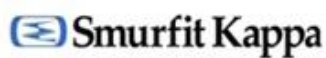
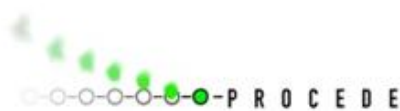


Eindrapport Biosyn



PROJECTTITEL: Biosyn
PROJECTCODE: 20113958
DOCUMENTTYPE: Rapport
PUBLICATIEDATUM: 22 september 2014
PROJECTLEIDER: G Maathuis, R Winters
AUTEUR(S): R Winters (red.)
COLLEGIALE TOETS: 1^e lezer

Bioclear b.v.*Postadres:*

Postbus 2262; 9704 CG Groningen

Bezoekadres:

Rozenburglaan 13C; 9727 DL Groningen

Telefoon: 050 571 84 55

Fax: 050 571 79 20

Email: info@bioclear.nl

Website: www.bioclear.nl



Bioclear werkt met het INK kwaliteitssysteem (Instituut Nederlandse Kwaliteit), een managementmodel, dat is afgeleid van het Europese EFQM Excellence model.



Bioclear beschikt over de procescertificaten BRL SIKB 2000, BRL SIKB 6000 en de onderliggende VKB-protocollen 2002 en 6002.

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 Bioclear.

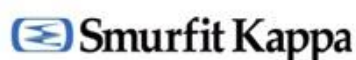
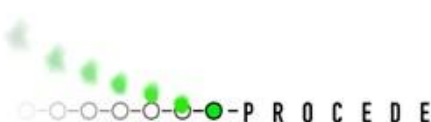
© Bioclear b.v.

Bioclear adviseert bedrijven, overheden en dienstverlenende organisaties op het terrein van de milieutechnologie.

Op opdrachten aan Bioclear zijn van toepassing de Algemene Voorwaarden voor onderzoeksopdrachten aan Bioclear, zoals gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Groningen.

BIO∞CAB

BioSyn



Samenwerkingsverband Noord-Nederland

Dit project wordt medegefinancierd door het Europees fonds voor Regionale Ontwikkeling en door het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie, Pieken in de Delta.

Inhoudsopgave

Hoofdstuk 1	Inleiding	1
1.1	Inleiding	2
1.2	Doelstelling	2
1.3	Leeswijzer	3
Hoofdstuk 2	Achtergrond	4
2.1	Inleiding	5
2.2	Vluchtige vetzuren uit biomassa als 'base chemical'	5
2.3	Een concept voor productie van vluchtige vetzuren uit biomassa	6
2.4	Van concept naar project	7
Hoofdstuk 3	Productie van vetzuren uit biomassa, hydrolyse en fermentatie	9
3.1	Inleiding	10
3.2	(Bio)chemische karakterisering van de reststromen	10
3.3	Identificatie en karakterisering van in de reststromen aanwezige microbiologie	11
3.4	Selectie en karakterisering van boterzuur producenten in beschikbare stammen collecties	12
3.5	Sturing en optimalisatie van fermentatieprocessen op basis van de in de reststroom aanwezige bacteriële populaties	13
3.6	Productie van andere vetzuren	15
Hoofdstuk 4	Microbiologie van fermentatie en sturing	16
4.1	Introductie	17
4.2	Vetzuurproductie in een industriële context	18
4.3	Productie van VFA	21
4.3.1	Situatie	21
4.3.2	Ontwikkeling van Q-PCR analyses op basis van theoretisch beschikbare informatie	21
4.3.3	Ontwikkeling van Q-PCR analyses op basis van experimentele set-up	22
4.4	Conclusies	24

Hoofdstuk 5	Winning van vluchtige vetzuren	25
5.1	Inleiding	26
5.2	Adsorptie	26
5.3	Extractie	27
5.4	Membraantechnologie	28
5.5	Selectie van de scheidingstechnologie	29
Hoofdstuk 6	Economie van vetzuurproductie	32
6.1	Inleiding	33
6.2	Waarde uit een reststroom	33
6.3	Procesontwerp	33
6.4	Economische evaluatie	35
6.4.1	Base case	35
6.4.2	Gevoeligheidsonderzoek	36
Hoofdstuk 7	De som van de delen: het concept en de kansen	38
7.1	Technologie van vetzuurproductie uit biomassa reststromen	39
7.2	Economie en markt van vetzuren uit reststromen	39
7.3	Kansen voor vetzuren uit reststromen	40



Hoofdstuk 1

Inleiding



1.1 Inleiding

Biosyn is uitgevoerd als een deelproject van het project BIOcab, een initiatief van het Dutch Biorefinery Cluster (DBC) en Bioclear. De partners in Biosyn waren Bioclear B.V., IMenz Bioengineering en Procede als uitvoerende partijen, met medewerking van Eska Graphic Board, Smurfit Kappa, Rixona en ondersteund door Waterschap Noorderzijlvest, Noblesse Proteins en NNZ. Wageningen UR en Rijksuniversiteit Groningen hebben het project met advies ondersteund.

1.2 Doelstelling

De overkoepelende doelstelling van Biosyn is om via nieuwe wegen waarde te creëren uit reststromen. De insteek die daarvoor is gekozen is nieuwe technieken en processen te ontwikkelen om met biologische processen reststromen om te zetten in vluchtige vetzuren, die dienen als 'base chemical' voor uiteenlopende toepassingen. Dit basisidee wordt verder uitgewerkt in hoofdstuk 2. Daarin wordt ook de achtergrond besproken hoe dit algemene idee is geconcretiseerd tot de projectdoelstelling zoals geformuleerd in het projectplan:

Ontwikkelen van procesgeïntegreerde fermentatietechnologie gebaseerd op open gemengde cultures om uit organische reststromen chemicaliën (PHA's, alcoholen, vetzuren) te produceren. De doelstelling is op te delen in een aantal hoofddoelen:

1. Beschikbaar maken van fermentatietechnologie gebaseerd op gemengde microbiologische cultures voor de productie van 'groene chemicaliën' uit organische reststromen;
2. Bedrijven van een pilotinstallatie voor vetzuurproductie uit reststromen;
3. Bedrijven van een pilotinstallatie voor de productie van biopolymeren (PHA's) uit reststromen;
4. Verwerven van kennis en inzicht in de technische en economische haalbaarheid van implementatiescenario's voor de te ontwikkelen technieken.

De overkoepelende doelstelling is gedurende de looptijd van het project onveranderd gehandhaafd. Wel is de opdeling in hoofddoelen gewijzigd. Dit is belangrijke mate terug te leiden op het gegeven dat tussen het opstellen van het plan (2009) en het van start gaan van het project (2011) belangrijke ontwikkelingen hebben plaatsgevonden. Een voorbeeld daarvan is dat andere partijen inmiddels pilot installaties voor PHA-productie operationeel hadden gemaakt. Om die ontwikkeling te ondersteunen is de focus verlegd naar de productie van vluchtige vetzuren, een stap die vooraf gaat aan de productie van (bijvoorbeeld) PHA's en die veelbepalend is voor zowel de uiteindelijke productkwaliteit als de economische haalbaarheid van technieken als PHA-productie.

1.3 Leeswijzer

Dit rapport beschrijft de belangrijkste uitkomsten van het project Biosyn, met de focus op het werk gericht op een generiek concept voor de productie van vluchtige vetzuren uit biomassa-reststromen. Hoofdstuk 2 beschrijft de achtergronden van de productie van vluchtige vetzuren uit biomassa-reststromen en de relevantie hiervan voor de biobased economy. Ook geeft dit hoofdstuk een toelichting op de inrichting van het project Biosyn. Hoofdstuk 3 beschrijft het werk dat is gedaan aan de ontwikkeling van vetzuurfermentaties. De focus van dat werk was gelegen in productspecificiteit en opbrengst. Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van nieuwe meettechnieken om enerzijds de ontwikkeling van geschikte fermentaties te ondersteunen en daarnaast om de procesvoering van die fermentaties verder te optimaliseren. In hoofdstuk 5 wordt beschreven met welke technieken vluchtige vetzuren gewonnen kunnen worden uit een mengsel en hoe hieruit een geconcentreerd vetzuur(mengsel) verkregen kan worden. Hoofdstuk 6 beschrijft aan de hand van een casus de economische aspecten van het concept van vetzuurproductie uit biomassa-reststromen en onderzoekt de economische haalbaarheid. In hoofdstuk 7 worden de uitkomsten gebundeld en wordt een afweging gemaakt van de uitkomsten van het project.



Hoofdstuk 2

Achtergrond



2.1 Inleiding

Het project Biosyn is gebaseerd op het gegeven dat uiteenlopende biomassa door microbiologische activiteit omgezet kan worden naar een beperkt scala aan interessante chemische verbindingen. Dit gebeurt door natuurlijke processen. Een deel van die processen verloopt via vluchtige vetzuren zoals azijnzuur, propionzuur en boterzuur. Deze processen worden nu onder andere ingezet voor de productie van biogas, maar lenen zich in principe ook voor het maken van hoogwaardiger producten.

Het basisconcept van Biosyn is het ontwikkelen van routes voor het creëren van waarde uit biomassareststromen door het produceren van vluchtige vetzuren met behulp van gemengde microbiologische culturen.

Een belangrijke motivatie om dit concept uit te werken en om dat juist nu te doen is gelegen in een streven naar meer duurzaamheid, waaronder hoogwaardig hergebruik van reststromen, dat een steeds breder maatschappelijk draagvlak krijgt. Dit idee kan daar een bijdrage aan leveren. Voor veel bedrijven biedt het idee een perspectief op een betere verwaarding van hun reststromen, wat past in een beleid van kostenreductie. Dit creëert tevens één kant van de markt: de producenten van reststromen hebben een (al dan niet latente) vraag naar technieken waarmee hun afvoerkosten verlaagd kunnen worden.

De andere zijde van de markt wordt gevormd door de afnemers van de producten. Voor vetzuren is er een bestaande markt in de chemie. Vetzuren uit biomassa bieden een perspectief op mogelijke vergroening van deze producten. Wel is er nog een groot gat tussen wat er in die industrie gevraagd wordt aan ingangskwaliteit van de grondstoffen/halffabricaten en het niveau waarop vetzuren uit biomassa gemaakt kunnen worden: **zuiverheid en productievolume** zijn belangrijke factoren om aandacht aan te besteden.

Om het gat tussen vetzuurproductie en –afname te dichten moet nog veel werk verzet worden. Het basisconcept van Biosyn speelt daarin een centrale rol: het zoekt naar een invulling van de technologische vraag hoe uit biomassa waardevolle nieuwe producten gemaakt kunnen worden en naar een antwoord op de economische vraag hoe dat tegen minimale kosten gerealiseerd kan worden. Dit zijn de kernvragen waarlangs het project Biosyn is ontwikkeld.

2.2 Vluchtige vetzuren uit biomassa als 'base chemical'

Biomassa is een verzamelterm voor een breed spectrum aan materialen die gemeen hebben dat ze van biogene oorsprong zijn. Een deel van deze materialen komt vrij als reststroom. Afhankelijk van de aard van het materiaal kan het opnieuw worden gebruikt, of wordt het als 'afval' bestempeld.

Biomassa bestaat chemisch gezien uit een breed spectrum aan moleculen. Dit beperkt het hergebruik tot specifieke vormen. Relatief hoogwaardige stromen kunnen ingezet worden als veevoer, meer laagwaardige stromen lenen zich doorgaans alleen voor energie-opwekking. In geval van natte biomassastromen, kan energie opgewekt worden door er biogas uit te produceren in een vergistingsinstallatie.

In het vergistingsproces wordt de biomassa via een aantal stappen microbiologisch omgezet tot biogas. In essentie wordt een breed spectrum aan moleculen uiteindelijk omgezet tot twee chemische verbindingen: koolstofdioxide en methaan. Behalve de productie van een energiedrager, is een belangrijke eigenschap van het proces de reductie van de complexiteit van de biomassa tot een tweetal chemische verbindingen: suikers, zetmelen, cellulose eiwitten, celstructuren en een grote diversiteit aan andere moleculen worden allemaal via een netwerk aan microbiologische conversies teruggebracht tot de twee genoemde verbindingen.

Deze reductie van de complexiteit door biologische processen kan ook ingezet worden voor de productie van andere verbindingen dan biogas. In het biologisch proces verlopen alle omzettingen (uiteindelijk) via intermediaire vluchtige vetzuren zoals azijnzuur, propionzuur en boterzuur. Het is zelfs relatief eenvoudig om de vervolgreactie naar biogas stop te zetten, waardoor ophoping van deze vetzuren optreedt. Ongewild gebeurt dit met enige regelmaat spontaan in vergistingsinstallaties, wat stilvallen van de biogasproductie tot gevolg heeft.

De vluchtige vetzuren worden in de chemische industrie ook geproduceerd uit fossiele grondstoffen en gebruikt als base chemical voor uiteenlopende toepassingen, met name chemicaliën en materialen. Dit zijn segmenten in de waardepiramide die boven de energietoepassing liggen. Productie van vluchtige vetzuren uit biomassareststromen met biologische processen gebaseerd op het vergistingsproces bieden de mogelijkheid om groene producten met een hogere waarde te genereren.

Producten die uit vluchtige vetzuren gemaakt kunnen worden omvatten de vetzuren zelf, alcoholen die na derivatisering van de vetzuren verkregen kunnen worden en bioplastics als polyhydroxyalkanoaten (PHA's). In alle gevallen dienen de vetzuren als startpunt voor de verdere productvorming.

2.3 Een concept voor productie van vluchtige vetzuren uit biomassa

De realisatie van dit basisidee is geen vanzelfsprekendheid. Technologisch dient een aantal vraagstukken geadresseerd te worden, maar ook marktintroductie is geen vanzelfsprekendheid. Productie van vluchtige vetzuren uit biomassareststromen verloopt via een fermentatieproces. Dit proces moet zodanig bedreven kunnen worden dat de opbrengst aan vetzuren, of liefst een enkel vetzuur, maximaal is. De geproduceerde vetzuren dienen uit de reactor gewonnen te worden met daarvoor geschikte scheidingstechnologie en opgewerkt te worden tot een gereed (tussen)product.

Als uitgangspunt is gekozen voor min of meer vaste biomassa-reststromen. Grofweg is aangehouden dat een reststroom ook in een vergister ingezet zou moeten kunnen worden. Dit type stromen komt veel voor en er zijn nog weinig initiatieven die zich daarop richten: in Nederland richt vergelijkbaar onderzoek zich doorgaans op afvalwater. Uiteindelijk doel is een geconcentreerde vetzuuroplossing of, zo mogelijk, een zuiver vetzuur te produceren dat ingezet kan worden voor verdere waardevervorming.

Om van reststroom tot product te komen moet een technologisch concept uitgewerkt worden. Daarnaast zal dit concept economisch getoetst moeten worden. Technologisch bestaat de uitdaging uit een aantal kernpunten:

- Omzetten van het vaste materiaal naar een opgelost substraat dat zich leent voor vetzuurproductie;
- Productie van vetzuren uit het opgeloste substraat, sturing van dit proces naar selectieve productie van een enkel vetzuur en maximalisatie van de opbrengst;
- Winning van het geproduceerde vetzuur
- Raffinage van het gewonnen vetzuur tot een product van voldoende zuiverheid

Het technologisch kernconcept bestaat daarmee uit een substraatvoorbehandeling, een fermentatie, een scheiding en een opzuivering. In het project worden deze stappen nader ingevuld, om zo te komen tot een technologisch basisconcept, dat ook dient als basis voor de beoordeling van de economische haalbaarheid.

Naast het technologische traject is het van groot belang om het economische aspect te ontwikkelen. Daarbij zijn twee vragen opgepakt:

- **Kunnen we de beoogde klanten bedienen met het product dat we maken?**
- **Is de technologie economisch levensvatbaar?**

In het voortraject is gesproken met partijen uit de chemische industrie. Deze partijen gaven aan dat zelf fermentatief vetzuren maken nu geen optie was, maar dat invoegen van fermentatief geproduceerde vetzuren binnen randvoorwaarden bespreekbaar was. Binnen randvoorwaarden betekent onder andere dat een **voldoende zuiverheid en volume** geboden moet worden.

Naast de industriële afzetroute zijn ook alternatieven bekeken en meegenomen in het project: vetzuren kunnen goed dienen als substraat voor de productie van PHA's; technieken om PHA's te maken uit afvalwater zijn in een gevorderd stadium van ontwikkeling.

2.4 Van concept naar project

In aanloop naar het project is aanvankelijk ingestoken op een vrij breed spectrum aan producten: vetzuren, alcoholen en polyhydroxyalkanoaten (PHA's). Alhoewel alcoholen zoals ethanol en butanol ook direct fermentatief gemaakt kunnen worden, ligt ook een indirecte route via vetzuren voor de hand.

Vetzuren zijn met gemengde microbiologische culturen ('niet-axenische processen') vrij eenvoudig te maken uit uiteenlopende biomassa-reststromen. Dat levert doorgaans een mengsel van vetzuren op in lage concentraties. Het beheersen en sturen van die productie naar een hogere selectiviteit en productiviteit is cruciaal om te komen tot een economisch realistisch concept. Twee aspecten zijn daarbij van groot belang:

- 1. Het beheersen van het biologische productieproces;**
- 2. De winning van de geproduceerde vetzuren.**

Het eerste punt is in belangrijke mate een microbiologisch en bioprocestechnologisch vraagstuk; het tweede punt is een scheidingstechnologisch vraagstuk. Het microbiologische vraagstuk is uitgewerkt door Bioclear, het bioprocestechnologische vraagstuk door IMEnz en het scheidingstechnologische vraagstuk door Procede.

Reststromen die als substraat zijn ingezet in het traject zijn aangeleverd door de betrokken bedrijven. Waar nodig hebben deze ook voorzien in de benodigde procesdata of economische gegevens. Procede heeft het voortouw genomen in het uitwerken van een economisch rekenmodel en de evaluatie van de economische haalbaarheid van het concept met dat model.



Hoofdstuk 3

Productie van vetzuren
uit biomassa, hydrolyse
en fermentatie



3.1 Inleiding

Tijdens verschillende industriële productie processen ontstaan bijproducten die mogelijk waardevolle componenten bevatten. In het onderhavige onderzoek is vooral onderzocht of er in de beschikbare reststromen interessante vetzuren voorkomen en of het mogelijk is om deze middels (gestuurde) fermentatie te produceren.

Dit onderzoek is uitgevoerd door IMEnz in samenwerking met Bioclear en met ondersteuning van de WUR, de RUG en Eska Graphic Board (hierna Eska). Daarnaast hebben Smurfit Kappa, Eska en Rixona voorzien in reststromen.

Op basis van oppervlakkige analyses was reeds duidelijk dat in sommige reststromen al significante hoeveelheden vetzuren voorkwamen. Sterk geurende vetzuren, zoals boterzuur, konden waargenomen worden in de reststroom van aardappelverwerker Rixona, maar ook in het proceswater van Eska worden diverse vetzuren aangetroffen, hoewel vooral melkzuur en azijnzuur.

Op basis van marktonderzoek was duidelijk geworden dat er in de markt een behoefte is aan boterzuur en daarom is besloten om te trachten **de fermentatieve productie van boterzuur te optimaliseren**. In het onderzoek zijn hiervoor verschillende strategieën gevolgd:

1. (Bio)chemische karakterisering van de reststromen
2. Identificatie en karakterisering van in de reststromen aanwezige microbiologie;
3. Selectie en karakterisering van boterzuur producenten in beschikbare stammen collecties;
4. Sturing en optimalisatie van fermentatie processen op basis van de in de reststroom aanwezige bacteriële populaties.

Een drietal reststromen is in meer detail bekeken:

1. Aardappelstoomschillen van Rixona;
2. Fine screen rejects van Smurfit Kappa;
3. Zeer koolstofrijk proceswater van Eska.

3.2 (Bio)chemische karakterisering van de reststromen

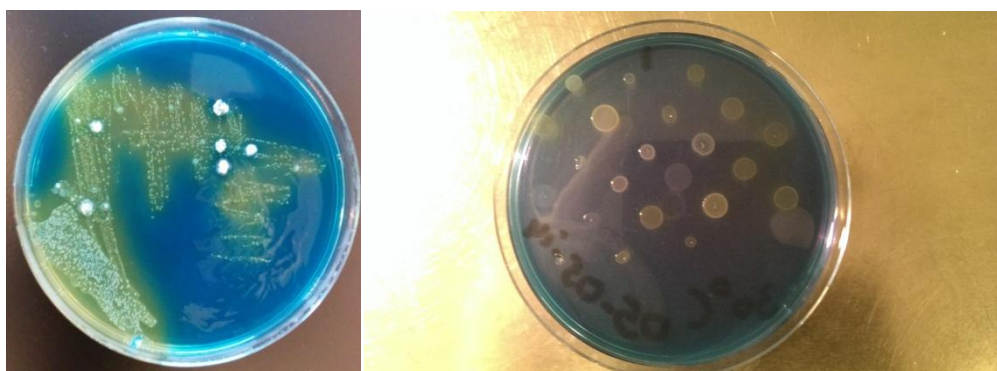
De verschillende reststromen zijn (bio)chemisch gekarakteriseerd met speciale aandacht voor de hoeveelheden beschikbare suikers (C) en eiwitten (N), aangezien deze van groot belang zijn als essentiële voedingsstoffen bij microbiële fermentatieprocessen. Op basis van ondermeer de beschikbare C en N gehalten kunnen procestechnologische berekeningen gemaakt worden die inschattingen geven van de haalbare productieniveaus van de eindproducten. Op basis van deze bepalingen is geconcludeerd dat met name de reststroom

afkomstig van aardappelverwerker Rixona interessant potentieel heeft, gezien de hoge hoeveelheden suiker en eiwitten.

Andere reststromen die geanalyseerd zijn, zijn in het algemeen minder rijk voorzien van deze componenten. Zo heeft bijvoorbeeld de Fine Screen Reject reststroom van Smurfit Kappa wel een hoog gehalte aan suikers (zetmeel en cellulose vezels), maar is er nauwelijks of geen stikstofbron in de vorm van bijvoorbeeld eiwit aanwezig. Tevens is dit materiaal niet of moeilijk toegankelijk voor de microbiologie, waardoor een extra ontsluitingsstap noodzakelijk is om suikers vrij te maken. De proceswaterfractie van Eska is wel rijk aan koolstof en stikstof, maar bevat daarnaast ook remmende verbindingen die mogelijk interfereren met gewenste fermentatieprocessen.

3.3 Identificatie en karakterisering van in de reststromen aanwezige microbiologie

Uit verschillende reststromen zijn micro-organismen geïsoleerd die vervolgens genetisch en biochemisch gekarakteriseerd zijn. Tijdens de selectie procedure is ondermeer rekening gehouden met de zuurstof behoefte/gevoeligheid van stammen. Daarom zijn er isolaties uitgevoerd onder aerobe en anaerobe omstandigheden. De stammen zijn ook onderworpen aan selectieve condities die het mogelijk maken hun vermogen tot zuurproductie aan te tonen (zie figuur 3.1).



Figuur 3.1. Zuurproductie door verschillende isolaten. De mate van geelkleuring is indicatief voor zuurproductie.

Op basis van de verschillende analyses is gebleken dat er een grote verscheidenheid en variatie aanwezig is. Met name bacteriën behorend tot de genera *Bacillus*, *Enterococcus* en *Lactobacillus*, zijn goed vertegenwoordigd in de verschillende reststromen. Op basis van de genetische informatie kon bovendien geconcludeerd worden dat het waarschijnlijk is dat verschillende van deze stammen in staat zijn tot het produceren van vetzuren, zoals boterzuur.

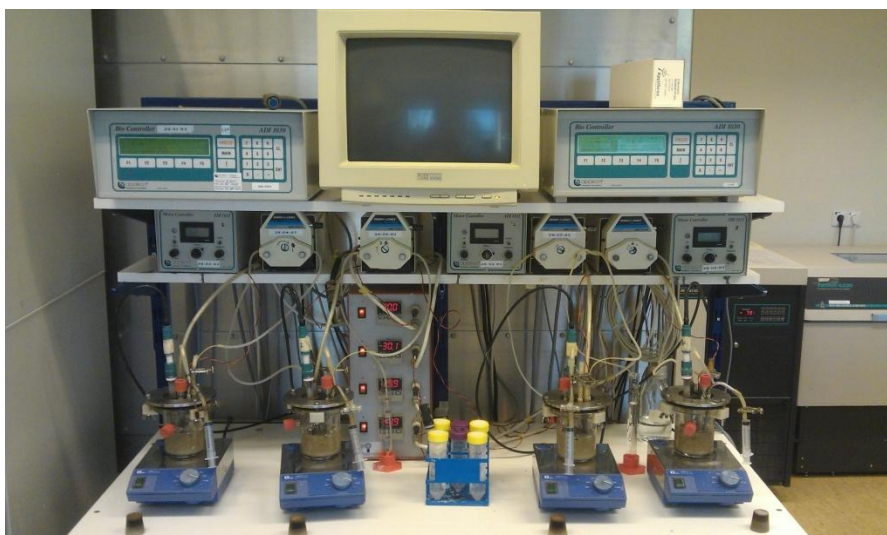
Er zijn uitgebreide analyses uitgevoerd waaruit gebleken is dat de aanwezige complexe microbiële populatie een grote verscheidenheid van (vet)zuren en andere verbindingen produceert. Een voorbeeld van de verschillende producten die aangetroffen worden in een fermentatief proces op basis van de Rixona reststroom is weergegeven in tabel 3.1.

Tabel 3.1. (Vet)zuur- en alcoholproducten (in mg/L) van een Rixona fermentatie.

Product	Fermentatieduur	
	t = 0	t = 48 uur
Barnsteenzuur	136	1777
Melkzuur	2660	8769
Mierenzuur	0	709
Azijnzuur	951	7681
Propionzuur	0	4151
1,2-Butaandiol	0	223
Ethanol	0	606
Boterzuur	0	457

3.4 Selectie en karakterisering van boterzuur producenten in beschikbare stammen collecties

De potentie van de verschillende reststromen bij de fermentatie van interessante micro-organismen is in detail geanalyseerd. Hiertoe zijn bekende industriële micro-organismen, zoals *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* en *Lactococcus*, maar ook een aantal industriële schimmelsoorten, gekweekt op media waaraan de verschillende reststromen waren toegevoegd. In een aantal gevallen is de beschikbaarheid van de voedingsstoffen (suikers en of eiwitten) verder verhoogd door verschillende voorbehandelingen. Zo is bijvoorbeeld de FSR reststroom van Smurfit Kappa ontsloten door gebruik te maken van een sonicator en enzymen (zie figuur 3.2).



Figuur 3.2. Fermentatie testopstelling met op de voorgrond de batchfermentoren en op de achtergrond de ondersteunende apparatuur.

De toepassing van enzymen was gericht op het afbreken van de complexe cellulose matrix tot kleinere suikers, die beter geschikt zijn voor opname door de micro-organismen. Het is duidelijk geworden dat door gebruik te maken van (combinaties van) voorbehandeling methoden de potentiële fermenteerbaarheid van de verschillende reststromen sterk verbeterd kan worden. Echter, de bruikbaarheid hiervan wordt beperkt door de additionele kosten die gerelateerd zijn aan deze procedures. De economische haalbaarheid is dan ook in belangrijke mate afhankelijk van de waarde van de producten die in het fermentatieve proces gevormd worden.

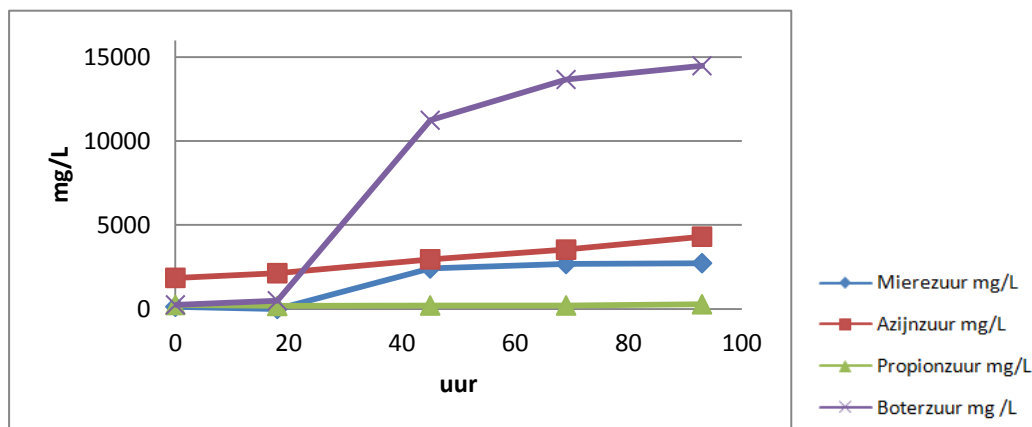
Naast bovengenoemde micro-organismen zijn er ook fermentatiestudies uitgevoerd met geselecteerde micro-organismen waarvan bekend is dat ze boterzuur kunnen produceren. Hierbij gaat het vooral om *Clostridia* soorten. Het is erg lastig gebleken om deze soorten te handhaven op reststroom gebaseerde media. Ook was het moeilijk om deze soorten op bekende (chemisch gedefinieerde) media te kweken. Een bijkomend nadeel van het toepassen van deze bacteriën vindt zijn oorsprong in het strikt anaerobe karakter van deze soorten, hetgeen vaak niet wenselijk is bij industriële fermentaties: het handhaven van strikte anaerobie is lastig en in een industriële context duur.

3.5 Sturing en optimalisatie van fermentatieprocessen op basis van de in de reststroom aanwezige bacteriële populaties

Een belangrijk deel van het onderzoek heeft zich gericht op **het ontwikkelen van methoden en procedures voor het sturen en optimaliseren van de fermentatieprocessen, met als belangrijkste doelstelling het maximaliseren van de boterzuurproductie**. Deze experimenten zijn vooral uitgevoerd met de reststroom van Rixona en daarbij is gebruik gemaakt van de reeds hierin aanwezige bacteriële populaties. Deze strategie was ingegeven door de constatering dat een pH (pH 7) en temperatuur (30°C) gecontroleerde fermentatie van een 20% Rixona reststroom al aanleiding gaf tot de productie van ~1 % procent boterzuur na 48 uur.

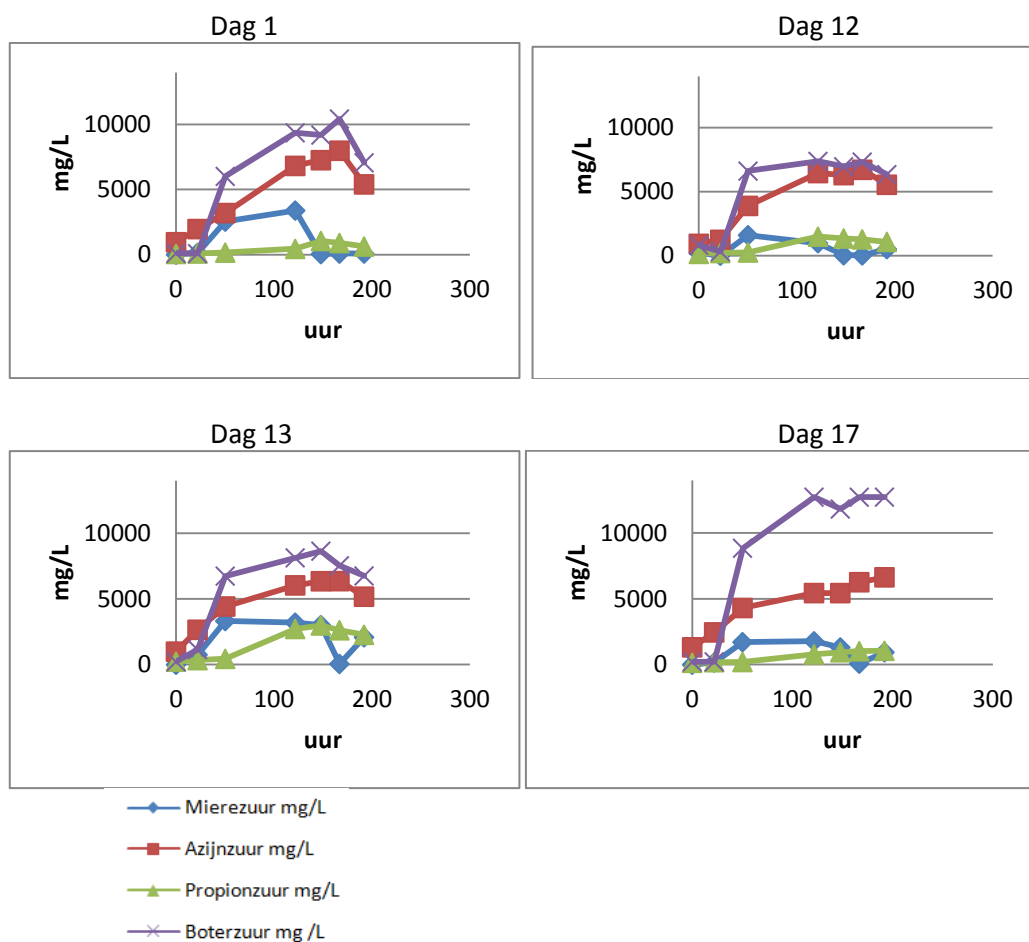
Vervolgens is via een iteratieve aanpak de fermentatieve boterzuurproductie geoptimaliseerd. De hiervoor gebruikte opstelling is weergegeven in Figuur 3.2. Hierbij is een groot aantal parameters onderzocht; in het bijzonder de effecten van pH, temperatuur, tijd, substraatconcentratie, zuurstof, additionele C en of N toevoegingen, combinaties met andere reststromen, fedbatch strategieën, beënting regimes, effecten batch tot batch variaties etc..

Uiteindelijk is het mogelijk gebleken om onder gecontroleerde condities uit de Rixona reststroom op efficiënte wijze boterzuur te produceren. Figuur 3.3 illustreert de productie van vetzuren onder deze specifieke omstandigheden.



Figuur 3.3. Fermentatieve vetzuurproductie uit Rixona reststroom onder gecontroleerde condities.

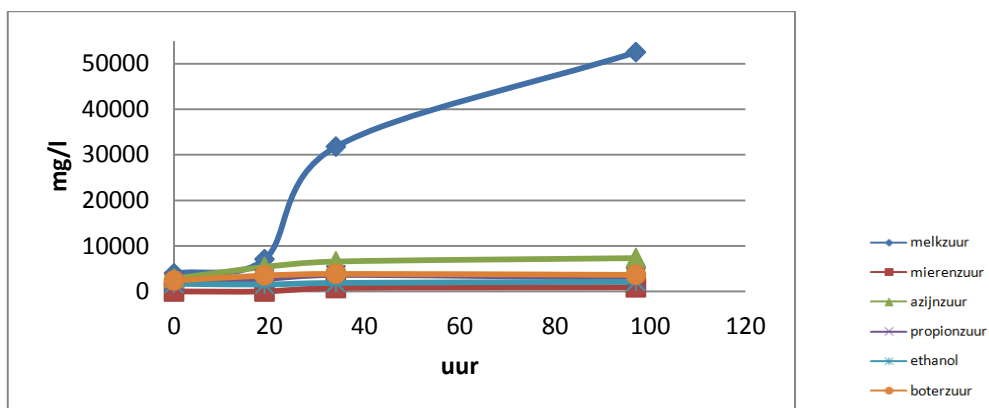
Tijdens deze optimalisatiestudies is gebleken dat aanzienlijke variatie in de kwaliteit van de grondstof kon optreden, hetgeen een grote invloed heeft op de uiteindelijke boterzuur productie niveau's die bereikt werden. Dit is geïllustreerd in onderstaande figuur 3.4.



Figuur 3.4. Vetzuurproductie onder gestandaardiseerde condities met verschillende Rixona reststroombatches. De batches zijn op verschillende dagen (dag 1, 12, 13 en 17) uit de voorraadsilo genomen en vervolgens gelijktijdig onder gecontroleerde condities gefermenteerd.

3.6 Productie van andere vetzuren

Naast de ontwikkeling van fermentatie processen voor boterzuurproductie is aangetoond dat het mogelijk is om door gerichte sturing een efficiënte melkzuurproductie te bewerkstelligen. Melkzuur is geen vluchtig vetzuur en kent andere scheidingstechnologische karakteristieken en valt daarom buiten de directe scope van het gevolgde concept: uitwerking van dit resultaat vraagt een andere insteek.



Figuur 3.5. Gecontroleerde fermentatie van Rixona reststroom met melkzuur als belangrijkste fermentatieproduct.



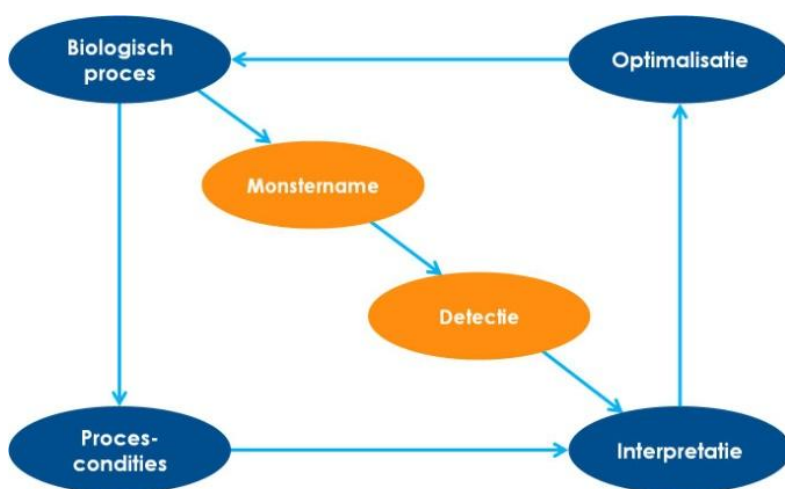
Hoofdstuk 4

Microbiologie van
fermentatie en sturing



4.1 Introductie

Voor de optimale biologische omzetting van reststromen naar groene chemicaliën zoals vluchtige vetzuren (Volatile Fatty Acids, VFA's) is de aanwezigheid en activiteit van de juiste microbiologie een cruciale factor. Gedurende een fermentatie is het mogelijk de omstandigheden te variëren en hierbij het effect op het productierendement en ook het aantal micro-organismen met een specifieke functie te monitoren. Daarmee kan worden **vastgesteld of een bepaalde factor (temperatuur, pH, nutriënten) een positief of negatief effect heeft op de productie van VFA's en in welke mate dit komt door veranderende aanwezigheid of samenstelling van de microbiologie.**



Figuur 4.1 Schematische weergave van de optimalisatiecyclus voor een biologisch proces. De route voor de monitoring van de microbiologische populatie is uitgelicht.

Met deze kennis kunnen de belangrijkste procesvoorwaarden voor een succesvolle productie worden gedefinieerd. Het identificeren en monitoren van de relevante micro-organismen is essentieel om het proces te optimaliseren en om een maximaal rendement te behalen. Hiervoor is gebruik gemaakt van innovatieve moleculaire (DNA) technieken. De aanpak en de toegevoegde waarde hiervan worden geïllustreerd aan de hand van twee casussen. Binnen deze casussen worden zowel de productie als de beheersing van vluchtige vetzuren (VFA's) behandeld. De eerste casus betreft de beheersing van vetzuren in proceswater van Eska. In deze casus wordt onderzocht hoe vetzuurproductie onder industriële omstandigheden optreedt en wat hierin de rol is van zowel de microbiologie, de procesomstandigheden en de procesvoering. De tweede casus betreft de productie van boterzuur uit de reststroom van Rixona.

Dit onderzoek is uitgevoerd door Bioclear met ondersteuning van IMEnz en de WUR en met medewerking van Rixona, Eska en Smurfit Kappa.

4.2 Vetzuurproductie in een industriële context

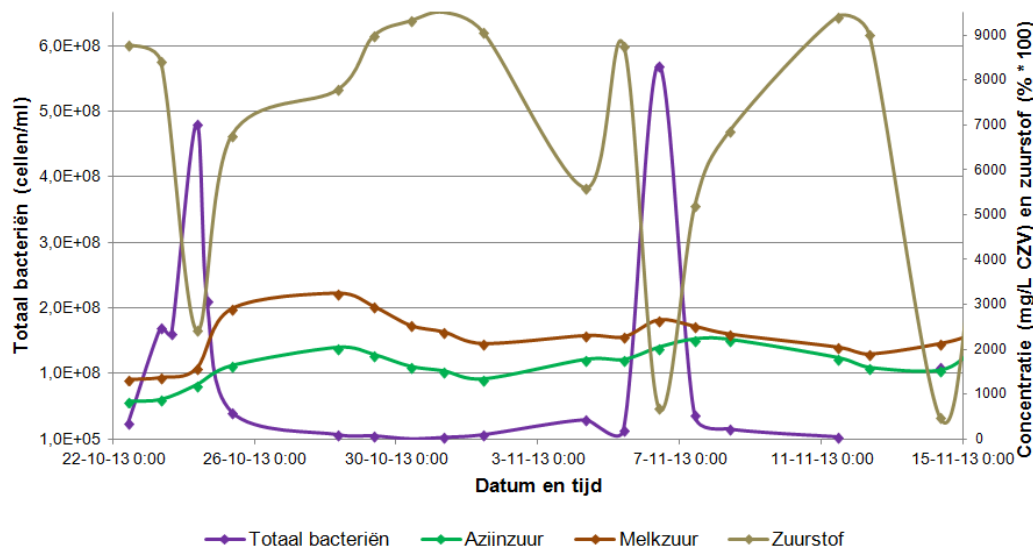
In het papierproductieproces vindt ongewenste productie van VFA's plaats, resulterend in stankoverlast in het product en de omgeving. Een beter begrip van de aard van de biologische processen die hierbij optreden is een eerste stap naar beheersing van deze 'wilde fermentaties'. Gezien de complexiteit van het papierproductieproces is gekozen voor het direct identificeren van de betrokken microbiologie in dit proces, in plaats van gebruik te maken van de bekende sequenties uit databases.

Voor het identificeren van de relevante microbiologie betrokken bij het VFA proces is, met bovengenoemde kennis, gekozen voor de volgende methoden:

- **Kloneren & Sequenzen methode (Key Bio-ID).** Met deze analyse wordt met relatief lage kosten en doorlooptijd de dominante micro-organismen in een monster geïdentificeerd. Aan de hand van deze resultaten kunnen vervolgens specifieke Q-PCR analyses worden ontwikkeld.
- **Q-PCR methode.** Met deze analyse worden microbiële groepen, soorten of functionaliteiten in een monster gedetecteerd en gekwantificeerd.

Correlaties tussen microbiologie en chemische data

Ondanks de complexiteit van het papier productieproces, laat een uitgebreide database met chemische waarden die de afgelopen jaren zijn verzameld, een aantal duidelijke correlaties zien wat betreft VFA- en zuurstofconcentraties. Voor een bepaalde reeks zijn monsters genomen voor het bepalen van de microbiologische populatie. Hierbij is het aantal bacteriën gekwantificeerd over een bepaalde tijdsreeks, waarna deze zijn vergeleken met de chemische parameters. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4.1.



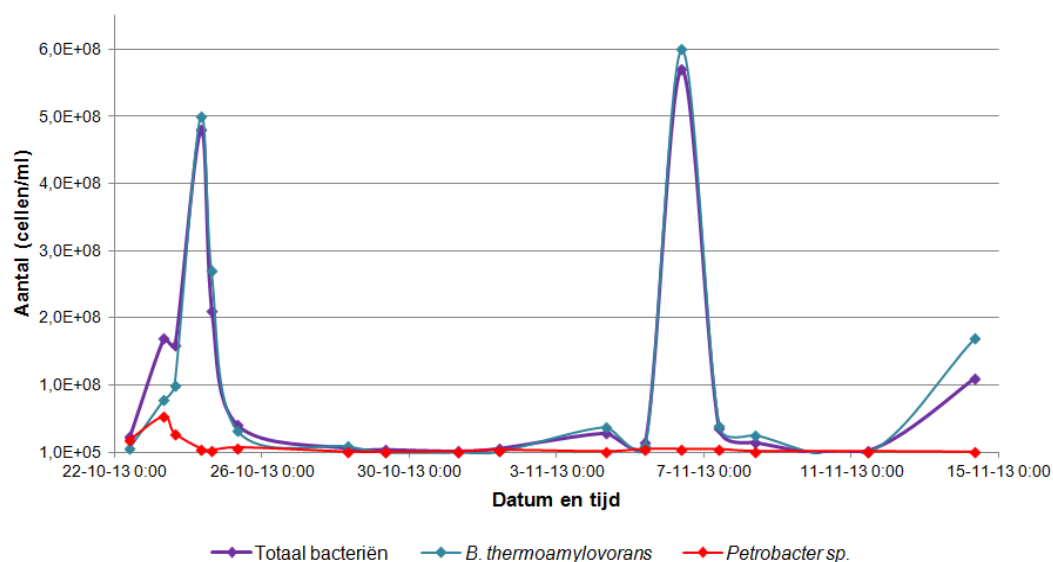
Figuur 4.1. Correlatie tussen azijnzuur, melkzuur, zuurstof en aantal bacteriën.

In figuur 4.1 is een directe correlatie waar te nemen tussen de zuurstofconcentratie en het aantal bacteriën. Uit de verzamelde gegevens over lange termijn blijkt dat de hoeveelheid VFA's direct toeneemt na een zuurstofafname. Deze afname van de zuurstofconcentratie hangt samen met een toename van het aantal bacteriën. Aan de hand van bovenstaande resultaten is besloten om op het moment van de bacterietoename monsters te nemen om vast te stellen welke bacteriën hier in zeer korte tijd in aantallen toenemen en in hoeverre zij een rol spelen in de daarop volgende VFA-productie.

Hiertoe zijn monsters bij hoge aantallen bacteriën en een referentiemonster genomen. Voor identificatie is gekozen voor een relatief snelle en goedkope identificatietechniek (Key Bio-ID). De resultaten van de identificatie zijn weergegeven in tabel 4.1.

Tabel 4.1. Resultaten van de Key Bio-ID. De 20 meest aanwezige bacteriën worden hier per monster geïdentificeerd.

Geïdentificeerde bacteriën	Referentie (23-10 8:24)	Monster #1 (24-10 8:28)	Monster #2 (6-11 9:41)
	Aantal keren geïdentificeerd		
<i>Aerococcus viridans</i>	2		
<i>Petrobacter succinatimandens</i>	6		
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	6	20	20
<i>Bacillus coagulans</i>	2		
<i>Pseudomonas putida</i>	1		
Onbekend	2		



Figuur 4.2. Kwantificering van totaal bacteriën, *B. thermoamylovorans* en *Petrobacter* spp.

Op basis van de resultaten van de Key Bio-ID zijn Q-PCR analyses ontwikkeld voor *Bacillus thermoamylovorans* en *Petrobacter* spp. (*Petrobacter* lijkt ook relevant omdat deze in gelijke aantallen als *B. thermoamylovorans* wordt aangetoond in de referentie, maar niet meer in de

monsters met een hoge VFA-concentratie). Deze bacteriën zijn in bovenstaande tijdsreeks gekwantificeerd. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4.2.

Uit figuur blijkt dat een zeer groot aandeel van de aanwezige bacteriën kan worden geïdentificeerd als *B. thermoamylovorans*. *Petrobacter* is slechts in lage aantallen aanwezig gedurende het proces. *B. thermoamylovorans* speelt duidelijk een significante rol in dit proces van VFA-productie. In tabel 4.2 is een overzicht gegenereerd van de eigenschappen van deze twee bacteriesoorten. De optimale pH-waarden en temperatuur vallen binnen de range van het watersysteem. Op basis van deze beperkt beschikbare data kan echter niet direct een oorzaak worden toegewezen voor de spontane reproductie van *B. thermoamylovorans*.

De data laat ook zien dat de samenstelling van de microbiologische populatie varieert in de tijd, ook bij stabiele procesomstandigheden.

Inmiddels is een vervolgonderzoek opgezet om te achterhalen waardoor deze bacteriën spontaan in aantallen toenemen en welke sturingsparameters nodig zijn om deze te beheersen (en daarmee de VFA-concentraties in het systeem).

Tabel 4.2 Eigenschappen van de twee relevante micro-organismen

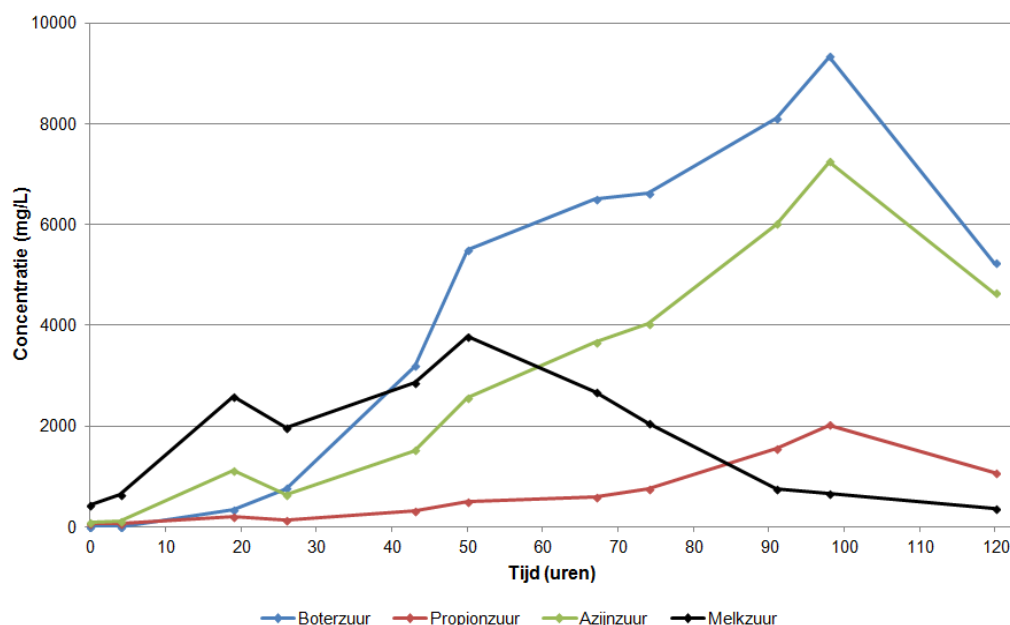
	<i>Petrobacter succinatimandens</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>
Variabele	Omstandigheden	
Respiratie	Aeroob (anaeroob alleen met nitraat)	Facultatief anaeroob
pH voor groei	5,5 – 8,8 (optimaal 6,9)	5,4 – 8,5 (optimaal 7,0)
Temperatuur	35 – 60 (optimaal 55)	Max. 58 (optimaal 50 – 55)
NaCl	Max. 3% (optimaal 0,5%)	
Substraat	Fumaraat, pyruvaat, succinaat, formaat, ethanol, organische zuren	Suikers
Elektronacceptor	Zuurstof of nitraat	
Producten		L-lactaat, formaat, acetaat, ethanol (geen H ₂)
Sporenvormer	Nee	Nee
Bijzonderheden	Tijdens aerobiosis óf in aanwezigheid van nitraat als elektronacceptor worden o.a. de volgende componenten <u>niet</u> gebruikt: acetaat, butyraat, propionaat en lactaat	Amylolitisch (omzetting van zetmeel naar suikers) Switch van homo- naar heterofermentatieve lactaatproductie bij i) switch van lage naar hoge pH en ii) switch van glucose overmaat naar glucoselimiterende condities

4.3 Productie van VFA

De eerste stap in de ontwikkeling is het identificeren van de micro-organismen die een rol spelen in de boterzuurproductie. Door deze identificatie wordt het mogelijk om specifieke analyses op te zetten om deze micro-organismen te kwantificeren en daarmee te achterhalen onder welke condities de boterzuurproductie maximaal wordt gestimuleerd. Deze procedure wordt geïllustreerd aan de hand van de casus van de productie van boterzuur uit de reststroom van Rixona.

4.3.1 Situatie

Om te achterhalen welke micro-organismen het meest relevant zijn voor de productie van boterzuur uit aardappelschillen, is een specifieke boterzuurfermentatie gebruikt waarbij bijna 10 g/L boterzuur is geproduceerd. Deze fermentatie is ingezet met aardappelstoomschillen, afkomstig van Rixona in Warffum. De VFA-concentraties die zijn gemeten gedurende deze fermentatie zijn weergegeven in figuur 4.3. De microbiologische populatie is gebaseerd op microbiologie die van nature al in de reststroom aanwezig is en waarvan de samenstelling onbekend is.



Figuur 4.3. VFA-producties bij een fermentatie bij pH 6,5 en een temperatuur van 30 °C.

4.3.2 Ontwikkeling van Q-PCR analyses op basis van theoretisch beschikbare informatie

Voor het identificeren van de relevante microbiologie en daarmee het verhogen van het productieproces zijn de volgende technieken toegepast:

- **NGS methode.** Met deze analyse worden de microbiologie en bijbehorende functionaliteiten (bijvoorbeeld boterzuurproductie) geïdentificeerd. Aan de hand van deze resultaten kunnen vervolgens specifieke Q-PCR analyses worden ontwikkeld.

- **Q-PCR methode.** Met deze analyse worden microbiële groepen, soorten of functionaliteiten in een monster gedetecteerd en gekwantificeerd.

Om te kunnen sturen richting de productie van VFA's (of andere producten) en het productieproces te kunnen beheersen, is het van belang om vast te stellen welke microbiologie hierin een rol speelt. Door middel van een uitgebreide literatuurstudie is vastgesteld welke metabole routes betrokken zijn bij deze productie en welke micro-organismen en functionele genen (stukjes DNA) hierbij betrokken zijn. Hieruit werd vastgesteld dat de complexiteit in metabole routes zeer hoog is.

Van veel micro-organismen is niet bekend welke route energetisch het meest gunstig is voor de productie van boterzuur. Er is een specifieke Q-PCR analyse ontwikkeld voor de meest relevante route voor boterzuurproductie (via het enzym butyrate kinase). Voor het ontwikkelen van deze analyses is gebruik gemaakt van DNA-sequenties in een wereldwijd beschikbare database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). De ontwikkelde analyse is getest op een aantal fermentaties waarin een hoge boterzuurproductie (>1%) werd gemeten en waar een groot aantal DNA-kopieën van butyrate kinase werd verwacht.

De hier bekende DNA-sequenties bleken onvoldoende aanwezig binnen de boterzuurfermentaties en daarmee bleken de ontwikkelde analyses geen goede monitoringstechniek voor optimalisatie van het proces op te leveren. Daarnaast was onbekend welk micro-organisme betrokken is bij dit proces binnen deze specifieke fermentatie. Het ontwikkelen van Q-PCR analyses door gebruik te maken van de "bekende" DNA-sequenties bleek geen toereikende methodiek op te leveren. Er moest dus buiten de gebaande paden gewerkt worden.

4.3.3 Ontwikkeling van Q-PCR analyses op basis van experimentele set-up

Om bovenstaande reden is besloten een diepte screening uit te voeren, waarbij is gekeken naar de soorten bacteriën die direct betrokken zijn bij de boterzuurproductie in deze fermentaties. Op basis van die informatie zijn vervolgens Q-PCR analyses ontwikkeld voor monitoring van die specifieke bacteriën. Gezien de complexiteit van het monster en de sterk variërende resultaten gedurende de verschillende batches, is voor identificatie de NGS (Next Generation Sequencing) aanpak toegepast. Hiermee worden de aanwezige micro-organismen geïdentificeerd, inclusief de functionele eigenschappen die binnen een micro-organisme aanwezig zijn (zoals de genen voor het enzym butyrate kinase).

Omdat binnen de fermentatie meerdere processen tegelijk plaatsvinden, geeft bovenstaande geen inzicht in de microbiologie die direct betrokken is bij de boterzuurproductie. *Lactobacillus* spp. is daarnaast een melkzuurproducent die slechts in mindere mate boterzuur vormt. Daarom is besloten om de complete lijst aan DNA-sequenties te filteren op sequenties die sterke overeenkomsten vertonen met het gen butyrate kinase. Deze is vervolgens gekoppeld aan het micro-organisme waarin het is aangetoond, waarna Q-PCR analyses kunnen worden ontwikkeld voor monitoring van dit organisme. De resultaten na het filteren van deze sequenties zijn weergegeven in tabel 4.4.

Tabel 4.3. Overzicht van de tien meest geïdentificeerde micro-organismen in de boterzuurfermentatie met aardappelstoomschillen.

Abundantie	Organisme
1	<i>Lactobacillus casei</i> W56
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1
3	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
4	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.1304
5	<i>Lactobacillus casei</i> str. Zhang
6	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-12
7	<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III
9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038
10	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334

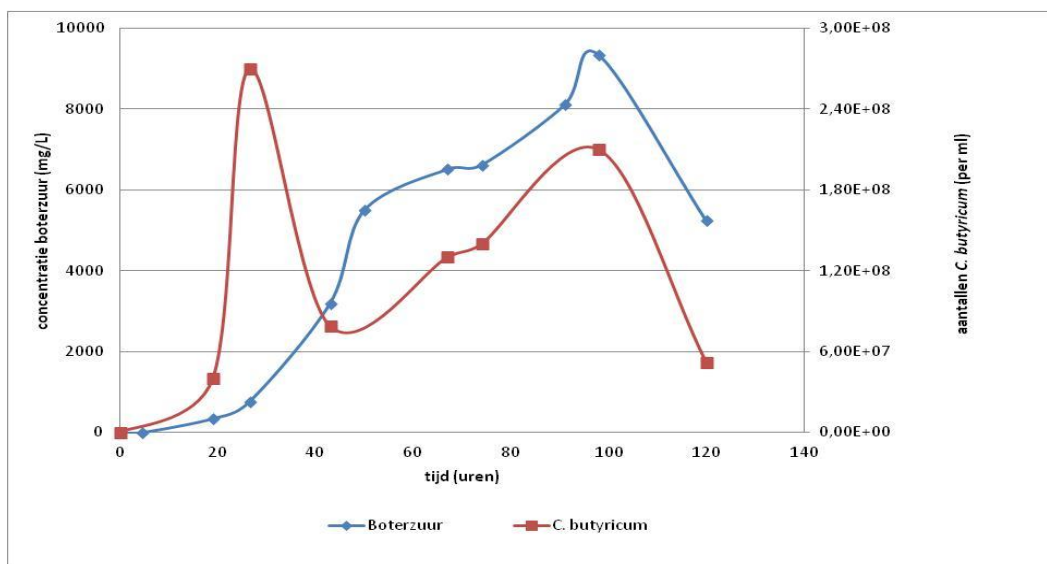
Tabel 4.4. Overzicht van de tien meest geïdentificeerde micro-organismen waaruit de geïdentificeerde butyrate kinase genen afkomstig zijn.

Abundantie	Organisme
1	<i>Lactobacillus casei</i> W56
2	<i>Clostridium butyricum</i> 5521
3	<i>Lactobacillus casei</i> A2-362
4	<i>Lactobacillus casei</i> M36
5	<i>Clostridium butyricum</i>
6	<i>Lactobacillus casei</i> BL23
7	<i>Subdoligranulum variabile</i> DSM 15176
8	<i>Lactobacillus casei</i> T71499
9	<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052
10	<i>Geobacter daltonii</i> FRC-32

Uit de data in tabel 4.4 is afgeleid dat *Lactobacillus* spp. en *Clostridium* spp. de meest waarschijnlijke boterzuurproducenten binnen deze fermentatie zijn. *Lactobacillus* spp. zijn melkzuurbacteriën die melkzuur produceren en in mindere mate ook vluchtige vetzuren zoals azijnzuur en boterzuur.

Gezien de oorsprong van het materiaal is het niet onverwacht dat veel melkzuurbacteriën zijn aangetroffen. Normaal gesproken zijn deze soorten niet de primaire produceerders van boterzuur. Naar verwachting zijn deze soorten verantwoordelijk voor de melkzuurproductie die wordt waargenomen (figuur 4.3). In de grafiek is tevens zichtbaar dat de melkzuurconcentratie halverwege afneemt, terwijl de boterzuurconcentratie blijft toenemen. De meest logische

verklaring ligt in de productie door *Clostridium* spp., die bekend staan als boterzuurproducenten. Om die reden is een Q-PCR analyse ontwikkeld, specifiek voor het detecteren van het butyrate kinase gen van *Clostridium butyricum* 5521. Dit gen is vervolgens gekwantificeerd in de eerder genoemde fermentatie en de resultaten zijn weergegeven in figuur 4.4.



Figuur 4.4. Correlatie tussen de boterzuurproductie en *C. butyricum*.

Er is een significante toename in *C. butyricum* waar te nemen tussen $t=0$ en $t=26,5$. Het aantal cellen stabiliseert vervolgens globaal, tot op $t=100$ een daling in zet. De productie van boterzuur komt op gang na de initiële groeifase; na $t=100$ verdwijnt een belangrijk deel van het gevormde boterzuur, mogelijk door vervolgomzettingen. Het is onduidelijk waarom de productiesnelheid vervolgens weer lijkt af te nemen. Mogelijk dat de condities op dat moment energetisch minder gunstig zijn voor boterzuurproductie (bijv. door een tekort aan nutriënten), waarna de productie wordt teruggeschroefd. Het is ook mogelijk dat de geproduceerde boterzuur weer wordt omgezet naar andere componenten.

4.4 Conclusies

Binnen dit project zijn diverse tools toegepast om inzicht te generen in de relevante microbiële populaties en processen. Aan de hand van de casussen is geconcludeerd dat enkel het meten van het totaal aantal bacteriën of Q-PCR analyses gebaseerd op bestaande kennis onvoldoende is voor metingen in complexe systemen. Een identificatiestap middels NGS of Kloneren & Sequencen vooraf is noodzakelijk om sturingsparameters te definiëren en inzicht te krijgen in de bestaande procesecologie. Voor processen waarbij procesomstandigheden weinig variëren, een minder diverse populatiesamenstelling bevatten of die erg gedomineerd worden door een type proces, is de Kloneren & Sequencen methode een goede aanpak, waarbij de dominante microbiologie op een relatief snelle en goedkope manier kan worden geïdentificeerd. Voor complexere processen waarbij het gaat om meer variatie, bijvoorbeeld door variërende grondstoffen of waarover minder bekend is, is de NGS aanpak een geschikte keuze.



Hoofdstuk 5

Winning van vluchtige
vetzuren



5.1 Inleiding

Om vetzuren geproduceerd tijdens een fermentatie beschikbaar te maken in een kwaliteit die aansluit bij de marktvraag, moeten ze worden opgewerkt. In eerste instantie is daarvoor een bewerking nodig waarmee de vetzuren worden gewonnen uit de fermentatievloeistof. Procede heeft onderzocht welke techniek het meest geschikt is voor het basisconcept.

Voor de winning van vetzuren uit waterige oplossingen zijn verschillende technologieën beschikbaar zoals adsorptie, (membraan)filtratie en extractie. Ook combinaties van deze scheidingsmethoden komen voor.

5.2 Adsorptie

Adsorptie is een scheidingsproces waarbij de vetzuren vanuit de vloeistoffase worden gebonden aan onoplosbare vaste deeltjes, het adsorbent.

Er worden twee soorten adsorptie onderscheiden, fysische en chemische adsorptie. Bij fysische adsorptie zijn de bindingen met het adsorbent relatief zwak. Bij chemische adsorptie vindt er werkelijk een chemische reactie plaats en is de binding relatief sterk. Bij de juiste keuze van een adsorbent, is het mogelijk om een selectieve scheiding van componenten te realiseren.

Er zijn verschillende adsorbentia die geschikt kunnen zijn voor adsorptie van vetzuren:

- Actief kool
- Polymeren
- Zeolieten

Actief-kooladsorptie is een effectief behandelingsproces voor het verwijderen van een brede variëteit aan organische verbindingen afkomstig uit diverse industriële bronnen. Actief-kooladsorptie wordt het meest toegepast voor de verwijdering van lage concentraties niet-afbreekbare organische verbindingen in grondwater, drinkwaterbronnen, proceswater of als polishing-stap na bijvoorbeeld een biologische behandeling. Het principe van actief-koolfiltratie is gebaseerd op de adsorberende capaciteit van het actief kool, dankzij het grote interne oppervlak.

Veruit de meeste adsorbentia voor ionenwisseling zijn gemaakt van polymeren met bepaalde actieve groepen. De mate van adsorptie hangt af van de sterkte van de basische groepen. Basische polymeren worden gebruikt voor de adsorptie van korte vetzuren uit waterige oplossingen. Daarnaast zijn goede resultaten verkregen met de adsorptie van korte vetzuren uit wijn. Veel polymere adsorbentia worden gebruikt als medium voor ionenwisseling.

Zeolieten die gebruikt worden voor de adsorptie van korte vetzuren zijn vaak een combinatie van silica en aluminium of silica met actieve groepen om selectief de vetzuren aan zich te binden. Ook combinaties met polymeren komen voor.

Naast bovengenoemde soorten adsorbentia zijn er nog verschillende andere varianten en materialen die als adsorbent gebruikt kunnen worden.

De meeste industriële processen met adsorptie worden uitgevoerd in gepakte bedden. Hierbij is de pakking het adsorbent en wordt de vloeistof over de pakking geleid. Wanneer het adsorbent verzadigd is met de vetzuren moet het worden geregenereerd om de vetzuren vrij te maken. Over het algemeen wordt dit gedaan met de volgende methoden:

- Thermal swing: vetzuren vrijmaken door verhitten van het adsorbent
- Pressure swing: vetzuren vrijmaken door de druk te verlagen

De thermal swing is de meest simpele en meest gebruikte regeneratiemethode. In de literatuur is deze methode succesvol getest bij de adsorptie van azijnzuur. Hierbij is het gelukt om azijnzuur te concentreren tot een 30% oplossing in water.

Aangetoond is dat (sommige) vetzuren moeilijk of slechts gedeeltelijk desorberen. Getest zijn azijnzuur, propionzuur en melkzuur. Melkzuur adsorbeert goed en verdringt voor een belangrijk deel azijnzuur en propionzuur, waardoor de adsorptiecapaciteit van azijnzuur en propionzuur afneemt.

5.3 Extractie

Vloeistof-vloeistof extractie is het oplossen van een component vanuit de ene vloeistoffase (drager) in een andere vloeistoffase (oplosmiddel) waarbij de vloeistoffases niet in elkaar oplossen. Hierbij heeft de op te lossen component een hogere affiniteit met het oplosmiddel dan met de drager. Hierdoor is het mogelijk om de component te concentreren in het oplosmiddel. Na de extractie wordt het oplosmiddel met de op te lossen component het extractant genoemd. De drager wordt dan het raffinaat genoemd.

Het belangrijkste bij het extractieproces is het kiezen van het juiste oplosmiddel. Dit oplosmiddel kan bestaan uit een pure component of een mengsel van verschillende componenten. De meest belangrijke criteria voor de keuze van het oplosmiddel voor de winning van vetzuren zijn:

- Distributie-coëfficiënt: een hoge waarde voor de distributie-coëfficiënt geeft een hoge affiniteit aan tussen oplosmiddel en component. Hierdoor kan worden volstaan met een lage oplosmiddel/drager flowratio.
- Oplosbaarheid: De oplosbaarheid van drager in het oplosmiddel en vice versa moet zo laag mogelijk zijn om te voorkomen dat er een extra scheidingsstap nodig is om het oplosmiddel terug te winnen uit het raffinaat.
- Kookpunt van het extractiemiddel: Wanneer de geëxtraheerde component weer verwijderd moet worden uit het extractant, wordt dit vaak gedaan door middel van verdamping (destillatie). In het geval van de verwijdering van de vetzuren uit afvalwater, waarbij we te maken hebben met zeer lage concentraties vetzuren, is het

energetisch gunstiger om een hoogkokende component te kiezen. Hierdoor worden tijdens de destillatie de vetzuren verdampt in plaats van de totale stroom extractiemiddel.

De uiteindelijke concentratie in het extractiemiddel is afhankelijk van de distributiefactor, de beginconcentratie en de verhouding tussen het water- en oplosmiddeldebiet.

Er zijn verschillende extractiemiddelen die gebruikt kunnen worden voor de extractie van korte vetzuren uit waterige oplossingen:

- Trioctylphosphine oxide (TOPO)
- Tri-n-octylamine (TOA)
- Tri-n-butylphosphate (TBP)
- Aliquat 336
- Alamine 336

Voor de winning van azijnzuur wordt extractie commercieel toegepast met TOPO als extractant.

Een aantal van bovenstaande extractiemiddelen is onderzocht op de evenwichten met vetzuren. Hieruit blijkt dat distributie-coëfficiënt van de extractanten afhankelijk is van de eigenschappen van de extractant: hoe lager de pH, hoe hoger de distributie-coëfficiënt. Hiernaast spelen concentratie van het extractant in het oplosmiddel en het oplosmiddel zelf een rol.

TOA is getest in verschillende oplosmiddelen. Hierbij komt de combinatie TOA/oleyl alcohol het beste uit het onderzoek bij hogere concentraties. Bij lage concentraties heeft TOA/ethyl acetate de hoogste distributie-coëfficiënt.

5.4 Membraantechnologie

Membraantechnologie is een scheidingsmethode waarbij bepaalde componenten door een semi-permeabele wand kunnen en andere worden tegengehouden. Een membraan splitst een voedingsstroom in een permeaat en een retentaat stroom. Het permeaat is de stroom die door het membraan is gegaan en het retentaat de stroom welke niet door het membraan gaat. Een membraan kan van allerlei materialen gemaakt zijn, zolang het maar semi-permeabel is voor minimaal één component in de voedingsstroom. De structuur van het membraan bepaalt het mechanisme van de scheiding:

- Grootte van de poriën: Door het membraan van poriën te voorzien van een bepaalde grootte, kunnen kleine moleculen wel vrij door het membraan bewegen, maar grotere moleculen kunnen er niet doorheen.
- Diffusie: Dichte membranen kunnen een scheiding bewerkstelligen waarbij bepaalde componenten oplossen in het membraan en vervolgens diffunderen naar de permeaat-fase.

De membranen kunnen niet alleen worden ingedeeld volgens hun structuur, maar ook volgens het proces waarin ze gebruikt worden. Industrieel veel toegepaste membraantechnologieën zijn:

- microfiltratie (MF): $\pm 0.05\text{-}5\ \mu\text{m}$
- ultrafiltratie (UF): $\pm 1.0\text{-}100\ \text{nm}$
- nanofiltratie (NF): $\pm 0.5\text{-}10\ \text{nm}$
- omgekeerde osmose (RO): $\pm 0.1\text{-}1\ \text{nm}$
- gasscheiding (GS): $\pm 0.1\text{-}1.2\ \text{nm}$

Nanofiltratie wordt gebruikt bij de scheiding van vetzuren uit water. Veel vaker wordt gebruik gemaakt van membranen die een adsorptieve werking hebben. Hierbij wordt de component aan de ene kant aan het membraan geadsorbeerd, diffundeert door het membraan en desorbeert aan de andere kant. Ook zijn er combinaties onderzocht waarbij membranen worden gebruikt in combinatie met een extractiemiddel om de scheiding te bevorderen.

Hoewel er vele typen membraanscheidingen bekend zijn, worden er maar een aantal commercieel toegepast voor de winning van opgeloste stoffen en vaak alleen in relatief makkelijke stromen waarin zich geen deeltjes of andere stoffen bevinden die vervuiling kunnen veroorzaken of in stromen waarbij er een goede voorbehandeling plaatsvindt. Op het gebied van de scheiding van vetzuren zijn er weinig commerciële toepassingen van membraantechnologie bekend. Dit vanwege de potentiële (biologische) vervuiling van het membraan.

5.5 Selectie van de scheidingstechnologie

Tabel 5.1 geeft een overzicht van de voor- en nadelen van de in de hierboven genoemde technologieën weer.

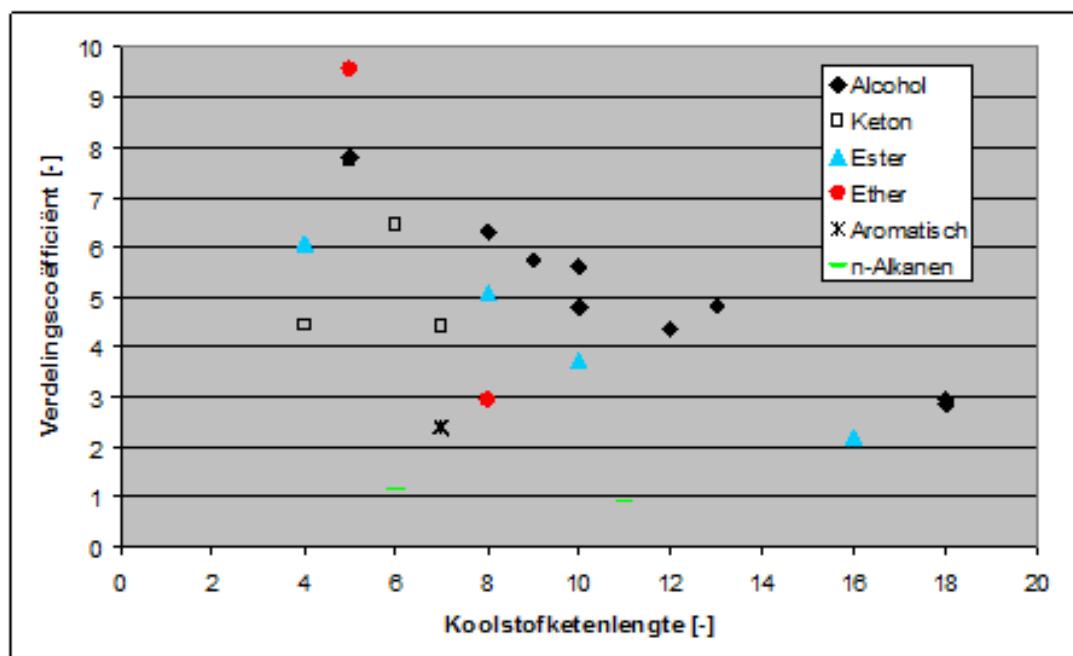
Membraantechnologie wordt op dit moment buiten beschouwing gelaten vanwege de kans op operationele problemen met vervuiling.

Zowel adsorptie als extractie kan goede mogelijkheden bieden om de vetzuren uit het afvalwater te winnen. Gezien het competitieve adsorptiegedrag van de te scheiden vetzuren zal de adsorptiecapaciteit echter (sterk) worden verlaagd.

Extractie is derhalve geselecteerd als technologie voor de winning van vetzuren. In figuur 5.1 wordt voor een aantal verschillende componenten (i.e. alcoholen, ketonen, esters, ethers, aromatische componenten en n-alkanen) de verdelingscoëfficiënt voor boterzuur weergegeven. Uit deze figuur volgt dat de verdelingscoëfficiënt afneemt met toenemende koolstof ketenlengte en dat de verdelingscoëfficiënt van boterzuur voor alcoholen relatief hoog is. Een alcohol met een relatieve korte ketenlengte lijkt dus een geschikt solvent.

Tabel 5.1. Overzicht van de karakteristieken per scheidingstechnologie

Technologie	Voordelen	Nadelen
Adsorptie/ ionenwisseling	Relatief makkelijk regenereerbaar Zeer goed werkzaam bij lage concentraties	Voornamelijk geschikt om hogere concentraties te verkrijgen In gepakte bedden gevoelig voor vervuiling Lage adsorptiecapaciteit door verdringing
Extractie	Kan zeer specifiek worden toegepast op componenten door keuze van extractiemiddel. De keuzemogelijkheden zijn, vanwege de zeer lage distributiecoëfficiënten bij vetzuren, beperkt. Laag energieverbruik	Mogelijk verlies van extractant door oplossing in water Extra scheidingstap om component van extractant te scheiden Een lage distributie-coëfficiënt voor vetzuren waardoor veel extractant nodig is.
Membraantechnologie	Zeer selectieve scheiding mogelijk Energetisch gunstig	Grote kans op verstopping van de poriën door biologische vervuiling en kalkaanslag Relatief duur per m ³ gefiltreerde vloeistof Nog in de ontwikkelingsfase, voornamelijk de combinatie membraan/andere scheidingsmethode



Figuur 5.1. Verdelingscoëfficiënt van boterzuur als functie van de ketenlengte (in C-atomen) van de extractant.

Voor een aantal verschillende componenten (i.e. alcoholen, esters en n-alkanen) is de invloed op de bacteriegroei en op de fasescheiding bepaald. Een negatieve invloed op bacteriëngroei kan betekenen dat, bij toepassing van in-situ extractie, de fermentatie wordt geremd. De negatieve invloed op de bacteriegroei neemt af met toenemende koolstof ketenlengte. Ook de fasescheiding lijkt nogal verschillend; de fasescheiding voor esters is slecht, de fasescheiding voor alkanen en alcoholen nogal wisselend, maar de fasescheiding voor de langere alcoholen lijkt goed.

Overall lijken de twee meest geschikte solvents, die een relatief hoge verdelingscoëfficiënt voor boterzuur hebben, geen negatieve invloed hebben op de groei van bacteriën en eenvoudig van de fermentatie waterfase gescheiden kunnen worden, te zijn:

- Oleylalcohol
- Dodecanol

Een dispersie van oleylalcohol met het fermentatiemengsel is getest en scheidt zich zeer eenvoudig en snel in twee fasen. Een deel van de bacteriën/eiwitten blijft in de organische fase achter. Deze bacteriën/eiwitten bewegen zich na verloop van tijd naar het grensvlak van de organische en waterfase. Oleylalcohol is daarom gekozen als solvent.

Het basisprincipe van de extractie van boterzuur vanuit de waterfase naar de oleylalcohol fase met vervolgens de scheiding van het boterzuur vanuit de oleylalcohol met behulp van vacuümdistillatie is succesvol experimenteel geverifieerd.

De verdelingscoëfficiënten voor de vetzuren (mierenzuur, azijnzuur, propionzuur, melkzuur en boterzuur) zijn experimenteel bepaald. Opvallend is dat de verdelingscoëfficiënten van mierenzuur, azijnzuur, propionzuur en melkzuur niet variëren met de concentratie, terwijl dit wel het geval is bij boterzuur waar de verdelingscoëfficiënt een functie is van de concentratie.

Tabel 5.2. Verdelingscoëfficiënt van vluchtige vetzuren voor oleylalcohol

Vetzuur	Verdelingscoëfficiënt [-] (concentratie basis)	Verdelingscoëfficiënt [-] (molfractie basis)
Mierenzuur	0.14	2.41
Azijnzuur	0.21	3.66
Propionzuur	0.93	16.4
Melkzuur	0.040	0.708
Boterzuur	Variabel tussen 3.2 – 4.1	Variabel tussen 49 – 71

Bovenstaande resultaten zijn gebruikt voor het opstellen van een procesontwerp. Het ontwerp en de economische haalbaarheid van het proces is weergegeven in hoofdstuk 6.



Hoofdstuk 6

Economie van
vetzuurproductie



6.1 Inleiding

De economische haalbaarheid van het concept van vetzuurproductie en -winning is uiteraard van groot belang. Van de reststroom van Smurfit Kappa is op basis van een vrij algemene afweging door Bioclear een inschatting gemaakt van de waarde die uit de reststroom maximaal te winnen is. Van het basisconcept van fermentatie en vetzuurwinning is door Procede een procesontwerp gemaakt. Met dit ontwerp en met de case van Rixona als basis is het idee onderzocht op economische haalbaarheid.

6.2 Waarde uit een reststroom

De waarde die uit een reststroom gegenereerd kan worden hangt in belangrijke mate af van de samenstelling van die stroom en de omvang van de fractie waarmee waarde te genereren is. In het geval van fine screen rejects (FSR) van Smurfit Kappa is specifiek gekeken welke waarde de vezelfractie van de rejects kunnen genereren bij omzetting richting uiteenlopende producten. De uitkomsten van deze beoordeling zijn weergegeven in tabel 6.1.

Tabel 6.1: opbrengst en potentiële waarde van mogelijke producten uit FSR

Toepassing	Product	Marktwaaarde	Opbrengst / ton FSR	Waarde FSR
		€/ton*		€/ton
Materiaal	PHA bioplastic	4000	0,075-0,175 ton PHA	300-700
Chemie	Hogere vetzuren	1000	0,25 ton vetzuren	250
	Azijnzuur	500	0,25 ton azijnzuur	125
Brandstof	Groen Gas	0,72 €/m ³ (SDE)	100m ³ CH ₄ = 114m ³ GG	82
Energie	Elektriciteit + Warmte	0,17 €/kWh (SDE)	333 kWh elektrisch	57
	Elektriciteit + Warmte	0,06 €/kWh	333 kWh elektrisch	20

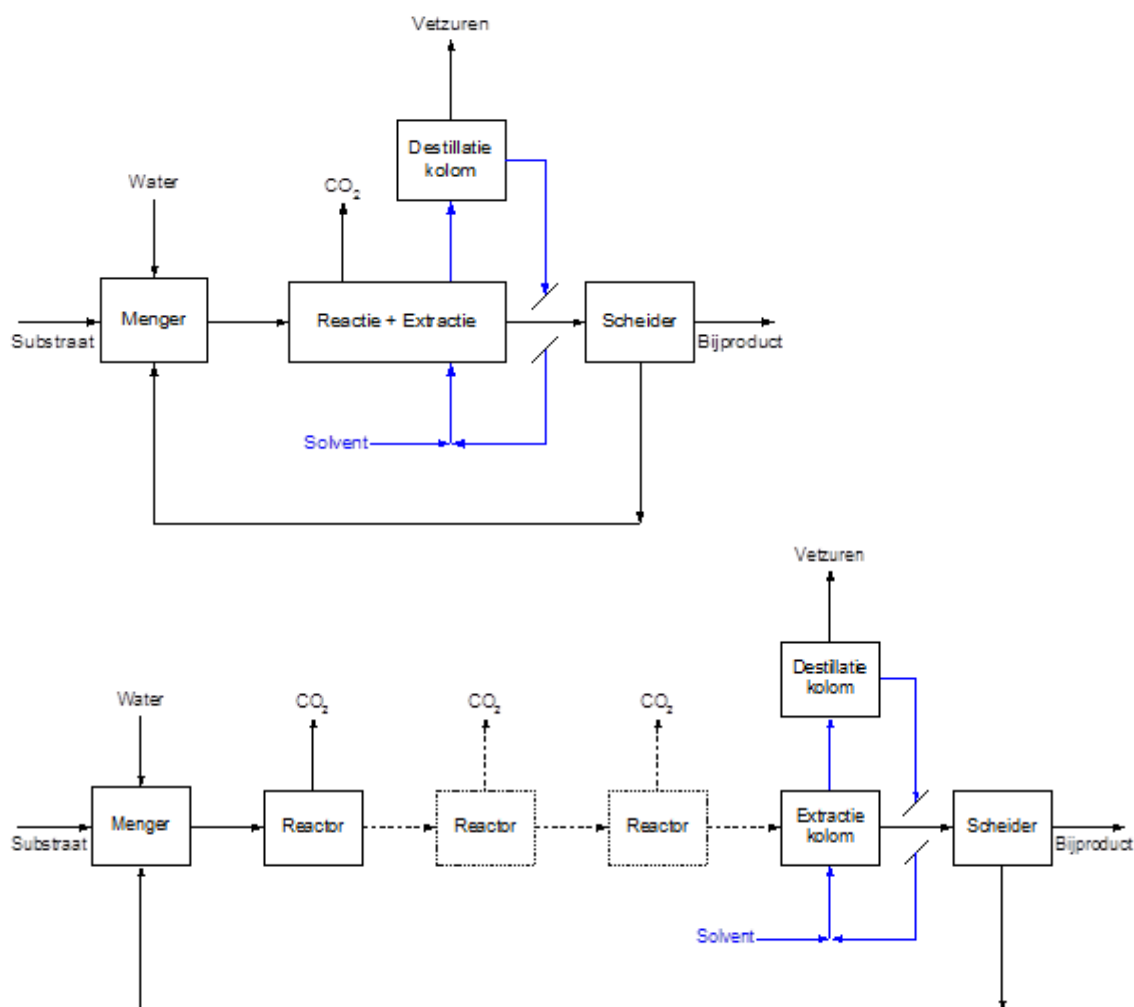
* tenzij anders vermeld

6.3 Procesontwerp

Om tot een inschatting van de kosten van de winning van vetzuren te kunnen komen is een (conceptueel) procesontwerp nodig. Daarbij zijn de volgende opties geëvalueerd:

- In-situ extractie in het geval er productinhibitie optreedt;
- Externe extractie in het geval er geen/nauwelijks productinhibitie optreedt.

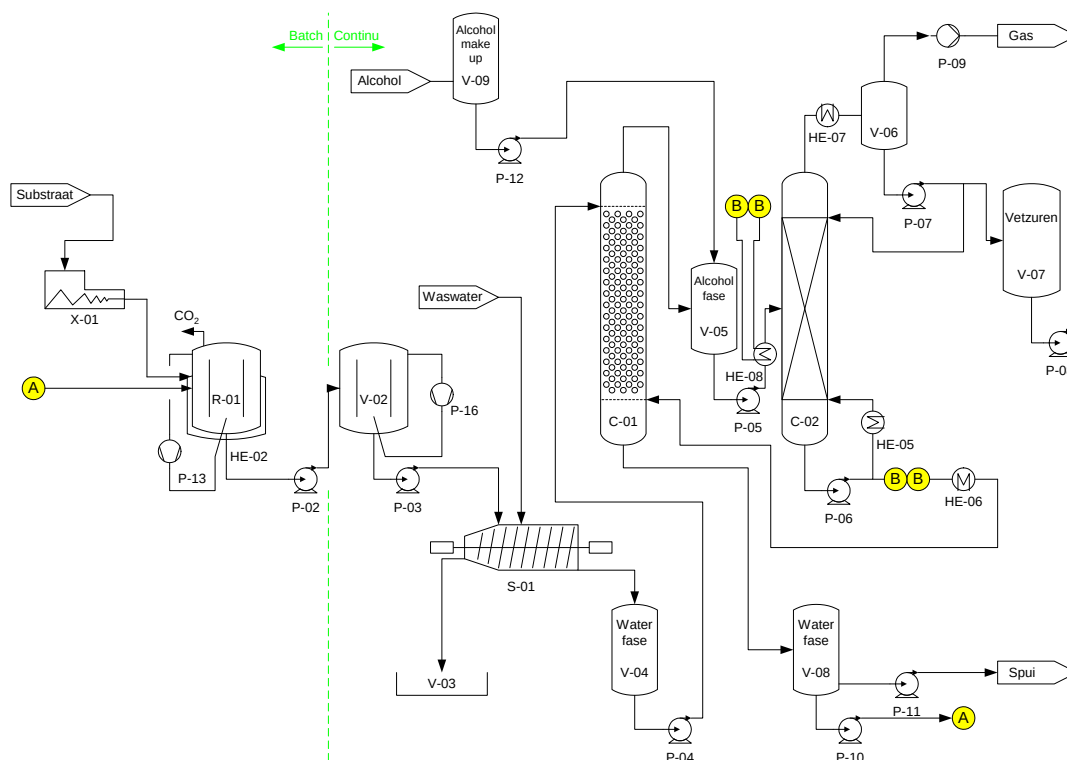
De processchema's zijn weergegeven in figuur 6.1



Figuur 6.1. Processchema's voor in situ extractie (boven) en externe extractie, beiden gevolgd door destillatie.

Van de verschillende procesonderdelen is een volledig procesmodel gemaakt, waarmee de massabalans, de afmetingen en het energieverbruik van de installaties kunnen worden berekend.

Uit een eerste algemene evaluatie blijkt dat, hoewel er geen/nauwelijks productinhibitie optreedt, bij in-situ extractie het verlies aan vetzuur relatief hoog is. Om verliezen te voorkomen is een externe extractie in alle gevallen noodzakelijk. Derhalve is er voor gekozen de variant met externe extractie nader te evalueren. Het processchema van dit model is weergegeven in figuur 6.2.



Figuur 6.2. Processchema bij het economisch rekenmodel. Het proces is gebaseerd op batchfermentatie gecombineerd met continue extractie en destillatie.

6.4 Economische evaluatie

6.4.1 Base case

Om de installaties te kunnen dimensioneren en de economische haalbaarheid in te kunnen schatten dienen diverse uitgangspunten te worden vastgesteld. Belangrijke uitgangspunten van de base case zijn weergegeven in tabel 6.2.

Op basis van bovenstaande wordt de totale investering geschat op circa € 850.000. Het energie- en watergebruik wordt ingeschat op circa € 37.500 per jaar. De grondstofkosten voor substraat, loog, zuur en solvent bedragen circa € 300.000 per jaar, terwijl de opbrengst van vetturen en solids op € 490.000 wordt ingeschat.

De resulterende terugverdientijd van bovenstaande base case bedraagt, op basis van een contante waarde benadering, ongeveer 16 jaar.

Tabel 6.2. Uitgangspunten van de base case.

Parameter	waarde	eenheid
Substraat	Rixona aardappelschillen	
Bedrijfsuren	8.000	uur/jaar
Substraatflow	4.750	ton/jaar
DS substraat	25	gew%
Concentratie substraat in fermentor	40	gew%
Fermentatie reactietijd	48	uur
Concentraties bereikt in fermentor:		
- Mierenzuur		gew%
- Azijnzuur	1,20	gew%
- Propionzuur	0,20	gew%
- Melkzuur	0,20	gew%
- Boterzuur	2,40	gew%
Oplosbaarheid van oleylalcohol in water	0,0015	kg/kg
Oplosbaarheid van water in oleylalcohol	0,0025	kg/kg
Solvent (i.e oleylalcohol) flow	5.000	kg/h
Afschrijvingstermijn	10	jaar
Substraat prijs	17,50	€/ton
Opbrengst vetzuurmengsel	1.000	€/ton

6.4.2 Gevoeligheidsonderzoek

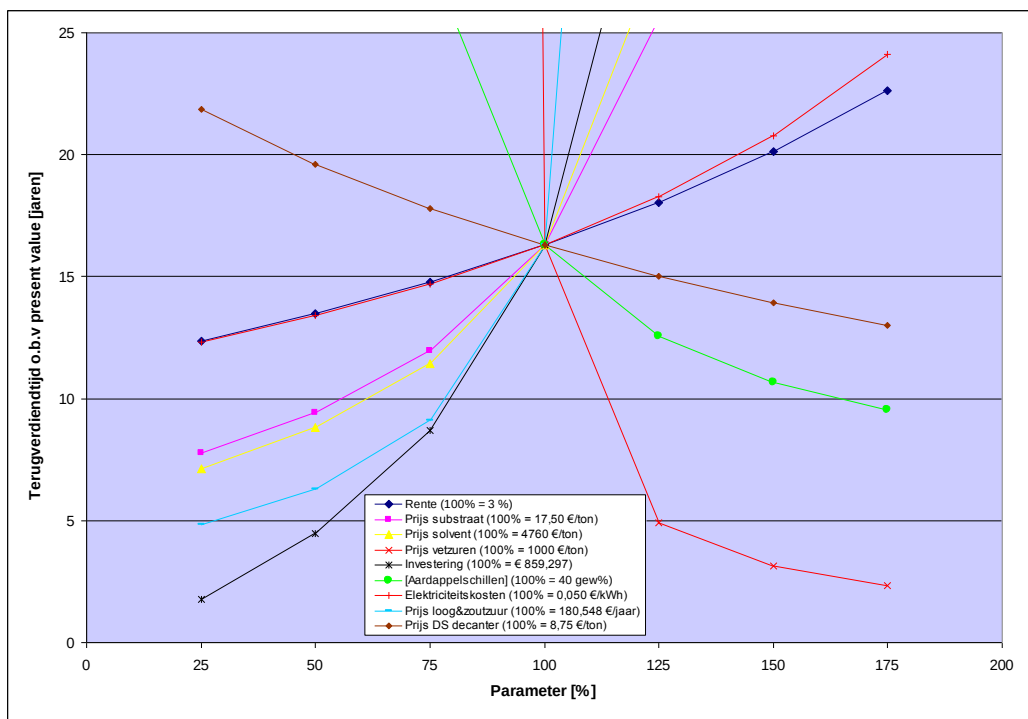
Met het model is onderzocht hoe de terugverdientijd afhangt van diverse parameters. De belangrijkste uitkomsten hiervan zijn grafisch weergegeven in figuur 6.3.

De variabelen die de terugverdientijd het sterkste beïnvloeden zijn;

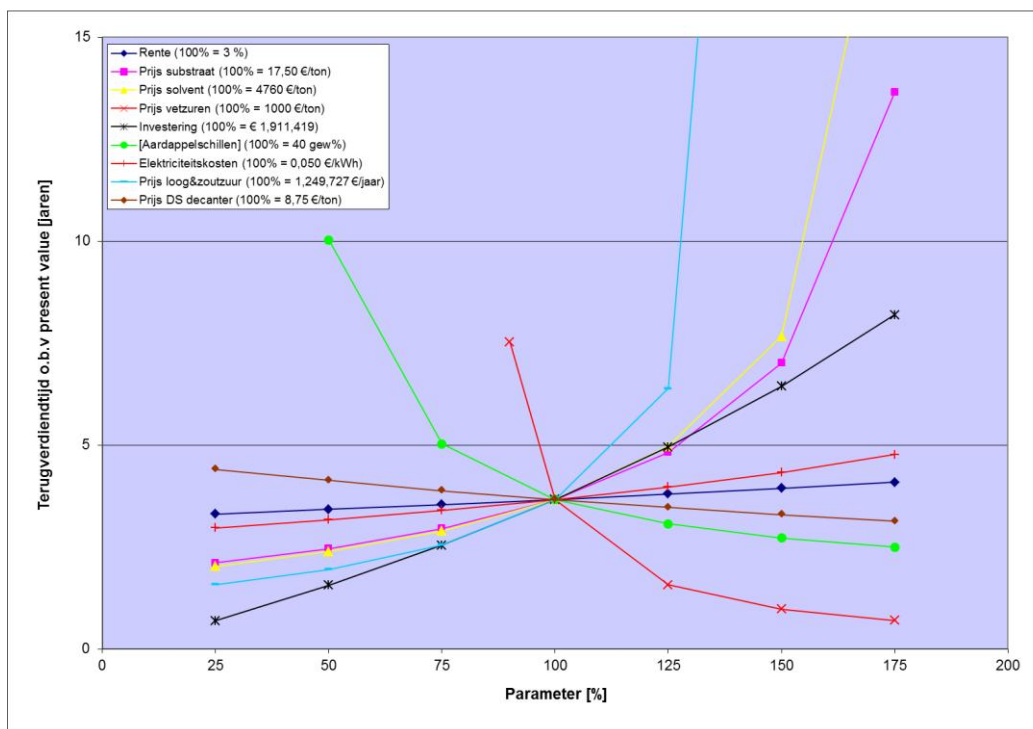
- Prijs van het substraat;
- Prijs van het solvent;
- Prijs van de vetzuren;
- Investeringskosten;
- Kosten van loog- en zuurdosering.

Omdat de gekozen omvang van de installatie beperkt is, is onderzocht of opschaling van het proces tot een gunstigere haalbaarheid zou leiden. Bij een substraatflow van 40.000 ton per jaar, zijnde ongeveer 10% van de in Nederland vrijkomende hoeveelheid, bedraagt de terugverdientijd op basis van een contante waarde ongeveer 4 jaar (figuur 6.4).

Aanbevolen wordt om de gehanteerde uitgangspunten nader vast te stellen. Het betreft met name de benodigde loog- en zuurdosering, de opbrengst van de vetzuren en de samenstelling en de prijs van het substraat.



Figuur 6.3. Variatie van de terugverdiendtijd met uiteenlopende parameters voor de base case



Figuur 6.4. Variatie van de terugverdiendtijd met uiteenlopende parameters voor 40 kton/a



Hoofdstuk 7

De som van de delen: het
concept en de kansen



7.1 Technologie van vetzuurproductie uit biomassa-reststromen

Uit het project komt op hoofdlijnen naar voren dat het **technisch (goed) mogelijk is om vetzuren te produceren en winnen uit biomassa-reststromen**. De praktijk is echter weerbarstig en dat legt beperkingen op aan de toepasbaarheid van het concept.

De microbiologie in een reststroom varieert in de tijd. Met nieuwe technieken is dit goed zichtbaar te maken. In combinatie met kennis van de (overige) proceskarakteristieken, is dit spontane proces goed te begrijpen.

Omdat in 'wilde fermentaties' de microbiologie in de reststroom als entmateriaal voor de fermentatie dient, is het lastig op basis van de reststroom alleen een stabiele fermentatie uit te voeren. In de praktijk zijn voor dit vraagstuk diverse succesvolle oplossingen operationeel: in mestcovergisting dient de mest als entmateriaal en in de waterzuivering wordt veel gewerkt met retourslib dat dezelfde functie vervult.

Fermentatie van biomassa-reststromen laat zien dat variatie in de reststroom, zelfs als deze niet opvallend is, kan leiden tot grote verschillen in de uitkomst van de fermentatie: er wordt een ander mengsel van vetzuren verkregen. De opbrengst van de fermentatie en tot op zekere hoogte de selectiviteit kan echter gestuurd worden, zij het dat dit verschilt per reststroom en per vetzuur.

De **winning van vluchtige vetzuren** kan goed uitgevoerd worden met vloeistofextractie. Een goede beheersing van de zuurgraad is voorwaarde om te komen tot een voldoende hoge efficiëntie van het systeem.

7.2 Economie en markt van vetzuren uit reststromen

De waarde die gecreëerd kan worden met op vetzuren uit reststromen gebaseerde producten verschilt per toepassing. Met name voor toepassingen richting chemie en materialen is de potentie hoog. Bij voldoende volume kan dit aanleiding geven specifieke opties nader te onderzoeken.

Winning van vetzuren uit een specifieke reststroom heeft bij voldoende schaalgrootte een terugverdientijd met perspectief. Hierbij dient oog te zijn voor de bij de evaluatie toegepaste aannames en resterende procesonzekerheden.

Het bereiken van de chemiemarkt is lastig. De ambitie om zuivere vetzuren te leveren is een te hoge ambitie gebleken. De gevraagde zuiverheid en het gevraagde volume kunnen nu nog niet gerealiseerd worden.

7.3 Kansen voor vetzuren uit reststromen

Productie van vetzuren uit biomassa-reststromen kan technologisch en er is een economisch perspectief. Dit perspectief is afhankelijk van de gekozen reststroom en vraagt voldoende schaalgrootte. Ook vraagt het doorontwikkeling van een aantal goede resultaten uit dit project.

Het bedienen van een vergaand ontwikkelde markt vanuit een nieuw concept is een stap te ver. **Een heel lokale en directe toepassing van vetzuren geproduceerd uit een reststroom lijkt de meest perspectiefvolle route.** Een initiatief om de haalbaarheid daarvan te toetsen loopt.

De kansrijkheid van dit initiatief is er in gelegen dat met nieuwe technologie een heel korte nieuwe economische keten wordt ontwikkeld, waarin een alternatief wordt gemaakt voor een bestaand product: de focus wordt nadrukkelijk gelegd op de innovatieve technologie, zonder dat direct werk verzet hoeft te worden om de economische keten of het product 'op gang' te brengen.

De afgelopen jaren zijn er diverse initiatieven geweest in de biobased economy die een vergelijkbaar traject hebben gevolgd. Voorbeelden zijn PHA's en zeefgoed. In beide gevallen vindt de nieuwe technologie vaak z'n eerste toepassing in een economisch relatief laagwaardige gebruiksvorm, maar biedt dit wel de mogelijkheid voor de technologie om voet aan de grond te krijgen, om vervolgens doorontwikkeld te worden ten behoeve van hoogwaardigere toepassingen.

Door de vetzuurproductie op plekken waar ze spontaan optreedt, zoals in proceswater van de agro-food en papierindustrie, beter te beheersen, is het beter mogelijk om deze in goede banen te leiden. Daarmee wordt overlast voorkomen en worden kansen voor valorisatie gemaximaliseerd. Ook dit resultaat krijgt al een vervolg.



Hoofdstuk 8

De deelnemende partijen



8.1 Lijst van deelnemers

Bioclear

Postbus 2262, 9704 CG Groningen

info@bioclear.nl, www.bioclear.nl

Rik Winters winters@bioclear.nl, Geerke Maathuis maathuis@bioclear.nl

IMEnz Bioengineering

LJ Zielstraweg 1, 9713 GX Groningen

research@imenz.com, www.imenz.com

Bertus van den Burg burg@imenz.com

Procede

Postbus 328, 7500 AH Enschede

www.procede.nl

Sjaak van Loo Sjakvan Loo@procede.nl

Eska Graphic Board

Postbus 90, 9610 AB Sappemeer

www.eskagraphicboard.com

Bert Uil b.uil@eskagraphicboard.com

Rixona B.V.

Postbus 5004, 5800 GA Venray

Westervalge 82, 9989 EE Warffum

info@rixona.nl, www.rixona.nl

Harrie Pieterman h.pieterman@rixona.nl

Smurfit Kappa Solidboard

Postbus 5, 9693 ZG Bad Nieuwesches

mail.solidboard@smurfitkappa.nl, www.solidboard.com

Klaas van der Vlist klaas.van.der.vlist@smurfitkappa.nl

WUR

WU Agrotechnologie & Voedingswetenschappen, Laboratory of Microbiology

Dreijenplein 10, 6703 HB Wageningen

www.wageningenur.nl

Caroline Plugge Caroline.Plugge@wur.nl

RUG

Faculteit Wiskunde en Natuurwetenschappen, Chemische Technologie, Instituut voor
Technologie, Engineering en Management

Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen

www.rug.nl

Erik Heeres h.j.heeres@rug.nl



Bumaga BV

Postbus 5486, 6802 EL Arnhem
info@bumaga.nl, www.bumaga.nl
Michiel Adriaanse m.adriaanse@bumaga.nl

Noblesse Proteins

Ambachtsweg 7, 9418 TW Wijster
Hendrik Hylkema

NNZ

Aarhusweg 1, 9723 JJ Groningen
info@nnz.nl, www.nnz.nl
Alies Gonlag agonlag@nnz.nl

Waterschap Noorderzijlvest

Postbus 18, 9700 AA Groningen
info@noorderzijlvest.nl, www.noorderzijlvest.nl
Kees van de Ven k.vandeven@noorderzijlvest.nl

