

Enz4Water - Enzymatische Filtration für die 4. Reinigungsstufe

Dorothee Schmiemann^{1,3} (dorothee.schmiemann@hs-niederrhein.de), Jessica Schneider² (Schneider.j@fn.de), Marcel Remek² (remek@dtnw.de), Indra Bartels^{1,4} (indra.bartels@hs-niederrhein.de), Felix Bachmann^{5, □} (f.bachmann@tum.de), Merdan Urcanli⁵, Manuel Hesse⁶, Jochen Stefan Gutmann^{2,3} (jochen.gutmann@dtnw.de), Martin Jäger¹ (Martin.Jaeger@hs-niederrhein.de), Arno Cordes⁵ (cordes@asa-enzyme.de), Klaus Opwis² (opwis@dtnw.de) und Kerstin Hoffmann-Jacobsen^{1*} (kerstin.hoffmann-jacobsen@hs-niederrhein.de)



¹ Hochschule Niederrhein, Fachbereich Chemie und Institut für Lacke und Oberflächenchemie, Adlerstr. 32, 47798 Krefeld

² Deutsches Textilforschungszentrum Nord-West gGmbH (DTNW), Adlerstr. 1, 47798 Krefeld

³ Institut für Physikalische Chemie und CENIDE (Center for Nano-integration), Universität Duisburg-Essen, Universitätsstraße 3, 45117 Essen

⁴ Fakultät für Chemie, Instrumentelle Analytische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstraße 5, 45141 Essen

⁵ ASA Spezialenzyme GmbH, Am Exer 19 C, 38302 Wolfenbüttel

⁶ HST Systemtechnik GmbH & Co. KG, Heinrichthaler Straße 8, 59872 Meschede

□ Aktuelle Adresse: TU München, School of Life Sciences, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, 85354 Freising-Weihenstephan

Abstract

Eine oxidative Behandlung anthropogener Spurenstoffe wie z.B. durch Ozonung gilt als vielversprechende Technologie für eine vierte Reinigungsstufe von Kläranlagen. Allerdings gehen unspezifische oxidative Verfahren mit dem Risiko toxischer Nebenprodukte einher. Laccasen sind Enzyme, welche die Oxidation von insbesondere phenolischen Substanzen mit Sauerstoff katalysieren und von Organismen zum Abbau von Giftstoffen genutzt werden. Ziel des Forschungsvorhabens Enz4Water war daher, ein enzymatisches Verfahren zur Oxidation von Spurenstoffen technisch zu realisieren, das in der Lage ist, toxische Produkte abzubauen und so mit der Ozonung kombinierbar ist. Der Lösungsansatz des Projektes bestand in der Entwicklung eines biokatalytisch aktiven textilen Filters, der im kontinuierlichen Testbetrieb in einer Kläranlage erprobt wurde.

Einleitung

Konventionell behandeltes Abwasser stellt eine wichtige Punktquelle für Spurenstoffe wie z.B. Arzneimittel dar. Daher wird die Aufrüstung von Kläranlagen mit einer vierten Reinigungsstufe als ein wirksames Instrument zur Verminderung der Spurenstoffbelastung der Gewässer angesehen.[1] Die Ozonung hat sich bisher in der großtechnischen Praxis als Verfahren bewährt, das ein breites Spektrum an Mikroverunreinigungen wirksam entfernen kann. Die potenziellen Risiken liegen in der Bildung von ggf. toxischen Nebenprodukten, welche eine Nachbehandlung erfordern.[2]

Ziel des EFRE Projektes Enz4Water (05.09.2019-28.02.2023) war, ein biokatalytisches Verfahren zur Behandlung von Spurenstoffen zu entwickeln, das isolierte Enzyme verwendet und somit im Gegensatz zu einer konventionellen biologischen

Stufe keine Nährstoffe benötigt und mit der Ozonung kombiniert werden kann. Die hier eingesetzten Laccasen gehören zur Enzymfamilie der Multi-Kupferoxidasen und sind als Oxidoreduktasen klassifiziert (EC 1.10.3.2). Sie oxidieren ein weites Spektrum aromatischer Substrate mit Sauerstoff als Co-Substrat zu Radikalen, die u.a. zu unlöslichen polymeren Verbindungen reagieren.[3] Die physiologischen Funktionen dieser in der Natur weit verbreiteten Enzyme beinhalten auch die Zersetzung von Abfall- und Giftstoffen. In der Industrie werden Laccasen zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln wie Wein und Backwaren und bei der Entfärbung von Textilien eingesetzt.[4]

Aufgrund ihrer inhärenten Funktion, oxidative Entgiftungsvorgänge zu katalysieren, werden Laccasen seit einiger Zeit im Zusammenhang mit Umweltschutztechniken wie der Behandlung von Abwasser diskutiert.[5] Laccasen konnten in Laboruntersuchungen bereits eingesetzt werden, um Farbstoffe, phenolische Verbindungen und eine Reihe von Spurenstoffen abzubauen.[6; 7] Es gibt bisher jedoch noch kein kontinuierlich betriebenes, rein enzymatisches Verfahren zur Spurenstoffbehandlung von Realabwasser im halb- und großtechnischen Maßstab.

Im Rahmen des Projektes Enz4Water wurde ein Verfahren zur enzymatischen Spurenstoffbehandlung auf Basis eines biokatalytischen Filters entwickelt, welcher mit der Ozonung kombiniert werden kann. Der Filter sollte die polymeren Produkte der Laccasebehandlung direkt zurückhalten. Hierfür wurden die Enzyme an leicht durchströmbaren, textilen Trägermaterialien fixiert und in einen kontinuierlichen Festbettfilter integriert. Dazu wurden zunächst verschiedene Laccasen produziert, die unter den nahezu neutralen Bedingungen des Abwas-

sers und bei niedrigen Temperaturen eine hohe enzymatische Aktivität aufwiesen. Mittels des biokatalytisch aktiven Textils wurde ein Abwasserfilter konstruiert und in einem Versuchsstand an der halbtechnischen Versuchskläranlage des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen in Neuss erprobt. Parallel dazu wurden die verketteten Mechanismen der Ozonung und der biokatalytischen Oxidation von Indikator-Spurenstoffen im Labor mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) sowie Ökotoxizitätsanalyse erforscht, um die Machbarkeit und die Sicherheit des Verfahrens zu bewerten.

Material und Methoden

Die Laccasen wurden in den Ursprungswirten nativ exprimiert und aufgereinigt.[7] Aktivitäten wurden mittels des Syringaldazin-Assays bei pH 5 bestimmt.[8] Zur Enzymimmobilisierung wurde ein Polyester-Nadelfilz (E 20102-000-0/G) der Firma Kayser Filtertech mit Polyacrylsäure (Degapas 4104S, Evonik) ausgerüstet. 12 g Textil wurden mit 40 mL Laccaselösung (30 mg/L, pH 5) ggf. zzgl. 4 w/w% Bayhydur XP 2487/1 (Covestro) benetzt und 24 h getrocknet. Der Versuchsstand wurde am Ablauf der halbtechnischen Kläranlage Neuss des Landesamts Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen mit einem Fluss von 100 L/h erprobt. Die mittlere Wassertemperatur betrug 16 ± 3 °C. Für ein Filtermodul wurden 1 kg Textil mit den Laccasen C und CU ausgerüstet. Das Filtermaterial wurde händisch um das Sammelrohr gewickelt und an den Enden abgedichtet. Die Analyse der Spurenstoffe erfolgte wie zuvor beschrieben [9] mittels eines Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Flugzeitmassenspektrometer-Systems (HPLC-Q-ToF-MS) mit einer Electrospray-Ionenquelle (ESI). Die Proben des Kläranlagenablaufs wurden durch Festphasenextraktion mit Oasis HLB Kartuschen (60 mg, Waters) 500-fach aufkonzentriert.

Abbauuntersuchungen im Labor wurden mit 10 mg/L Spurenstofflösungen und jeweils 300 U/L Laccase in dest. Wasser durchgeführt. Die Ozonung erfolgte in einem 500 mL Labor-Glasreaktor durch einen Ozongenerator der Firma Anseros.[8] Die enzymatische Nachbehandlung nach Ozonung einer 50 mg/L Paracetamolösung wurde in Erlenmeyerkolben mit 300 U/L Laccase C (*Trametes versicolor*) in einem 20 mM Ammoniumacetatpuffer bei pH 7 erprobt. Die Ökotoxizität wurde mittels Leuchtbakterientest analysiert.[10]

Ergebnisse und Diskussion

1. Isolierung, biotechnologische Herstellung und Charakterisierung von Laccasen für die Abwasserbehandlung

Es wurden zwei pilzliche Laccasen, Laccase CU und Laccase PP, biotechnologisch hergestellt, isoliert und mit der Laccase aus *Trametes versicolor* (C) verglichen, die bereits in Laboruntersuchungen in der Spurenstoffbehandlung eingesetzt wurde.[7] Die Eigenschaften der Laccasen sind in Tabelle 1

dargestellt. Laccasen haben typischerweise ihr Aktivitätsmaximum im sauren pH-Bereich und bei Temperaturen oberhalb von Raumtemperatur. Für einen Einsatz in der Abwasserbehandlung ist daher die Toleranz der Laccasen gegenüber niedrigeren Temperaturen und neutralen pH- Werten von Bedeutung. Wie in Tabelle 1 dargestellt weist Laccase CU eine besonders hohe Enzymaktivität und Resilienz bei 15 °C auf. Laccase PP dagegen ist besonders aktiv im neutralen bis alkalischen pH-Bereich. Aufgrund des Ursprungs aus Ascomyceten hat sie jedoch ein geringeres Redoxpotential, das ein eingeschränkteres Substratspektrum vermuten lässt.[11]

Die Analyse der Abbaubarkeit von Diclofenac (s. Tabelle 1) zeigte, dass die anhand des spektroskopisch nachweisbaren Modellsubstrats Syringaldazin (SGZ) gewonnene Aktivitätsreihe nicht direkt auf Spurenstoffe übertragbar war. Diclofenac wurde durch Laccase C besonders gut abgebaut. Dies änderte sich auch nicht beim masseäquivalenten Einsatz der Enzyme. Daher wurde beschlossen, die Laccasen C und CU aufgrund ihres komplementären Eigenschaftsprofil im technischen Versuch als Gemisch einzusetzen.

Tabelle 1: Eigenschaften der technischen Laccasen

	E0 [mV]	SGZ- Aktivität [U g ⁻¹]	Rest- aktivität bei 15°C [%]	pH Opti- mum	Diclo- fenac- abbau [%]
Laccase C	785	615	30	4-5	88
Laccase CU	≈ 700	14600	51	5-6	40
Laccase PP	<700	545	56	6-7	57

Das Redoxpotential der Laccase aus *Trametes versicolor* (C) [12] ist der Literatur entnommen. Die Restaktivität ist die Aktivität bei 15 °C im Verhältnis zur Aktivität bei 30 °C. Das pH-Optimum bezieht sich auf die SGZ-Aktivität. Die Abbaueffizienz gibt den prozentualen Abbau einer 10 mg/L Diclofenac-Lösung mit 300 U/L Enzym nach 24 h an.

2. Immobilisierung von Laccasen auf Polyestervliesstoffen

Zur Herstellung des biokatalytisch aktiven Filters sollten die Laccasen C und CU dauerhaft und aktiv auf dem Filtermaterial immobilisiert werden. Der verwendete Polyesternadelfilz wurde zunächst mit Polyacrylsäure (PAA) vorfunktionalisiert, um eine Anbindung der Laccasen über elektrostatische Wechselwirkungen zu ermöglichen. Diese adsorptive Immobilisierung wurde in einem zweiten Ansatz durch eine zusätzliche kovalente Verankerung verstärkt, indem Enzym und PAA mit einem kommerziellen Isocyanatvernetzer über die Carboxylgruppen der Polyacrylsäure und Enzyme und die OH-Gruppen der Enzyme vernetzt wurden. Jede Anbindung von Enzymen geht allerdings typischerweise mit Aktivitätsverlusten einher. So

mussten auch hier Aktivitätsverluste von ca. 80% durch Immobilisierung in Kauf genommen werden, um einen Durchflussprozess zu ermöglichen. Die biokatalytische Aktivität des enzymbeladenen Textils betrug 1 U/g. Die gesamte biokatalytische Aktivität des Filters wurde somit über die eingesetzte Textilmenge eingestellt.

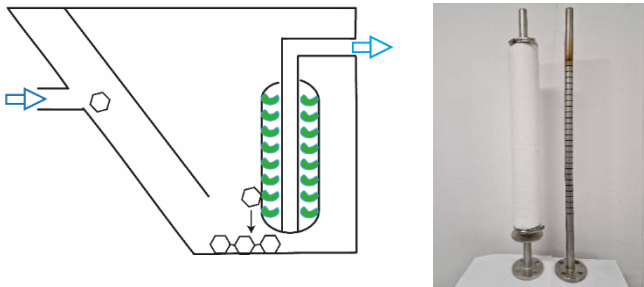


Abb. 1: Schema der Versuchsanlage für die Spurenstoffbehandlung im enzymatischen Filter (links) und Foto von Wickelmodul und Sammelrohr (rechts, Länge: 650 mm).

3. Entwicklung eines Filtermoduls für den Einsatz im halbtechnischen Maßstab

Das biokatalytisch aktive Textil wurde in Form eines gewickelten Filtermoduls (Abb. 1, rechts) technisch realisiert, welches das Wasser von außen nach innen durch den textilen Filter in ein perforiertes Sammelrohr leitet. Auf diese Weise konnten 1 kg Textil und damit geeignet große Enzymmengen in das System eingeführt werden. Das Filtermodul wurde in die in Abbildung 1 schematisch dargestellte Versuchsanlage zur biokatalytischen Spurenstoffbehandlung integriert. Die Versuchsanlage wurde über einen Sandfilter zum Rückhalt von Schwebstoffen befüllt. Die Pumpenregelung sicherte ein dauerhaftes Eintauchen des Filtermoduls im Wasser und ein kontinuierliches Durchströmen des Filters zum Ablauf. Vorversuche zeigten, dass der Sandfilter keine Rückhaltekapazität für die betrachteten Spurenstoffe aufwies.

Der Ablauf der halbtechnischen Versuchskläranlage in Neuss enthielt die Spurenstoffe Diclofenac (1750 ± 139 ng/L), Carbamazepin (209 ± 10 ng/L) und Metoprolol (235 ± 9 ng/L). Zunächst wurde in der Versuchsanlage ein biokatalytisches Textil erprobt, welches durch rein adsorptive Immobilisierung hergestellt wurde. Zu Beginn des Versuches konnten alle Spurenstoffe zu 100% abgebaut werden, jedoch sank die Abbaueffizienz bereits nach 2 h auf ca. 10% (Abb. 2 A). Durch kovalente Quervernetzung von Enzym und Textil konnte die Standzeit wesentlich erhöht werden. So konnten die Spurenstoffe über 6 h mit einer Effizienz von 40-70% abgebaut werden (Abb. 2 B). Erst nach einer Betriebszeit von 10 h fiel die Abbauleistung auf unter 50%. Der Vergleich mit dem adsorptiv beladenen Textil beweist, dass der Abbau mit kovalent enzymbeladenem Textil überwiegend biokatalytisch erfolgte. Dies gilt auch für die inertielle Abbauleistung, da die maximale

Adsorptionskapazität des Textils in Vorversuchen je nach Spurenstoff auf maximal 10% bis 60% bestimmt wurde. Dies bedeutet weiterhin, dass auch beim kovalent enzymbeladenen Textil die sinkende Abbauleistung bei Betriebszeiten von über 6 h auf ein kontinuierliches Abtragen der Enzyme von der Textiloberfläche zurückzuführen ist.

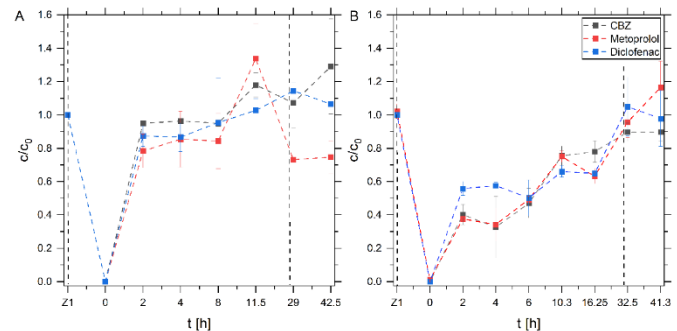


Abb. 2: Konzentration der Spurenstoffe Carbamazepin (CBZ), Metoprolol und Diclofenac im Ablauf des enzymatischen Filters im Verhältnis zum Ablauf der Versuchskläranlage Neuss über die Versuchslaufzeit unter Verwendung des adsorptiv enzymbeladenen (links) und kovalent enzymbeladenen Textils (rechts). Gestrichelte Linien zeigen an, dass ein neuer Wassercontainer am Kläranlagenablauf für den Zulauf verwendet wurde.

4. Mechanistische Untersuchung der chemo-enzymatischen oxidativen Spurenstoffbehandlung

Die Kombination von Ozonung und Abbau durch Laccasen wurde im Labor anhand von Modellabwässern mittels HPLC-HRMS und Ökotoxizitätsanalyse untersucht. Eine mechanistische Analyse gab Aufschluss, inwieweit eine Nachbehandlung von ozontem Abwasser mit Laccasen möglich ist und zur Verringerung der Ökotoxizität führt. Nach Ozonung der Modellsubstanz Paracetamol wurden die phenolischen Transformationsprodukte TP 168 und TP 111 sowie die Disäure TP 200 als Hauptprodukte identifiziert (Abb. 3).

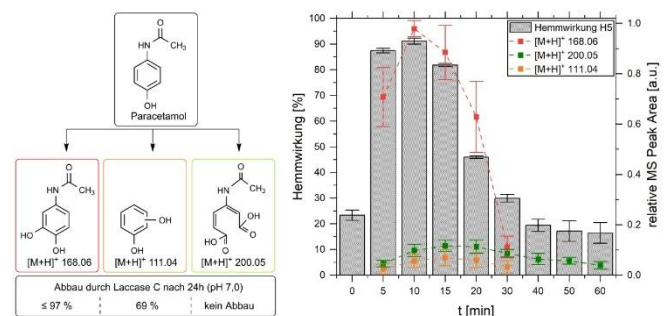


Abb. 3: Links: Ozonungsprodukte der Modellsubstanz Paracetamol gemäß HPLC-HRMS Analyse und deren Abbaubarkeit durch Behandlung mit Laccase C. Rechts: Verlauf der Peakflächen extrahierter Ionenchromatogramme (EIC) der Ozonungsprodukte und der Ökotoxizität in Abhängigkeit der Ozonungsdauer. Die Ökotoxizität des Modellabwassers wurde anhand der inhibierenden Wirkung auf die Lumineszenz von *Aliivibrio fischeri* nach 5 min Kontaktzeit analysiert.

Eine Korrelationsanalyse der Inhibierung von *Aliivibrio fischeri* und der LC-MS Peakflächen zeigte, dass die phenolischen Transformationsprodukte TP 168 und TP 111 ein hohes ökotoxikologisches Potential aufwiesen. Mittels Laccase C konnten genau diese phenolischen Produkte effizient abgebaut werden. Somit konnte gemäß erster Evaluierung die Ökotoxizität dieser Modellsubstanz nach Ozonung durch Laccasebehandlung reduziert werden.[8] Diese Erkenntnisse konnten in noch laufenden Untersuchungen auf ubiquitär vorkommende Spurenstoffe wie z.B. Sulfamethoxazol übertragen werden, für die bisher hohe Ozondosen empfohlen werden. Somit sollte eine Kombination aus Ozonung und Laccasebehandlung nicht nur die ökotoxikologische Unbedenklichkeit der oxidativen Verfahrensvariante verbessern, sondern auch einen Beitrag zur Verringerung des Energieaufwandes des Gesamtverfahrens leisten.

Zusammenfassung und Ausblick

Durch Erprobung im halbtechnischen Maßstab konnte gezeigt werden, dass die Verweilzeit des Wassers in dem hier entwickelten biokatalytischen Filtermodul ausreicht, um einen vollständigen biokatalytischen Abbau aller betrachteten Spurenstoffe zu erzielen. Zukünftige Optimierungen müssen die Irreversibilität der Enzymimmobilisierung unter den großen hydrodynamischen Belastungen verstärken, um die biokatalytische Aktivität über noch längere Zeit zu erhalten. Wie mechanistische Untersuchungen zeigen, ist dieses Verfahren in der Lage, phenolische Nebenprodukte der Ozonung in der Nachbehandlung ressourcenschonend zu entfernen.

Danksagung

Die Autoren danken der Europäischen Union und dem Land NRW für finanzielle Unterstützung im Rahmen des EFRE-Projekts Enz4Water (Förderkennzeichen EFRE-0801523). Wir danken zudem Herrn Detlef Bruszies für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der technischen Versuche und dem LANUV für die Möglichkeit die Versuche an der HtK durchzuführen.

Literatur

- [1] M. Ahting, F. Brauer, A. Duffek, I. Ebert, A. Eckhardt, E. Hassold, M. Helmecke, I. Kirst, B. Krause and P. Lepom, Empfehlungen zur Reduzierung von Mikroverunreinigungen in den Gewässern (Umweltbundesamt 2018).
- [2] F. Itzel, N. Baetz, L.L. Hohenk, L. Gehrman, D. Antakyali, T.C. Schmidt and J. Tuerk, Evaluation of a biological post-treatment after full-scale ozonation at a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 170 (2020), 115316.
- [3] J. Lu, Q. Huang and L. Mao, Removal of acetaminophen using enzyme-mediated oxidative coupling processes: I. Reaction rates and pathways, *Environmental Science & Technology*, 43 (18) (2009), 7062–7067.
- [4] M.D. Cannatelli and A.J. Ragauskas, Two decades of laccases: advancing sustainability in the chemical industry, *The Chemical Record*, 17 (1) (2017), 122–140.

- [5] L. Arregui, M. Ayala, X. Gómez-Gil, G. Gutiérrez-Soto, C.E. Hernández-Luna, Herrera de Los Santos, Mayra, L. Levin, A. Rojo-Domínguez, D. Romero-Martínez and M.C.N. Saparrat, Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation, *Microbial Cell Factories*, 18 (1) (2019), 1–33.
- [6] L.F. Stadlmair, T. Letzel, J.E. Drewes and J. Grassmann, Enzymes in removal of pharmaceuticals from wastewater: A critical review of challenges, applications and screening methods for their selection, *Chemosphere*, 205 (2018), 649–661.
- [7] V. Hahn, M. Meister, S. Hussy, A. Cordes, G. Enderle, A. Saningong and F. Schauer, Enhanced laccase-mediated transformation of diclofenac and flufenamic acid in the presence of bisphenol A and testing of an enzymatic membrane reactor, *AMB Express*, 8 (1) (2018), 1–11.
- [8] D. Schmiemann, L. Hohenschon, I. Bartels, A. Hermsen, F. Bachmann, A. Cordes, M. Jäger, J.S. Gutmann and K. Hoffmann-Jacobsen, Enzymatic post-treatment of ozonation: laccase-mediated removal of the by-products of acetaminophen ozonation, *Environmental Science and Pollution Research*, 30 (18) (2023), 53128–53139.
- [9] M. Voigt, I. Bartels, D. Schmiemann, L. Votel, K. Hoffmann-Jacobsen and M. Jaeger, Metoprolol and its degradation and transformation products using AOPs— Assessment of aquatic ecotoxicity using QSAR, *Molecules*, 26 (11) (2021), 3102.
- [10] Deutsches Institut für Normung, Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 2: Method using liquid-dried bacteria (DIN EN ISO 11348-2:2007) (2007).
- [11] A.M. Garzillo, M.C. Colao, V. Buonocore, R. Oliva, L. Falcigno, M. Saviano, A.M. Santoro, R. Zappala, R.P. Bonomo and C. Bianco, Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*, *Journal of Protein Chemistry*, 20 (2001), 191–201.
- [12] F. Xu, R.M. Berka, J.A. Wahleithner, B.A. Nelson, J.R. Shuster, S.H. Brown, A.E. Palmer and E.I. Solomon, Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile, *Biochemical Journal*, 334 (1) (1998), 63–70.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Kerstin Hoffmann-Jacobsen
Hochschule Niederrhein
Fachbereich Chemie und Institut für Lack- und Oberflächenchemie
Adlerstr. 32
47798 Krefeld
E-Mail: kerstin.hoffmann-jacobsen@hs-niederrhein.de