Behandlung von ungeschlichteter Baumwolle im Linitester.

Als Konsequenz aus diesen Untersuchungen sollen die saure Pektinase und die alkalische Cellulase in den folgenden Versuchen im Jigger (**Kapitel 4.2.5**) nicht mehr verwendet werden. Aus den Aktivitätsmustern der verbleibenden Enzyme ergibt sich daraus notwendigerweise eine neue Strategie bzgl. der Prozessführung, nämlich ein pH-Wert-Wechsel *während* der enzymatischen Behandlung der Baumwolle.

Bei einem industriellen Prozess wird die Baumwolle nach der Behandlung und Wäsche bei 120 - 140 °C getrocknet. Dem entsprechend wurden die Versuche vergleichend auch mit einer anschließenden Trocknung bei 120 °C unter Spannung durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass die Benetzungseigenschaften in allen Fällen deutlich schlechter sind bzw. dass gegenüber dem ursprünglichen Material überhaupt keine Verbesserung zu sehen ist. Obwohl bei den Versuchen im Linitester Effekte bzgl. des Gewichtsverlustes und der Benetzbarkeit nach einer Trocknung bei Raumtemperatur zu erkennen sind, reichen diese für eine Weiterverarbeitung des cellulosischen Materials nicht aus. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer Variation der Prozessführung.

4.2.5 Variation/Optimierung der Prozessführung

Die bisherigen Versuche wurden im Labormaßstab im Labomaten (s. 4.2.3) oder Linitester (s. 4.2.4) durchgeführt, um Effekte anhand einer Variation konkreter Enzymmischungen zu optimieren, wobei der pH-Wert konstant gehalten und die Temperatur nur in einem schmalen Bereich variiert wurde. In einer industriellen Anlage besteht dagegen die Möglichkeit, auf die genannten Prozessparameter auch während der Behandlung Einfluss zu nehmen. Durch eine Änderung des pH-Wertes, eine den Optima der Enzyme angepasste Temperaturführung und eine verzögerte Zugabe der Enzyme zu ausgewählten Zeitpunkten sollte die Aktivität der relevanten Enzyme bzgl. ihres spezifischen Substrates optimal ausgenutzt werden können. Die entsprechenden Versuche wurden in einem Jigger durchgeführt, dessen Materialführung der industriellen Realität näher kommt als ein Labomat bzw. Linitester.

Behandlung von Rohbaumwolle im Jigger

In **Abbildung 21** wird die Prozessführung der enzymatischen Umsetzung von geschlichteter Rohbaumwolle beschrieben. Dabei wurde die Grundflotte bei Raumtemperatur auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt, anschließend wurde die Flotte zusammen mit der α -Amylase Beisol T2090 und der sauren Cellulase Beizym UL auf eine Temperatur von 60 °C geheizt, bei der beide Enzyme eine genügend hohe Aktivität aufweisen. Nach einer einstündigen Verweilzeit wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde die alkalische Pektinase Beisol DAP und die thermophile Lipase TUHH zugefügt und die Temperatur schrittweise auf 70 °C erhöht. Das Spülen der Baumwolle erfolgte bei 70 °C.

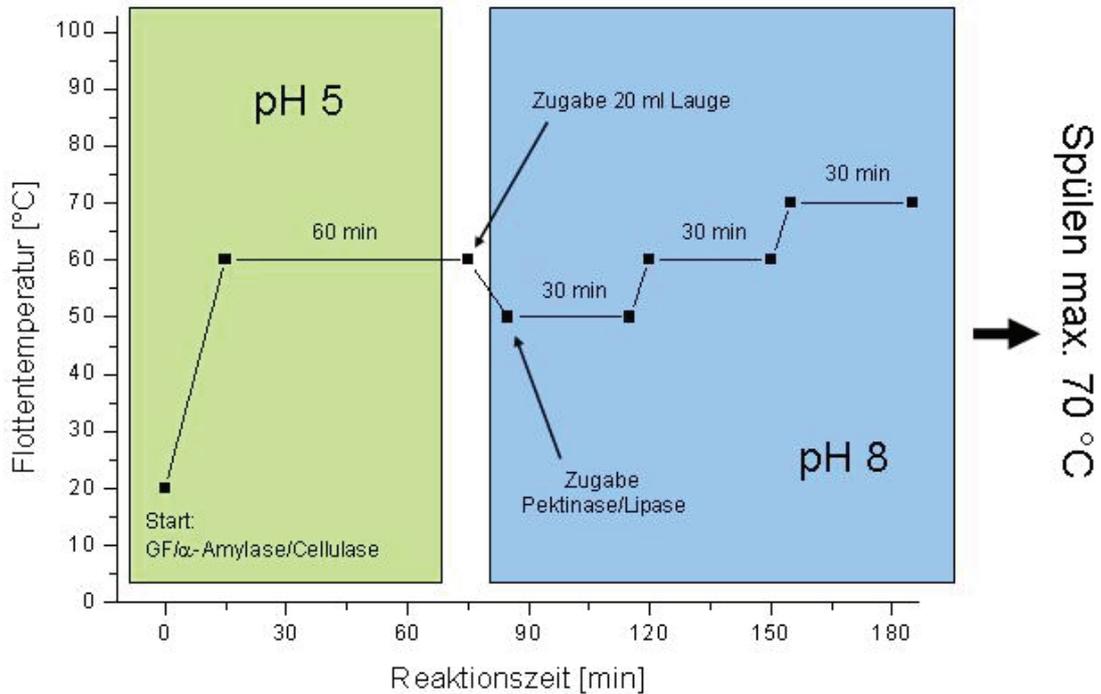


Abbildung 21: Prozessführung I im Laborjigger - Behandlung von geschlichtetem Baumwollgewebe.

Behandlung	Δm [%]	Tropfenein-sinkzeit [s] Trocknung 25 °C	Tropfenein-sinkzeit [s] Trocknung 120 °C	Restwachs-gehalt [%]	Restpektin-gehalt [%]
GF + α -Amylase	7,9	12,2	90	0,54	0,64
GF + α -Amylase + C	8,1	6,4	1390	n.b.	n.b.
GF + α -Amylase + P	8,8	6,4	390	n.b.	n.b.
GF + α -Amylase + P + L	8,1	2,8	610	n.b.	n.b.
GF + α -Amylase + C + P	9,2	< 1	170	n.b.	n.b.
GF + α -Amylase + C + P + L	9,0	5,8	470	0,52	0,09
entschlichtet + alkalisch abgekocht	9,1	< 1	< 1	0,31	0,15
Original	-	> 3600		0,83	1,56

Tabelle 21: Charakterisierung von Rohbaumwolle nach unterschiedlichen enzymatischen Behandlungen im Jigger (Prozessführung I).

Die Baumwolle wurde nach der enzymatischen Behandlung anhand von verschiedenen Messwerten charakterisiert. Die Ergebnisse werden in **Tabelle 21** vorgestellt und mit der unbehandelten bzw. konventionell entschlichteten und alkalisch abgekochten Probe verglichen.

Grundsätzlich wurde bei allen Behandlungen eine ausgezeichnete Entschlichtung erzielt. In Verbindung mit den Netzmitteln der Grundflotte bewirkt die α -Amylase einen Gewichtsverlust an der Rohbaumwolle von durchschnittlich 7,9 %, welcher vor allem von der entfernten Stärkeschlichte herrührt. Gegenüber der Originalprobe ergeben die Ammoniumoxalat- und die Chloroformextraktion nur eine mäßige Entfernung des Pektins bzw. der Baumwollwachse. Durch den Einsatz der alkalischen Pektinase kommt es dagegen zu einer drastischen Verminderung des Pektin-gehaltes, der sogar noch unter dem nach der konventionellen Methode liegt. Leider bewirkt die Lipase keinen signifikanten Wachsabbau, was sich deutlich auf die Benetzungseigenschaften im Vergleich zur konventionellen Prozedur auswirkt. Durch eine heiße Trocknung werden die in der Baumwolle verbleibenden Wachse und Fette durch Kapillarkräfte innerhalb der Faser an die Gewebeoberfläche transportiert, wo sie einen hydrophoben Film bilden, so dass die Tropfeneinsinkzeiten nach einer Trocknung bei 120 °C deutlich schlechter sind als die bei einer Lufttrocknung.

Da die Wachse mit der genannten Enzymmischung nicht direkt abgebaut werden können, wurde nun der enzymatischen Behandlung eine Heißstufe bei 95 °C angeschlossen, um die Wachse und Fette mit Hilfe der in der Grundflotte enthaltenen Tenside nachträglich zu mobilisieren.

Das Schema dieser erweiterten Prozessführung wird in **Abbildung 22** vorgestellt, die entsprechenden Ergebnisse für den Einsatz einer Mischung aller relevanten Enzyme werden in **Tabelle 22** zusammengefasst.

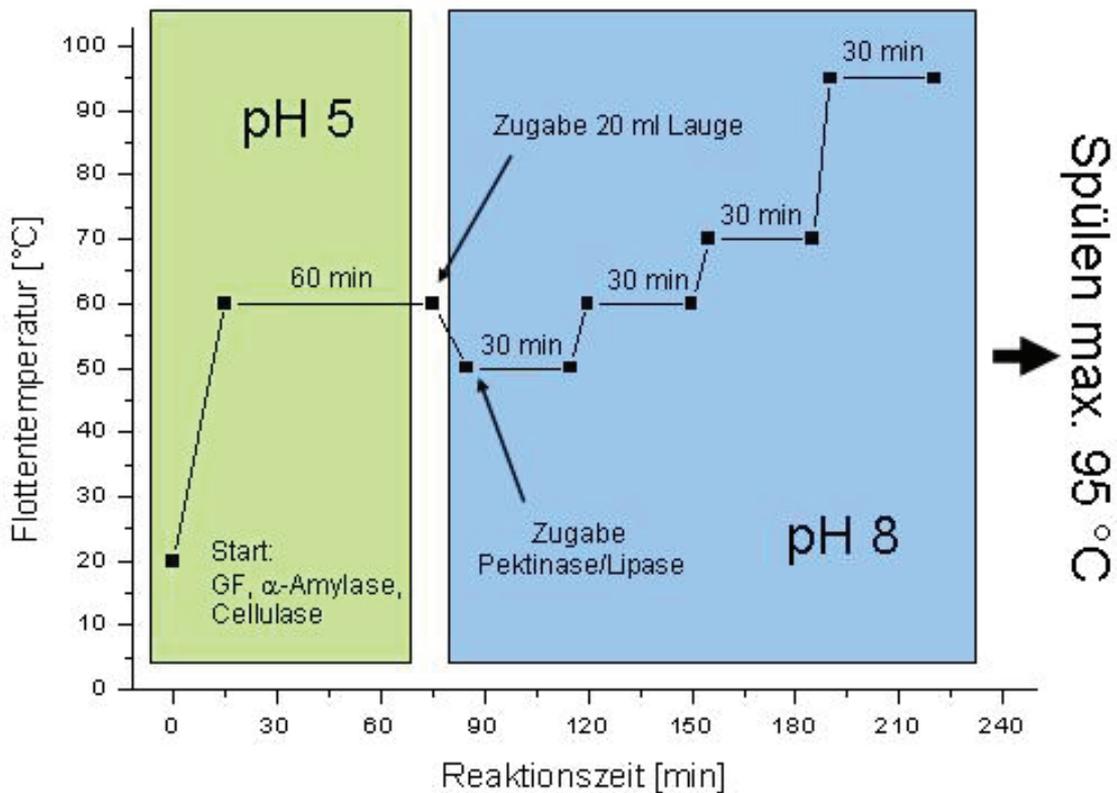


Abbildung 22: Prozessführung II im Laborjigger - Behandlung von geschichtetem Baumwollgewebe.

Behandlung	max. T [°C]	Δm [%]	Tropfeneinsinkzeit [s] Trocknung 25 °C	Tropfeneinsinkzeit [s] Trocknung 120 °C	Restwachsgehalt [%]	Restpektin-gehalt [%]
GF + α -Amylase + C + P + L	95 (II)	9,3	< 1	16	0,47	0,08
GF + α -Amylase + C + P + L	70 (I)	9,0	5,8	470	0,52	0,09
entschlichtet + alkalisch abgekocht	-	9,1	< 1	< 1	0,31	0,15
Original	-	-	> 3600		0,83	1,56

Tabelle 22: Charakterisierung von Rohbaumwolle nach unterschiedlichen enzymatischen Behandlungen im Jigger und Vergleich der Prozessführungen I und II.

Obwohl der Restwachsanteil nicht signifikant gesenkt werden konnte, findet man nach der Behandlung mit anschließender Heißwäsche auch bei einer Trocknung bei 120 °C eine gute Benetzbarkeit mit einer Tropfeneinsinkzeit von durchschnittlich 16 s.

Um die Entschlichtung und den Einfluss der Cellulase noch zu verbessern, wurde eine dritte Prozessführung gewählt, bei der die α -Amylase zunächst in ihrem Temperaturoptimum von 70 °C eingesetzt wurde. Erst nach einem Abkühlen der Flotte auf das Temperaturoptimum der Cellulase von 50 °C wurde diese der Flotte zugesetzt. Nach dem pH-Wert-Wechsel auf 8,0 wurde die Pektinase bei einer konstanten Temperatur von 70 °C eingesetzt. Auf die Verwendung der thermophilen Lipase wurde hierbei verzichtet, da ihr Effekt bzgl. des Wachsabbaus fraglich erscheint. Zur Wachsmobilisierung erfolgte im Anschluss wieder eine heiße Wäsche bei 95 °C. Das Schema der Prozessführung wird in **Abbildung 23** dargestellt.

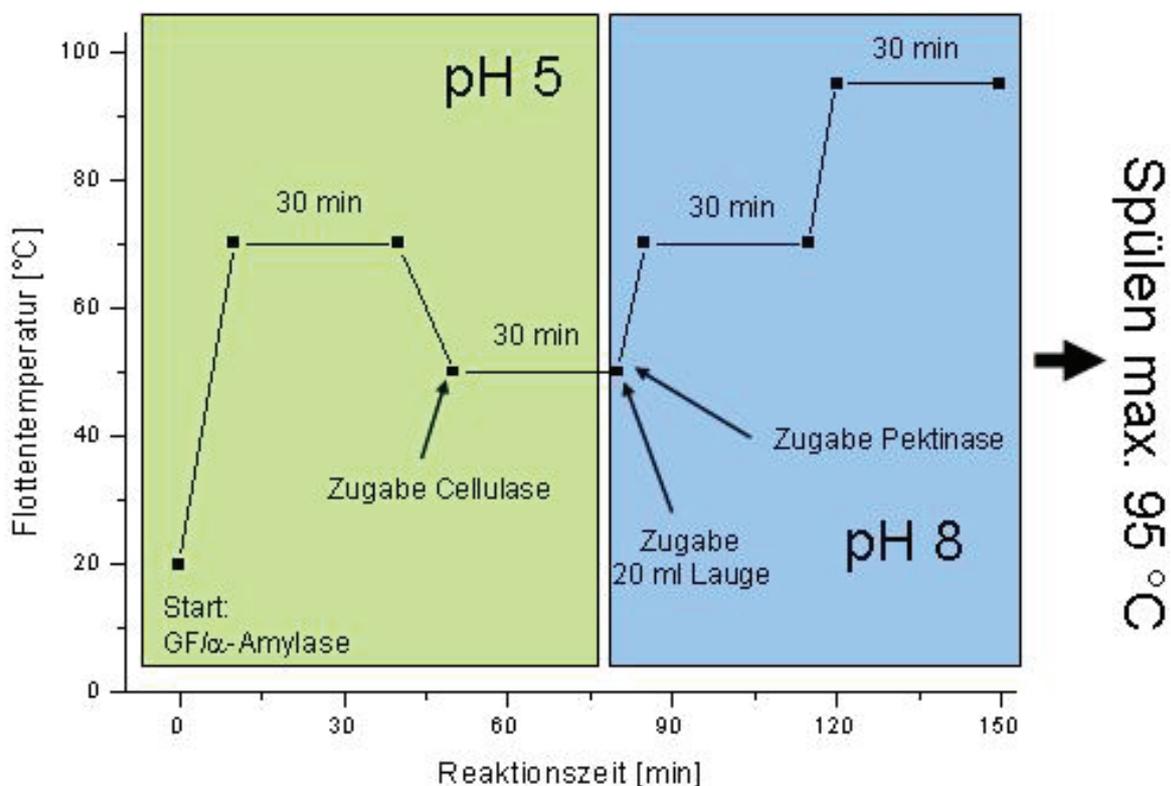


Abbildung 23: Prozessführung III im Laborjigger - Behandlung von geschlichtetem Baumwollgewebe.

Wie man anhand der **Tabelle 23** sieht, kann durch die modifizierte Prozessführung erneut eine verbesserte Benetzbarkeit der behandelten Baumwollware erzielt werden. Die Tropfeneinsinkzeit auf dem Gewebe liegt mit durchschnittlich 5,4 s deutlich unter den für eine Weiterverarbeitung erforderlichen 10 s.

Behandlung	Δm [%]	Tropfeneinsinkzeit [s] Trocknung 120 °C
GF + α -Amylase + C + P	8,7	5,4
entschlichtet + alkalisch abgekocht	9,1	< 1
Original	-	> 3600

Tabelle 23: Charakterisierung von Rohbaumwolle nach einer enzymatischen Behandlung mit α -Amylase, Cellulase und Pektinase im Jigger im Vergleich zum Original und der konventionell vorbehandelten Probe (Prozessführung III).

4.2.6 Enzymatische Weiterverwertung von glucosehaltigen Waschflotten aus der Entschlichtung

Bei der Umsetzung von Stärkeschlichten mit Amyloglucosidase entsteht - gemäß eines Exomechanismus - das Monosaccharid Glucose, welches von geeigneten Enzymen, den Glucoseoxidasen, in Gegenwart von Sauerstoff zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert werden kann. In einer folgenden Bleichstufe kann das Peroxid als bleichaktives Agens und die Gluconsäure zur Komplexierung störender Schwermetallionen dienen.

Dieser Prozess lässt sich in der HPLC quantitativ verfolgen. Beispielhaft zeigt **Abbildung 24** das Chromatogramm einer Umsetzung von Glucose mit gereinigter GOD (Serva). Nach $t = 4,0$ min eluiert gebildetes Wasserstoffperoxid, das folgende, kleine Signal bei $t = 4,5$ min rührt vom nicht umgesetzten Substrat Glucose. Das Oxidationsprodukt Gluconsäure erscheint bei $t = 14,0$ min.

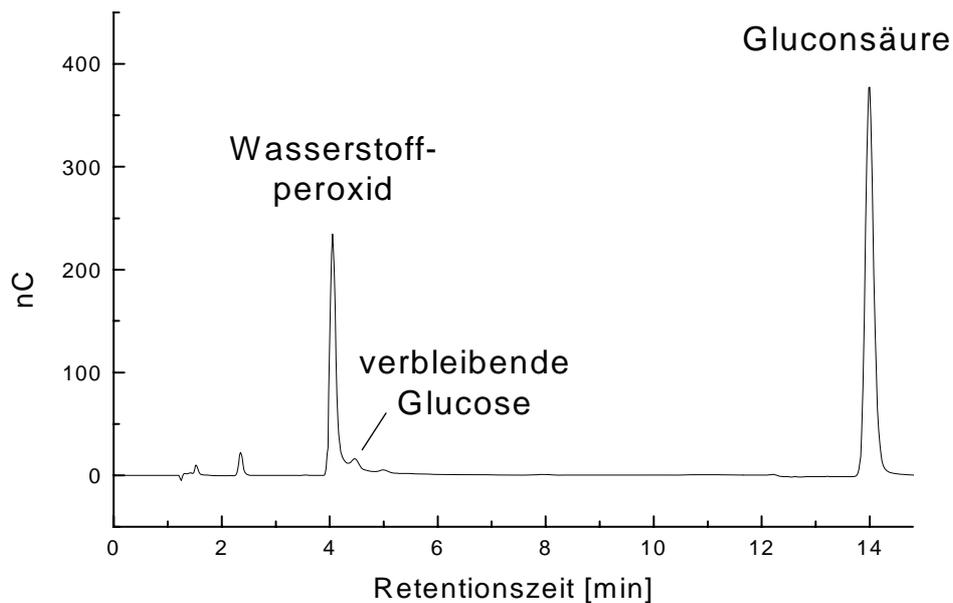
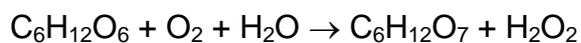
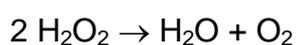


Abbildung 24: Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure und H_2O_2 mit GOD (Serva) in der HPLC ($c_{\text{Start}}(\text{Glucose}) = 5 \text{ g/l}$, $T = 38 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $t = 2 \text{ h}$).

In praxisrelevanten Entschlichtungsflotten mit Flottenverhältnissen von 1 : 5 und Stärkeschichtenaufgaben von 5 - 10 Gew.-% können durch eine enzymatische Entschlichtung mit Amyloglucosidasen ohne weiteres Glucosekonzentrationen von 10 - 20 g/l erzeugt werden. Aufbauend auf bereits im Vorfeld des Projektes vom DTNW erarbeiteten Ergebnissen zeigten weitere Versuche zur enzymatischen Oxidation wiederum, dass diese Glucosemengen problemlos mit GOD zu Gluconsäure gemäß der folgenden Reaktionsgleichung oxidiert werden können.



Pro umgesetztem Glucose-Äquivalent entsteht ein Äquivalent Gluconsäure und ein Äquivalent Wasserstoffperoxid. Die Umsatzrate der Gluconsäure sollte demnach derjenigen von Wasserstoffperoxid entsprechen. Tatsächlich findet man aber immer weniger Peroxid als Gluconsäure, da die verwendete GOD (Serva oder ASA) niemals frei von vergesellschafteter Katalase ist, so dass generiertes Wasserstoffperoxid sogleich durch Katalase gemäß der folgenden Reaktionsgleichung partiell wieder abgebaut wird.



Neben der aus der Entschlichtung vorgegebenen Glucosemenge bzw. -konzentration ist somit ein weiterer limitierender Faktor für die generierbare Wasserstoffperoxidmenge maßgeblich: das GOD/Katalase-Verhältnis in dem eingesetzten Enzympräparat. In technischen Präparaten beträgt der Katalaseanteil mindestens 10 %. In **Abbildung 25** sieht man den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Oxidation von Glucose mit einer technischen GOD. Im gleichen Maße wie die Glucosekonzentration sinkt steigt die Konzentration des Produktes Gluconsäure. Wasserstoffperoxid lässt sich dagegen zu keinem Zeitpunkt der Reaktion nachweisen. Es wird - wie oben beschrieben - gleich nach der Generierung durch die gegenwärtige Katalase wieder abgebaut.

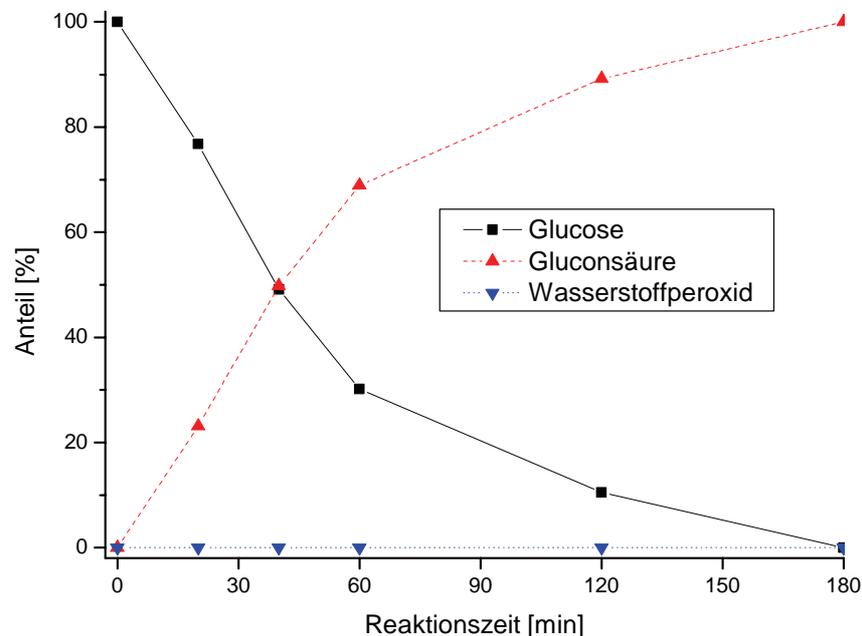


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Oxidation von Glucose mit technischer GOD (ASA).

Das technische Produkt mit einem hohen Katalaseanteil liefert trotz eines vollständigen Umsatzes der Glucose kein bleichaktives Wasserstoffperoxid und auch das gereinigte Produkt (GOD Serva) mit einem Katalaseanteil von weniger als 0,05 % liefert nur 40 % der möglichen Peroxidmenge (**Tabelle 24**).

Enzym	gebildete Produkte [g/l]		Ausbeute [%]	Verhältnis GOD : Katalase (Herstellerangaben)
GOD (Serva) 0,5 g/l	Gluconsäure	21,7	99,6	> 2000
	H ₂ O ₂	1,53	40,6	
GOD G-29 [®] (ASA) 5,0 g/l	Gluconsäure	21,4	98,3	10
	H ₂ O ₂	0	0	

Tabelle 24: Umsatz von 20 g/l Glucose mit verschiedenen Glucoseoxidasen (pH = 5, T = 38 °C, t = 3 h).

Die Verwendung des technischen Produktes (GOD, ASA) macht bzgl. der Generierung von H₂O₂ wegen der hohen Katalasenebenaktivität keinen Sinn. Das gereinigte Produkt (GOD, Serva) ist im Moment noch viel zu kostspielig für einen ökonomisch vertretbaren Prozess. Allerdings ließen sich mit den bereits erreichten Peroxidkonzentrationen von ca. 1,5 g/l in simulierten Bleichprozessen Weißgrade (nach Berger) von 65 erreichen, die für Farbwaren ausreichend sind.

Angesichts der besprochenen Problematik wurde in der zweiten Projektphase am DTNW eine andere Strategie zur Senkung der Katalasenebenaktivität verfolgt. Katalasen werden durch bestimmte Anionen inhibiert, indem das aktive Zentrum durch eine Komplexierung des Eisenkerns deaktiviert wird. Gelänge eine partielle Deaktivierung der Katalase im GOD/Katalasegemisch bräuchte eine präparative Trennung der beiden Enzyme nicht durchgeführt werden.

In einer Studie wurde der enzymatisch-katalysierte Abbau von Wasserstoffperoxid mit Katalase in Gegenwart der Anionen Azid N₃⁻ untersucht. Unter den gegebenen Bedingungen vermögen schon kleine Mengen Katalase, das angebotene Wasserstoffperoxid schnell und vollständig zu Wasser und Sauerstoff zu disproportionieren. Dies äußert sich durch eine starke Blasenbildung in der Reaktionslösung durch entweichenden Sauerstoff. Fügt man der Enzymlösung Salze der o.g. Spezies zu und gibt das Peroxid erst nach einer definierten Inkubationszeit hinzu, so wird in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration die Abbaureaktion unterdrückt. Wie man in **Abbildung 26** sieht, werden bei einer Konzentration von etwa 3,0 mmol/l Azid unabhängig von der Reaktionszeit (5 min oder 4 h) nur noch ca. 10 % des vorhandenen Wasserstoffperoxids abgebaut. Die Katalaseaktivität kann also mit geringen

Azidkonzentrationen fast vollständig beseitigt werden. Einen vergleichbaren Effekt erzielt man mit etwa der zehnfachen Menge Rhodanid SCN^- . An realen technischen GOD-Präparaten zeigte sich allerdings, dass auch die GOD-Aktivität von den Anionen gesenkt wird, so dass hier weitere Untersuchungen folgen müssten. Dabei sollten auch andere Inhibitoren getestet werden, nachdem sich Nitrit bereits als wenig effektiv erwies. In Absprache mit der DBU wurden die Versuche allerdings eingestellt, da eine befriedigende Lösung des Problems in der Projektrestlaufzeit für wenig wahrscheinlich angesehen wurde.

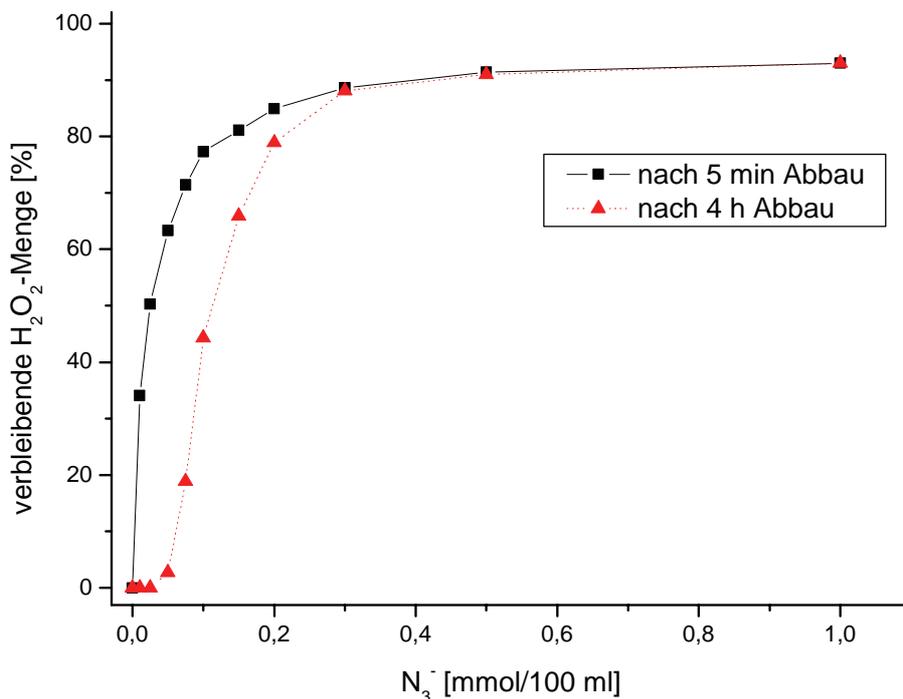


Abbildung 26: Enzymatischer Abbau von Wasserstoffperoxid mit Katalase in Gegenwart von Natriumazid ($t(\text{Inkubation}) = 5 \text{ min}$, $t(\text{Reaktion}) = 5 \text{ min}$ bzw. 4 h , $c(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Start}} = 3,0 \text{ g/l}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH-Wert} = 7$, $V = 50 \text{ ml}$, $m(\text{Katalase}) = 10 \text{ mg}$).

4.3 Praxisversuche im Industriemaßstab

Das Hauptziel des Projektes war die Entwicklung einer innovativen und umweltentlastenden Verfahrenstechnik zur kombinierten enzymatischen Vorbehandlung von Baumwolle. Folgerichtig wurde der Übertragbarkeit der im Labor gesammelten Ergebnisse auf die industrielle Praxis eine besondere Bedeutung beigemessen. Dem entsprechend wurden in der dritten Phase der Projektlaufzeit Praxisversuche bei der

Textilveredlung an der Wiese in Lörrach durchgeführt, die im Folgenden dokumentiert werden.

4.3.1 Kombination von Entschlichtung und der Entfernung von Baumwollbegleitsubstanzen

In dem F&E-Projekt sollte das alkalische Abkochen durch eine enzymatisch-katalysierte Alternative substituiert werden, die nach Möglichkeit in einer Prozessstufe durchgeführt werden kann. Daher wurden Praxisversuche an geschlichteter Rohbaumwolle realisiert - zum einem im üblicherweise praktizierten KKV-Verfahren, aber in Anlehnung an die Technikumsversuche auch im Industriejigger.

Beim KKV-Verfahren wurde das Gewebe mit einer Enzymflotte imprägniert. Neben der zum Entschlichten genutzten α -Amylase wurde im Versuch 2 die Pektinase Beisol DHP und im Versuch 3 zusätzlich noch die Cellulase Beizym UL verwendet. Der pH-Wert lag bei 5. Vergleichend wurde eine klassische Entschlichtung allein mit α -Amylase mit einem anschließenden Abkochprozess durchgeführt (Versuch 1)

Die Ware wurde nach dieser Behandlung zunächst nur anhand ihres Entschlichtungsgrades (**Tabelle 25**) und ihrer Benetzbarkeit (**Tabelle 26**) charakterisiert.

Verfahren	Probe		Note
KKV	1	klassisch entschlichtet	6
	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	7-8
	2	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	7
	3	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	6
Original			1

Tabelle 25: Entschlichtungsgrad (TEGEWA-Jodtest) von unterschiedlich im KKV-Verfahren behandelter Baumwolle.

Alle Versuche führten zu einem Entschlichtungsgrad von mindestens 6, der für eine Weiterverarbeitung ausreichend ist. Durch das alkalische Abkochen wird die beste Note von 7 - 8 erzielt, aber auch die Behandlung 2 mit Amylase und Pektinase liefert

ein sehr gutes Ergebnis (Note 7). Eine zusätzliche Verwendung von Cellulase (Versuch 3) führt zu keiner Verbesserung (Note 6).

Verfahren	Probe		Trocknung	Tropfeneinsinkzeit [s]	
KKV	1	klassisch entschlichtet	RT	18	
			SR	37 - > 600	
	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	RT	2 - 3	
			SR	2 - 3	
	2	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	RT	27	
			SR	286	
	3	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	RT	18	
			SR	> 600	
	Original			-	> 600

Tabelle 26: Benetzbarkeit (TEGEWA-Tropftest) von unterschiedlich im KKV-Verfahren behandelte Baumwolle (RT = Trocknung bei Raumtemperatur, SR = Trocknung im Spannrahmen).

Bzgl. der Benetzbarkeit der behandelten Baumwolle, die mittels des TEGEWA-Tropftests bestimmt wurde, ergaben sich große Unterschiede. Die Ergebnisse hängen zum einen - wie bereits erwähnt - von der Art der Trocknung ab, wobei die Spannrahmentrocknung der üblichen Praxis entspricht. Zum anderen hat die Art der Behandlung entscheidenden Einfluss auf die Güte der Benetzbarkeit. Das mit Abstand beste Ergebnis liefert die konventionelle Behandlung einschließlich des alkalischen Abkochens. Bei den rein enzymatischen Verfahren ergab sich bei Versuch 2, wie auch schon beim Entschlichtungsgrad, die beste Hydrophilie.

Zum Vergleich mit den im Labor- und Technikumsmaßstab durchgeführten Versuchen wurden darüber hinaus Versuche im Industriejigger durchgeführt. Die Entschlichtungsgrade und Tropfeneinsinkzeiten der unterschiedlich behandelten Baumwolle werden in

Tabelle 27 und **Tabelle 28** vorgestellt.

Verfahren	Probe		Note
Jigger	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	7-8
	2a	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	6
	2b	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	6
	3a	AP: α -Amylase (pH 5), Pektinase (pH 8)	5
	3b	ACP: α -Amylase, Cellulase (pH 5), Pektinase (pH 8)	6
Original			1

Tabelle 27: Entschlichtungsgrad (TEGEWA-Jodtest) von unterschiedlich im Jigger behandelte Baumwolle.

Wie beim KKV-Verfahren liefert hier die klassische Behandlung mit einem Entschlichtungsgrad von 7 - 8 das beste Ergebnis. Die rein enzymatischen Versuche führen zu Noten von 5 - 6.

Verfahren	Probe		Trocknung	Tropfen-einsinkzeit [s]	
Jigger	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	RT	7 - 8	
			SR	120 - > 600	
	2a	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	RT	11	
			SR	> 600	
	2b	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	RT	7	
			SR	378	
	3a	AP: α -Amylase (pH 5), Pektinase (pH 8)	RT	8	
			SR	125 - > 600	
	3b	ACP: α -Amylase, Cellulase (pH 5), Pektinase (pH 8)	RT	10	
			SR	133 - > 600	
	Original			-	> 600

Tabelle 28: Benetzbarkeit (TEGEWA-Tropftest) von unterschiedlich im Jigger behandelte Baumwolle (RT = Trocknung bei Raumtemperatur, SR = Trocknung im Spannrahmen).

Bzgl. der Benetzbarkeit lassen sich keine generellen Trends erkennen. Alle im Jigger durchgeführten Versuche führen zu ähnlichen Tropfeneinsinkzeiten, wobei die spannrahmengetrocknete Ware grundsätzlich wieder schlechter abschneidet. Die Ergebnisse aus den Technikumsversuchen werden nur teilweise bestätigt. So wäre das beste Ergebnis bei der Prozessführung III, die dem Industrieversuch 3b entspricht, zu erwarten gewesen (vgl. **Abbildung 23** und **Tabelle 23**, S. 68/69). In der Praxis zeigte sich jedoch, dass die Benotungen unabhängig von den verwendeten Enzymen und der Prozessführung nahezu gleich sind, so dass für die Realisierung in jedem Fall das einfachste Verfahren zu bevorzugen wäre, also die Variante 2a, bei der nur die Pektinase der α -Amylase zugeführt wird und kein pH-Wert-Wechsel stattfindet.

4.3.2 Heißbleiche der enzymatisch behandelten Baumwolle

Die klassische Baumwollvorbehandlung ist in der Regel mit dem alkalischen Abkochen nicht abgeschlossen, da die farbgebenden Komponenten der Baumwolle (Chromophore, Pigmente) hierdurch nicht beseitigt werden. Daher wird nahezu in allen Fällen eine Bleichstufe angeschlossen, bei der ein Weißgrad (nach Stensby) von mindestens 90 erzielt werden soll.

Dem entsprechend wurden die zuvor unterschiedlich - d.h. klassisch oder rein enzymatisch - behandelten Baumwollgewebe einer Heißbleiche unterzogen wurden, bei der auch der Entschlichtungsgrad und die Benetzbarkeit weiter verbessert werden.

Wie man

Tabelle 29 entnehmen kann, steigt die TEGEWA-Jodtest-Note in allen Fällen um etwa eine Note, so dass man auch bei den rein enzymatischen Verfahren zu exzellenten Ergebnissen gelangt. Mit einer Note von 8 ist das Ergebnis für das enzymatische KKV-Verfahren mit α -Amylase und Pektinase (KKV 2) nur geringfügig schlechter als die klassische Prozedur (KKV 1).

Verfahren	Probe		Note
KKV	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	8-9
	2	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	8
	3	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	7-8
Jigger	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	7-8
	2a	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	6-7
	2b	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	6-7
	3a	AP: α -Amylase (pH 5), Pektinase (pH 8)	5-6
	3b	ACP: α -Amylase, Cellulase (pH 5), Pektinase (pH 8)	6
Original			1

Tabelle 29: Entschlichtungsgrad von unterschiedlich behandelte Baumwolle (TEGEWA-Jodtest) nach einer Heißbleiche.

Besonders drastische Auswirkungen hat die Heißbleiche auf die Benetzbarkeit (**Tabelle 30**). Hydrophobe Rückstände, die durch die enzymatische Vorbehandlung in der Entschlichtungsstufe noch nicht mobilisiert wurden, werden offensichtlich durch die anschließende Heißbleiche entfernt, so dass die Benetzbarkeit aller rein enzymatisch vorbehandelten Proben mit der der klassischen Verfahren vergleichbar ist; die Verfahren, bei denen α -Amylase und Pektinase bei einem pH-Wert von 5 eingesetzt wurden, liefern hier sogar bessere Ergebnisse als bei den Baumwollgeweben, die zuvor konventionell entschlichtet und alkalisch abgekocht wurden.

Verfahren	Probe		Tropfeneinsinkzeit [s]
KKV	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	$3 / 3 / 3 / 3 / 3 = 3$
	2	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	$1 / 1 / 1 / 1 / 1 = 1$
	3	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	$2 / 2 / 2 / 2 / 2 = 2$
Jigger	1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	$2 / 2 / 2 / 2 / 2 = 2$
	2a	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	$< 1 / < 1 / < 1 / 1 / 1 = < 1$
	2b	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	$3 / 2 / 1 / 1 / 1 = 1,6$
	3a	AP: α -Amylase (pH 5), Pektinase (pH 8)	$2 / 2 / 2 / 2 / 2 = 2$
	3b	ACP: α -Amylase, Cellulase (pH 5), Pektinase (pH 8)	$2 / 3 / 4 / 3 / 3 = 3$

Tabelle 30: Benetzbarkeit (TEGEWA-Tropftest) von unterschiedlich behandelter Baumwolle nach einer Heißbleiche.

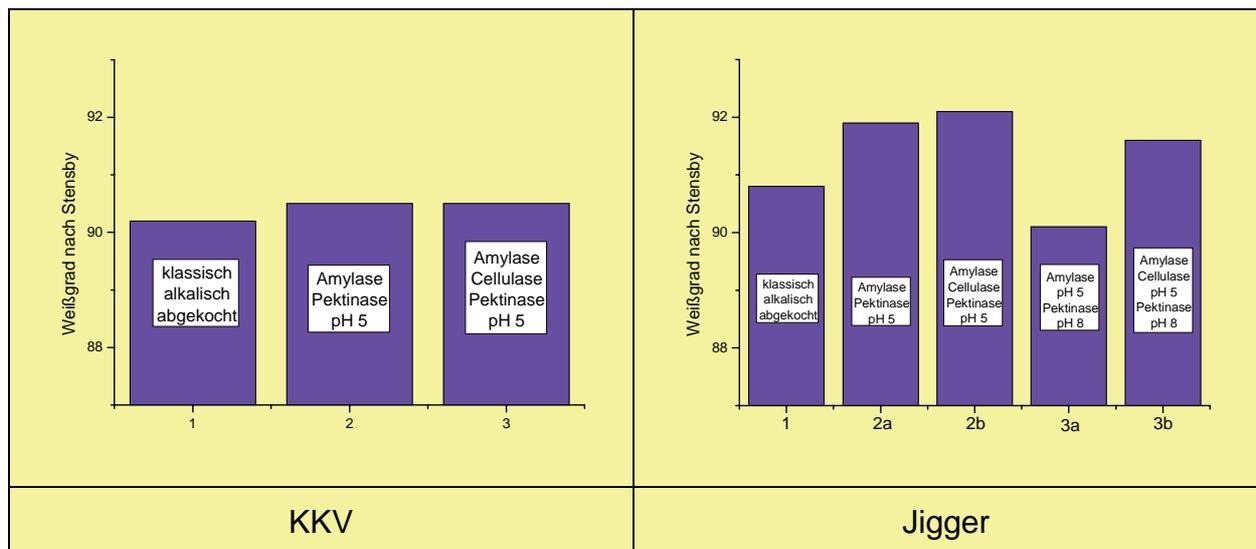


Abbildung 27: Weißgrad (nach Stensby) von unterschiedlich behandelter Baumwolle nach einer Heißbleiche.

In **Abbildung 27** werden die Weißgrade (nach Stensby) der unterschiedlich behandelten Baumwollgewebe nach der Heißbleiche dargestellt. Alle Proben erzielen einen ausgezeichneten Weißgrad von mehr als 90, wobei auch hier - sowohl im KKV-Verfahren als auch nach einer Jiggerbehandlung - die höchsten Werte bei den rein enzymatischen Prozeduren erreicht werden.

Da die Vorbehandlung - insbesondere das unspezifische alkalische Abkochen - auch direkten Einfluss auf das Gewicht und die mechanischen Eigenschaften der Baumwolle nimmt, wurden diese für die im praxisrelevanten KKV-Verfahren behandelten Proben bestimmt.

Der Gewichtsverlust der Vorbehandlung (**Tabelle 31**) resultiert in erster Linie aus der Entfernung der Stärkeschichte und der Entfernung der unerwünschten Baumwollbegleitsubstanzen. Darüber hinaus führt eine Alkalibehandlung allerdings auch zu einer partiellen Hydrolyse der Cellulose, die das Gewebe schwächt.

Probe		Flächengewicht	
		[g/m ²]	rel. [%]
1	klassisch entschlichtet und alkalisch abgekocht	166	- 11,2
2	AP: α -Amylase, Pektinase (pH 5)	172	- 8,0
3	ACP: α -Amylase, Cellulase, Pektinase (pH 5)	170	- 9,1
Original		187	-

Tabelle 31: Flächengewichte von unterschiedlich behandelter Baumwolle nach der gesamten Vorbehandlung incl. der Heißbleiche.

Wie zu erwarten war, verzeichnete die klassisch vorbehandelte Ware den höchsten Gewichtsverlust. Das Flächengewicht sank von 187 g/m² um 11,2 % auf 166 g/m². Beim enzymatischen Verfahren mit α -Amylase und Pektinase sank das Flächengewicht dagegen nur um lediglich 8,0 %. Beim zusätzlichen Einsatz von Cellulase, die auch die Faserstruktur der cellulosischen Baumwolle oberflächlich angreift, liegt der Gewichtsverlust mit 9,1 % etwas höher, aber immer noch deutlich unter dem Wert für die klassische Variante, bei der alkalisch abgekocht wurde.

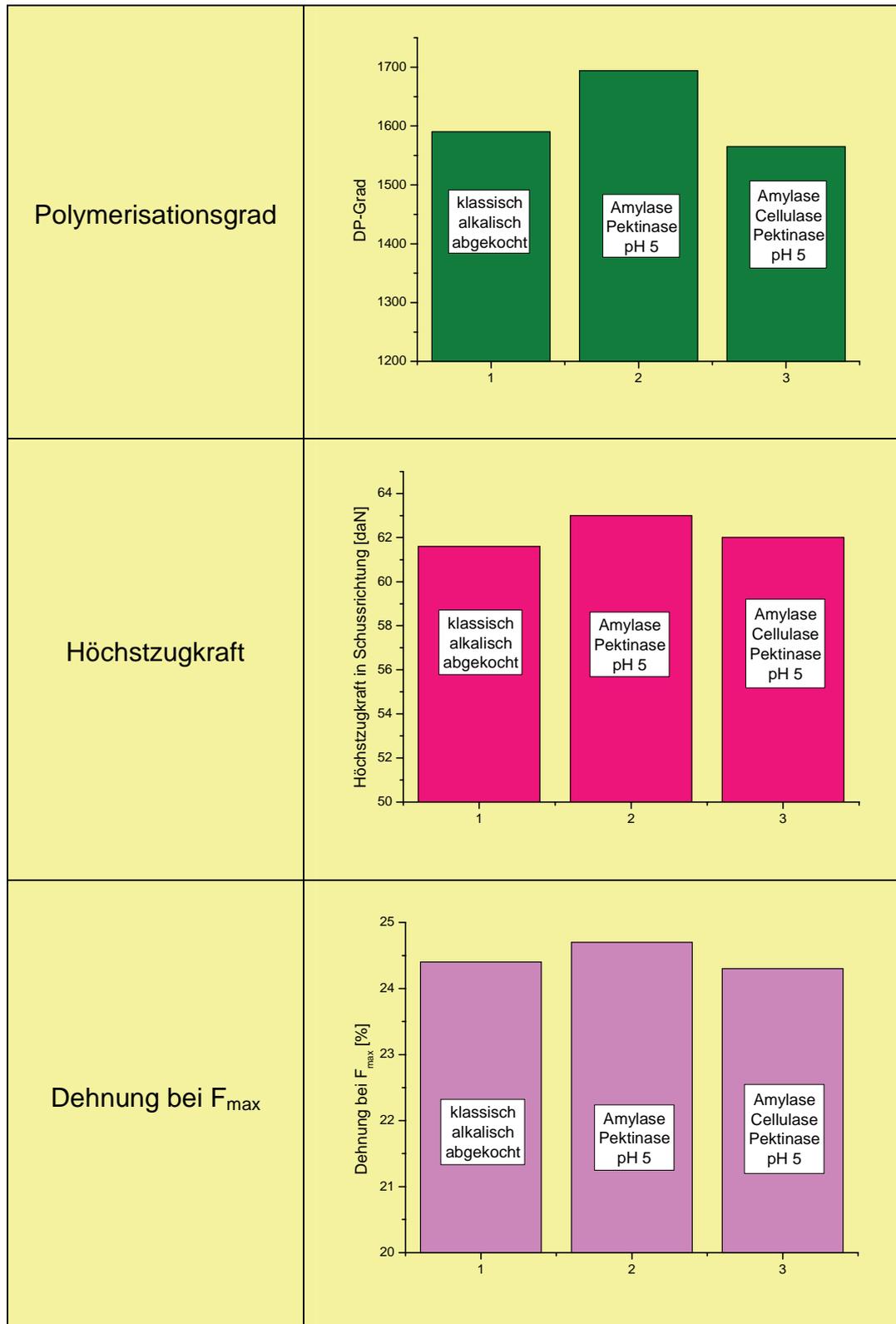


Abbildung 28: Polymerisationsgrad DP (nach DIN 54270-T3) und Festigkeit (nach DIN 53857 1, Streifenzugversuch) von unterschiedlich behandelter Baumwolle nach einer Heißbleiche.

Die unterschiedliche Schwächung des Gewebes durch die jeweilige Vorbehandlung zeigt sich am deutlichsten in den mechanischen Eigenschaften der Ware. In **Abbildung 28** werden die Ergebnisse von Polymerisationsgradbestimmungen und Streifenzugversuchen vorgestellt. Die jeweils besten mechanischen Eigenschaften lieferte das rein enzymatische Verfahren 2, bei der weder eine alkalische Hydrolyse durch Natronlauge noch eine enzymatisch-katalysierte Hydrolyse durch die Cellulase stattgefunden hat.

4.3.3 Färberei der enzymatisch behandelten Baumwolle

Neben den zuvor genannten Parametern für die Beurteilung einer Vorbehandlung von Baumwolle gilt die Anfärbbarkeit der Ware als wichtiges Kriterium für deren Güte, da ein Großteil der Ware nicht als Weißware sondern gefärbt weiterverarbeitet wird. Daher wurden Teile der verschieden vorbehandelten Warenbahnen einer repräsentativen Färbung in einem Mittelgrauton unterzogen. Die Muster wurden anschließend jeweils links, in der Mitte und rechts farbmetrisch untersucht.

Verfahren	Behandlung		Position	ΔE	Beurteilung
KKV	1	klassisch entschlichtet, alkalisch abgekocht + gebleicht	links	0,43	sehr gut
			Mitte (Referenz)	0	-
			rechts	0,43	sehr gut
	2	AP + gebleicht	links	0,37	sehr gut
			Mitte	0,55	gut
			rechts	0,59	gut
	3	ACP + gebleicht	links	0,24	sehr gut
			Mitte	0,69	gut
			rechts	0,21	sehr gut

Tabelle 32: Farbabstand ΔE (D65/10) von verschiedenen im KKV-Verfahren vorbehandelten Baumwollproben im Vergleich zur klassisch vorbehandelten Baumwolle nach der Färbung in einem Mittelgrauton (Beurteilung: 0 - 0,5 sehr gut, 0,5 - 0,8 gut, 0,8 - 1,0 mäßig, > 1,0 schlecht).

Zur Charakterisierung der Färbung wurden die farbmtrischen Ergebnisse mit dem Ergebnis der klassisch vorbehandelten und gefärbten Ware (Mitte) verglichen. Die Abweichungen zu diesem Standard werden in **Tabelle 32** aufgeführt. Vereinfachend wird hier nur der wichtigste Parameter - der Farbabstand ΔE - angegeben, wobei eine Differenz von weniger als 0,5 vom menschlichen Auge nicht mehr wahrgenommen werden kann. Ein Wert zwischen 0,5 und 0,8 gilt immer noch als gut. Die Messergebnisse zeigen, dass alle Muster gut bis sehr gut im Vergleich zur Standardware durchgefärbt wurden. Berücksichtigt man darüber hinaus, dass auch bei der klassisch vorbehandelten Ware an den Rändern Abweichungen von bis zu 0,5 zur Referenz in der Mitte auftreten, so ergibt sich daraus, dass die rein enzymatisch vorbehandelte Ware keinen signifikanten Unterschied im Farbabstand zur konventionell vorbehandelten Ware aufweist.

5 Vergleich eines enzymatischen Verfahrens mit einer konventionellen Baumwollvorbehandlung durch eine ökonomisch-ökologische Analyse

In einem durchschnittlichen deutschen mittelständischen Textilveredlungsbetrieb werden täglich rund 35.000 Laufmeter Baumwolle vorbehandelt - fast ausschließlich nach dem KKV-Verfahren, so dass sich die folgenden Berechnungen allein auf dieses Verfahren beziehen. Bei einer durchschnittlichen Warenbreite von 1,70 m und einem durchschnittlichen Warengewicht von 150g/m^2 sowie 230 Arbeitstagen ergeben sich somit etwa 2.000 t Baumwolle pro Jahr.

Das alkalische Abkochen, **auf das bei gleicher Warenqualität nach der kompletten enzymatischen Vorbehandlung incl. Bleiche vollständig verzichtet werden kann**, wird vom Veredler bei der konventionellen Prozedur mit etwa 0,24 €/kg Baumwolle (bzw. 0,06 €/Laufmeter) veranschlagt. Diese Kalkulation beinhaltet sämtliche Energie-, Wasser-, Chemikalien- und Personalkosten sowie die Abschreibungen der Maschinen.

Aus diesen Eckdaten ergeben sich für das alkalische Abkochen jährliche Kosten von etwa 480.000 €. Demgegenüber stehen die Kosten für die in dem enzymatischen Alternativverfahren zusätzlich verwendete Pektinase Beisol DHP mit einem Preis von 3,50 €/kg Enzymformulierung, wobei die Pektinase ohne einen zusätzlichen Arbeitsschritt einfach im Foulardierprozess mit der Amylasegabe kombiniert werden kann. Bei einer Flottenaufnahme von nahezu 100 % bei der Enzymimprägnierung (Klotzen) und einem Pektinasebedarf von 4 ml/l und einer Dichte des Produkts von nahezu 1 kg/l benötigt man für 2.000 t Baumwolle dementsprechend 8.000 kg Enzym zu einem Preis von etwa 28.000 €. (0,014 €/kg Baumwolle).

Letztlich ergibt sich somit für den mittelständischen Textilveredler ein jährliches Kosteneinsparpotential von etwa 450.000 €

Des Weiteren ist das kombinierte enzymatische Verfahren durch das Wegfallen einer kompletten Behandlungsstufe mit einer deutlichen Verkürzung des Gesamtprozesses verbunden, wodurch sich die Produktivität bei gleichem Personalbedarf steigern lässt, so dass sich die Vorbehandlungskosten weiter reduzieren.

Aus ökologischer Sicht erweist sich das kombinierte enzymatische Vorbehandlungsverfahren ebenfalls als äußerst attraktiv. Beim konventionellen Verfahren werden bis zur abschließenden Bleiche etwa 15 Brauchwasser pro kg Baumwolle benötigt (1 l Klotzen, 8 l Waschen, 3 l alkalisches Abkochen und nochmals 3 l Waschen). Das enzymatische Verfahren benötigt dagegen nur 9 l, da das alkalische Abkochen und die zusätzliche Waschstufe wegfallen. **Dies entspricht einer Brauch- und Abwasserersparnis von 40 %.** Bei einer Jahresproduktion von etwa 2.000 t Baumwolle ergibt sich demnach ein verringerter Wasserbedarf von 12.000 m³.

Darüber hinaus findet das alkalische Abkochen und der folgende Wasch- und Spülprozess bei Temperaturen nahe dem Kochpunkt von Wasser statt, so dass sich hieraus zusätzlich ein hohes Potential zur Energieeinsparung ergibt. Wegen der hohen Wärmekapazität von Wasser benötigt man zur Erhitzung von einem Liter etwa 10 °C kühlem Brauchwasser auf die Prozesstemperatur von 98 °C einen Energieeintrag von 368,3 kJ. **Bei einem verringerten Heißwasserbedarf von 12.000 m³ können somit jährlich etwa 4.420 GJ bzw. 1,23 Mio. kWh eingespart werden (ohne Wärmerückgewinnung und -verluste).** Diese Energiemenge entspricht je nach Energiequelle einer Kohlendioxidemission von etwa 230 - 500 t bezogen auf eine vollständige Verbrennung von Erdgas mit einem günstigen Kohlenstoff/Wasserstoff-Verhältnis (0,19 kg CO₂/kWh, geringe CO₂-Intensität) bzw. von Braunkohle mit einem ungünstigen Kohlenstoff/Wasserstoff-Verhältnis (0,41 kg CO₂/kWh, hohe CO₂-Intensität).

Des Weiteren werden beim alkalischen Abkochen neben dem Verbrauch von Hilfsmitteln vor allem etwa 25 g NaOH/l Flotte bzw. etwa 75 g NaOH/kg Baumwolle eingesetzt. **Bei einer Jahresproduktion von 2.000 t sind dies 150 t NaOH, auf die im alternativen enzymatischen Verfahren verzichtet werden kann, so dass die Salzfracht im Abwasser um den entsprechenden Betrag verringert werden könnte.**

Zusammenfassend wird in **Tabelle 33** das ökonomische und ökologische Einsparpotential des von den Projektpartnern entwickelten enzymatischen Verfahrens im Vergleich zur konventionellen Prozedur dargestellt, welches sich aus dem Verzicht auf das alkalische Abkochen durch den Einsatz von Pektinasen in der Entschlich-

tungsstufe ergibt, wobei die Warenqualität nach einer anschließenden Bleiche in jeder Hinsicht gleichwertig ist.

Kosten	226,-- €
Wasserbedarf	6.000 l
Energie	2,21 GJ bzw. 615 kWh
CO ₂	115 - 250 kg
NaOH	75 kg

Tabelle 33: Einsparpotential bei Anwendung des kombinierten Einsatzes von α -Amylasen und Pektinasen gegenüber der konventionellen Baumwollvorbehandlung (Entschlichtung mit α -Amylasen und alkalisches Abkochen) bezogen auf eine Tonne Baumwolle.

Die Angaben beziehen sich auf die Vorbehandlung jeweils einer Tonne Baumwolle, so dass ein interessierter textilveredelnder Betrieb die Zahlen leicht auf seine Produktionsmenge übertragen kann.

6 Diskussion

Im Verlaufe des dreijährigen Projektes konnte eine erfolgreiche Strategie zum kombinierten Einsatz von α -Amylase und Pektinase in der Baumwollvorbehandlung entwickelt werden.

Dabei werden die pektinspaltenden Enzyme der Entschlichtungsflotte zugeführt, so dass die Entschlichtung stattfinden kann, während gleichzeitig die Entfernung unerwünschter Baumwollbegleitstoffe derartig vorbereitet wird, dass sie letztlich in einer Bleichstufe gänzlich mobilisiert und von der Baumwolle entfernt werden können.

Die zunächst im Labor- und Technikumsmaßstab gesammelten Ergebnisse konnten in der letzten Projektphase erfolgreich auf den Einsatz im großtechnischen Maßstab übertragen werden. Dabei zeigte sich, dass die enzymatisch vorbehandelte Ware nach einer Bleiche die gleichen oder sogar bessere Qualitätsmerkmale aufweist als eine konventionell entschlichtete und alkalisch abgekochte Ware.

Parameter	Ware	
	klassische Behandlung	kombinierte enzymatische Behandlung
Entschlichtungsgrad	8 - 9	8
Tropfeneinsinkzeit [s]	3	1
Flächengewicht [g] (Abnahme zur Rohware)	166 (- 11,2 %)	172 (- 8,0 %)
Weißgrad (Stensby)	90,2	90,5
Höchstzugkraft [daN]	61,6	63,0
Dehnung bei F_{\max} [%]	24,4	24,7
DP-Grad	1590	1694
Farbabstand nach Färbung	0 - 0,43	0,37 - 0,59

Tabelle 34: Verschiedene Parameter von Baumwolle, die im KKV-Verfahren enzymatisch vorbehandelt wurde, im Vergleich zu klassisch entschlichteter und alkalisch abgekochter Ware (nach einer Heißbleiche).

In **Tabelle 34** werden verschiedene, für den Textilveredler relevante Parameter der unterschiedlich im KKV-Verfahren behandelte Baumwollwaren zusammengefasst. Wie man sieht, unterscheiden sich die Messwerte für den kombinierten Enzym-einsatz nur geringfügig von denen der klassischen Behandlung, die das ökologisch bedenkliche alkalische Abkochen beinhaltet, bzw. sind in den meisten Fällen sogar besser, was insbesondere für die mechanischen Eigenschaften gilt, da eine Schwächung der Baumwolle durch eine alkalische Hydrolyse der β -1,4-Bindungen der Cellulose durch NaOH vermieden wird.

Dies bedeutet wiederum, dass durch den kombinierten Einsatz von α -Amylasen und Pektinasen auf das alkalische Abkochen gänzlich verzichtet werden kann, ohne Kompromisse beim Vorbehandlungsergebnis in Kauf nehmen zu müssen. Weder das Benetzungsverhalten, noch der Weißgrad und die Anfärbbarkeit der gebleichten Ware sind schlechter als bei einer konventionell vorbehandelten Baumwolle, wobei es gleichzeitig zu einer deutlich geringeren Schädigung des Gewebes kommt.

Die Einsparung eines Teilprozesses hat eine Einsparung von Zeit, Hilfschemikalien, Energie und vor allem von Brauchwasser zur Folge. Daraus ergeben sich sowohl ökonomische als auch ökologische Vorteile für den Anwender, die bereits in **Kapitel 5** beschrieben wurden (s. **S 84-86**).

Über das Hauptziel des Projektes hinaus, konnten an der TUHH extremophile Lipasen aus unterschiedlichen Bakterienstämmen hergestellt werden, die über eine hohe Aktivität bzgl. der Hydrolyse von verschiedenen Fetten unterschiedlicher Kettenlänge verfügen. Des Weiteren sind diese Lipasen über einen weiten Temperatur- und pH-Wert-Bereich stabil. Ihre Empfindlichkeit gegenüber Calcium- und Magnesiumkationen schloss allerdings eine Verwendung in dem angestrebten Prozess aus, da diese Ionen im Prozesswasser enthalten sind und zusätzlich über den natürlichen Calcium- und Magnesiumgehalt der Ware in die Behandlungsflotte eingetragen werden.

Als Teilziel des Projektes wurde eine Weiterverwertung einer nach einer Entschlichtung mit Amyloglucosidase glucosehaltigen Behandlungsflotte in der Bleichstufe angestrebt. Das Problem, dass technische GOD-Präparate immer Katalase enthalten, welches bei der Glucoseoxidation entstandenes bleichaktives Wasserstoffperoxid unmittelbar zerstört, konnte im Verlaufe des Projektes nicht gelöst werden. Es wurden Untersuchungen zur selektiven Inhibierung von Katalase in technischen GOD-Katalase-Präparaten durchgeführt. Verschiedene anorganische Anionen sind in der Lage, die Aktivität von Katalase nachhaltig zu senken. Da aber auch die Glucoseoxidase von den untersuchten Spezies inhibiert wird, ist die vorgeschlagene selektive Inhibierung von Katalase noch nicht geglückt. Hier bedarf es weiterer Forschung.

7 Öffentlichkeitsarbeit

Gemäß den Richtlinien der DBU wurde am 29.04.2004 in Lörrach ein Statusseminar abgehalten. Am 23.03.2005 fand in Osnabrück ein Abschlussseminar zur Präsentation der erzielten Resultate statt. Des Weiteren sollen die Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt in der einschlägigen Fachliteratur veröffentlicht werden. Darüber hinaus wird der Abschlussbericht in einer verkürzten Form als DTNW-Mitteilung publiziert.

8 Fazit

In dem dreijährigen von der DBU geförderten Forschungsvorhaben haben die Projektpartner DTNW, CHT, TUHH und TV a.d.W. gemäß der anfänglichen Zielsetzung eine Verfahrenstechnik zum kombinierten Einsatz von Enzymen in der Baumwollvorbehandlung entwickelt.

Dabei wurde die Partnerstruktur im Vorfeld so gewählt, dass ein ausgewogenes Verhältnis aus Forschungseinrichtungen, Enzym- und Hilfsmittelherstellern sowie Anwendern vorhanden war, die die Umsetzung der Fragestellungen vom Labormaßstab in die industrielle Praxis gewährleistete. Gemäß dem Projektantrag wurden die Labor- und Technikumsversuche sowie die textilspezifischen Untersuchungen überwiegend am DTNW und bei der CHT durchgeführt. Die TUHH beschäftigte sich mit der Herstellung und Reinigung von extremophilen Lipasen. Die Überführung der gesammelten Ergebnisse in die großtechnische Praxis wurde in Absprache aller Projektpartner bei der TV a.d.W. durchgeführt.

Die Zusammenarbeit der Partner erwies sich dabei als fruchtbar und die durchgeführte Vorgehensweise hat sich bewährt, so dass im Verlaufe des Projektes nahezu alle gesteckten Ziele erfüllt werden konnten.

Das von den Projektpartnern entwickelte Verfahren ermöglicht einem textilveredelnden Betrieb die Einsparung eines kompletten ökologisch bedenklichen Arbeitsschrittes - dem alkalischen Abkochen in der Baumwollvorbehandlung - und ist mit einer Vielzahl von ökologischen aber auch ökonomischen Vorteilen verbunden.

Aus dem erfolgreichen Projekt ergeben sich neue Aufgabenstellungen für die Zukunft, wie etwa die Einbeziehung der vorgeschalteten Entmineralisierung in den Entschlichtungsprozess durch den Einsatz von säureresistenten α -Amylasen sowie die Generierung potentieller Einsatzgebiete der von der TUHH entwickelten thermophilen Lipasen. Die richtungsweisenden Versuche zur selektiven Inhibierung von Einzelaktivitäten in Enzymmischungen sollten ebenfalls konkretisiert werden.

9 Literatur

- [1] N. N., Reference Document on Best Available Techniques for the Textiles Industry, European Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) Bureau, European Commission, August 2002.
- [2] Uhlig, H.: Enzyme arbeiten für uns; C. Hanser Verlag; München 1991
- [3] Ruttloff, H.: Industrielle Enzyme; Behr's Verlag; Hamburg 1994 (ISBN 3-86022-126-4).
- [4] D. Marcher, H.A. Hagen, S. Castelli, Entschlichten mit Enzymen, ITB Veredlung **39** (1993) 3, 20-32.
- [5] Ratgeber für Cellulosefasern - Schlichten, Vorbehandeln, Färben, BASF, Ludwigshafen.
- [6] L.S. Meyer-Stork, Enzymanwendungen in der Textilindustrie: Möglichkeiten,- Grenzen - Potenziale, Maschen-Industrie **52** (2002) 5, 32-35.
- [7] M.L. Gulrajani, Degumming of Silk, Rev. Prog. Coloration **22** (1992), 79-82.
- [8] S. Fornelli, Eine Art von IQ für Enzyme - Enzymatisches Behandeln von Proteinfasern, Melliand Textilber. **75** (1994) 120-125.
- [9] A.B. Kundu, B.S. Ghosh, S.K. Chakrabarti, B.L. Ghosh, Enhanced Bleaching and Softening of Jute by Pretreatment with Polysaccharide Degrading Enzymes, Textile Res. J. **61** (1991) 12, 720-723.
- [10] M.-Y. Yoon, J. Kellis, A.J. Poulou, Enzymatic Modification of Polyester, AATCC Review **2** (2002) 6, 33-36.
- [11] K. Opwis, Aspekte zu enzymatischen Verfahren in der Textilveredlung, Konferenz-Einzelbericht: Avantex 2000, Internat. Symp. for High-Tech Apparel Textiles and Fashion, Frankfurt, Germany, 27.-29. Nov. 2000.
- [12] M. Tauber, G. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, Enzymatic Treatment of Acrylic Fibers and Granulates, AATCC Review **1** (2001) 9, 17-19.
- [13] M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding, Analyt. Biochem. **72** (1976) 248-254.
- [14] U.K. Winkler, M. Stuckmann, Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. **138** (1979) 663-670.

- [15] Arbeitsgruppe „Textile Vorbehandlung“, Melliand Textilber. **8** (1987) 581-583.
- [16] Arbeitsgruppe „Textile Vorbehandlung“, Die Violettskala, ein Maßstab für die Beurteilung des Entschlichtungsgrades stärkegeschlichteter Gewebe, textil praxis international **36** (1981) 1331-1350.
- [17] K. Opwis, A. Kele, D. Knittel, E. Schollmeyer, Enzymatic Recycling of Starch-Containing Desizing Liquors, Starch **51** (1999) 10, 348-353.
- [18] G. Buschle-Diller, X.D. Yang, Enzymatic Bleaching of Cotton Fabric with Glucose Oxidase, Textile Res. J. **71** (2001) 5, 388-394.