

Polysolan

eerste en tweede fase

Bestrijding van Erwinia door de afvoer van aardappelloof en de benutting van het bladmateriaal voor de biobased economy.



F. Debets

Versie: dec. 2015

Inhoud

1.	Inleiding.....	4
2.	Erwinia en de aardappelpootgoedteelt.	4
2.1	Het onderbreken van de verspreidingsroute.....	6
2.2	De resultaten van de veldproeven in 2015.....	8
3.	Aardappelloof en de Bio Based Economy.	10
4.	De verzuring van het blad	11
5.	De resultaten van de deelonderzoeken	13
5.1.	BIONND en PHA.....	13
5.2.	Van Hall Larenstein en ABC Kroos en eiwitwinning:	17
5.3	IMEenz Bioengineering en inhoudstoffen.....	20
5.4 .	Syncom en inhoudstoffen.....	23
5.5	HLB en de kwaliteit van de resten uit de kuil	25
5.6	Resumerend	26
6.	Vervolgactiviteiten	26
BIJLAGE 1	Rekenen aan de afvoer van nutriënten	28

1. Inleiding

De samenwerking in het Polysolan project is voortgekomen uit de zorg over de Erwinia besmetting in de pootaardappelsector. Een optie om de besmettingsroute in het veld te onderbreken werd door de pootgoedteler Piet Hoekstra samen met het mechanisatiebedrijf van Mijno van Dijk uitgewerkt, beiden uit Het Bildt, en uitgetest met een prototype van een maaimachine waarmee het loof van de knol gescheiden wordt en wordt afgevoerd. De omvangrijke hoeveelheid verwijderd aardappelloof leidde tot de vraag of dit materiaal inzetbaar kon zijn voor de *biobased economy*. Vier organisaties werden rond deze vraag betrokken: IMEnz; Syncom, BIONND; hogeschool Van Hall Larenstein i.s.m. ABC Kroos. Het consortium werd bijeengebracht en begeleid door GreenLincs (Errit Bekkering en Jan van Ee) en Debets bv (Frans Debets). Een startbudget voor een eerste fase werd beschikbaar gesteld door de provincie Drenthe. Na deze eerste fase in 2014 werd een 2015 vervolg gestart (tweede fase) waarin de resultaten uit de eerste fase verder werden uitgediept en waarin de maaiproeven werden herhaald (zomer 2015), nu in geïnfecteerde percelen. Deze tweede fase werd voor 50% gefinancierd door de drie noordelijke provincies, de deelnemende bedrijven financierden de andere 50%. Het project werd ook in de tweede fase ondersteund door HZPC (Kees Kristelijn) als vertegenwoordiger van de handelshuizen. Het onderzoeksbedrijf HLB uit Wijster nam in fase twee ook deel aan het overleg en deed flankerend onderzoek.

Dit rapport geeft een beknopt overzicht van de vragen, de handelingen en de resultaten van beide fasen (fase 1 in 2014, fase 2 in 2015).

Over de specifieke deelonderzoeken door de onderzoekers is aanvullende informatie beschikbaar bij de deelnemende bedrijven.

Het rapport wordt afgesloten met aanbevelingen voor het vervolg.

2. Erwinia en de aardappelpootgoedteelt.

Nederland produceert jaarlijks ca. 8 miljoen ton aardappelen. Ongeveer 20% daarvan zijn pootaardappelen, deze worden geteeld op ca. 38.000 ha. Een groot deel van het pootgoed wordt geëxporteerd. Erwinia is een verzamelnaam voor een groep van bacteriën die verschillende ziekten in verschillende plantensoorten kunnen veroorzaken. In aardappelen leidt het tot stengelnatrot (door *Dickeya* sp.), zwartbenigheid (door *Pectobacterium atrosepticum*) en afsterving van planten en knollen door een aantal soorten uit de *Pectobacterium* familie.



Afbeelding 1: Door Erwinia aangetaste plant



Afbeelding 2: Zwartbenigheid veroorzaakt door Erwinia

Een belangrijke bron van deze ziekten is het pootgoed dat tijdens de vermeerdering besmet is geraakt. De besmetting van pootgoedknollen gebeurt vooral tijdens de loofvernietiging, de oogst en het sorteren. De controle op de kwaliteit van het pootgoed is streng, dit betaalt zich uit in de consumptieteelt waar weinig Erwinia aantasting plaatsvindt. Ziektevrij pootgoed is daarom van groot belang.

De bacterie is moeilijk te bestrijden. Om besmetting in de nateelt te voorkomen wordt streng gecontroleerd op de aanwezigheid van de bacterie. Het kan leiden tot afkeuring van

percelen, deze worden dan gedeclasseerd tot consumptieaardappelen of tot een lagere pootgoedklasse (zie ook kader 1). In 2014 werden 1600 ha gedeclasseerd (ca. 4%). Van de declasseringen blijkt over de jaren heen ca 70 % veroorzaakt te worden door bacterieziekten. Diverse maatregelen vanuit de sector gericht op het terugdringen van Erwinia hebben effect, toch is verdergaande terugdringing gewenst.

Kader 1. De vermeerdering en pootgoedklassen.

Pootgoed wordt vermeerderd uit uitgangsmateriaal. Het begint op kleine schaal met de zogenaamde stamselectie of via de productie van miniknollen. Dit brengt na 3 of 4 jaren van vermeerdering de S klasse voort. De nateelt van S is SE, de nateelt van SE is E, de nateelt is daarna A en C. Het pootgoed van de klassen S, SE en E wordt basispootgoed genoemd en van de klassen A, B en C gecertificeerd pootgoed. Basispootgoed is bedoeld voor de teelt van pootaardappelen en gecertificeerd pootgoed voor de teelt van consumptie- en zetmeelaardappelen.

Om de oorzaak van de ziekte beter te leren kennen en te kunnen bestrijden is vanuit de aardappelsector een onderzoeksproject gestart, “Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging” (2004 – 2008), dit werd gevolgd door het “Deltaplan Erwinia” (2009 – 2013). Uit het Deltaplan onderzoek blijkt dat er bij vrijwel elk onderdeel van de teeltcyclus van pootaardappelen risicovolle handelingen vallen aan te wijzen die tot verergering van het probleem leiden. De introductie, in een schone teelt, van Erwinia door overleving van de bacterie in het perceel gedurende de voorafgaande vruchtwisselings-periode, in grond of via tussengewassen en onkruiden, is niet waarschijnlijk. Besmetting vanuit de lucht, via insecten of aerosolen tot een afstand van rond de 25 km is wel waarschijnlijk. Omdat de bacterie op het blad wordt aangetroffen kan verspreiding in de fase van het loofklappen, van het blad naar de bodem en vervolgens naar de knol, niet uitgesloten worden.

De schade voor de pootgoedteelt werd in 2008 door het LEI berekend op € 22 miljoen per jaar. Naast de directe schade op de akkerbouwbedrijven is tevens sprake van imago schade voor de sector, waardoor afzet in sommige landen wordt verloren ten voordele van andere exporterende bedrijven. Door diverse veranderingen in de teelt, zijn de problemen afgenomen en wordt geschat dat de schade intussen gehalveerd is.

2.1 Het onderbreken van de verspreidingsroute

Op basis van de onderzoeksrapporten en eigen jarenlange teeltervaring wilde Piet Hoekstra de volgende hypothese onderzoeken.

Bacteriën kunnen aanwezig zijn op het blad. Bij het loofklappen wordt het blad tot moes geslagen, bladdelen worden de lucht ingeworpen en komen weer terug in de kale voor. Van hieruit kunnen de bacteriën de knol bereiken. Zorgvuldig het blad afknippen en vervolgens tot buiten de akker afvoeren zal deze verspreidingsroute afbreken.

Vanuit deze benadering werd een subsidie aangevraagd bij de regeling Innovatieve Samenwerking (LNV-EZ), hiermee werd met mechanisatiebedrijf Mijno van Dijk een loofknipmachine gebouwd met een bladafvoer en bladopvang zodat het blad tot aan de akkerrand kon worden gebracht. In de zomer van 2014 werden enkele delen van percelen met de machine ontdaan van het blad. Deze test verliep goed, de machine kan het blad goed afknippen en afvoeren zonder dat er delen van blad worden verspreid over de akker.



Afbeelding 2: de loofmaaimachine in bedrijf.

De bovenbeschreven maaimethode verwijdert het blad van de in volle groei zijnde pootaardappel. Loofverwijdering vindt plaats om de groei voortijdig stop te zetten, want het pootgoed dient een kleine maat te hebben. Na het loof verwijderen wordt er nog gespoten om de hergroei van de stengels te voorkomen. De loofopbrengst in deze proef was ca. 1 kg blad per strekkende voorlengte, per hectare is dit ca. 20 ton. Afvoer is gewenst om bacterieverspreiding vanuit de hoop op de kopakker te voorkomen. Met de afvoer van het blad worden ook nutriënten afgevoerd, in bijlage 1 wordt hier nader op ingegaan.

De proef in 2014 werd uitgevoerd in een niet geïnfecteerd perceel. Het doel, het verwijderen van blad van een met *Erwinia* besmet perceel bleek daardoor niet mogelijk. In het gebied Friesland kon geen enkel geschikt perceel met enige *Erwinia* aantasting worden gevonden.

In 2015 werd wel in een geïnfecteerd perceel gemaaid. De vraag voor 2015 was of de loofverwijdering tot minder aanwezigheid van *Erwinia* in de geogoste knollen leidde, ten opzichte van de standaard geloofklapte percelen.

2.2 De resultaten van de veldproeven in 2015

In de zomer van 2015 werd in de omgeving van Franeker een perceel pootaardappelen van het ras Bildtstar afgekeurd. Het betrof een perceel klasse S die direct werd afgekeurd tot consumptieaardappel. Op basis van visuele waarneming betrof het een perceel met 0,5–1%, egaal over het perceel verdeelde, aangetaste planten. Hiermee werd het perceel geschikt bevonden voor de aanleg van een oriënterende proef.

Op 3 augustus werd in het perceel Bildtstar het loof geknipt in een blok van 8 rijen breed en 50 meter lang (afbeelding 3). Het loof werd afgevoerd en alleen de kniprestanten bleven op de grond liggen. Gelijktijdig werd van eenzelfde blok het loof geklapt op de traditionele manier (afbeelding 4). In beide blokken werd het restant vervolgens doodgespoten op dezelfde wijze.



Afbeelding 3: Foto van het blok waar gemaaid is.



Afbeelding 4: Foto van het blok waar geklapt is.

Na een periode van veel neerslag werden op 3 september 2015 uit beide aangelegde blokken monsters gehaald. Uit ieder veld werden 14 monsters van 25 knollen gehaald. De 25 knollen van ieder monster werden van 4 planten verzameld. De monsters werden diagonaal, en van voor naar achteren, over het blok verdeeld. De uitslagen van de Erwinia testen op de monsters staan in tabel 1 vermeld.

		Ds	Pa	Pw	Pcb	Pb	Po
Maaien	1	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	2	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	3	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	4	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	5	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	6	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	7	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	8	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	9	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	10	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	11	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	12	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	13	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	14	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
Klappen	1	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	2	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	3	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	4	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	5	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	6	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	7	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	8	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	9	Undet	Undet	30,69	28,79	Undet	Undet
	10	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	11	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	12	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
	13	Undet	Undet	Undet	32,52	Undet	Undet
	14	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet

Tabel 1: Resultaten (Ct-waarden) van toetsing op 6 “Erwinia” soorten van knollen geoogst na loofmaaien en loofklappen. Geel gemarkeerd zijn positieve reacties. Per methode zijn 14 monsters (1 t/m 14) onderzocht.

Verklaring afkortingen in tabel 1:

Ds = Dickeya ssp.
Pa = Pectobacterium atrosepticum
Pw = Pectobacterium wasabiae
Pcb = Pectobacterium carotovorum sp. brasiliense
Pb = Pectobacterium betavascularum
Po = Pectobacterium odoriferum

In dit veldonderzoek ging het om twee vragen:

- kan de machine het loof maaien en afvoeren;
- leidt het maaien en afvoeren van loof op een geïnfecteerd perceel tot minder Erwinia verspreiding.

De veldproeven in 2014 en 2015 lieten zien dat de machine het loof adequaat kan maaien en afvoeren. De veldproef in 2015 liet zien dat de verspreiding van bacterie wordt voorkomen.

Uiteraard is de proef eerste opzet geweest (proof of principle), het verschil tussen beide methoden is niet groot, maar dat in het knippen geen (0) en in het klappen wel (3) Erwinia verspreiding werd gevonden is zonder meer positief te noemen.

3. Aardappelloof en de Bio Based Economy.

Indien het bladknippen zin heeft als Erwinia remmende maatregel, dan is de vraag wat er met het geknipte blad kan en moet gebeuren. Achterlaten op de kopakker kan leiden ziekteverspreiding en is daarom geen optie. Afvoer naar een vergister of afvoer naar een composteerinrichting zijn opties. Naast, of in de plaats van, dit laagwaardige gebruik is wellicht hoogwaardiger gebruik mogelijk. Hiertoe werden drie routes onderzocht rond drie hoofdvragen:

1. Bevat aardappelblad inhoudsstoffen die tot waarde kunnen worden gebracht in de markt? Hierbij is te denken aan stoffen met een biologische activiteit (peptiden) of stoffen met een chemische of farmaceutische activiteit (stereo actieve moleculen).
2. Bevat het aardappelblad winbare eiwitten die technisch toegepast kunnen worden?
3. Kan aardappelblad verzuurd (ingekuuld) worden waarna het zuur gewonnen en gebruikt kan worden voor de productie van bioplastics op basis van melkzuur of (hydroxy) boterzuur?

Een vervolgvraag is of de interessante fracties in de praktijk ook winbaar zijn en of een bedrijfseconomische verwerking dan ook mogelijk is.

Deze vragen stonden centraal in 2014 en 2015.

Syncom en Imenz richtten zich op vraag 1; Van Hall Larenstein met ABC Kroos richtten zich op vraag 2; BIONND richtte zich op vraag 3.

Na de oogst van het blad werd het materiaal beschikbaar gemaakt voor de diverse onderzoeken. Syncom ontving vers bladmateriaal dat werd ingevroren en gevriesdroogd. Stengel en blad werden vermalen. Met diverse oplosmiddelen werden fracties geïsoleerd en met HPLC en GC-MS geanalyseerd op de aanwezigheid van de componenten phytol (voor cosmetische toepassingen) en de glycoalkaloïden solanine en chaconine.

IMenz onderzocht ook bladmateriaal, het werd eerst vermalen en daarna gecentrifugeerd. Aan het oplosbare deel werd vervolgonderzoek gedaan.

Van Hall Larenstein ontving vers blad dat in de verwerkingsunit van ABC Kroos in Winterswijk werd vermalen en gescheiden in fracties, ten behoeve van onderzoeksvraag 2.

Voor het onderzoek van BIONDD werd het blad ingekuuld (zie hoofdstuk 4). Om te beoordelen of in het uitgegiste materiaal ziekteverwekkende organismen aanwezig zijn onderzocht HLB de resten uit de kuilvat.

4. De verzuring van het blad

Om de bladoogst na het knippen te conserveren en om vraag 3 te beantwoorden werden in 2014 door Hoekstra en Van Dijk twee IBC containers geprepareerd, de bovenkant werd verwijderd en een ijzeren afdekplaat werd op maat gemaakt. Van het verse loof werd 300 kg. in elk vat gebracht (op 29-7-2014) in een plastic afdekking met de verzwaarde plaat er op zodat het loof luchtdicht werd opgeslagen en het volume onder druk van de verzwaarde plaat kon verminderen. Via een drainagebuis op de bodem en de aftapkraan kon het percolaat worden afgetapt. Eén vat werd voorzien van Bonsilage Plus (een bacteriepreparaat als silage versneller), het andere werd niet behandeld.

De percolaatstroom kwam na enkele dagen op gang, elke twee dagen kon ca. 5 liter worden afgetapt. Het was een gelig, frisruikend sap met een pH die terugliep tot 4.7. De troebelheid nam na de eerste week toe, dit indiceert dat er meer stoffen opgelost worden (nitraat, fosfaat, suikers, eiwit). In totaal werd 63 liter afgetapt. De monsters werden door BIONDD onderzocht op de mogelijkheid het energierijke percolaat te gebruiken voor de vermeerdering van PHA¹ bacteriën. In totaal werd per vat 63 liter afgetapt (s.g. 1,1).

Na ruim 2 maanden (op 10 oktober) werden de vaten geopend. Het overblijvende materiaal is een homogene steekvaste vezelachtige substantie.

In 2015 werd met één onbehandeld vat gewerkt dat na verzuring wekelijks werd afgetapt.

Kader 2: de productie van PHA – ontleend aan www.wageningenur.nl.

Er wordt veel onderzoek gedaan de productie van bioplastics op basis van PolyHydroxyAlkanoaten (PHA's). Voor de wereldproductie van PHA's wordt een groei verwacht van 19 kiloton in 2011 naar 145 kiloton in 2016. Een voordeel van PHA's is dat micro-organismen ze zowel kunnen produceren als afbreken. In de praktijk zijn er nog problemen: de kwaliteit is nog niet constant genoeg en de kostprijs is te hoog. Onderzoek en ontwikkeling is nodig om deze uitdagingen te lijf te gaan en commerciële kansen te verzilveren. De kostprijs voor productie van PHA's is nog te hoog, wat wordt veroorzaakt door de inzet van kostbare groeimedial componenten voor de bacteriën, hoge investeringskosten voor fermentatiefaciliteiten en voor downstream processing.

¹ PHA: PolyHydroxyAlkanoaten

Afbeeldingen 5: links een IBC container, rechts de twee gevulde containers met het verzwaarde deksel. Onder: na 6 weken is het materiaal vergaand geslonken, het deksel is gezakt. De overgebleven massa is steekvast (rechtsonder) .



5. De resultaten van de deelonderzoeken

5.1. BIONND en PHA

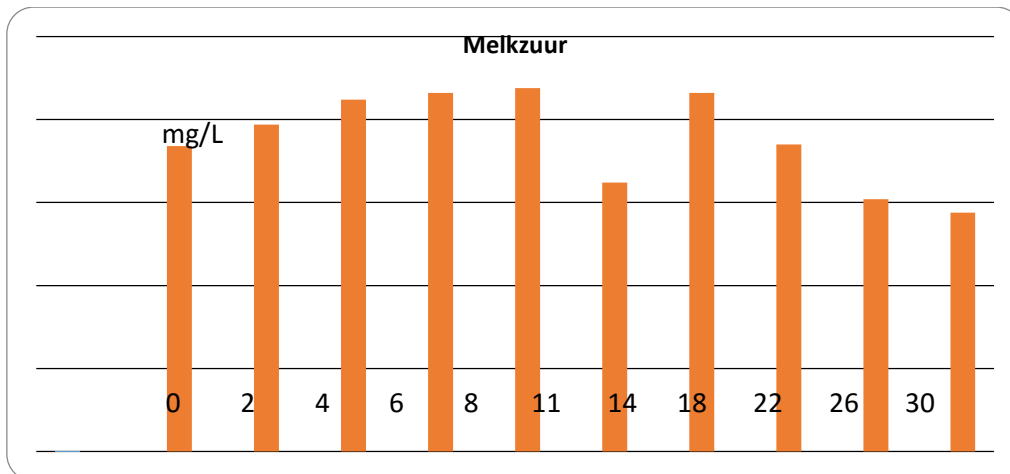
In 2014 werd analyses en bacteriegroei experimenten uitgevoerd op het verkregen perssap. In 2015 werden de verzamelde gegevens verder uitgewerkt. In dit deelonderzoek wordt onderzocht of het perssap uit ingekuild aardappelblad een goed groeimedium is voor de PHA bacteriën.

De vraagstelling voor BIONND in het kader van alternatieve toepassingen van aardappelloof was: **“Kan aardappelloof worden gebruikt als grondstof voor het produceren van het biologisch afbreekbare ‘plastic’ PHA (polyhydroxyalkanoaat)”?** Deze wordt hieronder beantwoord.

1. Voor het produceren van PHA door bacteriën in mengculturen zijn kleine zuren zoals azijnzuur, melkzuur of propionzuur nodig. De eerste deelvraag is daarom: **“Kunnen dergelijke zuren in voldoende mate worden verkregen door vers aardappelloof in te kuilen?”**
2. Het percolaat of het uitgeperste sap van de kuil zou dan kunnen worden gebruikt als substraat voor de PHA-producerende bacteriën. De volgende vraag is: **“Onder welke omstandigheden kunnen de bacteriële mengculturen worden aangezet tot een goede productie van PHA op basis van dit substraat?”**
3. De derde vraag is: **“Hoe kan de PHA efficiënt, milieuvriendelijk en tegen lage kosten worden geëxtraheerd uit de bacterieculturen?”**
4. En tenslotte: **“Wat kan er met de reststromen van dit proces worden gedaan om er nog enige waarde uit te halen?”**

Vraag 1.

Het antwoord op de eerste vraag werd gegeven door aardappelloof in te kuilen in een ca. 1m³ container, die luchtdicht werd afgesloten. Na enkele dagen begon er sap uit te lopen dat werd opgevangen en koel bewaard. De pH daalde na 2 dagen al tot 5.0 en daarna langzaam verder tot ongeveer pH 4.6. De melkzuur productie begon al heel snel en bereikte waarden van meer dan 20 gram/liter na ongeveer een week (Figuur 1), gevolgd door een lichte afname na 2 tot 3 weken.



Figuur 1. Melkzuur productie in de tijd

De azijnzuur productie begon later (ongeveer 10 dagen) en bereikte waarden van 5 gram/l na 30 dagen. Propionzuur wordt in lage concentraties (0,1 g/l) gevormd na 2 weken en blijft tamelijk constant. De solanine in het blad heeft blijkbaar geen negatieve invloed op het silageproces.

Vraag 2.

Door de bacteriën als mengculture te laten groeien op het aardappellofsap met een afwisselende aerobe/anaerobe fase wordt een groei bereikt van minstens 40 gram bacteriën per liter sap met een gehalte aan PHA van minstens 40% van het celgewicht. Verdere experimenten hebben aanwijzingen gegeven dat beide waarden nog kunnen worden verhoogd waardoor de opbrengst van PHA tenminste verdubbeld kan worden. Deze aanwijzingen moeten echter nog worden bevestigd. Verder wordt er gewerkt aan een nieuw type fermenter dat volgens literatuurgegevens een nog hogere opbrengst moet geven, gecombineerd met een eenvoudiger oogstmethode van de bacteriën.

Uit 1 m³ vers ingekuuld aardappelloof werd 65 l sap afgetapt (6.5 %), zonder geforceerd persen. Uit een graskuil kon ongeveer 30% vocht worden geperst en onder extra druk tot maximaal 50%. Gezien het hoge drogestof gehalte van gras silage (ongeveer 35%) in vergelijking met aardappelloof silage (ongeveer 25 %) zal er uit het loof van aardappelen meer vocht te persen zijn. Uitpersen kan tot zeker 50% van gewicht aan sap opleveren, dus per ton vers materiaal circa 500 liter sap. Op sap van aardappelloof werd aanvankelijk een bacteriële celdichtheid gevonden van ongeveer 40 g biomassa/liter, met een gehalte van 40% aan PHA. Dit is dus ongeveer 16 g PHA/l. In totaal is dat 8 kg PHA/ton vers materiaal, ofwel 160 kg PHA/ha. Meer dan 40% PHA (g PHA/g biomassa) en een verkoopprijs van minder dan € 3,50 /kg is volgens Etteke Wypkema (Phario, 2015) een levensvatbare business case.

Vraag 3.

De extractie van PHA uit de cellen moet voldoen aan vier criteria: 1. Het moet voldoende PHA opleveren, 2. Het moet de structuur van de PHA niet aantasten, 3. Het moet milieuvriendelijk zijn en 4. Het moet goedkoop zijn. De meeste methoden voldoen niet aan één of meerdere van deze criteria. Extractie met chloroform is de meest gebruikte methode, maar voldoet niet aan criteria 3 en 4. Extractie met superkritische CO₂ is geprobeerd, maar levert (nog) geen resultaat op (Daniela Trambitas, Feyecon, 2015). Vertering van de celbestanddelen met uitzondering van PHA kan worden gedaan met hypochloriet en zuren. Deze methode werkte goed en voldoet ook aan alle criteria, mits er zorg voor wordt gedragen dat het proces niet te lang duurt om de PHA niet aan te tasten. Tijdens het verteringsproces wordt de hypochloriet grotendeels omgezet in chloraat en chloride wat nauwelijks invloed op het milieu heeft en bovendien gemakkelijk neergeslagen en verwijderd kan worden. Experimenten om deze methode verder te verbeteren zijn nog gaande.

De verkregen PHA is vergeleken met PHA van andere producenten. PHA uit rioolwaterslib bestaat meestal uit ongeveer 70% PHB en 30 % PHV (Wypkema 2015). Biomer PHA (uit een monocultuur) is 100 % PHB; Sigma PHA (uit monoculturen) is 88 % PHB en 12 % PHV. De PHA van BIONND (uit een mengcultuur) is 93 % PHB en 7 % PHV (bepaling door Gerald Schennink, WUR-FBR, 2015). Dit wijst op een belangrijke rol van acetaat als C-bron. Blijkbaar wordt het melkzuur voornamelijk omgezet in azijnzuur voordat het door de bacteriën wordt opgenomen. De PHV wordt vooral gevormd uit de propionzuur die in lage concentraties in de kuil aanwezig is.

Vraag 4.

Na het uitlekken (of uitpersen) van de kuil blijft er een steekvaste massa over die voornamelijk bestaat uit plantencelwanden van cellulose en vezels van cellulose en lignine. De hemicellulose en pectine is grotendeels afgebroken tijdens het verzuringproces. Theoretisch zouden deze vezels gebruikt kunnen worden voor bijvoorbeeld karton of papier, waarbij ze wel eerst goed moeten worden gewassen om de onaangename geur te verwijderen. Vezels mogen maximaal 16 cm lang zijn en minder dan 9% asgehalte (grond) bevatten om interessant te zijn voor de papierindustrie (Johannes Reiners, Papierfabriek Klingele, Weener DE, 2015). Resultaten uit experimenten met ingekuild bietenloof wijzen erop dat de vezels beter geschikt zijn voor papier na het inkuilen dan als verse vezels, juist omdat water vasthoudende bestanddelen zoals pectine tijdens het inkuilen worden verteerd (Paul á Campo, 2013). Naast papier en/of karton zou de vezelfractie ook kunnen worden toegepast in biolaminaten zoals die bijvoorbeeld door Huis Veendam (www.huisveendam.nl) worden geproduceerd uit organische vezelresten. In combinatie met PHA zou er zelfs een volledig biologisch afbreekbaar laminaat kunnen worden gemaakt. Dit is in het huidige project niet verder onderzocht. Het terugbrengen naar het land als meststof is een optie, mits er geen ziekteverspreiding plaatsvindt, hierover deed HLB onderzoek.

Een andere fractie die overblijft na het inkuilen en uitpersen is het sap dat wordt gebruikt als substraat voor de PHA bacteriën. Naast de benodigde zuren bevat dit sap ook alle mineralen die uit de ingekuilde planten zijn geëkt (tabel 2).

Tabel 2. Minerale samenstelling van de perskoek en perssap' van gesileerde aardappelloof, nadat er geen sap meer uit de kuil lekte (in mg/100g DS).

		Aardappelloof		Ter vergelijking (vers blad)	
		'koek'	'sap'	Spinazie	Dille
				(rijke grond)	(arme grond)
Stikstof (vnl. NH_4^+)N		2780	2830	n.d.	n.d.
Fosfor	P	260	250	3200	1460
Kalium	K	4710	1652	7400	7200
Calcium	Ca	2640	419	2150	1780
Magnesium	Mg	250	85	460	194
Natrium	Na	20	245	550	480
Zwavel	S	618	268	6,43	2,4
Silicium	Si	108	n.d.	400	260
Borium	B	2,9	38,9	24,5	20
Koper	Cu	1,1	27,9	2,5	1,84
IJzer	Fe	104	69,8	99	104
Mangaan	Mn	9,6	9,0	20	26
Molybdeen	Mo	0,1	1,0	0,3	0,8
Zink	Zn	5,4	6,0	77,5	40

(Bepalingen door ALTIC, Dronten)

(Waarden uit de literatuur)

De mineralensamenstelling is vergelijkbaar, maar meestal lager in concentratie, met die van verse bladeren. Opvallend is de erg lage waarde van fosfor en de hoge waarde van zwavel. Een laag fosforgehalte is gunstig als de mineralenfractie zou worden gebruikt als bemesting, omdat daardoor de fosfaathuishouding van de bodem niet extra belast wordt.

Een evenwichtige bemesting verlaagt de kans op Erwinia besmetting (Erwinia Team 2012). Daarbij moet niet alleen worden gedacht aan NPK, maar aan het gehele complex van elementen. De minerale fractie die overblijft na de bioraffinage van aardappelloof bevat alle nutriënten die de plant nodig heeft en bovendien in de juiste verhoudingen, met uitzondering van P dat relatief laag is. Een deel van de mineralen in het sap zullen worden opgenomen door de PHA bacteriën, maar na het oogsten van de bacteriën kan het overblijvende substraat, na eventuele indikking, alsnog worden gebruikt als meststof voor het land waar de aardappelen vandaan komen, waarmee de kringloop gesloten wordt.

5.2. Van Hall Larenstein en ABC Kroos en eiwitwinning

Vers geoogst blad werd in Winterswijk in de bio raffinage pilotplant van ABC Kroos verwerkt (in 2014) en onderzocht op de gehalten en de winbaarheid van eiwit.

Aardappelloof werd op vrijdag aangeleverd en kon helaas pas na het weekend, op dinsdag verwerkt worden in de pilot plant. Hierdoor was het loof enigszins in kwaliteit achteruitgegaan.

1) Kwaliteit aardappelloof



Vrijdag: goed



Dinsdag: slecht

Afbeelding 4: verwerking loof

Van het aardappelloof werd 15.5 kilo aangevuld met ca. 30 liter water gemalen in een dissolver. Vanwege het hoge gehalte aan vezels ging dit moeizaam, zodat het vezelachtige mengsel alsnog in een labblender verkleind moest worden. Het gehomogeniseerde mengsel werd vervolgens geperst en afgecentrifugeerd om restant vezelmateriaal te verwijderen. De eiwitbevattende vloeistof werd vervolgens aangezuurd waarna het uitgevlokte eiwit afgecentrifugeerd werd.



Conclusie: In de praktijk blijkt het aardappelloof niet zonder meer verwerkbaar in de pilot plant van ABCKroos (die ontworpen is voor minder vezel bevattend eendenkroos). Hierdoor moesten enkele stappen voor nu in plaats van met industriële apparatuur helaas nog met laboratoriumapparatuur gedaan worden. Wel blijkt het eiwit volgens het bestaande protocol af te scheiden te zijn.

Tabel 3: Eiwit in de twee fracties

AARDAPPELLOOF EXTRACTIE		
	Eiwitgehalte op DS-basis	Droge stof
Eiwitrijke vloeistof	34%	3%
Perskoek	13%	13%

Een opwerking van aardappelloof tot een eiwitrijke fractie met minstens 30% eiwit blijkt goed haalbaar, hetgeen een verrijking is met een factor van minstens 3. Als restproduct blijft nog een vezelrijke perskoek over. Mits toegelaten qua veevoedingsregelgeving en mits voldoende energierijk (biologische beschikbaarheid) zou deze fractie afgezet kunnen worden in de veevoer sector. Als alternatief is de vezelfractie wellicht interessant voor de papierindustrie. Hier zou te zijner tijd nog verder onderzoek aan gedaan kunnen worden.

In eerder onderzoek aan kroos is onderstaande eiwitsamenstelling gevonden, de samenstelling van aardappelblad zal niet veel afwijken.

Aminoaciden 15						
Alanine	ANAL-10018	Q G	5,4	g/kg	58,2	g/kg DS
Arginine	ANAL-10018	Q G	5,4	g/kg	58,2	g/kg DS
Asparaginezuur	ANAL-10018	Q G	8,3	g/kg	89,4	g/kg DS
Cysteine	ANAL-10018	Q G	0,7	g/kg	7,5	g/kg DS
Glutaminezuur	ANAL-10018	Q G	9,1	g/kg	98,0	g/kg DS
Glycine	ANAL-10018	Q G	4,7	g/kg	50,6	g/kg DS
Histidine	ANAL-10018	Q G	2,2	g/kg	23,7	g/kg DS
iso-Leucine	ANAL-10018	Q G	4,1	g/kg	44,2	g/kg DS
Leucine	ANAL-10018	Q G	7,9	g/kg	85,1	g/kg DS
Lysine	ANAL-10018	Q G	5,6	g/kg	60,3	g/kg DS
Methionine	ANAL-10018	Q G	1,9	g/kg	20,5	g/kg DS
Phenylalanine	ANAL-10018	Q G	5,1	g/kg	54,9	g/kg DS
Serine	ANAL-10018	Q G	3,9	g/kg	42,0	g/kg DS
Threonine	ANAL-10018	Q G	4,0	g/kg	43,1	g/kg DS
Valine	ANAL-10018	Q G	5,2	g/kg	56,0	g/kg DS

Tabel 4: Aminozuursamenstelling van blad/loof eiwit, zoals bepaald door Nutricontrol (Veghel) in bladeiwitextract geproduceerd door ABCKroos.

Op basis van de opbrengsten is een kostprijs voor de verwerking van aardappelloof tot de eiwitverrijkte fractie berekend van ca. €2 tot €3 kilo drooggewicht. Dit onder de aanname dat aardappelloof als grondstof om niet beschikbaar is en bij een verwerkingsschaal van 1 kton aardappelloof per jaar.

In de praktijk is gebleken dat het aardappelloof zeer bederfelijk is en ook dat het in korte tijdsspanne (afhankelijk van weersomstandigheden waaronder geoogst kan worden) beschikbaar komt. Dit betekent dat de capaciteitsplanning voor de bioraffinage zeer nauw komt, en het geheel van oogst en verwerking afhankelijk is van een strakke logistieke planning. Zeker als natief eiwit als product gewenst is voor toepassingen als bijvoorbeeld functioneel ingrediënt in voedselformuleringen moet het uitgangsmateriaal zo vers mogelijk zijn. Voor bepaalde technische toepassingen (zie hieronder) komt dit mogelijk iets minder nauw.

Marktperspectieven

Op basis van de kostprijs van de eiwitfractie vallen laagwaardige toepassingen voor aardappelloof eiwit af. Dat wil zeggen dat een outlet voor het eiwit in de veevoeding eigenlijk geen optie is, aangezien het dan moet concurreren met producten als sojaschroot en koolzaadpresscake, die een waarde vertegenwoordigen van rond de 0.5 €/kg (met ca. 60% eiwit). De verwerking van aardappelloof tot hoogwaardige eiwitproducten is alleen levensvatbaar als deze afgezet kunnen worden in marktsegmenten die minstens 5 €/kg opleveren. Daarmee komen in ieder geval hoogwaardige toepassingen als functionele ingrediënten in samengestelde voedingsmiddelen in beeld. Concurrentie vindt dan plaats met soja isolaat, aardappel-eiwit (solanic), kippenei-eiwit, wei-eiwit en andere dierlijke eiwitten. Een probleem in de toepassing in humane voedingsmiddelen is dat dit eiwit dan wel als novel food geregistreerd dient te worden. Dat is op zich niet zo ingewikkeld, maar voor aardappelloof eiwit kan hier een probleem ontstaan als het in loof aanwezige solanine niet adequaat verwijderd kan worden.

De perspectieven voor niet-voedseltoepassingen zijn gunstiger. Natief plantaardig eiwit, waaronder aardappelloof eiwit, blijkt zeer interessant te zijn als ingrediënt in lijmformuleringen. Gesprekken hierover zijn gaande met Dynaplak (Veendam), die deze toepassing op basis van afgelopen jaar uitgevoerde verkennende experimenten zeer veelbelovend achten en hier ook graag mee verder willen. In deze toepassing is een marktwaarde van boven de 5 €/kg voor plantaardig, functioneel eiwit ook niet irreëel en komt daarmee ook nadrukkelijk in beeld. Het is duidelijk dat in dit geval de voedingsmiddelenwetgeving ook geen belemmerende factor zal zijn.

Een tweede interessante toepassingsmogelijkheid is de verrijkte aardappelloofeiwit fractie te gebruiken als uitgangsmateriaal voor de productie van bioactieve peptiden. Deze bioactieve peptiden vertegenwoordigen een hoge waarde en zijn wellicht tegen lagere kostprijs te maken indien uitgegaan wordt van een reeds opgezuiverde eiwitfractie dan wanneer uitgegaan wordt van ruwe bladmassa.

Vervolg

Om de toepassing van vrijkomend aardappelloof dichterbij commercialisering te brengen zouden ten aanzien van de vierkantsverwaarding van aardappelloof de volgende stappen nog gezet dienen te worden:

- Optimalisering van aardappelloof bioraffinage tot oplosbaar eiwit qua zuiverheid en opbrengst
- Onderzoek naar functionaliteit van aardappelloof eiwit ten aanzien van met name technische toepassingen in lijmen en coatings (i.c. kleef-, coatings en waterbindende eigenschappen). Bijvoorbeeld i.s.m. Dynaplast Veendam.
- Ontwikkeling van aardappelloof eiwit (-hydrolysaten) t.b.v. bioactieve peptiden onderzoek bij Imenz.
- Onderzoek naar toepassingsmogelijkheden van vezelrijke aardappelloof perskoek in papier- en karton toepassingen. Bijvoorbeeld i.s.m. Huhtamaki Franeker.

5.3 IMenz Bioengineering en inhoudstoffen

IMenz ontving vers gesneden aardappelloof. Het materiaal werd gescheiden in blad en stengel en ontsloten met een blender, daarna gecentrifugeerd. Aan het oplosbare deel werd verder onderzoek gedaan. 33% van de droge stof bestond uit eiwit, 25% van het totaal eiwit is oplosbaar in water. Verschillende oplosbare eiwit fracties, die verkregen zijn uit bladeren en/of stengels bleken een groei-remmend effect te hebben op *E. coli*, een bekende darmbacterie. Vervolgens zijn de oplosbare eiwitfracties verkregen uit totaal loof (blad + stengel) behandeld met 20 verschillende eiwit splitsende enzymen (proteasen), waardoor even zoveel hydrolysaten verkregen zijn. De functionaliteiten van deze hydrolysaten, m.n. de antimicrobiële werking tegen melkzuurbacteriën zijn onderzocht. Vier hydrolysaten bleken goede remmers van de groei van melkzuurbacteriën te zijn, terwijl andere hydrolysaten juist de groei stimuleerden.

Vervolgens fase werd de groeiremming onderzocht op twee *Erwinia* gerelateerde stammen: *Dickeya* (DS) en *Pectobacterium* (PCB), beschikbaar gesteld door HZPC. In dit geval zijn 40 eiwit splitsende enzymen (proteasen) gebruikt. Ook de *Erwinia* stammen werden geremd in hun groei door sommige hydrolysaten. De drie beste remmers zijn in meer detail onderzocht, waarbij gekeken is of de remming veroorzaakt wordt door het gesplitste eiwit of door het gebruikte protease. Voor twee van de drie gebruikte enzymen is aangetoond dat deze remmend werken op de groei van zowel DS als PCB. In hoeverre het gesplitste eiwit ook bijdraagt aan de remming is nog niet helemaal duidelijk, maar dit is wel waarschijnlijk en behoeft daarom nader onderzoek. Onbehandeld eiwit materiaal (uit blad en stengel) bevordert de groei van de geteste *Erwinia* stammen, hetgeen niet geheel onverwacht is.

Het vervolg in fase 2 (2015) richtte zich op een verdere analyse en karakterisering van de specifieke *Erwinia* remmende eiwit hydrolysaten en proteases.

Fase 2 in 2015

In het voor-onderzoek in fase 1 werden eiwit-hydrolysaten uit aardappelloof (ras: Desirée) geanalyseerd waaruit de volgende karakteristieken werden waargenomen:

- Melkzuurbacterie groeiremming d.m.v. hydrolysaten uit aardappelloof: geen groei i.a.v. 1, 3, 15, 18 ; groeiremming i.a.v. 11, 22, 25;
- *E. coli* (met het IMEnz screening system) - AMP activiteit waargenomen;
- *Erwinia* bacterie groep – groeiremming, mogelijk veroorzaakt door protease (P25, P29, P30) van enkele hydrolysaten;

Voor het vervolg in 2015 richtten de activiteiten zich op:

- AMP² activiteit bepalen
- Groeiremming hydrolysaten op *Dickeya* (Gram-neg) of *Pectobacterium* (Gram-neg)
- Het verschil tussen vers en ingevroren
- Nader onderzoek protease effect
- Evt. andere grondstoffen dan aardappelloof
- Fractioneren om AMP te scheiden van andere peptiden

Het uitgangsmateriaal was in 2015 anders dan in 2014, nl. het ras Desirée in 2014 en Bildtstar in 2015. Bovendien was Bildtstar (2015) - *Erwinia*-geïnfecteerd en Desirée niet.

De resultaten

De groeiremming van de *Dickeya* en *Pectobacterium* hydrolysaten door het nieuwe (2015) loof was matig, wel werd opnieuw AMP gemeten in *E. coli*, in de hoogste mate door de hydrolysaten P29 en P30 (~ 2x hoger dan controle).

Na fractioneren van 2 verschillende hydrolysaten (P29 en P30) zijn de AMP activiteiten beduidend sterker in een aantal fracties (~ 4 - 5 x hoger dan controle). Ook de groei van *E. coli* werd geremd (40 - 90%). Ter controle werden de enzymen geïnactiveerd. Ofwel de hypothese dat AMP activiteit wordt afgeschermd door niet-AMP of zelfs groeistimulerende componenten is hiermee bevestigd. Aan de hand van fractionering op basis van molecuul gewicht werden 5 fracties met hoge AMP activiteit en sterk geremde groei van *E. coli* gevonden. Na aceton precipitatie werd ook een fractie gevonden met deze (doel)eigenschappen. Aan de hand van (NH₄)₂SO₄ uitzouten werd 1 fractie met de bovengenoemde eigenschappen gevonden.

Enzymen blijken idd een goede groeiremmer / stressfactor van *E. coli* (60x); terwijl geïnactiveerd enzym groei niet blijkt te remmen o geen stress factor geeft (behalve P25 6x). Voor *Pectobacterium* werd groei geremd i.a.v. P25 en P29, niet met P30. Voor *Dickeya* geldt groeiremming i.a.v. P25, terwijl i.a.v. P29 en P30 initieel wel groei werd gemeten maar

² adenosinemonofosfaat

uiteindelijk op een lagere opbrengst uitkwamen (alles t.o.v. de referentie zonder enzym toevoeging). Uit een test met alternatieve grondstoffen zoals algen hydrolysaat werden geen remmers gevonden tegen *Pectobacterium*; alle geteste remmers gaven een stimulatie van de groei van dit organisme. Wel werden 2 hydrolysaten gevonden die de groei van *Dickeya* remmen. S48 wordt in vervolgonderzoek nog gefractioneerd.

Conclusies

Een aantal van de 2015 loof eiwit hydrolysaten geven ook AMP activiteiten in *E. coli*. Dit geldt ook in zekere mate ook voor een aantal voor *Dickeya* en *Pectobacterium*, maar de resultaten zijn nog niet overtuigend. Het is moeilijk te bepalen met welke van de remmers nader onderzoek wenselijk is.

Vers materiaal vs. ingevroren materiaal kan niet met elkaar worden vergeleken, omdat een ander ras + andere teelt (geïnfecteerd) moeilijk vergelijkt. Echter, wanneer het vinden van AMP afhankelijk is van een aardappelras, is dit beperkt bruikbaar omdat er door de jaren heen vele rassen worden geteeld.

Een onderzoeksvraag is: waarom zou ene ras gevoeliger zijn dan een ander ras? Kunnen we daar iets mee in de veredeling strategie?

De enzymen 25, 29, 30 remmen groei van de Gram-negatieve *E. coli*. Deze eigenschap bleek in beperkte mate ook voor Gram-negatieve *Pectobacterium* en *Dickeya* te gelden. De gebruikte verdunningen zijn relatief hoog, zodat de kosten beperkt zullen zijn. De kosten voor het enzym worden geraamd op minder dan $1/2000 \times €10,-$ per liter (gebruiksdosering), ofwel €0,005 (een halve cent). Dit zou wellicht als *Erwinia* bestrijdingsmiddel kunnen worden toegepast. Hoeveel per ha. moet worden toegepast hangt af van een doseringsexperiment. Herhalingsexperiment in *Dickeya* en *Pectobacterium* en de proteasen P25 en P29 zijn nog gewenst.

Na fractionering van actieve hydrolysaten kunnen de gezochte activiteiten (groeiremming / AMP) worden versterkt en deels gescheiden worden van andere activiteiten.

De veronderstelling is dat mechanisme groeiremmende proteasen waarschijnlijk op membraan niveau werken, met membraan eiwit afbraak dat leidt het disfunctioneren van de membraan (geassocieerde) eiwitten. Om de werking te verbeteren kan nog gedacht worden aan buitenmembraan-porie ontsluitende agentia als toevoeging aan een werkzaam product. Let wel op de eventueel remmende werking van dergelijke agentia, bijvoorbeeld chelerende agentia, op het toegepaste enzym. Enzym werking is wel zeer interessant als nieuwe toepassing. Deze toepassing is relatief eenvoudig te realiseren, tegen lage kosten.

Tabel 5: Enzymen getest op *E. coli*:

Protease (verdunding)	6x	60x	600x
Groei			
P25	+	+	Neutral
P29	-	-	Neutral
P30	-	-	Neutral
Rel. stress			
P25	+	+	Neutral
P29	++	++	Neutral
P30	+	+ -	Neutral

Geïnactiveerde enzymen geven geen stress in *E. coli*, *Pectobacterium* en *Dickeya*.

5.4 . Syncom en inhoudstoffen

Syncom ontving vers bladmateriaal dat met stikstof werd ingevroren. Blad en stengel werden vermalen en vervolgens gevriesdroogd. Uit het gevriesdroogde aardappelloof werden door middel van een extractie met (waterige) organische oplosmiddelen mengsels van verschillende componenten verkregen. In het onderzoek is gekeken of uit de looffractie de componenten phytol (voor cosmetische toepassingen) en de glycoalkaloïden solanine en chaconine kunnen worden geïsoleerd. Voor de glycoalkaloïd fractie is in eerste instantie een analysemethode opgezet om de hoeveelheid van beide componenten in het loof te bepalen. Verder is gekeken wat de invloed is van de zure fermentatie op de glycoalkaloïd fractie. Glycoalkaloïden zijn bioactieve verbindingen waarvan het na hydrolyse verkregen steroïde fragment (solanidine) eveneens een bioactieve werking heeft. Buiten dit onderzoek om is Syncom actief in de synthese van nieuwe bioactieve verbindingen uit solanidine en de synthese tot commercieel interessante steroïde intermediären (o.a. pregnenolone).

De resultaten

- **Phytol extractie**

In eerste instantie werd het ingevroren aardappelloof (oogst 2014) ontdaan van water door vriesdrogen en vervolgens geëxtraheerd met het organische oplosmiddel dichloormethaan. Het verkregen extract werd geanalyseerd met behulp van NMR, GC-MS en TLC en bestond uit een mengsel van verbindingen waaronder waarschijnlijk phytol. Verdere zuivering met kolomchromatografie had een slechte recovery tot gevolg. Ongeveer de helft van het oorspronkelijke materiaal blijft onder de gekozen condities aan de kolom hangen en de fracties die geïsoleerd worden zijn nog steeds mengsels van verbindingen.

Hiervan is de identiteit (ook phytol) niet goed toe te kennen. Door de grote complexiteit van het systeem lijkt het niet interessant om hier verder onderzoek naar te doen. Geconcludeerd kan worden dat het niet haalbaar is om phytochemicaliën (phytol) uit aardappelloof te isoleren middels een extractie met een apolair organisch oplosmiddel.

- **Glycoalkaloïden extractie**

Uit de literatuur is bekend dat aardappelloof ruime hoeveelheden van de glycoalkaloïden solanine en chaconine bevat. De hoeveelheid is in belangrijke mate afhankelijk van het ras en de groeifase van de plant. Recentelijk publiceerden Distl en medewerkers hierover.

Duidelijk blijkt dat de gehaltes aan glycoalkaloïden in aardappelloof veel hoger liggen dan in de aardappelknollen en dat in het algemeen de verhouding chaconine/solanine ruwweg 10:1 is. Om de hoeveelheid glycoalkaloïden in loof te bepalen is het gevriesdroogde materiaal geëxtraheerd met 5% AcOH/H₂O. Met behulp van commercieel verkregen solanine en chaconine is een HPLC methode opgezet en zijn de gehaltes van de glycoalkaloïden gekwantificeerd. De waarden zijn:

Solanine: 9,7 mg/100 g loof (nat, vers materiaal)
Chaconine: 32,1 mg/100 g loof,
Totaal: 41,8 mg/100 g loof (fresh weight)

Deze waarden komen goed overeen met de gemeten waarden door Distl en medewerkers (2-46 mg/100 g loof). In een mogelijke vervolgfase zou gekeken kunnen worden naar een mogelijke optimalisatie van de extractie (worden alle glycoalkaloïden met de huidige methode geïsoleerd, kan middels een slimme vloeistof-vloeistof extractie direct solanine uit het loof worden geïsoleerd?). Voor mogelijke commerciële productie van glycoalkaloïden uit loof is het beter om dit te combineren met het isoleren van andere inhoudsstoffen (bijvoorbeeld eiwit). Hoewel er op dit moment nog op beperkte schaal gekeken wordt naar het gebruik van solanine/chaconine als geneesmiddel zijn er (nog) geen commerciële applicaties van glycoalkaloïden of het eenvoudig hieruit te synthetiseren solanidine. Dit zal veranderen indien blijkt dat solanidine een interessante grondstof is voor overige steroïden. Het bedrijf Syncom, maar ook andere spelers in het veld, onderzoeken op dit moment de mogelijkheden hier toe. Wel moet in ogenschouw genomen worden dat bij de isolatie van aardappeleiwit (Solanic) ook ruime hoeveelheden glycoalkaloïden in een gezuiverde vorm vrijkomen.

- **Fermentatie van aardappelloof, invloed op de glycoalkaloïdfractie.**

Tot op heden is er vrij weinig bekend over het afbraakpatroon van solanine/chaconine. Wel is duidelijk dat in eerste instantie enzymatisch het koolhydraat wordt afgesplitst, maar de vervolgaafbraak van solanine is niet opgehelderd. In het fermentatief proces van aardappelloof worden de koolhydraatfracties omgezet naar kleine organische zuren (propionzuur, azijnzuur etc.). Deze kunnen uitstekend dienen als grondstof voor de synthese van polyhydroxyalkanoaten, een interessant afbreekbaar biopolymeer. Omdat mogelijk onder de gekozen condities ook de glycoalkaloïden gedeeltelijk worden afgebroken zijn gedurende de fermentatie samples getrokken en gecheckt op de aanwezigheid van solanine/chaconine. Uit de analyses blijkt dat er in de eerste samples geen solanine/chaconine meer aanwezig is. Ook solanine wordt niet meer gedetecteerd. Het

meest waarschijnlijk is dat onder de zure omstandigheden het koolhydraat afsplitst en het gevormde solanine ontleedt tot solanthreen.

Conclusies

Door een te grote complexiteit aan kleine organische moleculen (phytochemicalien, secundaire metabolieten) is het commercieel niet interessant/mogelijk om hier specifieke moleculen uit te isoleren.

Aardappelloof bevat significante hoeveelheden glycoalkaloïden, met mogelijke toekomstige farmaceutische applicaties

In zuur milieu (fermentatie) hydrolyseren solanine en chaconine tot solanidine. Ook deze verbinding is echter niet stabiel en ontleedt tot solanthreen.

Aanbevelingen

Er moet beter gekeken naar de extractie van glycoalkaloïden uit het loof, inclusief extracties waarbij onder licht zure condities direct solanine uit het loof wordt geïsoleerd.

Van veel (glyco)alkaloïden is bekend dat deze klasse van verbindingen een anti-microbiële werking hebben. Dit zou verder uitgezocht moeten worden, o.a. gericht op *erwinia* bestrijding.

Syncom is op dit moment actief in de synthese van nieuwe producten uit solanine (al of niet biologisch actief) en de mogelijkheden om dit om te zetten naar belangrijke intermediären voor steroid synthese.

5.5 HLB en de kwaliteit van de resten uit de kuil

HLB ontving een monster bestaande uit materiaal uit de verzuringtank, met de vraag te achterhalen of hierin nog plant pathogene schimmels of bacterieziek in aanwezig waren.

Om na te gaan of er in het materiaal nog levend bacterieziek aanwezig was, is getoetst op drie *Pectobacterium*'s die in aardappel voorkomen, *Pectobacterium carotovorum* (natrot), *Pectobacterium atrosepticum* (zwartbenigheid) en *Dickeya* spp. (stengelnatrot). Het materiaal en het vocht is daarvoor in een specifiek medium geplaatst en na 2 dagen is het DNA geïsoleerd. Hierop is middels qPCR getoetst op de drie eerder genoemde bacteriën. Er werd met geen van de bacteriën een positieve reactie verkregen, waardoor het niet aannemelijk is dat een van deze nog aanwezig is geweest in het materiaal.

Voor het bepalen van de aanwezigheid van plantpathogene schimmels is ook zowel het materiaal als het vocht geplaatst op een voedingsbodem specifiek voor schimmels. Na circa 10 dagen groei zijn de aanwezige schimmels gedetermineerd. Hieruit bleek dat er voornamelijk *Geotrichum candidans* (melkzuurschimmel), gisten en amoeben aanwezig waren, maar geen van deze genoemde schimmels staat bekend als plant parasitair. De melkzuurschimmel staat bekend als een secundaire schimmel. Plantpathogene schimmels als *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Phytophthora* spp. en *Alternaria* spp. werden niet aangetroffen.

Het terugvoeren van deze restmaterialen naar de akker heeft, met deze uitkomsten, geen fytosanitaire nadelen.

5.6 Resumerend

In 2014 en 2015 is door de betrokken partijen met een bescheiden budget effectief onderzoek uitgevoerd dat een basis biedt voor vervolgacties. De bevindingen kunnen als volgt worden samengevat:

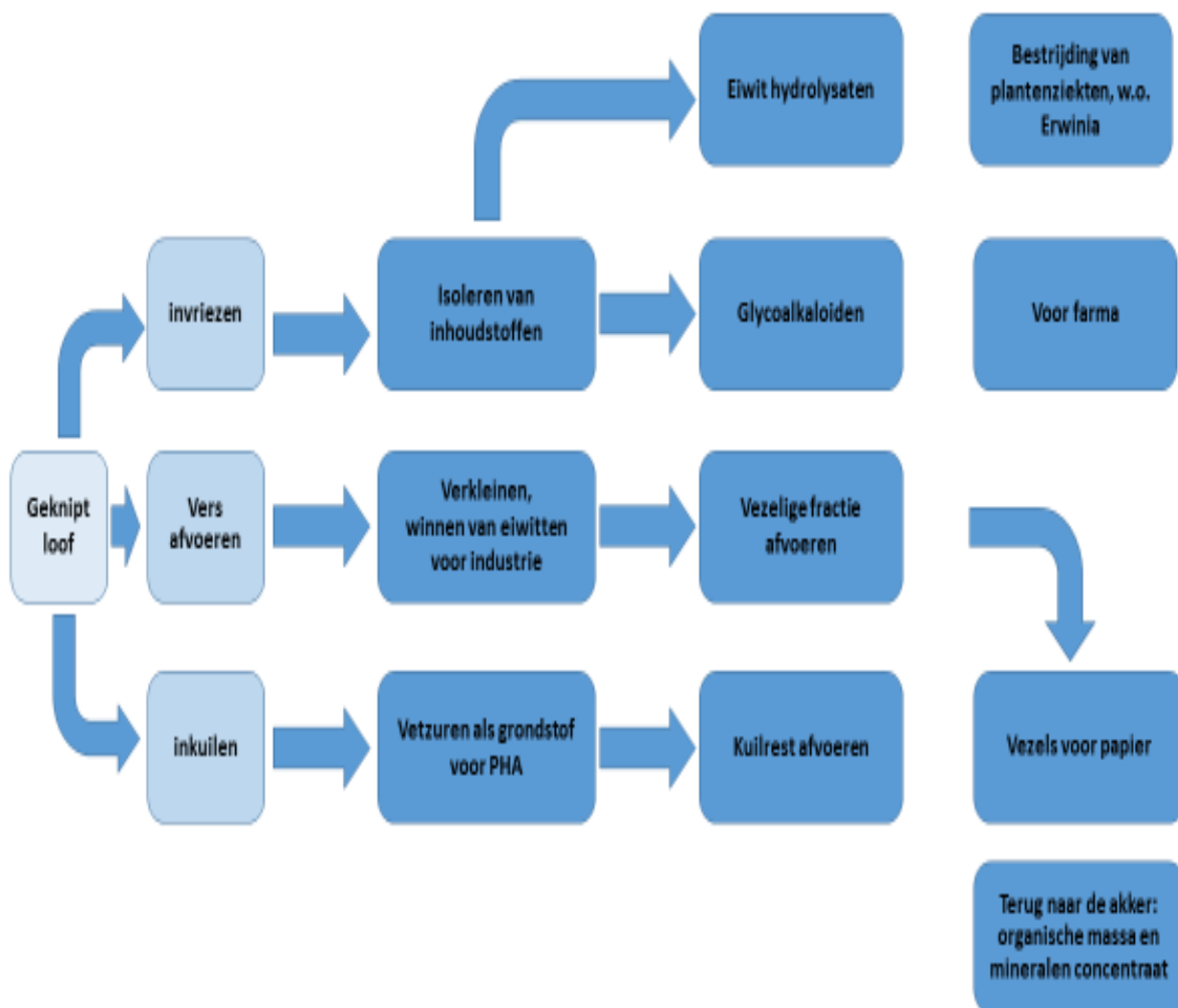
1. Het maaien van aardappelloof en het in een werkgang afvoeren van het gemaaide loof naar de akkerrand is goed mogelijk.
2. In erwinia geïnfecteerd perceel werd gemaaid en geklapt, in het gemaaide perceel werden geen erwinia geïnfecteerde knollen gevonden, in het geklapt perceel waren drie monsters wel geïnfecteerd. Deze bevindingen bevestigt de hypothese dat maaien en afvoeren van loof de verspreiding van erwinia vermindert.
3. Inkuiling van aardappelloof blijkt een sapstroom op te leveren, waaruit met hoge efficiëntie PHA's kunnen worden gemaakt. Het restmateriaal kan terug naar het land.
4. Aardappelloof eiwit blijkt winbaar op pilotplant schaal en heeft mogelijk waarde voor de lijm & coating industrie.
5. Aardappelloof eiwit hydrolysaten blijken een anti-microbiële activiteit te hebben tegen diverse micro-organismen, waarschijnlijk ook tegen Erwinia.
6. Aardappelloof blijkt een aantal interessante inhoudstoffen te bevatten, met name significante hoeveelheden glycoalkaloïden die mogelijk van belang zijn voor de farmaceutische industrie.

De betrokken partijen onderzoeken de mogelijkheid om vervolgonderzoek uit te voeren.

6. Vervolgactiviteiten

Voor vervolgactiviteiten zal bij voorkeur worden uitgegaan van de keten die begint bij het loofmaaien gericht op de Erwinia bestrijding. De daarbij vrijkomende loofmassa kan langs diverse routes benut worden. Het uitwerken van een stroomschema waarin massa, kosten en mogelijke opbrengsten ook geïndiceerd worden is een eerste vervolgstap. Onderstaand schema wordt daarin verder gedetailleerd.

Een project met de aardappelsector met aanvullende veldproeven is een noodzakelijke vervolgstap. Daaraan verbonden verwaardingsstappen kunnen daaraan verbonden worden. Een verwerkingsconcept waarin het loof direct wordt verwerkt op het erf kan daarbij de uitgangsvisie zijn.



Schema voor de samenhang van activiteiten

BIJLAGE 1 Rekenen aan de afvoer van nutriënten

Met de loof oogstmachine werd ca. 20 ton/ha. vers loof (blad en stengels) blad geoogst. Uitgaande van 10% droge stof is dit 200 kg. In de steekvaste rest die overblijft na de fermentatie zijn de onderstaande waarden gevonden .

Tabel A. meetwaarden in de steekvaste rest uit het fermentatievat.

		Zonder starter	Met starter	Eenheid
Droge stof	Ds	13,8	11,6	%
Stikstof	N	27,8	31,9	g/Kg Ds
Fosfaat	P	2,6	3,1	g/Kg Ds
Kalium	K	47,1	39,4	g/Kg Ds
Calcium	Ca	26,4	26,1	g/Kg Ds
Magnesium	Mg	2,5	2,8	g/Kg Ds
Natrium	Na	0,2	0,2	g/Kg Ds
Zwavel	S	6,2	5,5	g/Kg Ds
Silicium	Si	1,1	1,3	g/Kg Ds
Borium	B	29	26	mg/Kg Ds
Koper	Cu	10,5	10	mg/Kg Ds
Ijzer	Fe	1040	945	mg/Kg Ds
Mangaan	Mn	96	97	mg/Kg Ds
Molybdeen	Mo	0,98	0,69	mg/Kg Ds
Zink	Zn	54	40	mg/Kg Ds

De vaten werden gevuld met 300 kg vers loof (30 kg d.s.), daarvan werd ca. 70 kg (63 liter) vocht afgetapt. Rekenkundig is het d.s. gehalte van de resterende massa dan $30/300-70= 13\%$.

In de analyse is deze 13% ook gemeten. De gemeten waarden (N,P,K) zijn teruggerekend in kg per ha. uitgaande van 200 kg d.s. oogst.

	Meetwaarden volgens tabel A	Afvoer per ha. bij 200 kg ds afvoer
N	31,9 g/Kg Ds	6,39 kg
P	3,1 g/Kg Ds	0,62 kg
K	39,4 g/Kg Ds	7,88 kg

===