

Van kassenloof naar natuurlijke gewasbeschermingsmiddelen

| | |
|-----------------|--|
| Datum | Augustus 2013 |
| Auteur(s) | Coen Schuurbijs (TNO) Ronald Vroon (TNO) Willemijn Liese (TNO) Frans Weber (Koppert) Willem Ravensberg (Koppert) Marcel den Ouden (Den Ouden) |
| Aantal pagina's | 36 |
| Aantal bijlagen | 0 |
| Opdrachtgever | Productschap Tuinbouw |
| Projectnummer | 052.01213 |

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van TNO, Koppert en Den Ouden.

Indien dit rapport in opdracht werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de Algemene Voorwaarden voor opdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen de partijen gesloten overeenkomst.

Het ter inzage geven van het rapport aan direct belanghebbenden is toegestaan.

Samenvatting

Het project is opgezet om te onderzoeken of interessante alkaloiden uit tomatenloof (tomatine, tomatidine) en paprikaloof (solanine, solatidine) om te vormen zijn tot een gewasbeschermingsmiddel van natuurlijke oorsprong. Dit zal een boost geven aan de verwaarding van tomatenloof en paprikaloof.

Om deze vraag te beantwoorden heeft het onderzoek zich toegespitst op het opwerken van het loof (zeven en persen), het terugwinnen van de alkaloiden (filtratie en adsorptie), het onderzoeken van de biopesticide werking en het verkennen van de registratiekosten. Daarnaast is er onderzocht of er mogelijkheden zijn het perssap als tussenproduct op te slaan zodat de procesinstallaties kleiner kunnen blijven.

Zowel het tomatenloof als het paprikaloof is met succes gezeefd en geperst onder het verkrijgen van goed opwerkbaar perssap. Met een filtratiekolom proces is het gelukt om alkaloiden met succes terug te winnen. Door het toepassen van extractie kunnen hoge yields (>80%) van alkaloiden worden gehaald. Het opwerkingsproces geeft daarnaast zijstromen die naar eerste inzicht te verwaarden zijn.

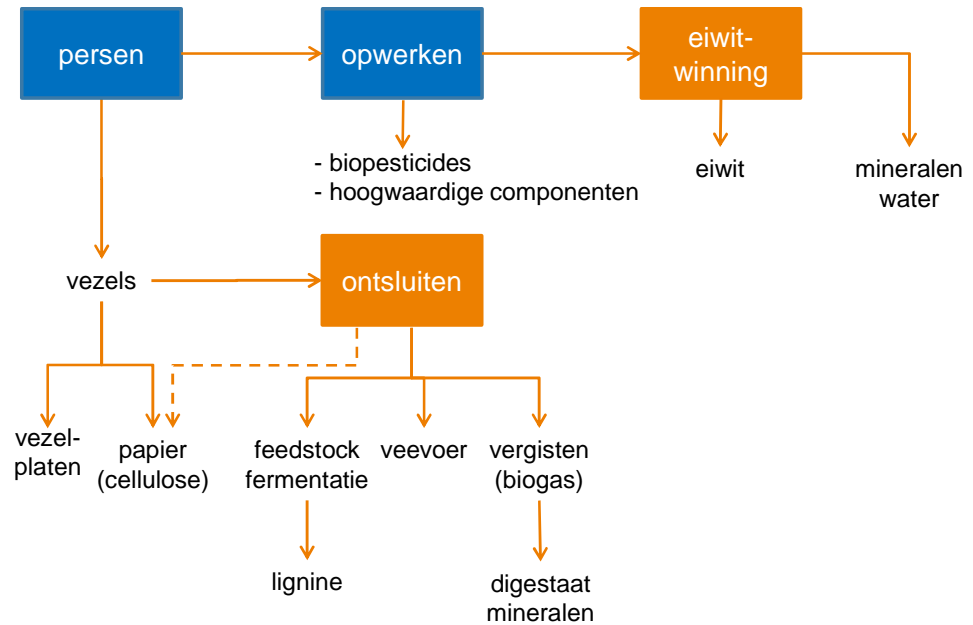
Uit de verschillende opwerkingen van zowel tomatenloofperssap en paprikaloofperssap zijn extracten voortgekomen met werking tegen verschillende typen schimmels. Ook is er werking tegen meeldauw aangetoond voor extract uit tomatenloof. De componenten die werkzaamheid vertonen blijken niet de glycoalkaloiden te zijn, maar een tot nog toe onbekende component. Het is waarschijnlijk dat verschillende stoffen de werkzaamheid tegen meeldauw en de schimmels uit het pythium geslacht verzorgen. Het wordt aanbevolen om in een vervolg onderzoek deze componenten nader te bepalen, te concentreren en terug te winnen.

Het is gelukt om perssap door middel van pH verhoging te stabiliseren voor langer dan 4 maanden zodat de afbraak van alkaloiden vertraagd wordt. Dit maakt een continu proces mogelijk. Vanuit economisch perspectief kan het werken op campagne basis mogelijk kosteneffectiever zijn.

De registratiekosten starten rond de 800 k€ (oplopend tot 2 M€ maximaal). Het registreren van zuivere stoffen is makkelijker dan extracten, ook van extracten moeten de hoofdcomponenten en werkzame componenten bekend zijn. Er gaan stemmen op om voor gewasbeschermingsproducten van biologische oorsprong de registratie in de toekomst te versoepelen.

Concluderend is het niet mogelijk om met de glycoalkaloiden terug gewonnen uit tomatenloof en paprikaloof een gewasbeschermingsproduct te maken, simpelweg omdat de gevonden werking van de extracten niet berust op deze stoffen. Het kassenloof blijft interessant als bron voor een natuurlijke gewasbescherming omdat er wel degelijk goede werking van de extracten is aangetoond tegen verscheidene schimmels en tegen meeldauw (alleen voor een extract uit tomatenloof). Verder onderzoek dient er op gericht te zijn de werkzame componenten nader te identificeren en de opwerking daarop toe te spitsen. Dit kan in combinatie met verdere verwaarding van de overige reststromen.

Voor verdere verwaarding van de overige reststromen zijn er verschillende routes. Mogelijke verwaardingsroutes staan in Figuur A weergegeven.



Figuur A Mogelijkheden voor de verdere verwaarding van de andere reststromen.

Interessant bij het verder ophelderen van de werkzame biopesticide component of componenten is of er ook andere hoogwaardige componenten teruggevonden worden die vermarkt kunnen worden.

Inhoudsopgave

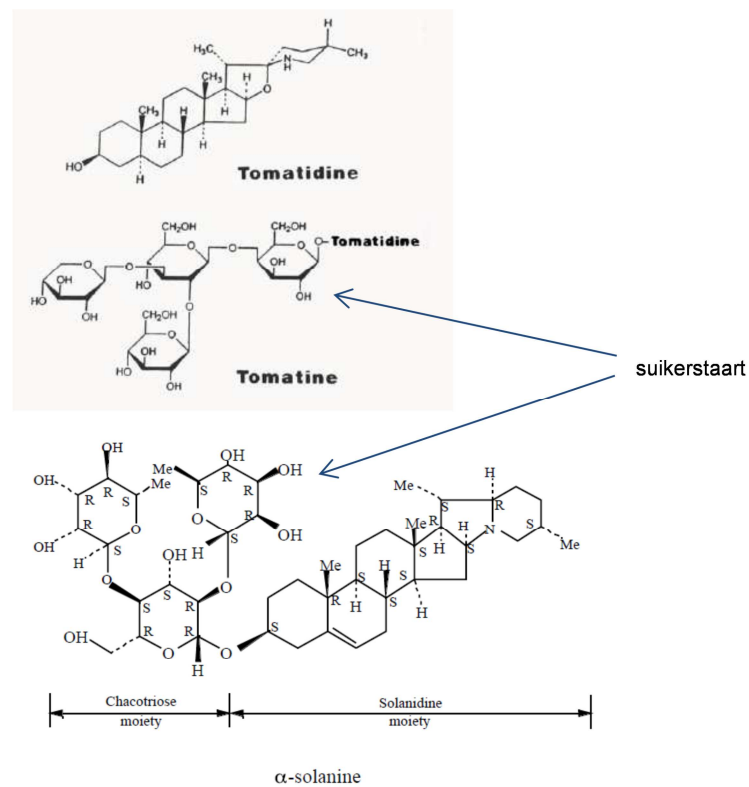
| | | |
|----------|---|-----------|
| | Samenvatting | 2 |
| 1 | Inleiding | 6 |
| 1.1 | Achtergrond | 6 |
| 1.2 | Doelstelling | 7 |
| 1.3 | Aanpak / uitvoering project | 7 |
| 1.4 | Opzet rapport..... | 8 |
| 2 | Zeven en persen van kassenloof | 9 |
| 2.1 | Introductie | 9 |
| 2.2 | Optimale combinatie van zeven en persen | 9 |
| 3 | Opwerken van perssap tot extract..... | 11 |
| 3.1 | Introductie | 11 |
| 3.2 | Opwerking van perssap tot extract | 11 |
| 3.3 | Resultaten verschillende opwerkingen | 13 |
| 3.4 | Resultaten alternatieve opwerkingsroutes..... | 16 |
| 3.5 | Conclusies en aanbevelingen..... | 17 |
| 4 | Stabilisatie van perssap..... | 18 |
| 5 | Gewasbeschermende werking van extract..... | 19 |
| 5.1 | Introductie | 19 |
| 5.2 | Aanpak – Methodeontwikkeling..... | 19 |
| 5.3 | Resultaten petri-schaal testen | 20 |
| 5.4 | Resultaten kasproef..... | 24 |
| 5.5 | Conclusies en aanbevelingen..... | 26 |
| 6 | Registratie onderzoek | 27 |
| 6.1 | Introductie | 27 |
| 6.2 | Registratie van zuivere stof tomatine/solanine | 27 |
| 6.3 | Registratie van kassenloofextract met tomatine/solanine | 28 |
| 6.4 | Inschatting kosten en tijdspad registratie | 28 |
| 7 | Economische analyse | 30 |
| 7.1 | Introductie | 30 |
| 7.2 | Ruwe kostenschatting fase 1..... | 30 |
| 7.3 | Kostenschatting fase 2 | 31 |
| 7.4 | Conclusies en aanbevelingen..... | 33 |
| 8 | Conclusies en aanbevelingen | 34 |
| 8.1 | Conclusies | 34 |
| 8.2 | Aanbevelingen | 35 |
| 9 | Referenties | 36 |

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Loof uit de tuinbouw wordt momenteel als afvalproduct beschouwd terwijl het in wezen kan dienen als een waardevolle grondstof voor een scala aan producten. Uit een studie uitgevoerd samen met Den Ouden is gebleken dat er in het loof van zowel de tomatenplant als de paprikaplant interessante componenten zitten met een biopesticide werking. Het terugwinnen van deze componenten puur dan wel in extractvorm en vervolgens deze gebruiken als natuurlijk gewasbeschermingsmiddel, valoriseert niet alleen het loof, maar vermindert tegelijk het gebruik van chemische en slecht biologisch afbreekbare pesticiden. Ook staat het winnen van deze componenten het verdere gebruik van het loof niet in de weg. Sterker nog, de productie van het perssap waaruit de componenten gewonnen kunnen worden is een logische stap in de productie van vezels en droge massa voor verdere valorisatie. Hiermee vormt het een waardevol onderdeel in de vierkantsverwaarding van kassenloof.

De geselecteerde componenten van interesse zijn tomatine en het afbraakproduct tomatidine (afbraak in deze is het verliezen van de suikerstaart) uit tomatenloof en solanine en het afbraakproduct solanidine uit paprikaloof. Beiden zijn zogenaamde glycoalkaloïden en worden gevormd door de planten als bescherming tegen biologische plagen. De moleculen staan afgebeeld in Figuur 1-1.



Figuur 1-1 Tomatine en tomatidine (boven), solanine en solanidine (onder).

Op basis van (Korthout, 2010) zijn tomatine en solanine geselecteerd uit de bestudeerde literatuur en op basis hun hoge aanwezigheid in de plant (te weten tomaat en paprika). In dit project is er specifiek gekeken naar de opwerking van tomatenloof en paprikaloof en de terugwinning van tomatine en solanine als gewasbeschermingsmiddelen. De ervaringen en conclusies zijn echter ook toepasbaar voor het terugwinnen van andere complexe moleculen van biologische oorsprong uit loof van andere planten.

1.2 Doelstelling

Het doel is te evalueren of het technisch en economisch haalbaar is om grondstoffen voor gewasbeschermingsmiddelen terug te winnen uit tomatenloof en/of paprikaloof en dit om te vormen tot een product dat gebruikt kan worden als gewasbeschermingsmiddel.

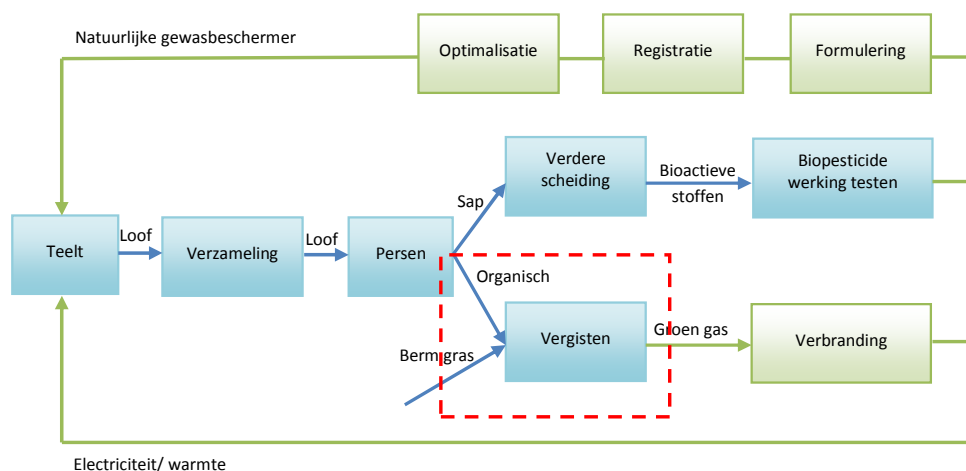
De evaluatie neemt in ieder geval de volgende punten in ogenschouw:

- De technische haalbaarheid en het kostenprofiel van de verschillende stappen in het opwerken van het loof tot gewasbeschermingsmiddel;
- De potentie van het verkregen gewasbeschermingsmiddel in de bestrijding van plagen;
- De uitdagingen en het kostenprofiel van de registratie van een gewasbeschermingsmiddel op basis van tomatenloof en paprikaloof.

Waar mogelijk wordt er aandacht gegeven aan andere mogelijkheden voor het restant van het loof in de wetenschap dat de gewasbeschermingscomponent slechts een onderdeel is van de waardevolle producten uit de opwerking van tomaten- en paprikaloof.

1.3 Aanpak / uitvoering project

De scope van het oorspronkelijke project staat weergegeven in Figuur 1-2 en beschreven in het oorspronkelijke projectplan [Hagen, 2011].



Figuur 1-2 Scope van het oorspronkelijke project plan gevolgd in Fase 1.

Het project besloeg de in blauw weergegeven stukken. Voor het complete beeld zijn in het groen stappen gegeven die na het project nog volgden bij voldoende succesvolle resultaten. Registratie is binnen het project al wel verkend om beter op het netvlies te krijgen wat de kosten en tijdslijnen daarvan zijn.

Tijdens de uitvoering van Fase 1 werd duidelijk dat het noodzakelijk was het project verder te focuseren op de opwerking tot gewasbeschermingsproduct. Het gewasbeschermingsproduct is de component met de meeste waarde. Daarom is de focus verlegd van zowel gewasbeschermers en biogas naar alleen gewasbeschermers. Zowel tomatenloof als paprikaloof zijn meegenomen. Als laatste aanpassing is besloten een aantal extra deelwerkpakketten toe te voegen waaronder als belangrijkste de tussentijdse analyse van het kostenprofiel van de opwerking. Dit staat omschreven in de update van het project plan [Schuurbijs, 2012a].

Bij de hernieuwde aanpak werd ruimte gemaakt om te kunnen schakelen als blijkt dat de focus veranderd moet worden richting een ander onderdeel van de keten.

1.4 **Opzet rapport**

Achtereenvolgens worden de verschillende stappen in het opwerken van tomatenloof en paprikaloof besproken op hoofdlijnen en met specifieke aandacht voor de conclusies en aanbevelingen. Er wordt ingegaan op het zeven en persen van kassenloof (hoofdstuk 2), de opwerking oftewel het winnen van glycoalkaloiden uit het perssap (hoofdstuk 3) en de stabilisatie van het perssap voor opslag (hoofdstuk 4). Het verkregen alkaloidenextract is getest op gewasbeschermende werking, waarvan de resultaten zijn gepresenteerd in hoofdstuk 5. Hoofdstuk 6 geeft een toelichting op de registratie van zuivere glycoalkaloiden of extracten als gewasbeschermingsmiddel. Slotstuk van deze rapportage vormen een economische analyse van het opwerkingsproces (hoofdstuk 7) en de conclusies en aanbevelingen (hoofdstuk 8).

2 Zeven en persen van kassenloof

2.1 Introductie

Het zeven van het tomaten en paprikaloof heeft 2 hoofddoelen:

- 1 Het verwijderen van niet plant bestanddelen zoals touw en plastic die onvermijdelijke meekomen met de oogst
- 2 Het concentreren van de stroom naar persbare plantbestanddelen die naar verwachting ook het grootste deel van de werkzame stoffen bevatten

Om te verifiëren of het perssap het grootste deel van de werkzame stoffen bevatten is er in de loop van het project een proef uitgevoerd waarbij er geëxtraheerd is uit vaste loof bestanddelen (zie paragraaf 3.4).

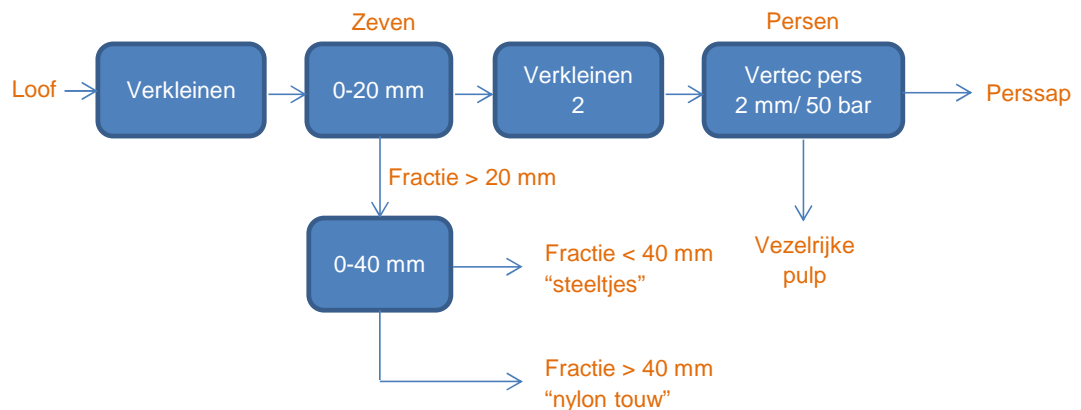
In totaal is er 5 maal tomatenloof en 3 maal paprikaloof verzameld, gezeefd en geperst. De optimale combinatie van zeven en persen staat in sectie 2.2 beschreven.

2.2 Optimale combinatie van zeven en persen

Het proces om te komen tot een optimaal perssap voor het winnen van glycoalkaloiden is nog niet volledig uitontwikkeld. Het zeven is nagenoeg optimaal. De combinatie van 0-20 mm zeven om te scheiden tussen loof/steeltjes + touw werkt goed en ook de opvolgende scheiding tussen de steeltjes en het nylon touw levert voldoende zuivere fracties op voor verdere verwerking.

Bij het persen is er nog een verdere ontwikkeling mogelijk. Tot nu toe levert het dubbel verkleinen en persen met een Vertec pers bij 2 mm gatgrootte en 50 bar persdruk het meest geconcentreerde perssap op (in termen van droge stof per liter perssap). Belangrijk bij het zeven en persen is dat er tussen binnenkomst van loof en het verwerken tot en opslaan van perssap niet meer dan 3 dagen zit. Ontbinding van het plantmateriaal zal anders het zeven en/of persen bemoeilijken en leidt sowieso tot verlies van waardevolle componenten. Het persen zoals in de laatste proeven uitgevoerd leidt tot een goede scheiding met een pulp die goed bruikbaar is voor verdere verwerking en gebruik van de vezels.

Het optimale proces staat weergegeven in Figuur 2-1. Het proces is optimaal voor verdere opwerking via filtratie en absorptie. Bij verandering van het proces van verdere opwerking kunnen aanpassingen aan het zeven en persen noodzakelijk zijn.



Figuur 2-1 Optimale proces voor zeven en persen van loof (zowel tomatenloof als paprikaloof).

Het perssap wordt vervolgens verder opgewerkt met als doel het terugwinnen van glycoalkaloïden. De overige fracties hebben voldoende zuiverheid om als grondstof te dienen voor verdere opwerking.

De verdeling van loof over de verschillende fracties is weergegeven voor tomatenloof en paprikaloof in Tabel 2-1. Dit is een representatief voorbeeld. De fracties hangen ook af van het type tomaat en paprika en meer nog de leeftijd van de plant bij oogsten en hoeveel tijd de plant heeft gelegen na oogsten.

Tabel 2-1 Verdeling van het tomatenloof en paprikaloof over de verschillende fracties.

| Fractie | Tomatenloof [wt%] | Paprikaloof [wt%] |
|------------------------------|----------------------|----------------------|
| Fractie < 20 mm | 77 | 77 |
| Waarbinnen: | | |
| Vezels | 53 | 50 |
| Perssap | 47 | 50 |
| Fractie 20-40 mm (steeltjes) | 10 | 21 |
| Fractie > 40 mm (nylon touw) | 13 | 2 |

Om een stabiel extract te krijgen wordt aangeraden in een vervolg onderzoek nader te kijken naar de invloed van plant ondersoort, leeftijd van de plant, bemestingsmethoden, ziektes die de plant hebben geplaagd en tijdsduur van het opwerken.

De fractie "steeltjes" kan direct als biobrandstof dienen of na verdere verkleining gebruikt worden om vezelplaten te persen of in te zetten bij vergisting, eventueel gecombineerd met de pulp uit het persproces. De fractie kan mogelijk ook gedroogd en afgestorven worden om te dienen als compost in de champignonteelt.

Voor de nylon touwfractie zijn de verdere verwerkingsroutes beperkter. Het is zuiver genoeg om weer als grondstof te dienen voor de kunststofindustrie (1-3 wt% organische vervuiling). Verder zou het omgevormd kunnen worden tot brandstof pellets voor bijstook.

3 Opwerken van perssap tot extract

3.1 Introductie

Middels zeven en persen van kassenloof is een perssap geproduceerd dat vervolgens is opgewerkt tot een extract. Doel van de opwerking was tweeledig. In de eerste plaats om extract te winnen dat gebruikt kon worden in de testen op biopesticide werking. Daarnaast was het doel om de opwerking steeds verder te verbeteren om de terugwinning van tomatine en solanine te verbeteren.

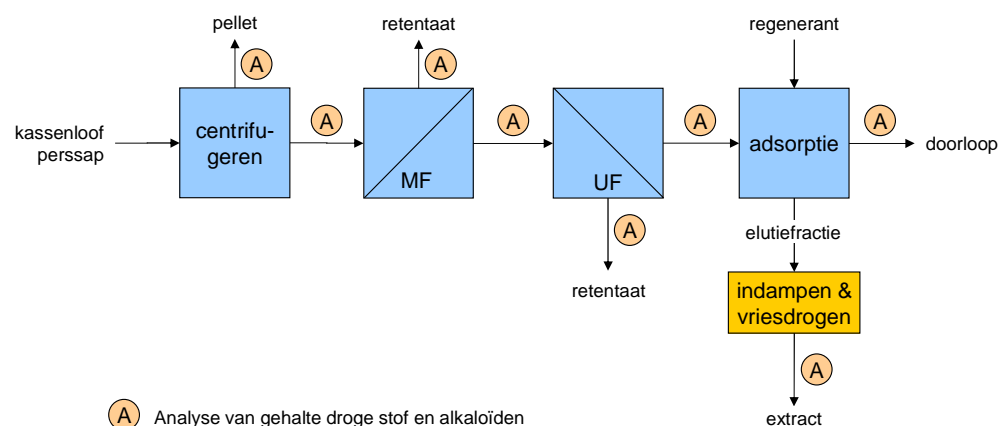
De toegepaste opwerkingsroute was er op gericht om vaste en onopgeloste delen te verwijderen waarna middels een chromatografische scheiding en droogstap een verrijkt alkaloidenextract is verkregen (paragraaf 3.2). De belangrijkste resultaten van de verschillende opwerkingen van tomatenloof- en paprikaloofperssap zijn in paragraaf 3.3 nader toegelicht. Daarnaast zijn enkele alternatieve opwerkingsroutes experimenteel onderzocht, waarvan de resultaten in paragraaf 3.4 zijn beschreven.

3.2 Opwerking van perssap tot extract

3.2.1 Opwerkingsroute voor productie van alkaloidenextract

Perssap van tomatenloof en paprikaloof ("kassenloof") is gefractioneerd volgens onderstaande processtappen (blauw weergegeven in Figuur 3-1):

- 1 Centrifugeren;
- 2 Microfiltratie over 0,45 μm ;
- 3 Ultrafiltratie over 5 kDa;
- 4 Adsorptie van alkaloiden op kolom.



Figuur 3-1 Opwerkingsroute voor productie van alkaloidenextract uit kassenloofperssap.

Centrifugeren is ingezet om de grove onopgeloste delen af te scheiden uit het perssap. Vervolgens zijn de fijnere onopgeloste delen verwijderd middels microfiltratie over 0,45 μm . Het MF-retentaat is de geconcentreerde fractie van onopgeloste delen; het MF-permeaat is helder. Deze eerste processtappen hebben tot doel om alle onopgeloste delen te verwijderen zodat het deeltjesvrije perssap

zonder operationele problemen op een adsorptiekolom kan worden verwerkt. Optioneel is het MF-permeaat verder gefractioneerd middels ultrafiltratie. In deze stap is het perssap gescheiden in twee fracties met componenten groter dan 5 kDa (UF-retentaat) en de alkaloiden en andere componenten kleiner dan 5 kDa (UF-permeaat). Vervolgens is het MF-permeaat of UF-permeaat (wanneer ultrafiltratie gebruikt is) over een adsorptiekolom geleid, waarbij alkaloiden en andere hydrofobe componenten binden aan het resin in de kolom. De doorloopfractie is daardoor vrij van alkaloiden en bevat met name de meer polaire componenten (zoals koolhydraten, eiwitten en zouten). Na adsorptie is de kolom geregenereerd met één of meerdere solvents met als doel de gebonden alkaloiden vrij te maken (elutiefraction). Tot slot is de elutiefraction geconcentreerd en gedroogd tot een extract middels indampen (verwijderen van solvents) en vriesdrogen.

3.2.2 Uitgevoerde opwerkingen

Binnen het project zijn verschillende batches van tomatenloof en paprikaloof perssap opgewerkt tot een extract, waarvan de gewasbeschermende werking is getest door en bij Koppert. Tabel 3-1 geeft een overzicht van uitgevoerde opwerkingen.

Tabel 3-1 Uitgevoerde opwerkingen van kassenloofperssap tot extract.

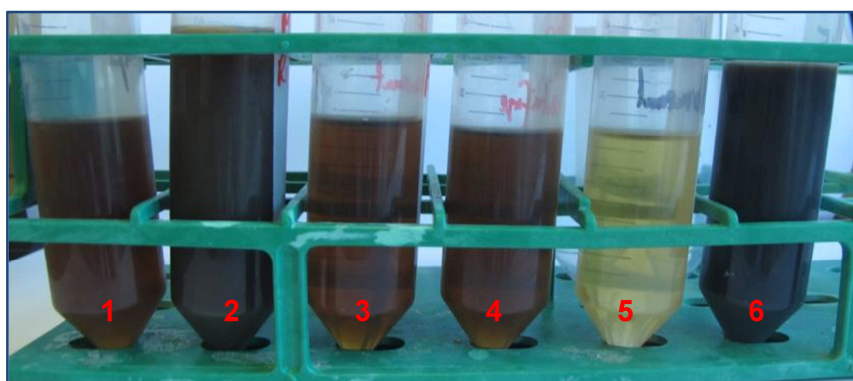
| Exp | Datum | Omschrijving | Verwerkt perssap [kg] | Extract (eluaat) [g DS] |
|-------|-----------|--|-----------------------|-------------------------|
| Run 1 | Aug 2011 | Verkennd labexperiment met tomatenloofperssap | 4,6 | 1 |
| Run 2 | Juni 2012 | Experiment op preparatieve schaal met paprikaloofperssap | 16,0 | 28 |
| Run 3 | Sep 2012 | Experiment op preparatieve schaal met tomatenloofperssap | 16,6 | 15 |
| Run 4 | Feb 2013 | Productierun met tomatenloofperssap | 98,8 | 175 |
| Run 5 | Feb 2013 | Productierun met paprikaloofperssap | 96,5 | 348 |

De eerste 3 opwerkingen (run 1-3) zijn uitgevoerd volgens het processchema weergegeven in Figuur 3-1. Voor de grotere productieruns (run 4 en 5) is besloten om de ultrafiltratie te laten vervallen en hiermee de opbrengst van droge stof en alkaloiden te verhogen.

Met droge stof wordt de totale vaste fractie bedoeld aanwezig in een bepaalde stroom na het volledig laten drogen, dit omvat dus zowel de onopgeloste vaste delen als de opgeloste vaste delen. De onopgeloste vaste delen zijn vaste delen die door middel van reguliere filtratie te verwijderen zijn. Opgeloste vaste delen zijn niet door middel van regulier filtratie te verwijderen.

3.3 Resultaten verschillende opwerkingen

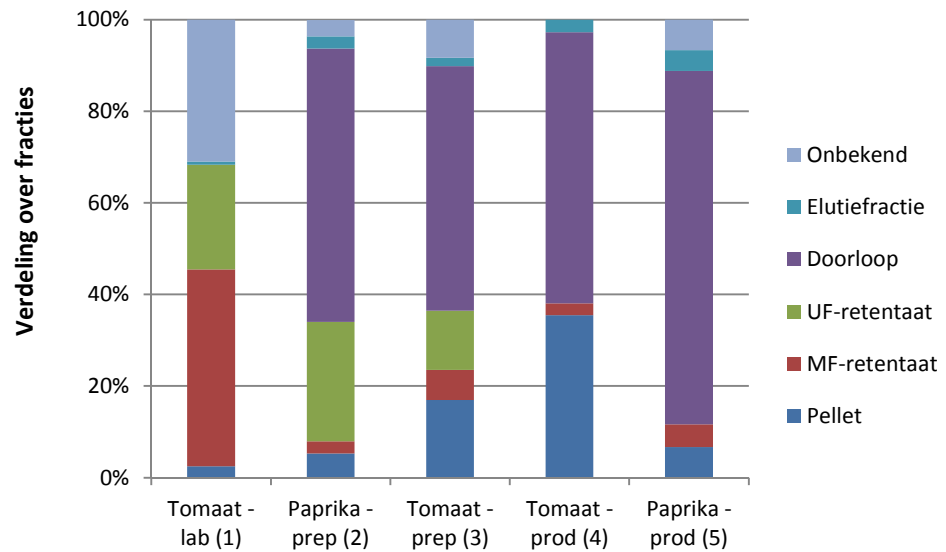
Vijf verschillende batches kassenloofperssap zijn opgewerkt tot een extract volgens het schema in Figuur 3-1. De foto in Figuur 3-2 toont de verschillende fracties na preparatieve opwerking van tomatenloofperssap (run 3). De foto is representatief voor alle 5 de opwerkingen. De fracties zijn geanalyseerd op hoeveelheid droge stof en gehalte aan alkaloiden op basis waarvan de performance van het opwerkingsproces is vastgesteld. Het droge stofgehalte is een eenvoudig te bepalen parameter die informatie geeft over de performance van het proces.



Figuur 3-2 Fracties na opwerking van tomatenloofperssap (run 3): perssap (1), MF-retentaat (2), MF-permeaat (3), supernatant (4), UF-permeaat (5) en UF-retentaat (6).

Resultaten droge stof

De verdeling van droge stof over de verschillende fracties na opwerking van vijf batches perssap is weergegeven in Figuur 3-3. Alle batches tomatenloofperssap bevatten meer onopgelost vast materiaal in vergelijking met het paprikaloofperssap. De afscheiding van deze vaste delen middels centrifugatie (pellet) en microfiltratie (MF-retentaat) bedraagt voor het tomatenloofperssap 24 tot 46% van de totale droge stof; voor paprikaloofperssap blijft dit beperkt tot maximaal 12%. De waargenomen variatie in het aandeel onopgeloste stof is met name veroorzaakt door procesverbeteringen tijdens het persen van de verschillende batches tomatenloof. Deze verbeteringen hebben er toe geleid dat een steeds groter gedeelte van de alkaloiden teruggewonnen kon worden in geconcentreerde vorm (zie resultaten alkaloiden). Uit de massabalans blijkt verder dat met het UF-retentaat 13 tot 26% van alle droge stof wordt afgescheiden; dit zijn vooral componenten met een molecuulgewicht groter dan 5 kDa. Voor bijna alle experimenten geldt dat de doorloopfractie na kolomadsorptie het overgrote deel (53-77%) van de droge stof bevat. Tomaat-lab 1 is hierop een uitzondering, hier zit het grootste deel in het MF retentaat, de oorzaak ligt hem waarschijnlijk in de manier van persen die geleid heeft tot een groter gedeelte grote deeltjes die afgevangen worden bij de microfiltratie. Dit zijn met name de niet-hydrofobe (polaire) verbindingen welke de kolom ongehinderd passeren. De opbrengst aan droge stof in het uiteindelijke extract (elutiefraction) bedraagt 0,7 tot 4,5% van de totale droge stof.



Figuur 3-3 Verdeling van droge stof over verschillende fracties na opwerking van vijf batches perssop.

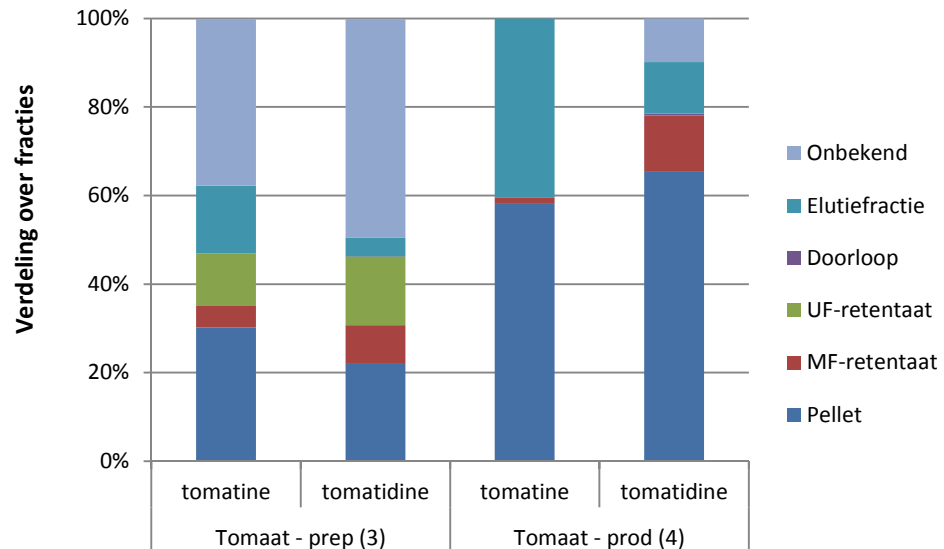
Het laten vervallen van de ultrafiltratie tijdens de productieruns heeft geresulteerd in een verbeterde opbrengst van droge stof in de elutiefraction. Voor het tomatenloofperssop (run 4) bevat deze fractie 4,5% van de totale hoeveelheid opgeloste droge stof (in MF-permeaat). Bij de eerdere opwerking van tomatenloofperssop (run 3) met inzet van ultrafiltratie was de opbrengst van droge stof 2,3%. Voor het paprikaloofperssop is de opbrengst aan opgeloste droge stof verbeterd van 3,0% (run 2, met inzet van ultrafiltratie) naar 5,1% (run 5).

Het wijzigen van de manier van persen van lage druk (4-6 bar) naar hoge druk (~50 bar) gaf een verhoging van de hoeveelheid totaal opgeloste droge stof (van 0.2 g DS/ kg perssop in run 1 naar 1.8 g DS/ kg perssop in run 4). Daarmee is ook de opbrengst aan alkaloiden sterk verbeterd waarschijnlijk doordat een deel van de alkaloiden geadsorbeerd zitten aan vaste delen (= droge stof). Wat ook op valt is dat de opgeloste vaste delen zijn toegenomen door de pers verbeteringen. Dit komt naar voren in de teruggang van het totale aandeel droge stof in de fracties "pellet", "MF-retentaaat" en "UF-retentaaat".

Resultaten alkaloiden

Figuur 3-4 toont de verdeling van de alkaloiden tomatine en tomatidine over de verschillende fracties na opwerking van twee batches tomatenloofperssop. Hieruit blijkt dat 22 tot 65% van alle alkaloiden achterblijft in het pellet na centrifugeren, terwijl verwijdering van alkaloiden via membraanfiltratie 1-13% (MF-retentaaat) bedraagt. Met de ultrafiltratiestap (toegepast in het preparatieve experiment, run 3) wordt nog eens 12-16% van de alkaloiden afgescheiden via het UF-retentaaat. Overall wordt bijna de helft tot driekwart van de alkaloiden in het perssop verwijderd tijdens de processtappen voorafgaand aan de adsorptiekolom; deze fractie alkaloiden is voor een groot deel gebonden aan onopgelost materiaal. De aanzienlijke variatie in verwijdering van alkaloiden is met name veroorzaakt door procesaanpassingen tijdens het persen van de verschillende batches tomatenloof. Het adsorptieproces is goed in staat om nagenoeg alle alkaloiden te binden (< 0.5% in doorloop). De overall massabalans laat zien dat van de alkaloiden in het

perssap 14% tot 40% in het ethanolextract terecht komen. De categorie 'onbekend' is niet toewijsbaar aan de verschillende fracties en komt onder andere voort uit onnauwkeurigheden in de concentratiebepaling.



Figuur 3-4 Verdeling van alkaloiden over verschillende fracties na opwerking van twee batches tomatenloofperssap.

Tabel 3-2 geeft een overzicht van het gehalte alkaloiden (tomatine + tomatidine) in verschillende fracties berekend per kg gezeefd tomatenloof (de 0-20 mm fractie, hiervan komt ~50-79 wt% in het perssap). Uit deze tabel kan worden geconcludeerd dat een aanzienlijk deel van de alkaloiden gebonden is aan onopgelost materiaal. Na afscheiding van persvezels (tijdens persen) en onopgeloste delen (tijdens opwerken) resteert slechts 6 tot 19% van het totale gehalte aan alkaloiden in opgeloste vorm in het MF-permeaat. Hiervan wordt nagenoeg alles gebonden op de adsorptiekolom. Met de beproefde opwerkingsroute is een overall recovery gerealiseerd van 1 tot 18% van de alkaloiden in gezeefd tomatenloof (2-36 % op basis van het perssap). Bij de laatste opwerking is de hoogste opbrengst gerealiseerd. Opgeteld komen de percentages alkaloiden in de persvezels en in het perssap bij "Tomaat-prep (3)" samen niet tot 100 %. Deels komt dit door onnauwkeurigheden in de bepaling. Mogelijk vindt er ook omzetting van de tomatine plaats naar moleculen die niet gemeten worden (tussenproducten van tomatine naar tomatidine of producten van volledige decompositie).

Tabel 3-2 Gehalte alkaloiden (tomatine + tomatidine) in verschillende fracties, uitgedrukt in mg per kg gezeefd tomatenloof.

| Fractie | Gehalte alkaloiden [mg/kg tomatenloof] | | | |
|----------------------------|--|------|-------------------|------|
| | Tomaat - prep (3) | | Tomaat - prod (4) | |
| Tomatenloof (fractie 0-20) | 345.1 | 100% | 257.1 | 100% |
| Persvezels | 253.6 | 73% | n.b. | |
| Perssap | 32.4 | 9% | 117.9 | 46% |
| MF-permeaat | 19.8 | 6% | 47.6 | 19% |
| Elutiefraction | 4.4 | 1% | 47.5 | 18% |

In de twee batches paprikaloofperssap zijn geen significante hoeveelheden alkaloiden aangetroffen. Het perssap had een totaalgehalte aan alkaloiden van maximaal 2 mg/kg, wat verwaarloosbaar is t.o.v. de 91 en 253 mg/kg perssap welke zijn aangetroffen in de batches tomatenloofperssap.

3.4 Resultaten alternatieve opwerkingsroutes

Extractie van verkleind tomatenloof

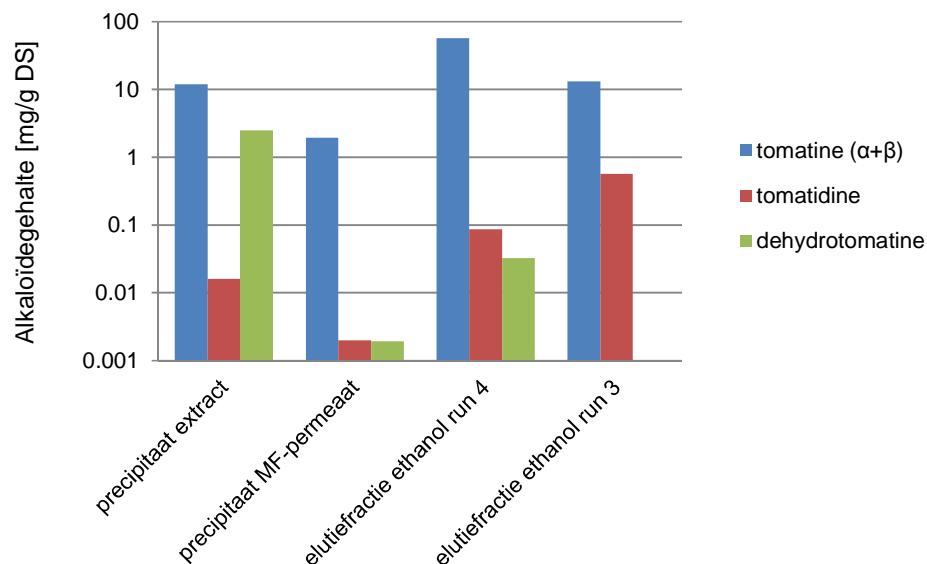
Extractie van kassenloof is experimenteel onderzocht als alternatief voor het persen met als doel het verbeteren van de opbrengst aan alkaloiden. Analyses lieten zien dat een groot deel van de alkaloiden achter bleef geadsorbeerd aan vezels en andere vaste onopgeloste delen. Resultaten hebben aangetoond dat vrijwel alle alkaloiden kunnen worden vrijgemaakt uit verkleind tomatenloof middels een zure extractie met 5% azijnzuur. Met extractie kan de recovery van alkaloiden met een factor 4 tot 6 worden verbeterd, wat betekent dat een overall recovery van >80 % binnen bereik komt. De toepassing van een extractiemiddel heeft tot gevolg dat de hoeveelheid te verwerken vloeistof sterk zal toenemen in vergelijking met persen (factor 3 tot 11).. Dit heeft gevolgen voor de grootte en dus kosten van de procesapparatuur. Deze toename kan wellicht worden beperkt door het loof na verkleining te mengen met geconcentreerd zuur, gevolgd door een persstap.

Precipitatie van alkaloiden

Tot slot is gekeken naar de mogelijkheid om alkaloiden uit perssap te winnen middels een precipitatiestap met als doel het vereenvoudigen van het opwerkingsproces. De precipitatie van alkaloiden in MF-permeaat van tomatenloofperssap en een zuur extract van tomatenloof is gerealiseerd door de pH te verhogen tot boven pH 10. Hiermee is een aanzienlijk deel van de alkaloiden geprecipiteerd uit beide oplossingen, waarbij het overall rendement 63 tot 80% bedraagt. De invloed op de activiteit is niet nader onderzocht, maar hoeft niet negatief te zijn. De verlaging van de pH ter stabilisatie (zie hoofdstuk 4) is er vooral op gericht om biologische activiteit die de alkaloiden aantast te stoppen.

De samenstelling en daarmee de zuiverheid van het eindproduct is afhankelijk van de methode van opwerking. Voor de precipitaten uit extract en MF-permeaat is de hoeveelheid alkaloiden per gram droge stof berekend (zie Figuur 3-5). Deze resultaten zijn vergeleken met de ethanol elutiefractionen van de opwerking van februari 2013 (run 4) en september 2012 (run 3). Geconcludeerd kan worden dat

met het adsorptieproces zoals is toegepast tijdens de productierun van februari 2013 een product wordt verkregen met het hoogste gehalte aan alkaloiden (per gram droge stof): 57 mg t.o.v. 14 mg/g DS voor het geprecipiteerde extract.



Figuur 3-5 Zuiverheid van verschillende alkaloidenfracties geïsoleerd uit tomatenloof (uitgedrukt in mg per gram droge stof).

3.5 Conclusies en aanbevelingen

De opwerkingsexperimenten hebben inzichtelijk gemaakt dat na verwijdering van onopgeloste delen (middels microfiltratie) de alkaloiden effectief kunnen worden gewonnen middels kolomadsorptie gevolgd door elutie met ethanol. Procesaanpassingen (zoals het laten vervallen van ultrafiltratie en elutie met een ethanol/water-gradiënt) hebben er toe bijgedragen dat het DS-rendement is verbeterd en dat het gehalte alkaloiden in het extract is toegenomen.

De beperkte overall recovery (18% van alkaloiden in gezeefd tomatenloof) kan met een factor 4-6 worden verbeterd door het kassenloof na verkleining te extraheren met azijnzuur, gevolgd door persen.

Een basische precipitatie van alkaloiden biedt de mogelijkheid om deze componenten op relatief eenvoudige wijze in handen te krijgen. De concentratie alkaloiden in het extract is daarbij wel lager dan bij het kolomadsorptie proces.

4 Stabilisatie van perssap

Tomatenloof en paprikaloof bevatten interessante alkaloiden, die geëxtraheerd kunnen worden in een installatie die het hele jaar door wordt bedreven. Echter, het loof wordt 1 tot 3 maal per jaar geoogst en daarna direct geperst. Het perssap moet dus maandenlang bewaard worden zonder dat er een verlies (afbraak) is van de alkaloiden.

De meest voor de hand liggende afbraak is biologische afbraak door micro-organismen. Om deze activiteit te minimaliseren is voorgesteld om het sap te bewaren onder anaerobe zure omstandigheden. Stabilisatie van perssap is bepaald voor verschillende bewaarcondities. Tijdens het bewaren is de pH gevolgd in de tijd en is het gehalte aan alkaloiden voor een aantal monsters bepaald.

De beste conservering van alkaloiden is te verwachten bij een lage pH. Analyses hebben aangetoond dat het tomatinegehalte 4 maanden constant blijft in een monster dat op pH3 is gebracht met azijnzuur. Het gebruik van zuur om de pH te verlagen is relatief duur. Beter zou zijn als de suikers aanwezig omgezet zouden kunnen worden tot zuren en in-situ zorgen voor de benodigde verzuring (inkuilen). Enten met melkzuurvormende bacteriën leidde wel tot een lagere pH, maar niet voldoende om afbraak van alkaloiden te voorkomen (bij tomatenloofperssap), mogelijk wordt dit juist veroorzaakt door de remmende werking van alkaloiden. In paprikaloofperssap, waar slechts lage hoeveelheden alkaloiden in aanwezig zijn is de bereikte pH bij enten lager, wat wijst op een hogere activiteit van zuurvormende micro-organismen.

Conservering door middel van azijnzuur toevoeging kan wellicht worden gecombineerd met een extractieve persing van kassenloof. In deze alternatieve opwerkingsroute wordt kassenloof na verkleining geëxtraheerd met azijnzuur, gevolgd door persen van de vezels. Het verkregen perssap is op deze wijze al aangezuurd en zal gedurende een aantal maanden kunnen worden opgeslagen met behoud van alkaloiden.

5 Gewasbeschermende werking van extract

5.1 Introductie

Vanuit TNO zijn in de loop van het project driemaal verschillende tomatenloof en paprikaloof extracten opgewerkt en verzonden naar Koppert. Deze extracten zijn door Koppert getoetst als fungicide tegen verschillende schimmels. Hiervoor zijn twee type experimenten toegepast:

- *Lab-toets*

Het extract wordt in verschillende concentraties door een voedingsagar gemengd. Vervolgens is de groeisnelheid van de te testen plantpathogene schimmel bepaald en vergeleken met een onbehandelde Petri-schaal.

- *Kas-proef*

De verschillende extracten worden gespoten over een komkommer gewas met meeldauw. De effectiviteit van deze extracten ten op zichte van een onbehandelde en een chemische referentie is bepaald.

De experimenten zijn uitgevoerd met extracten ontvangen op de volgende momenten:

- September 2011 (tomatenloofextract van run 1)
- Oktober 2012 (tomatenloofextract van run 3 en paprikaloofextract van run 2)
- Maart 2013 (tomatenloofextract van run 4 en paprikaloofextract van run 5)

De labtoets is driemaal uitgevoerd, met alle ontvangen extracten. De toets in de kas is alleen uitgevoerd met de extracten ontvangen in maart 2013.

5.2 Aanpak – Methodeontwikkeling

Labtoets

In deze methode wordt de radiale groeisnelheid van een schimmel op een voedingsbodem waaraan verschillende concentraties extract zijn toegevoegd bepaald en vergeleken met een controle plaat (voedingsbodem zonder toegevoegd extract).

Potato Dextrose Agar (PDA) wordt geautoclaveerd bij 121°C voor 20 min. Na het autoclaveren is de agar in een waterbad van 55 °C geplaatst. Van de verschillende extracten is een stock-oplossing in water of een 10 mM HCl oplossing gemaakt. Deze stockoplossingen zijn filter gesteriliseerd en steriel toegevoegd aan de warme vloeibare agar. Vervolgens zijn direct Petrischalen met een diameter van 45mm gevuld met 5 ml agar.

Deze Petri-schalen zijn aan een rand be-ent met een agar-ponsje afkomstig van een PDA plaat met daarop de te toetsen plant-pathogene schimmel. (Afkomstig uit de -80 °C cultuurcollectie van Koppert). De be-ente Petrischalen worden geïncubeerd in een stoof van 23 °C. Op regelmatige tijdstippen is de grootte van de

schimmelkolonie opgemeten met een liniaal. Met behulp van deze resultaten is de radiale groeisnelheid bepaald. Vervolgens is remming t.o.v. de onbehandelde plaat berekend.

Alle bepalingen zijn in triplo uitgevoerd.

Kasproef

Het EPPO (European Plant Protection Organization) protocol PP1/57(3) is gebruikt voor deze proef. Met meeldauw geïnfecteerde komkommerplanten zijn twee maal met een week interval bespoten met de verschillende extracten. Aan alle extracten was een uitvloeier toegevoegd. Voor en na elke bespuiting is de aantasting van de planten beoordeeld volgens de 0-5 index zoals beschreven in bovenstaand protocol.

5.3 Resultaten petri-schaal testen

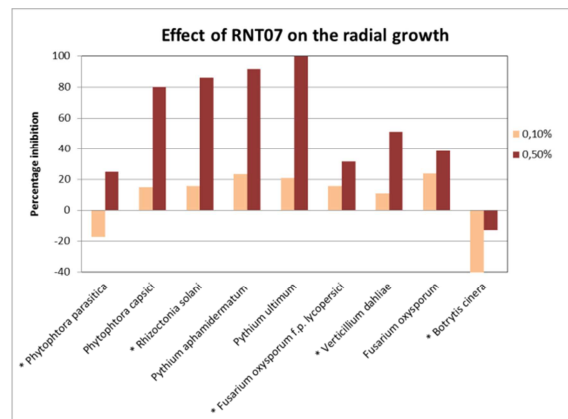
In onderstaande foto (Figuur 5-1) is een voorbeeld weergegeven van een experiment. Duidelijk is te zien dat de schimmel (*Pythium ultimum*) in de linker controle Petrischaal volledig volgroeid is. In de plaat met 0,1% tomaten extract (rechts) is iets groeiremming, bij 0,5% (midden) is de groei volledig geremd.



Figuur 5-1 Petrischaal labtoets met *Pythium ultimum*; controle (links), 0,5% (midden) en 0,1% tomatenloofextract (rechts).

Resultaten Experiment september 2011

In dit experiment is sample 'RNT07.2226.P191' (opgezuiverd tomatenextract) getoetst. Dit extract is het resultaat van de opwerking tomatenperssap in run 1. De alkaloiden concentratie in dit extract is onbekend. Toentertijd werd de concentratie bepaald met behulp van de onnauwkeurig gebleken Liquid Chromatography methode.



Bij 0.5 wt% is een duidelijke werking tegen vooral de twee soorten pythium schimmels zichtbaar.

Resultaten Experiment Oktober 2012

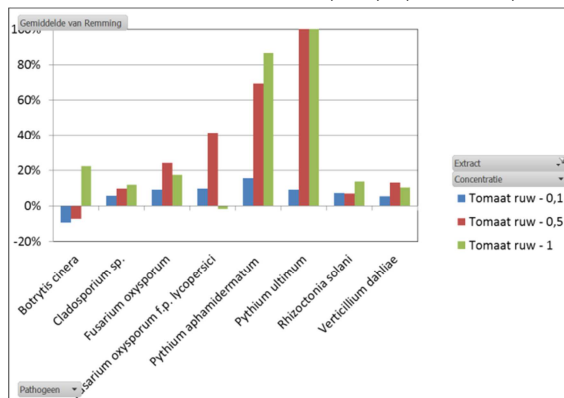
De concentraties aan alkaloiden van het ruwe tomatenperssap en het opgezuiverde tomatenperssap staan gegeven in Tabel 5.1. Het ruwe en gezuiverde extract is verkregen uit opwerking "run 2" voor het paprikaloofsap extract en "run 3" voor het tomatenloofsap extract. De concentraties aan alkaloiden in het paprikaloofperssap waren zo laag dat er geen noemenswaardig terugwinning mogelijk was (het perssap bevatte 0.03 mg/kg perssap aan alkaloiden).

Met ruw tomatenloofperssap wordt bedoeld het gedroogde extract van het permeaat van de ultrafiltratie stap, het opgezuiverde extract is het verkregen extract na adsorptie en elutie in de adsorptie stap in het opwerkingsproces.

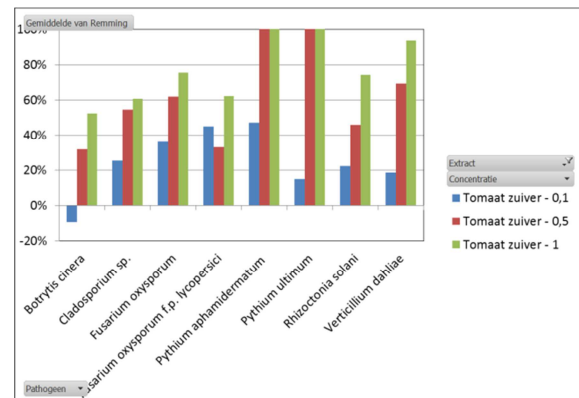
Tabel 5-1 Gehalte alkaloiden (tomatine + tomatidine) in de verschillende oplossingen

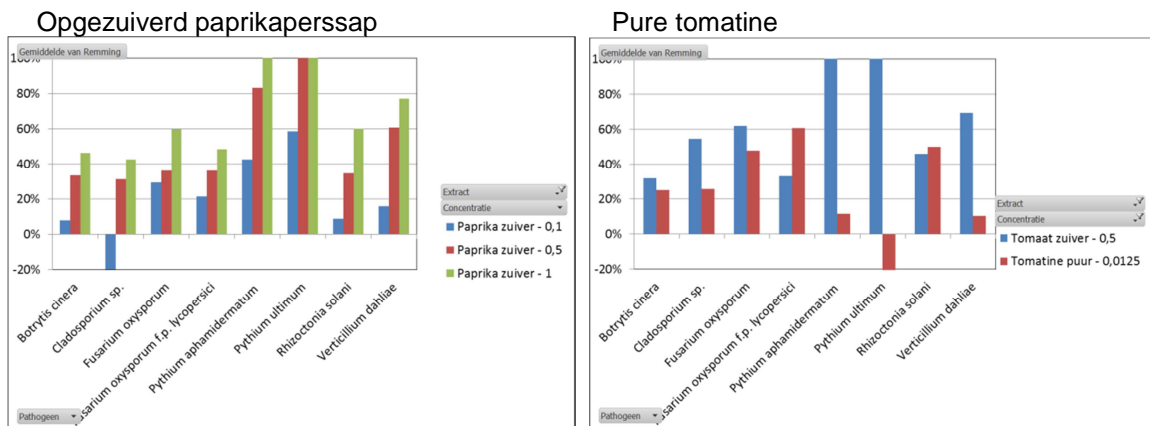
| Type | Droge stof | 0.1 wt% | 0.5 wt% | 1.0 wt% |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| | alkaloidenconcentratie [mg/ g DS] | [mg/ L] | [mg/ L] | [mg/ L] |
| Ruw tomatenloofperssap | 1.1 | 1.1 | 5.5 | 11 |
| Opgezuiverd tomatenloofperssap | 13.6 | 13.6 | 68 | 136 |

Ruw tomatenperssap Geteste concentraties: 0,1%; 0,5% en 1,0%



Opgezuiverd tomatenperssap





Wederom is er een goede werking tegen schimmels van het pythium geslacht zichtbaar voor zowel het extract op basis van tomatenloof als het extract op basis van paprikaloof. Beide extracten tonen ook een redelijke werking tegen Verticillium Sp.. Op grond van de dosis alkaloiden verwacht je eenzelfde werking voor de 0.1 wt% opgezuiverde tomatenloofperssap als voor de 1.0 wt% ruw tomatenloofperssap. Dit gaat niet op. Op sommige van de geteste schimmels werkt de 0.1 wt% gezuiverde tomatenloofperssap beter dan het 1.0 wt% ruw tomatenloofperssap en vice versa. Het extract geeft bij hogere concentraties wel een veel betere werking dan het ruwe tomatenloofperssap over de hele linie. De adsorptie stap concentreert naar de tegen deze schimmels werkzame componenten.

Het opgezuiverde paprikaloofperssap laat een redelijke werking zien terwijl hierin nauwelijks alkaloiden zijn aangetroffen. Hiermee rijst de vraag of de alkaloiden wel de werkzame stof zijn in het extract. Er is geanalyseerd op nog aanwezige resten bestrijdingsmiddelen, deze zijn niet in hoge concentraties aangetroffen. Dit wordt verder bevestigd door de werking van pure tomatine (gekocht bij Sigma-Aldrich). Tomatine puur is niet werkzaam tegen de pythium, het extract duidelijk wel.

Resultaten Maart 2013

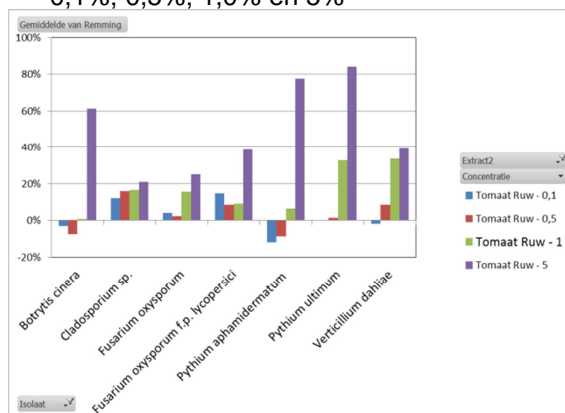
De concentraties aan alkaloiden van het ruwe tomatenperssap en het opgezuiverde tomatenperssap staan gegeven in Tabel 5.2. Het ruwe en gezuiverde extract is verkregen uit opwerking "run 5" voor het paprikaloofsap extract en "run 4" voor het tomatenloofsap extract. De concentraties aan alkaloiden in het paprikaloofperssap waren zo laag dat er geen noemenswaardig terugwinning mogelijk was (het perssap bevatte 1.8 mg/kg perssap aan alkaloiden).

Met ruw tomatenloofperssap wordt bedoeld het gedroogde extract van het permeaat van de microfiltratie stap, het opgezuiverde extract is het verkregen extract na adsorptie en elutie in de adsorptie stap in het opwerkingsproces. In deze opwerkingen was geen ultrafiltratie aanwezig.

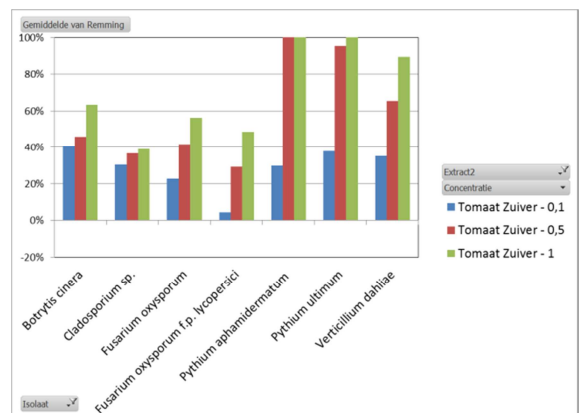
Tabel 5-2 Gehalte alkaloiden (tomatine + tomatidine) in de verschillende oplossingen

| Type | Droge stof | 0.1 wt% | 0.5 wt% | 1.0 wt% | 5.0 wt% |
|--------------------------------|------------|---------|---------|---------|---------|
| alkaloidenconcentratie | [mg/ g DS] | [mg/ L] | [mg/ L] | [mg/ L] | [mg/L] |
| Ruw tomatenloofperssap | 2.6 | 2.6 | 13 | 26 | 130 |
| Opgezuiverd tomatenloofperssap | 57 | 57 | 285 | 570 | NA |

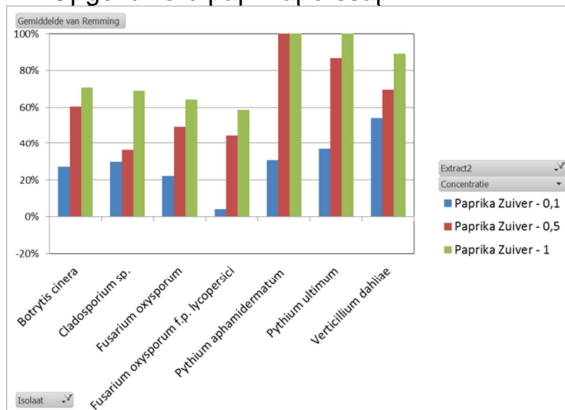
Ruw tomatenperssap
0,1%; 0,5%; 1,0% en 5%



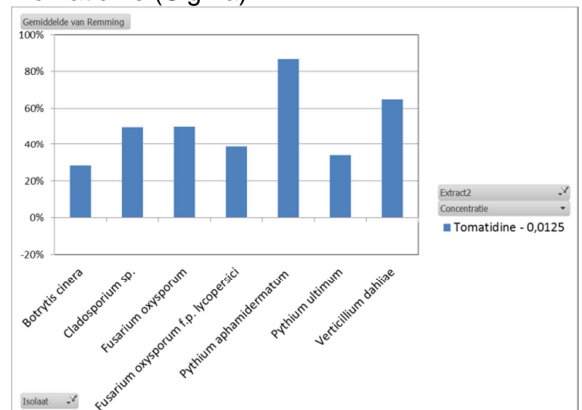
Opgezuiverd tomatenperssap



Opgezuiverd paprikaperssap



Tomatidine (Sigma)



De resultaten die we in de preparatieve biopesticide agar testen hebben gezien worden bij deze testen min of meer herhaald. Er zijn een aantal verschillen. Het ruwe perssap (in dit geval permeaat van de microfiltratie) toont veel minder werking in de agar testen. De ultrafiltratie stap zorgt waarschijnlijk voor een betere zuivering richting de werkzame component of componenten. De hoeveelheid tomatine is veel hoger in het geteste extract terwijl de werking ongeveer gelijk blijft. Dit is een verdere bevestiging dat de werking niet gekoppeld lijkt te zijn aan de aanwezigheid van alkaloiden. Opgezuiverd paprikaloofsap toont een vergelijkbare werking als opgezuiverd tomatenloofsap terwijl hier nauwelijks alkaloiden in zijn aangetroffen. Op zich hebben alkaloiden wel een werking zoals te zien is aan de testen met pure tomatidine in vergelijkbare concentraties. De werking van tomatidine is minder goed dan de werking van het extract.

5.4 Resultaten kasproef

Op 9 april is de meeldauw aantasting beoordeeld (0-5 schaal. 0: geen aantasting, 5: geen zware aantasting). Op dezelfde dag zijn de planten bespoten. Op 11-april (2 dagen na toepassing A) zijn de planten weer beoordeeld. In behandeling 2, is de meeldauw aantasting minder geworden, bij de overige behandelingen is deze ongeveer gelijk gebleven of zelfs toegenomen. Bij de laatste beoordeling (18 april: 2 dagen na de 2e keer bespuiten) is de meeldauw aantasting in deze behandeling nog steeds laag, en vergelijkbaar met de chemische referentie (behandeling 8). In de overige behandelingen is de meeldauw aantasting fors toegenomen. De resultaten staan weergegeven in Tabel 5.4.

In treatment 2 was op het einde van de proef lichte schade aan het gewas veroorzaakt door de behandeling zichtbaar.

De effectieve concentraties aan alkaloiden staan gegeven in Tabel 5.3.

Tabel 5-3 Gehalte alkaloiden (tomatine + tomatidine) in de verschillende spuitoplossingen

| Type | Droge stof | 0.2 wt% | 2.0 wt% | 8.0 wt% |
|--------------------------------|------------|---------|---------|---------|
| alkaloidenconcentratie | [mg/ g DS] | [mg/ L] | [mg/ L] | [mg/ L] |
| Ruw tomatenloofperssap | 2.6 | NA | NA | 208 |
| Opgezuiverd tomatenloofperssap | 57 | 114 | 1140 | NA |

Behandeling 2 betreft behandeling met het ruwe tomatenloofperssap. In deze 8 wt% oplossing zit 5 keer minder tomatine dan in de 2.0 wt% extract oplossing. Het is dus niet de tomatine die werkzaamheid toont tegen meeldauw.

Ook kun je concluderen dat de werkzame stof niet geconcentreerd wordt in de adsorptiekolom. Daarmee wordt aannemelijk dat andere stoffen werkzaam zijn tegen meeldauw dan tegen de schimmels in de agar testen. Mogelijk zijn deze ieder apart te winnen en te verwaarden.

Tabel 5-4 Resultaten van de spuitproeven van de verschillende oplossingen

| Rating Date | | 9-Apr-2013 | 11-Apr-2013 | 15-Apr-2013 | 18-Apr-2013 | |
|--------------------|------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Trt-Eval Interval | | 0 DA-A | 2 DA-A | 6 DA-A | 2 DA-B | |
| Trt No. | Treatment Name | Rate | Rate | Rate | Rate | |
| | | Unit | | | | |
| 1 | Uitvloeier | 0,01 % v/v | 2,3 a | 2,4 Ab | 3,4 A | 4,5 a |
| 2 | Tomaat extract Ruw | 8 % w/v | 2,1 a | 1,3 C | 1,5 B | 2,1 b |
| | Uitvloeier | 0,01 % v/v | | | | |
| 3 | Tomaat extract Zuiver | 0,2 % w/v | 2,0 a | 2,3 Ab | 3,4 A | 4,5 a |
| | Uitvloeier | 0,01 % v/v | | | | |
| 4 | Tomaat extract Zuiver | 2,0 % w/v | 2,2 a | 1,8 Bc | 3,2 A | 4,2 a |
| | Uitvloeier | 0,01 % v/v | | | | |
| 5 | Paprika extract Zuiver | 0,2 % w/v | 2,4 a | 2,9 A | 3,3 A | 4,8 a |
| | Uitvloeier | 0,01 % v/v | | | | |
| 6 | Paprika extract Zuiver | 2,0 % w/v | 2,0 a | 1,7 Bc | 3,4 A | 4,4 a |
| | Uitvloeier | 0,01 % v/v | | | | |
| 7 | Tomaat extract Zuiver | 0,2 % w/v | 2,1 a | 1,9 Bc | 3,0 A | 4,3 a |
| | Paprika extract Zuiver | 0,2 % w/v | | | | |
| | Uitvloeier | 0,01 % v/v | | | | |
| 8 | ROCKET | 0,1 % v/v | 2,2 a | 2,2 Ab | 2,3 A | 2,0 b |
| LSD (P=.05) | | | 0,49 | 0,62 | 0,75 | 0,41 |
| Standard Deviation | | | 0,28 | 0,35 | 0,43 | 0,23 |
| Bartlett's X2 | | | 8,123 | 10,557 | 3,986 | 3,546 |
| P(Bartlett's X2) | | | 0,322 | 0,159 | 0,781 | 0,83 |

Means followed by same letter do not significantly differ (P=.05, Student-Newman-Keuls)

5.5 Conclusies en aanbevelingen

Labtoetsen

- In alle drie de testen uitgevoerd op verschillende tijden met monster verkregen van verschillende extracties zijn de verkregen resultaten min of meer gelijk
- Beide *Pythium* soorten worden volledig geremd door de opgezuiverde fracties van tomaat en paprika vanaf 0.5 % oplossing
- De andere schimmels worden bij de geteste concentraties niet volledig geremd door de opgezuiverde fracties van tomaat en paprika
- De resultaten van de verschillende agarplaat testen laten zien dat de werkzame stof in de extracten waarschijnlijk niet de alkaloiden zijn, maar een tot nu toe onbekende component of componenten
- Het verschil in werkzaamheid tussen het ruwe tomatenloofperssap en het extract verkregen uit de adsorptiekolom bij de agartesten laat zien dat de adsorptiestap wel selecteerd naar de componenten werkzaam tegen schimmels van het pythium geslacht.

Kasproef

Uit de kasproef kwam duidelijk naar voren dat het ruwe sap een component bevat die meeldauw remt. Dit ruwe sap wordt gevormd door de droge fractie van het permeaat van de microfiltratiekolom. Echter in de extracten waarin het tomatine gehalte is verhoogd met behulp van adsorptiechromatografie (zie Hoofdstuk 3) bleek de meeldauw remmende fractie niet aanwezig te zijn. Dit geeft aan dat de adsorptie kolom niet selecteert naar de tegen meeldauw werkzame component of componenten.

Bij de start van dit project was de hypothese dat de glycoalkaloiden tomatine en solanine de componenten zijn in tomaat en paprika welke schimmeldodend kunnen zijn. Uit de kasproef blijkt dat tomatine niet de actieve stof is in het tomatenloofsap. Dit is een verdere bevestiging van wat we bij de labtoetsen gezien hebben.

Ondanks het feit dat tomatine niet de actieve stof is, blijkt het ruwe sap wel een component te bevatten welke een werking tegen meeldauw heeft. Het sap kan in de huidige vorm niet gebruikt worden omdat:

- 1) er schade optreedt na herhaalde bespuitingen met dit extract
- 2) de dosering (80 g/l) waarmee werking gevonden is, nog erg hoog is

In een vervolg onderzoek kan het interessant zijn om te bepalen wat de werkzame component in het ruwe sap is en deze verder te concentreren zodat de noodzakelijke dosering lager wordt en ook de plantschade wordt gereduceerd.

6 Registratie onderzoek

6.1 Introductie

Een belangrijk onderdeel van het op de markt brengen van een nieuw gewasbeschermingsmiddel vormt de registratie van het gewasbeschermingsmiddel. Om hier een beter zicht op te krijgen is er een onderzoek uitgezet bij een extern bureau dat gespecialiseerd is in de betrokken wetgeving. Het rapport dat ze hebben opgeleverd vormt de basis van dit hoofdstuk [ENVIRON, 2012].

De registratie van een gewasbeschermingsmiddel wordt gereguleerd door een specifieke EU-richtlijn [EU 1107/2009], welke vereisten beschrijft voor de toelating van een gewasbeschermingsmiddel binnen de EU. Implementatie van genoemde richtlijn vereist een gedetailleerde dossieropbouw [EU 544/2011]. Hoofdcategorieën zijn:

- 1 Identiteit actief bestanddeel;
- 2 Fysische en chemische eigenschappen actieve bestanddeel;
- 3 Gegevens over de actieve stof in relatie tot werkingsmechanisme en effecten op schadelijke organismen;
- 4 Analysemethoden;
- 5 Studies naar het toxicologische profiel en het metabolisme van de actieve stof;
- 6 Residu-analyse op de plant;
- 7 Analyses naar wat er mee gebeurt in het milieu/ ecotoxicologische studies.

Het opbouwen van het dossier is tijdsintensief en kostbaar, maar kan verkort en goedkoper worden als er in de literatuur al veel over de actieve stoffen of het extract vermeld en onderzocht is. Het, in het algemeen, duurste onderdeel van het dossier zijnde het toxicologische profiel, is nader onderzocht in de beschikbare literatuur om te bepalen welke onderzoeken noodzakelijk zijn en wat de kosten zullen zijn van de registratie van tomatine/tomatidine, solanine/solanidine of extracten daarvan. Daarna is op basis van deze informatie een inschatting gemaakt van de kosten van de opbouw van het dossier in het gunstigste scenario en in het minst gunstige scenario.

6.2 Registratie van zuivere stof tomatine/solanine

In de literatuur is er veel meer informatie beschikbaar over solanine dan over tomatine, omdat solanine ook in aardappel voorkomt en geassocieerd wordt met ziektebeelden, ongemak en zelfs vergiftigingen bij het eten van aardappels.

Toch geldt voor beide componenten dat het grootste deel van het toxicologische profiel door het uitvoeren van onderzoeken opgebouwd zal moeten worden. Voor solanine geldt wel dat onderzoeken naar toxiciteit voor de ongeboren vrucht en op de voortplanting niet nodig zijn, daarvoor is voldoende literatuur (dit scheelt bijna 400 k€). Voor zowel tomatine als solanine geldt als significante andere mogelijke uitzondering het onderzoek naar lange termijn toxiciteit en carcinogene effecten. Onderzoeken hiernaar kosten ruwweg 400 k€ en kunnen mogelijk weggelaten

worden onder de argumentatie dat tomaten en paprika's, die ook deze stoffen bevatten, al lange tijd gegeten worden zonder toxische en carcinogene effecten. De concentraties in de vrucht zijn wel een stuk lager en de omissie zal uitvoerig overlegd moeten worden met het bevoegd gezag.

6.3 Registratie van kassenloofextract met tomatine/solanine

Er is in de literatuur geen informatie beschikbaar over extracten gevormd uit het loof en de plant van tomaat en paprika. Er is hier en daar wat informatie te vinden over de effecten van extracten van de paprikavruucht en tomatenvruucht, maar deze zijn niet bruikbaar. Dit betekent dat voor het extract het gehele dossier zal moeten worden opgebouwd met als bijkomende complexiteit dat niet exact duidelijk is wat de werkzame stoffen zijn.

Wel gaan er in Europa stemmen op om de wetgeving gerelateerd aan gewasbeschermingsproducten van natuurlijke oorsprong los te weken van gewasbeschermingsproducten van synthetische oorsprong. Mogelijk leidt dit tot versimpelde en vooral goedkopere registratie voor gewasbeschermingsproducten die een biologische oorsprong hebben.

6.4 Inschatting kosten en tijdspad registratie

Naast de kosten voor het opstellen van een toxicologisch profiel zijn ook schattingen voor het opstellen van de rest van het dossier gemaakt door Koppert in samenwerking met Environ. Er wordt onderscheid gemaakt tussen een *best-case* en een *worst-case*. Bij de *best-case* kan er optimaal gebruik gemaakt worden van de beschikbare literatuur en hoeft er bijvoorbeeld geen studie gemaakt te worden naar de lange termijn toxicologische effecten en carcinogene effecten. Daarnaast zijn alle onderzoeken aan de onderkant van de range in kosten. In de *worst-case* zijn alle onderzoeken noodzakelijk en vallen ze allemaal in de max van de kostenrange. De daadwerkelijke kosten vallen daar ergens tussen. Waar precies is sterk afhankelijk van overleg met het bevoegd gezag en de precieze samenstelling van het product en de noodzakelijke dosering.

De verschillende onderdelen van het dossier waarvoor een kostenschatting is gespecificeerd, zijn in Tabel 6-1 gegeven.

De *best-case* en *worst-case* schattingen van de kosten van registratie staan in Tabel 6-2. Volgens de EU website [EU, 2012] neemt het traject van indiening tot registratie tot daadwerkelijke toelating tussen de 2,5 en 3,5 jaar in beslag.

De *best-case* en *worst-case* schelen ruim 1 miljoen euro in omvang. Dit zit hem grotendeels in de humane toxicologische onderzoeken. In de economische analyse is het gemiddelde van de *best-case* en *worst-case* als kapitaalinvestering meegenomen.

Tabel 6-1 Onderdelen van het dossier en de kostenschatting van de registratiekosten.

| # | Naam | Beschrijving |
|---|-------------------------------|--|
| 1 | Humane toxicologische proeven | Proeven die onderzoeken wat de directe en indirecte gevaren zijn voor de mens bij gebruik. Dit betreft dierproeven om deze effecten te onderzoeken. Ook onderzoek naar genotoxiciteit en carcinogeniteit valt hierbinnen |
| 2 | Overige proeven | Dit omvat onderzoek naar ecotoxiciteit, residu onderzoek en waar het eindigt in het milieu. Doordat het natuurlijke extracten betreft kunnen deze proeven waarschijnlijk tot een minimum beperkt blijven |
| 3 | Werkingsproeven | Proeven die aantonen dat het middel werkzaam is. Dit wordt per gewas bepaald. We maken hier een inschatting voor 2 gewassen. |
| 4 | Dossierbouw | Het compileren, schrijven en bespreken van het dossier met het bevoegd gezag. Als het dossier kleiner kan zijn zijn de kosten hiervoor ook lager |
| 5 | Beoordelingsfees | Dit zijn de kosten van het laten beoordelen en registreren van je gewasbeschermingsmiddel |

Tabel 6-2 Kostenschattingen voor verschillende onderdelen in het opbouwen van een dossier.

| # | Naam | Best case | Worst case |
|---|-------------------------------|------------------|--------------------|
| 1 | Humane toxicologische proeven | € 190,000 | € 1,181,000 |
| 2 | Overige proeven | € 150,000 | € 150,000 |
| 3 | Werkingsproeven | € 100,000 | € 100,000 |
| 4 | Dossierbouw | € 150,000 | € 300,000 |
| 5 | Beoordelingsfees | € 250,000 | € 250,000 |
| | Totaal | € 840,000 | € 1,981,000 |

Uit de biopesticide werkingstesten (hoofdstuk 5) komt naar voren dat de werkzame componenten waarschijnlijk niet de alkaloiden zijn. Wat de werkzame component ook is, de registratie zal dezelfde algemene weg volgen en zal een kostenprofiel hebben dat ligt tussen de best case en worst case hierboven beschreven.

7 Economische analyse

7.1 Introductie

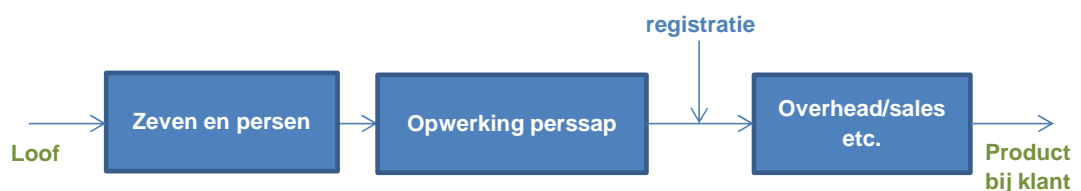
Aan het einde van Fase 1 is een ruwe kostenschatting gemaakt gebaseerd op de kosten van het zeven en persen en het opwerken van tomatenloofperssap. Deze kostenschatting is gebaseerd op de kosten per verwerkte ton perssap en is uitgewerkt om te komen tot een opbrengst per spuiting. Deze kostenschatting was sterk gebaseerd op de dosering van alkaloiden, de hoeveelheid alkaloiden in het perssap en de terug win efficiëntie. Deze kostenschatting staat samengevat weergegeven in sectie 7.2.

Zoals in hoofdstuk 5 aangegeven blijken de alkaloiden niet de werkzame stof te zijn in het verkregen extract. Hierdoor is de business case niet langer te bepalen omdat de opbrengsten niet bepaald kunnen worden. Ook is het niet zeker dat de opwerking voor de echte werkzame stoffen hetzelfde eruit zal zien. Ter voorbereiding voor verdere analyse in de toekomst is de methodiek voor de kostenschatting zoals gebruikt in Fase 1 is aangepast door de kosten en baten beter te scheiden en op basis van de operationele kosten (OPEX) de rate of return en de terug verdien tijd te bepalen. De methodiek zal wel van nut kunnen zijn en deze wordt beschreven in sectie 7.3.

Hieronder worden de belangrijkste onderdelen van de kostenschattingen weergegeven. De kostenschattingen zijn opgesteld voor tomatenloof; voor de verwerking van paprikaloof zullen soortgelijke overwegingen gelden.

7.2 Ruwe kostenschatting fase 1

De kostenschatting op het einde van Fase 1 is beschreven in een draft memo [Schuurbijs, 2012b]. Het proces waarvan een kostenschatting is gemaakt bestond uit de hoofdonderdelen zoals weergegeven in Figuur 7-1.



Figuur 7-1 Proces van loof tot aan product bij de klant.

Parameters voor de kostenschatting zijn verkregen uit de opwerkingen in fase 1 (run 1 en run 2).

De kosten van iedere fase zijn vervolgens per ton perssap berekend. Voor de overhead en sales zijn niet specifiek kosten berekend, maar is een factor aangehouden gebaseerd op input van Koppert [Ravensberg, 2010]. De berekende kosten staan weergegeven in Tabel 7.1

Tabel 7-1 Kosten per processtap berekend per ton perssap.

| Kostenpost | Waarde [per ton perssap] |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Zeven en persen | € 15 |
| Opwerking perssap | € 21 |
| Registratie | € 34 ¹ |
| Totaal | € 71 |
| Factor marktprijs vs. productieprijs | 2.4 |
| Totaal kosten | € 127² |

¹de registratiekosten worden in 5 jaar terug verdiend

²de factor marktprijs vs. productieprijs is van toepassing op de productiekosten en niet op de registratie. De productiekosten zijn met deze factor vermenigvuldigd waarna de registratiekosten erbij op zijn geteld

Doordat de werkzame stof niet de alkaloiden blijken te zijn is niet langer bekend wat de winbare hoeveelheden waardevolle stof zijn, noch wat de benodigde dosering is. Beiden zijn noodzakelijk om een schatting te maken van de inkomsten.

7.3 Kostenschatting fase 2

In fase 2 is de kostenschatting met de ervaringen met grotere schaal productie verder gedetailleerd. Zo is er een schatting gemaakt van de kosten van opslag op basis van de uitkomsten van de bewaarproeven. Ook is er nader gekeken naar het drogen van het extract.

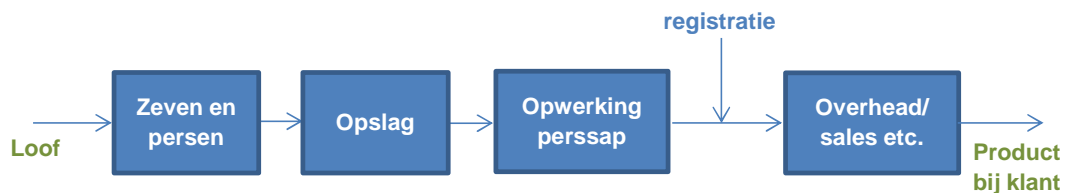
De voornaamste wijzigingen zijn weergegeven in Tabel 7-2.

Tabel 7-2 Veranderingen in de kostenschatting t.o.v. Fase 1.

| Naam | Beschrijving |
|------------------------------|--|
| Toevoegen opslag | Op basis van de resultaten van de stabilisatieproeven is er een kostenschatting gemaakt van de CAPEX en OPEX van opslag. De beste manier van stabiliseren is door toevoeging van 5-8 wt% azijnzuur |
| Elutievloeistof recycle | Het verkrijgen van het extract gebeurde tot nu toe door middel van vriesdrogen en was niet meegenomen in de kostenschatting. Als eerste benadering voor de opwerking is een destillatieve scheiding tussen water en ethanol genomen. |
| Aanpassing dosering tomatine | De dosering is aangepast aan de dosering gebruikt in de meeldauwproeven. Het gehalte aan tomatine in het gebruikte extract is hoger wat betekent dat de toegepaste dosering hoger is |
| Weglaten ultrafiltratie | De ultrafiltratie verwijderde een grote hoeveelheid aan alkaloiden en is daarom verwijderd bij de laatste opwerking zonder nadelige effecten |

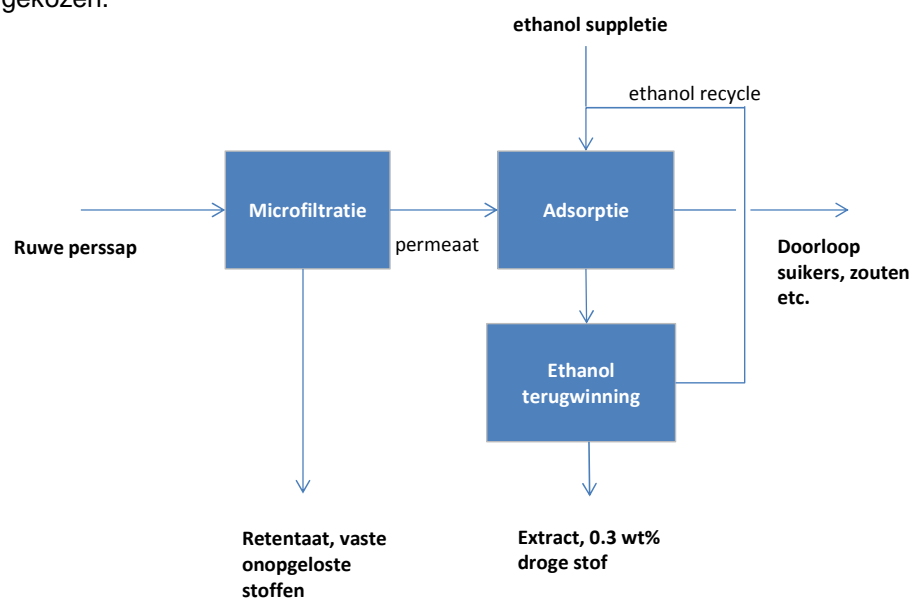
Het grootste verschil zit hem in de opzet van de kostenschatting. De kosten zijn verdeeld in kapitaalinvestering noodzakelijk (CAPEX, inclusief registratie) en de operationele kosten. De operationele kosten oftewel OPEX worden apart opgevoerd van de opbrengsten. Het verschil daartussen levert de cashflow op waarmee de kapitaalkosten voor zowel apparatuur als voor registratiekosten in de loop der jaren worden afbetaald, hiermee wordt een *internal rate of return* (IRR) en een *payback time* uitgerekend. Deze benadering is gangbaar in de chemische industrie om potentiële (verbeter) projecten met elkaar te vergelijken om te bepalen waar het geld besteedt gaat worden. Hoewel nu niet bepaald kunnen opbrengsten van andere (bij)producten makkelijk meegenomen worden. Voor de vergelijking met de Fase 1 kostenschatting zijn ook de kengetallen van de Fase 1 kostenschatting uitgerekend.

Het proces in stappen waarvan nu een ruwe kostenschatting gemaakt is staat beschreven in Figuur 7-2.



Figuur 7-2 Proces aan de basis van de kostenschatting.

Het proces voor opwerking is schematisch weergegeven in Figuur 7-3. Belangrijkste veranderingen zijn het weglaten van de ultrafiltratie kolom en het toevoegen van de destillatie kolom om ethanol terug te winnen. Bij de elutiestap elueert een combinatie van water en ethanol van de kolom, deze zullen ergens in het proces van elkaar gescheiden moeten worden om grote verliezen aan ethanol te vermijden. Als eerste schatting voor de kosten van nabewerking is voor destillatie gekozen.



Figuur 7-3 Schematisch processchema opwerking tomatine uit tomatenloofperssap.

Het kostenprofiel na aanpassing aan de ervaringen opgedaan in Fase 2 staat weergegeven in Tabel 7-3.

Tabel 7-3 Kosten van de verschillende stappen bij de verwerking van tomatenloof tot tomatine extract.

| Kostenpost | Waarde [per ton perssap] |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Zeven en persen | € 16 |
| Opslag perssap | € 7 |
| Opwerking perssap | € 37 |
| Registratie | € 39 |
| Totaal | € 99 |
| Factor marktprijs vs. productieprijs | 2.4 |
| Totaal kosten | € 183¹ |

¹² de factor marktprijs vs. productieprijs is van toepassing op de productiekosten en niet op de registratie. De productiekosten zijn met deze factor vermenigvuldigd waarna de registratiekosten erbij op zijn geteld

De kostentoename is toe te dichten aan de opslag van perssap (direct door de kosten voor azijnzuur voor stabilisatie en indirect door toename CAPEX), daarnaast is de opwerking ook duurder geworden door de toevoeging van een betere schatting voor de kosten van de nabewerking.

De keuze voor een volcontinue opwerking gekoppeld aan opslag van het geperste loof (omdat dit een aantal keren per jaar beschikbaar komt) leidt tot een grote benodigde opslagcapaciteit en een daaraan gekoppelde grote kapitaal investering (ongeveer 40% van het totale benodigde kapitaal). Hier zijn mogelijkheden om kapitaalkosten te verlagen door meer in campagne stijl te gaan werken.

De registratiekosten en de kapitaalinvestering voor het neerzetten van de opslag en de procesinstallatie betreffen ieder ruwweg 50% van de totale kapitaalkosten.

7.4 Conclusies en aanbevelingen

Een methodiek is opgezet om de kosten en de opbrengsten van de opwerking van tomatenloof naar gewasbeschermingsproduct te kunnen kwantificeren. Doordat de werkzame stof niet bekend is kan er geen schatting gemaakt worden van mogelijke opbrengsten en kan de business case niet verder doorgerekend worden.

Het wordt aanbevolen in een vervolgonderzoek de werkzame stof en de bijbehorende dosering vast te stellen en daarmee de business case verder te bepalen. Ook wordt aanbevolen de business case te bepalen voor een opwerking meer in campagne stijl zodat er veel minder kosten gemoeid zijn met opslag.

8 Conclusies en aanbevelingen

8.1 Conclusies

Zowel het tomatenloof als het paprikaloof is met succes gezeefd en geperst onder het verkrijgen van goed opwerkbaar perssap. Met een filtratiekolom proces is het gelukt om alkaloiden met succes terug te winnen. Door het toepassen van extractie kunnen hoge yields (>80%) van alkaloiden worden gehaald. Het opwerkingsproces geeft daarnaast zijstromen die naar eerste inzicht te verwaarden zijn.

Uit de verschillende opwerkingen van zowel tomatenloofperssap en paprikaloofperssap zijn extracten voortgekomen met werking tegen verschillende typen schimmels. Ook is er werking tegen meeldauw aangetoond voor het extract uit tomatenloofperssap.

Het is mogelijk gebleken om perssap door middel van pH verhoging te stabiliseren voor langer dan 4 maanden zodat de afbraak van alkaloiden vertraagd wordt.

De registratiekosten zijn vastgesteld en starten rond de 800 k€ (oplopend tot 2 M€ maximaal). Het registreren van zuivere stoffen is makkelijker dan extracten, ook van extracten moeten de hoofdcomponenten en werkzame componenten bekend zijn. Er gaan stemmen op om voor gewasbeschermingsproducten van biologische oorsprong de registratie in de toekomst te versoepelen.

Er is vastgesteld dat extracten van paprikaloof perssap en tomatenloofperssap werkzaam zijn tegen verschillende schimmelplogen en meeldauw (alleen extract op basis van tomatenloof). Er is ook vastgesteld dat alkaloiden tomatine/solanine en derivaten niet aan de basis liggen van de biopesticide werking.

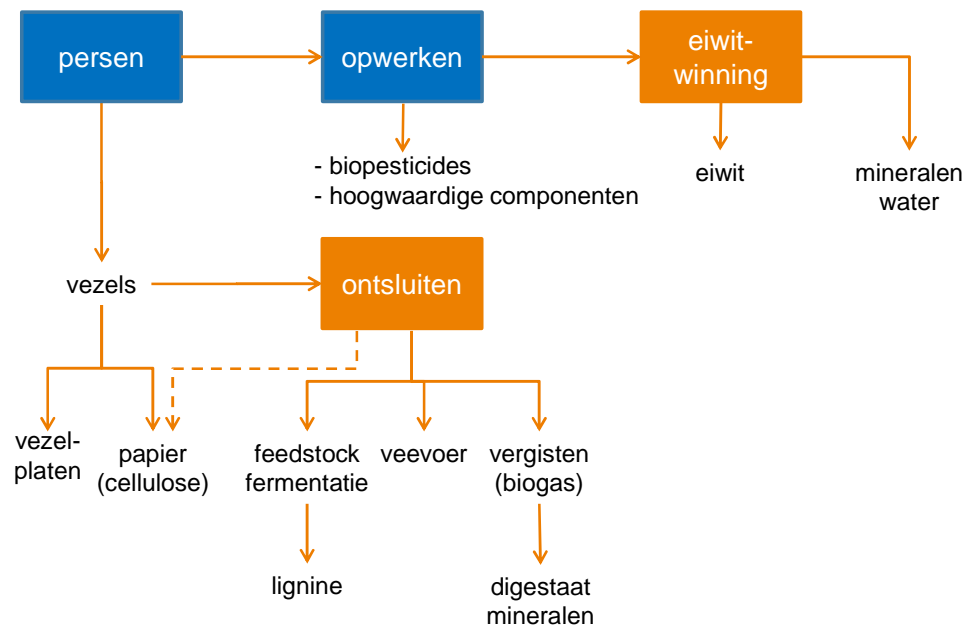
Doordat de werkzame stof niet bekend is kon er geen business case opgesteld worden omdat hiervoor de winbare hoeveelheid werkzame stof en de benodigde dosering bekend moeten zijn. De business case zal in ieder geval geholpen zijn als ook andere reststromen verwaard kunnen worden zodat deze inkomsten bijdragen. De methodiek om in een later stadium de business case te kunnen doorrekenen is opgesteld en kan snel aangepast en gebruikt worden.

Concluderend is het niet mogelijk om met de glycoalkaloiden terug gewonnen uit tomatenloof en paprikaloof een gewasbeschermingsproduct te maken, simpelweg omdat de gevonden werking van de extracten niet berust op deze stoffen. Het kassenloof blijft interessant als bron voor een natuurlijke gewasbescherming omdat er wel degelijk goede werking van de extracten is aangetoond tegen verscheidene schimmels en tegen meeldauw (alleen voor een extract uit tomatenloof). Verder onderzoek dient er op gericht te zijn de werkzame componenten nader te identificeren en de opwerking daarop toe te spitsen. Dit kan in combinatie met verdere verwaarding van de overige reststromen.

8.2 Aanbevelingen

Belangrijkste aanbeveling is om nader uit te zoeken waar de veelbelovende werkzaamheid tegen meeldauw vandaan komt. Welke component of combinatie van componenten deze werkzaamheid geven deze te concentreren tot een economisch rendabel extract. Uit de biopesticide werking testen komt naar voren dat andere componenten aan de basis liggen van de werking tegen schimmels van het pythium geslacht. Het is aan te bevelen om nader te bepalen welke componenten dat zijn en deze te concentreren.

Ook is het aan te bevelen om de verwaarding van de overige reststromen nader uit te werken. Mogelijke verwaardingsroutes staan in Figuur 8-1 weergegeven.



Figuur 8-1 Mogelijkheden voor de verdere verwaarding van de andere reststromen.

De mogelijkheden zijn legio. Interessant bij het verder ophelderen van de werkzame biopesticide component of componenten is of er ook andere hoogwaardige componenten teruggevonden worden die vermarkt kunnen worden.

9 Referenties

ENVIRON. 2012. Solanaceae: safety assessment of glycoalkaloids, Examining the feasibility of a new plant protection product, NL11-KOSOLA, 2012.

EU 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, 21 October 2009.

EU 544/2011. Implementing Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the data requirements for active substances. 10 June 2011.

EU. 2012. Website bezocht op 18 april 2012.

http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/index_en.htm

Hagen E. 2011. Van loof naar natuurlijke gewasbeschermingsmiddelen en energie. Projectplan, april 2011.

Ravensberg W. 2010. The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to success. PhD Thesis Wageningen University, 7 September 2010.

Schuurbiers C. 2012a. Van loof naar natuurlijke gewasbeschermingsmiddelen en energie. Aangepast projectplan, mei 2012.

Schuurbiers C. 2012b. WP 8.1 Kostenschatting, 12EM/824, Augustus 2012.

Väänänen, T. 2007. Glycoalkaloid content and starch structure in *Solanum* species and interspecific somatic potato hybrids (dissertation). EKT-series 1384. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 79 + 45 pp.

Väänänen T, Kuronen P, Pehu E. 2000. Comparison of commercial solid-phase extraction sorbents for the sample preparation of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography A*, 869 (2000): 301–305.