



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och jordsbruksvetenskap

## ***Mucor indicus* potential inom producering av öl**

– Jämförelse mot *Saccharomyces cerevisiae*, påverkan  
av mäsningstemperaturen

*Beer production potential of Mucor indicus – comparison with  
Saccharomyces cerevisiae, influence of mashing temperature*

Viktor Nilsson

**Självständigt arbete • 15 hp**

Agronomprogrammet- Livsmedel  
Molekylära Vetenskaper, 2019:14  
Uppsala, 2019



# *Mucor indicus* potential inom produktion av öl – Jämförelse mot *Saccharomyces cerevisiae*, påverkan av mäsningstemperaturen

*Beer production potential of Mucor indicus – comparison with Saccharomyces cerevisiae, influence of mashing temperature*

Viktor Nilsson

**Handledare:** Albina Bakeeva, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för molekylära vetenskaper  
**Examinator:** Volkmar Passoth, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för molekylära vetenskaper

**Omfattning:** 15 hp  
**Nivå och fördjupning:** G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i livsmedelsvetenskap - kandidatarbete  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för molekylära vetenskaper  
**Kurskod:** EX0876  
**Program/utbildning:** Agronomprogrammet - Livsmedel

**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2019  
**Serietitel:** Molekylära Vetenskaper  
**Delnummer i serien:** 2019:14

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *S. cerevisiae*, *M. indicus*, Mäsning, Mäsningstemperatur, Etanol.

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för molekylära vetenskaper



## Sammanfattning

En av de vanligaste mikroorganismerna som används vid produktion av öl är *Saccharomyces cerevisiae*. Dess goda förmåga att omvandla socker till etanol samt bidragandet med smakämnen till den färdiga produkten är några av egenskaperna som gör *S. cerevisiae* så användbar. En annan mikroorganism som kan omvandla socker till etanol och som idag används vid produktion av olika livsmedel är *Mucor indicus*. Vid produktion av öl är mäsning den process där malt och vatten blandas och värms upp. I detta steg bryts stärkelse ned till socker av enzymer från malten. Temperaturen som mäsken värms upp till påverkar vilka enzymer som är aktiva i stärkelsenedbrytningen. Aktivitet från olika enzymer leder till att det bildas olika sorter och mängd socker.

En laboratoriestudie har genomförts för att jämföra *S. cerevisiae* och *M. indicus* effektivitet och produktivitet i att omvandla socker till etanol som tillkommit från de olika mäsningstemperaturerna 64°C och 70°C. Syftet med denna studie har varit att undersöka om *M. indicus* kan vara lika effektiv och produktiv som *S. cerevisiae* i att producera etanol från vört som mäsats i olika temperaturer.

Metoden som genomfördes var att brygga öl i ett laboratorium utifrån en standardiserad bryggingsmetod. Prover togs under de olika stegen i bryggingsprocessen och analyserats med spektrofotometer och HPLC. Resultaten från analyserna gav svar på provinnehållets stärkelsekoncentration samt mängd och sockerarter.

*M. indicus* har förmågan att producera lika stor mängd etanol (14 g/l) under fermentering från vört som mäsats i temperaturerna 64°C och 70°C. Resultatet visar att *M. indicus* kan tillgodogöra sig olika sorter socker som tillkommit från olika enzyms nedbrytning av stärkelse. Resultatet är likt den förmåga som *S. cerevisiae* har. Däremot har *M. indicus* inte förmågan att producera lika stor mängd etanol som *S. cerevisiae* (54 g/l) under samma förhållanden.

*M. indicus* har inte samma effektivitet och produktivitet att producera etanol som *S. cerevisiae*. Dock visar resultaten på att *M. indicus*, likt *S. cerevisiae*, kan producera etanol under fermentering från vört som mäsats i olika temperaturer. Resultaten kan vara intressanta ifall *M. indicus* skulle användas till framställning av alkoholsvaga öl eller andra typer av alkoholsvaga drycker som framställs genom mäsning och fermentering.

*Nyckelord:* *S. cerevisiae*, *M. indicus*, mäsning, mäsningstemperatur, etanol.



## Abstract

One of the most common microorganisms that are used in production of beer is *Saccharomyces cerevisiae*. Its good ability to convert sugar into ethanol together with its contribution of flavor to the finished product are some of the qualities that makes *S. cerevisiae* so useful. Another microorganism that can convert sugar into ethanol and is used for production of different foods is *Mucor indicus*. Mashing is a process during beer production when malt and water are blended and heated. During this step, starch is broken down into fermentable sugars by enzymes from the malt. Depending on the temperature at which the mash is heated, various enzymes are activated. Activity from different enzymes leads to the formation of different varieties and amounts of sugar.

A laboratory study was conducted to compare efficacy and productivity of *S. cerevisiae* and *M. indicus* in converting sugar into ethanol from the various mashing temperatures of 64°C and 70°C. The purpose of this study was to investigate whether *M. indicus* could be as effective and productive as *S. cerevisiae* in producing ethanol from wort mashed in different temperatures.

The method that was carried out was to brew beer in a laboratory based on a standard brewing process. Samples were taken during the different stages of the brewing process and analysed by spectrophotometer and HPLC. The results of the analysis gave an answer to the samples starch concentration and quantity and variety of sugars.

*M. indicus* was able to produce equal amounts of ethanol (14g/L) during fermentation from wort mashed at 64°C and 70°C. The result showed that *M. indicus* can assimilate different kinds of sugar that have been derived from the degradation of starch by different enzymes. The result was similar to the ability of *S. cerevisiae*. However, *M. indicus* does not have the ability to produce as much ethanol as *S. cerevisiae* (54g/L) during the same conditions.

*M. indicus* do not have the same efficacy and productivity to produce ethanol as *S. cerevisiae*. However, the results show that *M. indicus*, like *S. cerevisiae*, can produce ethanol during fermentation from wort mashed at different temperatures. The results may be of interest if *M. indicus* were to be used to produce low alcohol beers or other types of low alcohol beverages produced by the process of mashing and fermentation.

**Keywords:** *S. cerevisiae*, *M. indicus*, mashing, mash temperature, ethanol.

# Innehållsförteckning

<b>1</b>	<b>Inledning</b>	<b>7</b>
1.1	Bakgrund	7
1.2	Malt enzymer	7
1.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.4	<i>Mucor indicus</i>	8
1.5	Syfte	9
1.6	Frågeställning	9
<b>2</b>	<b>Material och metod</b>	<b>10</b>
2.1	Litteraturstudie	10
2.2	Laboratoriestudie	10
	2.2.1 Förkultur	10
	2.2.2 Mäskning	11
	2.2.3 Kokning	11
	2.2.4 Fermentering	12
2.3	Analytisk metod	12
	2.3.1 Spektrofotometer	12
	2.3.2 HPLC	13
<b>3</b>	<b>Resultat</b>	<b>14</b>
3.1	Spektrofotometer	14
	3.1.1 Stärkelsestandard	14
	3.1.2 Mäskning	15
	3.1.3 Kokning	15
	3.1.4 Fermentering	15
3.2	HPLC	16
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>18</b>



<b>5</b>	<b>Slutsats</b>	<b>21</b>
	<b>Referenslista</b>	<b>22</b>
	<b>Tack</b>	<b>24</b>
	<b>Bilaga</b>	<b>25</b>



# 1 Inledning

## 1.1 Bakgrund

Vid ölbrygning används normalt ingredienserna malt, humle, jäst och vatten (Sylsilä, 1997). Genom tillämpning av bryggningsmetoderna mäs-kning, vörtkokning och jäsning får man fram den färdiga produkten öl. Beroende på vilka sorter och typer av malt, humle och jäst som väljs samt vilken teknik som användas vid brygg-ningsmetoderna kan man få fram många olika stilar av öl.

## 1.2 Maltenzym

Malten framställs genom att blötlägga korn för att få kärnan att börja gro. Sedan torkas och rostas kornen. Processen kallas mältning och leder till att stärkelsened-brytande enzymer i kornet som  $\beta$ -amylas aktiveras och  $\alpha$ -amylas bildas (Löhde, Nilsson & Lyhagen, 1996). Enzymaktiviteten i kornmalten är viktig under mäs-kningsprocessen. Mäs-kning är det processteg i ölbrygning där vatten och korn-malt blandas under upphettning. Enzymer som finns i kornmalten, amylaser, börjar successivt en nedbrytning (hydrolys) av stärkelser (amylopektin och amylos) till enklare jäsbara sockerarter (glukos, maltos och maltotrios) och ojäsbära sockerarter (dextriner) (Evans et al., 2003).

Mäs-kningen sker normalt under 60 minuter mellan temperaturerna 60-75°C. Tem-peraturvalet påverkar gelatiniseringen av stärkelser samt hur aktivt ett enzym verkar på att bryta ned stärkelsen. Vid 60-65°C är temperaturen optimal för  $\beta$ -amylas och vid 70-75°C är temperaturen optimal för  $\alpha$ -amylas (Westerlund, 2012). De olika mäs-kningstemperaturerna innebär att kornmalten befinner sig i två olika enzymak-tiva miljöer, vilket resulterar i en vört med olika typer och mängd av stärkelser och

socker. Vid ölbrygning brukar man därför försöka mäska vid temperaturer där båda enzymerna är aktiva. När  $\alpha$ -amylas aktiveras börjar enzymet med en slumpvis hydrolys av inre (1,4) - $\alpha$ -glykosidbindningar i stärkelsen vilket bildar linjära och förgrenade dextriner (ojäsbara sockerarter) samt oligo-tri-di och monosackarider (MacGregor et al., 1999, Brandam et al., 2003). När  $\beta$ -amylas aktiveras börjar enzymet med en sekventiell hydrolys av (1,4) - $\alpha$ -glykosidbindningar från den icke reducerande änden av stärkelsekedjor och dextriner vilket frigör maltosenheter (MacGregor, 1996). Den totala nivån av effekt och enzymaktivitet hos amylaserna kallas diastatisk kraft (Evans et al., 2003). I bryggeriindustrin är diastatisk kraft en nyckelparameter för bedömning av maltens kvalitet då diastatisk kraft estimerar kapaciteten av ett malts förmåga att bryta ned stärkelse till jäsbart socker. Under fermenteringen omvandlar jästen jäsbart socker till etanol och koldioxid, medan dextriner bidrar med restsötma för det färdiga ölet.

### 1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* tillhör domänen eukaryoter och divisionen ascomycota i riket fungi (Willey, Sherwood & Woolverton, 2014). *S. cerevisiae* (ölsockersvamp) är en mikroorganism som används som standard jäst vid brygning av överjäst öl så som ale, porter och stout. Etanol och koldioxid är de primära metaboliterna som *S. cerevisiae* bildar under fermenteringen genom omvandling av jäsbart socker i form av hexoser (Karimi & Zamani 2013; Walker & Stewart, 2016). Etanol är normalt en inhibitor för mikroorganismer (You et al., 2003). *S. cerevisiae* kan däremot överleva och växa i en miljö upp till 13% etanol tack vare dess lipidsammansättning i plasmamembranet (Ghareib et al., 1988). *S. cerevisiae* aktiveras vid temperaturer mellan 10-30°C under anaeroba förhållanden (Westerlund, 2012). Under fermenteringen bidrar *S. cerevisiae* dessutom med substanser som ger smaker och aromer till det färdiga ölet. Förutom etanol och koldioxid bildas tex. flyktiga estrar som ger det färdiga ölet en fruktig karaktär (Stam et al., 1998) Diacetyl är ytterligare substans som kan bildas vilket ger det färdiga ölet en smak av smörkola. Diacetyl kan vara önskad i vissa ölsorter så som engelsk ale, medan den kan anses som en felsmak i andra ölsorter så som lager.

### 1.4 *Mucor indicus*

*Mucor indicus* tillhör domänen eukaryoter och divisionen zygomyceter i riket fungi (Sharifia et al., 2008). *M. indicus* är en dimorf svamp vilket innebär att den kan växa i både jästliknande och filamentös form. Tillväxtformen kan influeras genom att reglera koncentrationen av sporer som ympas vid kultivering (Lennartsson, 2012).

Vid hög koncentration av sporer ( $6 \times 10^6$  sporer/ml) är tillväxten främst i jästliknande form under både aeroba och anaeroba förhållanden. Vid låg koncentration av sporer ( $3 \times 10^4$  sporer/ml) är tillväxten främst i filamentös form under både aeroba och anaeroba förhållanden (Lennartsson, 2012, Sharifia et al., 2008). *M. indicus* använts i produktionen av olika former av livsmedel som tex fermenterade sojaböner (tempe), fermenterat ris, öl och koagulerande enzym för mjölk (Lewandowska et al., 2016). Öl kan produceras med hjälp av *M. indicus* då svampen är en etanolproducerande organism. *M. indicus* har förmågan att producera etanol från jäsbara sockerarter (glukos, mannos, galaktos och fruktos) under aeroba och anaeroba förhållanden (Karimi & Zamani, 2013). Till skillnad från *S. cerevisiae* kan *M. indicus* producera etanol genom metabolism av socker i form av både hexos (glukos) och pentos (xylos) (Lewandowska et al., 2016). Dock kan svampen endast ta upp xylos under aeroba förhållanden (Sharifyazd & Karimi, 2017).

## 1.5 Syfte

Denna studie avser att jämföra effektivitet och produktivitet i att omvandla olika sockerarter som tillkommit genom mäsning i olika mäsningstemperaturer till etanol under fermentering. Jämförelsen görs mellan de etanolproducerande mikroorganismerna *M. indicus* och *S. cerevisiae*.

## 1.6 Frågeställning

I den här studien ska följande frågeställningar besvaras:

- Har mäsningstemperaturen någon inverkan på *M. indicus* förmåga att producera etanol?
- Är *M. indicus* lika effektiv och produktiv som *S. cerevisiae* i att omvandla socker till etanol under fermentering med vört från olika mäsningstemperaturer?

## 2 Material och metod

### 2.1 Litteraturstudie

Litteraturen som användes för kandidatarbetet hämtades till störst del från databaserna *Pubmed*, *Google Scholar* och *Epsilon*. Information har även hämtats från böcker lånade från Sveriges lantbruksuniversitet SLU. Utförandet av laboratoriestudien baseras på företaget Craft Labs labprotokoll (Mayers & Faria-Oliveira, 2018) och tillhandahölls efter personlig kontakt med företaget. Labprotokollet anpassades efter den laboratoriestudie som skulle utföras för detta kandidatarbete.

### 2.2 Laboratoriestudie

#### 2.2.1 Förkultur

För att odla fram aktiva mikroorganismer togs en ögla av *S. cerevisiae* J122 (tillhandahölls av Institutionen för molekylära vetenskaper, SLU) som vuxit på jäst pepton-dextros agar (YPD, jästextrakt 10 g/l, pepton 20 g/l, dextros 20 g/l och agar 20 g/l) och ympades om till en ny förtillverkad YPD platta. En ögla *M. indicus* (Isolerad från Lao alkohol jäst, tillhandahölls av Lotchana Taysayayong från universitet Champasack, Laos) som vuxit på malt extrakt agar (MEA) ympades om på en ny förtillverkad MEA platta. Samtliga nya plattor ympades om i tripletter. *M. indicus* inkuberades upprätt och *S. cerevisiae* inkuberades upp och ned i 25°C under 72 timmar.

Som tillväxtmedium förberedes jästmedia (YM) buljong (glukos 10 g/l, jästextrakt 3 g/l, pepton 5 g/l och maltextrakt 3g/l) i två stycken en liters flaskor. Ingredienserna blandades i flaskorna med destillerat vatten och autoklaverades.

Efter 72 timmars inkubering togs en ögla av *S. cerevisiae* och *M. indicus* och ympades till varsin 500 ml e-kolv innehållandes 400 ml YM buljong. E-kolvorna inkuberades på ett skakbord på 150 rpm i 25°C under 72 timmar.

### 2.2.2 Mäskning

Mäskningstid som tillämpades var 60 minuter. Mäskningstemperaturer var 64°C och 70°C.

Tre liter vatten värmdes till 60°C och fördelades till två stycken bägare med mäskpåse innehållandes 300 g malt vardera. Vattnet och malten blandades ett par minuter för att homogeniseras. Bägarna med homogeniserad blandning placerades i ett 64°C respektive 70°C vattenbad. Mäskningstiden startade när blandningen i bägarna uppnådde samma temperatur som vattenbadet. För att bibehålla en homogeniserad blandning blandades mäskan var femtonde minut genom omrörning. Två prover om 5 ml pipetterades vid mäskningens start och två prover om 5 ml pipetterades vid mäskningens slut till 15 ml centrifugtuber. För att förhindra att sammansättningen i proverna skulle ändras genom en fortsatt enzymaktivitet tillsattes 0,1 ml av 1M HCl i varje 15 ml centrifugtub. Proverna användes till spektrofotometri för mätning av mäskens stärkelsekoncentration. Efter 60 minuter av mäskning lyftes bägarna ur vattenbadet. Mäskan, nu kallad sötvört, fördes över till varsin steril en liters flaska.

### 2.2.3 Kokning

Under kokningen inaktiveras enzymerna och nedbrytning av stärkelse upphör (Sylä, 1997). Kokningen bidrar även med sterilisering av sötvörten samt att det via Maillard reaktionen bildas viktiga färg- och smakföreningar. Kottiden som tillämpades var 60 minuter.

I varje flaska tillsattes en steril omröringsmagnet. Flaskorna placerades på en värmeplatta med omrörning. Kottiden startade när vätskan i flaskan började att koka. Direkt vid starten av kokningen tillsattes 5 g humlepellets. Efter 60 minuter togs två prover om 5 ml från båda flaskorna. Proverna användes för spektrofotometri och HPLC analys. Flaskorna med den färdiga vörten kylades ned till rumstemperatur i ett kallbad.

## 2.2.4 Fermentering

Den nedkylda vörten fördelades till totalt 12 stycken 100 ml flaskor. I sex av flaskorna hälldes 80 ml vört som mäs-kats i 64°C. I de övriga sex flaskorna hälldes 80 ml vört som mäs-kats i 70°C. Tre stycken av flaskorna innehållandes vört som mäs-kades i 64°C ympades med 0,80 g *M. indicus*. Tre stycken flaskor ympades med 0,74 g *S. cerevisiae*. Samma fördelning av flaskor och mängd (g) *M. indicus* och *S. cerevisiae* ympades till flaskorna som innehöll vört som mäs-kats i 70°C. För varje flaska tillsattes ett vattenlås. Flaskorna placerades i ett 20°C rum i 14 dagar för fermentering. Efter 14 dagar flyttades flaskorna till ett 2 °C rum i ett dygn för sedimentering. Från varje flaska togs prover för analysering med spektrofotometri och HPLC.

## 2.3 Analytisk metod

### 2.3.1 Spektrofotometri

Spektrofotometri användes som analytisk metod för att få svar på den stärkelsekoncentration som fanns i de tagna proverna.

Fyra stärkelsestandarder med olika koncentrationer (10 g/l, 5 g/l, 1 g/l, 0,1 g/l) förberedes (Mayers & Faria-Oliveira, 2018). Stärkelsestandarderna späddes (1/50) genom pipettering av 2 µl lösning till 998 µl destillerat vatten. Från varje utspädd stärkelselösning pipetterades 400 µl till 2 ml Eppendorfrör. I Eppendorfrören tillfördes 400 µl jodlösning (tillhandahölls av Albina Bakeeva, SLU). Eppendorfrören skakades väl med vortex. Blandningen överfördes till kyvetter.

Prover som togs efter 0 minuters mäs-kning späddes (1/50). Prover som togs efter 60 minuters mäs-kning späddes (1/5) genom pipettering av 200 µl prov till 800 µl destillerat vatten. Från varje utspätt prov pipetterades 400 µl till 2 ml Eppendorfrör. I Eppendorfrören tillfördes 400 µl jodlösning. Eppendorfrören skakades väl med vortex. Blandningarna överfördes till kyvetter.

Prover som togs efter 60 minuters kokning späddes (1/5). Prover som togs efter fermentering med *M. indicus* och *S. cerevisiae* späddes (1/5). Från varje utspätt prov pipetterades 400 µl till 2 ml Eppendorfrör. I Eppendorfrören tillfördes 400 µl jodlösning. Eppendorfrören skakades väl med vortex. Blandningarna överfördes till kyvetter. Destillerat vatten användes som blankt prov. Absorbansen mättes på 580 nm (spektrofotometer Ultrospec 1100 pro, UK)



### 2.3.2 HPLC

HPLC användes som analytisk metod för att få svar på den mängd jäsbara sockerarter samt etanol som fanns i de tagna proverna.

Sex analyter (glukos, fruktos, maltos, glycerol, ättiksyra och etanol) användes som standarder. Fyra standardprover med olika koncentrationer (0,1 g/l, 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l) förberedes genom spädning. En stamlösning blandades med koncentrationen 10 g/l genom att väga in 1 g av vardera analyt i en 100-ml mätkolv. Mätkolven fylldes sedan med destillerat vatten. Från stamlösningen späddes de övriga koncentrationerna. Varje standardprov filtrerades genom ett 0,2 µm filter ner i HPLC-vial.

En utspädd lösning (1/10) av HCl förberedes. Till 12 Eppendorfrör tillsattes 900 µl utspädd HCl.

Från det färdiga ölet, som mäskades i 64°C och fermenterades med *S. cerevisiae*, togs tre prover om 100 µl och späddes i Eppendorfrör innehållandes 900 µl HCl. Samtliga Eppendorfrör centrifugerades (13 000 x g, 1 minut). Supernatanten från de centrifugerade proverna filtrerades genom 0,2 µm filter ner i HPLC-vialer. Samma princip upprepades för det färdiga ölet som mäskades i 64°C och fermenterades med *M. indicus* samt för det färdiga ölet som mäskades i 70 °C och fermenterades med *S. cerevisiae* samt *M. indicus*. Samma princip upprepades även för de prover som togs efter 60 minuters kokning.

Som mobilfas användes 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Inställningar för HPLC var flöde 0,6 ml/minut, kolontemperatur 60°C, elueringstid 45 minuter/prov, refraktiv index (RI)-detektor och jon exkluderande kolonn (Rezex- ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex). Instrumentet som användes var en Agilent 1100 från Agilent Technologies.

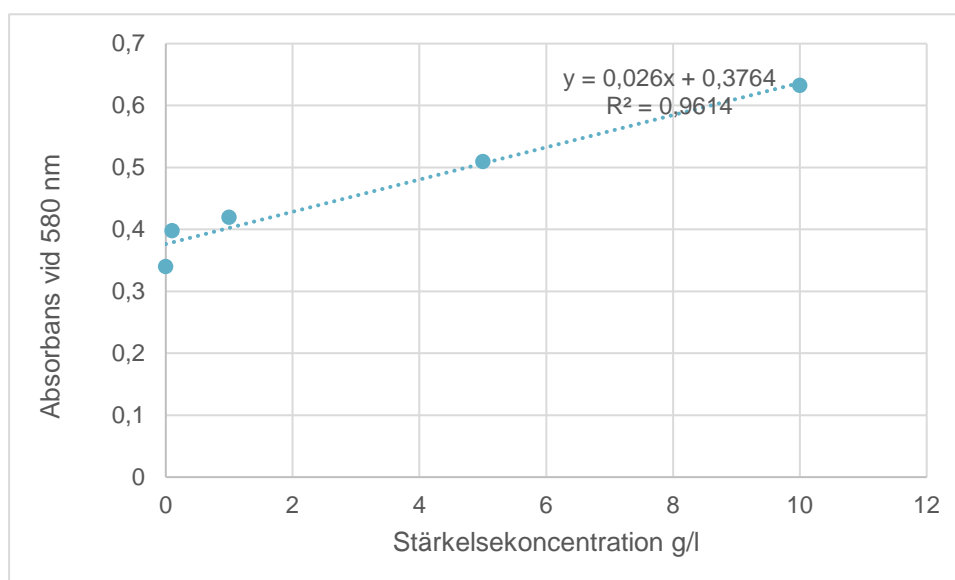
## 3 Resultat

### 3.1 Spektrofotometri

I följande avsnitt visas resultaten av stärkelsekoncentration från prover tagna ur olika steg under bryggningsprocessen.

#### 3.1.1 Stärkelsestandard

Från absorbansen i tabell 9 (bilaga) gjordes en standardkurva (Figur 1). I standardkurvan ges en linjär ekvation ( $y=0,026x+0,3764$ ) som beskriver absorbansens beteende i relation till stärkelsekoncentrationen i stärkelsestandarderna.



Figur 1. Figuren visar absorbansen från stärkelsestandardernas olika koncentrationer (g/l)

Från absorbansen i tabellerna 10–13 (bilaga) beräknades stärkelsekoncentrationen (tabell 1–4) med ekvationen ( $y=0,026x+0,3764$ ). Medelvärden av stärkelsekoncentrationerna samt felmarginal presenteras i tabellerna 1–4.

### 3.1.2 Mäskning

Från absorbansen i tabell 10 (bilaga) beräknades stärkelsekoncentrationen i tabell 1.

Tabell 1. Stärkelsekoncentrationen i gram per liter från prover tagna från olika mäskningstemperaturer efter 0 och 60 minuters mäskning. Fel marginal inom parentes

Mäskningstemperatur	Stärkelsekoncentration g/l	
	0 minuter mäskning	60 minuter mäskning
64°C	0,66 ( $\pm 0,019$ )	11,1 ( $\pm 0,577$ )
70°C	0,72 ( $\pm 0,038$ )	12,3 ( $\pm 2,653$ )

### 3.1.3 Kokning

Från absorbansen i tabell 11 (bilaga) beräknades stärkelsekoncentrationen i tabell 2.

Tabell 2. Stärkelsekoncentrationen gram per liter från prover tagna efter 60 minuters kokning. Fel marginal inom parentes

Mäskningstemperatur	Stärkelsekoncentration g/l
64°C	14,5 ( $\pm 3,307$ )
70°C	19,6 ( $\pm 3,480$ )

### 3.1.4 Fermentering

Från absorbansen i tabell 12 (bilaga) beräknades stärkelsekoncentrationen i tabell 3.

Tabell 3. Stärkelsekoncentrationen gram per liter tagna från prover efter fermentering med *M. indicus*. Fel marginal inom parentes

Mäskningstemperatur	Stärkelsekoncentration g/l
64°C	12,5 ( $\pm 0,173$ )
70°C	14,4 ( $\pm 0,212$ )

Från absorbansen i tabell 13 (bilaga) beräknades stärkelsekoncentrationen i tabell 4.

Tabell 4. Stärkelsekoncentrationen gram per liter tagna från prover efter fermentering med *S. cerevisiae*. Felmarginal inom parentes

Mäskningstemperatur	Stärkelsekoncentration g/l
64°C	24,6 ( $\pm 0,288$ )
70°C	24,8 ( $\pm 0,692$ )

### 3.2 HPLC

I följande avsnitt visas resultaten av mängden (g/l) kolkällor och etanol som finns kvar från prover tagna efter 60 minuters kokning och efter fermentering. Från tabellerna 5,6 och 7 räknades mängden etanol bildat från mängden monosackarider som visas i tabell 8.

Tabell 5. Mängd g/l för prover tagna efter 60 minuters kokning. Felmarginal inom parentes

Mäskningstemperatur	Maltos g/l	Glukos g/l	Fruktos g/l
64°C	63,3 ( $\pm 0$ )	13,1 ( $\pm 0$ )	3,7 ( $\pm 0$ )
70°C	48,1 ( $\pm 4,10$ )	12,3 ( $\pm 1,20$ )	3,7 ( $\pm 0,30$ )

Varje prov (maltos, glukos, fruktos) i Tabell 5 spädades (1/10) innan analyseringen med HPLC. Mängden (g/l) i tabell 5 är beräknat inklusive antalet spädningar.

Tabell 6. Mängd g/l för prover tagna efter fermentering med *M. indicus*. Felmarginal inom parentes

Mäskningstemperatur	Maltos g/l	Glukos g/l	Fruktos g/l	Etanol g/l
64°C	73,8 ( $\pm 4,50$ )	21,7 ( $\pm 3,00$ )	5,37 ( $\pm 0,05$ )	13,6 ( $\pm 0,50$ )
70°C	58,9 ( $\pm 7,30$ )	25,5 ( $\pm 2,40$ )	5,40 ( $\pm 0,14$ )	14,1 ( $\pm 0,50$ )

Varje prov i Tabell 6 spädades (1/10) innan analyseringen med HPLC. Mängden (g/l) i tabell 6 är beräknat inklusive antalet spädningar.

Tabell 7. *Mängd g/l för prover tagna efter fermentering med S. cerevisiae. Felmarginer inom parentes*

Mäskningstemperatur	Maltos g/l	Glukos g/l	Fruktos g/l	Etanol g/l
64°C	0	0	1,53 ( $\pm 0,05$ )	52,4 ( $\pm 2,50$ )
70°C	0	0	1,60 ( $\pm 0,05$ )	56,2 ( $\pm 1,25$ )

Varje prov i Tabell 7 späddes (1/10) innan analyseringen med HPLC. Mängden (g/l) i tabell 7 är beräknat inklusive antalet spädningar.

Tabell 8. *Mol etanol/ mol monosackarid för prover mäskade i 64°C och 70°C med S. cerevisiae.*

Mäskningstemperatur	<i>S. cerevisiae</i> mol etanol/ mol monosackarid
64°C	2,61 ( $\pm 0,13$ )
70°C	3,52 ( $\pm 0,09$ )

Resultaten från tabell 8 beräknades enligt räkneexempel 1 (bilaga)

Resultaten mol etanol/ mol monosackarid för *M. indicus* blev negativa då en större mängd (g/l) glukos och maltos fanns efter fermentering än innan fermentering.

## 4 Diskussion

Stärkelsekoncentrationen från prover tagna efter 0 minuters mäs-kning i olika mäs-kningstemperaturer (tabell 1) kan tolkas som likvärdiga. Stärkelsekoncentrationen från prover tagna efter 60 minuters mäs-kning i olika mäs-kningstemperaturer (tabell 1) kan även tolkas som likvärdiga. Resultaten visar på att det finns lika mycket lös-lig stärkelse kvar efter 60 minuter 64°C mäs-kning som 60 minuter 70°C mäs-kning. Enligt labprotokollet (Mayers & Faria-Oliveira, 2018) indikerar koncentrationen av stärkelse som finns kvar efter mäs-kning den effektivitet som amylaserna haft under mäs-kningen. Förväntningen är att ingen stärkelse ska vara detekterbar efter 60 minuters mäs-kning ifall tillräcklig enzymaktivitet har uppnåtts (Sysilä, 1997). Här kunde ett enkelt jod-test utförts för att indikera om stärkelse fortfarande fanns kvar efter 60 minuters mäs-kning och då avgjort om mäs-kningen skulle fortsätta eller inte. Resultaten från tabell 1 kan tolkas som att amylaserna har varit lika i sin effektivitet att bryta ned stärkelser vid de olika mäs-kningstemperaturerna. För att få ett tydligare resultat på amylasernas effektivitet under mäs-kning kunde man eventuellt ha valt att använda sig av ett Megazyme kit och göra en isotermisk experimentell studie om amylasernas aktivitet likt Brandam et al., (2003). Efter 60 minuters kokning (tabell 2) finns en viss ökning i stärkelsekoncentrationen från båda proverna. Resultaten kan dock anses vara för marginella för att en ökning i stärkelsekoncentration faktiskt skett. Det kan anses som att det är lika stor stärkelsekoncentration efter 60 minuters kokning som efter 60 minuters mäs-kning. Efter fermentering med *M. indicus* (tabell 3) är stärkelsekoncentrationen inom samma värden som efter 60 minuters kokning och kan anses som likvärdiga. Samma antagande kan även göras för resultaten i tabell 4 för *S. cerevisiae*.

Under normala förhållanden vid fermentering omvandlas en monosackarid (glukos) till två etanolmolekyler (Willey, Sherwood & Woolverton, 2014). Tabell 8 (resultat) visar på större mängd producerad etanol per tillgänglig monosackarid för *S. cere-*

*visiae*. För *M. indicus* blev mängd producerad etanol lägre än tillgänglig monosackarid. Resultatet kan innebära att det funnits ytterligare kolkällor tillgängliga under fermenteringen, vilka inte analyserades med HPLC. Enligt kromatografi resultaten från HPLC (bilaga) ges indikationer om att det möjligtvis finns andra kolkällor i prover tagna efter 60 minuters kokning samt efter fermentering. Jämförs retentionstiden för de okända potentiella kolkällorna i proverna mot standard retentionstider (www.shodex.com) kan man anta att de är maltotrios och maltotetraos. Resultaten i tabell 8 visar att *S. cerevisiae* producerat mer etanol per tillgänglig glukos. Det innebär att maltos, som var en av analyterna, inte är ensam källa till glukos. Maltotrios och maltotetraos kan även ha brutits ned och bidragit med ytterligare glukos. *S. cerevisiae* har enzymet  $\alpha$ -glucosidase (maltas) som kan hydrolysera di- och oligosackarider samt stärkelse (Dušan et al., 2014). Enzymet kan därför ha brutit ned både maltotrios och maltotetraos under fermenteringen och bidragit med ytterligare tillgång till glukos. Enligt kromatografi resultaten från HPLC (bilaga) gällande *S. cerevisiae* kan man avläsa att den kolkälla som kan antas vara maltotrios har minskat i mängd efter fermentering jämfört med den mängd som fanns efter 60 minuters kokning. Det tyder på att maltotrios kan vara den bidragande faktorn till att resultaten i tabell 8 visar på mer bildat etanol per tillgänglig glukos, då analyseringen med HPLC enbart presenterade redan fria glukosmolekyler samt nedbruten maltos som glukoskälla. Resultaten i tabell 8 visar även att det finns en viss skillnad i mängd mol etanol/ mol monosackarid producerat av *S. cerevisiae* beroende på mäsknings-temperatur. Mängden mol etanol/ mol monosackarid är lite högre i prover från 70°C mäskning. Resultatet kan innebära att det funnits mer glukos tillgängligt för *S. cerevisiae* som fermenterat vört som mäskats i 70°C. Som tidigare beskrivet i inledningen av kandidatarbetet så är  $\alpha$ -amylas aktivt vid 70°C och hydrolyserar löslig stärkelse till bland annat maltotrios.

Resultaten gällande mängden mol etanol/ mol monosackarid för *M. indicus* blev negativa. Resultatet tolkas att det finns mer glukos än producerat etanol efter fermenteringen. Jämförs tabell 5 mot tabell 6 (resultat) kan man se att samtliga kolkällor som analyserats med HPLC har ökat i mängd (g/l) efter fermentering jämfört mot prover tagna efter 60 minuters kokning. Enzymet  $\alpha$ -amylas kan produceras av *M. indicus* (Gulati et al., 2007). Som tidigare nämnts hydrolyserar  $\alpha$ -amylas ned stärkelse till di- och monosackarider. Ytterligare stärkelse kan därför ha brutits ned av *M. indicus* vilket kan ge en förklaring till varför maltos och glukos ökat i mängd (g/l) efter fermenteringen. Ytterligare nedbruten stärkelse kan även vara anledningen till varför *M. indicus* visade på negativa resultat gällande mol etanol/ mol monosackarid.

Tidigare studier som gjorts om *M. indicus* av Millati et al., (2005) och Sues et al., (2005) visar på att *M. indicus* har kapacitet att producera etanol med en avkastning och produktivitet likt *S. cerevisiae*. Dessa studier har dock använt sig av en noggrann komponering av utvalda kolkällor och vitaminer för optimala förhållanden för mikroorganismerna. Enligt tabell 6 (resultat) har *M. indicus* producerat 14 g/l etanol efter fermentering med vört mäskat i 64°C och 70°C. Enligt tabell 7 (resultat) har *S. cerevisiae* producerat 54 g/l etanol efter fermentering med vört mäskat i 64°C och 70°C. För *M. indicus* har produktionen av etanol avstannat fortare än för *S. cerevisiae*. Den ökade mängden kolkällor som tillkommit under fermenteringen har *M. indicus* inte kunnat tillgodogöra lika effektivt som *S. cerevisiae*. De negativa siffrorna för *M. indicus* från tabell 8 (resultat) kan tolkas som att fler glukosmolekyler har tillkommit under fermenteringen än vad *M. indicus* klarat av att omvandla till etanol. För *S. cerevisiae* har däremot fler glukosmolekyler omvandlats till etanol då det tillkommit glukos från kolkällor som inte analyserades med HPLC och därmed inte togs i beaktning vid beräkning av mol etanol/ mol monosackarid. För att underlätta förståelsen av provresultaten i tabell 8 (resultat) bör även maltotrios och maltotetraos förberetts som standarder.

Vid fermentering tillsattes olika mängd (g) *S. cerevisiae* och *M. indicus*. Anledningen var att det fanns för liten mängd *S. cerevisiae* tillgänglig samt att *M. indicus* hade ympats i flaskor och vägts innan *S. cerevisiae*. Det fanns dessutom ingen möjlighet att lämna proverna till dagen efter för att möjligtvis förkultivera ytterligare *S. cerevisiae*. Förkultiveringen av *M. indicus* som gjordes genom inkubering i e-kolv tillsammans med jästmedia buljong i 25°C under 72 timmar var under aeroba förhållanden. Efter inkubering var tillväxten övervägande filamentös. Eventuellt kunde man även ha inkuberat *M. indicus* i anaeroba förhållanden för att se om tillväxten blev annorlunda jämfört med aeroba förhållanden. Då kunde man ha jämfört produktion av etanol med *M. indicus* som kultiverats aerobt och anaerobt, likt det som utfördes av Sharifia et al., (2008)

Tabell 6 (resultat) som visar att *M. indicus* kan producera lika stor mängd (g/l) etanol från vört som fermenterats vid de olika mäsningstemperaturerna är intressant. Resultatet ger en bild av hur mycket etanol *M. indicus* kan producera från den mängd (g) *M. indicus* som tillsattes vid fermenteringen. Hade vidare studier gjorts med enbart *M. indicus* kunde man ökat mängden (g) av *M. indicus* vid fermenteringen för att möjligtvis få ett bättre utbyte av mol etanol/ mol monosackarid. Studien skulle möjligtvis ge svar på mängd (g) *M. indicus* som krävs för att producera lika mycket etanol som den mängd (g) *S. cerevisiae* som tillsattes vid fermentering under denna laboratoriestudie.



## 5 Slutsats

Resultaten visar att *M. indicus* har förmågan att producera etanol från vört som mäs-kats i olika temperaturer. Därmed har *M. indicus*, liksom *S. cerevisiae*, kunnat tillgodo-göra sig de olika jäsbara sockerarterna som amylaserna brutit ned från stärkelse vid de olika jäskningstemperaturerna. Däremot så är *M. indicus* inte lika effektiv och produktiv i att producera etanol som *S. cerevisiae* under de förutsättningar som la-boratoriestudien utgick från. Den potentiella produkten som kan produceras baserat på etanolproduktionen i denna laboratoriestudie är i form av svagdricka. Dock så har resultaten visat att *M. indicus* kan producera lika hög mängd (g/l) etanol under fermentering utifrån vört mäs-kat i 64°C och 70°C. Detta kan liknas med *S. cere-visiae*. För att *M. indicus* eventuellt ska uppnå samma effektivitet och totala mängd (g/l) producerad etanol som *S. cerevisiae* bör en större mängd (g) av *M. indicus* tillsättas vid fermentering. Därför kan *M. indicus* utifrån denna laboratoriestudie inte anses vara ett lika effektivt och produktivt alternativ som *S. cerevisiae* vid pro-duktion av öl.

## Referenslista

- Brandam, C., Meyer, X.M., Proth, J., Strehaiano, P., Pingaud, H., 2003. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. *Biochemical Engineering Journal* 13, 43–52. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00100-6)
- Dušan, V., Nenad, M., Dejan, B., Filip, B., Segal, A.M., Dejan, Š., Jovana, T., Aleksandra, D., 2014. The specificity of  $\alpha$ -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* differs depending on the type of reaction: hydrolysis versus transglucosylation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 6317–6328. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5587-9>
- Evans, E., Wegen, B. van, Ma, Y., Eglinton, J., 2003. The Impact of the Thermostability of  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase, and Limit Dextrinase on Potential Wort Fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 61, 210–218. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-61-0210>
- Ghareib, M., Youssef, K.A., Khalil, A.A., 1988. Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiologica* 33, 447–452. <https://doi.org/10.1007/BF02925769>
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S., 2007. Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of phytase. *Folia Microbiol* 52, 491. <https://doi.org/10.1007/BF02932109>
- Karimi, K., Zamani, A., 2013. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnology Advances* 31, 466–481. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.009>
- Lennartsson, P.R., 2012. Zygomycetes and cellulose residuals: hydrolysis, cultivation and applications. Ph.D. thesis. Chalmers University of Technology, Department of Chemical and Biological Engineering. Gothenburg, Sweden. <http://hb.diva-portal.org/smash/get/diva2:876998/FULLTEXT01>
- Lewandowska, M., Szymańska, K., Kordala, N., Dąbrowska, A., Bednarski, W., Juszczak, A., 2016. Evaluation of *Mucor indicus* and *Saccharomyces cerevisiae* capability to ferment hydrolysates of rape straw and *Miscanthus giganteus* as affected by the pretreatment method. *Bioresource Technology* 212, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.063>
- Löhde, J., Nilsson, L. B., & Lyhagen, R. (1996). *Malkorn från kärna till öl*. Svalöf Weibull.
- MacGregor, A.W., 1996. Malting and Brewing Science: Challenges and Opportunities. *Journal of the Institute of Brewing* 102, 97–102. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00900.x>
- MacGregor, A.W., Bazin, S.L., Macri, L.J., Babb, J.C., 1999. Modelling the Contribution of Alpha-Amylase, Beta-Amylase and Limit Dextrinase to Starch Degradation During Mashing. *Journal of Cereal Science* 29, 161–169. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0233>

- Mayers ,J., Faria-Oliveira., F. (2018) *Beer brewing practical*. Craft Labs
- Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J., 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.007>
- Sharifia, M., Karimi, K., Taherzadeh, M.J., 2008. Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1253–1259. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0422-x>
- Sharifyazd, S., Karimi, K., 2017. Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electronic Journal of Biotechnology* 30, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.09.003>
- Stam, H., Hoogland, M., Laane, C., 1998. Food flavours from yeast, in: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Springer US, Boston, MA, pp. 505–542. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_16)
- Sysilä, I (1997). *Small scale brewing*, First Edition. Limes, Helsinki
- Walker, G.M., Stewart, G.G., 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2, 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Westerlund, Ö, Grenadine Bokförlag 2012. *101 Öl du måste dricka innan du dör*, 2012/2013, 215-217. Grenadine Bokförlag AB Stockholm
- Willey, J.M. Sherwood, L.M. Woolverton, C.J., 2014. *Prescott's Microbiology* Ninth edition, 249-250, 595-596, 974. 2 Penn Plaza, New York NY 10121.
- You, K.M., Rosenfield, C.-L., Knipple, D.C., 2003. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1499–1503. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003>
- Zastrow, C.R., Hollatz, C., de Araujo, P.S., Stambuk, B.U., 2001. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotech* 27, 34–38. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000158>

## Tack

Jag vill först och främst ge ett varmt tack till min handledare Albina Bakeeva på SLU som varit till stor hjälp under arbetet i laboratoriet samt ett stort stöd vid tolkning av resultat och utformning av text. Jag vill även tacka Jonas Ohlsson på SLU för sin hjälp med HPLC och tolkning av dess resultat.

Ett stort tack ger jag även till Volkmar Passoth på SLU för att han redan i oktober 2018 började hjälpa till med planering av arbetet och för att han gav stöd och visade intresse för den idé jag hade till kandidatarbetet.

Ett sista tack ger jag till företaget Craft Labs som bidrog med det labprotokoll som jag sedan kunde anpassa min laboratoriestudie efter.

# Bilaga

## Spektrofotometer

Tabell 9. Absorbans mätt från olika koncentrationer av stärkelsestandard

Stärkelsekoncentration % och g/L		Absorbans
1%	10 g/l	0,633
0,5%	5 g/l	0,510
0,1%	1 g/l	0,420
0,01%	0,1 g/l	0,398
0%	0 g/l	0,340

Varje stärkelsekoncentration i Tabell 9 spädde (1/50) innan mätning av absorbans. Absorbansen i Tabell 9 är från de utspädda proverna. Absorbansen användes för att göra standardkurvan.

Tabell 10. Absorbans från prover tagna från olika mäsningstemperaturer efter 0 och 60 minuters mäsning

Mäsningstemperatur	Absorbans	
	0 minuter mäsning	60 minuter mäsning
64°C		
Prov 1	0,393	0,650
Prov 2	0,394	0,680
70 °C		
Prov 1	0,396	0,765
Prov 2	0,394	0,627

Varje prov i Tabell 10 spädde (1/5) innan mätning av absorbans. Absorbansen i Tabell 10 är från de utspädda proverna. Absorbansen användes i ekvationen från standardkurvan för att räkna ut stärkelsekoncentrationen i proverna.

Tabell 11. Absorbans från prover tagna efter 60 minuters kokning

Mäskningstemperatur	Absorbans
64°C	
Prov 1	0,840
Prov 2	0,668
70°C	
Prov 1	
Prov 2	
	0,795
	0,976

Varje prov i Tabell 11 späddes (1/5) innan mätning av absorbans. Absorbansen i Tabell 11 är från de utspädda proverna. Absorbansen användes i ekvationen från standardkurvan för att räkna ut stärkelsekoncentrationen i proverna.

Tabell 12. Absorbans från prover tagna efter fermentering med *M. indicus*

Mäskningstemperatur	Absorbans
64°C	
Prov 1	0,698
Prov 2	0,707
70°C	
Prov 1	0,745
Prov 2	0,756

Varje prov i Tabell 12 späddes (1/5) innan mätning av absorbans. Absorbansen i Tabell 12 är från de utspädda proverna. Absorbansen användes i ekvationen från standardkurvan för att räkna ut stärkelsekoncentrationen i proverna

Tabell 13. Absorbans från prover tagna efter fermentering med *S. cerevisiae*

Mäskningstemperatur	Absorbans
64°C	
Prov 1	1,008
Prov 2	1,023
70 °C	
Prov 1	
Prov 2	1,038
	1,002

Varje prov i Tabell 13 späddes (1/5) innan mätning av absorbans. Absorbansen i Tabell 13 är från de utspädda proverna. Absorbansen användes i ekvationen från standardkurvan för att räkna ut stärkelsekoncentrationen i proverna

## HPLC

Resultat g/l:

Tabell 14. HPLC resultat. Mängd (g/l) maltos, glukos, fruktos och etanol efter fermentering med *M. indicus*, mäskat i 64°C

<i>M. indicus</i> prov	Maltos	Glukos	Fruktos	Etanol
1	71,1	23	5,40	14,4
2	80,2	17,6	5,40	12,7
3	70	24,6	5,50	13,6

Tabell 25. HPLC resultat. Mängd (g/l) maltos, glukos, fruktos och etanol efter fermentering med *M. indicus*, mäskat i 70°C

<i>M. indicus</i> prov	Maltos	Glukos	Fruktos	Etanol
1	68,9	23,8	5,61	14,5
2	51,6	28,9	5,31	13,8
3	55,7	23,7	5,26	13,9

Tabell 36. HPLC resultat. *Mängd (g/l) maltos, glukos, fruktos och etanol efter fermentering med S. cerevisiae, mäsakat i 64°C*

<i>S. cerevisiae</i> prov	Maltos	Glukos	Fruktos	Etanol
1	0	0	1,56	49,8
2	0	0	1,51	51,6
3	0	0	1,48	55,9

Tabell 47. HPLC resultat. *Mängd (g/l) maltos, glukos, fruktos och etanol efter fermentering med S. cerevisiae, mäsakat i 70°C*

<i>S. cerevisiae</i> prov	Maltos	Glukos	Fruktos	Etanol
1	0	0	1,65	54,9
2	0	0	1,63	58,2
3	0	0	1,60	55,5

#### Räkneexempel 1

Från tabellerna 11, 12 och 13 beräknades mol etanol/ mol monosackarid. Nedan visas ett räkneexempel.

Molvikt monosackarid (glukos, fruktos): 180,16 g/mol

Molvikt disackarid (maltos): 342,3 g/mol

Molvikt etanol: 46,07 g/mol

g/l för prov efter 60 minuters kokning som mäsakats i 64°C:

Maltos 63,3 g/l

Glukos 13,1 g/l

Fruktos 3,7 g/l

mol/l för prov efter 60 minuters kokning som mäsakats i 64°C:

Maltos:  $63,3(\text{g/l}) / 342,3 (\text{g/mol}) = 0,184926 \text{ mol/l}$

Glukos:  $13,1 (\text{g/l}) / 180,16 (\text{g/mol}) = 0,072713 \text{ mol/l}$

Fruktos:  $3,7 (\text{g/l}) / 180,16 (\text{g/mol}) = 0,020537 \text{ mol/l}$



Monosackarid ekvivalent för prov efter 60 minuters kokning som mäskats i 64°C:

Maltos:  $0,184926 \cdot (342,3/180,16) = 0,3513 \text{ mol/l}$

Glukos:  $0,072713 \cdot (180,16/180,16) = 0,072713 \text{ mol/l}$

Fruktos:  $0,020537 \cdot (180,16/180,16) = 0,020537 \text{ mol/l}$

g/l för prov efter fermentering som mäskats i 64°C med *S. cerevisiae*:

Maltos: 0 g/l

Glukos: 0 g/l

Fruktos: 1,53 g/l

mol/l för prov efter fermentering som mäskats i 64°C med *S. cerevisiae*:

Maltos: 0

Glukos: 0

Fruktos:  $1,53 \text{ (g/l)} / 180,16 \text{ (g/mol)} = 0,008492 \text{ mol/l}$

Monosackarid ekvivalent för prov efter fermentering som mäskats i 64°C med *S. cerevisiae*:

Maltos: 0

Glukos: 0

Fruktos:  $0,008492 \cdot (180,16/180,16) = 0,008492 \text{ mol/l}$

g/l etanol för prov efter fermentering som mäskats i 64°C med *S. cerevisiae*:

52,4 g/l

mol/l etanol för prov efter fermentering som mäskats i 64°C med *S. cerevisiae*:

$52,4 \text{ (g/l)} / 46,07 \text{ (g/mol)} = 1,1374 \text{ mol/l}$

Total mol/l monosackarid ekvivalent efter 60 minuters kokning:

$0,3513 \text{ (mol/l)} + 0,072713 \text{ (mol/l)} + 0,020537 \text{ (mol/l)} = 0,444605 \text{ mol/l}$

Total mol/l monosackarid ekvivalent efter fermentering:

0,008492 mol/l

Total mol/l etanol efter fermentering:

1,1374

Tabell 18. *Differens mol/l efter 60 minuters kokning och efter fermentering*

Mol/l	Efter 60 minuters kokning	Efter fermentering	Differens
Etanol	0	1,1374	1,1374
Monosackarid-ekvivalenter	0,444605	0,008492	0,436112

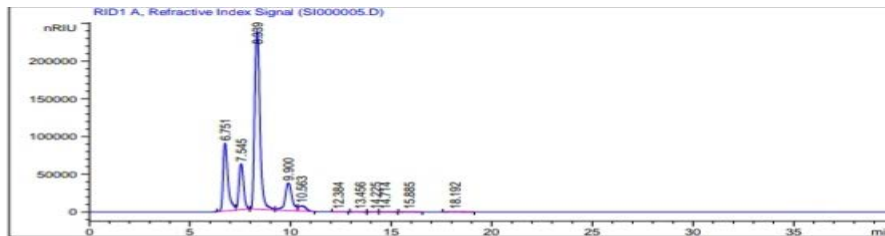
Mol etanol/ mol monosackarid från prov som mäskats i 64°C med *S. cerevisiae*:

$1,1374 \text{ (mol/l)} / 0,436112 \text{ (mol/l)} = 2,608 \text{ mol etanol / mol monosackarid}$

Övriga resultat se tabell 8 (Resultat)

## Kromatografi

Prov taget efter 60 minuters kokning. Mäskat i 64°C



### External Standard Report

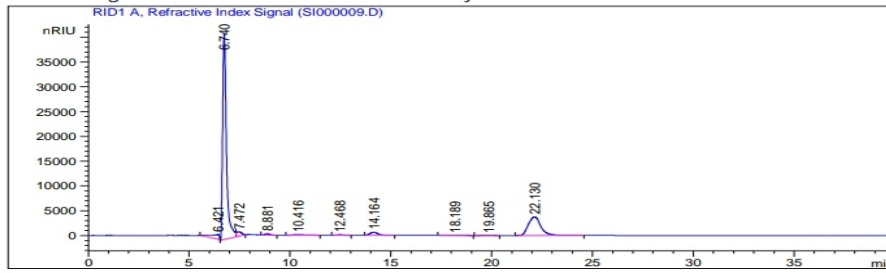
Sorted By : Retention Time  
Calib. Data Modified : Wednesday, April 24, 2019 11:32:58 AM  
Multiplier: 1.0000  
Dilution: 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Sig	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
8.339	1	BV	4.29225e6	1.42877e-5	61.32664		MALTOSE
9.900	1	VV	8.57773e5	1.40549e-5	12.05593		GLUCOSE
10.563	1	VB	1.65575e5	1.40802e-5	2.33134		FRUCTOSE
14.225	1	BV	2326.66748	4.06317e-5	9.45365e-2		GLYCEROL
15.885	1	BB	1336.22681	2.77137e-5	3.70318e-2		ACETATE
22.139	1		-	-	-		ETHANOL

Totals : 75.84547

Prov taget efter fermentering med *S. cerevisiae*. Mäskat i 64°C.



External Standard Report

Sorted By : Retention Time  
 Calib. Data Modified : Wednesday, April 24, 2019 11:32:58 AM  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

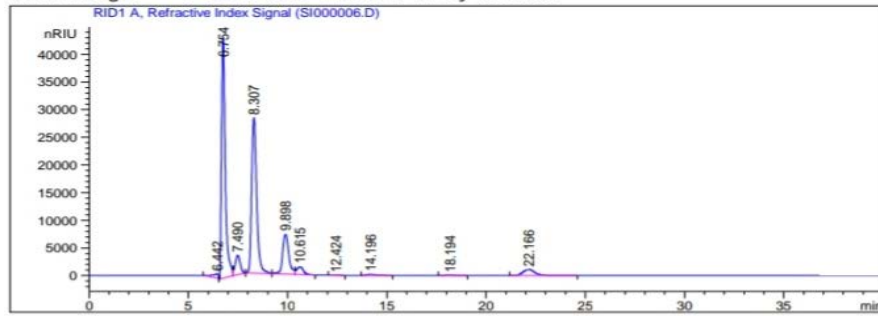
Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Sig	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
8.297	1		-	-	-		MALTOSE
9.893	1		-	-	-		GLUCOSE
10.416	1	BB	5068.67236	3.07886e-5	1.56057e-1		FRUCTOSE
14.164	1	VB	1.72819e4	2.07000e-5	3.57736e-1		GLYCEROL
15.724	1		-	-	-		ACETATE
22.130	1	BB	1.59874e5	3.11772e-5	4.98442		ETHANOL

Totals : 5.49821

Prov taget efter fermentering med *M. indicus*. Mäskat i 64°C.

Last changed : 4/24/2019 11:36:14 AM by leticia



External Standard Report

Sorted By : Retention Time  
 Calib. Data Modified : Wednesday, April 24, 2019 11:32:58 AM  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Sig	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
8.307	1	BV	4.95311e5	1.43560e-5	7.11069		MALTOSE
9.898	1	VV	1.57621e5	1.44819e-5	2.28265		GLUCOSE
10.615	1	VB	3.35170e4	1.61591e-5	5.41605e-1		FRUCTOSE
14.196	1	BB	5601.57129	2.71659e-5	1.52172e-1		GLYCEROL
15.724	1		-	-	-		ACETATE
22.166	1	BB	4.61693e4	3.11226e-5	1.43691		ETHANOL

Totals : 11.52403