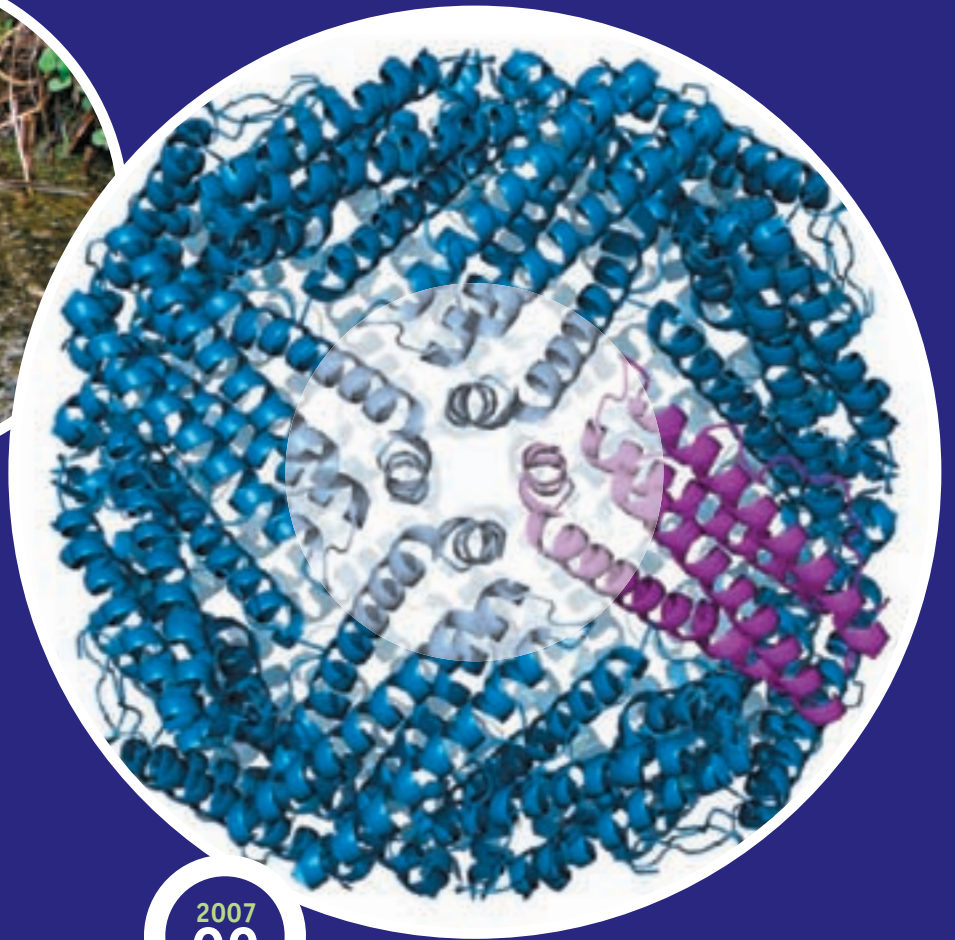


LABORATORIUM EXPERIMENTEN MET THERMOSTABIEL FERRITINE VOOR FOSFAATVERWIJDERING



RAPPORT

2007
09

LABORATORIUM EXPERIMENTEN MET THERMOSTABIEL FERRITINE
VOOR FOSFAATVERWIJDERING

STOWA RAPPORT

2007

09

ISBN 978.90.5773.365.9



stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 030 232 11 99 FAX 030 232 17 66
Arthur van Schendelstraat 816
POSTBUS 8090 3503 RB UTRECHT

Publicaties van de STOWA kunt u bestellen bij:
Hageman Fulfilment POSTBUS 1110, 3330 CC Zwijndrecht,
TEL **078 623 05 00** FAX 078 623 05 48 EMAIL info@hageman.nl
onder vermelding van ISBN of STOWA rapportnummer en een afleveradres.

COLOFON

UITGAVE STOWA, Utrecht, 2007

UITVOERDERS

ir J.F. Jacobs; TUDelft
M.N. Hasan, MSc; TUDelft

BEGELEIDERS

prof.dr. W.R. Hagen; TUDelft
prof.dr.ir. M.C.M. van Loosdrecht; TUDelft

GEBRUIKERSCOMMISSIE

W.P.M. van Bragt; Hoogheemraadschap Delfland
ir. R.A.E. Knoben; Royal Haskoning
ing. W.G. Poiesz; Waterschap Noorderzijlvest
ir. R. Ruitenbergh; Nalco Europe bv
ir. C.A. Uijterlinde; STOWA

AFBEELDINGEN VOORPAGINA

- 1 Structuur van ferritine
- 2 Oppervlaktewater in de Botanische Tuin TUDelft

DRUK Kruyt Grafisch Advies Bureau

STOWA rapportnummer 2007-09
ISBN 978-90-5773-365-9

TEN GELEIDE

STOWA laat toegepast-wetenschappelijk onderzoek uitvoeren op het gebied van regionale watersystemen, afvalwaterbehandeling, waterketens en waterwering. Met het onderzoek pogen we een brug te slaan tussen meer fundamenteel onderzoek en de praktijk van het waterbeheer.

Met het Ferritine onderzoek heeft STOWA bijgedragen aan de fundamenteel wetenschappelijke ontwikkeling van een innovatieve waterzuiveringstechnologie. Op laboratoriumschaal zijn de mogelijkheden verkend om Ferritine in te zetten om fosfaat vergaand te verwijderen. Ferritine is een hol eiwit dat ijzer en fosfaat in de kern kan opslaan. De focus was hierbij gericht op toepassing binnen de afvalwaterzuivering en/of de behandeling van oppervlaktewater. Met het onderhavige onderzoek op laboratoriumschaal, is slechts een verkenning van een innovatieve technologie gegeven.

Fosfaatverwijdering uit afvalwater (effluent) en oppervlaktewater staat volop in de belangstelling. Technieken waarmee zeer lage concentraties behaald kunnen worden, tegen acceptabele kosten zonder veel hulpstoffen en restproducten kunnen een belangrijke bijdrage leveren aan eutrofiëringsproblemen. In dit stadium van de ontwikkelingen lijkt het Ferritine-proces aan de voorwaarden te kunnen voldoen. Fosfaatconcentraties van 0,01 mg/l ortho-fosfaat lijken haalbaar. En ondanks dat de kosten nu nog hoog worden ingeschat, is er de verwachting dat door optimalisatie van de Ferritine-productie de kosten kunnen worden verlaagd, zodat het systeem economisch interessant kan worden gemaakt. De verwachtingen zijn tot op heden enkel en alleen gebaseerd op labschaal onderzoek, en er is nog een opschalingstraject te gaan voordat Ferritine op praktijkschaal kan worden toegepast.

Utrecht, juni 2007

SAMENVATTING

Fosfaatverwijdering is een maatregel die geschikt is om de mate van eutrofiëring van oppervlaktewater tegen te gaan. Bestaande fosfaatverwijderingsystemen zijn: biologische systemen, bestaande uit microbiële verwijdering, helofytenfilters of groene vijvers en fysisch-chemische systemen, gebruikmakend van metaalzouten of kalk.

Er is op labschaal onderzoek gedaan naar een alternatief ortho-fosfaat verwijderingsysteem dat werkt met behulp van een recombinant ferritine-eiwit uit *Pyrococcus furiosus*. Het thermostabiele ferritine is een hol eiwit dat ijzer en fosfaat opslaat door middel van gekatalyseerde ijzer(II)-oxidatie met zuurstof. Het toegevoegde ijzer wordt tegelijk met fosfaat in het eiwit opgeslagen in minerale vorm. Het eiwit kan vervolgens geregenereerd worden door reductie van de gevormde ijzer(III)kern.

Voor de regenereerbare defosfatering die gebruik maakt van thermostabiel ferritine zijn de belangrijkste procesparameters, zoals fosfaatbelading, beladingskinetiek, en enzymstabiliteit vastgesteld. Verder is er een conceptueel procesontwerp gemaakt met als doel het verwijderen van fosfaat uit een waterstroom van 10.000 m³ per dag van 0,5 tot 0,01 mg ortho-fosfaat per liter, waaruit blijkt dat een dergelijk fosfaatverwijderingsysteem technisch haalbaar is. Het ontworpen systeem produceert minder slib dan een fysisch-chemische methode, aangezien door gebruik van ferritine er geen co-precipitatie plaatsvindt. Bovendien bestaat het gevormde slib voor ongeveer eenderde deel uit biologisch materiaal.

Er is een verkennende kostenberekening uitgevoerd waaruit blijkt dat de stichtingskosten voor de fosfaatverwijderingsfaciliteit die gebruik maakt van ferritine liggen in de orde van grootte van bestaande fysisch-chemische fosfaatverwijderingsystemen. De directe kosten zijn momenteel hoger dan de bestaande defosfateringsystemen. Door optimalisatie van de ferritineproductie kunnen de directe kosten worden verlaagd, zodat het systeem economische interessant kan worden gemaakt.

DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonodig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n zes miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 030-2321199.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 8090, 3503 RB Utrecht.

Email: stowa@stowa.nl.

Website: www.stowa.nl

LABORATORIUM EXPERIMENTEN MET THERMOSTABIEL FERRITINE VOOR FOSFAATVERWIJDERING

INHOUD

	TEN GELEIDE	
	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
1	INLEIDING	1
1.1	Doelstelling	1
1.2	Fosfaatverwijdering	1
1.2.1	Eutrofiëring en fosfaat	1
1.2.2	Biologische verwijdering	2
1.2.2	Fysisch-chemische verwijdering	2
1.2.3	Gecombineerde verwijdering	3
1.3	Ferritine	3
1.3.1	Structuur ferritine	3
1.3.2	Functie van ferritine	4
1.3.3	Fosfaat in ferritine	5
1.3.4	Pyrococcus furiosus	5
1.3.5	Historisch perspectief	6
1.4	Enzymtoepassingen	7
1.4.1	Applicaties met enzymen	7
1.4.2	Enzymen in de waterzuivering	7

2	ONDERZOEKSRISULTATEN	9
2.1	Belading van ferritine	9
	2.1.1 IJzerbelading	9
	2.1.2 Fosfaatbelading	10
2.2	Kinetiek van ferritine	12
	2.2.1 IJzerbeladingskinetiek	12
	2.2.2 Fosfaatbeladingskinetiek	13
	2.2.3 Andere kinetische effecten	13
2.3	Regeneratie	15
2.4	Immobilisatie	16
2.5	Stabiliteit van ferritine	17
3	CONCEPTUEEL PROCESONTWERP	18
3.1	Productie van ferritine	19
	3.1.1 Procesbeschrijving	19
	3.1.2 Ontwerpbasis	19
	3.1.3 Processtructuur	20
	3.1.4 Engineering	20
	3.1.5 Procesoverzicht	22
3.2	Fosfaatverwijdering	23
	3.2.1 Procesbeschrijving	23
	3.2.2 Ontwerpbasis	23
	3.2.3 Processtructuur	24
	3.2.4 Engineering	25
	3.2.5 Procesoverzicht	27
3.3	Neveneffecten	27
	3.3.1 Opslag	27
	3.3.2 Slibproductie	28
	3.3.3 Sociaal	28
3.4	Economie	28
	3.4.1 Productie van ferritine	28
	3.4.2 Fosfaatverwijdering	29
4	EVALUATIE	30
4.1	Technische haalbaarheid	30
4.2	Economische haalbaarheid	31
4.3	Conclusie	31
	APPENDIX	
A	Verklarende woordenlijst	32
B	Materialen en methode	33
C	Neveneffecten van de ferritineproductie	35

1

INLEIDING

In dit rapport worden beknopt de resultaten van het onderzoek ter bepaling van procesparameters voor de evaluatie van de mogelijkheid tot het toepassen van thermostabiel ferritine voor fosfaatverwijdering in de waterzuivering uiteengezet.

In de inleiding worden de achtergrond en doelstellingen van het project behandeld. In hoofdstuk 2 worden de resultaten van het onderzoek uiteengezet. Daarna wordt in hoofdstuk 3 een conceptueel procesontwerp geschetst. Tot slot zal in hoofdstuk 4 de effectiviteit en toepasbaarheid van het systeem worden besproken. In appendix A is een verklarende woordenlijst opgenomen.

1.1 DOELSTELLING

Bestaande fosfaatverwijderingstechnieken zijn niet in staat ortho-fosfaat concentraties van 0,01 mg/l te halen zonder zeer hoge slibproductie. De doelstelling van dit project is het vaststellen van de procesparameters, het maken van een conceptueel procesontwerp en evalueren van een fosfaatverwijdering die gebruik maakt van thermostabiel recombinant ferritine voor zowel afval- als oppervlaktewater.

1.2 FOSFAATVERWIJDERING

1.2.1 EUTROFIERING EN FOSFAAT

Veelal wordt het optreden van eutrofiëring voornamelijk bepaald door de nutriënten fosfaat en/of stikstof. Aangezien in vele gevallen fosfaat het limiterende nutriënt is en sommige algen ook gebruik kunnen maken van stikstof uit de lucht, wordt met name fosfaatverwijdering gebruikt om eutrofiëring tegen te gaan.

Fosfaat komt in verschillende vormen voor in oppervlaktewater. Het opgeloste fosfaat bestaat voornamelijk uit ortho-fosfaationen (PO_4^{3-}). Het niet opgeloste fosfaat (particulair fosfaat) kan zich bevinden in deeltjes van ijzer(III)fosfaat en in zwevend organisch materiaal.

In metingen van oppervlaktewater wordt meestal uitgegaan van opgelost fosfaat en totaal fosfaat; onderstaande vergelijking geeft de verhouding aan tussen deze gemeten grootheden.

$$P_{\text{totaal}} - P_{\text{opgelost}} = P_{\text{particulair}}$$

In het algemeen ligt de gemiddelde fractie particulier fosfaat tussen de 40 en 80% van het totale fosfaat en is dus een belangrijk deel van het aanwezige fosfaat. Voor ecologische wateren wordt gestreefd naar totaal fosfaat concentratie van ongeveer 0,01 mg/l om eutrofiëring tegen te gaan.

1.2.2 BIOLOGISCHE VERWIJDERING

Buiten de nieuwe vorm van fosfaatverwijdering beschreven in dit rapport zijn er twee verschillende soorten van fosfaatverwijdering bekend. Bij fysisch-chemische methoden wordt fosfaat fysisch-chemisch gebonden en vervolgens neergeslagen. Bij biologische methoden wordt fosfaat vastgelegd in biomassa, welke vervolgens wordt verwijderd.

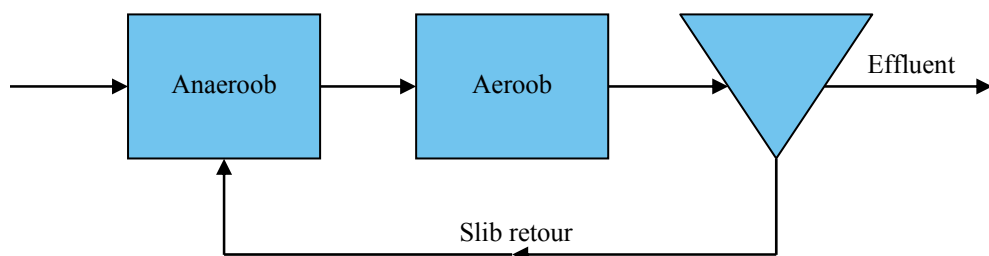
Voor de biologische verwijdering onderscheiden we drie verschillende methoden, te weten helofytenfilters, groene vijvers en het A/O proces.

Helofytenfilters zijn zuiveringsmoerassen met waterbodembewortelende landplanten.

Hierbij wordt fosfaat verwijderd door vastlegging in biomassa (planten en micro-organismen), absorptie aan bodemdeeltjes, en bezinking van het particulier fosfaat. Hierdoor kan er jaarlijks tussen de 20 en 50 kg P/ha worden verwijderd.

Groene vijvers werken door middel van fytoplankton en waterplanten die fosfaat verwijderen door vastlegging. Hierbij wordt voornamelijk ortho-fosfaat verwijderd en is de verwijderingscapaciteit laag door de lage groeisnelheden in Nederland. Deze optie zal dus ook niet verder in dit verslag besproken worden.

FIGUUR 1.1 HET A/O PROCES VOOR BIOLOGISCHE FOSFAATVERWIJDERING



Micro-organismen leggen ook fosfaat vast, aangezien ze het nodig hebben voor intracellulaire energie overdracht. Fosfaat is daardoor een essentiële celcomponent die 1 tot 2% van de totale massa bedraagt. Door een combinatie van anaërobe en aërobe zones, het zogenaamde A/O proces (figuur 1.1), kan 2 tot 4 keer zo veel fosfaat in actief slib worden opgeslagen. Voor de groei van het micro-organisme in een dergelijke methode is wel een koolstof- en energiebron nodig in de vorm van BOD (biochemical oxygen demand).

1.2.2 FYSISCH-CHEMISCHE VERWIJDERING

Fysisch-chemische fosfaatverwijdering is gebaseerd op de chemische vorming van precipitaat en de bezinking hiervan. Hierin wordt onderscheid gemaakt tussen methoden die gebruik maken van metaalzouten of van kalk.

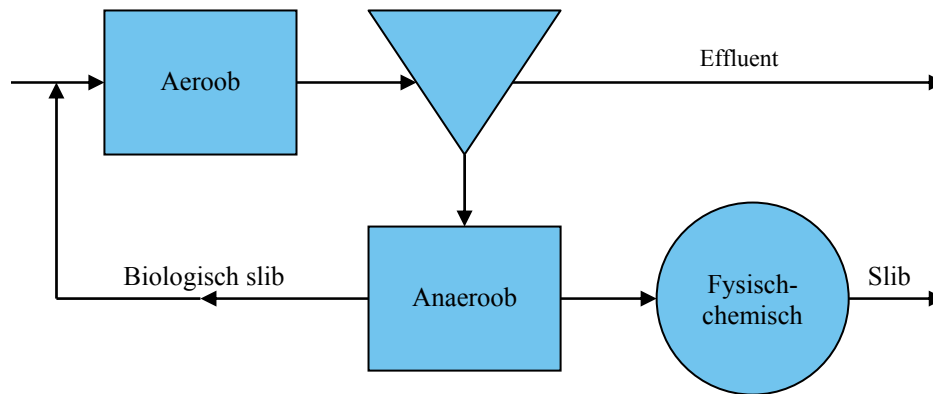
In de methode met metaalzouten vormen zich onoplosbare polymeren van metaalhydroxyl complexen die fosfaat absorberen. Veelal wordt gebruik gemaakt van ijzer- of aluminiumzouten, zoals $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{O}_4$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, AlCl_3 , FeSO_4 of FeCl_3 . Bij dit type zuivering wordt niet alleen fosfaat verwijderd, maar zal door co-precipitatie ook zware metalen en zwevende stof worden weggenomen. Voor een verbeterde vorming van vlokken kan ook een vlokhelpmiddel (zetmeelderivaten of polyelektrolieten) worden toegevoegd of een vlokkingfilter worden gebruikt.

Bij de kalkmethode wordt een precipitaat met Ca gevormd, welke wordt verwijderd na vlokvorming. Bij deze methode zal wel de pH van het effluent gecorrigeerd moeten worden aangezien precipitatie het beste verloopt rond pH 10. Verder zal ook de alkaliteit moeten worden gecorrigeerd, omdat er ook calciumcarbonaat zal precipiteren.

1.2.3 GECOMBINEERDE VERWIJDERING

Er zijn ook combinaties van biologische en fysisch-chemische fosfaatverwijdering mogelijk. Het phostrip proces is een duidelijk voorbeeld van een dergelijke combinatie. In deze methode wordt fosfaat vastgelegd in een aërobe zone en afgescheiden in een anaërobe zone, waarna het fosfaat fysisch-chemisch wordt geprecipiteerd en verwijderd ¹.

FIGUUR 1.2 HET PHOSTRIP PROCES VOOR GECOMBINEERDE FOSFAATVERWIJDERING

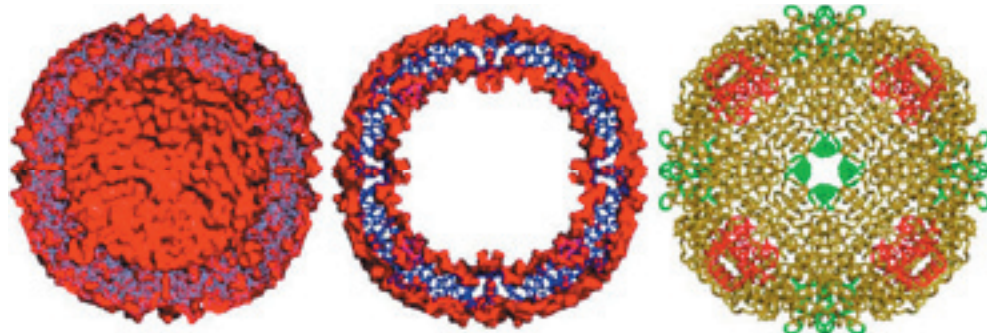


1.3 FERRITINE

1.3.1 STRUCTUUR FERRITINE

Ferritine is een bijna bolvormig eiwit dat van binnen hol is. Het ferritine eiwit heeft een buitendiameter van ongeveer 12 nm en een binnendiameter van omtrent 8 nm (figuur 1.3). Hierdoor omgeeft een eiwitlaag van ongeveer 4 nm een holte met een volume van zo'n 270 nm³. Deze holte is normaal gevuld met water uit de omgevende oplossing, maar kan ook gemineraliseerd ijzer bevatten. Uit theoretische berekeningen blijkt dat de holte 4500 ijzer ionen zou kunnen bevatten, maar in de praktijk blijkt dat er maximaal 2500 tot 3000 ijzer ionen (\pm 32 gewichtsprocent) in ferritine kan worden opgeslagen.

FIGUUR 1.3 STRUCTUUR VAN FERRITINE. LINKS EEN DWARSDOORSNEDE VAN HET EIWIET WAARDOOR ÉÉN HEMISFEER ZICHTBAAR IS; MIDDEN EEN DOORSNEDE ZODAT ENKEL EEN PLAK UIT HET CENTRUM TE ZIEN IS; RECHTS LIJNVOORSTELLING WAARIN DE KANALEN ZICHTBAAR ZIJN GEMAAKT²



Ferritine heeft 6 hydrofobe en 8 hydrofiële kanalen, die de omgeving met de binnenholte verbinden (figuur 1.3). Deze 0,5 nm wijde kanalen bevinden zich op de grensvlakken tussen de subeenheden³. Ferritine bestaat uit 24 subeenheden (figuur 1.4) met ieder een gewicht van ongeveer 20kDa.

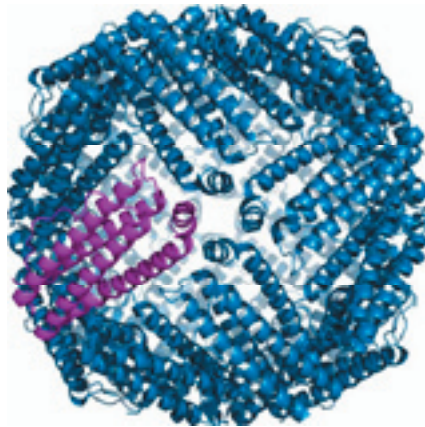
¹ Vesilind en Rooke (2003), Water treatment plant design, IWA Publishing

² Theil et al. (2006) *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11, p803-810

³ Proux-Curry & Chasteen (1995), *Coordination Chemistry Reviews*, 144, p347-368

FIGUUR 1.4

STRUCTUUR VAN FERRITINE, WAARBIJ EEN SUBEENHEID IS UITGELICHT IN HET PAARS



In ferritine van bacteriën, archaea en planten zijn alle 24 subeenheden identiek en het complex bevat dan ook 24 katalytische centra. Zoogdier ferritines bevatten twee soorten subeenheden, de zogenaamde H en L subeenheden⁴. De H subeenheden bevatten een katalytisch centrum, terwijl de L eenheden deze niet bevatten. Er wordt gedacht dat de L subeenheden een functie hebben in het bevorderen van de nucleatie van het ijzeroxide mineraal in de holte. De verhouding tussen de twee subeenheden verschilt van orgaan tot orgaan. Bij amfibieën is zelfs een derde soort subeenheid gevonden, de zogenaamde M subeenheid, maar de specifieke functie hiervan is nog niet opgehelderd.

Bacteriële ferritines hebben maar één enkele soort subeenheid, maar sommige hebben heemgroepen. Ferritines met heemgroepen worden bacterioferritines genoemd en hebben de mogelijkheid om tot 12 heemgroepen per bacterioferritine te binden. De heemgroepen hebben waarschijnlijk een functie bij de ijzeroxidatie en/of reductie.

1.3.2 FUNCTIE VAN FERRITINE

Door zijn twee oxidatietoestanden, te weten Fe^{2+} en Fe^{3+} , en zijn algemene voorkomen is ijzer zeer belangrijk voor allerlei essentiële levensprocessen zoals, zuurstoftransport, nitrificatie, elektronentransport en fotosynthese⁵. Maar sinds de aanwezigheid van grote hoeveelheden zuurstof in de aardse atmosfeer, vanaf ongeveer 2,8 miljard jaar geleden, is ijzer voor organismen moeilijker toegankelijk geworden. Dit komt omdat de stabiele vorm van ijzer (Fe^{3+}) in neutrale, waterige, zuurstofhoudende oplossing een oplosbaarheid heeft van slechts 10^{-18} M. Bovendien veroorzaakt Fe^{2+} in aanwezigheid van zuurstof, door Fenton reacties, voor cellulaire oxidatieve schade.

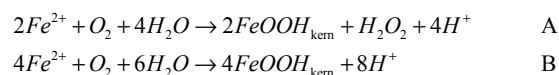
De primaire biologische rol van ferritine is een veilige en reversibele opslag van ijzer, waardoor een effectieve ijzerconcentratie in de cel van ongeveer 10^{-4} M in stand wordt gehouden. In de holte van het ferritine wordt ijzer opgeslagen in de vorm van een ferrihydriet, in tegenstelling tot het lepidocrociet ($\gamma\text{-FeOOH}$) en geothiet ($\alpha\text{-FeOOH}$) precipitaat dat wordt gevormd door auto-oxidatie in een waterige oplossing⁶.

De opslag van ijzer gaat als volgt: (1) opgelost Fe^{2+} reageert met zuurstof op de ferroxidase locatie in een kanaal tot Fe^{3+} , (2) vervolgens gaat het gevormde Fe^{3+} de holte binnen en (3) vormt een kern van ijzerhydroxide. De reactievergelijkingen staan in figuur 1.5. De vergelijking A geeft de reactie bij een zeer lage hoeveelheid ijzer per ferritine ($<100 \text{ Fe/Frt}$), terwijl vergelijking B hoort bij beladingen van meer dan 250 ijzerionen per ferritine.

⁴ Smit (2004) *Critical Reviews in Microbiology*, 30, p173-185

⁵ Carrondo (2003) *The EMBO Journal*, 22, p1959-1968

⁶ Chasteen & Harrison (1999) *Journal of Structural Biology*, 126, p184-194

FIGUUR 1.5 REACTIEVERGELIJKINGEN VOOR IJZERINCORPORATIE ⁷

Door middel van reductie kan het ijzer weer in de vorm van Fe^{2+} uit het ferritine herwonnen worden. De fysiologische reductor hiervoor is onbekend, maar in vitro is de kernreductie met bekende reductoren zoals dithioniet of thioglycolaat aangetoond.

Verder is ferritine in verschillende organisme waarschijnlijk betrokken bij de weerstand tegen cellulaire redox-stress. In anaerobe archaea wordt gedacht dat ferritine een beschermende rol heeft tegen zuurstof.

1.3.3. FOSFAAT IN FERRITINE

In verschillende ferritinekernen is naast ijzerhydroxide ook fosfaat aangetroffen. Hierbij zijn OH^- ionen uit de kern vervangen door ortho-fosfaat ionen (PO_4^{3-}). Voornamelijk hebben ferritines van bacteriële en plantaardige bron een natuurlijk hoog fosfaatgehalte in hun kern. IJzer/fosfaat ratios tussen de 1 en 2 zijn gevonden voor in vitro gevormde kernen. Dit verschil in fosfaatconcentratie heeft meer te maken met intracellulaire omgeving van ferritine, dan structureel andere eiwiteigenschappen.

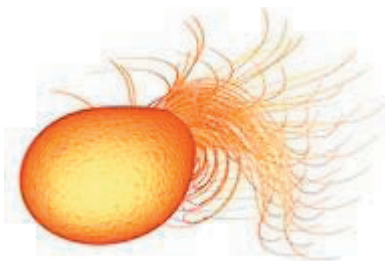
Kernen met een lage hoeveelheid fosfaat zijn kristallijn van structuur, terwijl de ferritinekernen met een hoge concentratie van fosfaat meer amorf zijn. De reductiepotentiaal van fosfaat bevattende kernen is ook negatiever (-400 mV) dan fosfaatvrije kernen (-200 mV)⁸. Toch is de fysiologische functie van de fosfaatincorporatie onbekend wel is het duidelijk dat het de ijzeropname versnelt. Het is verder bekend dat ferritinekernen geen sulfaat of carbonaat bevatten. Bovendien is bekend dat ferritine arseen kan bevatten.

1.3.4. PYROCOCCUS FURIOSUS

In het laboratorium van de enzymologie groep is veel ervaring met *Pyrococcus furiosus* (zie figuur 1.6). *P. furiosus* is een hyperthermofiel zee archaeon, met een optimum groeitemperatuur van 100°C. Dit organisme is geïsoleerd uit een Italiaanse geotherme zee-afzetting en is een strikte anaëroob⁹.

Het zeer thermostabiele ferritine van *P. furiosus* is nog zeer actief tussen de 60 en 100°C. Het eiwit vertoont geen verminderde activiteit na 11 uur incubatie op 100°C (figuur 1.7). Zelfs na 36 minuten autoclaveren is er geen afname in de activiteit meetbaar. De halfwaardetijd, de tijd waarop de activiteit van het eiwit met de helft is afgenomen, is 48 uur voor 100°C en 85 minuten voor 120°C.

FIGUUR 1.6 PYROCOCCUS FURIOSUS



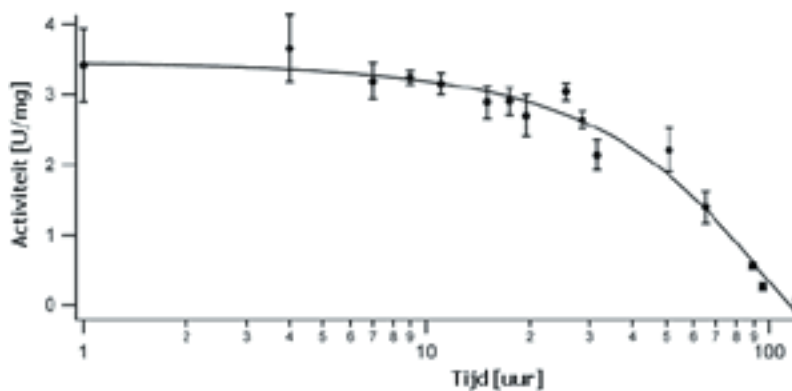
⁷ Lindsay et al. (2003) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621, p57-61

⁸ Andrews (1998) *Advances in Microbial Physiology*, 40, 281-350

⁹ Fiala & Stetter (1986) *Archives of Microbiology*, 145, p56-61

Ferritine van *P. furiosus*, waarvan hier gebruik wordt gemaakt, is een bacterieel ferritine zonder heemgroepen. De fysiologische rol van *P. furiosus* ferritine is nog onbekend, al kan er gespeculeerd worden over een beschermende functie ten opzichte van oxidatie door zuurstof.

FIGUUR 1.7 STABILITEIT VAN *P. FURIOSUS* FERRITINE OP 100°C ¹⁰



Voor de productie van dit thermostabiele ferritine van *P. furiosus* is het gen dat codeert voor dit eiwit in *Escherichia coli* gebracht. Dit maakt het mogelijk om zeer eenvoudig recombinant ferritine van *P. furiosus* in grote hoeveelheden te produceren en makkelijk te zuiveren door zijn thermostabiele eigenschappen.

1.3.5 HISTORISCH PERSPECTIEF

Zoals uit tabel 1.1 blijkt is ferritine voor het eerst ontdekt in varkenslever door Schiedeberg. Het onzuivere preparaat met een eiwit dat ongeveer 6% ijzer bevatte werd ferritine genoemd. Laufferberger isoleerde en zuiverde ferritine uit paardemilt in 1937. Veel onderzoek is gedaan naar dit eiwit, maar vooral sinds recombinant ferritine en mRNA iets meer dan 20 jaar geleden beschikbaar zijn gekomen heeft de kennis over het eiwit een vlucht genomen (figuur 1.8).

TABEL 1.1 TIJDLIJN VAN FERRITINE EN *PYROCOCCLUS FURIOSUS*

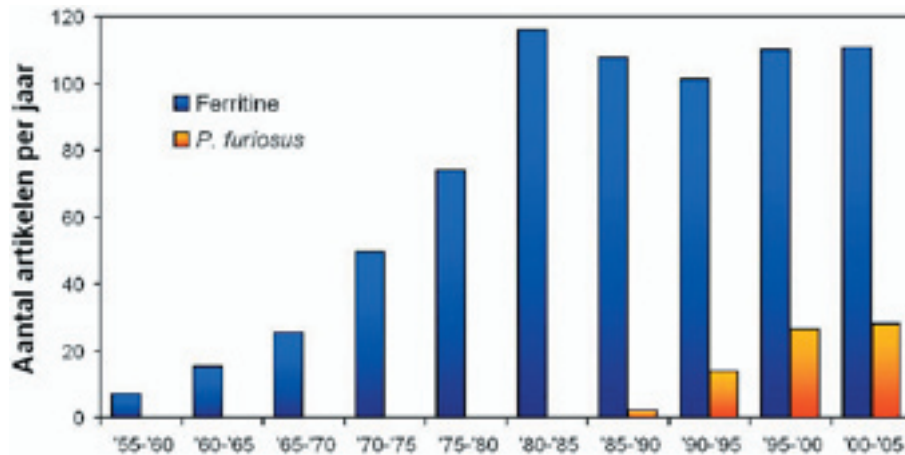
Jaar	Gebeurtenis
1894	Ontdekking van zoogdier ferritine.
1937	Eerste zuivering van ferritine.
1944	Ontdekking van fosfaat als kernconstituent.
1963	Ontdekking van plant ferritine.
1971	Eerste ferritine uit een schimmel.
1979	Ontdekking van bacteriële ferritine. *
1986	Ontdekking van <i>Pyrococcus furiosus</i> .
1989	Klonering van het eerste bacterioferritine gen.
1992	Eerste bacteriële ferritine van een strikte anaerob.
2005	Klonering van <i>P. furiosus</i> ferritine gen.

* Al in 1973 geïsoleerd, maar beschreven als cytochroom

De zee archaeon *P. furiosus* is pas in 1986 ontdekt door Fiala en Stetter. Met name na de opheldering van het genoom is er een grote interesse in het organisme ontstaan door zijn zeer thermofiel karakter.

¹⁰ Tatur et al. (2005) *Extremophiles*, 10, p139-148

FIGUUR 1.8 JAARLIJKS GEPUBLICEERDE WETENSCHAPPELIJKE ARTIKELEN MET FERRITINE OF PYROCOCCLUS FURIOSUS IN HUN TITEL



1.4 ENZYMTOEPASSINGEN

1.4.1 APPLICATIES MET ENZYMEN

Enzymtechnologie is zeer interessant, aangezien enzymen vele reacties selectief en efficiënt kunnen katalyseren. De laatste decennia is er dus ook veel aandacht voor dit technologieveld. Enzymen worden op zeer grote schaal toegepast voor wasproducten, zetmeel verwerking, zoetstofproductie, en verkrijgen van enantiomeer zuivere producten¹¹.

De meeste industrieel toegepaste enzymen worden eenmalig gebruikt en extracellulair geproduceerd, omdat dit laatste de kosten van verwerking zeer verlaagt.

1.4.2 ENZYMEN IN DE WATERZUIVERING

Traditioneel zorgen waterzuiveringsprocessen voor het verlagen van grove indicatoren van vervuiling, zoals BOD (biochemical oxygen demand) en TOC (total organic carbon). Hierdoor hebben deze traditionele biologische zuiveringsmethoden vaak problemen met het consistent verwijderen van specifieke stoffen tot op lage concentraties. Heden ten dage ligt juist de nadruk op het specifiek verwijderen van de vervuilende componenten tot op lage concentraties.

De fysisch-chemische behandelingsmethoden die recent zijn ontwikkeld zijn vaak in staat de vereiste lage niveaus te bereiken, maar zijn over het algemeen niet zeer specifiek. Hierdoor zijn dit soort processen vooral economisch aantrekkelijk als additionele eindstap in een totaalproces.

Enzymen zijn juist een manier om specifiek een bepaalde component en gerelateerde componenten te verwijderen en hierdoor kunnen de mogelijk benodigde reactanten met een zeer hoge stoichiometrische efficiëntie worden gebruikt. Voor het gebruik van enzymen voor een technische en economische haalbare waterzuiveringstoepassing moet worden voldaan aan verschillende voorwaarden, zie tabel 1.2.

¹¹ Buchholz et al. (2005) Biocatalysts and enzym technology, Wiley-VCH

TABEL 1.2

EISEN VOOR EEN ENZYMATISCHE WATERZUIVERINGSTOEPASSING.

Voorwaarde	
1.	Het geproduceerde product moet minder toxisch of toegankelijker zijn.
2.	Het enzym moet specifiek genoeg zijn voor de te verwijderen component(en).
3.	Het enzym moet genoeg activiteit vertonen onder de omstandigheden.
4.	De te gebruiken reactor moet eenvoudig zijn.
5.	Het enzym moet redelijk stabiel zijn onder de reactiecondities.
6.	Het enzym moet in grote hoeveelheid en tegen lage kosten beschikbaar zijn.
7.	Het enzym mag niet gebruik maken van kostbare cofactoren.

Enzymen zoals cellulasen, cyanidasen, esterases, laccasen en peroxidasen zouden toepasbaar kunnen zijn in waterzuiveringsapplicaties¹². Er is helaas weinig ervaring buiten labschaal en zeer kleine testfaciliteiten.

¹² Karam en Nicell (1997) *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69, p141-153

2

ONDERZOEKSRESULTATEN

In dit hoofdstuk zullen de resultaten van het onderzoek uiteen worden gezet. Het laboratoriumonderzoek heeft zich erop gericht om verscheidene procesparameters te verkrijgen die nodig zijn voor een conceptueel procesontwerp. Hiertoe is eerst de beladingscapaciteit van ferritine onderzocht. Verder is gekeken naar de kinetiek van deze belading en eventuele effecten van externe factoren op deze kinetiek, zoals pH temperatuur en zouten. Tot slot is de regeneratie en immobilisatie van ferritine onderzocht. Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van synthetisch afvalwater. De gebruikte materialen en methode zijn in het appendix te vinden.

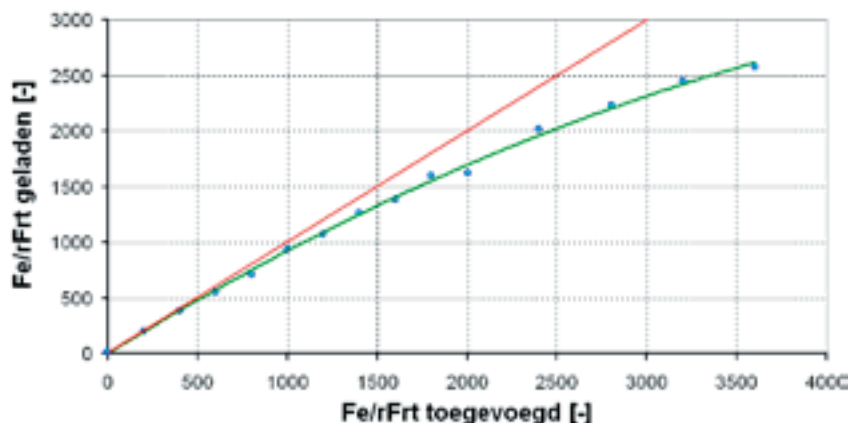
2.1 BELADING VAN FERRITINE

2.1.1 IJZERBELADING

Aangezien de fosfaatbelading van recombinant ferritine (rFrt) gekoppeld is aan de belading van ferritine met ijzer, is de incorporatie van ijzer ten eerste onderzocht.

Figuur 2.1 laat zien hoeveel ijzer er per ferritine in de kern wordt geladen bij een bepaalde hoeveelheid toegevoegde ijzer(II) in aërobe condities. De trendlijn (groen) buigt langzaam af van de maximale incorporatielijn (rood). Dit geeft aan dat er steeds meer ijzer moet worden toegevoegd om dezelfde verhoging van incorporatie te krijgen. Bij een toevoeging van minder dan 600 Fe/rFrt wordt meer dan 95% van het ijzer in ferritine geladen, terwijl er bij een toevoeging van 3200 Fe/rFrt nog geen 75% wordt geïncorporeerd.

FIGUUR 2.1 IJZERBELADING VAN FERRITINE OP PH=7,0

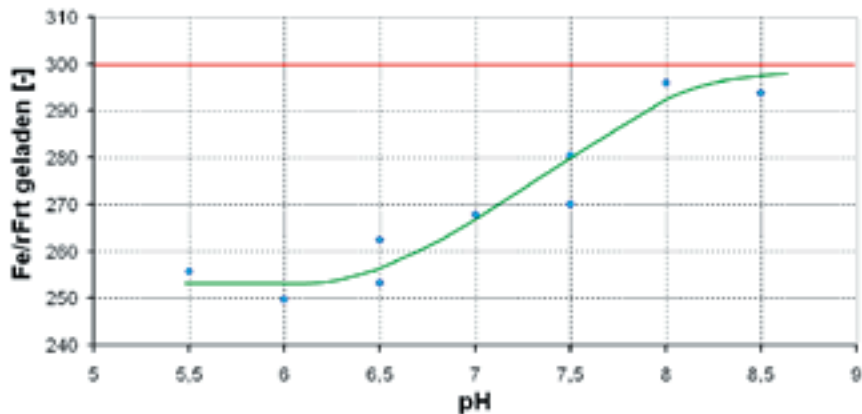


Het niet geladen ijzer(II) auto-oxideert met de aanwezige zuurstof en zal vervolgens als mineraal neerslaan. Bij een toevoeging van 3600 Fe/rFrt slaat een deel van de geladen ferritine samen met het auto-geoxideerde ijzer neer en is dan dus onbruikbaar. Het zo neergeslagen ferritine verliest niet zijn kern. Een maximale belading van 2700 Fe/rFrt is gevonden, welke veel lager is dan het theoretische maximum van 4500 Fe/rFrt. Toch correspondeert deze waarde goed met ferritines van ander organismen, zoals beschreven in de literatuur

Volgens de reactievergelijkingen uit hoofdstuk 1 spelen protonen een rol bij het incorporeren van ijzer in ferritine. Bovendien zijn de meeste enzymen pH afhankelijk en daarom is gekeken naar het effect van pH op de ijzerbelading.

Uit figuur 2.2 is duidelijk op te maken, dat er een effect is van de pH op de hoeveelheid ijzer dat geïncorporeerd wordt in ferritine. Boven pH=6 neemt de belading toe tot er na pH=8 een verzadiging plaats vindt.

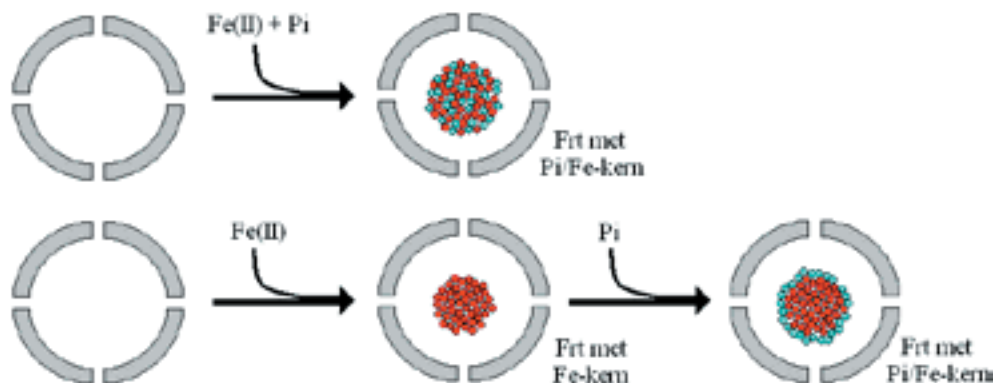
FIGUUR 2.2 PH-EFFECT OP DE IJZERBELADING VAN FERRITINE. AAN 1,0 μ M FERRITINE WERD 0,3 MM IJZER(II) TOEGEVOEGD, DE RODE LIJN GEEFT HET MAXIMUM VAN 300 FE/RFRT AAN



2.1.2 FOSFAATBELADING

Voor het laden van fosfaat zijn er praktisch twee mogelijkheden. Ten eerst kan fosfaat simultaan geladen worden met ijzer. Hierbij wordt ferritine tegelijkertijd blootgesteld aan in oplossing zijnde fosfaat en ijzer(II) onder aërobe condities. Dit leidt tot een gelijktijdige incorporatie van fosfaat en ijzer en zorgt voor een amorfe kernstructuur (zie figuur 2.3).

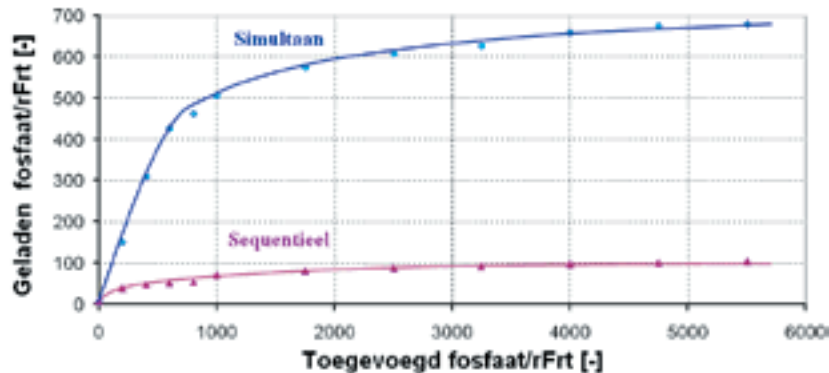
FIGUUR 2.3 SIMULTANE EN SEQUENTIËLE FOSFAATBINDING IN FERRITINE (FRT)



Ten tweede kan de belading van fosfaat en ijzer sequentieel worden gedaan. Hierbij wordt ferritine eerst blootgesteld aan ijzer(II) onder aerobe condities, waardoor het ijzer wordt geïncorporeerd als mineraal in de kern. Daarna wordt de ferritine met minerale kern blootgesteld aan fosfaat. Dit fosfaat gaat dan een binding aan met de ijzerkern, waardoor er een fosfaatlaag over de ijzerhydroxide-kern heen ontstaat, zie figuur 2.3.

In principe zou er meer fosfaat gebonden kunnen worden door simultane belading terwijl bij sequentiële belading het fosfaat makkelijker te verwijderen is. De resultaten met ferritine zijn weergegeven in figuur 2.4.

FIGUUR 2.4 FOSFAATBELADING MET 1,0 MM FE(II) VAN 1,0 μ M FERRITINE OP PH=7,0

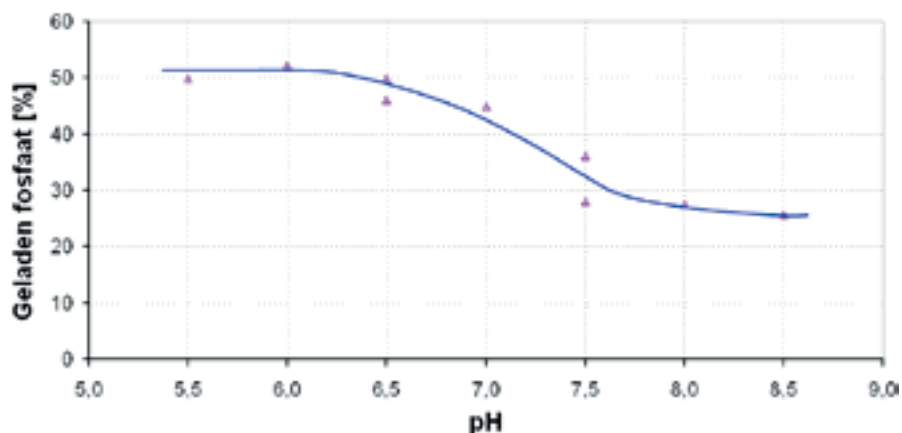


Uit figuur 2.4 is direct duidelijk dat simultane belading een groter deel van de toegevoegde hoeveelheid fosfaat incorporeert dan bij sequentiële belading. De maximale belading bij een meer dan 5voudige overmaat van fosfaat voor simultane en sequentiële incorporatie is op molaire basis respectievelijk 0,70 en 0,14 ortho-fosfaat per ijzer.

Bij een lage toevoeging van fosfaat kan er bij simultane belading meer dan 75% van het toegevoegde fosfaat in de kern van het ferritine worden vastgelegd. Dit houdt dus in dat voor een hoog fosfaatverwijderingsrendement er op molaire basis een overmaat ijzer(II) moet worden toegevoegd.

Verder blijkt uit de metingen van de geladen hoeveelheid ijzer dat er ongeveer 20% minder ijzer wordt geïncorporeerd bij sequentiële belading in vergelijking tot simultane belading. Ook het effect van pH op de fosfaatbelading is onderzocht. Het blijkt (zie figuur 2.5) dat alhoewel er meer ijzerbelading is bij hogere pH waarde, er juist minder fosfaat wordt geladen. De resulterende ratio tussen ijzer en fosfaat zal dus hoger zijn in een zuur milieu, waardoor het voor een fosfaatverwijdering interessant is om bij wat verlaagde pH te werken.

FIGUUR 2.5 PH-EFFECT OP DE FOSFAATBELADING. BIJ VERSCHILLENDE PHS WERD 0,5 MM IJZER(II) EN 0,5 MM FOSFAAT TOEGEVOEGD AAN 0,5 μ M FERRITINE



2.2 KINETIEK VAN FERRITINE

2.2.1 IJZERBELADINGSKINETIEK

De fosfaatincorporatie is gekoppeld aan de ijzerbelading en hierom is de reactiekinetiek van ijzeroxidatie met ferritine onderzocht. Zoals al eerder door Tatur en collegae¹³ vastgesteld, volgt ferritine niet de veel gebruikte Michaelis-Menten kinetiek, maar blijkt dat het beter te beschrijven is met de Hill-vergelijking.

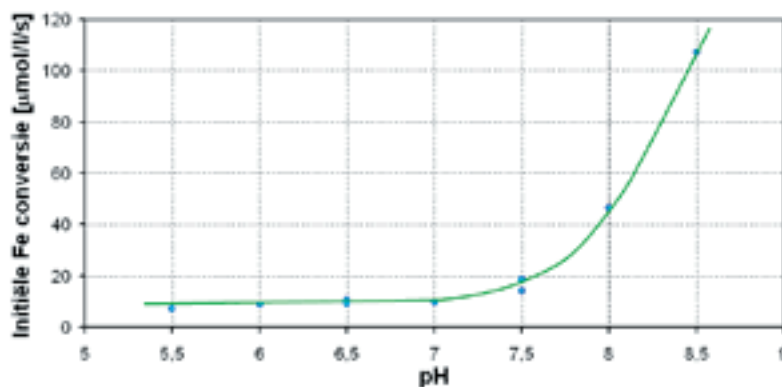
$$\text{Hill vergelijking: } V = V_{\max} \cdot S^n \cdot \left(S^n + K_{1/2}^n \right)^{-1}$$

De fit aan de Hill-vergelijking, met V als de specifieke activiteit, S de substraat concentratie, n de Hill-coëfficiënt en $K_{1/2}$ concentratie op de helft van de maximale activiteit geeft $V_{\max} = 25 \mu\text{mol ijzer/mg eiwit/min}$, $K_{1/2} = 5 \text{ mM ijzer(II)}$ en $n=2$.

Net als in het vorige hoofdstuk is er ook bij de kinetiek gekeken naar het effect van de pH. Uit figuur 2.6 is op te maken dat vooral boven $\text{pH}=7,0$ de initiële conversiesnelheid sterk toeneemt. De conversie neemt van $\text{pH}=7,0$ tot $\text{pH}=8,5$ toe met een factor 11. Daar staat tegenover dat van $\text{pH}=5,5$ tot $\text{pH}=7,0$ de conversie nauwelijks toeneemt (factor 1,3).

Ook de auto-oxidatie van ijzer(II) in een ferritinevrije oplossing neemt toe met de pH. Als de initiële beladingsnelheid van ferritine vergeleken wordt met de auto-oxidatie blijkt dat de ratio afneemt van 142 tot 3,6 over het pH traject van 5,5 naar 8,5. Met andere woorden de beladingsnelheid van ferritine blijft groter dan die van de auto-oxidatiesnelheid, maar in verhouding neemt de auto-oxidatiesnelheid sneller toe met toenemende pH.

FIGUUR 2.6 EFFECT VAN DE PH OP DE BELADINGSNELHEID GEMETEN OP KAMERTEMPERATUUR BIJ EEN FERRITINECONCENTRATIE VAN $1,0 \mu\text{M}$



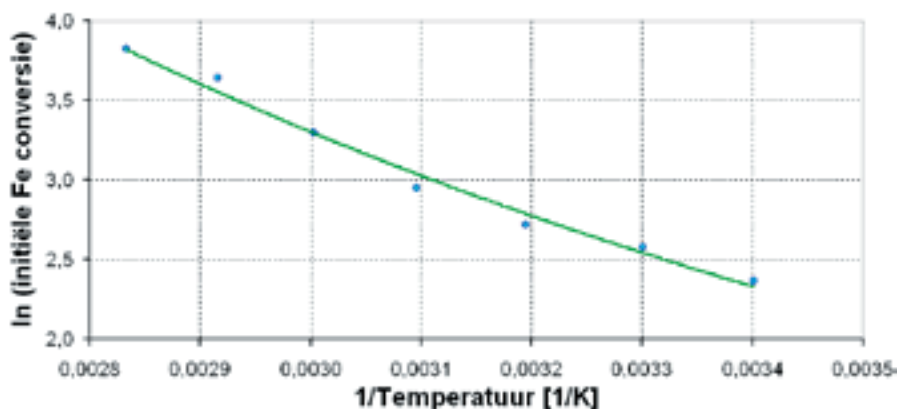
Aangezien ferritine afkomstig is uit een hyperthermofiel organisme is ook gekeken naar het effect van de temperatuur op de ijzerbeladingsnelheid. Zoals te zien is in figuur 2.7 neemt de conversiesnelheid met meer dan een factor 4 toe van 20 tot 80°C . Voor de modellering van het temperatuurseffect op de reactiesnelheid (V) wordt veel gebruik gemaakt van de Arrhenius vergelijking.

$$\text{Arrhenius vergelijking: } V = A \cdot \left(\frac{E_a}{R \cdot T} \right)$$

In figuur 2.7 is een "Arrhenius-plot" gemaakt en de lineaire relatie laat zien dat het temperatuurseffect over de range van 20 tot 80°C de theorie volgt en dus zo gemodelleerd kan worden voor het procesontwerp.

¹³ Tatur et al. (2005) *Extremophiles* 10, p139-148

FIGUUR 2.7 ARHENIUS PLOT VOOR DE IJZERBELADING VAN FERRITINE



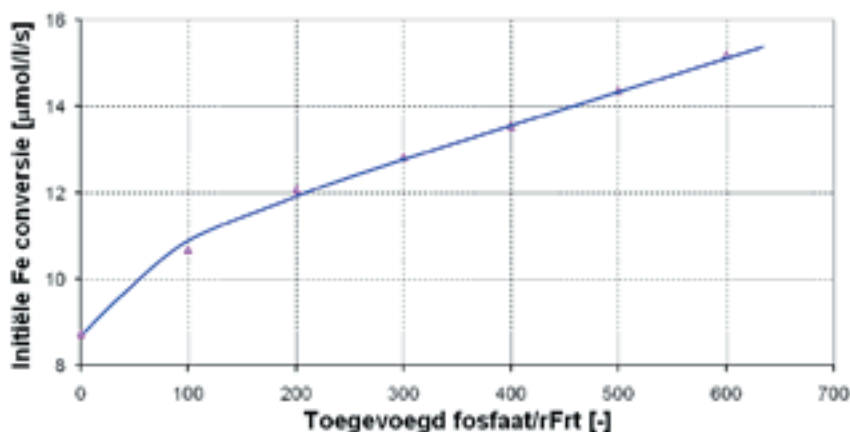
Door experimentele beperkingen is niet gekeken naar procestemperaturen van 5 tot 20°C. Aangezien het temperatuureffect het model volgt voor een grote temperatuur range kan het veilig worden geëxtrapoleerd naar deze lagere procestemperaturen.

2.2.2 FOSFAATBELADINGSKINETIEK

De beladingskinetiek van de combinatie ijzer en fosfaat is onderzocht. Voor de sequentiële incorporatie van ijzer en fosfaat zijn geen kinetische studies gedaan, aangezien er geen foto-spectroscopische methode beschikbaar is.

Uit de kinetische studie voor de simultane belading van ijzer en fosfaat bleek dat de toevoeging van fosfaat de beladingsnelheid positief beïnvloedt (zie figuur 2.8). Bij een toevoeging van een viervoudige overmaat, ten opzichte van ijzer, steeg de initiële ijzerincorporatiesnelheid naar meer dan het dubbele.

FIGUUR 2.8 EFFECT VAN FOSFAAT OP DE BELADINGSNELHEID OP 250C EN PH=7,0 MET 300 µM FE(II) EN 1,0 µM FERRITINE



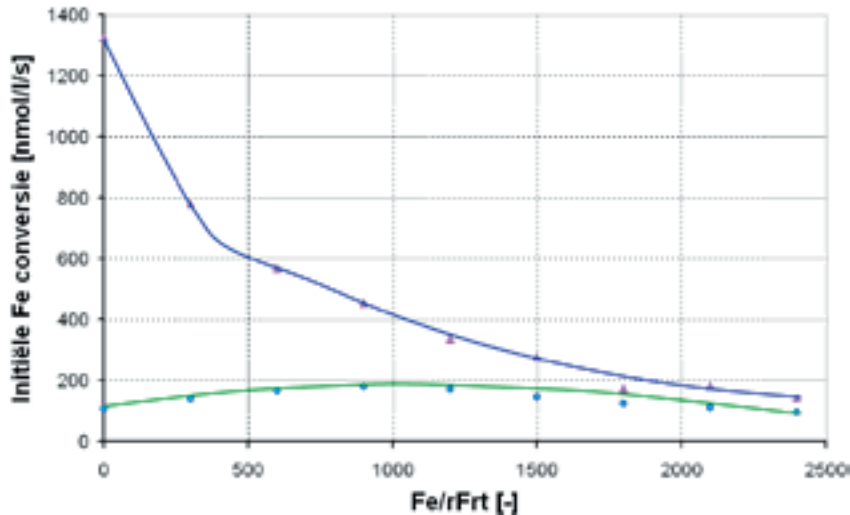
2.2.3 ANDERE KINETISCHE EFFECTEN

Uit de literatuur blijkt dat de ijzerincorporatiesnelheid afhankelijk is van de hoeveelheid ijzer dat al in de kern is opgeslagen. Dit hebben we met succes kunnen verifiëren voor ons ferritine (figuur 2.9). Bij een belading van ongeveer 1000 mol ijzer per mol ferritine is er een maximum in de conversiesnelheid die 66% hoger ligt dan die van een bijna leeg ferritine.

Ook in aanwezigheid van fosfaat is dit kern-effect onderzocht en het blijkt dat door de toevoeging van fosfaat er geen maximum meer ontstaat. De ijzerincorporatiesnelheid neemt juist systematisch af met de vergroting van de kern. Rond de maximale vulling benaderen de snelheden van met en zonder fosfaat elkaar zeer dicht. Met ander woorden het effect van

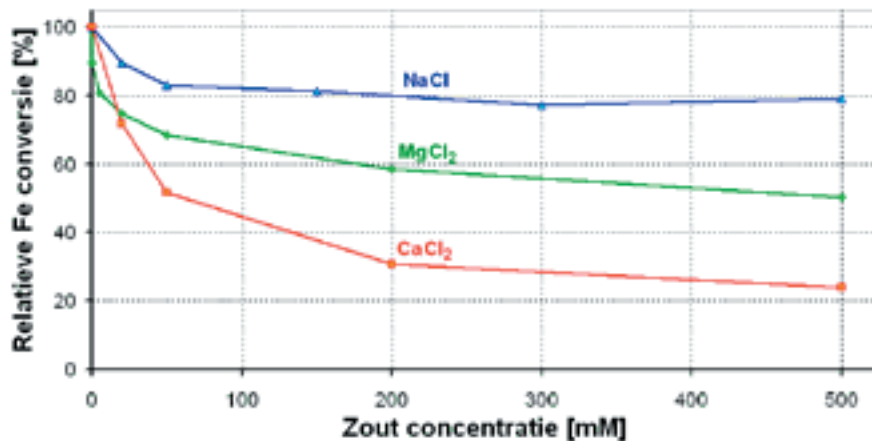
fosfaat op de conversiesnelheid zoals boven beschreven is dus sterk afhankelijk van de ijzerbelading.

FIGUUR 2.9 EFFECT VAN DE HOEVEELHEID IJZER IN DE KERN OP DE BELADINGSNELHEID. DE ONDERSTE CURVE (GROEN) IS ZONDER FOSFAAT, TERWIJL DE BOVENSTE CURVE (BLAUW) IS GEMETEN MET EEN 10X OVERMAAT VAN FOSFAAT TEN OPZICHTE VAN IJZER OP 25°C EN PH=7,0 MET 150 NM FERRITINE



Aangezien er in de literatuur voor eiwitoplossingen veel gebruikt wordt gemaakt van zouten, voornamelijk voor eiwitlading of nabootsing van de normale intracellulaire omgeving van het eiwit, is er gekeken of de zoutconcentratie een effect heeft op de activiteit van het ferritine.

FIGUUR 2.10 EFFECT VAN VERSCHILLENDE ZOUTEN OP DE BELADINGSNELHEID OP 25°C EN PH=7,0 MET 300 µM FE(II) EN 1,0 µM FERRITINE. DE IJZERCONVERSIE ZONDER TOEVOEGING VAN ZOUT IS OP 100% GESTELD.



Er is een effect van de zoutconcentratie (zie figuur 2.10) op de ijzerbeladingsnelheid van ferritine. Door een toevoeging van al 50 mM zout neemt de initiële ijzer(II) conversiesnelheid af. Er zijn ook andere metaalionen, zoals Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Tb^{3+} en Zn^{2+} , bekend die binden aan het ferroxidase centrum en zo verlagen ze de ijzeroxidatiesnelheid van ferritine. Hiervan is verder bekend dat Zn^{2+} het sterkste bindt en uit onze metingen blijkt dat al een concentratie van 100 µM een reductie van 83% geeft in de ijzer(II)conversie.

Ook de auto-oxidatie van ijzer(II) is afhankelijk van de hoeveelheid zout in de oplossing. Door toevoeging neemt ook de auto-oxidatiesnelheid af. Verder is gevonden dat de gebruikte buffer een effect kan hebben op de incorporatiesnelheden. Buffers als TRIS en BIS-TRIS die metaal-ionen kunnen complexeren, verlagen de ijzer(II) conversie, terwijl een 20 mM carbonaat buffer (HCO_3^-) juist een verhoging van ongeveer 20% in de reactiesnelheid geeft.

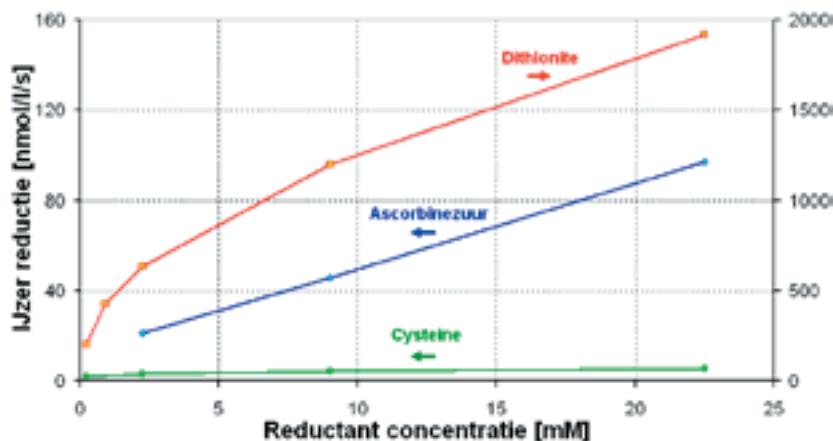
2.3 REGENERATIE

Om ferritine te regenereren moet het ijzer worden gereduceerd, waarbij ook het fosfaat weer vrij komt. Vanuit de literatuur zijn verschillende reductanten bekend waaronder: ascorbinezuur, cysteine, flavinen (FADH_2 , FMNH_2 , riboflavine), glutathion, methylviologen, sulfhydrylen (thioglycolaat, dithioniet, dihydroliopaat), en superoxide.

Voor ferritine zijn de reductanten dithioniet, ascorbinezuur en cysteine getest (zie figuur 2.11). Hieruit blijkt dat reductie met cysteine en ascorbinezuur zeer langzaam is in verhouding tot de reductie met dithioniet.

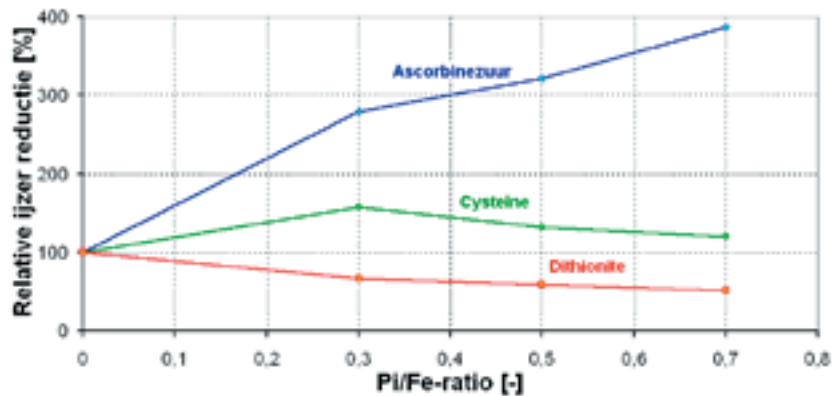
De omkering van de biomineralisatie van ferritine is langzamer dan de incorporatie en alleen met dithioniet kan er door gebruik te maken van een grote overmaat, een ijzerreductiesnelheid worden behaald die in de orde van grootte van de ijzeroxidatiesnelheid ligt.

FIGUUR 2.11 REDUCTIE VAN DE IJZERHYDROXIDEKERN VAN 150NM FERRITINE DOOR VERSCHILLENDE REDUCTANTEN BIJ PH=7,0



Aangezien de ijzerincorporatiesnelheid beïnvloed wordt door de aanwezigheid van ferritine, zal ook de reductiesnelheid afhankelijk zijn van de hoeveelheid ijzer in de ferritine kern. In figuur 2.12 is duidelijk af te lezen dat de reductie met ascorbinezuur en cysteine positief worden beïnvloed door aanwezigheid van fosfaat. Daarentegen wordt de reductiesnelheid met dithionite tot wel 50% verlaagd.

FIGUUR 2.12 EFFECT VAN DE FOSFAAT/IJZER RATIO IN DE FERRITINEKERN OP DE IJZERREDUCTIESNELHEID MET EEN FERRITINECONCENTRATIE VAN 150 NM BIJ PH=7,0. DE IJZERREDUCTIE VAN EEN FOSFAATLOZE KERN IS OP 100% GESTELD



Voor het verwijderen van ijzer en fosfaat uit de kern is ook gekeken naar een pH verandering. Het effect van pH verandering tussen de 5,5 en 8,5 op een al gevormde kern in ferritine in aërobe condities is zeer gering. Minder dan 5% fosfaat en 2% ijzer is te mobiliseren door een pH verandering.

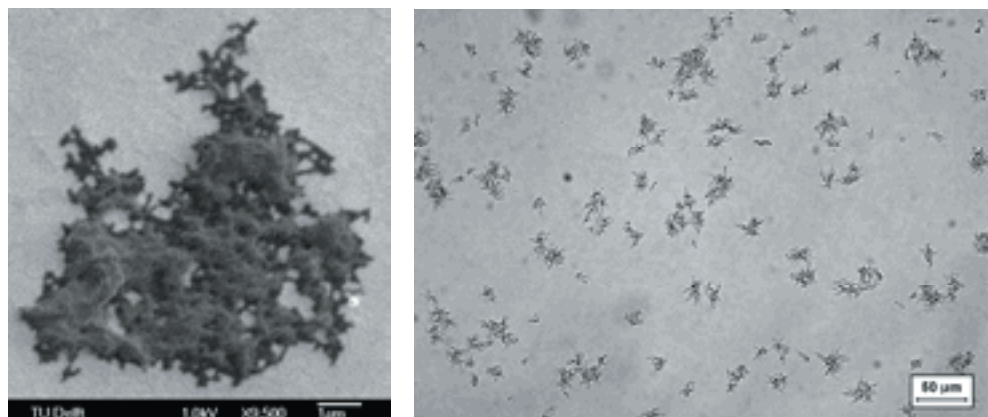
2.4 IMMOBILISATIE

Voor het gebruik van ferritine als een fosfaat filter ligt het voor de hand om het eiwit te immobiliseren. Als immobilisatietechniek is gekeken naar het vormen van CLEAs (cross-linked enzyme aggregates), door middel van glutaraldehyde.

In figuur 2.13 zijn de gevormde CLEA deeltjes te zien. Door middel van het veranderen van de reactiecondities, zoals reactantconcentratie en de roersnelheid, kan de gemiddelde grootte van de CLEA worden beïnvloed.

De activiteit van geïmmobiliseerd ferritine is gelijk aan die van vrij ferritine, als deeltjes worden gevormd waar geen massatransportlimitaties bij optreden. Er is dus geen sprake van inactivering van de actieve centra door de CLEA formatie. En het is dus op deze manier technisch mogelijk om het fosfaatbeladen ferritine op een eenvoudige manier weer uit het behandelde water te halen.

FIGUUR 2.13 RECOMBINANT FERRITINE CLEAS. BEELDEN GEMAAKT MET BEHULP VAN SEM (LINKS) EN EEN LICHTMICROSCOOP (RECHTS)



2.5 STABILITEIT VAN FERRITINE

Ferritine is uit zichzelf een zeer stabiel enzym. Het is stabiel in oplossingen tot 6M ureum, verder vertoont het eiwit geen verminderde activiteit na 11 uur incubatie op 100°C. Zelfs na 36 minuten autoclaveren is er geen afname in de activiteit meetbaar.

Verder is ferritine bestand tegen het herhaaldelijk bevroren en ontdooien, waardoor opslag ook kan geschieden bij bijvoorbeeld -20°C. Bij deze temperaturen kan ferritine in onsteriele omstandigheden voor meerdere maanden worden bewaard.

Onder de procescondities van pH=7, een temperatuur van 5 tot 20°C in een carbonaat buffer is ferritine stabiel. In de praktijk zijn waterzuiveringsinstallaties voor afval zowel als oppervlaktewater verre van steriel. Door deze onsteriliteit wordt ferritine bedreigd door microbiële groei. Na ongeveer 5 tot 7 dagen zal ferritine zodanig aangetast zijn door microbiële degradatie dat het meetbaar functionaliteit zal verliezen.

3

CONCEPTUEEL PROCESONTWERP

Om het potentieel van een ferritine fosfaatverwijdering te beoordelen is een conceptueel procesontwerp gemaakt uitgaande van de voorwaarde voor een enzymatische waterzuiveringstoepassing. Deze toepassing kan zowel als nabehandeling van een afvalwaterzuiveringsinstallatie als voor oppervlaktewater behandeling gebruikt worden.

Het ferritine enzym vertoont activiteit in de temperatuur range van 5 tot 20°C en rond pH=7,0 in een carbonaat buffer. Verder is het redelijk stabiel onder de procesomstandigheden, al is het gevoelig voor microbiële degradatie. Het kan in principe in een eenvoudige reactor gebruikt worden en voldoet zo aan drie van de zeven voorwaarden (zie tabel 1.2).

Ook maakt ferritine geen gebruik van kostbare co-factoren, al kunnen het benodigde ijzer(II)zout en de oxidant (zuurstof) gezien worden als co-factoren. De oxidant is vrijelijk toegankelijk en de benodigde concentratie relatief laag. Als er geen anaërobe processtap voor de fosfaatverwijderingsstap met ferritine zit, zal er genoeg zuurstof in het water aanwezig zijn voor complete oxidatie van het benodigde ijzer. Het ijzer(II)zout is in bulk verkrijgbaar en is niet kostbaar, al moet aangemerkt worden dat ijzer(III)zouten die veel gebruikt worden in de fysisch-chemische verwijdering goedkoper zijn.

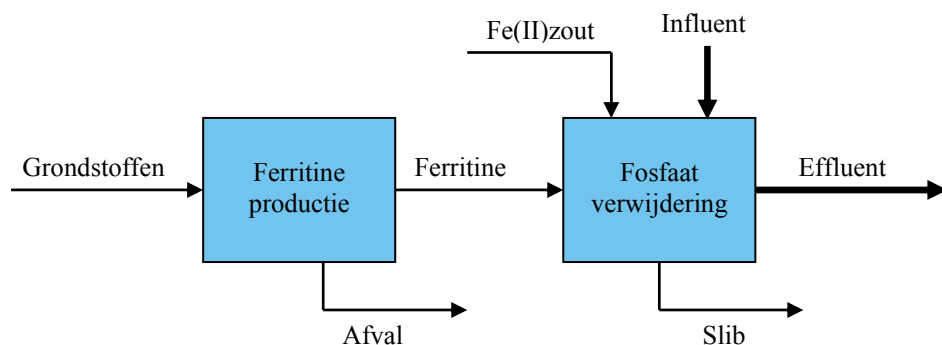
Ferritine is redelijk specifiek voor fosfaat, hoewel ook andere oxoanionen (bijvoorbeeld arsenaat, molybdaat en vanadaat) in de kern kunnen worden ingebouwd.

Een andere voorwaarde is dat het product minder toxisch of toegankelijker moet zijn dan de uitgangsstof. Hoewel ijzer(III)hydroxide met fosfaat zeer slecht oplosbaar is zorgt de eiwitmantel van ferritine ervoor dat het geheel nog steeds zeer goed oplosbaar is. Hierdoor is het product nog minder toxisch, nog beter toegankelijk geworden. Om de toegankelijkheid te vergroten zal dus het ferritine geïmmobiliseerd moeten worden.

Recombinant *P. furiosus* ferritine is niet tegen lage kosten in grote hoeveelheden beschikbaar. Hiertoe zal dus een productiefaciliteit moeten worden opgezet.

Concluderend kan alleen aan de voorwaarden worden voldaan als ferritine wordt geïmmobiliseerd en het eiwit zelf op grote schaal wordt geproduceerd. Een degelijk proces zal er uitzien zoals schematisch in figuur 3.1 is aangegeven.

FIGUUR 3.1 FOSFAATWATERZUIVERINGPROCES MET BEHULP VAN FERRITINE



3.1 PRODUCTIE VAN FERRITINE

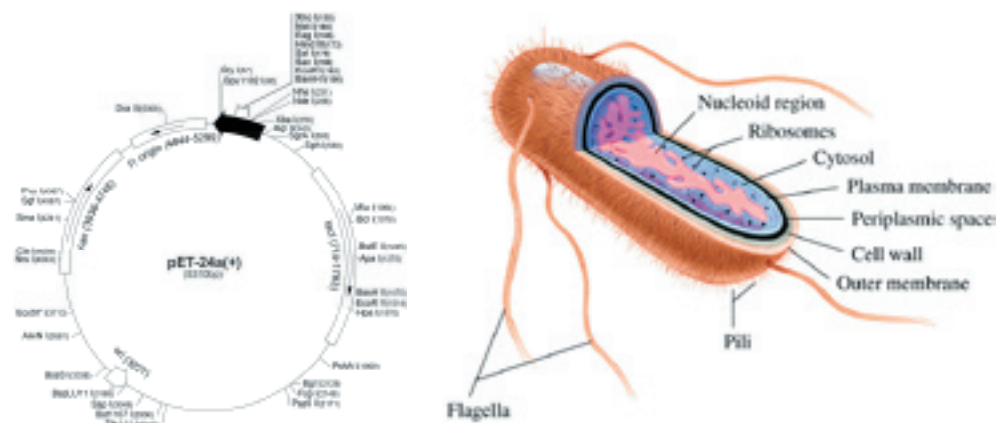
3.1.1 PROCESBESCHRIJVING

Aangezien recombinant *P. furiosus* ferritine (rFrt) niet commercieel op grote schaal beschikbaar is, zal de enzymproductie ontworpen worden om inzicht te krijgen in de kosten. Voor een bruikbare toepassing van ferritine zal het eiwit moeten worden geïmmobiliseerd. Het doel is dus het ontwerpen van een ferritine productiefaciliteit tegen zo laag mogelijke kosten die voldoende geïmmobiliseerd ferritine (± 40 ton/jaar) produceert voor een ferritine fosfaatverwijdering die 10.000 m³/d behandelt.

3.1.2 ONTWERPBASIS

Voor de productie van het thermostabiele ferritine van *Pyrococcus furiosus* is een BL21-CodonPlus (DE3)-RIL *Escherichia coli* beschikbaar die een pET24a(+) vector heeft waarop het benodigde gen zich bevindt (figuur 3.2). De vector met T7 promotor, Lac operator en IPTG (ispropylthiogalactoside) inductor systeem stelt ons in staat ferritine te produceren tot ongeveer 25 gewichtsprocent¹⁴. Verder geeft de vector antibioticumresistentie, zodat er selectieve groei kan plaatsvinden.

FIGUUR 3.2 DE GEBRUIKTE PET24A(+) VECTOR EN ESCHERICHIA COLI



Voor productie van ferritine wordt gebruik gemaakt van een rijk groeimedium, waarin na initiële groei door middel van IPTG inductie de productie van recombinant ferritine wordt gestart. De productie vindt plaats op 37°C en pH=7,0. De kinetiek zal gemodelleerd worden met het model van Monod.

De productie van recombinant ferritine in *E. coli* is intracellulair, zodat de celwand gebroken zal moeten worden voordat het eiwit verder gezuiverd kan worden. *E. coli* bevat zelf geen thermofiele eiwitten, waardoor het ferritine eenvoudig (>95%) in één verhittingstap gezuiverd wordt. Door deze verhittingstap denatureren alle *E. coli* eiwitten en kunnen op dichtheid en/of oplosbaarheid worden afgescheiden.

Voor de rest zal gebruik worden gemaakt van de beschikbare kennis op het gebied van productie van recombinant enzymen in bacteriën.

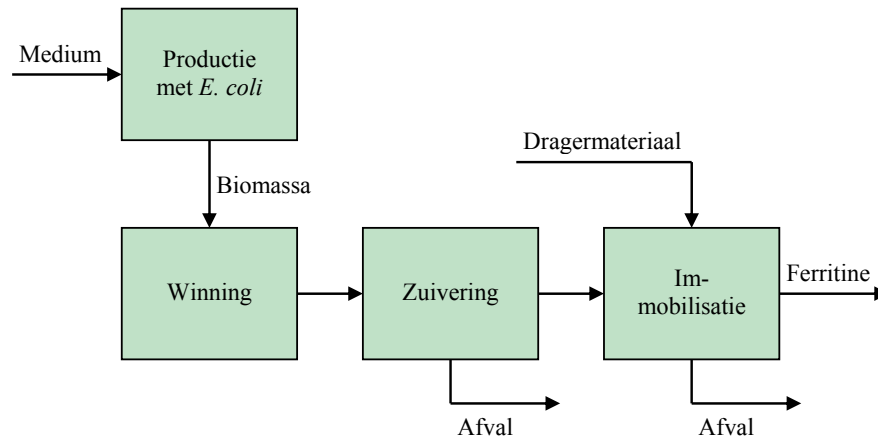
¹⁴ Tatur et al. (2006) *Extremophiles* 10, p139-148

3.1.3 PROCESSTRUCTUUR

Voor de ferritineproductie zal het proces beginnen met de groei van de *E. coli*, zodat het gewenste eiwit intracellulair wordt geproduceerd. De geproduceerde ferritine zal vervolgens door celbreking uit de biomassa worden gewonnen. Na zuivering van het ferritine, door de verwijdering van overgebleven celcomponenten, zal ferritine geïmmobiliseerd worden op een dragermateriaal (zie figuur 3.3).

FIGUUR 3.3

PROCESSHEMA VAN DE RECOMBINANT FERRITINEPRODUCTIE



3.1.4 ENGINEERING

PRODUCTIE MET *E. COLI*

Door gebruik te maken van recombinant *E. coli* kan ferritine van een extremofiel zeer gemakkelijk geproduceerd worden in een mesofiele cultuur. Aangezien gebruik wordt gemaakt van een monocultuur zullen alle ingaande stromen gesteriliseerd moeten worden.

Om te voorkomen dat het recombinant *E. coli* zijn vector verliest kan gebruik worden gemaakt van de antibioticaresistentie die op de vector is geplaatst. In de pre-cultuur zal hiervan gebruik worden gemaakt, maar uit milieutechnische en kostenoverwegingen zal geen antibioticum in de uiteindelijk ferritineproductie worden toegevoegd.

Na initiële groei kan door middel van IPTG of lactose de enzymproductie geïnitieerd worden. Door de hoge kosten van IPTG zal het veel goedkopere lactose worden gebruikt. Hierbij wordt na initiële groei overgestapt van groei op glucose naar productie op lactose.

Voor de reactor is een fed-batch systeem gekozen, omdat deze veel industrieel wordt toegepast, aangezien het goede controle geeft over de procescondities en hoge productconcentraties geeft. Bij goede procesvoering kan een opbrengst van ongeveer 50% biomassa per hoeveelheid koolstofbron verwacht worden. Ook is een fed-batch systeem minder gevoelig voor genetische instabiliteit van het recombinant organisme dan een chemostaat.

Een nadeel van het fed-batch systeem is dat het net als het batch systeem gevoelig is voor groeiremmende fermentatieproducten. Bij *E. coli* fermentatie is voornamelijk de acetaatinhibitie een groot probleem. Om deze inhibitie te voorkomen en nog hogere productconcentraties te behalen zal gebruik worden gemaakt van een membraanfermentatie. Hierbij kunnen zeer hoge productconcentraties worden gehaald, wat de winning en zuivering van het enzym zeer vergemakkelijkt.

WINNING

Na de productie moet de cel gebroken worden om het ferritine te winnen uit de biomassa. Hiervoor zijn vier verschillende soorten processen die op grote schaal toepasbaar zijn, te weten mechanisch, chemisch, thermisch en enzymatisch. De mechanische en enzymatische zijn hiervan de meest efficiënte. In de enzymatische behandeling wordt gebruik gemaakt van lysozym, maar dit is het effectiefst tegen Gram-positieve bacteriën. Aangezien *E. coli* een Gram-negatieve bacterie is, is gekozen voor een mechanische celbrekingsmethode. Een bijkomend voordeel is dat er bij mechanische behandeling geen extra stoffen aan de processtroom toegevoegd worden. Bij deze methode worden de cellen gebroken door zeer grote schuifkrachten die vrijkomen bij het plots verlagen van de druk.

ZUIVERING

Bij de zuivering is er voor gekozen niet eerst de gebroken celmassa van de opgeloste fractie te scheiden, maar direct het geheel te zuiveren door een verhittingsstap. In een dergelijke verhittingsstap (1 uur op 80°C) zullen alle *E. coli* eiwitten denatureren, terwijl het thermostabiele ferritine goed blijft. De gebroken biomassa zal zo direct dienst doen als een soort van klonteringsmiddel, waardoor de daaropvolgende scheiding vergemakkelijkt wordt. Deze verhittingsstap is veel kostenefficiënter dan de gebruikelijke precipitatie- en adsorptiemethoden die gebruikt worden voor niet thermostabiele enzymen, vooral als er een goede warmte-integratie plaatsvindt.

Na de verhittingsstap zal de niet oplosbare fractie moeten worden verwijderd van de opgeloste ferritine. Dit kan door middel van sedimentatie, filtratie of centrifugatie. Aangezien de deeltjesgrootte van de te verwijderen vaste stof ter grootte is van 0,2 µm en de fractie vaste stof groter is dan 10% is centrifugatie de aangewezen techniek.

IMMOBILISATIE

Immobilisatie van ferritine is nodig om het vastgelegde fosfaat uit de waterstroom te verwijderen. Immobilisatie heeft wel als nadeel dat er door de onsteriele aard van waterzuiveringsprocessen microbiële vervuiling zal ontstaan. Aangezien het geïmmobiliseerde enzym periodiek vervangen dient te worden zal een zeer goedkoop dragermateriaal gebruikt moeten worden.

Voor de immobilisatie van enzymen zijn verschillende mogelijkheden, zoals in figuur 3.4 aangegeven. Insluiting is het opsluiten van het enzym in een kleine ruimte. Hierbij kan het eiwit in een matrix van polymeren of vaste stof (actieve kool of keramiek) worden vastgelegd. Ook kan het enzym door middel van een membraan worden geïmmobiliseerd. Deze methoden van enzym insluiten zijn niet alleen duur, maar hebben ook hun beperking ten aanzien van massatransport. Verder is bij gebruik van dit soort systemen een veel optredend probleem dat een deel van de enzymen weglekt, wat zeker in de beoogde toepassing zeer ongewenst is.

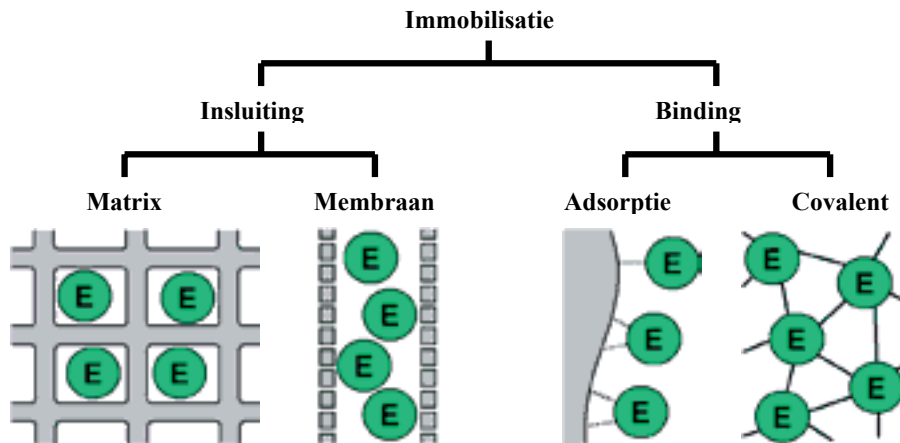
Enzymen kunnen ook door adsorptie vastgelegd worden op een oppervlak, maar de zwakke binding tussen enzym en het dragermateriaal (bijvoorbeeld silica, poreus glas, klei of cellulose) geeft problemen met desorptie bij hoge hydrodynamische krachten die nodig zijn voor een fosfaatverwijderingstoepassing.

Door gebruik te maken van een sterke covalente binding kan geïmmobiliseerd ferritine de hydrodynamische krachten aan, is er weinig kans op het weglekken van enzym en kan er gebruik gemaakt worden van een goedkope drager.

Door de ferritines covalent aan elkaar te verbinden door middel van glutaraaldehyde ontstaan er CLEAs (cross-linked enzyme aggregates). Door hun deeltjesgrootte is het vastgelegde

fosfaat gemakkelijk van de waterstroom te verwijderen. Er is dus voor gekozen om ferritine niet aan een oppervlak te binden om op deze manier slibproductie te verlagen, dragermateriële kosten te besparen en reactorcomplexiteit te verkleinen.

FIGUUR 3.4 IMMOBILISATIE VAN ENZYMEN



Een veel gevonden probleem bij immobilisatie door middel van covalente binding van enzymen is dat de activiteit afneemt. Dit komt doordat het enzym ontvouwt of de functionele centra in het enzym worden aangetast. Uit onze eigen experimenten blijkt dat de activiteit van ferritine niet afneemt en dat daarom CLEA formatie een zeer geschikte methode is. Tot slot zullen de gevormde ferritine CLEAs ontdaan moeten worden van eventuele overgebleven reactieproducten en geconcentreerd worden. Dit kan gedaan worden in een filtratiestap, waarbij de gevormde filtratiekoek gewassen wordt met water.

3.1.5. PROCESOVERZICHT

Samenvattend is er gekozen voor de productie in een membraan fed-batch systeem (zie tabel 3.1), waarna de winning bestaat uit een mechanische celbreking. De daarop volgende enzymzuivering vindt plaats door thermische degradatie en centrifugatie. Voor de immobilisatie is gekozen voor een sterke covalente binding met behulp van glutaaraldehyde. Tot slot zal het geïmmobiliseerde ferritine geconcentreerd en gewassen worden over een filter alvorens het gereed is voor opslag en verder gebruik.

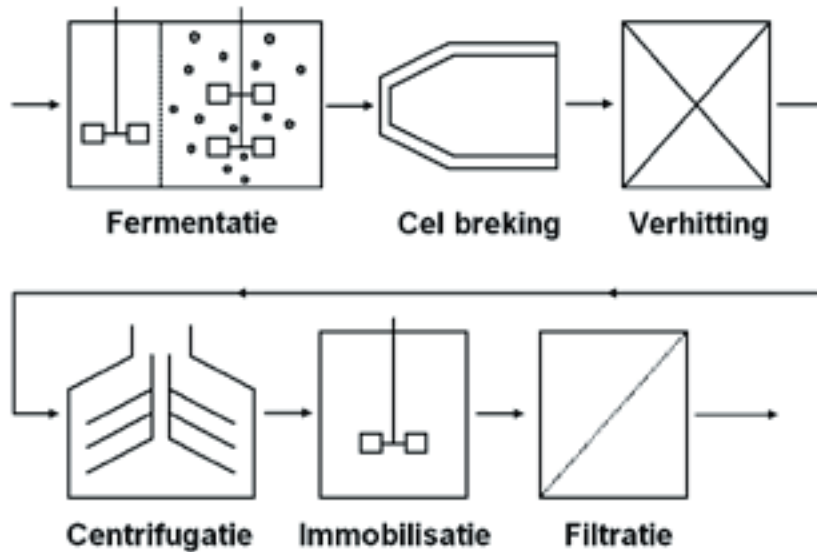
TABEL 3.1 PROCESOPTIES VOOR DE PRODUCTIE VAN FERRITINE. DE GEKOZEN PROCESSTAPPEN VOOR DE VERSCHILLENDE TAKEN ZIJN MET BLAUW AANGEGEVEN

Groei E.coli	Winning	Zuivering	Immobilisatie
Batch fermentatie	Chemisch	Centrifugatie	Adsorptie
Chemostaat	Enzymatisch	Filtratie	Covalente binding
Fed-batch fermentatie	Mechanisch	Sedimentatie	Matrix insluiting
-	Thermisch	-	Membraan insluiting

Het uiteindelijke proces voor de productie van recombinant *P. furiosus* ferritine zal er procesmatig zoals in figuur 3.5 aangegeven uit komen te zien.

FIGUUR 3.5

PRODUCTIEPROCES VOOR RECOMBINANT FERRITINE



3.2 FOSFAATVERWIJDERING

3.2.1 PROCESBESCHRIJVING

Na de productie van geïmmobiliseerd recombinant *P. furiosus* ferritine (rFrt) kan het ingezet worden voor een fosfaatverwijderingstoepassing. Het doel hierbij is het ontwerpen van een fosfaatverwijderingsfaciliteit, die met behulp van ferritine 10.000 m³ water per dag op een dusdanige wijze behandelt, dat het influent water met ongeveer 0,5 mg ortho-fosfaat per liter gezuiverd wordt tot een niveau van 0,01 mg ortho-fosfaat per liter.

3.2.2 ONTWERPBASIS

Door de productie van thermostabiel ferritine dat geïmmobiliseerd is kan fosfaat worden gebonden in de kern van ijzer(III) die zich vormt in het enzym in de aanwezigheid van ijzer(II) en een oxidant. Als oxidant zal zuurstof uit de omgeving gebruikt worden omdat dit een zeer goedkoop en efficiënt oxidant is.

Bij het gebruik maken van een enzym in een waterzuiveringstoepassing zal rekening gehouden moeten worden met de niet-steriele aard van het influent water. De beperkte levensduur van het gebruikte enzym door microbiële degradatie zal afgewogen moeten worden tegen de kosten van sterilisatie.

Verder kan ferritine als het gevuld is met ijzer(III) en fosfaat geregenereerd worden door gebruik te maken van een reductor. De kosten van regeneratie zullen moeten worden afgewogen tegen de verlenging aan levensduur.

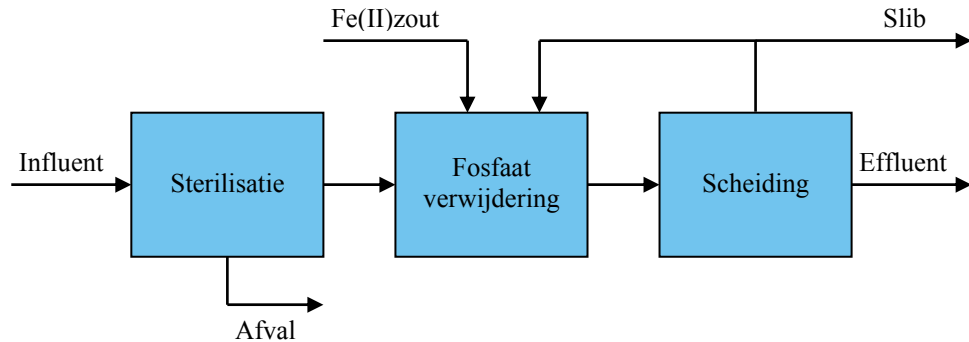
In het ontwerp zal gebruik worden gemaakt van de uit experimenten bepaalde evenwichtsbeladingen (zie hoofdstuk 2.1) en gevonden kinetische parameters (zie hoofdstuk 2.2).

Aangezien de gevonden reactiesnelheden voldoende zijn op een temperatuur van 5 tot 20°C en pH=7,0 in een acetaat buffer, zal geen gebruik worden gemaakt van kostbare pH- of temperatuurveranderingen om de reactiesnelheden te verhogen.

3.2.3 PROCESSTRUCTUUR

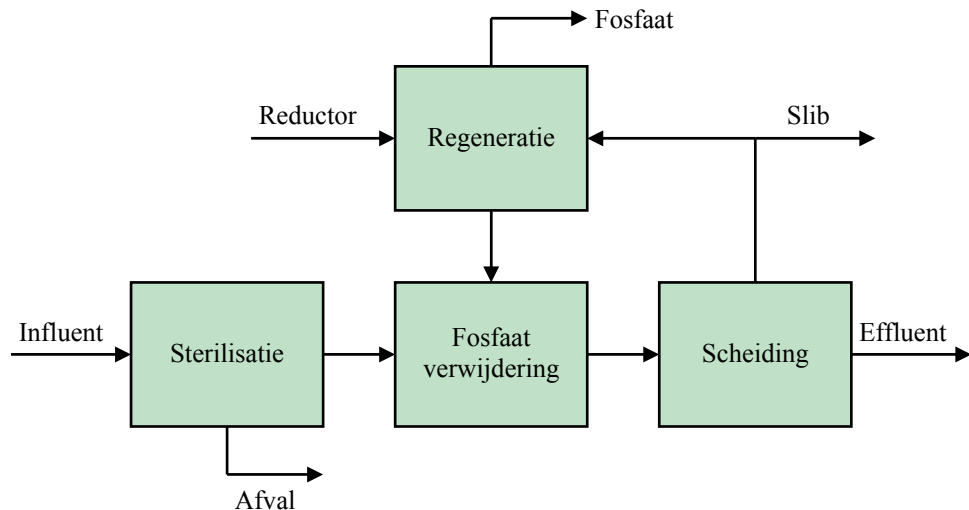
Voor de fosfaatverwijdering zal het proces mogelijkwijs beginnen met een sterilisatiestap om de ferritine te beschermen tegen microbiële degradatie. Daarna zal in een reactor het fosfaat worden geïncorporeerd in ferritine. Vervolgens zullen in een scheidingstap de ferritine CLEAs van de effluentstroom verwijderd worden om terug gebracht te worden naar de reactor, totdat ferritine volledig is gevuld en verwijderd zal moeten worden (figuur 3.7).

FIGUUR 3.7 PROCESSTRUCTUUR VAN FOSFAATVERWIJDERING ZONDER REGENERATIE



Er kan ook voor gekozen worden om een regeneratiestap op te nemen in de ferritine recycle stroom, zoals in figuur 3.8 aangegeven. Hierdoor kan met behulp van een reductor het ijzer en fosfaat terug gewonnen worden uit ferritine, waarna ferritine opnieuw kan worden ingezet voor de fosfaatverwijdering. Aangezien hierbij de tijd dat ferritine wordt inzet vergroot, dient ook de levensduur van ferritine te worden vergroot. Hierdoor zal sterilisatie niet meer optioneel zijn, maar juist een vereiste voor economische inzet van ferritine.

FIGUUR 3.8 PROCESSTRUCTUUR VAN FOSFAATVERWIJDERING MET REGENERATIE VAN FERRITINE



3.2.4 ENGINEERING

STERILISATIE

De sterilisatie van het influent water kan op verschillende manieren, bijvoorbeeld door toevoeging van een desinfectiemiddel, bestraling met UV, een hitte schok of filtratie.

Sterilisatie door filtratie is niet geschikt voor een waterzuiveringsproces aangezien veel wateren zwevende stof bevatten en dus veel operationele problemen zouden optreden. De toevoeging van een desinfectiemiddel is niet in overeenstemming met het beoogde doel van een zuivering voor ecologische oppervlaktewateren, want de gebruikte middelen zouden in het milieu terecht kunnen komen. Verder zouden de overgebleven resten van het desinfectiemiddel zeer moeilijk uit de processtroom te verwijderen zijn. Bestraling met UV levert maar een beperkte efficiëntie op in grote processtromen en zal dus gecomplementeerd moeten worden met een ander sterilisatiemethode. De hitteschok methode is vrij universeel te gebruiken, maar is zeer kostbaar bij grote processtromen.

Er kan dus geconcludeerd worden dat voor sterilisatie van het influent van een zeer grote waterstroom er geen efficiënte en goedkope oplossing voor handen is. Dus als er niet voor regeneratie gekozen wordt is het beter om het proces zo in te richten dat ferritine in korte tijd beladen wordt en verwijderd wordt voor microbiële degradatie een grote rol begint te spelen (na ongeveer één week). Wordt er wel voor regeneratie gekozen dan zal door het langdurige gebruik van ferritine toch desinfectie van het influent nodig zijn. Hiervoor zou het beste gekozen kunnen worden voor de hitteschok methode, maar de additionele kosten zullen moeten worden meegenomen in de procesmatige beslissing.

REGENERATIE

Voor de regeneratie zijn twee opties beschikbaar. Ten eerste kan door middel van een reductor het ijzer en fosfaat worden vrijgemaakt uit ferritine. Ten tweede kan een pH verandering gebruikt worden voor de regeneratie. Uit de experimenten is gebleken (zie hoofdstuk 2.3) dat de pH verandering maar een zeer beperkte hoeveelheid fosfaat vrijmaakt en grote hoeveelheden zouten in het water zou brengen, waardoor het niet eenvoudig toepasbaar is.

De regeneratie met een reductor zorgt voor een betere verwijdering van ijzer en fosfaat uit het ferritine, maar selectie van de reductor is cruciaal. Uit de experimenten blijkt dat de snelheden van de reductiestap vele malen langzamer zijn dan die van de incorporatie. Bovendien zijn de reductanten die de redelijkste snelheden geven vrij duur.

Voor de regeneratie met een reductor zal het medium met het te regenereren ferritine vrij van oxidanten gemaakt moeten worden, omdat anders het vrijgekomen ijzer direct weer geïncorporeerd zal worden.

Na een economisch vergelijk blijkt dat ferritine een niet haalbare hoeveelheid keer geregeneerd zal moeten worden om de kosten van regeneratie te dekken ten op zichte van eenmalig gebruik. Daarom is gekozen om het ferritine niet te regenereren, maar direct na volledige vulling weg te doen. Hierdoor is het gebruik van een sterilisatiestap ook niet nodig.

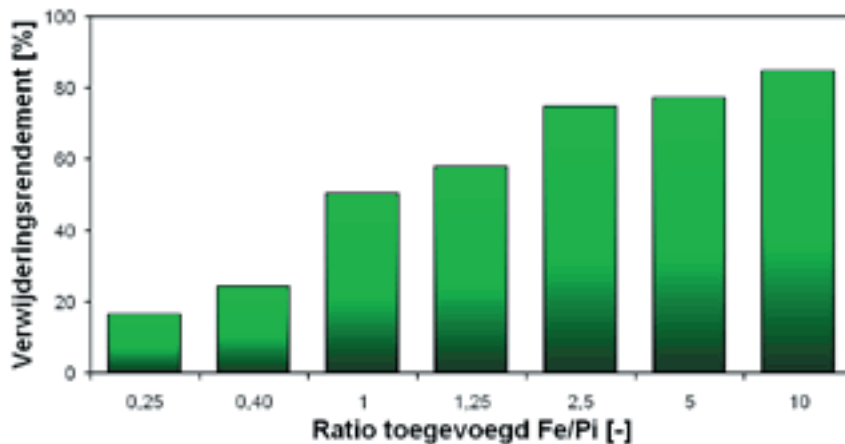
FOSFAATVERWIJDERING

Voor de fosfaatverwijdering is een ijzer(II)zout nodig en zuurstof. Uit berekeningen van de opgeloste hoeveelheid zuurstof blijkt dat er normaliter voldoende zuurstof aanwezig is in water voor de oxidatie van het ijzer. Er is dus geen additionele toevoer van zuurstof, in de vorm van lucht nodig aan de reactor. Wel zal ijzer(II) aan de reactor moeten worden toegevoegd. Uit een inventarisatie is gebleken dat opgelost FeCl_2 en FeSO_4 hiervoor de beste opties zijn. Aangezien FeCl_2 de goedkoopste blijkt, zal deze in het ontwerp worden gebruikt,

al moet worden opgemerkt dat zeer gemakkelijk over te stappen is van het ene naar het andere ijzer(II)zout.

Voor de procesvoering van deze optie kan gekozen worden uit een tank- of bed-reactor. Aangezien ferritine denatureert als het overladen wordt met ijzer of aan een concentratie groter dan 1 mg ijzer(II) per liter wordt blootgesteld, is een vast-bed reactor geen reële optie. Een batch gedraaide reactor zal door het hoge debiet van het influent een zeer groot volume hebben of zeer korte cyclus moeten hebben, wat dit type reactoren zeer onpraktisch maakt. De keuze blijft dan tussen twee gerelateerde systemen, de continue tank reactor of een gefluïdiseerd bed. Het voordeel van het gefluïdiseerd bed is dat het geen additionele scheidingsstap nodig heeft om de ferritine in de reactor te houden. Uit massatransport berekeningen blijkt dat het geïmmobiliseerde ferritinedeeltjes zo rond een tiende van een millimeter kunnen zijn. Voor een dergelijke deeltjesgrootte zouden de verhoudingen van een gefluïdiseerd bed niet in reguliere proporties zijn en door het grote massaverschil van de deeltjes door belading (+30%) is het gebruik van een continue tank reactor gemakkelijker.

FIGUUR 3.9 FOSFAATVERWIJDERINGSRENDERMENT BIJ VERSCHILLENDE TOEVOEGINGEN VAN IJZER(II) TEN OPZICHTE VAN FOSFAAT, AANGEGEVEN IN EEN MOLLAIRE RATIO



Door de limitaties van het verwijderingsrendement (zie figuur 3.9), maximaal 85% bij 10x overmaat van ijzer(II) op molaire basis, zijn er twee in serie staande continue tank reactoren nodig voor een volledige verwijdering. De ferritine in beide reactoren zal dan wekelijks moeten worden vervangen, waardoor microbiële degradatie wordt beperkt.

SCHEIDING

Aangezien een continue tank reactor de geïmmobiliseerde ferritine CLEAs niet vasthouden, zal een scheidingsstap nodig zijn voor een recycle van de ferritine. Voor een dergelijk scheiding kan gebruik worden gemaakt van centrifugatie, filtratie of sedimentatie. Door het kleine dichtheidsverschil en grote benodigde verblijftijd is sedimentatie geen ideale oplossing. Aangezien de deeltjesgrootte in de orde ligt van een tiende van een millimeter en de fractie vaste fase niet groot is, ligt een eenvoudige filtratiestap voor de hand.

Door de filtratiestap zullen vaste deeltjes in het influent die een grootte hebben van meer dan 100 μm zich in het proces ophopen. Om deze ophoping te beperken zal er maximaal 5 mg van deze deeltjes per liter in het influent aanwezig mogen zijn.

3.2.5. PROCESOVERZICHT

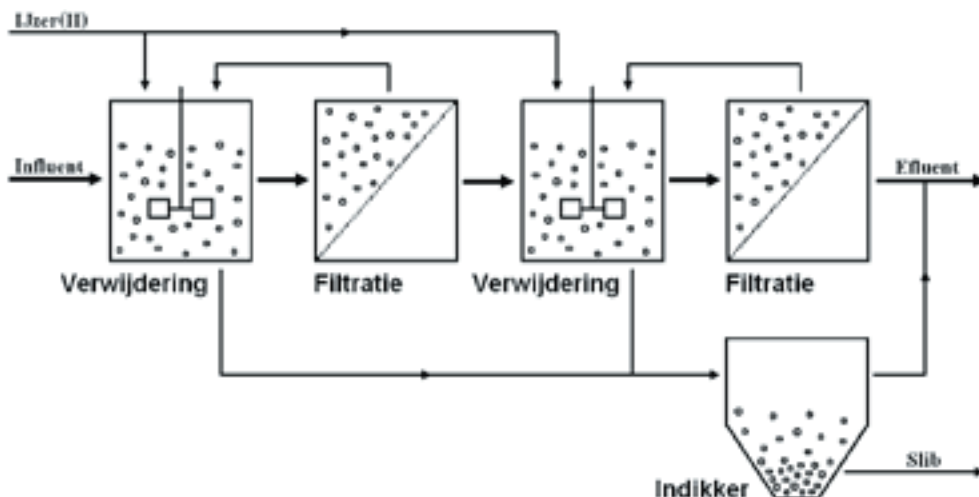
Samenvattend is er gekozen voor een fosfaatverwijdering zonder sterilisatie en regeneratie (zie tabel 3.2). De verwijdering vindt plaats in een continue tank reactor gevolgd door een filtratiestap, zodat de ferritine CLEAs in de reactor worden gehouden. Op basis van de uit de experimenten gevonden limitaties voor het verwijderingsrendement van fosfaat zullen twee in serie staande reactoren nodig zijn voor de volledige zuivering van 0,5 mg ortho-fosfaat per liter tot 0,01 mg ortho-fosfaat per liter

TABEL 3.2 PROCESOPTIES VOOR DE PRODUCTIE VAN FOSFAATVERWIJDERING MET FERRITINE. DE GEKOZEN PROCESSTAPPEN VOOR DE VERSCHILLENDE TAKEN ZIJN MET BLAUW AANGEGEVEN

Sterilisatie	Regeneratie	Fosfaat verwijdering	Scheiding
Desinfectiemiddel	pH verandering	Continue tank reactor	Centrifugatie
Bestraling	Reductor	Gefluidiseerd bed	Filtratie
Filtratie	Geen regeneratie	Geroerde tank reactor	Sedimentatie
Hitte schok	-	Vast bed	-
Geen sterilisatie	-	-	-

Het uiteindelijke proces voor de verwijdering van fosfaat met behulp van recombinant *P. furiosus* ferritine zal er procesmatig uitzien zoals in figuur 3.10 aangegeven.

FIGUUR 3.10 FOSFAATVERWIJDERINGSPROCES MET FERRITINE



3.3 NEVENEFFECTEN

De neveneffecten die van belang zijn voor de defosfatering met ferritine zullen hieronder behandeld worden. De neveneffecten die een rol spelen bij de recombinant ferritineproductie zijn in de appendix te vinden.

3.3.1. OPSLAG

Ferritine is net al vele andere enzymen gevoelig voor microbiële degradatie. Uit de testen bleek dat de ferritine, zonder sterilisatie, voor meer dan een half jaar op -20°C of een beperkt aantal weken op +4°C bewaard kan worden. Daarentegen is op kamertemperatuur na enkele dagen de ferritine gedegradeerd door microbiële groei.

Door sterilisatie en steriele oplag is het mogelijk om ferritine voor een langere periode op te slaan. Bij deze sterilisatie kan gezien zijn thermostabiliteit gebruik worden gemaakt van

standaard thermische methoden. Verder is ferritine bestand tegen het herhaaldelijk bevriezen en ontdooien, hierdoor is onsteriele opslag in bevroren vorm ook mogelijk.

Bij de opslag van ijzer(II)zouten moet ermee rekening worden gehouden dat ze oxideren tot ijzer(III) in de aanwezigheid van water en een oxidant zoals zuurstof. Het ijzer(II)zout zal dus vochtvrij en liefst onder anaerobe condities moeten worden opgeslagen. In opgeloste vorm kan de oxidatie geremd worden door de verlaging van de pH.

3.3.2 SLIBPRODUCTIE

In de fosfaatverwijderingstoepassing zal het gevormde slib naast ijzer en fosfaat ook een recombinant eiwit bevatten. Hierdoor wordt de afzet van het slib kostbaarder. Wel zal het slib in de faciliteit ontdaan worden van het grootste deel van het water door middel van sedimentatie. De fosfaatverwijdering zal een slibproductie van 30 mg droge stof per liter geven, terwijl fysisch-chemische methode 30 tot 60 mg droge stof per liter produceren. Uit de lage toegevoegde ijzer/fosfaat-ratio (molair 10:1) had een lagere slibproductie verwacht mogen worden, maar het ferritine en het gebruikte dragermateriaal zorgen voor additioneel slib. Het slib bestaat dus ook voor 30 tot 40% uit biologisch materiaal. Dit biologische materiaal zou verwijderd kunnen worden door verbranding of vergisting.

Door de filtratiestap in het proces kan vaste stof uit het influent worden ingevangen, als het groter is dan een tiende van een millimeter. Deze vaste stof zal zich in het te verwijderen slib ophopen, waardoor de slibproductie hoger dan 30 mg/l zal worden.

3.3.3 SOCIAAL

In principe is het voorkomen van de vervuiling te prefereren boven de behandeling van de vervuilde fase. Verder is het omzetten van de vervuilende component te prefereren boven het overdragen van de component van de ene in de andere fase. Een fosfaatverwijdering zoals deze is dus een duidelijk voorbeeld van een “end-of-pipe” oplossing en voor de inzet van een dergelijk systeem ligt het voor de hand eerst de bron van de vervuiling aan te pakken.

Verder zal voor een waterzuivering voor ecologische oppervlaktewateren ook in het ontwerp gekeken moeten worden naar de inpassing van de installatie in het landschap.

3.4 ECONOMIE

Voor de kostenberekening van het ferritine defosfateringsstelsel is gebruik gemaakt van een positief en een negatief scenario. In het positieve scenario wordt uitgegaan dat de procesparameters toepasbaar zijn zonder veiligheidsmarge en lage marktprijzen voor grondstoffen, terwijl er in het negatieve scenario wordt uitgegaan van een veiligheidsmarge van ongeveer 10% op de procesparameters en hogere grondstofprijzen.

3.4.1 PRODUCTIE VAN FERRITINE

Voor de productie van ongeveer 40 ton actief geïmmobiliseerd ferritine per jaar zullen de directe productiekosten tussen 40 tot 55 €/kg liggen. Dit zou inhouden dat een gewone marktprijs tussen de 50 en 70 €/kg komt te liggen. Deze marktprijs ligt in lijn met de verwachting aangezien bulk enzymen die geproduceerd worden op een schaal van 10.000 ton per jaar typisch 5 tot 30 €/kg kosten en enzymen met een productie van minder dan een ton kosten vaak meer dan 50.000 €/kg.

Van de kosten voor alle grondstoffen die nodig zijn voor het proces, zijn die voor glucose, lactose en glutaaraldehyde het grootst. Deze nemen ongeveer 50% van de totale kosten voor ruwe grondstoffen voor hun rekening. Een efficiënt gebruik van deze stoffen in het proces zal dus essentieel zijn voor een economische productie. Als gekeken wordt naar de directe pro-

ductiekosten dan blijken de grondstoffen ($\pm 30\%$) en personele kosten ($\pm 20\%$) de belangrijkste factoren te zijn.

Voor de productiefaciliteit van ferritine is een investering van 3,0 tot 3,5 miljoen euro vereist. Deze investering zal, bij de gestelde marktprijs, zich terug verdienen in ongeveer 10 jaar.

3.4.2 FOSFAATVERWIJDERING

Voor de verwijderingsinstallatie die 10.000 m³ water per dag verwerkt en dus ongeveer 1,8 ton ortho-fosfaat per jaar verwijdert, zullen de directe kosten komen op 0,7 tot 0,9 €/m³ behandeld water. Dit komt neer op verwijderingskosten van 1,4 tot 1,8 euro per gram verwijderd ortho-fosfaat. Deze kosten liggen boven die van andere fosfaatverwijderingen, zoals het helofyten filter en fysisch-chemisch behandeling, maar ze liggen wel in de zelfde orde van grootte.

Als we kijken naar de totale directe kosten dan nemen de kosten voor ferritine ongeveer 75% voor hun rekening. Het is dus duidelijk dat dit de grootste kostenfactor is en dat de directe kosten zeer gevoelig zijn voor een prijsverandering in de ferritineproductie. Beperking van het gebruik van ferritine of verlaging van de productiekosten van ferritine zullen dus direct een groot verlagend effect hebben op de prijs van de waterbehandeling.

Voor de fosfaatverwijderingsfaciliteit is een investering van 1,0 tot 1,5 miljoen euro nodig. Dit zorgt ervoor dat het totale proces, verwijdering en ferritineproductie, een investering van 4 tot 5 miljoen vereist. De stichtingskosten zijn dus 2,4 tot 3,6 duizend euro per m³/h voor de fosfaatverwijderingsfaciliteit of 9,6 tot 12 duizend euro per m³/h voor het totale proces.

4

EVALUATIE

4.1 TECHNISCHE HAALBAARHEID

Om de technische haalbaarheid van de fosfaatverwijdering met recombinant *P. furiosus* ferritine te onderzoeken is gekeken naar de eiwitproductie, enzymstabiliteit, fosfaatbelading, beladingskinetiek, regeneratie, eiwit-immobilisatie en er is een conceptueel procesontwerp gemaakt.

De eiwitproductie kan op een eenvoudige en commerciële wijze gebeuren in de gewenste bulk hoeveelheden. De enzymstabiliteit onder de gestelde procesomstandigheden van een waterzuiveringsproces is voldoende, al zal er rekening moeten worden gehouden met de microbiële degradatie door de niet-steriele aard van een waterzuiveringsproces. Door middel van ferritine kan in het conceptueel procesontwerp nagestreefde effluent fosfaatconcentratie van 0,01 mg ortho-fosfaat per liter worden gehaald uit een waterstroom van 10.000 m³ per dag. Een verwijderingsrendement van rond de 85% kan dan behaald worden, de fosfaatbelading is dan ongeveer 250 fosfaationen per ferritine. De beladingskinetiek zorgt voor een hydraulische verblijftijd onder de 10 minuten. Deze kinetiek is afhankelijk van externe factoren zoals zoutconcentraties, temperatuur en pH. De regeneratie is ook technisch mogelijk in een anaerobe milieu met behulp van een reductor. De eiwit-immobilisatie door vorming van CLEAs is een zeer geschikte methode gebleken. Het is eenvoudig en de activiteit van ferritine wordt niet verlaagd.

In vergelijking met de microbiologische fosfaatverwijdering gebruikt het ferritineproces geen BOD en kan het lagere fosfaatconcentraties bereiken. Ten opzichte van helofytenfilters gebruikt het minder oppervlak en is het juist geschikt voor ortho-fosfaatverwijdering. Het ferritineproces lijkt veel op de fysisch-chemische methode, want het heeft een vergelijkbaar fosfaatverwijderingsrendement en kan vergelijkbare lage ortho-fosfaat effluentconcentraties bereiken. De fysisch-chemische methode verwijdert ook particulier fosfaat, maar produceert meer slib met hogere ijzergehaltes dan het ferritineproces. Hierbij moet worden opgemerkt dat door de filtratiestap in het ferritineproces vaste stof uit het influent worden ingevangen als het groter is dan 100µm, wat dan vervolgens in het slib zal komen. De hoge slibproductie in de fysisch-chemische methode wordt veroorzaakt door de co-precipitatie met andere anionen, terwijl het slib van de ferritine methode voor 30 tot 40% uit biologisch materiaal bestaat.

Door de filtratiestap in het proces kan vaste stof uit het influent worden ingevangen, als het groter is dan een tiende van een millimeter. Deze vaste stof zal zich in het te verwijderen slib ophopen, waardoor de slibproductie hoger dan 30 mg/l zal worden.

4.2 ECONOMISCHE HAALBAARHEID

De fosfaatverwijderingsfaciliteit voor een waterstroom van 10.000 m³ per dag vergt een investering van 1,0 tot 1,5 miljoen euro, terwijl een totaalproces, inclusief ferritineproductie, een investering van 4 tot 5 miljoen vereist. De stichtingskosten liggen tussen de 2.400 tot 3.600 euro per m³/h voor de fosfaatverwijderingsfaciliteit; dit ligt in de orde van grootte van de stichtingskosten van een uitgebreide fysisch-chemische fosfaatverwijderingsinstallatie.

De economische voorwaarden voor de regeneratie van ferritine door middel van een reductant bleken niet te verenigen met de technische haalbaarheid. Ferritine wordt dus gebruikt totdat het eiwit volledig is beladen en wordt dan verwijderd als slib.

De directe kosten voor ortho-fosfaatverwijdering door middel van recombinant *P. furiosus* ferritine ligt tussen de 0,7 tot 0,9 euro per kubieke meter behandeld water en de verwijderingskosten tussen de 1,4 tot 1,8 euro per gram ortho-fosfaat. Deze kosten zijn iets hoger dan voor de helofytenfilter of de fysisch-chemische behandeling.

Kostenbesparingen kunnen vooral worden bereikt in de productie van het ferritine-eiwit. Door schaalvergroting of de productie onder te brengen in een bedrijf dat ook al vele andere bulkenzymen maakt, kunnen de productiekosten verlaagd worden. Verbeterde biochemische productie-eigenschappen zouden ook de prijs van ferritine verlagen. Deze eigenschappen zijn te beïnvloeden door de keuzes die gemaakt worden bij de genetische modificatie, zoals de keuze van de gastheer, de vector, de promotor en de inductor. De momenteel beschikbare gemodificeerde *E. coli* is bijzonder geschikt voor labschaal, maar voor bulkproductie zou het interessant zijn om te kijken naar: (1) een alternatieve inductor of constitutieve mutant, (2) extracellulaire ferritineproductie in *Bacillus* of *Aspergillus* soorten en (3) het gebruik van auxotrofe mutanten ter vervanging van de antibioticumresistentie.

Een alliantie tussen een biotechnologische bedrijf voor de eiwitproductie en een waterzuiveringsbedrijf voor de defosfateringstoepassing ligt voor de hand, aangezien zo het grootst mogelijk schaalvoordeel en expertiseverdeling kan worden behaald.

4.3 CONCLUSIE

Op laboratoriumschaal is aangetoond dat het technisch mogelijk is, met behulp van hyperthermostabiel ferritine eiwit, ortho-fosfaat te verwijderen tot 0,01 mg ortho-fosfaat per liter. In vergelijking tot andere systemen die een dergelijk effluentkwaliteit kunnen leveren is het ferritineproces zeer specifiek en produceert minder slib. De geschatte fosfaatverwijderingskosten voor het ferritineproces zijn op dit moment hoger dan voor andere systemen, maar er is ruimte voor kostenverlaging door optimalisatie.

Om het ferritineproces daadwerkelijk toe te passen zal onderzoek moeten worden gedaan onder procescondities met werkelijk oppervlakte- en afvalwater, aangezien in dit onderzoek alleen gebruik is gemaakt van synthetisch afvalwater. Ten opzichte van de benodigde kostenverlaging zal samen met producenten van recombinant eiwitten, zoals biotechnologie en/of life-science bedrijven, gekeken kunnen worden naar de productie van het ferritine eiwit.

APPENDIX

A. VERKLARENDE WOORDENLIJST

Aeroob	In aanwezigheid van zuurstof.
Amorf	Zonder kristallijne structuur.
Anaeroob	Zonder aanwezigheid van zuurstof.
Archaea	Eén van de drie domeinen van leven.
Auxotrofe mutant	Een organisme dat niet in staat is om al zijn benodigde stoffen zelf te maken.
Beladingskinetiek	Kinetiek van de opslag van ijzer en/of fosfaat.
CLEA	Cross-linked enzyme aggregates; door covalente binding geïmmobiliseerd enzym.
Co-factor	Additionele stof die buiten het substraat nodig is voor de enzymfunctie.
Enantiomeer	Een enkele vorm van een stof die optisch actief is.
Fenton reactie	Reactie van waterstofperoxide met ijzer(II) waarbij er reactieve hydroxylradicalen ontstaan.
Heemgroep	Een complexe verbinding met een centraal ijzer-ion.
Hyperthermofiel	Een extremofiel organisme bij hoge temperaturen.
In vitro	Toepassen van een techniek in een reactievat.
In vivo	Toepassen van een techniek in een levend organisme.
mRNA	Messenger ribonucleic acid; RNA dat een centrale rol speelt in de expressie van een eiwit.
Nucleatie	De initiële vorming van een kerndeeltje.
Oxidatietoestand	Het ladingsgetal van een ion
Recombinant eiwit	Niet-eigen eiwit geproduceerd door recombinant organisme.
Recombinant organisme	Organisme met niet-eigen DNA.
Redox-stress	Cellulair disfunctioneren door schadelijke reductiereacties.
Thermostabiel	Stabiel onder hoge temperaturen.
Vector	Stuk genetisch materiaal voor de overdracht van DNA.

B. MATERIALEN EN METHODE

FERRITINEPRODUCTIE

Voor de (over-)productie van het thermostabiele ferritine van *Pyrococcus furiosus* is het benodigde gen met een pET24a(+) vector in BL21-CodonPlus (DE3)-RIL *Escherichia coli* gebracht. De vector heeft een T7 promotor, Lac operator en IPTG inductor systeem, en geeft antibiotikumresistentie tegen chlooramphenicol en kanamycine¹⁵.

Onder druk van 50 mg/l chlooramphenicol en 20 mg/l kanamycine is *E. coli* gekweekt op 37°C en pH=7,0 in een Luria-Bertani medium. Na een initiële groeiperiode is door toevoeging van 0,5 mM IPTG de ferritineproductie gestart.

Na de kweek is het medium verwijderd door centrifugatie. De verkregen biomassa is opgelost in een TRIS buffer en is anti-peptidase toegevoegd. Hierna zijn de cellen gebroken en in twee stappen gezuiverd door middel van een verhittingstap van 90°C voor 1½ uur en centrifugatie. Het supernatant is geconcentreerd over een 100 kDa filter en de zuiverheid is op gel getest.

BUFFERS EN PH

Als buffer is gebruik gemaakt van 20 mM MOPS gesteld op pH=7,0. Bij de pH experimenten is gebruik gemaakt van 50 mM bufferoplossingen om er zeker van te zijn, dat er geen ongewenste pH verandering plaats vond. Voor de hoge pH waarde is gebruik gemaakt van EPPS, terwijl er voor de lage pH waarde gebruik is gemaakt van MES.

ENZYMBEPALING

De enzymconcentraties zijn vastgesteld door middel van de Lowry assay¹⁶. Hierbij wordt door middel van de Biureet reactie en BCA (bicinchoninezuur) de hoeveelheid eiwit door een kleurbeoordeling gemeten. Aangezien thermostabiel enzymen minder snel ontvouwen en ter voorkoming van de invloed van ijzer op de assay is er gebruik gemaakt van een TCA (trichloorazijnzuur) eiwitprecipitatie¹⁷.

IJZERBEPALING EN KINETIEK

De ijzerconcentraties zijn bepaald door middel van een ferrozine assay¹⁸. Hierbij vormen ferrozine en Fe(II) een gekleurd complex met een extinctiecoëfficiënt op 562 nm van 28000 abs/(mol/l)/cm bij pH=7,0. Om de hoeveelheid ijzer te bepalen in het eiwit is ferritine gedenaatueerd door toevoeging van een overmaat HCl, welke daarna weer gebufferd is met acetaat. Voor de ijzerkinetiek is gebruik gemaakt van de lichtabsorptie van ijzer(III)hydroxide. Deze heeft een extinctiecoëfficiënt op 320 nm van 2200 abs/(mol/l)/cm. Voor de ijzer(III)kernen met fosfaat is de extinctiecoëfficiënt gecorrigeerd. Verder moet worden opgemerkt bij deze spectrometrische methode dat het geen onderscheid maakt tussen ijzeroxidatie op het katalytische centrum van ferritine en de nevenreactie (auto-oxidatie van ijzer(II) met zuurstof). Hiervoor zijn controlereacties zonder ferritine uitgevoerd, om te verifiëren dat de snelheid van de nevenreactie verwaarloosbaar was ten opzichte van de door ferritine gekatalyseerde ijzeroxidatie.

¹⁵ Tatur et al. (2006) *Extremophiles* 10, p139-148

¹⁶ Lowry et al. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, p265-275

¹⁷ Bothwell en Mallett (1955) *The Biochemical Journal* 59, p599-602

¹⁸ Stookey (1970) *Analytical Chemistry* 42, p779-781

FOSFAATBEPALING

Voor de bepaling van de hoeveelheid fosfaat in de kern van ferritine is eerst het eiwit gedena-tureerd door toevoeging van een overmaat HCl. Hierna is door middel van de fosfaat-molyb-daatmethode spectroscopisch de hoeveelheid fosfaat vastgesteld¹⁹.

BELADING

Om ferritine te beladen met ijzer is ferritine eerst in de juiste verhouding aan de buffer toegevoegd in aerobe condities. Hierna is in kleine hoeveelheden langzaam de benodigde hoeveelheid anaerobe aangezuurde ijzer(II)sulfaat oplossing toegevoegd. Hierbij is rekening gehouden met de maximale oplosbaarheid van zuurstof. De oplossing van ferritine en ijzer heeft dan minimaal een reactietijd van 1 uur gekregen om te zorgen voor een volledig ont-wikkeld evenwicht. Hierna is de oplossing over een sephadex G-25 kolom gezuiverd om alle niet geïncorporeerde ijzer en additionele anionen te verwijderen.

Als er ook fosfaat in ferritine geladen moest worden, is voor of na, afhankelijk van het ge-wenste beladingsregiem, een fosfaatbufferoplossing van de gewenste pH en concentratie toe-gevoegd. Bij het sequentiële beladingsregiem is na de toevoeging van het fosfaat opnieuw een reactietijd van minimaal 1 uur in acht genomen voor volledige ontwikkeling van het evenwicht.

REGENERATIE

Voor de regeneratie met reductanten zijn eerst alle oplossingen anaëroob gemaakt en is er in een afgesloten anaërobe cuvet gemeten. In de spectrometrische methode is gebruik gemaakt van ferrozine dat een gekleurd complex maakt met ijzer(II) dat na reductie uit het ferritine komt (zie ook "ijzerbepaling en kinetiek").

Voor de regeneratie met behulp van pH verschuiving is eerst de gewenste ferritinebelading gemaakt zoals beschreven onder "belading". Na de reactietijd van meer dan 1 uur is de oplos-sing over een sephadex G-25 kolom veranderd van buffer en pH. Na een tweede reactietijd van 1 uur is de oplossing opnieuw over een sephadex G-25 kolom gehaald om eventuele niet aan ferritine geassocieerde ionen te verwijderen.

IMMOBILISATIE

De immobilisatie van ferritine is gedaan in een geroerd vat met een oplossing van ferritine, waaraan een gewenste hoeveelheid gluteraldehyde is toegevoegd²⁰. Na de gewenste reactie-tijd is het mengsel gecentrifugeerd en de ferritine CLEAs in een zuivere bufferoplossing over-gebracht.

¹⁹ Lowry et al. (1954) *J. Biol. Chem.* 207, p1-17

²⁰ Schoevaart et al. (2004) *Biotech. and Bioeng.* 87, p754-762

C. NEVENEFFECTEN VAN DE FERRITINEPRODUCTIE

AFVAL

In de kweek wordt gebruik gemaakt van antibioticumresistentie voor de selectie van *E. coli* met de juiste vector. Maar er bestaat ongerustheid over de kans dat het gen voor de resistentie in het milieu komt, waardoor mogelijk pathogene organismen deze resistentie overnemen en dus mediceenaal gebruik van antibiotica minder effectief wordt. Niet alleen moet voorkomen worden dat het antibioticumresistentiegen via een afvalstroom in het milieu komt, ook zal het gebruikte antibioticum uit het gebruikte medium gehaald moeten worden om te voorkomen dat er veel antibiotica in de omgeving komen.

Aangezien er door de immobilisatie toxisch glutaaraldehyde in de afvalstroom van de filtratieunit kan komen, moet er voor gezorgd worden dat deze stroom gezuiverd wordt, of dat de glutaaraldehyde volledig wordt omgezet.

VEILIGHEID

Glutaaraldehyde is een toxische stof die ook schadelijk is voor het milieu. Bij de formulering van maatregelen ter preventie van lekkage en een veilige werkomgeving zal hier speciaal aandacht aan moeten worden besteed.

Aangezien er een grote ongerustheid bestaat over de ongewenste ecologische invloed van het vrijkomen van genetisch gemodificeerde cellen, zijn er regels en richtlijnen voor het gebruik van gentechnologie.

Deze regels en richtlijnen gaan met name over de preventie van het vrijkomen van de genetisch gemodificeerde organisme en/of het gebruikte gen. Hierbij speelt de (1) overlevingskans van het organisme, (2) de mogelijkheid van de vector om naar een ander gastheer over te gaan en (3) de aard van de genen en genproducten een rol. Uit onderzoek zal moeten blijken aan welke regels het hier gebruikte gemodificeerde organisme zal moeten voldoen. Minimaal zal er gewerkt moeten worden met gesloten systemen en zullen alle uitgaande stromen gesteriliseerd moeten worden.

Tot slot moet worden opgemerkt, dat er nog geen onderzoek is gedaan naar de mogelijk negatieve effecten van recombinant *P. furiosus* ferritine op mensen. Het lichaamsvreemde eiwit zal dus voorlopig als mogelijk schadelijk en potentieel allergeen moeten worden aangeduid.

SOCIAAL

De perceptie van genetische modificatie is van belang voor een proces dat recombinant eiwit produceert en gebruikt. Uit de barometer van de Europese Unie blijkt, dat het gebruik van genetische modificatie voor het opruimen van afvalstromen redelijk acceptabel wordt gevonden door het publiek. Het zit duidelijk in tussen de extremen van het gebruik van gentechnologie voor voeding (zeer negatief) en de productie van medicijnen voor tot nu toe ongeneselijke ziekten (positief). Toch zal het wenselijk zijn om de ethische aspecten rond het gebruik van recombinante enzymen voor een waterzuiveringstoepassing, die zich richt op gevoelige ecologische wateren, nader te bekijken. Verder kan door een duidelijke inventarisatie van mogelijk gevoelige punten rond het vrijkomen van genetisch gemodificeerde organismen, antibioticaresistentiegenen, en recombinant enzym een duidelijk beheersingsbeleid worden gemaakt. Door deze beschermingsmaatregelen kan ook voorkomen worden dat de publieke perceptie negatief wordt beïnvloed.