

**TKI BBEG:  
Biopulping: selectieve  
lignine ontsluiting met  
witrotschimmels**

Rapportage

TKI BBEG (TEBE117013)



creating with the **power of nature**

OPDRACHTGEVER: RVO  
PROJECTTITEL: TKI BBEG: Biopulping: selectieve lignine  
ontsluiting met witrotschimmels  
PROJECTCODE: 20165100/12839  
DOCUMENTTYPE: Rapportage  
PUBLICATIEDATUM: Januari 2022  
PROJECTLEIDER: Jeroen Tideman  
AUTEUR(S): Jeroen Tideman, Matthijs de Koning  
COLLEGIALE TOETS: Eline Keuning

Bioclear earth b.v.  
Rozenburglaan 13C; 9727 DL Groningen  
Telefoon: 050 571 84 55  
Email: [info@bioclearearth.nl](mailto:info@bioclearearth.nl)  
Website: [www.bioclearearth.nl](http://www.bioclearearth.nl)



Bioclear earth is gecertificeerd conform  
ISO 9001:2015.



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



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

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden  
vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk,  
fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder  
voorafgaande toestemming van Bioclear earth.

© Bioclear earth b.v.

Bioclear earth adviseert bedrijven, overheden en dienstverlenende  
organisaties op het terrein van Bodem, Water en Klimaat.

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

# Inhoudsopgave

1	Ten geleide	1
2	Samenvatting	2
3	Achtergrond	6
3.1	Biopulping	6
3.2	Vooronderzoek	7
3.3	Witrotschimmels	8
4	Projectopzet	9
4.1	Doelstelling	9
4.2	Toepassingen	9
4.3	Werkpakketten	11
5	Resultaten	12
5.1	WP 0 – Inventarisatie	12
5.2	WP 6 – Procesontwikkeling	16
5.3	WP 1 – Schimmel optimalisatie	21
5.4	WP 3 – Biomassa matrix	23
5.5	WP 4 – Toepassing Papier	27
5.6	WP 4 – Toepassing Groen Gas	30
5.7	WP 2 – Optimalisatie groeicondities	38
5.8	WP 5 – Opschaling	44
6	Conclusies	50
7	Discussie	52
8	Aanbevelingen	54

Bijlage 1 Vergisting WP3 tarwestro (ADL=8%)

Bijlage 2 Vergisting WP3 Miscanthus (ADL=12%)

Bijlage 3 Vergisting WP3 vlaslemen (ADL=23%)

Bijlage 4 Eerste fase compostering als pretreatment?

Bijlage 5 Stappenschema screeningstesten

# 1 Ten geleide

Dit rapport betreft de openbare eindrapportage van het project “Biopulping: selectieve lignine ontsluiting met witrotschimmels”, uitgevoerd in de periode december 2017 tot en met september 2021.

Het project “Biopulping” is uitgevoerd met subsidie van het Ministerie van Economische Zaken en Klimaat-Klimaat en Energie, subsidieregeling Topsector Energie uitgevoerd door Rijksdienst voor Ondernemend Nederland binnen de regeling TKI BBEG (referentie TEBE117013).

Aanvullende financiering is aan het project bijgedragen door STOWA (projectcode 432.714), Rijkswaterstaat, Attero BV, Waterschap Aa en Maas, Wetterskip Fryslân en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier.

Dit project is conform projectplan uitgevoerd in consortiumverband door de consortiumpartners: Bioclear earth BV, WUR PRI, CNC Grondstoffen BV, KCPK, Staatsbosbeheer, BVOR en Attero BV. Enkele opschalingstesten zijn uitgevoerd in België, bij Mycelia NV. RVO heeft tijdens de looptijd het project verlengd om de biomassa screening in WP3 en de opschalingstesten in WP5 (die omwille van de COVID-19 pandemie vertraging opgelopen hadden) goed uit te kunnen voeren.

Deze rapportage omvat de belangrijkste projectdoelen en projectresultaten en beschrijft de door Bioclear earth uitgevoerde activiteiten in meer technisch detail. Dit document wordt vergezeld door een technische rapport van de WUR waarin de activiteiten van de WUR en CNC in meer detail beschreven staan (<https://doi.org/10.18174/561758>).

Bioclear earth wil alle financiers en deelnemende partijen bedanken voor hun inbreng, inzet en bijdrage aan het project. In het specifiek herdenken wij Yede van der Kooij †.



## 2 Samenvatting

Er is in de maatschappij groeiende behoefte en noodzaak aan het inzetten van biomassa ten behoeve van verduurzaming. In deze 'biobased economy' worden allerlei biomassa (rest)stromen als nieuwe grondstoffen verwerkt tot een scala aan producten uit de biobased waardepiramide. Hiervoor zijn nieuwe bioraffinage processen benodigd. Lignocellulose biomassa kan een belangrijke duurzame grondstof zijn voor toepassing in onder andere *feed*, *fibres*, *fermentation products* en *fuels*. De uitdaging is echter om de recalcitrante matrix te ontsluiten om de inhoudsstoffen beter te kunnen benutten.

In de natuur zijn witrotschimmels de primaire afbrekers van lignocellulose biomassa. In tegenstelling tot veel industriële processen vindt deze afbraak plaats op kleine schaal en onder milde condities. Selectieve witrotschimmels zijn zelfs in staat om de lignine te kraken en verwijderen zonder de cellulose te consumeren. De biopulping techniek maakt gebruik van dit natuurlijke principe. Een voorbehandeling van vezelrijke substraten met selectieve witrotschimmels zorgt ervoor dat de cellulose vezel uit de lignocellulose biomassa beter beschikbaar komt voor nieuwe toepassingen zoals de productie van groene chemicaliën, biobased vezelgrondstoffen, groen gas en feed. Op papier heeft biopulping de potentie om uit te groeien tot een platformtechnologie die decentraal ingezet kan worden.

Dit project had daarom als doelstelling om middels onderzoek, ontwikkeling en opschaling voor de biopulping techniek een stap richting de praktijk te zetten.

Vele toepassingen zijn denkbaar. Door verschillende types biomassa en de verschillende eindproducten te combineren zijn allereerst de twee meest kansrijke waardeketens geselecteerd om op te focussen. De eerste waardeketen is de productie van groen gas uit gras- en rietachtigen (stro). De tweede waardeketen is de productie van een vezelgrondstof ten behoeve van grafische papieren uit rietachtige biomassa stromen.

De uitgevoerde economische analyse liet zien dat 'proven technology' uit de paddenstoelenindustrie (pasteuriseren van biomassa, gebruik van graanbroed, doorgroeien van substraat in schone tunnels) een 'no-go' is voor de economische haalbaarheid. De beoogde biobased toepassingen zijn in vergelijking met de voedseltoepassing namelijk minder hoogwaardig en ook is de voor biopulping benodigde tunnelcapaciteit zeer hoog vanwege de lange voorbehandelingstijd.

Op basis van dit resultaat is een innovatief concept gedefinieerd waarmee in een bioreactor vloeibaar inoculum geproduceerd wordt en de biopulping van biomassa onder selectieve omstandigheden plaatsvindt. Als in dit project aan deze randvoorwaarden voldaan kan worden, dan maakt de biopulping techniek ook economisch kans van slagen.

De best presterende selectieve witrotschimmel is voor zover bekend de basidyomyceet *Ceriporiopsis Subvermispota*. De WUR heeft van deze soort een wereldwijd unieke collectie opgebouwd van in totaal meer dan 30 stammen via het verzamelen van de circa 11 bekende stammen (10 dikaryons en 1 monokaryon) waaruit in de aanloop naar dit project nog 20 extra monokaryons zijn gecreëerd. Met al deze strains is een screening uitgevoerd. Op basis van selectiviteit in afbraak en groeikarakteristieken zijn de twee best presterende stammen, een monokaryon en een dikaryon, geselecteerd voor verder gebruik in het project.

Het toepassingsgebied en pretreatment effect van biopulping is vervolgens in kaart gebracht middels het voorbehandelen van een zestal verschillende soorten biomassa: natuurhooi, tarwestro, Miscanthus, lisdodde, vlasleem en hennepscheven. Pasteuriseren zorgde in deze test voor het voorkomen van infecties. Hieruit kwam naar voren dat biomassa met een hoge vezelfractie (>80%, liever >85%) goed gekoloniseerd wordt. Biomassa met een lagere vezelfractie (range 70%-80%) zoals natuurhooi en lisdodde is niet alleen minder selectief voor schimmel kolonisatie, maar bevat vaak inhoudsstoffen zoals organische zuren die schimmelgroei remmen. De grootste impact van biopulping werd verkregen voor de materialen die behalve een hoog vezelgehalte ook een hoog lignine gehalte hadden (>10%, liever >15%). Verder bleek ook dat tijdens de voorbehandeling ook organische stof verloren gaat. De schimmel heeft namelijk ook energie nodig voor zijn metabolisme. Cellulose bleef over het algemeen goed behouden, maar tijdens de pretreatment wordt naast de lignine ook de hemicellulose afgebroken. De materialen met een hoog lignine gehalte hebben standaard een lager hemicellulose gehalte en daardoor minder last van procesverliezen, maar dit was geen absolute trend. Het monokaryon presteerde net iets beter dan het dikaryon.

Toepassingstesten zijn uitgevoerd voor papierproductie. Er zijn succesvol prototypes van 100% en 30% Miscanthus papier gemaakt. De met biopulping voorbehandelde strootjes vallen na een simpele mechanische voorbehandeling in water uiteen in losse vezels. Deze stap is vergelijkbaar met de mechanische pulping stap in papierfabrieken. Wel is er nog een mechanische filtratiestap nodig omdat biopulping de hardste stukjes biomassa (de knopen of 'nodes') in het stro ongemoeid laat. Ook bleekt biopulping de vezels. Hiermee is het effect van de pretreatment bewezen. Een logische volgende stap zou het verwerken van een grote batch gebiopulpte Miscanthus in een commerciële papierfabriek zijn.

Er is uitgebreid vergistingsonderzoek uitgevoerd naar de toepassing van biopulping ten behoeve van groen gas productie. Er is vastgesteld dat pretreatment inderdaad voor een verbeterde verteerbaarheid zorgt. Dit was aanwijsbaar het effect van lignine afbraak, want enkel hemicellulose afbraak zorgde niet voor deze versnelling. Een optimale pretreatment tijd is vastgesteld op circa 8-12 weken. De gebiopulpte materialen breken dan zeer veel sneller af in vergisting. Ook maakt Biopulping mechanische voorbehandeling compleet overbodig. Aangezien er tijdens de pretreatment organische stof verloren gaat, ontstaat er een balans tussen meeropbrengst door betere ontsluiting en minderopbrengst door verlies aan organische stof. Of er uiteindelijk na correctie per ton oorspronkelijke ingaande biomassa een netto meeropbrengst aan biomethaan verkregen wordt hangt af van de verblijftijd in vergisting, het lignine gehalte van het substraat en of de referentie gemalen wordt. Voor gebiopulpt vlas (23% lignine) is de biomethaanopbrengst na 60 dagen meer dan verdubbeld (+117%) ten opzichte van de gemalen referentie. Voor de materialen tarwestro (8% lignine) en Miscanthus (13% lignine) werd een zo goed als neutraal resultaat behaald (respectievelijk +1% en -10%). Als gebiopulpt materiaal echter vergeleken wordt met ongemalen referentie dan zorgt pretreatment voor alle geteste substraten voor een meeropbrengst van +7% (stro), +126% (Miscanthus) en +104% (vlas) na 60 dagen vergisting.

Ondanks deze zeer positieve testresultaten is de praktische meerwaarde voor de groen gas sector helaas nog niet onomstotelijk vastgesteld. Materialen met een zeer hoog lignine gehalte van waarbij het grootste voordeel werd behaald zijn schaars in biovergisting. Droge materialen met 10-20% lignine die al gebruikt worden in biovergisting, kunnen over het algemeen prima mechanisch voorbereid worden waardoor de grootste meerwaarde van biopulping verdwijnt. De versnelling van vergisting alleen lijkt onvoldoende interessant om te investeren in biopulping.

Als cruciale stap in het innovatieve kweekconcept is er door Bioclear earth zeer veel aandacht gegeven aan het ontwikkelen, optimaliseren en het selectief maken van het vloeibare kweekmedium. Hier is een screenings methodologie voor ontwikkeld. Uiteindelijk is gebleken dat de beste samenstelling een arm mineraal medium op zeer lage pH van 2,5-3,5 met toevoeging van een vitamine en enkele verschillende stoffen die niet toxisch of schadelijk zijn. Deze stoffen hadden geen nadelig effect op de groei van witrotschimmels, maar remden wel de groei van concurrerende bacteriën en schimmels. Besmetting met bacteriën en de agressieve *Trichoderma* schimmels werd hiermee volledig voorkomen. Wel is er nog enkele malen een besmetting opgetreden van een gist die sneller groeit dan een schimmel. Ook is er eenmaal met moleculaire technieken een besmetting opgespoord van een *Penicillium* schimmel die visueel lastig van de *C.Subvermispora* te onderscheiden was. Deze belangrijke resultaten onderstrepen dat er een redelijk robuust medium ontwikkeld is, maar dat er tegelijkertijd nog ontwerpisen aan de kweekreactor gesteld worden met betrekking tot inoculatie en hygiënisatie. Als belangrijke bijvangst in het project is er gevonden dat middels deze vloeibare kweek onder de juiste omstandigheden ook oxidatieve enzymen (mangaan peroxidase, laccase) geproduceerd worden, de productie is hiervan verder verhoogd via het toepassen van inducerende stoffen in het kweekmedium.

Als laatste is er in dit project opgeschaald. Allereerst is de samenstelling en pH van het klassieke axenische graanbroed voor *C.Subvermispora* geoptimaliseerd en succesvol full-scale gevalideerd in 5L zakken, een gangbare schaal in de paddenstoelen industrie. Hoewel het monokaryon iets beter presteert in de pretreatment, vormt het dikaryon een robuuster mycelium. Vervolgens is er door Mycelia een innovatief axenisch 'vloeibaar gemaakt' broed geproduceerd dat ook opgeslagen en getransporteerd kan worden. Beide broedsoorten zijn succesvol toegepast in het aanenten van vloeibare kweek; het vloeibaar gemaakte broed paste het beste bij vloeibare kweek, het graanbroed diende eerst vermalen te worden. Verschillende reactorconcepten zijn getest. De meest simpele configuratie (een bubble column) voldoet voor de kweek. Een roerder kan eventueel toegevoegd worden om te suspenderen en dispergeren bij hoge biomassa concentraties. De reactor moet wel gesteriliseerd worden en de ingaande lucht moet gefilterd worden. Pasteurisatie voldeed ook in de meeste gevallen, maar niet altijd. De vloeibare kweek is op een schaal van 0,3L, 2L en 10L succesvol uitgevoerd bij Bioclear en daarna op 200L redelijk succesvol getest bij Mycelia. Ook is de keten voor het gehele concept bij Bioclear integraal op kleine schaal gedemonstreerd: vloeibaar gemaakt broed, 1<sup>e</sup> kweek in seed fermentor, doorzet van kweek in een productie fermentor, inoculeren en koloniseren van lignocellulose biomassa.

Tenslotte is de biopulping van biomassa zelf opgeschaald. Bij CNC zijn uitgebreid testen uitgevoerd om stro op een natuurlijke wijze te pasteuriseren op een schaal van 70-80kg, dit was ondanks alle verschillende settings door de geringe warmteontwikkeling helaas niet succesvol. Ook is in deze en andere testen gebleken dat de ingaande biomassa wel degelijk een pasteurisatie dient te ondergaan om een goed biopulping resultaat te verkrijgen. Het aanzuren van de biomassa zelf tot pH4 was onvoldoende beschermend. Het gebruik van al gepasteuriseerd stro was niet succesvol vanwege de hoge start pH. Een grotere schaal lijkt nodig om deze pasteurisatie te kunnen valideren.

Als afsluitende test zijn bij Mycelia tarwestro en Miscanthus in big-bags voorbehandeld met verschillende types broed (graan vs. vloeibaar) onder verschillende typen hygiënisatie (pasteurisatie vs. sterilisatie). Op een schaal van 500kg is gebleken dat vloeibaar broed goede resultaten gaf. Het kostbaardere graanbroed was nog actiever en zorgde voor oververhitting. Hiermee is aangetoond dat er mechanische ventilatie nodig is om het proces te kunnen beheersen. De meeste big-bags zijn hierdoor oververhit geraakt waardoor de gewenste schimmels zijn afgestorven.

In de overige big-bags is uiteindelijk wel goede kolonisatie, maar helaas geen lignine afbraak aangetoond, waardoor het vermoeden is ontstaan dat de tweede stap van vloeibare kweek geïnfecteerd is geraakt.

Deze onderzoeks- en opschalingsresultaten geven aan dat er ondanks de grote vooruitgang in het beheersen van de techniek, er helaas geen doorbraak is gevonden in het onder selectieve condities kunnen koloniseren van de biomassa. Ook blijkt de balans tussen ontsluiting van de lignocellulose enerzijds en verlies aan organische stof in de pretreatment anders cruciaal waardoor vooralsnog enkel materialen met een hoog lignine gehalte geschikte substraten lijken te zijn. Hierdoor is het ontwikkeldoel van een generieke pretreatment onder selectieve condities niet gehaald. Biopulping blijft vooralsnog een techniek die een enorme kapitaalsinvestering vergt met een nog relatief geringe meerwaarde voor de praktijk.

De meest voor de hand liggende vervolgstap is om in combinatie met papierproductie te onderzoeken of ook 1-2 weken koloniseren onder schone omstandigheden volstaat om de biomassa selectief te maken. Dit wordt bevestigd door de business case. Een andere vervolgstap kan het enzymatisch voorbehandelen van biomassa zijn. Verder kan het vloeibaar kweekconcept en de enzymatische activiteit van de witrotschimmels mogelijk breder ingezet worden in verschillende toepassingen ten behoeve van verduurzaming van de maatschappij.

Al met al is de TKI Biopulping een succesvol project geweest. Ondanks dat er momenteel slechts beperkt zicht is op een eerste praktijktoepassing, is er in dit project veel nuttige kennis ontwikkeld en gedeeld. Helaas leidt dit nog niet direct tot een toepassing richting praktijk. De bottleneck voor opschaling blijft dat de biomassa gehygiëniseerd moet worden. De projectrapportages zijn daarom openbaar beschikbaar gesteld zodat een ieder op de behaalde resultaten kan voortbouwen. Ook is het de intentie van Bioclear earth en de WUR om deze kennis medio 2022 verder te verspreiden middels publicatie in een peer-reviewed journal.

Bioclear earth wil alle deelnemende partijen en financiers hartelijk bedanken voor de geleverde bijdragen.

Het project 'Biopulping' is in de periode 2017-2021 binnen de regeling TKI BBEG in consortiumverband uitgevoerd door Bioclear earth, WUR PRI, CNC Grondstoffen BV, KCPK, Staatsbosbeheer, Attero BV, BVOR, STOWA, Rijkswaterstaat, Waterschap Aa en Maas, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier en Wetterskip Fryslân.

Het project is uitgevoerd met subsidie van het Ministerie van Economische Zaken en Klimaat-Klimaat en Energie, subsidieregeling Top Sector Energie uitgevoerd door Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (TEBE117013). Aanvullende financiering is aan het project bijgedragen door STOWA (432.714), Rijkswaterstaat, Attero BV, Waterschap Aa en Maas, Wetterskip Fryslân en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier.



## 3 Achtergrond

### 3.1 Biopulping

Lignocellulose is de meest voorkomende hernieuwbare grondstof op aarde die gebruikt kan worden voor toepassingen in energie, chemie, materiaal, feed & food. Hoewel lignocellulose reststromen een belangrijke rol kunnen spelen in het verduurzamen van onze samenleving, maakt de recalcitrantie van de matrix, met name door de aanwezige lignine, het lastig om de grondstof optimaal te kunnen benutten in bioraffinage processen voor de productie van energie en/of grondstoffen. Op dit moment worden voor de ontsluiting van deze gewassen in gecentraliseerde fabrieken stevige chemische-processen ingezet die tevens een forse input van energie vergen.

In de natuur wordt de lignocellulose matrix onder milde procescondities gekraakt door witrotschimmels. Selectieve witrotschimmels zijn zelfs in staat om het recalcitrante lignine enzymatisch af te breken zonder hierbij de cellulose te consumeren. Hierbij gebruiken de schimmels de aanwezige hemicellulose als bron van energie voor hun groei en productie van enzymen. Verder speelt waarschijnlijk het mycelium zelf een rol in het mechanisch ontsluiten van de lignocellulose matrix.

De 'biopulping' techniek maakt van dit natuurlijke principe gebruik. Resultaat na een voorbehandeling van 2<sup>e</sup> generatie biomassa met biopulping is een grotendeels ontsloten cellulose vezel die beschikbaar is voor een scala aan biobased toepassingen: energie, chemie, vezel & feed. Vanwege de milde procescondities kan de techniek mogelijk ook gedecentraliseerd toepassing vinden. Op papier heeft biopulping de potentie om uit te groeien tot een generieke biobased pretreatment techniek (een zogenaamde 'platformtechnologie').

Het idee van biopulping is niet nieuw. De techniek wordt, behoudens enkele opschalings-onderzoeken voor papierproductie uit hout echter nog niet grootschalig in de praktijk toegepast. Er vindt wel in het wetenschappelijke domein veel onderzoek plaats naar de biopulping techniek. Bekende bottlenecks die overwonnen dienen te worden zijn verlies van organische stof door een lage selectiviteit van de schimmels en de lange procestijden plus benodigde steriliteit in de pretreatment. In dit project hopen we antwoord te vinden op deze uitdagingen. De hieruit voorkomende vraagstelling voor dit project was dan ook of we de beoogde meerwaarde van de techniek kunnen kwantificeren en of we een geoptimaliseerd, robuust en kosteneffectief proces kunnen ontwikkelen om de techniek een stap verder te brengen richting praktijk.

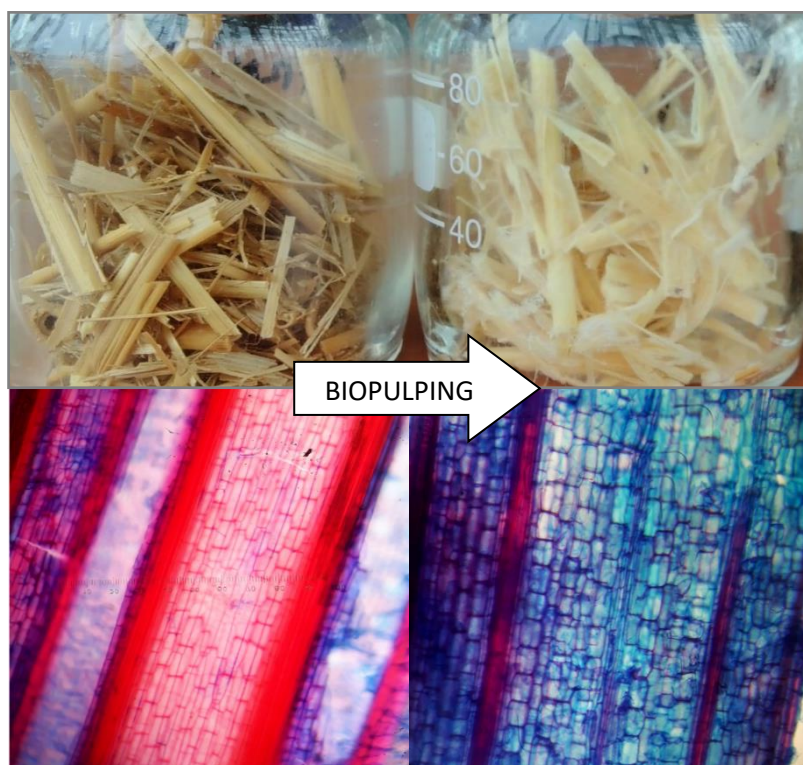


**Figuur 1: man-made chemische pulping (links) vs. nature-made biopulping (rechts). Met als kenmerken respectievelijk: grote schaal, hoge temperatuur, korte behandeltime input van energie & chemicaliën, vs. kleine schaal, lage temperatuur, langere behandeltime, input / afbraak van lignine en hemicellulose.**

## 3.2 Vooronderzoek

In de aanloop naar dit TKI project is er op labschaalproof-of-principle van de techniek gegeven door zowel de WUR-PR als Bioclear earth (TRL 1). Uit het onderzoek van de WUR-PR is de best presterende schimmel naar voren gekomen, te weten de basidyomyceet *Ceriporiopsis Subvermispora*. Op basis hiervan heeft Bioclear earth een bij de praktijk passend technologie concept geformuleerd (TRL 2) en een tweetal kansrijke waardeketens geselecteerd te weten bioenergie en papiervezel. Via vergistingstesten is door Bioclear earth proof-of-principle gegeven van het positieve effect (meeropbrengst & versnelling) van voorbehandeling op biovergisting van de biomassa.

Het wordt voorzien dat de energiecomponent het startpunt is van de introductie en verdere ontwikkeling van de biopulping technologie richting hoogwaardigere biobased toepassingen. De ketens hiervoor dienen namelijk nog ontwikkeld te worden. Op termijn kan na voorbehandeling de ontsloten biomassa verder enzymatisch gehydrolyseerd worden tot suiker of vetzuren en gebruikt worden als co-substraat in vergisting of als grondstof voor groene chemicaliën. Naast genoemde toepassingen doet de WUR in andere projecten onderzoek naar de 'feed'toepassing.



**Figuur 2: biologisch tarwestro voor en na behandeling met *C. Subvermispora* als proof-of-principle voor biopulping. Met het biopulping proces worden lignine (en hemicellulose) selectief verwijderd uit de lignocellulose matrix van 2e generatie reststromen. Eindresultaat is een ontsloten en gebleekte cellulose vezel die beschikbaar is voor een scala aan biobased toepassingen: energie, chemie, vezel & feed. Via kleuring is onder de microscoop de lignine (roze) en de beschikbare cellulose (blauw) vervolgens zichtbaar gemaakt.**

### 3.3 Witrotschimmels

Witrotschimmels zijn in staat om na kolonisatie van de biomassa onder zuurstofrijke, aerobe, condities lignine te kraken. Dit doen zij via de productie van een scala aan oxidatieve enzymen. Deze enzymen kunnen met hulpstoffen (mineralen, vetzuren) vrije radicalen produceren die op hun beurt kunnen penetreren in de lignine matrix om deze af te breken. Verder kunnen de hyphen van schimmels de biomassa op een mechanische manier helpen ontsluiten. Door de afbraak van lignine kleurt lignocellulose wit, de kleur van cellulose.

Een belangrijk onderscheid is dat tussen primaire afbrekers (zoals bijvoorbeeld oesterzwam die direct op stro groeit) en secundaire afbrekers (zoals bijvoorbeeld champignon die voor zijn groei al een voorontsloten compost nodig heeft). Om verliezen te minimaliseren worden de primaire afbrekers gebruikt voor de biopulping techniek.

De witrotschimmels kunnen verder in twee klassen worden onderverdeeld: de selectieve witrotschimmels en de niet selectieve witrotschimmels. De selectieve witrotschimmels breken in eerste instantie de hemicellulose-lignine matrix af tijdens de vegetatieve groei (kolonisatie van de biomassa). Door deze aanpak ('pretreatment') is de cellulose ontsloten en beschikbaar voor de schimmel om snel paddenstoelen te kunnen maken. Vervolgens consumeren de selectieve witrotschimmels de vrijgemaakte cellulose in tweede instantie tijdens de generatieve groei (vorming van vruchtlichamen). De groep van niet selectieve witrotschimmels breken tijdens de kolonisatie van de biomassa al de gehele matrix af.

Om cellulose maximaal te behouden worden de selectieve witrotschimmels gebruikt voor de biopulping techniek. Verder wordt de vorming van paddenstoelen vermeden. Verder is het voor de toepassing van biopulping belangrijk dat de gebruikte schimmel saprotroof is, enkel groeiend op dood materiaal, en niet pathogeen is voor zowel mensen (proces veiligheid) als planten (toepassing van digestaat!).

In dit project wordt er gebruik gemaakt van *Ceriporiopsis Subvermispora*, geselecteerd als best presterende stam uit het vooronderzoek. Een voordeel van deze soort is dat hij geen vruchtlichamen vormt.

Een goed startpunt voor verzamelde kennis op het gebied van witrotschimmels is het boek 'Wood and tree fungi – Biology, protection and use' (Schmidt O. 2006) waarin in wordt gegaan op type schimmels, fysiologie, groei en reproductie alsmede de moleculaire mechanismes in de afbraak van lignocellulose materialen.

## 4 Projectopzet

### 4.1 Doelstelling

Dit project heeft als doelstelling om voor de biopulping techniek een stap te zetten van het wetenschappelijke domein naar het toegepaste domein. Via onderzoek, ontwikkeling en opschaling wordt de blauwdruk voor een on-site biopulping proces ontworpen voor de pretreatment van verschillende lignocellulose biomassastromen.

De belangrijkste uitdagingen om tot een bij de praktijk passend concept te komen zijn:

- ten eerste het verkrijgen van inzicht in de relevante waardeketens (type lignocellulose biomassa vs. biobased toepassing, de meerwaarde van biopulping);
- ten tweede het ontwikkelen van het biopulping proces zelf (optimale schimmel, optimale / selectieve groeicondities, benodigde voorbehandelingstijd, opschaling);
- ten derde om een juiste balans te vinden tussen eenvoud en controleerbaarheid (economisch haalbaar proces).

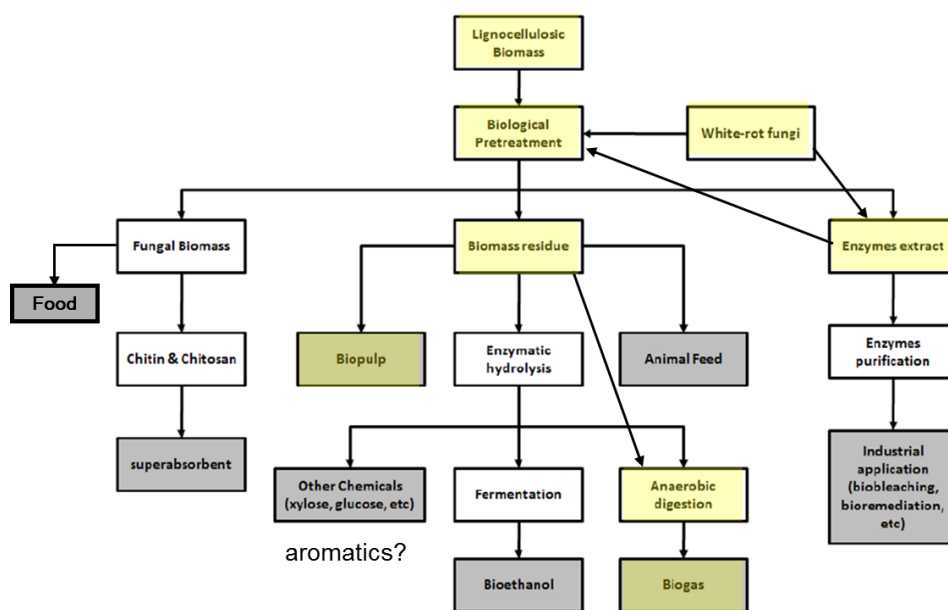
De opgedane kennis zal verspreid worden en bij een positief project resultaat (m.a.w. een technisch-economisch haalbaar proces) worden gebruikt om via een demonstratie op praktijkschaal in een vervolgproject tot de beoogde marktintroductie te komen.

### 4.2 Toepassingen

Door in dit project biomassa zoals gras, hout, riet en stro met deze selectieve witrotschimmel voor te handelen en de biomassa enkel te laten koloniseren en begroeien, wordt de cellulose maximaal behouden en beschikbaar gemaakt voor diverse eindtoepassingen. Enerzijds kan de cellulose verder afgebroken en omgezet worden in bijvoorbeeld bio-energie, groene chemicaliën of feed toepassingen. Anderzijds kan cellulose worden aangeboden als ontsloten, gebleekte vezel voor toepassing in bijvoorbeeld grafische papieren of textiel.

Het onderstaande overzicht uit de literatuur, aangevuld met inzichten uit dit project, geeft de mogelijke routes weer hoe lignocellulose biomassa met behulp van witrotschimmels tot waarde kan zijn. De in het plaatje geel gearceerde blokken zijn daadwerkelijk in dit project onderzocht. In het overzicht is ook te zien dat naast het biologisch voorbehandelen van biomassa met de schimmel zelf, ook een enzym extract gebruikt zou kunnen worden.

Een belangrijke parameter is het verschil in kenmerken en eigenschappen van de verschillende soorten biomassa. Relevante lignocellulosebiomassa kan ruwweg in vier verschillende type stromen worden onderverdeeld. De grasachtigen, houtachtigen, rietachtigen en hennepachtigen. Elk type stroom heeft zijn kenmerkende eigenschappen wat het materiaal meer of minder geschikt kan maken voor biopulping.



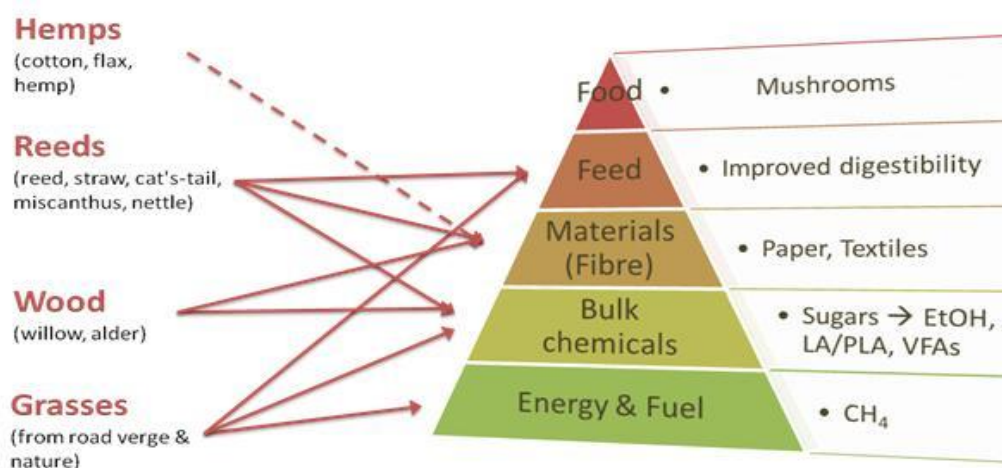
Adapted from Millati R, et al. 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. BioResources 6:5224–5259.

**Figuur 3: routes voor de inzet van witrotschimmels in de pretreatment van lignocellulose biomassa.**

Hennepachtige materialen zijn afkomstig uit primaire productie en zijn geteeld voor hun zeer lange en hoogwaardige vezels. Houtachtige materialen bevatten een zeer hoog lignine gehalte, als vezel wordt hout ingezet in papier en karton. Hout komt zowel uit primaire productie als reststroom beschikbaar. Rietachtige materialen zijn veelal droge reststromen zoals stro en riet, maar kunnen ook specifiek gekweekt zijn zoals Miscanthus of lisdodde. Grassen zijn typisch meer heterogene en nattere reststromen met relatief meer inhoudsstoffen, relatief minder vezel en structuur en een relatief laag lignine gehalte in vergelijking met de andere soorten biomassa. Een onderdeel van dit project is om te onderzoeken voor welk type stromen biopulping geschikt is.

Onderstaand figuur toont de verschillende soorten lignocellulose biomassa stromen in relatie tot de verschillende typen eindtoepassingen in de biobased waardepiramide. Er is te zien dat er veel verschillende combinaties te maken zijn. In dit project is gekozen om te focussen op het ontwikkelen van twee specifieke waardeketens.

1. Gras- en rietachtigen richting bio-energie. Dit is een al bestaande waardeketen waar de inzetbaarheid van lignocellulose reststromen zoals gras (in Nederland) en stro (internationaal) gelimiteerd is vanwege de beperkte afbreekbaarheid, beperkte afbraaksnelheid en viscositeitsopbouw in vergistingsprocessen. Indien succesvol kan biopulping bij groen gas productie voor een grote duurzame impact zorgen.
2. Rietachtigen richting grafische papieren. Er is vanuit de projectpartners veel interesse in vezelgrondstoffen, echter in Nederland ontbreken klassieke pulpings mogelijkheden. Door de lignocellulose vezel via biopulping op te waarden tot hoogwaardige vezel kan deze ingezet worden ten behoeve van circulaire, lokaal geproduceerde papieren.



Figuur 4: indeling van lignocellulose biomassa vs. biobased toepassingen.

## 4.3 Werkpakketten

Het biopulping project is onderverdeeld in verschillende werkpakketten (WP's). Onderstaande tabel geeft een overzicht van al deze werkpakketten en de beoogde resultaten. De opbouw van dit rapport de volgorde van de onderstaande tabel aan ten behoeve van een logische opbouw van de verhaallijn. In vergelijking met het projectplan is de inhoud van Werkpakket 4 'groen gas uit gras' uitgebreid. In het werkpakket is focus gelegd op toepassingsonderzoek voor biopulping en is opgesplitst in 'toepassing papier' (WP4a) en 'toepassing groen gas' (WP4b). De groen gas toepassing zelf heeft zich verbreed van enkel gras naar gras en stro door meerdere biomassa stromen voorbehandeld in WP3 te testen.

Naast dit rapport heeft de WUR een technische rapportage opgesteld met daarin door hun de uitgevoerde werkzaamheden en resultaten in WP1, WP3 en WP5 (zie <https://doi.org/10.18174/561758>).

Tabel 1: overzicht van de werkpakketten en beoogde resultaten.

WP	Naam	Beoogde resultaten
0	<i>Inventarisatie</i>	Inventariseren wensen en doelen, opstellen samenwerkingsovereenkomst.
6	<i>Procesontwikkeling</i>	Blauwdruk van pretreatment o.b.v. economische haalbaarheid.
1	<i>Schimmel optimalisatie</i>	Inzicht in de optimale stam <i>C.Subvermispora</i> uit 30 kandidaten.
3	<i>Biomassa matrix</i>	Definiëren toepassingsgebieden biopulping & inzicht in pretreatment effect.
4a	<i>Toepassing Papier</i>	Biopulpings toepassingstesten voor grafische papieren.
4b	<i>Toepassing Groen Gas</i>	Biopulpings toepassingstesten voor groen gas uit gras en stro.
2	<i>Optimalisatie groeicondities</i>	Inzicht in optimale en selectieve groeicondities, inoculatie & kolonisatie.
5	<i>Opschaling</i>	Opschaling tot ~1000kg schaal in onderzoeks- & praktijkomgeving.
7	<i>Communicatie</i>	Meetings, rapportages, kennisoverdracht.

## 5 Resultaten

### 5.1 WP 0 – Inventarisatie

Er is bij de start van het project begonnen met het in kaart brengen van de wensen en verwachtingen van alle deelnemers. De beoogde toepassingen zijn aan de hand van de opgestelde 'biomassa matrix' verder uitgewerkt en besproken met het consortium. Ook is er in deze fase een samenwerkingsovereenkomst tussen alle samenwerkende partijen opgesteld. Tenslotte is in dit werkpakket alle voor dit project benodigde apparatuur aangeschaft waardoor het hele werkpakket succesvol afgerond werd.

#### *Biomassa matrix*

De onderstaande biomassa matrix is opgesteld om inzicht te krijgen in de meest kansrijke product-markt combinaties. De matrix zet de type biomassastromen uit tegen de mogelijke biobased toepassingen. Op deze manier ontstaat een handige overzichtstabel om discussies over de te onderzoeken routes te faciliteren.

Biomassa vs. Toepassing	Bioenergie	Groene chemicaliën	Vezel	Feed
<b>Grasachtigen (natuur, berm) NAT</b>	Startpunt in bestaande bio-energie keten	Op termijn met gekoppeld proces.	Techniek niet nodig voor karton. Gras niet geschikt voor papier	Mits van onbesproken herkomst (natuur)
<b>Rietachtigen DROOG</b>	<b>Stro</b> , verbranden Te hoogwaardig	Op termijn	Grafisch papier	2 <sup>e</sup> generatie feed
<b>Houtachtigen DROOG</b>	Te hoogwaardig / verbranden	Op termijn	Bestaande industrie, niet aanwezig in NL	Te recalcitrant?
<b>Hennepachtigen</b>	Te hoogwaardig	Te hoogwaardig	Katoenvervanger	Te hoogwaardig

**Figuur 5: biomassa matrix met selectie van de meest kansrijke toepassingen.**

Er was veel consensus onder de deelnemende partijen over de niet kansrijke routes:

- Allereerst werd vastgesteld dat hennepachtigen (hennep, vlas) geteeld worden voor hun zeer lange en heel hoogwaardige vezels die momenteel al via mechanische fractioneringprocessen verwerkt worden. Biopulping zou niet veel aan deze bestaande waardeketens toevoegen. Hooguit zou biopulping toegepast kunnen worden op de ligninerijke bastfractie (vlasleem of hennephoutjes).
- Ten tweede werd hout niet als kansrijk gezien. Er werd vastgesteld dat er in de maatschappij veel vraag is naar houtachtige materialen, maar dat hout als grondstof schaars is. Alle houtachtige product- en reststromen vinden daarom hun weg wel in de samenleving. Verder kan genoemd worden dat er in Nederland geen houtverwerkende industrie bestaat die cellulose vezels produceert en waar biopulping mogelijk op aan kan sluiten als booster voor klassieke pulping procedés.
- Tenslotte werd vastgesteld dat de productie van groene chemicaliën uit tweede generatie niet direct een realistisch startpunt is vanwege de na pretreatment extra benodigde enzymatische hydrolyse- en conversie stappen, de grote benodigde schaal en de nog ontbrekende waardeketens. Biopulping zou indien succesvol wel verder richting chemie doorontwikkeld kunnen worden. De projectdeelnemers noemen wel dat een vezelmateriaal het beste als vezel zelf ingezet kan worden.

Na het wegstrepen van deze minder kansrijke routes werd voor de overblijvende routes de biopulping pretreatment beoordeeld voor zowel gras- als rietachtigen.

Er zijn een groot aantal verschillende type grasachtige reststromen zoals ingekuild bermgras, ingekuild natuurgras, gehooïd natuurgras en heterogene maaisels uit ecologische verbindingzones met elk hun eigen kenmerken qua samenstelling, homogeniteit en hygiënische status.

- Biovergisting is voor grasachtigen een opkomende techniek. Bermgrassen kunnen worden verwerkt in GFT vergisters en tegelijkertijd de winterdip aan beschikbare groenstomen opvangen, natuurgrassen kunnen als relatief goedkoop co-product worden toegevoegd aan agrarische vergisters en ook is monovergisting van bermgras in ontwikkeling. De geringe opbrengst en trage afbreekbaarheid zijn limiterend voor de vergisting en de vezel zorgt voor mechanische problemen (drijfslagen, viscositeitsopbouw). Hier zijn grassen slechts beperkt toevoegbaar aan vergisters. Biopulping zou daarom mogelijk een goede rol kunnen spelen in verbeterde omzetbaarheid en versnelde afbraak.
- De vezel uit gras wordt over het algemeen als niet sterk genoeg beschouwd voor grafische papieren. Wel wordt gras al in karton verwerkt, hier is echter geen pretreatment stap zoals biopulping voor nodig.
- Gehooïd natuurgras kan ook al direct zonder biopulping pretreatment als diervoeder worden ingezet. Ook zet Staatsbosbeheer maaisels direct lokaal in als bodemverbeteraar.

Er zijn een groot aantal verschillende soorten biomassa die onder de rietachtigen ingedeeld worden zoals riet, stro, Miscanthus, lisdodde en brandnetel. In Nederland is er de laatste jaren veel aandacht voor het inzetten van lisdodde in natte teelten ter voorkoming van veenoxidatie ('paludiculturen') en worden er nuttige toepassingen voor dit nieuwe gewas gezocht. Miscanthus wordt ook gebruikt als nieuwe teelt om bijvoorbeeld ganzen te weren rondom Schiphol, maar heeft ook op zichzelf als nieuw landbouwgewas voor biobased toepassingen nuttige kenmerken zoals een hoge opbrengst, weinig behoeften en een sterke vezel. Voor deze vezelmaterialen is de papiertoepassing met name interessant en in dit project zal worden onderzocht of biopulping een geschikte pretreatment is.

Biovergisting lijkt voor rietachtigen op het eerste gezicht niet direct voor de hand te liggen. De rietachtigen uit primaire productie zoals Miscanthus inzetten voor groene energieproductie is niet direct duurzaam. Voor droge vezelrijke materialen die als reststroom beschikbaar komen liggen thermische technieken meer voor de hand wanneer toch ingezet wordt op bioenergie. Uitzondering hierop is stro, een reststroom die internationaal heel veel vrijkomt en waar biovergisting wel opkomend is om energie te winnen en mineralen te recyclen. Door te vergisten wordt de C/N verhouding geschikter gemaakt voor terugvoer naar de bodem en worden mineralen circulair ingezet. In veel landen is er relatief veel stro en weinig mest. In China is er bijvoorbeeld sinds kort een verbod op het verbranden van rijststro ingesteld. In Oost-Europa, Denemarken en Frankrijk zijn enorme hoeveelheden tarwestro beschikbaar. Biopulping is voor stro dus internationaal een kansrijke techniek die als exportproduct in de markt gezet kan worden. In Nederland zelf is er echter relatief veel mest en weinig stro waardoor stro kostbaar is en biopulping hier lokaal niet voor de hand ligt.



De feed route lijkt voor Nederland niet interessant aangezien hier al veel hoogwaardige voedermaterialen beschikbaar zijn. Ook is er een andere schimmel nodig zoals bijvoorbeeld oesterzwam of shiitake die in tegenstelling tot de in dit project gebruikte *C.Subvermispora* al de benodigde GRAS status hebben. Internationaal is de feed route relevant voor landen met veel stro en weinig eiwitrijke gewassen. Biopulping zou tweede generatie reststromen kunnen opwaarderen tot een voor herkauwers verteerbaar product.

### **Wensen van de projectpartners**

Er is in aanloop naar de eerste consortium bijeenkomst aan alle projectpartners gevraagd waar de interesse ligt en waar de kansen gezien worden. Hieruit kwam het volgende naar voren.

**Bioclear earth** is, als expert in het ontwikkelen en toepassen van biologische processen ten behoeve van verduurzaming, gemotiveerd om de biopulping techniek een stap verder richting de praktijk te brengen. Bij voorkeur als generieke pretreatment techniek. Bioclear wil graag inzicht krijgen in de toepasbaarheid (biomassa-product-waardeketen) en wat de bijbehorende randvoorwaarden en benodigd proces ontwerp zijn voor verdere opschaling. De visie van Bioclear earth is om een selectief proces te ontwikkelen om de kosten beheersbaar te kunnen houden. De pretreatment van grasachtigen en stro lijkt de grootste kans. Verder is Bioclear geïnteresseerd in mogelijkheden om schimmels breder in te zetten t.b.v. verduurzaming.

De **WUR** heeft als expert op het gebied van witrotschimmels en biopulping als doel om kennis over voorbehandeling met witrotschimmels en ontsluiting van cellulose en hemicellulose op te doen en te verspreiden via wetenschappelijke publicaties. Er is interesse om de 30 verzamelde stammen te onderzoeken. Tarwestro is voor de WUR de ideale referentie om de resultaten met eerder onderzoek te kunnen vergelijken. Qua toepassingen ziet de WUR bioenergie uit natte stromen, vezeltoepassingen van droge stromen en feed als meest kansrijk.

**CNC** draagt als grootste producent van compost voor de champignonteelt aan het project bij met haar kennis en infrastructuur op het gebied van opschaling van de pretreatment stap.

**Staatsbosbeheer** heeft als doelstelling om natuur te creëren en daarom wordt gezocht naar meerdere nieuwe toepassingsmogelijkheden om de vele biomassa reststromen zoals gras, riet, heide uit natuur beter te kunnen verwaarden. Innovaties zoals biopulping stimuleren is hierin een belangrijke activiteit. Staatsbosbeheer wil zo hoog mogelijk verwaarden en heeft al veel kennis opgedaan rondom eierdozen, veevoer en vergisting en noemt als belangrijk aandachtspunt dat elke bewerking geld kost. Hout vindt zijn weg al en kan op specificatie geleverd worden, ook wordt er in andere projecten gekeken naar toepassen van hout in de chemie. Verder aandachtspunt is de discussie rondom grondstof vs. afval.

**Attero** heeft als doel om haar inputmaterialen beter te ontsluiten om zo biogasproductie te kunnen verhogen. Bermgras is bij uitstek geschikt om de winterdip op te vullen. Biogas en compost zijn de huidige producten, ook wordt er gekeken naar hoogwaardigere producten zoals PLA en biocomposieten. Via biopulping kan er mogelijk uit bermgras een betere vezel gemaakt worden, hiervoor is de hele keten nodig. Attero heeft veel kennis rondom bermgras en inkuilingsprocessen en noemt een schaalgrootte van 50kton / jaar binnen een straal van 30km.

**STOWA** is als ondernemende overheid koploper in het aanjagen en implementeren van de Circulaire Economie. STOWA is op zoek naar circulaire innovaties; biopulping past goed in het cellulose thema binnen de Energie en Grondstoffen Fabriek (EFGF) waarin biomassa één van de top 5 grondstoffen is. Ook hebben waterschappen als doelstelling om netto energie te produceren. STOWA kan zowel eindgebruiker als biomassa leverancier (maaisels, cellulose, slib) zijn en is met name geïnteresseerd in cascadering en het creëren van een zo hoog mogelijke waarde op het gebied van energie, vetzuren en bioplastics.

**Rijkswaterstaat** heeft als doel om vezel in de brede zin beter beschikbaar te maken en wil graag inzicht in hoe vezels het beste toe te passen. RWS heeft de rol van biomassa leverancier en rentmeester van natuurlijk kapitaal en beschikt over bermgras en hout, maar ook over natuurgras en riet. RWS kan zelf launching customer zijn, de business case en ketenvorming is hierin leidend. Beoogde toepassingen zijn biomethaan voor eigen gebruik, vezels en in de toekomst groene chemie.

**Waterschap Aa en Maas** is op zoek naar inzicht in het perspectief van biopulping vanuit de stromen die waterschappen genereren. Er wordt geredeneerd vanuit de zuiveringsopgave, klimaatopgaven en circulaire toepassingen. De afzet van de vrijkomende biomassa grondstoffen (grassen en in de toekomst lisdodde, miscanthus, wilgenhout) is belangrijk: het is lastig om grote volumina bij elkaar te krijgen. Eenvoudige behandeling en conserveringstechnieken kunnen hierin mogelijk helpen. De zuiveringen gaan meer en meer functioneren als grondstoffen- en energiefabrieken waarbij zoveel mogelijk waardevolle stoffen (alginaat, bioplastics, fosfaat en cellulose, biogas en in de toekomst mogelijk waterstof of mierenzuur) worden teruggewonnen. Voorbehandelde vezels dienen zo hoog mogelijk op de waarde piramide te worden ingezet. De feed toepassing is interessant gezien de hoge veedichtheid in het Aa en Maas gebied.

Het **Wetterskip** wil lokaal kansen benutten en faciliteren in het aanjagen van de EFGF en bioraffinage. Laten zien dat het kan! De keten en toepassingen komen daarna vanzelf. Er is focus op cellulose en bioplastic, ook zijn lisdoddes een veelbelovende nieuwe teelt.

**Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier** wil een voorbeeldfunctie vervullen in het aanjagen van de biobased economy door de EFGF van de grond te krijgen en biomassa stromen te verwaarden. Er is overlap met cellulose vezels uit RWZI's en mogelijk een mooie link met paludicultuurprojecten waarin lisdoddes gekweekt gaan worden. Gras en riet zijn relevante biomassa stromen en er is interesse in producten die in de eigen organisatie zelf ingezet kunnen worden zodat de waterschappen een eigen markt kunnen creëren.

De **BVOR** is een brancheorganisatie waarin de aangesloten leden organische reststromen be- en verwerken tot verschillende producten. Hierin vormen leden een landelijk dekkend netwerk van vergunde inrichtingen met technische voorzieningen en bezitten ze over een jarenlange ervaring met heterogene organische reststromen. Deze infrastructuur biedt een aantrekkelijke schaalgrootte om innovaties op aan te laten sluiten. Organische bodemverbeters en biobrandstoffen zijn momenteel hierin de belangrijkste producten. Er is ook veel interesse in biobased innovaties waarmee de allerhande groene reststromen uit de openbare ruimte nog beter verwaard kunnen worden. De BVOR probeert die innovaties op verschillende manieren te faciliteren. Eén daarvan is door deelname aan projecten zoals in TKI biopulping.

Het **KCPK** heeft als doel om te werken aan betaalbare, ontsloten vezels van lokale bodem. Hierbij wordt gekeken naar onbenutte natuurlijke gewassen zoals bijvoorbeeld natuurgras, riet en lisdodde en ook naar speciaal geteelde gewassen zoals Miscanthus en hennep. De materiaaltoepassing van de vezel (indien tussen 0.8 en 2.5 mm) in grafische papieren is interessant, de KCPK kan op dit gebied kennis, netwerk en expertise bijdragen aan het project.

## 5.2 WP 6 – Procesontwikkeling

Doel van dit werkpakket is om een techno-economisch haalbaar procesconcept te ontwikkelen dat past bij de beoogde waardeketens. In het project is er daarom gestart met een economische analyse. De uitkomsten van deze analyse geven duidelijke randvoorwaarden waaraan een technisch ontwerp moet voldoen wil het ook financieel haalbaar kunnen zijn. Op basis hiervan is een blauwdruk ontwikkeld voor een pretreatment proces dat in de praktijk kansrijk kan zijn. Via deze aanpak konden de ontwikkelwerkzaamheden in het project beter vormgegeven worden en de technische resultaten getoetst worden aan het opgestelde concept en de succes criteria.

### *Groen gas*

In dit werkpakket is er een concept ontwikkeld om biopulping op grote schaal uit te voeren in combinatie met groen gas productie. Er is ontworpen voor 20kton biomassa per jaar, realistisch voor een grote vergistingslocatie. Als uitgangsmaterialen zijn bermgras en stro genomen. Bermgras is relevant voor Nederland, stro is een substraat voor biovergisting dat wereldwijd sterk in opkomst is. Biovergisting heeft als voordeel dat stro beter geschikt wordt gemaakt voor toepassing in de bodem. Als stro direct op de bodem wordt toegepast, vindt er in de bodem compostering plaats onder onttrekking van stikstof uit de bodem die dan niet meer direct beschikbaar is voor gewasgroei. Door afbraak in vergisting ontstaat er een homogeen digestaat waarmee de mineralen teruggevoerd kunnen worden. Ook ontstaat op plekken waar weinig mest beschikbaar is via vergisting van stro een voor de bodem gunstigere C/N verhouding door de omzetting van koolstof tot biogas. Op plekken waar veel mest beschikbaar is, is het wellicht een logischere keus om via compostering een bodemverbeteraar te maken. Er is daarom een analyse uitgevoerd naar de beschikbaarheid en verhouding van stro en mest wereldwijd. Hieruit kwam naar voren dat er op de meeste plekken een relatieve overmaat aan stro is en vergisting een goed idee kan zijn. Nederland is hierop met zijn hoge veedichtheid de uitzondering.

### *Meerwaarde biopulping bermgras*

Voor bermgras ligt de biogasproductie op 100 tot 140Nm<sup>3</sup> per ton ingekuild gras. Een meerproductie van naar schatting 20-30% geeft een toegevoegde waarde van 10-18 euro per ton nat ingaand materiaal (20-40Nm<sup>3</sup> biogas, 13-26Nm<sup>3</sup> groen gas) wat aangeeft dat het technologie concept wil het kans van slagen hebben in het scenario 'meeropbrengst' zeer simpel moet zijn. Aangezien biopulping vergisting ook kan versnellen en bermgras als afvalstroom tegen een poorttarief verwerkt wordt kan hier in een business case slim op ingezet worden. Met een typisch poorttarief van 15 euro per ton bermgras en een groen gas opbrengst van 45 euro per ton bermgras komen de totale inkomsten per ton bermgras op 60 euro. Stel dat er bij gelijkblijvende biogasopbrengst van 100Nm<sup>3</sup> per ton bermgras 2-3x meer bermgras in een bestaande vergister verwerkt kan worden, dan geeft dit in het nieuwe scenario inkomsten van 120-180 euro. Dit is 60-120 euro meer voor respectievelijk 2 en 3 ton verwerkt bermgras. Deze versnelling mag dan maximaal dus 30-40 euro per ton bermgras kosten. Het scenario 'versnelling' geeft hier dus het meest financiële ruimte voor biopulping.

### **Meerwaarde biopulping tarwestro**

De product waarde van een ton droog stro in groen gas productie is aan de hand van meerdere bronnen gemiddeld ingeschat op 180-260 euro (850kg organische stof / ton stro, 60% afbraak in biovergisting geeft 408Nm<sup>3</sup> biogas, ofwel 233Nm<sup>3</sup> biomethaan, ofwel 261Nm<sup>3</sup> groen gas met een waarde van 0,7-1,0 euro per Nm<sup>3</sup> groen gas). Hiervoor moet het materiaal worden aangekocht, getransporteerd, vergist en het gas opgewerkt. De organische stof bestaat voor circa 15% uit lignine dat niet anaeroob afbreekbaar is. De maximale organische stof afbraak in vergisting kan dus 85% zijn. De maximale te halen meeropbrengst is dan +25% afbraak op 60% afbraak, oftewel +42% opbrengst aan biogas. Aangezien er altijd procesverliezen zijn is er gerekend met een gerealiseerde meeropbrengst van naar schatting 20-30% door biopulping. Hiermee voegt het biopulping proces een directe waarde toe van 36-78 euro per ton droog stro. Bijkomende voordelen is een versnelde afbraak en daardoor een lagere viscositeit en / of een kortere verblijftijd, waardoor vergisters hoger belast kunnen worden. Deze indirecte voordelen zijn in dit stadium lastig kwantificeerbaar en zijn goede pluspunten voor de techniek maar zullen niet in een investering meegenomen worden.

Om deze toegevoegde waarde te kunnen vergelijken met kentallen uit de paddenstoelen-industrie moet er gerekend worden aan de tonnen nat materiaal waarvoor de compostings-processen zijn ontworpen. De gewichtstoename bij het natmaken van stro is een factor 3-4x waardoor de toegevoegde waarde van biopulping circa 10-20 euro per ton nat materiaal is. Dit lijkt een lage toegevoegde waarde, echter bij de decentrale verwerking van een realistische praktijkhoeveelheid van 20kton droog stro op jaarbasis met een meerproductie van 20-30% aan groen gas wordt er een extra inkomen verwacht van 720k-1560k euro op jaarbasis waardoor investeringen in technologie zeker mogelijk zijn.

### **Paddenstoelen sector**

Biopulping is technisch te realiseren met bestaande technieken die in de paddenstoelen industrie op grote schaal gebruikt worden. In de paddensector is stro ook een veel toegepast substraat waardoor er met bestaande kentallen al een goede economische inschatting gemaakt kan worden. Aangezien de waarde van de beoogde biobased toepassingen in feed, materials en fuels lager is dan de waarde van paddenstoelen en de verwachte voorbehandelingstijd van 8-12 weken langer is dan de circa 4 weken verblijftijd die nodig is voor de productie van paddenstoelensubstraat is de eerste vraag of deze technieken passend zijn bij biopulping.

In paddenstoelen productie wordt onder schone condities gewerkt. Graanbroed wordt gebruikt om de compost aan te enten. Voor champignons wordt dit graanbroed verspreid door biomassa die in fase I en fase II compostering is geconditioneerd. Hierna koloniseert het mycelium in een fase III tunnel het substraat. Verkoopprijs van deze natte compost is circa 140 euro per ton. Hiervan zijn naar schatting circa 10 euro de kosten van het gebruikte graanbroed. De doorgroeide compost gaat daarna in bulktransport naar de champignonkwekers en levert voor hen, afhankelijk van of er handmatig of machinaal wordt geoogst, een waarde op van ruwweg 1,4-2,5x de aankoopkosten. Hoewel precieze data betrouwbaar en lastig te achterhalen zijn, geven deze indicatieve bedragen al aan dat de broedkosten al limiterend zullen zijn, maar dat met name de tunnelprocessen te kostbaar lijken om een rendabel proces te ontwerpen.

In de oesterzwamteelt zijn er minder voorbereidingen van het substraat en wordt het broed met het substraat afgevuld in zakken. Er moet echter meer broed worden gebruikt. De kosten van oesterzwambroed zijn niet exact bekend, maar liggen ergens tussen de 25 en 65 euro per ton nat substraat waarmee de broedkosten al een factor hoger uitkomen dan de toegevoegde waarde van biopulping in biovergisting. In dit project zijn voor *C. Subvermispora* hoeveelheden broed gebruikt die overeenkomen met de hoeveelheden in oesterzwamproductie. Het is via deze analyse duidelijk geworden dat in dit project voor zowel broedkosten als voor tunnelcompostering een alternatief gevonden moet worden.

### **Milieutechnologische processen**

De verblijftijden en bewerkingskosten van compostering passen wél beter bij de biopulping techniek. Er is onderscheid tussen buitencompostering van groenafval en binnencompostering van GFT-afval. Buitencompostering is laag-technologisch en kan men uitvoeren voor circa 10-15 euro per ton. Voor binnencompostering kan met 25-30 euro per ton gerekend worden. Deze bedragen liggen lager dan de kosten van tunnelcompostering uit de champignon industrie. In compostering zijn er veel verschillende procesconfiguraties mogelijk: van zeer extensieve buitencompostering op het veld, via een meer gecontroleerde windrow compostering op een betonplaat, tot beter beschermde compostering met actieve beluchting, een membraanvlies, een eenvoudig dak of in een simpele tunnel tot compostering in beter gecontroleerde boxen of zelfs productiehallen. Een goed overzicht is te vinden op de website van Compost Systems uit Oostenrijk (<https://www.compost-systems.com/en/solutions>). Ook is er de hele logistiek van onder andere laden, lossen en transport van biomassa. Voor inkuilen van bermgras zijn deze kosten (ontvangst, kuil opzetten, uitkuilen, transport naar de vergister) circa 10 euro per ton.

### **Ontwikkelvraag**

De uitgevoerde economische analyse laat zien dat 'proven technology' uit de paddenstoelenindustrie duidelijk een 'no-go' is voor de economische haalbaarheid. Typisch milieutechnologische processen voor vaste substraten passen vanuit kostenperspectief beter bij biopulping. Ondanks dat deze processen wel levensvatbaar lijken, zijn er belangrijke verschillen. Er is namelijk in milieutechnologische processen geen entmateriaal nodig en ook zijn zoals compostering, inkuiling en vergisting niet-selectieve processen op basis van mixed cultures. Het is daarom in dit project de ontwikkelvraag of biopulping technisch dermate robuust kan worden gemaakt voor praktijktoepassing.

### **Procesconcept en beoogde waardeketen**

Voor dit project is een innovatief concept gedefinieerd waarmee in een bioreactor vloeibaar inoculum geproduceerd wordt en de biopulping van biomassa onder selectieve omstandigheden plaatsvindt. Als in dit project aan deze randvoorwaarden voldaan kan worden, dan maakt de biopulping techniek ook economisch kans van slagen. Het ontwikkelde technologie concept bestaat uit drie stappen.

- 1) Als eerste stap vindt er productie van 'axenisch' schimmelbroed plaats onder gecontroleerde omstandigheden vanuit een goed geconserveerde moeder cultuur. Dit is bestaande techniek en hiervoor bestaan marktpartijen die broed kunnen leveren. Het broed wordt tot het gebruikt wordt onder lage temperatuur on-site opgeslagen.
- 2) Als tweede stap wordt er on-site uit dit axenische broed, onder selectieve condities een vloeibaar inoculum geproduceerd. Doel in dit project is om deze stap te ontwikkelen zodat tegen lage kosten een grote hoeveelheid entmateriaal geproduceerd kan worden.

- 3) Als derde stap wordt on-site ingekulde biomassa geïnoculeerd met dit entmateriaal en onder selectieve condities onder controle van temperatuur een aantal weken voorbehandeld. Resultaat is een selectief ontsloten lignocellulose vezel. Uitdaging in dit project is om een selectieve manier te ontwikkelen die robuust genoeg is.



**Figuur 6: de visie van Bioclear earth op de beoogde waardeketen voor biopulping. Off-site vindt de conservering van de benodigde schimmels en de productie van axenisch broed plaats. On-site wordt het broed verderd in inoculatie reactoren (seed-fermentor en productie-fermentor) waarna de biomassa wordt voorbehandeld op de plek waar deze vrijkomt en gebruikt wordt. Ook zou biomassa enzymatisch voorbehandeld kunnen worden met de in de bioreactor geproduceerde enzymen.**

### **Kosten vloeibaar broed**

Er is al aangetoond dat graanbroed te kostbaar is voor biopulping. Maar is vloeibaar broed dan goedkoper? Voor het graanbroed is onder de onderbouwde aanname dat het circa 1,5% schimmel bevat teruggerekend naar de kostprijs per kilogram schimmel. Deze ligt in de orde grootte 100-250 euro per kg afhankelijk van de schaal van productie. Vervolgens is vergeleken met de kostprijs voor de on-site productie van vloeibaar broed.

Typisch kost een vloeibare kweek afhankelijk van de schaal en eisen orde grootte 60-100 euro per m<sup>3</sup> kweek aan afschrijving van kapitaalslasten en operationele kosten. Met een realistische schimmelconcentratie van 5kg per m<sup>3</sup> in het medium zijn de productiekosten dan 12-20 euro per kg schimmel, waarvan 4-6 euro aan nutriëntkosten. Per kilogram geproduceerde schimmel is dit al een factor 10 goedkoper dan graanbroed.

Bij een enthoeveelheid van 0,025m% schimmel (een factor 100 groter dan de minimale hoeveelheid gerapporteerd in patentliteratuur) is er per ton droog stro 50 liter kweek nodig waarmee de broedkosten op 3-5 euro per ton stro komen, oftewel rond de 1 tot 2 euro per ton natgemaakt stro. Deze kostenstructuur past wel goed bij de biopulping toepassing.

Voor het procesontwerp is de hoeveelheid vloeibaar inoculum vastgesteld op 5% ten opzichte van het stro. Als er per jaar op een locatie 20kton droog stro verwerkt wordt en er elke week een hoeveelheid stro ingezet wordt, dan komt dit per week neer op 400 ton stro per week en 20m3 benodigde ent. De broedproductie bestaat uit twee stappen, een seed-fermentor en een productie-fermentor. Met een batch cycle tijd van een week per stap moet de productie fermentor 20m3 zijn, waardoor de seed fermentor slechts 0,3-3m3 hoeft te zijn. De kapitaalsinvestering voor een dergelijk systeem mag dan ruwweg in de orde grootte 300k tot 500k euro liggen waarmee de afschrijving gedurende 10 jaar per m3 geproduceerd broed ruwweg op 30-50 euro ligt. Nutriëntenkosten zijn berekend op 20-30 euro per m3 broed en is er nog ruimte voor 10-20 euro per m3 aan operationele kosten. Deze kostenopbouw lijkt realistisch.

Er is vervolgens contact opgenomen met verschillende leveranciers. Specialistische bedrijven actief in de hoogwaardige farma en fermentatieindustrie bleken enkele orde groottes te kostbaar. Reactorbouwers uit de milieutechnologie die benaderd zijn geven allemaal aan niet goed aan de hygiënische specificaties te kunnen voldoen. Een middenweg vormt een slim ontwerp geleverd door toeleveranciers van procesapparatuur aan de voedingsmiddelensector, zoals bijvoorbeeld in de melkverwerkende industrie.

### Kosten tunnelsystemen

Bij een tweetal gerenommeerde leveranciers aan de paddenstoelensector offertes opgevraagd voor fase II/III tunnelsystemen toegespitst op het biopulping proces. De indicatieve bedragen voor het neerzetten van 10-20 tunnels ontlepen elkaar niet veel. Er is op een vereenvoudigde manier verder gerekend uitgaande van 10 jaar afschrijving, 0% rentelasten, het voorbehandelen van 20kton droog, ofwel 60kton nat, stro per jaar, met een verblijftijd van 1-2-4-8-12 weken. Onderstaande figuur geeft de investeringskosten weer, waaruit geconcludeerd wordt dat alleen een pretreatment tijd van 1-2 weken in tunnels economisch kans van slagen kan hebben. De kosten voor pasteurisatie zijn hierin nog niet verwerkt.

Verblijftijd	<i>weken pretreatment</i>	1	2	4	8	12
Runs per jaar	<i>runs per jaar</i>	52	26	13	7	4
Capaciteit	<i>ton droog per run</i>	385	769	1538	3077	4615
Capaciteit	<i>ton nat per run</i>	1154	2308	4615	9231	13846
Capaciteit	<i>tunnels</i>	6	12	23	46	69
Afschrijving	<i>euro / jaar</i>	288.462	576.923	1.153.846	2.307.692	3.461.538
Kosten	<i>euro / ton stro droog</i>	14	29	58	115	173
Kosten	<i>euro / ton stro nat</i>	5	10	19	38	58

Figuur 7: kosten voor fase II/III tunnelsystemen.

### Kosten aanzuring stro

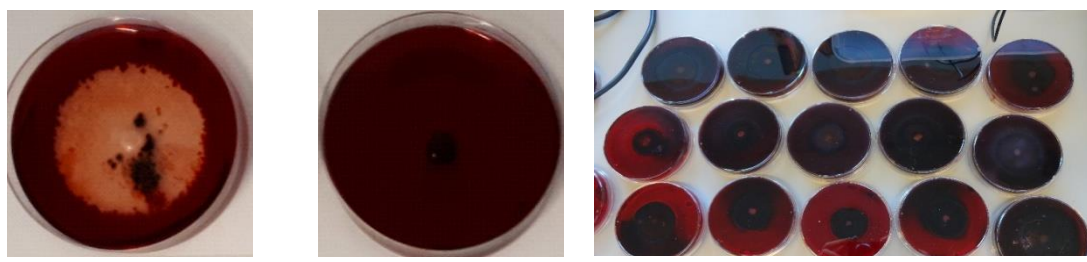
Tenslotte zijn er testen en berekeningen gedaan om de kostprijs voor het aanzuren van stro, met het oog op het verkrijgen van selectieve procescondities, te achterhalen. Voor het bereiken van een eind pH van 5 / 4 / 3 in het stro is er respectievelijk circa 1 / 2,5 / 4 euro aan zoutzuur nodig per ton nat stro. Voor citroenzuur liggend deze kosten circa een factor 3 hoger. Hieruit concluderen we dat alleen licht selectieve condities op pH 5 economisch haalbaar lijken.

## 5.3 WP 1 – Schimmel optimalisatie

In dit project wordt er gebruik gemaakt van *Ceriporiopsis Subvermispora*, geselecteerd als best presterende soort witrotschimmel uit zowel het vooronderzoek van de WUR als ook in publicaties van andere onderzoeksgroepen. In aanloop naar dit project heeft de WUR daarom wereldwijd alle beschikbare stammen van de *Ceriporiopsis Subvermispora* verzameld. Uit deze circa tien stammen, met name dikaryons, zijn vervolgens ook monokaryons gemaakt, waardoor er in totaal een dertigtal stammen beschikbaar zijn voor dit project. Doelstelling in WP1 was om uit deze 30 stammen de beste kandidaten te selecteren voor toepassing in biopulping en de overige werkpakketten. De ideale stam groeit snel, breekt lignine selectief af, groeit snel op lage pH, is tolerant tegen vetzuren en kan idealiter een grote hoeveelheid sporen vormen. De dikaryons staan erom bekend dat ze wat sneller groeien, de monokaryons produceren wat minder mycelium en wat meer enzymen. Over het algemeen vormt *C.Subvermispora* een erg 'dun' mycelium, wat aangeeft dat de soort geschikt kan zijn voor pretreatment.

De WUR heeft deze 30 stammen van *Ceriporiopsis Subvermispora* onderzocht op hun vermogen om twee lignocellulose houdende substraten selectief van lignine te ontdoen. In overleg met de projectdeelnemers zijn (ingekuild) bermgras en tarwestro voor deze test geselecteerd. In dit werkpakket is biologisch tarwestro gebruikt, omdat de WUR daar al ervaring mee had vanuit het vooronderzoek met de originele stam van *Ceriporiopsis Subvermispora*. In werkpakket 3 is niet biologisch, maar regulier tarwestro toegepast om ook eventuele effecten van aanwezige fungicides op de pretreatment uit te kunnen sluiten. De substraten zijn in dit werkpakket gedurende 2 en 5 weken geïncubeerd met de schimmelstammen waarna er via vezelanalyse en droge stof analyse een massabalans over de pretreatment opgesteld kon worden. De details en resultaten van deze testen zijn te lezen in de WUR rapportage. De testen op stro waren erg succesvol. Bermgras koloniseerde minder goed.

In aanvulling op de werkzaamheden van de WUR heeft Bioclear earth verscheidene assays en testen uitgevoerd om de selectiviteit en enzymproductie van de stammen te bevestigen en de meest geschikte stammen te kiezen. Ook groeisnelheid bepaald in radiale groei assays en groei in erlenmeyers op verschillende pH's.



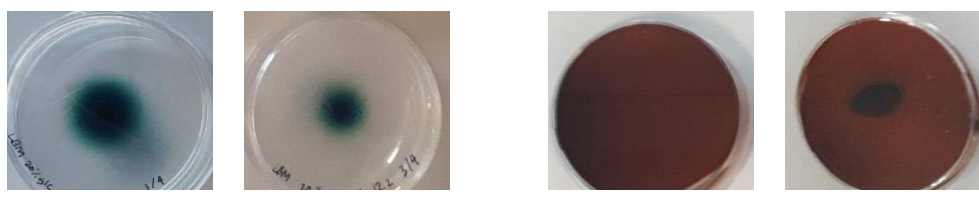
Non- selective

Selective

Figuur 8: selectiviteitsassay.

Op agar platen op basis van Cellulose Basal Medium is een Congo Red assay uitgevoerd voor alle 30 stammen *C.Subvermispora*. Wanneer er regio's ontkleuren dan duidt dit op cellulase activiteit. Oesterzwam (links) was duidelijk niet selectief, alle 30 stammen van *C.Subvermispora* vertoonden geen activiteit. In een ABTS laccase assay op plaat scoorden alle stammen *C.Subvermispora* zoals positief en was er geen voorkeur aan te geven. *C.Subvermispora* groeide niet tot nauwelijks op platen met alleen lignine als koolstofbron, maar wel als er naast lignine nog makkelijk verteerbare koolhydraten aanwezig waren.





**Figuur 9: laccase activiteitsassay op plaat.**

Vervolgens zijn bij Bioclear groeitesten uitgevoerd in een vloeibaar medium op verschillende pH's. pH3 staat model voor de inoculatie bioreactor. pH5 en pH6 staan model voor het stro vlak na inoculatie. Het percentage in de tabel is weergegeven is het drooggewicht van de schimmel ten opzichte van het maximaal haalbare drooggewicht bij 100% omzetting van de aanwezige koolstofbron tot 50% biomassa. De data is uitgezet tegen de door de WUR gemeten data van gedurende vijf weken voorbehandeld tarwestro waarin het behoud / afbraak van droge stof, cellulose, hemicellulose en lignine weergegeven is.

Voor de uiteindelijke stamselectie is er allereerst geselecteerd op een zo hoog mogelijke lignine afbraak en een zo groot mogelijk behoud van droge stof en cellulose. Het is uit de ratio's meteen duidelijk te zien welke stammen het best scoren. MES15032 en MES14706 presteren het best, MES15023 is een goede reserve met wel meer cellulose afbraak. Tegelijkertijd met de lignine wordt ook de hemicellulose afgebroken, uit de data blijkt dat dit niet te vermijden valt.

In de groeitest doet de MES15032 en MES15023 het heel goed en ook met name erg goed op lage pH. Dit bevestigt de keuze. De dikaryons waaronder MES14706 groeiden in een ander experiment in radial growth assays eerder uitgevoerd op plaat als beste, maar miste in deze test.

Er is aan de hand van de resultaten besloten om voor dit project de MES15032 als best presterende monokaryon en de MES14706 als best presterende dikaryon te selecteren. De originele MES13094 presteerde niet goed in dit experiment en is voor stro verder meegenomen als referentie om de gegenereerde data te kunnen vergelijken met data uit het verleden.

strain	WUR Wheat Straw Pretreatment						BCE Growth in erlenmeyers		
	RECOVERY 5w				RATIOS		Reactor	Colonization	
	DM	C	HC	L	C/L	DML	pH 3	pH 5	pH 6
MES13093	90%	81%	51%	75%	109%	121%			
MES13094	92%	94%	42%	91%	104%	101%			
MES14407	88%	81%	41%	57%	144%	156%	31%	8%	0%
MES14698	89%	88%	47%	63%	139%	141%			
MES14699	88%	84%	28%	57%	148%	156%	40%	22%	7%
MES14700	95%	87%	47%	67%	130%	143%	39%	41%	16%
MES14701	95%	86%	56%	70%	122%	135%			
MES14702	91%	76%	32%	57%	134%	159%	38%	11%	9%
MES14703	88%	82%	35%	49%	166%	179%	51%	24%	17%
MES14704	87%	85%	46%	61%	139%	142%	68%	44%	16%
MES14705	85%	80%	24%	46%	174%	185%			
MES14706	83%	82%	24%	41%	199%	201%			
MES14707	86%	85%	30%	56%	151%	153%	46%	35%	11%
MES15019	92%	87%	32%	63%	137%	145%			
MES15020	86%	71%	27%	44%	162%	197%	56%	36%	34%
MES15021	87%	71%	32%	59%	121%	148%	52%	21%	7%
MES15022	82%	74%	16%	39%	188%	209%	36%	40%	21%
MES15023	80%	68%	12%	32%	216%	252%	50%	58%	28%
MES15024	88%	83%	51%	61%	135%	144%	39%	14%	13%
MES15025	92%	82%	38%	60%	136%	153%	49%	31%	17%
MES15026	93%	91%	71%	83%	111%	113%	61%	44%	15%
MES15027	87%	82%	26%	54%	153%	162%	52%	20%	22%
MES15028	88%	76%	25%	46%	166%	191%	50%	34%	16%
MES15029	91%	81%	24%	55%	147%	166%	41%	40%	6%
MES15030	85%	68%	21%	41%	165%	206%	43%	23%	19%
MES15031	86%	71%	25%	50%	143%	173%	47%	40%	8%
MES15032	84%	84%	26%	40%	213%	211%	71%	34%	8%
MES15033	92%	93%	85%	95%	98%	97%	34%	14%	13%
MES15035	86%	76%	19%	39%	196%	220%	53%	33%	21%
MES15036	87%	82%	20%	47%	176%	185%	29%	8%	7%

**Figuur 10: combinatie van WUR resultaten en BCE resultaten.**

## 5.4 WP 3 – Biomassa matrix

In WP0 is al uitgebreid stil gestaan bij de biomassa matrix en wat logische keuzes zijn voor toepassing van biopulping. In dit werkpakket heeft de WUR op basis van de geselecteerde combinaties onderzoek gedaan naar het voorbehandelen van verschillende typen, met name rietachtige, biomassa met de twee uit WP1 als beste naar voren komende schimmelstammen. De *C.Subvermispora* MES15032 is gebruikt als best presterende monokaryon, de MES14706 als best presterende dikaryon op alle substraten aangevuld met de MES13094 als goed presterende monokaryon en referentie voor eerder uitgevoerde testen. De onderzochte biomassastromen zijn natuurhooi, tarwestro, lisdodde, Miscanthus, vlasleem en hennepscheven zoals weergegeven in onderstaand figuur. De voorbehandelde biomassa is op verschillende tijdstippen geanalyseerd op droge stof behoud en vezelsamenstelling en vervolgens in WP4 getest voor toepassing als papiervezel en groen gas substraat. Door het voorbehandelen van biomassastromen met verschillende karakteristieken is een goed beeld ontstaan van de praktische inzetbaarheid van de biopulping techniek, de toepasbaarheid van de gebiopulpte grondstoffen, de meerwaarde van biopulping en de benodigde voorbehandelingstijd.



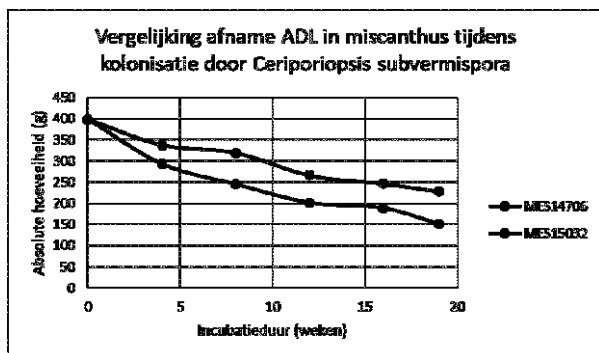
**Figuur 11: de in WP3 geteste grondstoffen.**

De onderzoeksopzet en alle resultaten staan uitgebreid beschreven in de WUR rapportage. De belangrijkste uitkomsten worden hier kort samengevat.

Miscanthus, tarwestro vlas en hennep raakten goed begroeit. Hoe langer de voorbehandelingstijd, hoe meer mycelium er was waar te nemen. Natuurgras raakte matig doorgroeit, lisdodde raakte zeer slecht doorgroeit. De pH daalde in alle zakken zoals verwacht naar een eindwaarde tussen 3,4 en 4,2. Aangezien lisdodde niet gekoloniseerd raakte met schimmel mycelium is er voor deze grondstof verder vezelanalyse uitgevoerd.

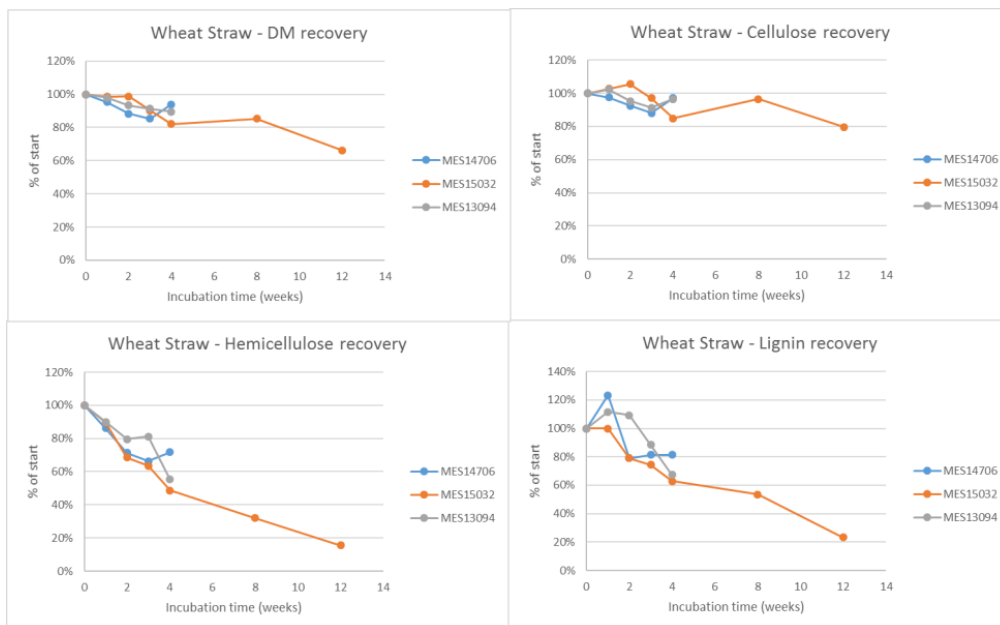
Na de vezelanalyse voor de overige substraten bleek dat hennep voor beide stammen na 12 weken een zeer hoge afbraak van lignine (70%-90%) en hemicellulose (91%-98%) had. Er was echter ook veel cellulose (41%-59%) en droge stof (37%-50%) verdwenen. Voor gehooit natuurgras ontstond hetzelfde beeld. Na 12 weken was er voor beide stammen een hoge afbraak van lignine (63%-65%) en zeer hoge afbraak van hemicellulose (87%-91%), maar was er tegelijkertijd ook veel cellulose (54%-63%) en droge stof (44%-49%) verdwenen. Vlasleem gaf een beter resultaat. Na 12 weken was er een hoge afbraak van de lignine (51%-75%) en hemicellulose (59%-89%), terwijl er door de schimmels minder cellulose (20%-22%) en droge stof (23%-24%) was verbruikt. Ook de Miscanthus had een beter resultaat.

Na de maximale voorbehandelingstijd van 19 weken was de cellulose grotendeels behouden (slechts 16% afbraak) en ook was er relatief weinig (26%-29%) droge stof verdwenen. Terwijl de hemicellulose (56%-67%) en lignine (43%-62%) meer afgebroken werden. Voor de Miscanthus zijn op meerdere tijdstipmomenten analyses uitgevoerd. Onderstaande figuur toont de afbraak van lignine door de tijd heen. Over het algemeen waren de resultaten voor beide geselecteerde schimmelstammen redelijk vergelijkbaar, de MES15032 brak vaak net iets meer lignine af en presteerde daardoor het best.



Figuur 12: lignineverwijdering door *C.Subvermispora* in Miscanthus.

Het gebruikte tarwestro had voor stro een relatief laag lignine gehalte (7%-8%). De afbraak is in onderstaand figuur weergegeven. De stammen gedragen zich vergelijkbaar. Voor MES15032 was er na 8 weken voorbehandeling nog 85% droge stof en 96% cellulose behouden, terwijl de lignine voor 47% en de hemicellulose voor 68% was afgebroken.



Figuur 13: het verloop van de pretreatment van tarwestro.

Door verschillende typen stromen voor te behandelen is er goed inzicht ontstaan wanneer biopulping wel en niet succesvol kan zijn. Hiervoor is in onderstaand figuur het overzicht van de verschillende biomassa stromen en hun samenstelling weergegeven. De laatste kolom loopt al vooruit op het toepassingsonderzoek uitgevoerd in WP4.

Substraat	Vezel-fractie	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignine	C/L ratio	HC/L ratio	As	Opmerking
Vlaslemen	85%	51%	10%	23%	2,2	0,4	2.7%	beste resultaat groen gas
Hennepscheven	86%	58%	12%	16%	3,6	0,8	4.1%	
Lisdodde	76%	41%	20%	15%	2,7	1,3	5.6%	slechte kolonisatie
Miscanthus	91%	56%	22%	13%	4,3	1,7	3.0%	beste resultaat papier
Natuurhooi	73%	39%	26%	8%	4,9	3,3	2.6%	slechte kolonisatie
Tarwestro	87%	49%	31%	7%	7,0	4,4	3.9%	

**Figuur 14: overzicht van de voorbehandelde biomassa stromen.**

Een hoge vezelfractie van >80%, liefst >85% lijkt een randvoorwaarde voor succesvolle schimmelkolonisatie. De materialen die het best gekoloniseerd werden hebben allemaal een vezelfractie van >85%. Het valt in het overzicht op dat de natuurhooi en lisdodde, die het minst goed gekoloniseerd werden, verreweg de laagste vezelfractie hadden van <80%. Dit betekent dat er naast de vezel dus relatief meer inhoudsstoffen aanwezig waren zoals bijvoorbeeld vetzuren en eiwitten die de schimmelgroei mogelijk geremd hebben. Voor lisdodde kan nog genoemd worden dat dit gewas in het water groeit, waardoor lisdodde mogelijk zichzelf al goed beschermd heeft tegen afbraak door schimmels.

De materialen met het hoogste cellulose gehalte van >55% (Miscanthus en hennep) zijn de meest interessante uitgangsmaterialen voor papierproductie. Ook zijn de overige karakteristieken van de vezel natuurlijk belangrijk. Hier wordt in WP4 op ingegaan.

Een hoog lignine gehalte van >~10%, liever >15%, liefst >20%, of een Cellulose: Lignine ratio van <~4, lijkt een belangrijke randvoorwaarde voor een meerproductie in groen gas. In WP4 is gebleken dat de materialen met het hoogste lignine gehalte en de laagste Cellulose: Lignine ratio het meeste profijt hadden van de biopulping pretreatment.

Verder valt het op dat het lignine gehalte van alle biomassa stromen omgekeerd evenredig is met het hemicellulose gehalte. Aangezien in de pretreatment zowel lignine als hemicellulose wordt afgebroken zullen de absolute verliezen aan hemicellulose lager zijn voor materialen met een hoger lignine gehalte. Dit blijkt inderdaad zo te zijn (data niet weergegeven). Een HC: L ratio van <~3, liever <2, liefst <1 lijkt het meest geschikt.

Er is geen verklaring gevonden waarom de hennepscheven en het natuurhooi een groot verlies aan cellulose hadden door de pretreatment, mogelijk was de voorbehandelingstijd te lang. Ook is het mogelijk dat voor elk type biomassa een ander type schimmelsoort of zelfs schimmelstam optimaal blijkt te zijn.

Al de opgedane inzichten opgedaan in dit werkpakket is vervolgens gecombineerd met kennis over groei van witrotschimmels en opschaling. Hieruit is de onderstaande 'checklist' opgesteld aan de hand waarvan eenvoudig bepaalt kan worden of biopulping een werkbare en relevante pretreatment techniek kan zijn.

## Welke biomassa is geschikt?



### Randvoorwaarden / karakteristieken / inzichten :

1. Steekvast (moet zuurstof doorlaten)
2. Voldoende structuur (moet stapelbaar zijn)
3. Laag gehalte aan (vrije) stikstof (ammonium remt schimmelgroei)
4. Laag gehalte aan organische zuren (remt schimmelgroei)
5. Laag gehalte aan 'makkelijke' inhoudsstoffen (concurrentie bacteriën, broei, verlies)
6. Dus hoog gehalte aan 'taai' vezel (selectief groeisubstraat voor witrotschimmels!)
  - Vezelfractie >80%, liefst 85%.
7. Waarvan hoog gehalte aan cellulose (als de waardevolle inhoudsstof)
8. En een hoog gehalte aan 'te kraken' lignine (anders geen pre-treatment nodig)
9. En daardoor een laag gehalte aan hemicellulose (dit gaat verloren)
  - Lignine gehalte >10%, liever >15%, liefst > 20%.
  - C:L ratio <-4, liefst zo klein mogelijk
  - HC:L ratio <-3, liever < 2, liefst <1

Dus **wel** droge stromen met veel structuur en bijna 100% lignocellulose vezel zoals hout, stro, riet, ..., ... Grassen zijn al minder geschikt. Maar duidelijk **niet** vloeibaar materiaal, mest, ingekuuld materiaal en makkelijk verteerbare materialen.

### Figuur 15: checklist om op eenvoudige wijze de geschiktheid en relevantie van biopulping als pretreatment techniek te kunnen bepalen.

Naast beschreven activiteiten heeft Bioclear earth in dit werkpakket een inventarisatie uitgevoerd naar de hoeveelheden, locatie en samenstelling van lignocellulose biomassa restromen die wereldwijd beschikbaar komen.

## 5.5 WP 4 – Toepassing Papier

Dit hoofdstuk bespreekt de ontwikkeling van de toepassing van biopulping bij papierproductie. De relatief hoogwaardige vezeltoepassing van lignocellulose biomassa is van interesse voor veel van de consortiumpartners. Biopulping is van origine zelfs ontwikkeld om op grote schaal houtchips voor te behandelen ten behoeve van papierproductie. Aangezien er in Nederland, zoals in Scandinavië en Duitsland, geen klassieke chemische pulpingsfabrieken zijn, is er geen beschikbare capaciteit om cellulose uit lignocellulose grondstoffen te winnen en te benutten. Het voorliggende idee is om biopulping in te zetten om beschikbare lignocellulose biomassa lokaal voor te behandelen. Na ontsluiting met het biopulpingproces kan de biomassa in de aanwezige papierfabrieken verder worden verwerkt tot een lokaal product met een circulair karakter.

Eind 2020 hebben KCPK en Bioclear earth in samenwerking met Papiermakerij De Hoop in Rotterdam daarom prototypes gebiopulpt papier gemaakt met als doel om inzicht te krijgen in de toepasbaarheid van de techniek. Basis voor het papier waren de in WP3 door de WUR voorbehandelde substraten natuurhooi, lisdodde, vlaslemen, Miscanthus en hennepscheven.



**Figuur 16: Miscanthus 100% gebiopulpt (L), Papier van 100% gebiopulpt + gezeefd Miscanthus (M), Idem met circa 30% Miscanthus + cellulose en een CO<sub>2</sub> bindend vulmiddel (R).**

Als eerste werden de verschillende voorbehandelde grondstoffen na biopulping pretreatment van 12 weken (natuurhooi, lisdodde, vlaslemen) of 19 weken (Miscanthus) vergeleken met de referentie (0 weken pretreatment). Hiervoor zijn de grondstoffen 7 minuten op een 'zachte' manier (20.000 revoluties in totaal) met een labpulper vervezeld. Deze voorbehandeling heeft als doel om de vezels te individualiseren, suspenderen en homogeniseren en is vergelijkbaar met de mogelijkheden in de Nederlandse papierfabrieken.

De foto's geven een impressie van deze behandeling. De eerste observatie was dat biopulping zoals verwacht inderdaad een groot effect heeft op de grondstoffen. In water was met name visueel de ontsluiting goed waar te nemen. Voor de referenties waren na behandeling met de labpulper de individuele 'strootjes' nog aanwezig, de gebiopulpte substraten vielen echter door de uiteen in vezels met her en der nog een strootje.



**Figuur 17: Proof-of-principle van biopulping. Vervezeling van 'door biopulping behandelde Miscanthus strootjes t=19' (L) vs. vervezeling van 'niet gebiopulpte Miscanthus strootjes t=0' (R)**

Bij het uitvoeren van deze testen is er verder waargenomen dat biopulping invloed heeft op de kleur van de droge substraten. De gebiopulpte substraten zijn 'roder' in vergelijking met de onbehandelde referenties. Hoe houtiger het materiaal, hoe sterker de kleurverandering. Bij het verwerken kleurt het substraat vervolgens het water. Dit zijn aanwijzingen voor de aanwezigheid van oplosbare afbraakproducten uit lignine. Uitzonderingen hierin waren lisdodde (niet goed gekoloniseerd) en natuurhooi (al erg donker van kleur).

Uit de eerste prototypes bleek dat er ondanks de volledige kolonisatie van het substraat met schimmel naast vervezelde biomassa ook nog enkele geheel intacte strootjes aanwezig waren. Bij inspectie leken dit op het oog de meest houtige stukjes van de grondstof te zijn waaruit geconcludeerd werd dat de witrotschimmel zelf ook kieskeurig is en enigszins selectief in welke biomassa het wel of niet gebruikt.



**Figuur 18: rode verkleuring (R) goed te zien voor het gebiopulpte vlas vs. de niet gebiopulpte vlas (L).**



**Figuur 19: impressie van de grondstof screening.**

Natuurhooi leverde een donker gekleurd materiaal op en heeft een relatief 'slappere vezel' in vergelijking met de andere grondstoffen. Lisdodde werd niet door de schimmel gekoloniseerd en daardoor niet goed gebiopulpt. Vlas was nog iets houtiger dan Miscanthus. Stro is vanwege de kostprijs en aanwezige silicaten minder interessant voor de papiersector. Hennep is als grondstof voor papier relatief te hoogwaardig; de grondstof heeft een hoge prijs, nog hoogwaardigere toepassingen en de erg lange vezels (in verhouding tot houtvezels) kunnen voor mechanische problemen zorgen in het standaard papierproces.

Als vervolg is er daarom voor gekozen om het Miscanthus papier verder door te ontwikkelen. Dit gezien de interesse uit de markt (telersgroep rondom Schiphol, KCPK) en de meest veelbelovende technische resultaten. Allereerst zijn de houtige deeltjes eenvoudigweg via een zeef verwijderd. Hierdoor stond een egaal 100% Miscanthus papier met een exclusieve uitstraling. Door vervolgens een maagdelijk cellulose en een vulmiddel met gebonden CO<sub>2</sub> toe te voegen ontstond een Miscanthuspapier (met circa 30% Miscanthusvezels) dat nog witter oogde met een fijnere uitstraling.

Middels deze testen is er aangetoond dat biopulping een geschikte voorbehandeling kan zijn om lokaal uit Miscanthus een papiergrondstof te maken. Waar normaal gesproken voor circulair papier slechts een aantal procent lignocellulose vezelgrondstoffen toegevoegd wordt, biedt biopulping de mogelijkheid om het percentage lignocellulose vezelgrondstoffen in circulair papier te verhogen. Indien er voldoende interesse is aan de afname kant, dan zou een logische vervolgstap zijn om als demonstratie grotere batches Miscanthus middels tunnelcompostering te biopulpen en vervolgens in een fabriek hier papier van te maken. De fabriek van Schut papier in Heelsum leent zich hier uitstekend voor vanwege de mogelijkheid tot het maken van kleinere batches (vanaf circa 2 ton) en hun ervaring met de verwerking van circulaire stromen. Het is wel de verwachting (van de KCPK) dat indien succesvol dit een niche toepassing zal zijn.



**Figuur 20: Miscanthus t=0 (zak links) en t=19 (zak rechts). Papier prototypes (onder).**



## 5.6 WP 4 – Toepassing Groen Gas

Eerste beoogde startpunt voor ontwikkeling van de technologie is om deze te introduceren in de al bestaande waardeketen van groen gas productie, in de basis van de biobased waardepiramide. Op deze manier kan ervaring worden opgedaan met een nieuwe technologie, zonder de directe noodzaak om ook tegelijkertijd nieuwe waardeketens te moeten ontwikkelen.

In biogasproductie worden biomassa stromen onder anaerobe condities tot een mengsel van methaan, koolstofdioxide en enkele sporengassen. Dit mengsel wordt verder opgewerkt tot groen gas en in het aardgasnetwerk ingevoerd. Biovergisting vindt decentraal plaats, maar heeft toch vaak een aanzienlijke schaal in de ordegrrootte van 10-100kton biomassa per locatie. Vanwege de toenemende vraag naar duurzame brandstoffen is de markt sterk groeiend. Er is zo langzamerhand een schaarste aan het ontstaan aan duurzaam beschikbare grondstoffen en reststromen. Voor een effectieve vergisting is het essentieel om zoveel mogelijk koolstof uit de biomassa om te zetten. Daarom is er in de sector de sterke behoefte aan opbrengstverhogende technieken, zeker als deze het mogelijk maken om meer laagwaardigere, duurzamere substraten als grondstof in te zetten. Deze tweede generatie reststromen zijn lastig verteerbaar, hebben een geringe gasopbrengst en zorgen voor mechanische problemen in de vergisters. Daarom kan slechts een gedeelte van de vergistercapaciteit met deze materialen benut worden. Het biopulping concept lijkt heel goed bij deze markt te passen om vergisting te verbeteren. Verbetering kan zijn een meeropbrengst aan groen gas, een versnelling van de omzetting en het verhogen van de doorvoer, het verhogen van het aandeel lignocellulose in een vergister, of het beschikbaar maken van nieuwe materialen voor vergisting.

Doel van dit werkpakket was daarom om biopulping te ontwikkelen voor groen gas productie. Allereerst uit grassen want bermgras is een voor Nederland zeer relevante reststroom en veel van de projectpartners bezitten of verwerken bermgras en ook andere maaisels. Aangezien internationaal er een trend is gesignaleerd om meer en meer stro te gaan vergisten is hier ook op gefocust. Tenslotte zijn ook Miscanthus en vlas vergist om breder inzicht te krijgen in de meerwaarde van biopulping voor groen gas gerelateerd aan de biomassa karakteristieken.

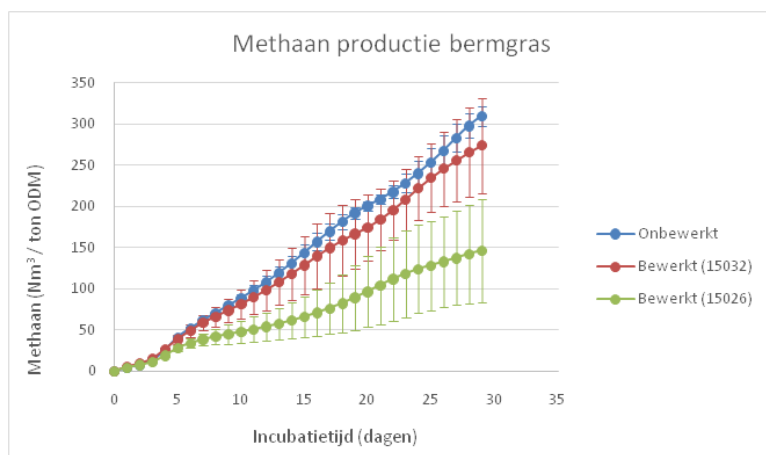
In het vergistingsonderzoek zijn de voorbehandelde substraten in triplo mesofiel vergist in een volume van 0,5L om de anaerobe biologische afbreekbaarheid in kaart te brengen. De samples werden mechanisch geroerd en de temperatuur is gecontroleerd in een waterbad op 38°C. Het geproduceerde biogas werd gewassen in 4M NaOH om de CO<sub>2</sub> te verwijderen, de methaanproductie is continu gelogd. Voor de testen is gebruik gemaakt van de dunne fractie van het digestaat van een plantaardige monovergister die bietenpulp verwerkt. Dit is een geschikt entmateriaal voor deze testen want het is gewend aan een hoge belasting, aan het afbreken van makkelijk beschikbare suikers en ook aan de afbraak van cellulose vezels. De ISR (Inoculum Substrate Ratio) op basis van organische stof is in de testen gesteld op circa 2,5. Dit komt neer op typisch 7 gram droog substraat en 300 gram digestaat als inoculum. De vergistingsduur was 60 dagen, dit is langer dan de verblijftijd in de meeste praktijkvergisters (20-40 dagen), maar geeft een volledig inzicht in het effect van voorbehandeling op de anaerobe afbreekbaarheid van substraten. Na vergisting zijn de triplos eerst gemiddeld, waarbij ook gekeken is naar de variatie. Van de resultaten is vervolgens de gasopbrengst van digestaat afgetrokken om zo de gasopbrengst uit enkel het substraat te achterhalen. Vervolgens is de gasopbrengst van de voorbehandelde substraten vergeleken met de referentie substraten. Ook is er voor een eerlijk vergelijk gecorrigeerd voor het organisch stof verlies in biopulping.

De resultaten zijn zowel gerapporteerd voor de hoeveelheid vergist materiaal als voor de originele hoeveelheid materiaal die gebiopulpt is. Er is zowel gemalen als ongemalen substraat vergist. Het fijn gemalen substraat is het meest homogeen, maar het ongemalen substraat is meer relevant voor de praktijk omdat malen zelf ook een mechanische pretreatment is. Er is bij de start van het project begonnen met dit werkpakket, de testmethodiek is geperfectioneerd aan de hand van de eerste testen.

### Groen gas uit gras

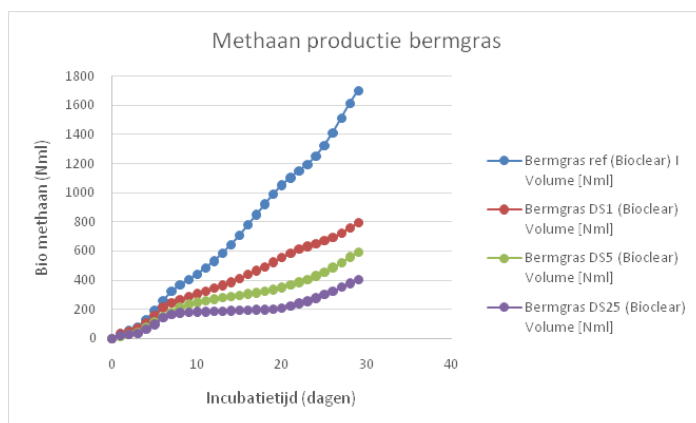
In het eerste jaar van het project is naar voren gekomen dat het originele beoogde concept van biopulping helaas niet geschikt is voor de pretreatment van ingekuuld bermgras. Hier zijn middels het onderzoek drie oorzaken voor gevonden. Ten eerste bevat bermgras nog een groot gedeelte (circa 40-60%) makkelijk verteerbare inhoudsstoffen die tijdens voorbehandeling gedeeltelijk verloren gaan. Ten tweede bevat ingekuuld bermgras organische zuren die de schimmelgroei van de *C. Subvermispora* remmen. Ten derde heeft ingekuuld bermgras gebrek aan voldoende structuur wat opschaling van dit aerobe proces lastig maakt. Daarom is er in WP3 verder gegaan met het gebruik van natuurhooi, een droger en vezeliger materiaal, maar met nog steeds circa 20%-30% makkelijk verteerbare inhoudsstoffen.

In de eerste fase is wel aangetoond dat het toevoegen van kalk de aanwezige vetzuren neutraliseert en kolonisatie van bermgras met schimmels mogelijk maakt. Ook verrijkt de voorbehandeling met *C. Subvermispora* de cellulose: lignine ratio van ingekuuld bermgras. Onderstaand figuur toont de vergisting van het 5 weken in WP1 voorbehandelde bermgras ten opzichte van de referentie. Uit de test blijkt echter dat de onbehandelde referentie beter presteert dan de behandelde grassen. Het werkelijke resultaat is nog minder hoopgevend aangezien er geen correctie voor droge stof verlies tijdens voorbehandeling is toegepast.



Figuur 21: vergisting van bermgras uit WP1

Om de voorbehandeling zonder pH neutralisatie uit te kunnen voeren is Bioclear earth op zoek gegaan naar een alternatieve selectieve witrotschimmel. Na een screening van een tiental verschillende soorten witrotschimmels werd er één soort geïdentificeerd die zonder toevoeging van kalk het bermgras zeer goed koloniseerde. De onderstaande figuur toont het na voorbehandeling vergiste bermgras. Hoe meer suspensie was gebruikt om het bermgras aan te enten, hoe meer schimmelgroei er was, hoe minder biomethaan opbrengst er was. Waarschijnlijk groeit deze schimmel goed op de aanwezige makkelijk verteerbare inhoudsstoffen en vetzuren en is deze schimmel verder niet van nut voor biopulping.



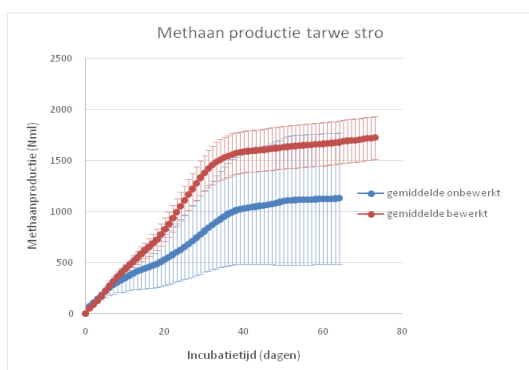
**Figuur 22: voorbehandeling van bermgras zonder pH neutralisatie.**

Vanwege de slechte kolonisatie en het verlies aan organische stof bij een goede kolonisatie is er nagedacht over alternatieve strategieën. Alternatieve concepten zoals het eerst uitpersen van kuilgras of het nabehandelen van de dikke fractie van vergist bermgras om biopulping mogelijk te maken zijn door Attero en Bioclear earth niet als kansrijk beoordeeld. Misschien is het voor vezeltoepassingen nog het meest kansrijk om het concept om te draaien en een korte vergisting juist als voorbehandelingstechniek in te gaan zetten om suikers, vetzuren en eiwitten te verwijderen en zo de grasvezel verbeterd beschikbaar te maken voor biobased toepassingen.

### Enzymatische voorbehandeling

Voor de toepassing van witrotschimmels in combinatie met bermgras is de enige technische mogelijkheid die overblijft het direct op het substraat toepassen van een cocktail van door schimmels geproduceerde oxiderende enzymen. Hoewel de potentiële maximale meeropbrengst van enzymvoorbehandeling geringer is, is deze route kansrijker aangezien de schimmels het bermgras niet hoeven te koloniseren. Ook is deze route eenvoudiger aangezien er geen composteringstunnel hoeft te worden aangelegd. De enzymen worden in een fermentor on-site geproduceerd en kunnen worden vermengd met het substraat dat na een incubatie van 12-48 uur vervolgens aan een vergister wordt toegevoegd.

Om dit concept te testen zijn eerste screeningstesten uitgevoerd op tarwestro. In labkweek zijn oxidatieve enzymen geproduceerd (laccases en peroxidases), die in overmaat zijn toegevoegd aan bermgras en tarwestro. Na 48 uur incubatie is het materiaal vergist en vergeleken met het materiaal wat onbehandeld was. Voor tarwestro was er gemiddeld een meeropbrengst van +50% gerealiseerd, echter wederom was de variatie te groot om conclusies te kunnen trekken.



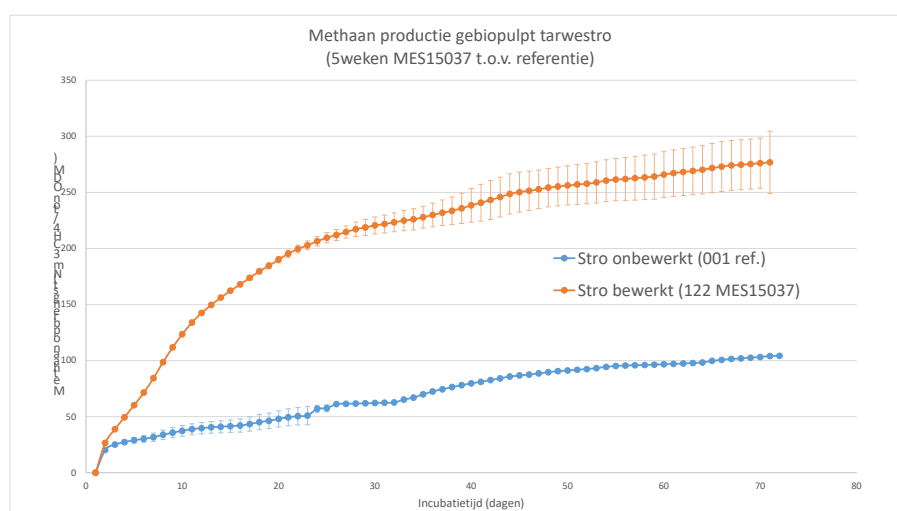
**Figuur 23: vergisting van tarwestro na enzymatische pretreatment.**

Na optimalisatie van de enzymproductie in WP2 via het toevoegen van inducerende stoffen is in een vergistingstest waarin stro werd voorbehandeld met een hoge concentratie enzymen in aanwezigheid van een redox mediator na 40 dagen vergisting een blijvende meer opbrengst van 4,3% vastgesteld.

### Groen gas uit stro (WP3)

In de aanloop naar dit project was er al proof-of-principle gegeven van de meerwaarde van biopulping in de vergisting van stro. Met een vergistingsduur van 30 dagen was dit een relatief korte test. Ook is er in deze screeningstesten niet gecorrigeerd voor eventueel droge stof verlies dat tijdens de voorbehandeling optreedt. In dit werkpakket is daarom vervolgens verder onderzoek gedaan naar het vergisten van gebiopulpt tarwestro.

In de eerste test met triplos van in WP1 voorbehandeld materiaal bleek dat de biomethaan opbrengst bijna verdrievoudigde. Kanttekening hierbij is dat de referentie onder verwachting produceerde. Helaas is er geen vezelanalyse van voorbehandeling met MES15037 beschikbaar.



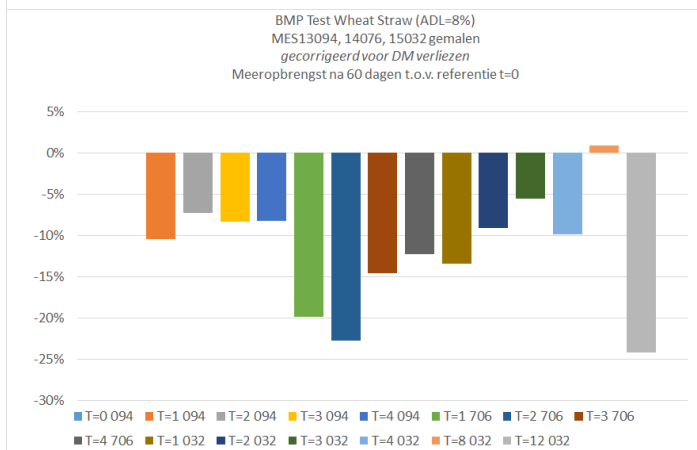
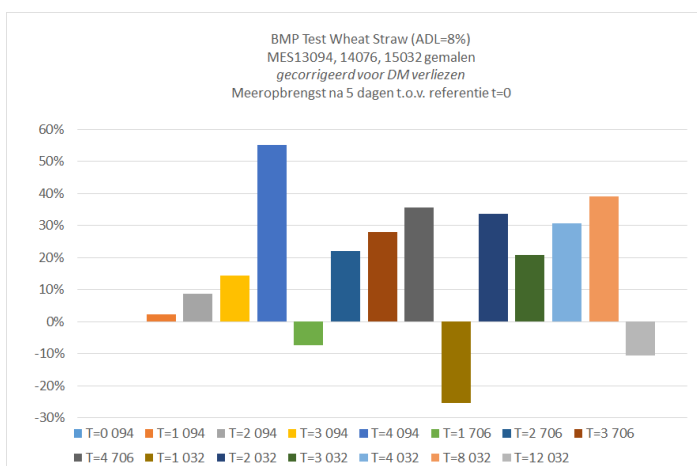
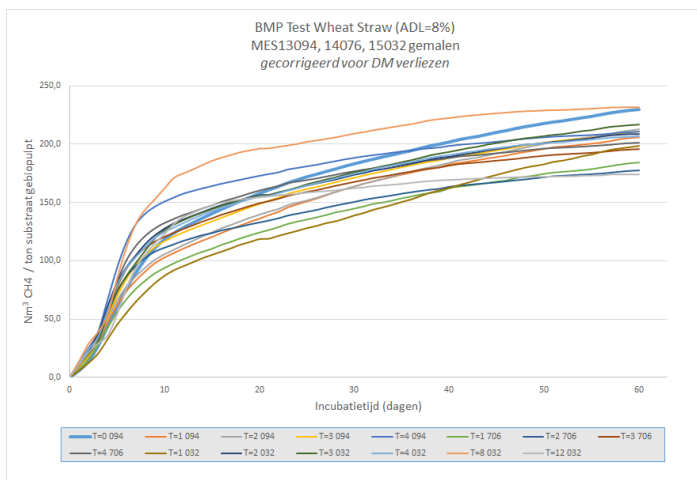
Figuur 24: eerste test met in WP1 voorbehandeld tarwestro.

Vervolgens is een omvangrijke test opgezet waarin tarwestro voorbehandeld in WP3 60 dagen is vergist. De stammen waren in WP1 geselecteerd op basis van een zo hoog mogelijk lignine afbraak en een zo groot mogelijk behoud aan droge stof. Naast de lignine is ook de hemicellulose afgebroken. De geteste voorbehandelingstijd waren t=1-2-3-4 weken voor alle drie de schimmelstammen MES13094, MES14706 en MES 15032 en ook t=8-12 weken voor de MES15032. Het verloop van de massabalans en lignine verwijdering tijdens deze pretreatment is in figuur 13 te zien. Alle vergistingsdata is weergegeven in Bijlage 1.

De vergisting is succesvol verlopen. Na vergisting is allereerst is de biomethaanopbrengst geplot per ton droog vergist materiaal en is de meeropbrengst vergeleken met de referentie. Vervolgens is er, om een eerlijk vergelijk te kunnen maken, voorde voorbehandelde samples gecorrigeerd voor de organische stof die tijdens voorbehandeling verloren is gegaan. De biomethaanopbrengst is daarna geplot per ton droog materiaal als ingangsstroom in het biopulping proces. Deze data is wederom vergeleken met de referentie. De onderstaande figuren zijn een selectie van de data en zijn allemaal gecorrigeerd voor droge stof verlies tijdens de pretreatment.

Uit de resultaten concluderen we dat het bewerkte stro in vergisting geen meerwaarde geeft ten opzichte van niet voorbewerkt stro. In het begin van de vergisting treedt er een versnelling op. Na 5 dagen vergisten is er een meeropbrengst van +8% - +55% ten opzichte van de referentie. Alleen de samples na 1 week en 12 weken voorbehandeling gaven geen versnelling. Na 60 dagen is de meeropbrengst echter verdwenen en is er een minderopbrengst van -5% tot -24%.

Enkel de MES 15032 na 8 weken pretreatment geeft een meeropbrengst van +1%. Uit deze test is geconcludeerd dat, wanneer er gecorrigeerd wordt voor het droge stof verlies in pretreatment, biopulping geen meerwaarde geeft voor stro met een laag lignine gehalte. Het voorbehandelde materiaal breekt wel versneld af.



Figuur 25: groen gas opbrengst uit gebiopolpt stro.

### Groen Gas uit stro (WP1)

Aangezien de vergisting van stro een versnelling gaf, maar door het verlies van organische stof in de pretreatment geen meerwaarde is er vervolgens onderzocht of de beste stammen uit WP1 (MES13094, MES15032, MES14706) niet op basis van verkeerde aannames (hoogste afbraak van lignine en hemicellulose) geselecteerd zijn. In onderzoek & ontwikkeling dienen vals negatieve resultaten zo veel mogelijk vermeden te worden omdat aan de hand hiervan mogelijke kansrijke opties weggestreept worden. Daarom is teruggedaan naar de resultaten uit WP1 en zijn aanvullende samples aan vergistingsonderzoek onderworpen. Sample MES14707 na 2 weken is als referentie genomen aangezien de originele referentie opgebruikt was en dit sample nog nauwelijks verschilde ten opzichte van de referentie.

Er zijn naast deze referentie twee groepen samples geselecteerd voor de vergistingstesten die duidelijk verschillen van de origineel geselecteerde samples:

1. Samples met een zo groot mogelijke afbraak van hemicellulose en een zo groot mogelijk behoud van droge stof, cellulose en lignine.
2. Samples met een zo groot mogelijke afbraak van lignine en hemicellulose en een zo groot mogelijk behoud van droge stof en cellulose.

Tarwestro Selectie	WP1 sample	Recovery (% of uitgangsmateriaal)				BMP gecorrigeerd voor DM verlies vs. 2w MES707 (ref)				Nm3 CH4/ton substraat Na 59 dagen
		DM	C	HC	L	Na 5 dagen	Na 15 dagen	Na 30 dagen	Na 59 dagen	
REF	2w MES707	100%	100%	92%	105%	100%	100%	100%	100%	150
HC afbraak met DM, C, L behoud	2w MES094	99%	96%	74%	104%	104%	98%	91%	88%	132
	2w MES702	101%	100%	72%	105%	109%	97%	85%	82%	122
	2w MES035	101%	93%	68%	97%	109%	99%	96%	96%	144
	2w MES025	98%	96%	56%	94%	114%	111%	99%	91%	136
	5w MES094	92%	94%	42%	91%	107%	98%	87%	81%	121
L+HC afbraak met DM, C behoud	5w MES 700	95%	87%	47%	67%	171%	128%	103%	90%	134
	5w MES 702	91%	76%	32%	57%	175%	128%	101%	85%	128
	5w MES 025	92%	82%	38%	60%	201%	142%	112%	93%	139
L+HC afbraak met C behoud (minder DM behoud)	5w MES 032	84%	84%	26%	40%					
	5w MES 706	83%	82%	24%	41%					

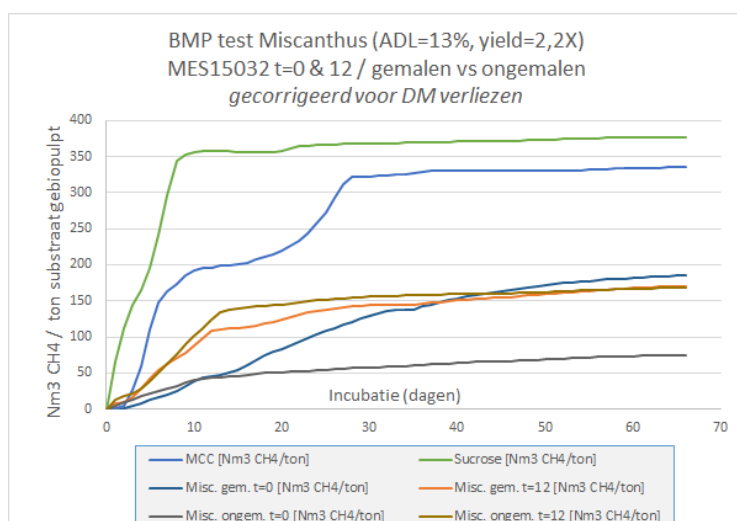
Figuur 26: vergisting van strosamples uit WP1.

De resultaten van deze vergistingstest zijn weergegeven in bovenstaand figuur en geven de volgende belangrijke inzichten in de mechanismen achter versnelling en meeropbrengst:

1. Droge stof behoud is de belangrijkste parameter voor een hoge biomethaan opbrengst bij een lange vergistingstijd. Na 59 dagen vergisting heeft de referentie de hoogste biomethaan opbrengst. De overige samples hebben een methaan opbrengst in de range 81%-96% ten opzichte van de referentie. Dit resultaat, een kleine minderopbrengst voor alle voorbehandelde samples, komt exact overeen met alle andere testen gedaan op met MES15032 voorbehandelde tarwestro.
2. Hemicellulose afbraak is niet de belangrijkste drijfveer achter de grote versnellingen die gevonden zijn in vergisting van met MES15032 voorbehandelde biomassa. De groep samples met enkel hemicellulose ontsluiting laat de eerste 5 dagen, mogelijkkerwijs door een minimale afbraak van de lignine, een lichte versnelling zien in de afbraak ten opzichte van de referentie. Na 15 dagen is deze versnelling echter alweer verdwenen.
3. Lignine afbraak is inderdaad de belangrijkste drijfveer achter de grote versnellingen die gevonden zijn in vergisting van met MES15032 voorbehandelde biomassa. De groep samples met zowel hemicellulose als lignine ontsluiting laat in de eerste 5 dagen een enorme versnelling zien (+71%-101% vs. de referentie) die ook nog na 15 dagen in stand is (+28%-42% vs. de referentie). Er is aangetoond dat hemicellulose afbraak alleen niet voor deze versnelling zorgde. Echter na 30 dagen is de gevonden meeropbrengst weer zo goed als verdwenen en na 59 dagen is er een kleine minderopbrengst.

### Groen gas uit Miscanthus

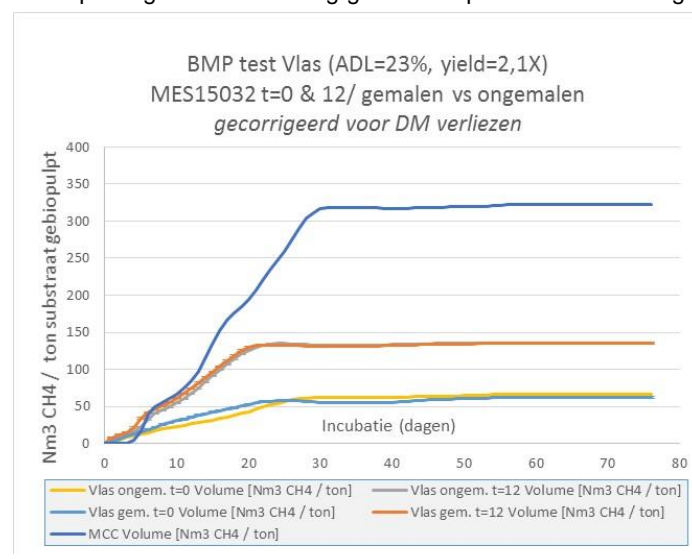
Het gebruikte tarwestro had, met 7%-8% aan lignine, voor stro een relatief laag lignine gehalte. Normaal gesproken ligt het lignine gehalte van stro tussen de 10%-15%. Daarom is ook Miscanthus met een lignine gehalte van 13% getest als modelsubstraat voor in de praktijk relevante lignine hoeveelheden. Miscanthus is voor MES15032 op verschillende tijdstippen ( $t=0-4-8-12-16-19$  weken) vergist en ook is op  $t=12$  weken gemalen miscanthus met ongemalen miscanthus vergeleken. Alle details, vergistingsdata en conclusies staan in Bijlage 2. Op basis van vergist materiaal is er een kleine meeropbrengst. Deze meeropbrengst verdwijnt als er wordt gecorrigeerd voor organisch stof verlies. Wel is er een hoge meeropbrengst ten opzichte van niet gemalen Miscanthus en is er te zien dat biopulping een enorme versnelling geeft.



Figuur 27: vergisting van gebiopulpte Miscanthus.

### Groen gas uit vlasleem

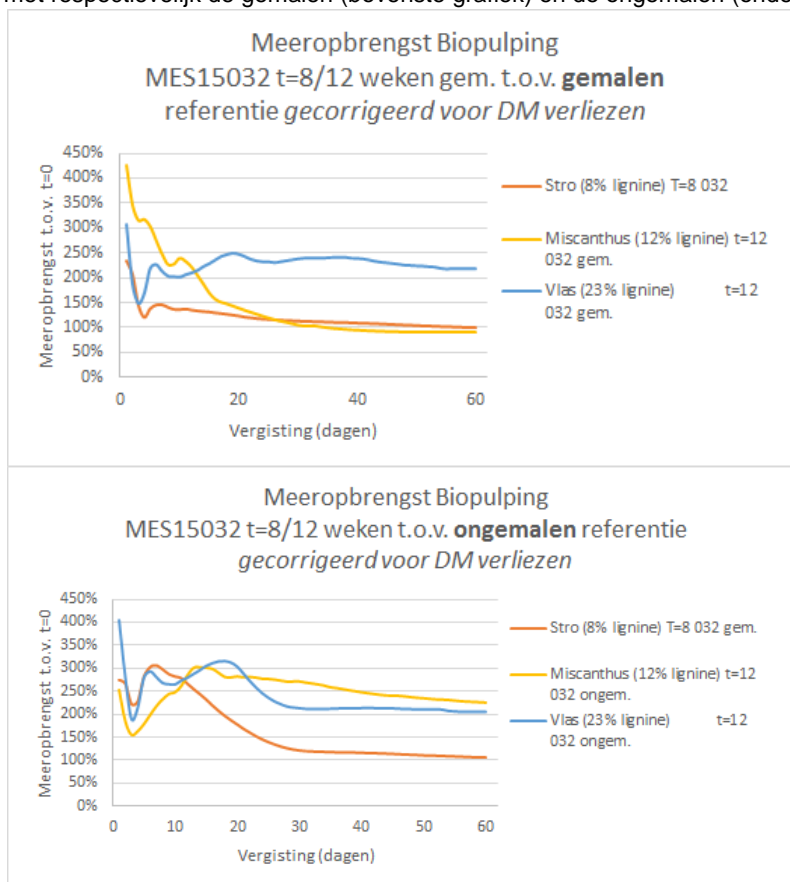
Tenslotte is het gebiopulpte vlasleem met het hoogste lignine gehalte van 23% vergist. Vlas is voor MES15032 zowel ongemalen als gemalen vergeleken op  $t=0$  en  $t=12$  weken. Alle details, vergistingsdata en conclusies staan in Bijlage 3. Er is te zien dat bij vlas biopulping een enorme meeropbrengst en versnelling geeft ten opzichte van zowel gemalen als ongemalen vlas.



Figuur 28: vergisting van gebiopulpte vlas.

## Concluderend

De onderstaande figuren vatten de testresultaten voor de drie geteste substraten samen in vergelijking met respectievelijk de gemalen (bovenste grafiek) en de ongemalen (onderste grafiek) referentie.



**Figuur 29: het effect van biopulping op tarwestro, Miscanthus en vlas in vergelijking met zowel de gemalen (boven) als ongemalen referentie (onder).**

Een optimale pretreatment tijd voor vergisting is vastgesteld op circa 8-12 weken. De gebiopulpte materialen breken dan door lignineverwijdering zeer veel sneller af in vergisting. Ook maakt biopulping mechanische voorbehandeling compleet overbodig. Aangezien er tijdens de pretreatment organische stof verloren gaat, ontstaat er een balans tussen meeropbrengst en minderopbrengst. Of er uiteindelijk na correctie per ton oorspronkelijke ingaande biomassa een netto meeropbrengst aan biomethaan verkregen wordt hangt af van de verblijftijd in vergisting, het lignine gehalte van het substraat en of de referentie gemalen wordt. Voor gebiopulpt vlas (23% lignine) is de biomethaanopbrengst na 60 dagen meer dan verdubbeld (+117%) ten opzichte van de gemalen referentie. Voor de materialen tarwestro (8% lignine) en Miscanthus (13% lignine) werd een zo goed als neutraal resultaat behaald (respectievelijk +1% en -10%). Als gebiopulpt materiaal echter vergeleken wordt met ongemalen referentie dan zorgt pretreatment voor alle geteste substraten voor een meeropbrengst van +7% (stro), +126% (Miscanthus) en +104% (vlas) na 60 dagen vergisting.

Ondanks deze zeer positieve testresultaten is de praktische meerwaarde voor de groen gas sector helaas nog niet onomstotelijk vastgesteld. Materialen met een zeer hoog lignine gehalte van waarbij het grootste voordeel werd behaald zijn schaars in biovergisting. Droge materialen met 10-20% lignine die al gebruikt worden in biovergisting, kunnen over het algemeen prima mechanisch voorbereid worden waardoor de grootste meerwaarde van biopulping verdwijnt. De versnelling van vergisting alleen lijkt onvoldoende interessant om te investeren in biopulping.



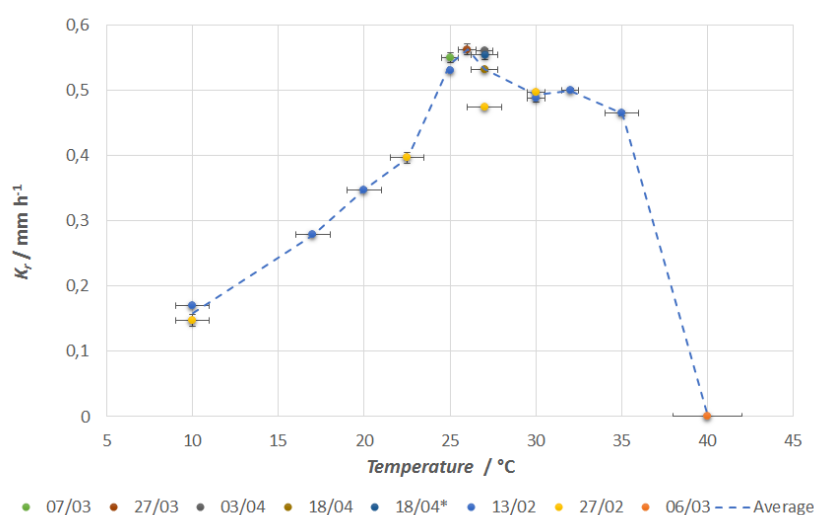
## 5.7 WP 2 – Optimalisatie groeicondities

De in WP6 gestelde randvoorwaarde voor een betaalbaar biopulping proces waren het gebruik van vloeibaar broed en het creëren van selectieve groeiomstandigheden. Daarom is in dit werkpakket is er veel tijd en aandacht besteed aan het ontwikkelen, optimaliseren en het selectief maken van het vloeibare kweekmedium. Hier is ook een screeningsmethodologie voor ontwikkeld (zie Bijlage 5). Voor de kweek van *C. Subvermispota* zijn daarom eerst optimale temperatuur, pH, stikstofbron, stikstofconcentratie en koolstofbron bepaald. Daarna heeft het onderzoek zich gericht op het vinden van toevoegstoffen die niet schadelijk zijn voor de *C. Subvermispota*, maar die wel de groei van bacteriën, gisten en ongewenste schimmels kunnen remmen of voorkomen. Verder kwam er een extra kans naar voren in de vorm van productie van oxidatieve enzymen en is er onderzoek gedaan naar productieverhoging. Tenslotte heeft Mycelia aan de hand van de inzichten het graanbroed geoptimaliseerd en gevalideerd.

### Optimale groeicondities

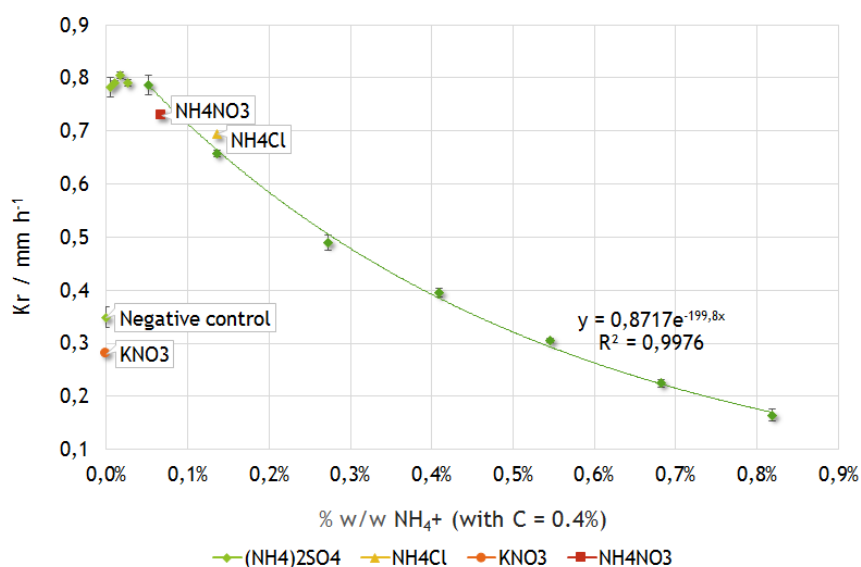
Allereerst heeft het onderzoek zich gericht op de optimale groeicondities voor *Ceriporiopsis Subvermispota*. Hier is de originele stam MES 13094 voor ingezet. De basiscondities voor een goede groei zijn een optimale temperatuur en pH. Daarnaast is voor schimmels het type stikstofbron en de concentratie van belang. Niet alle types stikstof kunnen worden gebruikt en witrotschimmels zijn vaak gevoelig voor te veel ammoniak. Er zijn diverse koolstofbronnen gescreend. Een idee was bijvoorbeeld dat als ethanol gebruikt kon worden door de schimmel, dat deze stof meteen een dubbelfunctie kon vervullen in een desinfectie stap. Een ander vergelijkbaar idee was het gebruik van organische zuren als koolstofbron en zo tegelijkertijd infecties te voorkomen. Ook is lignine als selectieve koolstofbron getest. Tenslotte zijn er verschillende minerale media vergeleken met een rijk organisch medium.

Op PDA plaat is een temperatuur optimum vastgesteld via het meten van de radiale groeisnelheid. De optimum temperatuur is vastgesteld op 26°C. De groeisnelheid blijft hoog tot een temperatuur van 35°C.



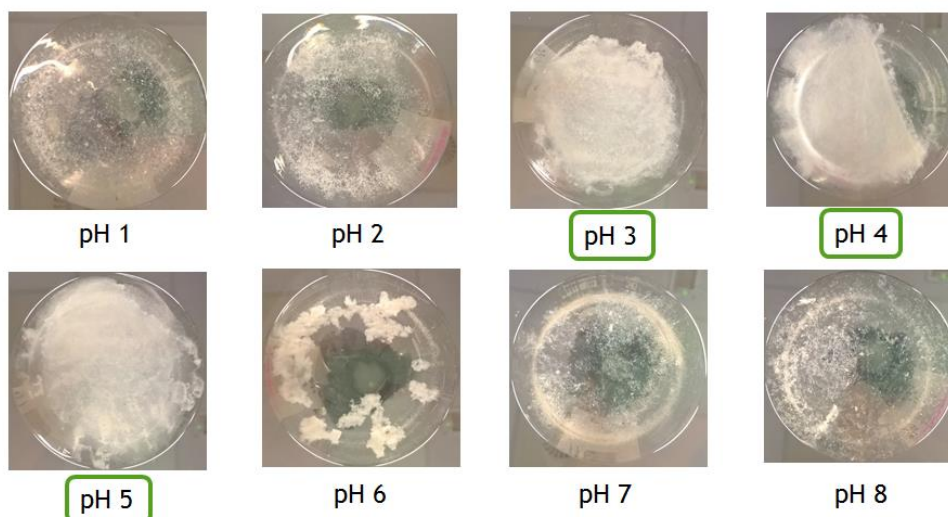
Figuur 30: temperatuur optimum voor *C.Subvermispota*.

Vervolgens is op plaat de radiale groeisnelheid opnieuw vastgesteld op een constante temperatuur van 30°C. Uit de test kwam naar voren dat de schimmel zoals verwacht nitraat inderdaad niet kan gebruiken. Ook ureum kon niet worden gebruikt en leek toxisch voor de schimmel. Alle groeisnelheden voor de verschillende ammoniumzouten overlaptten, een lage ammonium concentratie blijkt optimaal voor groei. Dit experiment is herhaald in vloeibaar medium waarin net als op plaat 0,05m% ammonium ook optimaal was.



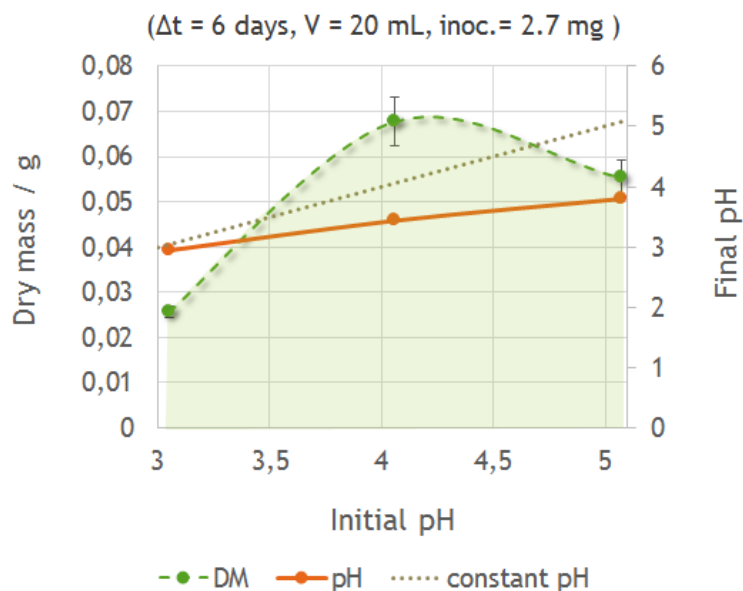
**Figuur 31: optimale stikstofbron en -concentratie.**

Hierna is er onderzoek gedaan naar pH. pH is een onderscheidende parameter voor deze schimmel aangezien groei op lage pH het beste gaat. Dit geeft vloeibare media al veel robuustheid tegen bacteriële infecties. Er is in de eerste test gevonden dat de range van pH3-5 een optimum is. Ook kan de schimmel het medium om zich heen zelf verder verzuren.



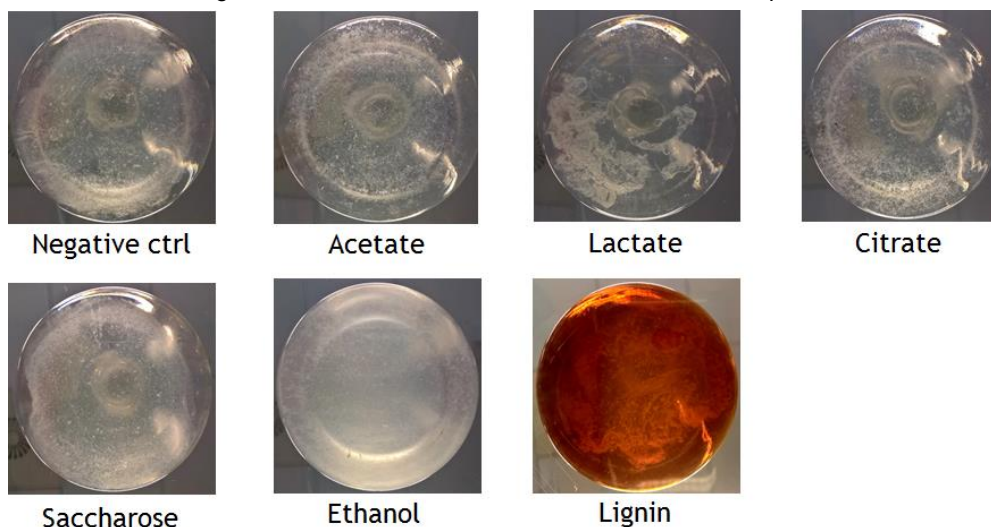
**Figuur 32: optimale pH voor groei.**

In een vervolgtest is hierop ingezoomd. pH4 bleek in deze test een optimum start pH waarbij de schimmel het medium verzuurt naar pH 3,5. In latere reactorstudies is daarom op pH 3,5 gestart en gevonden dat de schimmel nog groeit op een pH van 2,5.



**Figuur 33: pH ontwikkeling in vloeibare kweek.**

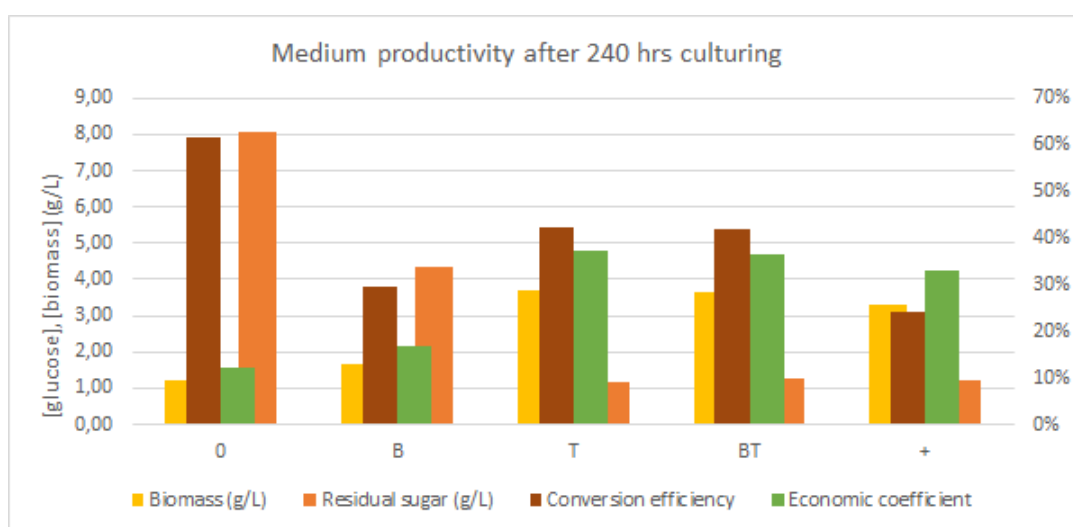
Er zijn verschillende koolstofbronnen getest met het idee om hiermee selectiviteit aan het kweekmedium toe te voegen. Dit gaf voor alle substraten helaas geen positieve resultaten. Hoewel de schimmel selectief lignine kan afbreken, gebruikt hij hiervoor hemicellulose als cosubstraat. Selectieve kweek op lignine bleek zowel op plaat als in oplossing niet mogelijk. Hoewel de schimmel goed groeit op glucose, blijkt hij sacharose zelf niet goed om te kunnen zetten. Glucose en invertsuiker zijn echter kostbaar. Uiteindelijk is een praktisch en betaalbare koolstofbron gevonden in glycerol. Glycerol heeft als voordeel dat het niet alleen betaalbaar en goed beschikbaar is, ook is het voor gisten niet fermenteerbaar waardoor het mogelijk ook een beetje extra robuustheid geeft mocht er in de bioreactor lokaal anaërobie optreden.



**Figuur 324: onderzoek naar koolstofbronnen.**

Tenslotte zijn organische en minerale media met elkaar vergeleken. De *C.Subvermispora* groeit het beste op een rijk organisch medium van enkel glycerol en Nutrolase (een reststroom uit de aardappelverwerkende industrie). Dit zijn beide tegen lage kosten commercieel verkrijgbare biobased reststromen. Hier hoeft alleen nog een zuur aan toegevoegd te worden om de pH op 3,5 te stellen. Deze opzet geeft veel minder complexiteit in vergelijking met minerale media die uit veel verschillende ingrediënten bestaan. Hoewel dit een heel aantrekkelijke optie leek, is hier later op teruggekomen omdat bleek dat er door het gebruik van nutrolase vanwege zijn rijke samenstelling relatief meer infecties optraden dan met een simpel mineraal medium.

Het mineraal medium gaf een mindere goede groei. Er is daarom ook onderzoek gedaan naar benodigde toevoegstoffen. Het bleek dat thiamine (vitamine) belangrijk was voor de groei van *C.Subvermispora*.



Figuur 35: vloeibare kweek met een eenvoudig mineraal medium met Biotine (B), Thiamine (T) vergeleken met geen toevoeging (0) en nutrolase (+)

### Selectieve groeicondities

Na optimalisatie van het groeimedium is lang gefocust op selectiviteit van de kweek. Schimmels zijn trage groeiers die op houtige materialen hun eigen ecologische niche vinden. Hier komen ze als een van de weinige organismen aan voedsel door met hun enzymen lignocellulose buiten de cel af te breken en vervolgens de vrijkomende suikers op te nemen. Schimmels zie je altijd op oppervlakten groeien waar ze zowel aan voedsel als aan zuurstof kunnen komen. In de paddenstoelen industrie wordt hier handig gebruik van gemaakt door de inzet van 'solid state' processen. Solid state fermentatie zou daarom ideaal zijn voor de kweek, maar is mechanisch veel lastiger te realiseren dan vloeibare kweek. Daarom is ervoor gekozen om de vloeibare kweek verder door te ontwikkelen. In vloeibaar medium geeft 'liquid surface growth' goede resultaten. Wanneer de schimmel op de oppervlakte van het medium groeit vormt hij een laag die aan de ene kant de voedingsstoffen uit het medium kan opnemen en aan de andere kant de beschikbare zuurstof uit de lucht. Dit bespaart beluchtungskosten en ook raakt door het vormen van een mycelium laag het medium minder snel geïnfecteerd met andere micro organismen. Wederom was het lastig om hier een mechanisch goed functionerende bioreactor voor te ontwerpen. Daarom is de 'submerged' vloeibare kweek in batch systemen verder doorontwikkeld.

Er is gekozen voor een batch proces omdat enerzijds de verwachting is dat een continu proces op een gegeven moment infecteert en anderzijds is het bij schimmels belangrijk om te werken met een constante genetische bron door steeds terug te gaan naar de moeder cultuur. Dit bleek ook daadwerkelijk uit testen waarin na het vijf tot tien keer doorzetten van een kweek de schimmels niet goed meer wilden groeien.

In vloeibare kweek is er volop concurrentie van bacteriën, gisten en andere 'groene' schimmels zoals *Trichoderma*, *Penicillium* en *Aspergillus* soorten. Aangezien witrotschimmels van al deze groepen de meest trage groeiers zijn is het niet logisch dat de concurrentie gewonnen kan worden. De oplossing hiervoor is om heel schoon te werken, dit past echter minder goed bij decentrale productieketens voor groen gas. Daarom is er in dit project focus gelegd op het vinden van het meest robuuste kweekmedium.

Uiteindelijk is gebleken dat de beste samenstelling voor vloeibare kweek een arm mineraal medium met glycerol als koolstofbron op zeer lage pH van 2,5-3,5 met toevoeging van vitamine B1. Er zijn daarnaast veel additionele toevoegstoffen gescreend en geoptimaliseerd voor toepassing in dit medium. We voegen aan het recept enkele verschillende stoffen toe die niet toxisch of schadelijk zijn en die geen nadelig effect op de groei van witrotschimmels. De specifieke details (type en concentratie) van de toevoegstoffen houden we vertrouwelijk. Maar er kan onder andere worden gedacht aan stoffen als organische zuren en aromatische verbindingen. Na optimalisatie remden deze stoffen succesvol de groei van concurrerende bacteriën en schimmels. Besmetting met bacteriën en de agressieve *Trichoderma* schimmels werd hiermee volledig voorkomen. Wel is er nog enkele malen een besmetting opgetreden van een gist die sneller groeit dan een schimmel. Ook is er eenmaal met moleculaire technieken een besmetting opgespoord van een *Penicillium* schimmel die visueel in de kweekreactor lastig van de *C.Subvermispora* te onderscheiden was.

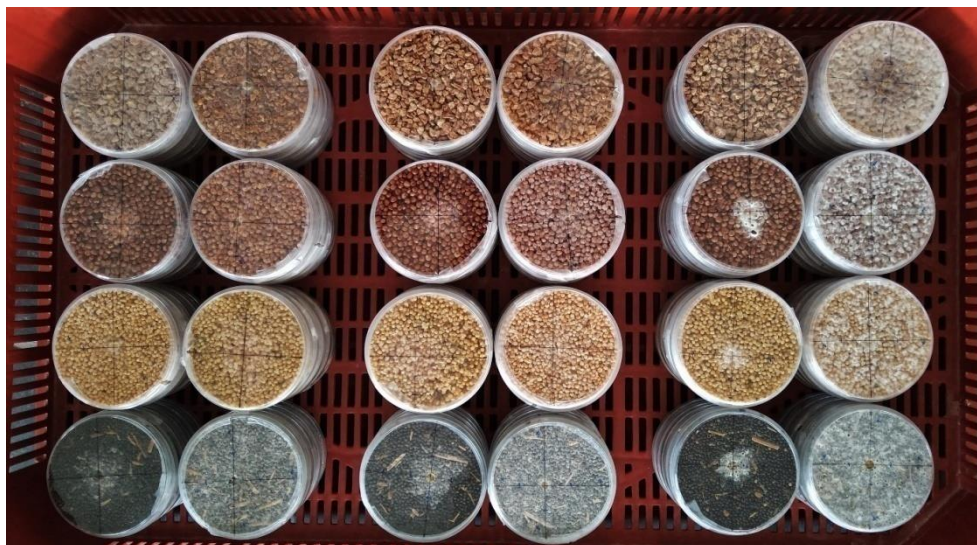
Deze resultaten onderstrepen dat er een redelijk robuust medium ontwikkeld is, maar dat er tegelijkertijd nog ontwerpeisen aan de kweekreactor gesteld worden met betrekking tot inoculatie en hygiënisatie. Met name de besmetting met gist bleek redelijk hardnekkig. Door de snelle groei van gisten kan een batch volledig geïnfecteerd raken en anaeroob worden. Aangezien gisten eencellige schimmels zijn die uitstekend groeien op lage pH was het moeilijk om geschikte stoffen te vinden die selectief infectie konden voorkomen. Er is in de opschalingsfase gebleken dat met goede procescontrole dit geen probleem hoeft te zijn. Dit geeft wel ontwerpeisen aan het kunnen hygiëniseren van de reactor, het schoon kunnen toevoegen van entmateriaal en de kwaliteit van het gebruikte water.

### Enzymproductie

Als belangrijke bijvangst in het project is er gevonden dat middels deze vloeibare kweek onder de juiste omstandigheden ook oxidatieve enzymen (mangaan peroxidase, laccase) geproduceerd worden. De productie hiervan is verder verhoogd via het toepassen van co-culturing en het toevoegen van inducerende stoffen in het kweekmedium. Via een design of experiments studie zijn de optimale combinaties geselecteerd en gevalideerd waardoor uiteindelijk 1500 U/l laccase met 65 U/l mangaan peroxidase kon worden verkregen en ook 450 U/l laccase met 400 U/l mangaan peroxidase.

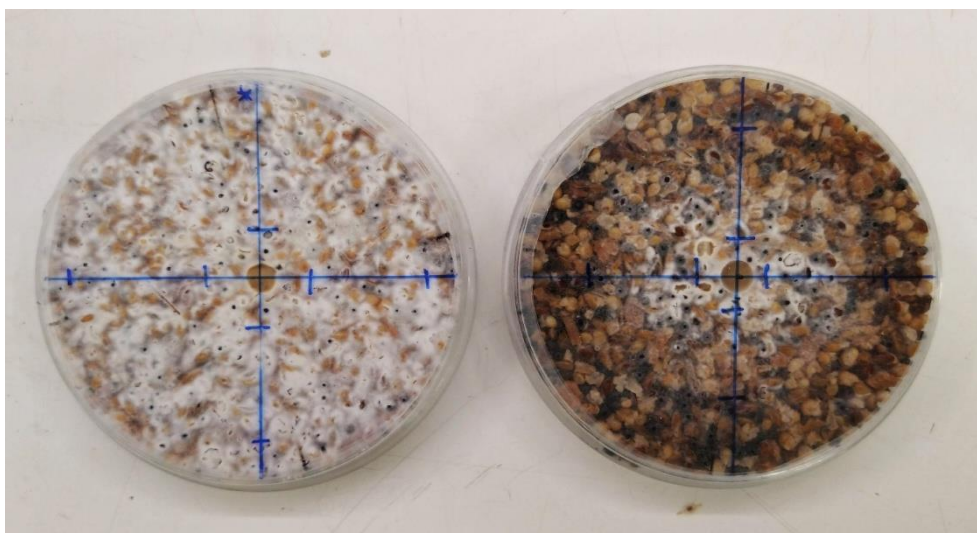
### Broedproductie

Dit werkpakket is afgesloten met het vertalen van de opgedane inzichten naar een commercieel graanbroed. Bij Mycelia zijn voor de verschillende stammen *C.Subvermispora* testen uitgevoerd met al de commercieel beschikbare granen (tarwe, gerst, gierst, koolzaad, rijst, haver, sorghum, mais) op zowel neutrale als lage pH gebufferd op pH3,3. Op alle granen groeide de schimmel een factor 4 sneller bij lage pH versus normale pH, mais was hierop de uitzondering. Het dikaryon MES15706 vormde een dichter mycelium dan de monokarya (MEST13094, MES15032, MES15023, MES15022).



Figuur 36: kolonisatie onderzoek.

Er is op basis van dit onderzoek een standaard commercieel graanmengsel samengesteld en gekwalificeerd voor de axenische productie van broed via solid state fermentation. Hoewel sommige individuele granen beter presteerden dan het mengsel, blijft het mengsel een goede, robuuste en economische keus.



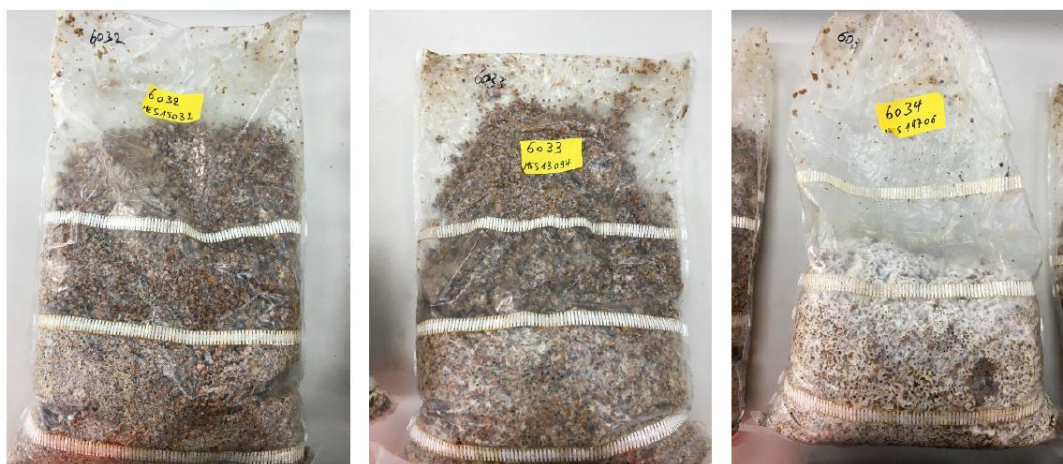
Figuur 37: het samengestelde standaard recept op lage pH (links) vs. op neutrale pH (rechts) voor MES14706.

## 5.8 WP 5 – Opschaling

In dit werkpakket zijn opschalingsexperimenten uitgevoerd op basis van de inzichten opgedaan in WP1-4. Opschaling is uitgevoerd voor zowel de productie van broed, van vloeibare kweek, voor het pasteuriseren, aanenten en biopulpen van biomassa om een proof-of-concept van biopulping te demonstreren. Aangezien er in dit project geen volledig selectieve condities zijn gevonden blijft de grootste limiterende factor voor een simpel biopulping concept de noodzaak om schoon te werken. Dit is technisch mogelijk, maar brengt hoge kosten met zich mee.

### Inoculum

Allereerst is de samenstelling en pH van het klassieke axenische graanbroed voor *C.Subvermispora* geoptimaliseerd en succesvol gevalideerd in 5L zakken, een gangbare schaal in de paddenstoelen industrie. Dit is dus meteen al full-scale. Hoewel het monokaryon iets beter presteert in de pretreatment, vormt het dikaryon een robuuster mycelium. De zakken kunnen na productie gekoeld worden getransporteerd en opgeslagen op de plek van gebruik. Het broed is gebruikt voor testen op kleine schaal bij Bioclear earth, en op grotere schaal in de Fermi bij CNC en in big-bags bij Mycelia.



**Figuur 38: 5L zakken met broed van MES15032, MES13094 en MES14706.**

Een shelf-life test van een zak met MES13094 liet zien dat na 6-7 maanden opslag op 4°C het broed nog steeds gebruikt kan worden voor inoculatie. Ongeveer de helft van de test runs koloniseert binnen 13 dagen volledig een plaat. Limiterende factor is het mycelium dat de graankorrels aan elkaar 'lijmt'. De daadwerkelijke shelf-life is voor monokaryons dan ook hoger dan voor dikaryons.

Dit graanbroed is op een hoeveelheid van 28 liter broed per ton natte biomassa in big-bag testen gebruikt. Het betrof een gepasteuriseerde big-bag met MES13094 voor zowel tarwestro als Miscanthus en 2 gepasteuriseerde en 2 gesteriliseerde big-bags met MES15032 en Miscanthus. Alle big-bags met graanbroed raakten oververhit waaruit geconcludeerd wordt dat het graanbroed hoog actief is en dat het succesvol in biopulping gebruikt kan worden. Ook is er geforceerde ventilatie nodig om de temperatuur in biopulping te kunnen controleren.

Vervolgens is er door Mycelia een meer innovatief axenisch 'vloeibaar gemaakt' broed geproduceerd dat ook opgeslagen en getransporteerd kan worden. Het betreft een mengsel van gemalen graanbroed met speciale toevoegstoffen die helpen in de oplosbaarheid en het 'plakken' aan biomassa wanneer het wordt toegepast. De verwachte shelf-life voor dit type broed is 2-3 maanden bij opslag op 4°C. Tijdens het opslaan zal de activiteit van het broed langzaam achteruit gaan.

Dit type broed vloeibaar gemaakt broed is succesvol gebruikt in 2L bioreactoren bij Bioclear en 200L bioreactoren bij Mycelia. Ook het graanbroed is in vloeibare kweek gebruikt bij Bioclear. De gehele korrels gingen op een schaal van 2L op de bodem samenklonteren waardoor de schimmel niet in suspensie ging groeien. Het vooraf malen van het graanbroed verhielp dit probleem. Mogelijk zal verder opschalen ook dit probleem kunnen verhelpen. Als de beide types broed met elkaar vergeleken worden, dan is het duidelijk dat het vloeibaar gemaakte broed het beste past bij vloeibare kweek. Er zou voor dit type broed een systeem uitgedacht kunnen worden waarin een suspensie van het vloeibare broed direct in een bioreactor gedoseerd kan worden.

### Vloeibare kweek

De vloeibare kweek is op een schaal van 0,3L, 2L en 10L succesvol uitgevoerd bij Bioclear. Er is begonnen met suspensies in Erlenmeyer en daarna in speciale mini reactoren van 0,3L. Het in WP2 geoptimaliseerde medium is gebruikt. In latere testen is het graanbroed en vloeibaar gemaakt broed gebruikt. Ook is de kweek zelf als broed gebruikt voor een tweede kweek om het seed fermentor concept te demonstreren. Essentiële conditie in de kweek van schimmels is het creëren van voldoende mening, door middel van het toedienen van lucht via de bodem van het kweekvat.

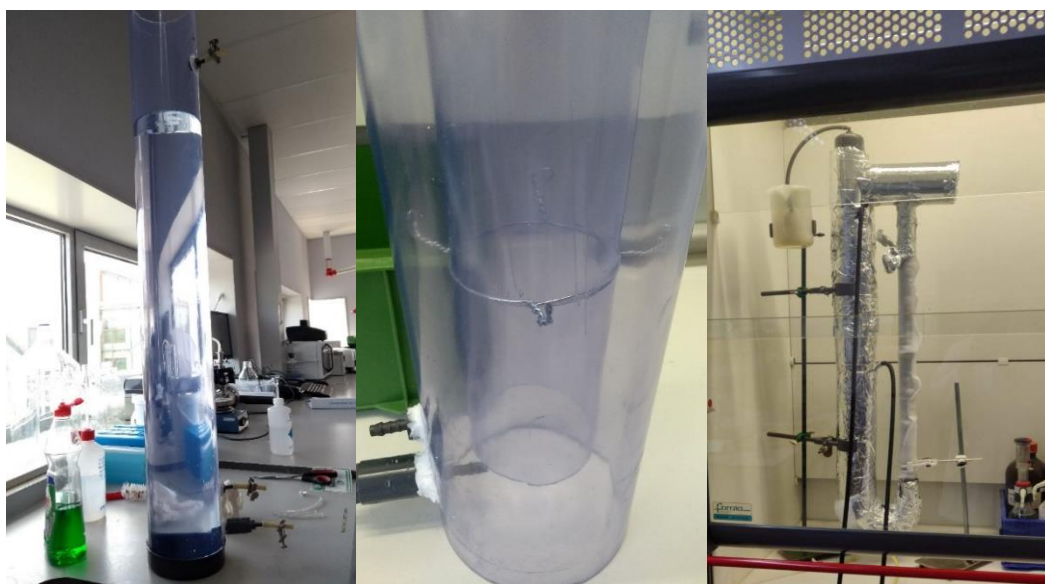
Tijdens deze werkzaamheden zijn er verschillende type reactoren getest om zo te bepalen waaraan een opschaling moet voldoen om een culture succesvol te kunnen kweken. De eerste testen zijn uitgevoerd in glazen flessen waarbij de flessen actief zijn belucht terwijl deze zijn verwarmd in het waterbad. Dit resulteerde uiteindelijk in een schimmelbal aan het uiteinde van de zuurstof slang waardoor het beschikbare oppervlakte laag blijft en de zuurstof toevoer op termijn kon gaan blokkeren. Wanneer de flessen onder een hoek geïncubeerd worden, ontstaat er een circulaire stroming door het medium heen waardoor de resulterende wervelingen de biomassa tot afzonderlijke ronde deeltjes (pellets) kunnen vormen, zoals getoond in het rechter paneel. Dit zorgt ervoor dat de effectieve dichtheid van de schimmelbiomassa in vloeistof flink kan stijgen en de grondstoffen uit het medium beter kunnen worden omgezet.



Figuur 39: onvoldoende gemende kweek (links) en voldoende gemengde kweek (rechts).



Na het vaststellen dat vorm/circulatie van de luchtstromen een grote invloed hebben op de uiteindelijke morfologie, zijn er drie verschillende type 'airlift' reactoren gebouwd en getest. Bij deze reactoren wordt de lucht inlet gebruikt om ook mengen/stroming te creëren in de culture. De varianten berusten op de volgende principes. De eerste reactor is een 'bubble column' reactor en bestaat uit een simpele cilinder waarbij de lucht van onder wordt aangevoerd en aan het oppervlakte van het medium ontsnapt waarbij de pellets niet kunnen dalen. De tweede reactor is een zogenaamde 'internal loop airlift' reactor. In deze reactor gaat de luchtstroom van onder naar boven door de binnenste cilinder, waardoor de schimmelpellets naar boven worden gedrukt. Hierna dalen de pellets weer via de buitenste ring naar beneden. De derde reactor was een zogenaamde 'external loop' airlift reactor en bestond uit twee parallelle cilinders waar de lucht van onderin de brede buis wordt aangevoerd om de pellets omhoog te brengen waarna deze kunnen verzamelen in de zijwaarts nok van de reactoren. De vloeistof stroomt hierdoor rond en de pellets gaan via de tweede cilinder weer dalen richting de luchttoevoer.



**Figuur 40: 3 airlift reactoren. Bubble column (links), Internal loop (midden) en external loop (rechts).**

Experimenten met deze type reactoren hebben laten zien dat de verschillende vormen van luchttoevoer geen grote invloed hebben op de wijze waarop de schimmel zich binnen een vloeibare culture ontwikkeld zolang er voldoende kracht wordt uitgeoefend om het materiaal in beweging te houden. Op het moment dat deeltjes stil komen te staan, handelt de schimmel zoals deze in de natuur zou doen; vanuit de pellets ontstaan dunne schimmeldraden die om zich heen grijpen om het netwerk uit te breiden. Deze draden plakken aan alles vast wat een negatieve feedbackloop veroorzaakt en de pellets weer samenkomen tot één schimmelmassa.

Ook hebben deze proeven bevestigd dat een redelijke mate van schoon werken cruciaal is voor het voorkomen van ongewenste besmettingen. Er zijn vele experimenten geweest waarbij besmettingen in bovenstaande prototypes ervoor zorgden dat voor experimenten opgestelde hypothesen niet konden worden beantwoord.

In de experimenten bleek dat kweek van schimmels in alle type reactoren mogelijk was. Hoe simpeler de reactor, hoe succesvoller de kweek. Dit had met name te maken met het kunnen schoon houden van het proces. Er is daarom geconcludeerd dat de meest simpele reactor, de bubble column, het beste past bij het biopulping proces.

Aan deze reactor kan nog een mechanische roerder worden toegevoegd voor het creëren van meer afschuifkrachten voor het verbeterd suspenderen van de schimmel en het controleren van de pelletgrootte via het dispergeren van de schimmel.

Met deze opgedane kennis zijn de laatste laboratoriumexperimenten ingezet met reactoren van 2 en 10 liter waarbij het mogelijk was om alles onderdelen schoon te maken middels pasteurisatie of sterilisatie. Pasteurisatie voldeed in de meeste gevallen, maar niet altijd. In de praktijk zou dit ook kunnen met heet water, stoom en/of UV. Om op grote schaal niet het gehele medium te hoeven verhitten is UV een goede optie om tegen lage energie input in ieder geval het ingaande water vrij te krijgen van micro organismen.

De reactoren zijn opgebouwd uit één kweekruimte waarin gefilterde lucht, vanuit een centraal punt, onderin de reactor wordt aangevoerd. Wanneer de verhouding tussen het volume medium en het volume lucht over tijd hoog genoeg wordt ingesteld (0.5 tot 1,0 verversingen van het reactorvolume per minuut), zal er binnen de kweekruimte genoeg menging zijn om de schimmel succesvol te kweken. Gezien de geringe groeisnelheid van schimmels is de voor menging toegevoegde lucht een overmaat en is het actief dispergeren van de lucht niet nodig om de kweek aerob te houden.

Deze kweken zijn een aantal malen succesvol herhaald. Typische opbrengst lag in orde grootte 5 gram per liter (range 3-6 gram per liter) aan drooggewicht schimmel met een batch cycle tijd van 7-10 dagen. Ook zijn de kweken van batch tot batch doorgezet. Na het doorzetten van de kweek verkorte de batch cycle tijd naar 4-5 dagen.



**Figuur 41: de 2L reactoren en de 10L reactor voor vloeibare kweek.**

Schuimvorming is een mogelijk aandachtspunt in dit type beluchte reactoren. Door te switchen van het complexe organisch medium op basis van nutrolase naar het arme mineraal medium kon schuimvorming voorkomen worden. Het toevoegen van antifoam is ook succesvol getest.

Een roerder kan eventueel toegevoegd worden om te suspenderen en dispergeren bij hoge biomassa concentraties. Dit is een aantal malen succesvol gedemonstreerd voor de 2 liter reactor, maar dit gaf niet direct een duidelijke meerwaarde. Als er actief geroerd wordt dient er een optimum gevonden te worden tussen de minimale energie input die nodig is voor een bepaalde menging en een maximale energie input. Een te agressieve menging levert te veel mechanische stress op en inhibeert de schimmelgroei.

De natuurlijke neiging van schimmels is om op vaste oppervlakten te groeien. Dit was soms ook het geval binnen de kweekreactoren en heeft negatieve consequenties voor de groei en het oogsten van de schimmel, het schoonmaken van de kweekomgeving en dus de gehele betrouwbaarheid van herhaaldelijke productie binnen de installatie. Tijdens de testfasen van het project is voornamelijk met glas gewerkt. Wanneer dit materiaal wordt gebruikt is enige constante vloeistofstroom over het oppervlakte voldoende om eventuele vaste schimmel los te spoelen en terug te brengen in oplossing. Op grote schaal is dit echter niet mogelijk waardoor elektrolytisch gepolijst staal het best inzetbare materiaal voor grote kweektanks zal zijn.

Na het uitvoeren kweekexperimenten op deze laboratorium schaal zijn er twee productiecycli gedraaid bij Mycelia. Hierbij is er gebruik gemaakt van een vloeibaar gemaakte vorm van het broed, wat tijdens WP 2 ontwikkeld is, om zo 200L volumes van het robuuste vloeibare schimmel aan te enten. Deze test is uitgevoerd in steriele kweekvaten waarbij de lucht van onder is aangevoerd met een verversing van 0,5 reactorvolumes per minuut om zo menging te creëren binnen de culture. De temperatuur was 25°C in de reactoren. Na incubatie was de biomassaconcentratie in de eerste run 1,5g/l, en 0,1g/l. De fermentor met de hoge biomassaconcentratie kon niet worden doorgezet vanwege een mechanische blokkade. De fermentor met lage biomassaconcentratie is toen gekoeld opgeslagen en later is 10 liter (5%) van de reactorinhoud doorgeent naar een nieuwe fermentor. In deze sequentiële kweek werd een biomassa concentratie van 3g/l gehaald. Deze laatste kweek om de big bags op 1%, 2% en 5% aan te enten. Hierbij zijn cultures gekweekt die gestart zijn met gekoeld ent materiaal of kweekproduct uit een voorafgaande cyclus. Hiermee is aangetoond dat het doorzetten van een kleine (en schonere) start culture naar een groter productievolume mogelijk is middels deze methode.

### **Biomassa pretreatment**

Tenslotte is de biopulping van biomassa zelf opgeschaald. Bij Bioclear is er op kleine schaal gewerkt aan het verkrijgen van optimale en selectieve condities voor het inoculeren van biomassa. Tijdens de gehele onderzoeksperiode zijn verschillende vloeibare kweek producten ingezet om kleine porties substraat voor te bewerken met schimmel om vast te stellen hoe nieuwe vloeibaar gebaseerd ent materiaal zicht verhoudt tot traditioneel graanbroed. Wanneer het voorbewerkingsproces correct verloopt, zal het substraat veranderen van kleur door het plaatsvinden van oxidatiereacties en niet zichtbaar besmet raken met groene schimmel. Als het stro schoon is gemaakt via pasteurisatie dan is dit succesvol. Een zeer lage pH van 2,5-3 maakte het stro ook selectief, echter dit bleek niet een betaalbare optie gezien de grote hoeveelheden benodigd zuur. Voor de vloeibare kweek zijn gelijke hoeveelheden gemalen broed vergeleken met de pellets en tot suspensie gemalen pellets.



**Figuur 42 kleinschalige kolonisatie experimenten.**

In deze testen is waargenomen dat het graanbroed en de schimmelpellets zelf zich het makkelijkst kunnen vestigen en verspreiden in vergelijking met de suspensie.

Tenslotte is de beoogde keten voor het gehele concept bij Bioclear integraal op kleine schaal gedemonstreerd: vloeibaar gemaakt broed is gebruikt voor een eerste kweek in de seed fermentor, een kleine hoeveelheid van deze kweek is doorgezet in de productie fermentor, dit materiaal is gebruikt om stro te inoculeren en koloniseren. Een hoeveelheid aan vloeibare ent van 5% van de biomassa met een concentratie van 5g/l aan schimmel drooggewicht, zoals becijferd in WP6 was hiervoor voldoende.

Bij CNC zijn uitgebreid testen uitgevoerd in het Fermini systeem om stro op een natuurlijke wijze te pasteuriseren op een schaal van 70-80kg. De aanpak en resultaten staan uitgebreid beschreven in de WUR rapportage. De testen waren ondanks alle verschillende settings door de geringe warmte ontwikkeling helaas niet succesvol. Ook is in deze en andere testen gebleken dat de ingaande biomassa wel degelijk een pasteurisatie dient te ondergaan om een goed biopulping resultaat te verkrijgen. Het aanzuren van de biomassa zelf tot pH4 was onvoldoende beschermend. Het gebruik van al gepasteuriseerd stro was niet succesvol vanwege een te hoge start pH van 8-9. Een grotere schaal van enkele tonnen biomassa lijkt nodig om ook de pasteurisatie te kunnen valideren.

Als afsluitende test zijn bij Mycelia tarwestro en Miscanthus in twaalf big-bags voorbehandeld met verschillende types broed (graan vs. vloeibaar) onder verschillende typen hygiënisatie (pasteurisatie vs. sterilisatie) en verschillende concentraties aan vloeibaar broed (1%, 2%, 5%). Op deze schaal van 500kg is gebleken dat vloeibaar broed goede resultaten gaf. Het duurdere graanbroed was nog actiever en zorgde daardoor voor oververhitting. Hiermee is aangetoond dat er zeker mechanische ventilatie nodig is om het proces te kunnen beheersen. De meeste big-bags zijn hierdoor oververhit geraakt waardoor de gewenste schimmels zijn afgestorven. De met vloeibaar broed aangeente big-bags met tarwestro zijn ook oververhit geraakt, een indicatie voor goede activiteit. Het lastiger afbreekbare Miscanthus raakte niet oververhit met vloeibaar broed. In deze big-bags was uiteindelijk wel kolonisatie, maar geen ontkleuring te zien die typisch is voor biopulping. Samples zijn getest op vezelsamenstelling maar er kon geen lignine afbraak worden aangetoond. Het vermoeden is ontstaan dat de tweede stap van vloeibare kweek geïnfecteerd is geraakt. Wel is met deze test aangetoond dat het concept van vloeibaar broed kan werken, 2% broed is waarschijnlijk hiervoor al genoeg.

Deze onderzoeks- en opschalingsresultaten geven aan dat er ondanks de grote vooruitgang in het beheersen van de techniek, er helaas geen doorbraak is gevonden in het onder selectieve condities kunnen koloniseren van de biomassa. Hierdoor blijft biopulping een kostbare techniek die een enorme kapitaalsinvestering vergt waardoor de meerwaarde voor de praktijk relatief gering zal zijn.

De meest voor de hand liggende vervolgstap is om in combinatie met papierproductie te onderzoeken of ook 1-2 weken koloniseren onder schone omstandigheden volstaat om de biomassa selectief te maken. Dit wordt bevestigd door de business case. In deze productie moet dan mechanisch geventileerd worden en ook kan graanbroed vergeleken worden met vloeibaar broed. Een andere vervolgstap kan het enzymatisch voorbehandelen van biomassa zijn. Verder kan het vloeibaar kweekconcept en de enzymatische activiteit van de witrotschimmels mogelijk breder ingezet worden in verschillende toepassingen.

## 6 Conclusies

De projectresultaten en de daaruit voortkomende conclusies zijn al uitgebreid beschreven in de individuele hoofdstukken. Deze conclusie vat de verschillende cruciale aspecten die in dit project zijn blootgelegd voor het slagen van het biopulpingproces en de bijpassende oplossingen om deze aspecten op de juiste manier te sturen samen.

### *Vloeibaar broed*

Ten eerste is er een ontwerp opgesteld voor hoe een grootschalige bioreactor voor het vloeibaar kweken van de schimmel eruit zou moeten zien. Enkele speerpunten van deze installatie zijn; 1. het schoon inbrengen van de componenten voor het vloeibare medium. 2. Het genereren van voldoende menging om de schimmeldeeltjes in suspensie te houden. 3. Het effectief en schoon verplaatsen van volgroeide cultures naar opslagtanks of andere downstream processen. 4. Het adequaat kunnen schoonmaken van de reactoren door het gebruik van C&SIP of vergelijkbare technieken. Daarnaast is het gebruik van schoon en actief (vloeibaar) broed om het systeem mee aan ten enten cruciaal voor het creëren van een betrouwbaar kweekproces. Elk van deze aspecten kan een mogelijk kritisch breekpunt zijn voor deze initiële fase van het voorbereidingsproces. Dit resulteert in het feit dat de benodigde installatie een grote investering vereist op basis van de karakteristieken waar deze aan moet voldoen. Dit staat haaks op de vereisten voor het opereren in de energiemarkt waar wordt gewerkt met (relatief) laagwaardige eindproducten en dunne marges op productie.

### *Biomassa kolonisatie*

Ten tweede is maximale kolonisatie van groene grondstoffen van groot belang voor het in staat stellen van de schimmel om de beschikbare lignine zo ver mogelijk af te breken. De belangrijkste succes factor in dit proces is het creëren van selectieve groeiomstandigheden waardoor alleen de witrotschimmel het materiaal kan koloniseren. Traditioneel gezien worden hier tunnels voor gebruikt waarbij de grondstoffen met een temperatuurbehandeling aanwezig competeerende organisme worden afgedood. Een kosten effectieve variant hierop is het recreëren van de selectieve groeiomstandigheden uit het vloeibare medium uit het kweekproces. Uitgevoerde testen hebben aangetoond dat wanneer de witrotschimmel wordt aangebracht op schone grondstoffen, kolonisatie goed verloopt en de voorbehandeling kan plaatsvinden. Echter is de genoemde kosteneffectieve oplossing niet genoeg om de witrotschimmel de kans te geven om de grondstoffen goed te koloniseren en dus voor te behandelen.

### *Kapitaalslasten*

Ten derde zullen de investeringen die nodig zijn om een biopulping proces op te zetten moeten worden terugverdiend. Voor nichetoepassingen zoals bijvoorbeeld papier uit Miscanthus kan gebruik worden gemaakt van bestaande tunnelcapaciteit in de paddenstoelenindustrie. Voor groen gas productie op grote schaal moet het proces lokaal echter opgezet worden en betaald kunnen worden vanuit een meerwaarde afkomstig uit een verhoogde biomethaan opbrengst uit de grondstoffen. Na het uitvoeren van vele vergistingstesten zijn de belangrijkste observaties dat de meerwaarde vaak niet voldoende is om de investeringskosten op een redelijk termijn terug te verdienen en dat correcte voorbehandeling vaak hand in hand gaat met het verlies van droge stof.

Dit laatste aspect heeft het grootste effect wanneer er substraten worden gebruikt met een laag lignine gehalte aangezien er relatief weinig vergistbare stof wordt ingekapseld door dit netwerk en je dus niet veel wint met het biopulpen ten opzichte van het droge stof verlies. In het extreme geval kan dit zelfs betekenen dat behandeld materiaal een slechtere opbrengst heeft dan onbehandelde materiaal.

### **Beschikbaarheid van grondstoffen**

En ten slotte zijn er de natuurlijke grondstoffen zelf. Er is dus vastgesteld dat een hoog ligninegehalte nodig is om uiteindelijk voldoende biogas meeropbrengst te creëren om het voorbereidingsproces economisch haalbaar te maken. Hierbij kan gedacht worden aan hout, stro, olifantsgras of vlas. Echter zijn deze specifieke grondstoffen juist in de minderheid binnen Nederland. Ook zijn deze grondstoffen vaak afkomstig uit primaire productie en dus niet duurzaam inzetbaar in de productie van groene energie. Grondstoffen zoals grassen, die in grote hoeveelheden verkrijgbaar zijn, zijn vaak te nat, hebben te weinig structuur, bevatten te veel remmende inhoudsstoffen en te weinig lignine om voor te behandelen middels biopulping. Dit maakt het lastig om een dergelijke techniek te implementeren in een gebied waar er geen overvloed is aan de juiste grondstof.

## 7 Discussie

Doel van dit project was om biopulping van het wetenschappelijke domein naar het toegepaste domein te brengen via de ontwikkeling van een generiek en selectief on-site proces om groene reststromen voor te behandelen met het oog op een verbeterde afbraak in groen gas productie en / of als meer hoogwaardige vezel in bijvoorbeeld grafische papieren.

### **Meerwaarde**

Er is gevonden dat biopulping via lignineverwijdering de cellulosevezel inderdaad beter beschikbaar maakt. Hier staat echter tegenover dat door de pretreatment de hemicellulose gedeeltelijk verloren gaat. In vergelijking met onbehandelde biomassa ontstaat er dan de keuze tussen: a) biomassa circa 8 weken voorbehandelen en beschikken over een kleinere hoeveelheid van een beter beschikbare vezel, b) ofwel biomassa niet voorbehandelen en het beschikken over grotere hoeveelheid van een minder goed ontsloten organische stof.

Overall ontstaat het beeld dat biopulping de meeste meerwaarde geeft voor toepassingen; 1) waarin de directe toepassing van de lignocellulose biomassa door de aanwezige lignine niet mogelijk is, en 2) en waar de processtap na de pretreatment een korte verblijftijd heeft. Dit is bijvoorbeeld het bijvoorbeeld het geval voor toepassing van lignocellulose materialen in een papierfabriek (zoals gedemonstreerd in dit project), bij vertering in de pens van een koe, of voor verdere enzymatische ontsluiting richting groene chemie.

Voor het toepassen van biopulping in combinatie met processen met een langere verblijftijd, zoals biovergisting, zorgt biopulping voor een enorme versnelling aan het begin van het proces, maar dit wordt uiteindelijk gecompenseerd door de tijdens voorbehandeling verloren gegane organische stof. Belangrijk inzichten en aanknopingspunten voor groen gas productie zijn dat:

- biopulping een grote meerwaarde geeft als er niet mechanisch verkleind wordt;
- biopulping een mechanische verkleining van lignocellulose biomassa voor vergisting volledig overbodig maakt;
- biopulping voor een enorme versnelling van afbraak gedurende de eerste 15-30 dagen van het vergistingsproces zorgt;
- biopulping wel een verdubbeling in methaanopbrengst geeft voor vergisting vlas met een zeer hoog lignine gehalte van >20%. Aangezien dit type materialen in de praktijk niet gebruikt worden in biovergisting biedt dit mogelijk een kans voor het aanboren van nieuwe feedstocks voor groen gas productie.

### **Beheersbaarheid en kosten**

Het idee om schimmels in te zetten voor het voorbehandelen van natuurlijke grondstoffen stamt al uit de jaren 50. Biopulping is dus al lang niet meer een nieuwe techniek en in de afgelopen decennia is er al veel onderzoek gedaan. Het is echter voor zover bekend nog nooit gekomen tot praktijktoepassingen. Na het uitvoeren van dit TKI project is wederom duidelijk geworden waarom het charmante idee zich inderdaad niet zo makkelijk laat opschalen tot een praktijkproces.

In dit project is geconcludeerd dat wanneer er gekozen wordt voor een robuust proces er geen economisch perspectief is. Echter wanneer er gekozen wordt voor een kosteneffectief proces is er geen technische kans van slagen.

Bepalend hiervoor zijn:

- dat de relatief traag groeiende schimmels de concurrentiestrijd met andere schimmels verliezen;
- dat er geen selectieve condities zijn gevonden waarin biopulping schimmels de ecologische niche volledig kunnen domineren;
- dat er hierdoor een kapitaalintensief benodigd is om besmetting te voorkomen;
- dat de kapitaalslasten verder stijgen door de lange voorbehandelingstijd;
- dat de meerwaarde voor groen gas productie beperkt lijkt voor de in de sector beschikbare substraten met een gangbaar lignine gehalte.

Het is in dit project niet gelukt om een volledig selectief proces te ontwikkelen. In alle testen op zowel biomassa als in vloeibare kweek treedt op enig moment alsnog besmetting op van andere schimmels zoals *Trichoderma* soorten en *Penicillium* soorten of gisten specifiek in vloeibare kweek. Het scenario waarin een eventuele besmetting geaccepteerd wordt is verworpen. Goed gecontroleerde vloeibare kweek is wel een kansrijke innovatie gebleken om de broedkosten te kunnen verminderen.



## 8 Aanbevelingen

### *Mogelijke vervolgstappen*

Een logische vervolgstap, als bevestiging van de beheersbaarheid van het hygiënische procesconcept, is om in een schone omgeving grotere hoeveelheden biomassa voor te behandelen onder controle van temperatuur (mechanische ventilatie). In deze test zou ook een gedeelte van de biomassa na 1 en 2 weken kolonisatie naar een niet schone omgeving gebracht kunnen worden om te onderzoeken of een succesvolle kolonisatie van de biomassa al voldoende bescherming geeft tegen besmetting en oververhitting. Verkorte verblijftijd zou een gecombineerde conserverings- ontsluitingsstap zijn voor de biomassa en de tunnelcapaciteit een factor 4-8 vergroten. Deze test is uitstekend te combineren met het maken van een grote batch voorbehandelde Miscanthus die bij Schut verwerkt kan worden tot een circulair papier.

Op basis van de inzichten uit dit project zou ook opnieuw op zoek gegaan kunnen worden naar de 'ideale' biopulping schimmel. In dit project is de schimmel aan de voorkant met name geselecteerd op de beste performance in selectieve afbraak. In dit project is gebleken dat een zeer snelle groei en kolonisatie en / of de groei onder selectieve condities nog belangrijkere selectie parameters zijn voor praktijktoepassing.

Bioclear earth houdt de behaalde biopulping resultaten voor verbeterde groen gas productie in het achterhoofd tijdens al haar werkzaamheden in deze sector. Wellicht ontstaan er in de toekomst nieuwe openingen voor toepassing van deze techniek.

### *Alternatieve toepassingen witrotschimmels*

Bioclear earth heeft tijdens dit project de volgende aanknopingspunten gevonden voor de inzet van witrotschimmels die interessant kunnen zijn voor verdere inventarisatie:

- De inzet van enzymen of schimmels in waterzuiveringen of bodemsaneringen voor de oxidatie van complexe verontreinigingen die niet door bacteriën worden afgebroken. Dit zijn typisch recalcitrante verontreinigingen die door hun grootte niet een bacteriecel in getransporteerd kunnen worden, maar die schimmels met behulp van hun enzymen wel extracellulair kunnen afbreken.
- Het implementeren van het ontwikkelde concept van vloeibaar entmateriaal in de bestaande markt van paddenstoelenkweek (oesterzwam, champignon), of in de opkomende markt van biobased materialen op basis van mycelium en biomassa.
- De inzet van het vloeibare kweekconcept voor de (on-site) productie van oxiderende enzymen. De schimmel maakt peroxidases aan die niet op commerciële schaal verkrijgbaar zijn. Hoewel laccases commercieel verkrijgbaar zijn produceren witrotschimmels de meest krachtige variant van dit type enzym (de zogenaamde high redox potential laccase).
- De inzet van schimmels ten behoeve van bodemgezondheid en biodiversiteit in de landbouw. Geselecteerde schimmels zouden via bijvoorbeeld houtcompost mogelijk een bijdrage kunnen leveren aan de ziekteverendheid van bodems.
- Voor biopulping het verder ontwikkelen van de toepassing feed voor landen waar weinig eiwitrijke gewassen beschikbaar zijn. Rijststro kan op deze manier bijvoorbeeld beschikbaar worden gemaakt voor herkauwers. De selectiviteit van het proces blijft een uitdaging.
- Voor biopulping processen het tevens benutten van de afbraakproducten van de lignine als bijvangst naast de ontsloten cellulose vezel.

# Bijlagen

Bijlage 1	Vergisting WP3 tarwestro (ADL=8%)
Bijlage 2	Vergisting WP3 Miscanthus (ADL=12%)
Bijlage 3	Vergisting WP3 vlaslemen (ADL=23%)
Bijlage 4	Eerste fase compostering als pretreatment?
Bijlage 5	Stappenschema screeningstesten

## Bijlage 1 Vergisting WP3 tarwestro (ADL=8%)

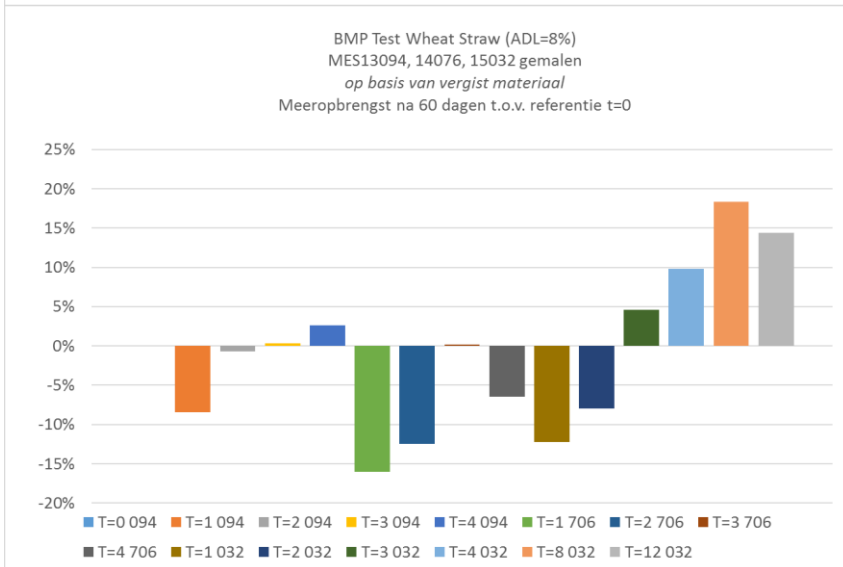
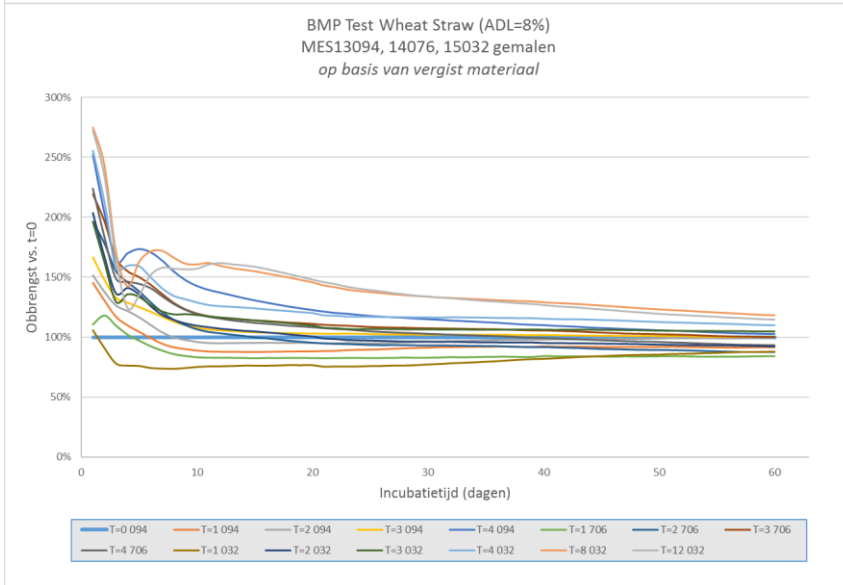
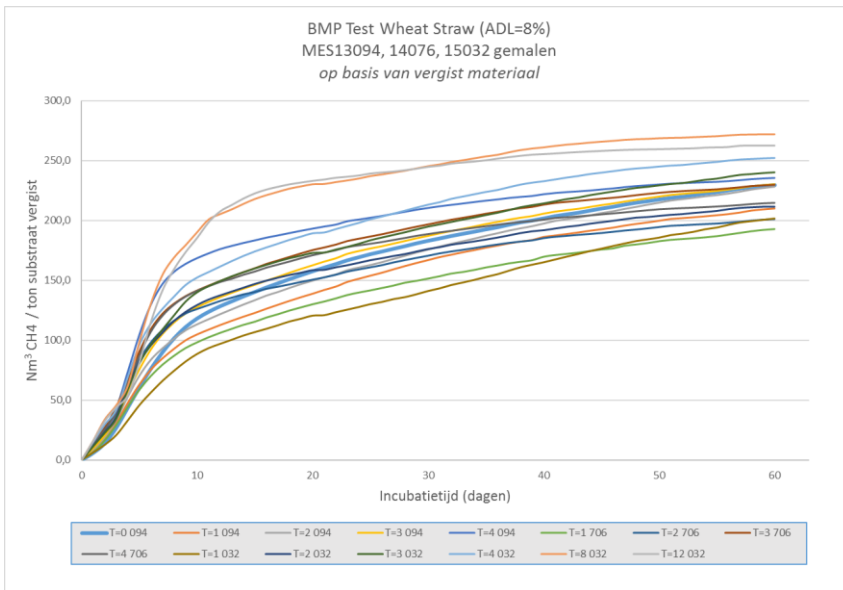
In deze bijlage staan de volledige vergistingsdata weergegeven van tarwestro. Tarwestro (na pasteurisatie 83% vezel, 44% cellulose, 32% hemicellulose en 8% lignine) is in WP3 voorbehandeld met *C.Subvermispora* MES13094, MES14706 en MES15032 door de WUR. De eerste grafiek laat de massabalans zien van de test. Vergisting van gemalen substraat is in triplos uitgevoerd in geroerde batchflessen van 0,5L op een constante temperatuur van 38°C met een ISR (InoculumSubstrate Ratio) van 2,5. Het gebruikte digestaat was afkomstig uit de navergister van Cosun in Vierverlaten. Het CO<sub>2</sub> uit het biogas is afgevangen met 4M NaOH en het geproduceerde CH<sub>4</sub> is continu gelogd. De referentie is tweemaal in triplo uitgevoerd, interne controle was MCC (Microkristallijn Cellulose, niet weergegeven). De testen zijn goed verlopen.

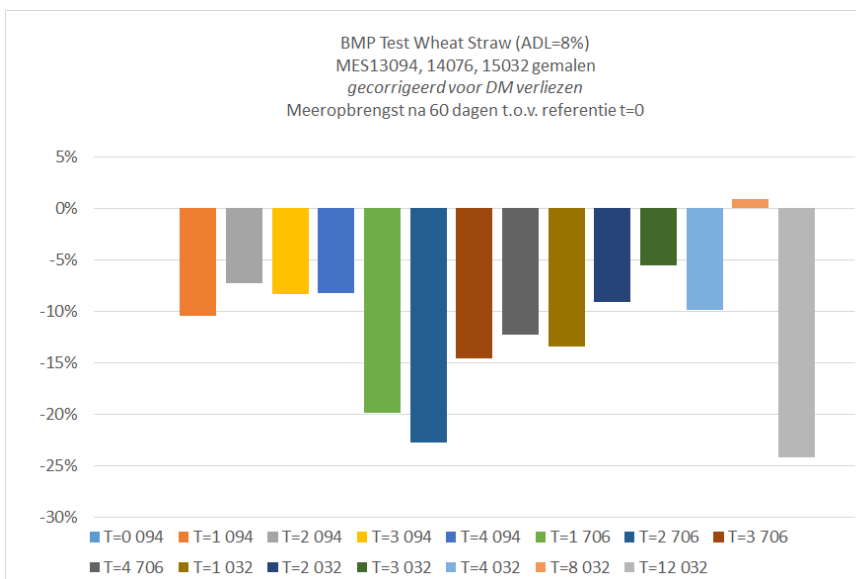
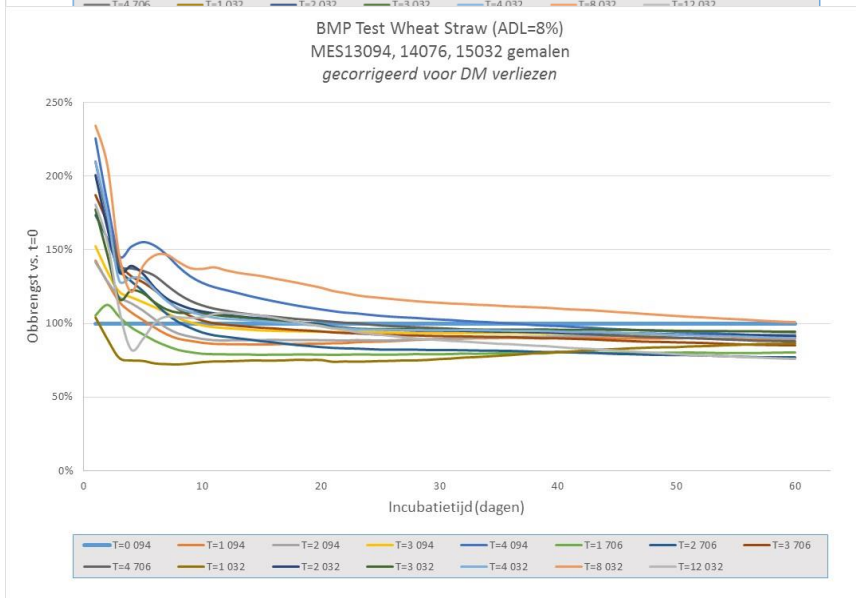
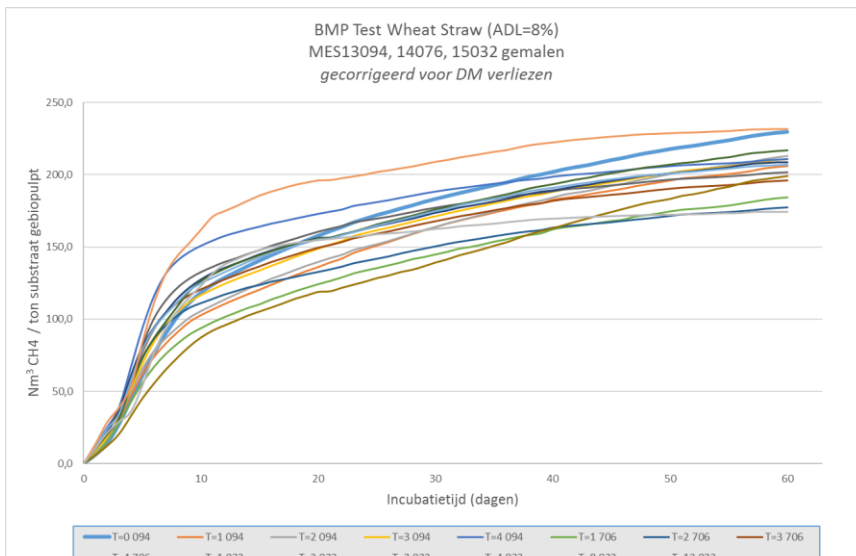
De opbrengst (biomethaan per hoeveelheid vergist tarwestro) is, als er niet gecorrigeerd wordt voor droge stof verlies tijdens de voorbehandeling, na 60 dagen als volgt:

- De biomethaan opbrengst neemt toe met toenemende voorbehandelingstijd.
- Na 1 week voorbehandeling geven alle stammen nog een minderopbrengst.
- Er is een duidelijke versnelling van de vergisting te zien ten gevolge van voorbehandeling.
- MES 15032 is de best presterende stam. Voorbehandeling van 8 weken is het optimum.
- De meeropbrengst van maximaal +18% t.o.v. de referentie blijft bescheiden.

Echter na correctie voor droge stof verlies tijdens het biopulpen dan is het volgende te zien:

- Er is geen meeropbrengst na 60 dagen vergisting. De referentie is samen met MES15032 t=8 weken de best presterende stam. De overige stammen geven een minderopbrengst van -5% tot -25% t.o.v. de referentie.
- De meeste stammen geven een versnelling tot 10 dagen vergistingstijd.
- Na 5 dagen vergisting geeft het stro dat meer dan 1 week voorbehandeld is een duidelijke meeropbrengst van +16% tot +73% (zonder correctie voor droge stof verlies) ofwel +9% tot +55% (met correctie voor droge stof verlies) t.o.v. de referentie. Dit geeft mogelijk aanknopingspunten voor de 'Feed' verwaardingsroute.





## Bijlage 2 Vergisting WP3 Miscanthus (ADL=12%)

In deze bijlage staan de volledige vergistingsdata weergegeven van Miscanthus. Miscanthus (na pasteurisatie 88% vezel, 54% cellulose, 22% hemicellulose, 12% lignine) is in WP3 voorbehandeld met *C.Subvermispora* MES15032 door de WUR. De eerste grafiek laat de massabalans zien van de test. Vergisting van gemalen substraat is in triplos uitgevoerd in geroerde batchflessen van 0,5L op een constante temperatuur van 38°C met een ISR (InoculumSubstrate Ratio) van 2,5. Het gebruikte digestaat was afkomstig uit de navergister van Cosun in Vierverlaten. Het CO<sub>2</sub> uit het biogas is afgevangen met 4M NaOH en het geproduceerde CH<sub>4</sub> is continu gelogd. Interne controles waren was MCC en sucrose. De testen zijn goed verlopen.

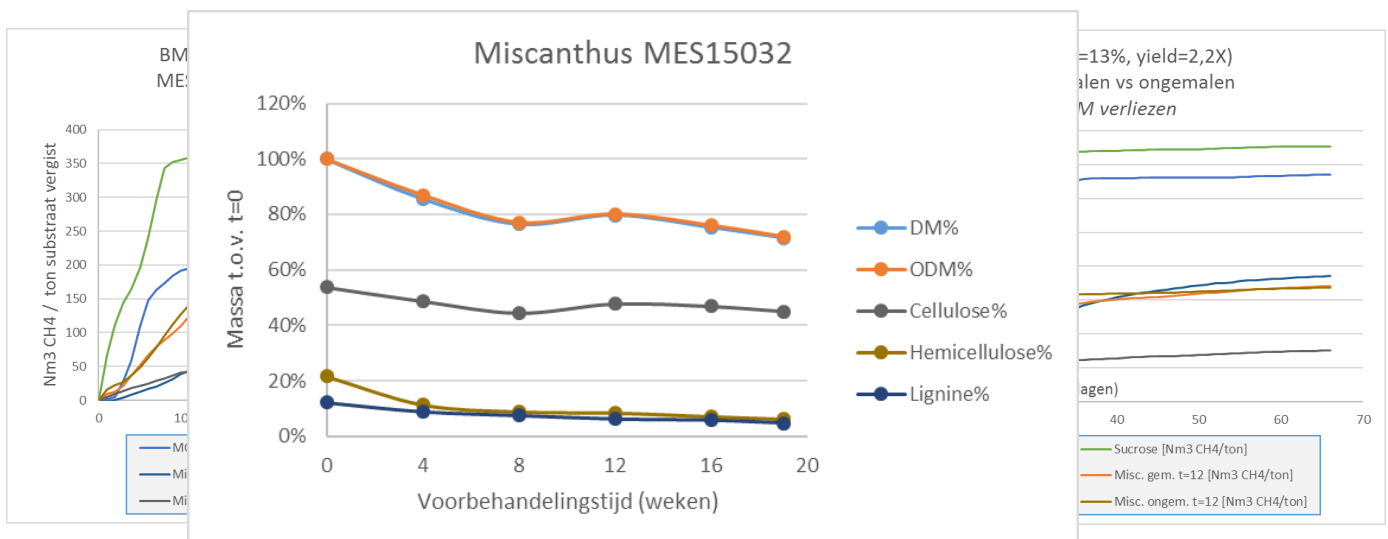
Als de gemalen met de ongemalen Miscanthus wordt vergeleken blijkt er duidelijk dat:

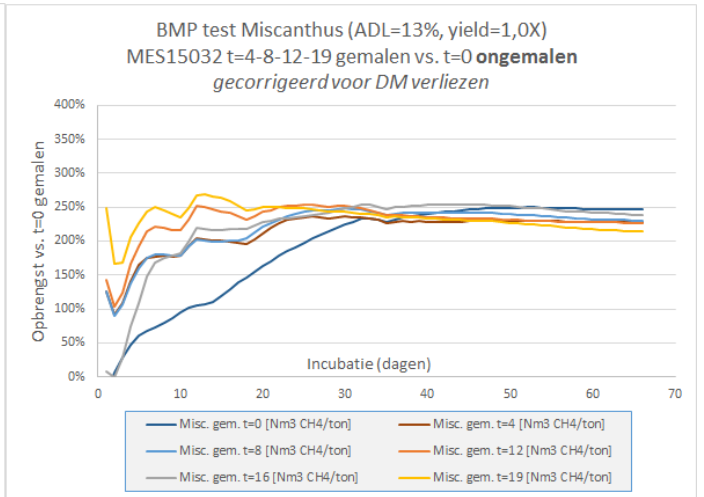
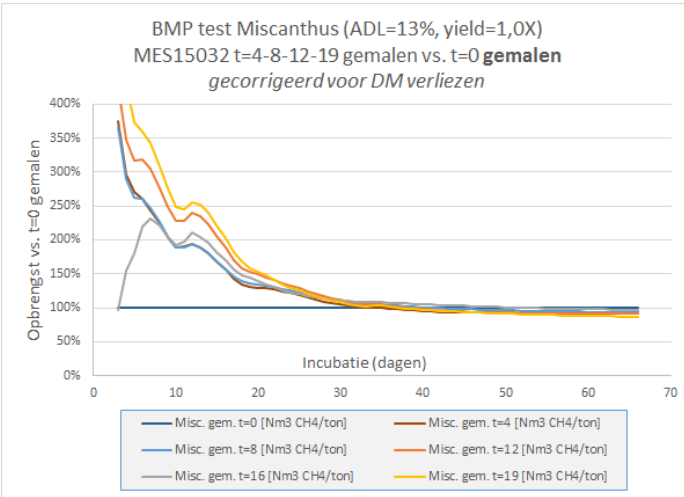
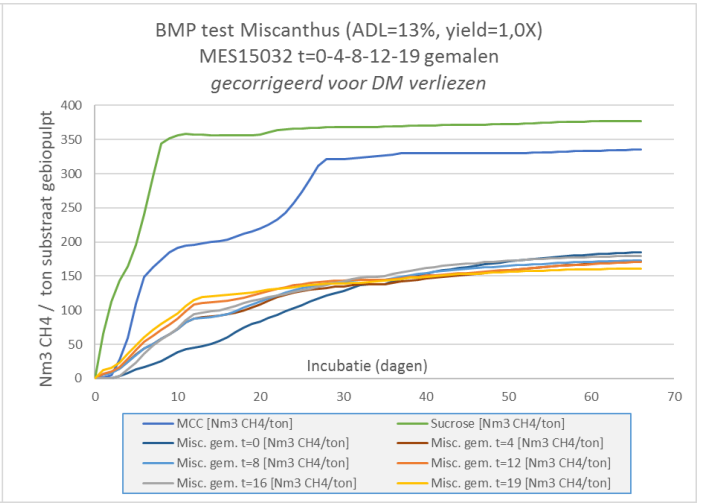
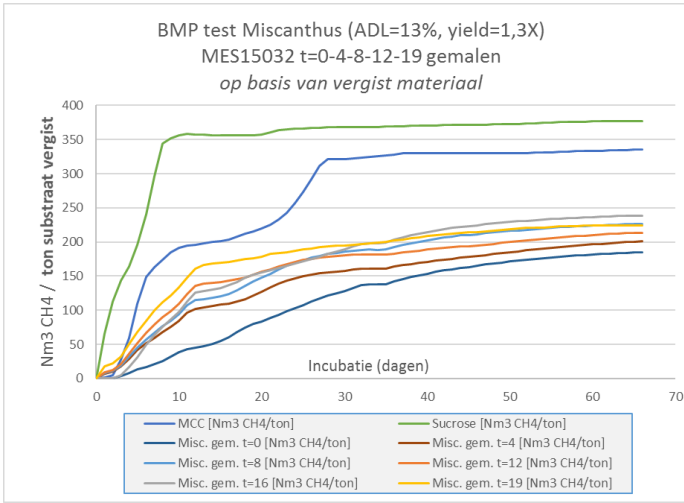
- Ongemalen Miscanthus zeer slecht vergistbaar is.
- Gemalen, maar niet gebiopulpt, Miscanthus redelijk goed vergistbaar is.
- Gebiopulpt Miscanthus ongeveer even veel biomethaan opbrengst geeft, maar veel sneller vergist dan de gemalen Miscanthus.
- Dat als er gebiopulpt wordt, malen geen extra voordeel meer geeft.

Deze resultaten komen overeen met de observatie gedaan tijdens de papiertesten dat biopulping inderdaad de vezels losmaakt uit de strootjes waardoor een chemische of mechanische voorbewerking niet meer nodig lijkt.

Als er voor de gemalen samples naar de tijdserie wordt gekeken dan concluderen we:

- Biopulping versnelt de vergisting gedurende de eerste 30 dagen.
- De versnelling is in de eerste 15 dagen enorm.
- Hoe langer de voorbehandeling, hoe sneller vergistbaar.
- Het materiaal energiedichter wordt, maar als er gecorrigeerd wordt voor droge stof verliezen er na 60 dagen geen meeropbrengst meer over is.
- Als er vergeleken wordt met ongemalen Miscanthus dat de biogasopbrengst een factor 2,1-2,4x toeneemt.





## Bijlage 3 Vergisting WP3 vlaslemen (ADL=23%)

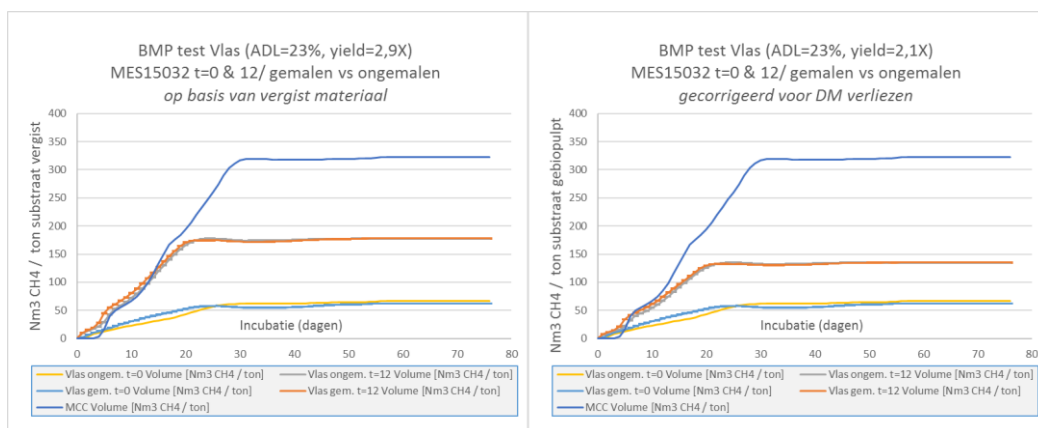
In deze bijlage staan de volledige vergistingsdata weergegeven van vlaslemen. Vlaslemen (na pasteurisatie 83% vezel, 49% cellulose, 11% hemicellulose, 23% lignine) is in WP3 voorbehandeld met *C.Subvermispora* MES15032 door de WUR. Na 12 weken incubatie was nog 76% van de droge stof aanwezig, 78% van de cellulose, 11% van de hemicellulose en 25% van de lignine.

Vergisting van gemalen substraat is in triplos uitgevoerd in geroerde batchflessen van 0,5L op een constante temperatuur van 38°C met een ISR (InoculumSubstrate Ratio) van 2,5. Het gebruikte digestaat was afkomstig uit de navergister van Cosun in Vierverlaten. Het CO<sub>2</sub> uit het biogas is afgevangen met 4M NaOH en het geproduceerde CH<sub>4</sub> is continu gelogd. Interne controle was MCC. De testen zijn goed verlopen.

De resultaten laten zien dat de onbehandelde vlaslemen slecht vergist. Er is geen verschil in de vergisting van losse strootjes en gemalen vlaslemen. Een belangrijk verschil met Miscanthus is het hogere lignine gehalte waardoor vlaslemenrecalcitranter is.

Ook voor de gebiopulpte vlaslemen is er geen verschil tussen gemalen en ongemalen. Echter de opbrengst licht een factor 3 hoger in vergelijking met onbehandeld vlas (op basis van vergist materiaal) en een factor 2 hoger als er gecorrigeerd wordt voor droge stof verliezen ten gevolge van het biopulpen.

Er ontstaat zo een duidelijk beeld dat hoe hoger het lignine gehalte van een substraat, hoe groter de meerwaarde van biopulpen ten opzichte van de niet behandelde referentie. Stro (8% lignine) geeft -5% tot -25% minderopbrengst. Miscanthus (12% lignine) geeft een gelijke opbrengst. Vlas (23% lignine) geeft een verdubbeling van biomethaan opbrengst. Hoe hoger het lignine gehalte, hoe selectiever de witrotschimmels ook op het substraat kunnen groeien.





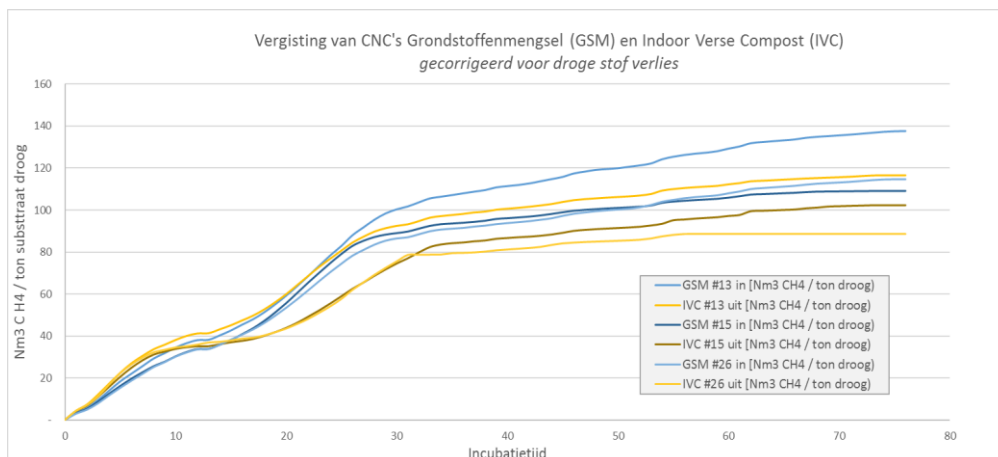
## Bijlage 4 Eerste fase compostering als pretreatment?

Tijdens de opschaling van biopulping is er gebleken dat het erg kostbaar is om de juiste, langzaam groeiende witrotschimmel het substraat te laten koloniseren en langdurig te laten biopulpen. Er is daarom onderzocht of een eenvoudigere pretreatment op basis van een korte compostering in een gesloten omgeving (zoals gedaan wordt in de paddenstoelenindustrie) wellicht biogasproductie kan verhogen. Het voordeel van dit proces is dat er niet onder schone omstandigheden gewerkt hoeft te worden. Dit past qua kosten en karakter goed bij de groen gas sector. Een bijkomend voordeel is dat voor deze pretreatment lignocellulose grondstof gemengd dient te worden met mest. Dit past goed bij agrarische covergisting.

De beoogde werking achter deze ontsluiting is de combinatie van een temperatuur van 75-80°C in combinatie met een hoog gehalte aan ammonia in de lucht en een pH~8. Deze combinatie zorgt dat de ferulicacids en coumaricacids die zeer waarschijnlijk de verbinding vormen tussen lignine en hemicellulose hun bindingen verliezen waardoor gedacht wordt dat de hemicelluloses en cellulose gemakkelijker toegankelijk zijn voor enzymen. De WUR heeft al uitgebreid onderzoek naar dit werkingsmechanisme gedaan, beschreven in het proefschrift van Thibaut Mouthier.

Voor deze test is bij CNC zowel uitgaande product (IVC, IVC\_uit, Indoor Verse Compost, gecomposteerde fractie) als het ingaande substraat (grondstoffenmengsel, IVC\_in) van de eerste fase compostering gesampled, geanalyseerd en vergist. De test is voor drie tunnels uitgevoerd waarin de condities heersen: pH~8-9, NH<sub>3</sub> ~10.000ppm, T=75-80°C, t=5 dagen.

Van Soest analyse gaf een ingaande vezelfractie van 51-57%, bestaande uit 11-13% lignine, 10-13% hemicellulose en 30-31% cellulose. Droge stof verlies door de IVC voorbehandeling was 6-14% aangenomen dat het asgehalte tijdens voorbehandeling constant blijft. De vezelsamenstelling bleef door voorbehandeling gelijkaardig, de hemicellulose was afgenomen naar 6-9%. De vergisting liet zien dat de compostering in de eerste 15 dagen voor een snellere vergisting zorgt, maar dat net als bij biopulping de eindopbrengst gelijk of minder is ten opzichte van de referentie. Zeker wanneer er gecorrigeerd wordt voor droge stof verliezen in het proces. De waarde van groen gas afkomstig uit IVC is bij een droge stof gehalte van 29%, een gemiddelde methaanopbrengst van 115Nm<sup>3</sup>/ton droog, een methaangehalte van 89% in groen gas en een waarde van €0,70/Nm<sup>3</sup> groen gas circa 26 euro per ton grondstoffenmengsel of IVC.



## Bijlage 5 Stappenschema screeningstesten

Met onderstaand stappenschema kan voor een specifieke schimmel op een gestructureerde manier worden vastgesteld wat de mogelijkheden van en eisen aan vloeibare kweek zijn. De stappen worden onderverdeeld in:

- Soort (1)
- Basischecks op plaat (2-4)
- Checks vloeibaar medium (5-7)
- Checks selectief medium (8-9)
- Checks mechanische stress (10-12)
- Eerste opschaling van vloeibare kweek (13-15)
- Toepassing van vloeibare kweek op substraat (16-17).

Checks:

1. Soort – zorg voor de **juiste soort** relevant voor de praktijk en check mogelijke risico's.
2. Plaat – eerst basis groei op plaat. Stel **optimale type agar** vast (PDA, MEA, ..).
3. Plaat – check **invloed van licht/UV** (licht donker) op groei (bioreactor is donker).
4. Plaat – check temperatuur range. Stel de **Tmax** vast via radiale groeisnelheid op plaat.
5. Erlenmeyer – Selectie van een **werkend vloeibaar medium** met glucose (keuze mineraal, Aguiar, Nutrolase, rijk PDB medium). Groeit de schimmel zowel op arme als rijke media?
6. Erlenmeyer – stel **werkende stikstofbronnen** vast (ammonium vs. nitraat vs. ureum vs. organisch) en optimale hoeveelheid (veelal laag voor ammonium vanwege toxiciteit).
7. Erlenmeyer – stel **werkende koolstofbronnen** vast (glucose vs. glycerol vs. sucrose vs. fructose/lactose/citraat vs. cellulose vs. ethanol ..). → Bepaal of de **biomassa yield** per gram koolstofbron naar verwachting is.
8. Erlenmeyer – check **pH range** waarin vloeibare groei mogelijk is en bepaal optimale pH → is een zeer lage pH mogelijk? (selectief medium tegen bacteriegroei).
9. Erlenmeyer / Well diffusion assays – check in welke mate de schimmel tegen **organische zuren** kan (combinatie type, hoeveelheid, pH!) en andere componenten die bacteriegroei vertragen en groei van andere schimmels hinderen.
10. Groeit het mycelium onder verschillende condities van **mechanische stress**? (plaat / erlenmeyer / geschudde erlenmeyer / bubbelkolom / geroerde reactor).
11. Groeit het mycelium ook verder na **blenderen**? (sommige soorten niet).
12. Is het mycelium op substraat **bestendig tegen omschudden**?
13. Lukt het om de soort te kweken in verschillende volumes? (0,1L, 2L, 10L), wat is de biomassa opbrengst, koolstof efficiëntie en de Batch Cycle tijd?
14. Lukt het om de batch (seed fermentor) door te enten in een tweede batch (productie fermentor)? Wat is de invloed op Batch Cycle tijd?
15. Wat is het optimale entmateriaal van de batch kweek? (suspensie, stukjes agar, graan, gemalen graan, vloeibaar gemaakt broed). Gebruik praktijkbroed.
16. Lukt het om met de overmaat vloeibare kweek substraat te inoculeren en te doorgroeien? (overmaat broed).
17. Wat is de benodigde verhouding broed & substraat? Wat is de lag-time (kiemsnelheid) en kolonisationsnelheid? Wat is de sterkte van het mycelium?



**Bioclear earth bv**

Rozenburglaan 13  
9727 DL Groningen  
The Netherlands

**T** +31 (0)50 571 84 55

[info@bioclearearth.nl](mailto:info@bioclearearth.nl)  
[www.bioclearearth.nl](http://www.bioclearearth.nl)