
Project Biopulping: Selectieve Lignocellulose Ontsluiting met Witrotschimmels'

Rapportage over uitvoering van werkpakketten 1 en 3 (door WUR) en werkpakket 5 (door CNC)

Johan Baars^{1,2}, Ed Hendrix¹ & Patrick Hendrickx¹

¹Wageningen University & Research

²CNC Grondstoffen

Dit onderzoek is in samenwerking met Bioclear Earth en in opdracht van TKI Hernieuwbare Energie uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Plant Breeding, in het kader van project TEBE117013 binnen TKI Hernieuwbare energie.

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, December 2021



Rapport WPR-2021-6

Baars, J.J.P., E. Hendrix, P. Hendrickx, 2021. *Project Biopulping; Selectieve Lignocellulose Ontsluiting met Witrotschimmels*. Wageningen Research, Rapport WPR-2021-6. 52 blz.; 32 fig.; 27 tab.; 5 ref.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/561758>.

Trefwoorden: schimmel, *Ceriporiopsis subvermispora*, lignine, cellulose, hemicellulose, lignocellulose afbraak

© 2021 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Plant Breeding, Postbus 386, 6700 AJ Wageningen; T 0317 48 28 36; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Rapport WPR-2021-6

Foto omslag: Tarwestro doorgroeid met *Ceriporiopsis subvermispora* stam MES14706

Inhoud

Inhoud	3
Woord vooraf	5
Samenvatting	7
1	Werkpakket 1; selectie van de best presterende schimmelstammen. 9
1.1	Gebruikte substraten 9
1.1.1	Ingekuild bermgras 9
1.1.2	Tarwestro 10
1.2	Gebruikte schimmelstammen 10
1.3	Uitvoering van het experiment 11
1.3.1	Proefopzet 11
1.3.2	Toelichting op vezelanalyse m.b.v. ANKOM apparatuur. 13
1.3.3	Optimalisatie vezelanalyse bermgras en tarwestro-substraat 14
1.4	Effecten van behandeling van lignocellulose met verschillende <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> stammen 17
1.4.1	Ingekuild bermgras 17
1.4.2	Tarwestro 21
1.4.3	Vergelijking van de selectieve lignine afbraak in substraat gebaseerd op ingekuild bermgras en op tarwestro. 24
1.5	Best presterende isolaten van <i>C. subvermispota</i> 25
1.6	Conclusie Werkpakket 1 26
2	Werkpakket 3; Doorgroeiing van lignocellulose substraten door stammen van <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> 27
2.1	Gebruikte lignocellulose reststromen 27
2.2	In te zetten behandelingen 27
2.2.1	Doorgroeiing t.b.v. gebruik als substraat voor biogas productie 27
2.2.2	Doorgroeiing t.b.v. gebruik als vezelmateriaal 28
2.3	Uitvoering van de teeltproef 29
2.3.1	Hakselen, bevochtigen en stomen van de substraten 29
2.3.2	Broedbereiding en enten 30
2.3.3	Doorgroeiing van het substraat 30
2.3.4	Bemonstering van het doorgroeide substraat. 33
2.4	Analyse van de doorgroeide substraten 34
2.4.1	Vezelsamenstelling van aangeleverde substraten 34
2.4.2	Substraat voor biogas productie 35
2.4.3	Substraat voor productie vezelmateriaal 38
3	Werkpakket 5; Pasteurisatie van stro substraat en doorgroeien met <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> op semi-industriële schaal 42
3.1	De solid state fermentor 42
3.2	Pasteurisatie van het substraat 43
3.3	Conclusie 49
4	Eindconclusie 50

Woord vooraf

De onderzoeksinspanningen binnen project Biopulping zijn verdeeld over meerdere werkpakketten. De voorbereidingen voor de uitvoering van het project vallen binnen Werkpakket 0. Vervolgens wordt er in Werkpakket 1 gezocht naar de meest optimale stammen van de schimmelsoort waarmee gewerkt wordt. Binnen dit werkpakket worden 30 stammen (20 homokaryons en 10 kruisingen) binnen de soort *Ceriporiopsis subvermispota* onderzocht op hun vermogen om lignocellulose houdende substraten selectief van hemicellulose en lignine te ontdoen.

In werkpakket 2 is gewerkt aan de optimalisatie van de groeiomstandigheden. In dit werkpakket werd gestart met *C. Subvermispota* MES 13094 en werden de werkzaamheden uitgebreid naar de in WP1 geselecteerde stammen. In dit werkpakket werden verscheidene vaste groeisubstraten (graan, sorghum, ..) die typisch in broedproductie gebruikt worden gescreend op geschiktheid voor de productie van axenisch *C. Subvermispota* broed via Solid State Fermentation. Daarnaast is gewerkt aan de ontwikkeling van vloeibaar medium onder niet steriele omstandigheden.

Binnen Werkpakket 3 werden verschillende typen, met name rietachtige, biomassa voorbehandeld met de twee uit WP1 als beste naar voren komende stammen. Het voorliggende verslag rapporteert over de resultaten van dit Werkpakket.

Werkpakket 4 focuste op de voorbehandeling van diverse type grassen (berm- en natuurgras, EVZ maaisel, ..) en genereerde inzicht in de vergistbaarheid van de voorbehandelde grassen. Aan de hand van de batch BMP curves wordt de meerwaarde voor een continue vergister theoretisch berekend. De resultaten worden getoetst aan de praktijkervaringen van de ketenpartners. Aangezien de meeropbrengst en versnelling cruciaal zijn voor inzicht in de business case van biopulping wordt er direct bij de start van het project al begonnen aan dit werkpakket. Dit werkpakket zal tot het eind van het project doorlopen om zo het aantal testen te maximaliseren. Uitkomst is een geoptimaliseerde manier van voorbehandeling en inzicht in de meerwaarde van de techniek.

Binnen Werkpakket 5 werden opschalingsexperimenten uitgevoerd en binnen werkpakket 6 werd gewerkt aan procesontwikkeling. De visie van Bioclear earth bij start van het project was:

- Productie van axenisch broed via SSF
- Transport en on-site opslag van axenisch broed op lage temperatuur
- Wekelijkse on-site productie van vloeibaar inoculum uit axenisch broed onder selectieve omstandigheden
- Wekelijkse beenting van biomassa en biopulping van biomassa onder controle van temperatuur en zuurstofgehalte
- Vergisting van voorbehandelde biomassa.

Deze blauwdruk werd in Werkpakket 6 verder uitgewerkt in termen van benodigde technieken, kosten van deze technieken, inpassing van deze technieken. Aan de hand van de te verwachten kostprijs van biopulping in combinatie met de data uit WP4 wordt geconcludeerd wat de economische haalbaarheid is van het proces. In combinatie met inzichten uit alle werkpakketten wordt vervolgens geconcludeerd of een vervolgotraject ingezet zal worden om de techniek te valideren in de praktijk.

Zoals eerder gezegd, richt dit verslag zich op de resultaten van werkpakketten 1 en 3 van het Biopulping project. Binnen werkpakket 3 werden verschillende typen biomassa voorbehandeld met de twee uit WP1 als beste naar voren komende stammen. Er werd daarbij gewerkt met twee mogelijke toepassingen van het op te leveren behandelde materiaal. Deze toepassingen waren biogasproductie (op basis van tarwestro) en productie van vezelmateriaal voor de papier industrie (op basis van *Miscanthus*, Natuurgras, Lisdodde, Vlasleem en Hennepscheven).

De bovengenoemde materialen werden doorgroeid met 3 *C. subvermispota* stammen; MES15032 als beste monokaryon in WP1, MES14706 als beste dikaryon in WP1 en MES13094 als referentie uit de eerdere biogas testen. Het schimmeldoorgroeide materiaal werd op verschillende momenten tijdens de kolonisatie door de schimmels bemonsterd en het bemonsterde materiaal werd geanalyseerd op vezelsamenstelling. De materialen werden vervolgens opgestuurd naar Bioclear Earth voor verdere analyse (saccharificeerbaarheid en biogas productie).

Uitkomst van het totale project is inzicht in meerwaarde van pretreatment voor verschillende biomassasoorten voor verschillende toepassingsgebieden (energie, vezel, chemie, feed).

Samenvatting

In Werkpakket 1 (uitgevoerd door WUR Plant Breeding) is gezocht naar de meest optimale stammen van *Ceriporiopsis subvermispota*. Hiervoor zijn 30 stammen (20 homokaryons en 10 kruisingen) binnen de soort *C. subvermispota* onderzocht op hun vermogen om tarwestro en ingekuild bermgras selectief van hemicellulose en lignine te ontdoen. Op basis van de resultaten van Werkpakket 1 blijken *C. subvermispota* stammen MES15023 (monokaryon), MES15032 (monokaryon) en MES14706 (dikaryon) het meest selectief in de afbraak van lignine in zowel tarwestro als bermgras en is het resultaat van doorgroeien van de substraten met deze stammen een relatieve verrijking in cellulose.

In Werkpakket 3 (eveneens uitgevoerd door WUR Plant Breeding) zijn verschillende typen biomassa voorbehandeld met de uit Werkpakket 1 als beste naar voren komende stammen. Er werd daarbij gewerkt met twee mogelijke toepassingen van het op te leveren behandelde materiaal. Deze toepassingen waren biogasproductie (op basis van tarwestro) en productie van vezelmateriaal voor de papier industrie (op basis van Miscanthus, Natuurgras, Lisdodde, Vlaslemen en Hennepscheven). De bovengenoemde materialen werden doorgroeid met 3 *C. subvermispota* stammen; MES15032 als beste monokaryon in WP1, MES14706 als beste dikaryon in WP1 en MES13094 als referentie uit de eerdere biogas testen. Het met schimmel doorgroeide materiaal werd op verschillende momenten tijdens de kolonisatie door de schimmels bemonsterd en het bemonsterde materiaal werd geanalyseerd op vezelsamenstelling. Stro substraat raakte (evenals in Werkpakket 1, goed doorgroeid met alle drie de schimmelstammen. Ook Miscanthus, vlaslemen en hennepscheven raakten goed doorgroeid met beide geteste schimmelstammen. In tegenstelling tot tarwestro en miscanthus, raakte het natuurgras substraat slechts met moeite doorgroeid. Lisdodde raakte nauwelijks gekoloniseerd door beide geteste schimmelstammen.

Uitgaande van de selectieve verrijking van substraten met cellulose (door afbraak van hemicellulose en lignine) bleek vooral na 8 weken incubatie het relatieve gehalte aan cellulose in het tarwestro sterk omhoog te zijn gegaan, ten koste van 19% verlies aan droge stof. Na 12 weken was het relatieve gehalte aan cellulose nog sterker gestegen, maar dit ging ten koste van 35% van de droge stof. In Miscanthus steeg de verhouding cellulose/lignine van 4.4 bij aanvang van de schimmelincubatie gestaag naar 9.8 na 19 weken incubatie met stam MES 15032, maar dit ging ten koste van 20% van de droge stof. Stam MES14706 gaf minder goede resultaten te zien (cellulose/lignine verhouding 6.4 na 19 weken incubatie).

Vlaslemen, natuurgras en hennepscheven werden uitsluitend geanalyseerd na 12 weken doorgroeiing met de schimmels. In geval van vlaslemen steeg de verhouding cellulose/lignine van 2.1 bij aanvang naar 6.6 na 12 weken incubatie met stam MES15032. Dit ging echter ten koste van 24% van de droge stof. Bij stam MES14706 steeg de verhouding cellulose/lignine slechts naar een waarde 3.4 na 12 weken incubatie. In natuurgras steeg de verhouding cellulose/lignine niet erg sterk na 12 weken incubatie met de schimmels, maar er verdween wel ongeveer 44% (MES14706) en 49% (MES15032) van de droge stof. In natuurgras bleek de afbraak niet erg selectief; zowel cellulose, hemicellulose als lignine werden allemaal afgebroken. In geval van hennepscheven steeg de verhouding cellulose/lignine bijzonder sterk na 12 weken incubatie met MES15032; van 3.6 bij aanvang naar 18.5 na 12 weken. Dit ging echter ten koste van 50% van de droge stof. Bij incubatie met MES14706 steeg de verhouding cellulose/lignine na 12 weken incubatie naar 7.1 en dit ging ten koste van 37% van de droge stof. Vanwege de slechte kolonisatie van lisdodde door de beide schimmels is besloten om dit substraat niet verder te analyseren.

Binnen Werkpakket 5 zijn door CNC Grondstoffen een reeks aan experimenten uitgevoerd gericht op het opschalen van de teelt van *C. subvermispota*. In de commerciële praktijk wordt een substraat bedoeld voor schimmelkweek gepasteuriseerd door het substraat door eigen microbiele activiteit te laten opwarmen tot waarden rond 60-65°C. De door CNC Grondstoffen uitgevoerde experimenten hebben echter geen van allen succes gehad. In de solid state fermentor bleek het niet mogelijk om de gewenste temperaturen te bereiken. In een experiment waarin gebruik is gemaakt van commercieel beschikbaar substraat op basis van tarwestro bleek echter dat *Ceriporiopsis subvermispota* niet in

staat bleek om dat substraat te koloniseren (terwijl schimmels zoals *Pleurotus ostreatus* (de oesterzwam) en *Lentinula edodes* (shiitake) daar in de commerciële praktijk geen enkel probleem mee hebben. Mogelijk heeft *C. subvermispora* een probleem met de hoge pH van het commerciële substraat. Pogingen om een selectief substraat te maken door tarwestro te verzuren met citroenzuur waren echter eveneens niet succesvol. Het is duidelijk dat de opschaling van het systeem nog enig werk behoeft.

1 Werkpakket 1; selectie van de best presterende schimmelstammen.

WUR Plant Breeding beschikt over 30 stammen van de schimmel *Ceriporiopsis subvermispora*. Het betreft 20 homokaryons en 10 dikaryons ontstaan uit kruisingen tussen homokaryons. Binnen Werkpakket 1 worden deze 30 stammen onderzocht op hun vermogen om twee lignocellulose houdende substraten selectief van hemicellulose en lignine te ontdoen. De te onderzoeken substraten zijn (ingekuuld) bermgras en tarwestro. Effecten van de behandeling met de schimmels zijn gevolgd aan de hand van massabalansen (op te stellen op basis van natgewicht, droge stof gehalte en as-gehalte bij aanvang en bij elke bemonstering). Veranderingen in de samenstelling van het lignocellulose substraat zijn in kaart gebracht d.m.v. een vezel analyse. De resultaten van dit deel van het onderzoek worden in onderstaand hoofdstuk gedetailleerd besproken.

1.1 Gebruikte substraten

In werkpakket 1 is gebruik gemaakt van twee substraten; ingekuuld bermgras en tarwestro. Deze substraten zijn gekozen in overleg met de begeleidingscommissie van het project. Dit hoofdstuk beschrijft de herkomst van beide substraten en de voorbereidingen die nodig waren om *Ceriporiopsis subvermispora* in het substraat te kunnen laten groeien.

1.1.1 Ingekuuld bermgras

Ingekuuld bermgras werd aangeleverd door projectpartner Attero vanuit een kuil gelegen op het terrein aan de Vamweg 7 in Wijster. Het bermgras was afkomstig uit Groningen, regio Delfzijl en verzameld in het najaar van 2017. Op het moment van het nemen van het bermgrasmonster werd per dag ongeveer 15 ton van het ingekuilde materiaal bijgevoerd aan een GFT vergister. Het snijvlak van de kuil waaruit het bermgras werd verzameld was dus ongeveer 1 dag oud. Voor de bemonstering werd het ingedroogde materiaal opzij gelegd en werd zoveel mogelijk nog warm materiaal verzameld. Het was echter niet mogelijk om erg diep in de kuil te bemonsteren omdat het ingekuilde gras niet uit elkaar getrokken kon worden. Na het verzamelen van 30 kg materiaal in 2 vuilniszakken, is de inhoud van de zakken vacuüm getrokken met een handpompje en zijn de zakken dichtgebonden. Bij aankomst in Wageningen zijn de zakken gelabeld en opgeslagen in een koelcel van Unifarm. Het droge stof gehalte van het ingekuilde bermgras was 23.1% (st. dev. 2.7%, n=3). De pH van het ingekuilde bermgras werd bepaald door 1 deel bermgras te mengen met 10 delen gedemineraliseerd water en na een uur de meting te verrichten. De pH varieerde tussen 4.3 en 4.9.

In een verkennende studie werd onderzocht of *C. subvermispora* in staat was om het ingekuilde bermgras zonder voorbereidingen te koloniseren. Hiertoe werden broedkorrels van rassen MES15020 en MES14700 uitgelegd in bakjes met ge-autoclaveerd bermgras (in triplo). Echter na een week was nog geen groei van het mycelium te zien. Om de groeikracht van de broedkorrel te controleren werden ze weer uit het bermgras gehaald en uitgelegd op moutextract-agar. Ter vergelijking werden ook broedkorrels uitgelegd die niet in het bermgras hadden gelegen. Uit deze test bleek dat na een week in het ingekuilde bermgras het mycelium in de broedkorrel was afgestorven. Mycelium in broedkorrels die niet met het bermgras in aanraking waren gekomen hadden voldoende groeikracht. Vervolgens is het experiment herhaald met bermgras waaraan een beetje calciumcarbonaat was toegevoegd (3 gram per 200 gram natgewicht). Na autoclaveren varieerde de pH afhankelijk van het bakje tussen 5.9 en 6.3. Echter ook in het bermgras met een hogere pH bleek het mycelium niet te kunnen groeien.

Vervolgens is besloten om het bermgras te spoelen. Hiervoor werd 460 gram bermgras ingeweekt in een emmer met 10 liter water waarin 16,4 gram calciumcarbonaat was gesuspenderd. Na incubatie bij kamertemperatuur gedurende het weekend is het bermgras via een papierfilter van het water gescheiden. Het calciumcarbonaat zit dan nog gewoon door het gras heen. Na spoelen werd in het

bermgras een pH van 6.7 gemeten. Bermmaaisel met calciumcarbonaat is vervolgens geautoclaveerd en be-ent met broedkorrels. Na 3 dagen was myceliumgroei op het bermgras te zien. Aangezien het spoelen van het ingekuilde bermgras goede effecten bleek te hebben op de groei van *C. subvermispora* is 26 kg bermgras gemengd met calciumcarbonaat (35.7 g per kg natgewicht bermgras). Plukken bermgras waarin groei van microorganismen zichtbaar was, zijn verwijderd. Het bermgras/calciumcarbonaat mengsel is vervolgens 1 dag in grote tonnen met water gespoeld. Na spoelen werd het overtollig water verwijderd door het gespoelde bermgras uit te laten lekken. Vervolgens werd het bermgras in porties van 200 gram afgevuld in microboxen met een inhoud van 1200 ml (SacO₂, Deinze, België, model TP1200+TPD1200). Tijdens het vullen van de bakjes is gewerkt vanuit een grote kuip. Vanuit deze kuip werden ongeveer 10 bakjes gevuld. Vervolgens werd het resterende bermgras met de hand goed gemengd. Daarna werden weer 10 bakjes gevuld. Vervolgens werd het resterende bermgras weer gemengd met de hand. Dit werd herhaald tot alle bakjes gevuld waren.

Ten behoeve van het berekenen van een massa-balans aan het einde van het experiment werd iedere microbox gewogen voorafgaand en na vullen met bermgras. Verder werd van iedere microbox het gewicht bepaald na autoclaveren (om waterverlies in te kunnen schatten). De pH van het bermgras substraat was 7.1 (st. deviatie 0.3, n=3) voorafgaand aan het autoclaveren. Na autoclaveren van het substraat gedurende 20 minuten op 121°C was de pH gedaald naar 6.7 (st. deviatie 0.1, n=3). De microboxen met bermgras werden ge-ent met 2.6 tot 3 gram broed. De broedkorrels werden zo homogeen mogelijk door het substraat gemengd. Een hoeveelheid van 3 gram broed per 200 gram substraat komt overeen met 15 kg/ton substraat. Uitgaande van een dichtheid van 500 g/liter komt dat overeen met 30 liter broed per ton.

1.1.2 Tarwestro

Ten behoeve van het experiment werd biologisch tarwestro gehaald bij een producent van stro-substraat voor oesterzwamteelt. Behalve stro bevat dat substraat een supplement (eiwit), mineralen en kalk (15 kg calciumcarbonaat/ton). Het stikstofrijke supplement werd met name toegevoegd voor een goede productie aan paddenstoelen en heeft weinig effect op de kolonisatie van het substraat. Dit substraat kon zonder verdere voorbereiding worden gebruikt voor de experimenten. Het gehalte aan droge stof in het substraat was gemiddeld 25.3% (st. deviatie 0.04%, n=3).

Het stro-substraat werd in porties van 150 gram afgevuld in microboxen met een inhoud van 1200 ml (SacO₂, Deinze, België, model TP1200+TPD1200). Tijdens het vullen van de bakjes is gewerkt vanuit een grote kuip. Vanuit deze kuip werden ongeveer 10 bakjes gevuld. Vervolgens werd het resterende bermgras met de hand goed gemengd. Daarna werden weer 10 bakjes gevuld. Vervolgens werd het resterende bermgras weer gemengd met de hand. Dit werd herhaald tot alle bakjes gevuld waren. Ten behoeve van het berekenen van een massa-balans aan het einde van het experiment werd iedere microbox gewogen voorafgaand en na vullen met tarwestro. Verder werd van iedere microbox het gewicht bepaald na autoclaveren (om waterverlies in te kunnen schatten). De pH van het tarwestro was 7.1 (n=2) voorafgaand aan het autoclaveren. Na autoclaveren van het substraat gedurende 20 minuten op 121°C was de pH gedaald naar 7.0 (n=2). De microboxen met bermgras werden ge-ent met 2.5 tot 3 gram broed. Het broed werd zo homogeen mogelijk door het substraat gemengd. Een hoeveelheid van 3 gram broed per 200 gram substraat komt overeen met 15 kg/ton substraat. Uitgaande van een dichtheid van 500 g/liter komt dat overeen met 30 liter broed per ton.

1.2 Gebruikte schimmelstammen

Voor het experiment is gebruik gemaakt van 30 *Ceriporiopsis subvermispora* stammen zoals weergegeven in Tabel 1. Zoals te zien, vallen de stammen in twee grote groepen uiteen; dikaryons (diploïden met twee afzonderlijke kernen per cel) en monokaryons (haploïden met slechts een kern per cel). In de meeste gevallen zijn de monokaryons in een eerder project middels protoplastering geïsoleerd uit de dikaryons. Van alle stammen werd broed gemaakt op sorghum korrels (een gierstsoort). Deze specifieke graansoort wordt op ons lab standaard gebruikt omdat het een mooie donkere korrel oplevert na autoclaveren, waarop de groei van het witte mycelium goed te zien is.

Tabel 1. Overzicht van de gebruikte stammen

Nr.	WUR ref,	Origin	Ploidie (mono/di)
1	MES13094	CBS 347.63	Monokaryon
2	MES14407		Monokaryon
3	MES14698		Dikaryon
4	MES14699		Dikaryon
5	MES14700		Dikaryon
6	MES14701		Dikaryon
7	MES14702		Dikaryon
8	MES14703		Dikaryon
9	MES14704		Dikaryon
10	MES14705		Dikaryon
11	MES14706		Dikaryon
12	MES14707		Dikaryon
13	MES15019	WUR	Monokaryon
14	MES15020	WUR	Monokaryon
15	MES15021	WUR	Monokaryon
16	MES15022	WUR	Monokaryon
17	MES15023	WUR	Monokaryon
18	MES15024	WUR	Monokaryon
19	MES15025	WUR	Monokaryon
20	MES15026	WUR	Monokaryon
21	MES15027	WUR	Monokaryon
22	MES15028	WUR	Monokaryon
23	MES15029	WUR	Monokaryon
24	MES15030	WUR	Monokaryon
25	MES15031	WUR	Monokaryon
26	MES15032	WUR	Monokaryon
27	MES15033	WUR	Monokaryon
28	MES15034	WUR	Monokaryon
29	MES15035	WUR	Monokaryon
30	MES15036	WUR	Monokaryon
31	MES15037	WUR	Monokaryon
32	MES15039	WUR	Monokaryon

1.3 Uitvoering van het experiment

Effecten van de behandeling ingekuild bermgras en tarwestro met de 30 stammen *Ceriporiopsis* subvermispora (zie Tabel 1) wordt gevolgd aan de hand van massabalansen (op te stellen op basis van natgewicht, droge stof gehalte en as-gehalte bij aanvang en bij elke bemonstering).

Veranderingen in de samenstelling van het lignocellulose substraat worden in kaart gebracht d.m.v. een vezel analyse met behulp van ANKOM apparatuur.

Uit de massa-balansen kan worden afgeleid welk van deze schimmelstammen tijdens het doorgroeien van het substraat het minste verlies aan droge stof oplevert. Uit de vezelanalyse kan worden afgeleid in hoeverre het doorgroeien van het substraat gepaard gaat met verliezen aan hemicellulose, cellulose en lignine. De schimmelsoort is gekozen om haar vermogen om selectief lignine af te breken. Tijdens doorgroeiing van het substraat van de verhouding cellulose/lignine daardoor hoger worden.

1.3.1 Proefopzet

Zoals beschreven in paragrafen 1.1.1 en 1.1.2, werd het bermgras en het tarwestro afgevuld in microboxen en ge-ent met broed van de verschillende schimmelstammen. Vervolgens werden de

Tabel 2. Overzicht uitgevoerde behandelingen.

Schimmelstam	Ingekuild bermgras		Tarwestro	
	2 weken incubatie	5 weken incubatie	2 weken incubatie	5 weken incubatie
geen	X	X	X	X
MES14407	X	X	X	X
MES14698	X	X	X	X
MES14699	X	X	X	X
MES14700	X	X	X	X
MES14701	X	X	X	X
MES14702	X	X	X	X
MES14703	X	X	X	X
MES14704	X	X	X	X
MES14705	X	X	X	X
MES14706	X	X	X	X
MES14707	X	X	X	X
MES15019	X	X	X	X
MES15020	X	X	X	X
MES15021	X	X	X	X
MES15022	X	X	X	X
MES15023	X	X	X	X
MES15024	X	X	X	X
MES15025	X	X	X	X
MES15026	X	X	X	X
MES15027	X	X	X	X
MES15028	X	X	X	X
MES15029	X	X	X	X
MES15030	X	X	X	X
MES15031	X	X	X	X
MES15032	X	X	X	X
MES15033	X	X	X	X
MES15034	X	X	X	X
MES15035	X	X	X	X
MES15036	X	X	X	X
MES15037	X	X	X	X

microboxen geïncubeerd bij 24°C en 70% relatieve luchtvochtigheid gedurende 2 en 5 weken. Als negatieve controle werd substraat zonder broed gedurende dezelfde periode geïncubeerd. Alle behandelingen werden in duplo uitgevoerd. Voor de analyse van de effecten van de schimmels op ingekuild bermgras en tarwestro werden per substraat type 122 microboxen gebruikt (dus 244 voor het volledige experiment).

Ten behoeve van het berekenen van een massa-balans aan het einde van het experiment werd iedere microbox gewogen voorafgaand en na vullen met tarwestro. Verder werd van iedere microbox het gewicht bepaald na autoclavieren (om waterverlies in te kunnen schatten). Na incubatie gedurende 2 of 5 weken werden de microboxen met inhoud ingevroren bij -20°C en vervolgens gevriesdroogd. De reden dat er is gekozen voor vriesdrogen in plaats van drogen bij hoge temperatuur, is dat drogen bij hoge temperatuur een negatief effect heeft op de resultaten van vezelanalyse middels ANKOM apparatuur. Van het gevriesdroogde materiaal werden vervolgens kleine monsters genomen voor bepaling van het droge stofgehalte en as-gehalte van het materiaal. Het droge stof gehalte werd bepaald door drogen tot constant gewicht bij 103°C luchttemperatuur. Het as-gehalte werd bepaald door gedurende 4 uur te verassen bij 550°C.

1.3.2 Toelichting op vezelanalyse m.b.v. ANKOM apparatuur.

Vezelanalyse met behulp van ANKOM apparatuur berust in principe op de vezelanalyse ontwikkeld door Van Soest (Van Soest, 1963 a,b; Van Soest & Wine, 1967; Van Soest et al., 1991). In deze methode wordt gedroogd plantmateriaal gewassen bij 100°C met een zeepoplossing op neutrale pH, bestaande uit natrium dodecyl sulfaat (SDS), EDTA, natriumboraat, natriumfosfaat (buffer) en triethyleen-glycol. In deze oplossing lost alle oplosbaar as, vetten, pigmenten, eiwitten, suikers, zetmeel en pectine op. Het materiaal dat na wassen niet is opgelost wordt de Neutral Detergent Fiber (NDF) fractie genoemd. In planten, bestaat de NDF fractie uit onoplosbaar as, hemicellulose, cellulose en lignine.

Een gelijksoortige analyse kan worden uitgevoerd, waarbij het gedroogde plantaardig materiaal wordt gewassen bij 100°C in een oplossing met cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) en zwavelzuur (1N H₂SO₄). Het materiaal dat overblijft na behandeling met deze zure zeepoplossing, wordt Acid Detergent Fiber (ADF) genoemd. Acid Detergent Fiber bestaat uit cellulose, lignine, zuur-onoplosbaar as (AIA) en silica. In de zure zeepoplossing zal naar verwachting het hemicellulose dat in het plantaardig materiaal aanwezig is, oplossen.

Na behandeling van het plantmateriaal met zure zeepoplossing, kan de hoeveelheid cellulose in het monster worden bepaald door een behandeling met geconcentreerd zwavelzuur (72%). Hierdoor lost het cellulose op en blijft het lignine achter, samen met het gedeelte van het as dat niet in zuur oplost. De hoeveelheid lignine die daar in zit, kan worden bepaald door de resterende fractie te verassen. Alle organisch materiaal verdwijnt dan uit het monster en deze hoeveelheid organisch materiaal wordt gelijkgesteld met de hoeveelheid in het materiaal aanwezige lignine. Dit wordt Acid Detergent Lignin (ADL) genoemd.

Door de bovengenoemde behandelingen uit te voeren kan de Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF) en Acid Detergent Lignin (ADL) worden bepaald. Door simpelweg het verschil in gewicht tussen de verschillende fracties te berekenen, kan men een schatting maken van de hoeveelheden hemicellulose, cellulose en lignine in een monster.

- NDF-ADF = hemicellulose
- ADF-ADL = cellulose
- ADL = lignine

ANKOM is het bedrijf dat deze analyses tot op een zekere hoogte heeft geautomatiseerd. Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van ANKOM A2000 apparatuur, waarin tot maximaal 24 monsters gelijktijdig kunnen worden geanalyseerd.

De betrouwbaarheid van deze methode om de gehalten aan hemicellulose, cellulose en lignine te schatten, is sterk afhankelijk van de aanwezigheid van storende stoffen in het plantaardig materiaal. Bekende storende stoffen zijn de vetten. Monsters die meer dan 5% vet bevatten moeten eerst met aceton worden geëxtraheerd voordat ze kunnen worden geanalyseerd volgens de methode van Van Soest. Verder kunnen eiwitten als storende factor werken. Dit hangt samen met de temperatuur waarop het plantaardig materiaal voorafgaand aan de bepaling wordt gedroogd (Jones & Bailey, 1972). Bij hoge temperatuur denatureren de eiwitten in het monster. Als gevolg daarvan worden ze slecht oplosbaar in de neutral detergent oplossing. Natrium sulfiet wordt gebruikt als middel om de oplosbaarheid van eiwitten te verhogen (door het verbreken van zwavelbruggen in de eiwitstructuur), maar heeft als nadeel dat het ook er voor zorgt dat een deel van het lignine oplost (Van Soest & Robertson 1980). Om die reden wordt vriesdrogen als de beste methode gezien om monsters plantaardig materiaal te drogen. Echter, in de dagelijkse praktijk worden monsters vaak bij 70°C gedroogd in een poging om de denaturatie van eiwitten te beperken.

Verder kan onoplosbaar zetmeel de resultaten van de vezelanalyse verstoren. Om dit effect te minimaliseren wordt een thermo-stabiel α -amylase toegevoegd aan de neutral detergent oplossing. Indien gewassen wordt met een acid detergent oplossing, bevat het resulterende acid detergent fiber naast cellulose en lignin een variabele hoeveelheid hemicellulose (xylanen) en andere componenten. De manier om deze fout te minimaliseren is een was-stap met neutral detergent uit te voeren op het monster, voordat de ADF methode wordt toegepast (Van Soest & Robertson 1980).

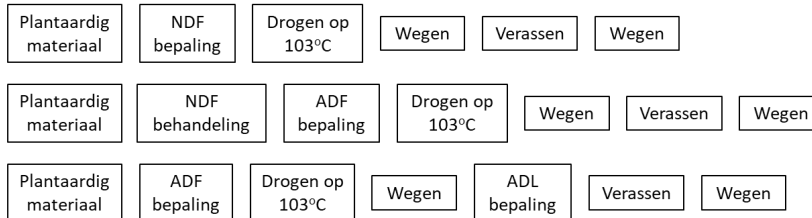
Zoals uit de voorgaande bespreking van de methode al is gebleken, kan as een storende factor zijn. Hier kan voor worden gecorrigeerd middels de manier waarop de analyse wordt uitgevoerd en door te

werken met getallen voor de as-vrije organische fracties van het plantaardig materiaal. Zoals is te zien in Figuur 1, kan de vezelanalyse op twee verschillende manieren worden uitgevoerd; alle bepalingen achter elkaar (sequentieel) of de verschillende bepalingen in parallel (hetgeen de standaard methode

Sequentieel



Standaard methode bij Plant Breeding



Figuur 1. Overzicht van de twee manieren waarop vezelanalyse middels ANKOM is uitgetest.

is bij WUR Plant Breeding). Hoe de as-fractie in de plantaardige materialen zich gedraagt in de neutral detergent oplossing, de acid detergent oplossing en bij de ADL behandeling met geconcentreerd zwavelzuur, laat zich moeilijk voorspellen. Plantaardig materiaal met daarin relatief veel zand (silicium oxide) zal een asrest hebben die niet gemakkelijk in zuren oplost. Plantaardig materiaal met daarin veel calciumcarbonaat zal zich in dat opzicht anders gedragen. Om die reden is in onderstaande paragrafen gekeken hoe de asrest zich gedraagt in de verschillende oplossingen. Met deze informatie in de hand kan vervolgens gekeken worden welke van de beide methoden het beste gebruikt kan worden. Uiteraard is de sequentiële methode waarbij alle behandelingen achter elkaar worden uitgevoerd het minst arbeidsintensief.

1.3.3 Optimalisatie vezelanalyse bermgras en tarwestro-substraat

Voor analyse in de ANKOM apparatuur wordt ongeveer 500 mg droog plantaardig materiaal in een zuurbestendig zakje met een hele lage asrest ingewogen. Vervolgens wordt dit materiaal in de detergens oplossing(en) gedoopt en worden de opgeloste delen met grote volumes water weggespoeld. Na drogen van het zakje met inhoud wordt het gewicht bepaald en zakje met inhoud verast. In Tabel 3 wordt een vergelijking gegeven van de meetwaarden die verkregen worden indien de analyse wordt uitgevoerd op een substraat op basis van ingekuuld bermgras volgens de beide manieren die getoond worden in Figuur 1. Na behandeling met neutral detergent, acid detergent of geconcentreerd zwavelzuur (voor bepaling van ADL) vinden we tussen de 87 en 131 milligram as terug in de vezelfracties na behandeling.

Als we ons eerst richten op de WUR Plant Breeding standaard methode, dan zien we dat we na correctie voor de hoeveelheid as in de vezelfractie (meest rechtse kolom in Tabel 3) een NDF gehalte van 54-57% hebben, een ADF gehalte van 39-42% en een ADL gehalte van 8-12%.

Met deze getallen kunnen we de gehalten aan hemicellulose, cellulose en lignine berekenen volgens onderstaande formules:

- $NDF - ADF = \text{hemicellulose}$ bijv. $57\% - 39\% = 18\%$ hemicellulose
- $ADF - ADL = \text{cellulose}$ bijv. $39\% - 8\% = 31\%$ cellulose
- $ADL = \text{lignine}$ bijv. 8% lignine

Indien we de vezelfracties berekenen volgens de sequentiële methode zoals getoond in Figuur 1, dan komen we op andere waarden uit. Omdat in de sequentiële methode niet na elke stap een as-gehalte wordt bepaald, rekent men met waarden die niet gecorrigeerd zijn voor as. Dat zijn in Tabel 3 de waarden in de op een na meest rechtse kolom). In geval van het monster van stam MES14407 zou dan met de volgende waarden worden gerekend; een NDF gehalte van 77%, een ADF gehalte van 63%. Voor het ADL gehalte wordt met een waarde van 7% gewerkt omdat deze waarde wel voor het

Tabel 3. Vergelijking van twee manieren om ANKOM vezelanalyse uit te voeren op substraat op basis van ingekuuld bermgras.

Stam	Tijdstip bemonstering (weken)	Behandeling	Hoeveelheid in ANKOM zakje vóór	Hoeveelheid in ANKOM zakje na	% resterend na behandeling	% as in vezelfractie	Hoeveelheid as (mg)	Vezelfractie (geen ascorrectie)	Vezelfractie (met ascorrectie)
WUR Plant Breeding standaard methode									
MES14407	2	NDF	500	385	77%	26%	100	77%	57%
MES14407	2	NDF	500	392	78%	28%	108	78%	57%
MES14699	2	NDF	500	378	76%	30%	114	76%	53%
MES14699	2	NDF	500	369	74%	27%	98	74%	54%
MES14407	2	ADF	500	316	63%	36%	114	63%	40%
MES14407	2	ADF	500	318	64%	41%	131	64%	37%
MES14699	2	ADF	500	327	65%	40%	129	65%	40%
MES14699	2	ADF	500	316	63%	30%	95	63%	44%
MES14407	2	ADF-ADL	500	129	26%	68%	87	26%	8%
MES14407	2	ADF-ADL	500	166	33%	72%	119	33%	9%
MES14699	2	ADF-ADL	500	173	35%	64%	110	35%	13%
MES14699	2	ADF-ADL	500	158	32%	68%	108	32%	10%
Sequentieel									
MES14407	2	NDF-ADF-ADL	500	125	25%	74%	92	25%	7%
MES14407	2	NDF-ADF-ADL	500	128	26%	72%	92	26%	7%
MES14699	2	NDF-ADF-ADL	500	140	28%	67%	94	28%	9%
MES14699	2	NDF-ADF-ADL	500	148	30%	66%	98	30%	10%

as-gehalte wordt gecorrigeerd. Als we met deze getallen de gehalten aan hemicellulose, cellulose en lignine berekenen volgens onderstaande formules, krijgen we als waarden:

- NDF-ADF = hemicellulose bijv. 77% - 63% = 14% hemicellulose
- ADF-ADL = cellulose bijv. 63% - 7% = 56% cellulose
- ADL = lignine bijv. 7% lignine

De sequentiële methode geeft een lager gehalte aan hemicellulose en een forse overschatting van het gehalte aan cellulose in het monster. Aangezien de WUR Plant Breeding standaard methode ons meer begrip geeft van de precieze samenstelling van de fracties, is er voor gekozen om alle monsters op basis van ingekuuld bermgras te analyseren met deze methode.

In Tabel 4 wordt een vergelijking gegeven van de meetwaarden die verkregen worden indien de analyse wordt uitgevoerd op een substraat op basis van tarwestro volgens de beide manieren die getoond worden in Figuur 1. In tegenstelling tot het substraat op basis van ingekuuld bermgras, zijn deze analyses voor elk van beide monsters slechts in enkelvoud uitgevoerd. Na behandeling met neutral detergent, acid detergent of geconcentreerd zwavelzuur (voor bepaling van ADL) vinden we

tussen de 13 en 31 milligram as terug in de vezelfracties na behandeling. Dat is veel lager dan de hoeveelheid as in de bermgrasmonsters.

Als we ons eerst richten op de WUR Plant Breeding standaard methode, dan zien we dat we na correctie voor de hoeveelheid as in de vezelfractie (meest rechtse kolom in Tabel 4) een voor MES 15026 na 2 weken incubatie een NDF gehalte van 64% hebben, een ADF gehalte van 47% en een ADL gehalte van 10%.

Tabel 4. Vergelijking van twee manieren om ANKOM vezelanalyse uit te voeren op substraat op basis van tarwestro.

Stam	Tijdstip bemonstering (weken)	Behandeling	Hoewelheid in ANKOM zakje vóór behandeling	Hoewelheid in ANKOM zakje na behandeling	% as in vezelfractie	Hoewelheid as (mg)	Vezelfractie (geen ascorrectie)	Vezelfractie (met ascorrectie)	
WUR Plant Breeding standaard methode									
MES15026	2	NDF	500	353	71%	9%	31	71%	64%
MES14707	5	NDF	500	289	58%	11%	31	58%	52%
MES15026	2	ADF	500	261	52%	11%	28	52%	47%
MES14707	5	ADF	500	236	47%	11%	26	47%	42%
MES15026	2	ADF-ADL	500	70	14%	29%	20	14%	10%
MES14707	5	ADF-ADL	500	54	11%	36%	19	11%	7%
Sequentieel									
MES15026	2	NDF-ADF-ADL	500	59	12%	31%	18	12%	8%
MES15026	2	NDF-ADF-ADL	500	59	12%	32%	19	12%	8%
MES14707	5	NDF-ADF-ADL	500	33	7%	41%	13	7%	4%
MES14707	5	NDF-ADF-ADL	500	36	7%	50%	18	7%	4%

Met deze getallen kunnen we de gehalten aan hemicellulose, cellulose en lignine berekenen volgens onderstaande formules:

- NDF-ADF = hemicellulose bijv. 64% - 47% = 17% hemicellulose
- ADF-ADL = cellulose bijv. 47 - 10% = 37% cellulose
- ADL = lignine bijv. 10% lignine

We kunnen nu kijken of, indien we de vezelfracties berekenen volgens de sequentiële methode zoals getoond in Figuur 1, we op andere waarden uit komen. Omdat in de sequentiële methode niet na elke stap een as-gehalte wordt bepaald, rekent men met waarden die niet gecorrigeerd zijn voor as. Dat zijn in Tabel 4 de waarden in de op een na meest rechtse kolom). In geval van het monster van stam MES15026 zou dan met de volgende waarden worden gerekend; een NDF gehalte van 71%, een ADF gehalte van 52%. Voor het ADL gehalte wordt met een waarde van 8% gewerkt omdat deze waarde wel voor het as-gehalte wordt gecorrigeerd. Als we met deze getallen de gehalten aan hemicellulose, cellulose en lignine berekenen volgens onderstaande formules, krijgen we als waarden:

- NDF-ADF = hemicellulose bijv. 71% - 52% = 19% hemicellulose
- ADF-ADL = cellulose bijv. 52% - 8% = 44% cellulose
- ADL = lignine bijv. 8% lignine

In geval van substraat op basis van tarwestro geeft de sequentiële methode geeft een gehalte aan hemicellulose dat min of meer gelijk is aan het hemicellulose gehalte zoals bepaald met de WUR Plant Breeding standaard methode. Ook de schattingen van het gehalte aan cellulose in het monster liggen voor deze methode dicht bij elkaar. Aangezien de WUR Plant Breeding standaard methode veel arbeidsintensiever is en er een forse vertraging in het project was opgelopen door ziekte van medewerkers, is er voor gekozen om alle monsters op basis van tarwestro te analyseren met de sequentiële methode (wetende dat we de hoeveelheid cellulose ietsjes overschatten).

1.4 Effecten van behandeling van lignocellulose met verschillende *Ceriporiopsis subvermispota* stammen

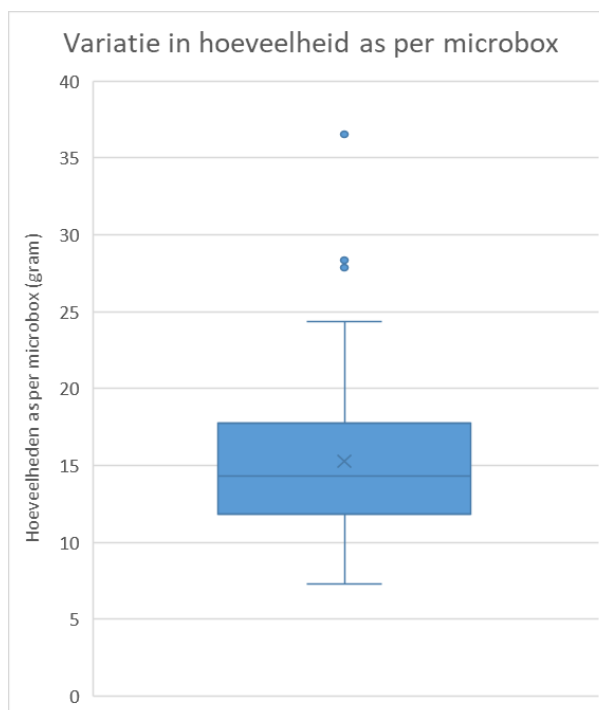
Het experiment werd uitgevoerd met als doel het meest effectieve isolaat van *Ceriporiopsis subvermispota* te identificeren. Het meest effectieve isolaat van *C. subvermispota* kenmerkt zich door een lage consumptie van substraat, gekoppeld aan een zo selectief mogelijke afbraak van lignine. Om dit te kunnen vaststellen is ieder *C. subvermispota* isolaat in duplo gekweekt in ligno-cellulose substraten (ingekuuld bermgras en tarwestro). Bij aanvang van het experiment is de hoeveelheid substraat en het drooggewicht bepaald en na 2 en 5 weken is de resterende hoeveelheid substraat en het drooggewicht bepaald (zie Tabel 2 voor een overzicht). Omdat de hoeveelheden cellulose, hemicellulose en lignine in de substraten op een as-vrije basis zijn bepaald, is van alle substraten die met schimmel waren geïncubeerd ook het as-gehalte bepaald. Aangezien er tijdens het experiment geen as verdwijnt uit de kweek, is aangenomen dat de hoeveelheid as aan het einde van het experiment overeenkomt met de hoeveelheid as die aan het begin van het experiment aanwezig was. Gehalten aan hemicellulose, cellulose en lignine werden bepaald zoals beschreven in paragraaf 3.2.1.. Met behulp van de data voor vers-gewicht, drooggewicht, as-gehalte en percentages hemicellulose, cellulose en lignine in de organische fractie, zijn massabalansen opgesteld. Uit deze massabalansen is vervolgens afgeleid welk *C. subvermispota* isolaat het minste substraat verbruikt, gekoppeld aan de sterkste delignificatie.

1.4.1 Ingekuuld bermgras

1.4.1.1 Homogeniteit van het ingekuilde bermgras

Berekeningen zijn gebaseerd op de veronderstelling dat we het substraat volledig gehomogeniseerd afvullen in de microboxen. Dat kunnen we controleren door te kijken naar de hoeveelheid as die we aan het einde van het experiment in de microbox terug vinden. Indien het substraat inderdaad volledig homogeen was op het moment van afvullen de microboxen, dan zou in iedere microbox ongeveer evenveel as aanwezig moeten zijn. Figuur 2 toont de hoeveelheden as die per microbox zijn berekend op basis van drooggewicht en asgehalte. De hoeveelheden as per microbox variëren tussen 7 en 37 gram. Gemiddeld was 15 gram as aanwezig (standaard deviatie 5, n=120).

Dit doet de vraag rijzen, waar de uitschieters in hoeveelheid as vandaan komen. Een eerste



Figuur 2. Analyse van de berekende hoeveelheden as in bermgras per microbox, op basis van drooggewicht substraat en asgehalte.

mogelijkheid is dat het ingekuilde bermgras erg inhomogeen is en zand bevat in een onregelmatige verdeling. Echter, om dergelijke variatie in het substraat zo veel mogelijk te vermijden is tijdens het vullen van de microboxen gewerkt vanuit een grote kuip. Vanuit deze kuip werden telkens ongeveer 10 microboxen gevuld. Vervolgens werd het resterende bermgras met de hand goed gemengd. Daarna werden weer 10 microboxen gevuld. Vervolgens werd het resterende bermgras weer gemengd met de hand. Dit werd herhaald tot alle microboxen gevuld waren. Een andere mogelijkheid is dat de hoeveelheid as per microbox is overschat als gevolg van een probleem bij de as-bepaling. De waarden voor het as-gehalte van de monsters varieerde tussen 15 en 61% van het drooggewicht (gemiddeld 31%, st. dev. 8%, n=120). Een hoge waarde voor het as-gehalte zou kunnen ontstaan doordat er bij toeval een steentje in het monster voor verassing is terecht gekomen en door de analist niet is opgemerkt. Doordat met een dergelijke foutief hoge waarde is gewerkt zou er dan een onjuist waarde voor de totale hoeveelheid as in de microbox zijn berekend. Zoals te zien in Figuur 2 gaat het in dit geval om 3 outliers op een totaal van 120 waarden.

1.4.1.2 Recovery van droge stof na incubatie van substraat op basis van ingekuild bermgras met *C. subvermispora* isolaten.

Tabel 5 geeft een overzicht van de hoeveelheid droge stof die na 2 of 5 weken incubatie met de verschillende *C. subvermispora* stammen werd teruggevonden. De controle is zonder te zijn beent met een schimmelstam gedurende 5 weken geïncubeerd bij 24°C. In deze controle werd na 5 weken 94% van de droge stof teruggevonden. Na 2 weken incubatie bij 24°C werd tussen 86 en 105% van de droge stof teruggevonden (gemiddeld 93%, st. dev. 5%, n=56. Bij isolaten MES13094, MES14703, MES15022, MES15023, MES15024, MES15026, MES15028, MES15031 en MES15032 was de recovery aan droge stof meer dan 95%.

Na 5 weken incubatie bij 24°C werd tussen 75 en 100% van de droge stof teruggevonden (gemiddeld 85%, st. dev. 9%, n= 56). Bij isolaat MES14698 werd na 5 weken in één van de twee duplo's een ongewoon hoge hoeveelheid droge stof berekend. De andere duplo had een recovery van 85%. Bij isolaten MES14698, MES14700, MES14701, MES14702, MES14407, MES14707, MES15019, MES15020 en MES15021 was de recovery aan droge stof meer dan 85%.

Tijdens het doorgroeien van het substraat wordt een gedeelte van de voedingsstoffen verademd tot CO₂ en H₂O. Een ander deel van de voedingsstoffen wordt omgezet in mycelium componenten. Een lage recovery aan droge stof is waarschijnlijk te wijten aan consumptie van vodingstoffen uit het substraat door de schimmel(s).

Tabel 5. Overzicht van de recovery aan droge stof in bermgras gebaseerd substraat

Recovery van droge stof na het experiment		
	Incubatie duur (weken)	
	2	5
geen	Geen data	94.4%
MES13094	99.3%	76.0%
MES14407	92.6%	90.0%
MES14698	92.0%	121.2%
MES14699	89.5%	83.6%
MES14700	92.2%	92.5%
MES14701	92.7%	86.2%
MES14702	89.7%	92.2%
MES14703	95.8%	79.9%
MES14704	94.1%	83.1%
MES14705	92.9%	84.6%
MES14706	89.4%	82.9%
MES14707	91.5%	98.4%
MES15019	88.8%	87.3%
MES15020	90.4%	87.6%
MES15021	90.3%	87.0%
MES15022	97.0%	79.5%
MES15023	105.5%	76.6%
MES15024	95.9%	77.3%
MES15025	88.0%	80.9%
MES15026	101.7%	83.9%
MES15027	92.0%	76.7%
MES15028	97.5%	74.5%
MES15029	87.8%	79.8%
MES15030	86.4%	78.1%
MES15031	97.2%	75.7%
MES15032	103.3%	79.4%
MES15033	90.0%	76.9%
MES15035	94.3%	76.8%
MES15036	87.5%	84.8%
MES15037	Geen data	

1.4.1.3 Relatieve verrijking met cellulose van substraat op basis ingekuuld bermgras na incubatie met *C. subvermispota* isolaten.

Tabel 6 en 7 geven een overzicht van de geschatte hoeveelheden cellulose, hemicellulose en lignine die in de microboxen aanwezig zijn na respectievelijk 2 en 5 weken incubatie bij 24°C. De controle is, zonder te zijn be-ent met een schimmelstam, gedurende 5 weken geïncubeerd bij 24°C (hetgeen de reden is waarom er geen waarden in Tabel 6 te zien zijn voor de controle (geen isolaat)).

Tabel 6. Relatieve verrijking van substraat gebaseerd op ingekuuld bermgras na 2 weken incubatie met diverse *C. subvermispota* stammen

Isolaat	Recovery van hemicellulose (g)	Recovery van cellulose (g)	Recovery van lignine (g)	Cellulose/lignine ratio
geen				
MES15026	-1.0	15.0	2.4	6.2
MES15032	-2.2	13.8	2.4	5.8
MES13094	-2.4	14.5	2.7	5.4
MES15023	-1.1	16.0	3.0	5.4
MES15031	-2.2	13.7	2.7	5.1
MES15027	-0.1	16.4	3.3	5.0
MES15030	-0.1	13.8	2.9	4.8
MES14704	0.0	17.3	3.8	4.6
MES14699	-0.2	15.5	3.4	4.6
MES15029	-1.3	13.3	2.9	4.5
MES15022	-0.6	15.1	3.4	4.5
MES14703	-1.8	14.5	3.2	4.5
MES14705	0.2	15.6	3.6	4.3
MES14701	1.0	15.5	3.6	4.3
MES14407	2.0	17.3	4.1	4.2
MES14707	2.3	16.2	3.8	4.2
MES15021	-0.4	16.0	3.9	4.2
MES15024	1.3	17.1	4.1	4.1
MES15019	1.7	16.5	4.0	4.1
MES15035	0.7	15.6	3.8	4.1
MES15033	-0.1	14.1	3.5	4.0
MES14700	0.8	16.7	4.2	4.0
MES15036	1.5	15.9	4.1	3.9
MES15028	0.2	16.5	4.3	3.9
MES14698	1.0	17.1	4.5	3.8
MES14706	2.6	15.8	4.2	3.8
MES15025	0.1	16.2	4.3	3.8
MES14702	-0.2	17.4	4.8	3.6
MES15020	2.1	14.8	4.2	3.6
MES15037		Geen data		

Zoals te zien in Tabel 6 en 7 zijn de schattingen van de hoeveelheden hemicellulose in het substraat op basis van ingekuuld bermgras erg laag. In een flink aantal gevallen levert de berekening van NDF-ADF zelfs een negatief getal op. Ook in de controle die niet met schimmel is be-ent, is in Tabel 7 een licht negatieve waarde voor de geschatte hoeveelheid hemicellulose te zien.

De hoeveelheid cellulose in de controle is 14.0 gram. De schattingen voor de hoeveelheden cellulose in de substraten na 2 weken incubatie met schimmel liggen tussen 13.3 en 17.4 gram. De schattingen voor de hoeveelheden cellulose in de substraten na 5 weken incubatie met schimmel liggen tussen 9.5 en 14.7 gram. In geval van incubatie met schimmelisolaat MES14698 is er zelfs sprake van 20.8 gram cellulose, maar dit is een gevolg van de overschatting van de hoeveelheid droge stof in de microbox (zie Tabel 5).

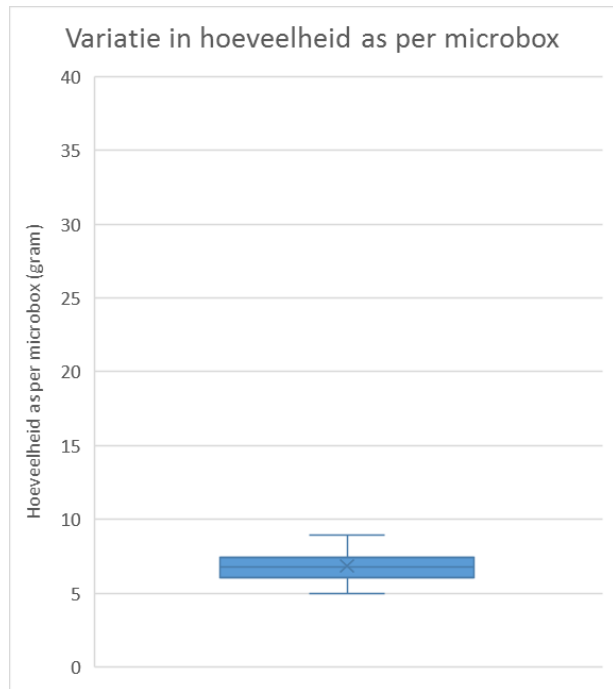
De hoeveelheid lignine in de controle 3.1 gram. De schattingen voor de hoeveelheden lignine in de substraten na 2 weken incubatie met schimmel liggen tussen 2.4 en 4.8 gram. De schattingen voor de hoeveelheden lignine in de substraten na 5 weken incubatie met schimmel liggen tussen 1.7 en 5.1 gram. De schatting van 5.1 gram is een gevolg van de overschatting van de hoeveelheid droge stof in de microbox schimmelisolaat MES14698 (zie Tabel 5).

Tabel 7. Relatieve verrijking van substraat gebaseerd op ingekuild bermgras na 5 weken incubatie met diverse *C. subvermispora* stammen

Isolaat	Recovery van hemicellulose (g)	Recovery van cellulose (g)	Recovery van lignine (g)	Cellulose/lignine ratio
geen	-0.3	14.0	3.1	4.5
MES14707	-4.8	10.5	1.7	6.0
MES14705	-3.5	11.3	2.1	5.5
MES15022	-3.4	11.1	2.1	5.3
MES14703	-2.4	11.6	2.3	5.0
MES15023	-3.3	10.3	2.1	5.0
MES15031	-3.3	9.5	1.9	5.0
MES14701	-2.3	12.4	2.5	4.9
MES15030	-2.4	10.3	2.1	4.9
MES14702	-4.2	11.8	2.4	4.8
MES15027	-2.3	10.2	2.1	4.8
MES14706	-2.3	12.3	2.6	4.8
MES15019	-3.2	12.3	2.6	4.7
MES15020	-2.1	12.6	2.8	4.5
MES14407	-2.1	11.7	2.6	4.5
MES15025	-1.7	11.1	2.5	4.5
MES15028	-3.0	10.0	2.2	4.5
MES15032	-2.5	10.9	2.5	4.4
MES14700	-2.5	14.0	3.2	4.3
MES14704	-2.9	11.1	2.7	4.2
MES15021	-0.5	13.1	3.2	4.1
MES15026	-0.8	11.9	2.9	4.1
MES14698	1.3	20.8	5.1	4.0
MES15029	-2.6	10.5	2.6	4.0
MES15036	-2.2	11.1	2.9	3.9
MES15033	-0.6	13.0	3.4	3.8
MES15024	-0.4	11.3	3.0	3.7
MES14699	-0.2	14.7	4.0	3.7
MES15035	-0.8	10.5	3.1	3.4
MES13094	-0.5	12.1	4.3	2.8
MES15037		Geen data		

Om een indruk te krijgen van de mate waarin selectief lignine is verwijderd uit het substraat door de *C. subvermispota* stammen, is een cellulose/lignine ratio berekend. Voor de controle is die ratio 4.5. Na 2 weken incubatie is de ratio cellulose/lignine opgelopen tot 6.2 (MES15026), 5.8 (MES15032) en 5.4 (MES13094 en MES15023). Na 5 weken incubatie is de ratio cellulose/lignine echter terug gelopen tot 4.1 (MES15026), 4.4 (MES15032), 2.8 (MES13094) en 5.0 (MES15023).

Na 5 weken incubatie zijn de isolaten waarbij de hoogste ratio cellulose/lignine werd gevonden MES14707 (ratio 6.0), MES14705 (ratio 5.5), MES15022 (ratio 5.3) en MES14703, MES15023 of MES15031 (alleen ratio 5.0).



Figuur 3. Analyse van de berekende hoeveelheden as in tarwestro per microbox, op basis van drooggewicht substraat en asgehalte.

1.4.2 Tarwestro

1.4.2.1 Homogeniteit van het gebruikte tarwestro

Berekeningen zijn gebaseerd op de veronderstelling dat we het substraat volledig gehomogeniseerd afvullen in de microboxen. Dat kunnen we controleren door te kijken naar de hoeveelheid as die we aan het einde van het experiment in de microbox terug vinden. Indien het substraat inderdaad volledig homogeen was op het moment van afvullen de microboxen, dan zou in iedere microbox ongeveer evenveel as aanwezig moeten zijn. Figuur 3 toont de hoeveelheden as uit het tarwestro-substraat die per microbox zijn berekend op basis van drooggewicht en asgehalte. De hoeveelheden

Tabel 8. Overzicht van de recovery aan droge stof in tarwestro gebaseerd substraat

Isolaat	Incubatie duur (weken)		Isolaat	Incubatie duur (weken)	
	2	5		2	5
geen	Geen data	90.9%	MES15021	100.1%	87.4%
MES13093	Geen data	89.9%	MES15022	96.4%	82.3%
MES13094	98.7%	91.9%	MES15023	97.8%	79.7%
MES14407	96.9%	88.2%	MES15024	100.0%	88.3%
MES14698	94.6%	89.2%	MES15025	98.3%	91.7%
MES14699	96.9%	88.3%	MES15026	99.9%	93.3%
MES14700	99.4%	95.3%	MES15027	99.3%	86.9%
MES14701	100.4%	95.1%	MES15028	99.7%	87.5%
MES14702	100.8%	90.6%	MES15029	97.6%	91.4%
MES14703	98.6%	88.5%	MES15030	100.7%	84.5%
MES14704	100.1%	87.1%	MES15031	95.6%	86.0%
MES14705	99.5%	85.3%	MES15032	97.6%	83.6%
MES14706	99.0%	82.7%	MES15033	98.5%	91.7%
MES14707	100.0%	86.3%	MES15035	101.4%	85.9%
MES15019	96.3%	91.8%	MES15036	96.8%	86.8%
MES15020	101.1%	85.6%			

as per microbox variëren tussen 5 en 9 gram. Gemiddeld was 7 gram as aanwezig (standaard deviatie 1, n=116). Daarmee is het tarwestro-substraat veel homogener gebleken dan het substraat op basis van ingekuild bermgras (met hoeveelheden as per microbox die variëren tussen 7 en 37 gram, gemiddeld 15 gram st. dev. 5, n=120).

1.4.2.2 Recovery van droge stof na incubatie van substraat op basis van tarwestro met *C. subvermispota* isolaten.

Tabel 8 geeft een overzicht van de hoeveelheid droge stof die na 2 of 5 weken incubatie van tarwestro gebaseerd substraat met de verschillende *C. subvermispota* stammen werd teruggevonden. De controle is zonder te zijn be-ent met een schimmelstam gedurende 5 weken geïncubeerd bij 24°C. In deze controle werd na 5 weken 91% van de droge stof teruggevonden.

Na 2 weken incubatie bij 24°C werd tussen 93 en 104% van de droge stof teruggevonden (gemiddeld 99%, st. dev. 3%, n=58). Bij isolaten MES15026, MES14707, MES15024, MES15021, MES14704, MES14701, MES15030, MES14702, MES15020 en MES15035 was de recovery aan droge stof gemiddeld 100%.

Na 5 weken incubatie bij 24°C werd tussen 75 en 99% van de droge stof teruggevonden (gemiddeld 88%, st. dev. 4%, n= 57). Bij isolaten MES14702, MES15029, MES15025, MES15033, MES15019, MES13094, MES15026, MES14701 en MES14700 was de recovery aan droge stof gemiddeld meer dan 90%.

1.4.2.3 Relatieve verrijking met cellulose van substraat op basis van tarwestro na incubatie met *C. subvermispota* isolaten.

Tabel 9 en 10 geven een overzicht van de geschatte hoeveelheden cellulose, hemicellulose en lignine die in de microboxen aanwezig zijn na incubatie van het tarwestro gebaseerd substraat gedurende respectievelijk 2 en 5 weken bij 24°C. De controle is zonder te zijn be-ent met een schimmelstam gedurende 5 weken geïncubeerd bij 24°C.

Na 5 weken incubatie bevatte de microbox met de onbe-ente controle 5.8 gram hemicellulose. Na 2 weken incubatie was in de microboxen met tarwestro-substraat nog tussen 3.3 en 5.5 gram hemicellulose over. Na 5 weken incubatie was dat gedaald naar waarden tussen 0.68 en 4.9 gram.

Na 5 weken incubatie bevatte de microbox met de onbe-ente controle 12.9 gram cellulose. De schattingen voor de hoeveelheden cellulose in de substraten na 2 weken incubatie met schimmel liggen tussen 11.5 en 13.7 gram. De schattingen voor de hoeveelheden cellulose in de substraten na 5 weken incubatie met schimmel liggen tussen 8.7 en 12.1 gram.

Na 5 weken incubatie bevatte deze microbox met de onbe-ente comtrole 3.4 gram lignine. De schattingen voor de hoeveelheden lignine in de substraten na 2 weken incubatie met schimmel liggen tussen 2.6 en 3.8 gram. De schattingen voor de hoeveelheden lignine in de substraten na 5 weken incubatie met schimmel liggen tussen 1.1 en 3.2 gram.

Om een indruk te krijgen van de mate waarin selectief lignine is verwijderd uit het substraat door de *C. subvermispota* stammen, is een cellulose/lignine ratio berekend. Voor de onbe-ente controle is die ratio 3.8. Na 2 weken incubatie is de ratio cellulose/lignine opgelopen tot 4.6 (MES15022) en 4.0 (MES14698, MES14703, MES15029 en MES15031). Na 5 weken incubatie is de ratio cellulose/lignine echter nog verder opgelopen tot 8.2 (MES15023), 8.1 (MES15032), 7.6 (MES14706) en 7.5 (MES15035).

Tabel 9. Relatieve verrijking van substraat gebaseerd op tarwestro na 2 weken incubatie met diverse *C. subvermispota* stammen

Isolaat	Recovery van hemicellulose (g)	Recovery van cellulose (g)	Recovery van lignine (g)	Cellulose/lignine ratio
MES13093	Geen data	Geen data	Geen data	Geen data
MES13094	4.3	12.4	3.5	3.5
MES14407	4.0	12.6	3.3	3.9
MES14698	5.3	12.9	3.3	4.0
MES14699	4.9	13.1	3.5	3.8

Tabel 9 (vervolg). Relatieve verrijking van substraat gebaseerd op tarwestro na 2 weken incubatie met diverse *C. subvermispora* stammen

Isolaat	Recovery van hemicellulose (g)	Recovery van cellulose (g)	Recovery van lignine (g)	Cellulose/lignine ratio
MES14700	5.0	13.6	3.5	3.9
MES14701	4.5	12.1	3.4	3.6
MES14702	4.2	12.9	3.6	3.6
MES14703	5.1	13.0	3.2	4.0
MES14704	5.3	13.3	3.5	3.8
MES14705	5.3	13.7	3.6	3.8
MES14706	4.9	13.1	3.5	3.7
MES14707	5.3	12.9	3.6	3.6
MES15019	5.5	12.8	3.4	3.7
MES15020	5.0	13.0	3.6	3.7
MES15021	4.7	12.3	3.4	3.6
MES15022	5.2	12.1	2.6	4.6
MES15023	4.7	12.4	3.2	3.8
MES15024	4.3	12.5	3.3	3.8
MES15025	3.3	12.4	3.2	3.9
MES15026	4.9	13.0	3.8	3.4
MES15027	4.8	12.7	3.3	3.8
MES15028	4.5	11.5	3.0	3.9
MES15029	5.0	12.3	3.1	4.0
MES15030	4.9	12.0	3.2	3.7
MES15031	4.3	12.1	3.0	4.0
MES15032	4.8	12.3	3.2	3.9
MES15033	4.6	12.2	3.4	3.6
MES15035	3.9	12.0	3.3	3.6
MES15036	5.4	12.4	3.3	3.8

Tabel 10. Relatieve verrijking van substraat gebaseerd op tarwestro na 5 weken incubatie met diverse *C. subvermispora* stammen

Isolaat	Recovery van hemicellulose (g)	Recovery van cellulose (g)	Recovery van lignine (g)	Cellulose/lignine ratio
geen	5.8	12.9	3.4	3.8
MES13093	2.9	10.4	2.5	4.1
MES13094	2.4	12.1	3.1	3.9
MES14407	2.3	10.5	1.9	5.5
MES14698	2.7	11.3	2.1	5.3
MES14699	1.6	10.8	1.9	5.6
MES14700	2.7	11.2	2.2	5.0
MES14701	3.2	11.1	2.4	4.7
MES14702	1.9	9.8	1.9	5.1
MES14703	2.0	10.6	1.7	6.3
MES14704	2.7	10.9	2.1	5.3
MES14705	1.4	10.3	1.6	6.6
MES14706	1.4	10.5	1.4	7.6

Tabel 10 (vervolg). Relatieve verrijking van substraat gebaseerd op tarwestro na 5 weken incubatie met diverse *C. subvermispota* stammen

Isolaat	Recovery van hemicellulose (g)	Recovery van cellulose (g)	Recovery van lignine (g)	Cellulose/lignine ratio
MES15019	1.9	11.2	2.1	5.2
MES15020	1.6	9.1	1.5	6.2
MES15021	1.8	9.2	2.0	4.6
MES15022	0.9	9.5	1.3	7.2
MES15023	0.7	8.8	1.1	8.2
MES15024	3.0	10.7	2.1	5.1
MES15025	2.2	10.5	2.0	5.2
MES15026	4.1	11.8	2.8	4.2
MES15027	1.5	10.6	1.8	5.8
MES15028	1.4	9.8	1.6	6.3
MES15029	1.4	10.4	1.9	5.6
MES15030	1.2	8.7	1.4	6.3
MES15031	1.5	9.2	1.7	5.5
MES15032	1.5	10.9	1.3	8.1
MES15033	4.9	12.0	3.2	3.7
MES15035	1.1	9.8	1.3	7.5
MES15036	1.2	10.6	1.6	6.7

1.4.3 Vergelijking van de selectieve lignine afbraak in substraat gebaseerd op ingekuuld bermgras en op tarwestro.

Als we kijken naar de cellulose/lignine ratio als indicator voor de mate waarin lignine selectief is verwijderd door de *C. subvermispota* stammen uit het substraat op basis van ingekuuld bermgras, zien we de hoogste ratio bij een incubatietijd van twee weken (zie Tabel 6 en 7). De hoogste ratio is dan 6.2 in geval van incubatie met stam MES15026. Na 5 weken incubatie is de ratio teruggelopen tot 4.1 (wat lager is dan de onbe-ente controle; 4.5). Tabel 11 geeft een overzicht van het verloop van de mate van selectieve lignine afbraak voor de andere best-presterende schimmel-isolaten op substraat gebaseerd op ingekuuld bermgras.

Tabel 11. Vergelijking van de mate van selectieve lignine afbraak in substraat op basis van ingekuuld bermgras.

Isolaat	Cellulose lignine ratio na 2 weken incubatie	Cellulose lignine ratio na 5 weken incubatie
MES15026	6.2	4.1
MES15032	5.8	4.4
MES13094	5.4	2.8
MES15023	5.4	5.0
MES14707	4.2	6.0
MES14705	4.3	5.5
MES15022	4.5	5.3
MES14703	4.5	5.0
MES15031	5.1	5.0

Mogelijk is de reden dat MES15026, MES15032, MES13094 en MES15023 na 2 weken incubatie terugvallen in de mate waarin het lignine in het substraat selectief wordt afgebroken, gelegen in de lage waarden voor hemicellulose in het substraat. Bij analyse van het op ingekuuld bermgras gebaseerde substraat na 2 weken incubatie worden uitsluitend negatieve waarden voor de schatting van de aanwezige hoeveelheid hemicellulose gevonden. Bij isolaten MES14707 en MES14705, die na 5 weken incubatie de hoogste ratio cellulose/lignine bereiken geldt dat op het moment van 2 weken incubatie nog hemicellulose in het substraat aanwezig lijkt te zijn. Voor MES15022, MES14703 en MES15031 is dat veel minder duidelijk het geval, maar bij die isolaten is de stijging van de ratio cellulose/lignine na 2 weken incubatie veel minder sterk. De trend lijkt te suggereren dat de selectieve afbraak van lignine alleen kan plaatsvinden indien hemicellulose als koolstofbron aanwezig is. Bij gebrek aan hemicellulose moeten de schimmel-isolaten cellulose gaan gebruiken als koolstofbron en daalt de mate van selectiviteit waarmee lignine kan worden afgebroken. Voor MES15026, MES15032 en MES13094 geldt dat ze sterk terugvallen in cellulose/lignine ratio. Dat gaat gepaard met een daling van de hoeveelheid cellulose per microbox van 13.8-15.0 gram na 2 weken incubatie naar 10.9-12.1 gram na 5 weken incubatie. Echter, isolaat MES15023 valt niet sterk terug in cellulose/lignine ratio en heeft eveneens een daling in hoeveelheid cellulose per microbox van 16.0 naar 10.3 gram. Waarschijnlijk is de hoeveelheid beschikbaar hemicellulose dus niet de enige factor die bepalend is in de mate van selectiviteit voor de lignine afbraak.

Tabel 12 geeft een overzicht van het verloop van de mate van selectieve lignine afbraak voor de best-presterende schimmel-isolaten op een substraat gebaseerd op tarwestro. Voor de onbe-ente controle is cellulose/lignine ratio na 5 weken incubatie 3.8. Na 2 weken incubatie is de ratio cellulose/lignine nog niet erg veel opgelopen, maar na 5 weken incubatie worden waarden van 7.5 tot 8.2 gehaald. Als we kijken naar de waarden voor het in het substraat aanwezige hemicellulose, dan zien we bij de best presterende isolaten na 2 weken incubatie geschatte gehalten van 3.9 tot 5.3 gram per microbox. Na 5 weken is de geschatte hoeveelheid hemicellulose gedaald naar waarden tussen 0.7 en 2.7 gram per microbox. Dit suggereert dat de selectieve lignine afbraak niet geremd wordt door een gebrek aan hemicellulose als koolstofbron voor de diverse schimmelisolaten.

Tabel 12. Vergelijking van de mate van selectieve lignine afbraak in substraat op basis van tarwestro.

Isolaat	Cellulose lignine ratio na 2 weken incubatie	Cellulose lignine ratio na 5 weken incubatie
MES15022	4.6	7.2
MES14698	4.0	5.3
MES14703	4.0	6.3
MES15029	4.0	5.6
MES15031	4.0	5.5
MES15032	3.9	8.1
MES15023	3.8	8.2
MES14706	3.7	7.6
MES15035	3.6	7.5

1.5 Best presterende isolaten van *C. subvermispora*

Tabel 13 geeft een overzicht van de best presterende isolaten van *C. subvermispora* met betrekking tot selectieve lignine afbraak. Isolaten MES15023, MES15032 en MES14706 lijken zowel op substraat op basis van ingekuuld bermgras, als op substraat op basis van tarwestro het meest selectief in de afbraak van lignine. Zoals te zien in Tabel 1 is isolaat MES14706 een dikaryon, terwijl isolaten MES15023 en MES15032 beiden monokaryons zijn.

Tabel 13. Overzicht van de *C. subvermispora* isolaten die het meest selectief zijn in lignine afbraak op zowel substraat op basis van ingekuuld bermgras als tarwestro.

Isolaat	Ingekuuld bermgras			Tarwestro		
	Cellulose lignine ratio		DM	Cellulose lignine ratio		DM
	2 weken incubatie	na 5 weken incubatie	recovery (2 weken)	2 weken incubatie	na 5 weken incubatie	recovery (5 weken)
MES15023	5.4	5.0	105.5%	3.8	8.2	79.7%
MES15032	5.8	4.4	103.3%	3.9	8.1	83.6%
MES14706	3.8	4.8	89.4%	3.7	7.6	82.7%
MES15035	4.1	3.4	94.3%	3.6	7.5	85.9%
MES15022	4.5	5.3	97.0%	4.6	7.2	82.3%
MES14705	4.3	5.5	92.9%	3.8	6.6	85.3%
MES14703	4.5	5.0	95.8%	4.0	6.3	88.5%
MES14707	4.2	6.0	91.5%	3.6	5.7	86.3%
MES15029	4.5	4.0	87.8%	4.0	5.6	91.4%
MES15031	5.1	5.0	97.2%	4.0	5.5	86.0%
MES14698	3.8	4.0	92.0%	4.0	5.3	89.2%
MES15026	6.2	4.1	101.7%	3.4	4.2	93.3%
MES13094	5.4	2.8	99.3%	3.5	3.9	91.9%

1.6 Conclusie Werkpakket 1

Op basis van de resultaten van Werkpakket 1 blijken *C. subvermispora* stammen MES15023 (monokaryon), MES15032 (monokaryon) en MES14706 (dikaryon) het meest selectief in de afbraak van lignine in zowel tarwestro als bermgras.

2 Werkpakket 3; Doorgroeiing van lignocellulose substraten door stammen van *Ceriporiopsis subvermispota*

Teneinde vast te kunnen stellen of een voorbehandeling van lignocellulose reststromen met schimmel *Ceriporiopsis subvermispota* meerwaarde heeft m.b.t. het gebruik van deze materialen als grondstoffen voor biogasproductie en/of als vezelmateriaal voor de papierproductie is een selectie van grondstoffen doorgroeide met een klein aantal *C. subvermispota* stammen. Op basis van de resultaten van Werkpakket 1 zijn de volgende *C. subvermispota* stammen geselecteerd; MES15032 (beste monokaryon in WP1) en MES14706 (beste dikaryon in WP1). Stam MES13094 werd gebruikt als referentie op basis van eerder uitgevoerde biogas testen.

2.1 Gebruikte lignocellulose reststromen

Voor gebruik als substraat voor een biogas toepassing is gebruik gemaakt van tarwestro. Hiervoor werd gebruik gemaakt van ontstoft en gehakseld tarwestro. Voor de testen als substraat voor een toepassing als vezelmateriaal voor de papier industrie is gewerkt met Miscanthus, Natuurgras, Lisdodde, Vlaslemen en Hennepscheven. Tabel 14 geeft een overzicht van de voor het teeltexperiment benodigde hoeveelheden droge stof van de verschillende reststromen.

Tabel 14 Gebruikte hoeveelheden materiaal van de verschillende reststromen.

Rest stroom	Benodigde hoeveelheid droge stof	Leverancier
Tarwestro	9.5 kg	Vestjens stroverwerking, Haalen
Miscanthus	38.8 kg	Gertjan de Jong, Elgra
Natuurgras (gehoid)	10.6 kg	Wim Bles, Staatsbosbeheer
Lisdodde	11.8 kg	Enzo Marsiglia / Natuurlijke Zaken / Wetterskip
Vlaslemen	10.6 kg	Van de Bilt, Sluiskil
Hennepscheven	10.6 kg	Omni Extract, Uden / Michiel Adriaanse, KCPK

Voorafgaand aan gebruik zijn alle substraten met een te lange structuur gehakseld op een deeltjes lengte van 2-3 cm. Na bevochtiging van een klein gedeelte van het materiaal, zijn de substraten in microboxen gesteriliseerd en be-ent met de gekozen schimmelstammen. Na een week is gekeken of de schimmels van de broedkorrel komen en op het substraat groeien.

2.2 In te zetten behandelingen

2.2.1 Doorgroeiing t.b.v. gebruik als substraat voor biogas productie

Het tarwestro werd gebruikt als substraat voor de productie van materiaal dat getest kon worden in de productie van biogas. In Tabel 15 wordt een overzicht gegeven van de uitgevoerde behandelingen. Tarwestro geïncubeerd met de stammen MES14706, MES15032 en MES13094 werd geoogst na een doorgroeitijd van 1, 2, 3 of 4 weken. Daarnaast werd tarwestro doorgroeid met MES15032 voor een langere periode geïncubeerd om te zien tot hoe ver de selectieve lignine afbraak zou doorgaan. Deze behandelingen werden geoogst na 8 en 12 weken.

2.2.2 Doorgroeiing t.b.v. gebruik als vezelmateriaal

Tabel 16 geeft een overzicht van de behandelingen die werden uitgevoerd ten behoeve van het testen van materialen als vezelmateriaal voor papierproductie. Hennepscheven, lisdodde, miscanthus, natuurgas (gehooïd) en vlaslemen werden doorgroeïd met de stammen MES14706 en MES15032 en bemonsterd na 12 weken. Met miscanthus daarentegen werd een tijdreeks bestudeerd en werd na 4, 8, 12, 16 en 19 weken bemonsterd.

Tabel 15 Behandelingen ten behoeve van gebruik als grondstof voor biogas productie

Beh.	Substraat	Stam	Monster moment
1	Tarwestro	Geen	Voorafgaand aan pasteurisatie
2	Tarwestro	MES13094	Na pasteurisatie (T = 0)
3	Tarwestro	MES14706	Na 1 week (T = 1)
4	Tarwestro	MES15032	Na 1 week (T = 1)
5	Tarwestro	MES13094	Na 1 week (T = 1)
6	Tarwestro	MES14706	Na 2 weken (T = 2)
7	Tarwestro	MES13094	Na 2 weken (T = 2)
8	Tarwestro	MES15032	Na 2 weken (T = 2)
9	Tarwestro	MES14706	Na 3 weken (T = 3)
10	Tarwestro	MES13094	Na 3 weken (T = 3)
11	Tarwestro	MES15032	Na 3 weken (T = 3)
12	Tarwestro	MES14706	Na 4 weken (T = 4)
13	Tarwestro	MES13094	Na 4 weken (T = 4)
14	Tarwestro	MES15032	Na 4 weken (T = 4)
15	Tarwestro	MES15032	Na 8 weken (T = 8)
16	Tarwestro	MES15032	Na 12 weken (T = 12)

Tabel 16 Behandelingen ten behoeve van gebruik als grondstof voor papier productie

Beh.	Substraat	Stam	Monster moment
1	Hennepscheven	MES14706	Na pasteurisatie (T = 0)
2	Lisdodde	MES14706	Na pasteurisatie (T = 0)
3	Miscanthus	MES14706	Na pasteurisatie (T = 0)
4	Natuurgas gehooïd	MES14706	Na pasteurisatie (T = 0)
5	Vlaslemen	MES14706	Na pasteurisatie (T = 0)
6	Miscanthus	MES14706	Na 4 weken doorgroeï (T = 4)
7	Miscanthus	MES15032	Na 4 weken doorgroeï (T = 4)
8	Miscanthus	MES14706	Na 8 weken doorgroeï (T = 8)
9	Miscanthus	MES15032	Na 8 weken doorgroeï (T = 8)
10	Hennepscheven	MES14706	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
11	Hennepscheven	MES15032	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
12	Lisdodde	MES14706	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
13	Lisdodde	MES15032	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
14	Miscanthus	MES14706	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
15	Miscanthus	MES15032	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
16	Natuurgas gehooïd	MES14706	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
17	Natuurgas gehooïd	MES15032	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
18	Vlaslemen	MES14706	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
19	Vlaslemen	MES15032	Na 12 weken doorgroeï (T = 12)
20	Miscanthus	MES14706	Na 16 weken doorgroeï (T = 16)
21	Miscanthus	MES15032	Na 16 weken doorgroeï (T = 16)
22	Miscanthus	MES14706	Na 19 weken doorgroeï (T = 19)
23	Miscanthus	MES15032	Na 19 weken doorgroeï (T = 19)

2.3 Uitvoering van de teeltproef

2.3.1 Hakselen, bevochtigen en stomen van de substraten

De doorgroeiing van de substraten werd uitgevoerd in autoclaveerbare plastic zakken met een luchtfilter (Type PPD75/REU6/X47*57, polypropyleen, 10 liter inhoud, www.SacO2.com). Teneinde de substraten goed te kunnen vullen in de zakken werden de substraten met lange deeltjes gemalen tot een lengte van 2-3 cm.

Teneinde de substraten vocht op te laten nemen, werden ze in linnen zakken verpakt en enkele dagen ondergedompeld in grote bakken met water (Figuur 4). Per substraat werd een aparte bak gebruikt. Na drie dagen ondergedompeld te zijn, werden ze zakken weer uit het water gehaald. Vervolgens werden de linnen zakken met substraat een dag op roosters gelegd om uit te lekken. Daarbij werden de zakken aan de bovenzijde bedekt met plastic om indrogen zoveel mogelijk tegen te gaan. Lisdodde bleek veel meer water te hebben opgenomen dan verwacht. Om die reden zijn de zakken met lisdodde nog extra uitgewrongen om er zo veel mogelijk water uit te persen. Het water laat zich er makkelijk uit knijpen. Bij het afvullen van het tarwestro in de substraatzakken is mangaanchloride toegevoegd aan het natte stro. Hiervoor is 143 mg mangaanchloride vermengd met 100 gram nat stro en dit mengsel is zo gelijkmatig mogelijk over het strosubstraat verdeeld. Vanwege de grote hoeveelheid water die werd gebruikt om het stro te bevochtigen was oplossen in het water geen optie.

Van alle bevochtigde substraten werd het vochtgehalte, as-gehalte en de pH bepaald (Tabel 17).



Figuur 4. Bevochtigen van de substraten

Tabel 17 Vochtgehalten en portie grootte per substraatzak

Rest stroom	Vochtgehalte (% versgewicht)	Asgehalte (% droge stof)	pH	Afgevuld in polypropyleen filter zakken in porties van	Aantal zakken
Tarwestro	79.8%	3.9%	4.9	2.4 kg natgewicht	16
Miscanthus	71.2%	3.0%	5.3	2.8 kg natgewicht	44
Natuurgras (gehoid)	79.9%	2.6%	5.7	2.5 kg natgewicht	18
Lisdodde	85.5%	5.6%	6.2	1.6 kg natgewicht	42
Vlaslemen	77.7%	2.8%	6.8	2.8 kg natgewicht	15
Hennepscheven	78.7%	4.1%	7.3	2.4 kg natgewicht	18

Na het vullen van de substraatzakken werden ze in de teeltruimte geplaatst (Figuur 5). Vervolgens werd de teeltruimte met behulp van stoom opgewarmd tot een temperatuur van 70°C. Middels temperatuursensoren die in (extra) zakken met tarwestro, lisdodde, vlas lemen en hennepscheven waren geplaatst kon de opwarming van de substraten worden gevolgd. Nadat alle substraten een temperatuur van 70°C hadden bereikt, werd deze temperatuur gedurende 8 uur gehandhaafd. In een periode van ruim twee dagen was substraat op 70°C gebracht en weer afgekoeld tot een temperatuur van 25-28°C. Na afkoelen was het substraat klaar voor inoculatie met de schimmelstammen.



Figuur 5. Plaatsing van de substraatzakken in de teeltruimte

2.3.2 Broedbereiding en enten

Broed van de geselecteerde *C. subvermispora* stammen werd bereid op sorghum korrels in microboxen. Na enten werd het broed gedurende een periode van 7 weken geïncubeerd bij een temperatuur van 25°C en een luchtvochtigheid van 70%. Van stam MES 13094 werd minimaal 455 ml aangemaakt terwijl van rassen MES13094 en MES14706 respectievelijk minimaal 7874 en 5141 ml werd aangemaakt. Bij het berekenen van de benodigde hoeveelheid broed zijn we uitgegaan van 38 liter broed per ton substraat. In vergelijking met de hoeveelheden die normaliter in de industrie worden gebruikt is dat een royale hoeveelheid broed.

Voorafgaand aan het enten van de substraten werd het broed verdeeld in de benodigde porties (91 ml per zak voor tarwestro, 105 ml per zak voor miscanthus, 59 ml per zak voor lisdodde, 113 ml per zak voor vlasleem, 96 ml per zak voor natuurgas, 88 ml per zak voor hennepscheven). Het broed werd op het gepasteuriseerde substraat gestrooid en vervolgens werd de substraatzak dichtgeplakt. Daarna werd de zak stevig geschud om het broed zo gelijkmatig mogelijk door het substraat te mengen. Afhankelijk van het substraat was goed mengen in meerdere of mindere mate mogelijk.

2.3.3 Doorgroeiing van het substraat

Na enten werd het klimaat van de teeltcel ingesteld op 28°C luchttemperatuur, een RV van 70%, circulatie 50%. Het CO₂ gehalte in de lucht werd niet geregeld.

2.3.3.1 Kolonisatie van tarwestro-substraat

De kolonisatie van het tarwestro substraat was goed te volgen aan de hand van de verandering van kleur van het substraat. Op het oog raakte het substraat goed en gelijkmatig doorgroeid. Figuur 6 geeft een indruk van de doorgroeiing.



Figuur 6. Indruk van de doorgroeiing van het tarwestro-substraat

2.3.3.2 Kolonisatie van miscanthus-substraat

Ook de kolonisatie van het miscanthus substraat was goed te volgen aan de hand van de verandering van kleur van het substraat. Op het oog raakte ook dit substraat goed en gelijkmatig doorgroeid. In geval van miscanthus was de doorgroei-periode uitzonderlijk lang. Het laatste monster werd genomen na 133 dagen doorgroei-tijd (19 weken). Aan het einde van deze periode was een hoop luchtmycelium gevormd in de substraatzakken. Figuur 7 geeft een indruk van de doorgroeiing.



Figuur 7. Indruk van de doorgroeiing van het miscanthus substraat.

2.3.3.3 Kolonisatie van natuurgras-substraat

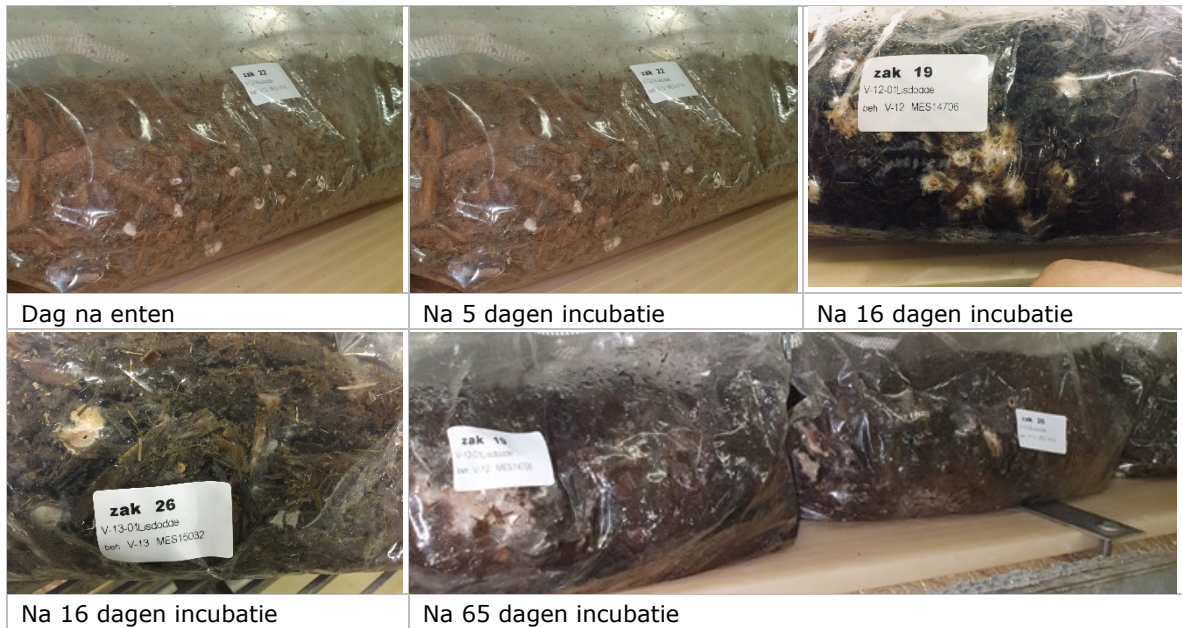
Ook de kolonisatie van het natuurgras substraat was eveneens goed te volgen aan de hand van de verandering van kleur van het substraat. In tegenstelling tot tarwestro en miscanthus, raakte het natuurgras substraat slechts met moeite doorgroeid. De kolonisatie met mycelium was ongelijk en zelfs bij een heel lange incubatie bleven er plekken in het substraat ongekoloniseerd. De reden voor de moeizame kolonisatie door de schimmel is niet duidelijk. Mogelijk was het substraat iets te nat. Figuur 9 geeft een indruk van de doorgroeiing.



Figuur 8. Indruk van de doorgroeiing van het natuurgras substraat

2.3.3.4 Kolonisatie van lisdodde-substraat

De schimmels hadden grote moeite met de kolonisatie van het lisdodde substraat. Terwijl in de overige substraten de schimmel na 16 dagen incubatie tijd de broedkorrels had verlaten en in het substraat groeide, was in het geval van lisdodde na 16 dagen het mycelium nog geconcentreerd in kleine kolonies rondom de broedkorrel met een erg compact mycelium. Zelfs na 65 dagen kolonisiertijd was in veel zakken het substraat nog slechts marginaal doorgroeid. Vanwege de slechte kolonisatie zijn veel substraatzakken niet eens bemonsterd. De reden voor de slechte kolonisatie is niet duidelijk. Mogelijk was het substraat ondanks het uitwringen naar bevochtiging nog steeds iets te nat. Figuur 9 geeft een indruk van de doorgroeiing.



Figuur 9. Indruk van de doorgroeiing van het lisdodde substraat. Er zijn geen foto's van de myceliumgroei na 84 dagen doorgroeiing.

2.3.3.5 Kolonisatie van vlasleem-substraat

Ook de kolonisatie van het vlasleem substraat was goed te volgen aan de hand van de verandering van kleur van het substraat. In geval van vlasleem waren na 16 dagen doorgroei met het mycelium nog gedeelten van het substraat niet gekoloniseerd. Echter in de daaropvolgende periode raakte het gehele substraat doorgroeid. Aan het einde van de incubatieperiode was er een uitbundige hoeveelheid luchtmycelium te zien. Figuur 10 geeft een indruk van de doorgroeiing.



Figuur 10. Indruk van de doorgroeiing van het vlasleem substraat

2.3.3.6 Kolonisatie van hennepscheven-substraat

De kolonisatie van het hennepscheven substraat was eveneens goed te volgen aan de hand van de verandering van kleur van het substraat. Net als bij de vlasleem, waren er bij de hennepscheven na 16 dagen doorgroei met het mycelium nog gedeelten van het substraat die niet gekoloniseerd waren. Echter in de daaropvolgende period raakte net als bij de vlasleem het gehele hennepscheven substraat doorgroeid. Aan het einde van de incubatieperiode was er een uitbundige hoeveelheid luchtmycelium te zien. Bij het oogsten substraat bleek het hennepscheven substraat veel natte plekken te bevatten. Figuur 11 geeft een indruk van de doorgroeiing.



Figuur 11. Indruk van de doorgroeiing van het henepescheven substraat

2.3.4 Bemonstering van het doorgroeide substraat.

Tabel 18. geeft een overzicht van het aantal zakken substraat dat per incubatietijdstip werd bemonsterd van het tarwestro voor gebruik als substraat voor biogasproductie. Op elk tijdstip werd per zak het natgewicht bepaald. Na openen van de zak werd de inhoud gehomogeniseerd en gedroogd op 70°C. Van een gedeelte van het gedroogde materiaal werd vervolgens het gehalte droge stof bepaald bij 103°C en werd het asgehalte bepaald. Natgewicht, droge stofgehalte bij 70°C, droge stofgehalte bij 103°C en asgehalte werden gebruikt bij berekening van een massabalans. Een gedeelte van het gedroogde substraat werd gebruikt voor analyse van de vezelsamenstelling middels ANKOM analyse. Het resterende materiaal werd gemalen tot 1 mm deeltjesgrootte ten behoeve van biogasmetingen en aangeboden aan Bioclear Earth.

Tabel 18 Overzicht van het aantal zakken substraat dat per monstertijdstip werd geofferd voor de biogasproef.

Incubatieduur	Stam	Aantal zakken
Voorafgaand aan pasteurisatie	geen	1
Na pasteurisatie (T=0)	geen	1
1 week (T=1)	MES13094	1
	MES14706	1
	MES15032	1
2 weken (T=2)	MES13094	1
	MES14706	1
	MES15032	1
3 weken (T=3)	MES13094	1
	MES14706	1
	MES15032	1
4 weken (T=4)	MES13094	1
	MES14706	1
	MES15032	1
8 weken (T=8)	MES15032	1
	MES15032	1
12 weken (T=12)	MES15032	1

Tabel 19 geeft een overzicht van het aantal zakken substraat dat per incubatietijdstip werd bemonsterd van miscanthus, vlaslemen, lisdodde, hennepscheven en natuurgras voor gebruik als vezelmateriaal voor papierproductie. Op elk tijdstip werd per zak het natgewicht bepaald. Na openen van de zak werd de inhoud van de zakken van dezelfde behandeling gehomogeniseerd en gedroogd op 70°C. Van een gedeelte van het gedroogde materiaal werd vervolgens het gehalte droge stof bepaald bij 103°C en werd het asgehalte bepaald. Natgewicht, droge stofgehalte bij 70°C, droge stofgehalte bij 103°C en asgehalte werden gebruikt bij berekening van een massabalans. Een gedeelte van het gedroogde substraat werd gebruikt voor analyse van de vezelsamenstelling middels ANKOM analyse (in duplo).

Tabel 19 Overzicht van het aantal zakken substraat dat per monstertijdstip werd geofferd voor de vezelproef

Incubatie duur	Substraat	Stam	Aantal zakken
Na pasteurisatie (T=0)	Hennepscheven	MES14706	6
	Lisdodde	MES14706	14
	Miscanthus	MES14706	4
	Natuurgras gehooïd	MES14706	6
	Vlaslemen	MES14706	5
4 weken (T=4)	Miscanthus	MES14706	4
	Miscanthus	MES15032	4
8 weken (T=8)	Miscanthus	MES14706	4
	Miscanthus	MES15032	4
12 weken (T=12)	Hennepscheven	MES14706	6
	Lisdodde	MES14706	14
	Miscanthus	MES14706	4
	Natuurgras gehooïd	MES14706	6
	Vlaslemen	MES14706	5
	Hennepscheven	MES15032	6
	Lisdodde	MES15032	14
	Miscanthus	MES15032	4
	Natuurgras gehooïd	MES15032	6
16 weken (T=16)	Vlaslemen	MES15032	5
	Miscanthus	MES14706	4
	Miscanthus	MES15032	4
26 weken (T=26)	Miscanthus	MES14706	4
	Miscanthus	MES15032	4
		Totaal	137 zakken

2.4 Analyse van de doorgroeide substraten

2.4.1 Vezelsamenstelling van aangeleverde substraten

Tabel 20 geeft een overzicht van de samenstelling van het aangeleverd lignocellulose materiaal dat gebruikt is voor het experiment. In het kader van de beoogde selectieve afbraak van lignine is het interessant om de substraten te rangschikken op basis van een aflopend gehalte aan lignine. Vlaslemen bleek het hoogst gehalte aan lignine te bevatten en tarwestro het laagst. Als we kijken naar de verhouding cellulose/lignine, dan bevat vlaslemen de laagste waarde en tarwestro de hoogste. In dat licht bezien, lijkt de cellulose aanwezig in vlaslemen sterker beschermd door lignine dan de cellulose in het gebruikte tarwestro.

Tabel 20 **Vezelsamenstelling van de aangeleverde lignocellulose substraten**

Substraat	NDF (%)	ADF (%)	ADL (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignine (%)	Ratio cellulose / lignine	As (%)
Vlaslemen	85%	74%	23%	51%	10%	23%	2.2	2.7%
Hennepscheven	86%	74%	16%	58%	12%	16%	3.6	4.1%
Lisdodde	76%	56%	15%	41%	20%	15%	2.7	5.6%
Miscanthus	91%	69%	13%	56%	22%	13%	4.3	3.0%
Natuurgras	73%	47%	8%	39%	26%	8%	4.9	2.6%
Tarwestro	87%	56%	7%	49%	31%	7%	7	3.9%

Tabel 21 geeft een overzicht van het effect van het pasteuriseren van de bevochtigde substraten op de vezelfractie. Pasteurisatie op 70°C gedurende 8 uur (inclusief opwarmen en afkoelen) heeft als belangrijkste effect dat de gehalten aan NDF, ADF en ADL in de droge stof iets lager worden. Mogelijk leidt de temperatuur behandeling er toe dat een klein gedeelte van deze fracties iets beter oplosbaar wordt en niet langer wordt terug gevonden in de onoplosbare fracties.

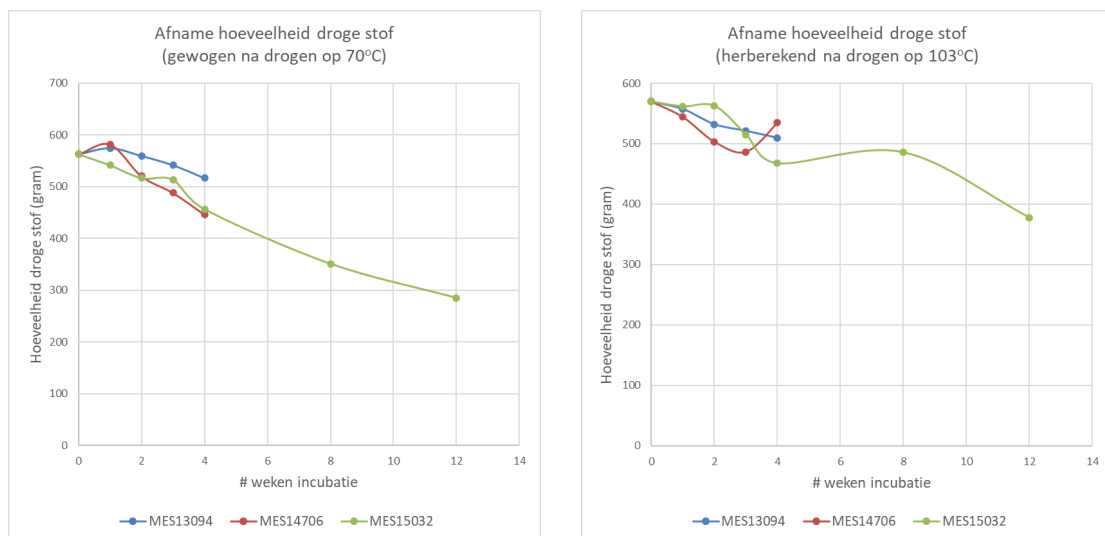
Tabel 21 **Effect van pasteurisatie op de gehalten NDF, ADF en ADL in de substraten**

Substraat	NDF (%)		ADF (%)		ADL (%)	
	Vóór	Na	Vóór	Na	Vóór	Na
Vlaslemen	85%	83%	74%	72%	23%	23%
Hennepscheven	86%	85%	74%	71%	16%	15%
Lisdodde	76%	74%	56%	54%	15%	14%
Miscanthus	91%	88%	69%	66%	13%	12%
Natuurgras	73%	71%	47%	46%	8%	8%
Tarwestro	89%	83%	57%	53%	8%	8%

2.4.2 Substraat voor biogas productie

2.4.2.1 Consumptie biomassa

Tijdens de incubatie van het tarwestro met de schimmelstammen wordt biomassa geconsumeerd. Figuur 12 geeft een indruk van de verandering in de hoeveelheid biomassa gedurende de incubatietijd.



Figuur 12. Verloop van de hoeveelheid droge stof per substraat zak gedurende de incubatietijd. Links berekend na drogen op 70°C, rechts herberekend na drogen van een gedeelte van het op 70°C gedroogde materiaal op 103°C.

De droge stof gehalten werden bepaald door eerst de volledige inhoud van de zakken te drogen bij 70°C. Dit vanwege de nadelige effecten van hogere temperaturen op de mogelijkheden om vervolgens vezelsamenstelling te bepalen m.b.v. ANKOM en de mogelijkheden om biogas productie goed te meten. Een gedeelte van het op 70°C gedroogde materiaal werd vervolgens gedroogd op 103°C voor een meer nauwkeurige bepaling. Met de droge stof gehalten uit de bepaling op 103°C werd vervolgens berekend hoeveel droge stof over was gebleven in de substraatzakken na incubatie met de schimmelstammen. De meetwaarden staan weergegeven in Tabel 22. Het is duidelijk dat tijdens de incubatie met de schimmels een aanzienlijk gedeelte van de droge stof wordt omgezet in CO₂ en water

Tabel 22 Verloop hoeveelheden droge stof per substraatzak tijdens incubatie met schimmelstammen

Incubatie duur (weken)	Hoeveelheid droge stof per substraatzak (na droging bij 70°C)			Hoeveelheid droge stof per substraatzak (Herberekend na droging van op 70°C gedroogd materiaal op 103°C)		
	MES13094	MES14706	MES15032	MES13094	MES14706	MES15032
0	563	563	563	570	570	570
1	575	582	542	558	544	562
2	560	521	517	532	503	563
3	542	488	514	521	486	515
4	517	446	457	510	535	468
8			351			486
12			285			378

onder vorming van biomassa (onderdeel van de droge stof). Het verloop vertoont geen mooie vloeiende lijn, daar zijn twee mogelijke verklaringen voor. De eerste is dat het bevochtigde substraat bij aanvang van de proef niet heel erg homogeen zou zijn, waardoor er bij aanvang van de proef verschillende hoeveelheden droge stof in de substraatzakken terecht zijn gekomen. De waarden bij 70°C zijn echter afkomstig van het drogen van de hele inhoud van de zak en laten zien dat dat zeker een rol heeft gespeeld. De tweede is dat bij de bemonstering voor het meten van de droge stof gehalten variatie is ontstaan. Dat wordt duidelijk als we kijken naar de waarden die voortgekomen zijn uit de herberekening van de hoeveelheden droge stof op basis van het drogen van een subsample van het bij 70°C gedroogde materiaal op 103°C.

2.4.2.2 Effecten op vezelsamenstelling van het substraat

Tabel 23 toont de resultaten van de vezelanalyse middels ANKOM. Voorafgaand aan het incuberen van de substraten met schimmel, wordt het tarwestro substraat 8 uur op 70°C gepasteuriseerd. Dat blijkt al een invloed te hebben op de hoeveelheden cellulose en hemicellulose zoals gemeten middels ANKOM. In de ANKOM analyse wordt in principe gekeken hoeveel materiaal onoplosbaar blijkt in neutral detergent (3% SDS, 1.5% EDTA en 1% triethyleen glycol), acid detergent (1 M H₂SO₄ + 2% CTAB) en hoeveel materiaal niet valt te hydrolyseren in 70% zwavelzuur. Blijkbaar wordt door de pasteurisatie van het tarwestro substraat een gedeelte van het cellulose en hemicellulose materiaal oplosbaar waardoor we het niet meer terugvinden in onze ANKOM analyse.

Indien we ons richten op de afbraak van cellulose (oplosbaar maken van de cellulose fractie) dan zien we dat in geval van een incubatie met stam MES13094 (referentie uit eerdere testen) er na 4 weken doorgroeiing nog ongeveer 96% van de oorspronkelijke hoeveelheid cellulose aanwezig is. In geval van gebruik van stam MES14706 (beste dikaryon in WP1) is na 4 weken doorgroeiing nog ongeveer 97% over en in geval van gebruik van MES15032 (beste monokaryon in WP1) nog ongeveer 85% over (hoewel dat, als je naar de trend kijkt, een onderschatting is). In geval van MES15032 is de incubatieduur voortgezet tot in totaal 12 weken en zelfs na die lange incubatieperiode is nog 80% van alle oorspronkelijk aanwezig cellulose nog aanwezig (niet oplosbaar geworden).

Als we kijken naar de afbraak van hemicellulose, zien we een ander beeld. In geval van een incubatie met stam MES13094 zien we een steeds snellere afname van de hoeveelheid hemicellulose tot er na 4 weken doorgroeiing nog ongeveer 55% van de oorspronkelijke hoeveelheid hemicellulose aanwezig is. Ook in geval van gebruik van stam MES14706 zien we een afname van de hoeveelheid hemicellulose,

maar volgens een ander patroon. De sterkste afname vindt plaats in de eerste twee weken waarna de hoeveelheid hemicellulose zich lijkt te stabiliseren op ongeveer 70% van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid. In geval van gebruik van MES15032 loopt de hoeveelheid hemicellulose tijdens de

Tabel 23 Resultaten vezelanalyse op tarwestro middels ANKOM.

Stam	Incubatie duur (weken)	DM (103°C) (gram)	As (gram)	OM (gram)	cellulose (gram)	hemicellulose (gram)	lignine (gram)	Ratio cellulose/ lignine
n.a.	Voor Pasteurisatie	578	10	568	288	182	43	7
MES 13094	T = 0 (na pasteurisatie)	570	17	553	258 (100%)	171 (100%)	46 (100%)	6
MES 13094	T=1	558	8	550	260 (101%)	159 (93%)	49 (107%)	5
MES 13094	T=2	532	5	527	242 (93%)	142 (83%)	47 (103%)	5
MES 13094	T=3	521	10	511	234 (90%)	142 (83%)	39 (85%)	6
MES 13094	T=4	510	10	500	247 (96%)	94 (55%)	30 (65%)	8
MES 14706	T=1	544	3	541	246 (95%)	155 (90%)	54 (118%)	5
MES 14706	T=2	503	7	496	236 (91%)	125 (73%)	35 (77%)	7
MES 14706	T=3	486	10	476	225 (87%)	115 (67%)	36 (79%)	6
MES 14706	T=4	535	12	523	250 (97%)	124 (72%)	36 (79%)	7
MES 15032	T=1	562	10	552	263 (102%)	157 (91%)	44 (96%)	6
MES 15032	T=2	563	8	555	268 (104%)	119 (70%)	35 (76%)	8
MES 15032	T=3	515	8	507	247 (96%)	111 (65%)	32 (71%)	8
MES 15032	T=4	468	13	455	219 (85%)	81 (47%)	28 (61%)	8
MES 15032	T=8	486	17	469	251 (97%)	49 (28%)	24 (53%)	10
MES 15032	T=12	378	12	366	206 (80%)	21 (12%)	10 (22%)	21

incubatieduur gestaag terug. Na 4 weken is nog ongeveer 47% over en na 12 weken slechts 12% (d.w.z. niet oplosbaar geworden). Voor wat betreft de afbraak van lignine, lijkt de trend sterk op die van hemicellulose. In geval van een incubatie met stam MES13094 zien we een steeds snellere afname van de hoeveelheid lignine tot er na 4 weken doorgroeiing nog ongeveer 65% van de oorspronkelijke hoeveelheid aanwezig is. In geval van gebruik van stam MES14706 zien we net als voor hemicellulose de sterkste afname in lignine in de eerste twee weken waarna de hoeveelheid lignine zich lijkt te stabiliseren op ongeveer 80% van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid. In geval van gebruik van MES15032 loopt (net als bij hemicellulose) de hoeveelheid lignine tijdens de incubatie gestaag terug. Na 4 weken is nog 61% over en na 12 weken nog slechts 22%.

Voor de beoordeling van de vergistbaarheid is het waarschijnlijk het meest interessant om te kijken naar de verhouding van de hoeveelheid cellulose en de hoeveelheid lignine in het substraat. Dat is te beschouwen als de mate van verrijking van het tarwestro met cellulose. In de 4 weekse incubatie

periode loopt de ratio cellulose/lignine echter niet sterk op. Op basis van de langere incubatieduur zoals bij MES15032 lijkt daar pas sprake van te zijn na 8 weken of meer.

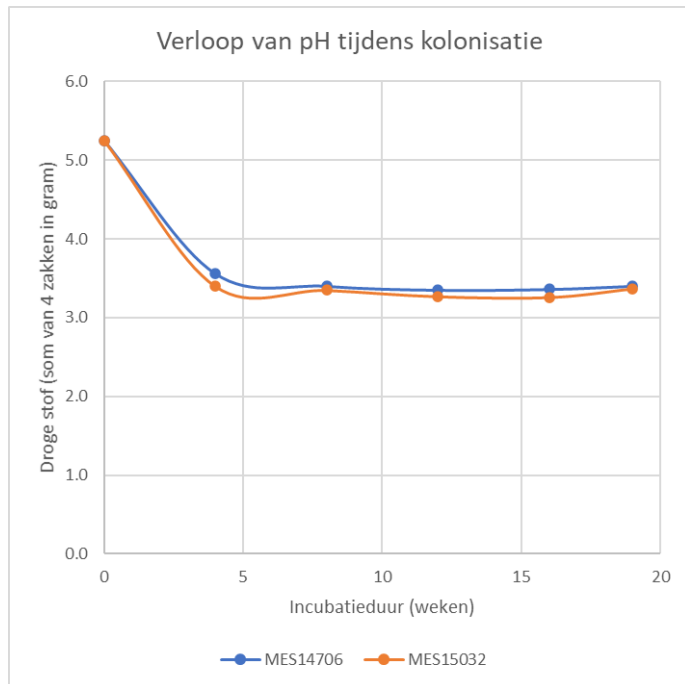
2.4.3 Substraat voor productie vezelmateriaal

2.4.3.1 Miscanthus

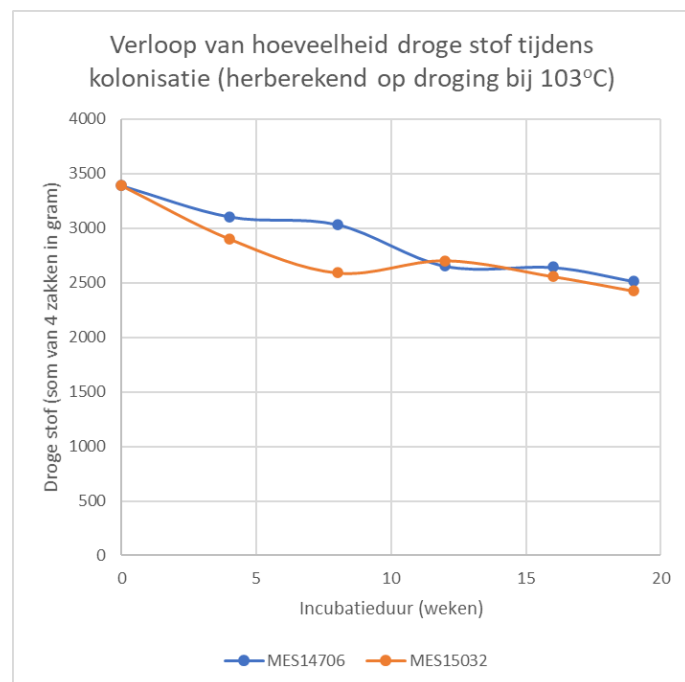
Alleen voor Miscanthus is een tijdsreeks gevolgd van 0 tot 19 weken kolonisatie door de schimmelstammen. Miscanthus substraat werd ofwel be-ent met stam MES14706 ofwel met stam MES15032. Er was oorspronkelijk gepland om 24 weken te koloniseren, maar het experiment is iets eerder be-eindigd om de geproduceerde materialen te kunnen analyseren voor toepassingen. Figuur 14 toont het verloop van de droge stof in de tijd. Per bemonsteringstijdstip werden telkens 4 substraatzakken geofferd en de inhoud gedroogd op 70°C. Een kleine hoeveelheid werd daarvan bemonsterd om te drogen op 103°C. Op basis van de meetwaarden bij droging op 103°C werd herberekend hoeveel droge stof er per tijdstip nog aanwezig was. Gedurende de looptijd van het experiment neemt de hoeveelheid droge stof gestaag af van ongeveer 3400 gram bij aanvang tot 2400-2500 gram na 19 weken.

Figuur 13 toont het verloop van de pH van het substraat. Na de eerste 4 weken was de pH al gedaald van ongeveer 5.3 naar ongeveer 3.5 en gedurende de rest van de incubatieduur bleef de pH min of meer stabiel op die waarde.

De resultaten van de vezelanalyse van het Miscanthus substraat middels ANKOM staan weergegeven in Tabel 24. Als we kijken naar de incubatie van het Miscanthus substraat met stam MES14706 dan zien we dat de hoeveelheid cellulose gedurende de eerste 8 weken min of meer gelijk blijft en daarna afneemt tot 84% van de bij aanvang aanwezige hoeveelheid. Echter tussen 8 en 12 weken incubatie zien we ook een plotselinge afname van de (herberekende) hoeveelheid droge stof en het is niet duidelijk of deze plots snelle afname van de hoeveelheid cellulose een gevolg is van een versnelde afbraak door de schimmel of het gevolg is van rekenkundige effecten als gevolg van het herberekenen van de hoeveelheid droge stof van het 70°C gedroogde materiaal naar het 103°C gedroogde materiaal. Desondanks is duidelijk dat zelfs na 19 weken incubatie met de schimmel er nog 84% van het



Figuur 13. Verloop van de pH in het Miscanthus substraat tijdens de doorgroeiing met *Ceriporiopsis subvermispora*.



Figuur 14. Verloop van de hoeveelheid droge stof op de verschillende monstertmomenten. De hoeveelheid droge stof is de som van de droge stof aanwezig in 4 monsterzakken.

Tabel 24. Resultaten vezelanalyse middels ANKOM op het Miscanthus substraat

Stam	Incubatie duur (weken)	DM (gram)	As (gram)	OM (gram)	Cellulose (gram)	Hemi cellulose (gram)	Lignine (gram)	Ratio Cellulose /lignine
MES 14706	T = 0 (na pasteurisatie)	3390	121	3269	1760 (100%)	816 (100%)	399 (100%)	4.4
	T=4	3106	58	3048	1731 (98%)	495 (61%)	338 (85%)	5.1
	T=8	3034	95	2940	1704 (97%)	485 (59%)	320 (80%)	5.3
	T=12	2654	106	2548	1499 (85%)	421 (52%)	266 (67%)	5.6
	T=16	2643	82	2561	1529 (87%)	395 (48%)	247 (62%)	6.2
	T=19	2514	62	2452	1472 (84%)	360 (44%)	228 (57%)	6.4
MES 15032	T = 0 (na pasteurisatie)	3390	121	3269	1760 (100%)	816 (100%)	399 (100%)	4.4
	T=4	2901	57	2844	1619 (92%)	428 (52%)	293 (74%)	5.5
	T=8	2590	73	2517	1463 (83%)	352 (43%)	245 (62%)	6.0
	T=12	2703	85	2618	1567 (89%)	348 (43%)	202 (51%)	7.8
	T=16	2557	75	2482	1544 (88%)	298 (37%)	188 (47%)	8.2
	T=19	2424	75	2349	1479 (84%)	266 (33%)	152 (38%)	9.8

oorspronkelijk aanwezige cellulose aanwezig is. In geval van incubatie van het Miscanthus substraat doorgroeit met stam MES15032 zien we min of meer dezelfde trend als bij incubatie met stam MES14709 en is er na 19 weken incubatie nog 84% van het oorspronkelijk aanwezige cellulose aanwezig.

In geval van hemicellulose zien we in de eerste 4 weken een snelle afname, gevolgd door een iets langzamere afname in de daaropvolgende periode. In geval van incubatie met MES14706 is na 12 weken nog ongeveer de helft van de hemicellulose over en na 19 weken nog 44%. Bij een incubatie met MES15032 gaat de afbraak van hemicellulose iets sneller. Na 12 weken is nog 43% over en na 19 weken nog 33%.

In geval van lignine wordt ongeveer hetzelfde patroon gevolgd als bij hemicellulose. Bij incubatie met stam MES14709 is na 12 weken nog 67% van de lignine over en na 19 weken nog 57%. Stam MES15032 is effectiever in de afbraak van lignine. Na 12 weken is nog de helft over en na 19 weken nog een derde deel.

Kijkende naar de ratio cellulose/lignine, dan zien we dat monokaryon MES15032 effectiever is in de selectieve afbraak van lignine dan dikaryon MES14706. Beginnend met een verhouding van 4.4. delen cellulose per deel lignine, loopt bij MES14706 de verhouding op tot 6.4 na 19 weken, terwijl de verhouding bij MES13052 oploopt tot 9.8.

2.4.3.2 Vlaslemen

Substraat op basis van vlaslemen werd gedurende 12 weken doorgroeit met ofwel stam MES14709 ofwel stam MES15032. Startend met in totaal 3345 g droge stof, is in geval van doorgroeiing met stam MES14706 na 12 weken nog 2564 gram over. Dat is 77% van de hoeveelheid waarmee gestart is. In geval van doorgroeiing met stam MES15032 is de situatie nagenoeg hetzelfde. Uitgaande van 3345 g droge stof bij aanvang, is na 12 weken doorgroeiing nog 2539 gram over (76%).

Tabel 25 geeft een overzicht van de resultaten van de vezelanalyse van het Vlaslemen substraat middels ANKOM. Bij beide stammen is na 12 weken incubatie nog ongeveer 80% van de oorspronkelijk aanwezige cellulose over. Met betrekking tot hemicellulose en lignine verschillen de resultaten tussen de stammen. Stam MES15032 is veel efficiënter voor wat betreft de afbraak van hemicellulose en lignine; na 12 weken incubatie is nog slechts 11% van de oorspronkelijke hoeveelheid hemicellulose over en nog 25% van de oorspronkelijke hoeveelheid lignine. De ratio cellulose/lignine gaat daarmee van 2.1 delen cellulose per deel lignine bij aanvang naar een waarde van bijna 7. In geval van stam MES14709 is na 12 weken nog 41% van de hemicellulose en 49% van het lignine over. De ratio cellulose/lignine gaat daarmee van 2.1 delen cellulose per deel lignine bij aanvang naar een waarde van slechts 3.4.

Tabel 19. Resultaten vezelanalyse middels ANKOM op het Vlasleem substraat

Stam	Incubatie duur (weken)	DM (gram)	As (gram)	OM (gram)	Cellulose (gram)	Hemi cellulose (gram)	Lignine (gram)	Ratio Cellulose /lignine
MES 14706	T=0 (na pasteurisatie)	3345	79	3267	1585 (100%)	421 (100%)	758 (100%)	2.1
	T=12	2564	71	2493	1274 (80%)	172 (41%)	370 (49%)	3.4
MES 15032	T=0 (na pasteurisatie)	3345	79	3267	1585 (100%)	421 (100%)	758 (100%)	2.1
	T=12	2539	177	2362	1239 (78%)	48 (11%)	188 (25%)	6.6

2.4.3.3 Natuurgras

Substraat op basis van natuurgras werd gedurende 12 weken doorgroeid met ofwel stam MES14709 ofwel stam MES15032. Startend met in totaal 3621 g droge stof, is in geval van doorgroeiing met stam MES14706 na 12 weken nog 2029 gram over. Dat is 56% van de hoeveelheid waarmee gestart is. In geval van doorgroeiing met stam MES15032 is de situatie nagenoeg hetzelfde. Uitgaande van 3345 g droge stof bij aanvang, is na 12 weken doorgroeiing nog ongeveer de helft over (1838 gram).

Tabel 26. Resultaten vezelanalyse middels ANKOM op het natuurgras substraat

Stam	Incubatie duur (weken)	DM (gram)	As (gram)	OM (gram)	Cellulose (gram)	Hemi cellulose (gram)	Lignine (gram)	Ratio Cellulose /lignine
MES 14706	T=0 (na pasteurisatie)	3621	236	3385	1272 (100%)	996 (100%)	285 (100%)	4.5
	T=12	2029	249	1780	585 (46%)	134 (13%)	107 (37%)	5.5
MES 15032	T=0 (na pasteurisatie)	3621	236	3385	1272 (100%)	996 (100%)	285 (100%)	4.5
	T=12	1838	297	1541	466 (37%)	89 (9%)	101 (35%)	4.6

Tabel 26 geeft een overzicht van de resultaten van de vezelanalyse van het natuurgras substraat middels ANKOM. Bij beide stammen is na 12 weken incubatie een grote hoeveelheid cellulose afgebroken (oplosbaar gemaakt); in geval van incubatie met stam MES14706 is nog ongeveer 46% van de oorspronkelijk aanwezige cellulose over. In geval van incubatie met stam MES15032 zelfs nog minder (37%). Ook hemicellulose en lignine zijn na 12 weken incubatie bij beide stammen fors afgenomen. MES14706 heeft de hemicellulose gereduceerd tot 13% van de oorspronkelijke hoeveelheid en MES15032 zelfs tot 9%.

Voor wat betreft lignine heeft eveneens een flinke afbraak plaatsgevonden. Na 12 weken incubatie door MES14706 en MES15032 is respectievelijk nog 37 en 35% van de oorspronkelijke hoeveelheid over.

Doordat zowel cellulose, hemicellulose als lignine allemaal worden afgebroken in het natuurgras substraat verbetert de ratio cellulose/lignine niet erg.

2.4.3.4 Hennepscheven

Substraat op basis van hennepscheven werd gedurende 12 weken doorgroeid met ofwel stam MES14709 ofwel stam MES15032. Startend met in totaal 3418 g droge stof, is in geval van doorgroeiing met stam MES14706 na 12 weken nog 2152 gram over. Dat is 63% van de hoeveelheid waarmee gestart is. In geval van doorgroeiing met stam MES15032 wordt zelfs nog meer droge stof afgebroken. Uitgaande van 3418 g droge stof bij aanvang, is na 12 weken doorgroeiing nog ongeveer de helft over (1702 gram).

Tabel 27. Resultaten vezelanalyse middels ANKOM op het hennepscheven substraat

Stam	Incubatie ­ duur (weken)	DM (gram)	As (gram)	OM (gram)	Cellulose (gram)	Hemi cellulose (gram)	Lignine (gram)	Ratio Cellulose /lignine
MES 14706	T=0 (na pasteurisatie)	3418	123	3295	1840 (100%)	526 (100%)	507 (100%)	3.6
	T=12	2152	98	2054	1077 (59%)	46 (9%)	152 (30%)	7.1
MES 15032	T=0 (na pasteurisatie)	3418	123	3295	1840 (100%)	526 (100%)	507 (100%)	3.6
	T=12	1702	139	1563	756 (41%)	10 (2%)	41 (8)	18.5

Tabel 27 geeft een overzicht van de resultaten van de vezelanalyse van het hennepscheven substraat middels ANKOM. Stam MES14706 breekt een aanzienlijk deel van de cellulose af gedurende de 12 weekse doorgroeiperiod; er blijft slechts een kleine 60% van over. Stam MES15032 breekt echter nog veel meer cellulose af. In deze kweek blijft slechts een dikke 40% over van de oorspronkelijke hoeveelheid cellulose.

Vooraf wat betreft hemicellulose vindt er een sterke afbraak plaats. In hennepscheven die 12 weken doorgroeid zijn met stam MES14706 blijft nog 9% van de oorspronkelijke hoeveelheid over en in de hennepscheven die doorgroeid zijn met stam 15032 zelfs maar 2%.

Ook lignine wordt sterk afgebroken. In hennepscheven die doorgroeid zijn met stam MES14706 blijft na 12 weken nog 30% van de oorspronkelijke hoeveelheid lignine over terwijl in geval van stam MES15032 zelfs slechts 8% over blijft.

Als gevolg van de relatief sterke afbraak van lignine stijgt de ratio cellulose/lignine aanzienlijk. In geval van stam MES14706 van een waarde 3.6 naar 7.1 en in geval van stam MES15032 zelfs naar 18.5.

2.4.3.5 Lisdodde

Naarmate de tijd na enten van het lisdodde substraat vorderde bleek dat de schimmels niet goed in staat waren om lisdodde te koloniseren. Mogelijk is het hoge vochtgehalte (85.5%) bij aanvang van de kweek daar debet aan of bevat lisdodde een schimmelwerende stof. Vanwege de slechte kolonisatie is besloten om dit substraat niet verder te analyseren.

3 Werkpakket 5; Pasteurisatie van stro substraat en doorgroeien met *Ceriporiopsis subvermispota* op semi-industriële schaal

3.1 De solid state fermentor

In de proeven die in Werkpakket 3 zijn uitgevoerd met betrekking tot doorgroeien van diverse lignocellulose reststromen, is gebleken dat een pasteurisatie van het substraat bij 70°C gedurende 8 uur er voor zorgt dat tarwestro-substraat goed en zonder infecties wordt gekoloniseerd door *Ceriporiopsis subvermispota*. In de industriële teelt van oesterzwammen wordt bijvoorbeeld grootschalig tarwe-stro gebaseerd substraat geproduceerd in tunnels waarbij tijdens pasteurisatie temperaturen tot 65°C worden bereikt, gevolgd door een kort-durende conditionering bij 45°C. Tijdens de conditionering ontwikkelt zich een thermofiele microflora die de gemakkelijk toegankelijke voedingsstoffen in het substraat vastlegt in biomassa, onder uitstoot van CO₂ en water. Het effect daarvan is dat er voor opportunistische concurrentschimmels zoals *Trichoderma* soorten, *Aspergillus* soorten en *Penicillium* soorten (gezamenlijk groene schimmels genoemd) geen gemakkelijk toegankelijke voedingsstoffen meer beschikbaar zijn.

In werkpakket 5 is geprobeerd om op een schaal van ongeveer 80 kg natgewicht substraat een pasteurisatieproces uit te voeren. Voor dit doel heeft CNC Grondstoffen een solid state fermentor beschikbaar waarin delen van het compostingsproces voor de productie van champignonsubstraat kunnen worden gesimuleerd



Figuur 16. Solid state fermentor waar de pan langs boven in kan zakken



Figuur 15. Pan van de solid state fermentor (met links op de grond het uitneembare deksel met gaten voor doorvoer van lucht).

(Figuur 15 en 16). Met behulp van een grondstoffenmengsel voor de bereiding van champignoncompost zijn in het verleden temperaturen van 70°C substraat temperatuur bereikt. Voor het afdoden van groene schimmels is waarschijnlijk een substraat temperatuur boven 60°C gedurende 8 tot 12 uur voldoende. De solid state fermentor bestaat uit een diepe pan met een binnenzijde diameter van 59 cm en hoogte van 85 cm. Deze pan heeft een geperforeerde bodem waardoor lucht langs de onderzijde door het substraat geblazen kan worden. Als de pan tot 20 cm onder de bovenzijde wordt gevuld, kan hij 175 liter substraat bevatten. Het aantal kilogrammen substraat dat gevuld kan worden is afhankelijk van de bulk density van het substraat. Stro-substraat bezit veel "structuur" waardoor het zich moeilijk laat samenpersen. In de experimenten kon gewoonlijk rond 80 kg natgewicht aan substraat worden gevuld. De Ferminipan kan met een takel in de solid state fermentor worden geladen. De solid state fermentor is uitgerust met een ventilator die lucht door het substraat kan blazen. De samenstelling van de lucht kan worden geregeld door bijmenging van buitenlucht.

De solid state fermentor is uitgerust met 4 temperatuursensoren voor het meten van de substraattemperatuur (twee onder en twee boven in het substraat. Daarnaast is het systeem uitgerust met sensoren voor de temperatuur van de ingaande lucht en de retourlucht. Verder is het mogelijk om het zuurstofgehalte van de lucht die het substraat binnengaat en van de lucht die het substraat verlaat te meten. Het proces van opwarmen en op temperatuur houden van het substraat wordt aangestuurd door een computersysteem dat volgens een vooraf ingegeven recept het geheel aanstuurt.

3.2 Pasteurisatie van het substraat

Het stro dat gebruikt werd in de experimenten was afkomstig van Vestjens Stroverwerking in Haelen.

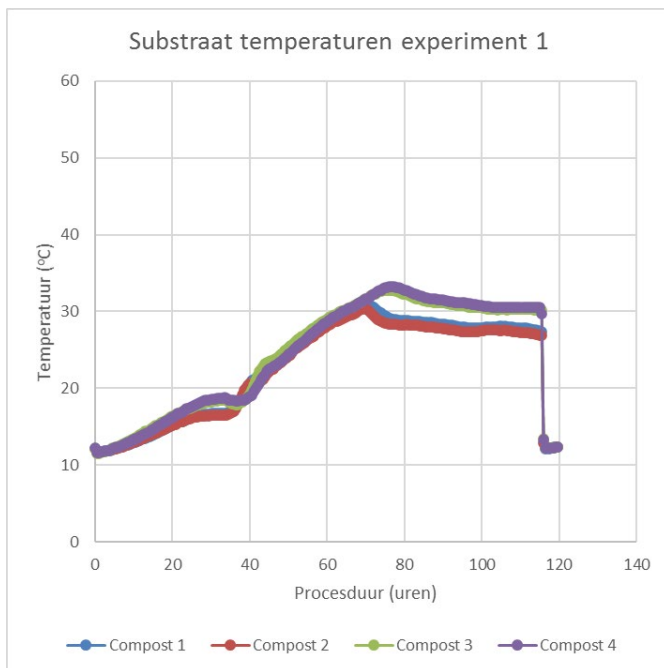


Figuur 17. Strovoorraad verkregen van Vestjens Stroverwerking in Haelen. Per pakket 20 kg tarwestro. De rechterfoto geeft een indruk van de lengte van de strodeeltjes.

Het betrof gehakseld en ontstoft stro dat verpakt in plastic blokken (20 kg gewicht) werd aangeleverd (Figuur 17). Om stro op het juiste vochtgehalte te brengen werd het afgevuld in netzakken en minimaal overnacht ondergedompeld in water. Vervolgens werden de zakken uitgelekt. Normaliter wordt in de industrie gebruik gemaakt van de populatie aan micro-organismen om het substraat zichzelf op te laten warmen. In een eerste experiment werd gebruik gemaakt van bietenpulpbrok als bron van suikers en eiwit voor de micro-populatie. Na het wellen van de bietenbrok werd het gemengd met het uitgelekte stro (1 kg gewelde bietenbrok per 72 kg strosubstraat). Vervolgens werd de solid



Figuur 18. Bevochtigen van stro



Figuur 19. Ontwikkeling van de temperatuur in een stro substraat, gemengd met bietenpulp.

Aangezien we met heel mooi schoon stro werkten, had de gedachte post gevat dat we entmateriaal zouden moeten gebruiken om te zorgen dat er in ieder geval microlevens in het substraat aanwezig zou zijn. Verbruggen Paddenstoelen in Erp produceert zelf een biologisch tarwestro gebaseerd substraat voor de teelt van oesterzwammen en heeft ons voorzien van entmateriaal in de vorm van fermenterend natuurgras (Figuur 20). Op het moment van bemonstering had het gras een temperatuur van meer dan 40°C en een milde ammonia-geur.

state fermentor gevuld met het substraat mengsel. Figuur 19 geeft een beeld van de ontwikkeling van de temperatuur in het substraat. Over een periode van ongeveer 3 dagen liep te temperatuur op tot ongeveer 30°C, waarna de temperatuur stabiliseerde. Het microlevens was niet in staat om voldoende activiteit te ontwikkelen om de temperatuur omhoog te jagen. Bij het be-eindigen van het experiment zag het stro er nog mooi schoon uit en het rook nog fris. Er waren geen infecties met onkruidschimmels te zien.

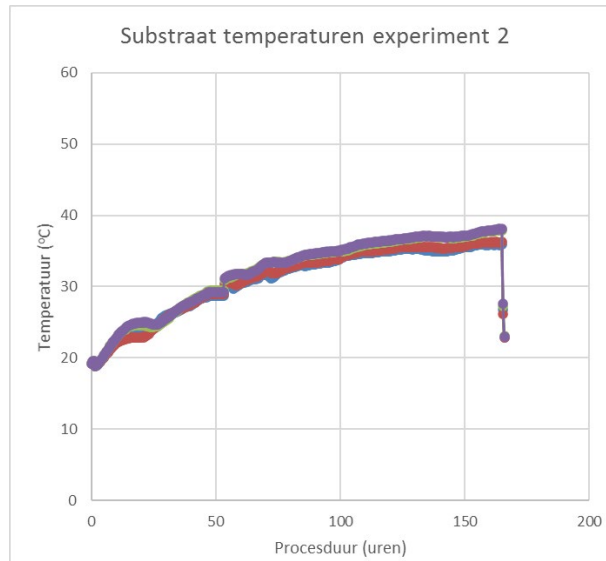


Figuur 20. Entmateriaal in de vorm van fermenterend natuurgras



Figuur 21. Strosubstraat met daarover verdeeld het entmateriaal (donker gekleurd) en het kristalsuiker (witte was).

Er werd vervolgens een nieuwe batch met tarwestro bevochtigd door onderdompelen. Nadat het stro was uitgelekt werd het gemengd met 1



Figuur 22. Ontwikkeling van de substraat temperatuur in experiment 2.

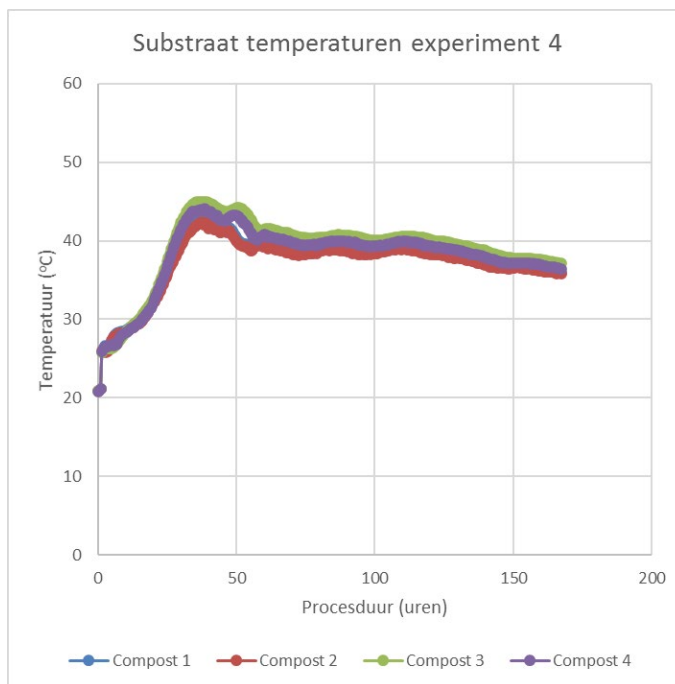
kg van het entmateriaal en 1 kg kristalsuiker(Figuur 21). Daarna werd de solid state fermentor gevuld en aangezet. In dit experiment liep tijdens het proces de temperatuur van het substraat op tot maximaal 38°C in een periode van een kleine 7 dagen (Figuur 22).

In een derde experiment is gekeken of andere proces instellingen het mogelijk maken om een hogere temperatuur te bereiken in het substraat. In dit experiment is wederom gewerkt met ongeveer 70 kg strosubstraat, gemengd met entmateriaal en een kilo kristalsuiker. In aanvang heeft het proces gedurende 4 dagen gelopen onder recept "FB Uitzweetproces 28/03/2017". Daarbij heeft het strosubstraat nooit een temperatuur bereikt die hoger was dan 34°C. In een poging om de temperatuur van het substraat te verhogen is het uitzweetproces gestopt en is een nieuw proces gestart (CE Fermini fase 1 proces 12/1/2016). Hierdoor liep de temperatuur op van 31°C na 35°C. In dit proces is iets misgegaan in de zin dat het programma de ingestelde minimum zuurstof concentratie negeerde. Hierdoor liep de zuurstofconcentratie in het substraat gestaag terug totdat op een gegeven moment alle zuurstof was geconsumeerd. De temperatuur van de retourlucht was op dat moment 35-36°C. Vervolgens heeft het systeem twee dagen gedraaid zonder zuurstof, met de buitenklep op 20%, maar met een actueel toerental van de ventilator op 6%. Het systeem kreeg hierdoor te weinig zuurstof. Na in totaal een week is het experiment afgebroken. De temperatuur van het substraat bleef hangen op 33-34°C. Bij het openen van de solid state fermentor rook het stro licht zuur en waren er kleine plekjes met groene schimmel te zien (Figuur 23).



Figuur 23. Voorbeeld van een infectieplekje met groene schimmel

In het vierde experiment werd het stro-substraat uit experiment 3 hergebruikt. Het werd uit de solid state fermentor gehaald, afgekoeld en gemengd met een kilo kristalsuiker. Vervolgens werd proces FI (Fermini fase 1 proces 23-10-2018) opgestart (bestaand uit fasen 120 t/m 127). Na een week werd het proces afgebroken. In dit experiment liep de temperatuur in ruim anderhalve dag op naar ongeveer 43°C, om vervolgens 20 uur boven 40°C te blijven en daarna langzaam lager te worden (Figuur 24). Bij het leeghalen van het fermentorvat zaten er her en der kleine infectieplekjes met groene schimmel in het substraat. Het natte stro is gebruikt om een vijfde experiment in te zetten.



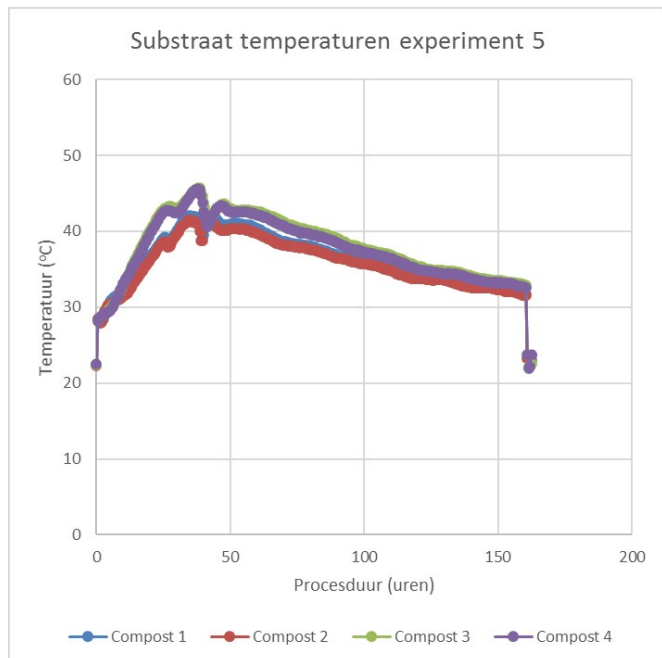
Figuur 24. Temperatuurverloop van het substraat in experiment 4

Nadat het stro uit de solid state fermentor was gehaald, werd 1 kg kristalsuiker en 8 liter water toegevoegd en gemengd. De kleine infectieplekjes zijn niet uit het stro verwijderd, maar er gewoon weer doorheen gemengd. Daarna is de solid state fermentor opnieuw geladen en opnieuw opgestart met proces FI, met de aanpassing dat in fase 201 het zuurstofgehalte op 4% is gezet. Bij aanvang is het gewicht aan substraat 73.7 kg. Later op de avond is de ventilator capaciteit verlaagd naar 25% van het maximaal toerental met als bedoeling om de warmte zo veel mogelijk in het substraat te houden. Daarna is het toerental van de ventilator nog verder verlaagd en vervolgens weer verhoogd in een poging om de

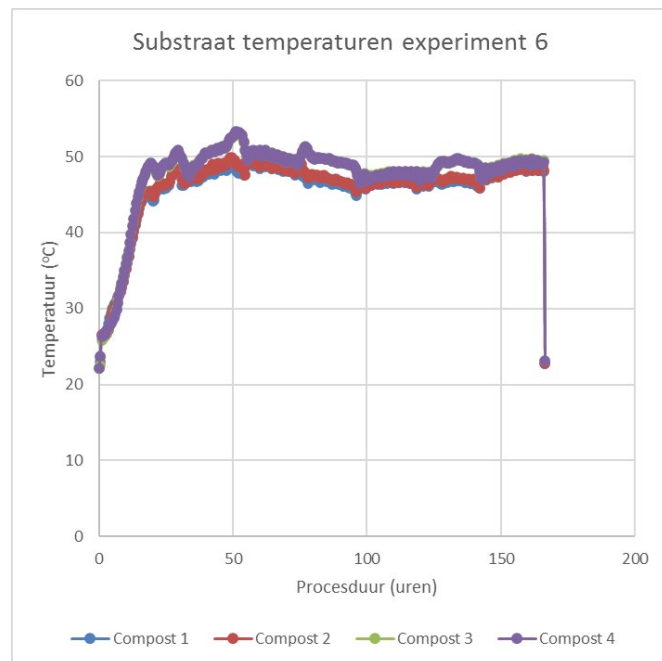
substraat temperatuur te verhogen. Het temperatuursverloop in het substraat staat weergegeven in Figuur 25. Het substraat warmde in iets minder dan een dag op tot een temperatuur van 42-44°C, om vervolgens na 50 uren procesduur weer te dalen tot iets boven 30°C.

In een ultieme poging om meer activiteit in het strosubstraat te krijgen, is geprobeerd om naast een koolstofbron ook een stikstofbron aan te bieden aan de microflora. Het stro-substraat dat nog in de solid state fermentor zat is uit de fermentor gehaald en gemengd met anderhalve kilo kristalsuiker, een pond geleisuiker en 1.15 kilo bijvoedmiddel (Champfood, minimaal 42% ruw eiwit). Vervolgens werd water toegevoegd om het stro weer op vocht te brengen. Nadat het substraat weer in de fermentor was geladen, is proces FI (Fermini fase 1 proces 23-10-2018) opgestart. Daarnaast is geprobeerd om warmteverlies uit de fermentor te beperken door de luchtslangen van en naar de fermentor, alsmede de ventilator enigszins te isoleren met glaswol. Na ongeveer een dag is de fermentor in storting gevallen. De storting is echter binnen 2 uur verholpen en lijkt weinig effect te hebben gehad op het proces. Figuur 26 geeft een beeld van het temperatuursverloop in het substraat. Na ruim een dag had het substraat een temperatuur van meer dan 40°C bereikt. In de daaropvolgende dagen werd op sommige plekken van de fermentor een substraat temperatuur van 50-51°C bereikt. Daarna stabiliseerde de temperatuur enigszins op waarden rond 45-48°C.

Na een week werd het proces afgebroken en werd de inhoud van de fermentor geïnspecteerd. Aan de oppervlakte van het



Figuur 25. Temperatuursverloop van het substraat in experiment 5.



Figuur 26. Temperatuursverloop van het substraat in experiment 6.



Figuur 27. Infectieplekjes op het substraat uit experiment 6. Het bleken in alle gevallen lokale infecties.

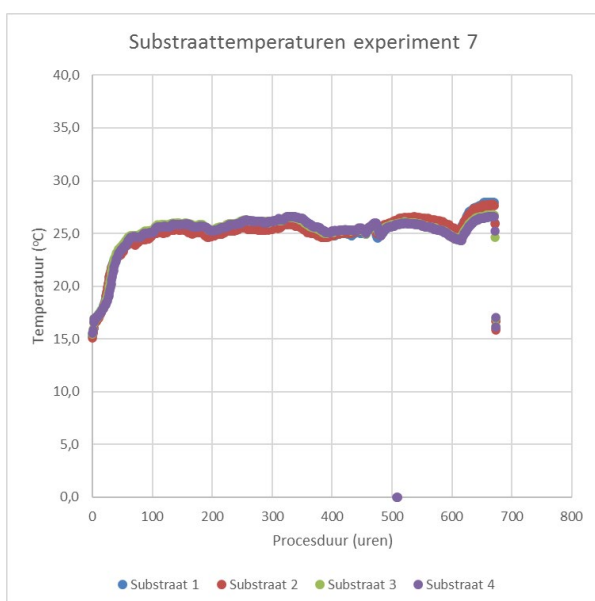
substraat werden witte schimmelplekjes gezien (Figuur 27), maar dieper in het fermentorvat werden geen infecties gezien.

Aangezien het problematisch bleek om een stro-substraat goed te pasteuriseren in de solid state fermentor van CNC en we geen vorderingen maakten, is er contact gezocht met VeMeSpecials in Gemert. Dat bedrijf produceert tarwestro substraat voor reguliere oesterzwamteelt en zij hebben ons voorzien van 80 kilo gepasteuriseerd stro-substraat met een vochtgehalte van 74.1%, een asgehalte van 14.5% (op droge stof basis) en een pH waarde van 8.9.



Figuur 28. Broed zoals aanleverd door Mycelia van 3 stammen Ceriporiopsis subvermispora. Van links naar rechts; stam MES15032 (beste monokaryon uit werkpakket 1), stam MES13094 (een monokaryon dat in eerdere biogastesten werd gebruikt) en stam MES14706 (beste dikaryon uit werkpakket 1).

Ten behoeve van de proeven bij CNC is door Mycelia broed gemaakt van 3 C. subvermispora stammen (zie Figuur 28); MES15032 (beste monokaryon uit werkpakket 1), stam MES13094 (een monokaryon dat in eerdere biogastesten werd gebruikt) en stam MES14706 (beste dikaryon uit werkpakket 1). Het broed van de beide monokaryons was niet heel sterk doorgroeid met mycelium. Het broed van het dikaryon bevatte duidelijk meer mycelium en in dat broed werden de broedkorrels door de schimmeldraden bijeengehouden. In overleg met Bioclear Earth is de keuze gemaakt om de fermentor te enten met stam MES15032, aangezien deze stam de best presterende was in werkpakket 1.



Figuur 29. Temperatuurverloop van het substraat in experiment 7.

Voorafgaand aan het enten is de grote plastic bak waarin het broed door het substraat werd gemengd ontsmet met Divosan en nagespoeld met schoon water. De benodigde hoeveelheid broed (er is ge-ent met het equivalent van 25 liter broed per ton substraat) is in een laminar flow kast uit de (ontsmette) broedzak gehaald en door het substraat gemengd. Met het substraat is de fermentorpan gevuld tot een volume van 174,7 liter met een startgewicht van 70.3 kg (bulk density van het substraat 0.402 kg/L). Vervolgens is de fermentor opgestart met proces FR (myceliumgroei). Het temperatuurverloop van het proces wordt weergegeven in Figuur 29. Na 19 dagen is de fermentor geopend om te zien of er doorgroei van het substraat had plaatsgevonden. Op het oog had er geen schimmelgroei plaatsgevonden. Er is een beetje substraat bemonsterd uit de bovenlaag van de fermentor om te zien of de pH van het substraat was veranderd. Een verlaging

van de pH is mogelijk een indicatie dat er schimmelgroei heeft plaatsgevonden. Het substraat uit de bovenlaag bleek een pH 8.5 te hebben (beginwaarde 8.9). Vervolgens is de fermentor gesloten en is het proces voortgezet. Na een totale procesduur van 28 dagen is het experiment gestopt. Na 28 dagen was de pH van het substraat 8.36. In een klein plekje was het substraat verkleurd (indicatie van schimmelgroei) en daar was de pH gedaald tot 7.0.

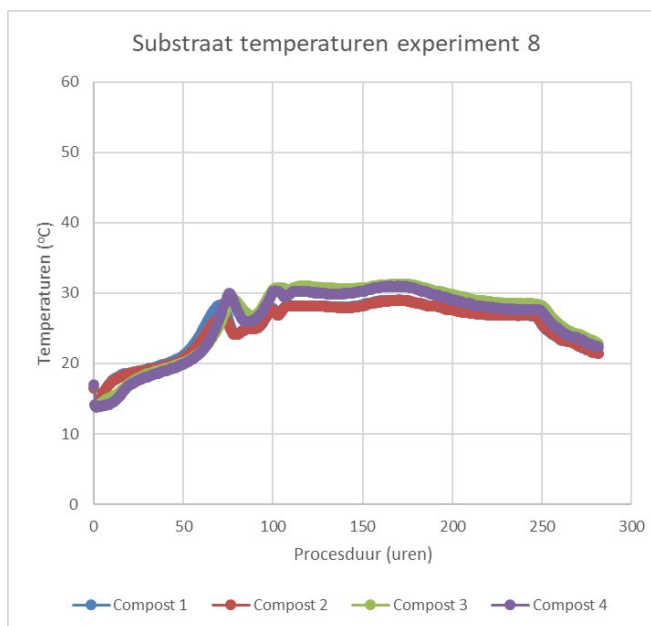
Het commercieel verkrijgbare oesterzwamsubstraat is in een proces van trial en error uitontwikkeld tot een betrouwbaar substraat voor de teelt van oesterzwam (*Pleurotus ostreatus*). De hoge start pH van het substraat dient om het risico van infecties te minimaliseren. Oesterzwam is blijkbaar beter in staat om met de hoge pH om te gaan dan concurrentschimmels. Ook shiitake (*Lentinula edodes*) is in staat om het commercieel verkrijgbare oesterzwamsubstraat goed te doorgroeien. Voor *C. subvermispora* ligt dat blijkbaar anders. Mogelijk is een pH van bijna 9 te ver uit het optimale pH bereik van deze schimmel en zijn de mogelijkheden om het substraat te verzuren beperkt. Wat daarnaast ook niet heeft geholpen is dat we gekozen hebben voor een stam waarvan het broed niet optimaal bezet was met schimmeldraden.

Nadat bleek dat het commercieel verkrijgbare stro-substraat niet geschikt was, is op een projectvergadering op 25 november 2020 besloten om een low-tech methode te testen; aanzuren van tarwestro tot een pH tussen 3 en 4. Hiervoor werd tarwestro bevochtigd met water waarin citroenzuur zat opgelost. Om 70 kg strosubstraat te maken met 70% vocht, is 21 kg droog stro nodig. Uitgaande van een droge stof gehalte in stro van 90%, is 23.3 kg stro nodig (bevat 21 kg droge stof en 2.3 kg water). Om het stro op het juiste vochtgehalte te krijgen is vervolgens 54.7 kg water toegevoegd waarin 1263 g citroenzuur was opgelost. Het stro heeft vervolgens 3 dagen de tijd gekregen om het water op te nemen. Hiervoor werd het stro enigszins samengedrukt. De uiteindelijk bereikte pH van het strosubstraat was daarmee op 3.8 gekomen. Het uiteindelijke vochtgehalte van het stro substraat was 73.2% (asgehalte 4.7% van de droge stof).

Het aangezuurde strosubstraat werd geïnoculeerd met broed van stam MES14706 (1 kg/71 kg



Figuur 31. Infectie met groene schimmel die zich heeft ontwikkeld in het met citroenzuur aangezuurde stro-substraat



Figuur30. Temperatuurverloop in het substraat van experiment 8.

substraat = 1.4% w/w). Na vullen van de fermentor werd de doorgroeiing gestart met proces FG. De ontwikkeling van de temperatuur in het substraat wordt weergegeven in Figuur 30. Na de eerste dagen ontstaat een flinke activiteit in de fermentor en loopt de temperatuur op naar 28°C (bij een aanvoer temperatuur van de lucht op maximaal 22°C). Het zuurstofgehalte in de fermentor zakt snel naar 0% en dat wordt pas laat opgemerkt. Na 16 uur zonder zuurstof werd het zuurstofgehalte weer verhoogd naar waarden rond 15%. Gelijktijdig met de toevoer van zuurstof steeg de

temperatuur weer. Het proces werd vervolgens zo aangepast dat het handhaven van de juiste temperatuur prioriteit heeft.

Na ruim 11 dagen werd het proces afgebroken. Bij het openen van de fermentor bleek dat de inhoud een flinke infectie met groene schimmel had (Figuur 31). Deze was met name zichtbaar op het oppervlak van het stropakket. Om te proberen om de infectie af te doden, is de fermentor weer gesloten en is een pasteurisatieproces gestart (Proces FH Fase2 – 26-8-2018). Door de infecterende schimmel zo hard mogelijk te laten groeien is geprobeerd om het substraat zichzelf op te laten warmen. De temperatuur van het substraat liep daarbij op tot 50°C en deze temperatuur is zo lang mogelijk op peil gehouden. Na be-eindiging van het proces bleken er geen groene sporen meer aanwezig.

Dit laatste experiment maakte duidelijk dat aanzuren van het stro-substraat tot waarden rond pH 4 niet voldoende is om *C. subvermispota* voldoende voorsprong te geven op concurrent-schimmels. Een temperatuurbehandeling is zonder meer noodzakelijk.

3.3 Conclusie

De reeks aan experimenten die zijn uitgevoerd om het stro-substraat door eigen microbiele activiteit te laten opwarmen tot waarden rond 60-65°C die in de praktijk gebruikt worden om substraten voor schimmelteelt te pasteuriseren, hebben geen van allen succes gehad. In een experiment waarin gebruik is gemaakt van commercieel beschikbaar substraat op basis van tarwestro bleek echter dat *Ceriporiopsis subvermispota* niet in staat bleek om het substraat te koloniseren (terwijl schimmels zoals *Pleurotus ostreatus* (de oesterzwam) en *Lentinula edodes* (shiitake) daar in de commerciële praktijk geen enkel probleem mee hebben. Mogelijk heeft *C. subvermispota* een probleem met de hoge pH van het commerciële substraat. Pogingen om een selectief substraat te maken door tarwestro te verzuren met citroenzuur waren echter eveneens niet succesvol.

4 Eindconclusie

Uit de rapportage is duidelijk geworden dat er twee stammen van *Ceriporiopsis subvermispota* kunnen worden geïdentificeerd die in staat zijn om lignocellulose houdende substraten selectief te verrijken in cellulose (door afbraak van lignine en hemicellulose). Het betreft MES15032 (een monokaryon) en MES14706 (een dikaryon). Deze verrijking in cellulose gaat telkens gepaard met een verlies aan droge stof dat in het proces wordt omgezet in koolzuurgas, water en schimmel-biomassa.

In werkpakket 3 is aangetoond dat het proof of principle geleverd kan worden voor gebruik van deze schimmels in tarwestro, miscanthus, vlasleem en hennepscheven. In natuurgras bleek de afbraak niet erg selectief; zowel cellulose, hemicellulose als lignine werden allemaal afgebroken. Lisdodde raakte nauwelijks gekoloniseerd door beide geteste schimmelstammen.

De experimenten in werkpakket 3 laten zien dat voor elk type lignocellulose substraat er een balans moet worden gevonden tussen voldoende verrijking in cellulose en een beperkt verlies aan droge stof. Om dat goed te kunnen doen, moet worden opgeschaald naar een commercieel systeem, zoals gebruikt wordt in de bereiding van substraat voor de teelt van eetbare paddenstoelen. In de commerciële praktijk wordt tarwestro in batches tot wel 125-250 ton natgewicht bewerkt tot substraat voor paddenstoelenteelt. Dit wordt gedaan in afsluitbare ruimten met beluchte vloeren waarin de lucht door het substraat kan worden gecirculeerd (Figuur 32). In deze ruimten wordt de microbiële activiteit in het substraat middels de beluchting gestuurd en is het mogelijk om het substraat zichzelf op te



Figuur 32. Tunnelsystemen zoals in gebruik bij CNC Grondstoffen/

laten warmen tot temperaturen tussen de 60 en 70°C (afhankelijk van chemische samenstelling en aanwezige microflora). Bij deze temperaturen worden concurrent schimmels afgedood en heeft de schimmel die in het substraat wordt ge-ent een snelle start waardoor deze schimmel al snel dominant is in het substraat. Binnen Werkpakket 5 zijn door CNC Grondstoffen een reeks aan experimenten uitgevoerd gericht op het opschalen van de teelt van *C. subvermispota*. De door CNC Grondstoffen uitgevoerde experimenten hebben echter geen van allen succes gehad. In de solid state fermentor bleek het niet mogelijk om de gewenste temperaturen te bereiken. In een experiment waarin gebruik is gemaakt van commercieel beschikbaar substraat op basis van tarwestro bleek echter dat *Ceriporiopsis subvermispota* niet in staat bleek om dat substraat te koloniseren (terwijl schimmels zoals *Pleurotus ostreatus* (de oesterzwam) en *Lentinula edodes* (shiitake) daar in de commerciële praktijk geen enkel probleem mee hebben. Mogelijk heeft *C. subvermispota* een probleem met de hoge pH van het commerciële substraat. Pogingen om een selectief substraat te maken door tarwestro te verzuren met citroenzuur waren echter eveneens niet succesvol.

Het is duidelijk dat de opschaling van het systeem nog enig werk behoeft. Zodra de opschaling mogelijk is, wordt het ook mogelijk om onder commerciële procescondities uit te zoeken waar de juiste balans ligt tussen selectieve verrijking in cellulose bij beperkte verliezen aan droge stof.

Literatuur

- Jones D.I.H. & Bailey R.W. (1972) The hydrolysis of cell wall polysaccharides from freeze-dried and oven-dried herbage by rumen and mould carbohydrates. *J. Sci. Food Agric.* 23, pp. 609-614.
- Van Soest P.J. (1963a) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46, pp. 825-829
- Van Soest P.J. (1963b) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46, pp. 829-835.
- Van Soest, P.J. & Robertson J.B. (1980) Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: Standardization of analytical methodology for feeds, pp. 49-60. Workshop Ottawa, 1979. Ed. W.J. Pigden e.a. IDRC-134e, Canada
- Van Soest P.J., Robertson J.B. & Lewis B.A. (1991) Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Dairy Sci* 74, pp. 3583-3597.

Correspondentie adres voor dit rapport:

Postbus 386
6700 AJ Wageningen
T 0317 48 28 36
www.wur.nl/plant-research

Rapport WPR-2021-6

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.