



**LUNDS**  
UNIVERSITET

**Institutionen för Livsmedelsteknik**

---

# **Hur påverkas rapsmassa av fermentering med mjölksyrabakterier?**

---

**Jim Nielsen, Mats Pegert och Kornelius Åxman**

Examensarbete för högskoleexamen

i livsmedelsteknik, 15 hp

2017

Examinator: PhD Karolina Östbring

Handledare: MSC Elin Oscarsson

Företag: Gunnarshögs gård, Erik Nilsson

## **Abstract**

When coldpressing rapeseeds in extraction of rapeseed oil, there becomes a pomace called rapeseed press rest. This rapeseed press rest has high protein content and an amino acid composition better than most other vegetables. Hopefully, rapeseed press rest can be used in future food production.

Rapeseed contains a high level of antinutrients in the form of glucosinolates, phenolic compounds and phytic acid accumulate in the rapeseed after pressing. Several of these substances contribute to a bitter taste, dark color and give the rapeseed press rest its antinutritional properties.

From the rapeseed press rest, a rapeseed mass alike “Skyr”(a thick Icelandic yogurt) is produced. The rapeseed mass was heat treated for the purpose of killing pathogens. To eliminate bitter taste and make the product more nutritional, the rapeseed mass was fermented with lactic acid bacteria with a high enzyme activity. Three different strains of *Lactobacillus plantarum* were used in combination with standard yogurt culture.

The result of fermentation was successful with the correct heat treatment.

Analysis made during the course were pH, protein content, water content, viscosity, microbiological activity and taste in sensory analysis.

## Sammanfattning

Vid kallpressning av oljerika rapsfrön för att utvinna rapsolja blir det en pressrest kallad rapsfrökaka. Denna rapskaka har en hög proteinhalt och en aminosyrasammansättning bättre än flertalet andra vegetabilier. Förhoppningen är att detta kan utnyttjas i framtida livsmedelstillverkning.

Raps innehåller en hög halt antinutrientier i form av glukosinolater, fenolföreningar och fytinsyra som efter pressning ansamlas i rapskakan. Flertalet av dessa ämnen bidrar till en bitter smak, mörk färg och ger massan dess antinutritionella egenskaper.

Från rapsfrökakan produceras en rapsmassa tänkt att bli ett skyrliknande livsmedel. Rapsmassan värmebehandlades i syfte att avdöda eventuella patogener. För att eliminera bitter smak och få produkten mer nutritionell så fermenteras rapsmassan med mjölksyrabakterier med hög enzymaktivitet. Tre olika stammar av *Lactobacillus plantarum* användes i kombination med standard yoghurtkultur.

Resultatet av fermenteringen blev lyckad vid rätt värmebehandling.

Under arbetets gång analyserades pH, proteinhalt, vattenhalt, viskositet, mikrobiologisk aktivitet samt smak vid sensoriska analyser.

## Förord

Vi är tre elever som studerar på Lunds universitet och läser livsmedelsteknisk högskoleutbildning. Det är en tvåårig utbildning på heltid som innefattar 120 högskolepoäng. Examensarbetet är en del av utbildningen och motsvarar 15 högskolepoäng. Syftet med detta projekt var att minska halten utav antinutrientier i rapsmassa som ger en oönskad bitter smak samt att få en mikrobiellt säker produkt. Arbetet innehåller inte en exakt beskrivning på hur rapsmassan producerades. Vissa mikroorganismer som användes vid fermenteringen nämns inte vid sina fulla namn.



*Bildkälla: Jim Nielsen*

Bild 1: Bilder från projektet

Vi vill tacka Elin Oscarsson, Karolina Östbring, Åsa Håkansson, Zishan Chaudhry, Ia Rosenlind, Hans Bolinsson, Dan Johansson, Charlott Håkansson och Erik Nilsson för all hjälp med vårt projekt.

## Innehållsförteckning

1	Inledning.....	6
1.1	Bakgrund .....	6
1.2	Antinutrierter i rapskaka .....	8
1.3	Mjölksyrafermentering .....	9
1.4	Värmebehandling .....	11
1.5	Bakteriell tillväxtkurva.....	11
1.6	Syfte .....	12
1.7	Uppgift .....	13
2	Metodik .....	14
2.1	Litteraturstudier .....	14
2.2	Måldokument och slabbförsök .....	14
2.3	Framställning av rapsmassa.....	14
2.4	Värmebehandling och provtagning .....	15
2.5	Agarplattor och spädserier.....	15
2.6	Fermentering .....	16
2.7	Reologi .....	17
2.8	PCR och gelelektrofores.....	17
2.9	Proteinanalys .....	19
2.10	Vattenhalt .....	20
2.11	Analys av glukosinolater .....	20
2.12	Sensorik analys.....	20
3	Resultat.....	21
3.1	Proteinanalys .....	21
3.2	Värmebehandling .....	21
3.3	Fermentering .....	22
3.4	Vattenhalt .....	23
3.5	Sensorisk analys .....	24
3.6	Reologi .....	24
3.7	DNA-analys via PCR .....	25
4	Diskussion .....	26
4.1	Proteinhalt .....	26
4.2	Reologitest.....	26
4.3	Värmebehandling .....	26
4.4	Fermentering .....	27
4.5	Sensorisk analys .....	28
4.6	DNA-analys via PCR .....	28
5	Slutsats .....	30

6	Felkällor .....	31
7	Referenser.....	32
8	Bilagor .....	34

# 1 Inledning

## 1.1 Bakgrund

Raps (*Brassica napus*) är en art i familjen korsblommiga växter (bild 2) och odlas som oljeväxt. Ursprungligen har raps uppkommit som en korsning mellan kål och rova. Deras svarta frön innehåller 30–40 % olja. Rapsolja är rik på enkelomättade fettsyror vilket har bidragit till ett ökat intresse då sunda livsmedel har fått ett större fokus hos allmänheten (Lärn-Nilsson, 2017).



*Bildkälla: Jim Nielsen*

Bild 2: Bild på rapsblommor.



Vid produktion av kallpressad rapsolja blir återstoden en grön-brun-svart kaka (bild 3). Vid pressning av 3 kg frön får man ut cirka 1 liter olja och cirka 2 kg rapsfrökaka, detta beroende på huruvida det är vår-raps eller höst-raps som används. Enbart i Sverige räknar man med att det blir cirka 180 000 ton rapskaka från oljepressning (M Rayner, 2017).



*Bildkälla: Jim Nielsen*

Bild 3: Bild på rapskaka.

Rapsfrökaka har en hög proteinhalt och ett välbalanserat innehåll av aminosyror som är jämförbar med animaliska proteiner. Aminosyrasammansättningen är mer komplett än hos andra vegetabiliska proteinkällor då den har höga halter av lysin och svavelhaltigt metionin (Lärn-Nilsson, 2017). Detta gör att rapskaka har möjlighet att bli en god proteinkälla även i human kost. Se tabell 1. Proteiner från rapsfrökaka har även goda emulgerings-, skum- och gelbildande egenskaper. Rapsfrökaka används idag till djurfoder och biobränsle (Tan, 2011).



Tabell 1. Proteinhaltsjämförelse av rapsprotein och sojaprotein samt jämförelse med rekommendationerna.

Essentiella aminosyror	Rapsprotein (B. napus, cv. Altex)*	Sojaprotein (isolat)*	RDI för vuxna **
	mg/g protein	mg/g protein	mg/g protein
Isoleucin	44,7	43,5	17
Leucin	74,7	67,9	23
Lysin	66	52,3	52
Fenylalanin + Tyrosin	46,7 + 31,9	51,4 + 36,1	47
Metionin + Cystin	22,4 + 20,8	9,2 + 0,5	23
Treonin	48,1	39,8	41
Valine	56,5	42,8	24
Histidin	44,7	42,8	29
Tryptophan***	14	13	6

\* (Tan, 2011) \*\* (Abrahamsson L., 2013), \*\*\* (Ohlson, 1979)

I en estnisk studie analyserades innehållet i rapskaka där kallpressning gjordes vid 60 °C, (jämfört med Gunnarshögs gård som värmer till högst 35 °C). I denna studie hade rapsfrökakan ett proteininnehåll på 30,6 %, råfiberinnehåll på 11,2 %, fettinnehåll på 17,8 % och ett energiinnehåll på 14,5 MJ/kg (Leming R., 2005), (Gunnarshög gård, 2017).

## 1.2 Antinutrient i rapskaka

Rapsfrön innehåller olika sekundära metaboliter i form av olika fenolföreningar, dvs olika små molekyler som växten kan utnyttja som skydd mot insekter, uttorkning etc. Olika faktorer som påverkar innehållet av sekundära metaboliter är växtedel, art, klimat och odlingsbetingelser (Ullvén, 2002). Den mest dominant fenolföreningen är sinapin som är ett derivat av sinapinsyra. Den bidrar till bitter smak, mörk färg och försämrad digerbarhet (Tan, 2011).

Andra fenoler är tanniner som även är antioxidanter men de bidrar med en oönskad bitterhet. Fytinsyra finns i rapsfrökakan som mixade salter, magnesium och kalium. De kan förutom att binda till mineraler även binda till proteiner och därmed hämma mängden tillgängligt protein (Tan, 2011).

Glukosinolater är ett aromämne i raps samt i andra korsblommiga växter och förekommer i högst koncentration i frövitån. De är en grupp svavelinnehållande föreningar som fungerar som skydd mot insektsangrepp. De antinutritionella egenskaperna ökar när de inaktiva glukosinolatmolekylerna bryts ner och bildar biologiskt aktiva och mer skadliga metaboliter. Glukosinolater och dess metaboliter har en bitter smak. Via växtförädling har man sedan 1970-talet odlat s.k. dubbellåg raps med ett kraftigt reducerat innehåll av glukosinolater. Då glukosinolater ansamlas i rapsfrökakan (och inte i oljan vid pressning) så kvarstår en del av dess antinutritionella effekter (Carlsson, 2012).

Glukosinolater påverkar omsättningen av jod i sköldkörteln vilket kan ge upphov till struma. (Håkansson J., 1994)

I Danmark har en metod utvecklats där fermenterad rapsfrökaka ingår i proteinfoder för grisar. Det rapporteras om en bättre maghälsa, högre smältbarhet och en bättre smak då fermenteringen bryter ner de bittra smakämnen. Metoden visar även att tillgängligheten av proteiner, energi och fosfor i fodret ökar (Kling, 2011).

### **1.3 Mjölksyrafermentering**

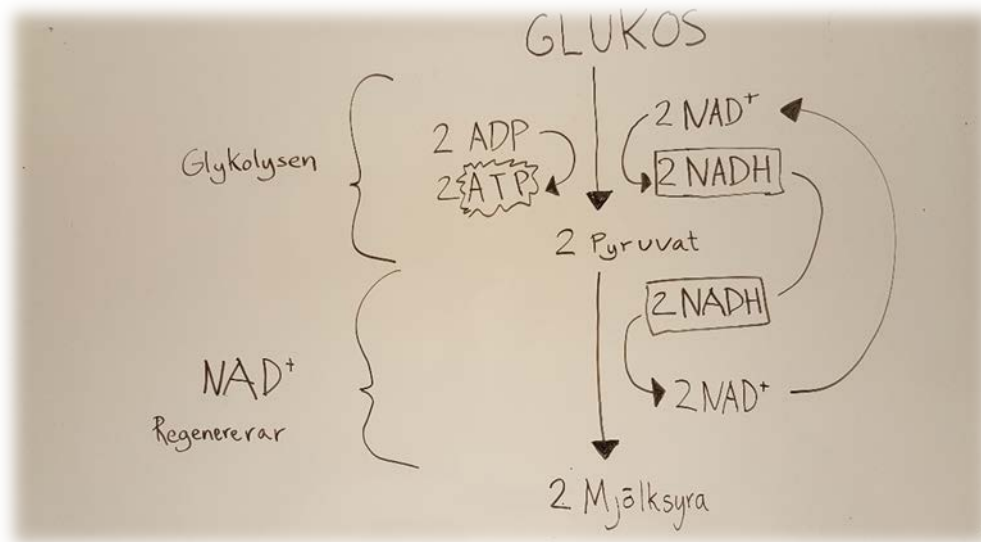
Att fermentera med *Lactobacillus* (mjölksyrabakterier) har vi gjort i många tusen år med syftet att förbättra hållbarhet och hygien. Men också ge livsmedlet en karaktäristisk smak och en annan textur. Ofta får livsmedlet en fastare konsistens vid mjölksyrafermentering då proteinernas vattenbindandeförmåga ökar vid ett lägre pH (Josefine, 2017).

Vid fermentering med hjälp av *Lactobacillus* omvandlas kolhydrater till olika karboxylsyror, t.ex. mjölksyra. (Molin, 2015) Detta bidrar till ett sänkt pH som därmed ger en konserverande effekt av livsmedlet.

Ilja Metjnikov (Nobelpristagare i medicin eller fysiologi år 1908) påpekade att mjölksyrafermenterade livsmedel har en gynnsam effekt på tarmens flora och därmed kan påverka hälsan (Josefine, 2017). "Probiotisk" är ett uttryck som används för vissa levande bakteriestammar som bidrar till större hälsofördelar än konventionell föda (Molin, 2015).

Fermentation är en anaerob process som liksom cellandningen startar via glykolysen, en metabol process där glukosmolekylen bryts ned till två pyruvatmolekyler (pyruvinsyra). Vid

fermentation går dock pyruvat inte in i citronsyracykeln och det sker ingen oxidation och elektrontransportkedjan avbryts. NADH transporterar sina elektroner direkt till pyruvatmolekylen och bildar biprodukten laktat, som är den deprotonerade formen av mjölksyra (Khan Academy, 2017). Se figur 1.



Bildkälla: Jim Nielsen

Figur 1: Skiss över fermenteringsprocessen.

*Lactobacillus* (LAB) är grampositiva, fakultativt anaeroba, icke sporbildande, katalas och oxidas-negativa bakterier (Josefine, 2017). Det finns cirka 90 namngivna arter och underarter av LAB (Molin, 2015). Vanligt förekommande LAB inom tillverkning av livsmedel är *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* och *Streptococcus thermophilus* (yoghurt), *Lactobacillus acidophilus* (filmjök), *Lactobacillus plantarum* (surkål, Proviva), samt att det inom charkindustrin är vanligt med mjölsyrafermentering t.ex. salami (Josefine, 2017).

*Lactobacillus* kan delas in i homofermentativa LAB som omvandlar kolhydrater till mjölksyra, eller obligat heterofermentativa LAB som bildar mjölksyra, CO<sub>2</sub> samt etanol/ättiksyra. Det finns även fakultativa heterofermentativa LAB som producerar mjölksyra, CO<sub>2</sub> och andra biprodukter om de ges rätt förutsättningar och substrat i förhållande till dess metabolism (Molin, 2015) (Cornell University, 2010).

*Lactobacillus plantarum* har ett relativt stort genom vilket gör att den har god anpassningsförmåga för olika förhållanden. *L. plantarum* har förmåga att fermentera många olika kolhydrater. Den har hög tolerans mot lågt pH vilket gör att den klarar att passera genom de sura förhållanden som råder i magen. *L. plantarum* har kapacitet att fermentera till pH <4.

*L. plantarum* har varierande tannas-aktivitet och kan även metabolisera fenoliska syror (Molin, 2015). Olika enzymatiska aktiviteter hos *L. plantarum* är amylas, emulsin ( $\beta$ -glucosidase), dekarboxylas, laktat, dehydrogenas, peptidas, fenolsyra dekarboxylas, fenol reduktas, proteas och tannas (Martínez-Villaluenga, 2006).

*Lactobacillus plantarum A* är en probiotisk bakterie med en förmåga att binda till tarmceller och därmed ”täta” tarmen. *L. plantarum A* har antimikrobiella egenskaper mot patogener som t.ex. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* och *Yersinia enterocolitica*. Detta motverkar inflammationer i tarmen (Molin, 2015).

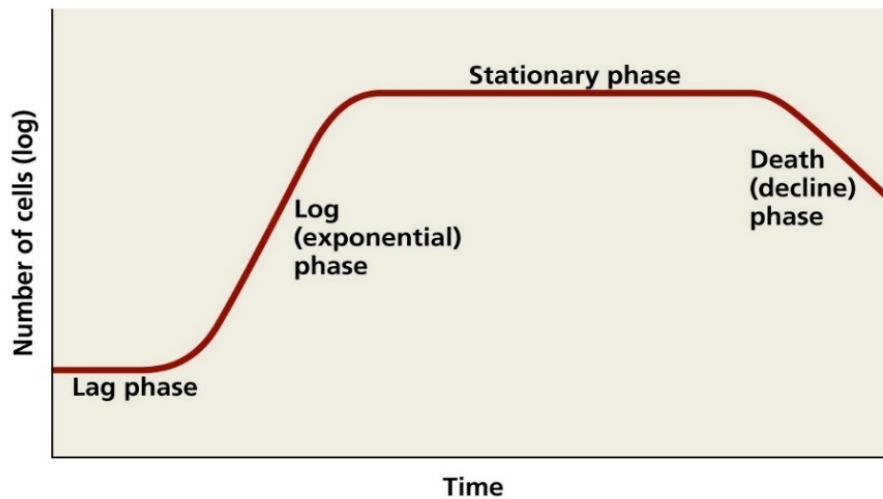
*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* är homofermentativ och används vanligen som starterkultur vid yoghurttillverkning tillsammans med *Streptococcus thermophilus*.

#### **1.4 Värmebehandling**

Livsmedel ska naturligtvis vara säkra att äta. Därför görs så mycket som möjligt för att säkra att de inte innehåller sjukdomsframkallande bakterier. Värmebehandling är en metod för att säkra produkten och görs för att avdöda eventuella bakterier och mikroorganismer som är patogena. Vid växtodling kan det finnas en rad olika bakterier i jorden. *Bacillus*-släktet är en allmänt förekommande bakterie som är sporbildare och kan därmed överleva mer extrema förhållanden. Arter ur *Bacillus*-släktet är vanligtvis inte patogena, men det finns arter som kan leda till matförgiftning t.ex. *Bacillus cereus* (Folkhälsomyndigheten, 2013).

#### **1.5 Bakteriell tillväxtkurva**

Bakteriell tillväxt kan beskrivas i en så kallad tillväxtkurva med fyra olika faser: lag-fas, log-fas, stationär fas och deklinationsfas (dödsfas). I figur 2 visas en typisk tillväxtkurva.



Bildkälla: [http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4\\_growth/index.bak](http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4_growth/index.bak)

Figur 2: Illustration över en bakteriell tillväxtkurva

Fördröjningsfas (lag-fas) är när en bakterie kommer ner i ett nytt medium och anpassar sig till den nya miljön innan den börjar dela sig. Den tid som behövs för cellen att ställa om till den nya miljön kallas för fördröjningsfas eller ibland lagfas.

Bakterier förökar sig genom delning (två identiska dotterceller bildas vid celldelningen). Om tillgången på näringsämnen är konstant och om de fysikal-kemiska egenskaperna hos odlingsmediet inte förändras, så delar de sig med samma hastighet hela tiden. Detta innebär att tillväxten är exponentiell. Den exponentiella tillväxtfasen (logfasen) kan dock inte fortgå hur länge som helst eftersom odlingsmediet utarmas på näringsämnen och mediets pH vanligtvis förändras. Logfasen är den tid det tar för antalet bakterier att fördubblas under odling och den kan variera väldigt mycket för olika bakterier. Under den stationära fasen dör bakterier med ungefär samma hastighet, som de återbildas vid celldelningarna och i deklinationsfasen dör bakterierna snabbare än de återbildas. (Thougaard H., 2007)

När man bestämmer en tillväxtkurva vill man oftast kunna följa tillväxten av bakterier i realtid för att veta när man till exempel ska göra en tillsats av någon substans eller när odlingen bör avbrytas, samt för att se om bakterier producerar syra under en fermentering.

## 1.6 Syfte

Syftet med detta projekt är att fermentera rapsmassan med hjälp av olika hälsosamma bakteriekulturer som har förmåga att eliminera oönskad bitter smak. Genom värmebehandlingar vid olika temperatur och tid vill vi få fram en mikrobiellt säker produkt.

## 1.7 Uppgift

Projektet är indelat i två faser där det första steget är en litteraturstudie för att identifiera och skapa kännedom om de kemiska komponenter som skapar den bittra smaken. Teorin är att det är fenolföreningar/tanniner, fytater samt glukosinolater som ger bitterhet. Vi kommer även mäta halten av de antinutritionella glukosinolaterna hos rapskaka.

I fas två produceras rapsmassa. Vidare sker värmebehandling och analyser av patogener (VRBD, TSA, MRSA, Maltagar) samt förekomst av sporbildare med hjälp av sportest. Detta görs för att kunna säkerställa att det är ett säkert livsmedel. Rapsmassan fermenteras med olika bakteriekulturer: standard yoghurtkultur (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) vid samtliga prov, samt med olika tillsatser av (*Lactobacillus A* *Lactobacillus B* och *Lactobacillus C*). Fermenteringens förlopp kommer att mätas genom pH för att se när den är klar. Den

Dessa bakterier har en hög tannas-aktivitet vilket i teorin skulle kunna påverka tanniners förekomst i rapskaka, och därmed kunna reducera den bittra smaken. En annan teori är att *Lactobacillus* kan använda glukosinolaterna som näring. Reologin undersöks före och efter fermentering. Proteinhalt analyseras före och efter fermentering.



## 2 Metodik

### 2.1 Litteraturstudier

Information till detta arbete användes webbsökning på sidorna

<https://lovisa2.lub.lu.se>

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

<http://www.sp.se/foodbioscience>

[www.ne.se](http://www.ne.se)

Vid sökningen på sidorna användes olika typer av ämnesord som *rapskaka*, *rap*, *rapeseed cake*, *antinutrient*, *Lactobacillus*, *fenolföreningar*, *tanniner*, *fyttater*. \* sattes till efter orden för att utöka sökningarna, till exempel *glukosinolater*\* *glukosinolater*, *glukosinolaterna* osv.

Även litterära källor har använts vilka redovisas i källhänvisningen.

### 2.2 Måldokument och slabbförsök

Ett måldokument skapades för att projektet skulle kunna planeras. Två stycken trädstrukturer skapades för att få en överblick av laborationerna. För att få rätt inställningar gjordes slabbförsök på samtliga delar av projektet. Reologi studerades för att hitta rätt inställningar samt utrustning till maskinen, fermentering, vilken spädserie vi ska använda oss av vid mikrobiella analyser, proteinanalys och rapsmassa.

### 2.3 Framställning av rapsmassa

Material: Omrörare, centrifug, knivhack, induktionsspis, natriumhydroxid och citronsyra.

Rapsmassan framställdes från rapskaka, en restprodukt från pressning av kallpressad rapsolja. Denna rapskaka finfördelades i en knivhack (5 \* 4 sekunder) och blandades sedan med dH<sub>2</sub>O under omrörning. Natriumhydroxid (NaOH) tillsattes blandningen till ett bestämt pH uppnåddes. Massan placerades i en kyl under några timmar. Sedan centrifugerades massan i en Beckman/Coulter-centrifug. Supernatanten (den vätska som finns över sedimentet) sparades och sedimentet kastades. En syra tillsattes supernatanten till ett visst pH varpå det senare hettades upp på en induktionshäll till en förutbestämd temperatur. Massan

centrifugerades på nytt och sedimentet som bildades vid denna centrifugering blev den slutliga massan som användes vidare i projektet.

## 2.4 Värmebehandling och provtagning

Material: Vattenbad, termometer, VRBD-, Malt- och TSA-plattor

Rapsmassan vägdes upp (50 g) i fyra olika behållare med lock. De fyra olika massorna genomgick fyra olika värmebehandlingar med varierande tid och temperatur. Se Tabell 2.

Tabell 2. Värmebehandling, planerad tid och temperatur.

Tid	Temperatur
30 min	55 °C
20 min	65 °C
10 min	70 °C
10+15-30 min*	80 °C*

Den fjärde behållaren genomgick ett sportest. Upphettning till 80 °C i 10 minuter innan massan fick vila över natten. Dagen efter upphettades massan till 80 °C på nytt\*.

Behållarna utrustades med termoelement kopplade till en termometer innan de placerades i ett tempererat vattenbad. Efter önskad värmebehandling slutfört placerades behållarna i en kyl för att kylas ner igen.

Samtliga prover genomgick sedan en provtagning för att undersöka om det fanns kvarvarande mikroorganismer i massan. Detta gjordes genom att sätta prover på olika typer av agarplattor vilka var VRBD-, Malt- samt TSA-plattor. Samtliga prover gjordes som dubbelprover.

## 2.5 Agarplattor och spädserier

Material: MRS- (merck KGaA), VRBD- (merck KGaA), Malt- (sigma aldrich) och TSA-agar (sigma aldrich), petriskålar, autoklav, glaskulor, spädrör, Bacteriological peptone och natruimklorid (NaCl).

Fyra olika agartyper behövdes till försöket. Samtliga blandades enligt den mängd som var angiven. MRS-, TSA- samt Malt-agarn autoklaverades innan de tillsattes till petriskålarna. VRBD-agarn kokades upp i 3 min innan den fördelades i petriskålarna.

Peptonpulver blandades tillsammans med NaCl och dH<sub>2</sub>O innan det fördelades i spädrör á 9 ml per rör. Sedan autoklaverdes rören.

Glaskulor för användning vid provsättning autoklaverades.

Arbetsytan i ett dragskåp desinficerades. Sex stycken spädrör med 9 ml i vardera sattes i ett provrörsställ. 1 gram rapsmassa togs och placerades i det första spädröret. 1 ml togs sedan från första spädröret och överfördes till det andra spädröret. Därefter togs 1 ml från det andra till det tredje spädröret. Denna procedur fortsatte så långt som spädserien var ämnad att vara. Vortexning gjordes mellan varje spädning. 0,1 ml vätska togs från olika spädrör och placerades ut på den agartyp som ville testas. Provet spreds ut på hela agarplattan med hjälp av glaskulor.

Prover tagna på VRBD-plattor inkuberades i 37 °C i 24h, Malt-plattor i rumstemperatur i en vecka, MRS-plattor i 37°C i 72h i en fakultativ anaerob miljö samt TSA-plattor i 30 °C i 72h.

## 2.6 Fermentering

Material: Yoghurtkultur (*Lactobacillus bulgaricus* och *Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus* (A, B och C), centrifuge (Eppendorf centrifuge 5804), MRS-buljong, MRS-plattor, TSA-plattor, rör, ympnålar, saltlösning 0,85 %, pH-mätare.

En MRS-buljong tillredes enligt beskrivning på förpackningen. Den mängd som angavs var 5,22 g MRS-buljong per 100 ml dH<sub>2</sub>O. Tre olika sammansättningar av bakterier blandades ner i varsin behållare med buljong. Samtliga innehöll yoghurtkultur samt en typ av *Lactobacillus*. Yoghurtkulturen tillsattes i en koncentration av 0,002 g per 5 ml MRS-buljong. *Lactobacillus* tillsattes i en koncentration av en blå ympnål per 5 ml MRS-buljong. Bakterierna väcktes genom att buljongen innehållande bakterier inkuberades i 37 °C i ett dygn.

Efter inkubationens slut centrifugerades rören (RCF 4029). Supernatanten hälldes av och bakteriekulturen förblev på botten. En saltlösning (0,85 %) tillsattes för att "tvätta"

bakterierna. De centrifugerades på nytt med samma intällningar. Saltlösningen hälldes av och bakteriekulturerna tillsattes i varsin behållare med värmebehandlad rapsmassan. Det tillsattes även stärkelse till massan i en koncentration på 0,2 g per 10 g massa innan det hela blandades noga. Stärkelsen tillsattes som näring åt bakterierna. Därefter placerades proven i ett värmeskåp på 37 °C för att starta fermenteringen.

Fermentationen kontrollerades en gång per dag genom att utföra pH-mätningar. När pH slutat att sjunka ansågs fermentationen färdig.

Efter fermentationens slut utfördes mikrobakteriella tester genom att applicera den fermenterade rapsmassan på både MRS-plattor och TSA-plattor för att jämföra tillväxten av mjölksyrebakterier samt eventuellt övriga mikroorganismer.

## **2.7 Reologi**

Material: Reologimätare (Malvern kinexius pro från 2010) samt mjukvaruprogram tillhörande reologimätaren (rSpace for kinexius), prob 4V21SC0001 SS.

Mätning utfördes för att undersöka om viskositeten i massan förändrades vid fermentation. Med hjälp av ett reologiskt test undersöktes hur rapsmassans viskositet påverkades vid stress i form av en roterande prob. Viskositet är ett mått på hur trögflytande en vätska är, desto lättare det är att röra om i vätskan desto lägre är viskositeten. Reologimätaren ger ett mått på hur mycket kraft som krävs för att röra om i massan under förutbestämda betingelser (Schliwa, 2008). Ett prov utfördes med ofermenterad rapsmassa och ett prov gjordes med rapsmassa fermenterad med *Lactobacillus plantarum* A.

Inställningarna som gällde för detta försök bestämdes till 5-1000 Pa, och maskinen skulle redovisa mätning i 15 olika punkter. Temperaturen på massa vid mätningen bestämdes till 20°C.

## **2.8 PCR och gelelektrofores**

Material: Rör, centrifug (Thermo heraeus pico 21), pipetter, UV-strålning, sterilrum, skakmaskin, is, PCR-reagens och PCR-maskin (Eppendorf, mastercycler). Se bild 4.



Bildkälla: Jim Nielsen

Bild 4: Bilder på maskiner som användes vid PCR.

Kolonier som skulle identifieras placerades i 30 små rör innehållande små glaskulor samt milliQ (rent vatten). Rören placerades i en skakmaskin i 30 minuter för att bakterierna skulle gå sönder och dess DNA bli fritt i lösningen.

I ett sterilt rum utfördes en blandning av en mastermix som användes vid analysen. 30 tomma rör samt pipetter steriliserades genom UV-strålning. De tomma rören placerades i ett rörställ på en bädd av is. En mastermix blandades med hjälp av pipetter. Ingredienserna kan ses i tabell 3.

Tabell 3. Innehåll i mastermix för PCR-analys.

H <sub>2</sub> O	551,25 µl
Buffert	75,00 µl
dNTP	15,00 µl
ENV1	15,00 µl
ENV2	15,00 µl
Toptaq	3,75 µl

Beståndsdelar:

H<sub>2</sub>O utgörs av nukleasfritt rent vatten. Bufferten bidrar till en miljö som gör att processen kan fungera. ENV<sub>1</sub> samt ENV<sub>2</sub> är primers som fäster på arvs massa. dNTP är byggstenar som kan bygga upp nytt DNA genom kopiering. Toptaq är enzymet som katalyserar processen.

22,5 µl av mastermixen pipetterades ner i var och ett av de tomma rören. Sedan tillsattes 2,5 µl av var och ett av rören innehållande de sönderskakade bakterierna.

Rören placerades i en maskin (toptaq25). Maskinen fungerar på så sätt att proven värms upp och kyls ner upprepade gånger. Enzymet Toptaq katalyserar processen och primers som tillsatts fäster på bakteriernas arvs massa som fungerar som en mall för den enzymatiska kopieringen av DNA:t mellan dessa primers genom användning av dNTP som byggstenar. DNA:t dubblas för varje temperaturekvens vilket gör att koncentrationen av bakteriens arvs massa ökar exponentiellt. (Willey, 2008)

Efter maskinen slutfört sin process utfördes en infärgning med hjälp av "loading dye". 1 µl loading dye applicerades på en steril plastfilm innan 2,5 µl PCR-produkt applicerades på färgen. Blandningen fördes sedan ner i en gel. En svag ström vandrade genom gelen. Gelen färgades sedan i ett färgbad med gelred som gjorde att DNA:t blev synligt i UV-ljus. Gelen lystes därefter med UV-ljus. Detta gjordes för att påvisa att det fanns DNA i proven som sedan skickades vidare till ett laboratorium för analys.

När resultatet från laboratoriet kom tillbaka var de i form av DNA-sekvenser. Dessa klipptes i ett program som hette BioEdit. De delar som var otydliga klipptes bort med detta program innan sekvensen kördes mot en databas (BLAST) för att kunna se vilken mikroorganism som hade det aktuella DNA:t.

## **2.9 Proteinanalys**

Proteinanalyserna gjordes med hjälp av N/Protein Analyzer (FlashEA 1112) där proven förbränns och kvävet reducerades till N<sub>2</sub>. Med vetskap om mängden N<sub>2</sub> kunde sedan proteinhalten bestämmas enligt Dumas metoder.

Proteinanalysatorn kalibrerades enligt tillhörande instruktioner och ca 0,0250 g vägdes upp med hjälp av proteinanalysatorns utrustning. Trippelprover analyserades sedan och proteinhalten bestämdes därefter teoretiskt.



## 2.10 Vattenhalt

Vattenhalten fastställdes genom att livsmedelsproverna torkades.

En skål placerades på vågen som tarerades. Ca 2 g rapsmassa placerades i skålen och vikten noterades med 3 decimalers noggrannhet. Detta repeterades för 2 prov och gjordes både på obehandlad och fermenterad rapsmassa. Proverna placerades sedan i ett torkskåp på 102°C i ca 20 h. De fick sedan svalna i en exsickator och därefter vägdes vardera och de nya vikterna noterades. Skillnaden i vikt före och efter torkningen blir vattenhalten. Beräknades enligt ekvation (1).

$$\text{vattenhalt} = \frac{m(\text{före torkning}) - m(\text{efter torkning})}{m(\text{före torkning})} \quad (1)$$

m=massa

## 2.11 Analys av glukosinolater

För att få ett faktiskt värde på huruvida glukosinolater påverkas utav fermenteringen var tanken att ett före- och efter prov skulle sändas till analys, men dessvärre kunde inte den tjänsten levereras inom vår tidsram. Prover är dock sparade för framtida analys.

## 2.12 Sensorik analys

Vid två tillfällen genomfördes sensorisk rangordningstest av fermenterad rapsmassa där syftet var att finna den med minst bitterhet i smaken. Samtliga försök hade fermenterats med yoghurtkultur + *Lactobacillus plantarum* A, B eller C. Dessutom provades en fermentering med enbart yoghurtkultur samt en med blandning av *L. plantarum* A och C, vilket blir sammanlagt 5 olika prover.

Bedömarna fick prova blint och i varierande ordning för att undvika att ordningen ska kunna fälla ett utslag. Det blev ett enhälligt beslut att rapsmassa fermenterad med *L. Plantarum* A hade bäst smak och förmåga att neutralisera mycket av de bittra smakämnen.

Den sensoriska analysen innefattade 10 personer och utfördes vid två olika tillfällen.

### 3 Resultat

Av 200 g torr rapskaka fick man ut ca 130 g rapsmassa efter tillverkningsprocessen vilket innebär ett torrsammansutbyte på cirka 65 %.

#### 3.1 Proteinanalys

Proteinhalt efter analysering redovisas i tabellform, se tabell 4.

Tabell 4. Proteinhaltsjämförelse av olika rapsmassa.

Beskrivning av rapsmassa	Proteinhalt
Obehandlad rapsmassa (ofermenterad)	13,7 %
Fermentering med yoghurtkultur och <i>L. Plantarum</i> A	12,0 %
Fermentering med yoghurtkultur och <i>L. Plantarum</i> B	13,6 %
Fermentering med yoghurtkultur och <i>L. Plantarum</i> C	13,6 %
Fermentering med yoghurtkultur	14,8 %
Fermentering med yoghurtkultur, 2/3 <i>L. Plantarum</i> A och 1/3 <i>L. Plantarum</i> C.	13,9 %

Proteinhalten skiljde sig inte nämnvärt vid de olika fermenteringarna jämfört med proteinanalysen på den råa rapsmassan. Se bilaga I.

#### 3.2 Värmebehandling

Värmebehandlingen av rapsmassan gjordes i två omgångar eftersom den första analysen visade på att sporbildande bakterier förekom. Resultatet av värmebehandlingarna redovisas i tabellform, se tabell 5 och 6. Tiden det tog för massan att uppnå önskad temperatur var 10 min.

Tabell 5. Första värmebehandlingen.

Temperatur (°C)	Tid (min)	Resultat på TSA spädning -1 (cfu/g)	Resultat på TSA spädning -2 (cfu/g)	Resultat på VRBD spädning -1 (cfu/g)	Resultat på Malt spädning -1 (cfu/g)
Obehandlad	Obehandlad	Överväxt	Överväxt	Ingen tillväxt	Ingen tillväxt
55	30	4*10 <sup>2</sup>	Överväxt	Ingen tillväxt	Ingen tillväxt
65	20	4*10 <sup>2</sup>	Ingen tillväxt	Ingen tillväxt	Ingen tillväxt
70	10	Överväxt	Överväxt	Ingen tillväxt	Ingen tillväxt
80	10	2*10 <sup>2</sup>	Överväxt	Ingen tillväxt	Ingen tillväxt

Tabell 6. Andra värmebehandlingen.

Temperatur (°C)	Tid väckning av sporer (min)	Tid avdöda (min)	Resultat på TSA spädning -1 (cfu/g)
80	10	10	Tillväxt
80	10	20	Tillväxt
80	10	30	Tillväxt
85	10	30	Tillväxt
90	10	30	Tillväxt

Rapsmassan som värmebehandlats på 80°C i 20 min var slätare än den på 30 min som var mer gryning. Desto hårdare värmebehandling som utfördes, ju mer gryngigt blev det.

### 3.3 Fermentering

Bakterieantal efter 7 dygns fermentering visas i tabell 8 och pH-värden som togs under fermenteringens gång visas i tabell 7.

Tabell 7. Cfu hos fermenterad rapsmassa med olika kulturer. Värden anges som medelvärde med standardavvikelse.

Kulturer	MRS spädning -6 (cfu)	TSA spädning -6 (cfu)
Yoghurtkultur	59	58
Yoghurtkultur och <i>L.plantarum B</i>	62	63
Yoghurtkultur och <i>L.plantarum A</i>	72	78
Yoghurtkultur och <i>L.plantarum C</i>	67	64
Yoghurtkultur, 1/3 <i>L.plantarum C</i> och 2/3 <i>L.plantarum A</i>	69	71

Tabell 8. pH på de olika fermenterade rapsmassorna med olika kulturer, vid olika tidsintervall.

	pH <i>L. plantarum</i> B	pH <i>L. plantarum</i> A	pH Yoghurt kultur och <i>L. plantarum</i> C	pH Yoghurt- kultur	pH Yoghurtkultur och 2/3 <i>L. plantarum</i> A 1/3 <i>L. plantarum</i> C
Dag 1	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Dag 2	4,10	4,16	4,11	3,98	4,14
Dag 3	4,06	4,22	4,05	3,99	4,16
Dag 4	4,16	4,33	4,12	4,08	4,22
Dag 5	Ej analyserad	Ej analyserad	Ej analyserad	Ej analyserad	Ej analyserad
Dag 6	4,29	4,40	4,22	Ej analyserad	Ej analyserad
Dag 7	Ej analyserad	Ej analyserad	Ej analyserad	Ej analyserad	Ej analyserad
Dag 8	Ej analyserad	4,12	Ej analyserad	4,39	4,16

### 3.4 Vattenhalt

Vattenhaltsberäkningar utfördes med hjälp av vikterna från laborationer. Se tabell 9 och 10. Vattenhalten beräknades med hjälp av ekvation (1).

Tabell 9. Viktskillnad på ickefermenterad rapsmassa samt vattenhalt.

	Startvikt på prover (g)	Vikt efter torkning (g)	Vattenhalt (%)
Prov 1	1,94	0,35	81,8
Prov 2	2,15	0,39	82,0
Medelvärde	2,05	0,37	81,9

Tabell 10. Viktskillnad på fermenterad rapsmassa (med *Lactobacillus* A) samt vattenhalt

	Startvikt på prover (g)	Vikt efter torkning (g)	Vattenhalt (%)
Prov 3	2,31	0,40	82,7
Prov 4	1,98	0,37	81,5
Medelvärde	2,15	0,39	82,1

Beräkningarna visar att vattenhalten inte påverkas i någon större utsträckning efter fermentering.

### 3.5 Sensorisk analys

Den parametern som skulle analyseras vid den sensoriska analysen var vilken av de fermenterade proven som hade minst bitter smak. Analysen var vid två olika tillfällen och deltagarantalet var sammanlagt tio personer.

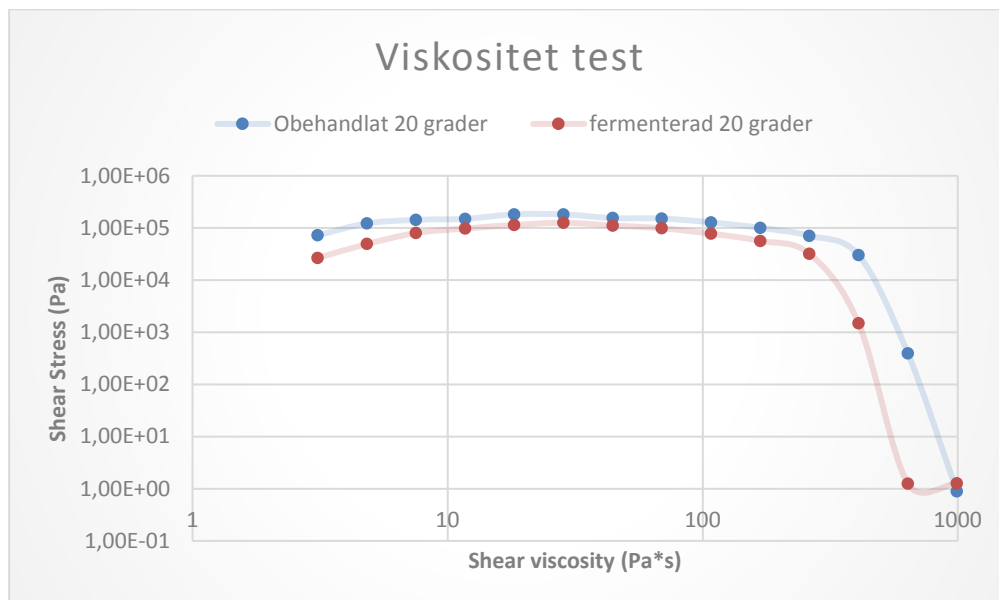
De prover som analyserades var:

- Enbart yoghurtkultur (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* och *S. thermophilus*)
- Yoghurtkultur + *L. plantarum* A
- Yoghurtkultur + *L. plantarum* B
- Yoghurtkultur + *L. plantarum* C
- Yoghurtkultur + 2/3 *L. plantarum* A + 1/3 *L. plantarum* B

Resultatet var enhetligt, *L. plantarum* A var lämpligast för att fermentera bort önskad bitterhet. Ingen av de andra proverna fick någon röst vid analyserna.

### 3.6 Reologi

Resultaten av reologimätningen visas i figur 3.



Figur 3: viskositetstest av obehandlad och fermenterad rapsmassa (*Lactobacillus plantarum* A).

Mätningen visar en liten skillnad, viskositeten var något lägre vid prov av den fermenterade rapsmassan. Den fermenterade massan som testet utfördes på var fermenterad med

*Lactobacillus plantarum* A. Den hade fermenterats under 7 dygn och hade vid provtillfället ett pH på 4,12.

### 3.7 DNA-analys via PCR

De prover som användes för DNA-analys var tagna från samma rapsmassa före och efter fermenteringsprocessen. Massan var fermenterad med en kombination av yoghurtkultur samt *L.plantarum* A och var värmebehandlad i 10 + 30 minuter i 80°C. Provsvaren kom i form av en DNA-sekvens som redigerades i Bio Edit och otydliga delar av sekvensen klipptes bort. Den redigerade sekvensen laddades upp i en databas på internet (NCBI, 2016) där sekvensen matchades mot databasen och svaren kom i procenttal. Vi angav 95 % som nedre gräns som en godtagbar matchning. Se bilaga II

Tabell 11. Prov tagna på ofermenterad rapsmassa, värmebehandlad 10 + 30 minuter, 80 °C. Provsvaren anger att de är från släktet *Bacillus*.

Prov 1-4	Matchning i %
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	100
<i>Bacillus vallismortis</i>	100
<i>Bacillus siamensis</i>	100
<i>Bacillus velezensis</i>	100

Resultaten på ofermenterad rapsmassa (10 + 30 minuter, 80 °C) visar att det var tillväxt av *Bacillus*, vilket även misstänktes före analys då de överlevt värmebehandlingen. Prover tagna på rapsmassa med 90 °C värmebehandling (10 +30 minuter) visade på tillväxt (en koloni) av *Lactobacillus plantarum*.

De arter av *Bacillus* som matchades mot proven visade på icke patogena bakterier. DNA-sekvensen hos dessa bakterier var så pass identiska att denna metod ej kunde särskilja dem.

Alla prover tagna på fermenterad rapsmassa visade på *Lactobacillus plantarum*. Det fanns dock ett avvikande prov som visade på *Staphylococcus epidermis*.

Analysen visade ingen på förekomst av *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* eller *Streptococcus thermofilus*. Se bilaga II



## 4 Diskussion

### 4.1 Proteinhalt

Vår teori var att proteinhalten ska öka med fermentering då *Lactobacillus* förbrukar andra ämnen i rapsmassan. Dessvärre kunde denna teori inte styrkas vid våra mätningar.

Vid en första mätning av proteinhalten på obehandlad rapsmassa fick vi ett värde på ca 9,0 %. Vid en andra mätning användes ofermenterad rapsmassa samt de olika fermenteringsförsöken gjord på samma massa. Medelvärdet från de olika mätningarna varierade mellan 12,0 % till 14,7 % beroende på vilken fermentering som föregått.

Vid proteinanalys så förbränns rapsmassan och proteinhalten mäts då via N<sub>2</sub>-halten. En felkälla är att olika proteiner ger olika N<sub>2</sub>-halter vilket ej tagits hänsyn till. Ett medelvärde av proteiners N<sub>2</sub>-halt i vegetabiliska livsmedel hade förvalts men detta värde överensstämmer inte exakt. Ett medelvärde räknas sedan ut.

### 4.2 Reologitest

Reologimätningen utfördes för att bestämma viskositeten på värmebehandlad rapsmassa och för att se skillnad mellan fermenterad och ickefermenterad. Skillnaden var liten, men den lilla skillnaden som fanns anses bero på att under fermenteringen har *L. plantarum* lyckats frigöra bundet vatten vilket gör rapsmassan lösare.

En första reologimätning gjordes med en finräfflad, cylinderformad prob (C25G A0009 SS) som gav missvisande resultat. Detta tros bero på att skjulningar vilket innebär ett vattenlager bildas runt den roterande proben som leder till missvisande resultat. Vidare utfördes ett nytt försök med en ”vispliknande” prob som gav resultat som inte antydde på att några skjulningar förekommit.

### 4.3 Värmebehandling

Den första värmebehandlingen visade tillväxt vid samtliga försök på TSA-plattorna (tabell 4), vilket tyder på förekomst av sporbildande bakterier (tillväxten liknade en *bacillus* tillväxt). Detta föranledde till ett andra försök där vi ökade temperaturen till 90 °C, som dessvärre var en för tuff värmebehandling och bidrog till en oönskad grynighet. Dock så var sporerne detroniserade.

Dessa försök föranledde till att vi lade till en extra värmebehandling på 10 minuter dagen före 30-minuters behandlingen med syfte att väcka sporer med förhoppning att de lättare kunde avdödas. Bägge värmebehandlingarna var på 80 °C, en temperatur som vi fann inte var produktförstörande.

Ytterligare försök gjordes vid 85 °C vilket gav ett tillfredsställande resultat då det var mindre tillväxt vid odling, prov 1 var utan tillväxt samtidigt som prov 2 hade en mindre tillväxt.

Det visade sig att det var de extra 10 minuterna värmebehandling som gjorde skillnaden i huruvida fermenteringen skulle bli lyckad eller inte. Se tabell 5.

#### 4.4 Fermentering

För att få en lyckad fermentering behöver *Lactobacillus* en god tillväxtmiljö. De behöver näring, värme och inte för mycket konkurrens. Det visade sig nämligen att om antalet *Bacillus* reducerades via värmebehandling så kunde *Lactobacillus*-bakterierna konkurrera bort återstoden. Fermenteringen blev lyckad oavsett vilka stammar av *Lactobacillus* som användes om värmebehandlingen var tillräcklig. Om däremot värmebehandlingen var otillräcklig så blev även fermenteringen det.

Vilka typer av *Lactobacillus* som användes valdes ut på inrådan av experter här på LTH. Att valet föll på dessa tre stammar utav *L. plantarum* beror på de variationer de har i enzymaktivitet och hur det skulle kunna påverka antinutrienterna. Att det var skillnad märktes tydligt vid sensoriktesterna.

*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* och *S. thermophilus* är bakterier vanliga vid yoghurttillverkning, därav kallas de för yoghurtkulturer. Då dessa inte var närvarande i slutprodukten vid kombination med *L. plantarum A* så har de blivit utkonkurrerade eller saknat möjlighet att kunna tillväxa. Då enbart yoghurtkulturen användes så märktes det att en fermentering hade skett, men den var dock otillfredsställande då smaken var bitter. Huruvida yoghurtkulturen kan uteslutas är osäkert då den troligtvis kan haft en inverkan vid starten av fermenteringen och kan ha bidragit till att konkurrera ut oönskade bakterier.

Tidsaspekten visades även den spela en stor roll. Skillnaden mellan fermentering av mjölk till yoghurt och rapsmassa till en skyr är att mjölken inte har samma antinutrientier att bryta ner. Tre dagars fermentering sattes först som en gräns då vi ansåg att pH-värdet inte förändrades nämnvärt. I samband med det första försöket fann vi en studie där de har fermenterat

majspasta (Kutukutu). Målet med den studien var att med *Lactobacillus*-bakterier reducera innehållet av antinutrientier samt få bättre nutritionella värden i majspastan, det vill säga samma mål som vårt med rapsmassan. Fermenteringen av Kutukutu fick fortgå i 120 timmar innan den ansågs vara färdig. Fermenteringen visade på en markant minskning av antinutrientier i majspastan (Tchikoua R., 2015).

Vi förlängde fermenteringstiden på rapsmassan och fann att 192 timmar gav ett bra resultat. Då rapsmassan innehåller stora mängder antinutrientier så kräver det längre tid för nedbrytning.

Halten av sinapin misstänks vara oberörd av fermenteringen då det fortfarande är en bitter ton i smaken samt att färgen på rapsmassan är oförändrat mörk. Förmodligen krävs det andra metoder i tillägg för att reducera sinapinhalten. Enzymet lackas är en polyfenoloxidas som i en studie visat ha en inverkan på sinapin (Niu, 2015).

#### **4.5 Sensorisk analys**

Att *L. Plantarum A* (tillsammans med yoghurtkultur) var den kombination som bäst avlägsnade bitter smak betyder att den har enzymatiska aktiviteter som lämpar sig väl för att fermentera rapsmassa. Resultatet vid analysen var enhälligt och det var ett enkelt val att gå vidare med den i arbetet.

Vare sig *L. plantarum B* eller *C* gav liknande resultat, dock så var *B* något bättre. Därför testades en kombination av *L. plantarum A* och *B* som ej gav ett bättre resultat. Enbart yoghurtkultur var den som gav sämst resultat vilket tyder på sämre enzymatiska aktiviteter för detta ändamål då den inte kan bryta ned bittra smakämnen.

En kvalificerad bedömning som gjordes var att cirka 50% av den bittra smaken hade försvunnit. Detta kan förhoppningsvis mätas i framtida försök med hjälp av andra analysmetoder.

#### **4.6 DNA-analys via PCR**

Vid denna analys kom svar på huruvida fermenteringen blev lyckad och vilken typ av sporbildande bakterier som fanns i rapsmassan (se Bilaga II, prov 1–4). Då *Bacillus cereus* är allmänt förekommande i miljön och en relativt vanlig bakterie vid matförgiftningar så

arbetade vi efter den tesen (Folkhälsomyndigheten, 2013). Nu visade det sig vara en annan *Bacillus*-art av annan karaktär. Exakt vilken art framgår inte av analysen då DNA-sekvensen från provet kan matchas mot ett antal *Bacillus*-arter. De fyra första med högst matchningsprocent (100 %) var *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis* vilka är bakterier i *Bacillus subtilis*-gruppen under *Bacillus amyloliquefaciens*-strängen (Uniprot, 2017). *B. amyloliquefaciens* finns i vissa växter och kan syntetisera antibiotiska substanser. Dessa substanser fungerar som växtens skydd mot svamp- och bakterieangrepp (Encyclopædia Britannica, 1998).

De prover tagna på fermenterad rapsmassa (se Bilaga II, prov 11–24) visade entydigt på att *L. plantarum* hade utkonkurrerat alla bakterier och därmed kan fermenteringen anses vara fullbordad ur ett mikrobiologiskt sätt.

Analysen av ofermenterad rapsmassa värmebehandlad 10+30 minuter vid 90<sup>0</sup>C (se Bilaga II, prov 5–10) visade på förekomst av *L. plantarum* i form av någon enstaka koloni. Detta tros bero på kontaminering från provrör. Då det inte var någon förekomst av sporbildande bakterier så var värmebehandlingen tillräcklig. Dessvärre blev den höga temperaturen produktförstörande.

Ett av proverna visade med 96 % sannolikhet på *Staphylococcus epidermidis* och var kontaminerat.

## 5 Slutsats

För att få en framgångsrik fermentering så krävdes det en metod vid värmebehandlingen som var tillräckligt effektiv att mjölksyrabakterierna kunde tillväxa och konkurrera ut eventuellt överlevande *Bacillus*-sporer. Vid försök till fermentering med otillräcklig värmebehandling blev mjölksyrabakterierna utkonkurrerade av *Bacillus*-sporer.

När det lades till 10 minuters värmebehandling med syftet att väcka *Bacillus*-sporer dagen före 30 minuters behandling så blev fermenteringen framgångsrik. Tiden för fermentering utökades då det konstaterades en signifikant förbättring av smak då bitterheten minskade med tiden.

Den mest optimala fermenteringen av de använda mikroorganismerna skedde med *Lactobacillus plantarum A* då den har för ändamålet mest lämpad enzymaktivitet.

Vid framtida försök kan metoden för framställning av rapsmassa förbättras med t.ex. ultrafiltrering vilket möjligen kan bidra till minskat innehåll av sporbildande bakterier och antinutrientier. Vidare möjligheter är att utprova andra arter/stammar av mjölksyrabakterier med annan enzymaktivitet eller tillsats av enzymer, t.ex. lackas som inverkar på sinapin.

## 6 Felkällor

- Kontaminering av prov vid provtagning, pH-mätning eller provsmakning.
- Fermentering innebär arbete med ett levande organismer och därmed kan antalet mikroorganismer variera vid varje försök.
- Valet av mjölksyrabakterier. Möjligtvis finns det LAB med bättre enzymatiska egenskaper eller andra bättre kombinationer av LAB.
- Rapskakan kan vara kontaminerad av olika jordbakterier eller av skadedjur.
- PCR resultat något otillräckliga. De ger mer en indikation än ett konkret resultat.
- Reometerns geometri för mätning av viskositet kan utprövas för ett säkrare resultat.

### Förslag på framtida förbättringar

- Kunskaper om rapskakans innehåll är fortfarande begränsad. Mer forskning kan resultera i mer designade behandlingar.
- Rapskakans kvalitet kan variera beroende på sort och odlingsbetingelser.
- Rapsmassans viskositet kan variera med kvaliteten på rapskakan.

## 7 Referenser

Nationalencyklopedin, 2017. *Bacillus*. [Online]

Available at: <http://www.ne.se/ludwig.lub.lu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/bacillus>

[Använd 15 05 2017].

Abrahamsson, L., Andersson, A., Nilsson, G., 2013. *Näringslära för högskolan*. 6:e upplagan red. Stockholm: Liber AB.

Carlsson, Å., 2012. *Raps som fodermedel till slaktkycklingar*, Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.

Cornell University, 2010. *Dairy Foods Science Notes*. [Online]

Available at:

<https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Dairy-Cultures-HomoHeteroferm-10-08.pdf>

[Använd 04 05 2017].

Encyclopædia Britannica, 1998. *Bacillus*. [Online]

Available at: <https://www.britannica.com/science/bacillus-bacteria>

[Använd 18 5 2017].

Folkhälsomyndigheten, 2013. *Sjukdomsinformation om bacillus cereus (matförgiftning)*. [Online]

Available at: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittykydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/bacillus-cereus-matforgiftning/>

[Använd 18 5 2017].

Gunnarshög gård, 2017. *Tillverkning*. [Online]

Available at: <http://www.gunnarshog.se/tillverkning?infopath=9>

Håkansson J., Thomke, S., Pettersson, H., 1994. Rapsmjöl till slaktsvin. *VäxtEko*, 1 2.

Lärn-Nilsson, J., Pedersen, K., Dahlgren, C., Lindgren, S., 2017. *Mjölksyrabakterier*. [Online]

Available at: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/mjolkstyrabakterier>

[Använd 8 5 2017].

Khan Academy, 2017. *Fermentation and anaerobic respiration*. [Online]

Available at: <https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/variations-on-cellular-respiration/a/fermentation-and-anaerobic-respiration>

[Använd 10 05 2017].

Kling, M., 2011. *Nyhet från Greppa.nu*. [Online]

Available at:

<http://www.greppa.nu/download/18.e01569712f24e2ca0980009184/1370097073786/Fermenterad+raps+ett+alternativ+till+sojan%2C+nyhet+april+2011.pdf>

[Använd 11 05 2017].

Lärn-Nilsson, J., Ohlsson, R., 2017. *Raps*. [Online]

Available at: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/raps>

[Använd 17 05 2017].

Lunds universitet, 2017. *vinnova*. [Online]

Available at: <http://www.vinnova.se/sv/Resultat/Projekt/Effekta/2013-00117/Uppbearbetning-av-biprodukter-fran-rapsolja-produktion--klimatsmart-protein-med-mera/>

- Martínez-Villaluenga, C., 2006. *Fermented foods in health and disease prevention*. United kingdom: Nikki Levy.
- Molin, G., 2015. *Probi*. [Online]  
Available at: [http://probi.se/sites/all/files/attachment\\_files/lp\\_299-15\\_2015-06-10.pdf](http://probi.se/sites/all/files/attachment_files/lp_299-15_2015-06-10.pdf)  
[Använd 03 05 2017].
- NCBI, 2016. *Blast*. [Online]  
Available at:  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LO C=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO C=blasthome)  
[Använd 12 05 2017].
- Leming, R., Lember, A., 2005. Chemical composition of expeller-extracted and cold-pressed rapeseed Cake. 01 02, Issue 1, pp. 103-108.
- Ohlson, R., Anjou, K., 1979. Rapeseed protein products. *Journal of the American oil chemists' society* , 1 03, 56(3), pp. 431-437.
- Rayner, M., *Department of food technology, Engineering and Nutrition* [Intervju] (19 05 2017).
- Schliwa, M., Janmey P A., 2008. Rheology. *Current biology : CB*, 01 05, 18(15), pp. 639-641.
- Tan, S H., Mailer, R J., Blanchard, CL., Agboola, S O., 2011. Canola proteins for human consumption: Extraction, profile, and functional properties. *Journal of food science*, 01 01, 76(1), pp. 16-28.
- Tchikoua R., Tatsadjieu N L., Mbofung C M F., 2015. Nutritional properties and antinutritional factors of corn paste (Kutukutu) fermented by different strains of lactic acid bacteria. *International journal of food science*, 3 5, 2015(502910), pp. 1-13.
- Thougaard H., Varlund V., Möller Madsen R., 2007. Grundläggande mikrobiologi. i: *Grundläggande mikrobiologi*. u.o.:Studentlitteratur, pp. 110-112.
- Ullvén, K., 2002. *Forskningsnytt*. [Online]  
Available at: <http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/forskningsnytt/FLN02-06/FLN02-06C.PDF>  
[Använd 10 05 2017].
- Uniprot, 2017. *Taxonomy - Bacillus subtilis group*. [Online]  
Available at: <http://www.uniprot.org/taxonomy/653685>  
[Använd 18 5 2017].
- Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C., 2008. Microbiology. i: *Prescott, Harley and Klein's: Microbiology (seventh edition)*. New York: McGrawHill, pp. 362-366.
- Niu, Y., Jiang, M., Guo, M., Wan, C., Hu, S., Jin, H., Huang, F., 2015. Characterization of the factors that influence sinapine concentration in rapeseed meal during fermentation. *PLOS ONE*, 21 01, 10(1), pp. 1-12.



## 8 Bilagor

### Bilaga I

Rådata vid proteinanalyser, se tabell

*Tabell 1. Proteinhalter av obehandlad rapsmassa.*

Proteinhalt (Prov 1)	13,9342 %
Proteinhalt (Prov 2)	13,6024 %
Proteinhalt (Prov 3)	13,7098 %
<b>Medelvärde</b>	<b>13,7488 %</b>

*Tabell 2. Proteinhalter av rapsmassa efter fermentering med yoghurtkultur och Plantarum A.*

Proteinhalt (Prov 1)	11,9823 %
Proteinhalt (Prov 2)	12,1365 %
Proteinhalt (Prov 3)	11,8796 %
<b>Medelvärde</b>	<b>11,9994 %</b>

*Tabell 3. Proteinhalter av rapsmassa efter fermentering med yoghurt kultur och Plantarum B.*

Proteinhalt (Prov 1)	13,1576 %
Proteinhalt (Prov 2)	13,9688 %
Proteinhalt (Prov 3)	13,7653 %
<b>Medelvärde</b>	<b>13,6305 %</b>

*Tabell 4. Proteinhalter av rapsmassa efter fermentering med yoghurt kultur och Plantarum C.*

Proteinhalt (Prov 1)	13,2718 %
Proteinhalt (Prov 2)	13,5430 %
Proteinhalt (Prov 3)	13,8897 %
<b>Medelvärde</b>	<b>13,5681 %</b>

*Tabell 5. Proteinhalter av rapsmassa efter fermentering med yoghurt kultur.*

Proteinhalt (Prov 1)	14,3691 %
Proteinhalt (Prov 2)	15,1574 %
Proteinhalt (Prov 3)	14,7319 %
<b>Medelvärde</b>	<b>14,7528 %</b>

*Tabell 6. Proteinhalter av rapsmassa efter fermentering med yoghurt kultur, 2/3 Plantarum A och 1/3 Plantarum C.*

Proteinhalt (Prov 1)	13,6031 %
Proteinhalt (Prov 2)	14,1906 %
Proteinhalt (Prov 3)	13,9777 %
<b>Medelvärde</b>	<b>13,9238 %</b>

## Bilaga II.

### Matchningsresultat från DNA-analys via PCR

Tabell 7–10. Prover tagna på ofermenterad rapsmassa, värmebehandlad 10 + 30 minuter, 80°C.

Prov	Bakterie släkte/art	Matchning i %
1	Bacillus methylophilus	100
	Bacillus vallismortis	100
	Bacillus siamensis	100
	Bacillus velezensis	100

2	Bacillus methylophilus	100
	Bacillus vallismortis	100
	Bacillus siamensis	100
	Bacillus velezensis	100

3	Bacillus methylophilus	100
	Bacillus vallismortis	100
	Bacillus siamensis	100
	Bacillus velezensis	100

4	Bacillus methylophilus	100
	Bacillus vallismortis	100
	Bacillus siamensis	100
	Bacillus velezensis	100

Tabell 11. Prover tagna på ofermenterad rapsmassa, värmebehandlad 10 + 30 minuter, 90°C.

5	Lactobacillus plantarum	100
6	Lactobacillus plantarum	100
7	Lactobacillus plantarum	100
8	Lactobacillus plantarum	100
9	Ingen läsbar sekvens	0
10	Lactobacillus plantarum	100

Tabell 12. Prover tagna på fermenterad rapsmassa, värmebehandlad 10 + 30 minuter, 80°C.

11	Lactobacillus plantarum	100
12	Ingen matchning	0
13	Lactobacillus plantarum	100
14	Lactobacillus plantarum	100
15	Lactobacillus plantarum	100
16	Lactobacillus plantarum	100
17	Lactobacillus plantarum	100
18	Lactobacillus plantarum	100
19	Ingen läsbar sekvens	0
20	Ingen läsbar sekvens	0
21	Staphylococcus epidermis	96
22	Lactobacillus plantarum	99
23	Ingen matchning	100
24	Lactobacillus plantarum	100