

Processutveckling av rapsfrökaka:
seriell pH-fällning, uppskalning och
extrudering

Abstract

The transition to more sustainable food systems and plant-based protein sources has become increasingly important in reducing the climate impact of the food system. Rapeseed press cake is a by-product of oil extraction that has the potential to be used as a raw material for protein extraction and further use in plant-based foods, thanks to its balanced amino acid profile. Due to its bitter taste and high content of antinutritional factors, its use for human consumption is currently limited. To use rapeseed press cake as a protein source, proteins need to be extracted, purified, and separated from antinutritional compounds.

The aim of this thesis was to investigate whether the protein yield from rapeseed press cake could be improved through sequential pH precipitation, and how the protein composition was affected at different precipitation pH levels. The study also aimed to investigate how the outcome changed when scaled up to pilot scale. Furthermore, the rapeseed protein was co-extruded with pea protein isolate. During extrusion, it was investigated whether the drying step prior to extrusion could be eliminated by feeding the precipitate directly into the water inlet.

On a laboratory scale, protein was extracted from rapeseed press cake by alkaline extraction at pH 10.5, followed by a stepwise, sequential pH precipitation at pH 7–3, with pH 7, 5.5 and 4.5 yielding the highest yield. On a pilot scale, sequential extraction was carried out in a decanter using the selected pH values. The results showed that sequential precipitation at pilot scale did not increase the yield compared to the current established method, which is precipitation at a single pH (pH 3.5). Sequential precipitation yielded a lower yield (30 %) than precipitation at pH 3.5 alone (54%). It was not possible to eliminate the drying step during extrusion. However, when freeze-dried rapeseed protein was combined with pea protein isolate, a meat analogue with a fibrous structure could be formed. SDS-PAGE analysis suggests differences in protein size for precipitation at different pH values. Cruciferin precipitated in higher concentrations at the lower pH values, whilst oleosin and napin precipitated at the higher pH values.

Keywords: rapeseed press cake; protein extraction; pH shift method; sequential precipitation; SDS-PAGE; high-moisture extrusion; meat analogs

Sammanfattning

Övergången till mer hållbara livsmedelssystem och växtbaserade proteinkällor har blivit allt viktigare för att minska livsmedelssystemets klimatpåverkan. Rapsfrökaka är en restprodukt från oljeextraktion med potential att användas som råvara för proteinutvinning och vidare tillämpning i växtbaserade livsmedel tack vare dess balanserade komposition av aminosyror. På grund av bitter smak och högt innehåll av antinutritionella ämnen är användandet för humankonsumtion idag begränsad. För att kunna använda rapsfrökaka som proteinkälla behöver proteinerna extraheras för att renas och skiljas från antinutrienterna.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka om proteinutbytet från rapsfrökaka kunde förbättras genom seriell pH-fällning samt hur proteinsammansättningen påverkades vid olika fällnings-pH. Arbetet syftade även till att undersöka hur effekten påverkades vid uppskalning till pilotskala. Vidare extruderades rapsproteinet tillsammans med ärtproteinisolat. Vid extruderingen undersöktes huruvida torksteget innan extrudering kunde elimineras genom att mata precipitatet direkt i vattenporten.

I laboratorieskala extraherades protein från rapsfrökaka genom alkalisk extraktion vid pH 10,5 följt av en stegvis, seriell pH-fällning pH 7–3, där pH 7, 5,5 och 4,5 gav bäst utbyte. I pilotskala genomfördes seriell extraktion i dekanter med de utvalda pH-värdena. Resultatet visade att seriell fällning i pilotskala inte ökade utbytet jämfört med den etablerade metoden att fälla endast vid ett pH (pH 3,5). Seriell fällning gav sämre utbyte (30 %) än fällning vid enbart pH 3,5 (54 %). Det var inte möjligt att eliminera torksteget vid extrudering. Om rapsproteinets frystorkas går det däremot att, i kombination med ärtproteinisolat, skapa en köttanalog med fiberliknande struktur. SDS-PAGE-analys tyder på skillnader i proteinstorlek för fällning vid olika pH-värden. Cruciferin fälldes ut i högre koncentration vid de lägre pH-värdena medan oleosin och napin fälldes ut vid de högre pH-värdena.

Nyckelord: rapsfrökaka, proteinextraktion, pH-skiftmetod, seriell fällning, SDS-PAGE, extrudering, köttanalog

Förord

Detta examensarbete omfattar 15 hp och har utförts vid Institutionen för processteknik och tillämpad biovetenskap på Kemicentrum, Lunds tekniska högskola. Arbetet utgör den avslutande delen av kandidatprogrammet i livsmedelsteknik, omfattande 180 hp. Arbetet har gett en fördjupad förståelse för växtbaserade proteinprocesser och de utmaningar som förekommer vid uppskalning och extrudering.

Vi vill rikta ett mycket stort tack till Karolina Östbring för handledning och stöd genom hela arbetets gång. Vi vill även tacka Olexandr Fedkiv för all praktisk hjälp i pilothallen. Tack till Evangelia Papagianni för att ha tagit sig tid att svara på frågor och ge stöd i både praktiska och tekniska moment. Vi vill också tacka Abhinav Majumdar för hjälp vid extruderingen samt examinator Mikael Sjölin för alla insiktsfulla kommentarer. Deras insatser har varit mycket värdefulla för projektets genomförande. Slutligen vill vi tacka Gunnarshögs Gård för att ha tillhandahållit rapsfrökakan som använts i projektet samt för ett lärorikt studiebesök.

Lisa Bacharach och Amanda Liedman
Lund maj 2026

Innehållsförteckning

1. Inledning och bakgrund.....	1
1.1 Inledning	1
1.2 Raps	1
1.3 Industriell tillverkning av rapsolja.....	1
1.4 Näringsinnehåll och proteinsammansättning	2
1.5 Aminosyrasammansättning.....	2
1.6 Nackdelar och antinutrientier.....	2
1.7 Extraktion av växtprotein.....	3
1.8 Separation och uppskalning	4
1.9 Användningsområden för rapsprotein	6
1.10 Extrudering	6
1.11 Syfte.....	6
2. Material och metod.....	6
2.1 Material och kemikalier	6
2.2 Metod.....	7
2.2.1 Extraktion av rapsprotein med seriell fällning	7
2.2.2 Pilotskala.....	7
2.2.3 Extrudering.....	8
2.3 Analysmetoder	9
2.3.1 Materialbalans	9
2.3.2 Extraktionskoefficient	9
2.3.3 Precipitationskoefficient	9
2.3.4 Proteintbyte	9
2.3.5 Torrsubstans.....	9
2.3.6 Proteinanalys	10
2.3.7 Statistisk analys.....	10
2.3.8 SDS-PAGE.....	10
3. Resultat och diskussion	11
3.1 Labbskala.....	11
3.1.1 Extraktion av rapsprotein med seriell fällning	11
3.1.2 SDS-PAGE.....	14
3.2 Pilotskala.....	15
3.3 Extrudering	19
4. Slutsats.....	21
5. Framtida studier.....	22
Referenser.....	23

1. Inledning och bakgrund

1.1 Inledning

Livsmedelsförluster och matsvinn utgör i dagsläget en betydande utmaning vid utformningen av hållbara livsmedelssystem. Cirka 14 % av all mat som produceras globalt går förlorad efter att den skördats och innan den når marknaden, ytterligare 17 % slängs i detaljhandeln och av konsumenter. Livsmedelsförluster står för uppskattningsvis 8–10 % av de globala utsläppen av växthusgaser (1).

Livsmedelssystemet har stor påverkan på både klimat och miljö och är en av de största drivkrafterna bakom klimatpåverkan, förlust av biologisk mångfald samt överskridande av flera planetära gränser. Samtidigt förväntas världens befolkning fortsätta öka, vilket ställer högre krav på hållbara livsmedelssystem och alternativa proteinkällor. Enligt EAT-Lancet-kommissionen krävs en omställning mot mer växtbaserade kostmönster, där konsumtionen av frukt, grönsaker, baljväxter och nötter ökar samtidigt som konsumtionen av animaliska livsmedel minskar (2).

Animalieproduktion står för en betydande del av livsmedelssystemets miljöpåverkan, främst genom höga växthusgasutsläpp och omfattande resursanvändning. Även de animalieprodukter med lägst miljöpåverkan har i många fall högre påverkan än motsvarande vegetabiliska alternativ (3). Växtbaserade proteinkällor anses därför spela en viktig roll för både miljömässig hållbarhet och människors hälsa. I detta sammanhang blir växtbaserade proteinråvaror från restströmmar i jordbruks- och livsmedelsproduktion särskilt intressanta, då de möjliggör ett mer resurseffektivt utnyttjande av befintliga flöden i livsmedelssystemet. En sådan råvara är rapsfrökaka, en proteinrik restström från rapsoljaframställning.

1.2 Raps

Raps (*Brassica napus*) är en oljeväxt inom kålsläktet som odlas för sina frön med hög fetthalt (35–40 %). Raps tros ha uppstått genom en korsning mellan kål och rybs och har odlats i mer än 5000 år. Den spelar en viktig roll i växtföljder där den bidrar till förbättrad jordhälsa och större skördar. Oljan används främst som matolja men har, under senare år, även använts vid margarintillverkning (4). 95 miljoner ton raps skördades globalt 2025 (5), varav mer än 400 000 ton i Sverige (6). Globalt är rapsen den tredje största källan till vegetabilisk oljekonsumtion efter palmolja och sojaolja (7).

1.3 Industriell tillverkning av rapsolja

Den vanligaste metoden för att utvinna rapsolja är genom varmpressning. Processen startar med att rapsfrön krossas till en massa. Massan värms därefter upp till omkring 80 °C och fettet pressas ut med hjälp av en skruvpress som separerar oljan från den återstående rapsfrökakan. Den höga temperaturen gör fettet mer lättflytande varpå mer olja kan pressas ut. En hög temperatur gör även att hållbarheten förlängs eftersom produktförstörande enzymer inaktiveras, vilket minskar risken för oxidation. För att få ut återstående fett från rapsfrökakan kan ett godkänt lösningsmedel, ofta hexan, användas (4). En annan metod är kallpressning. Då används lägre temperaturer, omkring 35 °C, samtidigt som pressningen sker under längre tid (8). Kallpressad rapsolja får starkare färg, smak och doft (9).

Det krävs 3 kg rapsfrön för att producera 1 kg kallpressad rapsolja. Därmed genereras 2 kg rapsfrökaka som en restström. Den största delen av denna går till djurfoder, men på grund av sitt höga näringsinnehåll finns potential för användning till humankonsumtion (8). Kallpressad rapsfrökaka består främst av proteiner (30 %), fibrer (27–30 %) och olja (20 %) som inte kunnat pressats ut (10).

1.4 Näringsinnehåll och proteinsammansättning

Proteinerna i raps består till största del av förrådsproteinerna cruciferin (12S globulin) och napin (2S albumin) där cruciferin är dominerande och utgör 50–60 % av det totala proteininnehållet. Cruciferin är ett stort och neutralt protein som är saltlösligt. Proteinet har en måttlig värmestabilitet och goda emulgerande egenskaper. Molekylvikten i nativ form är 300–310 kDa och består av sex subenheter på 50 kDa som tillsammans formar en hexametrisk struktur. Varje subenhet består av en alfa-kedja med molekylvikten 29–33 kDa och en beta-kedja med 21–23 kDa.

Napin utgör 20–40 % av proteinerna i raps och är betydligt mindre än cruciferin. Det har visat sig vara mer stabilt för processering och låga pH-värden, men uppvisar sämre emulgerande egenskaper (7). Dock har goda skumstabiliserande egenskaper rapporterats (7, 11). Molekylvikten för napin är 12,5–14,5 kDa som i sin tur består av två polypeptidkedjor om 4,5 respektive 10 kDa (7).

Oleosiner representerar 6–8 % av proteinerna i raps (12). Det är ett lågmolekylärt alkaliskt protein med en molekylvikt på 18 kDa (7). Oljekroppspoteiner är designade för att skydda oljedropparna mot att slås ihop. Denna egenskap kan också användas för att stabilisera livsmedelsprodukter och därför anses de emulgerande egenskaperna vara goda (13).

Varje protein har en isoelektrisk punkt (pI) där dess löslighet är som lägst. För cruciferin har pI 7,2 rapporterats, för napin pI 11 och för oleosin och andra oljekroppspoteiner pI 6,5. För sammansättningen av proteiner i raps har olika pI rapporterats, mellan 3,5 och 6, där olika sorter tros bidra till skillnaden (7). Precipiterings-pH 4 har identifierats som det mest optimala för kallpressad rapsfrökaka när det kommer till proteinutbyte och proteinkoncentration (14).

1.5 Aminosyrasammansättning

Kompositionen av aminosyror är mer balanserad i raps än hos någon annan vegetabilie, inklusive baljväxter. Det är främst det höga innehållet av svavelaminosyror, cystein och metionin, som särskiljer sig hos rapsen. Aminosyran lysin kan vara begränsande i rapsproteinprodukter eftersom den påverkas av temperatur och är inblandad i maillardreaktioner som kan ske vid processering (7). I och med detta kan rapsprotein med fördel kombineras med ett protein med högt innehåll av lysin. En analys av aminosyror i kallpressad rapsfrökaka visade högre nivåer av lysin i rapsfrökaka och fällning än vad som tidigare påvisats, vilket kan bero på den låga temperaturen vid kallpressning (10).

1.6 Nackdelar och antinutrientier

Trots rapsproteinets höga proteinkvalitet och balanserade aminosyrasammansättning används rapsfrökaka främst till djurfoder. Detta på grund av dess höga innehåll av antinutritionella ämnen som påverkar biotillgängligheten (7). När oljan pressas ut från fröna koncentreras de andra ämnena, och så även antinutrienterna. För att ta fram produkter som är lämpliga för

humankonsumtion måste dessa ämnen reduceras eller tas bort. De mest betydelsefulla antinutrienterna i raps är glukosinolater, fytinsyra och fenoliska föreningar och beskrivs nedan.

Glukosinolater bryts i mag- och tarmkanalen ner till glukos och en rad potentiellt toxiska nedbrytningsprodukter. Dessa nedbrytningsprodukter har visats ge negativa effekter hos försöksdjur och hos människor har höga nivåer kunnat kopplas till minskat upptag av jod i sköldkörteln. Förutom negativa hälsoeffekter bidrar ämnena även till bitter och skarp smak. Halterna av glukosinolater har sänkts betydligt genom växtförädling varpå innehållet i rapsproteinprodukter är låga (7). Koncentrationen har också visats minska vid extraktion (10).

Fytinsyra kan ha vissa positiva effekter men är huvudsakligen känd för sina antinutritionella egenskaper. Hela rapsfrön innehåller 1–2 % fytinsyra. Fytat, som är fytinsyrans joner, är negativt laddade och binder därför till positivt laddade metalljoner som järn, zink och koppar och gör dem olösliga. Fytat kan också binda till proteiner vilket gör dem olösliga och minskar digererbarheten. Proteinupptaget kan minska ytterligare genom bindningar till enzymer som spjälkar proteiner, såsom trypsin och kymotrypsin (12).

Sinapin och tanniner är fenoliska föreningar som förekommer i raps. Sinapin binder till proteiner vilket leder till ett försämrat näringsvärde. En annan fenolförening är tanniner, vilka också binder till proteiner men även mineraljoner. Både tanniner och sinapin oxideras under alkaliska förhållanden, som vid proteinextraktion, vilket leder till mörk färg och bitter smak (7, 12).

1.7 Extraktion av växtprotein

För att kunna använda rapsfrökaka som proteinkälla behöver proteinerna extraheras för att renas och skiljas från antinutrienterna. För att extrahera proteiner från rapsfrökaka är pH-skiftmetoden och saltmetoden de vanligaste. Extraktion av proteiner från rapsfrökaka från kallpressad oljeproduktion har visats ge högre utbyte än varmpressad, samtidigt som proteiner från kallpressad rapsfrökaka visat bättre emulgerande egenskaper (13).

pH-skiftmetoden är en icke-termisk process som utnyttjar förändringar i pH för att lösa upp och fälla ut proteiner genom att påverka proteinets laddning. Metoden delas in i två steg; i det första steget tillsätts ett basiskt lösningsmedel för att höja pH i blandningen. Syftet är att skapa starkt negativa laddningar i proteinernas sidokedjor vilket ökar deras interaktion med vatten. pH-värde i detta steg kan variera mellan 8–12, där ett högre värde generellt ger ett högre utbyte. För att inte riskera att påverka proteinernas funktionalitet samt att minska kemikalieåtgång används ofta pH-värden 8,5–10 (15). De lösta proteinerna i vätskefasen, kallad light liquid phase (LLP), separeras från den fasta fasen, kallad spent solid phase (SSP), genom centrifugering (16).

I det andra steget sänks pH på LLP med hjälp av en syra till proteinernas pI, ofta runt pH 4–5, där de har neutral nettoladdning och fälls ut ur lösningen. Efter att proteinerna har fällts ut separeras de från supernatanten genom centrifugering. Tyngre partiklar, som de utfällda proteinerna, samlas i botten av kärlet vilket möjliggör uppsamling och vidare analys. Det utfällda proteinet kallas även för precipitat (15).

En fördel med pH-skiftextraktion är att den generellt ger ett högt proteinutbyte och möjliggör utvinning av proteiner med god löslighet och funktionella egenskaper. Samtidigt finns nackdelar, framför allt att högt pH kan orsaka partiell denaturering och försämrad

proteinkvalitet. Dessutom innebär metoden en stor vattenförbrukning och miljöpåverkan kopplad till kemikaliehantering, vilket även medför ekonomiska kostnader (16).

Saltmetoden bygger på principen om att salta in. Insaltningen gör att både anjoner och katjoner interagerar med proteinerna. Detta skapar en störning mellan de attraktiva krafterna mellan proteinmolekylerna vilket resulterar i ökad löslighet. Proteinerna fälls sedan ut genom att saltkoncentrationen minskar, saltas ut, genom ultra- eller diafiltrering. Salter som används är ofta NaCl eller CaCl₂ i koncentrationer mellan 0,1–1 M. Saltmetoden anses vara mer miljövänlig än pH-skiftmetoden på grund av den lägre kemikalieanvändningen och har även sensoriska fördelar då färgen blir ljusare och bitterheten lägre. Nackdelarna är främst att vattenanvändningen är hög och utbytet blir lågt (17).

Under de senaste decennierna har nya extraktionsmetoder uppmärksammats i hopp om att kunna effektivisera processen och minska miljöpåverkan. En av dessa nya metoder är ultraljuds-assisterad extraktion (UAE). Principen bygger på att ultraljudsvågor skapar akustiska kavitationer. Fenomenet uppstår när gasbubblor snabbt bildas på cellväggen för att sedan våldsamt implodera. Detta skapar chockvågor och höga krafter som tar sönder cellväggen och därmed kan vatten ta sig in och föra med sig proteiner ut i lösningsmedlet. De mest använda frekvenserna är 20–100 kHz. UAE ökar utbytet, men kan leda till att proteiner denaturerar eller får ändrade egenskaper (17).

Processning med mikrovågor är en annan metod som kan användas för extraktion. Elektromagnetiska vågor skapar en dipol-rotation och jonisk konduktion vilket förstör vätebindningar i cellväggen. Detta ger en ökad porositet som gör att lösningsmedlet kan tränga in. Strålningen ökar även värme och tryck vilket gör att cellväggen går sönder. Fördelar är en minskad extraktionstid och kemikalieanvändning medan nackdelarna är att det riskerar att bli för varmt och därmed denaturera proteiner. Sekundärstrukturen kan också förändras, vilket kan leda till ändrade egenskaper hos proteinerna (18).

Enzymassisterad extraktion (EAE) är en miljövänlig metod som kan användas för att extrahera växtproteiner. Kolhydrat- eller proteinnedbrytande enzymer används då för att bryta ner cellväggen och förbättra lösligheten av proteinerna däri. Metoden är snabb, skonsam mot proteinerna, kräver lite energi och ger ett högt utbyte. En nackdel med EAE är att det är dyrt med enzymer. Det kräver också kunskap om cellväggens komposition i den specifika växten för att hitta rätt enzym. För att gynna enzymets optimala förhållanden kan det även behöva läggas till extra processteg (19).

För att öka proteinutbyte kan flera extraktionsmetoder kombineras med varandra (20). I en studie utfördes proteinextraktion från rapsfrökaka med pH-shiftmetoden med en återcirkulering av SSP i syfte att öka utbytet. En återcirkulering ökade det ackumulerade utbytet från 70 % till 83 % (10).

På grund av att proteinsammansättningen i raps är komplex och de olika proteinerna i raps har olika pI, finns anledning att testa seriell fällning, där flera pH används i följd.

1.8 Separation och uppskalning

En bordscentrifug är en laboratoriecentrifug avsedd för separation av små provvolymen baserat på skillnader i densitet. Den används för att sedimentera biologiskt material och kan, beroende

på modell, vara utrustad med kylning för att minska påverkan på känsliga prover (21). Vid uppskalning till pilot används en dekantercentrifug.

Dekantercentrifugen utvecklades i slutet av 1800-talet för mejeriindustrin och revolutionerade separation av mjölk och grädde. Separationen sker genom att man använder grundprincipen för sedimentering med Stokes lag plus centrifugalkraft, detta för att påskynda separationsprocessen med flera tusen g-krafter. Partiklar med olika densitet och vikt skiktas i ett konstant flöde av material och med två utlopp där de olika faserna kommer ut. Centrifugtrumman har en rak cylindrisk form med en konformad ände, en skruv passas in med samma form. Skruven matar materialet mot den konformade delen av dekantern. I den cylindriska delen, den så kallade dammen, slungas de fasta partiklarna mot centrifugtrummans väggar med hjälp av centrifugalkraften. Den lätta fasen befinner sig närmare skruvens kärna och transporteras genom skruvgångorna till ett separat utlopp. I den konformade delen minskar vätskedjupet och en så kallad strand bildas, där separeras den tunga fasen från vätskefasen innan den matas ut genom ett separat utlopp. Trumman och skruven roterar med olika hastigheter, vilket bidrar till att det blir en separation (22).

I pilotskala finns det fem parametrar att variera för dekantern, dessa är följande:

Sammansättningen av feeden: Feedens viskositet kan påverkas genom uppvärmning av feeden, samt en större skillnad i partikelstorlek mellan partiklarna som skall separeras. Dessa faktorer påverkar sedimenteringshastigheten i feeden. Låg viskositet gör det lättare för partiklarna att sjunka till botten och större partiklar sedimenterar snabbare än mindre partiklar. Genom justering av dessa parametrar kan man påverka tiden det tar för separationen.

Pumphastigheten: Hastigheten in i dekantern justeras genom antalet liter per timme. En lägre pumphastighet ger partiklarna längre tid på sig att separera och sedimentera, men sänks pumphastigheten mer än det behövs bidrar det till förlorad kapacitet av systemet (23).

Acceleration: Centrifugens accelerationsvärde, dess g-kraft, är direkt relaterat till hastigheten. Accelerationen är viktig för att bestämma separationseffektiviteten. Ju högre rotationshastighet, desto effektivare blir separationen (24).

Weir disc: Ringarna är namngivna baserat på storleken uttryckt i millimeter på hålet i mitten av ringen. Storleken på hålet är det som avgör hur djup dammen blir och då även hur lång stranden blir (25). Längden på stranden avgör hur torr den tunga fasen blir, längre strand ger en torrare fas och en kortare strand ger en blötare fas. Ju mindre weir disc, desto längre uppehållstid.

Differentialhastigheten: Skruvens relativa hastighet i förhållande till trumman. Ju lägre differentialhastighet, desto längre uppehållstid har de fasta partiklarna i dekantern, och vice versa. En låg differentialhastighet ger en effektiv separation av de fasta partiklarna. Ju högre hastighet, desto renare blir den klara vätskefasen. Om differentialhastigheten däremot är för låg kan fasta partiklar bli kvar i den lätta fasen (23).

I pilotskala är dekantern betydligt mindre än i industrin för att man lätt skall kunna justera parametrar och olika produkter, dekantern som används i detta projekt har en kapacitet på 5–80 L/h. På industriell skala är det färre parametrar som kan justeras och utrustningen kan ha en kapacitet på upp emot 10 000 L/h. De används för separering av produkter med hög halt av fasta partiklar, såsom vid framställning av utfällt kasein och kristalliserad laktos i mejeriprocesser. De används även i andra livsmedelsapplikationer, exempelvis vid produktion av sojamjölk, samt inom avloppsrening för att avvattna slam (22).

1.9 Användningsområden för rapsprotein

På grund av rapsproteinets goda emulgerande och skumstabiliserande egenskaper finns flera potentiella användningsområden för rapsprotein inom livsmedel. Majoriteten av proteinbaserade emulgatorer inom livsmedelsindustrin har sitt ursprung i mjölk, ägg eller soja. Industrin har behov av ett lågkostnadsalternativ som kan användas i växtbaserade produkter såsom mejerianaloger och kylda såser (13). Andra tillämpningsmöjligheter är som proteintillskott, baktillsats eller extruderade köttanaloger (7, 12).

1.10 Extrudering

En industriell extruder består av en eller två roterande metallskruvar som transporterar och bearbetar råvaran genom ett uppvärmt system innan materialet pressas genom ett munstycke för att ge produkten önskad form. Under processen utsätts materialet samtidigt för blandning, uppvärmning, tryck, skjuvkrafter och kylning. Detta gör att råvaran både tillagas och formas i samma steg. Under extruderingen sker flera strukturförändringar i proteinerna. Proteinerna denatureras och aggregerar, samtidigt som skjuvkrafterna bidrar till att skapa fibrösa strukturer som kan ge produkten en köttliknande textur (26).

Extrudering används sedan länge inom livsmedelsindustrin vid produktion av exempelvis pasta, frukostflingor, snacks och djurfoder. Tekniken lämpar sig väl för växtbaserade köttalternativ eftersom stora mängder råvara kan bearbetas på relativt kort tid. Samtidigt är processen energikrävande och det är svårt att helt efterlikna den komplexa strukturen hos hela muskelköttprodukter såsom biff eller kycklingfilé. Tekniken används för framställning av en rad växtbaserade köttalternativ med varierande struktur, från burgare och nuggets (26) till mer strukturerade, fibrösa produkter som efterliknar kött med muskelstruktur (27).

1.11 Syfte

Syftet med examensarbetet var att modifiera pH-shiftmetoden för att öka utbytet för extraktion av rapsprotein utan att påverka proteinernas funktionalitet negativt. Vidare utfördes extrudering av precipitatet med syfte att effektivisera processen. Följande frågeställningar ställdes upp:

1. Kan proteinutbytet förbättras genom seriell fällning, där proteiner successivt fälls ut genom stegvis sänkning av pH-värden, och hur påverkar processen proteinsammansättningen i de olika fraktionerna?
2. Ändras effekten när man går upp i skala?
3. Är det möjligt att eliminera torksteget och mata rapsslurry direkt i extruderns vattenport?

2. Material och metod

2.1 Material och kemikalier

Rapsfrökaka från kallpressad oljeproduktion på Gunnarshögs Jordbruks AB (Hammenhög, Sverige) användes för både labb- och pilotskala. För att justera pH användes natriumhydroxid (1 M NaOH) och citronsyra, båda från VWR Chemicals (Belgien). Till proteinanalysen användes asparaginsyra från Thermo Fisher Scientific (Tyskland). För SDS-PAGE användes 50 mM Tris-HCl-buffert (pH 7), 4× Laemmli Sample Buffer, Mini-PROTEAN TGX Precast Polyacrylamide Gel, 10× Tris/Glycine/SDS Buffer och Precision Plus Protein Dual Color

Standards, alla från Bio-Rad Laboratories (USA). Ärtproteinisolat (80 % protein) till extrudering från Bulk Sport Supplements Limited (England).

2.2 Metod

2.2.1 Extraktion av rapsprotein med seriell fällning

50 g rapsfrökaka maldes i en knivkvarn (Grindomix GM 200, Retsch, Tyskland) i 4 x 5 sekunder. Pulvret lades i en 1-litersbägare, 450 g rumstempererat kranvatten (20 °C) tillsattes och blandningen rördes runt med en sked för att säkerställa att inget material fastnade i botten. Förhållandet mellan råmaterial och vatten var 1:9. Start-pH på slurryn mättes.

Behållarna sattes vid omrörare (Microstar 7.5 control, IKA Labortechnik, Staufen, Tyskland) inställda på hastighet 750 rpm och en pH-mätare installerades i vardera blandning. Läkningss-pH sattes till $10,5 \pm 0,05$. När pH 10,5 uppnåddes sattes en timer på en timme. pH övervakades och justerades till 10,5 var 5:e minut vid pH under 10,45.

Efter en timme hälldes blandningen över i centrifugrör. Därefter kördes de i en bordscentrifug (Avanti J-15R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) med inställningarna 4700 g, 10 min, 20 °C.

Den lätta fasen (supernatanten) fördes över till nya centrifugrör. Prover till TS och proteianalys togs från precipitatet, resten sparades i frys (-18 °C). Citronsyra (1 M) användes för att justera pH på supernatanten till pH 7. Därefter kördes behållarna i bordscentrifugen med samma inställningar som ovan.

Stegen ovan upprepades vid följande precipiterings-pH i fallande ordning:

pH 6,5 pH 6 pH 5,5 pH 5 pH 4,5 pH 4 pH 3,5 pH 3

Extraktion vid varje precipiterings-pH utfördes i triplikat. För samtliga precipitat sattes pH till 7 innan frystorkning. Formarna frystes i aluminiumformar till -25 °C i en blast freezer varefter hål gjordes på sidor och lock. Sedan kördes de i en frystork (Lyph-Lock 18, Labconco, Kansas City, MO, USA) enligt instruktioner i fyra dagar. Proven överfördes till provburkar som sattes utan lock i en exsickator i ett dygn. Detta gjordes för att säkerställa att allt vatten hade avlägsnats.

2.2.2 Pilotskala

Inställningarna för dekantern baserades på optimerade processparametrar från en tidigare pilotstudie på proteinutbyte från kallpressad rapsfrökaka (28). I första separationen användes ett inflöde på 60 L/h, 2000 g acceleration, 50 rpm differentialhastighet och weir disc 68. Motsvarande inställningar för det andra steget var 10 L/h, 4000 g, 6 rpm och weir disc 56.

3 kg rapsfrökaka maldes under 3 minuter i en mixer (R 5 Plus, Robot Coupe, Bourgogne, Frankrike). Rapsfrökakan blandades sedan i en blandningstank med 27 kg rumstempererat kranvatten (20 °C). Under omrörning på 300 rpm (Power control whisk Eurostar, IKA Labortechnik, Staufen, Tyskland) tillsattes NaOH (1 M) tills pH 10,5 uppnåddes. Slurryn stod därefter i en timme under omrörning och kontinuerlig justering av pH.

Under tiden monterades dekantern (CU-MD80-2, Lemitec, Berlin, Tyskland) enligt anvisningar med weir disc 68.

Parametrarna på dekantern ställdes in på differentialhastighet 50 rpm och acceleration 2000 g. Masterflexpumpen (Masterflex Easy-Load, 77200-62, Cole & Parmer, Vernon Hills, IL, USA) ställdes in på 60 L/h (200 rpm). Dekantern startades, när wattförbrukningen hade stabiliserats startades pumpen. LLP separerades från SSP och prover för mätning av TS samt proteinanalys togs. SSP vägdes och kasserades därefter.

Därefter genomfördes precipiteringssteget där dekantern sattes ihop på nytt men med weir disc 56, för att separera de utfällda proteinerna från lösningen. Supernatanten ställdes till pH 7 med citronsyra och hälldes sedan ner i blandningstanken. Parametrarna på dekantern ställdes in på differentialhastighet 6 rpm och acceleration 4000 g. Masterflexpumpen ställdes in på 10 L/h (35 rpm). Därefter upprepades stegen ovan. I detta steg togs även ett separat prov från precipitatet som placerades i en petriskål och fotograferades.

Precipiteringssteget upprepades för pH 5,5 och 4,5, med den enda skillnaden att pH ställdes till 7 innan proverna togs.

2.2.3 Extrudering

Innan extrudering frystorkades slurryn i fem dagar och maldes sedan under 3 minuter i en Robot Coupe. Prov togs för att mäta TS-halt. Startmaterialet bestod av 50:50 rapsprotein och ärtproteinisolat. Blandningen valdes i enlighet med den tidigare studie som extruderingsförsöket baserades på (29). Materialet blandades väl i en mixer utrustad med dubbelvisp (Universal Plus, Bosch, München, Tyskland) och vatten tillsattes med en sprejflaska för att nå en vattenhalt på 10,42 %. I försöket användes 1221 g rapsprotein, 1221 g ärtproteinisolat och 134,2 g vatten.

Målet för extruderingen var att nå följande parametrar, dessa baseras på tidigare pilotförsök med extrudering av 50:50 raps och ärt (29):

Mass flow: 3 kg/h

Moisture content: 65 % (mellan 60–70 %)

Screw speed: 700 rpm

Final temperature profile: 150–130–80–40 °C

Cooling die temp: 50 °C

Extrudern (Lab-Compounder Ketse 20/40 D, Brabender, Duisburg, Tyskland) sattes ihop enligt instruktioner och startades med vattenhalten inställd på 65 %. Under extruderingen tillsattes vatten direkt i matningszonen med hjälp av en pump (120U, Watson Marlow, Falmouth, Storbritannien) för att upprätthålla den önskade vattenhalten. Skruvhastigheten ökades snabbt till 600 rpm i steg om 100 rpm. Ett intervall på cirka 15 sekunder hölls mellan varje steg.

Temperaturprofilen ökades stegvis och nästa steg påbörjades först när systemet hade uppnått stabila förhållanden. När korrekt temperatur hade uppnåtts justerades vattenhalten. Provtagning genomfördes efter att temperatur- och tryckprofilen hade stabiliserats. Målet var att uppnå en degliknande konsistens vid utloppet. Vid för torr konsistens ökades vattenhalten och vid för våt konsistens begränsades flödet.

Blandningen matades in med en hastighet på 3 kg/h färdig produkt med hjälp av en gravimetrisk matarskruv (Feeder Control Module Congrav OP, Brabender, Duisburg, Tyskland). Vid

utloppet från extrudern formades produkten till ett rektangulärt extrudat och trycket vid matrisen registrerades med en tryckgivare.

2.3 Analyismetoder

2.3.1 Materialbalans

Figur 1 visar materialets övergångar under extraktionsprocessen.



Figur 1. Flödesschema över extraktionsprocessen.

2.3.2 Extraktionskoefficient

Extraktionskoefficienten beskriver hur mycket av proteinerna från råmaterialet som extraheras till den lätta fasen. Extraktionskoefficienten analyserades för labbskala samt pilotskala.

Ekvation 1 användes för att beräkna extraktionskoefficienten:

$$\text{Extraktionskoefficient (\%)} = \left(\frac{\text{massa protein i LLP (g)}}{\text{massa protein i råmaterial (g)}} \right) \times 100 \quad 1$$

2.3.3 Precipitationskoefficient

Precipitationskoefficienten beskriver hur mycket av proteinerna från första separationen som hamnat i precipitatet. Precipitationskoefficienten analyserades för samtliga precipitat från labbskala samt pilotskala.

Ekvation 2 användes för att beräkna precipitationskoefficienten:

$$\text{Precipitationskoefficient (\%)} = \left(\frac{\text{massa protein i precipitat (g)}}{\text{massa protein i LLP (g)}} \right) \times 100 \quad 2$$

2.3.4 Proteinutbyte

Utbytet visar hur mycket protein som finns i produkten jämfört med det som från början fanns i råmaterialet. Utbyte analyserades för samtliga precipitat från de olika fällnings-pH i labbskala samt för pilotskala.

Ekvation 3 användes för att beräkna proteinutbyte i gram:

$$\text{Proteinutbyte (\%)} = \left(\frac{\text{massa protein i precipitat (g)}}{\text{massa protein i råmaterial (g)}} \right) \times 100 \quad 3$$

2.3.5 Torrsubstans

Deglar fylldes med prov på 3–5 g och ställdes in i en torkugn på 103 °C i minst 18 timmar. Därefter lades deglarna i en exsickator i minst 30 minuter för att svalna. Torrsubstans (TS) analyserades för råmaterial, SSP samt precipitat från försök i labbskala samt uppskalning med dekanter. Även ärtproteinisolat analyserades. Alla prover analyserades i triplikat.

Ekvation 4 användes för att beräkna torrsubstans i procent:

$$\text{Torrsubstans (\%)} = \left(\frac{\text{massa efter torkning (g)}}{\text{massa innan torkning (g)}} \right) \times 100 \quad 4$$

2.3.6 Proteinanalys

Till proteinanalysen användes torkade prover från torrsubstansanalysen. Proverna mortlades till pulver och överfördes till Eppendorf-rör. Skålar tillverkades av tennark som pressades till en form. I skålarna tillsattes 23–27 mg prov. Därefter utfördes proteinanalyser enligt instruktion. Proteinanalys utfördes på råmaterial, SSP samt precipitat från försök i labbskala och uppskalning med dekanter. Analys utfördes även för ärtproteinisolat.

För analysen användes Flash EA 1112 Series Protein Analyzer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Analysen utfördes enligt Dumas-metoden, vilken förutsätter att allt kväve i livsmedlet härstammar från proteiner samt att alla proteiner innehåller 16 % kväve. Under analysen var proteinfaktorn inställd på 6,25. För att beräkna proteinhalten behövde även torrsubstansen vara känd.

Ekvation 5 användes för att beräkna proteinhalt i gram:

$$\text{Proten per 100 g} = \text{torrsubstans} \times \text{proteinhalt} \times 100 \quad 5$$

2.3.7 Statistisk analys

Statistisk analys utfördes i Microsoft Excel. Skillnader mellan grupper analyserades med tvåsidigt t-test och signifikansnivån sattes till $p < 0,05$. För analyser utförda i triplikat presenteras resultaten som medelvärde $\pm$ standardavvikelse.

2.3.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) är en typ av elektrofores där proteiner separeras efter molekylmassa i en polyakrylamidgel i ett elektriskt fält. Proteiner dras mot elektroden av motsatt laddning och hastigheten av vilken proteinet migrerar beror på dess storlek. Proteiner denatureras med hjälp av Sodium Dodecyl Sulfate som bryter svaga interaktioner och får proteinerna att vecklas ut till linjära kedjor samtidigt som de får en jämnt negativ laddning (30).

Proverna laddas i brunnar i toppen av en polyakrylamidgel och ett elektriskt fält appliceras. Proteinerna vandrar sedan genom gelen mot den positiva elektroden. En proteinstandard används för att bestämma storleken på okända proteiner och därmed kan de karaktäriseras avseende molekylvikt (30). I studien användes Precision Plus Protein Dual Color Standards som visade 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 samt 250 kDa.

För analys med SDS-PAGE ska proverna vara frystorkade. Proteinkoncentrationen för varje prov ska vara känd för att kunna räkna ut rätt mängd prov i förhållande till 50 mM Tris-HCl-buffert. Baserat på en tidigare opublicerad optimering av metoden för extraherat rapsprotein användes 2 μg protein/ μL buffer.

Provet vägdes direkt i 1,5 mL Eppendorf-rör och mängden hölls under 2 mg för att undvika senare läckage. Den mängd 50 mM Tris-HCl-buffert som krävdes för att uppnå önskad proteinkoncentration beräknades och tillsattes till Eppendorf-röret. En vortexblandare användes för att säkerställa att provet var fullständigt resuspenderat. Därefter överfördes 30 μ L av provet till nya Eppendorf-rör. 10 μ L Laemmli-provbuffert tillsattes och proverna vortexblandades kort.

En förgjuten polyakrylamidgel-kassett monterades i elektroforestanken före applicering av proverna. Tris/Glycine/SDS-löpbuffert hälldes i gelhållaren samtidigt som den kontrollerades för läckage. Löpbufferten fylldes upp till markeringen "2 Gels".

Den första brunnen laddades med 5 μ L proteinstandard. Därefter laddades resterande brunnar med 10 μ L av de förberedda proverna. Locket sattes på tanken och strömkablarna kopplades till strömkällan (PowerPac Basic, Bio-Rad, Singapore). Spänningen ställdes in på 200 V och elektroforesen startades. För att säkerställa att elektroforesen hade startat kontrollerades att bubblor bildades i botten av gelen. När de blå banden med spärfärg nådde botten stängdes strömmen av.

Locket togs bort och kassetten lyftes ut. Klämmorna lossades för att frigöra kassetten och de två plattorna separerades vid pilarna med hjälp av öppningsverktyget. För att lossa gelen från kassetten sköljdes den med destillerat vatten. Gelen överfördes därefter försiktigt till en plastbehållare med en liten mängd destillerat vatten för att förhindra uttorkning. Slutligen överfördes den till en svart UV/stain-free-bricka för analys i ett avbildningssystem (GelDoc Go, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3. Resultat och diskussion

I detta kapitel presenteras resultaten tillsammans med tillhörande diskussion för respektive delmoment.

3.1 Labbskala

3.1.1 Extraktion av rapsprotein med seriell fällning

I Tabell 1 sammanfattas resultat där våtvikt, torrsustans och protein redovisas för rapsfrökaka och precipitat. pH 7 genererade mest precipitat i vikt ($9,11 \pm 1,27$ g) följt av pH 4,5 ($5,96 \pm 0,42$ g), minst gav pH 3 ($1,27 \pm 0,04$ g). Högst TS-halt erhöles vid pH 7 ($2,24 \pm 0,27$) och pH 4,5 ($1,71 \pm 0,05$ g), även här gav pH 3 lägst ($0,10 \pm 0,02$ g). Den största mängden protein gav pH 4,5 ($1,48 \pm 0,06$ g) och pH 7 ($1,39 \pm 0,11$ g), lägst gav pH 3 ($0,02 \pm 0,00$ g). Vikten, TS och proteinmängden minskade med sjunkande pH, med undantag för pH 4,5 som avvek från denna trend genom en relativt hög mängd precipitat. Detta kan förklaras av att den seriella pH-fällningen innebär att material avlägsnas stegvis vid varje pH-steg, vilket resulterar i en successivt minskad mängd kvarvarande material.

Tabell 1. Våtvikt, TS och proteininnehåll i rapsfrökaka och precipitat i labbskala.

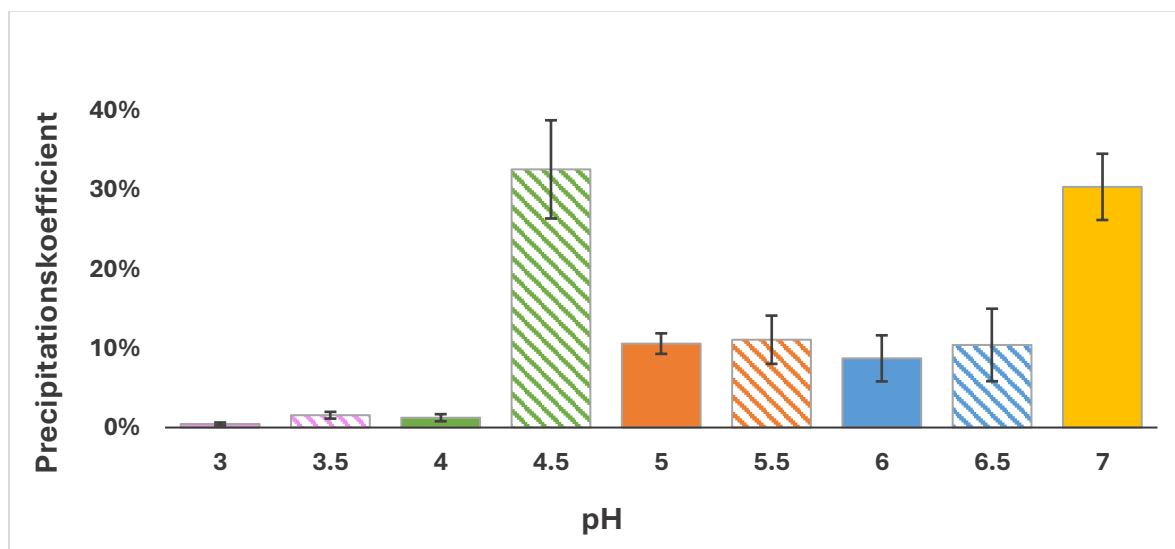
Startmaterial			
	Vikt (g)	Torrsubstans (g)	Protein (g)
Rapsfrökaka	50,0 ± 0,04	47,3 ± 0,03	13,6 ± 0,21
Precipitat			
	Vikt (g)	Torrsubstans (g)	Protein (g)
pH 7	9,11 ± 1,27	2,24 ± 0,27	1,39 ± 0,11
pH 6,5	4,95 ± 0,17	0,97 ± 0,26	0,46 ± 0,11
pH 6	4,45 ± 1,34	0,79 ± 0,29	0,41 ± 0,19
pH 5,5	4,60 ± 0,46	0,86 ± 0,11	0,50 ± 0,06
pH 5	3,10 ± 0,23	0,68 ± 0,10	0,49 ± 0,03
pH 4,5	5,96 ± 0,42	1,71 ± 0,05	1,48 ± 0,06
pH 4	1,63 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,01
pH 3,5	1,62 ± 0,11	0,17 ± 0,02	0,07 ± 0,01
pH 3	1,27 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,00
Total vikt (g)	36,69	Totalt protein (g)	4,88

Extraktionskoefficienten beskriver hur mycket av proteinerna från startmaterialet som lyckas bli lösliga i LLP. En hög extraktionskoefficient ger möjlighet att få ut mer proteiner från råmaterialet. Ett högre extraktions-pH (pH 12) har i andra studier gett högre extraktionskoefficient (59 %) men så höga pH-värden riskerar att försämra råmaterialet genom oxidation, vilket leder till mörkare färg och bitter smak. Därför valdes pH 10,5 som en kompromiss mellan högt utbyte och acceptabla sensoriska egenskaper (14).

Den genomsnittliga extraktionskoefficienten var 34 ± 6 %, där replikaten varierade mellan 28–39 %. Detta var lägre än vad som observerats i en tidigare studie (14), där ett värde på 52 ± 2 % rapporterades. Skillnaden kan delvis bero på att extraktionen i den tidigare studien genomfördes under fyra timmar vid pH 10,5, medan extraktionstiden i detta försök var en timme. Även centrifugeringstiden skiljde sig, samma centrifug och inställningar användes, men proverna centrifugerades i 20 minuter jämfört med 10 minuter i detta försök.

Variation mellan replikaten kan bero på skillnader i extraktionsförhållanden, exempelvis i råmaterialets sammansättning samt i pH-justering under extraktionen. Trots att proverna mortlades före proteinanalys användes små provmängder vid analysen, vilket kan ha bidragit till variation mellan proverna. Det kan inte uteslutas att olika delar av provets sammansättning representerades i varierande grad mellan analyserna. En möjlig felkälla kan även vara användningen av olika modeller av pH-mätare. För replikat 1 och 3 användes en pH-mätare med trepunktskalibrering och för replikat 2 en modell med tvåpunktskalibrering, detta kan ha påverkat precisionen vid pH-justeringen.

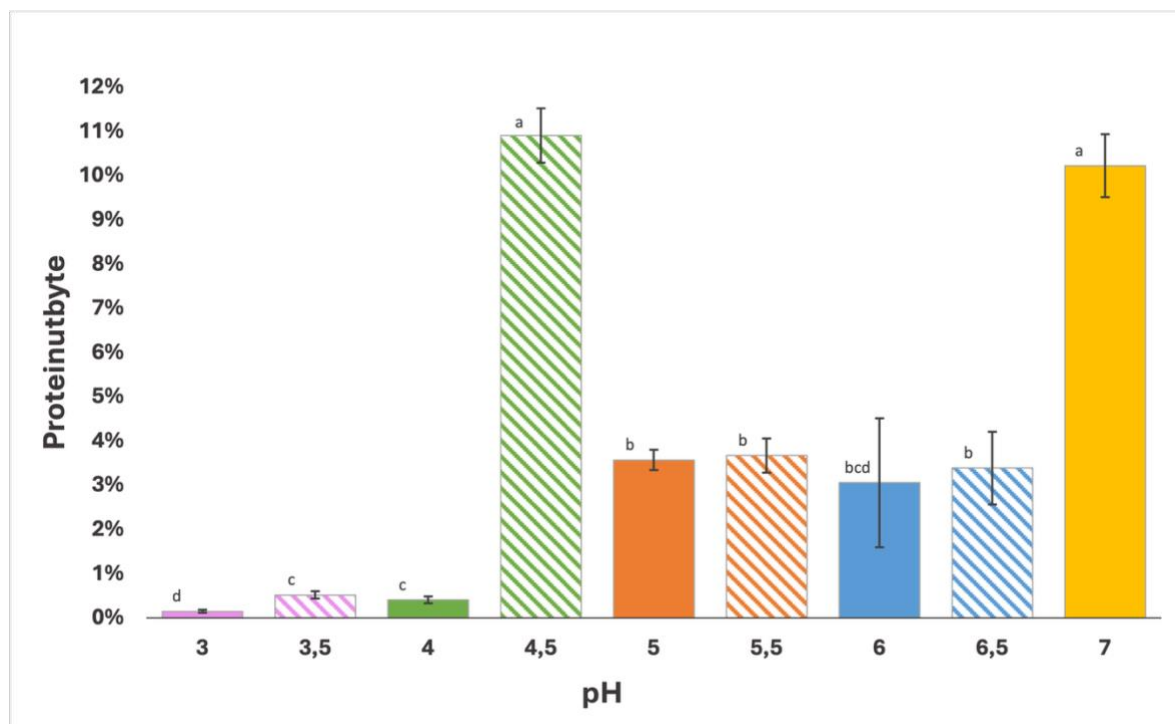
Precipitationskoefficienten beskriver hur stor andel av proteinerna från LLP som har hamnat i precipitatet. Stor variation observerades mellan pH-stegen (Figur 2) där pH 4,5 (33 %) och 7 (30 %) gav högst precipitationskoefficient och pH 3 (0,5 %) gav lägst.



Figur 2. Precipitationskoefficient i labbskala vid seriell pH-fällning av rapsprotein. Data visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse ($n = 3$).

Att även precipitationskoefficienten uppvisade lägre värden vid successivt lägre pH, medan pH 4,5 avvek genom ett relativt högt värde, följer samma mönster som tidigare observerats. Detta antas bero på samma bakomliggande faktor som tidigare beskrivits.

Proteinutbytet varierade mellan pH-stegen (Figur 3), där pH 4,5 gav det högsta utbytet (11 %) följt av pH 7 (10 %) och 5,5 (4 %). Efter pH 4,5 observerades en tydlig minskning vid de lägre pH-värdena. Skillnaderna mellan flera av pH-stegen var signifikanta ($p < 0,05$).



Figur 3. Proteinutbyte i labbskala vid seriell pH-fällning av rapsprotein. Data visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse ($n = 3$). Olika bokstäver anger signifikanta skillnader mellan grupper ($p < 0,05$). Grupper med samma bokstav skiljer sig inte signifikant åt.

Utbytet för fällning vid pH 4,5 och 7 gav signifikant högst utbyte jämfört med de andra pH-nivåerna. Tredje högsta utbyte gav precipitering vid pH 5, 5,5, 6 och 6,5. Utbytet från dessa kunde inte skiljas åt statistiskt. Lägst utbyte gav precipitering vid pH 3–4, där pH 3 gav signifikant lägst utbyte av samtliga testade nivåer. Detta följer samma mönster som tidigare observerats. Cruciferin, napin och oleosin utgör merparten av proteinerna i raps. Deras pI på 7,2, 6,5 respektive 11 skulle kunna vara en anledning till att fällningen vid pH 7 gav ett av de högre utbytena.

Trots relativt låga extraktionskoefficienter, precipitationskoefficienter och proteinutbyte gav försöken tydliga skillnader mellan de olika fällnings-pH. Resultaten bedömdes därför vara tillräckliga som underlag för vidare försök i pilotskala.

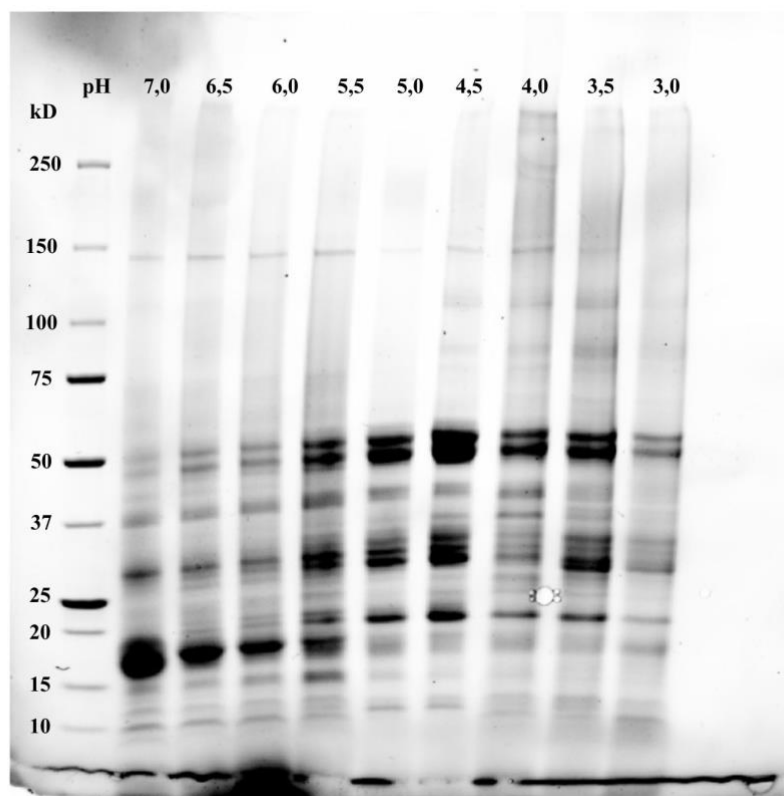
3.1.2 SDS-PAGE

Resultatet från SDS-PAGE visas i Figur 4. Fältet längst till vänster visar proteinstandarder i kilodalton (kDa) och till höger om standarderna följer precipitaten från de olika pH-värdena i fallande ordning. En markerad linje betyder närvaro av ett protein av samma storlek. Vid en hög koncentration blir linjen mer markerad. Resultatet visar på skillnader i proteinsammansättning för olika precipitations-pH.

Molekylvikten för cruciferin i nativ form är 300–310 kDa och består av sex subenheter på 50 kDa. För 50 kDa kan en distinkt linje utläsas för pH 5,5–3,5, där pH 4,5 innehar den starkaste linjen. Övriga pH värden har en svagare linje vid 50 kDa. Varje subunit består även av en alfa-kedja med molekylvikten 29–33 kDa och en beta-kedja med 21–23 kDa. Även dessa två spannar starkt färgade linjer mellan pH 5,5–3,5 med sitt maximum vid pH 4,5. Vid pH 4,5 noterades ett högt utbyte och resultatet visar att merparten av proteininslagen i precipitatet är cruciferin. Då övriga proteiner har lägre molekylvikt, under 18 kDa, är troligtvis merparten av proteinerna med högre molekylvikt cruciferin. pI för cruciferin är 7,2, men de lägre pH-värdena indikerar en högre koncentration.

Molekylvikten för napin är 12,5–14,5 kDa som i sin tur består av två polypeptidkedjor om 4,5 respektive 10 kDa. Analysen visar linjer vid molekylvikt 15–10 kDa vid de högre pH-värdena, pH 7–5,5. Vid lägre pH-värden blir linjerna svagare. pI för napin är 11 vilket kan förklara att en större mängd är löslig vid de högre pH-värdena och att napin-protein därför inte hamnar i precipitatet som är det som analyserats med SDS-PAGE i denna studie. Samtliga linjerna är svaga vilket indikerar en låg koncentration. En förklaring kan vara polypeptidkedjornas låga molekylvikt som går utanför standardens spann och då missas.

Oleosiner har en molekylvikt på 18 kDa. Genom analysen går att utläsa en starkt färgad linje i fältet för pH 7, pH 6,5, pH 6 och pH 5,5. Därefter avtar styrkan med lägre pH. pI för oleosiner är 6,5 vilket kan styrka att det rör sig om oleosiner.



Figur 4. SDS-PAGE-resultat över proteinsammansättning i precipitat från seriell pH-fällning av rapsprotein.

Sammantaget tyder SDS-PAGE-resultaten på att proteinsammansättningen i precipitat fällda vid högre pH-värden domineras av napin och oleosin medan vid lägre pH-värden dominerar istället cruciferin. I denna analys har endast de tre mest förekommande proteinerna cruciferin, napin och oleosin ingått. Detta på grund av begränsad information i litteraturen gällande övriga proteiner och deras molekylvikt. Utan kompletterande analys av aminosyrasammansättning kan resultatet inte tas med säkerhet.

3.2 Pilotskala

De tre pH-nivåer som valdes för pilotskala var 4,5, 5,5 och 7. pH 4,5 och 7 uppvisade signifikant högst proteinutbyte. När hänsyn togs till felstaplarna framstod pH 5–6,5 som en grupp utan signifikanta skillnader sinsemellan, där pH 5,5 valdes som en representativ mellannivå.

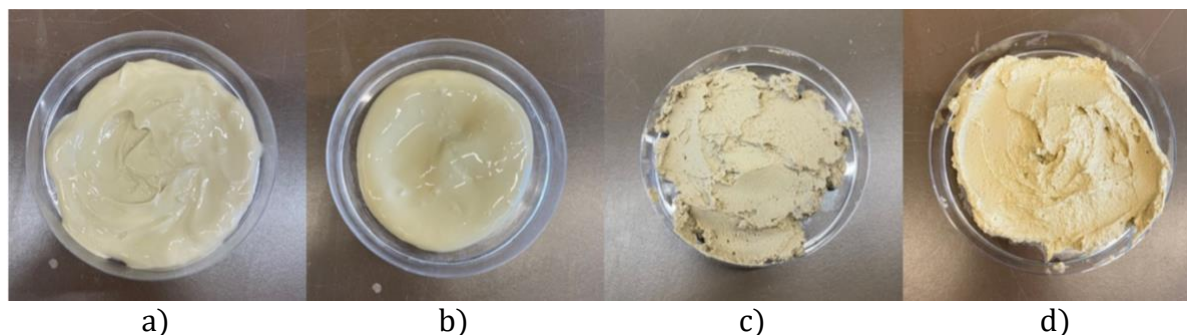
I Tabell 2 sammanfattas resultat från pilotskala med dekanter där vikt, torrsubstans och protein redovisas för rapsfrökaka och precipitat. I försöket med den seriella fällningen genererade pH 7 mest precipitat i både vikt och mängd protein. Precipitatet från pH 7 vägde $1698 \pm 0,00$ varav $136,7 \pm 2,05$ g protein. pH 5,5 och 4,5 gav betydligt mindre massa och stod för $52,41 \pm 0,56$ respektive $53,15 \pm 0,69$ g protein. Tillsammans gav de tre pH-värdena sammanlagt 2587 g precipitat varav 242,3 g protein.

Jämfört med kontrollextraktionen, där pH 10,5 följdes av ett precipiterings-pH på 3,5, gav seriell fällning mindre massa precipitat och mindre mängd protein. För kontrollomgången genererades $2976 \pm 0,00$ g precipitat varav $438,0 \pm 6,47$ g protein.

Tabell 2. Vikt, TS och proteininnehåll i rapsfrökaka och precipitat i pilotskala. Seriell fällning jämfört med kontroll.

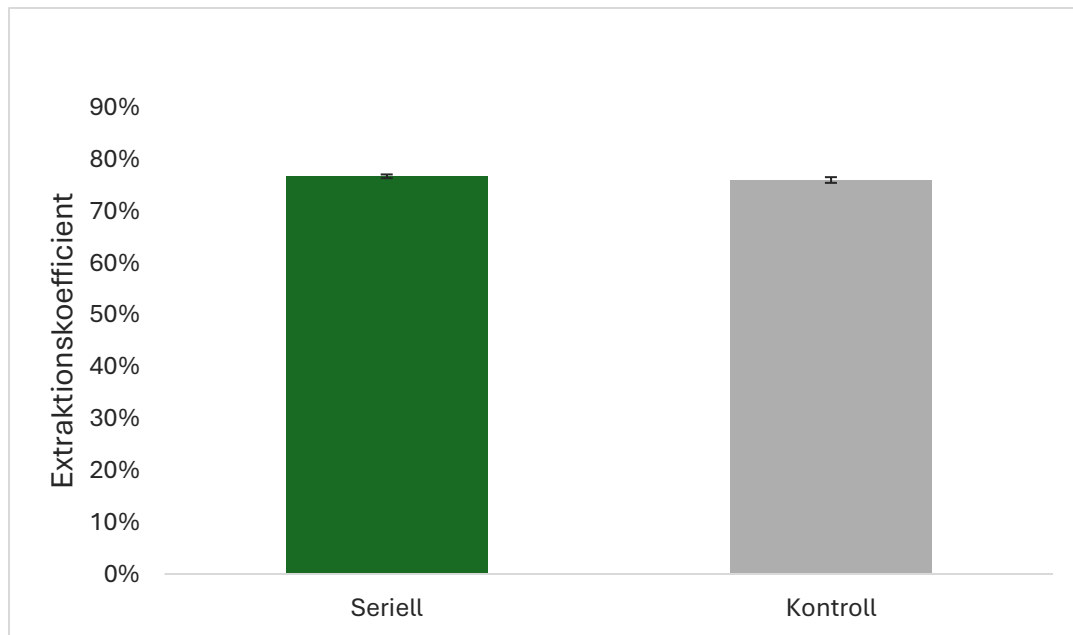
Startmaterial			
	Vikt (g)	Torrsubstans (g)	Protein (g)
Rapsfrökaka	3000 ± 0,00	2839 ± 1,98	815,8 ± 12,14
Precipitat seriell			
	Vikt (g)	Torrsubstans (g)	Protein (g)
pH 7	1698 ± 0,00	392,9 ± 3,14	136,7 ± 2,05
pH 5,5	465,5 ± 0,00	92,93 ± 1,11	52,41 ± 0,56
pH 4,5	424,0 ± 0,00	92,34 ± 0,71	53,15 ± 0,69
Totalvikt	2587	Totalt protein (g)	242,3
Precipitat kontroll			
	Vikt (g)	Torrsubstans (g)	Protein (g)
pH 3,5	2976 ± 0,00	809,1 ± 2,47	438,0 ± 6,47

Precipitat från seriell fällning samt från kontrollextraktion syns i Figur 5. De visar tydliga skillnader i konsistens där pH 7 och 3,5 är fastare än övriga. Detta kan kopplas till TS-halten, där pH 4,5 och 5,5 uppvisade lägre värden (22 % respektive 20 %) jämfört med pH 7 (23 %) och pH 3,5 (27 %).



Figur 5. Precipitat från seriell pH-fällning av rapsprotein i pilotskala vid pH: a) 4,5 b) 5,5 c) 7 samt från kontrollextraktion d) pH 3,5.

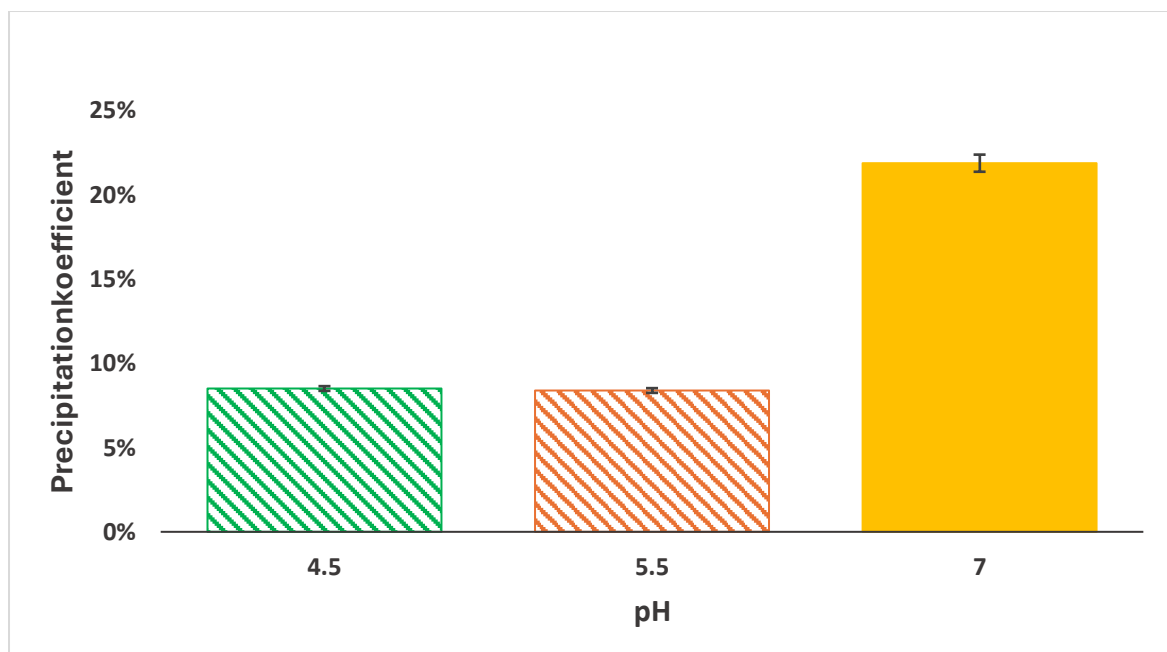
Extraktionskoefficienten från pilotskala redovisas i Figur 6. Extraktionskoefficient är hög för båda försöken, omkring 76 %. Vid båda försöken användes pH 10,5 under den första separationen. Från försöken i labbskala blev medelvärdet från extraktionskoefficienten 34 %. Även om värdet i labbskala är lägre jämfört med andra studier indikerar det att en uppskalning ger en mer effektiv extraktion i första separationen. Dekantern har sämre kapacitet att dela upp stora och små molekyler än bordscentrifugen, vilket i den första separationen kan bidra med ett tillskott av proteiner.



Figur 6. Extraktionskoefficient för seriell samt kontroll från extraktion av rapsprotein i pilotskala, baserad på jämförelse med råmaterialalets proteininnehåll.

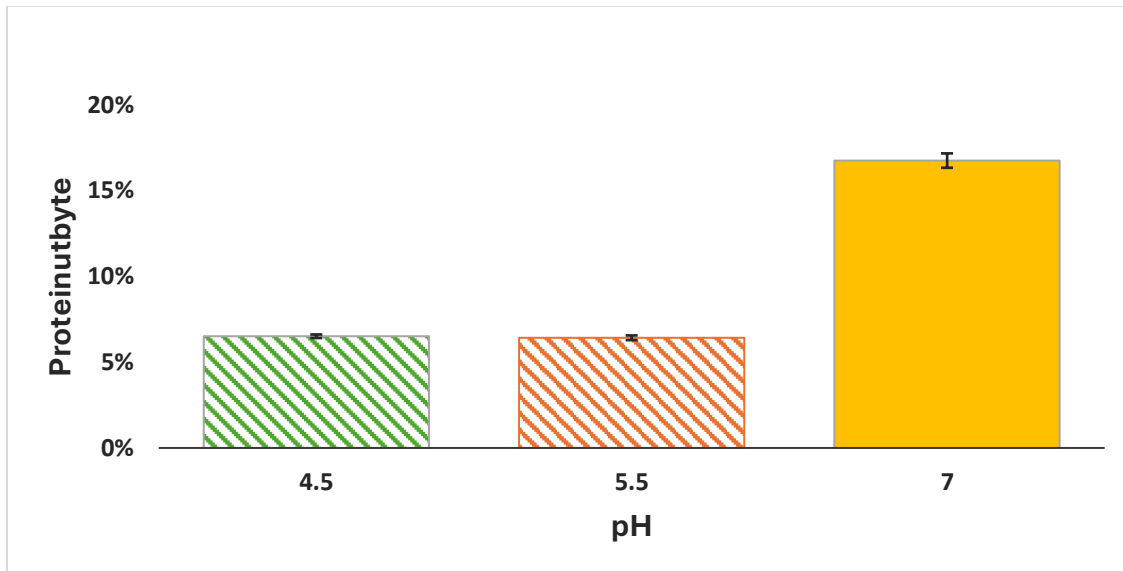
Fördelningen av precipitationskoefficienten redovisas i Figur 7. pH 7 var det pH-värde som enskilt fällde ut störst mängd proteiner med en precipitationskoefficient på 22 % följt av pH 4,5 och 5,5 som båda ligger kring 8 %. Totalt blev precipitationskoefficienten 39 % för den seriella fällningen.

I labbskala gav de tre utvalda pH-värdena en precipitationskoefficient på 74 %. Då extraktionskoefficienten i labbskala var lägre än vid pilotförsöken fanns färre proteiner att precipitera från LLP vilket troligtvis påverkade effektiviteten. En noterbar skillnad jämfört med labbskaleextraktionen var att pH 4,5 enskilt precipiterade en betydligt högre andel (33 %) av proteinerna.



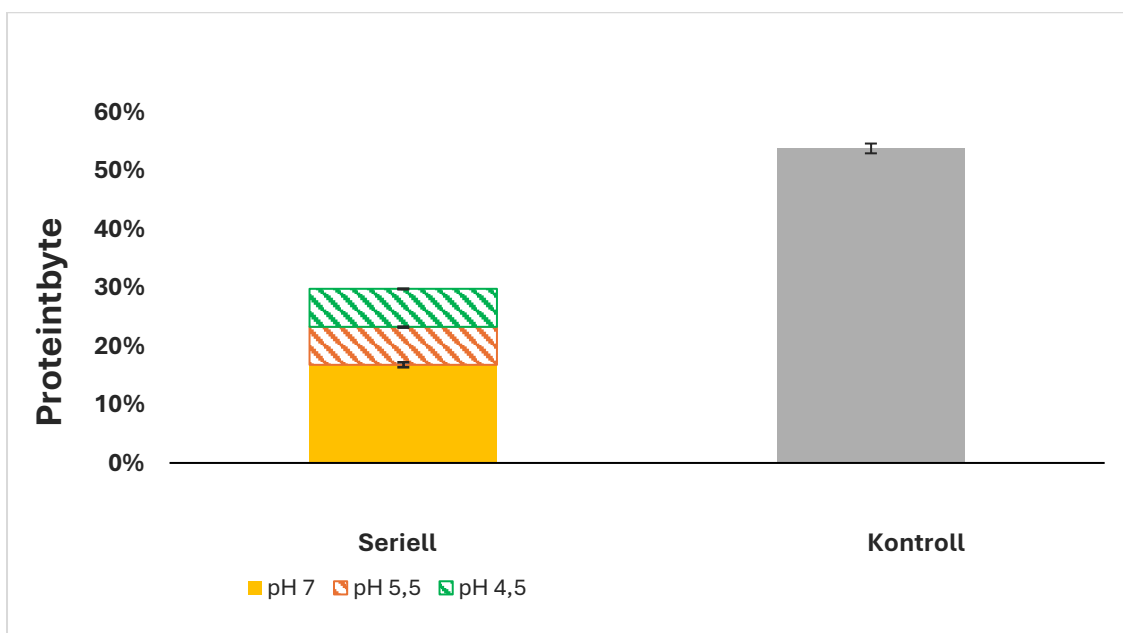
Figur 7. Precipitationskoefficient i pilotskala vid seriell pH-fällning av rapsprotein. Data visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse ($n = 3$).

Av de tre pH-värden som användes vid den seriella fällningen var det pH 7 som bidrog med högst utbyte, 17 % av proteinerna från rapsfrökakan (Figur 8). För pH 4,5 och 5,5 blev utbytet betydligt lägre, omkring 6 %. Detta kan delvis förklaras av att pH 7 utgjorde det första steget från den alkaliska extraktionen (pH 10,5), vilket innebar en större förändring i pH och därmed en mer omfattande initial utfällning.



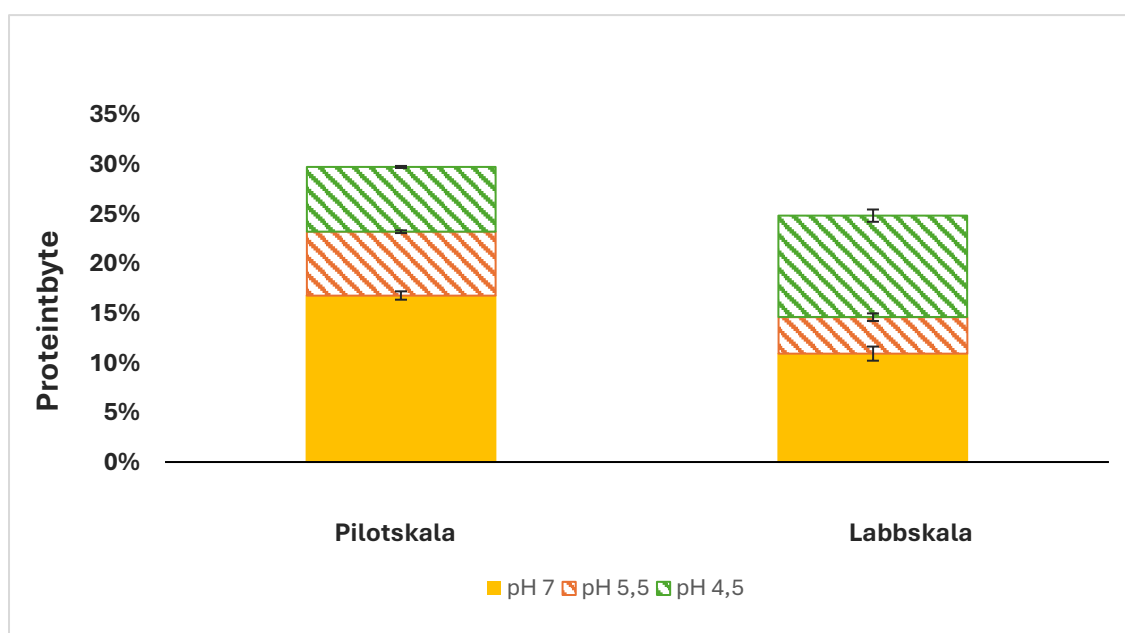
Figur 8. Proteinutbyte i pilotskala vid seriell pH-fällning av rapsprotein. Data visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse ($n = 3$).

Figur 9 visar ett staplat diagram där utbytet för den seriella fällningen jämförs med kontrollextraktionen. Resultatet visar att seriell fällning av rapsprotein med valda pH-värden och processparametrar inte ökar utbytet jämfört med fällning vid enbart pH 3,5. Utbytet för den seriella fällningen blev 30 % medan utbytet för kontrollextraktionen blev 54 %. Kontrollextraktionen överensstämmer även med en annan studie gjord på proteinextraktion från rapsfrökaka där ett utbyte på 52 % rapporterats för precipitations-pH 3,5 (10).



Figur 9. Staplat diagram över proteinutbyte för seriell fällning samt kontrollextraktion i pilotskala vid fällning av rapsprotein. Data visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse ($n = 3$).

Seriell fällning i pilotskala gav ett högre utbyte (30 %) jämfört med i labbskala (25 %) vilket redovisas i Figur 10. Båda utbyten är dock låga i jämförelse med andra studier där samma proteinfaktor använts (10). Eftersom precipitationskoefficienten var hög i pilotskala fanns mycket proteiner att fälla. Troligtvis har separeringen av proteinerna varit otillräcklig på grund av den metod och processparametrar som valdes för dekantern. De valda parametrarna baserades på resultat från en optimeringstudie (28). I studien användes en tvåstegsextraktion med saltmetoden samt precipiterings-pH 3,5 för rapsproteinextraktion vilka visade sig ej optimala för seriell fällning. Den första precipiteringsseparationen med pH 7 fungerade väl, men när supernatanten återcirkulerades med sänkt pH blev motståndet för lågt och proteinerna kunde inte separeras. Detta gällde för både pH 5,5 och efterföljande pH 4,5. För att öka utbytet i en seriell fällning skulle framtida studier kunna undersöka justering av differentialhastighet, acceleration, pumpastighet samt weir disc, då dessa parametrar påverkar både uppehållstid och separationsgrad.



Figur 10. Staplat diagram över proteinutbyte i pilotskala och labbskala. Data visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse ($n = 3$).

3.3 Extrudering

Ett försök genomfördes att mata rapsproteinslurryn i vattenporten i extrudern utan föregående torksteg. Försöket visade dock att slurryn hade för hög viskositet för att möjliggöra ett stabilt och jämnt flöde genom systemet. Ojämn matning observerades och förekomst av luftbubblor påverkade processens stabilitet negativt, vilket ledde till backflow och extrudern fick stängas ner. Baserat på dessa observationer bedömdes metoden som olämplig under de aktuella processförhållandena. Istället rekommenderades att råmaterialet frystorkas och mals för att sedan matas i pulverform i kombination med ärtprotein för att säkerställa ett stabilt processflöde.

För att få ihop mer material till extrudering gjordes en extra extraktion i pilotskala med precipiterings-pH 3,5. Detta blandades med det precipitat som samlats från den seriella fällningen i pilotskala och frystorkades samt mixades till ett pulver. För att uppnå en fiberlikande struktur genom extrudering krävs minst 60 % protein i det torra materialet. Av

denna anledning blandades rapsen med kommersiellt ärtproteinisolat. Dessutom utgör ärta och raps en lämplig kombination eftersom ärtans höga innehåll av lysin kompletterar rapsens aminosyrasammansättning (29).

I Tabell 3 redovisas de olika pulvren som användes för att tillverka köttanalogen. Frystorkat precipitat från seriell fällning i pilotskala och frystorkat precipitat från extra extraktion blandades med kommersiellt ärtproteinisolat. Blandningen innehöll totalt 1491 g protein varav 566 g kom från raps, vilket motsvarar 38 % av proteinerna.

Tabell 3. Vikter och proteininnehåll på startmaterial samt andel från raps.

Startmaterial		
	Vikt (g)	Protein (g)
Raps seriell	778	343
Raps extra	428	222
Ärtproteinisolat	1021	925
Total	2226	1491
Protein från raps		
	Vikt (g)	Andel (%)
Raps seriell + extra	565	38

Vid extruderingen utvärderades flera olika processinställningar, vilka presenteras i Tabell 4. Den mest optimala konsistensen uppnåddes när vattenhalten var 62,5 %. När cooling die-temperaturen sänktes till 40 °C fick extrudatet en mer muskelliknande struktur. När den sänktes ytterligare, till 30 °C observerades en mer gummiaktig textur och ökad bitterhet. Andelen protein i den färdiga produkten blev 25 % med en vattenhalt på 62,5 %.

Tabell 4. Extruderingsinställningar och bedömning av smak och textur för 50:50 raps- och ärtprotein.

Cooling die (°C)	Heating zone (°C)				Rpm	Moisture	Massflow	Anteckningar
	1	2	3	4				
50	40	60	80	80	700	70	3	
50	40	60	80	100	700	70	3	
50	40	70	90	110	700	70	3	
50	40	80	100	120	700	70	3	
50	40	80	110	130	700	70	3	
50	40	80	110	130	700	67,5	3	
50	40	80	110	130	700	65	3	
50	40	80	110	130	700	62,5	3	Godkänd textur och smak
40	40	80	110	130	700	62,5	3	Mer muskelliknande struktur

30	40	80	110	130	700	62,5	3	Gummiaktig, ökad bitterhet
20	40	80	110	130	700	62,5	3	Ökad bitterhet

Figur 11 visar köttanalogen producerad vid en vattenhalt på 62,5 % med en cooling die-temperatur på 40 °C, där en fiberliknande struktur kan observeras. Smakmässigt observerades en svag bitterhet samt en basisk bismak som påminde om bikarbonat. Bitterheten kan härledas till rapsfrökakans innehåll av glukosinolater och fenoliska föreningar, medan den basiska smaken sannolikt kan kopplas till de syror och baser som använts i flera steg under extraktionen. Bitterhet kan också förstärkas under extraktionsprocessen eftersom fenoliska föreningar extraheras tillsammans med proteinerna under alkaliska förhållanden, samtidigt som glukosinolater kan brytas ner till föreningar med bitter och skarp smak (7).

Resultaten indikerar även att högre cooling die-temperaturer kan bidra till en minskad bitterhet, då en reducerad bitterhet observerades vid de högre temperaturena.



Figur 11. Köttanalog framställd genom extrudering av 50:50 raps- och ärtprotein vid 62,5 % vattenhalt och cooling die 40 °C.

Resultaten visar att det är möjligt att framställa en köttanalog med fiberliknande struktur från en 50:50-blandning av raps- och ärtprotein, förutsatt att råmaterialet kan matas genom extrudern med ett jämnt flöde. Om smaken förbättras kan produkten användas som ett svensktillverkat alternativ till kött, exempelvis i form av grytbitar eller färs.

4. Slutsats

Utbytet vid extraktion av protein från kallpressad rapsfrökaka ökar inte genom seriell fällning av protein jämfört med den etablerade metoden att fälla endast vid pH 3,5. Detta visade sig både i labbskala och i pilotskala. Den seriella processen visade sig skalbar till pilotskala och utbytet blev högre i pilotskala jämfört med labbskala. Utbytet för seriell fällning i pilotskala blev dock lägre (30 %) än utbytet för den kontrollerade extraktion som gjordes med precipitations-pH 3,5 (54 %). Andra inställningar för dekantern kan troligtvis påverka utbytet. De använda dekanterinställningarna gav inte proteinerna möjlighet att separera effektivt vid pH 5,5 och 4,5 vilket visar på komplexitet gällande de parametrar som kan varieras vid en uppskalning.

Resultatet från SDS-PAGE indikerar att cruciferin fälls ut i högre koncentration vid de lägre pH-värdena, medan oleosin och napin fälls ut vid de högre pH-värdena. Detta antyder även att cruciferin tenderar att fällas ut vid lägre pH än proteinets pI 7,2. Cruciferin hade sin högsta koncentration vid pH 4,5 och oleosin vid pH 7. Napin fälldes ut i högst koncentration mellan pH 7–5,5, men visade generellt på en låg koncentration. Ytterligare analys med kompletterande proteinstandard hade kunnat förtydliga resultatet genom att fånga upp napinets polypeptidkedjor. SDS-PAGE är en metod som separerar proteiner utifrån deras storlek. För att ta reda på vilka proteiner det faktiskt rör sig om behöver metoden kompletteras med analys av aminosyrasammansättning.

Det går inte att mata in precipitat från raps i extruderns vattenport. Detta på grund av för hög viskositet på slurryn. Det går att extrudera precipitat från raps om det istället frystorkas och mals till pulver samt kombineras med ärtproteinisolat. Det var möjligt att skapa en köttanalog med fiberlik struktur från en blandning av raps- och ärtprotein. Den mest gynnsamma strukturen i denna studie erhöles vid en vattenhalt på 62,5 % och en cooling die-temperatur på 40 °C, baserat på visuell och sensorisk bedömning av struktur och upplevt tuggmotstånd. Om smaken förbättras kan produkten marknadsföras som ett cirkulärt och hållbart alternativ till kött med hög proteinkvalitet.

5. Framtida studier

Seriell pH-fällning i dekanter kan vidare undersökas, med justerade processinställningar för det andra separationssteget, för att utvärdera om proteinutbytet kan förbättras ytterligare. Relevanta processparametrar att undersöka kan vara acceleration, differentialhastighet och weir disc. En högre acceleration och en låg differentialhastighet ger en mer effektiv separationen, medan en längre strand ger en torrare fas. Det kan även vara relevant att undersöka andra extraktions- och separationsmetoder, som exempelvis ultraljud- eller enzymassisterad extraktion, samt kombinationer av dessa för att öka det totala utbytet. Då temperatur har stor påverkan på proteiners löslighet skulle även olika temperaturer vid extraktionen vara intressant att studera.

De köttanaloger som producerades vid extruderingen kommer att analyseras vidare av Olena Prykhodko som kommer att undersöka nedbrytning och biotillgänglighet av proteinerna i en in vitro-modell som simulerar övre delen av mag- och tarmsystemet. Vidare hade det varit önskvärt att utföra texturanalys för att se hur de producerade köttanalogerna i denna studie står sig jämfört med andra köttanaloger. Då smaken upplevdes negativ hade även studier om hur denna kunnat förbättras varit önskvärt. Antingen genom att förändra extraktionsmetoden eller genom att lägga till ytterligare processteg, såsom ultra- eller diafiltrering, för att bli av med salter.

Referenser

1. United Nations Environment Programme. Food Waste Index Report 2024. Nairobi: United Nations Environment Programme, 2024.
2. Rockström J, Thilsted S, Willett W, Gordon L, Herrero M, Hicks C, et al. The EAT-Lancet Commission on healthy, sustainable, and just food systems. *The Lancet*. 2025;406(10512):1625–1700.
3. Poore J, Nemecek T. Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*. 2018;360:987–992.
4. Nydahl M. Matfetter. In: Nylander A, Marklinder I, Nydahl M, editors. *Livsmedelsvetenskap*. 3 ed. Lund: Studentlitteratur; 2024. p. 173–208.
5. United States Department of Agriculture FAS. Production – Rapeseed. [Internet]: USDA Foreign Agricultural Service; n.d. [14 april 2026]. Available from: <https://www.fas.usda.gov/data/production/2226000>.
6. Jordbruksverket. Skörd av spannmål, trindsäd och oljevaxter 2025. Preliminär statistik för län och riket. [Internet]: Jordbruksverket; 2025 [20 april 2026]. Available from: <https://jordbruksverket.se/om-jordbruksverket/jordbruksverkets-officiella-statistik/jordbruksverkets-statistikrapporter/statistik/2025-12-12-skord-av-spannmal-trindsad-och-oljevaxter-2025.-preliminar-statistik-for-lan-och-rikt#oljevaxter>.
7. Wanasundara J, Kapel R, Albe-Slabi S. Proteins from Canola/Rapeseed – Current Status. In: Nadathur S, Wanasundara J, Scanlin L, editors. *Sustainable Protein Sources*. 2 ed: Academic Press; 2024. p. 285–309.
8. Gunnarshögs Gård. Tillverkning. [Internet]: Gunnarshögs Gård; n.d. [14 april 2026]. Available from: <https://www.gunnarshog.se/tillverkning/>.
9. Canola Council of Canada. Processing Canola. [Internet]: Canola Council of Canada; 2026 [16 april 2026]. Available from: <https://www.canolacouncil.org/about-canola/processing/>.
10. Ahlström C, Thuvander J, Rayner M, Mayer Labba I, Sandberg A, Östbring K. Pilot-Scale Protein Recovery from Cold-Pressed Rapeseed Press Cake: Influence of Solids Recirculation. *Processes*. 2022;10(3):557.
11. Aider M, Barbana C. Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trends Food Sci Technol*. 2011;22(1):21–39.
12. Karabulut G, Gultekin Subasi B, Ivanova P, Gökşen G, Chalova V, Capanoglu. Towards sustainable and nutritional-based plant protein sources: A review on the role of rapeseed. *Food Res Int*. 2025;202:115553.
13. Östbring K, Malmqvist E, Nilsson K, Rosenlind I, Rayner M. The Effects of Oil Extraction Methods on Recovery Yield and Emulsifying Properties of Proteins from Rapeseed Meal and Press Cake. *Foods*. 2019;9(1):19.
14. Ahlström C, Thuvander J, Rayner M, Matos M, Gutiérrez G, Östbring K. The Effect of Precipitation pH on Protein Recovery Yield and Emulsifying Properties in the Extraction of Protein from Cold-Pressed Rapeseed Press Cake. *Molecules*. 2022;27(9):2957.
15. Sultan Z, Ashfaq A, Jahan K, Qadri O, Younis K, Yousuf O. pH shift extraction technique for plant proteins: A promising technique for sustainable development. *Energy Nexus*. 2024;16:100329.
16. Cruz-Solis I, Ibarra-Herrera C, del Refugio Rocha-Pizana M, Luna-Vital D. Alkaline Extraction–Isoelectric Precipitation of Plant Proteins. In: Hernández-Álvarez A, Mondor M, Nosworthy M, editors. *Green Protein Processing Technologies from Plants*: Springer International Publishing; 2023. p. 1–29.

17. Chemat F, Rombaut N, Sicaire A, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier A, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem.* 2017;34:540–560.
18. Penas E, Hernandez-Ledesma B, Martinez-Villalueva C. Microwave-Assisted Extraction of Plant Proteins. In: Hernández-Álvarez A, Mondor M, Nosworthy M, editors. *Green Protein Processing Technologies from Plants*: Springer International Publishing; 2023. p. 211–236.
19. Kleekayai T, Khalesi M, Amigo-Benavent M, Cermeño M, Harnedy-Rothwell P, FitzGerald R. Enzyme-Assisted Extraction of Plant Proteins. In: Hernández-Álvarez A, Mondor M, Nosworthy M, editors. *Green Protein Processing Technologies from Plants*: Springer International Publishing; 2023. p. 131–178.
20. Hernández-Álvarez A, Mondor M, Nosworthy M. *Green Protein Processing Technologies from Plants*: Springer International Publishing; 2023.
21. Ohlendieck I, Harding S. Centrifugation and Ultracentrifugation. In: Hofmann A, Clokie S, editors. *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2018. p. 424–453.
22. Bylund G, Tetra Pak. Centrifugal separators and milk standardization. *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak; 2025. p. 126–127.
23. Alfa Laval. Optimizing fish processing with decanters. [Internet]: Alfa Laval; n.d. [29 april 2026]. Available from: <https://www.alfalaval.com/media/stories/food-processing/optimizing-fish-processing-with-decanters/>.
24. Flottweg. Centrifuge Speed and Acceleration. [Internet]: Flottweg; n.d. [27 april 2026]. Available from: <https://www.flottweg.com/wiki/separation-technology/centrifuge-speed-and-acceleration/>.
25. Lemitec. Laboratory decanter centrifuges. [Internet]: Lemitec; n.d. [29 april 2026]. Available from: <https://lemitec.com/en/technology>.
26. McClements D. *Plant-Based Meat: Building Meat from Plants*. Meat Less: The Next Food Revolution: Copernicus Books; 2023. p. 113–147.
27. Dekkers B, Boom R, van der Goot A. Structuring processes for meat analogues. *Trends Food Sci Technol.* 2018;81:25–36.
28. de la Cruz Padilla S. Study of the effects of the operating conditions of a decanter centrifuge on a pilot-scale protein recovery setup from cold-pressed rapeseed press cake: Lund University; 2023.
29. Zahari I, Ferawati F, Purhagen J, Rayner M, Ahlström C, Helstad A, et al. Development and Characterization of Extrudates Based on Rapeseed and Pea Protein Blends Using High-Moisture Extrusion Cooking. *Foods.* 2021;10(10):2397.
30. Bizeau J, Mertz D. Design and applications of protein delivery systems in nanomedicine and tissue engineering. *Adv Colloid Interface Sci.* 2021;287:102334.