

RAAK-PRO

ZEEVIVO Zeewier in visvoer

Rapport Werkpakket B, Bioraffinage



Auteur(s): Tom Wijers (Hogeschool VHL) &
Dirk Jan Vos (Danvos BV)

Penvoerder: Hogeschool Van Hall Larenstein

Consortium:

Hogeschool Van Hall Larenstein
Koninklijk Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee
Wageningen Livestock Research
Hortimare BV
Danvos BV



Samenvatting

Vanuit het ZEEVIVO project werd in werkpakket B, *Bioraffinage*, onderzoek gedaan naar het opwaarderen van eiwit uit zeewier. De hoofdvraag was: *Hoe is uit zeewier een commercieel interessant eiwitconcentraat te extraheren met een eiwitgehalte van tenminste 60%?*

Om deze vraag te beantwoorden zijn optimalisatieproeven uitgevoerd in het laboratorium. Daarnaast zijn er extractieproeven op pilotschaal gedaan, gevolgd door het concentreren en zuiveren van de eiwitten in deze extracten met behulp van membraanfiltratie.

In het laboratorium is gekeken naar het effect van de bewaarmethode, de pH en de temperatuur op de eiwitextractie-efficiëntie uit zeewier. Het verhogen van de temperatuur naar 50°C en de pH naar rond de 11 leidde tot een efficiënter proces dan zonder verhoogde pH en temperatuur. Daarbij kon tot bijna 60% van het eiwit uit het zeewier geëxtraheerd worden. Het is ook duidelijk geworden dat de manier van bewaren een groot effect heeft op de eiwitextractie en dat dit effect per zeewiersoort verschilt. Om dit te testen is er gekeken naar het effect van invriezen, vriesdrogen en luchtdrogen (bij 40°C en 70°C) op de eiwitextractie van twee bruinwieren *Saccharina latissima* en *Ascophylum nodosum*, één roodwier, *Chondrus crispus* en één groenwier, *Ulva lactuca*. De eiwitextractie van de verwerkte zeewieren is vergeleken met die van vers zeewier. Tenslotte is ook gekeken naar de samenstelling van de overgebleven pellet na extractie. Vers zeewier leidde bij alle vier soorten tot een redelijke eiwitextractie-efficiëntie, waarbij tussen de 35% en 55% van het eiwit in oplossing kwam. Bij sommige soorten leidde drogen of vriesdrogen tot een nog hogere eiwitextractie-efficiëntie. Gevriesdroogd *A. nodosum* had de hoogste eiwitextractie-efficiëntie van 59.6% van het eiwit in oplossing en een iets verhoogde eiwitconcentratie vergeleken met de biomassa voor extractie. De eiwitconcentratie in dit supernatant was nog wel laag met 10 g eiwit /100g droge stof/dry weight (DW). Voor *U. lactuca* is juist de overgebleven pellet na extractie een interessante eiwitbron. Meer dan 80% van het eiwit blijft in deze pellet terwijl de eiwitconcentratie van 9 g eiwit /100g DW is verhoogd naar 16 g eiwit /100g DW. Voor zowel de industrie als onderzoekers is het dus erg belangrijk welke combinatie van zeewiersoort en bewaarmethode gebruikt wordt, aangezien dit een groot effect kan hebben op de efficiëntie en concentratie van eiwitten in zowel de oplossing als in de overgebleven pellet.

Naast de optimalisatieproeven in het laboratorium zijn er op pilotschaal extracties uitgevoerd, gevolgd door eiwitzuivering en concentratie met behulp van membraanfiltratie. Met dit proces is gedroogde *U. lactuca* met 9,3 g eiwit /100g DW opgewaardeerd naar een geconcentreerde oplossing met een eiwitconcentratie van 31,2 g eiwit /100g DW. Dit was een toename in eiwitconcentratie van meer dan 300%, maar nog niet de 60 g eiwit /100g DW wat nodig was als eiwitcomponent in visvoer. Het totale eiwit rendement was laag, er was 200 kilo droog zeewier nodig voor 1,6 kilo eiwit in een eiwitconcentraat.

Zowel het supernatant als de pellet na de extractie van zeewier hebben potentie als nieuwe eiwitbron afhankelijk van soort en voorbehandeling methode. Een commercieel eiwitconcentraat uit zeewier met 60% of meer eiwit was lastig, maar een verrijkte pellet met meer dan 30% eiwit lijkt goed mogelijk, mits er voldoende kwalitatief hoog zeewier beschikbaar is.

Inhoudsopgave

Samenvatting	1
1. Introductie	3
2. Eiwitextractie optimalisatie	5
2.1 Extractie variatie	5
2.2 Optimalisatie pH en temperatuur	5
2.3 Effect van voorbehandeling en soort zeewier	7
3. Opschaling	12
3.1 Membraanfiltratie	12
3.2 Grootschalige eiwitextractie en concentratie	13
3.3 Niet eiwit stromen	14
4. Conclusies	16
5. Dankwoord	17
6. Literatuur	18

1. Introductie

Om de eiwitcomponent in visvoer, zoals vismeel of soja, te vervangen is een grondstof met minimaal 60% eiwit nodig. De eiwitconcentratie in zeewier ligt meestal tussen de 10% en 20% op basis van droge stof/dry weight (DW). Dit is te laag om als eiwitbron verwerkt te worden in visvoer en veel andere toepassingen. De eiwitconcentratie van de zeewier biomassa moet daarom verhoogd worden. Het verwerken en concentreren van de biomassa tot verschillende grondstoffen wordt bioraffinage genoemd, waarbij de focus binnen het ZEEVIVO project op de eiwitcomponent ligt. Met alleen de vaste biomassa is het opwaarderen van de eiwitconcentratie lastig, er is daarom in eerste instantie gekozen om op zoek te gaan naar een optimale en opschaalbare eiwitextractie waarbij de eiwitten in oplossing gebracht worden.

De hoofdvraag van het werkpakket B, *bioraffinage*, van ZEEVIVO was:

Hoe is uit zeewier een commercieel interessant eiwitconcentraat te extraheren met een eiwitgehalte van tenminste 60%?

Om deze vraag te beantwoorden is er eerst op kleine schaal gekeken naar het optimaliseren van de eiwit extractie uit zeewier. Zo is er onderzoek gedaan naar het effect van soort en voorbehandelingsmethode van zeewier op de eiwitextractie-efficiëntie. Parallel hieraan zijn extractieproeven op pilotschaal uitgevoerd in combinatie met het zuiveren van de extracten met behulp van membraanfiltratie.



Fig. 1: Verschillende zeewiersoorten die gebruikt zijn tijdens dit onderzoek, van links naar rechts: *U. lactuca*, *S. latissima*, *A. nodosum* en *C. crispus*.

Om de extractie te optimaliseren is binnen ZEEVIVO gevarieerd met pH, temperatuur, soorten zeewier en voorbehandeling van het zeewier. Deze proeven zijn kleinschalig uitgevoerd in het laboratorium van Van Hall Larenstein (VHL) in Leeuwarden. Uit de literatuur blijkt dat een toename van de pH de oplosbaarheid van eiwitten verhoogt (Fleurence et al. 1995; Harnedy and FitzGerald 2013; Kadam et al. 2016; Angell et al. 2017; Vilg and Undeland 2017) en daarmee ook de eiwitextractie-efficiëntie (het percentage eiwit dat uit de zeewier biomassa in oplossing komt). Het verhogen van de temperatuur verhoogt in sommige gevallen ook de eiwitextractie-efficiëntie (Harnedy and FitzGerald 2013) maar bij anderen juist weer niet (Vilg and Undeland 2017). De meeste proeven binnen dit project zijn gedaan met *Ulva lactuca* en *Saccharina latissima* maar daarnaast is ook geëxperimenteerd met de soorten *Ascophyllum nodosum* en *Chondrus crispus* (zie Figuur 1). Uit verschillende proeven is gebleken dat de voorbehandeling van het zeewier een grote invloed kan hebben op de extractie, terwijl dit nog niet goed beschreven is in de literatuur. Er is daarom ook een vergelijking gemaakt tussen de extractie van vers, bevroren, gevriesdroogd en lucht gedroogd (bij 40°C en 70°C) zeewier om te kijken wat het effect van voorbehandeling is op de eiwitextractie met vier verschillende zeewier soorten.

Op pilotschaal is gekeken naar de schaalvergroting om zo voldoende eiwit te kunnen produceren voor werkpakket C, *Visproductie*. Deze extractieproeven zijn uitgevoerd in Sint Maartensvlotbrug door het bedrijf Danvos B.V. die zich specialiseert in het verwerken en opwaarderen van biomassa. Tijdens het ZEEVIVO project zijn enkele honderden kilo's zeewier op grote schaal geëxtraheerd en is er gekeken naar het verder concentreren van de opgeloste eiwitten met behulp van membraanfiltratie. Bij

membraanfiltratie kunnen opgeloste stoffen in een vloeistof gescheiden worden op grootte van de opgeloste stoffen. Het doel was hierbij om de opgeloste stoffen zoals suikers, vezels en mineralen zo veel mogelijk te scheiden van de opgeloste eiwitten. In theorie ontstaat zo een concentraat met verhoogde eiwitgehalte en een hoger DW gehalte. Wanneer dit concentraat gedroogd wordt en verwerkt tot een poeder dan kan dit als eiwitcomponent verwerkt worden in visvoer om zo vismeel en soja te vervangen.

Veelgebruikte termen met uitleg:

<i>Supernatant</i>	- De vloeibare fractie die overblijft na extractie en centrifugeren.
<i>Pellet</i>	- De niet opgeloste biomassa die overblijft na extractie en centrifugeren.
<i>Eiwitextractie-efficiëntie</i>	- Het percentage eiwit in het supernatant na extractie als percentage van het eiwit dat aanwezig was in de zeewier biomassa voor extractie.
<i>Droge stof/Dry weight (DW)</i>	- Wat overblijft van een sample nadat al het water eruit verdampt is.
<i>Eiwitconcentratie</i>	- Het aantal gram eiwit in 100 gram DW van een sample.

2. Eiwitextractie optimalisatie

2.1 Extractie variatie

Uit werkpakket A, *Zeewierteelt*, is duidelijk geworden dat het mogelijk is om de groei van zowel *U. lactuca* als *S. latissima* te bevorderen met nitraat, én dat de eiwitconcentratie van het zeewier op een positieve manier te beïnvloeden is. De vervolgstap is om dit zeewier zo te raffineren dat er een component ontstaat met een verhoogde eiwitconcentratie die kan concurreren met vismeel of soja. Binnen ZEEIVO is gekozen voor een eiwitextractie, eventueel gevolgd door een concentratie stap, om tot een product met tenminste 60% eiwit te komen. Voor de extractie zijn er twee mogelijkheden: of er wordt zo veel mogelijk zeeiwier-eiwit opgelost en eventueel later geconcentreerd, of er worden zoveel mogelijk andere stoffen opgelost, waardoor de meeste eiwitten in de onopgeloste biomassa, de pellet, overblijven. Bij de laatste mogelijkheid is het van belang dat de overgebleven pellet een verhoogde eiwitconcentratie heeft, verdere concentratie van vast biomassa is namelijk erg lastig.

In de literatuur is veel variatie in de gevonden eiwitextractie-efficiëntie te vinden. Afhankelijk van de soort en extractie methoden (Fleurence et al. 1995; Wong and Cheung 2001a, b; Angell et al. 2017; Vilg and Undeland 2017; Kazir et al. 2019) liggen waardes tussen de 7% en 59% van het eiwit dat geëxtraheerd wordt uit de zeewier biomassa. De meeste papers baseren hun methode op die van Fleurence et al. (1995) waarbij gevriesdroogd en vermalen zeewier eerst een nacht wordt opgelost in water bij 4°C. Vervolgens wordt doormiddel van een centrifuge het opgeloste gedeelte, het supernatant, bewaard en wordt de overgebleven pellet opnieuw opgelost in water, deze keer met een verhoogde pH bij kamertemperatuur. Omdat bij opschaling een extra extractiestap erg kostbaar is, is er voor gekozen om binnen ZEEVIVO direct voor een extractie met verhoogde pH zonder eerst een neutrale extractie stap te gaan, ook al kan dat de eiwitextractie-efficiëntie met ongeveer 25% verminderen (Vilg en Undeland 2017). In Figuur 2 is een schematische weergave van de extractie die gebruikt is tijdens het ZEEVIVO project te zien.

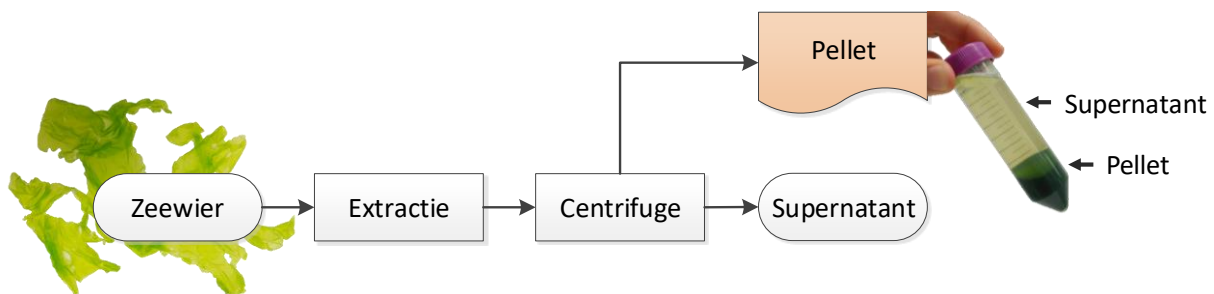


Fig. 2: Schematische weergave van de extractie gebruikt tijdens het ZEEVIVO project. Zeewier (in dit geval *U. lactuca* ter illustratie) wordt opgelost, dit noemen we het extract. Dit extract wordt gecentrifugeerd wat leidt tot een pellet van niet opgeloste biomassa en een supernatant met de opgeloste stoffen.

2.2 Optimalisatie pH en temperatuur

Het verhogen van de pH is een makkelijke en goedkope manier om de oplosbaarheid van eiwit te vergroten en daarmee dus ook het deel eiwit dat uit zeewier kan worden geëxtraheerd te verhogen. Van temperatuur is het beeld minder duidelijk, maar als een verhoging een positieve invloed heeft op de eiwitextractie-efficiëntie, dan is dit op grote schaal ook makkelijk toepasbaar.

Het effect van pH en temperatuur zijn getest op de wieren *U. lactuca* en *S. latissima*. De *U. lactuca* was gekweekt in bassins op Texel bij het onderzoeksinstituut NIOZ en de *S. latissima* was afkomstig uit een proefopstelling van de Noordzeeboerderij in de Noordzee, voor Scheveningen. Dit zeewier is eerst

ingevroren bij -20°C, vervolgens gevriesdroogd en vermalen (<0.3 mm) tot een homogeen poeder.

Eerst is er bij kamertemperatuur gekeken naar het effect van een verhoogde pH op de eiwitextractie-efficiëntie. Hiervoor is in triplo (n=3) 3 g zeewier opgelost in 60 ml water (biomassa DW tot water ratio van 1:20) met verschillende NaOH concentraties en uiteindelijk verschillende pH's. De oplossing is 1 uur geëxtraheerd op een schudtafel bij 140 rotaties per minuut (RPM). Na de extractie zijn het supernatant en de pellet gescheiden door het extract 15 minuten te centrifugeren bij 4500 rpm. Van het zeewier voor extractie en de pellet en het supernatant na extractie, zijn het DW gehalte en eiwit gehalte bepaald om zo de eiwitextractie-efficiëntie te bepalen.

Het DW gehalte van de zeewier voor extractie, pellet en supernatant zijn bepaald door een nat sample in duplo (n=2) tenminste 16 uur in een droogstoof van 105°C te zetten om zo het droge sample te verkrijgen. Het DW gehalte is berekend door het gewicht van het droge sample te delen door het gewicht van het natte sample maal 100%.

Het eiwit percentage is bepaald door het stikstof gehalte in een droog sample in duplo (n=2) te bepalen met de Kjeldahl stikstof methode (Kjeldahl 1883). Er is aangenomen dat eiwit uit zeewier voor 20% uit stikstof bestaat en door de verkregen stikstof waarden maal 5 te doen wordt het eiwit percentage verkregen (Angell et al. 2016).

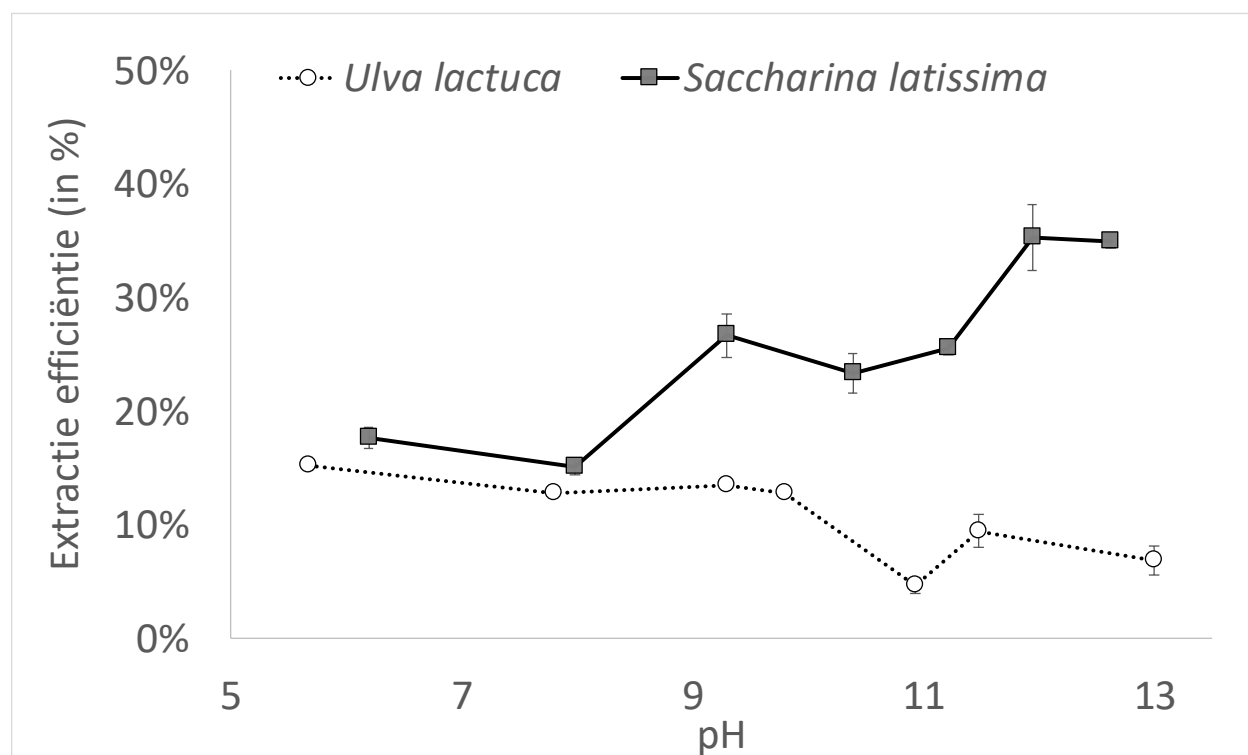


Fig. 3: Het effect van pH op de eiwitextractie-efficiëntie van gevriesdroogde *U. lactuca* en *S. latissima*. De extractie duurde 1 uur op een schudtafel bij 140 RPM bij kamertemperatuur met een droge biomassa tot water ratio van 1:20. Elk punt is een weergave van het gemiddelde $\pm$ SD waarbij n=3.

Uit de resultaten van de pH proef in Figuur 3 is te zien dat voor *S. latissima* een hogere pH een positieve invloed heeft op de eiwitextractie-efficiëntie. Voor *U. lactuca* is er een omgekeerd beeld te zien waarbij de eiwitextractie-efficiëntie afneemt naarmate de pH toeneemt. Hierdoor is de eiwitextractie-efficiëntie van *U. lactuca* bij een hogere pH veel lager dan bij *S. latissima*. Eerdere extractieproeven met verse en bevroren *U. lactuca* biomassa lieten bij pH 12 een vergelijkbaar resultaat zien als de *S. latissima* in deze proef. Er is daarom aangenomen dat voorbehandeling bij *U. lactuca* een groot effect heeft op de eiwitextractie-efficiëntie, dit hebben we later getest en bleek te kloppen (zie deel “2.3 Effect van voorbehandeling en soort zeewier”).

Uit de pH proef is aangenomen dat een optimale pH rond de 12 ligt, dit wordt bereikt met een 0.1

M NaOH oplossing tijdens de extractie. Om de optimale temperatuur te bepalen is daarom gebruik gemaakt van een 0.1 M NaOH oplossing tijdens de extractie bij 20°C, 30°C, 40°C en 50°C. Net als bij de pH proeven duurde de extractie 1 uur op een schudtafel bij 140 RPM. Van het zeewier voor extractie en het supernatant na extractie, zijn het DW gehalte en eiwit percentage bepaald om zo de eiwitextractie-efficiëntie te bepalen.

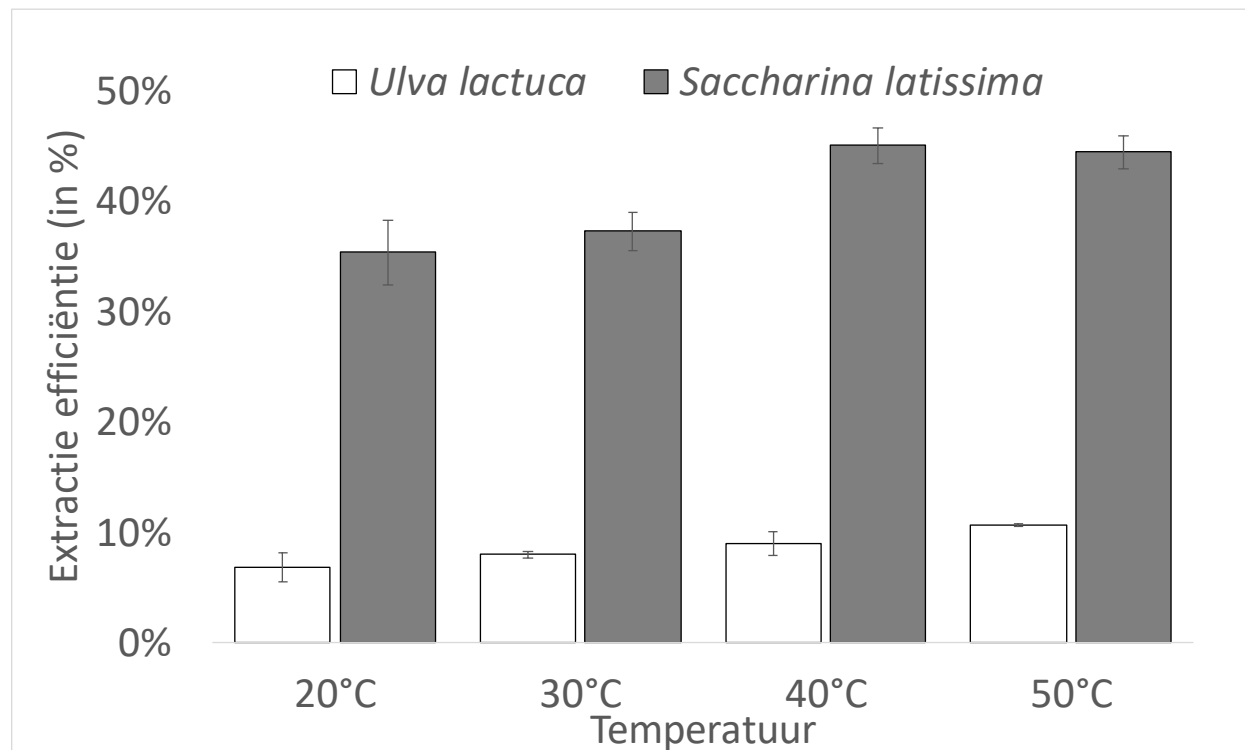


Fig. 4: Het effect van temperatuur op de eiwitextractie-efficiëntie van gevriesdroogde *U. lactuca* en *S. latissima*. De extractie duurde 1 uur op een schudtafel bij 140 RPM met een droge biomassa tot 0.1 M NaOH oplossing ratio van 1:20. Elke kolom is een weergave van het gemiddelde $\pm$ SD waarbij $n=3$.

Uit de resultaten van de temperatuur proef in Figuur 4 is te zien dat een toename in temperatuur leidt tot een hogere eiwitextractie-efficiëntie voor zowel *U. lactuca* als *S. latissima*. Voor *S. latissima* ligt het optimum op 40°C en is er geen verdere toename bij 50°C, voor *U. lactuca* neemt de eiwitextractie-efficiëntie nog toe tot 50°C. Omdat er geen afname is voor de extractie efficiëntie van *S. latissima* hebben we aangenomen dat 50°C een efficiënte temperatuur is voor een eiwit extractie op zeewier biomassa.

Voor de proeven met voorbehandeling en soort is aangenomen dat een extractie in een oplossing van 0.1 M NaOH bij 50°C een optimale eiwitextractie-efficiëntie is om zoveel mogelijk eiwit in het supernatant opgelost te krijgen.

2.3 Effect van voorbehandeling en soort zeewier

Zoals te zien is bij de pH en temperaturen proeven met *U. lactuca* en *S. latissima*, kan het gebruikte zeewiersoort veel invloed hebben op het hoeveelheid eiwit dat wordt geëxtraheerd. Met *U. lactuca* zijn op kleinere schaal vergelijkbare proeven uitgevoerd met vers en bevroren biomassa met een aanzienlijk hogere eiwitextractie-efficiëntie als resultaat vergeleken met het gevriesdroogde zeewier uit de hiervoor beschreven proeven. Om te testen wat het effect van soort en voorbehandeling is, zijn 4 soorten zeewier op 4 verschillende manieren geconserveerd. Voor dit experiment is gekozen voor *U. lactuca*, gekweekt op Texel bij het NIOZ zeewiercentrum, *S. latissima*, geoogst uit het wild in juni 2018 uit Oban, Schotland, *A. nodosum*, geoogst uit het wild in maart 2018 bij Breezanddijk en *C. crispus*, geoogst uit het wild in mei

2018 uit de Oosterschelde. Vers verzameld zeewier is binnen 24 uur gewassen met kraanwater om zand en ander vuil te verwijderen. Het gewassen wier is vervolgens met een gehaktmolen vermalen tot een homogene pulp (zie Figuur 5 voor een voorbeeld). Deze pulp is vervolgens op vier verschillende manieren geconserveerd, namelijk bevroren, gevriesdroogd en gedroogd in de lucht bij 40°C en 70°C. Daarnaast is er binnen 24 uur na het oogsten een extractie uitgevoerd op vers vermalen en gehomogeniseerd zeewier. Op het verse wier is zowel de geoptimaliseerde als de controle extractie uitgevoerd. Bij de **geoptimaliseerde extractie** wordt de pulp opgelost in een 0.1 M NaOH oplossing met een droge biomassa tot water verhouding van 1:30 (*C. crispus* bleef bij 1:20 te viskeus om goed te scheiden, waardoor gekozen is voor 1:30) en vervolgens 5 minuten gemixt met een T25 Ultra-Turrax® Disperser bij 24000 RPM, deze oplossing is vervolgens één uur geschud op een schudtafel bij 140 RPM bij 50°C. Na één uur is het extract gecentrifugeerd. Om te controleren of het verhogen van de pH en temperatuur inderdaad de eiwitextractie-efficiëntie verhoogt, is **alleen op de verse biomassa** nog een controle extractie uitgevoerd. Deze **controle extractie** is hetzelfde als de geoptimaliseerde extractie maar dan zonder het verhogen van de pH en temperatuur, deze extractie is uitgevoerd met gedemineraliseerd water bij kamertemperatuur. Alle proeven zijn uitgevoerd in triplo.

Van het zeewier voor extractie en de pellet en het supernatant na extractie, zijn het DW gehalte en eiwit percentage bepaald zoals beschreven bij de pH en temperatuur proeven hierboven. Met deze waarden zijn de eiwitextractie-efficiëntie van het supernatant, het geëxtraheerde eiwit percentage in de pellet en de eiwitconcentratie van zowel het supernatant als de pellet bepaald.



Fig. 5: Voorbeeld van (1) verse *U. lactuca* (2) verpulpt met een gehaktmolen en vervolgens in dit geval (3) gevriesdroogd als voorbehandeling voor de eiwit extractie.

Alle proeven zijn uitgevoerd in triplo. IBM SPSS Statistics software is gebruikt om meerdere one-way analysis of variance (ANOVAs) uit te voeren om te testen of voorbehandeling en eiwitconcentratie per soort verschillend zijn voor de supernatanten en pellets. Als er een significant verschil werd gevonden is een Tukey's post-hoc test gebruikt om significantie verschillen ($p < 0,05$) tussen behandelingen te vinden.

Voorbehandelingen en extractiemethoden:

- Fresh control* - Verse biomassa binnen 24 uur na oogsten geëxtraheerd met de controle extractie methode.
- Fresh* - Verse biomassa binnen 24 uur na oogsten geëxtraheerd met de geoptimaliseerde extractie methode.
- Frozen* - Bevroren biomassa bij -20°C geëxtraheerd met de geoptimaliseerde extractie methode. De bevroren biomassa is eerst weer volledig ontdooid voordat de extractie begon.
- Freeze dried* - Bevroren biomassa is 72 uur gevriesdroogd in een Martin Christ Alpha 2-4 LD plus vriesdroger en vervolgens geëxtraheerd met de geoptimaliseerde extractie methode.
- Air dried 40°C* - Verse biomassa is 72 uur gedroogd bij 40°C en vervolgens geëxtraheerd met de geoptimaliseerde extractie methode.
- Air dried 70°C* - Verse biomassa is 48 uur gedroogd bij 70°C en vervolgens geëxtraheerd met de geoptimaliseerde extractie methode.

Gekeken naar het verschil tussen *Fresh control* en *Fresh*, leidde het verhogen van de pH en temperatuur bij alle 4 geteste soorten tot een hogere eiwitextractie-efficiëntie (zie Figuur 6).

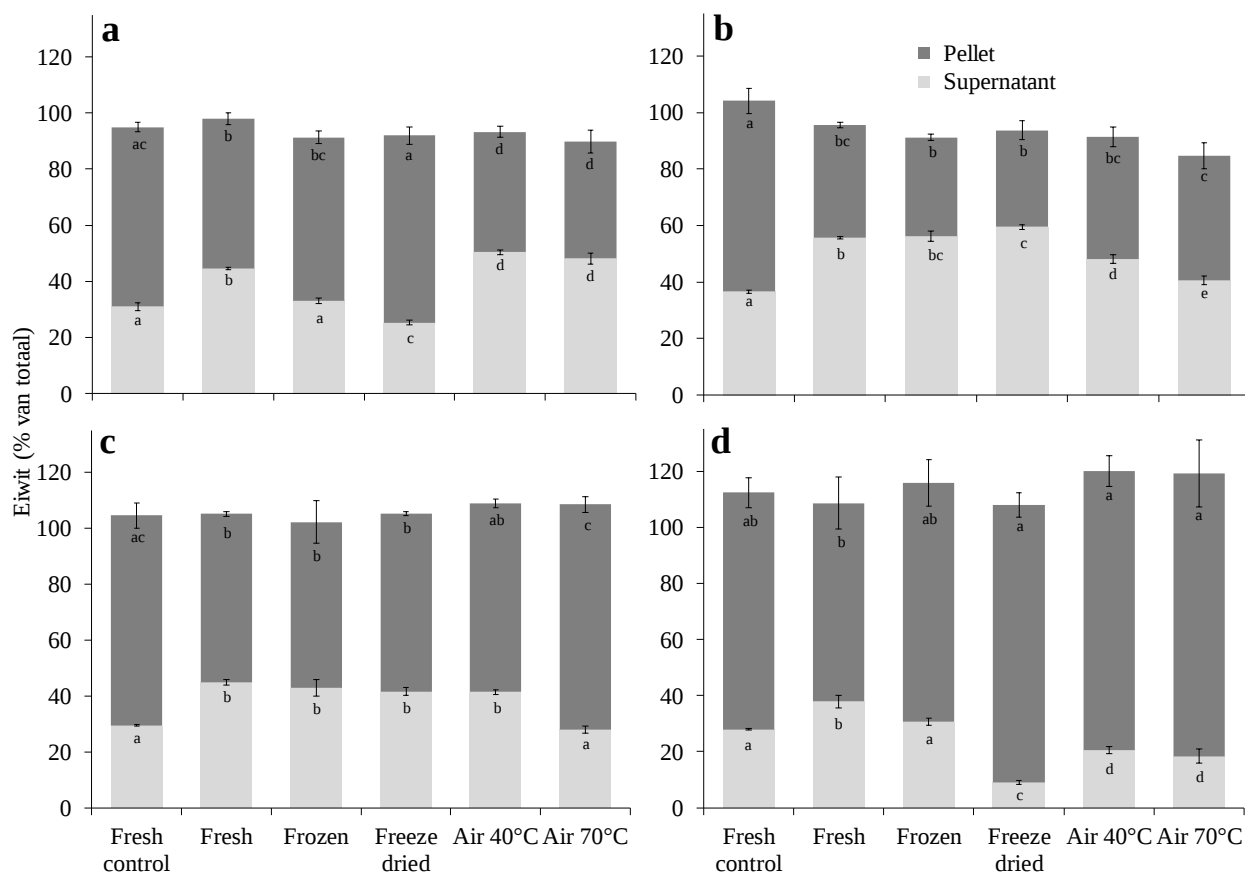


Fig. 6: Het totale percentage eiwit in zowel het supernatant (lichtgrijze balken) als de pellet (donkergrijze balken) verkregen uit de gehomogeniseerde pulp na extractie met 6 voorbehandeling/extractie methoden combinaties op de soorten (a) *C. crispus*, (b) *A. nodosum*, (c) *S. latissima* en (d) *U. lactuca*. Elke kolom is een weergave van het gemiddelde $\pm$ SD waarbij $n=3$. Kolommen met dezelfde letters per soort (pellet of supernatant) zijn niet significant verschillend van elkaar, getest met een one-way ANOVA ($p < 0.05$).

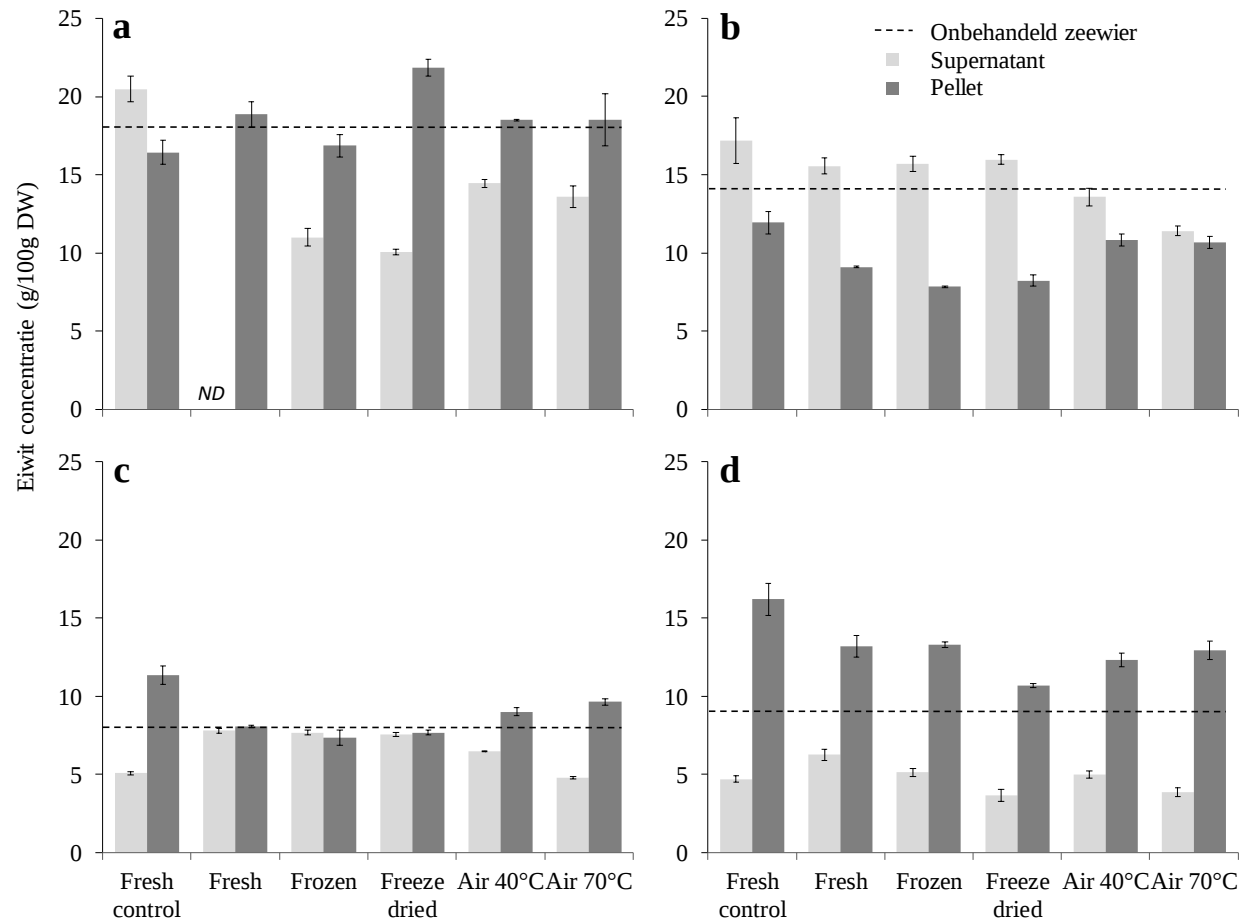


Fig. 7: De eiwitconcentratie in zowel het supernatant (lichtgrijze balken) als de pellet (donkergrijze balken) vergeleken met de gehomogeniseerde pulp (stippellijn) na extractie met 6 voorbehandeling/extractie methoden combinaties op de soorten (a) *C. crispus*, (b) *A. nodosum*, (c) *S. latissima* en (d) *U. lactuca*. Fresh *C. crispus* had onvoldoende supernatant en kon niet worden gedetermineerd (ND). Elke kolom is een weergave van het gemiddelde $\pm$ SD waarbij $n=3$. Een kolom met een * heeft een significant andere eiwit concentratie dan de gehomogeniseerde pulp, getest met een one-way ANOVA ($p<0.05$).

Voorbehandeling had bij alle 4 geteste soorten invloed op de eiwitextractie-efficiëntie. De voorbehandeling die leidde tot de hoogste eiwitextractie-efficiëntie was Air dried 40°C bij *C. crispus*, Freeze dried bij *A. nodosum* en Fresh bij *S. latissima* en *U. lactuca*. Over het algemeen gaf verse biomassa bij alle soorten een hoge eiwitextractie-efficiëntie. Daarnaast had een hoge droog temperatuur (Air dried 70°C vergeleken met Air dried 40°C) een negatief effect op de eiwitextractie-efficiëntie. Zoals ook al tijdens de pH proef bleek, had vriesdrogen een negatief effect op de eiwitextractie-efficiëntie van *U. lactuca*, evenals die van *C. crispus*. Daarentegen had Freeze dried *A. nodosum* de allerhoogste eiwitextractie-efficiëntie van alle soorten en behandelingen met bijna 60% van het eiwit in het supernatant. Concluderend lijkt *A. nodosum* het beste geschikt te zijn voor eiwitextractie en *U. lactuca* het minste met de laagste eiwit opbrengsten in het supernatant.

Gekeken naar de pellet is de geschiktheid logischerwijs andersom, bij *U. lactuca* bleef verreweg het meest eiwit in de pellet over en bij *A. nodosum* was slechts een klein deel van het eiwit over in de pellet, behalve bij de Fresh control. *C. crispus* en *S. latissima* zaten hier tussen in, waarbij *C. crispus* gevoeliger lijkt voor voorbehandeling dan *S. latissima* waar alleen het drogen bij een hoge temperatuur de eiwitextractie-efficiëntie verlaagde.

Behalve het percentage eiwit dat naar het supernatant of de pellet gaat is het interessant om te zien wat er gebeurde met de eiwitconcentratie in beide producten. Figuur 7 laat de eiwitconcentratie van

zowel het supernatant als de pellet zien vergeleken met de eiwitconcentratie van het onbehandelde zeewier, de gehomogeniseerde pulp voor extractie. Waardes die boven de stippellijn uitkomen hebben een verhoogde eiwitconcentratie vergeleken met de gehomogeniseerde pulp en waardes die er onder komen een afgenomen eiwitconcentratie.

De hoogste eiwitconcentratie werd gevonden in de pellet van de gevriesdroogde *C. crispus* met 21,9 g eiwit /100g DW. Qua toename valt dit relatief mee aangezien de eiwitconcentratie in de gehomogeniseerde pulp al hoog was met 18,1 g eiwit /100g DW. Net als de hoogste eiwitextractie-efficiëntie zijn de extracten van *A. nodosum* ook grotendeels toegenomen in eiwitconcentratie (vers, bevroren en gevriesdroogd). Er komt dus veel eiwit in het supernatant én de eiwitconcentratie vergeleken met de gehomogeniseerde pulp gaat omhoog. De eiwitconcentratie van rond de 16 g eiwit /100g DW is nog relatief laag maar deze vloeistof kan nog geconcentreerd worden met bijvoorbeeld pH geassisteerde uitvloeking (Vilg and Undeland 2017) of membraanfiltratie (Kadam et al. 2016) om zo de eiwitconcentratie te verhogen. Een nadeel is dat er weer een extra stap in het proces nodig zou zijn, wat de kosten verhoogt en bij beide methoden zal een deel van het opgeloste eiwit verloren gaan, niet 100% van het opgeloste eiwit vlokt uit of wordt geconcentreerd met membraanfiltratie.

Bij *U. lactuca* ging de eiwitconcentratie van alle supernatanten omlaag, maar die van alle pellets waren hoger vergeleken met de gehomogeniseerde pulp. In de pellet van het verse zeewier geëxtraheerd met de controle extractie methode is de concentratie zelfs toegenomen van 9,1 g eiwit /100g DW naar 16,2 g eiwit /100g DW, een toename van 78%, dit terwijl 85% van het eiwit in de pellet achter blijft. Daarnaast had de *U. lactuca* gebruikt in dit onderzoek een relatief lage eiwitconcentratie vergeleken met waardes uit de literatuur van rond de 20 g eiwit /100g DW (Shuuluka et al. 2013; Harrysson et al. 2018). Er van uit gaande dat bij een hogere eiwitconcentratie in de gehomogeniseerde pulp ook leidt tot een 78% toename in eiwitconcentratie zou bij *U. lactuca* biomassa met 20 g eiwit /100g DW een pellet kunnen ontstaan met 35,6 g eiwit /100g DW op een relatief eenvoudige en goedkope manier. Op een vergelijkbare manier laten Magnusson et al. (2019) een toename zien van 16,0 g eiwit /100g DW naar een verrijkte pellet met 31,5 g eiwit /100g DW, een toename in de eiwitconcentratie van 95%.

Deze resultaten laten zien dat zowel soort als voorbehandeling een groot effect kunnen hebben op de eiwitextractie-efficiëntie en eiwitconcentratie van de verschillende producten. Waarbij de ene soort vooral het supernatant potentie heeft als eiwitbron, is voor het andere soort de overgebleven pellet interessanter. Dit kan grote gevolgen hebben voor iedereen die met zeewier biomassa werkt. Er wordt daarom ook sterk aangeraden van te voren goed te kijken met welk soort gewerkt wordt en welke extractiemethode en voorbehandeling hiervoor geschikt zijn.

3. Opschaling

3.1 Membraanfiltratie

Tijdens het ZEEVIVO project is parallel aan de optimalisatie proeven begonnen met het opschalen van de eiwit extractie uit zeewier. Bij de start van ZeeViVo in 2015 werd bij Huiberts Biologische Bloembollen in Sint Maartensvlotbrug een raffinage unit gebouwd naar een ontwerp van Danvos BV te Opperdoes. Huiberts investeerde in productie ruimte en de benodigde infra structuur. Voor de procesapparatuur werd het project mede ondersteund door een subsidie van de Provincie Noord-Holland. In de periode 2016 tot en met 2019 was de productie unit in gebruik voor het project ZeeViVo. De eerste twee jaar van het ZEEVIVO project waren bestemd om voldoende eiwitgrondstof (100-200 kilo) te produceren met minimaal 60% eiwit op DW basis voor werkpakket C, *Visteelt*.

Zoals te zien is bij de extractie optimalisatie proeven, betekent een hoge eiwitextractie-efficiëntie niet altijd een hoge concentratie eiwitten in het supernatant. Om de eiwitconcentratie van een oplossing te verhogen kan gebruikt gemaakt worden van een membraanopstelling. Opgeloste stoffen worden, vaak onder druk, gescheiden op basis van grootte. De grotere delen gaan door het membraan terwijl de kleinere opgeloste stoffen door het membraan naar het permeaat gaan. Door de geconcentreerde oplossing continu door het membraan te laten lopen wordt de vloeistof ingedikt en het eiwit in theorie geconcentreerd (zie Figuur. 8).

Er zijn veel verschillende membranen met verschillende porie-grote, afhankelijk van de opgeloste stoffen die gescheiden moeten worden. Voor dit project is gebruikt gemaakt van een spiraalgewonden ultrafiltratie membraan met een porie-grootte van 10 kilo dalton. Het idee is dat de meeste opgeloste eiwitten uit zeewier hiermee in het concentraat blijven, terwijl opgeloste suikers en mineralen uitgespoeld worden. Zie Figuur 9 voor de gebruikte opstelling.

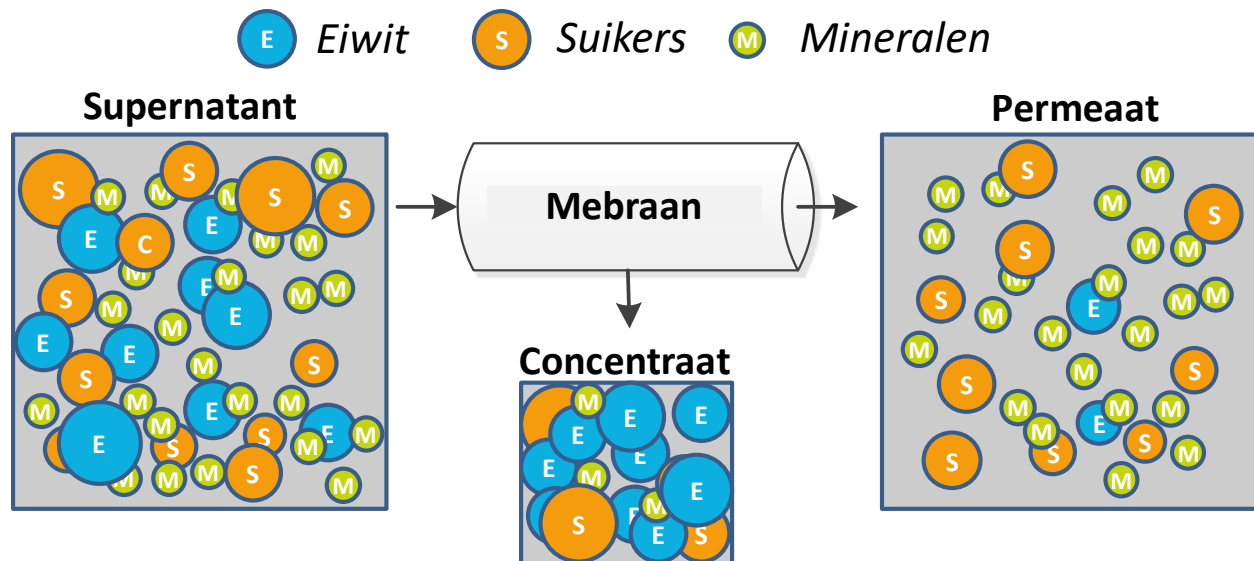


Fig. 8: Schematische weergave van de membraanfiltratie. Het supernatant wordt door het membraan geleid, waarbij de kleinere opgeloste stoffen als mineralen en suikers door het membraan gaan naar het permeaat en de eiwitten in het concentraat blijven. Door continu het concentraat door het membraan te laten lopen worden de eiwitten in theorie tegelijkertijd gepurificeerd en geconcentreerd. Een 100% scheiding is meestal onmogelijk omdat sommige eiwitten gebonden zijn aan suikers of omdat sommige eiwitten, suikers en mineralen dezelfde grootte hebben.

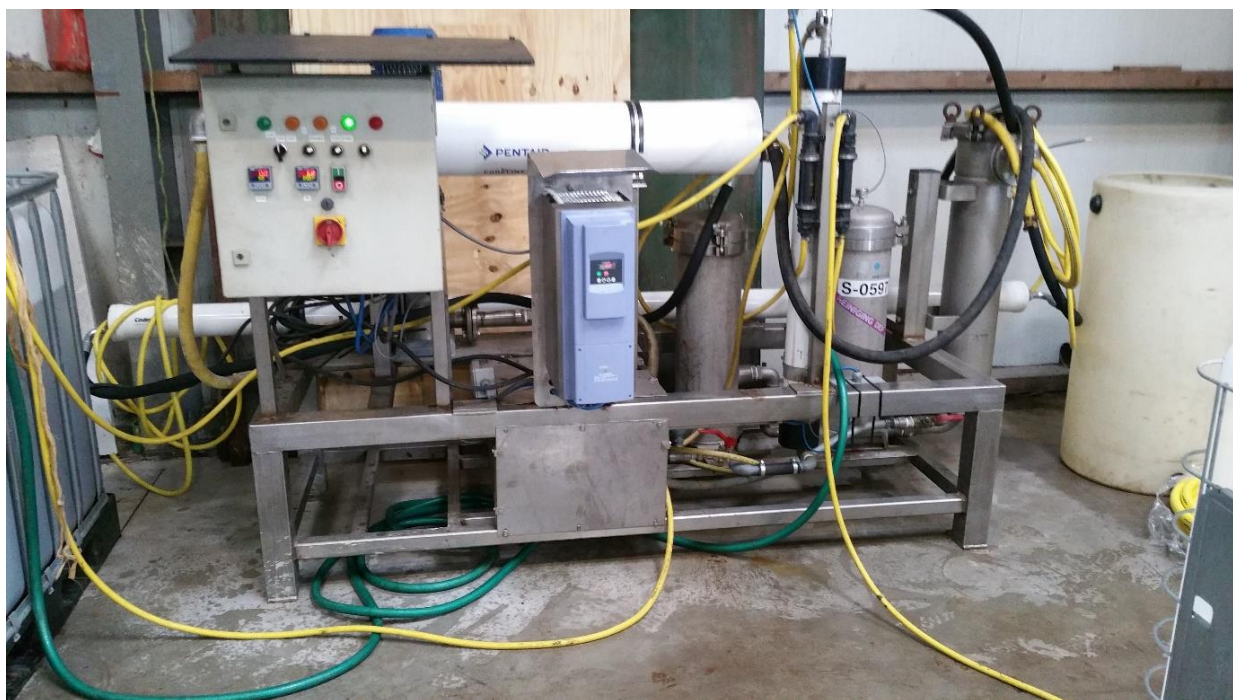


Fig. 9: De ultrafiltratie membraan opstelling in Sint Maartensvlotbrug bij Danvos B.V..

3.2 Grootschalige eiwitextractie en concentratie

In tegenstelling tot het laboratorium bij VHL in Leeuwarden, waar met honderden milliliters tot enkele liters extract gewerkt kon worden, had de pilot installatie bij Danvos B.V. de mogelijkheid om met enkele honderden liters tot enkele duizenden liters extract te werken. De beperkende factor was het verkrijgen van voldoende zeewier biomassa van goede kwaliteit. Om 100-200 kilo eiwitpoeder met tenminste 60% eiwit te verkrijgen zijn enorme hoeveelheden zeewier nodig. Met een gemiddelde eiwitextractie-efficiëntie van 50%, 10-20% eiwit in droog zeewier en een DW gehalte van vers zeewier van ongeveer 10-20%, is 5.000 tot 20.000 kilo zeewier nodig voor 100 kilo eiwit, waarbij de concentratie stap om tot een eiwit concentratie van 60% te komen nog niet is meegenomen in de berekening. Vissers uit het netwerk van een van de partners hebben in de zomer van 2017 meer dan duizend kilo *U. lactuca* verzameld en naar Sint Maartensvlotbrug gebracht. Dit is vervolgens met de hand uitgelegd en gedroogd in de zon, aangezien de opstelling niet direct beschikbaar was voor extractie.

Gezien de resultaten uit de optimalisatieproeven is ook op grote schaal een extractie uitgevoerd met verhoogde pH en temperatuur op de gedroogde *U. lactuca* biomassa (vers had de voorkeur gehad maar was niet mogelijk). In totaal is 200 kilo gedroogde *U. lactuca* met een DW gehalte van 75,7% en een eiwit concentratie van 11,6 g eiwit /100g DW (23,2 kg eiwit totaal) geëxtraheerd bij ongeveer 50°C met verhoogde pH van ongeveer 11. Dit heeft een dag gestaan onder constant roeren, waarna de niet opgeloste biomassa is verwijderd en een supernatant met opgeloste stoffen overbleef. Van het aanwezige eiwit was 14,3% opgelost in het supernatant, dit is de eiwitextractie-efficiëntie. Dit supernatant had een eiwit concentratie van 9,3 g eiwit /100g DW (3,3 kg eiwit totaal), iets lager dan de eiwit concentratie van de gedroogde biomassa, en een vergelijkbaar resultaat als verkregen met de optimalisatieproeven in het laboratorium. Na concentratie met de membraanfiltratie installatie bleef er een eiwitconcentraat over met een eiwit concentratie van 31,2 g/100g DW eiwit (1,6 kg eiwit totaal), de rest van het eiwit is teruggevonden in het permeaat met een eiwitconcentratie van slechts 7,1 g eiwit /100g DW (1,7 kg eiwit totaal).

Zeewier biomassa met een eiwit concentratie van 9,3 g eiwit /100g DW is met dit proces opgewaardeerd naar een oplossing met een eiwitconcentratie van 31,2 g eiwit /100g DW, meer dan

300% toename. De eiwitextractie-efficiëntie was relatief laag. Er was 200 kg gedroogd zeewier nodig voor slechts 1,6 kg eiwit als eindproduct. Ook was het niet mogelijk om tot een eiwitconcentratie van 60% te komen die nodig was voor het vervangen van de eiwitcomponent in het voer van kweekvis. Eind 2017 is daarom besloten om werkpakket B los te koppelen van werkpakket C. In werkpakket B is besloten om meer te focussen op verdieping in de extractie (proeven voorbehandeling, soort en pellet) en op grote schaal te kijken naar betere scheiding van niet opgeloste biomassa en supernatant en alternatieve extractiemethoden. Werkpakket C is mede hierdoor verder gegaan met proeven met tilapia in plaats van regenboogforel. Tilapia heeft een lagere eiwitbehoefte en daardoor kan een grondstof uit zeewier van boven de 35% eiwit voldoende zijn om bijvoorbeeld soja te vervangen.

Als de toelevering van voldoende kwalitatief hoogwaardig zeewier geen probleem zou zijn, was het haalbaar om een eiwitbron uit zeewier te extraheren met een concentratie van tenminste 35% en wellicht 60% eiwit. Als er een stabiele bron van verse *U. lactuca* met 20 g eiwit /100g DW beschikbaar was had de pellet, net als de proef met 200 kilo gedroogde *Ulva*. Een opwaardering van de eiwitconcentratie met 300% doormiddel van extractie en ultrafiltratie zou in theorie een eiwitcomponent van 60% uit zeewier kunnen worden verkregen. Er zou dan alleen nog steeds erg veel zeewier nodig zijn voor relatief weinig eiwit. Een andere mogelijkheid zou zijn om de zeewier biomassa, vooral *U. lactuca*, uit te spoelen en te focussen op de pellet. Zoals in vorig hoofdstuk berekend zou er bij zeewier, dat al 20 g eiwit /100g DW bevat, na de extractie 35,6 g eiwit /100g DW in de pellet zitten wat als goede eiwitbron had kunnen dienen voor de voerproeven van werkpakket C.

3.3 Circulaire productie op basis van zeewier

Tijdens het ZEEVIVO project hebben Danvos en Huiberts een circulair proces ontworpen en getest voor de verwerking van zeewier. Het proces is zo ingericht dat het eenvoudig op locatie te gebruiken is zodat het relatief zware zeewier niet te ver vervoerd hoeft te worden. Het raffinage proces leent zich zo voor decentrale en eventuele mobiele (varende) inzet in de nabijheid van locaties waar zeewier wordt gekweekt en waar op het achterland afzet is voor de voedingsstoffen, meststoffen en water. Het proces is gevalideerd door analyses van de raffinage producten in het laboratorium van VHL en door een 3e laboratorium (Nutralab). De focus lag in het ZEEVIVO project vooral op de eiwitcomponent, maar Danvos B.V. heeft naast het project ook nog gekeken naar het geven van meerwaarde aan de overige stromen, zoals de pellet na eiwit extractie (bouwmateriaal, grondverbeteraar, veevoer) en de opgeloste suikers en mineralen (bio-plastic, biologische biostimulant). Deze reststromen kunnen ook waarde hebben en moeten zeker niet over het hoofd gezien worden wanneer er gekeken wordt naar de mogelijke opbrengst van eiwit uit zeewier. Figuur 10 laat een schematische weergave zien van de extractie en concentratiestap met de eiwitstroom maar ook pellet en mineralen en suikers.

De producten die verkregen worden tijdens het proces zijn:

1. Een vloeibaar concentraat dat rijk is aan eiwitten, koolhydraten, vetten en celstof. Uit de zeewier grondstof wordt ca. 85% van de zouten tijdens de raffinage verwijderd en worden de andere componenten met een factor 2 tot 4 geconcentreerd. De producten hebben een hoge voedingswaarde met potentieel voor de vervanging van dierlijke en plantaardige grondstoffen in voedingsmiddelen, diervoeders (waaronder visvoer). Het vloeibare product is met beschikbare technologie uitstekend tot een poeder te verwerken.
2. Een mineraal rijk concentraat met 'biostimulanten' voor agrarische toepassingen. Testen op diverse gewassen, waaronder bloembollen werden over meerdere seizoenen uitgevoerd. De resultaten zijn veelbelovend en kunnen kunstmest volledig overbodig maken. Huiberts past het product toe op het eigen biologische bollenbedrijf en is reeds een bescheiden commerciële productie gestart.
3. Biopolymeer uit de rest pulp na extractie van eiwitten en mineralen. Met dit product in droge vorm zijn met succes bio-plastics en filamenten gemaakt. Toepassingen zijn al beschikbaar voor 3

D printen en spuitgieten van plastics. De plastics zijn volledig composteerbaar. Commerciële partijen hebben al interesse getoond.

4. Zoet water als 'product'. Na concentratie en ontwateren van het natte zeewier (85% water) wordt het water volledig hergebruikt in het proces en er blijft per saldo water over. Voor droge gebieden is dit zeker in combinatie met de minerale fractie interessant voor de landbouw.

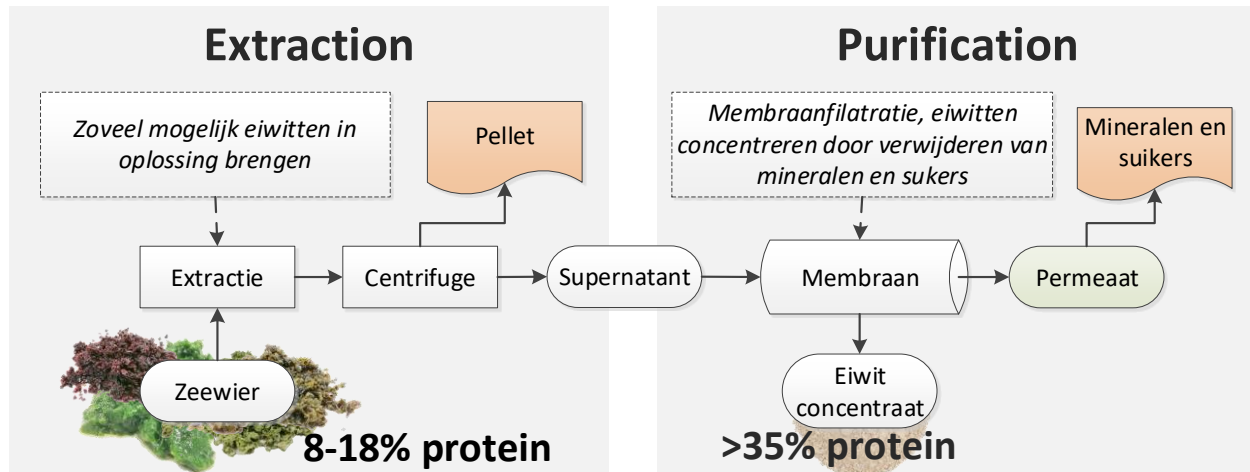


Fig. 10: Schematische weergave van extractie en concentratie van eiwitten uit zeewier. Het zeewier met 10-20% eiwit wordt eerst geëxtraheerd waarbij er zo veel mogelijk eiwit wordt opgelost in het supernatant. Dit supernatant wordt vervolgens door de membraanfiltratie installatie geperst waardoor een eiwitconcentraat ontstaat met hopelijk meer dan 35% eiwit zodat het als hoogwaardig eiwit kan worden afgezet. De overgebleven pellet en mineralen en suikers kunnen weer gebruikt worden als grondstof voor andere producten zoals biopolymeer of biostimulant.

4. Conclusies

De conclusies van het werk uitgevoerd in werkpakket B: “Zeewierraffinage” als onderdeel van het project ZEEVIVO kunnen als volgt worden samengevat:

- Een verhoogde temperatuur en pH hebben een positief effect op de hoeveelheid opgeloste eiwitten uit zeewier biomassa.
- Voorbehandeling zoals invriezen, vriesdrogen en lucht drogen kunnen grote invloed hebben op de hoeveelheid eiwit die geëxtraheerd kan worden.
- Elk soort zeewier reageert anders op voorbehandeling, het is dus van groot belang om dit duidelijk te hebben voor elk soort waarmee gewerkt wordt in de industrie maar ook in onderzoek.
- Met een relatief eenvoudige extractie kan tot bijna 60% van het eiwit uit de zeewier biomassa in oplossing worden gebracht.
- De eiwitconcentratie in het supernatant na extractie moet nog verder worden gezuiverd om tot een eiwitconcentratie te komen die geschikt is als eiwitcomponent in visvoer.
- De overgebleven pellet na extractie heeft ook potentie als geconcentreerde eiwitbron. Bij *U. lactuca* bleef 85% van het totale eiwit na extractie in de pellet terwijl de eiwitconcentratie met 78% was toegenomen.
- De zeewier-eiwitextractie resultaten en methoden op laboratorium schaal zijn goed te vertalen naar een pilot opstelling.
- Zeewier (zowel vers als geconserveerd) kan grootschalig industrieel verwerkt worden in een volledig circulair proces.
- Met behulp van membraanfiltratie is het mogelijk om de eiwitconcentratie van een supernatant met meer dan 300% te verhogen.
- Het raffinage proces leent zich voor decentrale en eventuele mobiele (varende) inzet in de nabijheid van locaties waar zeewier wordt gekweekt en waar op het achterland afzet is voor de voedingsstoffen, meststoffen en water.

5. Dankwoord

De auteurs willen graag Jordan Aalbers, Anouk Peters, Cornelis Lont, Jasper Dijkstra, Jeroen Spruit en Tristan Speerstra bedanken voor hun inzet als stagiair tijdens het project en de Noordzeeboerderij voor het beschikbaar stellen van *Saccharina latissima* voor het uitvoeren van een deel van de proeven. Dit onderzoek is medegefinancierd door Regieorgaan SIA, onderdeel van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO)

6. Literatuur

- Angell AR, Mata L, de Nys R, Paul NA (2016) The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *J Appl Phycol* 28:511–524. doi: 10.1007/s10811-015-0650-1
- Angell AR, Paul NA, de Nys R (2017) A comparison of protocols for isolating and concentrating protein from the green seaweed *Ulva ohnoi*. *J Appl Phycol* 29:1011–1026. doi: 10.1007/s10811-016-0972-7
- Fleurence J, Le Coeur C, Mabeau S, et al (1995) Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *J Appl Phycol* 7:577–582. doi: 10.1007/BF00003945
- Harnedy PA, FitzGerald RJ (2013) Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT - Food Sci Technol* 51:375–382. doi: 10.1016/j.lwt.2012.09.023
- Harrysson H, Hayes M, Eimer F, et al (2018) Production of protein extracts from Swedish red , green , and brown seaweeds , *Porphyra umbilicalis* Kützinger , *Ulva lactuca* Linnaeus , and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J . V . Lamouroux using three different methods. *J Appl Phycol* 30:3565–3580
- Kadam SU, Avarez C, Tiwari BK, O'Donnell CP (2016) Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Food Res Int* 99:1021–1027. doi: 10.1016/j.foodres.2016.07.018
- Kazir M, Abuhassira Y, Robin A, et al (2019) Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocoll* 87:194–203. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.047
- Kjeldahl J (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z Anal Chem* 22:366–382. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01338151>
- Magnusson M, Glasson CRK, Vucko MJ, et al (2019) Enrichment processes for the production of high-protein feed from the green seaweed *Ulva ohnoi*. *Algal Res* 41:101555. doi: 10.1016/j.algal.2019.101555
- Shuuluka D, Bolton JJ, Anderson RJ (2013) Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *J Appl Phycol* 25:677–685. doi: 10.1007/s10811-012-9902-5
- Vilg JV, Undeland I (2017) pH-driven solubilization and isoelectric precipitation of proteins from the brown seaweed *Saccharina latissima*—effects of osmotic shock, water volume and temperature. *J Appl Phycol* 29:585–593. doi: 10.1007/s10811-016-0957-6
- Wong K, Cheung PC (2001a) Influence of drying treatment on three *Sargassum* species 2. Protein extractability, in vitro protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *J Appl Phycol* 13:51–58
- Wong KH, Cheung PCK (2001b) Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. In vitro protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food Chem* 72:11–17. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00176-X