

## Übersichtsbeitrag

# Enzyme für Waschmittel

Wilfried Rähse

DOI: 10.1002/cite.201200012

Die hohe Leistung moderner Waschmittel bei bereits 30–60 °C ist nur durch den Einsatz von spezifischen Enzymen und abgestimmten Enzymmischungen möglich. Die verschiedenen Enzyme docken am Schmutz an und hydrolysieren die festsitzenden Proteine, Polysaccharide und Fette. Tenside spülen die resultierenden Bruchstücke in die Waschflotte. Die Herstellung der Enzyme erfolgt mit Mikroorganismen in 40- bis 125-m<sup>3</sup>-Fermentern. Ins Fermentermedium sekretierte Enzyme werden nach Beendigung der Fermentation von den Mikroorganismen abgetrennt, konzentriert und konfektioniert. Hierbei dient die Enzymlösung als Granulationsflüssigkeit. Zur Gewährleistung der Produktsicherheit ist ein spezielles Coating notwendig. Das Produktdesign wird von der Gentechnik (Leistung) und der Gestaltung der Partikel (Handhabung) bestimmt.

**Schlagwörter:** *Bacillus licheniformis*, Enzyme, Produktdesign, Protein Engineering, Waschmittel

*Eingegangen:* 31. Januar 2012; *revidiert:* 30. April 2012; *akzeptiert:* 09. Oktober 2012

## Enzymes for Detergents

The high performance of modern laundry detergents at 30–60 °C is only possible with specific enzymes and specially tuned enzyme mixtures. The various enzymes form complexes with the substrates (stains) and hydrolyze the fixed proteins, polysaccharides and fats. Surfactants rinse resulting fragments into the wash liquor. The enzymes are produced by appropriate microorganisms in fermenters with a size of 40 to 125 m<sup>3</sup>. The microorganisms secrete the enzyme into the medium. After the end of the fermentation, the enzymes are separated from the microorganisms, concentrated and converted into the final product. Here, the enzyme solution is used as granulation liquid. Product safety requires a special coating. The product design is determined by the protein engineering (performance) and the design (convenience) of the particle.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, Detergent, Enzyme, Product design, Protein engineering

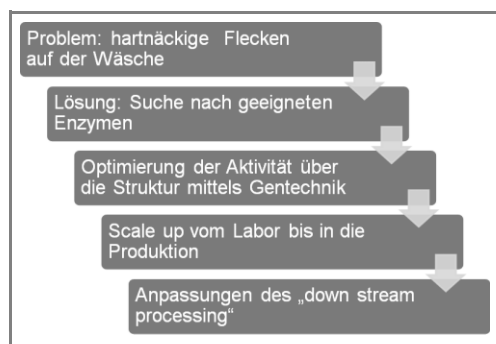
## 1 Produktdesign in der Biotechnologie

Nach den Regeln des Produktdesigns steht die Befriedigung von Kundenbedürfnissen im Mittelpunkt der Entwicklung eines Produktes [1, 2]. Im ersten Schritt erfolgt die Identifizierung des Problems. Daraufhin werden in der zweiten Stufe Lösungen angedacht, im Labor und Technikum ausgearbeitet und schließlich in einer Produktionsanlage realisiert. Diese wünschenswerte Vorgehensweise ist im Bereich chemischer Produkte bei Weitem nicht die Regel, sondern die Entwicklung geht oft vom vorhandenen Rohstoff, Know-how und/oder Herstellverfahren aus. Dabei wird die Frage gestellt, welche Produkte sich sonst noch mit den Ressour-

cen problemlos machen lassen. Erst viel später, wenn Muster aus dem Technikum vorliegen, wird der Kunde nach seiner Meinung gefragt und ein Markt gesucht.

In der Biotechnologie läuft die Entwicklung stets, wie es das Produktdesign fordert (s. Abb. 1). Auf die Identifizierung des Kundenproblems folgt eine individuelle Lösung. Bevor daraus ein wirtschaftliches Produkt entsteht, vergehen oft Jahre, manchmal sogar Jahrzehnte. Im Waschprozess lag das Kundenproblem darin, dass bei 60 °C und darunter Flecken nicht vollständig ausgewaschen werden konnten. Viele dieser Flecken sind biologischen Ursprungs. In der Biologie gibt es für diese Substanzen in der Regel auch Enzyme, die sie abbauen können. Der Forschungsansatz bestand darin, geeignete Enzyme zu finden, die schwierige Anschmutzungen unter den Bedingungen eines typischen Waschprozesses ablösen. In die Sprache der Chemie übersetzt bedeutet dies eine unspezifische Hydrolyse von

Dr.-Ing. Wilfried Rähse (Raehse1@t-online.de), Bahlenstraße 168, 40589 Düsseldorf, Deutschland.



**Abbildung 1.** Ablauf der kundenorientierten Entwicklung in der Biotechnologie am Beispiel der Waschmittelenzyme.

Proteinen und Polysacchariden in aniontensidhaltiger, stark alkalischer Lösung bei 40–60 °C.

Weil der Kunde heute Energie sparen möchte, besteht die neue Herausforderung darin, veränderte Enzyme mit einem Wirkungsmaximum bei 15–30 °C zu entwickeln. Der Trend zu niedrigeren Waschttemperaturen ist deutlich erkennbar, auch weil die beliebten, farbigen Gewebe bei häufigem Waschen weniger beansprucht werden.

## 2 Historie

Otto Röhm, visionärer Wissenschaftler und Gründer der Firma Röhm & Haas (1907), war der erste Chemiker, der Enzyme isolierte und einer technischen Nutzung zuführte. So meldete er 1913 ein Patent [3] an, das den Einsatz von Enzymen in Waschmitteln beschrieb. Bis zum tatsächlichen Durchbruch dauerte es rund ein halbes Jahrhundert. Ab Mitte der 60er Jahre wurde in vielen Waschmitteln Protease eingesetzt, die unlösliche und am Gewebe haftende Eiweißmoleküle zu spalten vermag. Ab 1971 kamen Enzyme nicht mehr als Pulver, sondern nur noch matrixverkapselt und gecoatet als Granulate in die Waschmittel. Das Überziehen der Partikel war notwendig, weil Enzymstaub bei exponierten Menschen Allergien auslösen kann. 1972 gelangten erstmals Universalwaschmittel in den Handel, die neben den Proteasen zusätzlich die stärkerespaltenden Amylasen enthielten, um gezielt polymere Kohlenhydrate mit Stärkestruktur abzubauen. Durch diese Kombination konnten erstmals Soßenflecken im Waschvorgang bei 60 °C vollständig entfernt werden. Seit 1975 gibt es neben den gecoateten Granulaten für feste Waschmittel auch flüssige Enzymzubereitungen für Flüssigwaschmittel als weitere Anbietungsform. 1986/1987 folgten Cellulasen, die absteigende Mikrofibrillen und Pilling an Baumwolle und baumwollhaltigen Mischgeweben beseitigen. Mit Unterstützung durch Lipasen wird in hochwertigen Waschmittelformulierungen seit 1988 die sonst erst bei höheren Waschttemperaturen einsetzende Wirkung der Tenside gegen Fettansammlungen schon bei 20 °C erzielt.

Die erste Generation an Proteasen und Amylasen zeigten die gewünschten Ablösungen unter den Waschbedingun-

gen. In der zweiten Generation produzieren gentechnisch modifizierte Mikroorganismen leistungsstärkere Enzyme, die sich wirtschaftlicher herstellen lassen. Beurteilt nach Enzymaktivität und waschtechnischer Leistung ist in den letzten zehn bis 15 Jahren der Einsatz von Enzymen in flüssigen und festen Waschmitteln von Jahr zu Jahr deutlich gestiegen. Weltweit werden Proteasen in zunehmenden Mengen als Fleckenspezialisten in Waschmitteln eingesetzt. Das Wirkoptimum fast aller Enzyme liegt in der von den Waschprogrammen vorgegebenen Zeit in der Nähe von 60 °C, nur bei der  $\alpha$ -Amylase deutlich darüber. In der alkalischen Waschlauge (pH-Wert 9–11) sind die meisten Enzyme bereits bei Waschttemperaturen unter 30 °C aktiv. Der gleichzeitige Einsatz oxidierender, bleichender Inhaltsstoffe kann rezepturabhängig inaktivierend wirken und muss bei der Formulierung und der Freisetzungskinetik beachtet werden.

Alle Enzymbezeichnungen weisen einen Bezug zum Substrat oder zur Funktion auf und enden mit „ase“. Die für Waschmittel interessanten Hydrolasen, die in leistungsstarken Produkten zu finden sind, führen hydrolytische Spaltungen durch, beispielsweise an Estern. Esterasen sind Ester-spaltende Enzyme, Lipasen hydrolysieren natürliche Öle (Lipide), die als Triglyceride Ester darstellen. Also beschreiben alle drei Bezeichnungen chemische Vorgänge, die bei der Fettspaltung auftreten, wobei der Begriff *Lipase* die konkreteste Angabe beinhaltet und der Begriff *Hydrolase* übergeordnet ist.

Die festen und flüssigen Waschmittel enthalten vom enzymhaltigen Produkt (Granulat oder Lösung) 0,2 bis zu < 2 %, wobei das eingesetzte Enzymprodukt zwischen 0,3 % (Cellulasen) und 5 % (Proteasen) reines Enzym enthält. Wegen der hohen Preise können die Enzymzusätze den Marktpreis des Endproduktes nennenswert beeinflussen. Billige Waschmittel enthalten oft ca. 0,2–0,3 % Protease, teure von jedem Enzym etwa 0,3–0,6 %. Die genauen Mengen sind von der Aktivität pro g Enzymprodukt abhängig. Bei einer groben Abschätzung ergeben sich folgende Zahlen: Die 100 % Rohstoffkosten eines enzymfreien Produktes steigen bei Zusatz von 0,2 % Enzym auf etwa 102 %, bei 2 % auf 120 %.

## 3 Enzyme

### 3.1 Enzyme als Teil der weißen Biotechnologie

Die Biotechnologie setzt biologische Reaktionen in analytischen und technischen Verfahren sowie in Produktionen ein. Sie wendet die Erkenntnisse von Biochemikern und (Mikro-, Molekular-)Biologen an, unterstützt von technischen Chemikern und Verfahrenstechnikern. Als interdisziplinäre Wissenschaft beschäftigt sich die Biotechnologie mit der Nutzung von lebenden Mikroorganismen, pflanzlichen oder tierischen Zellen, Zellgeweben und Enzymen. Ferner gehören die gezielten Veränderungen der Gene von Mikroorganismen und damit auch der Proteinstruktur von

Enzymen, das sogenannte Protein-Engineering, zur Biotechnologie.

Die biotechnologischen Anwendungen decken unterdessen viele Bereiche ab, von der Lebensmitteltechnologie und Chemie über die Medizin und Pharmazie bis hin zur Land-, Energie- und Abfallwirtschaft. Es hat sich eingebürgert, die Teilgebiete mit Farben zu kennzeichnen (Tab. 1). Die weiße Biotechnologie nutzt biotechnologische Verfahren in der industriellen Produktion [4], um Reaktionen durchzuführen und/oder Produkte zu synthetisieren. Deshalb lassen sich alle Produkte, die in großen Mengen regelmäßig produziert und wenigstens in einer Stufe einem biotechnologischen Verfahren unterworfen werden, der weißen Biotechnologie zurechnen. Deren Einfluss wird zukünftig deutlich wachsen [5] und gewinnt in Deutschland an Bedeutung [6].

Der weltweite Umsatz der weißen Biotechnologie lag 2004 bei 55 Mrd. € [7]. Er wurde erzielt mit verschiedenen organischen Säuren (Zitronensäure, Milchsäure) und Aminosäuren (*L*-Glutamat, *L*-Lysin), Lösungsmitteln (Bioethanol), Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine) und Vitaminen (Ascorbinsäure/Vit. C, Riboflavin/Vit. B2) sowie Biopolymeren (Dextran, Xanthan, Polylactid) und Kohlenhydraten (Sirupfructose, Glucose). Nach Hochrechnungen aus dem Jahr 2006 soll der Umsatz 2010 auf 125 Mrd. € [8] und bis 2015 auf 300 Mrd. US-\$ [9] ansteigen.

Zur weißen Biotechnologie zählen auch die Enzyme, hergestellt durch Mikroorganismen in Fermentern mit anschließenden Aufarbeitungen der Fermenterbrühen und Konfektionierungen in Feststoffe oder in Flüssigkeiten. En-

zyme werden weltweit in wachsenden Mengen für unterschiedliche Aufgaben benötigt. Sie arbeiten meist als Hilfsstoffe, in der Regel unbemerkt von den Konsumenten. Beispiele sind die Produktion von Backwaren, Fruchtsäften, Wein und Käse oder von Jeans, bei denen Cellulasen den Stonewashed-Effekt erzeugen.

Das Enzymgeschäft ist sehr dynamisch und wächst zurzeit mit etwa 10 % pro Jahr. Der Wert der Weltenzymproduktion lag 2005 bei 1,7 Mrd. € [10] und erreichte 2010 etwa 2,55 Mrd. € [11]. Marktführer mit 47 % ist die dänische Firma Novozymes, die alle wichtigen Anwendungsbereiche abdeckt. Dahinter kommen DuPont (ehem. Danisco-Genencor) mit 21 % und DSM (6 %). Hauptabnehmer der Enzyme sind mit etwa 34 % und einem Wert von knapp 0,9 Mrd. € die Hersteller von Wasch- und Reinigungsmitteln. Es folgen mit ebenfalls 34 % die technischen Enzyme (Ethanol aus Cellulose und Stärke, Leder, Textil, Papier), mit 23 % die Lebensmittel (Backwaren, Getränke, Sirup) sowie mit 9 % die Futterenzyme (Phytasen) [11]. Ein kleiner Teil der Enzyme wird für diagnostische sowie therapeutische Verfahren benötigt.

In der roten, grünen und blauen Biotechnologie [12] werden Spezialprodukte und innovative Anwendungen erforscht und entwickelt. Ferner erfolgt die Herstellung kleiner Produktmengen, insbesondere von gentechnisch hergestellten Arzneien in der roten Biotechnologie. Die graue Abfallwirtschaft stellt in diesem Zusammenhang einen Sonderfall dar, denn sie gehört zur Umwelttechnologie und ergänzt oder steht in Konkurrenz zur chemischen

Verfahrenstechnik. In großtechnischen Anlagen werden die Abwasser, die Abluft und die Böden gereinigt sowie der Müll verwertet. Normalerweise entstehen dort keine (hochwertigen) Produkte, im Gegensatz zur industriellen, weißen Biotechnologie.

### 3.2 Enzyme als Katalysatoren des Stoffwechsels in lebenden Zellen

Im Wesentlichen besteht der Stoffwechsel in lebenden Zellen aus zahlreichen, enzymkatalysierten Einzelschritten und bewirkt den Erhalt sowie die Vermehrung von Zellen und von Zellsubstanzen. Zu den wichtigen Zellsubstanzen zählen Proteine, Nucleinsäuren, Zellwandbestandteile und Reservestoffe [13]. Die Bausteine und die notwendigen Energien für die biochemischen Reaktionen stammen aus den zugeführ-

**Tabelle 1.** Anwendungen der Biotechnologie.

Bezeichnung der Biotechnologie	Einsatzgebiet	Beispiele (Schlagwörter)
weiß	Industrielle Biotechnologie <ul style="list-style-type: none"> <li>– Enzyme</li> <li>– Feinchemikalien</li> <li>– Agrar- und Pharma(vor)produkte</li> <li>– Lebensmittel</li> <li>– Ersatz fossiler Brennstoffe (Biomasse)</li> </ul>	Enzyme, Säuren, Antibiotika, Vitamine, Insulin, Aminosäuren, Biopolymere, Biokunststoffe, Biopestizide, Stärke, Hyaluronsäure, Käse, Stärke, Wein, Futtermittel, Kohlehydrate, Bioethanol, Biogas, Biowasserstoff
rot	Medizinisch-pharmazeutischer Bereich, Produkte für <ul style="list-style-type: none"> <li>– Therapie</li> <li>– Diagnose</li> <li>– Impfstoffe</li> <li>– Kosmetik</li> </ul>	Biopharmazeutika, Interferon, Wachstumshormone, monoklonale Antikörper, Blutgerinnungsfaktoren, Regenerationsmedizin (Tissue Engineering), Gen- und Stammzellentherapie, Spezialproteine
grün	Pflanzen in der Landwirtschaft <ul style="list-style-type: none"> <li>– höhere Erträge</li> <li>– Schädlingsresistenz</li> </ul>	Molecular Farming, Gentransfer, Genmodifizierung, Biopestizide (F & E)
blau	Mikroorganismen (Bakterien) aus dem Meer	Gewinnung von temperaturresistenten Bakterien
grau	Abfallwirtschaft <ul style="list-style-type: none"> <li>– Abwasser</li> <li>– Müllrecycling, Abfall</li> <li>– Kontaminierte Böden</li> <li>– Abluft-, Abgasreinigung</li> </ul>	Reinigung von industriellen und kommunalen Abwässern; Behandlung des Mülls; biologische Reinigung von Böden und Meeren (Erdöl); biologische Abluftreinigung

ten Nährstoffen, vorzugsweise aus Glucose. Zur Synthese bedarf es neben den Nährstoffen einiger Mineralsalze, Spurenelemente und Vitamine. Viele Nährstoffe werden zunächst in kleine Einheiten zerlegt (Katabolismus) und anschließend zu den benötigten Polymeren synthetisiert (Anabolismus). Alle Vorgänge laufen enzymkatalysiert ab. Die Unterschiede in den Begriffen im Vergleich zur Chemie und Verfahrenstechnik lassen sich der Abb. 2 entnehmen.

Höher entwickelte Zellen mit Kern enthalten Tausende von unterschiedlichen Enzymen, weil alle biochemischen Reaktionen, auch das Kopieren der Erbinformationen, dort über eine Enzymkatalyse ablaufen. Für jede einzelne Reaktion wird ein spezielles Enzym benötigt, also ein monomeres oder oligomeres, globuläres Protein ohne/mit Nichtproteinbestandteilen (prothetische Gruppen). Im ersten Schritt erfolgt die spezifische Bindung (Substratspezifität) des Metaboliten, der sich an das katalytische Zentrum des Enzyms anheftet. Teile der Polypeptidkette und/oder Cofaktoren bzw. prothetische Gruppen bilden dieses aktive Zentrum. Der Metabolit stellt ein Zwischenprodukt des biochemischen Stoffwechselvorgangs dar, der anschließend genau in die vom Enzym durch Absenkung der Aktivierungsenergie vorgegebene Richtung (Wirkungsspezifität) reagiert. Die Enzyme beschleunigen alle Reaktionen in Zellen und machen sie möglich, ohne sich selbst zu verändern. Sie arbeiten sehr effizient im neutralen Milieu, bei milden Temperaturen und in sehr geringen Konzentrationen. Zusammengefasst und vereinfacht stellen Enzyme in lebenden Zellen gebildete Proteine mit einem aktiven Zentrum [14] dar, die hochspezifisch biochemische Reaktionen katalysieren.

### 3.3 Struktur der Enzyme

Proteine sind Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von zehn- bis einigen Hunderttausend Dalton [15]. Etwa 20 verschiedene Aminosäuren bilden die Bausteine, von denen einige Hundert bis einige Tausend über Peptidbindungen miteinander verknüpft sein können. Die Reihenfolge der Aminosäuren bildet die Primärstruktur, während sich die

räumliche Faltung über Wasserstoffbrücken, teilweise auch über Disulfidbindungen, in die  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -Helixform [16] als Sekundärstruktur bezeichnen lässt. Abhängig von den Milieubedingungen (pH, Salze, Temperatur, Konzentrationen) entsteht in wässriger Lösung eine räumliche, globuläre (= weitgehend kugelförmige) Proteinstruktur, auch als Tertiärstruktur bezeichnet. Hierbei ordnen sich die unpolaren Proteinketten mehr innen, die polaren Seitenketten außen liegend an (Quartärstruktur) und stellen die gute Wasserlöslichkeit sicher. Eine exakte Molekülfaltung im Proteinmolekül bildet das aktive Zentrum. Genau in diese Öffnung gelangt das räumlich passende Substrat (Schlüssel-/Schloss-Prinzip, zum Teil unter räumlicher Anpassung [15]), wird gebunden und katalytisch umgesetzt (hydrolysiert im Fall von Hydrolasen). Die Produkte (z. B. Bruchstücke) verlassen anschließend das aktive Zentrum.

Mithilfe der Gentechnik lassen sich die aktiven Zentren auf den Anwendungsfall hin optimieren, indem die außen liegenden, endständigen Aminosäuren variiert werden. Auf diese Weise gelingt eine deutliche Steigerung der Aktivität, also der Reaktionsgeschwindigkeit, am gleichen Substrat und/oder eine Hydrolyse weiterer Metabolite. Die Optimierung des aktiven Zentrums stellt eine wesentliche Komponente des Produktdesigns dar.

## 4 Bedeutung der Enzyme in Waschmitteln

Die hohe Leistung moderner Waschmittel wäre ohne den Einsatz von spezifischen Enzymen und besonders von abgestimmten Enzymmischungen nicht realisierbar [17, 18]. Diese Katalysatoren zeichnen sich durch eine hohe hydrolytische Wirksamkeit bei gleichzeitig geringer Spezifität aus. Sie sind in alkalischen, tensidischen Medien bis etwa 60 °C verwendbar, auch in Gegenwart von bleichenden Substanzen. Die in den letzten Jahren entwickelten Enzyme weisen eine hohe Aktivität bereits bei relativ niedrigen Temperaturen auf. Nur dadurch ist es möglich, die Waschttemperatur deutlich abzusenken. So lassen sich im Niedrigtemperaturbereich bereits zwischen 20 und 40 °C dank der Enzyme akzeptable Waschleistungen erreichen. Das Waschen bei tieferen Temperaturen bringt eine beträchtliche Energieeinsparung im Vergleich zur Wäsche bei 60 °C, weil der Aufheizvorgang in der Waschmaschine die meiste Energie der Prozesskette „Herstellung, Transport, Waschen“ erfordert. Darüber hinaus liefern die Enzyme einen bedeutenden Beitrag zur Reduzierung der Waschmittelmengen, die 1980 pro 5 kg Wäsche noch bei 275 g lag und heute bei festen Kompaktwaschmitteln etwa 65–80 g beträgt. So bringen enzymhaltige Waschmittel auch aus ökologischer Sicht einen deutlichen Fortschritt [19]. Enzymfreie Waschmittel sind bezüglich Performance und Ökologie nicht mehr konkurrenzfähig.

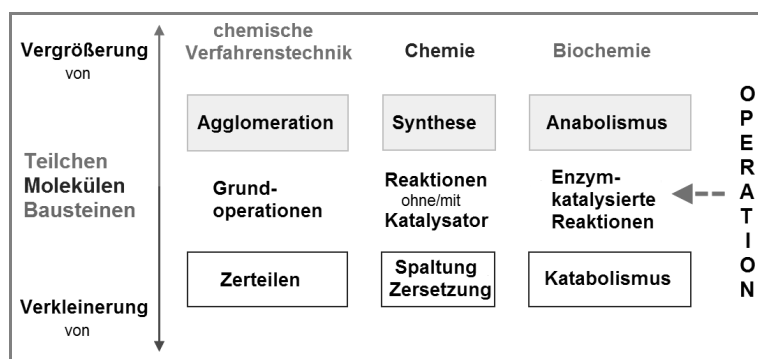


Abbildung 2. Operationen zur Vergrößerung und Verkleinerung von Teilchen, Molekülen und Zellbausteinen.

In der Waschflotte erfolgt die Schmutzablösung zum einen durch Tenside und zum anderen durch Enzyme. Für das Waschen von weißer Wäsche verfügen feste (Universal-)Waschmittel zusätzlich über ein Bleichsystem und über Stoffe zur Aufhellung des Gewebes. Die in den Waschmitteln enthaltenen Enzyme, insbesondere die Protease, Amylase und Lipase, wirken in erster Linie als Schmutz- und Fleckentferner. Sie eignen sich für alle Gewebetypen und Farben sowie für alle Waschprogramme. Entscheidend für eine sichtbare Produktleistung sind einerseits die Waschbedingungen (pH,  $T$ ,  $c$ ), andererseits die synergetische Wirkung von einem oder mehreren Enzymen mit den anderen Waschmittelinhaltsstoffen sowie mit der Chemie der Verschmutzung, des Substrates.

Die Cellulasen weisen typbedingt unterschiedliche Funktionen auf, die alle in Waschmitteln gefragt sind. Deshalb arbeiten große Waschmittelhersteller mit Gemischen verschiedener Cellulasen, um auf der einen Seite den Spließ und die Knötchen der Baumwollfasern zu entfernen und so diese zu glätten. Mit anderen Cellulasen kann Pigmentschmutz entfernt und die Wiederanlagerung von Pigmenten (Staub, Ruß, Kosmetik) verhindert werden. Diese Cellulasen steigern den Weißgrad und verstärken den Farbeindruck. Color- und Wollwaschmittel, die solche Cellulasegemische enthalten, lassen die Kleidungsstücke nach einigen Wäschen immer noch wie neu aussehen. Tab. 2 zeigt die in leistungsstarken Waschmitteln anzutreffenden Enzyme (ohne Unterteilung in Untergruppen).

Der große Erfolg des Einsatzes von Enzymen in Waschmitteln [20] beruht trotz der hohen Herstellkosten auf vier Pfeilern:

- (i) Gelungene Anpassung an Waschmittel und Waschflotte: Geeignete Enzyme arbeiten im alkalischen, tensidhaltigen und oxidierenden Milieu. Die Wirkung ist bereits bei Raumtemperatur nachweisbar, optimal im Temperaturbereich zwischen 50 und 60 °C.
- (ii) Produktleistung: sicht- und messbarer Erfolg nach der Wäsche. Für die Entfernung von kritischen Anschmutzungen gibt es im Temperaturbereich von 20–40 °C keine geeigneten Chemikalien als Alternative zu den neu entwickelten Enzymen.
- (iii) Ökonomie: wirtschaftliche Herstellung einerseits über optimierte Herstellverfahren und andererseits durch eine extreme Steigerung der Produktleistung mithilfe der Gentechnik.
- (iv) Sicherheit: potenzielle Gefahren bei der Enzym- und Waschmittelherstellung (Arbeitssicherheit) und bei der Anwendung (Produktsicherheit) sind bekannt und werden beherrscht.

## 5 Optimierung des Produktionsstamms

Das Suchen, Erkennen und Optimieren sowie das industrielle Produzieren soll hier am Beispiel der Proteasen beschrieben werden. Seit 1959 ist bekannt, dass die aus dem Stamm *Bacillus licheniformis* gewonnenen Subtilisine wirksame, unspezifische Serinproteasen für die Waschmittel darstellen, die sich durch eine hohe Verträglichkeit bezüglich Alkalität und Temperatur der Anwendung auszeichnen. Auch Komplektierungs- und Bleichmittel sowie die meisten Tenside vermindern im üblichen Temperaturbereich bis 60 °C nicht nennenswert die Proteaseaktivität.

**Tabelle 2.** Biokatalysatoren (Hydrolasen) in Waschmitteln.

Enzym	Molekulargewicht [Da]	Wirkprinzipien	Wirkoptimum		Funktionen im Waschmittel; Entfernung von
			pH	$T$ [°C]	
Alkalische Proteasen	24 300 (ca. 274 Aminosäuren)	Hydrolyse von Peptidbindungen, Ablösung von Proteinen auf der Faser	10–11	60	Gras, Schleim, Kot, Blut, Soßen, Spinat, verschiedene kosmetische Formulierungen und Lebensmittel (Eigelb)
$\alpha$ -Amylasen	40 000–50 000	Hydrolyse der $\alpha$ -1,4-glykosidischen Polysaccharidbindungen; Verflüssigung von Stärke	8	> 60	Nudeln, Soßen, Fleischsaft, Pudding, Kakao (Schokolade), Babynahrung, Kartoffeln
Cellulasen	52 000	Hydrolyse von $\beta$ -1,4-D-glykosidischen Cellulosebindungen in amorpher Cellulose; Anti-Pilling; Abbau von Mikrofibrillen; Entfernung von Pigmentschmutz	7–10	< 60	Feinen Fasern und Pills (Spließ, Knötchen); intensiviert den Farbeindruck; vermindert Kalk- und Pigmentablagerungen; Vergrauungshemmung
Lipasen (Esterasen)	50 000–67 000	Hydrolyse von Glyceriden	10	60	Öle, Butter, Margarine, technische Fette, Kosmetik (Make-up, Sonnencreme, Lippenstift)

Im Fermentationsverfahren wird *B. licheniformis* zunächst vermehrt und dann zur Produktion der Serinproteasen gebracht. Diese schleust der Mikroorganismus durch die Zellwand aus, so dass die Enzyme extrazellulär vorliegen. In der Lösung zerlegen die Proteasen große Proteinmoleküle, die im Nährmedium umherschwimmen [13, 21]. Denn nur die kleinen Peptidmoleküle und Aminosäuren kann der Bacillus in die Zelle aufnehmen und als Baustein oder Energiequelle zur Vermehrung nutzen. Die Nährlösung ist dementsprechend proteinreich eingestellt. Das optimierte Verfahren läuft so ab, dass am Ende der Vermehrungsphase möglichst viel Serinprotease in der Fermenterbrühe zur Ernte vorliegt. Durch Abstellen der Luftzufuhr und Einschaltung der Kühlung wird die Fermentation beendet und anschließend die Lösung aufbereitet.

Die Suche nach einer besonders leistungsfähigen Stammvariante vom *B. licheniformis* zielt zunächst auf eine gesteigerte Ausbeute im Fermenter ab. Die Entwicklung von Enzymvarianten mit verbesserter Leistung und Stabilität des Enzyms im Waschprozess ist eine zweite Optimierungsaufgabe. Eine ständige Überprüfung der anwendungstechnischen Eigenschaften stellt die Praxisbezogenheit während der Optimierung sicher. Früher sind die leistungsfähigen Stämme zunächst über Selektionsverfahren nach dem Such-und-Wegwerf-Prinzip isoliert worden. Ergänzend erfolgte die Selektion besonders wirksamer Stämme nach Auslösen einer künstlichen Mutation, also einer Veränderung des Genoms über energiereiche Strahlung oder chemische Mutagenese. Das Genom stellt die Gesamtheit der Erbinformationen einer Zelle dar. Mit vollständiger Sequenzierung des bakteriellen Genoms (*Bacillus subtilis* 1997, *B. licheniformis* 2004) ist es möglich, das Genom im Sinne einer verbesserten Produktivität oder Qualität durch Ausschalten oder Duplikation bestimmter Gene zu beeinflussen.

Etwa seit Mitte der 80er Jahre wird die gentechnische Modifikation des Proteasemoleküls (Protein Engineering) zur Optimierung der Proteaseleistung eingesetzt, die einen großen Sprung in der Enzymleistung brachte. In den Zellen existieren neben der helixförmigen DNA kleine, ringförmige DNA-Moleküle, die Plasmide, die zunächst als Genfähren in die Zellen genutzt werden. Mithilfe von speziellen Enzymen, den Restriktionsenzymen, werden die zur Enzymproduktion vorgesehenen Plasmide aufgeschnitten. Anschließend erfolgt die Zugabe des Gens für die Protease als Kassette. Ligasen verbinden die Gene mit den Schnittstellen [13]. Aus dem erhaltenen Pool lassen sich über Suchverfahren geeignete Plasmide identifizieren, isolieren und in den Produktionsstamm einfügen. Die gezielt veränderten Mikroorganismen produzieren das gewünschte Enzym in größerer Menge und/oder in gesteigerter Aktivität. Alle Produktionsstämme, die heute eingesetzt werden, sind aus wirtschaftlichen Gründen über das Genetic Engineering optimiert, wobei die Nutzung von Plasmiden gegenüber der Integration ins Genom inzwischen abgenommen hat.

Ein Blick in die Zukunft [22] zeigt drei interessante neue Ansätze zur Entwicklung überlegener Enzyme. Zum einen erfolgt die Suche über das Metagenom-Screening, bei dem alle Mikroorganismen aus dem Boden einbezogen werden und nicht nur die im Labor kultivierbaren. Die andere Methode heißt *Gene Shuffling*. Hier werden die Gene, die eine Bauanleitung für die Enzyme beinhalten, in kleine Abschnitte zerschnitten und anschließend statistisch wieder zusammengefügt (Protein Engineering). Die neuen Gene im Bacillus produzieren andere, bessere und schlechtere Enzyme, die nach den Anforderungen selektiert werden müssen. Drittens werden verstärkt synthetische Genbibliotheken eingesetzt, in denen bestimmte Aminosäurepositionen gezielt variiert oder festgelegt werden.

## 6 Industrielle Herstellung von Proteasen

Der Prozess zerfällt in einen sterilen Teil mit einer Anlagenausführung in Pharmaqualität und in einen nicht-sterilen Teil, der keimarm ausgeführt ist, wie in der kosmetischen Industrie. Das sterile sowie das keimarme Arbeiten bedingt den Einsatz von Edelstahl, damit sich die produktberührten Oberflächen leicht reinigen lassen und Mikroorganismen nicht in das Material eindringen können. Stähle mit den Werkstoff-Nummern 1.4301, 1.4404, 1.4435, 1.4462 und 1.4571 werden bevorzugt verarbeitet, meist mindestens fein geschliffen. Für die Hygiene der Anlage werden totaumentfreie Ventile und Rohrleitungen verbaut. Alle Maschinen und Apparate sowie die übrigen Anlagenteile sollten sich GMP-gerecht entleeren und reinigen lassen. Die Verschweißungen erfolgen, wie in der Pharmaindustrie üblich, in Automaten nahezu nahtfrei. Rohrleitungen weisen ein Gefälle auf, um total leerzulaufen. Zur Reinigung steht in der Regel eine vollautomatische CIP-Anlage (Cleaning in Place [23]) mit alkalischer und saurer Lösung, die oxidierende Substanzen enthalten kann, zur Verfügung. Nach dem Ausspülen von Produktresten mit Wasser erfolgen eine saure und dann eine alkalische Reinigung, in der Regel bei Temperaturen zwischen 60 und 80 °C. Die Anlage wird anschließend mit Wasser gespült und leergeblasen.

Im Vergleich zu den chemischen Reaktoren zeichnen sich die Fermenter durch eine Reihe von Besonderheiten aus, bedingt durch den Sterilbetrieb und die Begasung. Zur Vermeidung einer Besiedelung an rauen Stahloberflächen werden die Behälterinnenwände mit Korn 180/240 (Korngröße ca. 70–80 µm) fein geschliffen und anschließend in der Regel mit Pasten (Korn 320/400) bis zum Spiegelglanz poliert. Die bevorzugt in der Stahlqualität 1.4435 oder 1.4404 gefertigten, elektropolierten Armaturen und Bauteile weisen Rauigkeitswerte von unter 0,8 µm auf. Die Sterilität und leichte Reinigbarkeit erfordern spezielle, aufwendige Konstruktionen. Die Abdichtungen, insbesondere die doppelten Gleitringdichtungen, müssen hohen Ansprüchen an das Material und an die Fertigungsgenauigkeit genügen. Die Integrität wird über Messungen verifiziert und doku-

mentiert. Für die Dampfsterilisation des Fermenters, aller Zuleitungen und Armaturen existieren automatische SIP-Anlagen (Sterilizing in Place).

### 6.1 Drei-Stufen-Prozess

Der gesamte Herstellungsprozess lässt sich gemäß Abb. 3 in drei Stufen unterteilen. Stufe 1 stellt die Fermentation dar, also die Synthese von Enzymen durch Mikroorganismen. Die nachfolgenden Stufen werden unter dem Begriff Downstream Processing zusammengefasst. Stufe 2 bildet die Aufbereitung der Fermenterbrühe, in der zum einen die Mikroorganismen abgetrennt und deaktiviert werden und zum anderen die Aufkonzentrierung und Reinigung des Produktes erfolgen. In der dritten Stufe laufen die Konfektionierungen ab, entweder in Richtung auf die festen, gecoateten Granulate oder auf eine eingestellte Lösung.

Eine Analyse der Herstellkosten, die sich aus den Rohstoff- und Fertigungskosten zusammensetzen, ergibt für

Enzymgranulate nach der Alternative 2 (s. Abb. 3), dass die Fermentation etwa 30–40 %, die Aufbereitung 15–20 % und die Konfektionierung rund 40–50 % der gesamten Kosten ausmachen. Diese Werte hängen von den Verfahrensstufen und von der Enzymaktivität im Endprodukt ab. Je höher die Aktivität, desto höher sind die Fermentationskosten zu gewichten. Bei den Flüssigenzymen ist die Konfektionierung einfacher und kostengünstiger, hier kann der Fermentationsanteil aktivitätsabhängig die 50 %-Marke übersteigen.

### 6.2 Fermentation

Der selektierte Stamm, von der Agarkultur in der Petrischale über den Schüttelkolben und unterschiedlich großen Fermentern (25 L, 250 L, 2,5 m<sup>3</sup> etc.) hochgezüchtet, steht steril im Vorfermenter unter Wachstumsbedingungen in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Rohstoffe für die Nährlösung des Hauptfermenters befinden sich in Tanks und Fässern, Silos und Säcken und werden in einem separaten Rührbehälter entsprechend der Rezeptur in Wasser suspendiert. Die Sterilisation der Nährlösung (20 min, 121 °C, 2 bar) erfolgt bevorzugt im Hauptfermenter. Hierbei färbt sich die Lösung aufgrund der Maillard-Reaktion, also der Reaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern, braun. Die Glucoselösung karamellisiert durch die Temperatureinwirkung über die Oxidation mit Sauerstoff, so dass die Fermenterbrühe eine braune Farbe aufweist.

Die Enzymherstellung unterscheidet sich von anderen Fermentationsverfahren durch den hohen Sauerstoffbedarf in der Wachstumsphase. Daher werden für die Produktion diskontinuierlich betriebene Hochleistungsfermenter mit einem Gesamtvolumen zwischen 40 und 125 m<sup>3</sup> eingesetzt. Die Behälter weisen häufig ein H/D-Verhältnis von 3 auf und sind mit drei bis fünf Scheibenrührern ( $d/D = 0,25$  bis  $0,33$ ) ausgestattet. Über die schlankeren Behälter, die wegen der gesteigerten Flüssigkeitshöhe einen höheren Druck am Begasungsring bzw. an den Begasungsdüsen notwendig machen, lässt sich bei gleichem Gesamtvolumen die Verweilzeit der Gasblasen erhöhen. Dies allein reicht zur Sauerstoffversorgung von *B. licheniformis* nicht aus, sondern es ist für den Sauerstoffübergang in die flüssige Phase ein ungewöhnlich hoher Leistungseintrag von 10 kW m<sup>-3</sup> notwendig. Die dabei dissipierte Energie kann zu unerwünschten Temperaturerhöhungen in der Suspension führen. Das Sicherstellen einer konstanten Arbeitstemperatur im Bereich von 35–40 °C mit Kühlwasser erfordert entweder eine Erhöhung der Wärmeaustauschflächen oder eine Absenkung der Kühlwassertemperatur. Neben den heiz-/kühlbaren Wandungen lassen sich über innenliegende Wärmetauscher – als einfache oder doppelte Spirale ausgeführt – zusätzliche Flächen realisieren (s. Abb. 4). Die Austauschfläche steigt durch diese Maßnahme um den Faktor zwei bis fünf. Sie ermöglicht ferner eine sinnvolle Verkürzung der Aufheiz-/Kühlzeiten bei der Sterilisation, die abhängig

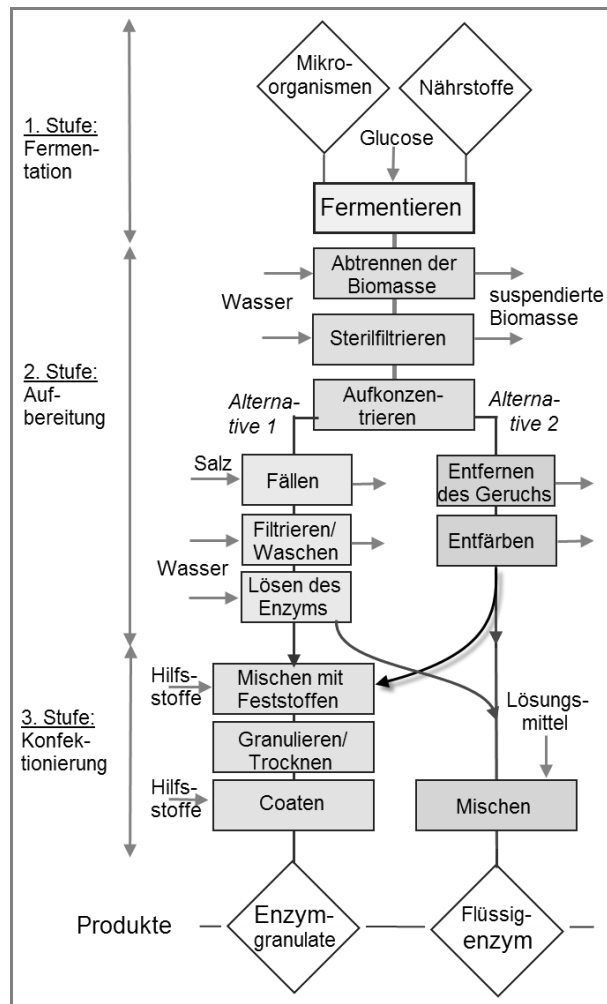
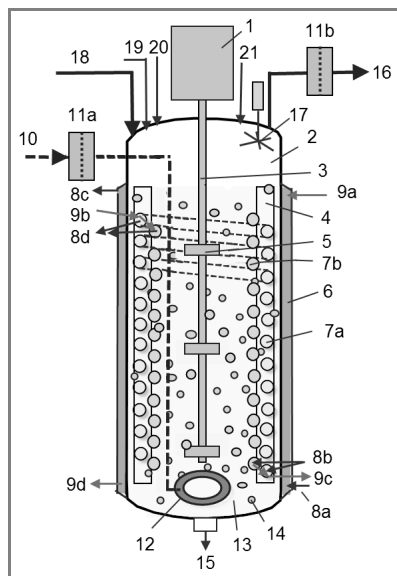


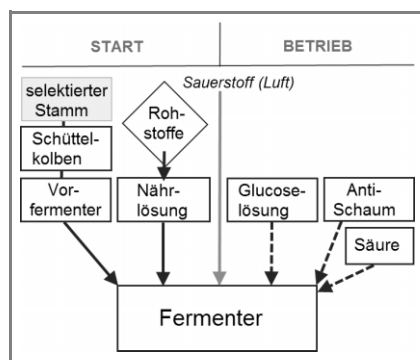
Abbildung 3. Blockflussbild der Enzymherstellung (Protease).



**Abbildung 4.** Batch-Hochleistungsfermenter (ohne Mess- und Regeltechnik). 1) Antrieb für die Rührerwelle; 2) Fermenter mit dem Durchmesser  $D$  und der Höhe  $H$ ; 3) Rührerwelle; 4) Stromstör; 5) Rührorgan (Scheibenrührer) mit dem Durchmesser  $d$ ; 6) Heiz-/Kühlmantel; 7a, b) innenliegende Wärmetauscher als doppelte Spirale; 8a, b) Zuläufe der Kühlwasser; 8c, d) Abläufe der Kühlwasser; 9a, b) Zuführungen des Dampfes; 9c, d) Ableitungen des Dampfes/Kondensates; 10) Zuführung der Luft; 11a, b) Sterilfilter für Zu- und Abluft; 12) Begasungsring; 13) Nährlösung; 14) Gasblasen; 15) Ablauf für die Flüssigphase; 16) Abluft; 17) mechanischer Schaumzerstörer; 18) Zugabe des Nährmediums, der Stammlösung und der Glucose; 19) pH-Einstellung mit Säure, 20) Dampfleinlass; 21) Anti-Schaummittel.

vom Verhältnis des genutzten Fermentervolumens zur Austauschfläche im Bereich von 3–5 Stunden liegen.

Nach Abkühlung auf die Fermentationstemperatur von 35–40 °C wird angeimpft und belüftet (s. Abb. 5). Die Fermentation läuft über 40–65 Stunden unter starkem Rühren und Einleitung großer Mengen an keimfreier Luft (ca.  $500 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) sowie portionsweiser Zugabe einer sterilen Glucoselösung. Zur Steuerung des Prozesses [21] dienen verschiedene Mess- und Regeleinrichtungen für die Temperatur, den Gasdruck und die Sauerstoffsättigung in Kombination mit dem Gasdurchsatz und Leistungseintrag, ferner für den pH-Wert und Schaumstand sowie für das Gewicht

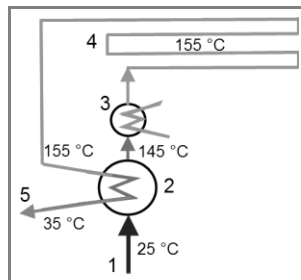


**Abbildung 5.** Blockfließbild der Fermentation.

und die Abgaszusammensetzung. Über die optische Messung der Trübung lässt sich die Zelldichte bestimmen und damit das Wachstum verfolgen. Die Fermentation ist beendet, wenn die Anzahl der Mikroorganismen abnimmt und die Enzymkonzentration ein Maximum zeigt.

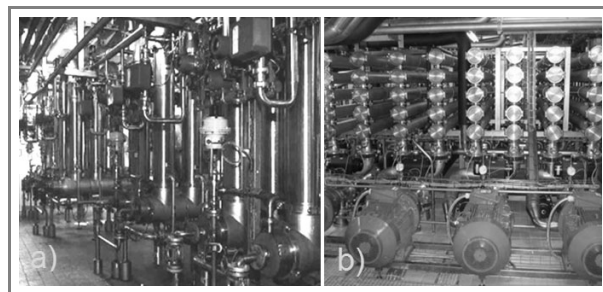
### 6.3 Aufarbeitung der Fermenterbrühe

Zur Enzymaufarbeitung müssen zunächst die Mikroorganismen aus der Fermenterbrühe abgetrennt werden. Wegen des geringen Dichteunterschiedes zwischen den Bazillen und der Lösung ist für einen Separatoreinsatz eine deutliche Verdünnung mit Wasser zur Verringerung der Dichte und der Viskosität erforderlich. Die anschließend in mehreren Stufen abgetrennten Mikroorganismen liegen in wässriger Suspension vor, die üblicherweise im Wärmetauscher gemäß Abb. 6 bei über 150 °C im Durchlauf sterilisiert wird. Nach mechanischer Abtrennung des Wassers und Trocknung des feuchten Gutes lässt sich aus der Biomasse ein organischer Dünger gewinnen.



**Abbildung 6.** Abtötung der Mikroorganismen in wässriger Lösung mittels kontinuierlicher Sterilisation bei ca. 5 bar. 1) Zulauf der Suspension; 2) Wärmetauscher mit Wärmerückgewinnung über den Ablaufstrom; 3) Dampfüberhitzer; 4) Verweilzeitstrecke; 5) Ablauf der sterilen Suspension.

Da sichergestellt sein muss, dass der Stamm nicht ins Produkt gelangt, erfolgt nach der Abtrennung der Mikroorganismen über Zentrifugalkräfte eine Sterilfiltration der Lösung in einer Mikrofiltrationsanlage über anorganische 0,14- $\mu\text{m}$ -Membranen unter Einsatz der Diafiltration [24]. Anschließend werden die Permeate aus der Mikrofiltration (MF) in einer Ultrafiltrationsanlage (UF, s. Abb. 7) um

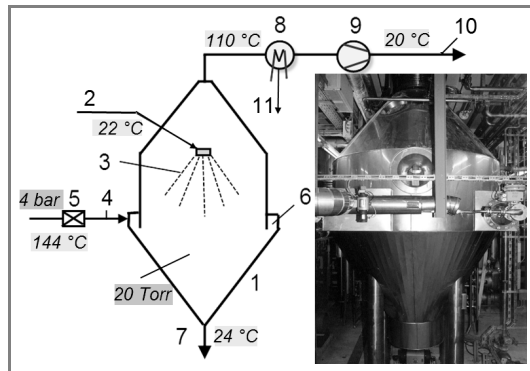


**Abbildung 7.** Technische Membrananlagen zur Sterilfiltration und zur Aufkonzentrierung: a) Mikrofiltration, b) Ultrafiltration mit den Kreisläufpumpen.



einen Faktor 20 bis 40 und dann im Dünnschichtverdampfer um den Faktor 2 aufkonzentriert. Während die Enzyme in der MF durch die Membran diffundieren und die restlichen Zellen sowie andere Feststoffe zurückbleiben, erfolgt in der UF (Trenngrenze 10–20 kDa) eine Aufkonzentrierung der Enzyme über die Abtrennung von Wasser und Salzen.

Im Weg 1 der Aufarbeitung (s. Abb. 3) fällt das Protein durch Zusatz eines Salzes (Ammonium- oder Natriumsulfat) aus und lässt sich abfiltrieren, waschen und wieder mit Wasser in eine helle Lösung überführen. In der alternativen Aufbereitung 2 wird die konzentrierte, braune Enzymlösung zunächst in einer neu entwickelten Desodorierungsanlage unter Vakuum (s. Abb. 8) mit überhitztem Wasserdampf von den Geruchsstoffen [25, 26] befreit und dann in dieser Form oder nach der Entfärbung über Adsorptionsharze [27] konfektioniert. Die flüssigen Anbietungsformen entstehen aus den entfärbten Enzymlösungen, die sich mit einem Diol und Wasser auf die gewünschte Aktivität einstellen lassen.

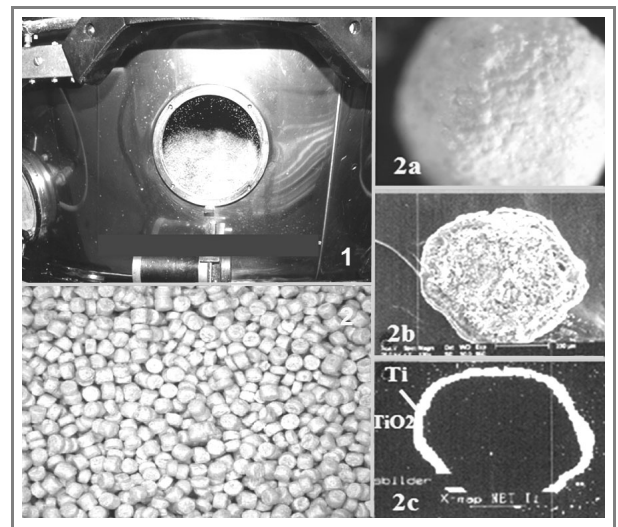


**Abbildung 8.** Desodorierungsanlage zur Entfernung von Geruchsstoffen der Fermentation aus Enzymlösungen; Innenreinigung mit Sprühköpfen über die CIP-Anlage. 1) isolierter Behälter; 2) Zuführung der Lösung über einen Düsenstock; 3) Sprühnebel; 4) Zufuhr des überhitzten Dampfes; 5) Reduzierventil; 6) Ringkanal zur gleichmäßigen Verteilung des Dampfes; 7) Produkt nach mehreren Umläufen; 8) Wärmetauscher; 9) Vakuumpumpe; 10) Abgas zur Verbrennung; 11) Geruchsstoffe in Wasser zur Abwasserreinigungsanlage.

Jede einzelne Stufe der gesamten Produktionskette, von der Ernte bis zum Fertigprodukt, verursacht aus unterschiedlichen Gründen nennenswerte Ausbeuteverluste, die insgesamt durchaus um und über 30 % liegen können. Für eine wirtschaftliche Produktion müssen diese Verluste an allen Teilschritten der Herstellung minimiert werden. Hierbei kommt der Aufbereitung eine entscheidende Bedeutung zu. Zum einen lassen sich dort die Verluste in den einzelnen Stufen über Rückführungen oder optimierte Diafiltrationen reduzieren, zum anderen können die großen Flüssigkeitsströme zur Ausbeutesteigerung nahezu vollständig recirkuliert werden.

## 6.4 Herstellung der Enzymgranulate

Das flüssige Enzymkonzentrat wird auf eine trockene Stoffmischung, die überwiegend aus Stärke besteht, in einem Mischer aufgesprüht und liegt danach als feuchter Feststoff vor. Dieser lässt sich unter Zusatz von Bindemitteln granulieren oder extrudieren/verrunden. Das Granulat sollte in kaltem Wasser gut löslich bzw. suspendierbar sein. Nach Trocknung im Wirbelbett mit anschließender Siebung erfolgt im Coater das Auftragen einer Schutzschicht (s. Abb. 9) mithilfe wässriger Lösungen oder Suspensionen [28, 29] unter Trocknungsbedingungen. In der Suspension sind vorzugsweise gut wasserlösliche Salze (Natriumsulfat) und/oder Polymere (Polyethylenglykole) sowie Titandioxid zur Verbesserung des Farbeindrucks enthalten. Mithilfe der Schicht werden die mechanischen Eigenschaften, insbesondere die Stabilitäten der Partikel, deutlich verbessert. Enzympartikel neigen zur Entmischung in der Waschmittelmatrix. Eine Reduzierung besteht in einer Anpassung von Dichte, Partikelgrößenverteilung und Form. Diese Probleme sowie die Granulation und das Coating sind ausführlich in der Literatur beschrieben [2, 30, 31].



**Abbildung 9.** Überziehen von Enzymgranulaten mit einer Schutzschicht. 1) Blick in einen Top-Spray-Wirbelschichtcoater für Enzyme; 2) gecoatete Extrudate: 2a) Großaufnahme einer Partikeloberfläche; 2b) in Harz (Epon) eingebettete, geschnittene Partikel in REM-Aufsicht; 2c) energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX).

Enzyme weisen sensibilisierende Eigenschaften auf. Dies bedeutet, dass nach einem ersten Kontakt über die Atemwege eine Sensibilisierung und bei einem erneuten Kontakt eine allergische Reaktion erfolgen kann. Hierbei reagiert jeder Mensch unterschiedlich. Wie bei Heuschnupfen wird nur eine Minderheit eine allergische Reaktion entwickeln. Zum Ausschluss aller Risiken sowie aus Gründen des Arbeitsschutzes bei der Herstellung und der Verarbeitung ist das Einatmen von Enzymstaub selbst in kleinsten Mengen zu vermeiden. Daher werden die Granulate mit einer

Schutzschicht überzogen. Für die Produktsicherheit erfüllt das Coating zwei essenzielle Aufgaben. Zum einen muss alveolengängiger Abrieb (kleiner  $10\mu\text{m}$ ) vermieden werden. Zum anderen sind die Granulate so zu fertigen, dass bei normaler Belastung im Betrieb und in der Anwendung durch Prall oder Scherung kein Enzymstaub entsteht. Der Verbraucherschutz wird durch das Coating erfüllt. Die marktgängigen, mit Coatingschichten umhüllten Enzymgranulate erfüllen alle Anforderungen und lassen sich problemlos in Waschmitteln einsetzen und handhaben [32].

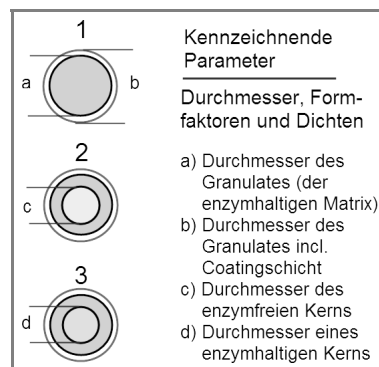
Des Weiteren erlaubt die Schicht Verbesserungen der Granulatfarbe über die zugefügten Weißpigmente sowie der Lagerstabilität durch Reduzierung des Kontaktes mit anderen Inhaltsstoffen der Waschmittelformulierung. Ein gutes Coating zeichnet sich durch eine hohe Gleichmäßigkeit der Schicht aus, die einerseits fest haften muss und andererseits eine gewisse Elastizität aufweisen sollte, damit sie bei mechanischer Beanspruchung nicht abplatzt. Ferner müssen die Teilchen hinreichend stabil sein und nicht brechen, damit keine ungeschützten Oberflächen entstehen. Plastisch verformbare oder elastische Rezepturen für die Matrix und für die Coatingschicht weisen somit Vorteile gegenüber harten, spröden Granulaten auf.

In der Produktion werden zur Kontrolle aus jeder Coatingcharge Proben gezogen. Ein wichtiger Qualitätsparameter ist das Abriebverhalten. Zur Quantifizierung laufen parallele Versuche in Wirbelschichtanlagen unter weltweit standardisierten Bedingungen. Die abgeriebenen Stäube werden gewogen und die Aktivitäten bestimmt. Um auch weltweit auf eine standardisierte Messmethode für das Bruchverhalten zurückgreifen zu können, arbeiten die großen Waschmittel- und Enzymhersteller an der Entwicklung einer Messapparatur, die der Bestimmung von Enzymstaub aus Granulaten nach Aufprall und Scherung dient. Die Messwerte müssen unterhalb strenger Grenzen liegen. Die Partikelbelastungen gehen in den Messanlagen weit über übliche Anwendungen (worst case) hinaus.

Die Bildung von Abrieb und Bruch lässt sich ferner mit den bekannten Methoden der Feststoffverfahrenstechnik quantitativ nachweisen. Das Granulatfestigkeits-Prüfsystem (Fa. ETEWE) misst die Bruchkraft und Druckfestigkeit und ermöglicht Aussagen über das Bruchverhalten der Granulate bei einer Druckbeanspruchung. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Granulate pneumatisch auf eine schiefe Wand zu schießen und den Abrieb über Reibungsbeanspruchungen in einer  $360^\circ$ -Schleife zu ermitteln. Die veränderte Größenverteilung der gestressten Partikel wird anschließend im Laserbeugungsspektrometer gemessen. Alle Methoden sind besonders interessant für vergleichende Messungen unter identischen Bedingungen.

Abgeschätzt für kugelförmige Teilchen weist die Schicht bei einem  $500\mu\text{m}$ -Partikel mit einem  $25\mu\text{m}$ -Coating (= Partikeldurchmesser + 10%) ein Gewicht von 16% bezogen auf das ungecoatete Teilchen bei vergleichbarer Dichte auf. Bei einer  $50\mu\text{m}$ -Schicht (+20%) liegt das Gewicht der Schicht bereits bei fast 50%; bei  $100\mu\text{m}$  (+40%) ergibt sich

mehr als eine Verdoppelung des Gewichts. Daraus lässt sich schließen, dass ein Coatingverfahren neben den hohen Fertigungskosten auch hohe Materialkosten verursachen kann. Wenn die Schicht gleichmäßig aufgetragen ist und eine Stärke von  $15\mu\text{m}$  überschreitet, funktioniert der Überzug im gewünschten Sinne. Ein weiterer Auftrag ist in der Regel nicht erforderlich. Gemäß Abb. 10 existieren drei Varianten des Granulataufbaus, die vom eingesetzten Granulationsverfahren abhängen.



**Abbildung 10.** Möglichkeiten des Aufbaus eines gecoateten Enzymgranulates. 1) Granulat mit inerter Coatingschicht; 2) Granulat mit inertem Kern, enzymhaltige Coatingschicht in der Mitte, außen Inertschicht; 3) Granulat mit enzymhaltigem Kern, enzymhaltige Coatingschicht in der Mitte, außen Inertschicht.

Kleinere Mengen an Enzymgranulaten (bis 50 kg) gelangen in Hobbocks, größere in Big Bags (UV-stabilisiertes Polypropylen) in den Versand. Die proteasehaltigen Enzymgranulate werden beim Enzymhersteller vor der Abfüllung dosiert einem Silo entnommen, gegebenenfalls mit anderen Granulaten (Amylasen, Cellulasen, Lipasen) im Mischer vereint und abgefüllt (s. Abb. 11). Die Granulate sind so stabil hergestellt und gecoatet, dass sie den pneumatischen Transport, die Zwischenlagerung im Silo und Entnahme sowie die Endmischung, den Transport zum Kunden und das weitere Handling in der Waschmittelfabrik problemlos



**Abbildung 11.** Abfüllung der Granulate in Hobbocks (50 kg) oder in Big Bags (750–800 kg).

überstehen. Geringen Aufwand erfordern die Aktivitätseinstellung und die Abfüllung der Flüssigenzyme in Fässer. Fässer lassen sich gut transportieren, die Entnahme beim Kunden ist einfach.

## 7 Arbeitssicherheit

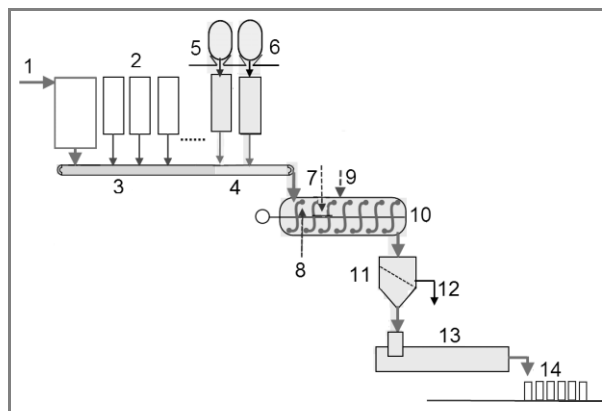
Die Waschmittelenzyme sind atemwegssensibilisierende Arbeitsstoffe, auch in Konzentrationen unter 1 % [33]. Daher ist das sichere Umgehen mit Enzymen und enzymhaltigen Vorprodukten sowie mit Zubereitungen sowohl im Labor und Technikum als auch in der Enzym- und der Waschmittelfabrik von hoher Bedeutung. Zum Sicherheitskonzept zählen die intensiven Schulungen der Mitarbeiter vor Arbeitsaufnahme und alle 6–12 Monate sowie das Tragen persönlicher Arbeitsschutzausrüstung. Dies sind in der Regel eine geeignete Atemmaske und Schutzbrille, ferner Hand- und Arbeitsschuhe sowie im Betrieb ortsabhängig der Schutzhelm. Die erste arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchung der Mitarbeiter findet vor Arbeitsaufnahme statt, die Zweite nach 6–12 Monaten [32]. Alle weiteren Untersuchungen erfolgen etwa alle zwei Jahre, außer der Arzt legt kürzere Zeiträume fest.

In der Enzymfabrik sind die von den Enzymen ausgehenden Gefahren allen gegenwärtig. Die Gebäude und Anlagen befinden sich immer im sauberen Zustand. Verschüttete Feststoffe, beispielsweise bei Probenahmen, werden sofort mit einem Spezialsauger entfernt, die Fußböden regelmäßig intensiv nass gereinigt. In der Aufarbeitung liegen die Enzyme gelöst in geschlossenen Anlagen vor. Jede festgestellte Leckstelle (z. B. an Pumpen) wird sofort beseitigt. Hier gibt es keine permanenten Arbeitsplätze, weil die Anlagen vollständig automatisiert und überwacht sind. Probenahmen erfolgen mit persönlicher Schutzausrüstung, Reparaturen und Wartungsarbeiten nur nach CIP-Reinigung und Spülung.

Dagegen müssen Mitarbeiter im Feststoffbereich oft tätig werden, beispielsweise zur regelmäßigen Spülung der Düsenstöcke des Coaters oder zum Wechseln der Kopfplatte des Extruders. Dort sind neben den Punktabsaugungen der Anlagen (wie auch an den Sieben, der Mühle, den Mixern) zusätzliche Raumabsaugungen angebracht, um die potenzielle Gefahr des Einatmens von Staub zu minimieren. Eine totale Kapselung der einzelnen Anlagenteile stellt sicher, dass sich jeder problemlos im Gebäude bewegen kann. Die Luftbelastung wird regelmäßig kontrolliert.

In der Waschmittelfabrik ist ein umfassendes Sicherheitskonzept schwieriger zu realisieren, weil viele unterschiedliche Stoffe gehandhabt werden. Auch dürften das Bewusstsein der potenziellen Gefahr sowie das Bestreben nach Sauberkeit weniger ausgeprägt sein. Zum Schutz der Mitarbeiter empfiehlt sich die Anlagenkapselung der Enzymzugabe und der nachfolgenden Wege in der Produktion (s. Abb. 12). Die Absaugungen enzymbelasteter Luft müssen von den anderen Absaugungen getrennt geführt wer-

den. Eine Rezyklierung der Filterstäube sowie des am Sieb anfallenden Überkorns erfolgt nach Auflösen und oxidativer und/oder thermischer Deaktivierung. Ein Verschnitt von Produkten, die außerhalb der Spezifikationsgrenzen liegen, ist qualitätsabhängig in Mengen von 0,5 bis ca. 5 % über ein Silo am Ende des Sammelbandes möglich (Stelle 6 in Abb. 12).



**Abbildung 12.** Kapselung (Nr. 4–13) der Enzymzugabe sowie der Waschmittelaufbereitung nach Enzymzusatz. 1) Turmpulver oder Rohgranulat oder Extrudat; 2) Vorlagen mit den Dosiereinrichtungen für verschiedene Komponenten der Aufbereitung; 3) gekapseltes Sammelband; 4) gekapselter Teil mit getrennter Absaugung für enzymhaltige Stäube; 5) Big Bag und Silo für die Enzymgranulate; 6) Big Bag und Silo für rezykliertes Endprodukt; 7) Parfümdosierung; 8) Niotensid-Dosierung; 9) Zugabe für Puffermittel; 10) Aufbereitungsmischer; 11) Sieb; 12) Überkorn; 13) Abfülllinie; 14) Waschmittel im Paket.

Bei der Produktion von Flüssigenzymen muss ebenfalls penibel auf Sauberkeit geachtet werden. Aerosolbindung ist zu vermeiden, ausgetretene oder verkleckerte Flüssigkeit sofort aufzunehmen. Angetrocknete Stellen können bei Kontakt oder insbesondere nach Feststoffaufwirbelung gefährlich werden. Auch hier empfiehlt sich eine Anlagenkapselung bis zur abgefüllten Flasche.

## 8 Produktdesign

Zur wirtschaftlichen Herstellung von Waschmittelenzymen müssen zwei Kernaufgaben gelöst werden. Dies betrifft einerseits die Entwicklung eines anwendungsoptimierten Enzyms mithilfe eines leistungsfähigen Produktionsstamms, gewonnen über das Genetic Engineering (Design des Enzyms) und die anwendungsbezogene Optimierung des Enzyms (Protein Engineering). Andererseits kommt es auf die Gestaltung der Granulate in richtiger Größe, Form, Dichte und Löslichkeit mit einem nahezu perfekten Überzug (Design des Endproduktes) an. Am Beispiel der Enzyme lässt sich zeigen, dass zwei völlig unterschiedliche, sich ergänzende Designarten für ein bedarfsgerechtes Produkt erforderlich sein können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Maurer, AB Enzymes GmbH, Darmstadt, für die kritische Durchsicht des Textes und für seine Anregungen.



**Wilfried Rähse** arbeitete bei der Henkel KGaA als Direktor im Bereich der Verfahrensentwicklung. Die Schwerpunkte seiner Tätigkeiten für Wasch-, Reinigungs- und Hautpflegemittel lagen im Produktdesign, in der Entwicklung innovativer Verfahren und Produkte zur Zukunftssicherung sowie in der Biotechnologie

(Downstream Processing von Enzymen). Seine Ideen und Arbeiten führten zu großen Produktionsanlagen, wie die Enzymaufarbeitung und die Megaperls. 1947 geboren, studierte er an der TU Berlin Chemie und chemische Verfahrenstechnik und promovierte 1976. Nach einer Assistententätigkeit (1971 bis 1977) an der Hochschule folgte eine 30jährige Tätigkeit bei Henkel in der Verfahrensentwicklung, aber auch in der Produktion und Umwelttechnologie. Seit 2010 ist Dr. Rähse als Partner der ATS-Lisence GmbH verantwortlich für die Produktentwicklung.

## Literatur

- [1] W. Rähse, S. Hoffmann, *Chem. Eng. Technol.* **2003**, 26 (9), 931–940.
- [2] W. Rähse, *Produktdesign in der chemischen Industrie*, Springer-Verlag, Berlin **2007**.
- [3] E. Smulders, W. Rähse, W. von Rybinski, J. Steber, E. Sung, F. Wiebel, *Laundry Detergents*, Wiley-VCH, Weinheim **2003**.
- [4] *Weißer Biotechnologie – Chancen für neue Produkte und umwelt-schonende Prozesse*, Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin **2008**.
- [5] G. Festel, J. Knöll, H. Götz, H. Zinke, *Chem. Ing. Tech.* **2004**, 76 (3), 307–312.
- [6] M. Nusser, *Chem. Ing. Tech.* **2008**, 80 (6), 713–724.
- [7] *Weißer Biotechnologie – Chancen für Deutschland*, Positionspapier Dechema e. V., Dechema, Frankfurt **2004**.
- [8] B. Garthoff, in *Weißer Biotechnologie – Ökonomische und ökologische Chancen* (Eds: W. Dubbert, T. Heine), Umweltbundesamt, Dessau **2006**, 17.
- [9] M. Schnee, T. Heine, *Weißer Biotechnologie am Kapitalmarkt*, DVFA-Fachpublikation, Dreieich **2008**.
- [10] M. Braun, O. Teichert, A. Zweck, *Übersichtsstudie: Biokatalyse in der industriellen Produktion*, VDI-Verlag, Düsseldorf **2006**.
- [11] K. Laugesen et al., *Novozymes Report 2010, Sales and Markets – Enzyme Business*, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark. <http://report2010.novozymes.com/Menu/Novozymes+Report+2010/Report/Sales+and+markets/Enzyme+Business>
- [12] M. Wink, *Molekulare Biotechnologie*, Wiley-VCH, Weinheim **2011**, 508.
- [13] P. Prawe, U. Faust, W. Sittig, D. A. Sukasch, *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Aufl., R. Oldenbourg Verlag, München **1994**.
- [14] T. Kriegel, W. Schellenberger, in *Biochemie und Pathobiochemie* (Eds: G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich), 8. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg **2007**, 107ff.
- [15] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2005**, 55ff.
- [16] H. R. Kalbitzer, P. E. Petrides, in *Biochemie und Pathobiochemie*, (Eds: G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich), 8. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg **2007**, 69ff.
- [17] *Enzymes in Detergency* (Eds: J. H. van Ee, O. Misset, E. J. Baas), Surfactant Science Series, Vol. 69, Marcel Dekker **1997**.
- [18] K.-H. Maurer, in *Industrielle Nutzung von Biokatalysatoren: ein Beitrag zur Nachhaltigkeit* (Eds: S. Heiden, A.-K. Bock, G. Antranikian), Vol. 14, Erich Schmidt-Verlag, Berlin **1999**, 173–185.
- [19] U. Roth, K. Hoppenheidt, S. Hottenroth, R. Peche, *Entlastungseffekte für die Umwelt durch Enzymeinsatz in Vollwaschmitteln*, Bayerisches Institut für Angewandte Umweltforschung und -technik, Augsburg **2004**.
- [20] *Enzymes in Industry: Production and Applications* (Ed: W. Aehle), Wiley-VCH, Weinheim **2008**.
- [21] K. Schügerl, *Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen: Prozessüberwachung*, Birkhäuser-Verlag, Basel **1997**, Ch. 3.3.
- [22] K.-H. Maurer, S. Wieland, *heute für morgen* **2005**, Henkel, Düsseldorf **2005**, 22–25.
- [23] *Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations* (Ed: A. Y. Tamime), 3rd ed., Blackwell Publishing, Oxford **2008**.
- [24] W. Rähse, F.-J. Carduck, *Chem. Ing. Tech.* **1985**, 57 (9), 747–753.
- [25] W. Rähse, K. Paatz, W. Pichler, H. Upadek (Henkel KGaA), *EP 0765182*, **1995**.
- [26] K. Paatz, W. Rähse, O. Dicoi (Henkel KGaA), *DE 4442318*, **1994**.
- [27] D. Baur, W. Pichler, W. Rähse, J. van Holt (Henkel KGaA), *DE 10304066*, **2003**.
- [28] H. Pawelczyk, W. Rähse, F.-J. Carduck, N. Kühne, V. Runge, H. Upadek (Henkel KGaA), *DE 4041752*, **1991**.
- [29] K. Paatz, W. Rähse, W. Pichler, B. Kottwitz (Henkel KGaA), *DE 19651446*, **1997**.
- [30] W. Rähse, *Chem. Ing. Tech.* **2009**, 81 (3), 231–253.
- [31] W. Rähse, *Chem. Ing. Tech.* **2009**, 81 (3), 225–240.
- [32] W. Schneider, *Fette, Seifen, Anstrichm.* **1972**, 74, 420–423.
- [33] BGI 504-23e (ZH 1/600.23e), *Auswahlkriterien für die spezielle arbeitsmedizinische Vorsorge nach dem Berufsgenossenschaftlichen Grundsatz G 23 „Obstruktive Atemwegserkrankungen“: Enzymhaltige Stäube*, Carl Heymanns Verlag, Köln **2005**.