



Slutrapport för projekt

Mikrobiell interferens som biocid i pappersproduktion och avloppsrening

Projektperiod: 2017-07-01 till 2020-12-31
Projektnummer: 44220-1

Med stöd från

VINNOVA
Sveriges innovationsmyndighet

 **Energimyndigheten**

FORMAS 

**Strategiska
innovations-
program**

Titel på projektet – svenska
Mikrobiell interferens som biocid i pappersproduktion och avloppsrening
Titel på projektet – engelska
Microbial interference as biocide in paper production and sewage treatment
Universitet/högskola/företag
Umeå universitet
Adress
901 87 Umeå
Namn på projektledare
Anders Johansson
Namn på ev övriga projektdeltagare
Rikard Landberg, Lena Nilsson, Mehrdad Arshadi, Rolf Claesson, Elisabeth Granström, Carina Öhman, Maria Hedberg, Torgny Mossing, Christian Hagelberg, Olof Öhgren, Maria Lindgren, Hans Thoren, Ulrika Husmark, Bo Hammarström, Göran Hallmans, Robert Hansson, Pär Nyström
Nyckelord: 5–7 st
Biocidersättning, rågkli, laktobaciller, pappersproduktion, avloppsrening, antimikrobiella metaboliter

Förord

Den tvärvetenskapliga referensgrupp som sedan tidigare är knuten till projektet har varit av stor betydelse och en bidragande orsak till projektets progression, både vetenskapligt och finansiellt. Kompetensen inom gruppen spänner över ett mycket stort vetenskapligt område och omfattar forskare och teknisk personal från tre högskolor (Umeå Universitet, Chalmers och SLU Umeå) samt fem företag (Norrmjerier, Vakin, SCA, Essity, Management och Skog AB). Projektet har även medfinansierats av Bo Rydins stiftelse.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	2
Summary	3
Inledning och bakgrund	6
Genomförande	7
Resultat och diskussion	9
Slutsatser, nyttiggörande och nästa steg	12
Publikationslista	13
Projektkommunikation	14
Referenser	14
Bilagor	15

Sammanfattning

En övergripande målsättning för projektet har varit att optimera den antimikrobiella effekten för biocidersättning framställd genom fermentering av vassla och rågkli med laktobaciller, samt att identifiera och studera effekter av de aktiva komponenterna.

Vi har genom våra experimentella studier visat att biocidersättning kan framställas på ett optimalt och kostnadseffektivt sätt genom fermentering av industriella restflöden. De restflöden som testats och fungerar bra är rågkli, vassla och avloppsvatten från mejeriet.

För att identifiera de aktiva substanserna utfördes initialt en separering av fermentet vid SLU i Umeå. I den fortsatta optimeringsprocessen analyserades metaboliter som frisatts eller bildats under fermenteringsprocessen genom masspektrometri (Chalmers, Göteborg). Effekten på fermentationsprocessen av olika tillsatser, tid dos och temperatur utgjorde parametrar som utvärderades.

Under projektperioden har en testpanel av olika bakteriearter som är vanligt förekommande i de processer som utförs hos våra samarbetspartners (SCA Obbola, Norrmejerier och Vakin) samlats in. Bakterierna har isolerats och artbestämt genom DNA-sekvensering och sparats för fortsatta analyser. Den antimikrobiella aktiviteten hos fermentet och vissa enskilda metaboliter som fermenterats fram har analyserats. Resultaten visar att en utvald laktobacillstam (*Lactobacillus plantarum* DSMZ13980) frisätter antimikrobiella substanser från rågkli under fermenteringen som hämmar tillväxt av icke önskvärda bakterier men har ingen effekt mot *L. plantarum*.

Sammantaget så har vi identifierat de bakomliggande mekanismerna för fermentering av rågkli vilket lett fram till:

1. Optimering av framställningsprocessen
2. Kartläggning av produktens biologiska aktivitet
3. Identifiering av kommersiell användning för industriella restflöden
4. Leverans av en produkt som kan ersätta skadliga kemikalier och därigenom få positiva effekter på arbetsmiljö, omgivningar och mikrobiell resistensutveckling



Bild 1. Arbete vid testanläggning på SCA Obbola pappersbruk. Analyserna avser att studera laktobacillernas effekt på slembildning i processvatten. Teknisk personal från pappersbruket deltar i arbetet.

Nästa steg blir att skala upp produktionen så att tester kan utföras i full skala vid produktionslinjen i SCA Obbola och i speciellt utsatta delar av Vakins avloppssystem.

Summary

The major goal of the project has been to optimize the antimicrobial effect of biocide replacements produced by fermentation of whey and rye bran with lactobacilli, and to identify and study the effects of the active components.

Through our experimental studies, we have shown that biocide replacement can be produced in an optimal and cost-effective way by fermentation of industrial residual flows. The residual flows that have been tested and work well are rye bran, whey and wastewater from the dairy industry.

To identify the active substances, a separation of the fermented rye bran was initially carried out at SLU in Umeå. In the continued optimization process, metabolites released or formed during the fermentation process were analyzed by mass spectrometry (Chalmers, Gothenburg). The effect of different additives, time dose and temperature were parameters that were evaluated.

During the project period, a test panel of different bacterial species that are common colonizers in the processes of our partners (SCA Obbola, Norrmejerier and Vakin). The bacteria have been isolated and species determined by DNA sequencing and saved for further analyzes.

The antimicrobial activity of the fermented rye bran and certain individual metabolites produced upon fermentation has been analyzed. The results show that a selected lactobacilli strain (*Lactobacillus plantarum* DSMZ13890) releases antimicrobial substances from rye bran during fermentation which inhibits the growth of undesirable bacteria but has no effect against *L. plantarum*.

Overall, we have identified the underlying mechanisms for fermentation of rye bran, which resulted in:

1. Optimization of the fermentation process
2. Mapped the biological activity of the product metabolites
3. Identified a commercial use for industrial residual flows
4. Delivered a product that can replace harmful chemicals and thereby improve the work environment, environmental pollution and microbial resistance development

The next step will be to scale up the production so that tests can be performed in full scale at the production line in SCA Obbola and in selected problematic parts of Vakin's sewage system.

Involverade personer och företag

Projektledare

Anders Johansson, docent, forskare Umeå Universitet. Har varit aktiv under hel projektiden, men under vissa delar arbetat mindre än angivet i projektet, vilket kompenseras genom förlängd dispositionstid.

Medsökande

Rikard Landberg. Professor, Livsmedelsvetenskap, Chalmers, Göteborg. Har ansvarat för analysarbete som utförts på Chalmers, dock med viss fördröjning p.g.a. köbildning på analysplattformen (redovisas i bilaga 3).

Lena Nilsson, PhD, forskare, Arcum, Umeå Universitet. Har under projektets gång erhållit tjänst på annan enhet, och har därför ersatts av Elisabeth Granström, som deltagit aktivt i projektet genom i första hand laboratorieanalyser. Elisabeth Pensionerades i maj 2020 och har sedan ersatts av Carina Öhman.

Samarbetspartners

Torgny Mossing, forskare, SLU, Umeå. Har under hela projektiden deltagit aktivt i projektet.

Olof Öhgren, pensionerad Kemist och Processingenjör, 35 års erfarenhet från SCA Obbola. Har under hela projektiden deltagit aktivt i projektet.

Göran Hallmans, Seniorkonsult, Medicinska Biobanken Umeå Universitet. Har haft rollen som stödperson under projektiden.

Rolf Claesson, PhD, Oral Mikrobiologi, Odontologi, Umeå. Varit ansvarig för en stor del av de mikrobiologiska analyserna, och har efter sin pensionering ersatts av mikrobiolog Maria Hedberg vid samma institution.

Mehrdad Arshadi, Forskare, SLU, Umeå. Utfört analyser avsedda för separering av fermentet (redovisas i bilaga 2)

Maria Lindgren, Teknisk chef, SCA Obbola. Bidragit med prov, know-how m.m. under hela projektet men ha ersatts av Hans Thoren under projektets gång. Företaget har även utfört studier på brukets laboratorium (Figur 1).

Christian Hagelberg, Teknisk chef, Norrmejerier, Umeå. Bidragit med prov, know-how m.m. under hela projektet. Företaget har även levererat material från restflöden som använts som substrat i fermenteringen.

Robert Hansson, VD, Vakin, Umeå. Bidragit med prov, know-how m.m. under hela projektet. Företaget har även gjort online mätningar av H₂S bildning i särskilt utsatta avloppsledningar (Figur 2). Detta har utförts av processingenjör Per Nyström.

Bo Hammarström, Affärskonsult, Uminova Innovation, Umeå. Varit rådgivande i frågor som gäller IP-rättigheter och marknads-undersökningar. Bo har pensionerats under projektiden, så arbetet utgår numera från hans företag Management och Skog AB.

Ulrika Husmark, Senior scientist, SCA Hygiene, Göteborg. Bidragit med prov, know-how m.m. under hela projektet.

Bo Rydins stiftelse för vetenskaplig forskning medfinansierar projektet genom ett separat anslag som täcker bl.a. lön för mikrobiolog Maria Hedberg.

Alla medsökande och projektpartners som omnämns i ovan stycke har deltagit i möten och presentationer i med avsikt att sprida resultaten och samla in kommentarer från de olika parterna.

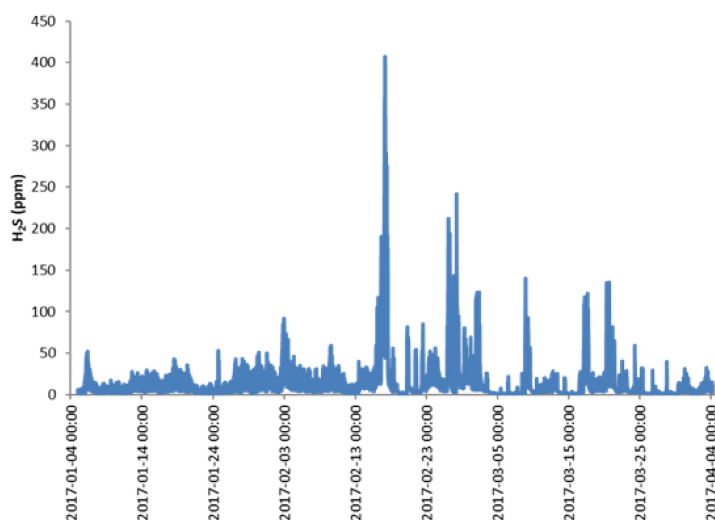


Bild 2. On-linemätning av H₂S koncentrationen vid pumpstation i avloppsledningen mellan Norrmejerier och Vakin. Grafen visar en representativ bild av gasbildningen (H₂S) som uppvisar stora variationer över tid. Mätningarna har utförts av teknisk personal från Vakin (Pär Nyström).

Inledning och bakgrund

Ökade krav på återvinning och resurseffektiv produktion innebär stora utmaningar för ett flertal företag. Dessa förändringar medför en ökad mikrobiell belastning bl.a. vid pappersproduktion och avloppsrening (Liang et al., 2019; Johansson et al., 2001). Idag använder pappersbruken stora mängder kemikalier för bakteriebekämpning, som både är kostsamt och kan ge upphov till resistensutveckling, samt en negativ inverkan på omgivningarna (Flemming et al., 2013). Det är därför ett stort behov av att utveckla hållbara alternativ som medför en mindre belastning för miljön (Rigol et al., 2004). För att försöka lösa dessa problem har vi etablerat samarbete med lokala företag (SCA Obbola, Vakin, Norrmejerier) för att testa ut möjliga metoder. Vi har nu utvecklat en biocid som är baserad på fermentationsprodukter från en stam av *Lactobacillus plantarum* (DSMZ 13890) som har visat sig ha god effekt mot inbindning och tillväxt av bakterier som finns i ovan nämnda system. *L. plantarum* är en art som är en species med välkänd antimikrobiell aktivitet och kan tillväxa under tuffa förhållanden (Behera et al., 2018). Ett omfattande arbete har utförts för att identifiera en laktobacill stam som växer optimalt i rågkli och samtidigt har en god pre- och probiotisk inverkan på sin omgivning. Biocidersättningen hämmar även produktion av gaser som kan leda till bildning av frätande och explosiva produkter. Fermentering av rågkli har tidigare prövats inom medicinsk forskning med avsikt att frigöra bioaktiva komponenter som påverkar bakterierna tarmfloran (Katina et al., 2007). För att kunna producera stora mängder av biociden på ett kostnadseffektivt sätt har vi nu börjat använda restprodukter från mejeriet och cerealie industrin. I våra preliminära resultat så har vi funnit att vår laktobacill växer utmärkt och genererar en effektiv biocidersättning i en blandning av vassle och rågkli. Detta innebär att vi nu har möjlighet att producera stora mängder biocid till en överkomlig kostnad. Vårt arbete i projektet syftar till att optimera denna process och att testa effekten i vår pilotanläggning, samt i system hos våra samarbetande företag. Ett miljövänligt alternativ till de traditionella kemikalierna kommer att innebära stora strategiska fördelar för de involverade företagen som nu kan förebygga och bekämpa de växande processtekniska problemen som är relaterat till mikroorganismer på ett effektivt och miljömässigt sätt. Det kan dessutom innebära nya användningsområden för industriella restprodukter från mejerier och cerealie bearbetning. Vi kommer att överväga möjligheterna att ge vår produkt ett IP-skydd så att den i framtiden kan produceras och säljas av ett lämpligt företag.

Syft Att utveckla en biocidersättning genom att fermentera industriella restflöden. Produkten blir kostnadseffektiv och minskar kemikalieanvändning och resistensutvecklingsproblem för potentiella användare.

- a) **Mål för studie** Att optimera produktion av laktobacill-baserad biocid på substrat av rågkli och restprodukter från mejerier så att effekten blir optimal mot mikrobiell 1) adhesion 2) tillväxt 3) H₂S-bildning 4) bildning av explosiv gas 5) slembildning (stopp i flöden) 6) korrodering av material 7) fiber-degradation.
- b) Att identifiera de aktiva komponenterna genom separering av den optimerade biociden, där fraktionerna testas i pilotanläggning och i agarodlingar följt av molekylär detektion av innehåll i de aktiva fraktionerna.

- c) Att producera och patentskydda en kommersiellt tillgänglig biocid som ur miljösynpunkt är ett bättre alternativ än dagens kemikaliebaserade och i linje med företagets policy med avseende på 1) miljöpåverkan 2) kemikaliehantering 3) arbetsmiljöprogram 4) kostnad.

Tidsram

Projektet avsåg initialt tiden 1/7 2017-0701 till 2019-06-30. På grund av att nyckelpersoner i projektet fått annan tjänst och erhållit anslag även från annan forskningshuvudman så har projektet förlängts t.o.m. 2020-12-31. Den förlängda dispositionstiden har godkänts av EM.

Mervärden

Gjorda försök visar att biociden har en potential att ersätta nuvarande kemikalier, dels för slembekämpning i recirkulerande system i cellulosaindustrin men även i ex kommunala ledningsnät. P.g.a. produktens miljövänliga sammansättning kan behandlingen ske av intern personal och kan innebära miljö-, arbetsmiljö- och ekonomiska fördelar.

Mikrobiell tillväxt påverkar slitstyrkan i papper och kan dessutom medföra dålig lukt och ett för högt spjäl i produkten. En uppgradering av fermentet (aktiva komponenter) skulle då kunna användas för att minska den mikrobiella kontamineringen i pappersprodukter där sådant är önskvärt. En sideeffekt blir också att en marknad öppnas för restprodukter från mejeri- och cerealie-industrin. Som odlingssubstrat använder vi vassla/skummjolk och rågkli, som alla finns i överskott.

Genomförande

Arbetet inleddes med att optimera fermenteringsprocessen för rågkli och laktobaciller. Parametrar som testades var tid, temperatur och inblandning av laktos och/eller vassla. Resultaten visar att 1% rågkli och 2% laktos eller vassla ger optimal tillväxt av laktobacillen. Arbetet ingick i Johanna Erikssons masterexamen vid civilingenjörsprogrammet (Umeå Universitet) och finns utförligt beskriven i bilaga 1. Arbetet involverade förutom projektledaren, Torgny Mossing SLU och Christian Hagelberg Norrmejerier. Lantmännen och Norrmejerier bidrog med restprodukter som användes som substrat vid optimeringen.

Nästa steg i processen var att separera fermentet i avsikt att identifiera fraktioner med bakteriehämmande aktivitet. Fraktioneringen utfördes av Mehrdad Arshadi på SLU genom "solide phase extraction" (SPE) teknik (Yang & Chang 2010). Separeringsprocessen finns utförligare beskriven i bilaga 2. Inga fraktioner med antimikrobiell aktivitet kunde identifieras med denna teknik, varför vi valde att inte vidare med denna teknik.

För att bättre förstå vad som händer rent biokemiskt under fermenteringsprocessen så identifierades metaboliter som bildats eller frisatts. Fermenteringar utfördes under olika tid, temperaturer och med tillsatser av laktos och/eller vassla. Koncentrationen av rågkli och mängd starterkultur av laktobaciller hölls konstant. Fermentet analyserades för pH-förändringar och laktobacillkoncentrationer innan de separerades genom centrifugering och frystes ner. Metabolomikanalys på

supernatanter och pelletar utfördes med masspektrometri av Rikard Landberg på Chalmers metabolomikplattform (Brunius et al., 2016). Ett stort antal metaboliter kunde identifierats och de som ökade substantiellt eller bildades under fermenteringen och de som frisattes från rågkli till den lösliga fasen valdes ut till test av antimikrobiell aktivitet. Det mikrobiella arbetet utfördes av Rolf Claesson och Elisabeth Granström vid Umeå Universitet. Lantmännen och Norrmejerier tillhandahöll substrat till fermenteringen. Resultaten från metabolomik analyserna finns utförligt beskrivna i bilaga 3.

Parallellt med övriga arbeten har ett stort antal bakterier från pappersbrukens processer (SCA Obbola och Essity) och Norrmejeriers avlopp isolerats. Isolerade bakterier artbestämdes genom amplifiering och sekvensering av 16S rRNA genen (Bokulich et al., 2020). Dessa isolat sparades och användes i en testpanel för analys av antimikrobiell aktivitet från fermentet och de identifierade fermentationsprodukterna. SCA Obbola, Norrmejerier och Vakin bistod med provtagning och den mikrobiella diagnostiken utfördes av Rolf Claesson och Maria Hedberg på Umeå universitet.

Slutligen så analyserades den antimikrobiella aktiviteten av fermentet och 9 olika renframställda fermentationsprodukter, som identifierats vid metabolomikanalyserna. Som testpanel användes bakterier som isolerats från utvalda miljöer hos de samverkande lokala företagen (Vakin, Norrmejerier och SCA Obbola). Lägsta hämmande koncentration (MIC) för varje substans och det orenade fermentet bestämdes med agarspänningsmetoden (Cardoso et al., 2020). Alla testade substanser uppvisade en antimikrobiell aktivitet som varierade i relation till vilken bakterie som testades (tabell 1). Testerna utfördes huvudsakligen av Maria Hedberg medan val av testsubstanser gjordes i samarbete med Rikard Landberg.

Resultat och diskussion

*Optimering av odlingssubstrat för *L. plantarum**

Vi har genom en mängd olika försöksupplägg optimerat tillväxtsubstrat för *L. plantarum*. Vi har uteslutande använt oss av komponenter som finns i överskott i industriella restflöden och visat att rågkli tillsammans med vassla eller tormjolk i olika koncentrationer utgör utmärkta substrat (bilaga 1). Vi har även visat att orena vätskefaser som avloppsvatten från Norrmejeriet kan utgöra vätskefasen i blandningen. Våra data visar att även om vi startar med en komplext sammansatt mikrobiologisk blandning så driver närvaron av rågkli tillväxten av vår laktobacill till så småningom en renkultur av *L. plantarum*.

Separering och aktivitetsbestämning

Som ett första steg i att identifiera de aktiva substanserna utfördes separering av fermentet genom "Solid Phase Extraction" (SPE). Fermentet separerades i fem olika fraktioner koncentrerades och användes för test av antimikrobiell aktivitet. Ingen av de testade fraktionerna uppvisade någon mätbar antimikrobiell aktivitet, varför vi inte gick vidare med denna metod. Analyserna finns mera utförligt beskrivna i bilaga 2.

Identifiering av metaboliter frisatta från fermenterat rågkli

Fermentet i olika blandningar av substrat har analyserats med masspektrometriska metoder vid analysplattformen på Chalmers i avsikt att identifiera metaboliter som ökar i koncentration vid fermenteringsprocessen (Brunius et al., 2016). Vi fermentering var tid och temperatur var parametrar som varierade och ett stort antal prover i pellet och supernatant kunde verifieras. De metaboliter som ökade substantiellt i koncentration under fermenteringen valdes ut som testsubstanser i efterföljande analyser av antimikrobiell aktivitet. En mer detaljerad beskrivning av metabolomikanalyserna och erhållna data finns bifogad (bilaga 3).

Isolering och karakterisering av bakterier vanligt förekommande i de våta delarna av industrierna flöden.

I avsikt att få en bild av mikroflorans sammansättning, samt att få en testpanel av bakterieisolat som representerar en specifik miljö, har en stor mängd bakterier isolerats och karakteriserats. Prover har tagits från olika miljöer hos de involverade företagen (Norrmejerier, SCA Obbola, Vakin) och isolerats genom odling på olika substrat. Den slutliga karakteriseringen har utförts genom amplifiering och sekvensering av 16S rRNA genen och har resulterat i identifiering av >30 olika bakteriearter (Bokulich et al., 2020). Bland de arter som isolerats finns ett flertal som är associerade till de problem som finns i miljön som bildning av slem (biofilm), illaluktande eller explosiva gaser (H_2 och H_2S) och korroderande metaboliter.

Analys av antimikrobiell aktivitet

Baserat på data från metabolomikanalyserna har nio olika substanser valts ut för att testas för antimikrobiell aktivitet. Kriterierna för att en substans skulle väljas ut var förutom att den identifierats i fermentet att den ökade i mängd i den lösliga

fraktionen, eller att den uppvisade en total ökning i fermentet. Testen gick till så att de olika renframställda substanserna eller fermentet gjöts in i olika koncentrationer i agarplattor tillsammans med bakteriesubstrat. Resultaten visade att i stort sett alla av de identifierade metabolerna hade en antibakteriell aktivitet som varierade stort beroende på kombinationen av bakterieart-metabolit. Även blandningar med alla nio utvalda metaboliter testades och blandningen följde ett mönster av antibakteriell aktivitet som liknade ursprungsfermentet (tabell 1). En intressant iakttagelse var att den laktobacillstam vi använt för fermenteringen var resistent mot alla de testade metabolerna. Denna observation har stor betydelse fermentationsprocessen som alltid slutar med en renkultur av laktobaciller i det rågklibaserade fermentet.

Tabell 1. Antimikrobiell aktivitet av fermentationsprodukter mot olika bakterier isolerade från processvatten (Norrmejerier, Essity eller SCA Obbola). Blandningar av fermentationsprodukter (Mix 7 & 9) och fermentets övertas (FRB sup) ingick även som testsubstanser. Den lägsta koncentration som hämmade bakterietillväxten vid inblandning i agarsubstrat anges (MIC).

Stam	MIC (mM)									MIC (vol%)
	Caproic	Cinnamic	DL-ind. lactic	DL-p- hydroxy	3-phenyl lactic acid	Propionic	Valeric	MIX 7	MIX 9	FRB Sup
Bacterieisolat										
<i>Bacillus</i> spp. (n=7)	<6.25-50	12.5	12.5–50	12.5	12.5–25	6.25-25	6.25-25	nt	nt	0.3 - 5
<i>C. sulfidigenes</i>	12.5	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	6.25	1.25	0.6	5
<i>Daeguia caeni</i>	6.25	6.25	12.5	12.5	25	6.25	12.5	1.25	0.6	5
<i>E. cecorum</i>	25	12.5	6.25	25	12.5	12.5	12.5	1.25	1.25	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	25	25	>25	25	25	12.5	2.5	2.5	≥5
<i>Pseudoxantomonas taiwanensis</i> T26	25	<1.5	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	1.25	1.25	1.25
<i>P. taiwanensis</i> T31	<1.5	<1.5	6.25	6.25	12.5	12.5	3	0.6	0.6	<0.3
<i>P. taiwanensis</i> T38	3	<1.5	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	0.3	0.3	<0.3
<i>Shewanella xiamenensis</i>	6.25	12.5	25	12.5	12.5	12.5	12.5	0.3	0.3	0.625
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ 13890	≥25	25	≥25	≥25	≥25	≥25	≥25	≥2.5	≥2.5	≥5

Diskussion om resultat

Utifrån de mål som fanns uppsatta av Energimyndigheten för denna utlysning så anser vi att projekt faller väl in under dessa målsättningar. Att identifiera användningsområden för industriella restprodukter, samtidigt som man kan lösa processtekniska problem hos företagen på ett kostnadseffektivt och miljövänligt sätt, känns centralt för utlysningen. Vi har dock trots hög kompetens inom den tvärvetenskapligt sammansatta projektgruppen ännu inte lyckats med att ha en produkt färdig som idag är tillgänglig på den öppna marknaden. Vi ser dock en stor potential i innovationen och kommer att driva projektet framåt mot ett sådant mål, även efter det att stödet från Energimyndigheten upphör. Vi har kommit en bra bit på vägen och har värdefull uppbackning av de involverade företagen i den processen. Dessa kontakter anser vi också är av största vikt för att snabbt kunna nå ut på marknaden med en färdig produkt.

Projektets totala budget på 3,4 milj (varav 1,5 milj i bidrag från EM) kr är förhållandevis liten i relation till den besparing som kan uppkomma om den kommer att kunna implementeras i de involverade företagen. Projektets måluppfyllelse dikteras nedan i punktform.

1. **Optimerad framställningsprocessen** – Här finns data som tydligt visar hur stor mängd av de olika råvarorna som behöver tillsättas för att få en optimal tillväxt av laktobacillerna. Optimal användning av råvarorna (rågkli och vassla) är en förutsättning för att få en kostnadseffektiv produktion.
2. **Kartlagt produktens biologiska aktivitet** – En stor mängd data finns nu tillgängliga så att effektiva kalkyler kan göras för vilken dos och den förväntade effekten behandlingen kommer att ha. Karakteriseringen av effekten mot specifika arter av mikroorganismer kommer att kunna utnyttjas för att ge tillförlitliga prognoser för hur den antimikrobiella behandlingen kommer att vara till nytta.
3. **Identifierat en kommersiell användning för industriella restflöden** – Produktion av biocidersättning baserad på enbart industriella restflöden kommer att sätta ett kommersiellt värde på dessa restprodukter. Idag destrueras eller deponeras en stor del av dessa restprodukter, vilket innebär utgifter för producenten och en belastning för miljön.
4. **Levererat en produkt som kan ersätta skadliga kemikalier och därigenom få positiva effekter på arbetsmiljö, omgivningar och mikrobiell resistensutveckling** – Vi har idag en produkt färdig som har potentialen att ersätta många av de kemikalier som idag används för mikrobiell kontroll. Produkten har testats i mindre format i laboratoriemiljö och i ”pilot plant” modeller på de involverade företagen. Det som återstår är nu att starta en storskalig produktion så att produkten även kan testas i större skala i den miljö där den kommer att användas. Arbetet med att skala upp produktionen ingår inte i denna ansökan, men processen har initierats i samarbete med Norrmejerier och de involverade intressenterna (SCA och Vakin). Arbetet med marknadsanalys och IP-rättigheter har påbörjats med involvering av Bo Hammarström (Management och Skog AB).

Tidplan och resursplan

Projektet har blivit fördröjt i tid p.g.a. köbildning på Chalmers analysplattform och även för att viktiga personer för projektet erhållit annan anställning som in kunnat kombineras med deltagande i detta projekt. Trots detta har vi nu kommit till projektslut som innebär att vi på ett förtjänstfullt sätt kan besvara de frågor vi ställde i projektplanen. Vi har även genom regelbundna möten och presentationer vid de involverade företagen spridit kunskapen om vår studie och kunnat motivera hur denna innovation kan göra nytta i företaget. Den tvärvetenskapliga projektgrupp som finns inom projektet är unik, och innehåller sammantaget en mycket hög och bred kompetens inom flera vetenskapliga områden. Interaktionen mellan akademien och företagen har på ett väsentligt sätt bidragit till projektets goda progression och för goda framtida utvecklingsmöjligheter.

Diskussion och utvärdering av projektgruppen

Utförandet av hela projektet har fungerat mycket bra och levererat resultat över förväntan. Trots detta så har det mest positiva och med störst värde varit det fina samarbetet mellan företagen och akademien i den tvärvetenskapligt sammansatta projektgruppen. Allas kompetens som finns inom denna grupp har behövts och kommit väl till nytta för projektets progression. Detta samarbete har även varit lika viktigt för det praktiska arbetet som berört provtagning och testning som till stora delar utförts av personal på de involverade företagen.

Min förhoppning är att förutom de rent vetenskapliga eller tekniska kunskaper om hur man kan identifiera eller lösa mikrobiellt relaterade problem, så har gruppens sammansättning bidragit till en ökad förståelse för hur arbetet fungerar inom olika organisationer (högskola/industri). Vi har även förmedlat en hel del kunskap om mikrobernas betydelse för de processer som företagen arbetar med och vill förändra/förbättra.

Eftersom företagen utgjort en aktiv del i projektet så kommer de även i fortsättningen att vara delaktiga i att driva projektet framåt. Det tydliga miljömässiga och ekonomiska fördelarna som projektet kan uppnå är en mycket bra morot för att få entusiasm för att fortsätta driva projektet framåt.

Slutsatser, nyttiggörande och nästa steg

Eftersom projektet vetenskapligt i stort sett uppnått programmets målsättningar (optimera fermentering, använda restflöten från industrin, identifiera de aktiva och karakterisera fermentets antibakteriella aktivitet) så planerar vi nu att gå vidare med två olika inriktningar.

1. Att skala upp produktionsprocessen så att innovationens effektivitet kan testas i fullskaleförsök vid de involverade företagen. Detta planeras i samarbete med Norrmejerier vad gäller produktionsanläggning, samt SCA Obbola och Vakin när det gäller fullskaliga tester.
2. Eftersom innovation fungerar utmärkt för standardiseringen av fermenteringsprocessen och metaboliterna påverkar bakterier enligt ett kartlagt mönster så kommer vi att gå vidare för att inventera behovet inom bageriindustrin. Vi kommer även att lägga till en "functional food" aspekt på produkterna eftersom de har potential att påverka människors sammansättning av normalflora på ett positivt sätt.

Konklusioner

Uppnådda resultat i relation till projektmålen

Resultaten som framkommit i projektet har på ett strukturerat sätt visat på möjligheterna för att använda industriella restprodukter för framställning av biocidersättning. Vi har lyckats komponera en substratblandning som specifikt

gynnar vår utvalda laktobacillstam men som samtidigt avger metaboliter som verkar i synergi med laktobacillerna för att hämma mikrobiell kontaminering. Genom att kartlägga den antimikrobiella aktiviteten av fermentet och de enskilda metaboliterna ökar förståelsen för innovationens möjligheter.

Besparingspotential

Pappersindustrin använder idag stora summor på kemikaliebasreade biocider som tillsätts regelbundet under tillverkningsprocessen. Enbart på Pappersbruket i Obbola används idag biocid för ett värde av ca 5 milj kr/år. Ett krav på ökad återvinning av råmaterial tillsammans med en process där allt större delar vätska recirkulerar i systemet ställer producenten på hårda prov. Enligt myndigheternas och företagets miljöpolicy krävs även en minskad användning av kemikalier iframställningsprocessen. Om vår innovation kan användas som biocidersättning ser vi en stor framtida besparingspotential med denna innovation. Eftersom produktion görs på i huvudsak industriella restflöden så blir både kostnaden och inverkan på omgivande miljö begränsad.

Vi ser även en möjlighet att vår innovation ska kunna användas för att minska korrosion och dålig lukt i speciellt utsatta delar av avloppssystem. Mikrobiella fermentationsprodukter orsakar idag stort slitage på många avloppsledningar genom att bakteriernas metaboliter bildar frätande och toxiska produkter som har negativ inverkan på material och hälsa. Ombyggnad av gamla slitna avloppsledningar utgör idag en stor kostnad för stadens reningsverk och en miljöpåverkan genom spridning av illaluktande skadliga gaser. En hämning av dessa processer har en stor besparingspotential både på material och miljö, vilket idag är svårt att omsätta i kronor och ören. Utsatta avloppsledningar rensas idag på mekanisk väg, vilket fungerar bra men kan vara tidskrävande och stoppar inte heller upp de mikrobiellt relaterade problemen som beskrivits ovan.

Publikationslista

Johanna Eriksson. Optimization of production of antibacterial substances with lactic acid bacteria. Master thesis UmU, Umeå 2018. Supervisors: T Mossing, C Hagelberg, A Johansson (bilaga 1).

Xue K, Liu Y, Iversen KN, Mazidi M, Qu Z, Dong C, Jin T, Hallmans G, Åman P, Johansson A, He G, Landberg R. Impact of a fermented high-fiber rye diet on *Helicobacter pylori* and cardio-metabolic risk factors: A randomized controlled trial among *Helicobacter pylori*-positive Chinese adults. *Front Nutr* (accepted Nov 20, 2020). DOI: 10.2188/jea.13.162

Landberg R, Hedberg M, Johansson A et al., *Lactobacillus*-associated metabolites from fermented rye have synergistic antimicrobial properties (manuscript in preparation).

När det gäller de studier som utförts i syfte att begränsa bakterietillväxten vid pappersproduktion och i avlopp har inget ännu publicerats. Där finns en kommersiell möjlighet att utveckla en produkt som de involverade företagen kommer att ha förtur till. Eventuellt så kan en produktion av en biocidersättning baserad på fermenterat rågkli bli möjlig i framtiden.

Projektkommunikation

Vi har regelbundet deltagit i möten med de involverade företagens tekniska personal för att informera om projektets resultat och planerade progress. Vi har främst samarbetat med SCA Obbola, Vakín och Norrmejerier, eftersom det varit geografiskt enkelt, men projektgruppen har även en gång besökt Essity och Mölnlycke. Prover har erhållits från alla tre företag, men på grund av den geografiska närheten har betydligt fler provtagningar utförts hos SCA Obbola.

Även inom den tvärvetenskapliga högskolegruppen hålls regelbundna möten där vi diskuterar resultat och en framtida utveckling av projektet. Vi avvaktar med ytterligare publicering till dess att vi vet hur planerna blir med en kommersiell utveckling av produkten.

Referenser

Behera SS, Ray RC, Zdolec N. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *Biomed Res Int* 2018; 28:9361614. doi: 10.1155/2018/9361614

Bokulich NA, Ziemski M, Robeson MS 2nd, Kaehler BD. Measuring the microbiome: Best practices for developing and benchmarking microbiomics methods. *Comput Struct Biotechnol J* 2020 Dec 3;18:4048-4062. doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.049

Brunius C, Shi L, Landberg R. Large-scale untargeted LC-MS metabolomics data correction using between-batch feature alignment and cluster-based within-batch signal intensity drift correction. *Metabolomics* 2016; 12: 173. doi: 10.1007/s11306-016-1124-4

Cardoso VM, Campos FF, Santos ARO, Ottoni MHF, Rosa CA, Almeida VG, Graef CFF. Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria. *J Appl Microbiol.* 2020; 129: 926-934. doi: 10.1111/jam.14666

Flemming HC, Meier M, Schild T. Mini-review: microbial problems in paper production. *Biofouling* 2013; 29: 683-696. doi: 10.1080/08927014.2013.798865

Johansson A, Holm SE, Olofsson C, Gref R, Svensson K, Lundström H, Wilhelmsson A, Hallmans G. Microflora in board with various contents of recovered

and virgin fibres. *Nordic Pulp Paper Res J* 2001; 1: 40-45. DOI: 10.3183/NPPRJ-2001-16-01-p040-045

Katina K, Laitila A, Juvonen R, Liukkonen KH, Kariluoto S, Piironen V, Landberg R, Aman P, Poutanen K. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiol* 2007; 24: 175-86. doi: 10.1016/j.fm.2006.07.012

Liang ZS, Sun J, Chau HK, Leong EI, Wu D, Chen GH, Jiang F. Experimental and modelling evaluations of sulfide formation in a mega-sized deep tunnel sewer system and implications for sewer management. *Environ Int.* 2019 Oct;131:105011. doi: 10.1016/j.envint.2019.105011

Rigol A, Latorre A, Lacorte S, Barceló D. Bioluminescence inhibition assays for toxicity screening of wood extractives and biocides in paper mill process waters. *Environ Toxicol Chem.* 2004 Feb;23(2):339-47. doi: 10.1897/02-632

Yang EJ, Chang HC. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* 2010; 139: 56-63. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.012

Bilagor

Bilaga 1. Johanna Eriksson. Optimization of production of antibacterial substances with lactic acid bacteria.

Bilaga 2. Mehrdad Arshadi. Separation of biocides fermented rye bran.

Bilaga 3. Rikard Landberg. Metabolic profile of *Lactobacillus plantarum* (DSMZ 13890) fermented rye bran and the influence of different growth conditions.

Bilaga 4. Administrativ bilaga.