



# LUNDS UNIVERSITET

**Institutionen för processteknik och tillämpad biovetenskap.**

**Avdelningen för livsmedel och läkemedel**

---

**Hydrolys och fermentering av *S.latissima***

---

**YTHL05 - Kandidatarbete i Livsmedelsteknik**

**Handledare: Borbala Erdei**

**Examinator: Ola Wallberg**

**Skribenter: Måns Lobell och David Lundgren**

**2024-06-06**

## Abstract

This study explored the possibilities of using specific, more accessible enzymes from previous studies' enzyme cocktails to determine whether they can break down the carbohydrates of the brown algae *S. latissima* into fermentable sugar chains without specifically tailored enzymes such as Alginate lyase and Laminarinase. The enzymes used were  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase and Amyloglucosidase, three enzymes commonly used in alcohol brewing. Through enzymatic hydrolysis at optimal times, temperatures and pH levels, it was found that they were unable to affect the complex carbohydrates in *S. latissima*.

Another study was conducted with the same purpose but with acid hydrolysis in mind, where more accessible and food-friendly acids such as acetic acid and citric acid were used to see if they could compare to the more commonly used sulfuric acid from previous studies. The HPLC-results indicated that the cellulose in the brown algae was successfully affected, with citric acid showing promising results.

The fermentation with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* did not produce any ethanol, likely due to insufficient sugar levels for the yeast to convert during fermentation.

A combination of acid hydrolysis as a pretreatment followed by enzymatic hydrolysis is of interest for future attempts.

**Keywords:** *S. latissima*, enzyme cocktail,  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase, Amyloglucosidase, enzymatic hydrolysis, acid hydrolysis, sulfuric acid, citric acid, acetic acid, sugar chains, HPLC, *Saccharomyces cerevisiae*

## Sammanfattning

Denna studie utforskade möjligheterna att använda sig av särskilda mer lättillgängliga enzymer ur tidigare studiers enzymblandningar för att ta reda på hur de kan bryta ner kolhydraterna hos brunalgen *S. latissima* till fermenterbara sockerkedjor utan specifikt anpassade enzymer som Alginate lyase och Laminarinase. Enzymerna som användes var  $\alpha$ -Amylas,  $\beta$ -Amylas och Amyloglukosidas, tre enzymer som ofta används vid bryggning av alkohol. Genom enzymatisk hydrolys i optimala tider, temperaturer och pH-värden visade det sig att de inte lyckades påverka de komplexa kolhydraterna i *S. latissima*.

En till studie utfördes med samma syfte men med syrehydrolys i åtanke där de mer lättillgängliga och livsmedelsvänliga syrorna ättiksyra och citronsyra används för att se om de kan möta sig med den vanligare använda svavelsyran från tidigare studier. HPLC-resultaten gav indikation på att cellulosan i brunalgen lyckats påverkas, där citronsyran visade lovande resultat.

Den vidare fermenteringen med jästsvampen *Saccharomyces cerevisiae* gav inte någon etanol, förmodligen på grund av för få halter socker för jästsvampen att omvandla.

En kombination av syrehydrolys som förbehandling följt av enzymatisk hydrolys är av intresse för framtida försök.

**Nyckelord:** *S. latissima*, enzymblandning,  $\alpha$ -Amylas,  $\beta$ -Amylas, Amyloglukosidas, enzymatisk hydrolys, syrehydrolys, svavelsyra, citronsyra, ättiksyra, sockerkedjor, HPLC, *Saccharomyces cerevisiae*

## Förord

Denna rapport är Måns Lobell och David Lundgrens bidrag till den akademiska världen och resultat från tre års studier i kandidatprogrammet Livsmedelsteknik på Lunds universitet, LTH. Vi vill tacka det passionerade teamet på företaget KOB B för deras givmildhet av donerad sockertång och deras strävan för en mer hållbar värld.

Vi vill även rikta ett stort tack till vår handledare Borbala Erdei som fann tid för, och tog hand om, oss kandidatstudenter i den skrämmande miljön av kemiteknikens salar. Ett stort tack till vår examinator Ola Wallberg också.

<b>1 Inledning</b> .....	<b>5</b>
1.1 Syfte.....	6
1.2 Frågeställningar.....	6
1.3 Avgränsningar.....	7
<b>3 Bakgrund och motivation</b> .....	<b>8</b>
3.2.3 Alginat.....	10
3.2.4 Laminarin.....	10
3.3 Fermentering.....	11
3.4 Hydrolys.....	12
3.4.1.1 $\beta$ -Amylas från vete.....	12
3.4.1.2 $\alpha$ -Amylase från <i>Bacillus licheniformis</i> .....	13
3.4.1.3 Amyloglucosidas från <i>Aspergillus niger</i> .....	13
3.4.2 Syrhydrolys.....	13
3.4.2 Bioetanol.....	14
3.5 Analyser och beräkningar.....	14
3.5.1 HPLC (Högpresterande vätskekromatografi).....	14
3.5.2 Beräkningar.....	14
<b>4 Material &amp; metod</b> .....	<b>16</b>
4.1 <i>S. latissima</i> .....	16
4.2 Provberedning av enzymatisk hydrolys.....	16
4.2.1 <i>S. latissima</i> .....	16
4.2.2 Enzymering.....	17
4.2.3 HPLC-Analys av tillgängligt socker.....	17
4.3 Provberedning av syrhydrolys.....	18
4.3.1 Uppvägning och spädning av syror.....	18
4.4 Fermentering.....	19
<b>5 Resultat</b> .....	<b>20</b>
5.1 Tillgängligt socker från enzymatisk hydrolys.....	20
5.2 Socker från syrhydrolys.....	20
5.2.2 Ättiksyra.....	20
5.2.3 Svavelsyra.....	21
5.2.4 Citronsyra.....	22
5.3 Etanol.....	23
<b>6 Diskussion</b> .....	<b>25</b>

6.1 Enzymatisk hydrolys.....	25
6.2 syrhydrolys.....	25
6.3 Fermentering & etanol.....	26
<b>7 Slutsats.....</b>	<b>28</b>
<b>8. Referenslista.....</b>	<b>29</b>
<b>9. Bilagor.....</b>	<b>34</b>

## 1 Inledning

Jordens befolkning växer konstant och med detta kommer problem som behöver hanteras. Några exempel på dessa problem är klimatförändringar och minskande resurser. För att möta dessa två problem behöver livsmedelsindustrin tänka nytt och hållbart avseende produktion och konsumtion av mat. Något som ständigt studeras är alternativa källor till livsmedel, där bland annat sjögräs kan vara en möjlig väg (Boderskov m.fl., 2023).

Det rika innehållet av mineraler, vitaminer, essentiella fettsyror och proteinvärde i sjögräs tas ofta upp som fördelar när det kommer till att vara alternativ källa till livsmedel (Nakhate & Van Der Meer, 2021).

Vissa arter av sjögräs innehåller även rika mängder av kolhydrater och sockerarter, och utnyttjas i läkemedelsindustrin och i livsmedelsindustrin, främst som förtjocknings- och sötningsmedel (Nakhate & Van Der Meer, 2021).

Att använda sjögräs mer som alternativ livsmedelskälla skulle kunna leda till en mer grön förbrukning än idag. Traditionellt jordbruk för sockerbetor eller sockerrör är resurskrävande och bemötandet av den ökande befolkningen leder till mer avskogning och högre utsläpp CO<sub>2</sub> (Boderskov m.fl., 2023). Intresset för odling av sjögräs växer och utvecklas alltmer. Sjögräsodlingar bidrar till ett mindre avtryck tack vare växternas förmåga att ta upp och lagra CO<sub>2</sub> (S., Olsen, Y., Surilayani, D., & Handå, A. 2021).

Det här arbetet har gått ut på att få en större förståelse kring *Saccharina latissima* (sockertång) polysackarider och möjligheterna kring extraktion av dessa med hjälp av mer lättillgängliga och kommersiella enzymer och syror.

## 1.1 Syfte

Denna studie har undersökt hur de mer lättillgängliga enzymerna från tidigare studiers enzymblandningar samt livsmedelssäkra syror påverkar brunalgen *S. latissimas* komplexa polysackarider och avkastningen av sockerarter det leder till. Brunalgen donerades från företaget KOB B i Göteborg som odlar och utvecklar tångprodukter.

## 1.2 Frågeställningar

1. Är det möjligt att via enzymatisk hydrolys, med hjälp av kommersiella enzymer, bryta ner tillräckligt mycket av *S. latissimas* komplexa polysackarider till monomer för att vidare kunna fermentera den till etanol med jästsvampen *Saccharomyces cerevisiae*?
2. Är det möjligt att via enzymatisk hydrolys bryta ner tillräckligt mycket av *S. latissimas* komplexa polysackarider för att kunna fermentera till etanol med hjälp av kommersiella enzymer?
3. Kan man hydrolysera nog med tillgängligt socker för att gå vidare till jäsning med hjälp av ättiksyra eller citronsyra?



### 1.3 Avgränsningar

- Denna studie använder enbart utav en art av brunalger, sockertång (*Saccharina latissima*), från en leverantör.
- Levererad tång kom redan blancherad och inlagd i saltlag, vilket kan ha påverkat den tidigare kända struktur och innehåll av *S. latissima*.
- Studien använder sig av bifogad specifikation gällande våtvikt/torrsvikt av proven vilket i verkligheten kan variera mellan proven.
- I studien analyseras inte innehåll av makroämnen i proven utan utgår från tidigare litteraturstudier.
- Studiens kvalitet påverkades av begränsad tid via till exempel brist på triplikat.

## 3 Bakgrund och motivation

### 3.1 Brunalger

Brunalger är en grupp av alger som tillhör divisionen Phaeophyta. De är vanligt förekommande i havet och är kända för sin bruna färg, vilket beror på pigmentet fucoxantin. Denna grupp av alger är vanligt förekommande längs kustlinjer runt om i världen och spelar en viktig roll i ekosystemen i kustnära områden. Brunalger är viktiga för havsmiljön på flera sätt. De utgör livsmiljöer och skydd för många marina organismer. Dessutom spelar de en roll i näringskedjan genom att vara föda för olika djur, från små kräftdjur till stora havslevande däggdjur. Utöver sitt näringsvärde har brunalger också kommersiell användning. De används i produktionen av vissa livsmedel, kosmetika, och till och med inom läkemedelsindustrin. Brunalger är flercelliga växter och karaktäriseras av dess antingen trådlika eller utbredda, ofta flikiga bål. Brunalgernas celler innehåller klorofyll och xantofyllfärgämnen fukoxantin och dioxantin, vilket är orsaken till dess brun-guldiga färg. Dess upplagsnäring består av kolhydratet laminarin och alkoholen mannitol. (Nationalencyklopedin 2024)

#### 3.1.1 Sockertång (*Saccharina latissima*)

På Sveriges västkust finner man det så kallade västerhavet som är hem till det större biodiversa marina livet i Sverige och det är här man kan hitta den så kallade sockertången, eller skräppetare, som den även kallas. Sockertång är en enbladig brunalg som karaktäriseras av dess utbredda flikiga blad. Stjälken som bär bladet kan i bredd variera mellan 20 och 50 cm och kan bli upp till 2 meter lång. Varje år växer ett nytt blad ut mellan stjälken och det gamla bladet som ersätter det förra. Sockertången växer på klippor och stenar ner till så långt som 30 meters djup. (Nationalencyklopedin 2024)

Dessa kvalitéer ger upphov till kommersiella odlingar av brunalgerna. Den kommersiella odlingen av brunalger har växt markant över åren, med en skörd på 16 miljoner ton 2019. Tången växer som fortast kring våren, kring 1.1 centimeter per dag, och slutar växa i slutet av sommaren, vilket ger kommersiella odlare ett särskilt fönster att arbeta med. Tången är fäst till rep när den odlas istället för att fästa sig vid stenar som vid normala fall.

## 3.2 Kolhydrater

Tabell 1: Generellt näringsvärde i brunalger samt fördjupning i kolhydraterna. Siffrorna baseras på studie genomförd av i, Y.; Zheng.m.fl (2021)

Brunalgers näringsämne	TS%	Kolhydrater	%
Kolhydrater	12,2 - 56,4	Alginat	18,9 - 66,7
Protein	4,3 - 24	Laminarin	5,29 - 35
Mineraler	17 - 44	Fuccoidan	3,94 - 28,3
Lipider	0,3 - 4,5	Mannitol	2,4 - 20
Mineraler	1,3 - 7,0	Cellulosa	1-8%
Spårämnen	16-1584 mg/kg	B-1,3-1,4 Glukan	

Tabell 1 visar hämtad generell data för näringsinnehållet i brunalger. Vidare kan man se innehållet av vilka kolhydrater man kan finna och mängden av dessa.

Tabell 2: Faktiskt näringsvärdesanalys från företaget KOBB utförd av Eurofins. (Se bilaga 9.2)

Näringsinnehåll	Resultat Enhet	Mätosäkerhet
Vattenhalt	81,8 g/100g	± 10%
Aska	14.4 g/100g	± 10%
Råprotein	1,08 g/100g	± 10%
Råfett	0,23 g/100g	± 30%
Kolhydrater (beräknade)	2,49 g/100g	

Enligt tabell 2 är mängden kolhydrater i sockertången som används för analys beräknas vara 2,49g/100g våtsubstans (vs). Vattenhalten i proven är 81,8% vilket leder till att torrsubstans (ts) blir 18,2%. Det betyder att i 18,2g ts finns det 2,49g kolhydrat, vilket ger prov som använts ca 13,6% kolhydrat/g ts.

### 3.2.1 Tillgängliga sockerarter

*S. Latissima* innehåller en stor mängd olika typer av socker. Enligt en studie fokuserad på analys av brunalgen fick de ca 50% antal socker i torrsvikt. Halten påverkas av säsongen som brunalgen skördas (Sharma et.al., 2018).

En annan studie föreslår även att 10% av totala kolhydraterna består av cellulosa (Kraan,

Stefan. (2012). Cellobios är en disackarid som består av två glukosmolekyler sammanlänkade med en  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidbindning. Det är en produkt av cellulosa-hydrolys och finns i växters cellväggar. Glukos, en monosackarid och den mest förekommande sockerarten, är en nyckelkälla till energi för levande organismer och en viktig komponent av kolhydrater. Xylos är ett socker som härstammar från hemicellulosa och är en vanlig beståndsdel i växters cellväggar och vissa alger. Galaktos är en monosackarid som är mindre söt än glukos och finns vanligtvis i mejeriprodukter, sockerbeter och gummiarter. Mannos är en typ av socker som finns i många växter och är en byggsten i olika polysackarider, glykoproteiner och glykolipider (Showalter, A. 1993)

### 3.2.2 Mannitol

Mannitol är en sex-kol sockeralkohol som förekommer naturligt i många växter, bland annat alger och tång och upptäcktes år 1806 av kemisten Joseph Louis Proust. Idag används hexaalkoholen som smakmedel, stabilisator och förtjockningsmedel med mera inom livsmedelsindustrin (Nationalencyklopedin 2024). Dess höga relativ söthet tillsammans med ett lågt glykemiskt index (GI) gör den till ett populärt sötningsmedel och är oftast syntetiskt framställd genom reduktion av mannos (Furugren, 2017: s223).

### 3.2.3 Alginat

Upp till 40 % av kolhydraterna i *S. latissima* består utav alginat, en polysackarid som förekommer i cellväggarna hos bruna alger och är uppbyggd av de två monosackariderna (1,4)- $\alpha$ -D-mannuronsyra (M) och (1,4)- $\alpha$ -L-glukuronsyra. Vid extraktion med syror eller alkali blir utfallet alginsyra. Alginaterna från brunalgernas cellväggar används som viskositetshöjare till olika livsmedel. (Furugren, 2017: s. 287-288)

### 3.2.4 Laminarin

Laminarin är en glukospolymer som består av (1,3)- $\alpha$ -D-glukan struktur med  $\alpha$ -(1,6) grenar. Likt mannitol är laminarin även en förrådskolhydrat som bidrar med den största delen fermenterbart socker i form av glukos (Schultze-Jena m.fl., 2022). Laminarinet är den näst största kolhydraten i *S. latissima* med upp till 35% innehåll.

### 3.3 Fermentering

Fermenterade livsmedel och drycker genomgår en process som involverar mikroorganismer eller enzymer som medför fördelaktiga biokemiska förändringar och betydande förändringar i maten. Praktiken att fermentera mat går tillbaka tusentals år, med tidiga bevis funna i produktionen av öl från korn och vin från druvor. Denna urgamla bioteknik har utvecklats från naturliga processer, där specifika mikroorganismer valdes ut på grund av näringstillgång och miljöförhållanden. Den har utvecklats till användningen av startkulturer, stamförbättring och, mer nyligen, genteknik. Nyckelmikroorganismer som är involverade i fermentering inkluderar mjölktsyrabakterier, mögel såsom *Aspergillus*- och *Penicillium*-arter, samt jäst, särskilt *Saccharomyces*-arter. Fermenterade livsmedel är en bas i dieter världen över, med mejeri-, dryckes- och spannmålsprodukter som de mest förekommande. De bidrar avsevärt till det globala matintaget, och utgör ungefär en tredjedel av kosten samt erbjuder betydande näringsvärde, samtidigt som de förbättrar smak och mångfald i våra matval. (Campbell-Platt, G. 1994).

#### 3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Jästsvampen *Saccharomyces cerevisiae*, även kallat vanlig bagerijäst, är väl undersökt och används flitigt inom grundläggande forskning om eukaryota organismer. Dess encelliga natur gör det till ett praktiskt verktyg för att studera olika biologiska processer, då många av dessa processer är liknande hos andra eukaryoter. Dessutom är jästen enkel att manipulera genetiskt. Utöver dess användning i forskning har *Saccharomyces cerevisiae* även en lång historia av användning inom olika bioteknologiska tillämpningar, tack vare dess förmåga att jäsa och producera alkohol och koldioxid, samt dess förmåga att klara av ogynnsamma förhållanden. Denna jästsvamp är särskilt viktig inom livsmedels- och dryckesindustrin, inklusive vinproduktion (Li m.fl., 2021). En möjlighet finns att mannitolet inte kommer påverkas av jästsvampen då den saknar enzymerna som behövs trots att den är den vanligaste använda jästen för etanolproduktion, saknar laminarin, vilket gör att den inte kan använda sig av mannitol (Hreggviðsson m.fl., 2020).

### 3.4 Hydrolysis

Hydrolysis innebär sönderdelning genom reaktion med vatten och är en väldigt vanlig metod av reaktion i livsmedelskemi.

Två typer av hydrolysis som används i arbetet för extrahering av sockerarter är enzymatisk och syrhydrolysis. Det är en process inom livsmedelskemi som bryter ner makromolekyler till mindre molekyler och, i detta arbete, polysackarider till oligo-, di- och monosackarider. Hydrolysis fungerar ofta som ett kritiskt mellansteg mellan mekanisk behandling och fermentering, där den mekaniska behandlingen tillgängliggör ytor för att hydrolysen ska kunna frigöra komponenter för att fermenteringen ska effektiviseras.

#### 3.4.1 Enzymatisk hydrolysis

En studie av J. Lamb m.fl lyckades utvinna  $9.18 \pm 1.21$  g/l socker med hjälp av en "enzymblandning" bestående av ett stort urval av enzymer, där bland annat amylaser användes (Lamb m.fl., 2018).

För att ta reda på hur mycket socker man kan utvinna med hjälp av enbart amylaser som vanligtvis används vid bryggning så har följande enzymer valts att användas utan de andra i enzymblandningen.

##### 3.4.1.1 $\beta$ -Amylas från vete

$\beta$ -Amylas används för att bryta ner  $\alpha$ -bundna polysackarider, såsom stärkelse och glykogen, genom att hydrolysera  $\alpha$ -bindningar. Det har använts i olika växtforskningar, Dessutom har  $\beta$ -amylas från korn använts för att undersöka påverkan av tryck och temperatur på katalytisk aktivitet. Detta enzym bryter ner naturliga substrat som stärkelse och glykogen till glukos och maltos genom att hydrolysera  $\alpha$ -(1,4) glukosbindningarna i polysackarider som består av tre eller fler  $\alpha$ -(1,4) bundna D-glukosenheter. En ren, kristallin  $\beta$ -amylasberedning består av fyra isoenzymer med olika isoelektriska punkter. Enzymet polymeriseras mycket snabbt genom sulfhydrylgrupper i avsaknad av reducerande medel. Aktiviteten hos enzymet kan återställas

genom att använda reducerande medel såsom merkaptoetanol eller ditiotritol, medan dess polymerisation och aktivitet kan hämmas av p-klormerkuribensoat.

Detta enzym valdes med bakgrunden av dess nedbrytning av glykogen till glycos, men också dess breda tillgänglighet i handeln (Sigmaaldrich 2024).

### **3.4.1.2 $\alpha$ -Amylase från *Bacillus licheniformis***

$\alpha$ -Amylas, ett medlem av endo-amylasfamiljen, har en molekylvikt på 57,6 kDa och består av tre funktionella domäner märkta A, B och C. Domän A har en ( $\beta/\alpha$ ) 8-struktur och är den största domänen, medan domän B är ansluten till domän A genom en disulfidbindning och är positionerad mellan domänerna A och C. Domän C består av  $\beta$ -blad och är länkad till domän A via en polypeptidkedja.  $\alpha$ -Amylas används för att bryta ned  $\alpha$ -bindningar av  $\alpha$ -länkade polysackarider som stärkelse och glykogen. Produkt A3403 kommer från *Bacillus licheniformis* och faller under typ XII-A. Den katalyserar hydrolys av  $\alpha$ -(1,4) glukosbindningar inom polysackarider som består av tre eller fler  $\alpha$ -(1,4) länkade D-glukosenheter, vilket resulterar i nedbrytning av naturliga substrat som stärkelse och glykogen till glukos och maltos.

Detta enzym valdes med bakgrunden av dess förmåga att bland annat bryta ner  $\alpha$ -bindningar av  $\alpha$ -länkade polysackarider. Även detta enzym togs in med kommersiell tillgänglighet i åtanke (Sigmaaldrich 2024).

### **3.4.1.3 Amyloglucosidas från *Aspergillus niger***

Amyloglucosidas, ett enzym som produceras av olika arter inom *Aspergillus*-släktet, är känt för sin förmåga att omvandla stärkelse till dextriner och glukos. Genom immobilisering kan dess stabilitet förbättras. Amyloglucosidas från *Aspergillus niger* har använts vid in vitro-digestioner och utvinning av kostfiber från quinoa och amarant. Detta enzym kan bryta ner olika glukosidbindningar i oligosackarider. Inom stärkelsebearbetningsindustrin används det för kommersiell produktion av D-glukos från majssirap. I detta arbete har den främst applicerats för att omvandla stärkelsen glykos. Även här har tanken lagts på den kommersiella tillgängligheten (Sigmaaldrich 2024)

### 3.4.2 Syrhydrolysis

Syrhydrolysen är en starkare metod av hydrolysis, där man använder sig av hög värme med autoklavering (121°C) och syror. Syrornas vätejoner attackerar kedjorna i polysackariderna vilket tillåter vattenmolekyler att inta dess plats, vilket bryter kedjorna till mindre byggstenar.

### 3.4.2 Bioetanol

Forskning av utvinningen av sockerarter och fermentering av *S. latissima* går i huvudsak ut på att finna optimalt utvinning av bioetanol och i huvudsak biobränsle. För att göra detta används starka syror för syrhydrolysis som svavelsyra, genetiskt manipulerade enzymer av till exempel alginate lyase, mannitol dehydrogenase. Dessa metoder kan både kombineras eller användas separat för resultat. Argument för varför biobränsle gjort på sjögräs kan leda till en cirkulär förbrukning av CO<sub>2</sub> görs då sjögräs tar upp stora mängder CO<sub>2</sub> under odlingen (*Out of the Blue*, u.å.).

## 3.5 Analyser och beräkningar

### 3.5.1 HPLC (Högpresterande vätskekromatografi)

Analyser av tillgängligt socker utfördes av en HPLC. HPLC separerar ämnen i ett prov genom att dessa fördelas mellan en mobil fas (vätskan som rör sig) och en stationär fas (material i kolonnen). Molekylerna i provröret rör sig olika snabbt genom den stationära fasen beroende på deras kemiska struktur. Detta gör att de elueras vid olika tidpunkter. Genom detta separeras de olika komponenterna i provet.

Efter att komponenterna passerat kolonnen detekteras de av en detektor. Signalerna från detektorn omvandlas och registreras av ett datorsystem som visar dem som ett kromatogram. Efter detektorn kan mobilfasen ledas vidare till ytterligare detektorer, en enhet för att samla fraktioner eller till avfall.



### 3.5.2 Beräkningar

För att räkna ut korrekt mängd syra att tillsätta till varje slurry behövs koncentration och densitet tas hänsyn till. Varje slurry ska ha 3% koncentration av separata syror i 100ml slurry.

C1, C2 och V2 är kända.

Genom ekvationen  $C1 \times V1 = C2 \times V2$  så behöver V1 räknas ut.

$$V1 = (C2 \times V2) / C1$$

Densitet ( $\rho$ ) är också känd och man kan då få ut  $V1 / \rho$  för faktisk mängd att tillsätta.

För att räkna ut hur mycket av ts som reagerade på syrhydrolysen behöver faktisk provmängd (10g/200ml) omvandlas till g/l, sedan används värdena från tabell 2 för att bestämma g kolhydrat/kg.

Om  $m = C \times V$  och man först vill få ut g/g blir ekvationen:

$$m = (C \times V) / 10 \text{ och } \text{kg/g} = ((C \times V) / 10) \times 1000$$

Då mängd kolhydrater/g är 13% ändras m till  $10 \text{ g} = 0,13 \times 10 = 1,3$  Då kan man även räkna ut mängd kolhydrat med följande ekvation:

$$m/\text{g kolhydrat} = m / 1,3 \text{ och}$$

$$\text{g/kg kolhydrat} = (m / 1,3) \times 1000$$

## 4 Material & metod

### 4.1 *S. latissima*

40 kg blancherad *S. latissima* i 70% saltlag donerades av företaget Kobb som i sin tur odlat och skördat det från Sveriges västkust. Brunalgen skördades från Sveriges västkust våren 2023 och blancheras innan förvaring i saltlag.

### 4.2 Provberedning av enzymatisk hydrolys

#### 4.2.1 *S. latissima*

Sockertången desalinerades och tvättades genom att placeras i hinkar fyllda med 5000g avjoniserat vatten där de fick stå i 24 timmar fyra gånger. Detta gjordes för att utnyttja det fysikaliska fenomenet “osmos”, vilket går ut på att finna en balans mellan cellväggens inre och yttre ämnehalt. Då cellerna innehöll höga halter av salt från saltlakningen uppstod ett osmotiskt tryck vilket tryckte ut saltet från cellerna och ut i omgivande vatten för att försöka skapa en osmotisk jämvikt. Salthalten i vattnet avlästes efter varje tvätt med en konduktivitetsmätare (Lovibond SensoDirect Con110) till en godkänd halt millisiemen/cm. Salt kan hämma jästens aktivitet eller tillväxt, vilket kan påverka jäsningsprocessen negativt. Förekomsten av salt kan minska jästens effektivitet och leda till en längre jäsningsperiod eller till och med stoppa jäsningsprocessen helt. Detta genom att saltet skapar en hypertonisk miljö som drar ut vattnet ur jästcellerna, vilket minskar deras metaboliska aktivitet. Även jonbalansen och enzymaktiviteten i jästcellerna kan påverkas om salthalten är för hög.

Därefter torkades tången i en varmluftsugn på 50°C i 72h och mixades därefter till en semipulveriserad substans för att underlätta hydrolys och fermentering.

Material: Plastbehållare 10L. Fin- sil 20cm. Konduktivitetsmätare (Lovibond SensoDirect Con110). Folieform 20cm. Varmluftsgn (Memmert). Matprocessor (robot coupe R 302 v.v)

### **4.2.2 Enzymering**

Trippelprov utfördes på samtliga prov.

Enzymerna  $\alpha$ -Amylas (A3403), amyloglucosidase (A7095) och b-amylas (A7130) användes under hydrolysen (Sigma Aldrich, Tyskland).

Tre slurrys på 10g *S. latissima* i torrsvikt blandades med 990 ml avjoniserat vatten till en 1:100 spädning med för att få en viskös konsistens. pH-värde avlästes till 7.5, 7.8 och 7.8. Slurryns pH-värde balanserades med hjälp av en 1,495 mol/L svavelsyra för att få ett pH på 6.9 för  $\alpha$ -Amylas optimala effekt.

Blandningarna rördes om med hjälp av en Heto-agro overhead stirrer på 300 rpm i 20°C temperatur i 2 timmar. Prov togs efteråt för att analysera tillgängliga sockerarter. pH sänktes vidare till 5,6, 5,6 och 5,3 i ett 65°C tempererat vattenbad. Amyloglucosidase tillsattes och rördes om på 300 rpm i två timmar. Efter provtagning kylde blandningar ner återigen till 20°C och pH sänktes ytterligare till 4,8, 4,7 och 4,8 och b-amylas tillsattes under omrörning.

Material:  $\alpha$ -Amylas (A3403 Sigma Aldrich, Tyskland), Amyloglucosidase (A7095 Sigma Aldrich, Tyskland), a-amylas (A7130 Sigma Aldrich, Tyskland), Vattenbad (Heto Lab Equipment, Danmark),

### **4.2.3 HPLC-Analys av tillgängligt socker**

2ml enzymerad slurry överfördes till mikrocentrifugtuber som sedan centrifugerades i 5 min, 130 rpm. 0,5 ml av supernatanten filtrerades därefter genom 0.22 $\mu$ m sterilfilter till 2ml-HPLC-vialer för analys. Proverna jämfördes sedan med 2 ml standardlösning för att jämföra mängder av sockerarterna cellobiose, glukos, xylos, galaktos, arabinos och mannos som blivit tillgängliga från enzymatiska hydrolysen.

Material: 2ml Mikrocentrifugtuber (Corning Costar) Centrifug (Eppendorf Minispin), HPLC-analysator (Shimadzu, Japan)

## **4.3 Provberedning av syrhydroly**

För provberedning och analys används metoder beskrivna av Maria Cristina Ravanal et.al som grund (Ravanal et, al, 2017).

### 4.3.1 Uppvägning och spädning av syror

För utförandet av syrhydrolys användes 100ml slurry syrorna svavelsyra, ättiksyra och citronsyra med 3% koncentration.

Tabell 3: Beräkning av hur stor mängd syra i 100 ml som krävs för att nå 3%-ig koncentration samt faktisk mängd tillsatt med ekvation från 3.6.2

Syra	Densitet $\rho$ (g/ml)	3% i 100ml (g) (3ml / %)	Mängd behövd ( $\rho / g$ ) = (ml)	Faktisk mängd: (ml)
Svavelsyra, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95%)	1.84	3.16	1.72	1.76
Ättiksyra, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (99.8%)	1.54	3.00	1.95	2.05
Citronsyra, CH <sub>3</sub> COOH (100%)	1.004	3.00	3.01	3.01

Tabell 3 visar hur liten mängd av vardera syra som behövde tillsättas i 100ml vatten för att få ut en 3%-ig koncentration. I svavelsyrans fall var det:

$$0.95 \times V1 = 0.03 \times 100$$

$$3 = 0.95V1$$

$$V1 = 3/0.95 = 3.16$$

$$3.16/1.84 = 1.62$$

### 4.3.2 Tillsättning av syror

Syrorna vägdes upp och tillsattes under omrörning tillsammans med 200ml av slurry i 500ml glasflaskor ämnade för autoklavering. Flaskorna placerades i autoklav i 1h på 121°C, 101.6 kPa. Proverna spädades vidare med 100 ml för en mer hanterbar viskositet och förbereddes sedan för HPLC-analys (se 4.2.3).

Material: Svavelsyra (95%), Ättiksyra (99.8%), Citronsyra (100%), Analysvåg (Avantor ), 500ml glasflaskor,

#### **4.4 Fermentering**

Efter att produkt har funnits i saltsyra- och citronsyraslurrys kan fermentering påbörjas. pH regleras från 2.7 respektive 3 till 4.8 resp 4.9 med pH-mätare och 10% NaOH. När slurrys nått önskat pH tillsätts 1g *S. Cerevisae* till vardera e-kolv med 200 ml slurry i.

Dessa placeras sedan i en temperaturkontrollerad inkubator på 30°C under omrörning i 48 timmar.

Material: pH-mätare (Hi-2020 Edge Hybrid Multiparameter PH-meter, Hanna instruments), 10% NaOH, 2st 500ml E-kolv, jäsrör med sugrör.

##### **4.4.1 HPLC-analys för etanol**

Efter 24 samt 48 timmar togs ett trippelprov av vardera slurry. 2ml av proverna centrifugerades och supernatanten genomgick filtrering genom 0.22µm sterilfilter. 0,5ml fylldes i vialer för HPLC-analys för etanol.

Material: 2ml Mikrocentrifugtuber (Corning Costar) Centrifug (Eppendorf Minispin)

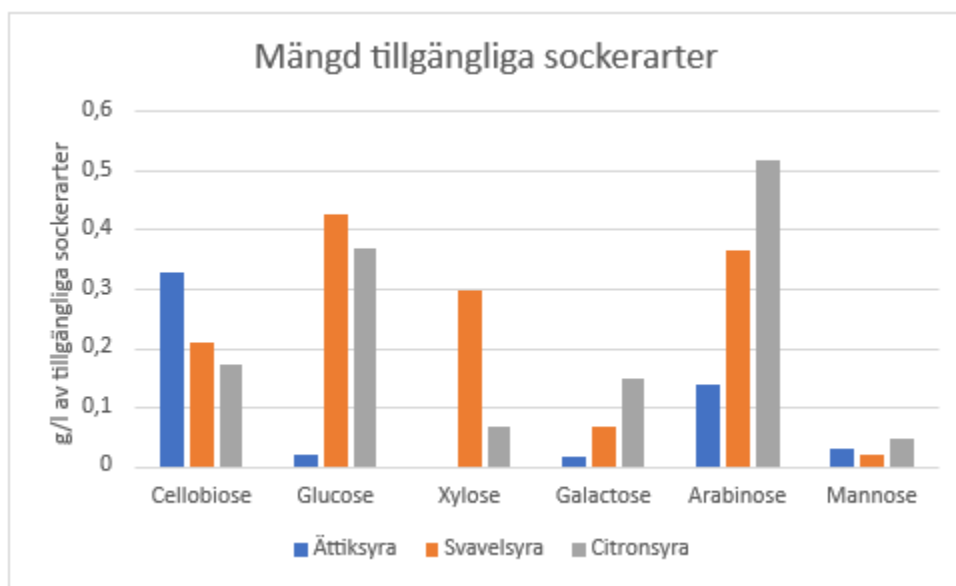
## 5 Resultat

### 5.1 Tillgängligt socker från enzymatisk hydrolys

Resultaten från HPLC-analys visade inte tillgängligt socker. Enzymerna bevisades otillräckliga för att klippa polysackaridkedjorna i *S. latissima*.

### 5.2 Socker från syrhydrolys

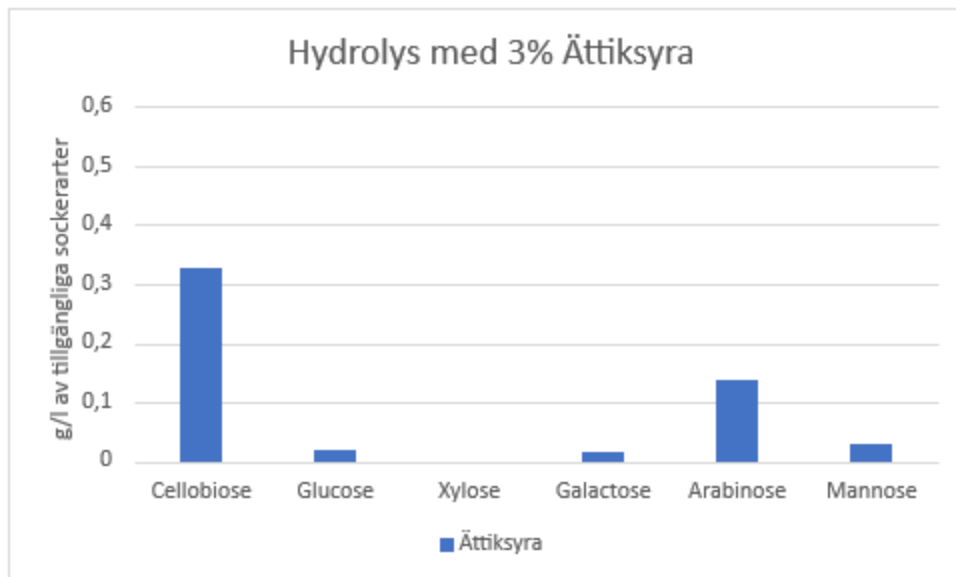
I figur 1 visas sockerarterna som detekterades av HPLC-analysen från 10g *S. latissima* i 200 ml slurry och behandlats med 3%-ig ättiksyra, svavelsyra och citronsyra. Halterna visas i g/l.



Figur 1: Mängd tillgängliga sockerarter efter syrhydrolys i g/l

#### 5.2.2 Ättiksyra

Figur 2 visar resultaten av syrhydrolys med 3% ättiksyra. Den minimala mängden glukos bevisar metoden vara den med minst avkastning av de tre.



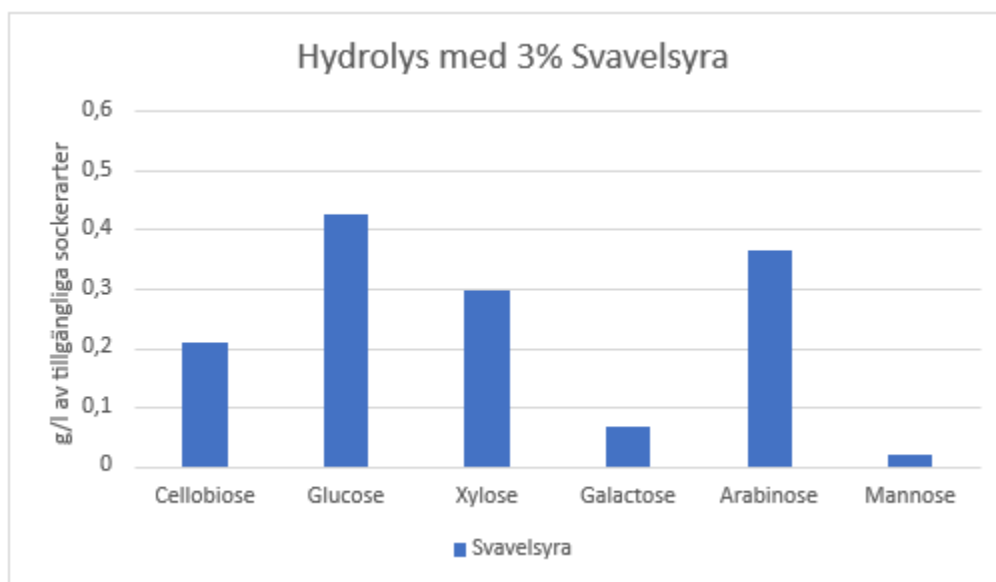
Figur 2: Mängd tillgängliga sockerarter från hydrolys med 3% ättiksyra

Tabell 4: Mängd sockerarter utvunna av ättiksyra från figur 2

Cellbios	Glukos	Xylos	Galaktos	Arabinos	Mannos
0,33g/l	0,02g/l	0	0,02g/l	0,13g/l	0,03g/l

### 5.2.3 Svavelsyra

Hydrolysen med svavelsyra är den vanligaste metoden och den med bäst avkastning med högst värde av glukos av de tre syrorna.



Figur 3: Mängd tillgängliga sockerarter från hydrolys med 3% svavelsyra

Tabell 5 Mängd sockerarter avkastade från svavelsyra från figur 3

Cellobios	Glukos	Xylos	Galaktos	Arabinos	Mannos
0,2g/l	0,42g/l	0,29g/l	0,06g/l	0,36g/l	0,02g/l

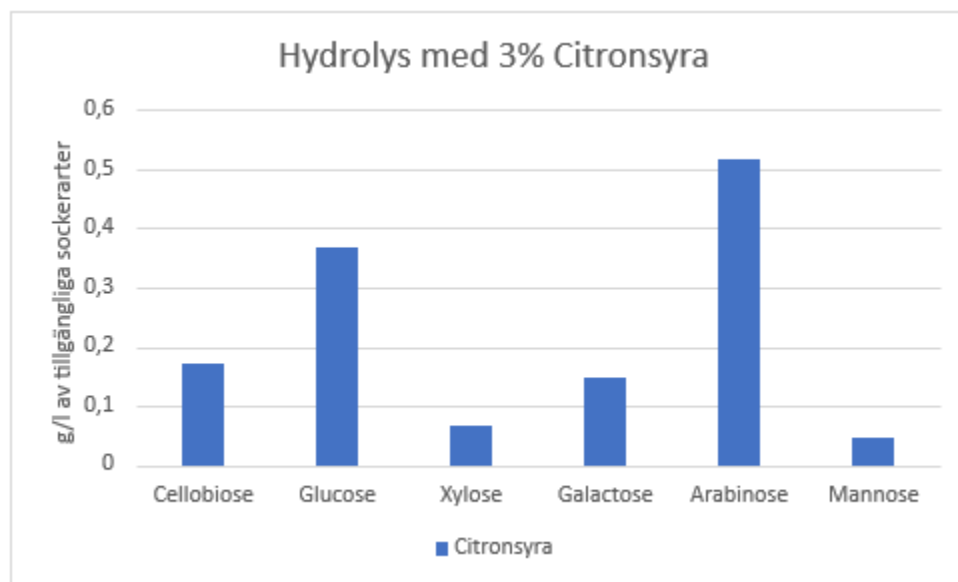
Tabell 6: Resultat för svavelsyra från uträkningarna använda från 3.6.2

Svavelsyra	g/g ts	g/kg ts	g/g kolhydrat	g/kg kolhydrat
Cellobios	0,0042	4,2	0,032	32
Glukos	0,0084	8,4	0,064	64
Xylos	0,0058	5,8	0,044	44
Arabinos	0,0072	7,2	0,055	55

Tabell 6 visar hur mycket gram av sockerarterna som avkastats per gram ts, samt per gram kolhydrat från hydrolys med svavelsyra.

## 5.2.4 Citronsyra

HPLC-analysen från slurryn med citronsyra visar en något lägre avkastning av sockerarter än svavelsyra.



Figur 4: Mängd tillgängliga sockerarter från hydrolys med 3% citronsyra

Tabell 7: Mängd sockerarter utvunna med citronsyra från figur 4

Cellobios	Glukos	Xylos	Galaktos	Arabinos	Mannos
0,17g/l	0,37g/l	0,06g/l	0,15g/l	0,52g/l	0,04g/l



Tabell 8: Resultat från uträkningarna använda från 3.6.2

Citronsyra	g/g ts	g/kg ts	g/g kolhydrat	g/kg kolhydrat
Cellobios	0,0034	3,4	0,026	26
Glukos	0,0072	7,2	0,055	55
Xylos	0,0012	1,2	0,09	9
Arabinos	0,0102	10,2	0,078	55

Tabell 8 visar hur mycket gram av sockerarterna som avkastats per gram ts, samt per gram kolhydrat från hydrolys med citronsyra.

Tabell 9: Skillnaden på svavelsyra och citronsyra från tabell 8

	Tot g/kg ts	tot g/kg kolhydrat
Svavelsyra	25,6	195
Citronsyra	22	145
Diff.	3,6	50

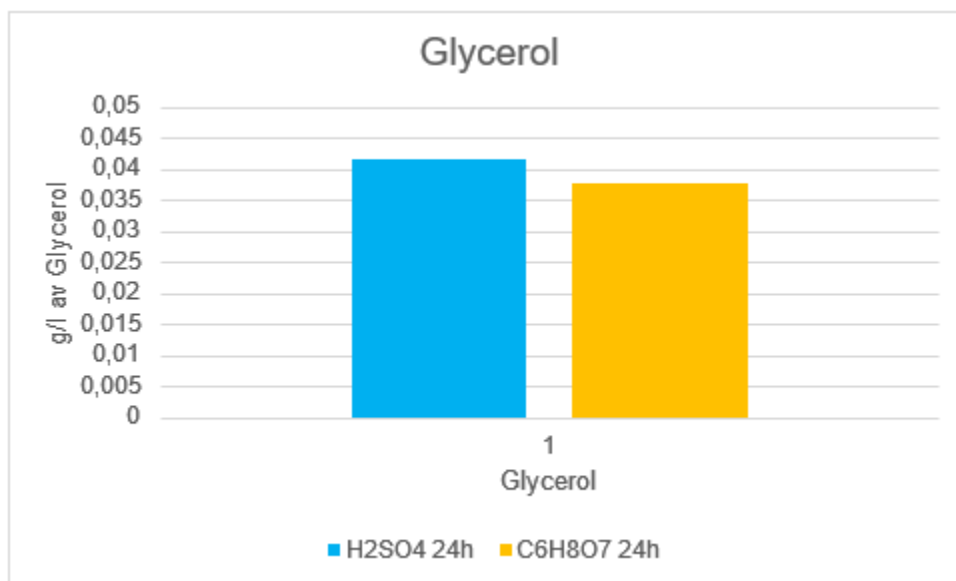
Tabell 9 visar differensen mellan totalt socker avkastat mellan svavelsyra och citronsyra och visar på en relativt liten skillnad.

### 5.3 Etanol

HPLC-analys visade ingen indikation av etanol. (Se bilaga 9.1)

### 5.3.1 Glycerol

Figur 5 visar att HPLC-analys visade avkast av liten mängd glycerol efter 24h av fermentering. Svavelsyra ( $H_2SO_4$ ) visade ett medelvärde på 0,0415g/l och citronsyra ( $C_6H_8O_7$ ) ett medelvärde på 0,0375g/l.



Figur 5: Medelvärde av mängd g/l glycerol utvinnet från 24 timmars fermentering av syrhydrolyserad slurry med svavelsyra och slurry med citronsyra med hjälp av jästsvampen *S. cerevisiae*

## 6 Diskussion

Resultatet av våra två olika typer av hydrolys kom tillbaka med både positiva och negativa resultat.

### 6.1 Enzymatisk hydrolys

Valet för enzymer för att besvara frågan om det “är möjligt att via enzymatisk hydrolys bryta ner tillräckligt mycket av *S. latissimas* komplexa polysackarider för att kunna fermentera ned till etanol med hjälp av kommersiella enzymer” var att ta reda på om lättillgängliga, något billigare enzymer som används för vanlig form av bryggning, kunde användas till *S. latissima*. Resultaten från HPLC-analysen visade inga spår av socker. Anledningen till detta är förmodligen att brunalger har för komplexa polysackarider i cellväggarna såsom alginat och laminarin som inte påverkades av valda enzymer.

Enzymerna som används i andra studier och arbeten inkluderar ofta alginate lyase och laminarinase, ibland med genetiska specifikationer för att klippa just dessa till monosackarider.

### 6.2 syrhydrolys

För att besvara frågeställningen om man kunde använda sig av ättiksyra eller citronsyra valde vi att utföra tester på samma vis som många andra studier vi läst. Dessa utfördes med hjälp av 3%-ig svavelsyra i autoklav på 121 C och vi valde att ersätta svavelsyran med ättiksyra och citronsyra i 2 av 3 försök för att kunna jämföra med standardiserad metod.

Dessa resultaten gav bättre ett resultat än de med enzymer. Ättiksyran visar en mindre avkastning av fermenterbara sockerarter. Cellobios är en disackarid som skulle behöva vidare enzymering för att brytas ner till glukos. Detta skulle behöva enzymer som cellobios eller  $\alpha$ -glukosidas. Svavelsyran som är den vanligaste typen av syra som används vid syrhydrolys var också den som i totalen visade bäst avkastning av fermenterbara sockerarter.

Dock visade citronsyra ett positivt resultat då resultaten inte blev långt ifrån svavelsyrans, som man kan se på tabell 9, vilket ger hoppet om att citronsyra kan vara ett potentiellt mer lättillgängligt alternativ.

Vår tankegång vid val av syror var att densamma som enzymerna i det att syrorna skulle vara lättillgängliga.

Teorin bakom avkastningen av glukos från syrhydrolysen är att det i huvudsak är cellulosan och hemicellulosan i bruntången som brutits ner och inte makrokomponenterna alginat eller laminarin. Vid hydrolysen bryts cellulösans  $\alpha$ -1,4-kedjade glukosenheter vilket släpper fritt glukoset.

Hemicellulosan är en polysackarid som innehåller en blandning av olika sockrar, bland annat de som analyserats, xylos, arabinos, glukos, mannos och galaktos. Vid hydrolys bryter syror ner kedjorna vilket förklarar varför vi fick en läsning av dessa vid HPLC-analys. Laminarinet kan delvis ha påverkats då det som tidigare nämnt är en förrådskolhydrat som innehåller glukos och det är därför möjligt att även denna har lyckats bli påverkad av hydrolysen.

Tabell 8 visar den faktiska mängd socker vi fick vid g/l och värdena blev relativt höga med tanke på att enbart cellulosa och hemicellulosan påverkats som består av ca 2-8% av totala kolhydraterna. Man kan då påstå att vi i alla fall lyckades påverka en stor del av cellulosa i *S. latissima* via vår metod.

Under syrhydrolysen använde vi oss av autoklivering för att öka effektiviteten kring nedbrytning av polysackarider. Men detta kan även ha lett till en mindre avkastning av socker, då tången även innehåller proteiner, aminosyror. Kombinationen av höga temperaturer, aminosyror och socker kan ha lett till en malliardreaktion som använt sig av frigt socker och därmed minskat faktisk frigt socker.

### 6.3 Fermentering & etanol

Fermenteringen av sockerarterna kom dessvärre inte tillbaka med spår av etanol. Detta kan bero på olika saker. Vissa studier utförde avmineralisering samt sanering av tången genom komplexa steg innan påbörjandet av hydrolys. Anledning för detta kan vara att innehåll av särskilda mineraler i *S. latissima* kan ha förstört jästcellerna och därmed förhindrat fermenteringen. En annan orsak till varför avkastningen blev så pass låg kan visas från resultatet av glycerol från 24h fermentering. *S. cerevisiae* kan, när utsatt för stress, av till exempel för låga nivåer av glukos, börja producera huvudsakligen glycerol istället för etanol. Detta kan vara en förklaring till varför 24h-proven visar nivåer av glycerol och 48h-proven saknar etanol.

Teorin bakom utbytet av glukos till etanol är  $0,51 \times \text{mängd glukos} = \text{etanol}$ . Alltså får man 51% etanol från mängden glukos som fermenteras. Detta betyder att vi i teorin bör ha fått ut ca. 0,21g/l etanol från svavelsyrhydrolysen och ca 0,19g/l etanol från citronsyrhydrolysen. I teorin kan mannitolet ha frigjorts från syrhydrolys och blivit tillgängligt för vidare nedbrytning. Det kan också vara möjligt att mannitolet frigjorts men inte vidare nedbrutits under fermenteringen då jästsvampen *S. cerevisiae* saknar enzymet laminarinase. För att få ut bäst resultat skulle en kombination av de två metoderna utföras med en förbehandling av syrhydrolysen uppföljt av enzymatisk hydrolys. I vårt fall är valet av enzymer fortfarande inte optimala för *S. latissimas* kolhydratsstruktur, men hade eventuellt kunnat leda till en något högre avkastning av sockerarter i slutändan. Syrhydrolysen hade assisterat med att bryta ned de mer komplexa polysackaridstrukturerna och ökat kontaktytan. Därmed hade, i teorin, enzymerna kunnat bryta ner de tillgängliga polysackariderna och oligosackariderna som uppstått efteråt.

## 7 Slutsats

Enzymerna  $\alpha$ -Amylas,  $\beta$ -Amylas och Amyloglukosidas går inte att använda enskilt för att utvinna socker från *S. latissima* via hydrolys. De behöver kombineras tillsammans med mer specifika enzymer såsom Alginate lyases eller Laminarinase för att påverka *S. latissimas* komplexa nätverk av polysackarider i form av alginat och laminarin i cellväggarna. Syrhydrolys med 3% koncentrerad citronsyra visade lovande resultat men lyckades bara påverka *S. latissimans* cellulosa och hemicellulosa. En kombination av förbehandling med syrhydrolys och efterbehandling med enzymatisk hydrolys hade i teorin kunnat leda till högre avkastning. Vidare studier behöver utföras.

## 8. Referenslista

Boderskov, T., Rasmussen, M. B., & Bruhn, A. (2023).

Upscaling cultivation of *Saccharina latissima* on net or line systems; comparing biomass yields and nutrient extraction potentials. *Frontiers in Marine Science*, 10, 992179.

<https://doi.org/10.3389/fmars.2023.992179>

Campbell-Platt, G. (1994).

Fermented foods — a world perspective. *Food Research International*, 27, 253-257.

[https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90093-0).

Frey, P. (2001).

Radical mechanisms of enzymatic catalysis.

*Annual review of biochemistry*, 70, 121-48 .

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.70.1.121>.

Kraan, Stefan. (2012).

Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook. 10.5772/51572.

Lamb, J. J., Sarker, S., Hjelme, D. R., & Lien, K. M. (2018). *Fermentative bioethanol production using enzymatically hydrolysed Saccharina Latissima*. SCIRP.

<https://doi.org/10.4236/aim.2018.85025>

María Cristina Ravanal, Sandeep Sharma, Javier Gimpel, Felipe E. Reveco-Urzuá, Margareth Øverland, Svein Jarle Horn, María Elena Lienqueo,

The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae,

Macrocystis pyrifera and Saccharina latissima, Algal Research, Volume 26, 2017, Sida 287-293, ISSN 2211-9264 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.012>.

Nakhate, P., & Van Der Meer, Y. (2021).

A Systematic Review on Seaweed Functionality: A Sustainable Bio-Based Material. *Sustainability*, 13(11), 6174. <https://doi.org/10.3390/su13116174>

Nationalencyklopedin, mannitol.

<https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/mannitol> (hämtad 2024-05-21)

Nationalencyklopedin, bladtång.

<https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/bladt%C3%A5ng> (hämtad 2024-05-21)

Nationalencyklopedin, brunalger.

<https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/brunalger> (hämtad 2024-05-21)

Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997).

Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231–241.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00352.x>

Out of the Blue: The Value of Seagrasses to the Environment and to People. (u.å.). [dataset].

[https://doi.org/10.1163/9789004322714\\_celc\\_2020-0252-0978](https://doi.org/10.1163/9789004322714_celc_2020-0252-0978)



Phwan, C.K., Chew, K.W., Sebayang, A.H. et al.(2019)

Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae. *Biotechnol Biofuels* 12, 191 (2019).

<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1533-5>

Showalter, A. (1993).

Structure and function of plant cell wall proteins.. *The Plant cell*, 5, 23 - 9.

<https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9>.

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926416308177?fr=RR-2&ref=pdf\\_download&rr=88120b214ee28f5d](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926416308177?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=88120b214ee28f5d)

Sharma, S., Neves, L., Funderud, J., Mydland, L. T., Øverland, M., & Horn, S. J. (2018).

Seasonal and depth variations in the chemical composition of cultivated *Saccharina latissima*. *Algal Research*, 32, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.012>

Schultze-Jena, A., Vroon, R. C., Macleod, A. K. A., Hreggviðsson, G. Ó., Adalsteinsson, B. T., Engelen-Smit, N. P. E., De Vrije, T., Budde, M. A. W., Van Der Wal, H., López-Contreras, A. M., & Boon, M. A. (2022).

Production of acetone, butanol, and ethanol by fermentation of *Saccharina latissima*: Cultivation, enzymatic hydrolysis, inhibitor removal, and fermentation. *Algal Research*, 62, 102618. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102618>

S., Olsen, Y., Surilayani, D., & Handå, A. (2021).

Carbohydrate of the Brown Seaweed, *Saccharina latissima*: A Review. *Joint proceedings of the 2nd and the 3rd International Conference on Food Security Innovation (ICFSI 2018-2019)*. <https://doi.org/10.2991/ABSR.K.210304.031>

Sigmaaldrich, Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*

<https://www.sigmaaldrich.com/SE/en/product/sigma/a7095> (hämtad 2024-04-22).

Sigmaaldrich,  $\beta$ -Amylase from barley

<https://www.sigmaaldrich.com/SE/en/product/sigma/a7130> (hämtad 2024-04-22)

Sigmaaldrich,  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis*

<https://www.sigmaaldrich.com/SE/en/product/sigma/a3403> (hämtad 2024-04-22)

Saifullah, Olsen, Y., Surilayani, D., & Handå, A. (2021).

*Carbohydrate of the Brown Seaweed, Saccharina latissima: A Review: 2nd and 3rd International Conference on Food Security Innovation (ICFSI 2018-2019)*, Banten, Indonesia. <https://doi.org/10.2991/absr.k.210304.031>

Saifullah, Olsen, Y., Surilayani, D., & Handå, A. (2021).

*Carbohydrate of the Brown Seaweed, Saccharina latissima: A Review: 2nd and 3rd International Conference on Food Security Innovation (ICFSI 2018-2019)*, Banten, Indonesia. <https://doi.org/10.2991/absr.k.210304.031>

Hreggviðsson, G. Ó., Nordberg-Karlsson, E. M., Tøndervik, A., Aachmann, F. L., Dobruchowska, J. M., Linares-Pastén, J., Daugbjerg-Christensen, M., Moenaert, A., Kristjansdottir, T., Sletta, H., Fridjonsson, O. H., & Aasen, I. M. (2020).

Biocatalytic refining of polysaccharides from brown seaweeds. I *Sustainable Seaweed Technologies* (s. 447–504). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00016-0>

I, Y.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Imre, B.; Wong, A.C.Y.; Hsieh, Y.S.Y.; Wang, D. Brown Algae Carbohydrates: Structures, Pharmaceutical Properties, and Research Challenges. *Mar. Drugs* 2021, 19, 620. <https://doi.org/10.3390/md19110620>

Wainwright, M. (1992). *An Introduction to Fungal Biotechnology*. Wiley.

Phwan, C.K., Chew, K.W., Sebayang, A.H. *et al.*

Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae. *Biotechnol Biofuels* 12, 191 (2019).

<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1533-5>

## 9. Bilagor

## 9.1 Resultat för HPLC-analys för etanol

			Acetic	Arabinose	Cellobiose	Ethanol	Formic	Furfural	Glucose	Glycerol	HMF	Lactic	Levulin	Succinic	Xyl+Gal+Man
			Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration	Concentration
St1	p2a1	1	0.5020	0.2500	0.2500	0.5050	0.2550	0.2560	0.5000	0.2520	0.2510	0.2500	0.2500	0.2510	0.2500
	p2a1	1	2.5077	1.2470	1.2489	2.5241	1.2764	1.2802	2.4990	1.2618	1.2554	1.2478	1.2506	1.2539	1.2468
	p2a1	1	5.0160	2.4956	2.4965	5.0471	2.5544	2.5625	4.9990	2.5248	2.5085	2.4946	2.5017	2.5072	2.4959
	p2a1	1	7.5285	3.7474	3.7484	7.5632	3.8368	3.8441	7.5047	3.7915	3.7693	3.7428	3.7556	3.7658	3.7466
	p2a1	1	10.0339	4.9970	5.1511	10.1280	5.0996	5.1183	10.1060	5.0970	5.0185	4.9455	5.0053	5.0241	5.0133
1.1	p2a2	1		0.0117			0.1216			0.0468					0.0488
1.2	p2a3	1		0.0103			0.1063			0.0412					0.0461
1.3	p2a4	1		0.0096			0.0847			0.0365					0.0444
2.1	p2a5	1		0.0132	0.0662		0.0801			0.0409					0.0718
2.2	p2a6	1		0.0124			0.0730			0.0369					0.0728
2.3	p2a7	1		0.0155			0.0651			0.0347					0.0752
3.1	p2a8	1		0.0086			0.0798								
3.2	p2a9	1		0.0083											
3.3	p2a10	1		0.0083											
4.1	p2a11	1		0.0221	0.0986										0.0260
4.2	p2b1	1		0.0206	0.1014				1.1654						0.0185
4.3	p2b2	1		0.0198	0.0767				1.1979						
St1	p2a1	1		0.2394	0.2812	0.4730		0.1982	0.4760	0.2135	0.2216		0.2125		0.2829
	Average		5.1176	0.7298	1.3519	4.3734	1.1361	2.2099	3.5560	1.1148	2.1707	2.5362	2.1626	2.5604	0.9599
	Std. Dev.		3.8114	1.4819	1.8340	3.9330	1.7455	1.9991	3.6213	1.7458	1.9546	1.8808	1.9507	1.9083	1.6224
	%RSD		74.4766	203.0427	135.6620	89.9299	153.6412	90.4638	101.8359	156.6045	90.0431	74.1583	90.2012	74.5303	169.0141

9.2 Analyserapport av levererad *S. latissima* från företaget KOBB, utförd av Eurofins.**Analyserapport**

Provnummer:	525-2023-05150208	<sup>1</sup> Provtagningsdatum:	2023-05-11
<sup>1</sup> Provmärkning:	170111 blöt	<sup>1</sup> Produkt	Blancherad tång
Provet ankom:	2023-05-15		
Analysrapport klar:	2023-05-24		
<sup>1</sup> Provets kod:	1701011 blöt		
Analyserna påbörjades:	2023-05-15		

Testkod	Parameter	Resultat	Enhet	Måto.	Metod/ref.	Lab
LP06U <sup>[a]</sup>	Vattenhalt	81.8	g/100 g	± 10%	NMKL 23	EUSELI
LP06V <sup>[a]</sup>	Aska	14.4	g/100 g	± 10%	NMKL 173	EUSELI
LP021 <sup>[a]</sup>	Råprotein enl. Kjeldahl (Nx6.25)	1.08	g/100 g	± 10%	NMKL 6:2003	EUSELI
LW1RG <sup>[a]</sup>	Råfett	0.23	g/100 g	± 30%	NMKL 160 mod.	EUSELI
LP06Z <sup>[a]</sup>	Kolhydrater (beräknade)	2.49	g/100 g		(EU) nr 1169/2011	EUSELI
LP072 <sup>[a]</sup>	Energivärde kJ (beräknad)	69	kJ/100 g		(EU) nr 1169/2011	EUSELI
LP072 <sup>[a]</sup>	Energivärde kcal (beräknad)	16	kcal/100 g		(EU) nr 1169/2011	EUSELI
LW04E	NaCl ber. ur Natrium halt	12.6	g/100 g			EUSELI
SL0AC <sup>[a]</sup>	Natrium Na	5000	mg/100 g	± 25%	SS-EN ISO 17294-2:2016 /SS- EN 13805:2014	EUSELI2