

Solid-state fermentation av sojaokara med *Aspergillus oryzae*: effekter på proteinhalt

Skrivet av Gabriel Jönsson & Patrik Johansson

2026-05-25

Sammanfattning

Sojaokara är en restprodukt som kommer från produktion av sojabaserade livsmedel så som tofu och sojamjölk. Substratet innehåller betydande näringsämnen och är rikt på kostfiber och protein. Sojaokara har en begränsad hållbarhet och medför utmaningar för fortsatt användning i industrin. Med fokus på cirkulär livsmedelsproduktion av näringsrik restström är sojaokara ett attraktivt fokusområde för forskning. En möjlig metod att förlänga hållbarheten och utöka användningsområdet för substratet via solid state fermentation (SSF). Filamentösa svampar används för att berika substratet med fermentering genom nedbrytning av substratet och tillväxt i biomassa, vilket potentiellt kan omvandla näringsämnena.

I detta arbete används *Aspergillus oryzae* för att fermentera sojaokara i syfte att öka proteinhalten samt identifiera och optimera processparametrar för tillväxt och ökad proteinhalt. Projektet utförs i kolaboration med ett företag som specialiserar sig på fermentering i bioreaktorer, samarbete är baserade på befintliga principer och diskuteras och behandlas med handledare och processtekniker på företaget. Arbetet görs iterativt efter den kapacitet som finns tillgänglig inom de faciliteter som företaget besitter, initialt undersöks kompatibilitet mellan substrat och befintlig bioreaktors processbehandling. Vidare studeras parametrar som behandlar substrat matrix, vattenhalt, syresättning av substrat, kolkälla samt fermenteringsförlopp. Analysmetod för proteinhalt som använts genomgående är Dumas-metoden samt visuella observationer av biomassan.

Resultaten visade att den process som använts i befintlig bioreaktor ej kunde appliceras på substratet i studien, den höga vattenhalten och kompakta strukturen bedömdes ge ogynnsamma förhållanden för tillväxt. Modifiering av matrix struktur och stabilitet samt pastöriseringsmetod för kontroll av vattenhalt resulterade i en förbättring av tillväxtförhållanden visuellt observerade vid skördetillfälle av fermenterat substrat. Efter diskussion med representant från företaget observerades en förtidig sporulering, detta resulterade i att vetemjöl adderades som lättillgänglig kolkälla i olika mängder och behandlingsprocesser. Resultaten visade en tydlig ökning i biomassa vid ökande tillsats av kolkälla, där 10-15% tillsatt vetemjöl mot blöt vikt av okara visade bästa resultat. Slutligen observerades fermenteringsförloppet, där skörd utfördes med intervallerna två till fem dygn. Förloppet för samtliga försök följde en liknande trend vilket resulterade i bästa skördetillfälle visade sig vara efter fyra dygns fermentering, oberoende av mängd tillsatt kol eller behandlingsprocess av vetemjölet.

Studien visar att sojaokara har god potential som substrat för SSF med *A. oryzae*. Resultaten visar att processparametrar såsom substratets struktur, vattenhalt, tillgång till kolkälla och fermenteringstid har en central roll för att uppnå gynnsamma tillväxtförhållanden, ökad biomasstillväxt och förändring i proteinhalt. Arbetet indikerar även att optimering av processer är en avgörande faktor för att möjliggöra effektiv fermentering av sojaokara och för vidare utveckling av substratet som näringsrik restström.

Nyckelord: Sojaokara, solid state fermentation (SSF), *A. oryzae*, filamentösa svampar, proteinhalt.

Abstract

Soy okara is a by-product generated from the production of soy-based foods such as tofu and soy milk. The substrate contains significant nutrients and is rich in dietary fiber and protein. Soy okara has limited shelf life, which creates challenges for its continued use in industry. With a focus on circular food production utilizing nutrient-rich side streams, soy okara represents an attractive area of research. One possible method to extend shelf life and broaden the application area of the substrate is solid-state fermentation (SSF). Filamentous fungi are used to enrich the substrate through fermentation by degradation of the substrate and biomass growth, which may potentially transform the nutrients.

In this study, *Aspergillus oryzae* was used to ferment soy okara with the aim of increasing protein content as well as identifying and optimizing process parameters for growth and increased protein content. The project was carried out in collaboration with a company specialized in fermentation using bioreactors. Processes were based on existing principles and discussed and evaluated together with supervisors and process engineers at the company. The work was conducted iteratively according to the capacity available within the facilities possessed by the company. Initially, compatibility between the substrate and the process treatment of the existing bioreactor was investigated. Furthermore, parameters related to substrate matrix, moisture content, substrate aeration, carbon source and fermentation progression were studied. The analytical method used throughout the study for protein determination was the Dumas method together with visual observations of the biomass.

The results showed that the process used in the existing bioreactor could not be directly applied to the substrate used in this study. The high moisture content and compact structure were assessed to provide unfavorable conditions for growth. Modification of matrix structure and stability, as well as sterilization methods for moisture control, resulted in improved growth conditions, visually observed at the harvesting stage of the fermented substrate. Following discussions with representatives from the company, premature sporulation was observed. This resulted in the addition of wheat flour as an easily accessible carbon source in different quantities and treatment processes. The results showed a clear increase in biomass with increasing carbon source addition, where 10–15% added wheat flour based on the wet weight of okara showed the best results. Finally, the fermentation progression was observed, where harvesting was performed at intervals between two and five days. The progression of all experiments followed a similar trend, resulting in the optimal harvesting time being identified after four days of fermentation, independent of the amount of added carbon source or treatment process of the wheat flour.

The study demonstrates that soy okara has good potential as a substrate for SSF with *A. oryzae*. The results show that process parameters such as substrate structure, moisture content, availability of carbon source and fermentation time play a central role in achieving favorable growth conditions, increased biomass growth and changes in protein content. The work further indicates that process optimization is a decisive factor for enabling efficient fermentation of soy okara and for the further development of the substrate as a nutrient-rich side stream.

Keywords: Soy okara, solid state fermentation (SSF), *A. oryzae*, filamentous fungi, protein content.

Förord

Detta arbete är ett avslut på vår kandidatutbildning i livsmedelsteknik på Lunds tekniska högskola. Arbetet har gett oss möjligheten att fördjupa våra kunskaper inom fermentering med filamentösa svampar.

Vi vill tacka vår handledare Borbala Erdei, vår examinator Åsa Håkansson, alla på Dapibuset som bidragit med kunskap, utrustning och råvaror, men speciellt Anna Barjuan för hennes expertis och guidning vid bollande av idéer.

Innehållsförteckning

Innehåll

Sammanfattning	1
Abstract	2
Förord.....	3
Innehållsförteckning	4
Syfte och frågeställning	6
Syfte	6
Frågeställning.....	6
Sojaböna.....	6
Ursprung och domesticering	6
Användning.....	7
Okara.....	8
Näringsmässig sammansättning.....	8
Bioaktiva ämnen	8
Strukturell uppbyggnad.....	9
Okara idag.....	9
Aspergillus oryzae	9
Solid state fermentation (SSF)	10
Dapibuset	11
Material & Metod	12
Maltlösning	12
Fermenteringsprocess	13
Rörinokulering	13
Inokulering av E-kolv	13
Fermentering	14
Torrs substans.....	15
Kväveanalys för protein.....	15
Metod för optimering av substrat och fermenteringsförutsättningar	16
Resultat	18
Initieringsförsök.....	18
Pastöriseringsprocess & luftflöde	19

Tillsats av lättillgänglig kolhydrat	22
Bestämning av optimal skördetid.....	25
Diskussion.....	35
Slutsats	38
Referenser	39
Bilagor.....	41

Syfte och frågeställning

Syfte

I dagsläget kasseras större delen av sojaokaran (Vong & Liu, 2016, s. 142). Det är en restprodukt från till exempel sojamjölksstillverkning. På grund av okarans höga vattenhalt är den väldigt svår att ta vara på. Genom att fermentera okaran ökar hållbarheten och näringsämnenas biotillgänglighet, vi vill också öka proteinhalten genom att metabolisera kolhydrater och på så sätt öka den mikrobiologiska tillväxten. Tillsammans med Dapibuset vill vi ta fram ett sätt att fermentera okaran på som fungerar och som är tillförlitligt. När vi hittat ett sätt, vill vi optimera det. Tanken är att det ska kunna användas som ett standardiserat tillvägagångssätt i framtiden.

Frågeställning

1. Går det att med hjälp av filamentösa svampar (*Aspergillus oryzae*) fermentera sojaokara för att öka proteinhalten?
2. Hur mycket ökar proteinhalten?

Sojaböna

Ursprung och domesticering

Sojabönan är en av världens viktigaste baljväxter och utgör en central källa till både protein och olja, särskilt inom djurfoder men även i livsmedel för människor (Hartman et al. 2011). Den odlade sojabönan anses ha sitt ursprung i den vilda arten *Glycine soja* och domesticeringsprocessen tros ha ägt rum i Ostasien för cirka 6000 – 9000 år sedan (Sedivy et al. 2017)

Frågan om var domesticeringen skedde har länge varit omdiskuterad, men nyare genetisk forskning har bidragit till en mer detaljerad förståelse av sojabönans tidiga historia. Ett stort antal studier pekar på området kring Gula floden (Huanghe) i norra Kina som den mest sannolika platsen för domesticeringen. Detta styrks av både hög genetisk variation hos den lokala sojabönan och arkeologiska fynd i regionen (Sedivy et al. 2017).

Samtidigt har Yangtzeflodens avrinningsområde i södra Kina föreslagits som en alternativ ursprungsplats baserat på genetiska analyser. Det saknas tydliga arkeologiska bevis från denna region, vilket gör att teorin om ett nordkinesiskt ursprung fortfarande har starkast stöd (Sedivy et al. 2017).

Forskning visar också att domesticeringen sannolikt var en gradvis snarare än en enskild händelse. En mellanform, *Glycine gracilis*, har fungerat som ett evolutionärt steg mellan vild och domesticerad soja, där genflöde mellan olika populationer har bidragit till utvecklingen av dagens odlade sojaböna (Sedivy et al. 2017).

Sammanfattningsvis tyder dagens forskning på att sojabönan har sitt ursprung i Ostasien, med det starkaste stödet för en domesticering i norra Kina. Samtidigt framstår domesticeringen som en komplex och långvarig process där både genetiska och kulturella faktorer har bidragit till utvecklingen av den moderna odlade sojabönan.

Användning

Sojabönan är en av världens viktigaste jordbruksgrödor och har haft stor betydelse för både matproduktion och jordbrukssystem under lång tid. Dess användning sträcker sig från tidiga jordbrukssamhällen i Asien till dagens globala livsmedelsindustri (Deutsch & Baraibar Norberg, 2024).

Tidigt odlades soja främst i Kina, där den användes som en del av jordbrukets växtföljd. En viktig egenskap hos sojabönan är att den kan bidra till att förbättra jordens kväveinnehåll genom symbios med bakterier i rotsystemet, vilket gjorde den värdefull i traditionellt jordbruk.

Under lång tid var sojabönan framför allt en regional gröda i Asien (Deutsch & Baraibar Norberg, 2024). Med tiden utvecklades dock tekniker för bearbetning, särskilt fermentering och pressning, vilket gjorde att bönan kunde användas mer varierat i matlagning. Sojaprodukter som tofu och fermenterade livsmedel blev viktiga inslag i flera asiatiska kök.

När industrialiseringen tog fart förändrades sojans roll. Oljan som kan utvinnas ur sojabönan började användas i större skala, bland annat till matolja och industriella produkter (Deutsch & Baraibar Norberg, 2024). Samtidigt uppstod en restprodukt vid oljeutvinning och livsmedelsproduktion, ofta kallad presskaka eller okara beroende på process. Denna restprodukt innehåller mycket protein och fiber och har därför använts både som djurfoder och i vissa fall som jordförbättringsmedel.

Under 1900-talet ökade sojans globala betydelse kraftigt. USA blev en stor producent och odlingen expanderade ytterligare när sojabönan visade sig fungera väl i storskaliga jordbrukssystem, särskilt i kombination med majsodling (Deutsch & Baraibar Norberg, 2024). Under andra världskriget fick soja också en viktig roll som billig och näringsrik proteinkälla.

Efter kriget växte efterfrågan på animaliska produkter, vilket gjorde soja till en central ingrediens i djurfoderindustrin. I dag används en mycket stor del av den globala sojaskörden till foderproduktion, vilket har bidragit till möjligheten att producera billigt kött i stora delar av världen.

Under senare decennier har odlingen förändrats ytterligare genom avreglering av handel och utveckling av genetiskt modifierade sorter. Detta har gjort det möjligt att odla soja i större skala och i nya regioner, särskilt i Sydamerika, som i dag är ett av de största produktionsområdena. Samtidigt har expansionen av sojaodlingar bidragit till förändringar i markanvändning, där naturliga ekosystem i vissa områden har ersatts av jordbruksmark (Deutsch & Baraibar Norberg, 2024).

Okara

Näringsmässig sammansättning

En begränsning för industriell användning av okara är dess höga vattenhalt, vilket leder till snabb försämrings och kort hållbarhet. Samtidigt innehåller okara betydande mängder kostfiber, protein och kolhydrater. De vanligaste fettsyrorerna i okara är linolsyra, palmitinsyra, stearinsyra och oljesyra (Asghar et al., 2023).

Okara innehåller även mono-, oligo- och polysackarider, så som arabinos, glukos, galaktos, raffinos och stärkelse. Vidare innehåller okara fytokemikalier, vilka är bioaktiva ämnen som förekommer naturligt i växter. Bland dessa återfinns ligniner och isoflavoner, vilka kan fungera som antioxidanter samt bidra till att förebygga hjärt- och kärlsjukdomar och potentiellt verka kemopreventivt vid cancerutveckling (Asghar et al., 2023).

Okara är dessutom en källa till flera mineraler, såsom Ca, Fe, Cu, P och Zn (Asghar et al., 2023). Den näringsmässiga sammansättningen kan variera beroende på sojabönans ursprung och odlingsförhållande.

Innehållet av kostfiber är högt, vilket är kopplat till flera hälsofrämjande effekter. Okara innehåller främst olösliga kostfiber och i mindre utsträckning lösliga fiber. Genom olika behandlingar, exempelvis fermentering, kan andelen lösliga kostfiber öka (Asghar et al., 2023).

Hur sojan odlas och hur den processas påverkar okarans innehåll och struktur (Asghar et al., 2023).

Bioaktiva ämnen

Okara innehåller en rad bioaktiva komponenter, såsom fenoler och isoflavoner, vilka bidrar till sojans hälsofrämjande egenskaper. Halten av dessa komponenter påverkas av både extraktionsmetod och processtemperatur (Asghar et al., 2023).

Vid fermentering av okara produceras enzymet β -glukosidas av mikroorganismerna. Enzymet bryter ner glykosidbundna bioaktiva ämnen genom att spjälka bort deras sockerdelar. När sockerdelen avlägsnas bildas så kallade aglykoner. Dessa former är mer biotillgängliga, vilket innebär att kroppen lättare kan ta upp och använda ämnena. Fermenteringen kan därför förbättra okarans näringsmässiga och funktionella egenskaper genom att öka tillgängligheten av bioaktiva komponenter, exempelvis isoflavoner (Asghar et al., 2023).

Bland de bioaktiva ämnena i okara finns det genistein, daidzein och glycitein, vilka är växtöstrogener. Särskilt isoflavoner har kopplats till potentiella hälsofördelar, såsom minskad risk för hjärt- och kärlsjukdomar, cancer och benskörhet, samt förbättrad matsmältning (Asghar et al., 2023).

Strukturell uppbyggnad

Mikroskopiska analyser har visat att okara har en grov, porös och oregelbunden mikrostruktur. Denna struktur är kopplad till dess höga innehåll av kostfiber, främst cellulosa, hemicellulosa och lignin (Asghar et al., 2023). Dessa strukturella egenskaper bidrar till hög vatten- och fettbindningsförmåga, vilket gör okara till hygroskopiskt och påverkar dess funktionella egenskaper i livsmedelssystem.

Processer som fermentering kan förändra okarans kemiska och strukturella egenskaper. Dessa förändringar tyder på att bland annat fiberns struktur ändras, vilket i sin tur kan påverka okarans funktionella egenskaper och dess användning i livsmedel (Asghar et al., 2023).

Okara idag

Den årliga produktionen av sojaokara är ca 14 miljoner ton globalt och det mesta kasseras på grund av svårigheterna med att förvara den (Vong & Liu, 2016). Sojaokara används idag till bland annat djurfoder och biogas, men även vid framtagning av nya livsmedel och vid tillverkning av traditionella livsmedel som tempeh. Sojaproduktionen spås öka med 3,3% årligen från 2025 till 2030 och med den ökningen kommer också en ökning av mängden sojaokara (Rohrer et al., 2025).

Livsmedelsproduktionen beräknas behöva öka med 60% fram till 2050 för att följa behovet. Att förädla sojaokara så den går att använda i eller som mänsklig föda hade varit ett stort steg i rätt riktning (Rohrer et al., 2025).

Aspergillus oryzae

Aspergillus oryzae är en aerob filamentös svamp som tillhör sektionen *Flavi* inom släktet *Aspergillus* (Gomi, 2014). Denna grupp omfattar både arter som används inom livsmedelsindustrin och arter som kan orsaka *Aspergillus* problem inom jordbruk och livsmedelssäkerhet. Exempelvis kan *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* bilda aflatoxiner, vilka är starkt toxiska och cancerframkallande ämnen. Trots att *A. oryzae* är nära besläktad med dessa arter saknar den förmågan att producera aflatoxiner och har därför länge använts vid framställning av fermenterade livsmedel. Även *Aspergillus sojae*, som används vid produktion av bland annat sojasås, delar denna egenskap (Gomi, 2014).

Svampen förekommer naturligt i jordmiljöer och på olika växter, men förknippas särskilt med ris (*Oryza sativa*), vilket också har gett upphov till artnamnet *oryzae*. För optimal tillväxt kräver *A. oryzae* aeroba förhållanden och temperaturer omkring 32–36 °C (Gomi, 2014). Tillväxt har däremot inte observerats vid temperaturer över 44 °C. Det optimala pH-intervallet ligger mellan 5 och 6, men sporena kan gro inom ett betydligt bredare pH-område. Arten är dessutom relativt tolerant mot låg vattenhalt och har visats kunna växa i substrat med begränsad tillgång till vatten, exempelvis majsmjöl med cirka 16 % vatteninnehåll. Generellt krävs en vattenaktivitet (aw) över 0,8 för att svampen ska kunna växa (Gomi, 2014).

Solid state fermentation (SSF)

SSF är en uråldrig process där mikroorganismer tillåts växa på ett fast medium utan tillgång till vätska. Det har hittats bevis på användning av SSF vid brödbakning i Egypten redan 2600 f.Kr (Yegin, 2025). Idag är det en ganska vanlig metod att använda för att bereda livsmedel, den används över hela världen på olika sätt. I Kina används den för att framställa koji som enkelt uttryckt är fermenterat ris, i Indonesien och Malaysia används det till tempeh som är fermenterade sojabönor, miso i Japan som är en fermenterad sojabönpasta, ogi i Västafrika som är en fermenterad gröt gjord på majs, durra eller hirs samt tarhana i Turkiet som är en blandning av korn och kärnmjöl som fått fermentera och sedan torkats.

Det växande intresset för SSF som process för att förädla växtbaserade restströmmar har ökat den senaste tiden (Yegin, 2025). Det är själva processen som är av intresse på grund av sin förmåga att göra hälsofrämjande ämnen mer tillgängliga i olika restströmmar. Med hjälp av SSF vill forskare ta fram ett mer hälsosamt sätt att äta på, genom att på olika vis inkorporera mer hälsosamma bioaktiva ämnen i människors dieter. Detta för att minska risken för diverse kroniska sjukdomar som diabetes och hjärt- och kärlsjukdomar (Yegin, 2025).

Produkten som man får kan torkas och användas som substitut i olika livsmedel och på så vis får man in de hälsosamma bioaktiva ämnena i vardagen.

Det används olika stammar av mikroorganismer beroende på vilken produkt det är. Det är enzymerna som de olika stammarna producerar som är de viktigaste metaboliterna som bildas av mikroorganismerna, och bidrar till önskade sensoriska egenskaper i de olika produkterna. Olika svampstammar är de vanligaste mikroorganismerna som används vid SSF, främst filamentösa svampar som växer som hyfer och bildar mycel (Yegin, 2025). Det är dessa svampars förmåga att växa på ytan och sedan tränga in i substratet för att nå näringen, som gör de så framgångsrika i SSF (Yegin, 2025).

Enligt studier har *A. oryzae* anpassat sig efter förhållanden under SSF, vilket gör att *glbB* genen i *A. oryzae* finns tillgänglig i stor omfattning under just SSF. Det är denna gen som ansvarar för produktionen av enzymet glukoamylas, som i sin tur spjälkar komplexa kolhydrater till enkla sockerarter som *A. oryzae* i detta fall sen kan använda som energi (Yegin, 2025).

Dapibuset

Dapibuset är ett relativt nystartat företag, startat av Lidia och Micael. De känner varandra sedan långt tillbaka och har jobbat mycket tillsammans. Efter en noggrann analys av marknaden såg de ett behov av att ta vara på de enorma restströmmar livsmedelsindustrin producerar. Deras idé går ut på att ta vara på restströmmen där restströmmen uppstår. Tanken är att de ska kunna ta vara på sin egen restström och med hjälp av fermentering själv, till exempel producera ett näringsrikt foder till sina djur.

Ta vara på restströmmar är något som fler behöver göra. Där vill Dapibuset hjälpa till med sin innovation. Bioreaktorn installeras och ställs in efter kundens behov för deras specifika restström, vilket gör det till en individuellt anpassad process som är optimerad för exakt de förhållandena som kunden kräver. Dapibuset är unika med sin idé och jobbar ständigt för att slå sig in på nya marknader.

Processen har många fördelar, inte bara för den som använder sig av den utan även för samhället i stort. Den förädlar en restström, minskar CO₂-utsläpp, ersätter soja, kortar ner supply chain, gör restströmmen mer biotillgänglig, höjer näringsvärde och proteinhalt samt bidrar till en mer resilient livsmedelsproduktion.

2024 var den första Dapibuset enheten färdig för användning. 2025 expanderade företaget och produktionen av fermentorer flyttade in i större lokaler samt att en uppgraderad version med större kapacitet stod färdig.

Tanken bakom företaget är att ta vara på en restström och av den producera både djurfoder och livsmedel. Företaget utvecklas ständigt och arbetar konstant med produktutveckling och forskning för att hitta nya sätt att använda tekniken på. Sojaokara är en råvara som har stor potential men är svår för industrin att ta vara på.

Själva processen går ut på att genom solid state fermentering öka proteinhalten, biotillgängligheten och näringsvärdet på en oanvänd råvara som finns i överflöd.

På FoodTech Forum 2025 tog Dapibuset hem priset för "Company of the year". Det är Sveriges största FoodTech event. Där samlas företag och människor som alla ligger i framkant vad gäller innovation och framåttänkande. Det handlar om allt från nya innovativa ingredienser och cirkulär produktion till smarta digitala verktyg och framtidssäkrade förpackningar.

Att deras idé bidrar till cirkularitet i livsmedelskedjan och minskat matsvinn gav Dapibuset en andra plats i Rosewood Seeds: Sustainability in Food competition 2025. Det är en internationell tävling för företag som fokuserar på just cirkularitet och minskat matsvinn.

Material & Metod

Maltlösning

Utrustning:

10 ml provrör

Rörställ

Dispensette S

Erlenmeyerkolv

Magnetisk omrörningsstav

MST Magnetic Stirrer (VELP Scientifica)

SHP Steriltechnik AG autoklav

SILEX 2BS vattenfilter

Malt

En 3% (w/v) maltlösning framställs genom tillsatts av malt samt filtrerat vatten i en Erlenmeyerkolv, volym baseras efter behov. Magnetisk omrörningsstav placeras i kolven och omrörning sker tills lösningen är visuellt homogen. Provrör placeras i rör ställ, varpå lösning pippeteras med 5 ml i provrör och följs av att locken skruvas åt. Rörstället placeras i autoklav och autoklaveras enligt program på 121 °C i 20 minuter, för att sterilisera medium för inokulering. Efter process inokuleras prov efter de svalnat, eller så förvaras prov i kyl (6°C) fram till användning.

Fermenteringsprocess

För att skapa gynnsamma tillväxtförhållanden och anpassning för de filamentösa svampar genomförs en successiv tillväxt. Fermenteringsprocessen delas in i tre faser: inokulering i provrör för liquid fermentation (LF), uppskalning i Erlenmeyerkolv fortsatt LF samt slutligen solid state fermentation (SSF) i substrat.

Rörinokulering

Utrustning:

BWR ULT Freezer, Model 350

UniSkill dragskåp

VWR Incubation Orbital Shakers, Model 5000I

Starterkultur för filament av *A. oryzae*

UniSkill dragskåp desinficeras genom avtorkning med etanol följt av UV behandling i cirka tio minuter före inokulering, fläkt startas innan användning. Samtliga föremål som används i aseptiska förhållanden desinficeras med etanol före användning. Ampull innehållande filament av *A. oryzae* hämtas ur BWR ULT Freezer en kort stund innan inokulering för upptining. Med hjälp av inokulerings ögla överförs filament av *A. oryzae* ur ampull och adderas i respektive provrör av steril maltlösning under aseptiska förhållanden. Provrör inkuberas sedan i Orbital Shaker vid 30°C och 165 rpm i tre dygn. Tillväxt konstaterades genom observation av vit filmantös mycelbildning i lösningen.

Starterkultur av *A. oryzae* tillverkas av personal på företaget och görs enligt samma princip som för rörinokulering men maltlösning kompletteras med frysmedium för förvar adderade kemikalier till detta är tri-sodiumcitrat dihydrat, magnesiumsulfat heptahydrat samt glycerol. Sporer av *A. oryzae* är inköpta via fermentationculture.eu.

Inokulering av E-kolv

Utrustning:

UniSkill dragskåp

Erlenmeyerkolv 250ml

Bomullsplugg

Aluminiumfolie

glasflaska för autoklivering

SILEX 2BS vattenfilter

VWR Incubation Orbital Shakers Model 5000I

Grahamsmjöl

Fyra gram grahamsmjöl tillsätts till vardera 250 ml Erlenmeyerkolv. Kolvarna försluts med bomullsplugg och täcks med aluminiumfolie för att minska kondensbildning i bomullsplugg under autoklivering. Glasflaskor fylls med vatten från SILEX 2BS vattenfilter och förslöts löst med kork fixerad med autoklavtejp. Erlenmeyerkolv och glasflaska autoklaverades vid 121°C och 20 minuter, efter autoklivering lämnas de att svalna i rumstemperatur.

Dragskåp desinficeras före inokulering genom avtorkning med etanol följt av UV-sterilisering i cirka tio minuter. Samtliga föremål som används i aseptiska förhållanden desinficeras med etanol före användning.

Till respektive Erlenmeyerkolv innehållande grahamsmjöl tillsätts 100 ml sterilt vatten. filament från två av de tidigare förberedda provrören av *A. oryzae* överförs aseptiskt med inokulerings ögla i respektive kolv. OBS Bomullsplugg avlägsnas enbart tillfälligt vid adderande av vatten och inokulum och återplaceras omedelbart för att minimera risk för kontaminering. Erlenmeyerkolv inkuberas därefter i Orbital Shaker vid 30°C och 165 rpm under tre dygn tills filament mycelbildning observeras i vätskekulturen.

Fermentering

Utrustning:

Bägare

Plastbox med lock

Metall sil för luftflöde

Luftslang och kopplingar

Kompressor

Luftflödesmätare

Inokulum av *Aspergillus oryzae*

Substrat (Sojaokara, risfiber och vetemjöl)

Substrat vägs in enligt de experimentella parametrar som undersöks och adderas till bägare som täcks med aluminiumfolie. Bägarna autoklaveras vid 121°C i 20 minuter för pastörisering av substratet.

Strax före avklarad autoklavcykel desinficeras fermenterings kärl och tillhörande komponenter genom avtorkning med etanol för aseptisk hantering. Efter autoklavering adderades 750g varmt substrat i fermenteringskärl som därefter förslöts. Kärlden anslöts till lufttillförsel via kompressor för att upprätthålla ett positivt lufttryck och därmed minska risken för kontaminering. Fermenteringskärl med substrat får därefter svalna ned till cirka 30°C före inokulering.

Lufttillförseln kopplades därefter tillfälligt bort och fermenteringskärlden öppnades individuellt. Cirka hälften av vätskekulturen från en Erlenmeyerkolv tillsattes till respektive fermenteringskärl och blandas försiktigt för en jämn fördelning av inokulum i substratet. Homogenitet eftersträvas ej utan snabb inokulering genomfördes för minimal kontaminerings risk. Fermenteringskärlden förslöts omedelbart efter inokulering.

Kärlden återansluts därefter till lufttillförseln och flöde justeras till X L/min beroende på de parametrar som undersöks. Fermentering genomfördes mellan 2–5 dagar baserat på de parametrar som undersöks.

Torrsubstans

Utrustning:

Aluminium formar

Ugn

Mettler PE 160 Microgram våg

Aluminiumformar märks och vägs före analys. Därefter vägdes cirka tre till fem gram substrat in i respektive form, samtliga vägningar utförs med tre decimalers noggrannhet med Mettler PE 160 våg och analys görs i triplikat.

Prover torkas i ugn på 103°C i minst 18 timmar. Efter torkning fick proverna svalna till rumstemperatur innan de på nytt vägs in för att bestämma torrsubstans.

Torrsubstanshalt beräknas enligt:

Kalkyl: $TS\% = (m_{\text{torr}}/m_{\text{våt}}) * 100$

m_{torr} motsvarar provets vikt efter torkning och $m_{\text{våt}}$ motsvarar provets ursprungliga vikt. Medelvärde beräknas från de tre triplikaten.

Kväveanalys för protein

Utrustning:

Mettler AE 163 våg

ThermoFisher asparaginsyra

Tennkapslar

Pincett

Kapsel press

Mortel

Sil

Flash EA 1112 series Elemental Analyzer (Thermo Finnigan, Italien)

Substrat torkades enligt metod för bestämning av torrsubstans innan vidare analys. De torkade proverna mals med mortel homogent vilket följs av siktning genom sil för att erhålla jämn partikelstorlek anpassad för analys.

Total kvävehalt bestäms genom Dumas-metoden med hjälp av en Flash EA 1112 series Elemental Analyzer (Thermo Finnigan, Italien). Metoden bygger på förbränning av provet där organiskt bundet kväve omvandlas till kvävgas som därefter beräknas av instrumentet. Den kalibrerade kvävehalten använder sig av beräkning av råproteinhalt 6,25 enligt Jones-faktorn som standard för analysmetoden. Instrumentet startas och förvärms enligt tillverkarens instruktioner tills arbetstemperatur uppnåtts. Efter uppvärmning och genomförande av "Leak test" återställs kalibreringsfaktorer för att säkerställa korrekta analysförhållanden. Kalibrering utförs med asparaginsyra enligt instruktioner. Cirka 25 - 50 mg prov vägs in i tennkapslar med en decimals noggrannhet och provmängder registreras

manuellt i instrumentets mjukvara. Var tionde prov markeras med en kontroll kapsel med asparginsyra för att fastställa en avvikelse på max $\pm 0,1$ från utgångsvärdet på 10,52.

Metod för optimering av substrat och fermenteringsförutsättningar

Undersökning av substratets lämplighet och processförutsättningar genomfördes utifrån parametrar som företaget arbetar med i den befintliga fermenteringsprocessen. Utvärderingen utfördes stegvis och en parameter justerades i taget för att identifiera dess påverkan på substratets förutsättningar för tillväxt av *A. oryzae*. Parametrar undersöktes i följande kronologisk ordning:

Initial bedömning av substratets applicerbarhet i befintlig process

Inledningsvis undersöktes möjligheten att applicera substratet direkt i den befintliga fermenteringsprocessen för att bedöma dess kompatibilitet med befintlig utrustning och processutformning. Substratet pastöriseras genom tillsats av två delar kokande vatten till en del substrat, följt av dränering efter 30 minuter. Efter avsvälning inokuleras substratet under aseptiska förhållanden enligt fermenteringsprocessens etablerade förutsättningar.

Justering av substratstruktur genom tillsatts av risfiber

För att förbättra substratets struktur och möjliggöra ökad syretillförsel tillsattes hela risfiber till substratet. Syftet är att skapa en mer luftig struktur i substratet där fibrerna bidrar till att skapa fler luftfickor, vilket förväntas förbättra luftgenomströmningen under fermentering. Mängden tillsatt risfiber baseras på substratets visuella struktur med utgångspunkt att fibrerna skall bidra med ett öppnare substrat, cirka 50-55g adderades *bilaga 1*.

Justering av vattenhalt och pastöriseringsmetod

Pastöriseringsmetod modifieras för att undersöka hur substratets vattenhalt påverkar fermenteringsförutsättningarna. Två metoder jämförs:

- Autoklivering av okara, där substratets ursprungliga vattenhalt bibehålls.
- Pastörisering i varmluftsugn, vilket reducerar substratets vatteninnehåll genom avdunstning.

Syftet är att identifiera ett vatteninnehåll som möjliggör tillräcklig syretillförsel för en god tillväxt, samtidigt som ett för torrt eller vått substrat undveks.

Justering av syretillförsel under fermentering

Syretillförseln under fermenteringsprocessen justerades för att undersöka dess påverkan på tillväxtförmågan hos *A. oryzae* i substratet. Detta justeras med en luftflödesmätare som mäter antal liter luft per minut som adderas till fermenteringen. Två luftflöden undersöktes, 0,5L/min samt 1L/min.

Tillsatts av lättillgänglig kolhydratkälla

För att undersöka om tillgänglig kolkälla är tillräcklig eller påverkar fermenteringsförloppet adderades vetemjöl till substratet som kolkälla. Två olika tillsatsnivåer av vetemjöl, beräknade som procent av okarans våtvikt undersöktes.

1. Adderas före pastörisering
2. Adderas efter pastörisering under aseptiska förhållanden

Mängd vetemjöl är fem, tio och 15% av substratets våtvikt. Syftet är att undersöka om tillsatts metod och mängd påverkade tillväxtförutsättningarna.

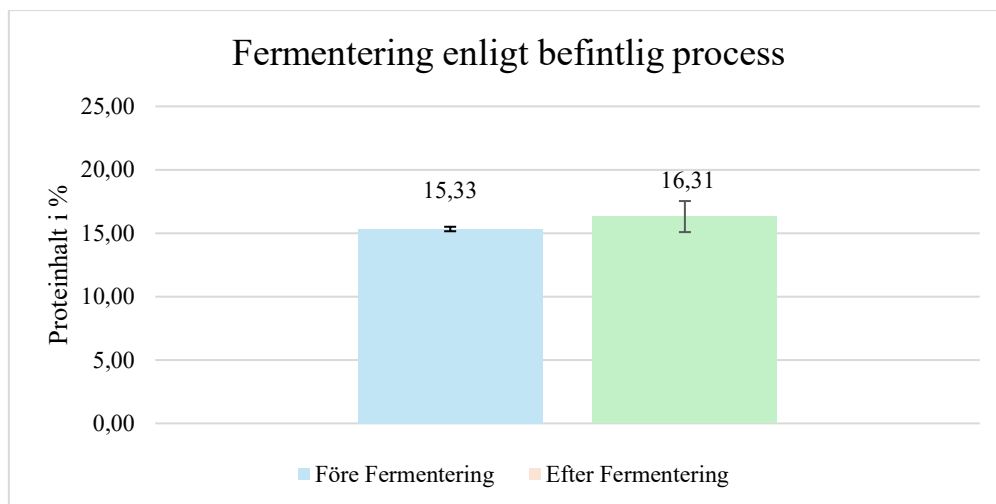
Tider att skörda boxar

Boxarna skördas vid olika tidpunkter för att följa utvecklingen över tid och identifiera optimala skördetillfällen. Skörd utförs efter två, tre, fyra och fem dygns fermentering.

Resultat

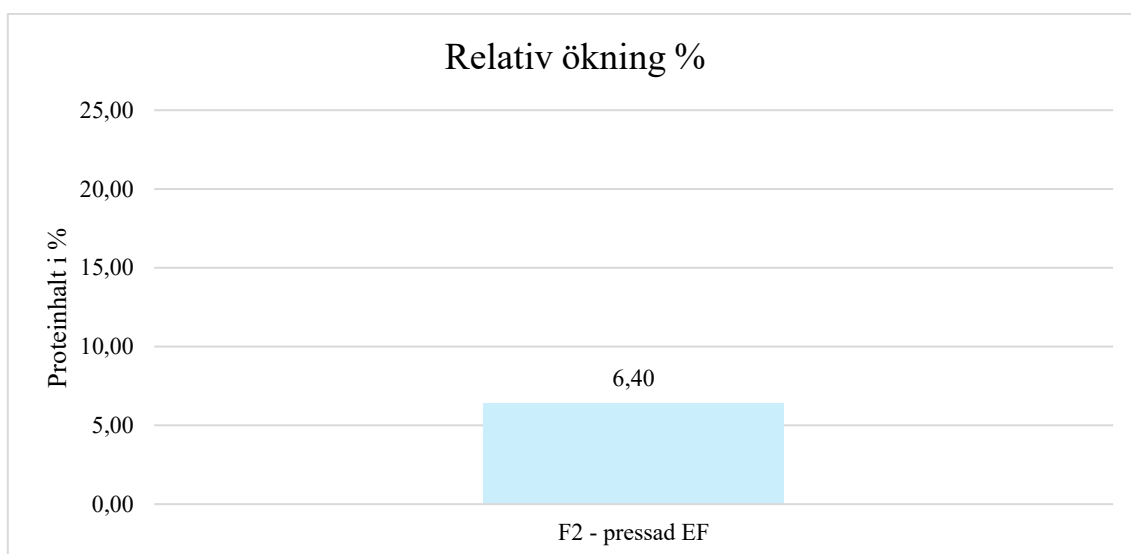
Initieringsförsök

Blå stapel i *Figur 1* representerar proteinhalt i substratet efter inokulering och före fermentering. Grön stapel representerar proteinhalt efter tre dygns fermentering enligt företagets befintliga process.



Figur 1. Fermenteringsprocess i enlighet med företagets befintliga rutiner.

Resultatet visar en begränsad ökning i proteinhalt från 15,33% före fermentering till 16,31% efter tre dygns fermentering, motsvarande cirka en total ökning på en procentenhet. Den begränsade förändringen indikerar att fermenteringsförhållanden inte resulterar i en större biomassackumulering under den undersökta perioden. Detta stöds även av den visuella bedömning av substratet där ingen tydlig förändring i tillväxt av biomassa observerades *bilaga 1*.

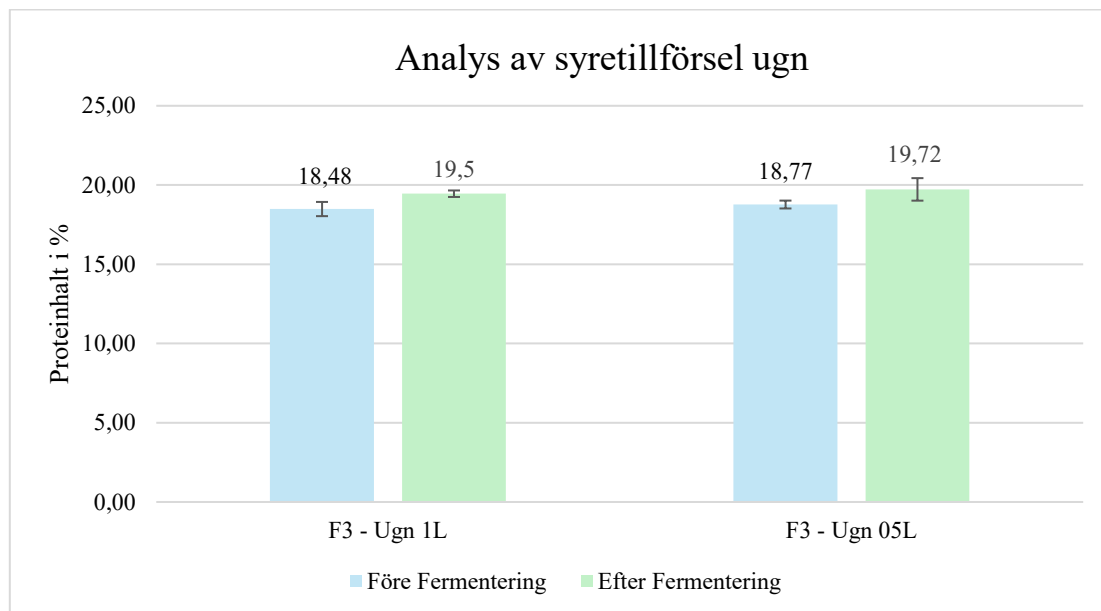


Figur 2. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, enligt vedertagen fermenteringsprocess

Den relativa förändringen i proteinhalt efter fermentering presenteras i *Figur 2*. Resultatet visar en begränsad ökning i proteinhalt efter tre dygns fermentering jämför med initial proteinhalt före fermentering, resultatet gav en relativ ökning på 6,4%. Den observerade ökningen indikerar att fermenteringen bidrog till en viss ackumulering, dock är förändringen begränsande under de undersökta förhållandena.

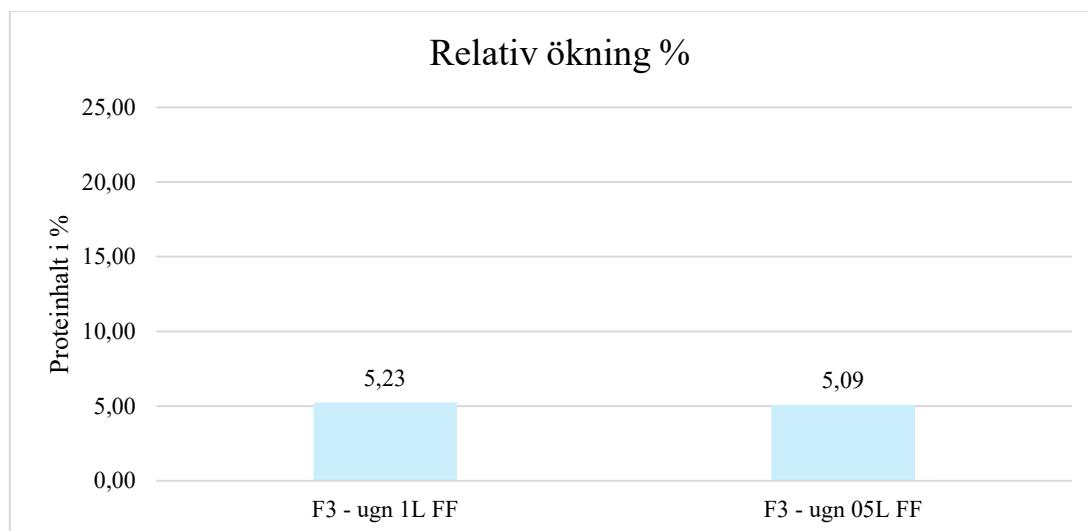
Pastöriseringsprocess & luftflöde

Förhållanden relaterade till syretillförsel i substratet undersöktes genom modifiering av pastöriseringsmetod och luftflöde under fermenteringsprocessen. Pastörisering utförs genom varmluftsbehandling på substratet för att reducera vattenhalt och för att avdöda potentiella mikroorganismer. Parametern som förändras under fermenteringen var luftflödet till fermenteringskärlet där två flöden jämfördes: 1L/min respektive 0,5L/min. Blå stapel i *Figur 3* representerar proteinhalt före fermentering och grön stapel representerar proteinhalt efter fermentering.



Figur 3. Ökning av protein visat i procentenheter, analys av syretillförsel, pastöriseringsprocess i ugn, felstaplar representerar variation mellan replikat.

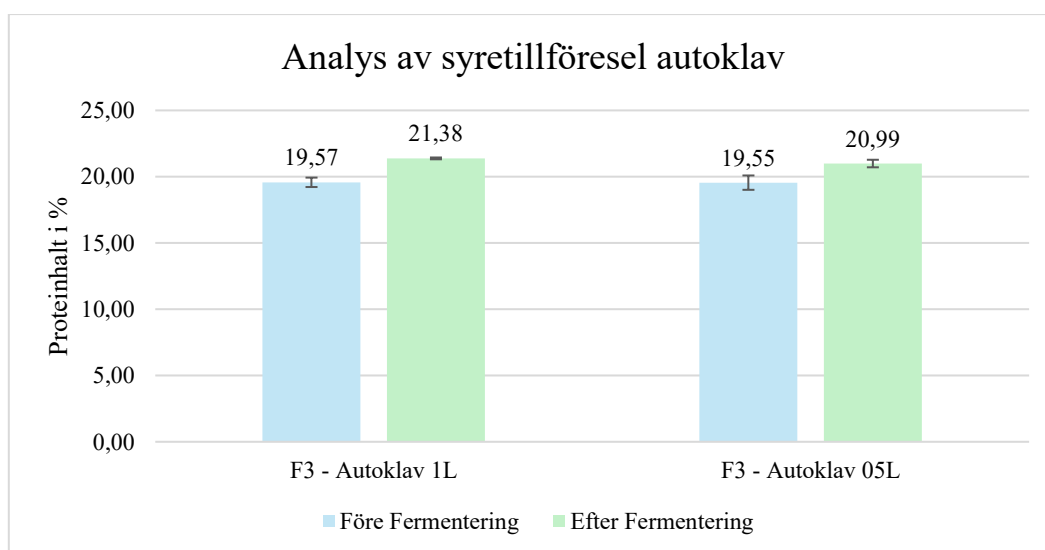
Resultatet visar en begränsad ökning i proteinhalt efter fermentering för båda luftflödena. För 1L/min ökade proteinhalten från 18,48% till 19,50% medan 0,5L/min ökade från 18,77% till 19,72%. Skillnaden mellan luftflödena är begränsad och ingen tydlig ackumulering observeras mellan de undersökta luftflödena. Resultaten indikerar att förändringen i luftflödena med pastöriseringsprocessen inte ger någon markant påverkan på proteinhalten för fermenteringsförhållandena.



Figur 4. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av syretillförsel, pastöriseringsprocess i ugn.

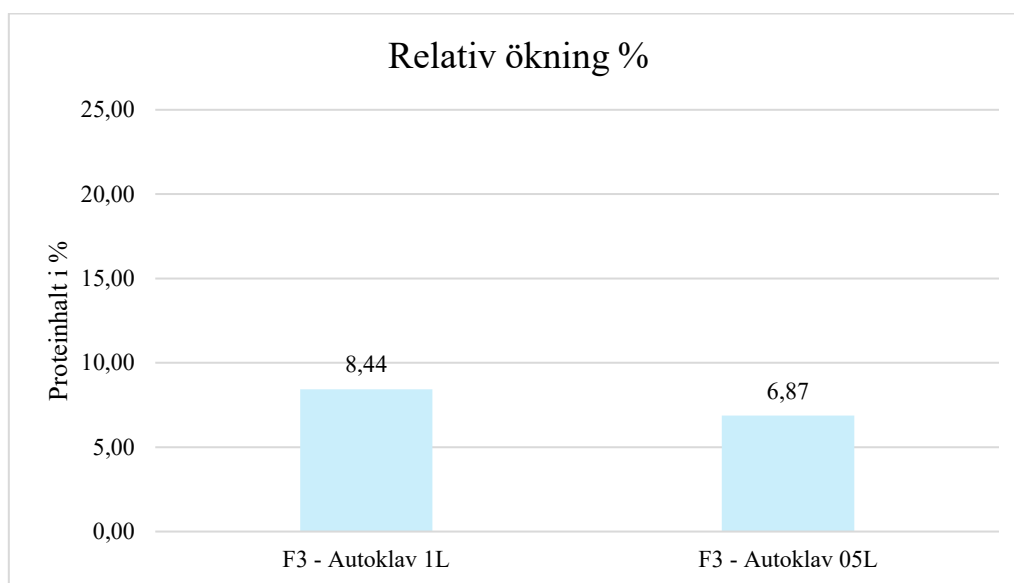
Den relativa ökningen av proteinhalt presenteras i *Figur 4*. Resultaten visar liknande relativ ökning mellan de undersökta luftflödena där 1L/min resulterade i en ökning på 5,23% medan 0,5L/min resulterade i en ökning på 5,09%. Resultatet indikerar att förändringen av luftflöde mellan 0,5L/min och 1L/min med pastöriseringsprocessen inte gav någon tydlig skillnad i relation till ackumulerat protein för de undersökta fermenteringsförhållandena.

Förhållanden relaterade till syretillförsel i substratet undersöktes genom modifiering av pastöriseringsmetod och luftflöde under fermenteringsprocessen. Pastörisering utförs genom autoklivering av substratet för att avdöda mikroorganismer samtidigt som substratets ursprungliga vattenhalt bibehålls. Parametern som förändras under fermenteringen var luftflödet till fermenteringskärlet där två flöden jämfördes: 1L/min respektive 0,5L/min. Blå stapel i *Figur 5* representerar proteinhalt före fermentering och grön stapel representerar proteinhalt efter fermentering.



Figur 5. Ökning av protein visat i procentenheter, analys av syretillförsel, pastöriseringsprocess i autoklav.

Resultatet visar en begränsad ökning av proteinhalt efter fermentering för båda luftflödena. För 1L/min ökade proteinhalten från 19,57% till 21,38% medan 0,5L/min ökade från 19,5% till 20,99%. Skillnaden mellan luftflödena är begränsad och ingen tydlig ackumulering av protein observeras mellan de undersökta luftflödena. Däremot observerades högre proteinhalt efter fermentering jämfört med motsvarande försök där pastörisering utfördes genom varmluftsbehandling *Figur 3*. Resultaten indikerar att autoklivering och bibehållen vattenhalt kan bidra till mer gynnsam tillväxt för *A. oryzae*. Visuellt bedömning visade en biomassatillväxt för det autoklaverade substratet *Bilaga 2, 3*.



Figur 6. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av syretillförsel, pastöriseringsprocess i autoklav.

Den relativa ökningen av proteinhalt presenteras i *Figur 6*. Resultaten visar en ökning för de undersökta luftflödena där 1L/min resulterade i en ökning på 8,44% medan 0,5L/min resulterade i en ökning på 6,87%. Trots den högre relativa proteinökningen i 1L/min valdes 0,5L/min vid vidare processutveckling. Beslutet baserades på visuell bedömning av substratet under försöksförloppet där 0,5L/min påvisade tydligare biomassatillväxt *Bilaga 2,3*. Dumas-analys genomfördes först vid ett senare tillfälle under projektets gång och resultaten var därför inte tillgängliga vid tidpunkten för val av parametrar. Resultatet indikerar att förändringen av luftflöde mellan 0,5L/min och 1L/min med pastöriseringsprocessen inte gav någon tydlig skillnad i relation till ackumulering protein för de undersökta fermenteringsförhållandena. Det observerades däremot en tydligt högre biomassatillväxt för det autoklaverade substratet i jämförelse med det varmluftsbehandlade substratet *Bilaga 2,3*. Vilket indikerar mer gynnsamma förhållande vid bibehållen vattenhalt.

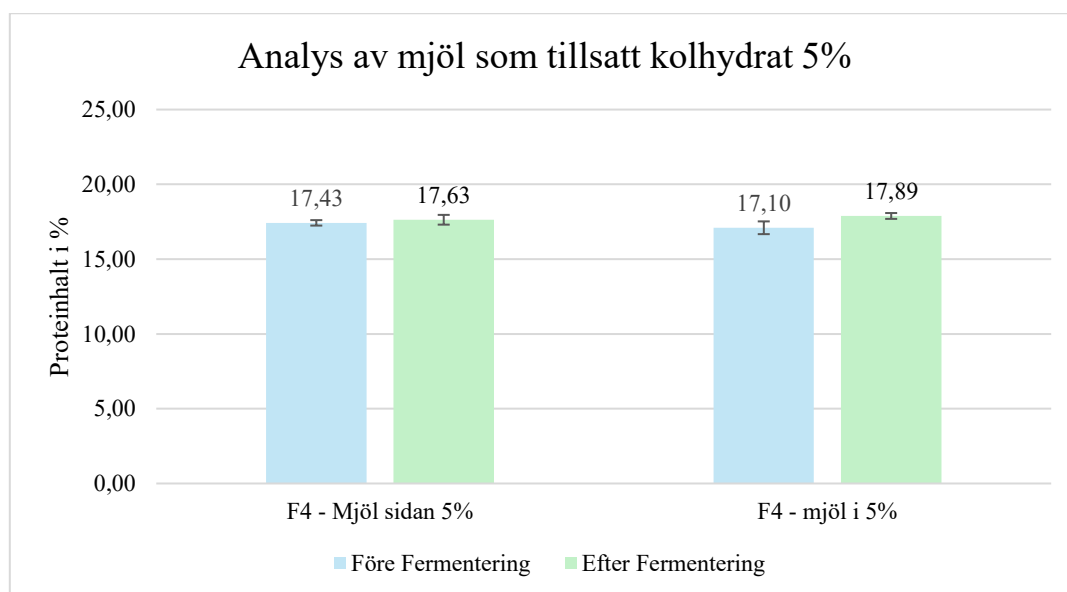
Tabell 1 Medelvärde av vattenhalt för olika steriliseringsmetoder

Vattenhalt medelvärde i %	Före fermentering	Efter fermentering
Försök 2 pressad efter ferm		86,7
Försök 3 ugn 1L/min	72,6	70,1
Försök 3 ugn 0,5L/min	68,3	71,9
Försök 3 autoklav 1L/min	77,8	79,2
Försök 3 autoklav 0,5L/min	78,2	79,2

Informationen i *tabell 1* beskrivs förhållandena i vattenhalt utifrån pastöriseringsprocessen före och efter fermentering.

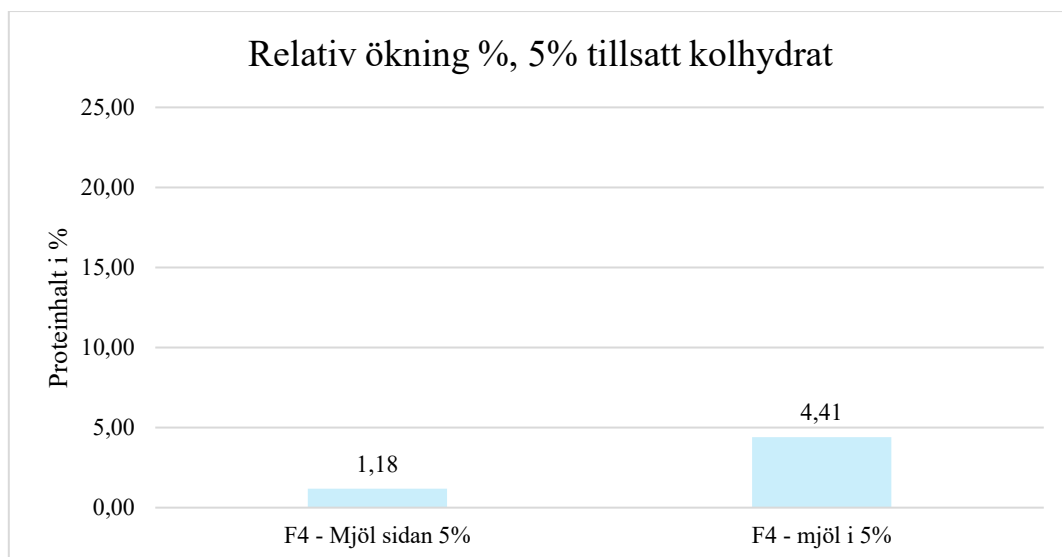
Tillsats av lättillgänglig kolhydrat

Tillsatts av lättillgängliga kolhydrater undersöktes tillsammans med metod för tillsatts till substratet. Vetemjöl användes som lättillgänglig kolkälla och jämfördes mellan två tillvägagångssätt. I det första försöket pastöriserades vetemjöl separat genom autoklavering innan det tillsattes till det sterila substratet. Vid andra tillvägagångssättet tillsattes vetemjölet direkt till substratet före pastörisering. Mängd tillsatt vetemjöl är fem procent av okarans våta vikt i fermenterings kärlet. Den blå stapeln i *Figur 7* representerar proteinhalt före fermentering och den gröna representerar proteinhalt efter fermentering.



Figur 7. Ökning av protein visat i procentenhet, analys av 5% tillsatt kolhydrat.

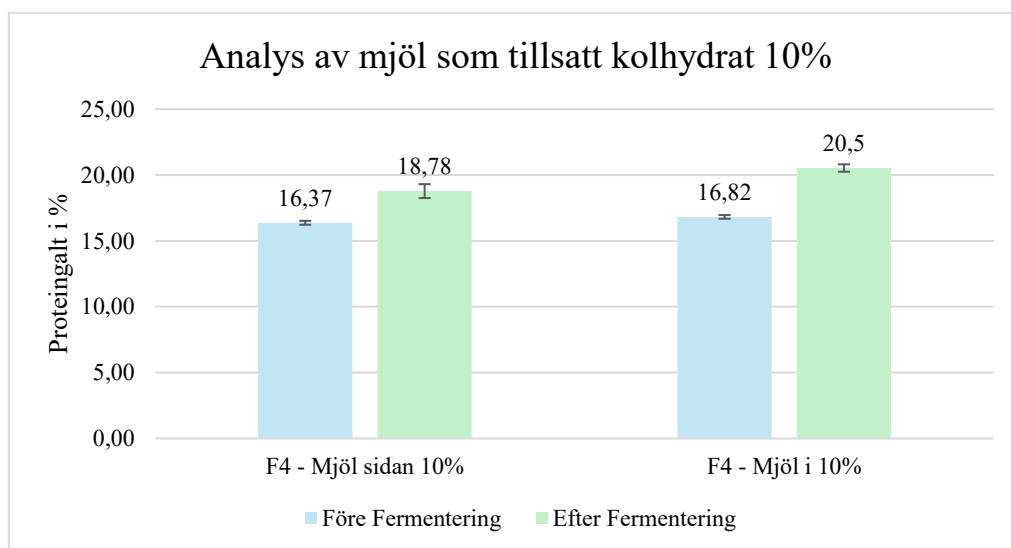
Resultatet visar en begränsad ökning i proteinhalt för båda metoderna. För vetemjöl tillsatt efter pastörisering ökade proteinhalten från 17,43% till 17,63%, medan vetemjöl tillsatt före pastörisering ökade från 17,10% till 17,89%. Resultatet indikerar att tillsatts av fem procent vetemjöl gav begränsad ackumulering av protein oberoende av tillsatsmetod. Däremot uppvisas tillsats av vetemjöl före pastörisering en något högre ökning jämför med tillsatts efter sterilisering. Vid den visuella bedömningen observerades även en rikare biomasstillväxt för fermenteringen där kolkälla tillsats före pastörisering *Bilaga 4,5*.



Figur 8. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av 5% tillsatt kolhydrat steriliserat i och sidan om substrat.

Den relativa ökningen presenteras i *Figur 8*. Resultaten visar en skillnad mellan de undersökta metoderna. För vetemjöl adderat efter autoklaveringen ökade det med 1.18%, medan vetemjöl adderat före fermenteringen resulterade i en ökning med 4,41%. Skillnaden observerades även visuellt där fermenteringen med vetemjöl tillsatt före pastöriseringen uppvisade en tydligare biomasstillväxt jämfört med tillsatts efter pastörisering *Bilaga 4,5*

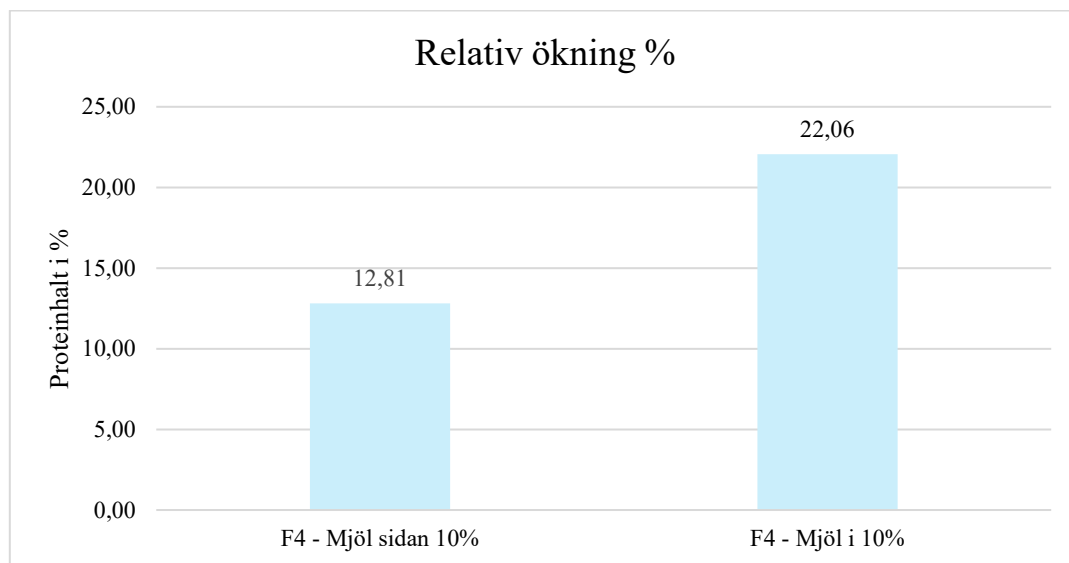
En högre tillsats av vetemjöl undersöktes för att utvärdera påverkan av en ökad tillgång på lättillgängliga kolhydrater. Mängd tillsatt vetemjöl här motsvarar tio procent av okarans våta vikt i fermenterings kärlet. Den blå stapeln i *Figur 9* representerar proteinhalt före fermentering och den gröna representerar proteinhalt efter fermentering.



Figur 9. Ökning av protein visat i procentenhet, analys av 10% tillsatt kolhydrat, blandad i samt sidan om substrat.

Resultaten i *Figur 9* visar en tydlig ökning i proteinhalt för båda tillsatsmetoder. För vetemjöl tillsatt efter pastörisering ökar det från 16,37% till 18,78% medan för vetemjöl tillsatt innan

autoklivering ökar det från 16,82% till 20,50%. Resultaten indikerar att den högre tillsatt mängden av vetemjöl resulterade i en högre halt ackumulerat protein jämfört med försöket för fem procent vetemjöl i *Figur 7*. Vetemjöl blandat innan pastörisering visade även högre proteinhalt efter fermentering jämfört med tillsatts efter pastörisering. Resultatet stöds av den visuella bedömningen där biomassatillväxten tydligt visat på en jämn kolonisering och tillväxt i substratet för båda försöken *Bilaga 6,7*. Fermenteringen där vetemjöl blandades in före pastörisering visade genomgående tydligare biomasstillväxt och valdes därför vidare för optimeringsprocessen *Bilaga 6,7*.



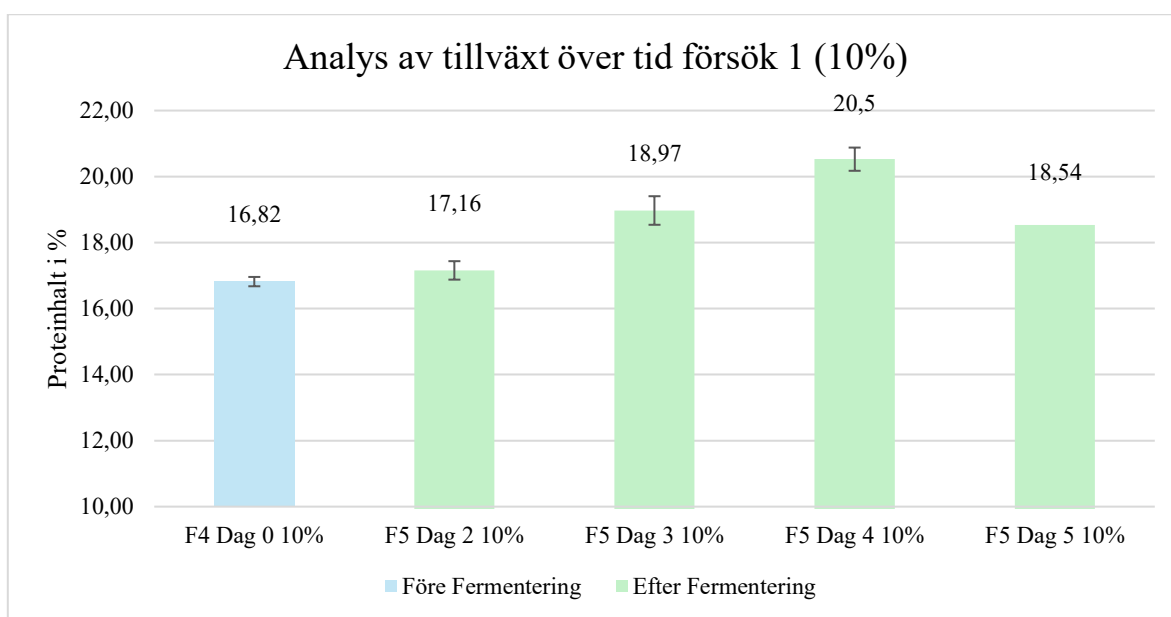
Figur 10. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av 10% tillsatt kolhydrat pastöriserat i och sidan om substrat.

Den relativa ökningen av proteinhalt presenteras i *Figur 10*. Resultaten visar en tydlig skillnad mellan tillsatsmetoderna där vetemjöl tillsatt efter pastörisering resulterar i en relativ ökning på 12,81%, medan vetemjöl tillsatt före pastörisering resulterade i en relativ ökning på 22,06%. Resultatet indikerar att tillsatt vetemjöl före pastöriseringen resulterat i mer gynnsamma förhållanden för protein ackumulerat jämfört med tillsatt vetemjöl efter pastörisering. Resultatet följer även den visuella bedömningen där fermenteringen med vetemjöl tillsatt före pastörisering genomgående uppvisar tydligare biomasstillväxt *Bilaga 6,7* och därför valts för vidare optimeringsprocess.

Bestämning av optimal skördetid

Försök 1

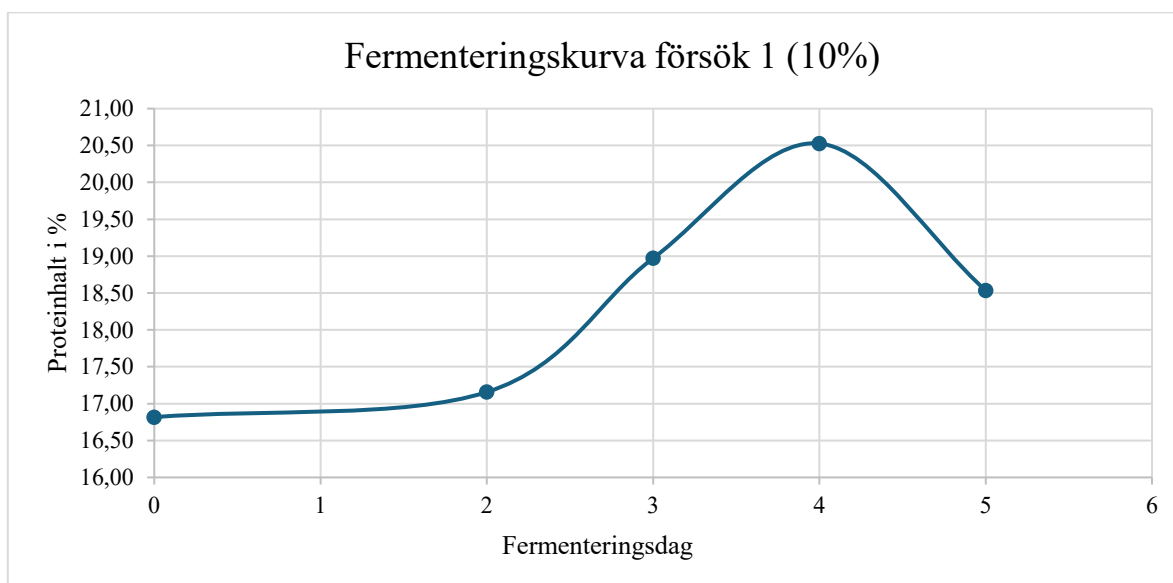
Tidsaspekten för tillväxtförhållande undersöktes för att identifiera vid vilket tidsintervall skörd av biomassa gav högst proteinhalten. Tidigare försök skördades efter tre eller fyra dygn, varpå ytterligare provpunkter i början och i slutet av fermenteringsförloppet inkluderas för att följa utvecklingen över tid. Tidigare optimerade parametrar implementeras. Blå stapel i Figur 11 representerar före fermenteringen och grön stapel representerar efter fermenteringen.



Figur 11. Ökning av protein visat i procentenhet, analys av tillväxt över tid dag 2 – 5, samt 10% tillsatt kolhydrat. Första försöket.

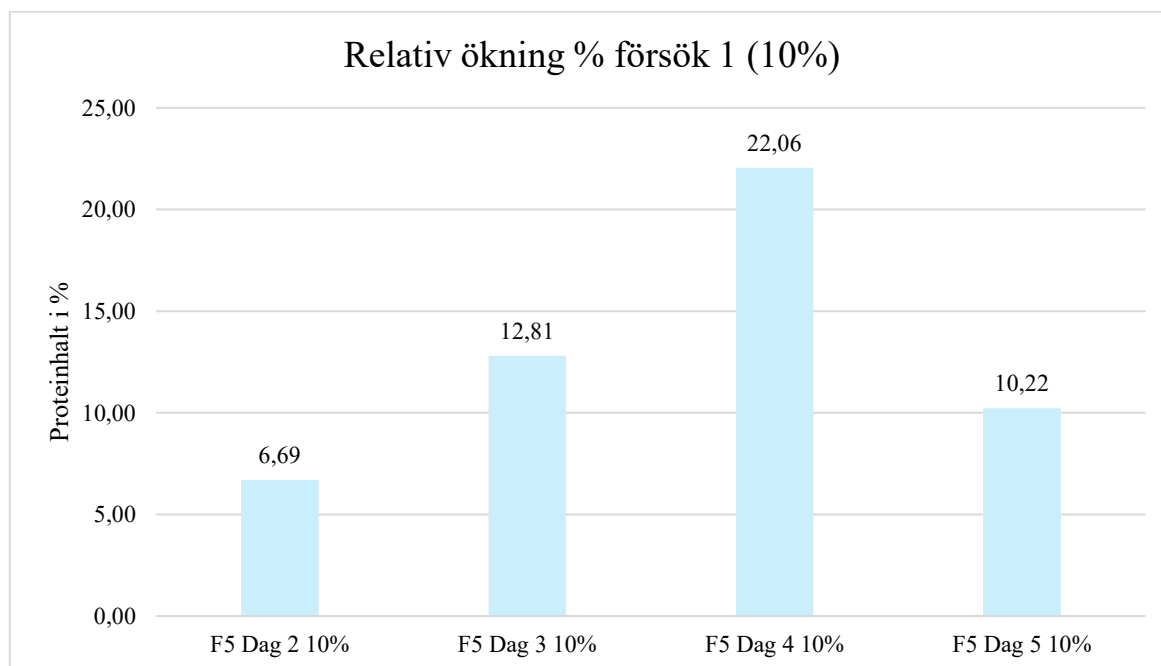
Resultaten visar en ökande trend i proteinhalt fram till dag fyra, följt av ett lägre resultat dag fem. Initial proteinhalt innan fermentering uppmättes till 16,82%, medan proteinhalt efter fermentering uppmättes till 17,16% för dag två, 18,97% för dag tre, 20,50% för dag fyra samt 18,54% för dag fem. Resultaten indikerar på en tillväxtfas mellan dag noll och dag fyra med en efterföljande minskning dag fem.

Fermenteringskurvan i *Figur 12* presenterar utvecklingen av proteinhalt över fermenteringsförloppet och visualiserar tydligare förändringen över tid jämfört med stapeldiagram i *Figur 11*.



Figur 12. Fermenteringskurvan visar att tillväxten i substratet följer faserna i mikroorganismens tillväxtkurva.

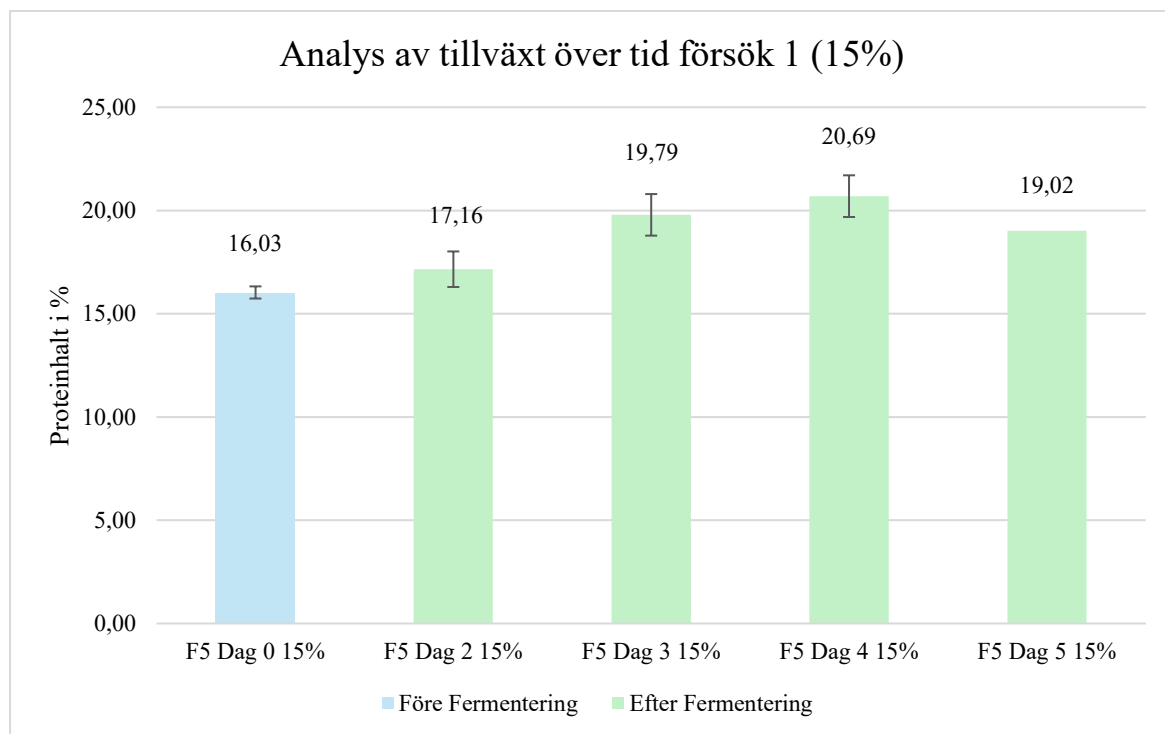
Kurvan i *Figur 12* visar en inledande period med begränsad förändring mellan dag noll och dag två, följt av en tydligare ökning i proteinhalt fram till dag fyra där högsta proteinhalt uppmättes. Efter dag fyra observerades en minskning i proteinhalt under dag fem. Förloppet uppvisar en likhet med mikrobiell tillväxt med en inledande etableringsfas som följs av en period med ökad tillväxt och slutligen avtagande.



Figur 13. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av tillväxt över tid dag 2 – 5, samt 10% tillsatt kolhydrat. Första försöket.

Den relativa ökningen presenteras i *Figur 13*. Resultaten visar ett tydligt mönster där dag två resulterar i 6,69%, dag tre 12,81%, dag fyra 22,06% samt dag fem 10,22%. Högsta relativa proteinökningen observerades dag på fyra.

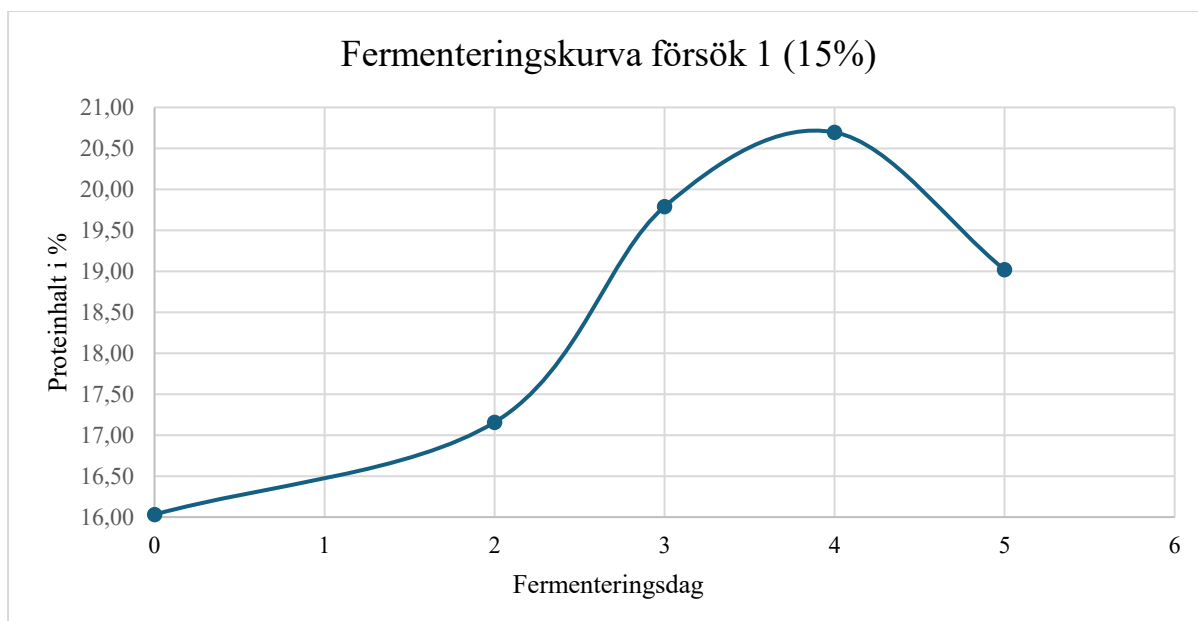
Tidsaspekten med samma parametrar undersöks också med en större kolkälla för att utvärdera om en större mängd kan vara aktuellt.



Figur 14. Ökning av protein visat i procentenhet, analys av tillväxt över tid dag 2 – 5, samt 15% tillsatt kolhydrat. Första försöket.

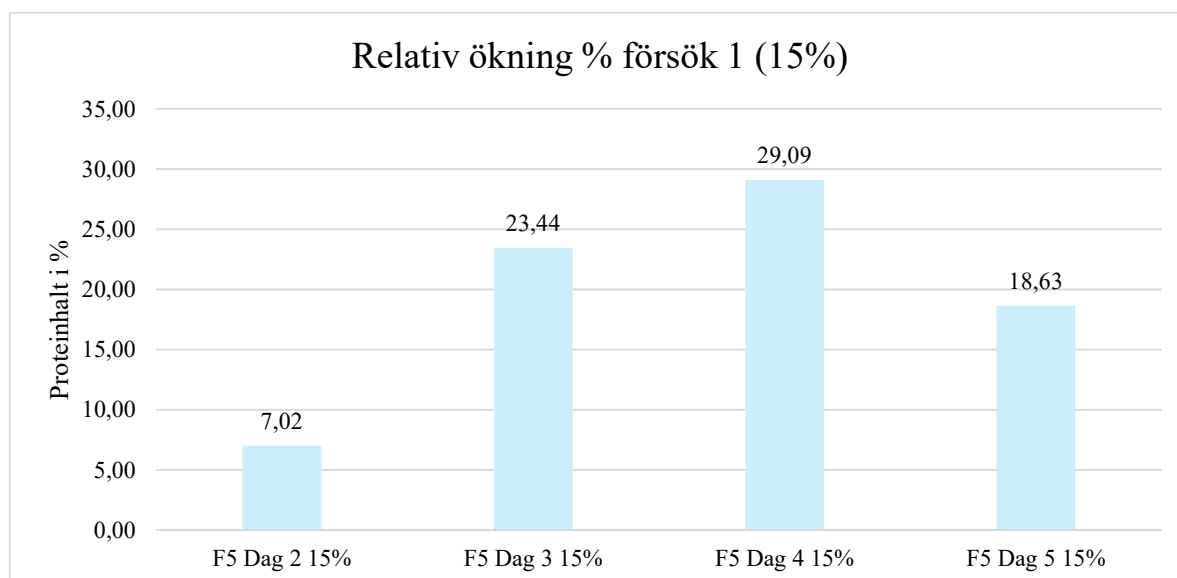
Resultaten visar en ökande trend i proteinhalt fram till dag fyra, följt av en minskning under dag fem. Initial proteinhalt innan fermentering uppmättes till 16,03%, medan proteinhalt efter fermentering uppmättes till 17,16% för dag två, 19,79% för dag tre, 20,69% för dag fyra samt 19,02% för dag fem. Resultaten indikerar på en tillväxtfas mellan dag noll och dag fyra med en efterföljande minskning dag fem.

Fermenteringskurvan i *Figur 15* presenterar utvecklingen av proteinhalt över fermenteringsförloppet och visar tydligare förändringen över tid jämfört med stapeldiagram i *Figur 14*.



Figur 15. Fermenteringskurvan visar att tillväxten i substratet följer faserna i mikroorganismens tillväxtkurva. Första försöket.

Kurvan i *Figur 15* visar en inledande period med begränsad förändring mellan dag noll och dag två, följt av en tydligare ökning i proteinhalt fram till dag fyra där högsta proteinhalt uppmättes. Efter dag fyra observerades en minskning i proteinhalt under dag fem. Förloppet uppvisar en likhet med mikrobiell tillväxt med en inledande etableringsfas som följs av en period med ökad tillväxt och slutligen avtagande. Kurvan är lik förhållandena presenterade i *Figur 12*.

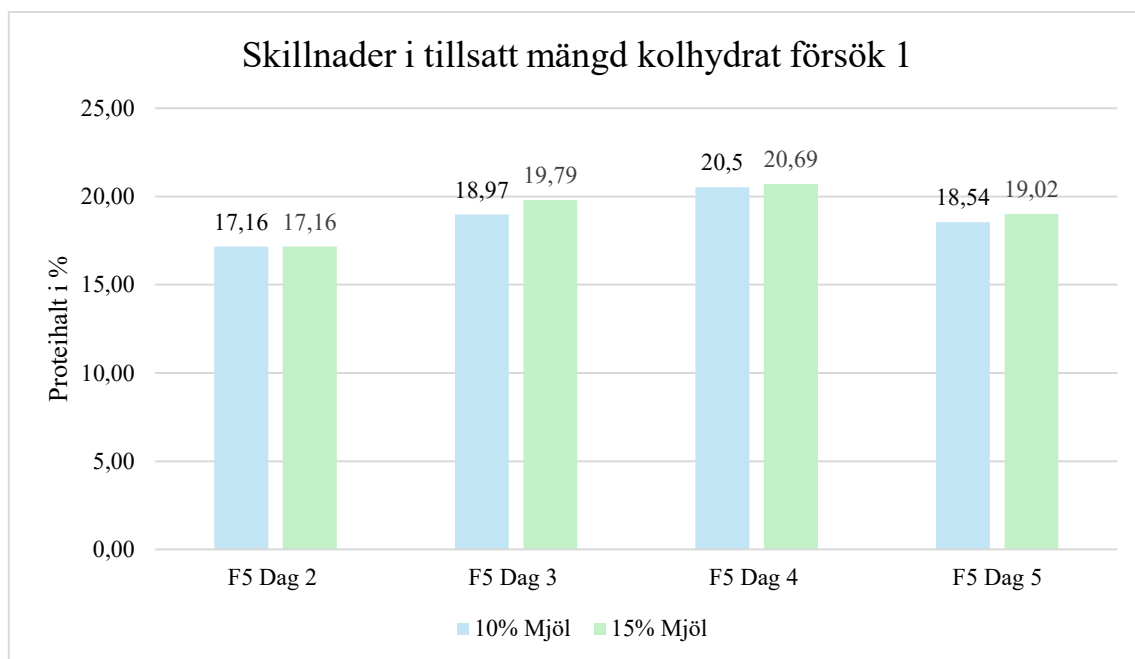


Figur 16. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av tillväxt över tid dag 2 – 5, samt 15% tillsatt kolhydrat. Första försöket.

Den relativa ökningen presenteras i *Figur 16*. Resultaten visar en tydlig kurva där dag två resulterar i 7,02%, dag tre 23,44%, dag fyra 29,09% samt dag fem 18,63%. Högsta relativa

proteinökningen observerades dag fyra. Resultaten visar en högre relativ proteinökning jämfört med försöket med tio procent tillsatt vetemjöl presenterat i Figur 13.

Data presenterad i *Figur 17* ger en överblick över skillnaden mellan de undersökta mängderna av tillsatt kolhydrat och deras påverkan på proteinhalten över fermenteringsförloppet.

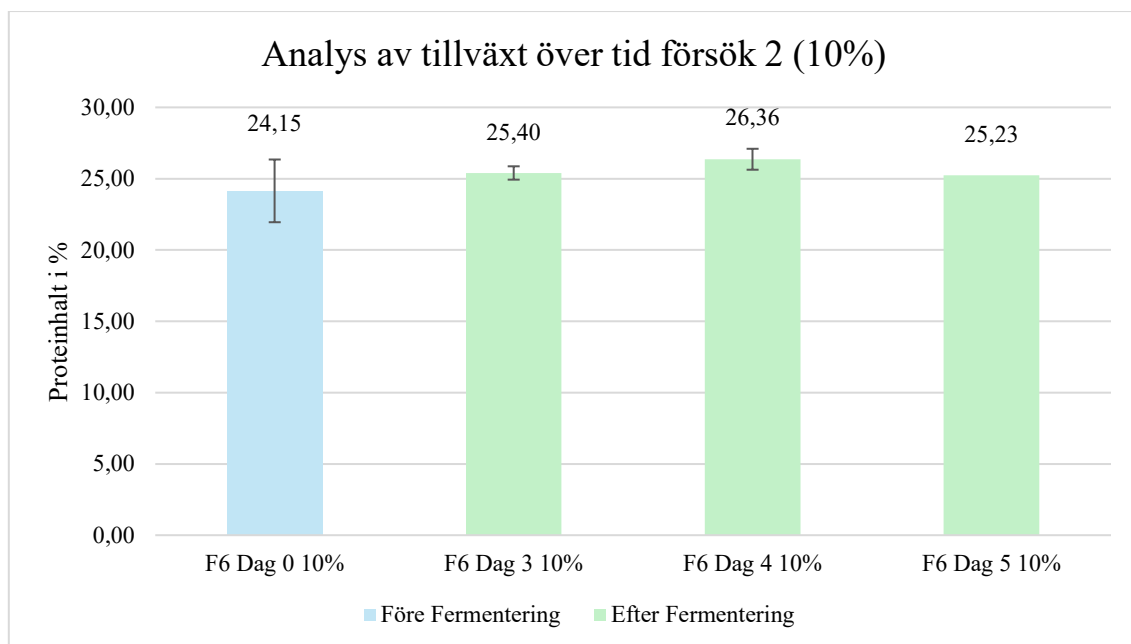


Figur 17. Visar på skillnaderna i proteinhalt, efter fermentering, mellan de olika mängderna tillsatt kolhydrat och antalet dagar som substratet fermenterat. Första försöket.

I resultatet syns det att försöken med de båda tillsatta mängderna följer ett liknande fermenteringsförlopp med en ökad proteinhalt fram till dag fyra, följt av minskning dag fem. Marginell skillnad observeras för 15% vetemjöl tillsatt för dag tre, fyra och fem jämfört med tio procent.

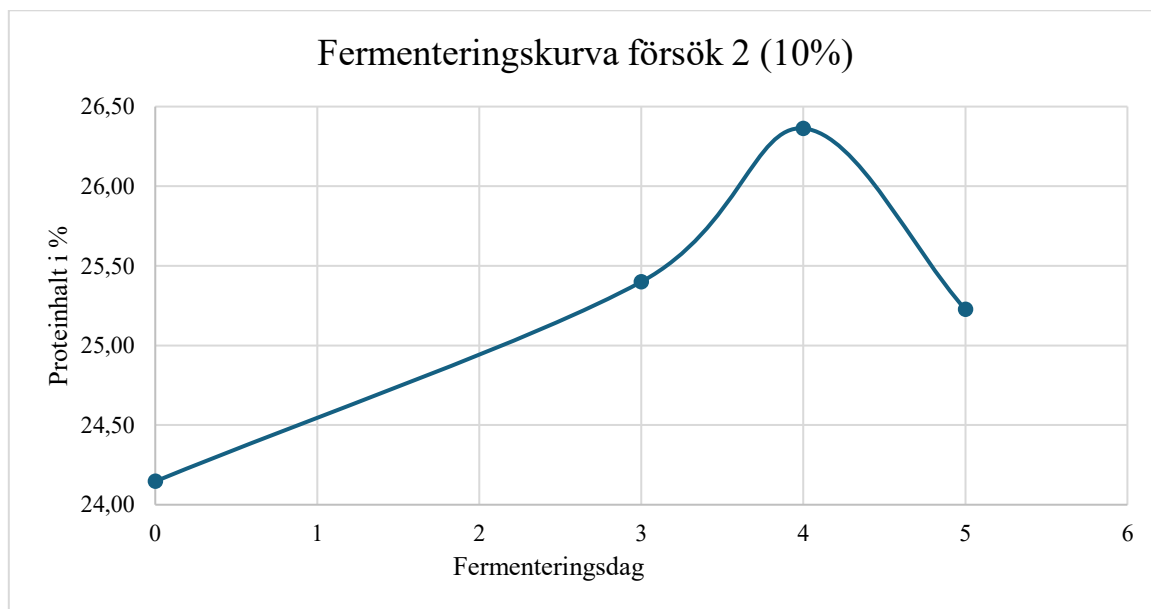
Försök 2

Data presenterad i *Figur 18* representerar proteinhalt vid fermentering över tid med samma parametrar som för försök fem men fokuserar på att titta på dygnen för förväntad optimal tillväxt för kontinuitet. För den här fermenteringen används en ny batch sojaokara. Den blå stapeln i *Figur 18* representerar före fermentering och de gröna representerar efter.



Figur 18. Ökning av protein visat i procentenhet, analys av tillväxt över tid dag 3 – 5, samt 10% tillsatt kolhydrat. Andra försöket.

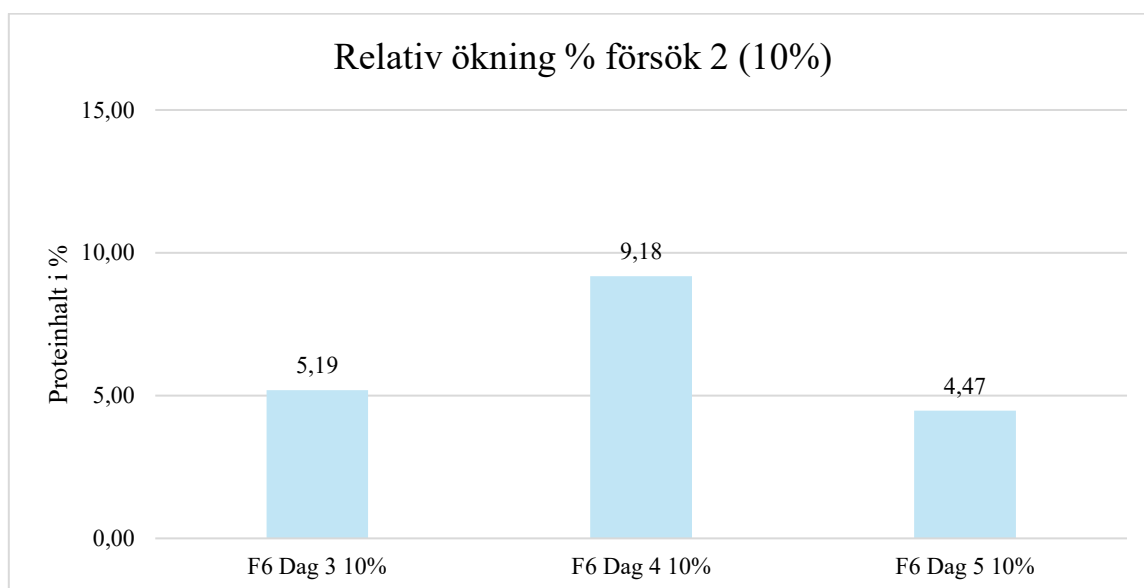
Analysen representerad i *Figur 18* för försök två följer samma trend som resultaten i det första försöket representerat i *Figur 11, 14*. Initial proteinhalt före fermentering uppmättes till 24,15%, medan proteinhalt efter fermentering uppmättes till 25,40% för dag tre, 26,36% för dag fyra och 25,23% för dag fem.



Figur 19. Fermenteringskurva som visar att tillväxten i substratet följer faserna i mikroorganismens tillväxtkurva. Andra försöket.

Resultatet i *Figur 19* representerar utvecklingen från dag tre till fem då tidigare skördedag ej undersökts i försök två, den inledande etableringsfasen presenteras därför inte i denna figur och utvecklingen mellan dag noll och dag tre bör ej tolkas som linjär. Detta stöds av

resultaten från försök ett, där dag två undersöktes och är presenterad i *Figur 12* för tio procent tillsatt vetemjöl samt *Figur 15* för 15% vetemjöl.

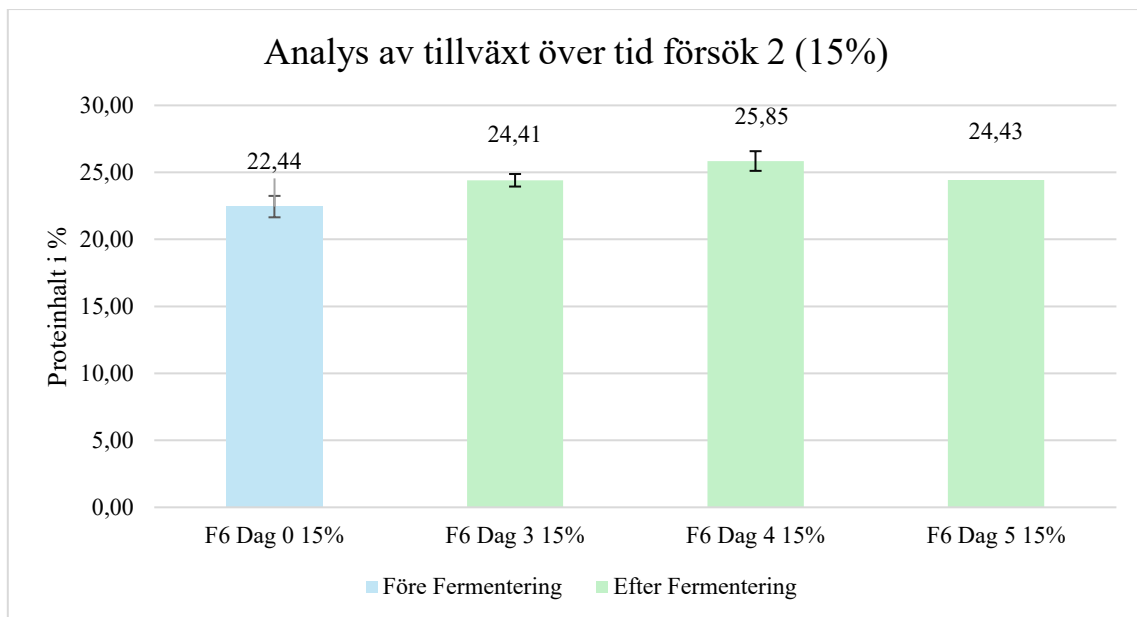


Figur 20. Den relativa ökningen av proteinhalt efter fermentering, analys av tillväxt över tid dag 3 – 5, samt 10% tillsatt kolhydrat. Andra försöket.

Den relativa ökningen för den sjätte fermenteringen, tio procent vetemjöl representeras i *Figur 20*. Resultaten visar en relativ ökning på 5,19% för dag tre, 9,18% för dag fyra samt 4,47% för dag fem. Högsta relativa ökning observerades dag fyra.

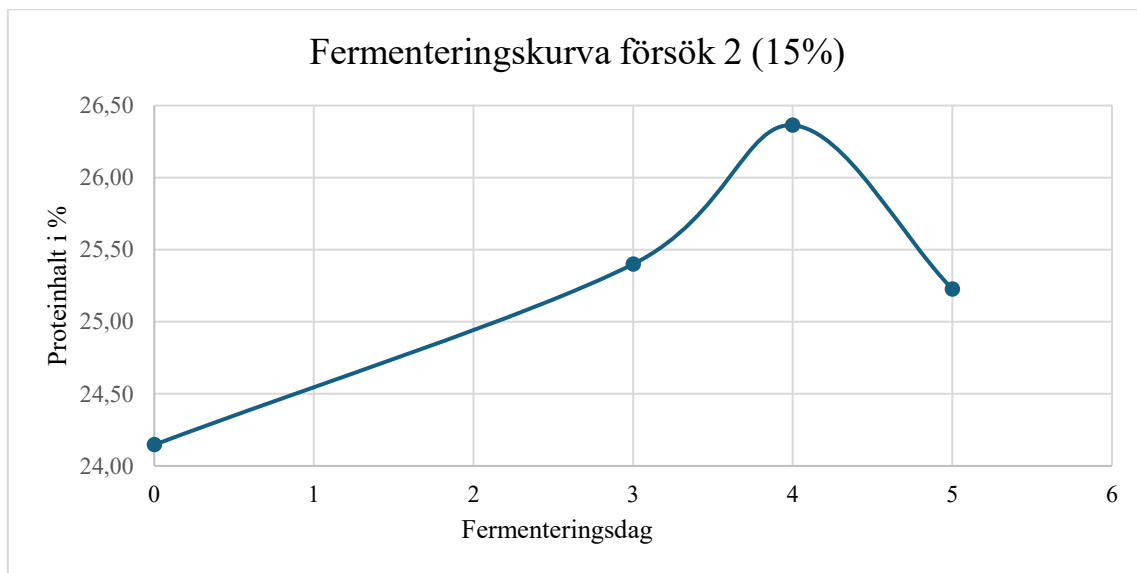
Resultatet följer samma fermenteringsförlopp som tidigare presenterats i Försök 1 med tio procent tillsatt vetemjöl *Figur 13*, Däremot uppvisade försök två genomgående en lägre relativ proteinökning än försök ett gjorde.

Data presenterad i *Figur 21* representerar fermentering över tid med samma parametrar som för försök fem men fokuserar på att titta på dygnet för förväntad optimal tillväxt för kontinuitet. Mängd tillsatt vetemjöl här är 15% i stället för tio procent som föregående. Den blå stapeln i *Figur 18* representerar före fermentering och de gröna representerar efter.



Figur 21. Ökning av protein visat i procentenhet, analys av tillväxt över tid dag 3 – 5, samt 15% tillsatt kolhydrat. Andra försöket.

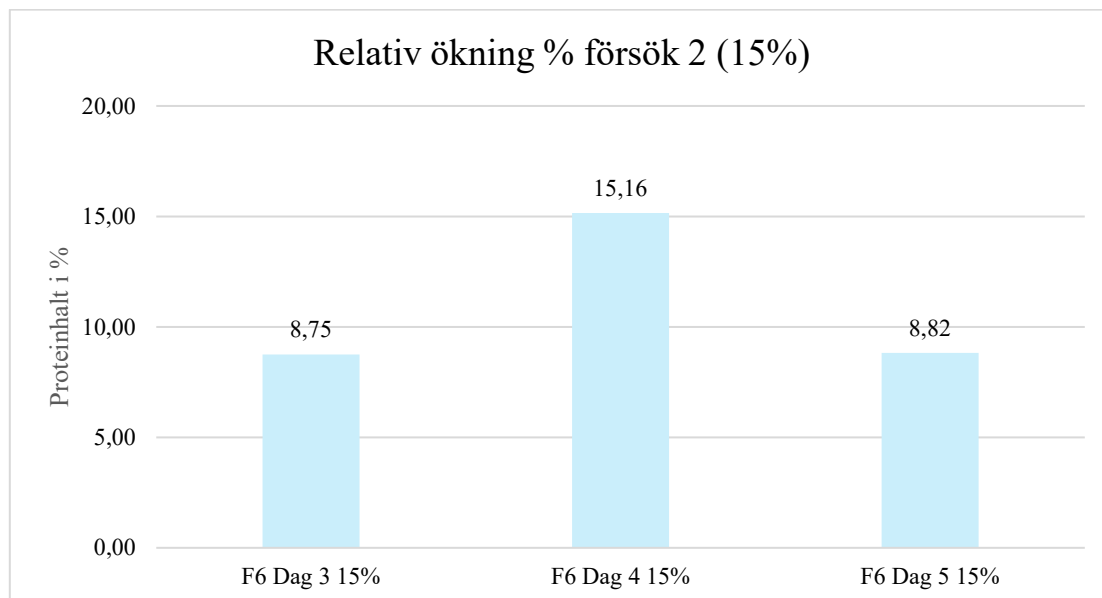
Analysen representerad i *Figur 21* för försök två 15% vetemjöl följer samma trend som resultaten för försök ett representerat i *Figur 11, 14*. Initial proteinhalt före fermentering uppmättes till 22,44%, medan proteinhalt efter fermentering uppmättes till 24,41% för dag tre, 25,85% för dag fyra och 24,43% för dag fem.



Figur 22. Fermenteringskurva som visar att tillväxten i substratet följer faserna i mikroorganismens tillväxtkurva. Andra försöket.

Resultatet i *Figur 22* representerar utvecklingen från dag tre till fem då tidigare skördedag ej undersökts i försök två, den inledande etableringsfasen presenteras därför inte i denna figur och utvecklingen mellan dag noll och dag tre bör ej tolkas som linjär.

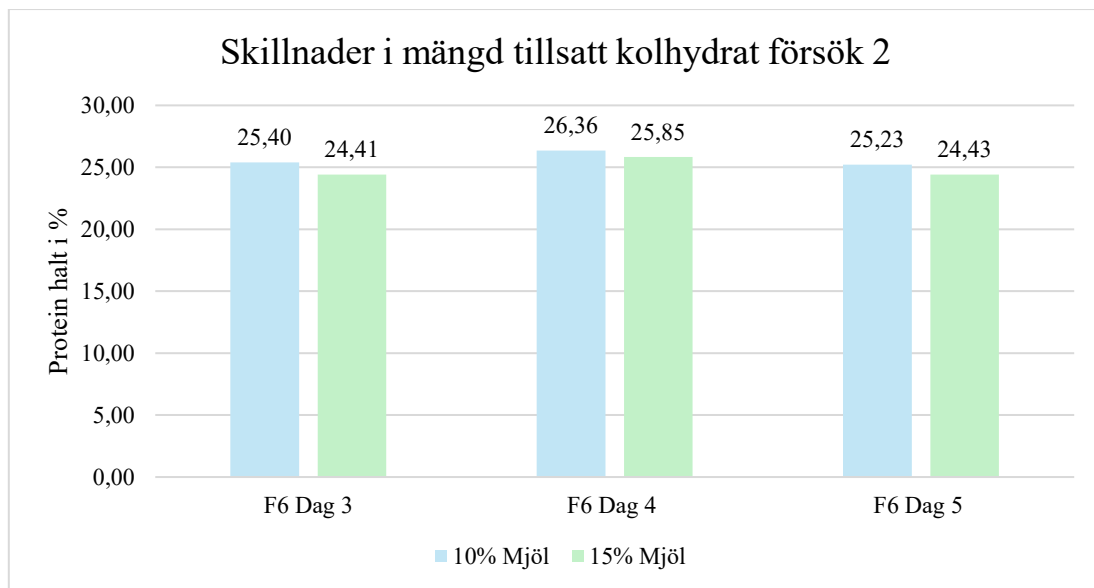
Detta stöds av resultaten från försök ett, där dag två undersöktes och presenteras i *Figur 12* för tio procent tillsatt vetemjöl samt *Figur 15* för 15% tillsatt vetemjöl.



Figur 23. Den relativa ökningen av proteinhalten efter fermentering, analys tillväxt över tid dag 3 – 5, samt 15% tillsatt kolhydrat. Andra försöket.

Den relativa ökningen för fermentering nummer sex, 15% vetemjöl presenteras i *Figur 23*. Resultaten visar en relativ ökning på 8,75% för dag tre, 15,16% för dag fyra samt 8,82% för dag fem. Högsta relativa ökning observerades dag fyra. Resultatet följer samma fermenteringsförlopp som tidigare presenterats i försök ett med 15% tillsatt vetemjöl *Figur 15*, Däremot uppvisade försök två genomgående en lägre relativ ökning av protein än försök ett gjorde.

Data presenterad i *Figur 24* ger en överblick över skillnaderna i tillväxtförhållande mellan de två tillsatsmängderna, 10 och 15%, av tillsatt vetemjöl undersökt för fermenteringsförloppet.



Figur 24. Visar på skillnaderna i proteinhalt, efter fermentering, mellan de olika mängderna tillsatt kolhydrat och antalet dagar som substratet fermenterat. Andra försöket.

Resultatet visar att båda tillsatsmängderna följer ett liknande fermenteringsförlopp med högsta proteinhalt observerad vid dag fyra, följt av en minskning dag fem. Skillnaderna observerade mellan de olika tillsatsmängderna är marginell där tio procent tillsatt vetemjöl visar en något högre proteinhalt jämfört med 15% tillsatt vetemjöl.

Diskussion

Syftet med projektet var att undersöka möjligheten att använda sojaokara som substrat för SSF med *A. oryzae*, samt identifiera processparametrar som kunde främja biomasstillväxt och proteinackumulering.

Projektupplägget utformades och konsulterades i samråd med handledande representant och ansvarig för befintlig fermenteringsprocess på Dapibuset. Parametrar som bedömdes kunna påverka tillväxtförhållandena identifierades och inkluderade bland annat substratets struktur, vattenhalt, luftflöde, tillsatts av lättillgängliga kolhydrater samt fermenteringstid.

Arbetet utfördes iterativt där resultaten från varje fermentering låg till grund för utformning av efterföljande försök. Den fortsatta processutvecklingen baserades initialt på visuella observationer av fermenteringen, där etablerad biomassa, sporbildning, doft, substratets struktur samt förmåga att hålla vatten användes som indikatorer för fortsatt optimering. Anledningen till att vi fokuserade på dessa aspekter initialt är att vi avvaktade med proteinanalys för att göra dessa under mer effektiva förhållande där vi kunde göra en samlad analys i stället.

Initialt undersöktes möjligheten att applicera Dapibusets befintliga fermenteringsprocess direkt på sojaokaran för att utvärdera om processen kunde användas utan modifiering. Resultatet visade inte någon tydlig etablering av biomassa och substratet hade en avvikande doftprofil jämfört med förväntad fermentering i enlighet med representant för Dapibuset. En möjlig förklaring till resultatet är att substratet innehöll för mycket vatten, vilket kan ha påverkat porositet och syretillförsel negativt. Vatten utgör en central parameter i SSF och det påverkar mikrobiell tillväxt och metabolism i substratet. Höga vattenhalter och låg porositet kan begränsa gasutbyte och syrediffusion, vilket kan påverka tillväxtförhållandena negativt. (Jin et al. 2019; Soccol et al. 2017).

För att förbättra substratets struktur genomfördes ytterligare ett försök baserat på Dapibusets process, med två modifierade parametrar. Hela risfiber adderades till substratet för att fungera som ett strukturförstärkande material. Mindre partikelstorlek kan bidra till agglomerering i substratet vilket kan begränsa luftflöde och syrediffusion under SSF (Yegin, 2025). Tillsats av risfiber syftade till att skapa en grövre struktur och bilda luftfickor för förbättrad syretillförsel genom substratet.

Utöver detta genomfördes en pressande dränering för att reducera överskott av vatten och skapa ett mer poröst substrat, vilket bedömdes kunna bidra till bättre syresättning och tillväxtförhållande (Jin et al. 2019).

Vattenhalt för substrat är uppmätt till 86,7% *Tabell 1*, med dessa förändringar observerades fortfarande inga tydliga indikationer på lyckad tillväxt. Begränsad sporbildning observerades visuellt men substratet hade inte heller samma distinkta doft som tidigare fermentering.

Resultatet i *Figur 1* visade endast marginell ökning av proteinhalt och gav därmed inget tydligt stöd för etablering av kolonisering i biomassa.

Vidare diskuterades möjligheten att avvika från den substratbehandling som används i Dapibusets befintlig process. En bidragande faktor till detta var svårigheten att återskapa samma förhållande under den pressande dräneringsprocessen, och därmed skapa kontinuitet mellan försöken. Detta resulterade i att vi tittade närmare på alternativa pastöriseringsprocesser samt olika mängd tillsatt syre under fermenteringsprocessen.

Två pastöriseringsprinciper undersöktes där varmluftsbehandling delvis syftade till att reducera vattenhalten medan autoklivering syftade till att bibehålla vattenhalten. Luftflöden på 0,5L/min respektive 1L/min undersöktes parallellt. Ugnsbehandling uppmätte en vattenhalt på 68–72% och autoklav uppmätte en vattenhalt på 78–79% för båda luftflödena (Tabell 1).

Visuellt observerades förbättrade tillväxtförhållanden ytligt men även vid brytning av substratet hade etablering börjat i mitten av substratet, detta var tydligast i det autoklaverade substratet jämfört med det som pastöriserats i ugn. Resultaten indikerar att vattenhalten kan ha haft större betydelse för tillväxtförhållandena än variationen mellan luftflöden i detta fall. Vattenhalt har en central faktor där för hög eller för låg vattenhalt kan påverka fermenteringsprocessen negativt, som nämnt innan kan en för hög vattenhalt reducera porositet och begränsa syrediffusion, medan en lägre vattenhalt kan skapa sämre mikrobiell tillväxt och metabolism i substratet (Agarwal et al., 2020). Utifrån resultaten i studien är en vattenhalt på 78–79% mer gynnsam för tillväxt jämfört med 68–72% eller 86,7%.

Efter observation av fermenteringskärl för försök tre konstaterades det att sporbildning hade initierats tidigare än förväntat, vilket fastställdes i dialog med handledare på Dapibuset. Sporuleringen observerades genom bildning av gröna sporer i och på substratet *bilagor 2,3*. Tidig sporulering kan indikera att substratet icke har optimala tillväxtförhållanden, där avsaknad av lättillgänglig näring utgör en möjlig förklaring. Vid odling av *A. oryzae* och andra filamentösa svampar kan förändringar i näringstillgång och miljöförhållanden påverka övergången från tillväxt till sporulering (Thougaard et al., 2007, s. 162-164; Ijadpanahsaravi & Wösten, 2024). Sojaokara innehåller höga nivåer av kostfiber men en låg mängd lättillgängliga kolhydrater, vilket potentiellt kan begränsa tillväxten under SSF. Detta motiverade vidare undersökning av vetemjöl som kolkälla. (Asghar et al., 2023)

Vetemjöl undersöktes genom tillsats före respektive efter autoklivering med mängderna 5% och 10% av okarans våta vikt, presenterat i *Figur 7, 9*. Den relativa ökningen för 5% presenterad i *Figur 8* visade begränsade förändring men indikerade en möjlig positiv effekt när vetemjöl blandades in i substratet före autoklivering. Effekten blev tydligare vid 10% tillsats där relativ proteinökning ökade markant, särskilt för mjöl blandat i före autoklivering.

Visuellt observerades att vetemjöl tillsatt efter pastörisering hade agglomererat och var svårare att fördela jämt i substratet. Inblandning före autoklaving gav däremot en jämnare struktur och mer finfördelat substrat. Samtidig observerades att vetemjölet genom autoklaving tillsammans med okaran bildade en mer sammanhängande struktur. Gelatinisering av stärkelse under värmebehandling kan ha ökat tillgängligheten av stärkelsen genom att granuler sväller och blir mer lättillgängliga för enzymatisk nedbrytning. (Furugren, 2017, s. 269)

Skillnaderna mellan 5% och 10% tillsatt kolhydrat indikerar att tillgången på lättillgängliga kolhydrater kan ha varit begränsade under tidigare försök. Detta stöds av tydligare spridning och etablering av biomassa i substratet presenterat i *Bilaga 4,5,6 och 7* samt ökad proteinhalt efter fermentering. Tidigare studier har visat att SSF av okara med filamentösa svampar kan öka proteinhalt och näringsvärde genom ackumulering av mycelbiomassa. proteinhalt (Marques et al., 2014).

Efter att en förbättrad tillväxt hade konstaterats fokuserade den fortsatta undersökningen på två frågeställningar: om ytterligare tillskott av kolkälla kan gynna fermenteringen samt vid vilken tidpunkt fermenteringen skulle sköras för bästa proteinhalt. De två avslutande fermenteringstillfällena fokuserade därför på 10% respektive 15% tillsatt vetemjöl, där substratet sköras efter två, tre, fyra och fem dygns fermentering.

Resultaten från samtlig fermentering visade konsekvent ett tillväxtförlopp där proteinhalten ökade fram till dag fyra, följt av en minskning dag fem. Detta mönster observerades oberoende av mängden tillsatt vetemjöl för båda fermenteringstillfällena *Figur 11, 14, 18 och 21*. Kurvorna för tillväxt *Figur 12,15,19 och 22* visualiserar tydligare utvecklingen där en initial etableringsfas följs av ökad tillväxt för att därefter avta. Förloppet överensstämmer med den förväntade tillväxtkurvan hos filamentösa svampar, den börjar med en lagfas följt av en logaritmisk tillväxtfas, efter den en stationärfas för att avslutas med en deklinationsfas, vilket relaterar till näringsbegränsning och sporulering (Cairns et al., 2019)

Vid jämförelse mellan mängderna tillsatt kolhydrat för den första fermenteringen observerades att en ökad mängd tillsatt vetemjöl korrelerade med en ökning i den ackumulerade relativa mängden protein. För 10% tillsatt vetemjöl observerades en maximal relativ ökning på 22,06% medan motsvarande för 15% tillsatt vetemjöl motsvarade 29,09%. Resultaten indikerade att tillgången på en mer lättillgänglig kolkälla fortsatt utgjorde en påverkande faktor på tillväxtförhållandena (Cebrián & Ibarruri, 2023). Andra fermenteringens resultat visade samma övergripande utveckling, men med en tydligt lägre relativ proteinhalt. Samtidigt observerades en mjukare och fuktigare struktur i substratet jämfört med första fermenteringen. Vid kontroll av syretillförseln konstaterades att syresättningen inte hade varit korrekt kopplad under hela fermenteringsförloppet, vilket sannolikt påverkat resultaten och utgör en möjlig felkälla.

Vidare uppvisade samtliga fermenteringskärl för andra försöket en tydlig doft av ammoniak. I försök två genomfördes fermenteringen på en ny batch sojaokara vilken hade en mycket högre halt råprotein initialt jämfört med alla tidigare försök. *A.oryzae* har en aktiv kväveomsättning där ammoniak är en central kvävekälla kopplad till ackumulerad biomassa

för tillväxt, vilket visar att ammoniak och kväve är nära kopplat till tillväxtförhållanden hos *A. oryzae* (Chutrakul et al., 2022). Det är möjligt att den förändrade sammansättningen av makronutrientier samt det avvikande luftflödet bidrog till förändrade fermenteringsförhållanden. Sambandet mellan substratets näringsinnehåll, den observerade ammoniaklika doften och den lägre mängden ackumulerat protein kunde dock inte fastställas inom ramen för studien. Trots dessa avvikelser indikerade resultaten att förhållandena under dygn fyra var mest gynnsamma för skörd.

Faktorer som diskuterats och tagits upp men som inte har elaborerats vidare är förhållandet till pH-värden, teoretiskt sätt skall förhållandet i substratet surna något under fermenteringsprocessen (Agnihotri, 1964), men våra observationer har inte visat på en märkbar förurning under fermentering.

Vad vi observerade under våra mätningar var att faktorer som vi justerat absolut har påverkat förhållandena för den filamentösa svampen (Cebrián & Ibarruri, 2023). Men eftersom Dumasmetsoden baseras på bestämning av total kvävehalt kan analysen inte skilja mellan ursprungligt protein, mikrobiellt protein, peptider eller fria aminosyror. Det är därför svårt att avgöra i vilken utsträckning den observerade ökningen beror på nybildning av mikrobiellt protein, nedbrytning av andra komponenter eller förändringar i substratets sammansättning under fermenteringen.

Slutsats

Som vi visat i våra försök går det att öka proteinhalten i sojaokara med hjälp av solid state fermentering. Våra försök visar också att de komplexa kolhydrater som till exempel olösliga kostfibrer, som finns i sojaokara är svåra för *A. oryzae* att börja bryta ner. Med hjälp av tillsatta mer lättillgängliga kolhydrater kommer nedbrytningsprocessen i gång fortare. För att bryta ner de mer komplexa kolhydraterna behöver enzymmängden vara stor. På grund av sojaokaras strukturella uppbyggnad behöver fermenteringsprocessen ställas in för att passa substratet. Den befintliga process som används är ej kompatibel med sojaokara som substrat.

Referenser

- Vong, W. C., & Liu, S.-Q. (2016). Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 139–147.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.011>
- Hartman, G. L., West, E. D., & Herman, T. K. (2011). Crops that feed the world 2: Soybean—worldwide production, use, and constraints. *Food Security*, 3, 5–17.
- Sedivy, E.J., Wu, F. and Hanzawa, Y. (2017), Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. *New Phytol*, 214: 539-553.
<https://doi.org/10.1111/nph.14418>
- Deutsch, L och Baraibar Norberg, M. (2024) Så blev sojabönan köttindustrins bästa vän. *Forskning och Framsteg*. <https://fof.se/artikel/sa-blev-sojabonan-kottindustrins-basta-van/>
- Asghar, A., Afzaal, M., Saeed, F., Ahmed, A., Ateeq, H., Shah, Y. A., Islam, F., Hussain, M., Akram, N., & Shah, M. A. (2023). Valorization and food applications of okara (soybean residue): A concurrent review. *Food science & nutrition*, 11(7), 3631–3640.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.3363>
- Rohrer, K., Whitfield, F., Aussanasuwannakul, A., Ningrum, A., Hugi, C., & Breitenmoser, L. (2025). Comparative Screening Life Cycle Assessments of Okara Valorisation Scenarios. *Environments*, 12(3), 93. <https://doi.org/10.3390/environments12030093>
- Gomi, K. (2014). *Aspergillus: Aspergillus oryzae*. I C. A. Batt & M. L. Tortorello (Red.), *Encyclopedia of food microbiology* (2:a uppl., s. 92–96). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00011-2>
- Yegin S. Solid-state fermentation as a strategy for improvement of bioactive properties of the plant-based food resources. *Bioresour Bioprocess*. 2025 Dec 3;12(1):140. doi: 10.1186/s40643-025-00981-7. PMID: 41335307; PMCID: PMC12675891.
- Jin G, Zhu Y, Rinzema A, Wijffels RH, Ge X, Xu Y. Water dynamics during solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* YH6. *Bioresour Technol*. 2019;277:68–76. doi:10.1016/j.biortech.2019.01.038.
- Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPS. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov*. 2017;1(1):52–71. doi:10.1016/j.biori.2017.01.002.).
- Agarwal, V., Kumar, D., Varadwaj, P., & Tiwari, A. (2020). Water activity and biomass estimation using digital image processing in solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 308, 123277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123277>
- Thougaard, H., Varlund, V., & Møller Madsen, R. (2007). *Grundläggande mikrobiologi med livsmedelsapplikationer* (2:a uppl.). Studentlitteratur.

Ijadpanahsaravi, M., & Wösten, H. A. B. (2024). *Germination strategies of stress-resistant Aspergillus conidia*. *Current Opinion in Food Science*, 57, 10119.

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101169>

Furugren, B. (2017). *Matkemi med kemiska grunder* (2:a uppl) KFS Lund AB.

Marquese, T.R., Corrêa, A.D., Lino, J. B. R., Abreu, C. M. P., & Simão, A. A. (2014). Chemical Constituents and technological functional properties of okara flour obtained from soybean. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(4), 348 – 354. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000400006>

Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2019). Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnology for biofuels*, 12, 77. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1400-4>

Cebrián, M., & Ibarruri, J. (2023). Filamentous fungi precessing by solid-state fermentation. I M. J. Taherzadeh, J. A. Ferreira, & A. Pandey (Red.), *Current Developments in Biotechnology and bioengineering: Fungal Biotechnology* (s. 251-292). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00003-X>

Chutrakul, C., Panchanawaporn, S., Vorapreeda, T., Jeennor, S., Anantayanon, J., & Laoteng, K. (2022). The Exploring Functional Role of Ammonium Transporters of *Aspergillus oryzae* in Nitrogen Metabolism: Challenges towards Cell Biomass Production. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 7567. <https://doi.org/10.3390/ijms23147567>

Agnihotri, V.P. Studies on Aspergilli XVI. Effect of pH, temperature, and carbon and nitrogen interaction. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 24, 305–314 (1964). <https://doi.org/10.1007/BF02053641>

Bilagor

Bilaga .1 Fermentering box 2



Bilaga .2 Autoklaverat 0,5L/min



Bilaga .3 Autoklaverat 1L/min



Bilaga .4 Fermentering nr.4 Mjöl värmebehandlat i substrat, efter fermentering.



Bilaga 5. Fermentering nr.4 Mjöl blandat i efter värmebehandling, efter fermentering.



Bilaga 6. Fermentering nr 4 Mjöl blandat i värmebehandlat substrat, efter fermentering.



Bilaga 7. Fermentering nr.4 Mjöl blandat i efter värmebehandling, efter fermentering.



Bilaga 8. Närbild av god etablering i och på substrat

