

# **Mestinnovatie “Bioraffinage van veevoergrondstoffen; een verkenning van opties om de verteerbaarheid van veevoergrondstoffen te vergroten en fosfaat te verwijderen”**

K.P.H. Meesters, L.A.M. van den Broek, J.P.M. Sanders

Rapport nr. VPP 2009/004

## Colofon

Titel	Mestinnovatie
Auteur(s)	K.P.H. Meesters, L.A.M. van den Broek, J.P.M. Sanders
AFSG nummer	VPP 2009/004
ISBN-nummer	n.v.t.
Publicatiedatum	Publicatiedatum
Vertrouwelijk	Nee/ja + expiratiedatum
OPD-code	OPD-code
Goedgekeurd door	J.P.M. Sanders

Agrotechnology and Food Sciences Group/ Valorisation of Plant Production Chains  
P.O. Box 17  
NL-6700 AA Wageningen  
Tel: +31 (0)317 480694  
E-mail: [info.afsg@wur.nl](mailto:info.afsg@wur.nl)  
Internet: [www.afsg.wur.nl](http://www.afsg.wur.nl)

© Agrotechnology and Food Sciences Group b.v.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, hetzij mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten of onvolkomenheden.

*All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system of any nature, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher. The publisher does not accept any liability for inaccuracies in this report.*



Het kwaliteitsmanagementsysteem van Agrotechnology and Food Sciences Group b.v. is gecertificeerd door SGS International Certification Services EESV op basis van ISO 9001:2000.

## **Inhoudsopgave**

<b>Beleidssamenvatting</b>	<b>4</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>6</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>8</b>
<b>2 Keuze van grondstoffen</b>	<b>10</b>
<b>3 Karakterisatie grondstoffen</b>	<b>11</b>
<b>4 Voorbehandeling met maleïnezuur</b>	<b>14</b>
4.1 Ontsluiting van C5 suikers	15
4.2 Ontsluiting van eiwitten	16
4.3 Ontsluiting van fosfaat	18
<b>5 Productie van melkzuur uit ontsloten suikers</b>	<b>19</b>
5.1 Proefopzet	19
5.2 Resultaten	19
5.3 Conclusies	20
<b>6 Terugwinning van fosfaat na ontsluiting</b>	<b>21</b>
<b>7 Discussie</b>	<b>23</b>
<b>8 Conclusies</b>	<b>26</b>
<b>9 Aanbevelingen</b>	<b>28</b>
<b>10 Literatuur</b>	<b>29</b>
<b>Bijlagen</b>	<b>30</b>

## Beleidssamenvatting

Reeds lange tijd is er in Nederland sprake van een mestprobleem. Er is op vele manieren geprobeerd dit probleem op te lossen. Hierbij is vooral gezocht naar oplossingen waarbij de mest als zodanig kan worden gescheiden in fracties welke ieder beter danwel met minder transport plaatsbaar zijn in de landbouw. Dit heeft echter nooit afdoende resultaat gehad.

Het mestprobleem in Nederland ontstaat door de grootschalige invoer van veevoer en het grootschalig gebruik van kunstmest. Hierdoor worden meer nutriënten naar het land gebracht dan er door oogst van gewassen van het land afgehaald worden. Er komt steeds meer fosfaat en stikstof op het land en dit hoopt zich op in de grond (fosfaatverzadiging) of spoelt uit naar grond- of oppervlaktewater.

Door het fractioneren van mengvoedercomponenten kan fosfor uit het veevoer verwijderd worden voordat het de koe of het varken ingaat. Hierdoor zal de mest minder fosfaat bevatten en dus gemakkelijker afzet kunnen vinden op het land van de omliggende boeren. De gewonnen fosfaat kan gebruikt worden als kunstmestvervanger waardoor minder kunstmest nodig zal zijn in Nederland of de fosfaat kan worden geëxporteerd. Zo wordt een structurele vermindering van de fosfaattoevoer naar het Nederlands grondgebied bereikt.

Dezelfde voorbehandeling kan ook leiden tot een betere verteerbaarheid van het voer. Omdat niet alle eiwitten in het voer door de dieren opgenomen kunnen worden, eten de dieren op dit moment meer eiwit dan strikt noodzakelijk. Als de beschikbaarheid van de eiwitten vergroot wordt, zal minder eiwitrijk voer nodig zijn en zal de stikstofuitstoot van de dieren kunnen verminderen. Per saldo kan de import van eiwitrijk voer dus afnemen bij gelijkblijvende dierlijke productie. Zo wordt een structurele vermindering van niet alleen stikstof maar ook kalium en fosfaat naar het Nederlands grondgebied bereikt.

In deze studie is aangetoond dat de bovengenoemde strategie een bijdrage kan leveren aan de oplossing van de mestproblematiek. Verschillende lignocellulosehoudende mengvoeder grondstoffen zijn beter beschikbaar gemaakt m.b.v. organische zuren bij hoge temperatuur. Het voordeel van deze methode is dat de suikers uit de lignocellulosefractie bij gaan dragen aan de energiewaarde van het voer. Dit is zeker het geval wanneer xylose in een latere stap in melkzuur wordt omgezet omdat xylose in varkens doorgaans slecht benut wordt. De beschikbaarheid werd zowel met maleïnezuur als met melkzuur verbeterd.

Zowel vrij als gebonden fosfaat ging in oplossing en kon middels toevoeging van  $Mg(OH)_2$  vrijwel kwalitatief geprecipiteerd worden als kunstmest. Deze kunstmest kan worden afgezet in Nederland of in het buitenland (zonder mest notatie).

Hoewel de gekozen route werkt, kleven er toch bij nadere analyse nadelen aan de methode:

1. Een aantal aminozuren degradeert deels en de andere aminozuren zijn moeilijk te concentreren
2. Het eiwit buffert waardoor eerst veel zuur nodig is om de juiste pH voor ontsluiting te bereiken, en vervolgens weer veel loog ter neutralisatie om het fosfaat neer te slaan.

Daarom wordt voorgesteld een alternatieve route te volgen waarbij eerst het eiwit middels een alkalische extractie grotendeels wordt uitgewassen. Vervolgens wordt de lignocellulose in het residu met maleïnezuur of zwavelzuur bij 150 °C ontsloten. Het voordeel van het elueren van het

eiwit en de hydrolyse van het resterend eiwit is dat slechts weinig (organisch) zuur nodig is om de grondstof op de gewenste lage pH te brengen.

Het voorgestelde proces biedt de nodige flexibiliteit wanneer verschillende grondstoffen worden aangeboden. Het proces is niet in zijn geheel beproefd maar wel zijn alle onderdelen uitgetest. Er wordt daarom aanbevolen voor verschillende geselecteerde grondstoffen nogmaals het gehele proces te doorlopen.

## Samenvatting

Verschillende lignocellulosehoudende mengvoeder grondstoffen zijn ontsloten m.b.v. organische zuren bij temperaturen tussen 130 en 170 °C. Het voordeel van deze ontsluiting is dat de suikers uit deze grondstoffen bij gaan dragen aan de energiewaarde van het voer. Dit is zeker het geval wanneer xylose in melkzuur wordt omgezet omdat xylose in varkens doorgaans slecht benut wordt. Het monozuur melkzuur blijkt, net als in de literatuur beproefde dizuren, de lignocellulose te ontsluiten en het eiwit (deels) in oplossing te brengen. Vanwege de zure voorbehandeling gaat vrij en gebonden fosfaat in oplossing en is dit fosfaat middels toevoeging van  $Mg(OH)_2$  vrijwel kwalitatief te precipiteren als kunstmest. Deze kunstmest kan worden afgezet in Nederland of in het buitenland (zonder mest notatie).

Hoewel de gekozen route werkt, kleven er toch bij nadere analyse nadelen aan de methode:

1. Een aantal aminozuren degradeert deels en de andere aminozuren zijn moeilijk te concentreren
2. Het eiwit buffert waardoor eerst veel zuur nodig is om de juiste pH voor ontsluiting te bereiken, en vervolgens weer veel loog ter neutralisatie om het fosfaat neer te slaan.

Daarom wordt voorgesteld een alternatieve route te volgen waarbij het eiwit middels een alkalische extractie grotendeels wordt uitgewassen. Zie Bijlage 2 voor het processchema. Daarna kan met cake2 desgewenst een hydrolysestap worden uitgevoerd zonder extra toevoegen van loog, ten einde aminozuren/peptiden te winnen. Deze fractie (extract B) bevat ook xylose dat in principe om te zetten is in melkzuur, waardoor de xylose direct een hogere waarde voor varkens krijgt. Dit extract B is natuurlijk altijd ook als rundveevoeder in te zetten. Vervolgens wordt de lignocellulose in het residu met maleinezuur of zwavelzuur bij 150 °C ontsloten. Het voordeel van het elueren van het eiwit en de hydrolyse van het resterend eiwit is dat slechts weinig (organisch) zuur nodig is. De resterende cake 3 is direct in te zetten als rundveevoeder of na cellulase behandeling als varkensvoeder, zoals we in een eerder project hebben voorgesteld. Het zure extract C wordt bij het basische extract A gevoegd en na verder aanzuren (vanwege de sterke buffering van het eiwit wordt hier juist het goedkope zwavelzuur gebruikt) kan het eiwit grotendeels worden geprecipiteerd. In het resterende extract D zit de fosfaat welke als struviet kan worden neergeslagen. In diezelfde struviet fractie komt ook een neerslag van Calciumsulfaat. Deze fractie is als kunstmest in te zetten. Het resterende extract E is direct dan wel na omzetting van xylose tot melkzuur als varkensvoer in te zetten, maar ook in te zetten in plaats van de zwavelzuur of maleinezuur ter ontsluiting van cake 2b. Hierdoor kan ook met minder water in het proces worden volstaan, waardoor de vloeibare stromen een hogere concentratie verkrijgen. Deze fractie bevat het natrium uit de eerste eiwitextractiestap. Concentratie is minder dan 3% op de drogestof. Terwijl de precipitaten alle een vrij hoge droge stof bevatten en in principe kosten effectief gedroogd kunnen worden om transport gemakkelijker te maken, bevatten de extracten steeds veel water. In principe zouden zij als vochtrijke voeders in brijvoeding kunnen worden opgenomen. Ook denkbaar is om deze stromen aan een biogas installatie aan te bieden. Het voorgestelde proces biedt de nodige flexibiliteit wanneer verschillende grondstoffen worden aangeboden. Het proces is niet in zijn geheel beproefd maar wel zijn alle onderdelen uitgetest.

Het wordt aanbevolen voor verschillende geselecteerde grondstoffen nogmaals het gehele proces te doorlopen.

# 1 Inleiding

Reeds lange tijd is er in Nederland sprake van een mestprobleem. Er is op vele manieren geprobeerd dit probleem op te lossen. Hierbij is vooral gezocht naar oplossingen waarbij de mest als zodanig kan worden gescheiden in fracties welke ieder beter danwel met minder transport plaatsbaar zijn in de landbouw. Dit heeft echter nooit afdoende resultaat gehad.

Het mestprobleem in Nederland ontstaat door de grootschalige invoer van veevoer en het grootschalig gebruik van kunstmest. Hierdoor worden meer nutriënten naar het land gebracht dan er door oogst van gewassen van het land afgehaald worden. Er komt steeds meer fosfaat en stikstof op het land en dit hoopt zich op in de grond (fosfaatverzadiging) of spoelt uit naar grond- of oppervlaktewater.

Door het fractioneren van mengvoedercomponenten kan fosfor uit het veevoer verwijderd worden voordat het de koe of het varken ingaat. Hierdoor zal de mest minder fosfaat bevatten en dus gemakkelijker afzet kunnen vinden op het land van de omliggende boeren. De gewonnen fosfaat kan gebruikt worden als kunstmestvervanger waardoor minder kunstmest nodig zal zijn in Nederland of de fosfaat kan worden geëxporteerd. Zo wordt een structurele vermindering van de fosfaattoevoer naar het Nederlands grondgebied bereikt.

Dezelfde voorbehandeling kan ook leiden tot een betere verteerbaarheid van het voer. Omdat niet alle eiwitten in het voer door de dieren opgenomen kunnen worden eten de dieren op dit moment meer eiwit dan strikt noodzakelijk. Als de beschikbaarheid van de eiwitten vergroot wordt, zal minder eiwitrijk voer nodig zijn en zal de stikstofuitstoot van de dieren kunnen verminderen. Per saldo kan de import van eiwitrijk voer dus afnemen bij gelijkblijvende dierlijke productie. Zo wordt een structurele vermindering van niet alleen stikstof maar ook kalium en fosfaat naar het Nederlands grondgebied bereikt.

Door productie van eiwit op Nederlands grondgebied te stimuleren op basis van reeds aanwezige N, P, K zal minder import van eiwitrijke grondstoffen nodig zijn waardoor het overschot aan mineralen zal afnemen en de druk op land use change in derde landen, zoals Brazilië omdat wij bijvoorbeeld minder sojaschroot als eiwitbron nodig hebben. Deze Nederlandse productie van mengvoedercomponenten valt buiten de scope van deze studie.

Deze studie heeft als doel om aan te tonen dat bovengenoemde strategie kan bijdragen aan de oplossing van de mestproblematiek. Er zijn met name vragen over de bruikbaarheid van de mild zure behandelingstechnologie voor de voorbehandeling van de grondstoffen van veevoerders. Binnen Wageningen UR is ervaring opgebouwd met organische zuren als Maleinezuur en Fumaarzuur als ontsluitingsmiddel voor lignocellulose. Het voordeel tov het gebruik van zwavelzuur is dat er veel minder bijproducten worden gevormd welke toxisch kunnen zijn voor dieren (en ethanol fermentaties). Het nadeel is dat deze zuren veel duurder zijn en teruggewonnen moeten worden om economisch haalbaar te zijn.

Deze organische zuren kunnen deels in het voeder achterblijven omdat deze doorgaans een voederwaarde hebben. Wanneer melkzuur kan worden benut om de (hemi)cellulose te ontsluiten dan kunnen de kosten laag blijven omdat uit de suikers in de (hemi)cellulose, melkzuur geproduceerd kan worden. In dat geval hoeft het zuur dan ook niet teruggewonnen te worden.



Een antwoord op deze vragen zal verkregen worden door een karakterisatie van de ruwe grondstoffen en een analyse van de gevolgen van mild zure behandeling van deze grondstoffen. In dit rapport zijn de volgende grondstoffen bestudeerd: Jatropha Press Cake (JPC), Wet Distillers' Grains (WDG), tarwegries, raapzaadschroot en suikerrietloof. Bijlage 1 betreft een voorstudie waarin vertegenwoordigers van verschillende klassen van grondstoffen zijn geselecteerd.

## 2 Keuze van grondstoffen

Op verzoek van de vergadering in Ede is in eerste instantie gekozen voor sojaschroot in plaats van raapschroot.

Nu blijkt bij nadere analyse dat sojaschroot wel heel weinig cellulose en hemicellulose bevat. (Ca 10% en daarnaast waarschijnlijk het nodige aan pectines). Bij raapzaadschroot is dat iets beter maar het houdt nog steeds niet over. Enerzijds is dat goed nieuws omdat er dan geen moeilijk substaat als (hemi)cellulose hoeft te worden ontsloten en omgezet, anderzijds betekent het dat de reststoffen naast eiwit dus van redelijk ongedefinieerde soort zijn zoals pectines en bijzondere suikers en dat er daardoor niet veel winst uit de ontsluiting van de cellulose en hemicellulose te verwachten is.

Onverminderd blijft dat de fosfaat en kalium t.o.v. het aanwezige eiwit hoog zijn. Dit geldt met name voor raapschroot welke hierdoor ook een lagere marktwaarde heeft. Daarnaast is er een andere grondstof groeiende door de bioethanol productie en dat is DDGS (Dried Distillers Grain and Solubles) welke in de natte vorm WDG (Wet Distillers Grain) heet. Deze bevat wel meer cellulose en hemicellulose volgens de eerste schatting. We hebben nu het plan opgevat om deze 3 grondstoffen en wellicht ook nog een aantal reststromen volgens oorspronkelijk plan te behandelen met organische zuren om aldus een vergelijkend onderzoek te doen en in te kunnen schatten waar de effecten van waarde verhoging met gelijktijdige fosfaat verwijdering het grootst zijn. De verwijdering van kalium is geen onderdeel van dit project maar is in principe later uit te voeren om de voederwaarde te verbeteren.

In de tropen komt veel suikerrietloof vrij. Tot voor kort werd dit op het veld verbrand, maar dit is in elk geval in Brazilië verboden. Hierdoor komt ook deze stroom nu beschikbaar op de markt. In landen als Indonesië zijn plannen om op grote schaal Jatropha te gaan kweken voor de productie van biodiesel. Hierdoor zal er veel Jatropha Press Cake vrijkomen.

Tot slot is, o.a. van wege het hoge fosfaatgehalte, ook tarwegries in dit onderzoek meegenomen.

### 3 Karakterisatie grondstoffen

De optimale methode voor de karakterisering van grondstoffen is nog niet gevonden. Voor hout en stro is bij AFSG een methode in gebruik die werkbaar is en goede resultaten geeft (vergelijkbaar met de resultaten van andere laboratoria). Deze methode bestaat uit diverse extracties (vrije suikers en vetten), een chemische hydrolyse (polymere suikers) en wat dan nog overblijft is lignine.

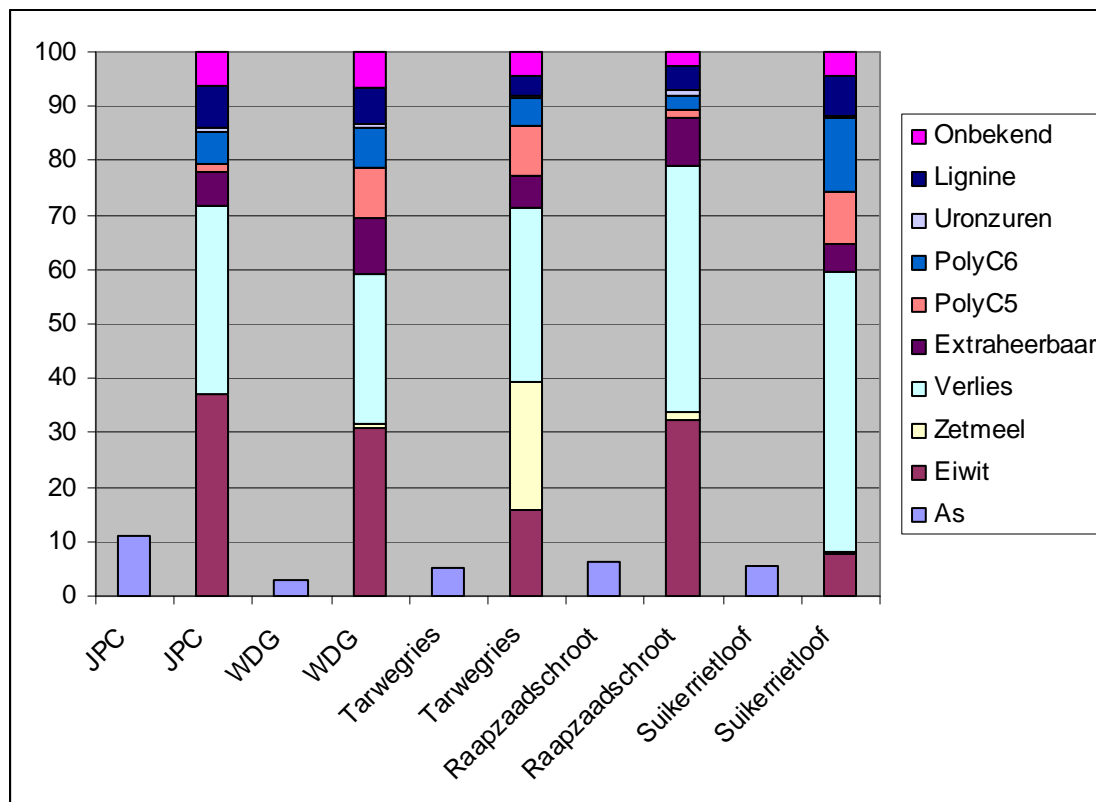
De grondstoffen die voor het mestinnovatieproject gekozen zijn, zijn echter fundamenteel verschillend van hout en stro. Ze bevatten namelijk ook zetmeel en eiwit. Voor zetmeel en eiwit zijn goed bruikbare analyses beschikbaar. Echter, de aanwezigheid van zetmeel en eiwit levert grote problemen als voor de overige componenten (extraheerbaar, polymere suikers, uronzuren en lignine) dezelfde methode wordt toegepast als voor hout en stro. Er ontstaat een vaste stof die niet tot poeder gemalen kan worden. Hierdoor kunnen de extracties niet goed uitgevoerd worden.

Daarom is tijdens dit onderzoek geprobeerd om voorafgaand aan de extracties zoveel mogelijk eiwit en zetmeel te verwijderen door enzymatische hydrolyses. Dit heeft geleid tot een veel betere handelbaarheid van de grondstoffen tijdens de extracties. Door verliezen tijdens deze extra stappen is een aanzienlijk deel van de originele grondstof niet beschikbaar gekomen voor de extracties. In Tabel 1 en Figuur 1 zijn de resultaten van de karakterisering van de verschillende grondstoffen weergegeven. Het verlies tijdens de extracties is in deze tabel weergegeven als 'Verlies'. De traditionele methode heeft altijd een deel dat onbekend is. Deels zijn dit componenten die niet geanalyseerd zijn (bijvoorbeeld methyl en acetaatgroepen); deels zijn dit ook verliezen. De meeste as komt terecht in de fractie 'extraheerbaar'.

**Tabel 1, Analyse van de samenstelling van grondstoffen (% van droge stof)**

	As	Eiwit	Zetmeel	Verlies	Extraheerbaar	PolyC5	PolyC6	Uronzuren	Lignine	Onbekend
<b>JPC</b>	11.14									
		37.18	0.00	34.51	6.23	1.32	6.01	0.96	7.37	6.41
<b>WDG</b>	2.80									
		30.87	0.73	27.48	10.59	9.19	7.25	0.79	6.39	6.73
<b>Tarwegries</b>	5.32									
		15.82	23.62	32.05	5.88	8.91	5.14	0.66	3.51	4.40
<b>Raapzaadschroot</b>	6.10									
		32.33	1.61	45.18	8.77	1.47	2.43	1.18	4.29	2.75
<b>Suikerrietloof</b>	5.59									
		7.78	0.20	51.61	4.94	9.73	13.55	0.52	7.16	4.51

**Figuur 1, Analyse van de samenstelling van grondstoffen (% van droge stof)**



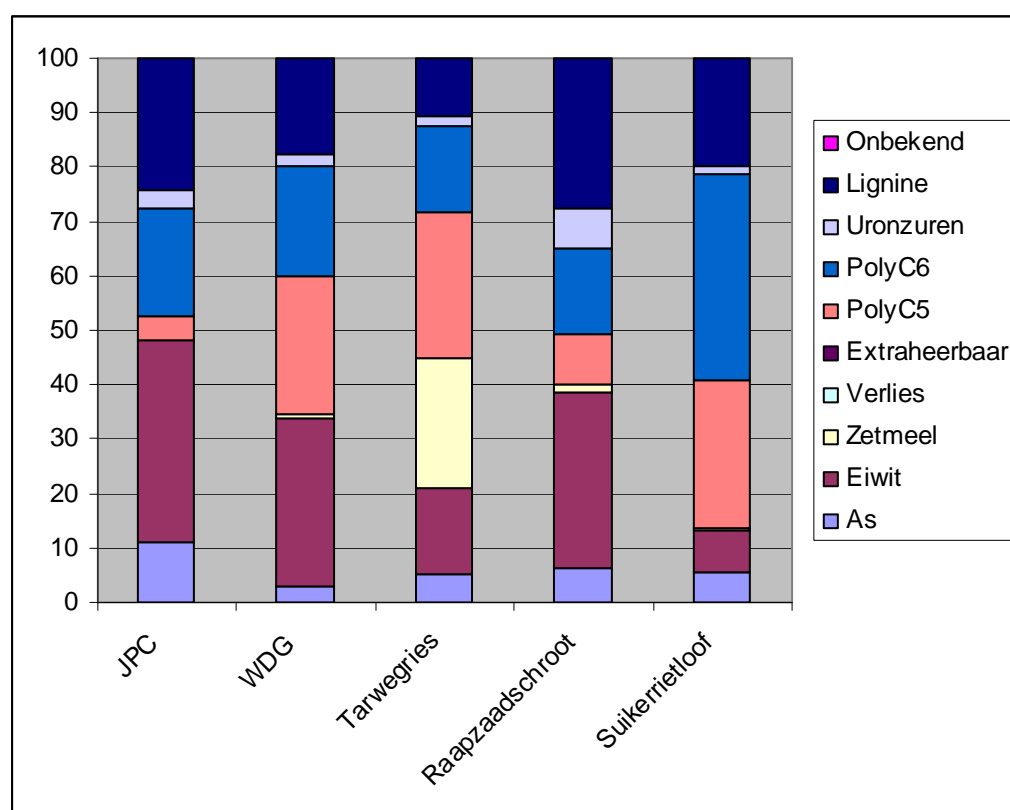
Het verlies tijdens de enzymatische verwijdering van zetmeel en eiwit is erg groot. Dit is ook wel logisch omdat er een groot aantal extracties, wasstappen, droogstappen en centrifugestappen doorlopen is. Bij elk van deze stappen zal materiaal verloren gaan. We kunnen in principe aannemen dat het deel dat verloren is gegaan, dezelfde samenstelling heeft als het deel dat wel overgebleven is voor analyse. Ook de fractie extraheerbaar is erg groot. In principe zou je in deze fracties een groot deel van de as en het vet verwachten. In de meeste grondstoffen zit echter nauwelijks vet (raapzaadschroot is zelfs nagenoeg vrij van vet), en toch is de fractie extraheerbaar veel groter dan het asgehalte. Dit komt waarschijnlijk omdat de extractie van zetmeel en eiwit onvolledig was. Om een betere indruk te krijgen van de samenstelling van de grondstof is het volgende aangenomen:

1. extraheerbaar is gelijk aan as
2. de samenstelling van 'verlies' en van 'onbekend' is gelijk aan de samenstelling van de originele grondstof na volledige verwijdering van as, eiwit en zetmeel

Dan ontstaat het beeld zoals berekend in Tabel 2 en Figuur 2.

**Tabel 2, Aangenomen samenstelling van grondstoffen (% van droge stof)**

	As	Eiwit	Zetmeel	Verlies	Extraheerbaar	PolyC5	PolyC6	Uronzuren	Lignine	Onbekend
JPC	11.14	37.18	0.00			4.36	19.83	3.18	24.32	
WDG	2.80	30.87	0.73			25.52	20.15	2.19	17.75	
Tarwegries	5.32	15.82	23.62			27.02	15.58	1.99	10.64	
Raapzaadschroot	6.10	32.33	1.61			9.41	15.53	7.55	27.48	
Suikerrietloof	5.59	7.78	0.20			27.16	37.80	1.46	19.99	



**Figuur 2, Berekende samenstelling van grondstoffen (% van droge stof)**

De metingen komen goed overeen met de verwachtingen: JPC, WDG en raapzaadschroot bevatten relatief veel eiwitten. Tarwegries bevat relatief veel zetmeel. Suikerrietloof bevat relatief veel C5 en C6 polymeren en lignine en lijkt daarmee erg op stro; omdat het suikerrietloof groen geogst is, bevat het meer eiwit dan stro.

## 4 Voorbehandeling met maleïnezuur

Door voorbehandeling van stro met maleïnezuur kunnen C5 suikers worden vrijgemaakt en kan de beschikbaarheid van polymere suikers voor enzymatische afbraak worden vergroot (Kootstra *et al.* 2009). Een vergroting van de beschikbaarheid voor enzymatische afbraak is een sterke aanwijzing dat de verteerbaarheid van het voer voor koeien is verbeterd. Koeien gebruiken namelijk vergelijkbare enzymen voor de vertering van gras. Door toevoeging van enzymen aan het ontsloten materiaal kunnen de polymere suikers ook beschikbaar gemaakt worden voor vertering door varkens.

De eerder gekarakteriseerde grondstoffen zijn behandeld met maleïnezuur. Raapzaadschroot is niet alleen met maleïnezuur, maar ook met melkzuur voorbehandeld. Melkzuur is een interessant alternatief voor maleïnezuur, omdat het (in tegenstelling tot maleïnezuur) toegestaan is als additief in veevoer. Voor ontsluiting zijn de monsters aangezuurd tot pH 3 (Tabel 3). Voor WDG, tarwegries en suikerrietloof was de benodigde maleïnezuurconcentratie gelijk aan 50 mM. Dit komt neer op een dosering van 10% maleïnezuur op basis van droge stof. Voor JPC en raapzaadschroot werd de gewenste pH pas bereikt na toevoeging van 90 mM. Bij toepassing van melkzuur was zelfs 260 mM nodig.

Na de ontsluiting is de pH opnieuw gemeten (Tabel 3, laatste kolom). In alle gevallen is een verhoging van de pH waargenomen. De stijging is het minst voor raapzaadschroot dat is behandeld met melkzuur.

**Tabel 3, Concentratie van organisch zuur en de pH voor en na de ontsluitingsproeven**

	Zuur	Concentratie (mM)	pH voor	pH na
<b>Jatropha</b>	MA	90	3.06	3.46
<b>WDG</b>	MA	50	3.04	3.39
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	50	3.05	3.37
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	90	3.04	3.36
<b>Raapzaadschroot</b>	LA	260	3.08	3.15
<b>Suikerrietloof</b>	MA	50	3.07	3.28

De bovenstaande vloeistof is geanalyseerd op C5 suikers, eiwitten, fosfaat en ammonium.

#### 4.1 Ontsluiting van C5 suikers

Als de gemeten suikerconcentraties in de bovenstaande vloeistof worden teruggerekend naar de bij de karakterisering bepaalde gehalten van polymere C5 suikers, dan blijkt dat slechts een zeer beperkt deel van de xylose in oplossing is gegaan (Tabel 4). De ontsluiting met melkzuur is iets slechter dan de ontsluiting met maleïnezuur.

**Tabel 4, Ontsluitingsrendement C5 suikers (percentage C5 suikers in oplossing gebracht ten opzichte van C5 suikers aanwezig in de ruwe grondstof)**

	Zuur	arab%	xyl%
<b>Jatropha</b>	MA	74%	4.4%
<b>WDG</b>	MA	44%	9.8%
<b>Tarwegries</b>	MA	44%	5.7%
<b>Raapzaad</b>	MA	32%	9.9%
<b>Raapzaad</b>	LA	27%	8.3%
<b>Suikerriet</b>	MA	44%	3.5%

Bij de suikeranalyse van de raapzaadschrootmonsters voor ontsluiting viel op dat er een extra piek te zien was. Deze piek was verdwenen na de ontsluiting. Inmiddels is aangetoond dat het hier gaat om sucrose. Er is ook literatuur gevonden waaruit blijkt dat raapzaadschroot relatief veel sucrose bevat (Siddiqui and Wood, 1977). Tijdens de ontsluiting wordt sucrose omgezet in glucose en fructose.

Wellicht zijn de polymere ketens wel ontsloten, maar zijn de C5 suikers nog niet gehydrolyseerd. Daarom zijn de ontsloten monsters (supernatant plus residu) behandeld met een enzympreparaat (GC220). Bij tarwegries kan het enzym het overgrote deel van de xylose vrijmaken. Bij Raapzaadschroot wordt maximaal 44% in oplossing gebracht (Tabel 5).

**Tabel 5, Ontsluitingsrendement C5 suikers na hydrolyse met GC220 (percentage C5 suikers in oplossing gebracht ten opzichte van C5 suikers aanwezig in de ruwe grondstof)**

	Zuur	arab%	xyl%
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	90%	82%
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	71%	44%
<b>Raapzaadschroot</b>	LA	58%	40%

De polymere C5 suikers kunnen na ontsluiting met maleïnezuur nog volledig intact aanwezig zijn in het pellet, of reeds opgelost in de vorm van oligomeren. Daarom is zowel de pellet als de oplossing behandeld met enzymen. Uit dit experiment blijkt dat het grootste deel van de C5 polymeren in onoplosbare vorm aanwezig was en een kleiner, maar aanzienlijk deel in oplosbare vorm (Tabel 6).

**Tabel 6, Percentage C5 suikers in supernatant na behandeling met maleïnezuur ten opzichte van totale hoeveelheid C5 suikers na behandeling (in pellet plus in supernatant)**

	Zuur	arab%	xyl%
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	47%	61%
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	49%	70%
<b>Raapzaadschroot</b>	LA	53%	74%

Het enzym GC220 heeft behalve C5 suikers ook de C6 polymeren grotendeels in oplossing gebracht. Dit kan een nadeel zijn omdat de C5 suikers dan niet meer selectief in melkzuur omgezet kunnen worden.

#### 4.2 Ontsluiting van eiwitten

Als de gemeten eiwitconcentraties in de bovenstaande vloeistof worden teruggerekend naar de bij de karakterisering bepaalde gehalten van eiwitten, dan blijkt dat na behandeling met maleïnezuur slechts zeer weinig eiwit in oplossing is gegaan (Tabel 7). De ontsluiting met melkzuur is efficiënter dan de ontsluiting met maleïnezuur.

**Tabel 7, Ontsluitingsrendement eiwit bij lage pH (percentage eiwit in oplossing ten opzichte van totale hoeveelheid eiwit in ruwe grondstof)**

	Zuur	Eiwit
<b>Jatropha</b>	MA	1.0%
<b>WDG</b>	MA	1.8%
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	3.2%
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	1.9%
<b>Raapzaadschroot</b>	LA	5.4%
<b>Suikerrietloof</b>	MA	2.5%

Van eiwitten is bekend dat ze slecht oplossen bij pH 4 en beter bij lagere of hogere pH waarden. Daarom is voor raapzaadschroot en tarwegries een deel van het sample naar pH = 10 gebracht met natronloog. Dit is gedurende 1 nacht geroerd. Na deze nacht was de pH gedaald tot 8.5. De pH is opnieuw verhoogd naar 10. Na een half uur roeren is de concentratie van oplosbaar eiwit in de vloeistoffase bepaald (Tabel 8). Het is evident dat de eiwitten veel beter oplossen bij deze hoge pH.



**Tabel 8, Ontsluitingsrendement eiwit bij pH 10 (Bradford) (percentage eiwit in oplossing ten opzichte van totale hoeveelheid eiwit in ruwe grondstof)**

	Zuur	Eiwit
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	28%
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	30%

De eiwitbepalingen zijn steeds uitgevoerd met het Bradford reagens. Dit reagens is niet gevoelig voor losse aminozuren en minder gevoelig voor peptiden. Een andere methode om eiwitten aan te tonen is de DUMAS bepaling. Dit is in feite een stikstofbepaling en daarom worden ook peptiden, aminozuren, ammonia, nitraat en nitriet meegenomen. De DUMAS bepaling geeft lagere resultaten voor het totaal eiwitgehalte van de grondstoffen dan de Bradford bepaling (Tabel 9). Het is niet ongevoelig dat met verschillende methoden een iets andere waarde gevonden wordt. De kleur van het Bradford reagens en het stikstofgehalte gemeten door de DUMAS bepaling is immers op verschillende manieren afhankelijk van de aminozuursamenstelling van het eiwit.

**Tabel 9, Eiwitgehalte in grondstoffen na ontsluiting volgens DUMAS**

	Eiwit
<b>Raapzaadschroot</b>	25%
<b>Tarwegries (los)</b>	14%

De DUMAS bepalingen bij zowel pH=3 als pH=10 laten zien dat veel meer stikstof in oplossing is gegaan dan de Bradford bepaling deed vermoeden.

**Tabel 10, Ontsluitingsrendement eiwit bij pH 3 (DUMAS) (percentage eiwit in oplossing ten opzichte van totale hoeveelheid eiwit na ontsluiting (Tabel 9))**

	Zuur	Eiwit
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	67%
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	72%

**Tabel 11, Ontsluitingsrendement eiwit bij pH 10 (DUMAS) (percentage eiwit in oplossing ten opzichte van totale hoeveelheid eiwit na ontsluiting (Tabel 9))**

	Zuur	Eiwit
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	86%
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	96%

Opnieuw blijkt dat bij hoge pH meer eiwitten (of peptiden of aminozuren of ammonia) in oplossing gaat dan bij lage pH waarden.

#### *Aminozyur degradatie*

In de uitgevoerde experimenten blijkt het zuur de hemicellulose goed te ontsluiten maar zijn de condities te zwaar voor het eiwit. Een aantal aminozuren is niet stabiel onder de geteste condities. Daarom moet men een voorextractie van het eiwit uitvoeren en/of bij lagere temperatuur een voor-hydrolyse uitvoeren, bijv met loog of zuur bij 110 of 120C en de ontstane peptiden/ aminozuren apart extraheren. Het nadeel is een extra stap en meer verdunning.

### 4.3 Ontsluiting van fosfaat

De ontsluiting van fosfaat is weergegeven in Tabel 12. Aan de hand van literatuurwaarden (kolom 5) kan geconcludeerd worden dat alle fosfaat uit de grondstoffen in oplossing is gegaan. Ook kan geconcludeerd worden dat een groot deel van het fosfaat in gebonden vorm aanwezig is. Waarschijnlijk gaat het hier om fytaat. Fytaat is ook na ontsluiting nog aanwezig en wordt dus niet afgebroken gedurende de mild zure behandeling.

**Tabel 12, ontsloten fosfaat (als percentage van totaal drooggewicht bij start v.d. proef)**

	Zuur	Totaal PO <sub>4</sub>	Vrij PO <sub>4</sub> *	Literatuur	Bron
<b>Jatropha</b>	MA	2.45%	0.77%		
<b>WDG</b>	MA	1.31%	0.32%	1.07%	Hutjens
<b>Tarwegries (los)</b>	MA	3.21%	0.83%	1.15%	Feedtogain.com
<b>Raapzaadschroot</b>	MA	2.68%	0.81%	0.4%-2%	Bernesson (2007)
<b>Raapzaadschroot</b>	LA	2.95%	0.80%	0.4%-2%	Bernesson (2007)
<b>Suikerrietloof</b>	MA	0.61%	0.27%		

\*het verschil tussen totaal fosfaat en vrij fosfaat is het gebonden fosfaat.

## 5 Productie van melkzuur uit ontsloten suikers

Natte suikerhoudende stromen zullen snel bederven. Varkens kunnen niet groeien op C5 suikers. Door omzetting van de C5 suikers in melkzuur kan de natte stroom geconserveerd worden. Melkzuur is wel verteerbaar voor varkens en zo kunnen de C5 suikers dus toch gebruikt worden voor de groei van het varken. De mogelijkheid van een melkzuurfermentatie op basis van de ontsloten suikers is in het laboratorium onderzocht.

### 5.1 Proefopzet

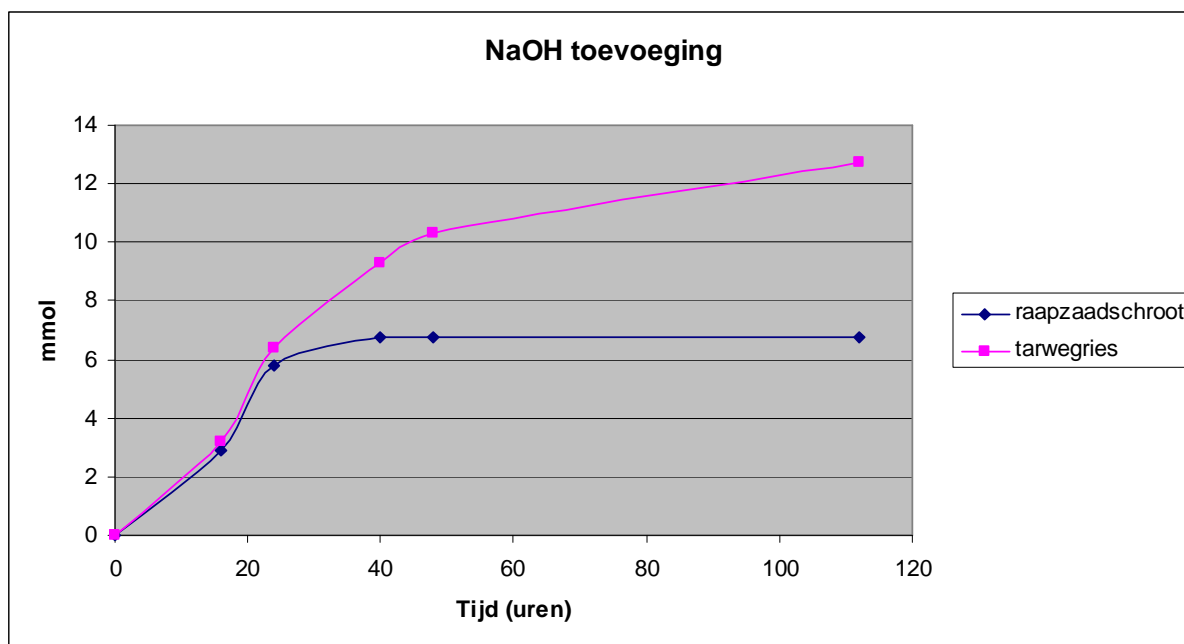
*Bacillus coagulans* is onder aerobe condities opgekweekt op een glucose medium. Na centrifugatie zijn de cellen overgebracht in een glucosevrij medium. Vervolgens zijn deze cellen toegevoegd aan 20 ml van de oplossing die ontstaan is in de ontsluitingsexperimenten. De aldus ontstane mengsels zijn anaeroob weggezet. Elke morgen en avond werd de pH gesteld op 6 door toevoeging van NaOH.. Na 0, 40 en 114 uur werd de melkzuurconcentratie bepaald.

### 5.2 Resultaten

De toevoeging van natronloog is te zien in Tabel 13 en Figuur 3. Bij raapzaad was na 40 uur geen natronloog meer nodig.

**Tabel 13, Gemeten pH en toegevoegde hoeveelheid natronloog aan kweek van *Bacillus Coagulans* op ontsloten raapzaadschroot en tarwegries**

Tijd (uren)	Raapzaadschroot			Tarwegries		
	pH	NaOH		pH	NaOH	
		$\mu\text{L}$ (8 N)	mmol		$\mu\text{L}$ (8 N)	mmol
16	4,66	360	2,88	4,04	400	3,20
24	4,74	725	5,80	4,36	800	6,40
40	5,84	845	6,76	4,59	1160	9,28
48	6,38	845	6,76	5,75	1290	10,32
112	6,21	845	6,76	4,86	1590	12,72



**Figuur 3** Toevoeging van NaOH aan kweek van *Bacillus coagulans* in ontsloten raapzaadschroot en tarwegries

Ook bij de tarwegries nam de consumptie van loog af in de tijd. In Tabel 14 is te zien dat de hoeveelheid toegevoegde loog goed overeenkwam met de gemeten melkzuurproductie. Uit de melkzuurconcentratie op het eind van het experiment kan berekend worden dat ongeveer 50% van de suikers aanwezig in de uitgangsstoffen is omgezet in melkzuur. Uit de chromatogrammen kan gezien worden dat na 112 uur alle vrije glucose en xylose is afgebroken.

**Tabel 14, Concentratie melkzuur gemeten in kweek van *Bacillus coagulans* in ontsloten raapzaadschroot en tarwegries**

Tijd (uren)	Raapzaadschroot		Tarwegries	
	mmol/L	mmol	mmol/L	mmol
0	0	0	0	0
40	214	3,98	372	6,98
112	206	3,73	540	10,01

### 5.3 Conclusies

*Bacillus coagulans* kan opgeloste suikers omzetten in melkzuur. De aanwezigheid van maleinezuur werkt niet inhiberend. De pH kan afnemen tot 4; dit geeft een goede conservering van de stroom.

## 6 Terugwinning van fosfaat na ontsluiting

Fosfaat kan met magnesium worden neergeslagen als magnesiumwaterstoffosfaat of als ammoniummagnesiumfosfaat (struviet). De vorming van struviet is alleen mogelijk bij hoge pH en indien voldoende ammonia aanwezig is. Voor vorming van struviet geldt een optimum pH van 11, terwijl magnesiumwaterstoffosfaat ook bij lagere pH waarden al gevormd wordt. Daarom is dit onderzoek gericht op de vorming van magnesiumkaliumfosfaat na toevoeging van  $Mg(OH)_2$ .

Eerst werd 150%  $Mg(OH)_2$  toegevoegd op basis van de gemeten fosfaatconcentratie in de supernatanten. De pH is gemeten voor en na toevoeging van  $Mg(OH)_2$  (Tabel 15).

**Tabel 15, Precipitatie van fosfaat bij toevoegen van 150% molair  $Mg(OH)_2$**

	Fosfaat in sup. (g/l)	Toegevoegd $Mg(OH)_2$ (g/l)	pH Voor	pH Na <sup>a</sup>	Neerslag
<b>Jatropha</b>	2,84±0,12	2,75	3,3	5,6	-
<b>WDG</b>	1,56±0,24	1,51	3,3	4,8	-
<b>Tarwegries</b>	3,64±0,30	3,53	3,2	6,4	Ja
<b>Raapzaadschroot</b>	3,10±0,09	3,00	3,2	5,7	Ja
<b>Raapzaadschroot (melkzuur)</b>	3,42±0,02	3,31	3,0	3,9	Ja <sup>b</sup>
<b>Suikerrietloof</b>	0,70±0,02	0,68	3,2	4,0	-

<sup>a</sup> overnacht geïncubeerd

<sup>b</sup> neerslag is afkomstig van troebele deeltjes

Uit Tabel 15 wordt duidelijk dat een neerslag alleen gevormd wordt als de pH voldoende hoog is. Om de pH verder te verhogen is aan alle batches een gelijke hoeveelheid van 5 g/liter  $Mg(OH)_2$  toegevoegd. Omdat de precipitatie nog altijd niet volledig was, is nogmaals 5 g/liter  $Mg(OH)_2$  toegevoegd (Tabel 16).

Tabel 16, Precipitatie van fosfaat door toevoegen van extra  $Mg(OH)_2$  t.o.v. Tabel 15.

	<b><math>Mg(OH)_2</math> toegevoegd (5 g/l)</b>		<b>Nogmaals <math>Mg(OH)_2</math> toegevoegd (5 g/l)</b>	
	<b>pH</b>	<b>% totaal fosfaat neergeslagen na incubatie</b>	<b>pH</b>	<b>% totaal fosfaat neergeslagen na incubatie</b>
<b>WDG</b>	7,6	37	8,4	80
<b>Suikerrietloof</b>	7,9	63	8,4	90
<b>Raapzaadschroot</b>	7,6	49	8,6	91
<b>Tarwegries</b>	7,8	76	8,5	96
<b>Jatropha</b>	7,2	39	8,8	96
<b>Raapzaadschroot (melkzuur)</b>	6,0	-5	8,5	82 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> In plaats van 5 (g/l) is 10 (g/l)  $Mg(OH)_2$  toegevoegd.

Het is duidelijk dat de precipitatie het beste verloopt bij een pH van 7.8 of hoger (63% of meer). Bij een pH van 8.4 of hoger wordt altijd een rendement behaald van meer dan 80% en ook 96% is mogelijk. Omdat de monsters na ontsluiting erg zuur zijn, is het verbruik van magnesiumhydroxide hoog ten opzichte van de hoeveelheid teruggewonnen fosfaat. Dit geldt des te meer voor het monster dat is aangezuurd met melkzuur. Door toepassing van andere basen (bijvoorbeeld NaOH) kan het verbruik van  $Mg(OH)_2$  in principe sterk verminderd worden. De relatief hoge kosten voor de pH verhoging kunnen ook worden toegeschreven aan de eiwitwinning die ook pas op gang komt bij hoge pH. Het precipitaat vormt (ondanks het zeer onzuivere supernatant) een compact en zuiver neerslag.

## 7 Discussie

### *Ontsluiting met maleinezuur*

De experimenten zijn uitgevoerd bij een pH van 3. In het geval van suikerrietloof was hiervoor 50 mM zuur nodig. Experimenten met stro en een gelijke hoeveelheid maleinezuur door Kootstra *et al.* (2009) resulteerden in een lagere pH (2.5). De grotere buffercapaciteit van de grondstoffen in dit onderzoek wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge concentratie van eiwitten. Het door Kootstra *et al.* (2009) gebruikte stro bevatte slechts 3% eiwit. Het suikerrietloof uit deze studie daarentegen bevat 10% eiwit (alle andere grondstoffen bevatten nog meer eiwit). Deze 10% eiwit kan ongeveer 20 mM zuur bufferen. Dit is waarschijnlijk ook de reden dat bij *Jatropha* Press Cake en raapzaadschroot (beide een hoger eiwitgehalte) nog meer zuur nodig was om de gewenste pH van 3 in te stellen. Het is niet helemaal duidelijk waarom dat bij WDG niet nodig was. Misschien komt dit door de zeer slechte oplosbaarheid van de WDG eiwitten.

Tijdens de experimenten steeg de pH. Dit kan verklaard worden door deamidering van de eiwitten. Bij elke mol gedeamideerd glutamine of asparagine wordt namelijk één mol zuur verbruikt: er wordt een carboxylgroep en een amine geproduceerd; de amine wordt vervolgens geprotoneerd. Als we uitgaan van ongeveer 10% glutamine en asparagine in het eiwit, dan kan door deamidering nog eens 6 mM zuur geconsumeerd worden. Dit kan de stijging van de pH tijdens de experimenten goed verklaren.

Ook hydrolyse van peptidebindingen kan zorgen voor extra verbruik van zuur. Als de eiwitten geheel gehydrolyseerd zouden worden is hiervoor 60 mM nodig.

### *Ontsluiting van C5 suikers*

Het ontsluitingsrendement van xylose is lager dan verwacht. Het lage rendement wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de relatief hoge pH (pH=3 tot 3.5). Eerdere proeven uitgevoerd door Kootstra *et al.* (2009) hebben laten zien dat hoe lager de pH, hoe meer xylose er in oplossing gaat. De pH tijdens de experimenten is goed vergelijkbaar met de pH die door Kootstra *et al.* (2009) werd gemeten tijdens proeven met fumaarzuur. Bij de proeven van Kootstra *et al.* ging ook slechts 10% van de xylose in oplossing.

Met dit lage rendement lijkt een melkzuurfermentatie niet de meest voor de hand liggende volgende stap. De opbrengst van xylose kan echter vergroot worden door incubatie met enzymen (GC220). Na behandeling met dit enzym kwam bij tarwegries het overgrote deel van de xylose vrij in de oplossing. De xylose uit raapzaad ging slechts voor 44% in oplossing. Volgens de literatuur (Siddiqui *et al.* 1977) bevat raapzaad relatief veel gemethyleerde xyloses. Het is waarschijnlijk dat GC220 niet in staat is om deze gemethyleerde xyloses te hydrolyseren. Ongeveer de helft van de xylose was na de mild zure behandeling al in de oplossing aanwezig als oligosaccharide.

De enzymatische behandeling met GC220 heeft ook een heel groot deel van de C6 polymeren in oplossing gebracht. Hierdoor is het niet meer mogelijk om de C5 suikers selectief om te zetten in

melkzuur en de C6 suikers intact te laten. Bij toepassing als varkensvoer hoeft dit geen nadeel te zijn.

#### *Ontsluiting van eiwitten*

De Bradford bepaling laat zien dat na ontsluiting bij pH 3 slechts weinig eiwitten in oplossing gaan. Als de pH verhoogd wordt naar 10, gaan al meer eiwitten in oplossing. De Bradford bepaling is ongevoelig voor peptiden en losse aminozuren die in oplossing zijn gegaan. Daarom is ook een Dumas bepaling uitgevoerd. Deze heeft aangetoond dat het grootste deel van de eiwitten in oplossing gaat bij een pH van 10.

#### *Ontsluiting van fosfaat*

Op basis van literatuurwaarden kan geconcludeerd worden dat het fosfaat goed in oplossing gaat. Een groot deel is aanwezig als gebonden fosfaat. Waarschijnlijk is dit fosfaat gebonden in de vorm van fytaat. Het gebonden fosfaat wordt wel oplosbaar gemaakt, maar niet gehydrolyseerd tijdens de zure ontsluiting.

#### *Fermentatie van vrijgemaakte suikers*

Met behulp van *Bacillus coagulans* konden alle aanwezige vrije suikers (C<sub>6</sub> en C<sub>5</sub>) worden omgezet in melkzuur.

#### *Precipitatie van fosfaat*

Een dosering van 150% Mg(OH)<sub>2</sub> op basis van het aanwezige fosfaat is onvoldoende om een goede precipitatie te verkrijgen. Dit komt omdat de pH te laag is. Als meer Mg(OH)<sub>2</sub> wordt gedoseerd ontstaat voor alle grondstoffen een goede neerslag. Bij een pH groter dan 8.6 kan meer dan 80% worden geprecipiteerd. De lage pH wordt veroorzaakt door het aanwezige organische zuur. Het Mg(OH)<sub>2</sub> verbruik zou verlaagd kunnen worden door neutralisatie van het organische zuur met een andere (goedkopere) base (bijvoorbeeld NaOH).

#### *Mestinnovatie door maleïnezuur ontsluiting*

Behandeling met maleïnezuur leidt tot ontsluiting van suikers, eiwitten en fosfaat uit veevoedergrondstoffen. De fosfaten kunnen vervolgens worden gewonnen door precipitatie. Met name voor grondstoffen met veel eiwitten is veel organisch zuur nodig om de gewenste lage pH te bereiken. Voor de precipitatie van fosfaat en/of het oplossen van de eiwitten is vervolgens evenzoveel base nodig.

#### *Alternatieve route*

Omdat er zeer veel zuur en base nodig is om de gewenste pH in te stellen, lijkt het zinnig om ook andere behandelingsschema's in ogenschouw te nemen. Er kan bijvoorbeeld gestart worden met het oplossen van de eiwitten door wassen met een basische vloeistof. Als de eiwitten verwijderd zijn, zal minder zuur nodig zijn voor de ontsluiting en kunnen ook de fosfaten weer makkelijker teruggewonnen worden. Een alternatief kan ook liggen in de ontsluiting onder basische



omstandigheden. Zeker als eerst de eiwitten worden opgelost in loog, zal er nog zeer weinig extra loog nodig zijn om de juiste pH waarde te bereiken voor de ontsluiting van de (hemi)cellulose. Daarom wordt voorgesteld een alternatieve route te volgen (zie Bijlage 2 voor het processchema en zie Bijlage 3 voor de **berekende** samenstelling van de verschillende te verkrijgen fracties). Bij de alternatieve route wordt eiwit middels een alkalische extractie grotendeels uitgewassen. Daarna kan met Cake2 (Stroom 4) desgewenst een hydrolysestep worden uitgevoerd zonder extra toevoegen van loog, ten einde aminozuren/peptiden te winnen. Deze fractie (Extract B, stroom 18) bevat ook xylose dat in principe om te zetten is in melkzuur, waardoor de xylose direct een hogere waarde voor varkens krijgt. Dit extract B is natuurlijk altijd ook als rundveevoeder in te zetten. Vervolgens wordt de lignocellulose in het residu met maleinezuur, melkzuur of zwavelzuur bij 150 °C ontsloten. Het voordeel van het elueren van het eiwit en de hydrolyse van het resterend eiwit in de eerdere stappen is dat in deze stap slechts weinig (organisch) zuur nodig is om de gewenste lage pH te behalen. De resterende Cake 3 (Stroom 21) is direct in te zetten als rundveevoeder of na cellulase behandeling als varkensvoeder. Het zure Extract C (Stroom 22) wordt bij het basische Extract A (Stroom 5) gevoegd en na verder aanzuren (vanwege de sterke buffering van het eiwit wordt hier juist het goedkope zwavelzuur gebruikt) kan het eiwit grotendeels worden geprecipiteerd (Cake 4, Stroom 8)). In het resterende extract D (Stroom 9) zit de fosfaat welke als struviet kan worden neergeslagen (Cake 5, Stroom 12). In diezelfde struviet fractie komt ook een neerslag van Calciumsulfaat. Deze fractie is als kunstmest in te zetten. Het resterende Extract E (Stroom 13) is direct dan wel na omzetting van xylose tot melkzuur als varkensvoer in te zetten, maar ook in te zetten in plaats van de zwavelzuur of maleinezuur ter ontsluiting van Cake 2b (Stroom 17). Hierdoor kan ook met minder water in het proces worden volstaan, waardoor de vloeibare stromen een hogere concentratie verkrijgen. Deze fractie bevat het natrium uit de eerste eiwitextractiestap. De concentratie is minder dan 3% op de drogestof. Terwijl de precipitaten alle een vrij hoge droge stof bevatten en in principe kosten effectief gedroogd kunnen worden om transport gemakkelijker te maken, bevatten de extracten steeds veel water. In principe zouden zij als vochtrijke voeders in brijvoeding kunnen worden opgenomen. Ook denkbaar is om deze stromen aan een biogas installatie aan te bieden. Het voorgestelde proces biedt de nodige flexibiliteit wanneer verschillende grondstoffen worden aangeboden. Het proces is niet in zijn geheel beproefd maar wel zijn alle onderdelen uitgetest.

## 8 Conclusies

- De mild zure ontsluiting met maleïnezuur kan een bijdrage leveren aan het reduceren van het mestprobleem.
- De hoeveelheid C<sub>5</sub> suikers in het supernatant na behandeling met maleïnezuur is aanvankelijk laag. Na ontsluiting is een aanzienlijk deel van de C5 suikers aanwezig als oplosbare oligomeer. Na ontsluiting kan een aanzienlijk deel van de C5 polymeren in het pellet en de oligomeren in oplossing gehydrolyseerd worden met enzymen. De koolhydraten zijn dan bijna kwantitatief beschikbaar voor vertering. Bij een betere vertering is minder voer nodig en ontstaat dus ook minder mest.
- De opgeloste suikers (C<sub>5</sub> en C<sub>6</sub>) kunnen door fermentatie met *Bacillus coagulans* volledig worden omgezet in melkzuur.
- Na maleïnezuurontsluiting gaat bijna alle fosfaat in oplossing. Een groot deel van het fosfaat is aanwezig in gebonden vorm (waarschijnlijk fytaat). Het opgeloste fosfaat kan verwijderd worden door precipitatie met Mg(OH)<sub>2</sub>. Door de grote buffercapaciteit (eiwit) is veel Mg(OH)<sub>2</sub> nodig. Zowel vrij als gebonden fosfaat (fytaat) kan door precipitatie vrijwel kwantitatief uit het voer verwijderd worden. Als het fosfaatgehalte van het voer afneemt, zal ook het fosfaatgehalte in de mest afnemen.
- De pH stijgt tijdens de ontsluiting. Waarschijnlijk door hydrolyse van eiwitten. Waarschijnlijk worden de grote buffercapaciteit en de stijging van de pH tijdens de ontsluiting beide veroorzaakt door de aanwezige eiwitten in de grondstoffen. Door de grote buffercapaciteit van de monsters is veel zuur nodig om een pH van 3 te bereiken. Dit geldt met name voor de monsters met hoog eiwitgehalte.
- Het zou beter zijn om de eiwitten uit de ruwe grondstoffen te verwijderen voorafgaande aan de ontsluiting. Hierdoor zou minder organisch zuur nodig zijn voor de ontsluiting en minder Mg(OH)<sub>2</sub> voor de precipitatie van fosfaat. Ook zou de kwaliteit van het gewonnen eiwit (aanwezige aminozuren) beter zijn. De oplosbaarheid van eiwit na ontsluiting bij pH 3.3 is zeer slecht. Bij pH 10 is de oplosbaarheid van eiwitten veel beter.
- Na een aantal aannames kan toch een beeld van het bioraffineren van de grondstoffen worden verkregen dat recht doet aan de verwachting van de mestinnovatie (zie Bijlage 2 en Bijlage 3).
- Een kwantitatief overzicht van de samenstelling van de verschillende fracties toont dat alle fracties tezamen een hogere voedingswaarde hebben dan de oorspronkelijke grondstoffen.
- Een ander alternatief (dat in deze studie geheel niet aan bod is gekomen) is het ontsluiten van de ruwe grondstoffen onder basische condities.
- De Dumas bepaling laat zien dat er meer stikstof in oplossing is gegaan dan op basis van de Bradford bepaling mag worden verwacht. De extra stikstof in de oplossing kan bestaan uit peptiden, losse aminozuren of ammonia. Deze degradatie is te voorkomen door een voorextractie van het eiwit.
- De methode voor de karakterisering van de grondstoffen is nog niet uitontwikkeld



## 9 Aanbevelingen

Op grond van het onderzoek kan de voorbehandeling van ruwe veevoedergrondstoffen om 2 redenen worden aanbevolen:

1. Door de voorbehandeling kunnen koolhydraten en eiwitten beter beschikbaar gemaakt worden voor monogastrische dieren (varkens). De C5 suikers kunnen na ontsluiting worden omgezet in melkzuur. Hierdoor worden deze suikers bruikbaar als energiebron voor varkens. Tevens kan het melkzuur een conserverende en probiotische werking hebben.
2. Door voorbehandeling kunnen fosfaten worden opgezuiverd uit veevoedergrondstoffen. Hierdoor kan de uitstoot van fosfaat in mest worden verminderd. Tevens kan het opgezuiverde fosfaat worden gebruikt als vervanger van fosfaaterts.

De voorbehandeling van veevoedergrondstoffen is nog niet uitontwikkeld. Het verbruik van organische zuur voor de ontsluiting kan sterk verminderd worden door eerst de eiwitten uit de ruwe grondstoffen te verwijderen. Dit zal ook leiden tot een vermindering van de hoeveelheid base die vervolgens weer nodig is om het zuur te neutraliseren. Het wordt daarom aanbevolen voor verschillende geselecteerde grondstoffen nogmaals het gehele proces te doorlopen.

## 10 Literatuur

Kootstra A.M.J., Beftink H.H., Scott E.L., Sanders J.P.M., Biochemical Engineering Journal, 2009

Siddiqui I.R. and Wood P.J., Carbohydrates of Rapeseed: a review, J. Sc. Fd Agric. 28, 530-538, 1977

## **Bijlagen**

**Bijlage 1, Vooronderzoek**

**Bijlage 2, Alternatief stroomschema**

**Bijlage 3, Ruwe massabalans over alternatief stroomschema**

## Bijlage 1, Vooronderzoek

Hoewel aanvankelijk sojaschroot als grondstof was gekozen om het concept van bioraffinage te toetsen is in het begin van het project het begrip ontstaan dat er gelukkiger keuzes gedaan hadden kunnen worden. Soja schroot bevat relatief veel eiwit per hoeveelheid fosfaat en kalium en is daardoor nog zeker een relatief waardevolle component voor varkens mengvoeder.

Wanneer we verschillende reststromen zoals deze in Nederland worden aangeboden als diervoeder component beschouwen dan zien we dat er een groot aantal zijn welke veel goedkoper dan sojaschroot zijn omdat zij een veel lager eiwit, suiker, zetmeel of vet- gehalte bevatten, terwijl de kalium en fosfaat gehalten in absolute zin niet enorm verschillen maar relatief dus wel: Wanneer we van de reststromen die hoog in kalium en/of fosfaat zijn tov de nuttige componenten, deze mineralen kunnen scheiden dan zal de verzameling aan verkregen componenten dus flink in waarde kunnen toenemen. Tabel 1 toont ter illustratie zes specifieke grondstoffen met hun eiwit, suikers/zetmeel, vet, fosfaat en kalium gehalten, met de berekende fosfaat/eiwit en kalium/eiwit verhoudingen. Des te hoger de K/eiwit waarde, des te minder aantrekkelijker als mengvoedercomponent voor varkens. Des te hoger de P/eiwit des te ongunstiger voor de randvoorwaarden gesteld door de mestwetgeving. Natuurlijk speelt de aanwezigheid van suikers, zetmeel en vetten ook mee in deze inschatting, maar het patroon zal niet sterk veranderen terwijl het niet eenvoudig is om gewichten toe te kennen aan de verschillende componenten onderling. De vraag zal zijn of/hoe fosfaat gemakkelijk af te scheiden is van de fractie waarin de opgeloste suikers en eiwitten zullen terechtkomen.

g/kg ds	tarwestro	raapstro	sojadoppen	tarwegries	raapschroot	sojaschroot
eiwit	33	50	130	175	428	526
suiker				66	98	110
vet	16	13		39	18	21
zetmeel				310		
cellulose	350	380	400	96	127	69
K	12.6	14	14.8	14	13.9	25.3
P	1.0	1.4	6.1	11	11.8	7.4
P/eiwit	0.033	0.028	0.046	0.062	0.027	0.014
K/eiwit	0.38	0.28	0.113	0.080	0.032	0.047

Tabel 1: Enkele reststromen zijn gerangschikt naar eiwitgehalte en op aantrekkelijkheid als varkensmengvoedercomponent. Bij te hoge kalium gehalten zullen reststromen zonder voorbehandeling hooguit als rundveevoedercomponent kunnen fungeren. Een verhoging van de eiwit ( inclusief andere nuttige componenten als vet, suiker, zetmeel en voor runderen ook hemicellulose( niet in de tabel)) zal de waarde van die componenten kunnen verhogen.

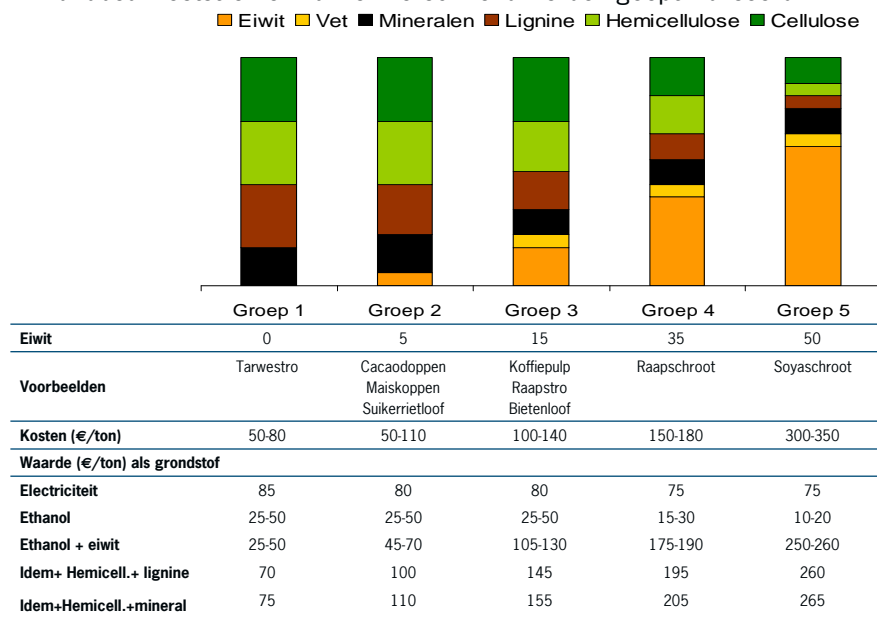
### Aansluiting op processen in ontwikkeling

Een andere maar vergelijkbare indeling kunnen we maken langs de as oplopend eiwit tot afnemend cellulose en hemicellulose. Met name de reststromen hoog in (hemi)cellulose hebben een lage waarde op de markt, en juist deze stromen worden experimenteel onderzocht vanwege 'tweede generatie' biobrandstof technologie zoals ethanol.

Als eerste resultaat van dit project hebben we ontdekt dat wanneer je toch de tweede generatie technologie toepast op reststromen, dat je beter van reststromen uit kunt gaan welke enige eiwit concentratie hebben, omdat je tegelijkertijd met het ontsluiten van de cellulose om vergistbare suikers te krijgen, je tevens het eiwit ontsluit en met name het fosfaat in een afscheidbare vorm brengt.

Tabel 2 laat een reken voorbeeld zien van verschillende categorieën grondstoffen waarbij aangenomen wordt dat het eiwit een waarde van 300 € en de verteerbare suikers een waarde van 100€ krijgen. Het is onder die aannames aan te raden grondstoffen uit de categorie 5% eiwit en/of nog liever die van 15% eiwit te kiezen. Raapschroot, uit de categorie 35% eiwit verhoogt ook in waarde, terwijl sojaschroot niet in waarde zal stijgen ondanks de extra kosten van de voorbehandeling.

- Landbouwreststromen kunnen verschillend worden geoptimaliseerd:



tabel 2 : Verschillende grondstoffen, gerangschikt naar eiwitgehalte. De huidige marktprijzen worden vergeleken met de waarde van de producten welke kunnen resulteren na bioraffinage. Bij representanten van groep 2 t/m groep 4 is een verbeterde economie te verwachten. De Hoog-eiwitstromen zoals sojaschroot maar ook de laageiwit stromen zoals tarwestro, zullen het minste voordeel van bioraffinage ondervinden. (De waarde van vergistbare suikers uit cellulose is meegenomen voor 100€/ton; eiwit als 300€/ton)



We hebben gekozen om raapschroot, tarwegries, maar ook suikerrietloof en bostel (uit ethanolproces) als representanten uit de interessante grondstof categorieën, voor te behandelen met maleinezuur waarmee we in een lopend project goede resultaten hebben verkregen met tarwestro voor wat betreft de ontsluiting van cellulose.

## **Bijlage 2, Alternatief stroomschema**



## **Bijlage 3, Ruwe massabalans over alternatief stroomschema**