



Optimering av tanninextraktion

- Extraktion av polyfenoler från tallbark

Optimization of tannin extraction
- Extraction of polyphenols from pine bark

Tomas Ekström

Arbetsrapport 4 2017
Examensarbete 30hp A2E
Jägmästarprogrammet

Handledare:
Torgny Mossing

Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för skogens biomaterial och teknologi
S-901 83 UMEÅ
www.slu.se/sbt

Tfn: 090-786 81 00

Rapport från Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Optimering av tanninextraktion

- Extraktion av polyfenoler från tallbark

Optimization of tannin extraction
- Extraction of polyphenols from pine bark

Tomas Ekström

Nyckelord: tannin, bark, polymer, slam, Pinus sylvestris, extraktion, optimering

Arbetsrapport 4 2017
Jägmästarprogrammet
EX0772, A2E

Examensarbete i skogshushållning vid Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi, 30hp
Handledare: Torgny Mossing, SLU, Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi
Examinator: Mehrdad Arshadi, SLU, Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi
Utgivningsort: Umeå
Utgivningsår: 2017
Rapport från Institutionen för Skogens Biomaterial och Teknologi

Förord

Tack till Torgny Mossing för handledning och support under hela studiens process från idé och praktiskt genomförande till utformning av rapporten. Ditt stöd har varit betydelsefullt för studiens resultat!

Ubbie Östman och Carina Jonsson, tack för er vägledning och stöttning i labbet. Ni gjorde labbprocessen både enklare och roligare. Tack för det!

Slutligen vill jag tacka Bo-Roland Granström för barken från de tre tallar som användes under studien. Den manuella avverkningen och barkningen säkrade den materiella kvalitén på arbetet.

Sammanfattning

Varje år produceras cirka 1 miljon ton slam i de svenska reningsverken. I slammet ackumuleras oönskade metaller och organiska ämnen. För att avvattna och skilja slammet från avloppsvattnet och effektivisera transporten till deponi eller åkermark som gödsel används ett flocknings-/koaguleringsmedel. Vanligtvis används den syntetiska polymeren polyakrylamid vid slamflockning. Polymeren bryts dock ner långsamt eller inte alls i naturen vilket kan bidra till en ackumulation i marken. Tanniner extraherat från bark har visat liknande egenskaper, kommersiella flockningsprodukter finns men tillverkas utomlands och då främst från akacia. Intresse finns att utvärdera möjligheterna att extrahera tanniner från, inhemska trädslag för senare användning mot avloppsslam och som retentionsmedel inom massaindustrin inom Sverige.

Då varje trädslag är unikt krävs olika förhållanden för optimal extraktion, därför behövs en metod som utvärderar vilka faktorer som påverkar tanninutfallet på inhemska trädslag. Syftet med detta examensarbete blir därav att kontrollera vilken inverkan de tre faktorerna temperatur, bark/liter lösningsmedel (TS-halt) och fraktionsstorlek har på extraktionsutfallet på trädslaget tall (*Pinus sylvestris*). Tanninerna extraherades genom att barken, under omrörning, fick ligga i en 8-procentig natriumkarbonatlösning. De tre faktorernas värden varierade mellan försöken och prover togs efter 4, 8, 16, 32 och 64 minuter. Mängden fenoler kontrollerades med hjälp av en fotospektrometer.

Resultatet visade att alla tre faktorerna hade en signifikant inverkan på extraktionsutfallet. Ökad temperatur och bark/liter lösningsmedel hade positiv korrelation med extraktionsutbytet medan ökad fraktionsstorlek visade negativ korrelation. Under studien uppnåddes inget optimalt förhållande för maximerat extraktionsutfall men det visade att framgångsrik extraktion av tanniner från inhemska trädslag är möjlig.

Nyckelord: tannin, bark, polymer, slam, *Pinus sylvestris*, extraktion, optimering

Summary

Each year about 1 million tons of sludge is created in the Swedish treatment plants. The sludge accumulates unwanted metals and organic substances. In order to dewater and separate the sludge from the waste-water and streamline the transport to landfills or farmland as fertilizer, a flocculation/coagulation agent is used. The most commonly used product in sludge flocculation is the synthetic polymer polyacrylamide. The polymer breaks down slowly or not at all in nature, which can contribute to an accumulation in the soil. Tannins extracted from the bark have similar properties, commercial flocking agents exist but are manufactured abroad, mainly from the bark of the Acacia tree. There is an interest to evaluate the possibilities of extracting tannins from native tree species for later use against sludge and retention aids in the paper industry in Sweden.

As each species is unique, they require different conditions for optimal extraction, therefore a method is needed that evaluates the factors that influence tannin extraction of native tree species. The purpose of this study is hence to evaluate what the impact of the three factors; temperature, bark/liter of solvent and fraction size, has on extraction outcome for the tree species pine (*Pinus sylvestris*). The tannins were extracted from the bark into an eight percent sodium carbonate solution while stirring. The values of the three factors varied between the trials and samples were taken after 4, 8, 16, 32 and 64 minutes. The amount of phenols was measured using a spectrophotometer.

The results showed that all three factors had a significant impact on the extraction outcome. Increased temperature and bark/liter solvent had a positive correlation with the extraction yield while increased fraction size showed a negative correlation. During the study no optimal ratio for maximized outcome was achieved, but showed that the extraction of tannins from indigenous tree species is promising.

Innehållsförteckning

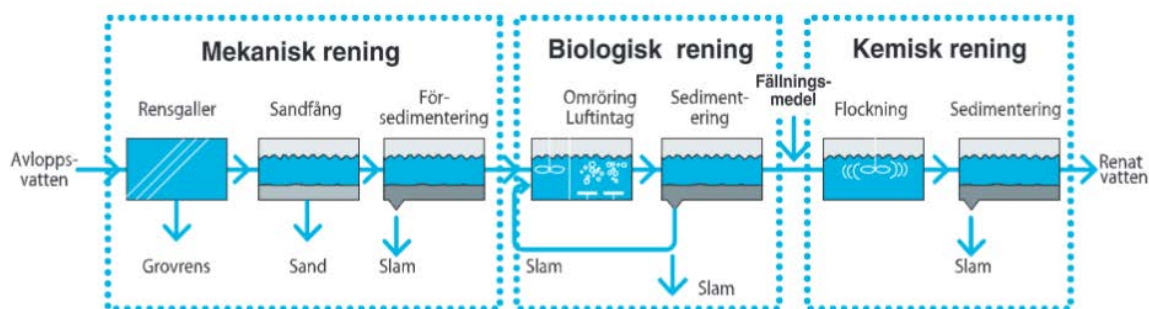
Bakgrund	2
Rening av avloppsvatten.....	2
Polymerer.....	3
Hydrolyserbara tanniner	5
Kondenserbara tanniner	6
Extraktion av tanniner	6
Katjonerade tanniner som flockningsmedel.....	7
Avgränsningar.....	8
Syfte.....	9
Material och metoder	10
Material.....	10
Försöksdesign	10
Metod	11
Mätning med UV.....	12
Analysmetod	14
Resultat	15
Minitab.....	15
Modde.....	16
Diskussion	23
Felkällor och framtiden	23
References	25
Bilaga 1	29
Bilaga 2.	30
Bilaga 3.	31
Bilaga 4.	32

Bakgrund

Rening av avloppsvatten

I Sverige finns det idag ca 2000 kommunala reningsverk där många av dessa är småskaliga. Oftast består vattenreningen i flera tekniska steg där kombinationen vanligtvis är mekanisk, kemisk och biologisk (Figur 1).

Rening av avloppsvatten inleds alltid med ett mekaniskt steg som genom galler, sandfång och försedimentering fångar upp större fasta partiklar som småsten, sand, grus, träbitar, papper, hår, textilier och plast. Oftast kommer sedan ett kemiskt steg där järnklorid (FeCl_3) eller andra kemikalier används för fällning av fosfor (P) som sedan avskiljs som järnfosfat (FePO_4) (Nordlund, 2015). Genom flockbildning och sedimentering avskiljs kem-slamm (slam som fällt med fällningsmedel) där cirka 90 procent av fosfor avlägsnas ur avloppsvattnet. I biosteget tillsätts syre till vattnet genom stora pumpar för att gynna de aeroba bakterierna som bryter ner cirka 90 procent av det organiska materialet och cirka 20 procent av kvävet som förbrukas av mikroorganismerna. Dessa klumpas sedan ihop till flockar och avskiljs i sedimenteringsbassänger (aktivslammetoden). (Naturvårdsverket, 2012; VAKIN, 2016)



Figur 1. Ett exempel på vattenreningens olika steg. (Naturvårdsverket, 2012)

Figure 1. An example of the different stages in a water treatment plant.

Slam bildas dagligen som en restprodukt vid rening av avloppsvatten och årligen produceras ca 1 miljon ton slam i de svenska reningsverken (Svenskt Vatten, 2016). Slammets torrsubstanshalt är 30 procent och under 2014 års mätningar var slammets genomsnittliga näringsinnehåll 2,6 procent fosfor och 4,5 procent kväve (SCB, 2014) vilket gör det till en intressant produkt för jordbruket och miljön.

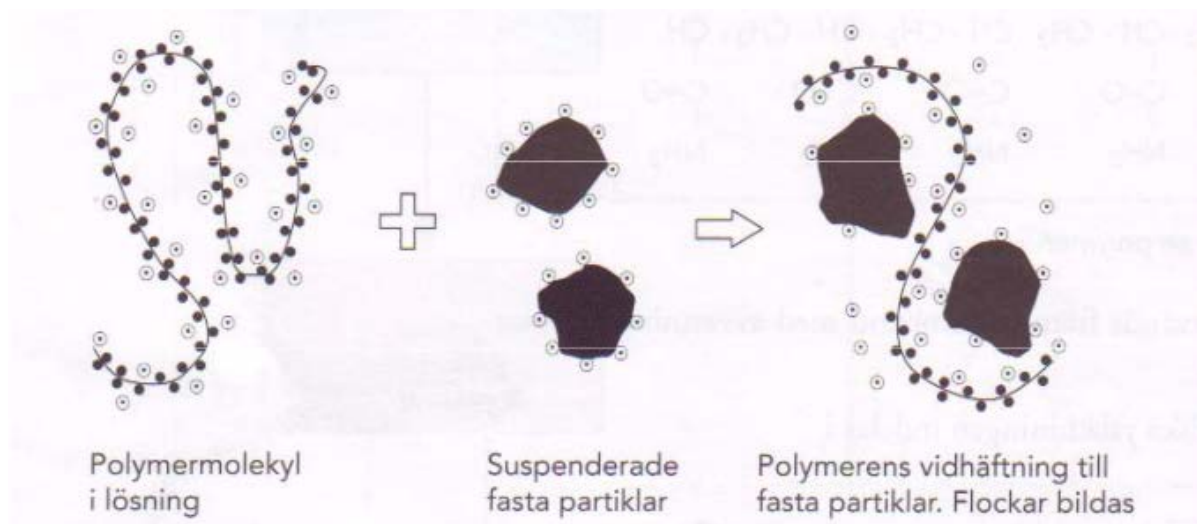
Idag sprids ca 25 procent av det totalt producerade slammets på åkrarna i Sverige. Slammets innehåller innan reningsprocessen många oönskade metaller och organiska ämnen men genom att behandla och röta slammets för utvinning av biogas hygieniseras slammets där antalet sjukdomsframkallande organismer minskar, särskilt vid termofil rötning (55°C) (Kjerstadius, et al., 2012; Naturvårdsverket, 2012).

För att det ska bli ekonomiskt hållbart att transportera slammets från biogasanläggningarna till åkrarna måste slammets avvattnas.

Detta beror på att TS-halten i biogödsel före avvattning är mycket låg, cirka 2 - 4 procent vilket betyder att om slammet inte skulle avvattas skulle onödigt mycket vatten köras runt på de svenska vägarna (Avfall Sverige, 2011).

Polymorer

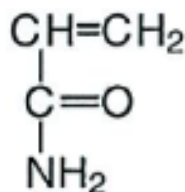
Ett sätt att effektivisera avvattningen är att tillsätta aluminium- eller järnsalter och/eller olika organiska/syntetiska polyelektrolyter (PE), som flockar slammet och förhöjer sedimenterings- och avvattningsegenskaperna. Polymerernas byggstenar är monomerer som bildar långa kedjor av organiskt material. Polymererna kan delas in i olika grupper beroende på vilken ytladdning som de har, det vill säga anjoniska, katjoniska eller nonjoniska polymerer. Även slammet har en ytladdning där primär och bioslam oftast har en mer negativt laddad yta och kemslam (slam avskilt med kemiska metoder) oftast en mer positiv laddad yta. Detta gör att flockningen underlättas då det är möjligt för de långa polymerkedjorna att bilda så kallade polymerbryggor mellan sig och slammet. I figur 2 visas hur polymeren lägger sig mellan de lösa partiklarna. (Hiltunen, 2010)



Figur 2. Bryggbildning av polymerer mellan de lösa partiklarna. (Hiltunen, 2010)

Figure 2. Crosslinking of the polymers between the loose particles.

I de svenska reningsverken används generellt katjoniska PE där polyakrylamid (PAM) är vanligast. PAM tillverkas genom att akrylamid (Figur 3) friradikalpolymeriseras vilket gör molekylerna mer reaktiva och dubbelbindningen till kol blir enkel. Då bildas en nonjonisk polymer som kan laddas till anjonisk genom att till exempel sampolymerisera akrylat med natriumakrylat eller laddas katjoniskt genom sampolymerisering med av till exempel amino-ester derivat och metylklorid. (Avfall Sverige, 2011; Wahlberg & Paxéus, 2003)



Figur 3. Akrylamid (Avfall Sverige, 2011)

Figure 3. Acrylamide

Användningen av PAM i slambehandlingen har kritiserats av miljöorganisationer till exempel KRAV, Ren åker ren mat och Konsumenternas, för att innehålla bland annat små mängder av det cancerframkallande ämnet akrylamid p.g.a. att inte all akrylamid polymeras vid produktion (Ren åker ren mat, 2009). Polyakrylamid var till exempel det ämne som användes vid tunnelbygget i Hallandsåsen i slutet av 1990-talet men då i mycket större koncentrationer (Livsmedelsverket, 2016). Monomerer polymeriserades direkt vid användningen som tätningsmedel med hjälp av en katalysator vilket minskade polymerisationsgraden. Mängden restakrylamid i de produkter som används på avloppsvatten anses dock vara låg, oftast lägre än 0,1 procent enligt leverantörerna. (Wahlberg & Paxéus, 2003). Problemet med PAM är att det bryts ner långsamt eller inte alls vilket skulle kunna innebära en ackumulering i marken (Avfall Sverige, 2011). Med den bakgrunden och önskemålen från regeringen att återföra fosfor till åkermarkerna krävs naturliga polymerer som lättare bryts ner i marken (Kling, 2013). Regelverket är inte helt tydligt och det finns inga direkta regler mot användning av PAM, begräsningarna är mer kopplade till enskilda organisationer där till exempel LRF och KRAV har restriktioner vid användning av slam på åkermark.

Biologiskt nedbrytbara polymerer

Biologiskt nedbrytbara material definieras av Europeiska kommissionen som ett ämne som efter 28 dygn har brutits ner aerobt 70 procent eller mer och slutprodukten av en fullständig nedbrytning ska då resultera i koldioxid och vatten (2005/360/EG). Det finns idag flera kommersiella produkter till exempel:

Kitosan är en delvis deacetylerad polymer erhållen från alkalisk deacetylering av kitin och utvinns ur skaldjur, till exempel räkor och krabbor. Kitosan (handelsnamnet) som både är koagulerande, flockande och bakteriedödande, kan brytas ner i naturen vilket gör slammet säkrare att använda vid till exempel landfyllnad. Kitin är efter cellulosa den vanligaste biopolymeren i världen. (Renault, et al., 2009)

Extracellulära polysackarider (EPS) framställs av bakterier i form av ett slem som lägger sig i mediet runt bakterierna. För att modifiera EPS-baserade polymerer binds en laddad molekyl till huvudkedjan. Dessa polymerer har tillsammans med katjonisering visat sig ha en viktig roll vid flockning av aktivt slam. (Higgins & Novak, 1997; Krentz, et al., 2006) Dock finns ingen information om att det används i någon större utsträckning kommersiellt i Sverige.

Stärkelse utvinns ur potatis, majs eller vete och är en disackarid bestående av glukos. Genom att binda ammoniumgrupper till polysackariden kan stärkelsebaserade polymerer produceras. Polymererna som är relativt billiga och bryts ner i marken används idag inom tillverkning av bioplast och massaindustrin som retentionsmedel. (Nordisk bioplastförening, 2011; Ziólkowska, et al., 2011; Prado & Matulewicz, 2014; Kuutti, et al., 2011)

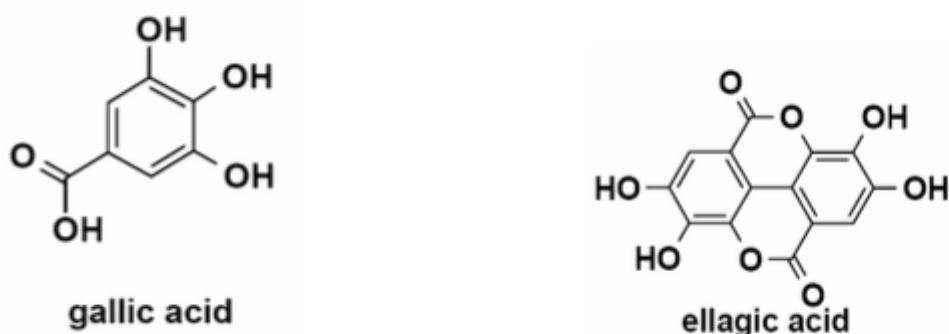
Tanniner finns i många växter och växtdelar men utvinns främst ur bark. Barken från träd har länge använts av människan för dess olika egenskaper. Bark är idag en stor restprodukt från skogsindustrierna, till exempel är det årliga barkutbytet i Kanada 17 miljoner m³ (Feng, et al., 2013), respektive 7,5 miljoner m³ för Sverige medräknat fäll och spån (Skogsstyrelsen, 2014). Bark används i stor utsträckning som landfyllnad eller som energi genom förbränning vid industrier. Mycket av dagens energi och kemikalier kommer från

fossila källor men på grund av den globala uppvärmningen, sinande oljekällor och varierande oljepriser blir det mer och mer intressant med förnyelsebara resurser. Tanniner är den enda ämnesgrupp i bark som hittills ger kommersiellt värdefulla kemiska produkter (Feng, et al., 2013). Det finns flera olika typer av tanniner men oftast delas de upp i undergrupper; hydrolyserbara och kondenserbara tanniner samt en grupp kallad komplexa tanniner (Hedqvist, 2001; Khanbabaee & Ree, 2001). Skador på växter ger ett ökat tanninnehåll vilket kan indikera på att många växter använder det som ett skydd mot bland annat infektioner, insekter och växtätande djur (Åkesson, 2009).

Tanniner extraheras främst ur mörka träslag och är vattenlösliga polyfenoler som kan bilda komplex med bland annat metaller, proteiner och alkaloider (Hedqvist, 2001). Traditionellt har tanniner använts för garvning av läder just på grund av dess höga reaktivitet med proteinet i djurskinn vilket gör att dessa polyfenoliska föreningar skiljer sig från andra typer av polyfenoler (Feng, et al., 2013). Eftersom tanniner har dessa speciella egenskaper används det inom många områden till exempel vid öl och vintillverkning för bland annat sina antioxidativa egenskaper samt för att göra vätskorna klarare. Då tanninernas polyfenoliska egenskaper gör att de kan utfälla tungmetaller och alkaloider (utom morfin), kan de användas vid förgiftningar av dessa substanser (Khanbabaee & Ree, 2001). Kondenserade tanniner har i studier framgångsrikt fungerat som metallfilter där tungmetaller som kadmium, koppar, zink m.m. bundits till tanninkomplexet (Suzuki, et al., 2004). Tanniner ska även ha en positiv påverkan på idisslare genom att skydda lättlösliga proteiner från nedbrytning i vommen till dess att fodret nått löpmagen samt att det fungerar som parasit och maskhämmande medel (Christensson, 2001).

Hydrolyserbara tanniner

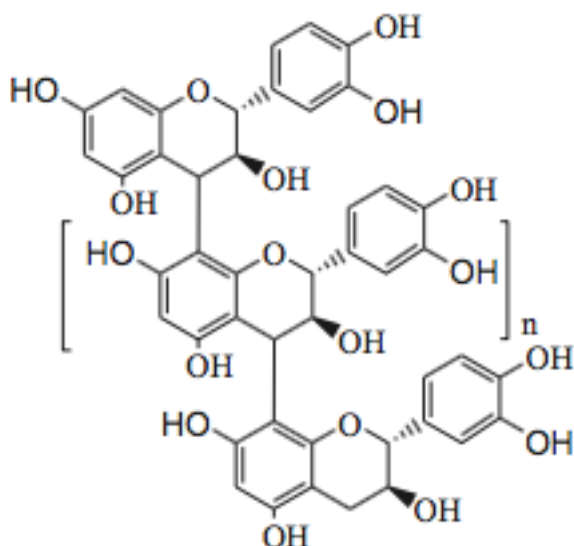
Gallotanniner och ellagitanniner är två olika sorters tanniner som kan hydrolyseras med syra till garvsyra och ellaginsyra. Dessa tanniner som ofta extraheras ur ek eller kastanj är lätta att hydrolysera och har därav fått namnet hydrolyserbara tanniner. De hydrolyserbara tanninerna är derivat av garvsyra (3,4,5-trihydroxyl bensoesyra), som är enkla blandningar av pyrogallol, glukosyror och olika fenoliska syror. Att det bildas garvsyra eller ellagisyra beror på polyfenolstrukturen, (Figur 4).



Figur 4. Garvsyrastruktur och Ellagisyrastruktur. (Åkesson, 2009)
Figure 4. Tannic acid structure and ellagic acid structure.

Kondenserbara tanniner

Kondenserade tanniner utgör mer än 90 procent av den totala kommersiella tanninproduktionen i världen och undergruppen har även störst förekomst inom växtriket. Dessa tanniner går i stor utsträckning att hitta i vindruvor, äpplen, te, olika baljväxter samt buskar och träd och extraheras ofta kommersiellt från Akacia. De kondenserade tanninerna består av komplexa kemiska strukturer av polyfenolen som genom kondensation när två molekyler sammanfogas stöts vattenmolekylen bort och flavanolenheter byggs ihop till större molekyler. Dessa grupper innehåller polyhydroxyflavan-3-ol oligomerer och polymerer som förenas genom kol-kolbindningar mellan flavonol subenheterna (Figur 5). Ett annat namn på dessa tanniner är proantocyanidiner vilket innebär att de bildar en kraftigt rödfärgade antocyanidiner vid upphettning och närvaro av surgjord alkohol. Den röda färgen utnyttjas vid analytiska kontroller av tanninhalten vid extraktionen då den röda färgen absorberar ljus vid en viss våglängd och ger därigenom ett mått på tanninkoncentrationen. Tanniner reagerar också starkt med kemikalier såsom formaldehyd. (Hedqvist, 2001; Feng, et al., 2013)



Figur 5. Struktur på kondenserade tanniner. (Feng, et al., 2013)

Figure 5. A structure of condensed tannins.

Extraktion av tanniner

Globalt och kommersiellt extraheras kondenserade tanniner främst från Quebracho (*Schinopsis balansae*), bark från Akaciaträd (*Acacia mearnsii*) och kastanj (*Castanea sativa*) (Pizzi, 1982; Fradinho, et al., 2002). Koncentrationen av tanniner vid extraktion ur bark beror på flera faktorer, bland annat på art, trädålder, lagringstid från fällning och extraktionsmetod. Icke gynnsam förvaring av barken innan extraktion kan leda till låghaltig extraktion av tanniner genom att extraktivämnena självkondenserar, oxideras och börjar att forma bindningar mellan fibrer eller protein. För att på bästa sätt förhindra det bör barken lufttorkas eller torkas på låg värme upp till 40°C. (Feng, et al., 2013)

Tanniner har traditionellt extraherats med hjälp av vatten (Raju, et al., 2008). Vattnets temperatur spelar stor roll i hur mycket tanniner, andra extraktivämnena och sockerarter som följer med vid extraktionen. Studier visar att extraktion med kallt vatten leder till större andel tanniner men mindre total extraktion och där extraktion med varmt vatten ger

högre total extraktion och där större andel hemicellulosa, ättiksyra och lignin extraheras. (Liiri, et al., 1982; Heller, 2009) Studier har även visat på att barkpartikelns storlek påverkar extraktionspotentialen, då mindre partiklar ger högre extraktion av tanniner (Onifade, 2000).

Tanniner kan extraheras än mer framgångsrikt med andra lösningsmedel än med vatten, till exempel används i stor utsträckning organiska lösningsmedel som metanol, etanol och aceton då dessa sedan lätt kan avlägsnas och återanvändas med hjälp av destillation eller evaporation. Ett samlösningsmedel, en blandning på både vatten och organiska lösningsmedel, har dock visat störst potential vid effektiv tanninextraktion jämfört med att använda de enskilda lösningsmedlen var för sig. Studier har även visat att alkaliska lösningsmedel kan öka extraktionshalten jämfört med att endast använda vatten. (Feng, et al., 2013). Exempel på ämnen som används för att göra en alkalisk lösning är natriumhydroxid (NaOH), natriumbisulfit (NaHSO₃) eller natriumkarbonat (Na₂CO₃) vilket i en studie (Vieira, et al., 2011) visade att en 8-procentig natriumkarbonatlösning gav optimal extraktion av tanniner (*Pinus oocarpa* var. *Oocarpa*) jämfört med vatten och natriumbisulfit. I en annan studie på en annan tall art var dock optimal natriumkarbonathalt endast 0,2 procent (Derkyi, et al., 2014). De optimala förhållandena vid extraktion av tanniner är artspecifika där olika lösningsmedel och temperaturer måste utvärderas för att urskilja bästa extraktionsmetod (Feng, et al., 2013).

Det finns flera olika metoder för att analysera polyfenolhalten i extraktet där vissa är mer eller mindre tillförlitliga. Ett sätt att kontrollera polyfenolhalten är att göra ett geltest, Stiasny test, då extraktet får reagera med formaldehyd som under konstant temperatur och behandling med natriumhydroxid stelnar till en gel. Tiden det tar för extraktet att gå från flytande till gel mäts vilket då blir den så kallade geltiden (Åkesson, 2009). En annan metod är att fenolerna får reagera med natriumbisulfit eller Folin-Ciocalteureagens som efter viss tillredning ger utslag vid mätning i en fotospektrometer (Antoine, et al., 2004; Waterhouse, 2012). En nyare metod som utformats av (Hagerman, 2002) är att utnyttja polyfenolernas förmåga att reagera med protein vilket då bildar ett färgat komplex läses av i en fotospektrometer (Åkesson, 2009). I denna studie användes en fotospektrometer för att läsa av polyfenolhalten enligt (Waterhouse, 2012) metod.

Katjoniserade tanniner som flockningsmedel

Tanniner har i många studier fungera som flockningsmedel av bland annat färgämnen, grumliga vattendrag och slam hos reningsverk (Beltrán-Heredia, et al., 2010; Sánchez-Martín, et al., 2010). Tanninerna som används är ofta katjoniserade. Katjoniseringen kan göras med olika metoder, till exempel med hjälp av formaldehyd och ammoniumklorid som tillreds med konstant temperatur och omrörning under 24h (Beltrán-Heredia, et al., 2011; Beltrán-Heredia, et al., 2010). Det finns flera kommersiellt tillförlitliga produkter som används vid vattenrening där undersökningar visar att det i många fall kan konkurrera med den idag vanligt använda aluminiumsaltet (Sánchez-Martín, et al., 2010; Beltrán-Heredia & Sánchez-Martín, 2009). Under denna studiens gång testades katjoniserade tanniner (Tanfloc) extraherat från Akacia på kommunalt avloppsvatten (Figur 6). Flockbildning av slammet kunde då tydligt urskiljas i mätglaset med tanniner jämfört med kontrollen utan polymerer.¹

¹ Personlig kommunikation: Torgny Mossing



Figur 6. Flockning/koagulering i kommunalt avloppsvatten med tillsats av 100 ppm katjoniserade tanniner (höger), kontroll utan tanniner (vänster). Bilden visar effekten efter sju minuter.

Figure 6. Flocculation / coagulation of municipal wastewater with addition of 100 ppm cationized tannins (right), control without tannins (left). The picture shows the effect after seven minutes.

Avgränsningar

Som tidigare nämnt kan tanniner extraheras med flera olika lösningsmedel, det billigaste alternativet hade varit att endast extrahera i varmt vatten. Men för att öka utfallet krävs någon typ av katalysator eller lösningsmedel som t.ex. etanol. I det här fallet användes salt som katalysator då tidigare undersökningar har visat goda resultat med natriumkarbonatlösning samt att det var praktiskt och ekonomiskt överkomligt. I studien valdes tre faktorer som baseras på tidigare nämnd litteratur vilka anger att temperatur och fraktionsstorlek har en signifikant inverkan på resultatet. Även mängden bark per liter vatten/lösningsmedel (TS-halt) är intressant till exempel ur en ekonomisk utgångspunkt vid ytterligare pilotstudier. Barken från tall användes för att det är ett inhemskt träslag som i stor utsträckning används inom skogsbruket samt att barken som användes i studien kunde baskas från dagsfärska stam vilket är gynnsamt för barkens ämnen innan extraktion.

Syfte

Tanniner som flockningsmedel finns redan som kommersiella produkter på marknaden. Exempel på dessa är Tanfloc och Silvafloc som tillverkas i Brasilien och av Akacia. Med den bakgrunden att katjonerade tanniner visar en tydlig koagulerande och flockande effekt i olika typer av avloppsvatten finns det intresse att utvärdera möjligheterna att extrahera tanniner även från inhemska trädslag. Katjonerade tanniner skulle också kunna fungera som retentionsmedel inom massaindustrin som i och med sin barkresurs kan gynnas av att producera och använda den internt. Framgångsrik extraktion kräver en metod som utvärderar vilka faktorer som påverkar utfallet då extraktionsmetoderna skiljer sig mellan trädslag. I den här studien kontrolleras därför tre faktorer mot varandra för att utvärdera dess inverkan på extraktionsutfallet på inhemskt trädslag samt om några eventuella samspelsinteraktioner förekommer.

Syftet med examensarbetet är att optimera extraktionen av polyfenoler ur tallbark med avseende på faktorerna temperatur, fraktionsstorlek, torrsubstans/lösningsmedel (TS-halt) och hur kombinationen mellan dessa påverkar resultatet.

Material och metoder

Material

Under arbetet användes bark från tall (*Pinus sylvestris*) som hämtades i Gräsmyr utanför Umeå. Eftersom det var viktigt att materialet var färskt barkades träden inom 24h från nedsågning. Barken fördelades i påsar där den mer orangea toppbarken skiljdes från den mer tjocka brunbarken i botten av trädstocken. Innan barken bearbetades förvarades den i kylskåp för att bevara färskheten och minimera förlusten av extraktivämnena. Barken torkades i värmeskap 40°C under minst 24 timmar tills den var torr nog att malas. Barken sållades sedan till tre fraktioner:

- **A:** 0 - 1,999 mm
- **B:** 2 - 3,999 mm
- **C:** 4 - 7,999 mm,

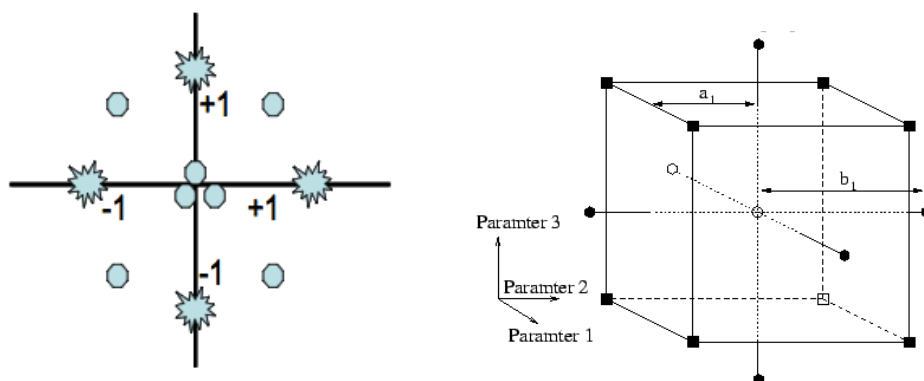
Det som var över 8mm maldes igen tills att det fanns en lämplig mängd av alla fraktioner.

Den utrustning som användes var magnetorrörare med temperaturreglerare och metallskål som vattenbad. 2 liters rundkolv med kork, termometer, E-kolv med sug som tillsammans med glasfilter (GF/C filterkapacitet) användes för filtrering, mätkolv 500ml, pipett, spruta med slang för provtagning, 300 ml bägare.

Försöksdesign

Försöket designades för att beskriva vilka faktorer och samspelsinteraktioner som ger optimalt utfall. Resultatet presenteras genom responsytor, vilka visar i vilken riktning eller området där optimal respons infaller. Även den statistiska signifikansen för faktorernas inverkan på resultatet presenteras. Försöksdesignen gör det även möjligt att på få observationer uppskatta utfallet genom att designen utesluter kombinationer som ger extremvärden som inte bidrar till resultatet. Detta reducerar antalet försök och minskar därigenom kostnader och tidsförbrukning.

I studien användes en central ”composite circumscribed-design” (CCC-design) (Figur 7), vilket är den ursprungliga formen av central composite design (CCD-design) som är en vanlig design vid responsytutformade experiment. CCC-design används på fem nivåer, stjärnpunkter, som är på ett visst avstånd från centrum baserat på hur många faktorer som är med i designen. Stjärnpunkterna sträcker sig som extremer utanför de höga och låga värdena för faktorerna och ger tillsammans med upprepade experiment i centrumpunkterna högkvalitativa förutsägelser över hela designytan. Försöksdesignen förser även experimentet med ett schema som beskriver i vilken ordning experimenten ska utföras i för att de externa faktorerna ska få minsta möjliga påverkan (Bil. 1).



Figur 7. CCC-design med två respektive tre parametrar.
Figure 7. A CCC-design with two or three parameters.

Metod

Datainsamlingen gjordes genom 33 försök där faktorerna temperatur, TS-halt och fraktionsstorlek kontrollerades. Försöken började alltid med att ett vattenbad på en magnetplatta värmdes upp till avsedd temperatur och en 8-procentig saltlösning tillreddes. Temperaturen på vattenbadet mättes med en digital termometer som placerades nära botten på plattan. Saltlösningen bereddes i en mätkolv där 40 g natriumkarbonat blandades med 500 ml destillerat vatten. Saltet i mätkolven löstes genom skakning eller med hjälp av en magnetloppa. När saltet hade löst sig i vattnet avlägsnades 4 - 6 ml vatten från vätskan med en pipett vilket då motsvarade fukthalten i barken efter torkning (Tab. 1). Mängden lösningsmedel beräknades genom att fukthalten i ml subtraherades med 500 (ml).

Tabell 1. Mängden saltlösning (ml) som avlägsnades inför varje extraktion beroende på barkens fukthalt

Table 1. The amount of brine (mL) which was removed before each extraction depending on the moisture content of the bark

<i>TS/Lösningsmedel (%)</i>		<i>Fukt i bark(ml)</i>			<i>Mängd lösningsmedel(ml)</i>		
<i>TS (%)</i>	<i>TS (g)</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>H2O A</i>	<i>H2O B</i>	<i>H2O C</i>
4,8%	23,8	2,1	2,1	2,1	497,9	497,9	497,9
6,0%	30,0	2,7	2,6	2,6	497,4	497,4	497,4
9,0%	45,0	4,0	3,9	3,9	496,0	496,1	496,1
12,0%	60,0	5,3	5,2	5,2	494,7	494,8	494,8
13,2%	66,2	5,9	5,8	5,8	494,2	494,2	494,2

Samtidigt som saltet löstes i vattnet vägdes barken upp för att motsvara rätt TS-halt. När saltlösningen hade nått rätt temperatur hälldes barken och saltlösningen samman i en 2 l rundkolv som placerades i vattenbadet (Figur 8). Till omrörningen användes en avlång trekantig magnetomrörare med ca 400 – 500 varv/min, beroende på trögheten i bark-vattenlösningen.



Figur 8. Extraktionsmodulen där rundkolven (2 l) stod i ett vattenbad för att hålla jämn temperatur genom hela försöket.

Figure 8. The extraction module, where the round bottom flask (2 l) was put in the water bath to maintain an uniform temperature throughout the experiment.

Prov togs efter 4, 8, 16, 32 och 64 minuter. Detta gjordes genom att vätskan från barkvattenlösningen sögs upp genom en slang till en spruta. Vätskan filtrerades sedan genom GF/C glasfilter ner i e-kolv och förvarades sedan i 2 ml ependorfrör. Efter 64 minuter filtrerades den resterade vätskan i 2 L rundkolven och hälldes över till fyra 50 ml provrör. Dessa centrifugerades i 20 minuter med 3600 varv/minut för att få större partiklar att sedimentera i botten. Vätskan i de fyra provrören filtrerades sedan genom GF/C glasfilter och fördelades i tre 50ml provrör för senare användning.

Mätning med UV

Mätning av fenoler i extraktet gjordes med fotospektrometer enligt Waterhouse (2012) som ursprungligen bygger på en metod som rapporterats av (Slinkard & Singleton, 1977). Metoden baseras på att fenolerna reagerar med Folin-Ciocalteureagens vilket sedan läses av (765nm) i en fotospektrometer (Shimadzu UV-1800). Metoden läser av den totala mängden fenoler i proverna. Lösningarna bereddes enligt beskrivningen nedan.

En natriumkarbonatlösning bereddes genom att 200 gram Natriumkarbonat löstes med 800 milliliter H₂O som sedan kokades. När lösningen åter kylts ner tillsattes några Natriumkarbonatkristaller. Efter 24 timmar filtrerades lösningen genom ett kaffefilter och spädades med destillerat vatten till 1000 ml.

För standardkurvan användes gallsyra som referens. Den bereddes genom att 0,500 gram torkad gallsyra löstes i 10 ml etanol som sedan späddes till 100 ml destillerat vatten. För varje provomgång gjordes en ny standardkurva denna bereddes genom att 1, 3, 10, 15 och 20 ml av gallsyrelösningen fördelades i 5 mätglas som späddes upp till 100 ml för nå rätt koncentration (Tabell 2).

Tabell 2. Standardkurvans koncentration fördelat på 5 mätglas
Table 2. Standard curve concentration spread over 5 measuring cylinders

<i>ml/mätglas</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	<i>20</i>
Koncentration (ml/l)	50	150	500	750	1000

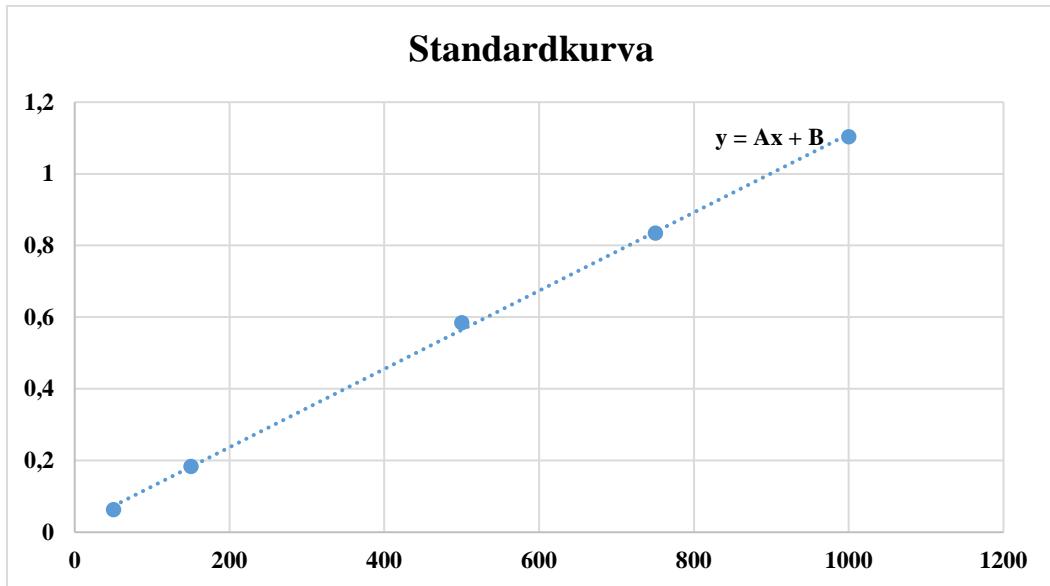
Nollproverna, standardkurvan och provbehandlingen förbereddes tillsammans och med samma metod vilka beskrivs nedan.

Nollproverna bereddes genom att 20 mikroliter H₂O fördelades i två 50 ml provrör. 1,58 ml H₂O samt 100 µl Folin-Ciocalteu reagens tillsattes sedan i varje provrör. Provrören skakades därefter på en skakplatta, proverna skulle sedan vila i 30 sekunder till 8 minuter innan 300 mikroliter natriumkarbonatlösning tillsattes. Provrören skakades ännu en gång och förvarades i värmeskåp (40 °C) i 30 minuter.

Standardkurvan bereddes genom att 20 mikroliter från varje koncentration (Tabell 2) fördelades i 50 ml provrör. 1,58 ml H₂O samt 100 µl Folin-Ciocalteu reagens tillsattes sedan i varje provrör. Provrören skakades därefter på en skakplatta, proverna skulle sedan vila i 30 sekunder till 8 minuter innan 300 mikroliter natriumkarbonatlösning tillsattes. Provrören skakades ännu en gång och förvarades i värmeskåp (40 °C) i 30 minuter.

Tanninproverna bereddes genom att proverna tagna efter 4, 8, 16, 32, 64 min späddes med H₂O för att hamna inom den inlästa standardkurvan (Figur 9). Från de spädda proverna togs sedan 20 mikroliter och fördelades i 50 ml provrör. 1,58 ml H₂O samt 100 µl Folin-Ciocalteu reagens tillsattes sedan i varje provrör. Provrören skakades därefter på en skakplatta, proverna skulle sedan vila i 30 sekunder till åtta minuter innan 300 mikroliter natriumkarbonatlösning tillsattes. Provrören skakades ännu en gång och förvarades i värmeskåp (40 °C) i 30 minuter.

Data sammanställdes genom att standardkurvans ekvation från varje provomgång användes för att räkna ut mängden fenoler i varje prov och tidpunkt för provtagningen (Figur 9).



Figur 9. Ett exempel på en standardkurva där den linjära funktionen användes för att beräkna mängden fenoler. X-axeln visar gallsyrekoncentrationen (ml/l) och Y-axeln standardkurvans värden från fotospektrometern.

Figure 9. An example of a standard curve, where the linear function is used to calculate the amount of phenols. The X-axis shows the bile acid concentration (ml/l) and Y-axis values from the standard curve spectrophotometer.

Analysmetod

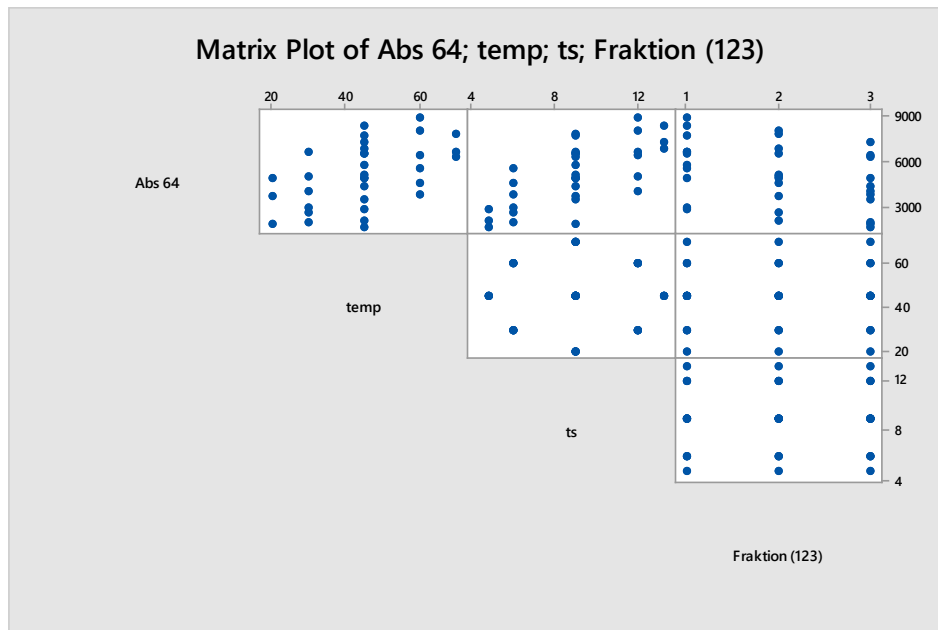
Statistiska analyser gjordes i Minitab version 17.3.1 och Modde version 10.1 (Umetrics). Först användes Minitab där en visuell analys gjordes av data för att se om något linjärt mönster gick att urskilja varefter en linjär regressionsanalys gjordes för att kontrollera signifikansen i data. Modde användes för att mäta signifikansen i varje enskild faktor samt om det fanns samspelseffekter mellan faktorerna. Här kontrollerades även tidseffekterna och eventuella optimala förhållandepunkter. För resultatet presenterades R^2 och Q^2 vilka beskrivs nedan:

- R^2 är en procent av variationen och ett mått på hur väl modellen förklarar och passar till försökets data. En bra modell kräver ett stort R^2 men är inte tillräckligt för att fullständigt förutsäga träffsäkerheten, vilket är särskilt sant då frihetsgraderna är få. Ett lågt R^2 innebär att reproducerbarheten av experimentet försämras eller att modellen inte passar för det data som används.
- Q^2 är en procent av variationen från svaret som genom korsvalidering talar om hur väl modellen förutsäger nya data. Detta innebär att en given del av datapunkterna utelämnas för modellen att förutsäga med hjälp av det resterande datasetet. En användbar modell bör ha stort Q^2 -värde. Lågt Q^2 -värde innebär samma problem som nämns för R^2 .

Resultat

Minitab

En första visuell analys av absorptionspunkterna ger en indikation att ett linjärt samband finns mellan extraktionsutbytet och faktorerna. Positivt för ökad temperatur och TS-halt, negativt för ökad fraktionsstorlek. Analysen gjordes på absorptionen av mängden fenoler efter 64 minuter (Figur 10).

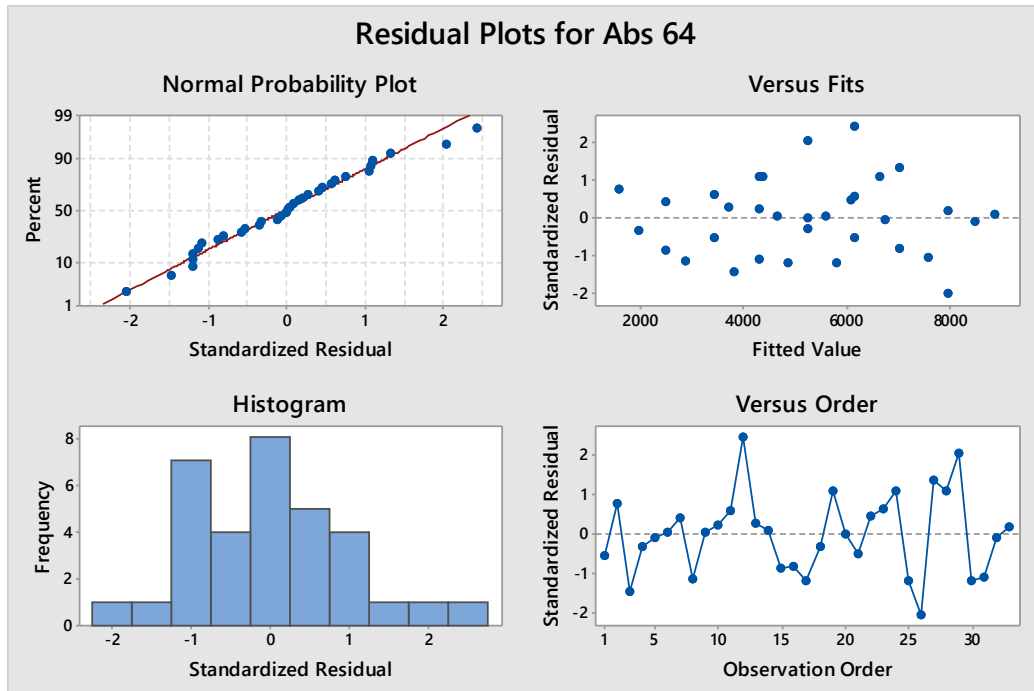


Figur 10. Visuell analys av faktorernas inverkan på extraktionsutbytet vid 64 minuter. Linjära samband går att urskilja för temperatur, TS-halt och fraktionsstorlek.

Figure 10. Visual analysis of the factors on the extraction yield at 64 minutes. Linear relationships can be distinguished for temperature, DM-content and fraction size.

Regressionsanalysen (Bilaga 2) bekräftar det linjära sambandet som den visuella analysen antyder. P- och F-värdena visar att alla faktorer har en signifikant inverkan på extraktionsutbytet av fenoler ($F\text{-value} < 5$, $p > 0,005$) med förklaringsgrad på 90 procent för modellen, 10 procent förklaras av andra faktorer än de tre observerade. Signifikansen verifierar att högre temperatur, högre TS-halt och minskande fraktionsstorlek ger ökat extraktionsutfall. Störst påverkan på resultatet har TS-halt, mer bark innebär mer tanniner. Regressionsanalysens ekvation indikerar hur mycket extraktionsutfallet ökar eller minskar för varje enhet som faktorerna varierar. Ekvationens konstant kan uteslutas då absorptionen får UV-mätningen endast sträcker sig ner till 800 vilket innebär att modellen kan ses fungera ner till den nivån, efter det uppstår tveksamheter.

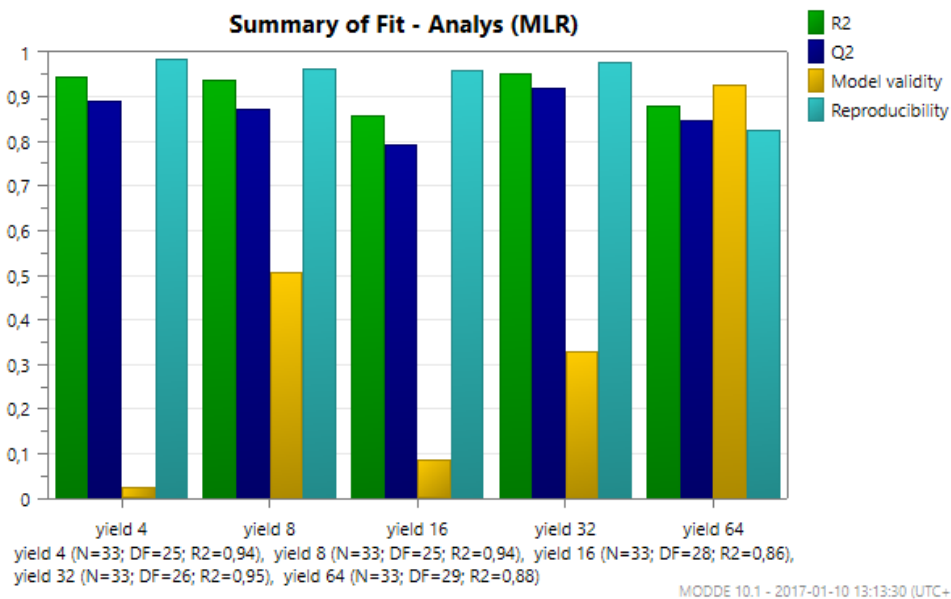
Residualdiagrammet (Figur 11) visar att datapunkterna är normalfördelade och extremvärden få, att det inte finns några inbördes korrelation mellan mätningarna och att residualerna har en konstant varians mellan varandra. Resultatet av regressionsanalysen kan därav fastställas som tillförlitligt.



Figur 11: Diagram över residualerna för att avgöra den statistiska tillförlitligheten i resultatet.
Figure 11. Graph of the residuals to determine the statistical reliability of the results.

Modde

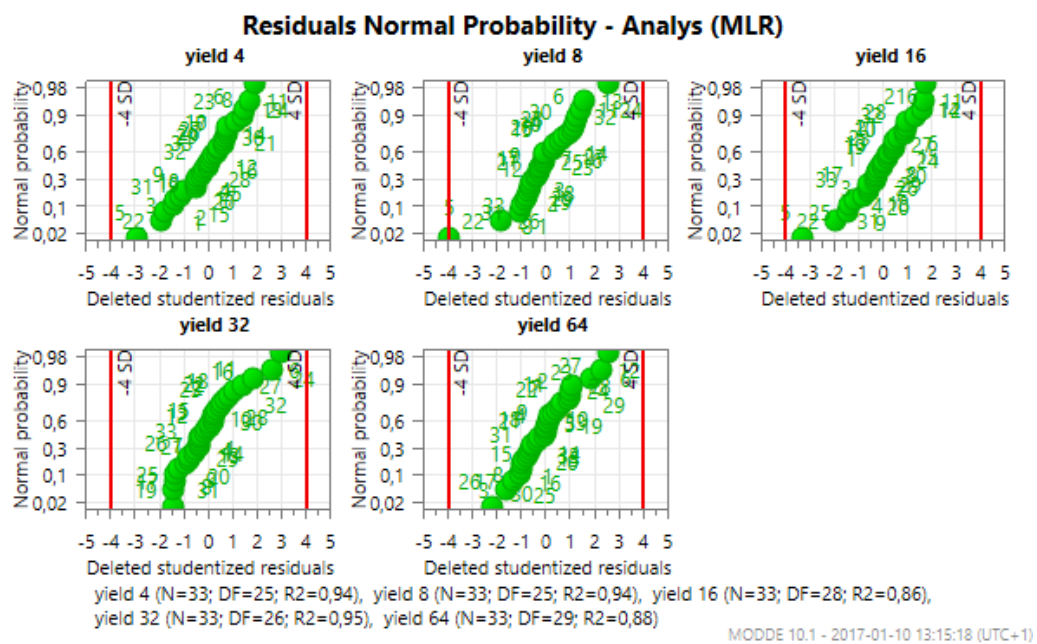
Summary of Fit (Figur 12) visar fyra staplar för varje provtagningstidpunkt. Höga staplar innebär en bra modell, låga staplar kan innebära att ytterligare utredning krävs. R^2 är i alla provtagningar över 85 procent vilket innebär att minst 85 procent av variationen i y kan förklaras av förändringarna i x. De återstående 20 procenten är övriga faktorer eller brus som den matematiska modellen inte kan förklara. För Q^2 är i alla provtagningar över 80 procent vilket innebär att modellen har god förmåga att förutsäga nya data. Modellen fungerar bättre dess längre extraktionstiden pågår då modellens giltighet ökar och stabiliseras efter 64 minuter.



Figur 12. Summary of Fit graf som visar R2, Q2, Modellens giltighet och Reproducerbarhet, vilket beskriver hur väl data passar in i den matematiska modellen.

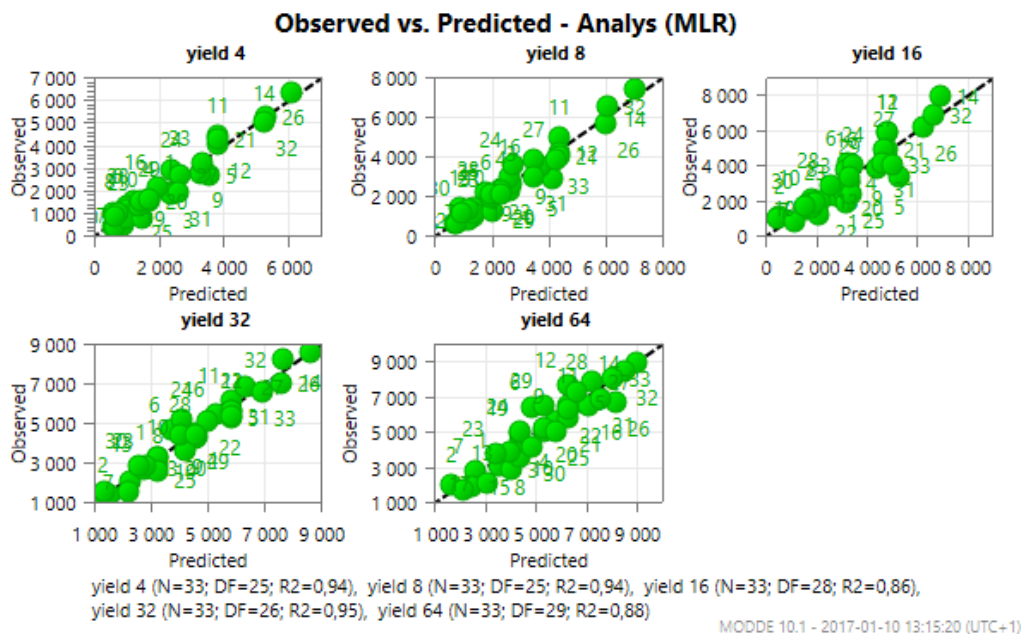
Figure 12. Summary of Fit graph showing R2, Q2, model validity and reproducibility, which describes how well the data fits into the mathematical model.

Residual normalfördelningskurvan (Figur 13) och **Observerade vs. Förutsagda-diagrammet** (Figur 14) kan liknas med "Residualdiagrammet" (Figur 11) men för alla provtidpunkter. Det visar att proverna är normalfördelade och har jämn fördelning runt den linjära regressionslinjen, endast experimentkörning 5 ligger på gränsen till att vara en extrem. Provpunkterna ligger rakare och mer jämnt fördelade över linjen efter 64 minuter vilket kan kopplas till "Summary of fit" (Figur 12.) att modellen stabiliseras över tid.



Figur 13. Residualdiagram som visar residualernas normalfördelning och potentiella extremvärden.

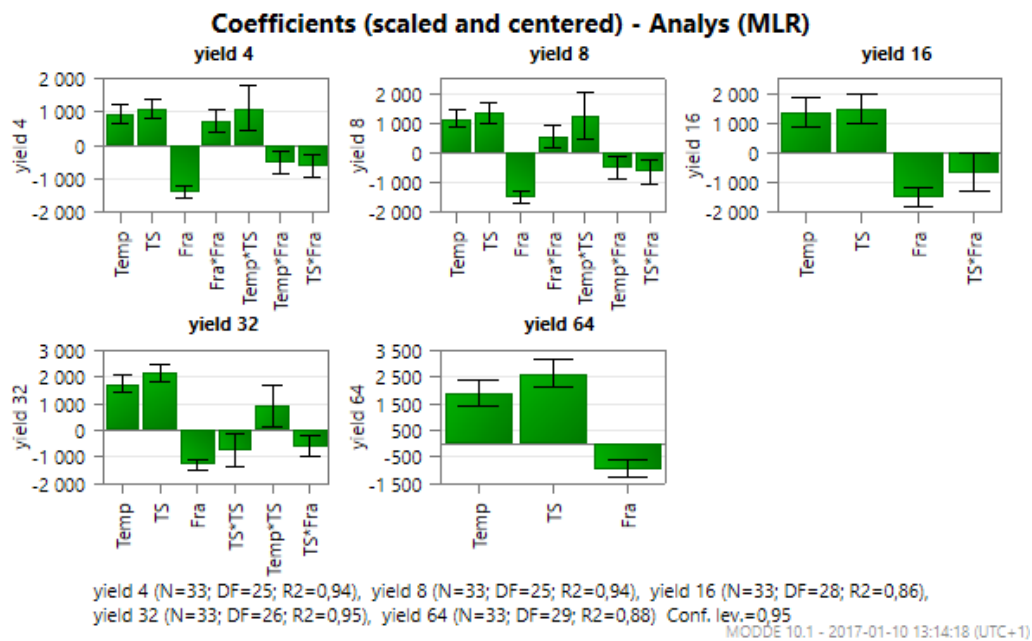
Figure 13. Residual plot, showing residuals normal distribution and potential outliers.



Figur 14. Observerade vs. Förutsagda-diagrammet visar hur väl modellen passar i på det data som använts.

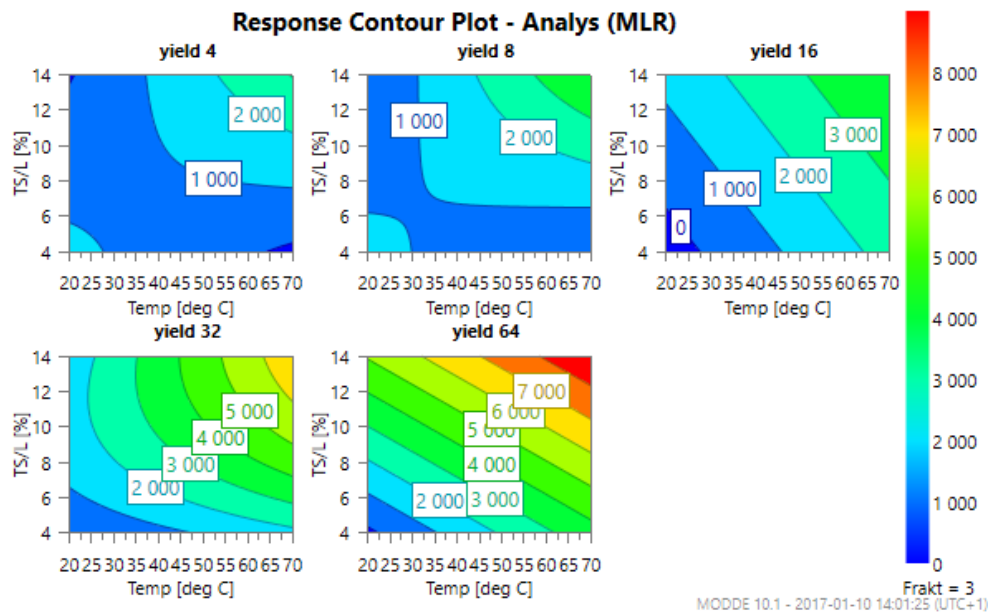
Figure 14. Observed vs. Predicted plot shows how well the model fits the data.

Koefficientdiagrammet (Figur 15) visar vilken inverkan de olika faktorerna har på extraktionsutfallet. Alla av de ingående faktorerna har en signifikant påverkan på resultatet. Både temperaturen och TS-haltens inverkan ökar över tid medan fraktionsstorlekens liksom samspelseffekterna minskar. Fraktionsstorleken och samspelseffekterna har dock en stor betydelse i början av extraktionen och kan därför ses som en katalysator. Men då modellens giltighet (Figur 12) i de första provtagningarna är relativt låg bidrar det till tveksamheter kring samspelseffekternas inverkan i början av extraktionen. TS-halten har i slutändan störst signifikans på resultatet, mer bark resulterar i mer tanniner. I bilaga 3 finns ett översiktsdiagram för koefficienterna där koefficienterna är uppstaplade bredvid varandra för alla provtidpunkter koefficienterna är normalfördelade med gemensamt Y-intervall vilket gör extraktionstidens inverkan lättare att jämföra mellan de olika faktorerna.

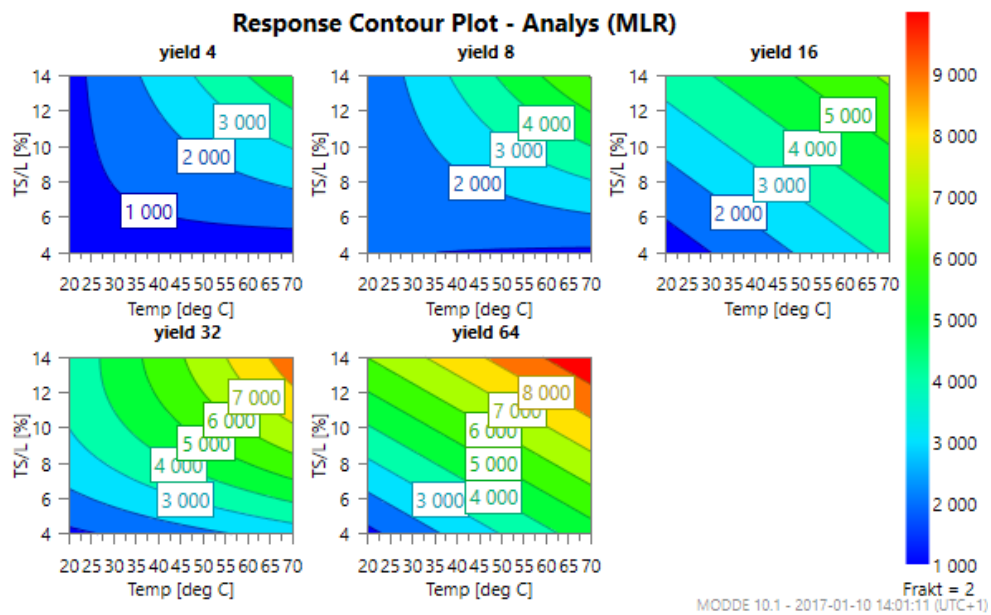


Figur 15. Koefficientsdiagrammet visar regressionskoefficienterna tillsammans med ett konfidensintervall vilket beskriver signifikansen för varje enskild faktor.
Figure 15. Coefficients graph shows the regression coefficients along with a confidence interval which describes the significance of each factor.

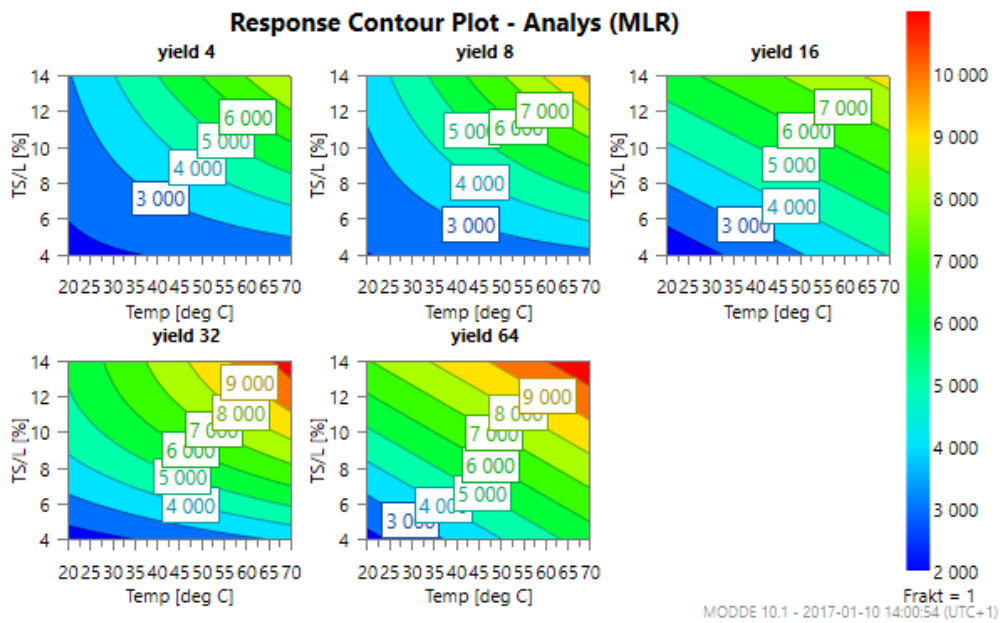
Responskonturdiagrammet (Figur 16, 17, 18) illustrerar faktorernas inverkan på resultatet samt vart eventuellt optimum befinner sig. Om linjerna i diagrammet är kurvade eller linjära beror på hur många koefficienter som har inkluderats. I figurerna nedan visas responskonturdiagrammet för respektive fraktion i fallande ordning, från största till minsta fraktion. Utan att någon optimal punkt har uppnåtts för extraktionen ger den minsta fraktionsstorleken (A) konstant högre respons jämfört med de övriga två. Mindre fraktionsstorlek resulterar även i att en högre respons uppnås snabbare under hela extraktionstillfället jämfört mellan de större fraktionsstorlekarna. Med ökande TS-halt krävs lägre temperatur för att uppnå samma respons, vilket återkopplar till TS-haltens betydelse i koefficientdiagrammet (Figur 15). I bilaga 4 finns en 3D-modell av konturdiagrammet vilket ytterligare indikerar på att det inte finns någon kulmination av extraktionsutfallet efter 64 minuter, diagrammet förtydligar även att högre respons uppnås snabbare med minskande fraktionsstorlek i och med att varje responsyta ligger närmare varandra.



Figur 16. Responskonturdiagrammet visar responsen av temperatur och TS-halt under fraktionsstorlek C.
Figure 16. The response contour plot shows the response of temperature and DM-content in the fraction size C.



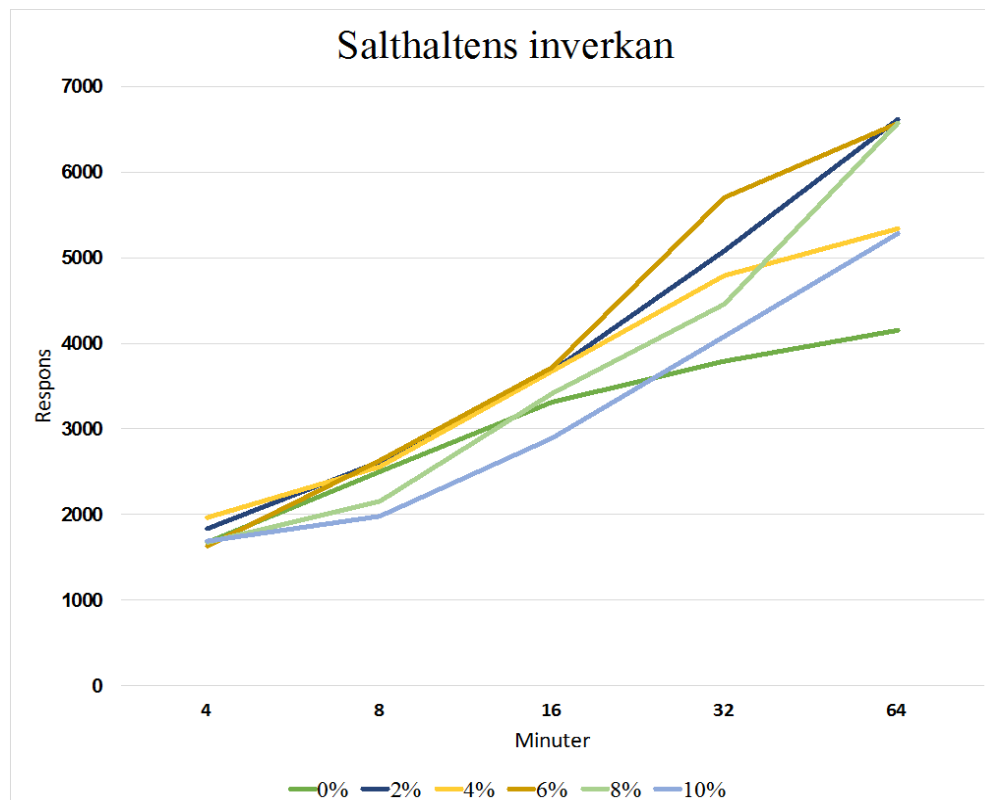
Figur 17. Responskonturdiagrammet visar responsen av temperatur och TS-halt under fraktionsstorlek B.
Figure 17. The response contour plot shows the response of temperature and DM-content in the fraction size B.



Figur 18. Responskonturdiagrammet visar responsen av temperatur och TS-halt under fraktionsstorlek A.

Figure 18. The response contour plot shows the response of temperature and DM-content in the fraction size A.

Under studien kontrollerades saltets inverkan på extraktionsutfallet för tall (*Pinus sylvestris*). Efter 64 minuter gav 2, 6 och 8 procent salthalt likvärdiga resultat runt 6500, vatten utan tillsats (0 procent salthalt) gav lägst resultat (Figur 19).



Figur 19. Figuren visar salthaltens inverkan på extraktionsutfallet (y-axeln) presenterat efter 4, 8, 16, 32 och 64 minuter (x-axeln).

Figure 19. The figure shows the impact of salinity on the extraction results (y-axis) presented after 4, 8, 16, 32 and 64 minutes (x-axis).

Diskussion

Ett viktigt steg för att hitta nya lösningar och produkter är att utveckla de metoder som används för att på ett optimalt och kostnadseffektivt sätt framställa produkterna. Det här arbetet har handlat om just det. Genom att identifiera vilka faktorer som påverkar utfallet, blir det nu lättare att arbeta vidare med att optimera extraktionen av tanniner från bark av svenska trädslag på ett kostnadseffektivt och konkurrensmässigt sätt. Som figurerna i resultatet visar har de tre ingående faktorerna en inverkan på mängden fenoler som extraheras ur tallbarken. Förhållandena är sådana att ökad temperatur, ökad TS-halt och minskande fraktionsstorlek ger en högre respons (bättre utbyte). Det var tyvärr inte praktiskt möjligt att öka temperaturen ytterligare men det linjära förhållandet mellan ökad temperatur och ökad respons skulle troligen börja avta efter kokpunkt samt att det i storskalig industri skulle vara mer praktiskt och ekonomiskt försvarbart med en lägre temperatur om utfallet var detsamma. TS-halten är ganska självförklarande då mer bark resulterar i mer tanniner. Dock är det inte praktiskt möjligt att ha allt för hög TS-halt då omrörningen för det här experimentet försämrades markant då en TS-halt över nio procent användes. Vid utformning av en pilotstudie skulle dock en högre TS-halt kunna vara ett alternativ om bättre utvecklade omrörningsutrustning finns tillgänglig. Att extraktionsutfallet ökar vid minskad fraktionsstorlek kan bero på att det finns fler kontaktytor för lösningsmedlet att verka. Allt för små fraktioner gjorde det emellertid svårare att filtrera bort barken samt att det går åt mer energi att mala barken till små fraktioner. Vid industriell användning får den önskade mängden tanniner bestämma nyttan i att mala barken till mindre fraktioner. För att studien inte skulle bli för omfattande begränsades extraktionstiden, detta resulterade dock i att ingen kulmination eller optimal punkt uppnåddes. Potentialen att höja extraktionsutfallet finns därför om extraktionstiden tillåts öka. För att uppnå en optimal extraktionstid krävs ytterligare studier samt att de ämnen som extraheras kontrolleras för att ge en uppfattning om tiden även ökar mängden sockerarter och andra biämnen som frigörs, vilket inte alltid är önskvärt. Med ökad extraktionstid minskar enligt översiktskoefficientsdiagrammet fraktionsstorlekens inverkan på extraktionsutfallet. Detta är intressant att ta med till vidarestudier då det kostar tid och energi att mala barken ner till finare fraktioner. Varje trädslag påverkas olika under olika extraktionsförhållanden därför krävs ytterligare studier för att granska andra svenska trädslag som i stor utsträckning används inom det svenska skogsbruket.

Felkällor och framtiden

Försök 5 visar sig som en extrem på Normalfördelningsgraf. Under UV-mätningen krävdes flera omtagningar i fotospektrometern då spädningen på denna inte kunde spädas på samma sätt som de andra som körts under liknande förhållanden. Troligtvis har det blivit något redan under experimentet som gjort att denna blivit mer koncentrerad än de övriga.

Att det finns en samspelseffekt i början skulle kunna vara en katalysator till snabbare extraktion, dock det finns fortfarande tveksamheter kring hur stor inverkan dessa har då modellen inte var lika signifikant för de tidigare provtagningarna. Under höga TS-halter krävdes ständig uppsikt över omrörningen då denna var stundvis bristfällig. Omrörningssvårigheterna var extra tydliga på mellanstorleken (B), vilket mest troligt beror på att det både var stora och små partiklar som dels gav en tröghet men samtidigt kunde slå loppa ur fas. Detta uppenbaras mest troligt på resultaten under de tidigare provtagningarna då vissa faktorer inverkan minskar över tid.

Under studiens gång testades som tidigare nämnt brasilianska katjoniserade tanniner på kommunalt avloppsvatten och vatten från Obbolas pappersbruk. Även studiens extraktion av tanniner testades på dessa vatten utan resultat, vilket troligen beror på den lätt anjoniska laddning som tanniner har innan de behandlas för att bli katjoniska. Under arbetet användes natriumkarbonat som katalysator för extraktionen, denna gjorde dock att lösningsmedlet blev kraftigt basiskt vilket eventuellt kan försvåra katjoniseringen. Extraktioner på 0, 2, 4, 6 och 10 procents salthalt gjordes för att utvärdera salthaltens inverkan. Extraktionsutfallet visade då inget linjärt eller kulminerande samband då 2, 6 och 8 procents salthalt gav liknande respons efter 64 minuter. Utan att en statistisk analys gjordes går det inte dra några signifikanta slutsatser men som tidigare nämnt har varje trädslag olika krav på extraktionsmetoden som används. Resultatet på saltets inverkan från tidigare studier har också visat olika svar gjorda på bark från akacia vilket då kan skilja sig från effekten som salt har på tall. Processen att katjonisera tanniner är patenterad, det finns rapporter som beskriver tillvägagångssättet men där beskrivningen inte är tillräckligt grundlig för att kunna utläsa exakta måttenheter. Därför krävs vidarestudier som undersöker hur tanniner från svenska trädslag kan katjoniseras. Potentialen att använda tanniner vid avloppsvattenrening är finns då det idag i stor utsträckning används syntetiska flockningsmedel som PAM. Sveriges utbredda skogsindustri är en stor källa på bark som idag används som bränsle eller deponeras. Studien har visat att potentialen för att extrahera tanniner ur svenska trädslag finns men ytterligare studier krävs för kontrollera andra lösningsmedel, tillräckliga salthalter, samt hur tanninerna ska bearbetas för att bli fullvärdiga bioprodukter.

References

- Åkesson, K., 2009. *Analys av tanniner – från granbarksextrakt*, Linköping: Linköpings universitet.
- Antoine, M.-L., Simon, C. & Pizzi, A., 2004. UV Spectrophotometric Method for Polyphenolic Tannin Analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, , Volym 91, p. 2729–2732 .
- Avfall Sverige, 2011. *Miljöeffekter av polymerer inom biogasbranschen - Förstudie*, Malmö: Avfall Sverige.
- Beltrán-Heredia, J. & Sánchez-Martín, J., 2009. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent. *Desalination*, Volym 249, p. 353–358.
- Beltrán-Heredia, J., Sánchez-Martín, J. & Dávila-Acedo, M., 2011. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. *Journal of Hazardous Materials*, 186(2-3), p. 1704–1712.
- Beltrán-Heredia, J., Sánchez-Martín, J. & Gómez-Muñoz, M., 2010. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. *Chemical Engineering Journal*, Volym 162, p. 1019–1025.
- Christensson, D., 2001. *Kondenserade tanniners effekt på mag-tarmparasiter hos idisslare*, Ultuna: u.n.
- Cordell, D. & Neset, T.-S., 2014. Phosphorus vulnerability: A qualitative framework for assessing the vulnerability of national and regional food systems to the multi- dimensional stressors of phosphorus scarcity. *Global Environmental Change*, Issue 24, pp. 108-122.
- Derkyi, N., Sekyere, D. & Darkwa, N., 2014. Effect of Extraction Solvent on Tannin-Formaldehyde Adhesives for Plywood Production. *JENRM*, 1(2), pp. 120-126.
- Feng, S. o.a., 2013. *Valorization of bark for chemicals and materials: A review*, London: Renewable & Sustainable Energy Reviews.
- Folkesson, E., Karlsson, J., Svensson, J. & Thuvander, J., 2011. *Torrefiering av bark*, Lund: Lunds Univeristet.
- Fradinho, D. o.a., 2002. Chemical characterisation of bark and of alkaline bark extracts from maritime pine grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 16(1), pp. 23-32.
- Hagerman, A. E., 2002. *Estimating quantities of tannins (protein precipitation methods)*. [Online]
Available at: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/>
[Använd 03 01 2016].
- Hansson, E. & Johansson, M., 2012. *Avlopp på våra åkrar – en rapport om miljögifter i slam*, Stockholm: Naturskyddsföreningen.

- Hedqvist, H., 2001. *Kondenserade tanniner och deras effekt på proteinmetabolismen i våmmen*, Ultuna: u.n.
- Heller, J. J. P., 2009. *The influence of hot water extraction on physical and mechanical properties of OSB*, u.o.: u.n.
- Higgins, J. M. & Novak, T. J., 1997. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering*, Volym 123, pp. 479-485.
- Hiltunen, J., 2010. *Mekanisk slamavvattning vid Sibbhults avloppsreningsverk*, Kristianstad: u.n.
- Johansson, B., 2011. Inledning. i: B. Johansson, red. *Återvinna fosfor – hur bråttom är det?*. Stockholm: Formas Fokuserar, pp. 9-21.
- Khanbabaee, K. & Ree, T. v., 2001. *Tannins: Classification and Definition*, u.o.: Natural Products Reports.
- Kjerstadius, H. o.a., 2012. *Rötning av avloppsslam vid 35, 55 och 60 °C*, Stockholm: Svenskt Vatten.
- Kling, M., 2013. *Slam och kretslopp: Slam som produktionsresurs i svenskt jord- och skogsbruk*, u.o.: KUNGL. SKOGS- OCH LANTBRUKSAKADEMIEN.
- KRAV, 2015. *Växtnäring: KRAV*. [Online]
Available at: <http://www.krav.se/vaxtnaring>
[Använd 11 12 2016].
- Krentz, D. O. o.a., 2006. Properties and flocculation efficiency of highly cationized starch derivatives. *Starch*, Volym 58, pp. 161-169.
- Kuutti, L. o.a., 2011. Properties and flocculation efficiency of cationized biopolymers and their applicability in papermaking and in conditioning of pulp and paper sludge. *Bioresources*, Volym 6, pp. 2836-2850.
- Liiri, O., Sairanen, H., Kilpeläinen, H. & Kivistö, A., 1982. Bark Extractives from Spruce as Constituents of Plywood Bonding Agents. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 40(2), p. 51–60.
- Livsmedelsverket, 2016. *Akrylamid*. [Online]
Available at: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/oonskade-amnen/akrylamid/>
[Använd 16 02 2017].
- Mellin, N., 2016. *LRF*. [Online]
Available at:
<https://www.lrf.se/contentassets/b8ff5a9ee99f4ad19bf8921fde009b51/uddevalla-kom-grp-skrivelse-till-samhallsbyggnadsnamnden-160604.pdf>
[Använd 11 12 2016].

Naturvårdsverket, 2002. *Aktionsplan för återföring av fosfor ur avlopp*, Stockholm: Naturvårdsverket.

Naturvårdsverket, 2012. *Biogas ur gödsel, avfall och restprodukter - Goda svenska exempel*, Stockholm: Naturvårdsverket .

Naturvårdsverket, 2012. *Rening av avloppsvatten i sverige*. [Online]
Available at: <https://www.naturvardsverket.se/Documents/publikationer6400/978-91-620-8629-9.pdf?pid=5493>
[Använd 21 12 2016].

Naturvårdsverket, 2013. *Hållbar återföring av fosfor - Naturvårdsverkets redovisning av ett uppdrag från regeringen*, Stockholm: Naturvårdsverket.

Nordisk bioplastförening, 2011. *Förnybara energikällor för produktion av bioplast*, Helsingborg: Nordisk bioplastförening.

Nordlund, M., 2015. *Miljörapport: Öns avloppsreningsverk*, Umeå: UMEVA.

Onifade, K., 2000. *Production of Tannin from the Bark of Eucalyptus camadulensis*, Minna: u.n.

Pizzi, A., 1982. Condensed tannins for adhesives. *Industrial and Engineering Chemistry Product*, Volym 21, p. 359–369.

Prado, J. H. & Matulewicz, M., 2014. Cationization of polysaccharides: A path to greener derivatives with many industrial applications. *European Polymer Journal*, Volym 52, pp. 53-75.

Raju, A. J. S., Jonathan, K. H. & Rao, S. P., 2008. Traditional extraction of bark tannin from the mangrove tree, *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou and its use in treating cotton fishing nets. *Natural Product Radiance*, 7(2), pp. 173-175.

Ren åker ren mat, 2009. *Ren åker ren mat*. [Online]
Available at: <http://www.renakerrenmat.se/fakta/Avloppsslam.pdf>
[Använd 05 12 2016].

Renault, F., Sancey, B., Badot, P.-M. & Crini, G., 2009. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*, Volym 45, p. 1337–1348.

REVAQ, Å., 2015. *Svenskt Vatten*. [Online]
Available at: <http://www.svensktvatten.se/globalassets/avlopp-och-miljo/uppstromsarbete-och-kretslopp/revaq-certifiering/revaq-arsrapport-2015.pdf>
[Använd 08 12 2016].

Sánchez-Martín, J., Beltrán-Heredia, J. & Solera-Hernández, C., 2010. Surface water and wastewater treatment using a new tannin-based coagulant. Pilot plant trials. *Journal of Environmental Management*, Volym 91, pp. 2051-2058.

Sánchez-Martín, J., González-Velasco, M. & Beltrán-Heredia, J., 2010. Surface water treatment with tannin-based coagulants from Quebracho (*Schinopsis balansae*). *Chemical Engineering Journal*, Volym 165, p. 851–858.

Salomon, E. & Wivstad, M., 2013. *Rötrest från biogasanläggningar*, Uppsala: SLU, EPOK – Centrum för ekologisk produktion och konsumtion.

SCB, 2014. *Utsläpp till vatten och slamproduktion 2014*, Stockholm: Statistiska centralbyrån.

Skogsstyrelsen, 2014. *Skogsstatistisk årsbok 2014*, Jönköping: Swedish Forest Agency.

Slinkard, K. & Singleton, V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volym 28, pp. 49-55.

Suzuki, Y., Sawada, K. & Chihara, K., 2004. *ADSORPTION CHARACTERISTICS OF TANNIN FOR HEAVY METAL IONS*, Japan: u.n.

Svenskt Vatten, 2016. *Slam och biogas: Svenskt Vatten*. [Online]
Available at: <http://www.svensktvatten.se/vattentjanster/avlopp-och-miljo/slam-och-biogas/>
[Använd 05 12 2016].

Wahlberg, C. & Paxéus, N., 2003. *Miljöpåverkan av polyelektrolyter från användning vid reningsverk*, Stockholm: VA-Forsk.

VAKIN, 2016. *Så renas avloppsvattnet*. [Online]
Available at:
vakin.se/vattenavlopp/avlopp/avloppsreningsverk/sarenasavloppsvattnet.4.1f19cd52130398d83ff80001771.html
[Använd 21 12 2016].

Waterhouse, A., 2012. *Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine*. [Online]
Available at: <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/fofin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>
[Använd 03 01 2016].

Vieira, M. C., Lelis, R. C. C., Silva, B. C. d. & Oliveira, G. d. L., 2011. Tannin Extraction from the Bark of *Pinus oocarpa* var. *oocarpa* with Sodium Carbonate and Sodium Bisulfite. *Floresta e Ambiente*, 18(1), pp. 1-8.

Wivstad, M., Salomon, E., Spångberg, J. & Jönsson, H., 2009. *Ekologisk produktion – möjligheter att minska övergödning*, Uppsala: Centrum för uthålligt lantbruk, SLU.

Ziółkowska, D., Shyichuk, A., Cysewski, P. & Organiściak, A., 2011. Flocculation efficiency of cationic potato starch in the presence of coagulants. *Chemik*, 65(4), pp. 309-314.

Bilaga 1

Labb	Temperatur (°C)	TS-halt (%)	Fraktionsstorlek	Körordnin g
1	30	6	A	1
2	60	6	A	9
3	20	9	A	24
4	45	13,242	A	32
5	45	4,758	A	3
6	70	9	A	26
7	45	9	A	11
8	30	12	A	5
9	45	9	A	12
10	45	9	A	21
11	60	12	A	14
1	30	6	B	7
2	60	6	B	6
3	20	9	B	23
4	45	13,242	B	31
5	45	4,758	B	17
6	70	9	B	27
7	45	9	B	20
8	30	12	B	25
9	45	9	B	4
10	45	9	B	29
11	60	12	B	33
1	30	6	C	2
2	60	6	C	13
3	20	9	C	15
4	45	13,242	C	28
5	45	4,758	C	18
6	70	9	C	22
7	45	9	C	8
8	30	12	C	30
9	45	9	C	10
10	45	9	C	19
11	60	12	C	16

Bilaga 2.

Regression Analysis: Abs 64 versus temp; ts; Fraktion (123)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	3	118161209	39387070	88,74	0,000
temp	1	33093138	33093138	74,56	0,000
ts	1	65851437	65851437	148,37	0,000
Fraktion (123)	1	19216633	19216633	43,30	0,000
Error	29	12871039	443829		
Lack-of-Fit	23	8580373	373060	0,52	0,879
Pure Error	6	4290666	715111		
Total	32	131032248			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
666,205	90,18%	89,16%	87,49%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	-1092	632	-1,73	0,095	
temp	71,63	8,30	8,63	0,000	1,00
ts	552,2	45,3	12,18	0,000	1,00
Fraktion (123)	-935	142	-6,58	0,000	1,00

Regression Equation

Abs 64 = -1092 + 71,63 temp + 552,2 ts - 935 Fraktion (123)

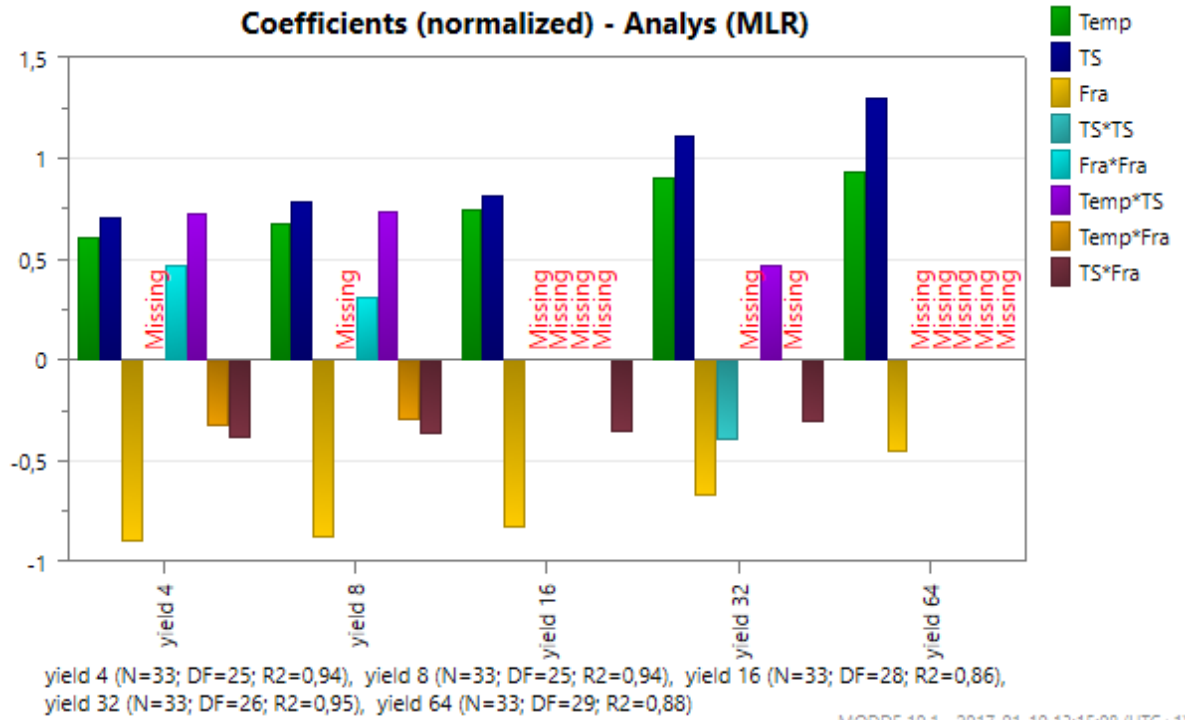
Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	Abs 64	Fit	Resid	Std Resid	
12	7737	6166	1570	2,45	R
26	6715	7957	-1242	-2,05	R
29	6572	5232	1341	2,04	R

R Large residual

Bilaga 3.

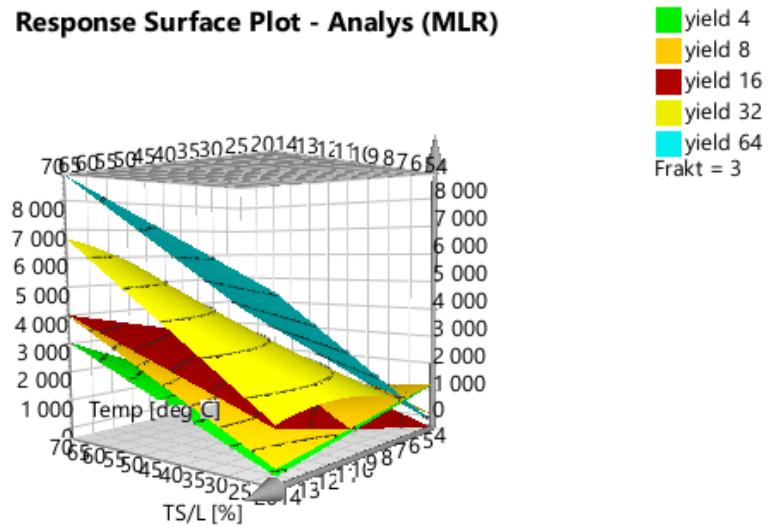
Översiktsdiagram för koefficienterna som visar faktorernas inverkan på responsen över tid, om de ökar/minskar.



Bilaga 4.

Responstyediagrammet har samma funktion som Responskonturdiagrammet men i 3D, detta gör det lättare att uppfatta en kulmination och eventuellt optimum. Grafen gör det även möjligt att urskilja hur faktorerna påverkar varandra. Figuren är i fallande ordning från största till minsta fraktionsstorlek. Med minskade fraktionsstorlek blir responsten för varje provtidpunkt högre och skillnaderna mellan tidpunkterna mindre.

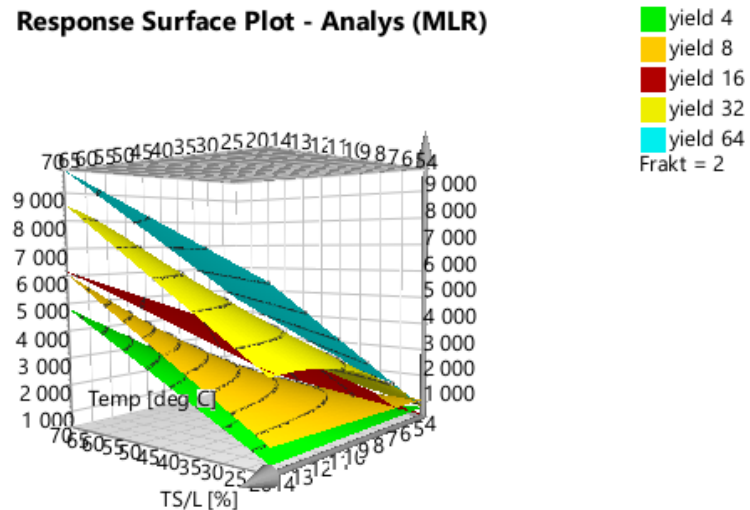
Response Surface Plot - Analys (MLR)



MODDE 10.1 - 2017-01-10 14:10:43 (UTC+1)

Fraktionsstorlek C.

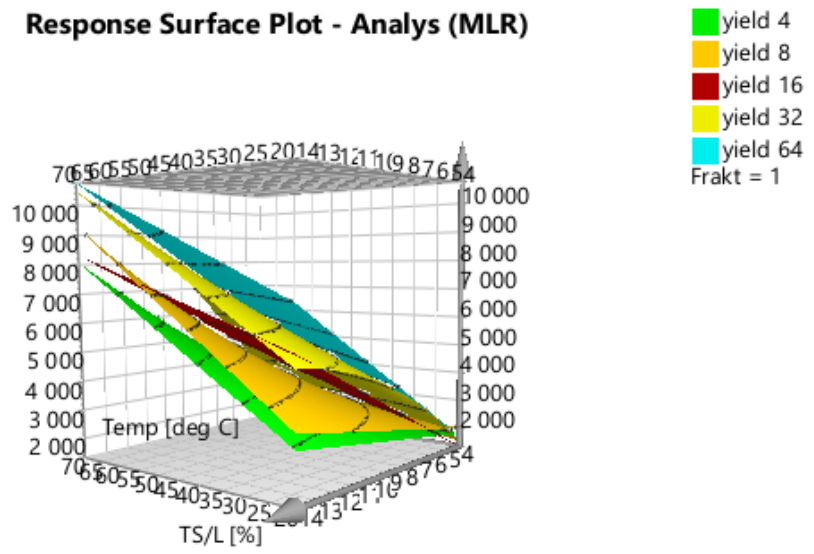
Response Surface Plot - Analys (MLR)



MODDE 10.1 - 2017-01-10 14:11:14 (UTC+1)

Fraktionsstorlek B.

Response Surface Plot - Analys (MLR)



Fraktionsstorlek A.

MODDE 10.1 - 2017-01-10 14:11:27 (UTC+ 1)