

ENZYMATISCHE DEGRADATION VON
POLYESTERBASIERTEM SUBMIKROPLASTIK ZUR
REDUKTION VON PLASTIKABFÄLLEN IN KLÄRANLAGEN
UND GEWÄSSERN UND ZUR SIMULTANEN
PROZESSINTEGRIERTEN FASER- UND
ANLAGENREINIGUNG

Aktenzeichen: 35242/0-32

Projektstart: 01.02.2020

Laufzeit: 26 Monate

Emsdetten 2022



30. JUNI 2022

SCHMITZ TEXTILES GMBH + CO. KG
Hansestraße 87, 48282 Emsdetten

BAND

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	35242/01	Referat	32	Fördersumme	122.942
----	-----------------	---------	-----------	-------------	----------------

Antragstitel **Enzymatische Degradation von polyesterbasiertem Submikroplastik zur Reduktion von Plastikabfällen in Kläranlagen und Gewässern und zur simultanen prozessintegrierten Faser- und Anlagenreinigung**

Stichworte

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
26 Monate	01.02.2020	31.03.2022	

Abschlussbericht

Bewilligungsempfänger	Schmitz Textiles GmbH + Co. KG Hansestraße 87 48282 Emsdetten Deutschland	Tel	025721532300
		Fax	
		Projektleitung Ralf Bosse	

Bearbeiter

Kooperationspartner Hochschule Niederrhein
Forschungsinstitut für Textil und Bekleidung (FTB)
Richard-Wagner-Str. 97
41065 Mönchengladbach
Deutschland

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Für die Farb- und Funktionsgebung von Polyestergeräten für z.B. Sonnenschutzgewebe werden in großem Umfang Nassprozesse als diskontinuierliche Garn- oder Stückfärbung durchgeführt, wodurch es prozessbedingt zur Abgabe von 1-3 % Oligomeren bezogen auf das Fasergewicht ins Färbereiabwasser kommt. Diese kurzkettigen Verbindungen bilden Kristalle, die sich an der Faseroberfläche, den Apparaten und Rohrleitungen ablagern und darüber hinaus in das Prozessabwasser gelangen, wo sie als Submikroplastik (Oligomere und speziell die cyclischen Trimere) auftreten. Zur Reduzierung dieser Oligomere sind der Einsatz hoher Temperaturen, Chemikalien sowie Textilhilfsmittel notwendig. Eine Alternative zu üblichen chemischen Hilfsmitteln, die zur Reduktion von Oligomeren eingesetzt werden, kann der Einsatz von Enzymen, sog. Polyesterasen, sein. In diesem Vorhaben sollte daher ein innovatives und praxistaugliches enzymatisches Verfahren für die Entfernung von Oligomeren im Rahmen der PET-Färbung entwickelt und für industrielle Nutzung verfügbar gemacht werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Die neu zu entwickelnde schonende Reinigungsmethode soll durch den Einsatz von Oligomerabbauenden Polyesterasen realisiert werden. Hierfür werden kommerziell erhältliche Enzyme beschafft und diese hinsichtlich ihrer Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen, pH-Werten und in unterschiedlichen Puffern mit Hilfe von Aktivitätstests analysiert. Auf Basis dieser Ergebnisse werden erste Versuchsbedingungen zum Oligomer-Abbau im Labormaßstab abgeleitet. Daraufhin werden die einzelnen Parameter auf einen größeren Ansatz übertragen und in einem Laborfärbeapparat für einen optimalen Oligomer-Abbau weiter angepasst. Anschließend wird eine Reinigungsmethode sowohl für Fasern und Garne als auch die genutzten Maschinen entwickelt. Dazu werden konventionelle Polyesterfärbungen mit unterschiedlichen Farbstoffen zunächst im Labormaßstab durchgeführt und mit den zuvor festgelegten Verfahrensparametern nach der Färbung behandelt. Im Anschluss daran soll die Skalierung auf den Laborfärbeapparat sowie die Implementierung in die laufenden Prozesse erfolgen. Flottenverhältnis, Enzymmenge und Inkubationszeit werden auf einen optimalen Oligomer-Abbau

eingestellt. Sowohl die Färbeapparate als auch die gefärbten Produkte sowie das Abwasser werden auf verbliebene Oligomere untersucht. Um die Umweltbelastung so gering wie möglich zu halten, wird untersucht, wie die Enzyme aus den Reinigungsflotten rückgewonnen und wiederverwendet werden können. Hierzu werden die Immobilisierung an chemikalienresistente, wasserdurchlässige Filter sowie die Immobilisierung an magnetische Beads untersucht. Abschließend soll der gesamte Prozess hinsichtlich seiner Umweltrelevanz bewertet werden.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel. 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • <http://www.dbu.de>

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurden Oligomere aus Garnspulen des Projektpartners Schmitz Textiles GmbH extrahiert und als Substrat für die Abbauuntersuchungen eingesetzt. In der Literatur wurden unterschiedliche Polyesterasen beschrieben, die Polyethylenterephthalat funktionalisieren bzw. abbauen können. Kommerziell erhältliche Polyesterasen wurden beschafft und untersucht. Damit ein Einschnitt-Verfahren (Polyesterfärbung und gleichzeitiger Oligomer-Abbau) entwickelt werden konnte, wurde die Resistenz der Polyesterasen bei verschiedenen Verfahrensparametern (Temperatur, pH-Wert, Zeit) mit Hilfe von Aktivitätstests basierend auf kolorimetrischen Substraten untersucht. Anschließend wurde die Fähigkeit, Oligomere abzubauen, untersucht. Dazu wurde ein spektrophotometrischer Test etabliert. Im Labormaßstab konnte insbesondere eine Lipase aus *Aspergillus oryzae* identifiziert werden, die Oligomere abbauen konnte. Der Vorteil dieser Lipase war, dass sie in relativ großen Mengen preisgünstig verfügbar war. Zum Ende des Projektes änderte sich dies jedoch und die Lipase sowie Vergleichsprodukte sind bis mindestens Mitte 2023 nicht mehr lieferbar.

Die enzymatische Behandlung von Garnproben zeigte keinen Einfluss auf die Farbgebung und auf diverse textilphysikalische Merkmale der Garne. Allerdings war ein Abbau der Oligomer-Ablagerungen auf der Faseroberfläche visuell nicht sichtbar.

Ein Up-Scaling der Versuche im Labormaßstab auf einen Laborfärbeapparat gelang nur mäßig gut, obwohl das Enzym über den gesamten Versuchszeitraum aktiv blieb. Verschmutzungen im Färbeapparat blieben auch nach der enzymatischen Reinigung zurück. Extraktionsversuche der Rückstände des Färbeapparats zeigten, dass neben Oligomeren, auch andere Substanzen (z.B. Farbstoffe) im Färbeapparat vorhanden waren. Diese konnten enzymatisch nicht abgereinigt werden und störten vermutlich die Reaktion.

Da weder die Reinigung des Laborfärbeapparates noch eine Abreinigung der Faseroberfläche mit den kommerziell erhältlichen Enzymen in einem zufriedenstellenden Maße gelang, wurde die Literaturrecherche intensiviert und nach weiteren (auch nicht kommerziell erhältlichen) Polyesterasen gesucht. Dabei entstanden Gespräche mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg (RWTH Aachen), die Cutinasen an sogenannte Ankerpeptide gekoppelt hat. Das Ankerpeptid bringt das Enzym in räumliche Nähe zum Substrat und führt dadurch zu einer besseren Substratumsetzung. Im Falle von PET konnte damit in der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg eine 6-fache Steigerung beim Polyesterabbau beobachtet werden. Die Plasmide mit der genetischen Information der Wildtyp-Cutinase (TCur1278-WT) sowie der Cutinase gekoppelt an das Ankerpeptid (TCur1278-TA2) wurden der HSNR freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten für Medien, die für die Expression der Cutinasen benötigt wurden, stand zum Ende der Projektlaufzeit keine ausreichende Menge der Cutinasen für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung. Parallel wurde eine weitere Polyesterase (TfCut2) an der HSNR kloniert, exprimiert und aufgereinigt sowie auf die Fähigkeit zum Oligomerabbau untersucht. Da aber auch hier nur sehr geringe Konzentrationen gegen Ende der Projektlaufzeit vorlagen, konnte erst einmal kein Oligomerabbau nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden Gespräche mit Prof. Bornscheuer und Dr. Wei der Universität Greifswald geführt. Extrahierte Oligomerproben wurden nach Greifswald geschickt und mit einer Oligomer-abbauenden Polyesterase behandelt. Abbauprodukte der Oligomere konnten in diesen Versuchen festgestellt werden. Leider konnte diese Polyesterase aus zeitlichen Gründen nicht mehr für die Reinigungsversuche verwendet werden.

Um die Umweltbelastungen so gering wie möglich zu halten, sollten die verwendeten Enzyme immobilisiert werden, um eine Rückgewinnung auf der Reinigungsflotte zu ermöglichen. Als Immobilisierungsreagenz wurden magnetische Beads gewählt, da diese eine Bewegung der Enzyme in der Flotte erlaubten. Durch magnetische Separation können diese Partikel aus wässrigen Lösungen wiedergewonnen werden. Aufgrund von Corona-bedingten Lieferschwierigkeiten der magnetischen Partikel sowie der benötigten Kopplungsreagenzien konnten diese Versuche erst gegen Ende der Projektlaufzeit durchgeführt werden, so dass Versuche im Laborfärbeapparat nicht mehr möglich waren. Jedoch konnte eine gute Immobilisierungseffizienz und Aktivität der immobilisierten Polyesterasen im Labormaßstab erreicht werden, so dass von einer effektiven Umsetzung der Oligomere sowie einer effektiven Rückgewinnung aus der Flotte ausgegangen werden kann.

Insgesamt ist zu sagen, dass Polyesterasen identifiziert werden konnten, die Oligomere abbauen können.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Zu Beginn der Pandemie wurde ein Vortrag bei der GFC Dornbirn eingereicht, in dem es allgemein um Polyester und Enzyme gehen sollte. Dort sollte auch das Thema Submikroplastik behandelt werden. Dieser Vortrag wurde leider nicht angenommen. Nachdem das Projekt einige Zeit lief und sich herauskristallisierte, dass der enzymatische Abbau der Oligomere und die Etablierung einer Reinigungsmethode nicht wie geplant entwickelt und durchgeführt werden konnte, wurde auf weitere Vortragseinreichungen verzichtet, da nur sehr wenige positive Ergebnisse präsentiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde auch auf Veröffentlichungen in Fachzeitschriften verzichtet. In persönlichen Gesprächen mit Firmen und Partnern wurde das Problem Submikroplastik thematisiert.

Fazit

Im Rahmen des Forschungsprojektes konnten kommerziell erhältliche Polyesterasen identifiziert werden, die im Labormaßstab Oligomere abbauen können. Allerdings ließ sich dieser Ansatz nicht auf die Färbeapparate beim Projektpartner Schmitz Textiles GmbH transferieren. In den praxisnahen Färbeprozessen treten noch zu viele Störfaktoren auf, die die enzymatische Reaktion hemmen bzw. die enzymatisch nicht abgereinigt werden können. Für ein Folgeprojekt ist es von Vorteil bzw. zwingend notwendig, wenn einer der beiden Partner in der Enzymentwicklung tätig ist. Rein mit kommerziellen Enzymen und den Corona-bedingten Lieferschwierigkeiten dieser Enzyme und anderer Reagenzien konnte keine zufriedenstellende Reinigungsmethode entwickelt werden. Die Hochschule Niederrhein konnte erst gegen Ende des Projektes selbstentwickelte Enzyme zur Verfügung stellen, die jedoch teilweise nicht mehr während der Projektlaufzeit getestet werden konnten.

1	Zusammenfassung.....	11
2	Einführung und Motivation.....	11
2.1	Submikroplastik in Form von Oligomeren.....	11
2.2	Bisherige Reinigungsmethoden.....	12
2.3	Zielsetzung.....	12
3	Methodik / Vorgehensweise.....	13
3.1	Enzymauswahl und Untersuchungen im Labormaßstab (HSNR).....	14
3.1.1	Enzymauswahl.....	14
3.1.2	Untersuchung zur Enzymaktivität bei verschiedenen Prozessparametern.....	15
3.1.3	Prüfungen zur Erkennung von Oligomeren.....	16
3.2	Immobilisierung von Enzymen.....	17
3.3	Untersuchungen zur Oligomer-Minderung durch den Färbeprozess sowie zum Oligomer- Abbau im Laborfärbeapparat (ST).....	18
3.3.1	Oligomer-Minderung durch den Färbeprozess.....	19
3.3.2	Oligomer-Abbau im Laborfärbeapparat von ST.....	20
4	Projektergebnisse.....	20
4.1	Auswahl geeigneter Enzyme und Untersuchungen zur Enzymaktivität.....	20
4.1.1	Auswahl geeigneter Enzyme.....	20
4.1.2	Untersuchungen zur Enzymaktivität.....	21
4.2	Extraktion von Oligomeren (HSNR).....	24
4.2.1	Untersuchung des Oligomerabbaus mittels UV/VIS-Spektrometrie.....	26
4.3	Einstellung der Verfahrensparameter und Versuche im Laborfärbegerät von ST.....	28
4.3.1	Versuche im Laborfärbeapparat (ST).....	28
4.4	Garnprüfungen nach Enzymbehandlung (ST).....	32
4.5	Untersuchungen zur Identifikation von Oligomeren (HSNR).....	35
4.5.1	Identifikation von Oligomeren über Rasterelektronen-Mikroskopie.....	35
4.5.2	Identifikation von Oligomeren über ATR-IR Analyse.....	38
4.6	Wiederverwendbarkeit der Enzyme.....	39
4.7	Ökologische und Ökonomische Gesamtbeurteilung.....	41
5	Fazit und Ausblick.....	42

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ursprünglicher Zeitplan und geänderter Zeitplan.....	13
Abbildung 2: REM-Bilder von Oligomer-Ablagerung aus der Literatur [7].....	16
Abbildung 3: Laborfärbeapparate bei ST.....	18
Abbildung 4: Bestimmung der Enzymaktivität mit Indoxylacetat-Substratmembranen bei sichtbarem Licht (A) bzw. mit UV-Licht (B).....	21
Abbildung 5: Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und Enzymkonzentration.....	22
Abbildung 6: Abnahme der Enzymaktivität bei hohen Temperaturen über die Zeit.....	22
Abbildung 7: Enzymaktivität in Abhängigkeit zum pH-Wert.....	23
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Polyesterase-Aktivität mit dem Substrat Impranil DLN-SD.....	23
Abbildung 9: Darstellung der Abhängigkeit von Polyesterase-Aktivität und verwendetem Puffer (Substrat Impranil DLN-SD).....	24
Abbildung 10: Ergebnisse der Extraktionsversuche.....	25
Abbildung 11: Spektren der zeitlich aufgelösten UV/VIS Analyse der Verseifung von Oligomeren.....	26
Abbildung 12: Ergebnisse der mittels UV/VIS-Spektroskopie analysierten enzymatischen Ringöffnung im Vergleich zur alkalischen Verseifung. „Sunsilk blind“ = ohne Farbstoff gefärbtes Garn; „Sunsilk hell“ = mit hellem Farbstoff gefärbtes Garn.....	27
Abbildung 13: Bestimmung der Enzymaktivität mittels Indoxylacetat-Substratmembranen im vierten Versuch mit dem Laborfärbeapparat.....	30
Abbildung 14: Anschmutzung des Färbeapparats nach der Enzymbehandlung und nach dem Auskochprozess.....	30
Abbildung 15: Enzymaktivität während des fünften Versuchs im Garnfärbeapparat.....	31
Abbildung 16: Laborfärbeapparat, vor und nach der Enzymatischen Reinigung, sowie nach längerer Verweilzeit der Flotte.....	32
Abbildung 17: Ergebnisse der Farbdifferenzmessung von der Standardfärbung gegen die Färbung mit enzymatischer Nachreinigung.....	33
Abbildung 19: Proben nach 500 Stunden Xenontester.....	34
Abbildung 20: REM-Bilder vom Sunsilk Garn (Rohgarn).....	35
Abbildung 21: REM-Bilder vom Sunsilk Garn mit Standardfärbung.....	36
Abbildung 22: REM-Bilder von Sunsilk Garn als Rohgarn, mit einer Standardfärbung und mit einer Standardfärbung gefolgt von einer einstündigen Enzymbehandlung.....	37
Abbildung 23: REM-Bilder von Sunsilk Garn als Rohgarn, mit einer Standardfärbung und mit einer Standardfärbung gefolgt von einer sechstündigen Enzymbehandlung.....	38
Abbildung 24: IR-Spektren des aus Garn extrahierten Oligomers und des Rückstandes aus Färbeapparaten im direkten Vergleich.....	38

Abbildung 25: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Enzymen an magnetische Beads	39
Abbildung 26: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Lipaseaktivität mit Nitrophenylacetat	40
Abbildung 27: Rückgewinnung der Beads mit einem Magneten	40
Abbildung 28: Schema des Färbeapparats.....	41
Abbildung 29: Zeit-Temperaturkurve des Auskochprozesses	41

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Enzymimmobilisierung mit EDC.....	17
Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Lipasen für die weiteren Untersuchungen	20
Tabelle 3: Textilphysikalische Qualitätsuntersuchungen nach verschiedenen Färbemethoden.....	34
Tabelle 4: Jährliche Kosten für den Auskochprozess.....	42

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATR-IR	attenuated total reflection - Infrarotspektroskopie
ca.	circa
cm	centimeter
cN/Tex	centiNewton pro tex
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
GFC	Global Fiber Congress
HSNR	Hochschule Niederrhein
Imp	Intermingelungspunkte
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
kWh	Kilowattstunde
l	Liter
m	Meter
M	Mol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nm	Nanometer
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PES	Polyester
PET	Polyethylenterephthalat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur

ST	Schmitz Textiles GmbH + Co. KG
TA2	Tachystatin 2
U	Unit
UV	Ultraviolet
WT	Wildtyp
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Zusammenfassung

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines innovativen und praxistauglichen enzymatischen Verfahrens für die Entfernung von Submikroplastik (Oligomere) im Rahmen der PET-Färbung. Dafür wurden kommerziell erhältliche Polyesterasen auf ihre Fähigkeit Oligomere abzubauen untersucht. Die Verfahrensparameter für eine Enzymbehandlung wurden an der Hochschule Niederrhein (HSNR) erst im Labormaßstab erprobt, um später bei der Firma Schmitz Textiles (ST) für den Industriemaßstab hochskaliert zu werden. Ziel des enzymatischen Verfahrens sollte sein, auf die regelmäßige Reinigung der Färbegeräte verzichten und ein Vergrauen der textilen Warenoberfläche vermeiden zu können.

2 Einführung und Motivation

Polyesterfasern sind mit 56,7 Mio. t die am weitesten verbreiteten Fasern auf der Welt [1]. Sie haben viele positive Eigenschaften und sind kostengünstig herzustellen. Beim Projektpartner Schmitz Textiles stellen Filamentgarne aus Polyester mit 95 % den wichtigsten Rohstoff zur Herstellung der Produkte wie innenliegender Sonnenschutz oder Markisenstoffe dar. Für die Farb- und Funktionsgebung der Garne werden in großem Umfang Nassprozesse als diskontinuierliche Garn- oder Stückfärbung in Hochdruckanlagen bei Temperaturen bis zu 130 °C durchgeführt, wodurch es prozessbedingt zur Abgabe von 1 – 3 % Oligomeren bezogen auf das Fasergewicht ins Färbereiabwasser kommt [2]. Diese kurzkettigen Verbindungen bilden Kristalle, die sich an der Faseroberfläche, den Apparaten und Rohrleitungen ablagern und darüber hinaus in das Prozessabwasser gelangen, wo sie als Submikroplastik auftreten. Plastik in der Umwelt ist generell ein globales Problem. Damit ist nicht nur das sichtbare Plastik in Form von Müll, sondern auch das kleine bis nicht sichtbare Plastik in Form von Mikroplastik gemeint. Mikroplastik (Kunststoffteilchen < 5 mm) führt zu großen Problemen in der Umwelt, welche Einflüsse Submikroplastik wie Oligomere hat und welche Mengen tatsächlich im Abwasser vorliegen, ist bisher noch nicht eindeutig untersucht und belegt worden.

2.1 Submikroplastik in Form von Oligomeren

Mikroplastik beschreibt Kunststoffteilchen < 5 mm, unterhalb einer Größe von 1 µm spricht man hingegen von Submikroplastik [3]. Die hier betrachteten Oligomere und speziell die cyclischen Trimere sind wasserunlösliche Oligoesterpartikel aus 3 Polyestermonomeren, die zu einem Ring geschlossen vorliegen und während des Färbeprozesses kristallisieren und ausfallen [4]. Aufgrund der Größe sind diese Partikel im Bereich des Submikroplastiks einzuordnen, wenn sie aber agglomerieren und sichtbare Stäube bilden, können sie ebenfalls dem Bereich des Mikroplastiks zugeordnet werden. Von den wasserunlöslichen Oligomeren wird eine hohe Konzentration (1 – 3 %) in die Färbereiperipherie oder direkt in die Umwelt abgegeben [2]; ein weiteres Problem ist die starke Verschmutzung der Färbeapparate, die nur sehr aufwändig zu reinigen sind [5]. Das Textilgut wirkt besonders in der Apparatfärbung, bei der die Behandlungsflotte durch die ruhenden Textilwickel

(Garnspulen, Kettbäume, Färbebäume) unter Druck gepumpt wird, in zahlreichen dieser Veredelungsprozesse wie ein Filter und reichert sich mit diesen Störpartikeln an, die die Ware mit einem Grauschleier überziehen und als Staub das nachfolgende Textilgut sowie die Maschinen belegen oder gar beschädigen.

2.2 Bisherige Reinigungsmethoden

Die klassische Polyester-Färbemethode erfolgt in saurem Milieu bei Temperaturen bis 130 °C. Gerade bei dieser Färbemethode von Polyester (PES) fallen Oligomere in hohen Mengen aus und führen zu einer starken Partikelbelastung. Um das Ausfallen der Oligomere zu verhindern, werden heute deshalb alkalische Färbemethoden angewandt, wodurch die Trimere in eine wasserlösliche Form überführt werden. Jedoch werden dabei hohe Mengen an Alkali nötig und die Ablagerung von Oligomeren auf Apparaten und Textil wird nicht vollständig verhindert. Weiterhin sind nicht alle Farbstoffe für die alkalische Färbung geeignet und der Faserstoff leidet durch eine Verseifung der Polymere. Das Färbeergebnis ist oftmals nicht zufriedenstellend, so dass weiterhin häufig das saure Verfahren angewendet werden muss, um die Anforderungen der Kunden zu erfüllen. Der Projektpartner Schmitz Textiles beispielsweise wendet aufgrund der Nachteile dieses Verfahren nicht an. Dort kommt der sogenannte HT-Ablass zum Einsatz, bei dem die mit Oligomeren belastete Flotte bei Temperaturen > 100 °C aus den Färbemaschinen und -apparaten abgelassen wird [2,6]. Die Oligomere sind bei dieser Temperatur noch nicht zu partikelförmigen Kristallen agglomeriert, dennoch belasten sie das Abwasser und gelangen in die Umwelt. Weitere Methoden sind Färbeprozesse bei tieferen Temperaturen, die jedoch in der Regel mit Einschränkungen hinsichtlich der Farbstoff- und Farbtonauswahl einhergehen. Zusätzlich werden beim Projektpartner Schmitz Textiles wöchentlich die Färbeapparate mit chemischen Mitteln ausgekocht, um mittels alkalischer Verseifung die Oligomere durch Aufbrechen der zyklischen Struktur in eine lösliche Form zu überführen. Zur Reduzierung der Oligomere auf der Ware müssen ebenfalls hohe Mengen an Alkali oder chemischen Textilhilfsmitteln eingesetzt werden. Dies ist weder als umweltschonend noch energiesparend anzusehen und wird deshalb nur sehr ungern angewendet.

2.3 Zielsetzung

Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Untersuchung einer völlig neuen Problemlösung durch enzymatische Degradation von Oligomeren als schonende Reinigungstechnik für Färbeapparate in der Polyesterfärbung, zur Verbesserung des Qualitätsausfalls von Textilien und als neuer Ansatz zur Reduktion von Mikro- und Submikroplastik in Gewässern. Daher wurde in diesem Vorhaben ein innovatives und praxistaugliches enzymatisches Verfahren für die Entfernung von Oligomeren im Rahmen der PES-Färbung untersucht. Dabei wurden folgende Primärziele verfolgt:

- Enzymatischer Abbau von Oligoestern, speziell tricyclischen Oligoestern, zur Vermeidung von Submikroplastik im Abwasser
- Reduktion störender Oligoester auf Fasern und Apparaten zur Qualitätsverbesserung,

- Reduktion aufwändiger, umweltbelastender chemischer Reinigungsprozesse von Textilgut und Apparaten.

Als sekundäre Ziele wurden die milden Reaktionsbedingungen und die Ressourceneffizienz der neuartigen Verfahren verfolgt sowie die Schonung des Textilguts im Hinblick auf die Gebrauchstauglichkeit (keine Schädigung oder gar Abbau des Polymerstamms).

3 Methodik / Vorgehensweise

Abbildung 1 zeigt den ursprünglichen und den aufgrund der Corona-Pandemie veränderten Zeitplan.



Abbildung 1: Ursprünglicher Zeitplan und geänderter Zeitplan

Durch starke Lieferverzögerungen und -schwierigkeiten musste der Zeitplan nach der Hälfte der Projektzeit aktualisiert werden. Manche Arbeitspakete mussten verschoben, andere konnten dafür zum Teil vorgezogen werden. Am Ende der Projektlaufzeit kam es verstärkt zu Lieferproblemen hinsichtlich der Enzymbeschaffung, so dass ein Antrag um eine zwei-Monatige zuwendungsneutrale Verlängerung gestellt und bewilligt wurde.

In der gegebenen Projektlaufzeit von 26 Monaten wurden gemäß Arbeitsplan folgende Schritte unternommen:

- Enzymauswahl und Überprüfung der Enzymaktivität bei verschiedenen Parametern (wie Enzymkonzentration, Zeit, Temperatur oder pH-Wert)
- Untersuchungen zur Identifikation von Oligomeren; Extraktion von Oligomeren aus den von ST gestellten PES-Garnen
- Ableitung der Verfahrensparameter für die Enzymbehandlung
- Prüfung einer Oligomer-Reinigung mittels Enzymbehandlung von Garnen und einem Laborfärbeapparat
- Untersuchungen zu Wiederverwendbarkeit der Enzyme im Labormaßstab
- Ökologische und Ökonomische Beurteilung

Nach der Identifikation einer für den Oligomer-Abbau geeigneten kommerziell erhältlichen Polyesterase konnte ein Hochskalieren der Enzymbehandlung auf einem Laborfärbeapparat (mit einem Volumen von 33 l) bei ST nicht direkt erreicht werden. Sowohl die Garne als auch der Färbeapparat zeigten Spuren von (Oligomer)-Ablagerungen. Durch Einstellung verschiedener Parameter wurde versucht, den Prozess zu optimieren. Die Ablagerungen konnten aber nicht vollständig entfernt werden. Richtung Ende der Projektlaufzeit konnten mit der kommerziellen Polyesterase keine weiteren Versuche mehr durchgeführt werden, weil sich der Liefertermin auf Juni 2023 verschoben hat. Die im Fachbereich Chemie / Biotechnologie der HSNR parallel entwickelten, exprimierten und aufgereinigten Cutinasen lagen nicht in den benötigten Mengen für den Einsatz im Laborfärbeapparat vor und konnten somit nicht getestet werden.

3.1 Enzymauswahl und Untersuchungen im Labormaßstab (HSNR)

3.1.1 Enzymauswahl

Nach eingehenden Literaturrecherchen im Hinblick auf geeignete Polyesterasen – zum Abbau der Oligomere sowohl auf dem Textil als auch an den Veredlungsgeräten – wurden vier kommerziell erhältliche Enzyme ausgewählt und beschafft: Lipase aus *Candida rugosa*, Lipase A von *Candida antarctica*, Lipase aus *Mucor miehei* sowie Lipase von *Aspergillus oryzae*.

Parallel wurde an der HSNR in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Chemie / Biotechnologie gezielt an der Entwicklung neuer Cutinasen gearbeitet. Dabei wurde eine rekombinante TfCut2 aus *Thermobifida fusca* in *Bacillus subtilis* exprimiert und aufgereinigt.

Von der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg (RWTH Aachen) wurden freundlicherweise zwei Plasmide zur Verfügung gestellt, die die genetischen Informationen für eine Cutinase (Tcur1278-WT) bzw. eine Cutinase mit dem Ankerpeptid Tachystatin 2 (Tcur1278-TA2) enthielten.

Mittels Elektroporation (2000 V, 25 µF, 200 Ω) wurde die Hefe *Pichia pastoris* BSYBG11 (bisy GmbH, Österreich) mit diesen Plasmiden transformiert. Die anschließende Selektion positiver Klone erfolgte mit Nähragarplatten, die das Antibiotikum Zeocin (100 µg/ml) enthielten. Die Selektion von Stämmen, die aktives Enzym produzierten erfolgte auf Impranil DLN-SD-Substratplatten. Pro Typ (Tcur1278-WT oder Tcur1278-TA2) wurden ca. 100 Klone auf Substratplatten (Nähragar mit Impranil DLN-SD und Zeocin) vereinzelt und für 1,5 Wochen bei 28 °C inkubiert. Cutinase-positive Klone wurden daraufhin in flüssigem Nährmedium bei 28 °C schüttelnd kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen zur Entfernung der Hefezellen 15 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Zur kompletten Entfernung der Zellen wurden die Überstände mittels eines 0,22 µm –Spritzenvorsatzfilters sterilfiltriert. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung des Überstandes mittels 15 ml-Amicon® Säulen (Cut off: 10 kDa) nach Herstellerangaben auf ca. 200 µl. Nach der Aufkonzentrierung wurde die Proteinkonzentration mittels ROTI-Nanoquant nach Herstellerangaben quantifiziert.

3.1.2 Untersuchung zur Enzymaktivität bei verschiedenen Prozessparametern

Für eine generelle Untersuchung der Enzymaktivität wurden zunächst, im Vergleich zu den Oligomeren, für die Enzyme leichter verfügbare Substrate verwendet. Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte daraufhin die Auswahl von geeigneten Enzymen und Prozessparametern.

Zur Identifikation geeigneter Prozessparameter wurden sogenannte Substratmembranen hergestellt auf bzw. in denen das Substrat Indoxylacetat immobilisiert war.

Dazu wurden 40 mg Indoxylacetat in 10 ml Aceton gelöst und Whatman-Filterpapier in diese Lösung getaucht. Nach Entfernung aus der Lösung, wurde das Filterpapier getrocknet und anschließend durch Eintauchen in 1 x PBS (Phosphat-gepufferte Saline) gewaschen. Das Filterpapier wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Substratmembranen konnten für eine Woche im Kühlschrank gelagert werden.

Niedrigere Enzymkonzentrationen wurden mit Hilfe von 4-Nitrophenylacetat bestimmt. Das Substrat wird in p-Nitrophenol und Essigsäure gespalten, wodurch ein gelber Farbstoff sichtbar wird. Dieser kann photometrisch gemessen werden. Hierzu wurden folgende Lösungen verwendet.

A 100 ml 0,2 mol/l Phosphatpuffer

0,831 g NaCl (150 mmol/l)

500 µl Triton X-100 (0,5 % v/v)

B 400 µl 50 mmol/l p-Nitrophenylacetat (92 mg in 10 ml Ethanol (96 %))

10 ml Lösung A

Zu 900 µl der Lösung A wurden 100 µl Enzymlösung gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Lösung B gestartet. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Extinktion bei 410 nm gemessen.

Neben Indoxylacetat und 4-Nitrophenylacetat wurde ebenfalls ein Polyestersubstrat (Impranil DLN-SD) für die Identifikation geeigneter Parameter genutzt. Dazu wurden 200 ml Agar (1,5 % Agar-Agar in H₂O dem.) autoklaviert (121 °C 20 min) und anschließend 800 µl Impranil DLN-SD zugeben. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und ca. 15 ml mittels Gießhilfe in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren waren die Platten im Kühlschrank mehrere Wochen lagerbar. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 10 µl Polyesteraselösung aufgetropft und in einer feuchten Kammer bei gewünschter Temperatur inkubiert.

Auf der Basis dieses qualitativen Enzymtests wurde eine quantitative Untersuchung der Polyesterase-Aktivität durchgeführt. Hierzu wurde das Substrat Impranil in einem Puffer (PBS oder Phosphatpuffer) dispergiert und anschließend die Enzymaktivität mittels Absorptionsabnahme bei 600 nm im Photometer ermittelt. Bei dieser Wellenlänge kann die optische Dichte (Trübung) einer

Lösung detektiert werden. Je höher die Absorption ist, desto trüber ist die Lösung. Durch den enzymatischen Abbau des Polyesters (1000 U/ml Lipase A1 *A. oryzae*) wurde die Lösung geklärt, was sich in einer Abnahme der Absorption bemerkbar machte.

3.1.3 Prüfungen zur Erkennung von Oligomeren

Um die Wirkung der Enzymbehandlung überprüfen zu können, wurden verschiedene Methoden zur Identifikation von Oligomeren durchgeführt und etabliert. Gefärbte Garne wurden an der HSNR zum einen rasterelektronenmikroskopisch untersucht und mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen.

Die Oligomere sind eindeutig als kleine Kristalle an der Garnoberfläche (teilweise alleinstehend, teilweise als fibröse Agglomeration) zu erkennen (s. Abbildung 2).

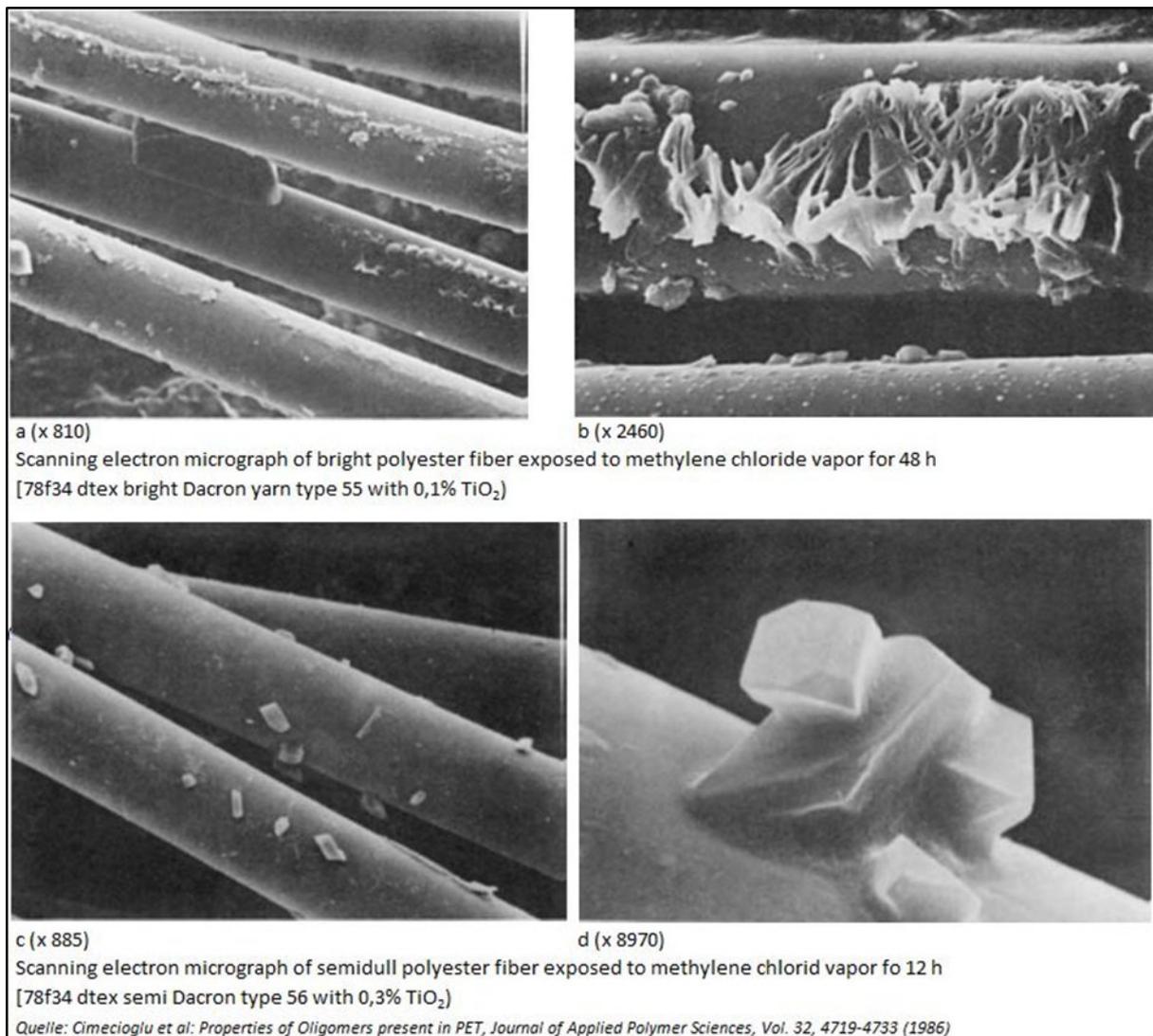


Abbildung 2: REM-Bilder von Oligomer-Ablagerung aus der Literatur [7]

Auch etwaige Faserschädigungen durch die Enzymbehandlung können durch diese Methode detektiert werden.

Zum anderen wurden aus den Garnen die Oligomere extrahiert und die Extraktion quantitativ bestimmt. Die quantitative Extraktionsmethode für Oligomere aus Garn sah eine mindestens 6-

stündige Soxhlet-Extraktion einer Garnprobe mit Dichlormethan vor. Dichlormethan ist ein gutes Lösemittel für PET-Oligomere, jedoch nicht für PET selbst. Durch die lange Einwirkzeit in der Soxhlet-Extraktion konnte davon ausgegangen werden, dass das Lösemittel die Oligomere nicht nur von der Faseroberfläche, sondern auch aus dem inneren des Garns herauslöst. Durch Differenzwägung des an die Soxhlet-Apparatur angeschlossenen Kolbens (vor und nach der Extraktion) konnte die Menge an extrahierbarem Oligomer bestimmt werden. Während der Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass bereits nach ca. 4 h keine messbare Menge Oligomer mehr extrahiert wird. Um trotz eventueller Unterschiede der Garne untereinander eine quantitative Extraktion zu gewährleisten, wurde die Extraktionsdauer auf mindestens 6 h festgesetzt.

Die bei der Extraktion erhaltenen Massen wurden als prozentualer Anteil der eingesetzten Probenmasse gegen die prozentuale Position der entnommenen Garnprobe in der Spule (in Abspulrichtung) aufgetragen, so dass neben der reinen Oligomer-Konzentration auch Rückschlüsse auf den Einfluss der Durchströmung der Spule im Färbeprozess auf die Ablagerung von Oligomeren getroffen werden konnten.

Nach der Isolierung von Oligomeren aus Garnspulen wurden diese in ersten Versuchen mit Polyesterasen versetzt, um das Abbauverhalten zu untersuchen. Es wurde versucht, den enzymatischen Abbau zeitaufgelöst mittels UV/VIS-Spektroskopie zu verfolgen. Hierzu wurden Mengen von 20 – 25 mg Oligomer in UV/VIS Küvetten eingewogen, das entsprechende Enzym in Phosphatpufferlösung hinzugegeben und im Abstand von 5-15 Minuten über einen Zeitraum von mehreren Stunden analysiert. Beobachtet werden sollte die Veränderung der Absorption im Bereich von 245 nm. Da die cyclischen Trimere aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Wasser die Absorptionseigenschaften der untersuchten Flüssigkeit nicht beeinflussen, deutet ein Anstieg der Lichtabsorption bei dieser Wellenlänge (s. Abbildung 11) auf die Bildung von wasserlöslichen Oligomeren aus den wasserunlöslichen cyclischen Trimeren hin.

Zusätzlich wurden die extrahierten Oligomer-Proben mittels ATR-IR untersucht.

3.2 Immobilisierung von Enzymen

Um eine Rückgewinnung der Enzyme zu ermöglichen, wurden diese an magnetische Beads gekoppelt. Die dafür benötigten Chemikalien bzw. Materialien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Enzymimmobilisierung mit EDC	
Aktivierungspuffer	0,1 mol/l MES, 0,5 mol/l NaCl, pH 6
PBS-Puffer 5 x	16 g NaCl, 2,5 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O, 0,4 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,3, auf 400 ml auffüllen
Quenchinglösung	Glycin 1 mol/l
EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)	40 mg/ml in Aktivierungspuffer
Carboxylat-funktionalisierte Beads und Magnet	

400 µl carboxylierte Partikel (Chemicell, Berlin) wurden mit 600 µl Aktivierungspuffer gemischt und anschließend gewaschen. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Das Pellet wurde in 1 ml Aktivierungspuffer aufgenommen und je 10 µl der EDC-Lösung addiert. Der Ansatz wurde gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl der 5-fach konzentrierten PBS-Lösung und eine entsprechende Enzymlösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Um ungesättigte Reste zu quenchen, wurden 20 µl Glycinlösung zugegeben. Die Mikropartikel wurden anschließend mehrmals in 1 x PBS-Puffer gewaschen bis im Überstand keine Enzymaktivität mehr nachweisbar war. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

3.3 Untersuchungen zur Oligomer-Minderung durch den Färbeprozess sowie zum Oligomerabbau im Laborfärbeapparat (ST)

Die Färbeapparate sind die Hauptanlagen des Färbereilabors für Kleinst- oder Musterpartien / Garnfärberei, wo auch sämtliche Garnveredelungsverfahren durchgeführt werden können. Bestehend aus einem Druckkessel mit bis 5 bar Druck / max. 140 °C Betriebstemperatur und Zusatzbehältern für Flottenansätze und Nachsätze / Zugabe von THM im Prozess, ruht die Ware, und die Flotte bewegt sich mit Hilfe der Flottenpumpen. Bei den Laborapparaten (s. Abbildung 3) ist es möglich, Flottenproben zu entnehmen. Da die Apparate mit modernen Steuerungen und Messeinheiten ausgestattet sind, ist es möglich den Färbeprozess sehr genau zu steuern und zu regeln.



Abbildung 3: Laborfärbeapparate bei ST

Hierzu gehört zum Beispiel das Aufheizen und Kühlen. Beim Färbeprozesses sind Heiz- und Kühlraten von ca. 0,2-10°C / Minute möglich. Die Pumpen sind mit Frequenzumrichtern ausgestattet und somit ist es, im Zusammenspiel mit der SPS-Steuerung, möglich die Umwälzraten der Behandlungsbäder sehr genau zu regeln. Die Regelung kann nach folgenden Vorgaben erfolgen: Pumpendrehzahl, Durchflussmenge sowie Pumpendruck. Beim Laborapparat ist die Flottenmenge regulierbar je nach Anzahl der Spulen die gefärbt werden müssen, bei 1-3 Kreuzspulen 33 Liter Flottenmenge, bei 5 Kreuzspulen 57 Liter Flotte, um eine optimale Ausfärbung (Auslastung) zu erzielen.

Für das Up-Scaling auf einen der Laborfärbeapparate wurde zunächst versucht, mit einem Enzymanteil von 3 ml/l die Garnspulen nachzureinigen. Der Rest der Flotte wurde mit einer Pufferlösung aufgefüllt. Für den ersten Versuch wurde eine Pufferlösung bestehend aus Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat und einem Tensid (Triton X 100) verwendet. Die Zusammensetzung war dabei wie folgt:

- 0,46271 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
- 1,15694 g/l Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
- 0,01 % Tensid (z.B. Triton X 100)

Nach der Einstellung des pH-Werts auf einen neutralen Wert von ca. 7-7,5 und der Temperatur auf 50 °C wurde die Enzymlösung mit der Lipase aus *Aspergillus oryzae* hinzugefügt.

Nach dem Ende der Enzymbehandlung wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Ameisensäure gestoppt. Durch die Einstellung von einem pH-Wert von unter 4 für 10 min wurde die Enzymaktivität herabgesetzt und die Enzyme inaktiviert.

3.3.1 Oligomer-Minderung durch den Färbeprozess

Parallel zur Analyse der Enzyme wurde bei ST nach Möglichkeiten geforscht, den Oligomeraustrag beim Färbeprozess zu reduzieren. Nach dem Patent DE10045057A1 [8], das ein Verfahren zum Färben von Polyester-Textilien mit Dispersionsfarbstoffen im alkalischen Bereich beschreibt und somit das Verseifen der Oligomere begünstigt, wurden Garne unter Zugabe von Harnstoff bei ST gefärbt. Sowohl das Rohgarn, das blindgefärbte Garn (= Färbeprozess ohne Farbstoff) als auch das blindgefärbte Garn mit Zugabe von Harnstoff wurden mit der beschriebenen Extraktionsmethode (s. Kap. 3.1.3) an der HSNR auf ihren Oligomeranteil untersucht.

In ersten Versuchen wurde auch gefärbtes Garn eingesetzt, da jedoch durch das Lösemittel auch der Farbstoff herausgelöst wurde und so eine gravimetrische Auswertung unmöglich wurde, wurde nachfolgend nur blindgefärbtes Garn und Rohgarn eingesetzt.

Für die Versuche wurden Standardgarne von ST verwendet:

- Fasergarn „Sunvas“ (PES Nm40/2 Ringgarn, glänzend)
- Filamentgarn „Sunsilk“ (PES 350f96 dtex glänzend texturiert)

3.3.2 Oligomer-Abbau im Laborfärbeapparat von ST

Die unterschiedlichen Garne wurden im Laborfärbeapparat von ST standardgefärbt, blindgefärbt (= Färbung ohne Farbstoff) und enzymatisch behandelt. Anschließend wurden die Garne rasterelektronenmikroskopisch auf Oligomerabbau bzw. Veränderungen an der Faseroberfläche untersucht. Weiterhin erfolgte eine Extraktion der Oligomere aus den behandelten Garnen sowie eine UV/VIS-spektrometrische Untersuchung enzymatisch behandelter Garne. Um bestimmen zu können, ob die Enzymbehandlung Einfluss auf den Farbton nimmt, wurde eine mögliche Farbabweichung der Garnfärbungen (ohne und mit Enzymbehandlung) mit dem Spektralphotometer CM 3610 a (Konica Minolta) gemessen. Zudem wurden weitere Messungen der Garne vorgenommen. Im Xenontester wurden die Garne für 500 h auf ihre Bewitterungsbeständigkeit geprüft. Auch die Höchstzugkraft und Höchstzugkraftdehnung wurden an den Garnen gemessen.

4 Projektergebnisse

4.1 Auswahl geeigneter Enzyme und Untersuchungen zur Enzymaktivität

4.1.1 Auswahl geeigneter Enzyme

Nach eingehender Literaturrecherche wurden folgende vier Lipasen für die Untersuchungen der Enzymaktivitäten ausgesucht: die Lipase A von *Candida antarctica*, die Lipase aus *Mucor miehei*, die Lipase aus *Aspergillus oryzae* und die Lipase aus *Candida rugosa* (s. Tabelle 2). Für diese Lipasen wurde bereits beschrieben, dass sie Polyester abbauen können. Im Rahmen des Projektes wurde untersucht, ob die Enzyme auch Polyester-Oligomere abbauen können.

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Lipasen für die weiteren Untersuchungen

Enzym Name	Hersteller	Konzentration	pH-Wert (bei 0,01 g/l)	Aussehen
Lipase A aus <i>Candida antarctica</i> recombinant	Sigma 62287-50MG-F	~ 2 U/mg	6,5 – 7,5	hellgelbes Pulver
Lipase aus <i>Mucor miehei</i>	Sigma 62298-100MG-F	~ 1 U/mg	6,5 – 7,5	hellgelbes Pulver
Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma L0777-50ML	>100.000 U/g	6,5 – 7,5	hellgelbe Flüssigkeit
Lipase aus <i>Candida rugosa</i> Type VII	Sigma L1754-5MG	> 700 U/mg	6,5 – 7,5	hellgelber, lyophilisierter Bodensatz

Die Entwicklung nicht kommerzieller Polyesterasen war zwar nicht Gegenstand dieses Projektes aber da sich aufgrund der Corona-Pandemie starke Lieferverzögerungen einstellten und die Abbauraten von den Oligomeren mit den kommerziellen Enzymen wirtschaftlich gesehen recht gering war, wurde nach Alternativen gesucht. Es konnten mit dem Fachbereich Chemie / Biotechnologie der HSNR und mit Unterstützung von Prof. Schwaneberg (RWTH Aachen) nicht kommerziell erhältliche Cutinasen (TfCut2, TCur1278-WT bzw. TCur1278-TA2) exprimiert und aufgereinigt werden. Leider lagen diese Enzyme erst gegen Ende der Projektlaufzeit vor bzw. waren nur in geringen Mengen verfügbar, so dass nur wenige Versuche im Hinblick auf den Oligomerabbau durchgeführt werden konnten.

4.1.2 Untersuchungen zur Enzymaktivität

Um zu überprüfen bei welchen Reaktionsbedingungen die ausgewählten Lipasen eine geeignete Enzymaktivität aufwiesen bzw. bei welchen Bedingungen die Enzyme inaktiviert wurden, wurden verschiedene Parameter eingehend untersucht. Mit Hilfe dieser Ergebnisse ließen sich Rückschlüsse für die Versuchsbedingungen für das zu entwickelnde Verfahren ziehen.

Die Lipasen wurden bis zu 4 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (von Raumtemperatur bis 90 °C) inkubiert und anschließend auf die Substratmembranen getropft. Aktive Enzyme wurden durch eine bläuliche Färbung der Membran sichtbar (s. Abbildung 4). Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Farbstoffumsetzung qualitativ bewertet.

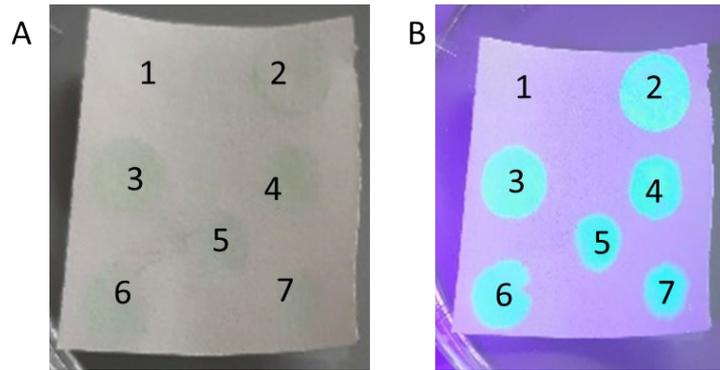


Abbildung 4: Bestimmung der Enzymaktivität mit Indoxylacetat-Substratmembranen bei sichtbarem Licht (A) bzw. mit UV-Licht (B)

(1: PBS; 2 – 7: unterschiedliche Enzymkonzentrationen)

Diese Methode erlaubt eine zuverlässige und schnelle Übersicht über den Einfluss von Zeit, Temperatur, Konzentration und pH-Wert auf die Enzymaktivität, wie in den folgenden Abbildungen dargestellt wird.

Abbildung 5 zeigt die Enzymaktivität der untersuchten Lipasen in unterschiedlichen Konzentrationen in Abhängigkeit zur Temperatur.

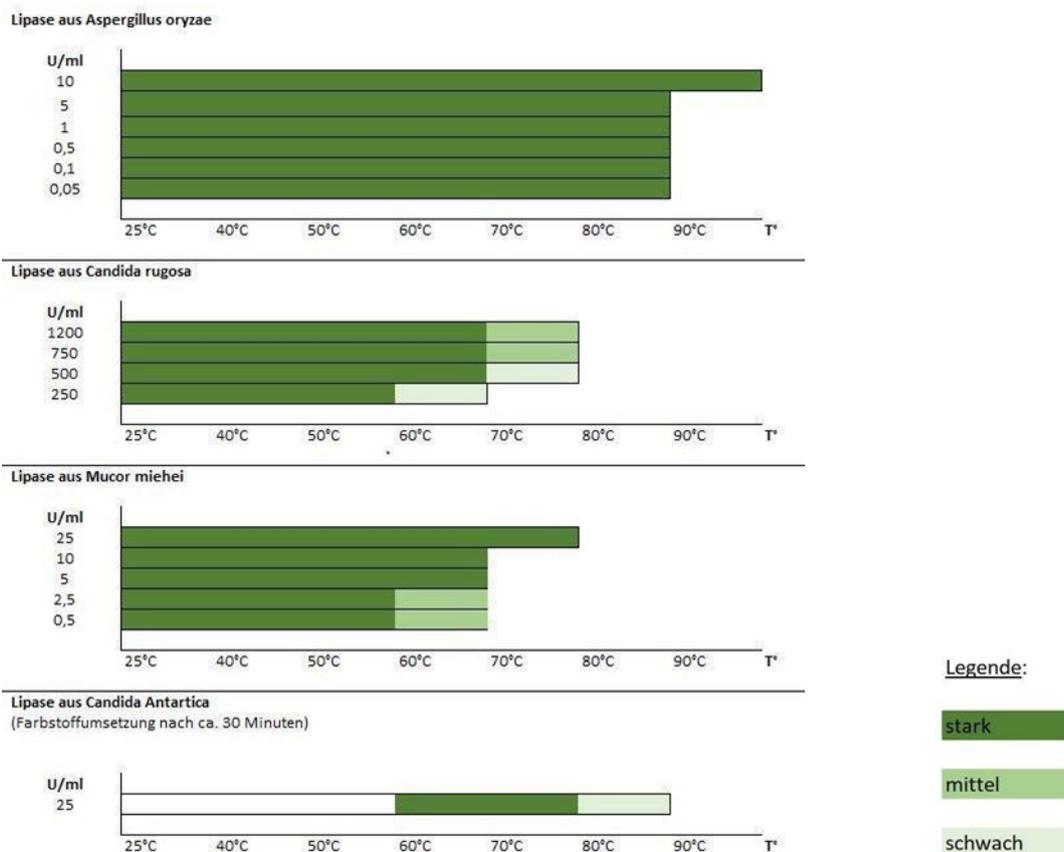


Abbildung 5: Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und Enzymkonzentration

Es wird deutlich, dass die Enzyme ab einer Temperatur von 80 °C nur noch schwach oder gar nicht mehr aktiv waren, was auf eine Denaturierung der Enzyme schließen lässt. Die Prüfungen ergaben

zusätzlich, dass bei hoher Temperatur und niedriger Enzymkonzentration die Enzymaktivität schnell abnahm (s. Abbildung 6).

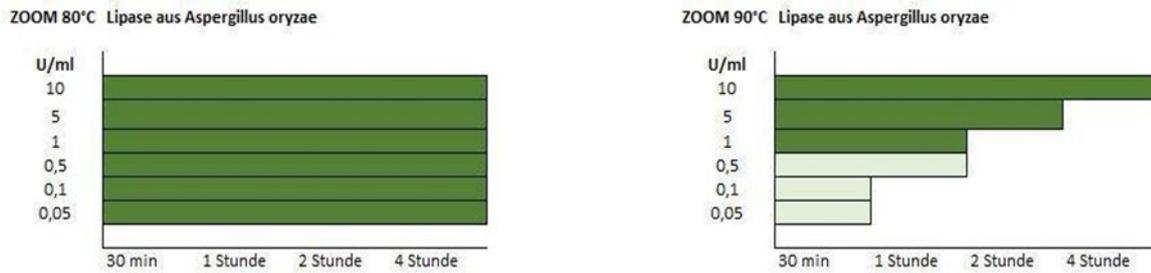


Abbildung 6: Abnahme der Enzymaktivität bei hohen Temperaturen über die Zeit

Der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Enzymaktivität wurde bei Raumtemperatur untersucht (s. Abbildung 7). Im neutralen und alkalischen Milieu zeigten die untersuchten Lipasen eine starke bis sehr starke Aktivität. Im sauren Milieu waren die niedrigen Enzymkonzentrationen schwach bis nicht mehr aktiv. Die dargestellten Aktivitäten waren über einen Zeitraum von vier Stunden stabil.

	RaumT°	pH-Wert		
	U/ml	7,5	4,14	12,8
Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	10	positiv	positiv	positiv!
	5	positiv	positiv	positiv!
	0,5	positiv	positiv	positiv!
	0,05	positiv	positiv	positiv!
	1	positiv	positiv*	positiv!
	0,1	positiv	positiv**	positiv!

	RaumT°	pH-Wert		
	U/ml	7,5	4,14	12,8
Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	1200	positiv	positiv	positiv!
	750	positiv	positiv	positiv!
	500	positiv	positiv	positiv!
	250	positiv	positiv**	positiv!

	RaumT°	pH-Wert		
	U/ml	7,5	4,14	12,8
Lipase aus <i>Candida antarctica</i>	25	positiv	positiv	positiv

	RaumT°	pH-Wert		
	U/ml	7,5	4,14	12,8
Lipase aus <i>Mucor miehei</i>	100	7,5	4,14	12,8
	10	positiv	positiv	positiv
	5	positiv	positiv*	positiv
	2,5	positiv	negativ	positiv
0,5	positiv	negativ	positiv	

Legende:

- * schwach
- ** sehr schwach
- ! sehr stark

Abbildung 7: Enzymaktivität in Abhängigkeit zum pH-Wert

Da für die untersuchten Lipasen in der Literatur beschrieben wurde, dass sie in der Lage sind Polyester abzubauen [9], wurde diese Eigenschaft näher untersucht. Aus diesem Grund wurde für praxisnähere Untersuchungen das Polyestersubstrat Impranil DLN-SD verwendet. Bei entsprechender Polyesterase-Aktivität wurde das Polyester abgebaut, so dass klare Höfe im Agar entstanden bzw. es zur Klärung der Suspension kam (s. Abbildung 8).

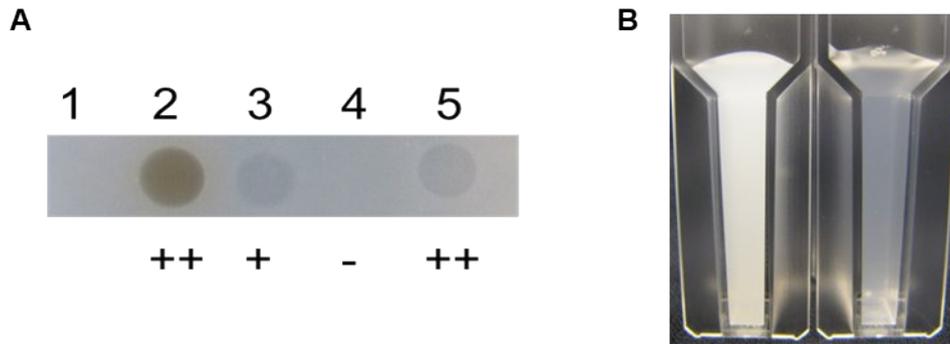


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Polyesterase-Aktivität mit dem Substrat Impranil DLN-SD

A: Klärhofbildung im Agar 1: PBS; 2: 1 U Lipase *M. miehei*; 3: 1 U Lipase *C. antarctica*; 4: 1 U Lipase *C. rugosa*; 5: 1 U Lipase *A. oryzae*; - keine Aktivität; + Aktivität; ++ hohe Aktivität; B: Klärung einer Suspension von Impranil DLN-SD mit 1000 U/ml Lipase *A. oryzae*

Es zeigte sich, dass entgegen der Literaturangaben die Lipase aus *C. rugosa* keine Aktivität gegenüber Polyester aufwies. Bei den anderen getesteten Enzymen konnte eine Polyesterase-Aktivität nachgewiesen werden. Hier erwiesen sich die Lipase aus *C. antarctica* sowie aus *A. oryzae* am geeignetsten.

Neben den qualitativen Untersuchungen im Agar wurde ebenfalls ein quantitativ auswertbarer photometrischer Test mit dem Polyestersubstrat etabliert. Eine Abnahme der Absorption bei 600 nm wies auf einen Abbau des Substrates hin. Dabei zeigte sich, dass der enzymbasierte Polyester-Abbau eine starke Abhängigkeit des verwendeten Puffers (Phosphat-gepufferte Saline bzw. Phosphatpuffer; Daten nicht gezeigt) aufwies und die Konzentration der verwendeten Puffer einen starken Effekt auf die Enzymaktivität hatte (s. Abbildung 9).

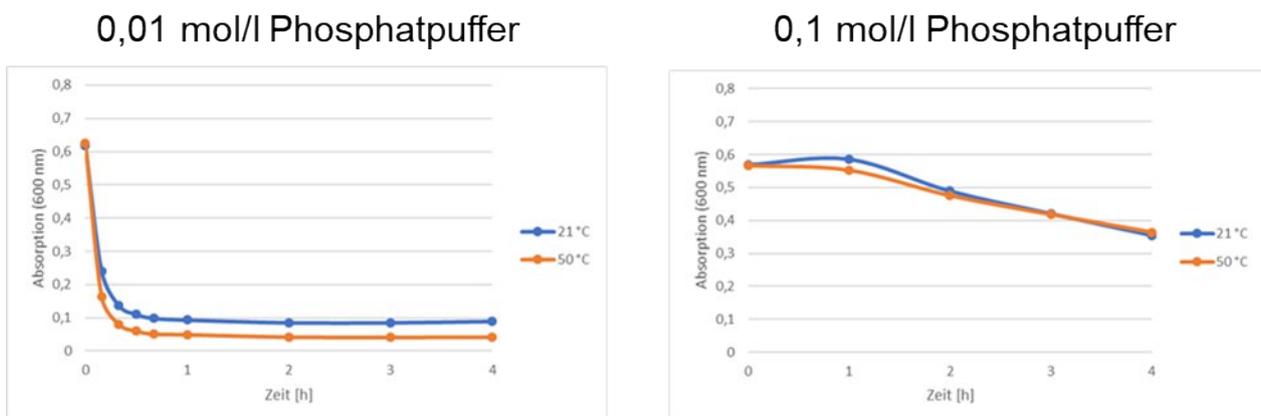


Abbildung 9: Darstellung der Abhängigkeit von Polyesterase-Aktivität und verwendetem Puffer (Substrat Impranil DLN-SD)

Durch eine Enzym-bedingte Klärung (1000 U/ml Lipase *A. oryzae*) der Substratlösung wird ein Unterschied der Enzym-Aktivität in verschiedenen Puffern sichtbar

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Auswahl der verwendeten Salze sowie eine geringere Konzentration dieser Salze einen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität hatte.

4.2 Extraktion von Oligomeren (HSNR)

Bei der Extraktion von Proben des Rohgarns „Sunvas“ zeigte sich ein sehr konstanter extrahierbarer Anteil von etwa 1,4 % der Probenmasse (s. Abbildung 10). Die Position der Probe in der Spule hatte keinen deutlichen Einfluss auf den Anteil extrahierbarer Substanzen.

Proben aus einer blindgefärbten, aber ansonsten identischen Spule (Datenreihe „Sunvas gefärbt“), zeigten einen deutlich höheren extrahierbaren Anteil von über 2 %, der zusätzlich am Anfang der Spule geringfügig, und im innersten Bereich der Spule deutlicher anstieg. Der allgemein höhere extrahierbare Anteil wird vermutlich auf die Anlagerung von Hilfsstoffen zurückzuführen sein, die während des Färbeprozesses verwendet und in der Extraktion entfernt wurden. Diese Auslegung wird durch die gelb- bis grünliche Färbung des Extraktes gestützt, welche bei der Extraktion des Rohgarns nicht auftrat (dort wurde, wie für Oligomere erwartet, ein farbloses Extrakt erhalten). Die Steigerung des extrahierbaren Anteils im Anfangs- und besonders im Endbereich der Spule könnte ein Hinweis auf eine ungleichmäßige Durchströmung der Spule im Färbeprozess sein. Bei der Durchströmung der Spule mit der Färbeflotte trat im eng gewickelten Garn vermutlich ein Tiefenfiltereffekt auf, so dass sich die eingesetzten Hilfsstoffe vor allem in den zuerst durchströmten Lagen sammeln.

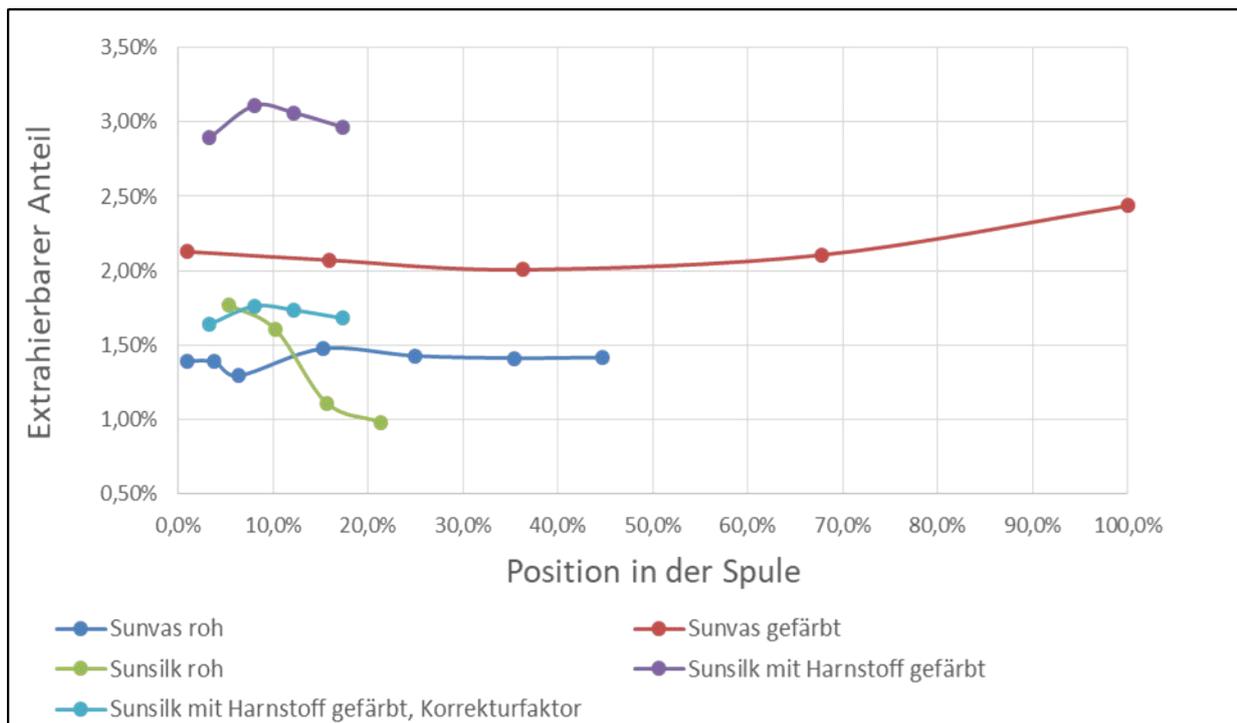


Abbildung 10: Ergebnisse der Extraktionsversuche

Anteil extrahierbarer Substanz an der Probenmasse in Abhängigkeit von der Position der Probe in der Spule in Abrollrichtung. 0 % = Anfang der Spule, 100 % = Spule vollständig abgerollt. „gefärbt“ bezeichnet hierbei eine Blindfärbung, d.h. ohne Einsatz von Farbstoff

Der deutlichere Anstieg der extrahierbaren Anteile im Inneren im Vergleich zum äußeren Bereich der Spule, unterstützt diese Theorie, da durch den geringeren Durchmesser der Spule in diesem Bereich eine Lage Garn eine geringere Masse besitzt. Bei Annahme einer Abscheidung von

Hilfsstoffen als Funktion der Anzahl der zu durchströmenden Lagen würde im inneren Bereich demnach die gleiche Masse an Hilfsstoffen auf weniger Garn abgeschieden, was den experimentellen Ergebnissen entspricht.

Bei der Extraktion des Rohgarns „Sunsilk“ wurde ein erhöhter Anteil extrahierbarer Substanzen am Anfang der Spule festgestellt, der im weiteren Verlauf abnahm. Der Grund hierfür konnte leider nicht ermittelt werden.

Bei der oben bereits erwähnten Färbung unter Einsatz von Harnstoff zeigte sich ein deutlich erhöhter Anteil extrahierbarer Substanzen im Vergleich zum Rohgarn. Da vermutet wurde, dass es sich bei der zusätzlich extrahierten Substanz zum Teil um Harnstoff handeln könnte, wurde eine Probe der extrahierten Substanz mit Wasser gewaschen. Durch Differenzwägung konnte der Anteil wasserlöslicher Substanzen und damit ein Korrekturfaktor ermittelt werden, durch den jeweils der Anteil des Extraktes berechnet werden konnte, der vermutlich auf Oligomere entfällt. In den ersten drei Datenpunkten stimmen die erhaltenen Ergebnisse gut mit denen des Rohgarns überein.

4.2.1 Untersuchung des Oligomerabbaus mittels UV/VIS-Spektrometrie

Die ersten UV/VIS-Messungen zur Untersuchung des enzymatischen Abbauverhaltens der extrahierten Oligomere scheiterten leider an einer anfänglich sehr hohen Trübung in der Küvette, die aus aufgewirbeltem (unlöslichem) Oligomerpulver bestand. Dieses sedimentierte über den Verlauf der Messungen und verfälschte dadurch die erhaltenen Messwerte. Bei späteren Messungen wurde daher genauestens auf eine vorsichtige Zugabe der Flüssigkeit über die Wände der Küvetten geachtet, das beschriebene Problem konnte leider trotzdem nicht immer vollständig vermieden werden.

Zum Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten wurde die alkalische Verseifung von Oligomeren auf die gleiche Weise untersucht, hierbei wurde die flüssige Komponente (2,5 ml 1 mol/l NaOH) wie beschrieben zu dem in der Küvette eingewogenen Oligomer (20 mg) gegeben. Abgesehen von geringen Sedimentationseffekten zu Beginn der Messung konnte die Verseifung erfolgreich zeitaufgelöst beobachtet werden (s. Abbildung 11).

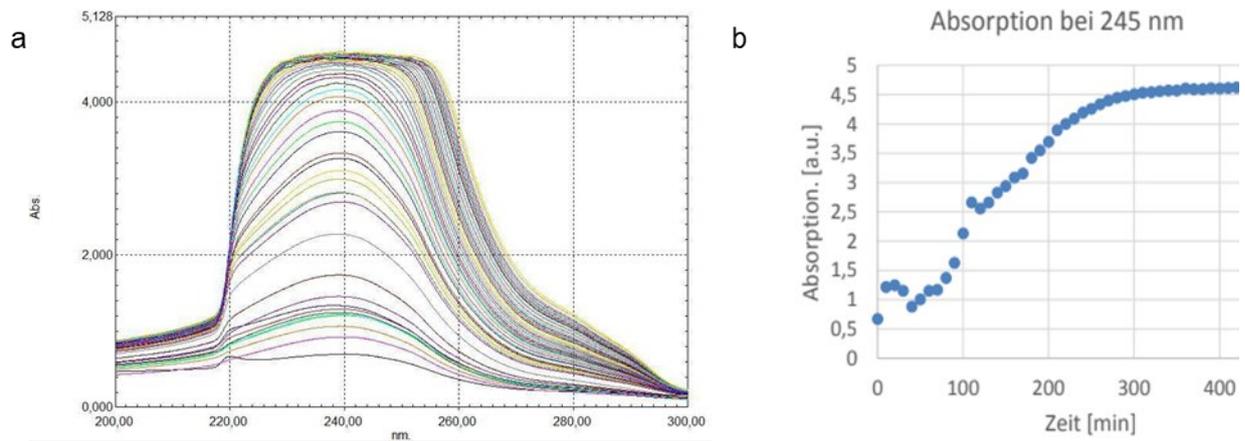


Abbildung 11: Spektren der zeitlich aufgelösten UV/VIS Analyse der Verseifung von Oligomeren
a: Absorptionsscan bei unterschiedlichen Zeitpunkten; b: Absorption bei 245 nm in Abhängigkeit von der Zeit

Die Absorption im relevanten Bereich um 245 nm stieg mit der Reaktionszeit an, und deutet, wie beschrieben, auf eine zunehmende Verseifung des Oligomers hin. Nach etwa 300 min stieg der Absorptionswert nicht mehr weiter an, was jedoch in diesem Fall nicht auf das Ende der Reaktion, sondern auf die Überschreitung des erfassbaren Messwerts zurückzuführen ist. Erkennbar ist dies auch in Abbildung 11 a, in der der Bereich oberhalb einer Absorption von 4,5 wie abgeschnitten wirkt. Die Messwerte bei höheren und niedrigeren Wellenlängen steigen weiter an, bis auch sie einen Wert von 4,5 erreichen. Dies muss in der Interpretation der weiteren Ergebnisse berücksichtigt werden.

Im nächsten Schritt wurden der enzymatische Abbau bzw. die enzymatische Ringöffnung bei den Oligomeren mit dieser spektroskopischen Methode untersucht (s. Abbildung 12). Basierend auf den Ergebnissen konnte die Reaktionsgeschwindigkeit aller in Frage kommender Enzyme untereinander verglichen werden.

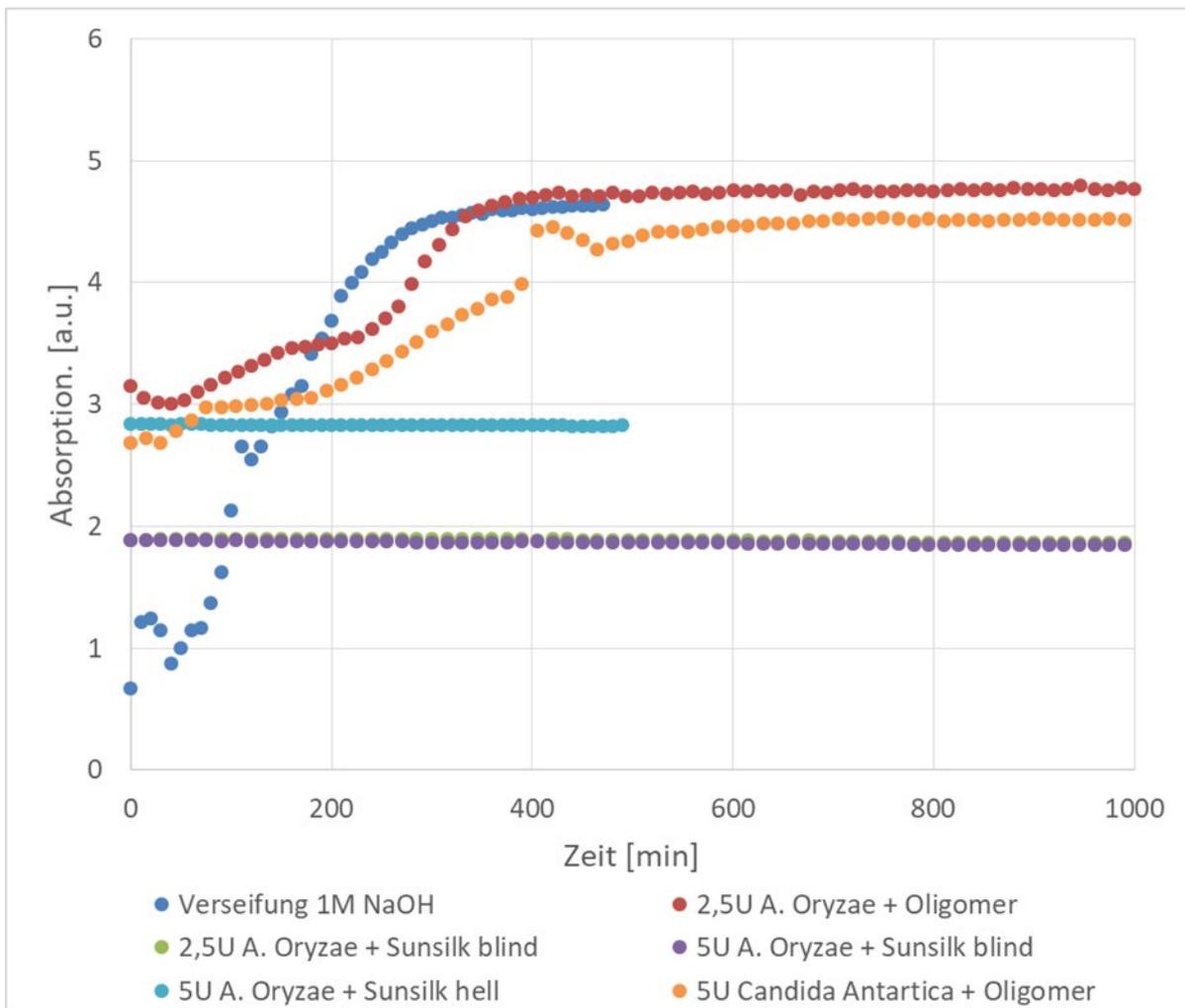


Abbildung 12: Ergebnisse der mittels UV/VIS-Spektroskopie analysierten enzymatischen Ringöffnung im Vergleich zur alkalischen Verseifung. „Sunsilk blind“ = ohne Farbstoff gefärbtes Garn; „Sunsilk hell“ = mit hellem Farbstoff gefärbtes Garn.

In den Versuchen wurde der Abbau der Oligomere durch Lipase A von *Candida antarctica* sowie Lipase von *Aspergillus oryzae* erfolgreich untersucht. Die Absorption bei 245 nm stieg über die Zeit an, was auf die Entstehung wasserlöslicher Abbauprodukte hinwies. Auch bei diesen Versuchen wurde innerhalb von etwa 5 h das Maximum der messbaren Absorption erreicht. Da durch die Gegenwart des Enzyms bereits von Anfang an eine Absorption von etwa 3 vorlag, fiel der für die Messung nutzbare Bereich leider gering aus. Dennoch war die enzymatische Ringöffnung gut zu beobachten.

Nach Beendigung der Reaktion befand sich am Boden der Küvette noch immer eine nennenswerte Menge Oligomer, die jedoch nicht gravimetrisch bestimmt werden konnte. Die Restmenge Oligomer deutete sowohl auf eine relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms (bei Raumtemperatur), als auch auf eine hohe Empfindlichkeit der Messmethode hin. Im nächsten Schritt wurde daher versucht, Garnproben anstelle des extrahierten Oligomers einzusetzen. Hierfür wurden ca. 20 mg verschiedener Garne in die Küvette eingewogen und mit verschiedenen Mengen der

Enzyme behandelt. Leider konnte hierbei jedoch keine Entstehung von Abbauprodukten beobachtet werden. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist eine zu geringe Oligomerkonzentration an der Oberfläche der Garne, jedoch wäre auch die Gegenwart von Substanzen (in oder an den Garnen) denkbar, die den Abbau durch die Enzyme verhindern – beispielsweise Rückstände aus dem Färbeprozess.

Nachfolgend wurde die an der HSNR entwickelte TfCut2 in die Reaktion eingesetzt. Ein Oligomerabbau konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, es kam nicht zu einem Anstieg der Absorption. Vermutlich war die Konzentration des Enzyms zu niedrig, um eine messbare Reaktion zu generieren. Die Enzyme Tcur1278-WT und Tcur1278-TA2 konnten leider mit dieser Methode nicht untersucht werden, da erst nach Projektende eine ausreichende Menge Enzym vorlag.

Eine Probe, der aus den Garnen von ST extrahierten Oligomere, wurde zusätzlich an die Universität in Greifswald, Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer / Dr. Wei geschickt. Dort wurden diese Oligomere mit einer Polyester-degradierenden Esterase (Wildtyp und Mutante; höherer Aktivität gegenüber BHET/MHET) versetzt. Es wurde festgestellt, dass diese Enzyme das Oligomer abbauen und die Effizienz des Abbaus stark von der Substratkonzentration abhängt. Diese Ergebnisse erreichten das Projektteam erst nach der Projektlaufzeit, so dass auch diese Polyester-degradierende Esterase nicht mehr in weiterführenden Versuchen eingesetzt werden konnte.

4.3 Einstellung der Verfahrensparameter und Versuche im Laborfärbegerät von ST

4.3.1 Versuche im Laborfärbeapparat (ST)

Zunächst wurde das Sun silk Garn bei **einem ersten Versuch** lediglich mit einer Standardfärbung der Firma ST behandelt. Das Garn aus diesem Ansatz diente für die nachfolgenden Versuche als Vergleichsobjekt, da durch die Standardfärbung, wie erwartet, Oligomere auf der Garnoberfläche abgelagert wurden. Das gefärbte Garn und das unbehandelte Rohgarn wurden an der HSNR auf den Oligomer Anteil sowie rasterelektronenmikroskopisch untersucht und miteinander verglichen (s. Abbildung 20 und Abbildung 21).

Bei **einem zweiten Versuch** wurde das Sun silk Garn im Anschluss an die Färbung zusätzlich einer 60-minütigen Enzymbehandlung unterzogen. Es konnte jedoch nach der Enzymbehandlung keine signifikante Reduktion der Oligomere im Vergleich zu der ersten Spulenfärbung festgestellt werden (s. Abbildung 22).

Aus diesem Grund wurde in **einem dritten Versuch** die Nachbehandlung mit der Enzymlösung auf 6 h erhöht. Hierbei sollte sich zeigen, ob die Enzyme bei einer längeren Wirkdauer eine größere Menge an Oligomeren abbauen können. Leider zeigten auch nach diesem Versuch die REM-Bilder einen ähnlichen Oligomergehalt im Vergleich zu dem unbehandelten Garn (s. Abbildung 23).

Aufgrund der Resultate der durchgeführten Versuche wurde vermutet, dass möglicherweise die Oligomere an den Polyester-Garnoberflächen schwerer für die Enzyme zugänglich sind als die Oligomere an den glatten Wänden des Färbeapparats. Aus diesem Grund wurde in **einem vierten Versuch** eine Enzymbehandlung des Laborfärbeapparates ohne Garnspulen vorgenommen. Diese Behandlung wurde wiederum mit dem standardmäßigen Auskochprozess verglichen.

In dem vierten Versuch wurde über eine Dauer von 6 h die Flotte immer wieder bewegt und ruhen gelassen, die Enzymaktivität über den gesamten Zeitraum hinweg überprüft und dokumentiert. Um sicher zu stellen, dass die Enzyme über die gesamte Dauer der Enzymbehandlung aktiv waren, wurde dies mit Hilfe von den Substratmembranen getestet (s. Abbildung 13).



Flotte zu Beginn



Nach der ersten Zirkulation



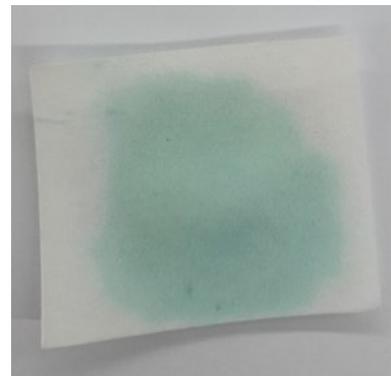
Nach der ersten Verweilzeit



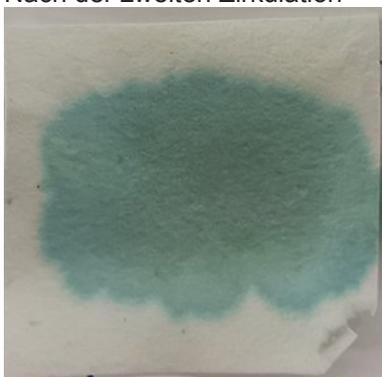
Nach der zweiten Zirkulation



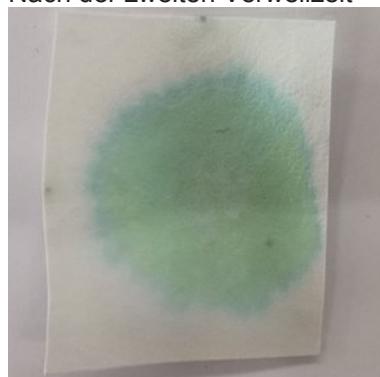
Nach der zweiten Verweilzeit



Nach der dritten Zirkulation



Nach der dritten Verweilzeit



Nach der vierten Zirkulation



Nach der vierten Verweilzeit

Abbildung 13: Bestimmung der Enzymaktivität mittels Indoxylacetat-Substratmembranen im vierten Versuch mit dem Laborfärbeapparat

Anhand der verschiedenen Substratmembranen ist ersichtlich, dass die Enzymaktivität über die Dauer des Versuchs zwar abgenommen hat, aber selbst nach der vierten Verweilzeit immer noch aktives Enzym vorlag. Der Laborfärbeapparat wurde jedoch durch die Enzymbehandlung nicht gereinigt (s. Abbildung 14). Der Apparat wies nach der Behandlung mit der Enzymflotte scheinbar mehr Verschmutzungen auf als zuvor.

Laborfärbeapparat vor der Enzymbehandlung



Laborfärbeapparat vor dem Auskochprozess



Laborfärbeapparat nach der Enzymbehandlung



Laborfärbeapparat nach dem Auskochprozess



Abbildung 14: Anschmutzung des Färbeapparats nach der Enzymbehandlung und nach dem Auskochprozess

In einem **fünften Versuch** wurde die 6-stündige enzymatische Reinigung zunächst wiederholt. Die Enzymaktivität wurde wiederum nach jedem Wechsel zwischen Zirkulation und Ruhephase auf ihre Aktivität überprüft (s. Abbildung 15).

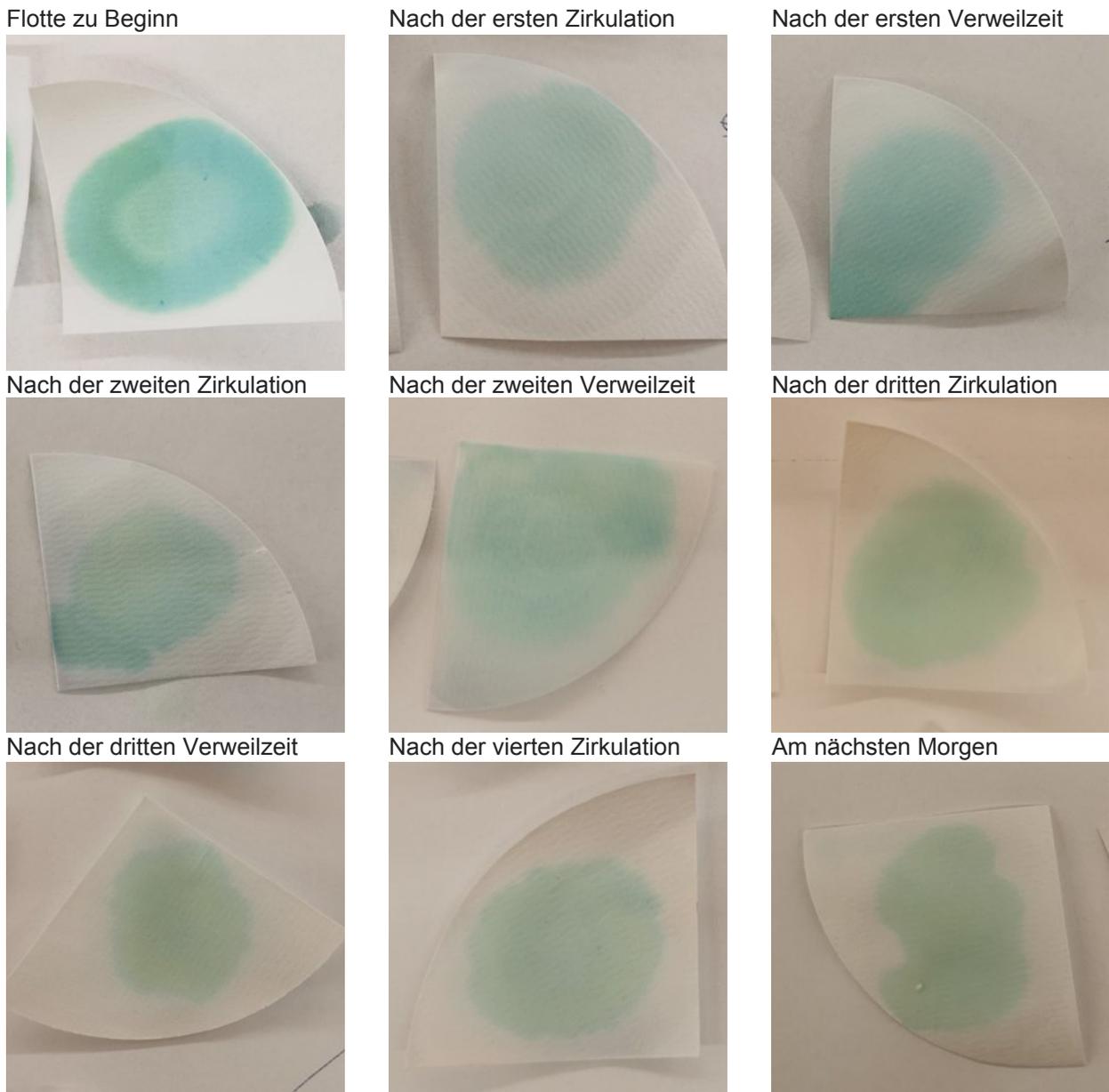


Abbildung 15: Enzymaktivität während des fünften Versuchs im Garnfärbeapparat

Im Vergleich zu dem vierten Versuch wurden die Enzyme nach der 6-stündigen Behandlung nicht sofort inaktiviert, sondern die gesamte Flotte zunächst in das Ansatzgefäß zurück gepumpt, um den Reinigungsstand des Färbeapparates zu überprüfen (s. Abbildung 16). Da der Färbeapparat noch keinen ausreichenden Reinigungsstand aufwies, wurde die Enzymflotte wieder hineingefüllt und dort über Nacht ruhen gelassen. Mit Hilfe der Substratmembranen konnte nachgewiesen werden, dass die Enzyme über den gesamten Zeitraum, also auch noch am nächsten Morgen, Aktivität aufwiesen.

vor der Enzymbehandlung



nach 6-stündiger
Enzymbehandlung



nach Behandlung über Nacht



Abbildung 16: Laborfärbeapparat, vor und nach der Enzymatischen Reinigung, sowie nach längerer Verweilzeit der Flotte

Nach der vollständigen Behandlung war zu beobachten, dass sich zwar im Behälter weiterhin deutliche Ablagerungen am oberen Rand zeigten, jedoch die Flotte auch gelöste Partikel aufwies.

Es war somit anzunehmen, dass durch die Enzymflotte die Oligomere von der Wand des Färbeapparats gelöst wurde, diese sich jedoch an der Wasseroberfläche angereichert, sich beim Ablassen abgesetzt und eine kreisförmige Ablagerung am oberen Rand des Behälters gebildet hat.

4.4 Garnprüfungen nach Enzymbehandlung (ST)

Um zu kontrollieren, ob bzw. welchen Einfluss die Enzymbehandlung auf die Garne haben, wurden die Garne auf eine mögliche Farbveränderung nach der Behandlung, ihre Witterungsbeständigkeit sowie diverse textilphysikalische Qualitätsprüfungen untersucht. Hierzu wurden die Garne eingesetzt, die im dritten Versuch der Enzymbehandlung verwendet wurden.

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen wurden aus einer Garncharge weitere Spulen mit dem bisherigen Standardverfahren gefärbt. Rein optisch ließ sich nach dem Färben kein Unterschied erkennen. Die Garnfärbungen wurden bei ST mit dem Spektralphotometer CM 3610 a (Konica Minolta) auf mögliche Farbabweichung untersucht. Die Abweichungen lagen bei 0,3 und sind damit völlig im Rahmen. Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen die beiden Proben im Vergleich. In

Abbildung 17 wird deutlich, dass beide Kurven nahezu identisch verlaufen und es somit keine Metamerie zwischen den beiden Spulen gab.

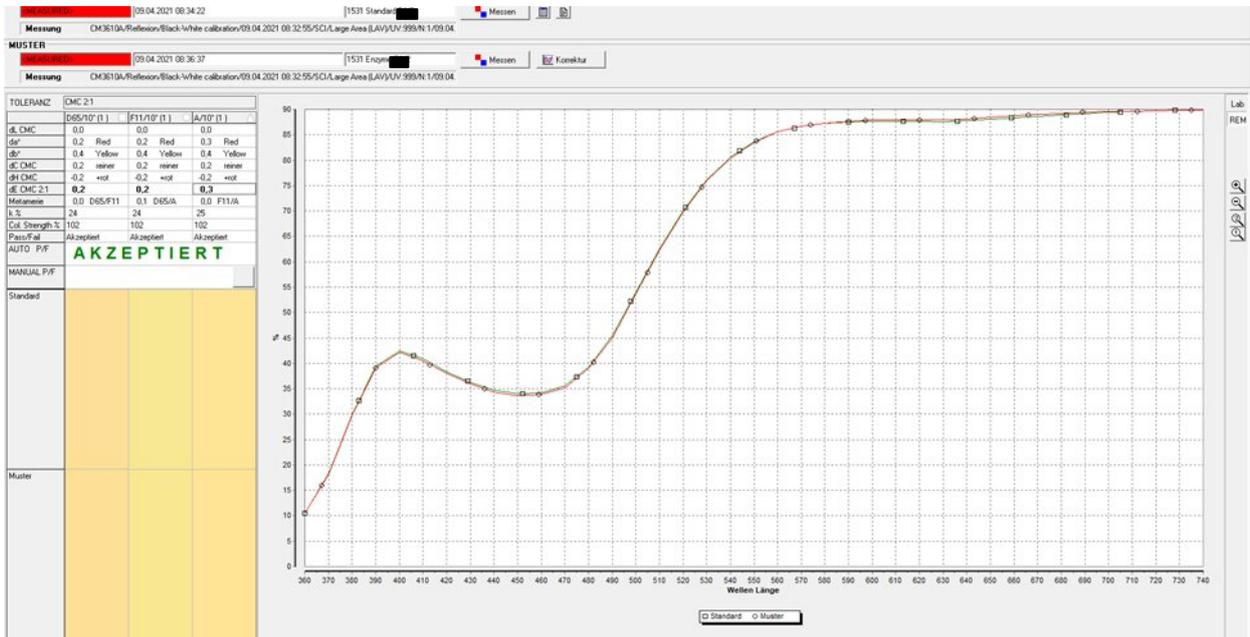


Abbildung 17: Ergebnisse der Farbdifferenzmessung von der Standardfärbung gegen die Färbung mit enzymatischer Nachreinigung

In Abbildung 18 wird die Farbabweichung angezeigt. In allen drei Bereichen lag die Abweichung unter 1. Bei Tageslicht und Kaufhauslicht bei 0,2 und bei Glühlampenlicht / Abendlicht lag die Abweichung bei 0,3.

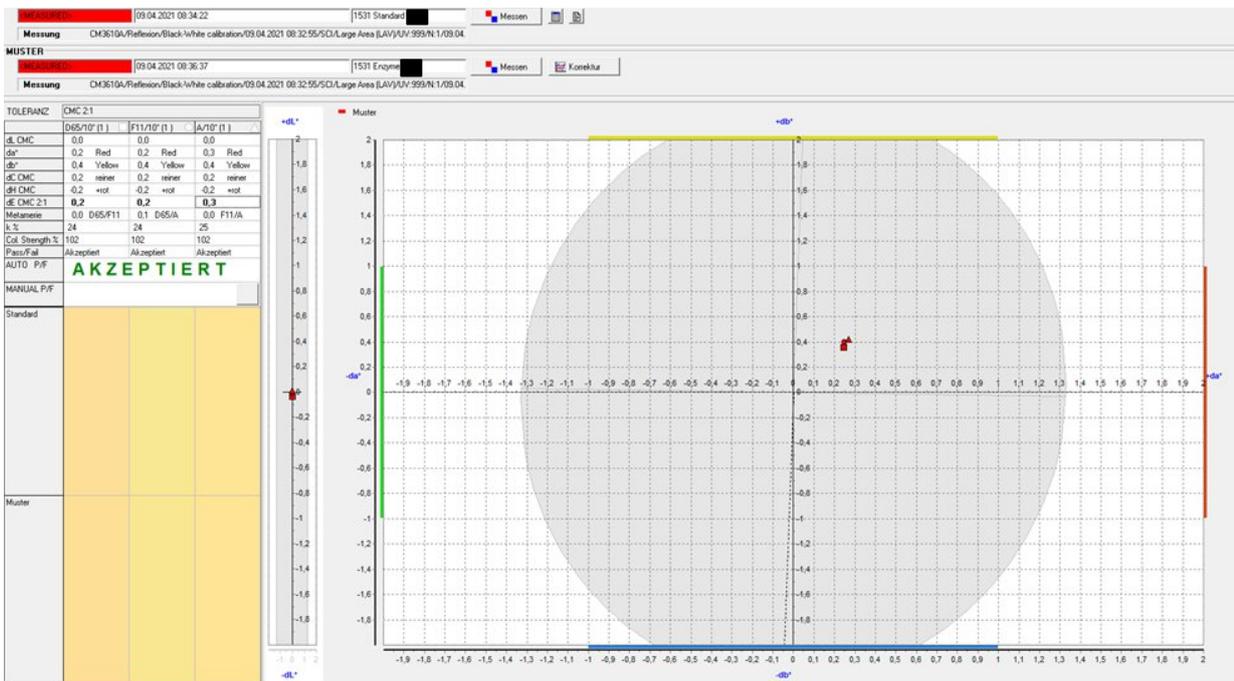


Abbildung 18: Farbabweichung Vergleich Standardfärbung und Färbung mit enzymatischer Nachreinigung
 = für D65, Tageslicht (0,2) = für F11, Kaufhauslicht (0,2) = für A, Glühlampenlicht / Abendlicht (0,3)

Die Werte wurden nach Toleranzblock CMC 2:1 gemessen. Bei CMC handelt es sich nicht um einen Farbraum, sondern um ein Toleranzsystem. Er bietet eine bessere Übereinstimmung zwischen der visuellen und gemessenen Farbdifferenz. Der CMC-Farbtoleranzraum basiert auf CIELAB (L^*C^*h) [10].

Bei der Prüfung zur Witterungsbeständigkeit (s. Abbildung 19) waren beide Proben kaum ausgebleicht und erfüllten die Note 7 bis 8, eher 8. Die Farbechtheit war also auch nach einer enzymatischen Behandlung gegeben.

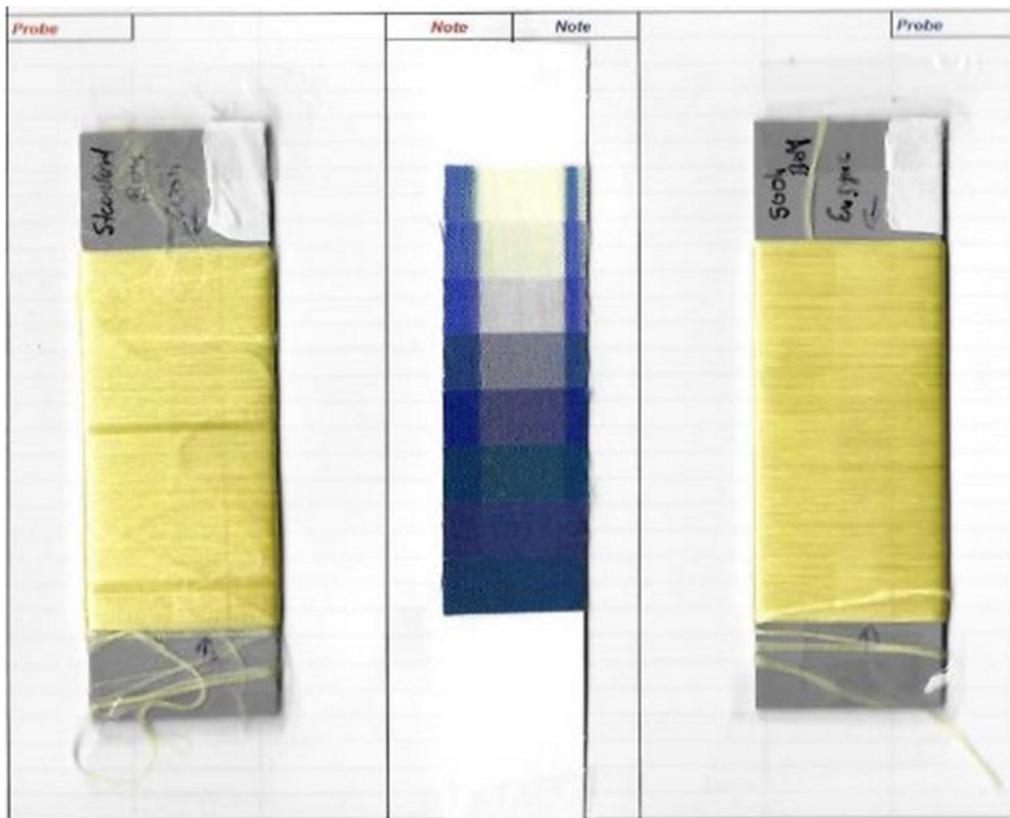


Abbildung 19: Proben nach 500 Stunden Xenontester
links: Standard, rechts: nach Enzymbehandlung

Zudem wurden diverse textilphysikalischen Qualitätsuntersuchungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Enzymbehandlungen einen Einfluss auf verschiedene Garnspezifische Eigenschaften aufwies (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Textilphysikalische Qualitätsuntersuchungen nach verschiedenen Färbemethoden

Prüfungsart	Norm	Einheit	Nach Enzymbehandlung	Standardfärbung	Standard rohweiss
Feinheitsbezogene Höchstzugkraft (Mittelwert)	EN ISO 2062	cN/tex	36,2	35,9	38,2
Feinheitsbezogene Höchstzugkraft (Minimalwert)	EN ISO 2062	cN/tex	34,1	34,0	37,0
Feinheitsbezogene Höchstzugkraftdehnung (Mittelwert)	EN ISO 2062	%	35,5	35,2	30,5
Feinheitsbezogene Höchstzugkraftdehnung (Minimalwert)	EN ISO 2062	%	31,6	30,2	25,7
Heißluftschumpf (160 °C – 12 min)	Hausmethode	%	3,4	3,5	18,4
Intermingelungspunkte (Imp)	Hausmethode	Punkte/m	90	90	90
Schlingenneigung (schlingenfreie Länge auf 1 m)	Hausmethode	cm	100,0	100,0	100,0
Shore-Wickelhärte (Ziwi Shore-Härtemessgerät)	Hausmethode		17,0	25,0	28,0

Die Eigenschaften des Garns nach der Enzymbehandlung wiesen im Vergleich zu dem standardgefärbten Garn bzw. zum Rohgarn keine signifikanten Unterschiede auf.

4.5 Untersuchungen zur Identifikation von Oligomeren (HSNR)

4.5.1 Identifikation von Oligomeren über Rasterelektronen-Mikroskopie

Die von ST im Laborfärbeapparat behandelten Garne (s. Kap. 4.3.1) wurden rasterelektronenmikroskopisch auf Oligomerablagerungen untersucht. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dargestellt.

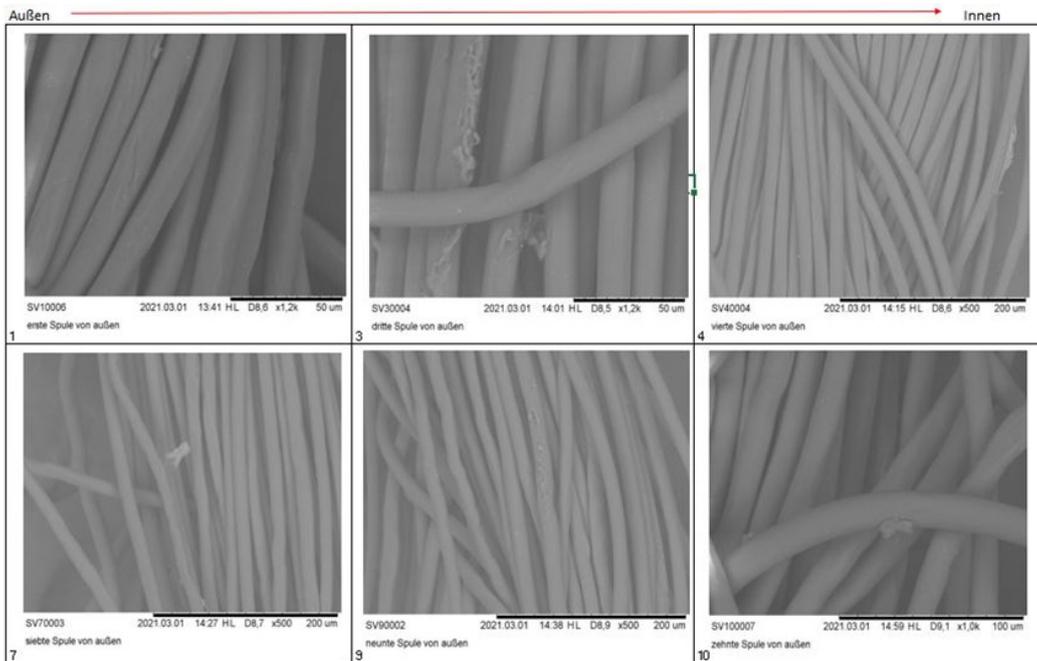


Abbildung 20: REM-Bilder vom Sunsilk Garn (Rohgarn)

Als erstes wurde das Sunsilk-Garn als Rohgarn sowie das Sunsilk-Garn standardgefärbt analysiert.

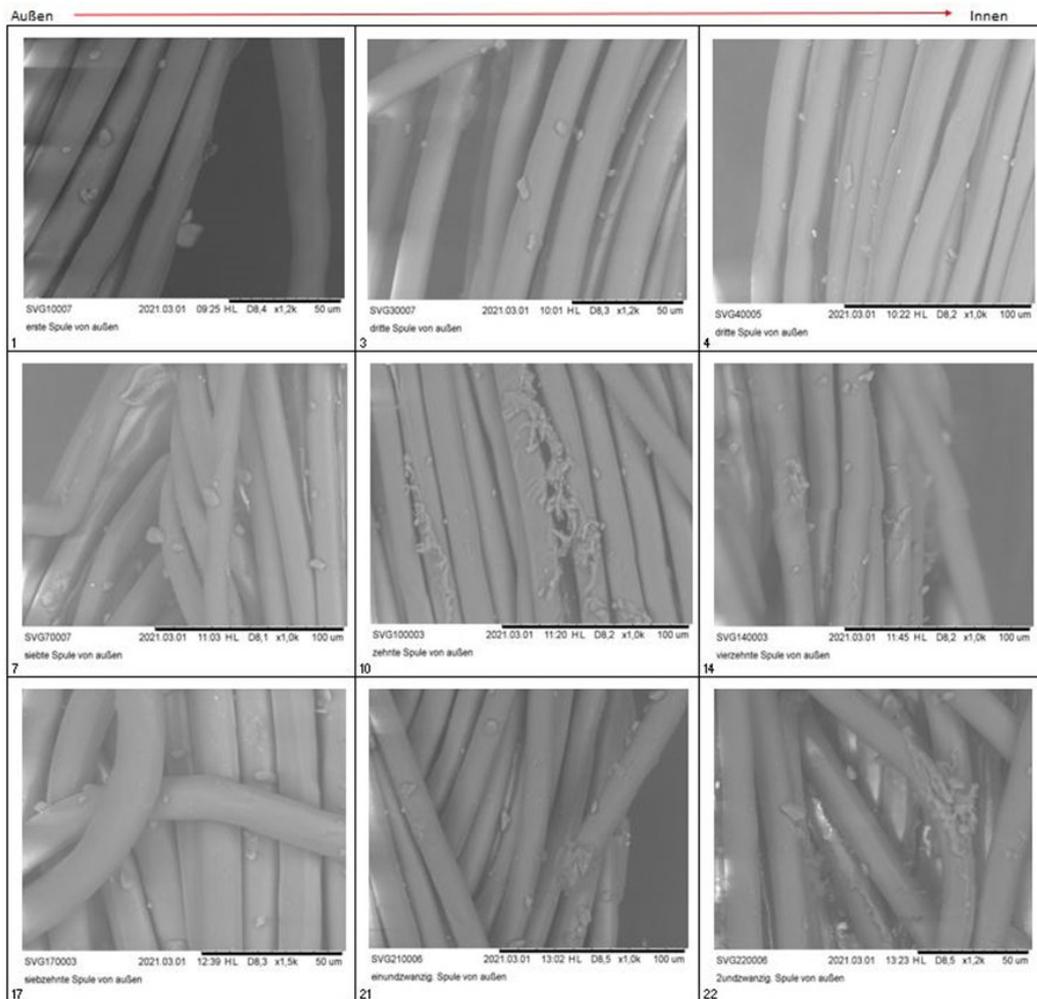


Abbildung 21: REM-Bilder vom Sunsilk Garn mit Standardfärbung

Abbildung 21 zeigt, dass die Standard PES-Färbung Oligomerablagerungen auf den Garnen bewirkt hat. Es wird auch deutlich, dass die höchste Oligomerablagerung in der Mitte und im Inneren der Färbespule zu finden war. Verglichen damit zeigte das Rohgarn (Abbildung 20) eine glatte Oberfläche; Oligomere waren kaum vorhanden.

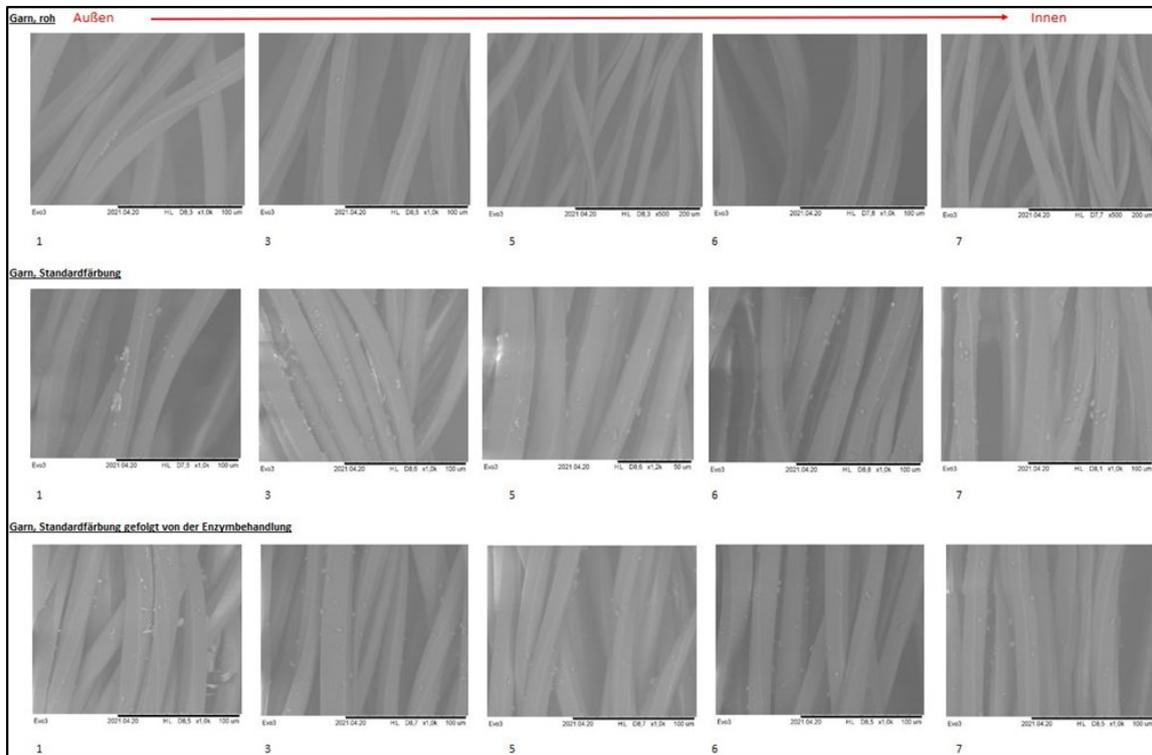


Abbildung 22: REM-Bilder von Sunsilk Garn als Rohgarn, mit einer Standardfärbung und mit einer Standardfärbung gefolgt von einer einstündigen Enzymbehandlung

Nach einer einstündigen Enzymbehandlung (nach dem in 4.3.1 beschriebenen Verfahren) wurde eine ähnliche Oligomerablagerung wie nach der Standardfärbung festgestellt (s. Abbildung 20), so dass daraus geschlossen werden kann, dass während der einstündigen Enzymbehandlung die Oligomere nicht abgebaut werden konnten.

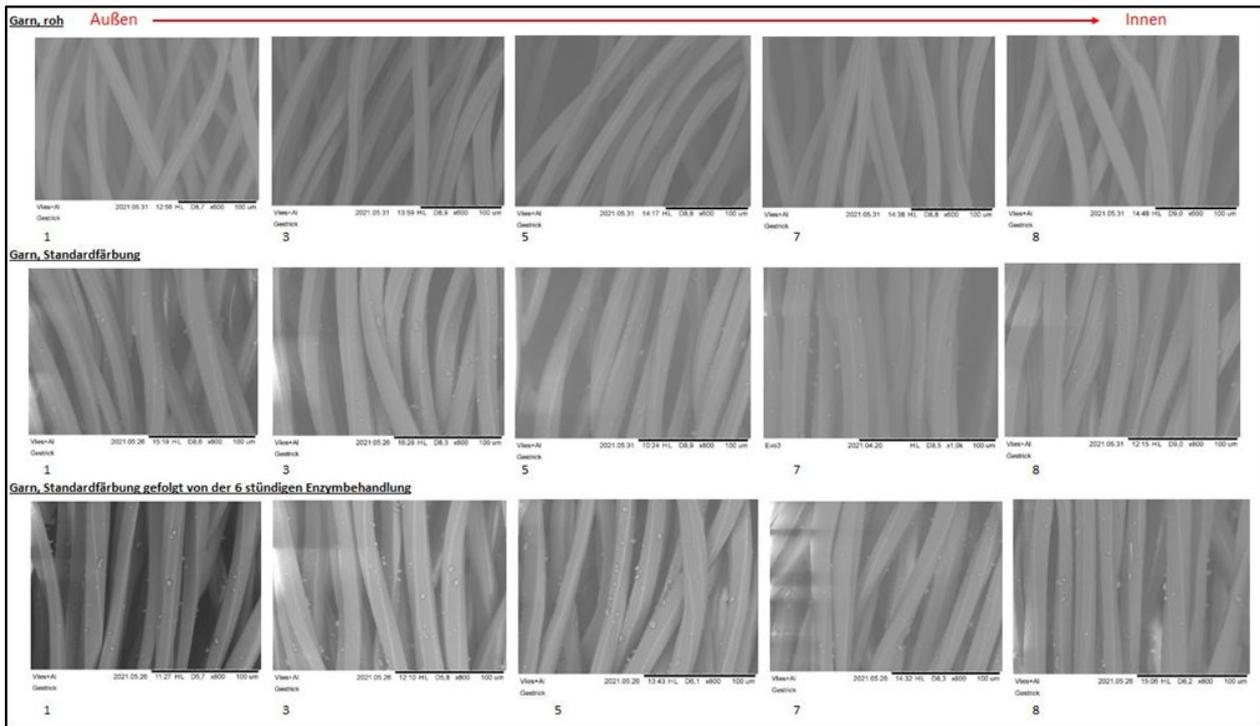


Abbildung 23: REM-Bilder von Sunsilk Garn als Rohgarn, mit einer Standardfärbung und mit einer Standardfärbung gefolgt von einer sechstündigen Enzymbehandlung

Auch nach einer 6-stündigen Enzymbehandlung konnte keine Reduzierung der Oligomerablagerungen auf den Garnoberflächen festgestellt werden (s. Abbildung 23).

4.5.2 Identifikation von Oligomeren über ATR-IR Analyse

Um zu klären, ob es sich bei den Rückständen im Färbegerät der Firma ST ausschließlich um Oligomere handelt, wurden die Rückstände und die aus den Garnen extrahierten Oligomere mittels ATR-IR-Spektroskopie untersucht und die erhaltenen Spektren miteinander verglichen. Die per Extraktion aus Polyestergeräten erhaltenen Proben konnten anhand ihres IR-Spektrums als die erwarteten PET-Oligomere identifiziert werden. Die aus dem Färbeapparat entnommenen Proben wiesen ebenfalls alle für PET-Oligomere erwarteten Absorptionsbanden auf, zusätzlich waren jedoch noch weitere Banden (insbesondere bei etwa 1500 cm^{-1} , rote Markierung in Abbildung 24) zu erkennen, die die erwarteten überlagerten und auf weitere Inhaltsstoffe hindeuteten. Da die aus dem Färbeapparat entnommenen Proben in Lösung außerdem eine deutlich sichtbare Färbung aufwiesen, wird angenommen, dass in der Probe neben den Oligomeren auch noch verschiedene Farb- und Hilfsstoffe aus dem Färbeprozess vorlagen.

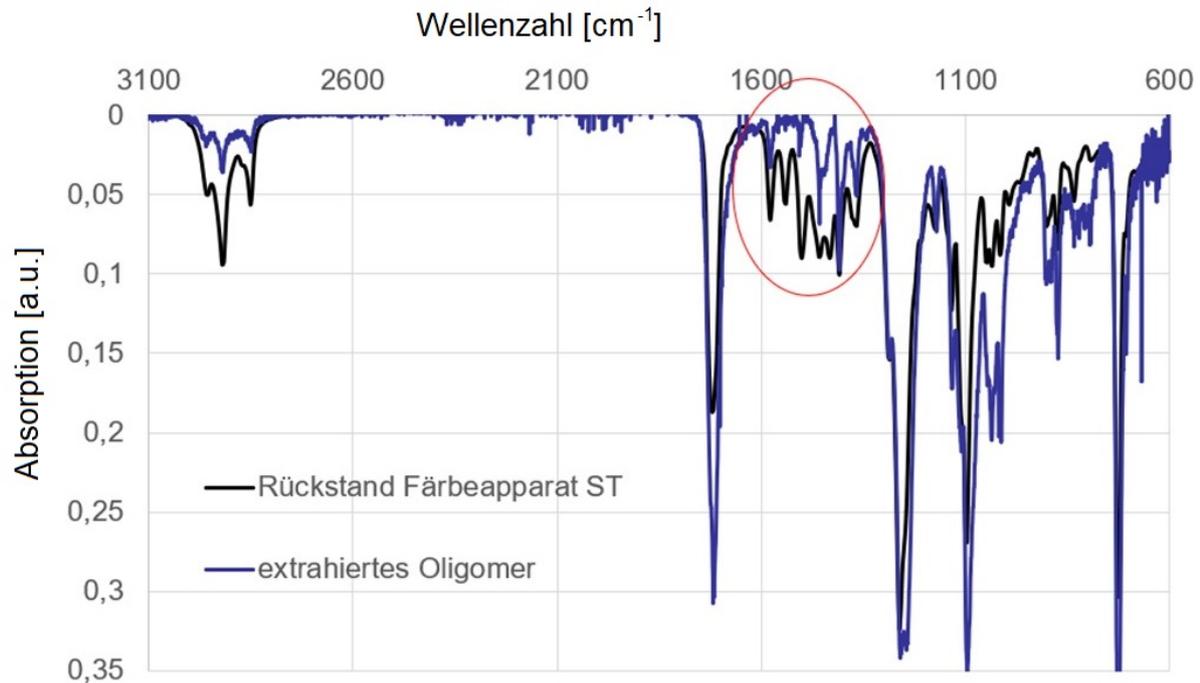


Abbildung 24: IR-Spektren des aus Garn extrahierten Oligomers und des Rückstandes aus Färbeapparaten im direkten Vergleich.

Aufgrund der Vielzahl an in Frage kommenden Stoffen, und der sehr geringen Probenmenge, war es leider nicht möglich, weitere Inhaltsstoffe der Probe zu identifizieren. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Fremdstoffe nicht mittels der verwendeten Enzyme abgebaut werden können, und daher nach der Enzymbehandlung im Färbeapparat verbleiben werden.

4.6 Wiederverwendbarkeit der Enzyme

Für die im Rahmen des Projektes durchgeführten Versuche im Laborfärbeapparat wurden jeweils 33 l Flotte mit einer Menge von 3 ml/l Enzymlösung versetzt. Da nach jedem Versuch im Laborfärbeapparat die Flotte abgelassen werden musste, wurden auch die darin befindlichen Enzyme entsorgt. Aus umweltschonenden sowie wirtschaftlichen Gründen sollten die Enzyme aus der Reinigungsflotte rückgewonnen werden können, damit eine Wiederverwendung möglich wird.

Zunächst wurde die Möglichkeit einer Immobilisierung der Enzyme an einen Filter ausgelotet. Hierzu sollten chemikalienresistente, wasserdurchlässige Filter mit geeigneten funktionellen Gruppen eingesetzt werden, an deren Oberfläche die Enzyme gebunden werden. Im Laufe des Projektes wurde jedoch von dieser Überlegung Abstand genommen, da eine Beweglichkeit der Enzyme in der Flotte als unerlässlich angesehen wurde. Weiterhin wäre die Enzymkonzentration bei Einsatz eines Filters sehr begrenzt gewesen und zudem wäre es möglich, dass die immobilisierten Enzyme durch Reststoffe aus der Flotte verdeckt würden, so dass sie nicht mehr in Kontakt mit den Oligomeren treten könnten.

Eine andere Möglichkeit der Immobilisierung von Enzymen bestand darin, dass die Enzyme an Oberflächen von superparamagnetischen Beads gebunden wurden. Diese Methode hatte den

Vorteil, dass die Enzyme in der Flotte beweglich blieben und im Anschluss an den Prozess mit Hilfe eines Magneten zurückgewonnen werden konnten.

Bei dem Hersteller wurden verschiedene, funktionalisierte Beads angefragt, da vermutet wurde, dass die Immobilisierungseffizienz auch von der Immobilisierungsreaktion abhängig ist. Aufgrund der Corona-Pandemie waren jedoch viele Reagenzien nicht verfügbar, so dass bei dem Hersteller lediglich Carboxylat-funktionalisierte Partikel beschafft werden konnten.

Eine schematische Darstellung der Immobilisierung von Enzymen an Carboxylat-funktionalisierte Beads ist in Abbildung 25 dargestellt.

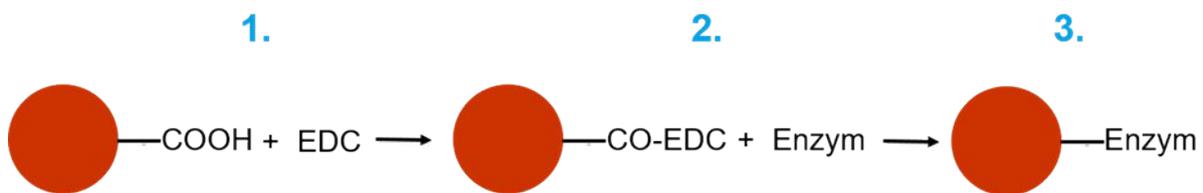


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Enzymen an magnetische Beads

Die Partikel wurden zuerst mit dem Crosslinker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert, so dass die verwendeten Enzyme anschließend an den Crosslinker kovalent gekoppelt werden konnten. Nicht gebundene Enzyme wurden durch mehrmaliges Waschen der Partikelsuspension entfernt. Der Erfolg der Immobilisierung wurde mit Hilfe von einem photometrischen Aktivitätstest ermittelt (s. Abbildung 26). Im Laufe des Projektes wurden verschiedene Enzymkonzentrationen verwendet, um die Immobilisierungseffizienz zu optimieren.

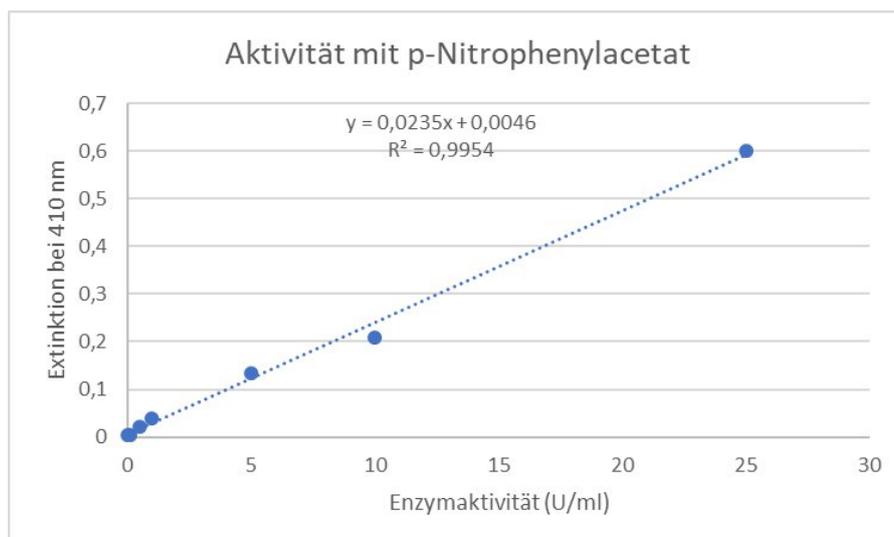


Abbildung 26: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Lipaseaktivität mit Nitrophenylacetat

Die Immobilisierungsversuche wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Lipase aus *A. oryzae* durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Immobilisierungseffizienz zunahm, wenn eine höhere

Konzentration der Enzyme verwendet wurde. Wurden 300 U dem Immobilisierungsansatz hinzugefügt, so lag die Immobilisierungseffizienz bei $4,1 \text{ U} / 1,8 \cdot 10^{10} \text{ Partikel}$. Für 500 U wurde ein Wert von $9,5 \text{ U} / 1,8 \cdot 10^{10} \text{ Partikel}$ und für 1000 U ein Wert von $25,3 \text{ U} / 1,8 \cdot 10^{10} \text{ Partikel}$ ermittelt. Bei dem Einsatz einer noch höheren Enzymkonzentration konnte die Immobilisierungseffizienz nicht weiter gesteigert werden. Die Enzymaktivität war über mehrere Wochen nach Lagerung im Kühlschrank stabil.

Die Separation der superparamagnetischen Partikel war mit Hilfe eines handelsüblichen Magneten innerhalb von wenigen Sekunden möglich (s. Abbildung 27).

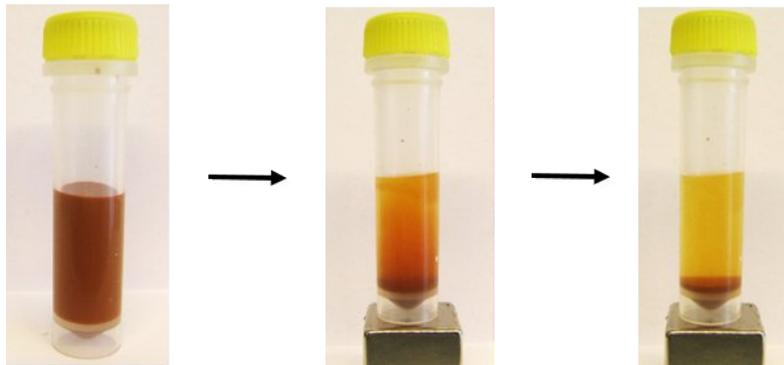
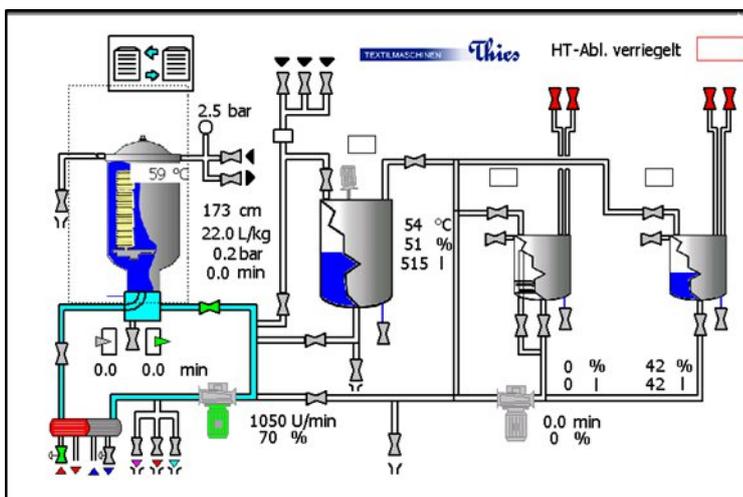


Abbildung 27: Rückgewinnung der Beads mit einem Magneten

Somit lässt sich feststellen, dass eine Immobilisierung an magnetische Partikel zur Rückgewinnung der Lipasen im Anschluss an die Enzymbehandlung im Färbeapparat prinzipiell geeignet wäre.

4.7 Ökologische und Ökonomische Gesamtbeurteilung (ST, HSNR)

Im Folgenden wird eine ökologische und ökonomische Gesamtbeurteilung des Verfahrens durchgeführt. In Abbildung 28 ist ein Schema des Färbeapparates sowie das bisherige Auskochrezept dargestellt.



Auskochrezept pro Liter Wasser:	
Natronlauge	= 10 ml
Merse RTU	= 5 ml
Hydrosulfit	= 2 g
Tecoredukt SRM 235%	= 1,5 g
Essigsäure	= 1,5g
TC entlüfter UKL	= 0,5 g

Abbildung 28: Schema des Färbeapparats

Abbildung 29 zeigt die Zeit-Temperaturkurve des Auskochprozesses. In der Grafik wird deutlich, dass neben dem Einsatz von Chemikalien und Wasser auch ein hoher Energieeinsatz notwendig ist. Dieser Verbrauch wurde zusammen mit dem Verbrauch an Energie und entstehende Stoffströme ermittelt.

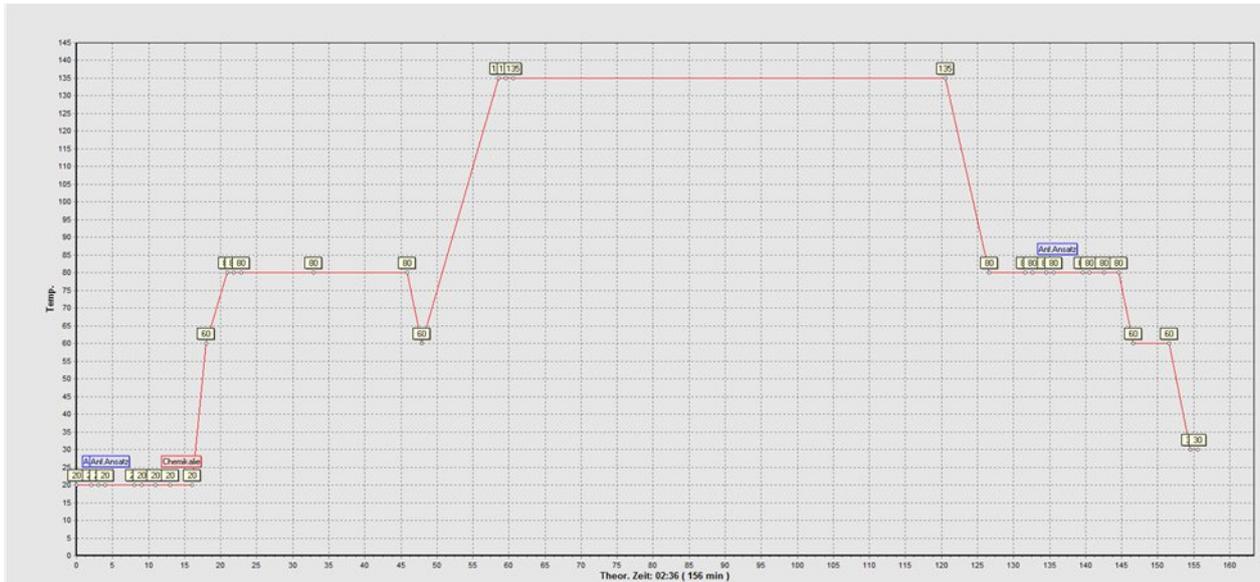


Abbildung 29: Zeit-Temperaturkurve des Auskochprozesses

Bei ST wurden im Jahr 2021 ca. 46.893 € für die Reinigung der Färbeapparate aufgebracht. Hierbei wurden die Färbeapparate insgesamt 296 Mal für jeweils 156 Minuten mit 3000 l Wasser ausgekocht. Die Kosten errechnen sich folgendermaßen (s. Tabelle 4):

Tabelle 4: Jährliche Kosten für den Auskochprozess

	Kosten für den Auskochprozess
Laufzeit/Overhead	130,74 €
Chemikalien	17,39 €
Wasser	10,10 €
Summe pro Auskochen	158,24 €
Summe im Jahr (für 296 Mal Auskochen)	48.893,04 €

Der Einsatz von Enzymen während des Färbeprozesses könnte pro Woche bei der Garnfärbung zu einer Wasser- und Energieersparnis von bis zu 17.760 Liter Wasser und 93,09 kWh führen, da auf den anschließenden Auskochprozess verzichtet werden könnte. Auf das gesamte Jahr (ausgehend von 50 Arbeitswochen) gerechnet wären dies 888.000 Liter Wasser und 4.654,5 kWh Energie. Die Mehrkosten für den Einsatz von Enzymen während des Färbeprozesses rentieren sich somit, sobald sie den Einsparungen durch das Wegfallen des Auskochprozesses entsprechen. Zudem würde der Einsatz von Enzymen dazu führen, dass auch im gefärbten Garn weniger Oligomere vorhanden wären. Bei den folgenden Prozessen wie dem Weben würden weniger Oligomere abgerieben, die

sich in den Maschinen festsetzen können. Zusätzlich entsteht durch die Oligomere beim Färbungsprozess eine Streifigkeit auf der Ware, durch deren Verhinderung pro Jahr zusätzlich ca. 29.880 € eingespart werden könnten.

Würden die Enzyme erst in einem separaten Folgeprozess im Anschluss an die Färbung eingesetzt, würde dieser Prozess durch den Einsatz niedrigerer Temperaturen zwar energieärmer aber durch die momentan hohen Enzym-Anschaffungskosten immer noch teurer sein als der Auskochprozess.

5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen des Forschungsprojektes konnten kommerziell erhältliche Polyesterasen identifiziert werden, die im Labormaßstab Oligomere abbauen können. Allerdings ließ sich dieser Ansatz nicht auf die Färbeapparate beim Projektpartner ST transferieren. In den praxisnahen Färbeprozessen treten noch zu viele Störfaktoren auf, die die enzymatische Reaktion hemmen können bzw. die dazu führen, dass die Garne und der Apparat nicht enzymatisch gereinigt werden können. Zusätzlich konnte das vielversprechendste kommerzielle Enzym gegen Ende der Projektlaufzeit nicht mehr geliefert werden, da die Produktion während der Corona-Pandemie eingestellt wurde, so dass keine weiterführenden Versuche durchgeführt werden konnten.

Da die anderen kommerziellen Polyesterasen für den Oligomerabbau nicht sonderlich geeignet bzw. wirtschaftlich nicht einsetzbar waren, wurde nach alternativen, nicht kommerziell erhältlichen Polyesterasen recherchiert. Dies war eigentlich nicht im Projekt vorgesehen. Nach Gesprächen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg, RWTH Aachen, und in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Chemie / Biotechnologie der HSNR wurden selbst Polyesterasen exprimiert und aufgereinigt. Diese konnten allerdings erst gegen Ende der Projektlaufzeit und in geringen Konzentrationen zur Verfügung gestellt werden, so dass sie teilweise nicht mehr während der (bereits) verlängerten Projektlaufzeit getestet werden konnten.

Für ein Folgeprojekt ist es von Vorteil bzw. zwingend notwendig, wenn einer der beiden Partner in der Enzymentwicklung tätig ist. Rein mit kommerziellen Enzymen und den Corona-bedingten Lieferschwierigkeiten dieser Enzyme und anderer Reagenzien konnte keine zufriedenstellende Reinigungsmethode entwickelt werden. Es gibt aber durchaus nicht kommerzielle Enzyme (s. Esterase der Universität Greifswald), die Oligomere abbauen können.

Literaturverzeichnis

1. <http://www.cirfs.org/ManmadeFibres/AboutManmadeFibres.aspx>, Stand 14.02.2019
2. Höhn W. (2003) Oligomere – Phänomen, Analyse und Minimierung von PES-Oligomeren. *melliand Textilberichte* vom 04.09.2003, S. 756
3. BMBF 02WPL1443A-G Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität –Innovative Analysetools für die toxikologische und prozess-technische Bewertung (SubµTrack), Laufzeit: 01.09.2017 - 31.08.2020
4. Vavilova, SYu., Prorokova, NP., Kalinnikov, YuA. (2003) The problem of cyclic oligomers in dyeing and processing polyester and ways of solving it. *Fibre Chemistry* 35(2):128-130
5. EP0021011 A1 (1980) Verfahren zum Entfernen von Oligomerablagerungen auf textilen Materialien
6. Deutsche Bundesstiftung Umwelt Osnabrück (2009) Entwicklung eines produktions-integrierten und abteilungsüberübergreifenden Wasser- und Energiewirkungskonzeptes durch Schließung von Wasserkreisläufen auf hohem Temperaturniveau. Abschlussbericht AZ 27258
7. Cimecioglu et al (1986): Properties of Oligomers present in PET, *Journal of Applied Polymer Sciences*, Vol. 32, 4719-4733
8. DE10045057A1(2001) Verfahren zum Färben von Polyester-Textilien
9. de Castro, AM., Carniel, A., Nicomedes Junior, J., da Conceição Gomes, A., Valoni, É. (2017) Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 44(6):835-844
10. Tintometer GmbH (2022): CMC-Farbtoleranzraum;
<https://www.lovibond.com/de/PC/Farbwerte/CMC-Farbtoleranzraum#:~:text=CMC%20ist%20kein%20Farbraum%2C%20sondern.zwischen%20visueller%20und%20gemessener%20Farbdifferenz>