

Dette er ottende og sidste artikel i en serie om vaskemidler anno 2005(-6). Serien startede i Dansk Kemi, 86, nr. 8, 9, 10 og 12 og 87, nr. 1, 2 og 3 og afsluttes her på midtersiderne. Det overordnede formål er at gøre unge kolleger, elever og lærere opmærksomme på, at det er et interessant og udfordrende fagområde.

Enzymer til vaskemidler

II. De nyeste udviklinger: carbohydraser af mange slags, helt andre enzymtyper, enzymatiske maskinopvaskemidler.... og det hele set i forbruger- og miljøperspektiv

Af Ture Damhus, Katja Salomon Johansen, Mikael Mikkelsen, Jesper Duus Nielsen, Merete Simonsen, Novozymes A/S

Vi introducerer i denne artikel den fjerde store produktkategori inden for vaskemiddelenzymer, cellulaserne; berører lige andre enzymtyper, der anvendes eller er på tegnebrættet; og kommer ind på maskinopvaskemidler, som har deres egen historie. Vi rundt af med et par vigtige spørgsmål for både producenter af vaskemidler og forbrugere af samme: sikkerhed ved håndteringen af enzymer og miljøaspekter ved deres anvendelse.

Cellulaser

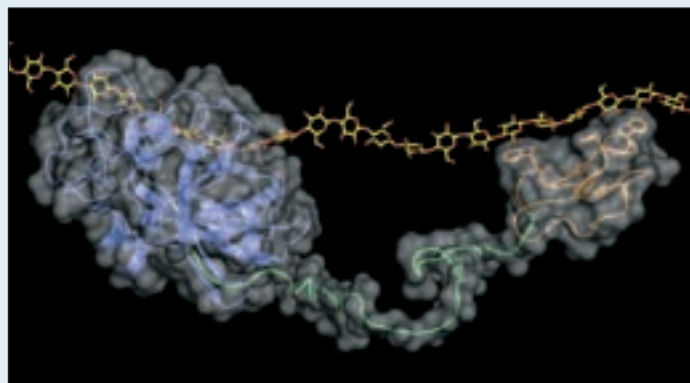
Målet – eller substratet – for cellulaser er ikke besmudsninger, men selve bomulden, som en stor del af vores vasketøj er lavet af. Forarbejdet bomuld består næsten 100% af cellulose, som er pakket i næsten perfekte krystallinske strukturer. Det gør bomuld stærk og langsomt nedbrydelig.

Interessen for at bruge cellulaser i vaskesammenhæng opstod i starten af 1970'erne. En af de store vaskemiddelproducenter havde opdaget, at cellulaser havde en blødgørende effekt på vasketøj, såsom halvgamle håndklæder, hvor overfladen virker helt sammenfiltret og føles hård mod huden. Nogle år senere blev det opdaget, at cellulaser også kunne give farvede tekstiler, som har fået et gråligt skær efter gentagne vaske, deres oprindelige farve igen.

De første cellulaseprodukter, der blev afprøvet til vask, var de naturlige blandinger af flere cellulosenedbrydende enzymer, som nogle svampe udskiller, når de dyrkes med cellulose som den eneste energikilde (se f.eks. [1]). Disse blandinger har til formål fuldstændigt at nedbryde cellulosen til glucose, som kan indgå i svampens stofskifte. Umiddelbart er det ikke det, vi ønsker skal være enden på vores vasketøj, og måske er det heller ikke nødvendigt med flere cellulasekomponenter for at opnå den ønskede effekt. Denne hypotese var udgangspunktet for et stort forskningsprojekt, som førte til isolering og kloning af flere monokomponentcellulaser, som havde meget forskellige egenskaber. Én af dem viste sig at være særlig god til bevare et nyt udseende på farvet bomuld efter mange ganges vask. Enzymet blev døbt Carezyme og blev en stor succes i vaskemiddelindustrien.

Strukturelt forskellige cellulaser

Carezyme er et godt eksempel på en cellulase fra en svamp. Molekylet består af tre dele, *det katalytiske domæne*, *et bindingsdomæne* og en peptidkæde (*linkeren*), som forbinder de to domæner. De cellulosebindende domæner, som findes i svampeenzymer, minder meget om hinanden. De består af ca. 25 aminosyrer, som er foldet på en sådan måde, at tre aromatiske ringe er placeret på række omtrent i ét plan, og med en afstand som netop svarer til afstanden mellem glucoseenhederne i cellulose [2]. Se Carezyme i figur 1. På denne måde opnås en stærk binding til cellulose ved hjælp af ikke-ioniske kræfter. Man mener, at dette bevirker, at den effektive substratkonzentration stiger, når det katalytiske domæne herved er bragt i tæt kontakt med cellulosen. Det skulle – alt andet lige – give en højere katalysehastighed og dermed en hurtigere nedbrydning [3].



Figur 1. Her ses en 3D-model af Carezyme, som holder fast på en enkelt cellulosekæde. Det katalytiske domæne i blå ses til venstre i billedet, bindingsdomænet i gult til højre og linkeren imellem i grønt. De tre tryptophaner i bindingsdomænet, som er ansvarlige for bindingen, kan også ses. Billedet er genereret af Esben Friis, Novozymes.

Man har identificeret en anden cellulase (Endolase), som også bliver brugt til vaskemidler. Den adskiller sig fra Carezyme bl.a. ved ikke at have noget bindingsdomæne, og den har også andre anvendelsesegenskaber. Den har en anti-redepositionseffekt, som på nogen måder svarer til den, der blev beskrevet for amylaser (se foregående artikel), men den virker i de tilfælde, hvor det ikke er en α -glucan (stivelse), men en β -glucan (nemlig cellulose i form af afslidte mikrofibriller) som binder det partikulære smuds til vasketøjets overflade [4]. Endvidere er det vist, at denne cellulase kan fremme fjernelsen af fedtstoffer under vaskeprocessen, endda fra det indre af fibre (lumen), hvor andre vaskemiddelindredienser har sværere ved at udøve en effekt [5].

Andre anvendelser af cellulaser

Erfaringer fra ét enzymanvendelsesområde kan ofte inspirere i et andet. I dag benyttes der således stigende mængder af cellulaser i tekstilindustrien, men det er i høj grad de samme principper og de samme enzymer, der udnyttes. Ved fremstilling af bomuldstekstiler opnår man ved hjælp af cellulaser et tekstil af høj kvalitet, der virker blødere og som holder sig pænt i længere tid. Denne proces kaldes *biopolishing*. En anden anvendelse baserer sig på, at for cowboybukser og andet tøj af denim dikterer moden i perioder et slidt look. Dette udseende, som man tidligere opnåede ved hårdhændet mekanisk påvirkning med pimpsten (*stone wash*), som sled på de store maskiner, som brugtes til processen, kan i stedet tilvejebringes ved en kraftig cellulasebehandling, hvorved den blå indigofarve delvist fjernes fra overfladen.

Andre enzymtyper

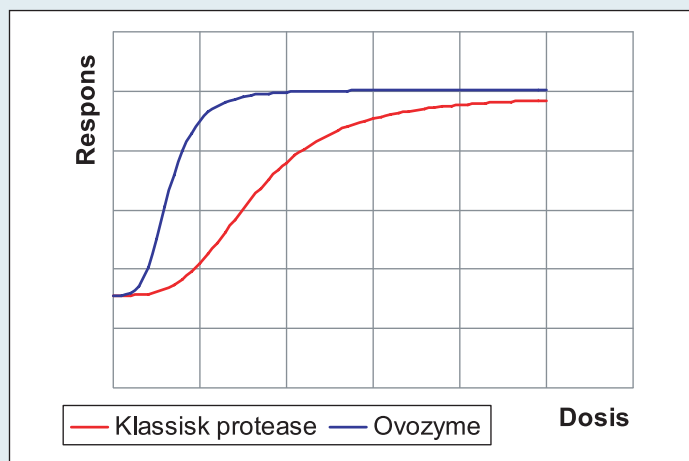
I de senere år har industrien arbejdet med, og til dels kommercieliseret, en række nye enzymtyper til vaskemidler. For det før

ste er der andre *carbohydraser*, altså carbohydratspaltende enzymer, end amylaser og cellulaser. Mest prominente er nok *mannanaserne* [6]. Mange fødemidler indeholder galactomananer – carbohydrater med en lidt mere kompliceret struktur end amylose eller cellulose – f.eks. hvis der er anvendt *guar gum* som konsistenshjælpemiddel. Et godt eksempel er chokoladeis. Genstridige pletter heraf fjernes effektivt med en passende valgt mannanase.

For det andet er der pectinspaltende enzymer, som i mange år har været i søgelyset til fjernelse af frugtpletter, som man ved indeholder *pectiner*, komplicerede polymerer baseret på bl.a. galacturonsyre. *Pectinhydrolaser* er analoge til de andre hydrolaser, mens *pectatlyaser* ligeledes spalter 1,4-bindingerne i pectin, men i stedet efterlader en dobbeltbinding i ringen ved 4-carbonatomet.

En helt anden boldgade er *oxidoreductaserne* eller redoxenzymerne. Der har været arbejdet meget med at erstatte blegesystemerne (artikel 3 i serien), som jo er oxidationssystemer, med oxidative enzymer. Af forskellige årsager er noget sådant endnu ikke blevet kommercielt realiseret. Dette er diskuteret i [7]. Et andet koncept, der heller ikke har nået forbrugeren, men som har været intensivt studeret, er anvendelse af et oxidativt enzym-system (baseret på en *peroxidase*, altså et enzym, der katalyserer oxidationer med hydrogenperoxid, plus et substrat for dette, der fungerer som *mediator*) til at oxidere tekstilfarver i opløsning til farveløse forbindelser for at forhindre farveoverførsel under vask [8].

Persyredannelsen i systemer analoge til de kendte aktiverede blegesystemer (se igen artikel 3) forsøges fremmet ved brug af hydrolaser, der ved spaltning af passende substrater farvoriserer hydrogenperoxid over vand [9]. Dette er dog et ambitiøst koncept [7].



Figur 2. Målt opvaskeperformance på æg (arbitrær skala) af proteaser som funktion af doseringen. Den klassiske protease er inhiberet af ovoinhibitorer fra æg og viser dårlig performance ved lav enzymdosering. Den nyudviklede protease *Ovozyme* viser ikke tegn på inhibering.

Maskinopvaskemidler

Vi har tidligere nævnt (se artikel 3 i serien), at de første maskinopvaskemidler brugte chlorforbindelser som blegesystem og var karakteriserede ved højt pH under vasken (omkring 12), udviklede en karakteristisk chlorlugt og ikke indeholdt enzymer. I 90'erne skiftede man over til TAED-systemet i mange maskinopvaskemidler, hvilket muliggjorde inkorporering af enzymer. I dag findes kun ganske få chlorbaserede produkter på markedet.

Inden for de sidste få år har maskinopvaskeprodukterne så gennemgået en rivende videreudvikling, og nye produktformer er blevet markedsført (se artikel 1 i serien, figur 3, produkt nr. 4 og 11). Hvor forbrugeren tidligere selv doserede den fornødne mængde pulver (typisk 40 g, som for en betydende del var fyldstof, Na_2SO_4 eller NaCl), så laves der nu tabletter, hvorved en en-

kelt tablet på 20 g er nok til at sikre en effektiv vask. De første tabletter var ét- eller tolagstabletter. Senere kom de såkaldte 3-i-1-tabletter, hvor afspændingsmidlet til det afsluttende skyl er indbygget, og salttilsætning til maskinen angiveligt er overflødiggjort, også selv om maskinen beder om det! De allersidste nye produkter i Mitteleuropa er såkaldte 4-i-1- og 5-i-1-produkter, som yderligere indeholder ingredienser til beskyttelse af glas og metaloverflader (jf. foregående artikel, korrosionsinhibitorer).



Figur 3. Havregrødsbesmudsede tallerkner vasket uden og med en amylase og derpå iodfarvet. Testbesmudsninger indrettes som regel sådan, at standardbehandlinger ikke efterlader dem helt rene, så der stadig er mulighed for at detektere forbedringer.

I forhold til et standard-tøjvaskemiddel i pulver- eller tabletform indeholder et maskinopvaskeprodukt en meget større del byldere, ingen anioniske tensider og kun meget lidt noniontensid (jf. eksemplet i boks 2 i artikel 6 i serien). Enzymmængden er normalt markant højere i maskinopvaskemidler.

I dag anvendes enzymer (proteaser og amylaser) som standard-ingredienter i næsten ethvert maskinopvaskemiddel. Proteaser fjerner f.eks. mælkeprodukter, påbrændt kød og æg. Det sidste byder på en udfordring. I æggeblommer og -hvider findes proteaseinhibitorer, hvis funktion er at beskytte ægget mod mikrobiel infektion. Inhibitorerne kan også virke under maskinopvask. Dette har betydet, at der har måttet udvikles nye proteaser, som er mere resistente over for disse ovoinhibitorer. Se figur 2.

Amylaser fjerner stivelsesholdige besmudsninger som f.eks. ris, pasta og havregrød. Efter en opvask kan de vaskede tallerkner umiddelbart se rene ud. Men hvis tallerknerne farves med en iodopløsning, vil iod reagere med det tilbageværende stivelse (fremkomst af blåsort farve på overfladen, se figur 3). Denne ikke fjernede stivelse vil gradvist blive opbygget gennem flere vaske, hvis den ikke fjernes helt i den enkelte vask. Nye amyla-



Figur 4. Betina Heide, Novozymes, i færd med at måle iodfarvede, stivelsesholdige besmudsninger på glasplader (til venstre) og ægbesmudsede glasplader (til højre) på et ZEISS-reflektansmåleapparat.

ser som Stainzyme (se den foregående artikel) er så effektive, at dette problem stort set er forsvundet.

Ved test af enzymer i fuldskala-opvasketest benyttes standardiserede besmudsninger, som detergentproducenter og testinstitutter også anvender. De vigtigste besmudsninger er æggeblomme, æggeblomme/mælk, påbrændt hakket kød, ris og havregrød, samt te som blegemiddelfølsom besmudsning.

Moderne produktion af vaskemiddelenzymer [7,10]

Som vi har været inde på tidligere, er basis for storskalaproduktion af enzymer beherskelse af mikrobielle gæringsprocesser, altså styret opformering i store tanke (hos Novozymes op til 160 m³) af bakterier eller svampe, som enten naturligt udskiller kommercielt interessante mængder af relevante enzymer (vildtypestammer), eller som er blevet genetisk modificeret til at producere enzym(er) med bestemte ønskværdige egenskaber i et passende højt udbytte. Vi har tidligere nævnt, at de forbedringer af produktionsøkonomien, der ligger i udnyttelsen af genteknologi, også indebærer store fordele for miljøet. Endvidere kan man vha. *protein engineering* (PE) systematisk udskifte aminosyrer bestemte steder i enzymmolekyler for at opnå bedre egenskaber i forhold til en bestemt anvendelse. Store PE-programmer kører for de klasser af enzymer, vi omtaler her i serien, se f.eks. [11-14].

Resultatet af en gæring, som kan vare fra et par dage og op til flere uger, er en gæringsvæske indeholdende enzymet sammen med salte, andre proteiner m.v., som i et vist omfang skal fjernes, afhængigt af bl.a. den påtænkte anvendelse. Rensning og opkoncentrering af enzymet sker især ved centrifugering, filtreringsprocesser (tromlefiltrering, ultrafiltrering) og i nogle tilfælde krystallisation af enzymet og påfølgende genopløsning. Man ender med opløsninger, som kan tilsættes stabilisatorer (først og fremmest polyoler som propan-1,2-diol), standardiseres ved måling af enzymaktiviteten og sælges som flydende enzymprodukter. Alternativt fremstilles tørre produkter, primært *granulater*, som er enzymholdige partikler med diameter fra omkring 1 mm og ned efter. Tidligere fremstilledes *prills*, der var enzymer indlejret i et smeltet voksmateriale, som derefter blev spraykølet til små kugler. Granulaterne er mere avancerede og indeholder enzymer og diverse hjælpestoffer i midten og en *coating* udenom, som beskytter enzymet og hindrer dannelse af enzymstøv.



Figur 5. Prøver af flydende enzymprodukter, som de kan fås fra Erhvervsakademi Roskilde (se boks 1), og granulater. Bemærk, at de flydende produkter har farver, som ikke skyldes enzymindholdet, men diverse komponenter fra gæringsprocessen. To af de tre viste granulater er farvede efter ønske fra kunder. Ofte ønskes dog mest muligt hvide granulater.

Enzymer og sikkerhed [15]

Enzymer er proteiner, og som mange andre proteiner (f.eks. dem der kendes fra pollen, husstøvmider og dyrehår) er de potentielle inhalationsallergener.

Vaskemidler er næsten de eneste produkter, der indeholder bevidst tilsatte og stadig aktive enzymer, når de kommer hjem til forbrugeren. Mange års erfaring viser dog, at enzymer ikke frembyder nogen risiko for forbrugeren for allergi eller irritation, hvis produkternes brugsanvisning følges. Før markedsføring af et nyt enzymprodukt tilvejebringes i øvrigt altid data omkring sikkerhed i henhold til de retningslinjer herfor, som fastlægges af de enkelte landes myndigheder.

Hvis en person i arbejdsmæssig sammenhæng udsættes for gentagen enzymeksponering af de øvre luftveje, kan det føre til en luftvejsallergi, som ytrer sig som f.eks. høfeber eller astma. Visse proteolytiske enzymprodukter kan desuden forårsage lokal irritation ved direkte kontakt til hud, øje eller slimhinder. Denne reaktion vil dog være mild, og den vil fortage sig hurtigt, når enzymeksponeringen ophører.

I mange lande er der fastlagt en grænseværdi for arbejdsmæssig eksponering; i Danmark er denne grænseværdi fastlagt til 60 ng enzymprotein/m³. Denne grænseværdi blev fastsat i begyndelsen af 1970'erne på det tidspunkt, hvor man var blevet klar over, at enzymer kunne forårsage allergi (se foregående artikel). Før da havde man produceret enzymer som pulverformige produkter, og der var ikke særlige forholdsregler ved håndtering af disse produkter, hverken hos enzymproducenten eller den fabrik, der fremstillede slutproduktet, f.eks. vaskemidlet.

Man begyndte i stedet at fremstille indkapslede enzymgranulater, og alle arbejds- og håndteringsprocesser blev grundigt gennemgået. I dag ved vi, at det er muligt at forebygge enzymallergier, hvis bestemte retningslinjer følges, primært at støv eller aerosoldannelse minimeres, så vidt muligt ved at produktionsprocesser gennemføres i lukkede systemer.

De steder, hvor der håndteres store mængder enzym, som f.eks. hos enzymproducenter som Novozymes, vil man oftest rutinemæssigt overvåge arbejdsmiljøet ved dels at måle enzymeksponeringen i luften, dels at teste eksponerede medarbejdere for sensibilisering med hudprøvetest eller blodprøve, så man rettidigt kan gribe ind og forebygge.

Gavner enzymer i vaskemidler miljøet?

I mange år har det været et generelt accepteret dogme, at enzymer kan hjælpe industrielle processer til at blive mere miljøvenlige f.eks. ved at muliggøre lavere processtemperaturer eller gennem erstatning af miljøskadelige kemikalier (enzymer er fuldt bionedbrydelige). Der har dog ikke tidligere eksisteret metoder, der objektivt kunne af- eller bekræfte dette dogme.

Udviklingen af *livscyklusanalyse* (LCA-)metoder har dog ændret dette [16,17]. En LCA er et redskab til sammenligning af

Boks 1: Hvordan får man fat i enzymer?

Erhvervsakademi Roskilde har venligst påtaget sig at distribuere gratisprøver af visse kommercielle enzymprodukter fra Chr. Hansen og Novozymes, som kan anvendes til illustrative forsøg i skolerne. Man betaler kun for forsendelsen. Udvalget kan til enhver tid ses ved at gå ind på hjemmesiden: <http://enzymer.ucr.dk>.

Visse enzymtyper kan i mere eller mindre ren tilstand også købes fra leverandører af laboratoriekemikalier.

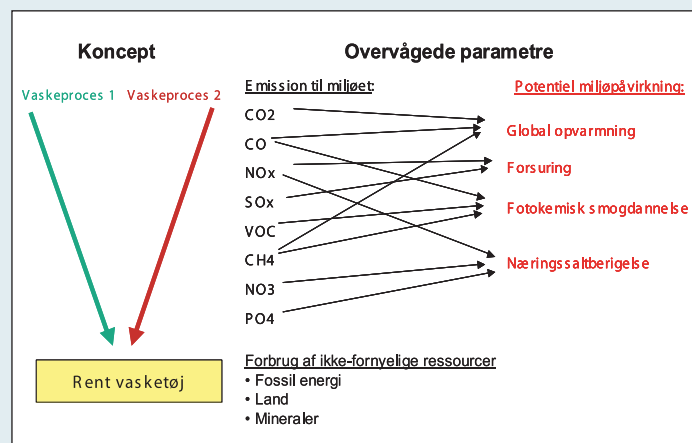
Iblødsætningsmidler og »pletløsnere« af forskellig slags indeholder ofte adskillige vaskemiddelenzymer – og meget af dem – og kan være brugbare kilder – afhængigt af, hvad der i øvrigt er i midlerne.

Mere eksotiske kilder er enzymholdige fødevarer som f.eks. ananas, ingefær, kiwi, papaya (proteaser); lever (katalase). Der er dog ingen garanti for, at disse enzymer virker under mere eller mindre realistiske vaskebetinger! – men man er da velkommen til at prøve.

miljøbidraget fra to forskellige processer, der giver samme resultat/produkt. Det kunne f.eks. være to måder at opnå rent tøj på. En forudsætning er, at resultatet af de to processer ikke kan skelnes fra hinanden, altså tøjet skal være »lige rent«. Derudover må de to processer ikke adskille sig på bivirkninger som skader på tøj eller tekstilfarver. Disse to processer analyseres så individuelt »fra vugge til grav«, hvilket vil sige fra råmaterialerne produceres, til affald eller selve produktet bortskaffes. Der måles bl.a. på miljøparametre som CO₂-emission, næringssaltforurening, forsurening, fotokemisk ozondannelse.

Sammenligner man miljøbelastningen af en vaskeprocess ved 40°C med miljøbelastningen af en ved 30°C, er det altså en forudsætning, at man opnår det samme vaskeresultat ved begge temperaturer. Det er ikke tilfældet med et gennemsnitligt moderne vaskemiddel, men hvis der tilsættes en passende »cocktail« af enzymer, kan samme vaskeresultat opnås ved begge processer på et bredt udsnit af forbrugerrelevante besmudsninger. Alle miljøbelastninger, lige fra udvinding af råmaterialer, disses bearbejdning og bortskaffelse til energien, der forbruges i selve vaskeprocessen, kan nu medtages i en LCA (se figur 6).

De to forskellige processer adskiller sig ved at en lille mængde natriumsulfat i vaskemidlet brugt ved 40°C er erstattet af den samme vægtmængde enzymprodukt i vaskemidlet brugt ved 30°C. Den anden forskel på de to processer er, at den ene bruger væsentlig mere energi til at opvarme vaskevandet end den anden. Det er klart, at der er en miljøbelastning ved at producere enzymerne, men analysen viser, at den klart opvejes af de miljøgevinster, der opnås ved det lavere energiforbrug. Dette skyldes primært den mindre mængde fossilt brændstof, der bruges til elektricitetsproduktion. Hvis hele Europa fulgte trop med denne temperatursenkning, ville man, populært sagt, kunne spare 2 større kraftværker i Europa.



Figur 6. LCA-konceptet brugt til at analysere to forskellige vaskeprocesser.

En lignende øvelse vil kunne laves på erstatning af traditionelle petrokemiske vaskemiddelingredienser med enzymer, ligesom LCA har fundet anvendelse på andre vaskemiddelingredienser, såsom i sammenligninger af triphosphat og zeolit som buildere (jf. artikel 4 i serien), og i en bred vifte af andre enzymbaserede industrier lige fra bagning til tekstilproduktion.

Idéer til forsøg med vaskemiddelezymer

Forsøg med enzymatiske vaskeeffekter (både pletfjernelse og anti-redepositionseffekter) giver mulighed for diskussion i klassen af ikke bare enzymeffekterne selv, men relateret information såsom ingredienser i vaskemidler, hårdhed af postevand (jf. boks 3 i artikel 1), energisparemærkning af vaskemaskiner, tekstiltyper, tekstilfarver, besmudsninger på service og tøj (blod, hudfedt, kosmetik, fødemidler, græs m.v.) og disses kemi-

ske egenskaber, spildevandsbehandling osv. Det er bare ikke nødvendigvis let at udarbejde reproducérbare og hurtige forsøg, der på overbevisende måde demonstrerer enzymatiske vaskeeffekter. Pladsen tillader desværre ikke at gå i detaljer, men [18] giver nogle forslag til, hvordan man kan gå til værks.

E-mail-adresser

Ture Damhus: tda@novozymes.com
Katja Salomon Johansen: ksjo@novozymes.com
Mikael Mikkelsen: mikm@novozymes.com
Jesper Duus Nielsen: jdun@novozymes.com
Merete Simonsen: msi@novozymes.com

Fotos: Leigh Murphy

Referencer

De generelle referencer om enzymer i den foregående artikel i serien og referencerne om vaskemidler i artikel 2 er også relevante for emnerne i denne artikel.

1. M. Schüle: Enzymatic properties of cellulase from *Humicola insolens*, *J. Biotech.* 57 (1997) 71-81.
2. J. Tormo *et al.*: Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose, *EMBO J.* 15 # 21 (1996) 5739-5751.
3. J. Eriksson, M. Malmsten, F. Tiberg, T.H. Callisen, T. Damhus, K.S. Johansen: Enzymatic degradation of model cellulose films, *J. Colloid Interface Sci.* 284 (2005) 99-106; Model cellulose films exposed to *H. insolens* glucoside hydrolase family 45 endo-cellulase – the effect of the carbohydrate-binding module, *ibid.* 285 (2005) 94-99.
4. K. Gibson: Anti-redeposition effects from enzymes, *Tenside Surf. Det.* 36 (1999) 388-392.
5. S.K. Obendorf, A. Varanasi, R. Mejdahl, V.S. Nielsen: Lipid Distribution on Cotton Textiles in Relation to Washing with Cellulase, *J. Surf. Det.* 6 # 1 (2003) 1-5. [Obendorfs gruppe har også indgående studeret fedtjernelse fra bomuldsfibre ved brug af lipaser, en effekt, der måske er knap så overraskende, men hvor det også viser sig, at fedtet fjernes fra det indre af fibrene.]
6. Q. Westdijk *et al.*: Mannanase – Enzyme Functionality for Stain Removal, *SÖFW-Journal* 130 # 6 (2004) 37-40.
7. E. Gormsen, E. Marcussen, T. Damhus: Enzymes, pp.137-163 i M.S. Showell (Ed.): *Powdered Detergents, Surfactant Science Series* Vol. 71 [Marcel Dekker, 1997].
8. L.S. Conrad, T. Damhus, O. Kirk, P. Schneider: Enzymatic inhibition of dye transfer, *Inform* 8 # 9 (1997) 950-957.
9. Patentskrift WO 2005/056782 (til Genencor og Procter & Gamble). Patentet omhandler nye perhydrolaser og anvendelser af sådanne. Det er på 523 sider!! (Se bemærkning ved [1] i den foregående artikel.)
10. T.T. Hansen, H. Jørgensen, M. Bundgaard-Nielsen: Production of proteases and other detergent enzymes, in *Handbook of Detergents*, Part F. To appear in *Surfactant Science Series* [in press, Marcel Dekker, 2006].
11. P.N. Bryan: Protein engineering of subtilisin, *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2000) 203-222.
12. J.E. Nielsen, T.V. Borchert: Protein engineering of bacterial α -amylases, *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2000) 253-274.
13. A. Svendsen: Lipase protein engineering, *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2000) 223-238.
14. M. Schüle: Protein engineering of cellulases, *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2000) 239-252.
15. Relevante links vedr. enzymsikkerhed:
Safe Handling of Enzymes. Novozymes A/S, 2001: www.novozymes.com
Subtilisin – HERA Report, 2005: <http://www.hera-project.com/>
Guidelines for the Safe Handling of Enzymes in Detergent Manufacturing. AISE, International Association for Soaps, Detergents, Maintenance Products, 2002: www.aise-net.org
Risk Assessment Guidance for Enzyme-Containing Products. SDA, The Soap and Detergent Association, 2005: www.sdaq.org
16. E. Saouter *et al.*: Life Cycle Assessment: A Novel Approach to the Environmental Profile of Detergent Consumer Products, Chapter 7 i *Handbook of Detergents*, Part B: Environmental Impact [U. Zoller, Ed.; *Surfactant Science Series* vol. 121 (2004)].
17. P.H. Nielsen: Life Cycle Assessment Supports Cold-Wash Enzymes, *SÖFW-Journal* 131 # 10 (2005) 24-26. Yderligere information kan fås ved henvendelse til Jesper Duus Nielsen.
18. T. Damhus: Generelt oplæg til forsøg, der demonstrerer vaskeeffekter af enzymer. [Skrift udarbejdet til brug ved kursus på Erhvervsakademi Roskilde i august 2004. Man er velkommen til at rekvirere dette skrift fra forfatteren.]