

***Charakterisierung von Fermentationsprodukten aus der
Fermentation von Nebenströmen der Kakaoindustrie durch
Pilze der Abteilung Basidiomycota***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Victoria Steiß (geborene Klis)

(M.Sc. Lebensmittelchemie)

aus Gießen

angefertigt von November 2019 – April 2023 am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
angewandte Ökologie, Institutsteil Bioressourcen, Gießen

2023

Dekan: Prof. Dr. Thomas Wilke

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn,
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Eisner, Honorarprofessur an der Technischen
Universität München (School of Life Sciences), Schwerpunkt: Verfahrenstechnik
pflanzlicher Rohstoffe

Für meine Familie

Selbstständigkeitserklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während dieser Zeit herzlich bedanken. Für die Diskussion der wissenschaftlichen Ergebnisse nahm er sich stets Zeit und unterstützte mich auch bei Problemstellungen. Ebenso danke ich Professor Dr. Peter Eisner für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Professor Dr. Martin Rühl und Professor Dr. Till Schäberle für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Dr. Marco A. Fraatz für seine fachliche Unterstützung in gaschromatographischen Angelegenheiten und bei wissenschaftlichen Fragestellungen allgemein. Danke für deine Zeit, deine Geduld und die enorme Hilfe.

Allen Partnerinnen und Partnern des CocoaFruit-Projekts möchte ich für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Projektes und den regen wissenschaftlichen Austausch danken. Thomas Bickel Haase danke ich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit. Für die Finanzierung des Projekts danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität sowie allen Kolleginnen und Kollegen des Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie Institutsteil Bioressourcen für die angenehme Zusammenarbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen sowie die Teilnahme an den sensorischen Untersuchungen. Insbesondere gilt mein Dank Janin Pfeiffer, Katharina Happel, Jeanny Jaline Jerschow-Schaumann, Dr. Andreas Hammer, Dr. Svenja Sommer, Dr. Axel Orban, Carolin Mewe und Christopher Back. Danke für die schöne Zeit, die gute Zusammenarbeit, eure Unterstützung und für eure Ratschläge. Weiterhin danke ich Frau Elke Landrock-Bill für die ESEM-Aufnahmen.

Allen Studentinnen und Studenten, die während ihrer Abschlussarbeiten zur Generierung von Daten beigetragen haben, gilt ebenfalls mein Dank. Hierbei geht mein besonderer Dank an Eva Pühn und Jeanny Jaline Jerschow-Schaumann.

Ich danke den fleißigen Korrekturleserinnen Dr. Svenja Sommer, Katharina Happel und Jeanny Jaline Jerschow-Schaumann.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere bei meinem Mann Patrick Steiß bedanken. Danke für all eure Unterstützung während dieser Zeit, für eure Geduld, eure Nachsicht, die aufbauenden Worte und dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Veröffentlichungen

Publikationen

Klis, V.; Pühn, E.; Jerschow, J. J.; Fraatz, M. A.; Zorn H: Fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp by *Laetiporus persicinus* yields a novel beverage with tropical aroma.

Fermentation. **2023**, 9 (533); <https://doi.org/10.3390/fermentation9060533>

Bickel Haase, T.; Klis, V.; Hammer, A. K.; Pinto Lopez, C.; Verheyen, C.; Naumann-Gola, S.; Zorn, H.: Fermentation of cocoa pod husks with *Pleurotus salmoneo-stramineus* for food applications. *Food Science & Nutrition*. **2023** (submitted)

Patent

Klis, V.; Zorn, H.; Bickel Haase, T.; Pühn, E.; Jerschow, J. J.: Erfindungsmeldung DE 102023110966.9: Fermentative Herstellung von Getränken aus dem Fruchtfleisch der Kakaofrucht. **2023**.

Tagungsbeiträge

Vortrag

Klis, V.; Jerschow, J. J.; Hammer, A. K.; Bickel Haase, T.; Naumann, S.; Zorn, H.: Nebenströme der Kakaobohnenproduktion – Entwicklung neuartiger Lebensmittel durch die Fermentation mit Speisepilzen. *Regionalverbandstagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, **2022**. Online-Veranstaltung.

Poster

Klis, V.; Hammer, A. K.; Bickel Haase, T.; Zorn, H.: Nebenströme der Kakaobohnenproduktion – Entwicklung neuartiger Lebensmittel durch die Fermentation mit Speisepilzen. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, **2022**, Hamburg.

Klis, V.; Hammer, A. K.; Bickel Haase, T.; Zorn, H: Development of novel food products by fermentation of cocoa side streams with edible fungi. *Choco Tec*, **2022**, Köln

Zusammenfassung

Der Kakaoanbau dient der Gewinnung von Kakaobohnen zur Herstellung von kakaohaltigen Produkten. Dabei fallen pro Kilogramm gewonnener Kakaobohnen zwischen sieben und neun Kilogramm Nebenströme an. Hierzu zählen die Fruchtschalen, die Bohenschalen und das Fruchtfleisch (Pulpe). Der große Anteil an Restbiomasse, die schlechten Anbaubedingungen sowie die negativen Auswirkungen auf die Umwelt machen ein Umdenken im Kakaoanbau erforderlich.

In dieser Arbeit wurde die Fermentation von Kakaofruchtschalen (CPH) und Kakaopulpe (KP) durch Speisepilze im Hinblick auf einen Einsatz im Lebensmittelbereich untersucht. CPH sind aufgrund ihrer nährstoffarmen Zusammensetzung und des hohen Faseranteils nicht direkt für die menschliche Ernährung einsetzbar. Nach einem initialen Screening auf Agarplatten sowie in Schüttelkolben zeigten *Pleurotus salmoneo-stramineus* sowie *Fomitopsis pinicola* die vielversprechendsten Ergebnisse für eine Nährwertaufwertung durch ihr Myzelwachstum. Die Medien- und Kultivierungsoptimierung umfasste die Supplementierung durch Natriumaspartat als Stickstoffquelle sowie die Fermentationsdauer. Eine achttägige Flüssigermentation durch *P. salmoneo-stramineus* erhöhte den Rohproteinanteil von 7,7 auf 22,1 g·100 g⁻¹ TM, eine viertägige Flüssigermentation durch *F. pinicola* erhöhte den Rohproteinanteil von 7,7 auf 17,5 g·100 g⁻¹ TM. Anhand der Aminosäureverteilung konnte über die essentiellen Aminosäuren die Proteinqualität bewertet werden. Hierfür wurde die Biologische Wertigkeit herangezogen. Diese lag für das Fermentat von *P. salmoneo-stramineus* bei 86 und für das Fermentat von *F. pinicola* bei 96 und war im Vergleich zu anderen pflanzlichen als auch tierischen Eiweißquellen sehr hoch. Durch die Fermentationen konnte kein Ligninabbau nachgewiesen werden. Aufgrund des hohen Ligninanteils in den Fermentaten ist ein direkter Einsatz der Myzel-Substrat-Komplexe in Lebensmitteln problematisch. Eine sinnvolle Alternative wäre die Isolierung des hochwertigen Proteins zum Einsatz in Lebensmitteln. Die hieraus resultierende Restbiomasse besteht zum größten Teil aus Lignin.

Weiterhin wurde die Kakaopulpe mit dem Ziel der Ausbildung interessanter Aromastoffe fermentiert. Die durch Pilze biotechnologisch hergestellten Aromastoffe werden als natürliche Aromastoffe klassifiziert. Vier Pilze der Gattung *Laetiporus* zeigten Aromaveränderungen hin zu tropisch-fruchtigen Noten, wie Kokos, Maracuja, Pfirsich und Mango, obwohl diese Pilze für die Ausbildung würziger, fleischartiger Noten bekannt sind. Durch eine 48-stündige Flüssigermentation von 10% Kakaopulpe in Trinkwasser mittels *Laetiporus persicinus* wurde ein ansprechendes Getränk entwickelt, das in einem sensorischen Panel mit einer Präferenz von 4,2 von 5,0 möglichen Punkten im Geschmack bewertet wurde und mit 1,34 g·100 mL⁻¹

Gesamtzucker als zuckerarm und alkoholfrei gilt. Eine großtechnische Umsetzung zur Herstellung eines fermentierten Getränks aus nur 10% hochwertiger Kakaopulpe mit kurzen Fermentationszeiten ist ein vielversprechender Ansatz, um Kakaofrüchten eine höhere Wertschöpfung zuzuführen. Mittels GC-MS-O wurde eine Aromaanalyse des Getränks durchgeführt. Neben bereits für den Pilzstoffwechsel bekannten Aromastoffen, wie (*R*)-Linalool, (*E*)-Nerolidol, 5-Butyl-2(5H)-furanon und Methylbenzoat, wurde eine Reihe an nicht näher identifizierten Sesquiterpenoiden mit maracuja- und kokosnussartigen Aromaeindrücken nachgewiesen. Diese Ergebnisse bieten ein interessantes Forschungsfeld für die Zukunft, da Sesquiterpenoide aus Pilzen mit tropischen-fruchtigen Geruchseindrücken bisher nicht beschrieben sind.

Insgesamt bietet diese Arbeit verschiedene Ansätze zur Fermentation von Kakaonebenströmen, die den Wert von Kakaofrüchten steigern und somit den Kakaoanbau nachhaltiger gestalten können. Für großtechnische Anwendungen sind weitere Forschungsarbeiten bzw. Untersuchungen zur Maßstabsvergrößerung notwendig. Zu beachten ist neben anderen Aspekten der Lebensmittelsicherheit, dass es sich bei Produkten aus Fermentationen durch Speisepilze der Abteilung Basidiomycota um *Novel Foods* handelt.

Abstract

Cocoa cultivation yields cocoa beans for the production of cocoa-based products. Between seven and nine kilograms of by-products are produced for every kilogram of cocoa beans. These include the cocoa pod husks (CPH), the bean shells and the cocoa pulp. The large quantity of residual biomass, the poor cultivation conditions and the negative impact on the environment require a fundamental change in cocoa farming.

In this work, the fermentation of CPH and cocoa pulp by edible fungi was investigated with a focus on their potential use in the food sector. CPH are not directly suitable for human nutrition due to their nutrient-poor composition and high fibre content. After initial screening on agar plates as well as in shaking flasks, *Pleurotus salmoneo-stramineus* and *Fomitopsis pinicola* showed the most promising results for nutritional improvement through their mycelial growth. Media and cultivation optimisation included supplementation with sodium aspartate as a nitrogen source and the fermentation period. An eight-day liquid fermentation by *P. salmoneo-stramineus* increased the crude protein content from 7.7 to 22.1 g·100 g⁻¹ DM, a four-day liquid fermentation by *F. pinicola* increased the crude protein content from 7.7 to 17.5 g·100 g⁻¹ DM. Based on the amino acid analysis, the protein quality could be evaluated *via* the essential amino acids. The biological value was used for this purpose. The value was 86 for the fermentate of *P. salmoneo-stramineus* and 96 for the fermentate of *F. pinicola* and thus very high compared to other plant and animal protein sources. No significant degradation of lignin was induced by the fermentations. Due to the high lignin content of the fermentates, a direct use of the mycelium-substrate complexes in foods is problematic. A suitable alternative would be the isolation of the high-quality protein for use in foods. The resulting residual biomass consists mainly of lignin.

Furthermore, the cocoa pulp was fermented with the aim of generating interesting aroma compounds. Four fungi of the genus *Laetiporus* showed aroma changes towards tropical fruity notes, such as coconut, passion fruit, peach and mango, though these fungi have been known for the formation of spicy and meaty notes so far. A 48-hour liquid fermentation of 10% cocoa pulp in drinking water using *Laetiporus persicinus* resulted in an appealing beverage that scored a preference of 4.2 out of 5.0 points in a sensory panel and is considered low in sugar with 1.34 g·100 mL⁻¹ total sugar and alcohol-free. A large-scale implementation to produce a fermented beverage from only 10% high quality cocoa pulp with short fermentation times is a promising approach to add value to cocoa fruits. By means of GC-MS-O, an aroma analysis of the beverage was carried out. In addition to aroma compounds already known for fungal metabolism, such as (*R*)-linalool, (*E*)-nerolidol, 5-butyl-2(5H)-furanone and methyl benzoate, a number of non-identified sesquiterpenoids with maracuja and coconut-like aroma

impressions were detected. These results offer an interesting field of research for the future, as sesquiterpenoids from fungi with tropical fruity odor impressions have not been described so far.

Overall, this work offers various approaches to the fermentation of cocoa side streams which may increase the total value of cocoa fruits and thus make cocoa farming more sustainable. Further research and upscaling studies are necessary for large-scale applications. In addition to other aspects of food safety, it should be noted that products from fermentations by edible fungi of the Basidiomycota division are regarded as novel foods.

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Aroma dilution analysis
AIL	Acid insoluble lignin
ASL	Acid soluble lignin
BG	Bestimmungsgrenze
CPH	Cocoa pod husks (Kakaofruchtschalen)
CPHF	Cocoa pod husk Fermentat
CSSV	Cocoa Swollen Shoot Virus-Krankheit
di	Direct immersion
DMAP	Dimethylallyldiphosphat
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
EAAI	Essential amino acid index
ESEM	Environmental scanning electron microscopy
FD	Flavor-dilution-Faktor
FID	Flammenionisationsdetektor
FPI	<i>Fomitopsis pinicola</i>
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatograph
hs	Head space
IC	Ionenchromatographie
ICCRI	Indonesian Cocoa and Coffee Research Institute
IPP	Isopentenylidiphosphat
KBE	Koloniebildende Einheiten
K _{OW}	Verteilungskoeffizient Octanol-Wasser
KP	Kakaopulpe
LiP	Ligninperoxidase
LMO	<i>Laetiporus montanus</i>
LPER	<i>Laetiporus persicinus</i>
LPO	<i>Laetiporus portentosus</i>
LSU	<i>Laetiporus sulfureus</i>
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MBTH	3-Methyl-2-benzothiozolinonhydrazon Hydrochlorid Monohydrat
MCC	Masamba cocoa clone
ME	Malzextrakt
MEA	Malzextrakt-Agar

MEPA	Malzextrakt-Pepton-Agar
MNA	Mononatriumaspertat
MnP	Manganperoxidase
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
MUFA	Mono unsaturated fatty acids
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NWG	Nachweisgrenze
OAV	Odor activity value
ODP	Olfactory detection port
OT	Odor threshold
PD	Pentan/Diethylether
PDCAAS	Protein digestibility corrected amino acid score
PSS	<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>
PUFA	Poly unsaturated fatty acids
qPCR	Real-time Polymerase chain reaction
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RI	Retentionsindex
SAFE	Solvent assisted flavor evaporation
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SFA	Saturated fatty acids
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SR	Split ratio
SUL	Sulawesi
VA	Veratrylalkohol
V _k	Variationskoeffizient
VP	Versatile Peroxidase

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	I
Danksagung	II
Veröffentlichungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Kakao - Schritte der Verarbeitung hin zu Kakaoprodukten	1
1.2 Nebenstrom- und Umweltproblematik	4
1.3 Bekannte Verwendungsmöglichkeiten für Kakao-Nebenströme	6
1.3.1 Kakaofruchtschalen	6
1.3.2 Kakaopulpe	9
1.3.3 Kakaobohnenschalen	12
1.4 Basidiomycota und Reststoffströme	13
1.5 Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Verwendete Chemikalien	16
2.2 Verwendete Geräte	21
2.3 Verwendete Pilze	23
2.4 Verwendete Substrate	24
2.5 Herstellung der Medien	25
2.5.1 Agar-Medien	25
2.5.2 Flüssigmedien	26
2.5.2.1 Sterilkontrolle der pasteurisierten Kakaopulpe	27
2.6 Kultivierung	27
2.6.1 Stammhaltung	27
2.6.2 Vorkultur	27
2.6.3 Hauptkultur	28
2.6.4 Ernte von pilzlicher Biomasse	28
2.6.5 Ernte von Kulturüberständen	28
2.6.5.1 Carbonisierung fermentierter Getränke	28
2.7 Screening-Ansätze und sensorische Methoden	29
2.7.1 Plattenscreenings	29
2.7.2 Flüssigscreenings	29
2.7.3 Sensorische Beschreibung im Panel	30

2.8	Methoden der Grundanalytik.....	30
2.8.1	Bestimmung der Restfeuchte.....	30
2.8.2	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl (Rohprotein).....	30
2.8.3	Bestimmung des Aminosäureprofils sowie Berechnung der biologischen Wertigkeit.....	31
2.8.3.1	Bestimmung von Asparaginsäure im Kulturüberstand.....	37
2.8.4	Enzymatische Glucose-, Fructose- und Saccharosebestimmung.....	38
2.8.5	Bestimmung der Rohasche.....	40
2.8.6	Bestimmung des Gehaltes an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen.....	41
2.8.7	Bestimmung des Gesamtfettgehaltes nach Weibull-Stoldt mittels vollautomatischer Soxtherm	42
2.8.8	Bestimmung des Fettsäureprofils.....	43
2.8.9	Bestimmung des Oxalsäuregehaltes	44
2.8.10	Bestimmung organischer Säuren.....	45
2.8.11	Bestimmung des Chitingehaltes	46
2.8.12	Bestimmung des Ligningehaltes	46
2.8.13	Bestimmung von am Ligninabbau beteiligten Enzymen	48
2.8.14	Bestimmung des Ergosterolgehaltes sowie Biomasseabschätzung.....	49
2.8.15	Rasterelektronenmikroskopie	51
2.9	Methoden der Aromanalytik	52
2.9.1	Aromaextraktion	52
2.9.1.1	Stir bar sorptive extraction	52
2.9.1.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender SAFE.....	52
2.9.2	Gaschromatographische Untersuchungen.....	53
2.9.3	Identifizierung aromaaktiver Substanzen	54
2.9.3.1	Abgleich der Massenspektren.....	54
2.9.3.2	Berechnung von Retentionsindices (RI's) nach van den Dool und Kratz..	54
2.9.3.3	Abgleich der Geruchseindrücke.....	54
2.9.4	Aromaverdünnungsanalyse (ADA).....	55
2.9.4.1	Statistische Untersuchung der Aromaverdünnungsanalyse	56
2.9.5	Quantifizierung ausgewählter Aromastoffe mittels Standardaddition.....	56
2.9.6	Berechnung des Aromawerts.....	57
2.9.6.1	Bestimmung der Geruchsschwelle in Wasser für 5-Butyl-2(5H)-furanon..	57
2.10	Validierung der Ergosterol-Methode	59
2.10.1	Grundkalibrierung und Linearität im Arbeitsbereich.....	59
2.10.2	Wiederfindung	61
2.10.3	Präzision.....	62
2.10.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	62
3.	Ergebnisse	64

3.1	Zusammensetzung der Substrate	64
3.2	Validierung der Ergosterol-Methode zur Quantifizierung des Pilzanteils	66
3.2.1	Grundkalibrierung und Linearität im Arbeitsbereich.....	66
3.2.2	Wiederfindung	67
3.2.3	Präzision.....	67
3.2.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	68
3.3	Fermentation von Kakaofruchtschalen (CPH)	69
3.3.1	Screening auf Agar-Platten.....	69
3.3.2	Screening in Submers-Kultur	70
3.3.3	Wachstumsreihen von FPI und PSS auf Malzextrakt-Medium	72
3.3.3.1	Ermittlung des Ergosterol-Referenzwerts zur Biomassequantifizierung ...	73
3.3.4	Medien- und Kultivierungsoptimierung.....	75
3.3.4.1	Stickstoff-Supplementierung	75
3.3.4.2	<i>Fed-Batch</i> Ansätze und Substratmenge	77
3.3.4.3	Wachstumsreihen und Erntetag von FPI und PSS auf CPH-Medium.....	79
3.3.5	Analytik der fermentierten Endprodukte (CPHF)	80
3.3.5.1	Chemische Zusammensetzung	80
3.3.5.2	Aminosäureverteilung und biologische Wertigkeit.....	81
3.3.5.3	Fettsäureverteilung.....	85
3.3.5.4	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CPH und CPHF	85
3.3.5.5	Ligningehalt und Aktivität der am Ligninabbau beteiligten Enzyme	86
3.3.6	Upscaling.....	89
3.4	Fermentation von Kakaopulpe (KP)	92
3.4.1	Sterilkontrolle der pasteurisierten Kakaopulpe	92
3.4.2	Screening auf Agarplatten	92
3.4.3	Screening der vier Schwefelporlinge in Submers-Kultur	93
3.4.4	Sensorische Beurteilung des KP-Getränks im Panel nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h.....	96
3.4.5	Optimierungsversuch durch Carbonisierung des KP-Getränks	98
3.4.6	Analytische Untersuchung des KP-Mediums und des KP-Getränks.....	100
3.4.7	Aromanalytische Untersuchungen des Kakaopulpe-Mediums	100
3.4.8	Aromanalytische Untersuchungen des Kakaopulpe-Getränks	103
3.4.8.1	Aromaverdünnungsanalyse (ADA).....	103
3.4.8.2	Quantifizierung von Aromastoffen und Berechnung des Aromawerts	108
3.4.8.3	Kinetische Untersuchung von Aromastoffen	109
4.	Diskussion.....	110
4.1	Fermentation von CPH zur Erzeugung pilzlicher Biomasse	110
4.1.1	Zusammensetzung von CPH	111

4.1.2	Ergosterol als Biomarker	112
4.1.3	Zweistufiges Screening zur Auswahl vielversprechender Pilze	115
4.1.4	Optimierung der Fermentation von CPH durch FPI und PSS.....	117
4.1.5	Bewertung der Endprodukte	120
4.1.5.1	Proteingehalt und Proteinqualität.....	121
4.1.5.2	Fett- und Aschegehalt.....	125
4.1.5.3	Ballaststoffe und Lignin.....	127
4.1.5.4	Upscaling.....	128
4.1.6	Mögliche Anwendungen im Lebensmittelbereich	129
4.1.7	Aspekte der Lebensmittelsicherheit	131
4.1.8	Ausblick	133
4.2	Fermentation von Kakaopulpe (KP) zur Erzeugung ansprechender Aromen	135
4.2.1	Screening	136
4.2.2	Sensorische Beurteilung der Getränke im Panel.....	137
4.2.3	Chemische Zusammensetzung des KP-Mediums und des finalen Getränks	139
4.2.4	Aromanalytische Untersuchungen des KP-Mediums und des fermentierten Getränks	140
4.2.4.1	Aromastoffe im KP-Medium	140
4.2.4.2	Aromastoffe im fermentierten Getränk	141
4.2.4.3	Kinetische Untersuchung von Aromastoffen	146
4.2.5	Ausblick	148
4.3	Fazit	149
5.	Literaturverzeichnis	151
6.	Anhang	173
6.1	Kalibriergeraden quantitativer Methoden	173
6.2	Chromatographische Reinheit von 5-Butyl-2(5H)-furanon.....	176
6.3	Fermentation von CPH – Screening in Submers-Kulturen	176
6.4	Fermentation von CPH – Analytik der Endprodukte	178
6.5	Validierung der Ergosterol-Methode	179
6.6	Fermentation von KP – Screening von Schwefelporlingen.....	182
6.7	Massenspektren der im KP-Medium vorkommenden Substanzen	182
6.8	Statistik der Aromaverdünnungsanalyse.....	193
6.9	Massenspektren der im fermentierten KP-Getränk vorkommenden Substanzen .	194
6.10	Quantifizierung von Aromastoffen im fermentierten KP-Getränk	204
6.11	Kinetische Untersuchung von Aromastoffen im KP-Getränk über die Zeit	206

1. Einleitung

1.1 Kakao - Schritte der Verarbeitung hin zu Kakaoprodukten

Der Kakaobaum (*Theobroma cacao* L.) zählt aufgrund seiner Kakaobohnen, die unter anderem zur Herstellung von Kakaopulver und Kakaobutter genutzt werden, zu einer der wirtschaftlich bedeutendsten Nutzpflanzen. Er gehört zur Familie der Malvengewächse (Unterfamilie *Sterculiaceae*) und stammt ursprünglich aus Zentral- und Südamerika (Afoakwa 2016). Er kann eine Höhe von 6 – 12 Metern erreichen und ist auf spezielle äußere Bedingungen angewiesen. So wächst er nur in einem bestimmten Radius von 20° um den Äquator und benötigt zwischen 1.200 und 1.500 mm jährlichen Niederschlag, Temperaturen zwischen 18 – 32 °C und genügend Schatten (Kim et al. 2011; Afoakwa 2016). Die Anzahl der jährlichen Blüten kann stark variieren. Der Kakaobaum ist auf Fremdbestäubung durch Insekten angewiesen. Dadurch werden nur wenige der vorhandenen Blüten befruchtet. So enden jährlich ca. 10 – 120 Blüten pro Kakaobaum in einer Frucht (Holst 1961). Kakaofrüchte zählen botanisch gesehen zu den Beeren und können in reifem Zustand 15 – 25 cm lang mit einem Durchmesser von 8 – 13 cm werden. Jede Frucht enthält zwischen 20 – 40 Bohnen, die von der weißen, schleimigen Kakaopulpe umhüllt werden (Kim et al. 2011). Die Kakaofruchtschale, die die Bohnen und die Kakaopulpe umgibt, ist aufgebaut aus Endocarp, Mesocarp und Epicarp (Abbildung 1) (Lu et al. 2018).

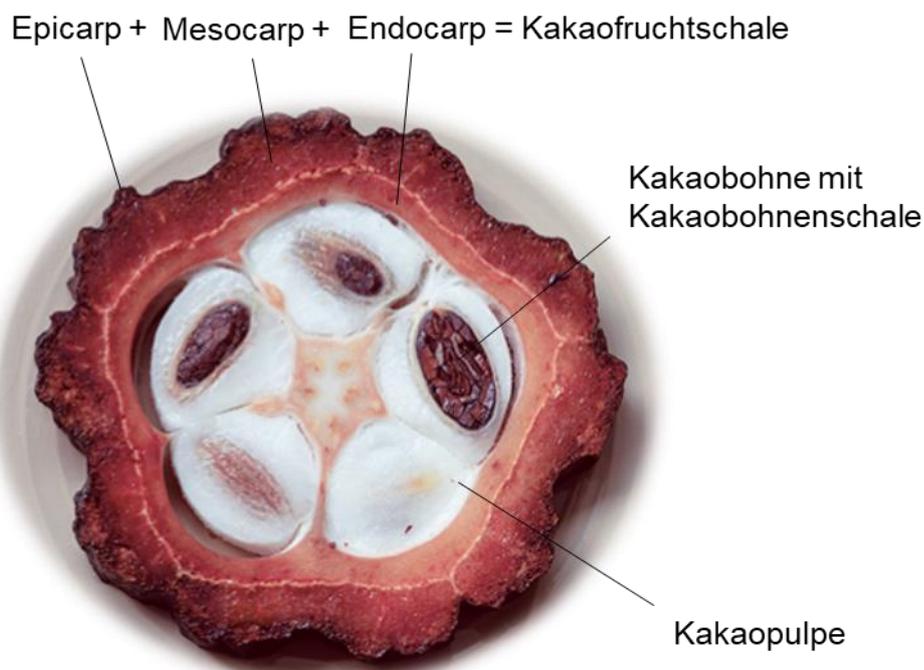


Abbildung 1: Querschnitt einer Kakaofrucht; mit Erlaubnis von Koa Switzerland GmbH ©.

Rohe und unbehandelte Kakaobohnen sind aufgrund ihres bitteren und unangenehmen Geschmacks ungenießbar (Vuyst und Weckx 2016). Für die Herstellung von Schokolade und anderen Erzeugnissen auf Kakaobasis ist zunächst eine Fermentation der Kakaobohnen erforderlich. Diese Fermentation ist einer der letzten verbliebenen großtechnischen spontanen mikrobiologischen Prozesse in der Lebensmittelindustrie (Meersman et al. 2013). Die Fermentation dient einerseits der Entfernung der Kakaopulpe durch pektinolytische Enzyme, wie Pektinmethylesterasen, Polygalacturonasen und Pektinlyasen, was für die anschließende trockene Lagerung notwendig ist (Schwan und Wheals 2004). Durch die Fermentation wird außerdem der Samenembryo abgetötet, was eine Keimung verhindert. Zusätzlich dient sie der Bildung von Aromavorstufen, der Farbentwicklung und der Verringerung der Bitterkeit (Afoakwa et al. 2015; Afoakwa 2016).

Nach dem Öffnen der reifen Kakaofrüchte werden die Kakaobohnen gemeinsam mit der sie umhüllenden Kakaopulpe von den Kakaofruchtschalen abgetrennt und in Haufen von 25 – 2.000 kg zusammengefasst. Hierbei kommt die Kakaopulpe in Berührung mit verschiedensten Mikroorganismen aus der Umgebung, beispielsweise von Transportboxen, Messern, durch die Berührung durch Arbeiter oder die Oberfläche der Kakaofrucht selbst. Diese Mikroorganismen tragen anschließend zur Fermentation bei. Die Kakaopulpe sorgt durch ihren hohen Anteil an Glucose und Fructose sowie an Zitronensäure für eine kohlenhydratreiche und saure Umgebung. Zudem schirmt sie die Kakaobohnen vom Luftsauerstoff ab (Schwan und Wheals 2004; Vuyst und Leroy 2020).

Die erste, anaerobe Fermentationsphase dauert etwa zwei Tage und wird bestimmt durch das Wachstum von Hefen und Milchsäurebakterien. Hefen produzieren pektinolytische Enzyme, die die Kakaopulpe verflüssigen, und wandeln die vorliegenden Zucker (vornehmlich Glucose) in Ethanol, organische Säuren und flüchtige Komponenten um (Lopez und Dimick 1995; Schwan und Wheals 2004). Abhängig von den äußeren Einflüssen wurden viele verschiedene Hefe-Stämme in der Literatur beschrieben, die zur Fermentation der Kakaobohnen beigetragen haben, unter anderem *Saccharomyces spp.*, *Rhodotorula spp.* und *Schizosaccharomyces spp.* (Thompson et al. 2012; Schwan und Wheals 2004). Hefen tragen außerdem zu einer erfolgreichen Fermentation bei, indem sie sowohl Aroma-Präkursoren als auch Aromastoffe selbst bilden. Hierzu zählen unter anderem höhere Alkohole und Ester, die neben anderen Aromastoffen für ein blumiges und fruchtiges Aroma der Kakaobohnen verantwortlich sind (Vuyst und Leroy 2020). Die Milchsäurebakterien verstoffwechseln die vorliegende Fructose entweder homo- oder heterofermentativ zu Pyruvat, welches anschließend weiter zu Milchsäure, Essigsäure und anderen Pyruvat-Metaboliten verstoffwechselt wird, die ebenfalls einen Beitrag zum Kakaoaroma leisten, wie zum Beispiel Diacetyl und Acetoin (Gänzle 2015; Vuyst und Leroy 2020). Auch Aminosäuremetabolite, wie beispielsweise 2-Methylbutanal oder Benzaldehyd, sind auf die vorhandenen

Milchsäurebakterien zurückzuführen (Vuyst und Leroy 2020). In dieser Phase der Fermentation steigt der pH-Wert aufgrund der Umwandlung von Citronensäure in Milchsäure an und die Temperatur erhöht sich von ca. 25 – 30 °C auf 35 – 40 °C (Vuyst und Leroy 2020). Durch das Abfließen der verflüssigten Kakaopulpe ändern sich die Fermentationsbedingungen nach ca. 48 Stunden hin zu aeroben Verhältnissen und Essigsäurebakterien, die die anaerobe Phase überlebt haben, beginnen zu wachsen (Schwan und Wheals 2004). Sie oxidieren den durch die Hefen produzierten Ethanol zu Essigsäure, und die durch die Milchsäurebakterien entstandene Milchsäure zu Acetoin. Hierdurch erhöht sich die Temperatur auf über 50 °C. Essigsäure, Ethanol und die hohen Temperaturen sind für die Übersäuerung des Keimblatts und somit das Absterben des Keimlings verantwortlich (van Ho et al. 2014).

Essigsäure und andere Fermentationsmetabolite diffundieren in die Kakaobohnen. Zu diesem Zeitpunkt werden Proteasen aktiv, welche enzymatisch Proteine zu erwünschten Aroma-Präkursoren abbauen (Afoakwa et al. 2008; van Ho et al. 2014). Neben freien Aminosäuren sind auch Peptide und reduzierende Zucker maßgeblich an der Ausbildung des Kakaoaromas beteiligt (Frauendorfer und Schieberle 2019).

Die endgültige Aromaausbildung erfolgt durch die anschließenden Schritte der Kakaoverarbeitung – die Trocknung und die Röstung der fermentierten Kakaobohnen. Durch die Trocknung wird zunächst der Wassergehalt herabgesetzt, wodurch die Anzahl lebender Mikroorganismen reduziert wird (Vuyst und Leroy 2020). Während der Röstung wird zum einen noch vorhandene Essigsäure entfernt, und zum anderen kommt es zur Bildung der typischen Schokoladen-Aromen aus den während der Fermentation entstandenen Präkursoren (Frauendorfer und Schieberle 2019). Zum Gesamtaroma von Kakao tragen sowohl flüchtige als auch nichtflüchtige Substanzen bei. Zu den nichtflüchtigen Substanzen zählen beispielsweise Alkaloide wie Theobromin und Coffein und Polyphenole, wie Catechine, Anthocyane und Proanthocyanidine, die den Produkten eine gewisse Adstringenz und Bitterkeit verleihen (Aprotosoiaie et al. 2016). Flüchtige Substanzen können während der Röstung beispielsweise durch die nichtenzymatische Bräunung (Maillard-Reaktion) oder den Strecker-Abbau entstehen (Afoakwa et al. 2008). Wichtige Substanzgruppen hier sind Alkohole, Aldehyde und Ketone, Ester, Furane und Furanone, oder auch Pyrazine (Aprotosoiaie et al. 2016). 3-Methylbutanal, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, Phenylacetaldehyd und 2,3,5-Trimethylpyrazin tragen neben vielen weiteren Aromastoffen entscheidend zum Kakaoaroma bei.

Die Entfernung der Kakaobohnenschale sowie das Aufbrechen der Bohnen kann vor oder nach der Röstung erfolgen. Die hierbei entstandenen Kakao-Nibs werden einer Alkalisierung mit Kalium- oder Natriumcarbonat unterzogen, um durch eine leichte Anhebung des pH-Werts die Farb- und Aromabildung zu beeinflussen und die Dispergierbarkeit des Kakaopulvers in

Wasser zu verbessern. Die durch Vermahlung erhaltene Kakaomasse kann anschließend abgepresst werden, wobei Kakaobutter und, nach einem weiteren Pulverisierungsschritt, Kakaopulver entstehen. Hieraus können verschiedenste Kakaoprodukte hergestellt werden (Afoakwa 2016). Kakaoprodukte werden nicht nur im Lebensmittelbereich, wie beispielsweise in Schokolade, kakaohaltigen Getränken oder Bäckereiprodukten eingesetzt, sondern auch in der Kosmetikbranche. Vor allem Kakaobutter ist eine beliebte Zutat sowohl im Lebensmittel- als auch im Kosmetikbereich. Aufgrund der besonderen Fettsäurezusammensetzung aus vor allem Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure, dem niedrigen Anteil an hoch ungesättigten Fettsäuren und der Symmetrie der Triacylglyceride, weist Kakaobutter einen engen Schmelzbereich zwischen 32 und 35 °C auf und erzeugt beim Schmelzen im Mund einen kühlenden Effekt (Müller 2020; Naik und Kumar 2014). In diversen Kosmetikprodukten wird Kakaobutter aufgrund ihrer feuchtigkeitsspendenden und antioxidativen Eigenschaften, hervorgerufen durch α -, β - und γ -Tocopherole, eingesetzt, da sie sich hervorragend zur Hauptpflege eignet und gleichzeitig einen anti-Aging Effekt aufweist (Naik und Kumar 2014).

1.2 Nebenstrom- und Umweltproblematik

Die Kakaoproduktion verzeichnete in den letzten Jahrzehnten eine stetige Zunahme. Um die enorm hohe Nachfrage nach dem Luxusgut bedienen zu können, steigen auch die Anbaumengen weiter an. Wurden im Erntejahr 2019/2020 noch 4,8 Millionen Tonnen Kakaobohnen produziert, so lag der Wert 2020/2021 schon bei 5,2 Millionen Tonnen. Zu den größten Anbauländern zählen die Elfenbeinküste und Ecuador, die zusammen über 60% des weltweiten Kakaoanbaus leisten. Weitere wichtige Anbauländer sind Kamerun und Indonesien (The International Cocoa Organization 2021). Ein Teil der Kakaobohnen wird nach der Fermentation zur Weiterverarbeitung in kakaoverarbeitende Länder exportiert. Der Großteil hiervon wird in Europa weiterverarbeitet. Die Niederlande und Deutschland zählen zu den Hauptimporteuren von Rohkakao. Die Herkunft der Kakaobohnen der deutschen Importe entfällt zu 50% auf die Elfenbeinküste, zu 17% auf Nigeria und zu 11% auf Ghana (CBI - Ministry of Foreign Affairs 2020).

Der Kakaoanbau ist allgemein für seine schlechten Arbeitsverhältnisse und die negativen Auswirkungen auf die Umwelt bekannt. Ca. 50 Millionen Menschen weltweit beziehen ihr Einkommen aus dem Kakaoanbau (Beg et al. 2017). Der größte Anteil wird durch Kleinbauern erzeugt. Durch die niedrige Gewinnbeteiligung leben Bauern und Bäuerinnen zumeist unterhalb der Armutsgrenze. Der Hauptgrund für die anhaltende Armut ist der niedrige internationale Kakaopreis (UNICEF 2018). Im Dezember 2022 lag der Handelspreis für eine Tonne bei 2.319,35 € (Statista Research Department 2022a). In diesem Kontext steht auch immer wieder das Problem der Kinderarbeit im Vordergrund (Schrage und Ewing 2005;

UNICEF 2018). Parallel zu diesen sozialen Problemen steht der Kakaoanbau auch vor ökologischen und ökonomischen Herausforderungen. In vielen Anbauregionen ist der niedrige Ertrag ein entscheidendes Problem. Ein Kreislauf aus niedrigem Einkommen, unzureichenden Investitionen und inadäquater Pflege der Plantagen führt zu niedrigen Erträgen. Erschwerende Faktoren sind der geringe Kakaopreis ab Hof, die hohen Investitionskosten, fehlender Zugang zu Darlehen und Krediten sowie die geringen Farm-Größen (Wessel und Quist-Wessel 2015). Da die Nachfrage das Angebot an Kakao übersteigt, ist die Erschließung landwirtschaftlicher Nutzflächen durch illegale Entwaldung ein zunehmendes Problem (WWF 2021b). Auch verschiedene Schädlinge und Baumkrankheiten tragen maßgeblich zu hohen wirtschaftlichen Verlusten bei. Zu den bekanntesten Kakaobaumkrankheiten zählen die *Cocoa Swollen Shoot Virus*-Krankheit (CSSV) und die *Black-Pod*-Krankheit. Bei der CSSV-Krankheit schwellen die Sprossen des Baumes an, bis es zum Absterben des Baumes kommt (Kouakou et al. 2012; Dzahini-Obiatay et al. 2010). Die *Black-Pod*-Krankheit wird durch die zwei pathogenen Spezies *P. palmivora* und *P. megakarya* verursacht und führt zu schwarzen Verfärbungen und zum Austrocknen der Früchte, wodurch die Bohnen unbrauchbar werden (Wessel und Quist-Wessel 2015).

Ein weiteres Problem stellt die Nebenstromproblematik des Kakaoanbaus dar. Im Gegensatz zu anderen Agrarprodukten, die in tropischen und subtropischen Regionen angebaut werden, wie z.B. Kaffee oder Tee, liegt der Nebenstromanteil bei Kakaofrüchten, abhängig von natürlichen Schwankungen, zwischen 70 und 90% des Gesamtgewichts (Vásquez et al. 2019). Bei Kaffeeirschen beträgt er ca. 30 – 50% (Preedy 2015). Den Hauptanteil der Restbiomasse der Kakaofrüchte nach Abtrennen der Kakaobohnen macht die Kakaofruchtschale aus. Pro Tonne Kakaobohnen fallen bis zu zehn Tonnen an Kakaofruchtschalen an (Feuchtweg) (Vriesmann et al. 2011). Diese verbleiben zumeist auf den Plantagen und dienen so einerseits als natürliches, organisches Düngemittel für die Kakaobäume, können allerdings beim Verrotten als Quelle für Baumkrankheiten, wie die *Black-Pod*-Krankheit, fungieren (Lu et al. 2018). Weiterhin fallen als Nebenströme die nach der Fermentation der Kakaobohnen verflüssigte Kakaopulpe sowie die Kakaobohnenschalen an. Im Vergleich zu den Kakaofruchtschalen ist deren Anteil zwar geringer, allerdings könnte die Verwendung der Nebenströme dazu beitragen, den zuvor beschriebenen sozialen, ökologischen und ökonomischen Problemen entgegenzuwirken, und den Kakaoanbau insgesamt nachhaltiger zu gestalten (Vásquez et al. 2019).

1.3 Bekannte Verwendungsmöglichkeiten für Kakao-Nebenströme

Seit einigen Jahren wird an neuen Möglichkeiten geforscht, die Nebenströme der Kakaofrucht einer wertbringenden Verwendung zuzuführen. Die anfallende Menge, die chemische Zusammensetzung sowie die Anwendbarkeit spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Im Folgenden ist der bisherige Forschungsstand zu den einzelnen Nebenströmen zusammengefasst.

1.3.1 Kakaofruchtschalen

Wie oben beschrieben, machen die Kakaofruchtschalen mit ca. 70 – 90% des Gesamtgewichts den größten Anteil der Frucht aus (Oddoye et al. 2013; Vriesmann et al. 2011). Im Verhältnis zu den großen Mengen an Kakao-Nebenströmen gibt es vergleichsweise wenige Verwendungsmöglichkeiten, die großtechnisch Anwendung finden. Frische Kakaofruchtschalen bestehen zu ca. 90% aus Wasser (Vriesmann et al. 2011). Aufgrund dieses hohen Wassergehaltes sind sie mikrobiologisch leicht verderblich und sollten für eine weitere Verwendung zunächst getrocknet werden. In der Literatur wurden, angelehnt an die stoffliche Zusammensetzung, verschiedene Verwendungsmöglichkeiten untersucht und diskutiert. Getrocknete Kakaofruchtschalen enthalten geringe Mengen an Fett und Protein, hingegen aber einen hohen Kohlenhydrat- und Ballaststoffgehalt. Auch der Aschegehalt ist vergleichsweise hoch (Tabelle 1) (Sobamiwa und Longe 1994; Vriesmann et al. 2011; Chun et al. 2016; Martínez et al. 2012).

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung von getrockneten Kakaofruchtschalen.

	Spannweite [g·100 g⁻¹ TM]	Referenzen
Asche	6,7 – 9,1	(Sobamiwa und Longe 1994; Vriesmann et al. 2011; Martínez et al. 2012)
Protein [Nx6,25]	4,2 – 8,6	(Sobamiwa und Longe 1994; Vriesmann et al. 2011; Martínez et al. 2012)
Fett	1,2 – 2,3	(Sobamiwa und Longe 1994; Vriesmann et al. 2011; Martínez et al. 2012)
Kohlenhydrate	29,0 – 32,3	(Martínez et al. 2012; Vriesmann et al. 2011)
Gesamtballaststoffe	36,6 – 56,0	(Martínez et al. 2012; Vriesmann et al. 2011)
Lignin	14,6 – 38,8	(Vriesmann et al. 2011; Sobamiwa und Longe 1994; Laconi und Jayanegara 2015)

Die erforschten Anwendungen erstrecken sich von der Landwirtschaft über den Bereich der Lebens-, Futtermittel und Kosmetika bis hin zum Sektor der Energiegewinnung. Abbildung 2 gibt einen Überblick über untersuchte Einsatzgebiete. Die Verwendung als Dünger oder

Futtermittel sowie die Herstellung von Seife sind traditionelle und in den Anbauländern bereits genutzte Alternativen für die sonst als Abfall anfallenden Kakaofruchtschalen (Oddoye et al. 2013).

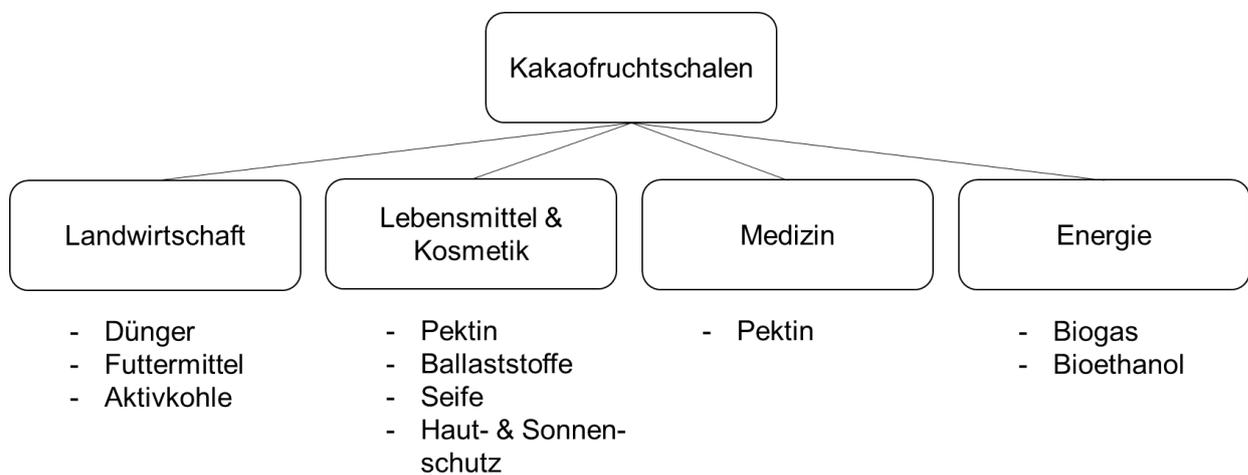


Abbildung 2: Auswahl beschriebener Einsatzmöglichkeiten der Kakaofruchtschale.

Aufgrund des hohen Aschegehaltes und den hierin enthaltenen Mineralstoffen eignet sich die Kakaofruchtschale als Dünger. Besonders der hohe Kalium- und Phosphatgehalt spielen hierbei eine Rolle. Mit bis zu $5.820 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Kalium und $710 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Phosphor dominieren diese beiden Mineralstoffe den Ascheanteil (Yapo und Koffi 2013). Ein aus Kakaoschalen gewonnener Dünger kann dabei nicht nur zur Düngung anderer Pflanzenarten, wie beispielsweise des Cashew-Baums eingesetzt werden (Adejobi et al. 2011), sondern auch zur Düngung von Kakaobäumen selbst. Der hohe Kaliumgehalt führt dabei zu einer signifikanten Zunahme der Größe des Setzlings, der Pflanzenhöhe und der Wurzellänge (Sodré et al. 2012; Akanbi et al. 2014).

Auch die Möglichkeit der Weiterverarbeitung von Kakaofruchtschalen zu Seifen beruht auf dem hohen Gehalt an Kalium. Beim Verbrennen der Schalen an der Luft entsteht eine K_2O -reiche Asche, die anschließend mit Wasser ausgelaugt, filtriert und aufkonzentriert werden kann. Bei der anschließenden Verseifung von diversen Ölen entsteht eine Seife mit vorteilhaften Eigenschaften, wie hoher Löslichkeit und guter Reinigungs- und Schaumbildungsfähigkeit (Gyedu-Akoto et al. 2015).

Kakaofruchtschalen können für die Fütterung von landwirtschaftlichen Nutztieren eingesetzt werden. Aufgrund der relativ nährstoffarmen Zusammensetzung und dem Vorkommen von für Tiere giftigem Theobromin müssen die Schalen allerdings zunächst verschiedenen Vorbehandlungsmethoden unterzogen werden (Laconi und Jayanegara 2015; Adamafio 2013). Durch eine Fermentation mit dem Pilz *Phanerochaete chrysosporium* kann

beispielsweise der Gehalt an Lignin reduziert werden, was zu einer verbesserten Verdaulichkeit führt (Laconi und Jayanegara 2015). Durch eine Fermentation mit *Aspergillus niger* kann der Theobromingehalt signifikant gesenkt werden (Adamafio et al. 2011).

Ein weiterer Inhaltsstoff der Kakaofruchtschalen ist Pektin. Es macht den größten Anteil an löslichen Ballaststoffen aus, die mit ca. 9,6 g·100 g⁻¹ in der Trockenmasse vertreten sind. Pektin kann durch unterschiedliche Extraktionsmethoden aus den Schalen gewonnen werden, beispielsweise durch die Extraktion mit heißem Wasser oder Citronensäure (Vriesmann et al. 2011; Vriesmann et al. 2012). Je nach Extraktionsmethode variieren Veresterungs- und Acetylierungsgrad, was einen direkten Einfluss auf die Viskosität und Gelbildungseigenschaften hat (Yapo und Koffi 2013). Die Verwendungsmöglichkeiten für Pektin aus Kakaofruchtschalen sind weitreichend und wurden größtenteils bereits patentiert. Beispielsweise kann das Pektin als Emulgator, elastisches Überzugsmittel für Lebensmittel, Kosmetika und pharmazeutische Produkte, sowie als Stabilisator, Texturgeber oder Lecithinersatz in Lebensmitteln verwendet werden (Bernaert et al. 2020).

Aufgrund der chemischen Zusammensetzung der Kakaofruchtschalen, insbesondere aufgrund des hohen Ballaststoffgehaltes, eignen sie sich zur Energiegewinnung. Beschrieben sind die Erzeugung von Biogas und Bioethanol. Unter Zuhilfenahme von verschiedenen aeroben und anaeroben Mikroorganismen kann in Kombination mit spezifischen Vorbehandlungsmethoden eine hohe Biogaserzeugungsrate erreicht werden (Dahunsi et al. 2019). Zur Produktion von Bioethanol eignet sich die Kakaofruchtschale aufgrund des hohen Gehaltes an Cellulose und Hemicellulose. Diese können durch unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden in ihre Monosaccharide abgebaut werden. Durch die anschließende Fermentation mit beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia stipitis* kann dann Bioethanol erzeugt werden (Igbinadolor und Onilude 2013).

Im Lebensmittelbereich wird die Kakaofruchtschale bisher nicht im Ganzen angewendet, sondern nur, wie zuvor beschrieben, einzelne extrahierte Stoffe, wie beispielsweise Pektin. Grundsätzlich sollte eine möglichst umfassende Anwendung von Nebenströmen aus der Lebensmittelindustrie in Lebensmitteln angestrebt werden, da dies gleichzeitig ökonomische und ökologische Vorteile bringt und in Zukunft aufgrund der steigenden Bevölkerungszahl immer mehr Menschen ernährt werden müssen. In den letzten zehn Jahren ist die Weltbevölkerung von 6,99 auf 7,91 Mrd. gestiegen (Statista Research Department 2022b). Dieser Anstieg wird sich in den nächsten Jahren verstärken, sodass Schätzungen davon ausgehen, dass bis zum Jahr 2100 10,35 Mrd. Menschen auf der Erde leben werden (Statista Research Department 2022c). Andererseits steht nur eine begrenzte landwirtschaftliche Nutzfläche zur Erzeugung von Lebensmitteln und Futtermitteln zur Verfügung. Rund 75% der

verfügbaren Nutzfläche werden zur Erzeugung von Fleisch und anderen tierischen Lebensmitteln verwendet. Die restlichen 25% werden dabei nicht ausschließlich zum Anbau von pflanzlichen Lebensmitteln verwendet, sondern vor allem zur Erzeugung von Futtermitteln wie Soja, Mais und Weizen (WWF 2021a). Kakao zählt vor allem zu den Genussmitteln, die zwar in hohem Maße weltweit verzehrt werden, aber keinen Zweck als Grundnahrungsmittel erfüllen (Fincke 1936). Vor allem in tropischen Regionen, wie der Elfenbeinküste, werden enorme Anbauflächen für Kakao benötigt. Pflanzliche Lebensmittel haben meist eine deutliche geringere Klimawirkung als tierische Lebensmittel. Kakao stellt hierfür jedoch kein gutes Beispiel dar. Mit 25,4 kg CO₂-Äquivalenten pro kg schneidet er deutlich schlechter ab als beispielsweise Mandeln mit 5,2 kg CO₂-Äquivalenten pro kg oder sogar als Schweinefleisch mit 10,3 kg CO₂-Äquivalenten pro kg (WWF 2021a).

1.3.2 Kakaopulpe

Traditionell verbleibt die Kakaopulpe zur Fermentation an den Kakaobohnen. Sie ist einerseits notwendig für eine erfolgreiche Fermentation, geht aber auch gleichzeitig währenddessen verloren, da sie verflüssigt wird und in den Boden abfließt. Pro Tonne zu fermentierender Kakaobohnen entstehen ca. 100 – 150 L verflüssigter Kakaopulpe, auch *Sweatings* oder Kakaohonig genannt (Oddoye et al. 2013). Neben dem Verlust eines hochwertigen Rohstoffs kann der Eintrag in den Boden diesen und die Gewässer verunreinigen und zu einem erhöhten Risiko für Schädlingsbefall führen (Dwapanyin et al. 1991). So wie in allen Bereichen gewinnt die Nachhaltigkeit auch im Kakaosektor an Bedeutung und die Weiterverwendung des Kakaohonigs ist aktueller als jemals zuvor. Beschrieben ist beispielsweise die Verarbeitung zu Marmelade (Anvoh et al. 2009), Kakaosirup (Toth et al. 2017) oder Essig, wobei letzteres einer zusätzlichen Fermentation unter Zuckerzugabe bedarf, um den Gehalt an Essigsäure zu steigern (Ganda-Putra et al. 2019).

Das reine Kakaofruchtfleisch besteht zum größten Teil aus Wasser, gefolgt von Mono- und Disacchariden. Zudem weist es einen hohen Gehalt an Citronensäure auf, wohingegen der Protein- und Fettgehalt gering sind (Pettipher 1986; Anvoh et al. 2009). Weiterhin enthält Kakaopulpe bis zum 300 mg·100 g⁻¹ TM Vitamin C. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die chemische Zusammensetzung.

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung von frischer Kakaopulpe; TM = auf die Trockenmasse bezogen.

Parameter	Gehalt	Literatur
Feuchte [%]	76,7 – 93,9	(Anvoh et al. 2009)
Wasseraktivität	0,97 – 0,98	(Pettipher 1986)
pH	3,3 – 3,9	(Pettipher 1986; Anvoh et al. 2009)
Zucker [g·100 g⁻¹]	11,06 – 13,05	
Glucose	3,00 – 5,06	(Pettipher 1986)
Fructose	3,80 – 6,07	
Saccharose	1,35 – 4,35	
Ballaststoffe [g·100 g⁻¹ TM]	10,56 – 16,14	
Cellulose	4,73 – 5,18	(Pettipher 1986)
Hemicellulose	1,58 – 2,85	
Lignin	0,50 – 1,50	
Pektin	3,75 – 6,61	
Protein [g·100 g⁻¹]	0,64 – 0,74	(Pettipher 1986)
Fett [g·100 g⁻¹]	0,35 – 0,75	(Pettipher 1986)
Asche [g·100 g⁻¹]	2,92 – 4,60	(Anvoh et al. 2009)
Ethanol [g·100 g⁻¹]	0,0 – 0,2	(Pettipher 1986)
Organische Säuren [mg·L⁻¹]		
Citronensäure	8,5 – 9,8	(Anvoh et al. 2009)
Äpfelsäure	3,1 – 4,1	
Oxalsäure	0,55 – 1,99	
Milchsäure	1,22 – 1,24	
Essigsäure	1,58 – 2,98	

Auch hinsichtlich ihrer Aromakomponenten bietet frische Kakaopulpe interessante Eigenschaften. Abhängig von ihrer Herkunft konnten 65 aromaaktive Substanzen nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderem 4-Vinyl-2-methoxyphenol (Nelke), δ -Decalacton (Kokos), Linalool (blumig), β -Damascenon (fruchtig, Weintraube) und γ -Nonalacton (fruchtig, Kokos) (Bickel Haase et al. 2021) (vgl. Abbildung 3).

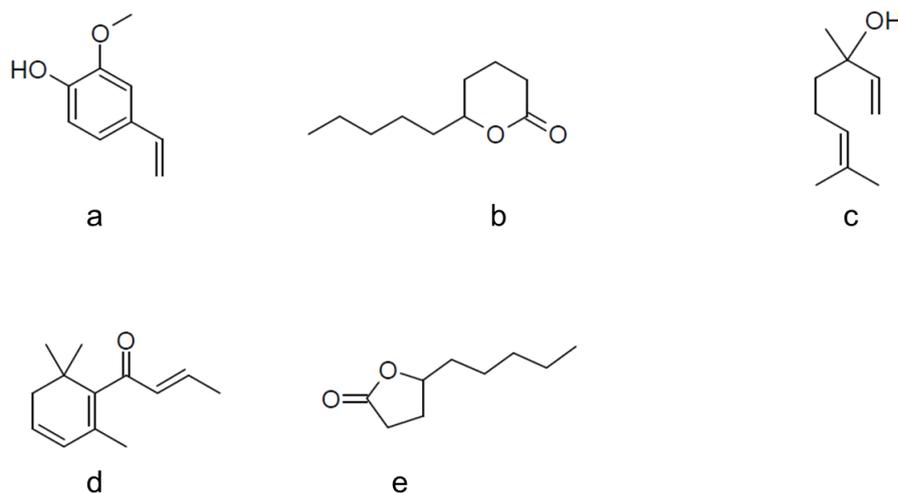


Abbildung 3: Strukturformeln bekannter Aromastoffe in Kakaopulpe; a: 4-Vinyl-2-methoxyphenol, b: δ -Decalacton, c: Linalool, d: β -Damascenon, e: γ -Nonalacton.

Studien haben nachgewiesen, dass die Entfernung eines Teils der Kakaopulpe vor der Fermentation keine negativen Auswirkungen auf die spätere Qualität des Kakaos hat (Schwan und Wheals 2004; Amanquah 2013), oder die Qualität bei bestimmten Kakaoarten durch die Reduzierung der Pulpe sogar erhöht werden kann, da zu viel Fruchtfleisch zu einer Übersäuerung der Bohnen führen kann (Schwan und Wheals 2004). Mithilfe eines Depulpers kann ein Teil des Fruchtfleischs schonend entfernt werden. Die Kakaobohnen werden dabei durch horizontal angeordnete rotierende Trommeln befördert, durch deren Löcher die Pulpe abfließen kann, ohne dass die Bohnen beschädigt werden (U.S. Food and Drug Administration 2020). Die Gewinnung eines Teils der hochwertigen Kakaopulpe bei gleichbleibender Qualität der fermentierten Kakaobohnen könnte zu einer Wertsteigerung der Kakaofrüchte und einer nachhaltigeren Nutzung führen. Unterschiedliche Verwendungsmöglichkeiten der frischen Kakaopulpe in der Lebensmittelindustrie wurden bereits untersucht. Vor allem in der Süßwaren- und Getränkeindustrie findet Kakaopulpe Anwendung.

Thematisch zum Einsatzgebiet passend kann Kakaopulpe oder ein daraus gewonnener Extrakt zum Süßen von Kakaomasse oder Kakaopulver eingesetzt werden und somit als Ersatz für Saccharose dienen. Hieraus können Schokoladenprodukte entwickelt werden, die zu 100% aus der Kakaofrucht gewonnen werden. Der in einem Patent beschriebene „Kakaozucker“ enthält hauptsächlich Saccharose, Glucose und Fructose und kann auch anderen als kakaohaltigen Produkten zugesetzt werden (Vieira et al. 2018).

Aufgrund des hohen Zuckergehaltes eignet sich Kakaopulpe sehr gut als Ausgangssubstrat zur Herstellung von alkoholhaltigen Getränken durch alkoholische Gärung. Verschiedene Studien beschreiben die erfolgreiche Herstellung eines Fruchtweins aus Kakaopulpe unter Zuhilfenahme von *Saccharomyces cerevisiae* (Dias et al. 2007; Duarte et al. 2010). Aufgrund des ausgebildeten Aromas ist die Akzeptanz von Kakaofruchtweinen gegenüber anderen

Fruchtweinen deutlich erhöht. Neben Alkoholen, wie 1-Hexanol und 2-Heptanol, und Monoterpenen, wie Linalool und α -Terpineol, tragen vor allem Ethylester maßgeblich zum Aroma des Fruchtweins bei. Unter anderem wurden Ethylhexanoat, Ethyllactat oder Diethylsuccinat nachgewiesen (Duarte et al. 2010). Auch zur Produktion eines Bier-ähnlichen Getränks kann Kakaopulpe eingesetzt werden, indem sie als Malzextrakt dient. Der Zusatz von 30% Kakaopulpe zu Beginn der Fermentation der Würze durch *Saccharomyces cerevisiae* bei 15 °C und 22 °C hat einen positiven Einfluss auf die Ethanolkonzentration, den Substratverbrauch, die Zellkonzentration sowie die allgemeine Akzeptanz (Nunes et al. 2020).

Auch der Einsatz in weiteren Produkten, wie beispielsweise Kefir, wurde untersucht und hinsichtlich Akzeptanz und Nährwert positiv bewertet (Puerari et al. 2012). Die Vielzahl der bisher untersuchten und erfolgreichen Anwendungsmöglichkeiten ist ein vielversprechender Start zur ganzheitlichen und damit nachhaltigen Nutzung der Kakaofrucht. Die Herstellung von Produkten aus oder mit Kakaopulpe könnte durch die Erschließung eines hochwertigen Rohstoffs zu einer Wertsteigerung der Kakaofrüchte beitragen und gleichzeitig einer Ressourcenverschwendung entgegenwirken (Vásquez et al. 2019).

Seit Februar 2020 sind das Fruchtfleisch, der Saft und der konzentrierte Saft aus dem Fruchtfleisch des *Theobroma cacao* L. in der europäischen Union als neuartiges Lebensmittel zugelassen. Im November 2022 folgte auch die Zulassung und Verwendung von Zucker aus dem Fruchtfleisch der Kakaopflanze als *Novel Food*. Durch einen Trocknungs- oder Reinigungsprozess wird dafür aus der Kakaopulpe oder dem konzentrierten Saft hochreine Glucose oder Fructose gewonnen (VO (EU) 2017/2470).

1.3.3 Kakaobohnenschalen

Die Kakaobohnenschalen bilden eine dünne Schicht um die Kakaobohnen. Sie werden nach der Röstung entfernt und fallen als Nebenprodukt an. Kakaobohnenschalen stellen einen eher kleinen Nebenstrom der Kakaofrucht dar. Sie machen ca. 10 – 17% des Gesamtgewichts der Bohnen aus (Rojo-Poveda et al. 2020). Wenn die Schalen nicht entsorgt werden, werden sie traditionell zumeist als Mulch verwendet. Durch ihr Verhältnis von Stickstoff (2%) zu Phosphat (1%) und Kalium (3%) kann der Mulch den Feuchtigkeitsverlust des Bodens verlangsamen und das Unkrautwachstum hemmen (Sukha 2003). Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung wurden vor allem in den letzten Jahren weitere Einsatzgebiete erforscht. Verschiedene Extrakte der Kakaobohnenschalen zeigten dabei aufgrund des Vorkommens bioaktiver Stoffe positive Einflüsse, wie z.B. eine Schutzwirkung gegen ischämische Schäden bzw. Durchblutungsstörungen in menschlichen Zellen (Arlorio et al. 2005) oder die Reduzierung chronischer Krankheiten wie Fettleibigkeit, Diabetes oder Dickdarm-Krebs (DeVries 2003; Kris-Etherton et al. 2002; Vásquez et al. 2019). Diese Eigenschaften sind unter anderem Polyphenolen zuzuschreiben, die mit einem Anteil von ca. 5% in der Trockenmasse

vertreten sind (Nsor-Atindana et al. 2012; Vásquez et al. 2019). Auch die Verwendung von extrahiertem Theobromin und Coffein aus Kakaobohnenschalen im Lebensmittelsektor ist ein mögliches Anwendungsbeispiel (Brunner et al. 1992). Im Gegensatz zu den Kakaofruchtschalen und der Kakaopulpe fällt dieser Nebenstrom nicht in den Anbauländern an, sondern in den Verarbeitungsländern.

1.4 Basidiomycota und Reststoffströme

Pilze der Abteilung Basidiomycota und Ascomycota bilden zusammen das Unterreich der Dikarya und werden auch als höhere Pilze bezeichnet. Die Basidiomycota umfasst etwa 30.000 beschriebene Arten, zu denen unter anderem fruchtkörperbildende Pilze gehören (Boddy et al. 2016). Ihre breit gefächerten Eigenschaften bieten ein umfangreiches Forschungsfeld. Aufgrund ihrer positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften sind die Fruchtkörper vieler Speisepilze zu beliebten Lebensmitteln geworden. Zu diesen Eigenschaften zählen ein hochwertiges Protein, ein hoher Ballaststoffgehalt, das Vorhandensein von B-Vitaminen und Vitamin D₂ sowie ein niedriger Fettgehalt (Manzi et al. 1999; Ahlborn et al. 2018). Insbesondere ihr hoher Proteingehalt macht sie zu einer attraktiven veganen Proteinquelle (Stephan et al. 2018). Die ausreichende Versorgung der breiten Bevölkerung mit Vitamin D ist generell kritisch. Der Großteil des Tagesbedarfs wird in den Sommermonaten durch endogene Synthese von Vitamin D₃ über Sonneneinstrahlung erlangt, die allerdings in den Wintermonaten fehlt. Die Zufuhr über Lebensmittel setzt in den meisten Fällen den Verzehr von tierischen Produkten voraus, da diese das wertvolle Vitamin D₃ enthalten (RKI 2019). Nennenswerte Mengen sind beispielsweise in fettreichen Fischen enthalten, wie z.B. in Hering oder Lachs (Souci und Andersen 2011). In Speisepilzen entsteht Vitamin D₂ unter Einfluss von UV-Licht aus Ergosterol, auch Pro-Vitamin D₂ genannt (Roberts et al. 2008). Speisepilze können daher einen Beitrag zur Vitamin D-Versorgung leisten. Ergosterol ist das pilzliche Pendant zum tierischen Cholesterin (vgl. Abbildung 4) und kann weiterhin als Biomarker zum Nachweis pilzlicher Biomasse genutzt werden, da es ausschließlich in der Zellmembran von Pilzen vorkommt (Mille-Lindblom et al. 2004).

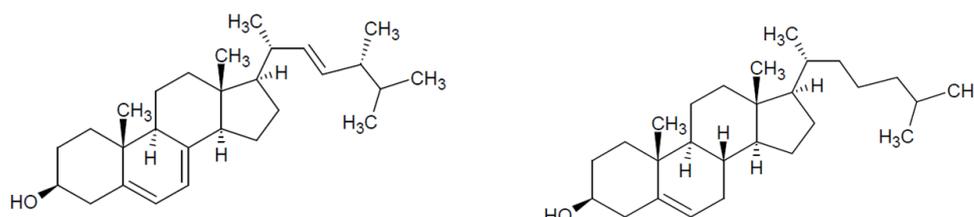


Abbildung 4: Ergosterol (Mycosterol) links und Cholesterol (Zoosterol) rechts.

Zusätzlich zu ihren guten Nährwerteeigenschaften sind viele Pilze der Abteilung Basidiomycota für ihre gesundheitsfördernde Wirkung bekannt. Unter anderem wurden bereits entzündungshemmende, antioxidative, immunmodulatorische, antikarzinogene und antidiabetische Wirkungen festgestellt (Gupta et al. 2017). Verantwortlich dafür sind verschiedene bioaktive Substanzen, die von den Pilzen gebildet werden. Eine wichtige Gruppe bioaktiver Verbindungen sind präbiotische Polysaccharide. Das bekannteste Beispiel sind die β -Glucane, welche in einer großen Anzahl verschiedener Pilze nachgewiesen wurde. Da β -Glucane zu einem gewissen Prozentsatz wasserlöslich sind, finden sich diese Verbindungen auch in wässrigen Extrakten (Rop et al. 2009). Es wurde bereits nachgewiesen, dass andere präbiotische Ballaststoffe in Pilzen, wie Maltotriose und Lactulose, den Stoffwechsel von nützlichen Darmmikroorganismen, wie *Lactobacillus*-Stämmen, fördern können (Sawangwan et al. 2018; Nowak et al. 2018).

Neben den Fruchtkörpern bilden Pilze noch einen weiteren, vegetativen Teil, das sogenannte Pilzmyzel. Dies ist das unterirdische Fadennetz des Pilzes. Dieses Pilzmyzel kann in Form von Myzelpellets in Submers-Fermentationen kultiviert werden (Trapp et al. 2018b; Ahlborn et al. 2019). Das gebildete Pilzmyzel hat ähnlich gute ernährungsphysiologische Eigenschaften wie die Fruchtkörper selbst. So wurde das Myzel von *Pleurotus sapidus* bereits erfolgreich in einer veganen Brühwurst eingesetzt und gilt als vielversprechende Alternative zu anderen pflanzlichen Proteinen (Stephan et al. 2018).

Darüber hinaus verfügen Ständerpilze über ein großes Repertoire an verschiedenen Enzymen. Sie sind in der Lage, Holz abzubauen. Lignin, Hemicellulose und Cellulose bilden die Zellwände von Pflanzen und sorgen für deren Verholzung. Lignolytische Enzyme können in Phenoloxidasen und Häm-Peroxidasen unterteilt werden (Serrano et al. 2020). Zu den Phenoloxidasen zählen die Laccasen, die in der Lage sind, Phenolringe zu Phenoxylradikalen zu oxidieren und dabei molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel verwenden (Gasser et al. 2012; Serrano et al. 2020). Zu den Häm-Peroxidasen zählen die Ligninperoxidase (LiP), die Manganperoxidase (MnP) und die Versatilen Peroxidase (VP). LiP oxidieren aromatische Ringe des Lignins zu Radikalkationen, während es durch MnP zu einer Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} kommt. Die chelatisierten Mn^{3+} -Ionen fungieren als Redox-Mediatoren und oxidieren phenolische Strukturen zu Phenoxylradikalen, wodurch die Ligninstruktur ebenfalls angegriffen wird. VP sind in der Lage, Mn^{2+} -Ionen sowie phenolische und nicht-phenolische aromatische Strukturen zu oxidieren (Ruiz-Dueñas und Martínez 2009; Serrano et al. 2020). Diese Eigenschaft führt zu einer großen Substratunabhängigkeit für das Wachstum der Pilze (Bosse et al. 2013; Trapp et al. 2018b).

Gleichzeitig sind Pilze der Abteilung Basidiomycota für die Produktion von natürlichen Aromastoffen bekannt. Die Bildung einer Vielzahl von aromawirksamen Substanzklassen wie

Aldehyde, Methylketone oder Terpene wurde bereits nachgewiesen und anhand der Stoffwechselwege aufgeklärt (Lomascolo et al. 1999). Bekannte Beispiele sind die Produktion von Vanillin (Vanille) durch *Phanerochaete chrysosporium* (Barbosa et al. 2008), Benzaldehyd (Marzipan) durch verschiedene *Pleurotus*-Arten (Beltran-Garcia et al. 1997; Liu et al. 2005) oder das in neueren Studien nachgewiesene walderdbeerähnliche Aroma durch die Fermentation von Johannisbeertrester durch *Wolfiporia cocos* (Sommer et al. 2021). Die Herstellung von Aromastoffen durch biotechnologische Verfahren ist eine wichtige Alternative zu natürlichen und chemischen Quellen. Vorteilhaft ist auch, dass biotechnologisch gewonnene Aromastoffe nach geltendem Recht als natürliche Aromastoffe vermarktet werden dürfen (Lomascolo et al. 1999; Janssens et al. 1992; VO (EG) Nr. 1334/2008).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die zwei Hauptnebenströme des Kakaoanbaus neuen Verwendungsmöglichkeiten zuzuführen. Hierzu wurden die Kakaofruchtschalen (CPH) sowie die Kakaopulpe (KP) mit Speisepilzen der Abteilung Basidiomycota fermentiert. Dafür sollten geeignete Kandidaten aus der institutseigenen Stammsammlung durch Wachstums- und Geruchsscreenings in Verbindung mit Literaturdaten untersucht und die vielversprechendsten Vertreter ausgewählt werden.

Bei der Fermentation der Kakaofruchtschalen sollte die proteinarme und faserreiche Schale durch den Verdau eines Pilzes und dessen gleichzeitiges Wachstum in Form von Pilzmyzel hinsichtlich ihrer Nährwertigenschaften aufgewertet werden. Leitparameter während der Optimierungsphase sollten der Rohproteingehalt sowie der Ergosterolgehalt sein. Ergosterol sollte zur quantitativen Abschätzung des Pilzanteils im Fermentat dienen. Zur Gesamtbewertung der Endprodukte sollte eine lebensmittelchemische Grundanalyse herangezogen werden, die unter anderem die Analyse der Aminosäuren und die Bewertung der Proteinqualität umfasst. Bei der Fermentation der Kakaopulpe sollte die Generierung ansprechender Aromen im Vordergrund stehen. Hierbei sollte ein natürlich aromatisiertes Getränk entwickelt werden und dieses mittels sensorischer Beurteilung im Panel und Aromaanalytik untersucht werden. Durch eine Aromaverdünnungsanalyse sowie die Identifizierung und Quantifizierung relevanter Aromastoffe sollten die Schlüsselaromastoffe identifiziert werden.

Die Fermentationsprodukte sollten im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert und bewertet werden. Ihre Anwendbarkeit im Lebensmittelbereich sollte anhand ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrer Nährwertigenschaften diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Tabelle 3: Verwendte Chemikalien.

Substanz	Reinheit	Hersteller
Acetoin	≥ 96%	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton	99,8%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Acetophenon	99%	Sigma Aldrich
Agar-Agar	Kobe I, für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>n</i> -Alkane (C ₇ – C ₃₀)		Sigma Aldrich
Ameisensäure	99 – 100%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Ammoniumnitrat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumsulfamat	> 98%	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
L-(-)-Äpfelsäure	99%	Acros Organics, New Jersey, USA
Methylbenzoat	analytical standard	Sigma Aldrich
Benzylalkohol	99%	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Borsäure	99,8%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Bortrifluorid	for Synthesis	VWR Chemicals, Radnor, USA
2-Butanon	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Calciumlactat-Pentahydrat	reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Celite® 545		Carl Roth GmbH & Co. KG
Chitin aus Krabbenschalen		Carl Roth GmbH & Co. KG
Citronensäure	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cyclohexan	≥ 99%	AnalytiChem GmbH, Duisburg, Deutschland
Decansäure	99%	Carl Roth GmbH & Co. KG

Substanz	Reinheit	Hersteller
7-Dehydrocholesterol	≥ 95%	Sigma Aldrich
Diethylether	99,9%	Prolabo Chemikalien, Sion, Schweiz
2,6-Dimethoxyphenol	≥ 97%	Sigma Aldrich
Dinatriumcarbonat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat	p.a.	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Enzymkit K-SUFRG		Megazyme, Wicklow, Irland
Enzymkit Total dietary fiber		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ergosterol	> 95%	TCI-International, Kita-Ku, Tokyo, Japan
Essigsäure	100%	J.T. Baker, New Jersey, USA
Essigsäureethylester	100%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	≥ 99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG
FAME Mix (37 Komponenten)		Supelco®, Merck KGaA
Glucose-Monohydrat	für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hefeextrakt	für Nährböden	Carl Roth GmbH & Co. KG
1-Heptanol	99%	Alfa Aesar
2-Heptanol	98%	Sigma Aldrich
2-Heptanon	99%	Sigma Aldrich
<i>n</i> -Hexan	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
1-Hexanal	98%	Sigma Aldrich
1-Hexanol	98%	Acros Organics
2-Hexanol	≥ 98%	Sigma Aldrich
Hexansäure	z.S.	Merck KGaA
Isooctan	for GC	Supelco®, Merck KGaA
Isopropanol	≥ 99,9%	Honeywell, Charlotte, USA
Isovaleriansäure	100%	TCI-International
Kaliumdihydrogenophosphat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhexacyanidoferrat (II)- Trihydrat	> 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kjeldahl Katalysatortabletten	Catalyst CT	VWR International, Leuven, Belgien

Substanz	Reinheit	Hersteller
α -Lactalbumin	Rein; Referenzstandard	United States Pharmacopeia (USP), Rockville, Maryland, USA
LB-Medium	Lennox für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Linalool	97%	Acros Organics
Linalool-oxid (Gemisch)	100%	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Ligninperoxidase (LiP)		Sigma Aldrich
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	$\geq 97\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG
Malzextrakt	für Nährböden	Carl Roth GmbH & Co. KG
Manganperoxidase		SAS Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland
Mangan-(II)-sulfat-Monohydrat	z.A.	Applichem GmbH
Methanol	HPLC grade	J.T. Baker
3-Methyl-2- benzothiazolinonhydrazon Hydrochlorid Monohydrat	97%	Alfa Aesar
2-Methyl-1-butanol	$\geq 99\%$	Sigma Aldrich
2-Methyl-3-buten-2-ol	98%	Sigma Aldrich
6-Methyl-5-hepten-2-on	99%	Sigma Aldrich
Misch-Std. H-OX		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck Deutschland
Mononatriumaspartat-Monohydrat	99%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-Morpholinoethansulfonsäure- Monohydrat	$\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG
N-Methyl-N- trimethylsilyltrifluoracetamid		Fluorochem, Hadfield, UK
N-Acetyl-D-Glucosamin	$\geq 98\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na-Hydrolysat Puffer A		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH
Na-Hydrolysat Puffer B		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH
NaOH Plätzchen	$\geq 98\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumascorbat	$\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	$\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG

Substanz	Reinheit	Hersteller
Natriumdisulfit	≥ 97%	Acros Organics
Natriumhydrogencarbonat	99,7%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumnitrit	≥ 99%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumsulfat (wasserfrei)	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Di-Natriumtartrat-Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natronlauge	32 – 33%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
(<i>E</i>)-Nerolidol	100%	Sigma Aldrich
Ninhydrin		Sykam
Ninhydrin-Reduktionsmittel		Sykam
γ -Nonalacton	100%	Merck KGaA
2-Nonanon	99%	Acros Organics
1-Octanal	99%	Sigma Aldrich
1-Octanol	100%	Honeywell
(<i>E</i>)-2-Octental	94%	Sigma Aldrich
1-Octen-3-on	96%	Sigma Aldrich
Oxalsäure-Dihydrat	p.A.	Applichem GmbH
<i>n</i> -Pentan	≥ 99%	Acros Organics
2-Pentanol	98%	Sigma Aldrich
2-Pentanon	100%	TCI-International
Petrolether	p.A.	Honeywell
Phenol	p.A.	Merck KGaA
Phenyllessigsäureethylester	99%	Alfa Aesar
2-Phenylethanol	99%	Acros Organics
1-Phenylethylacetat	≥ 99%	Supelco®, Merck KGaA
Phosphorsäure	85% reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure	25%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Salzsäure Maßlösung	0,1 N	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (rauchend)	37%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Schwefelsäure	98%	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Sojapepton (papainisch verdaut)	für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
α -Terpineol	96%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tetrahydrofuran	≥ 99,5% Rotipuran®	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiodiglycol	≥ 95%	Sigma Aldrich

Substanz	Reinheit	Hersteller
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	≥ 99,5%	Thermo Fisher Scientific
Tris-(hydroxymethylaminomethan)	≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Tryptophan	≥ 98%	Sigma Aldrich
Veratrylalkohol	96%	Thermo Fisher Scientific
Wasserstoffperoxid	30% reinst	Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Zink-(II)-sulfat-Heptahydrat	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Zinkacetat-Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG

2.2 Verwendete Geräte

Tabelle 4 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Aminosäureanalysator	S433	
Kationentrennsäule	LCA K13/Na, PEEK-Säule, 4,6 x 175 mm, sphärischer Kationentauscher auf Polystyrolbasis, 7 µm Partikelgröße, 10% Quervernetzung	Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Autoklav	Tuttnauer 5075ELV	Biomedis Laborservice GmbH, Gießen, Deutschland
5 L Bioreaktor	BioFlo 320 5 L	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
150 L Bioreaktor	Biostat D 100	Braun International, Melsungen, Deutschland
Brutschrank	IPP260	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Dispergiergerät	ULTRA-TURRAX T25	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Drucktank für Carbonisierung	20 L	Safer S.p.A. Castelmaggiore, Italien
Feuchtemessgerät	MA35M-230N	Sartorius, Göttingen, Deutschland
GC-FID	7890A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GC-MS-O	7890A – 5977 MSD	Agilent Technologies
GC-MS/MS-O	8890 - 7010B GC/TQ	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	Alpha1-4 LSC basic	Martin Christ GmbH, Harz, Deutschland
Große Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hochvakuumpumpe	DCU hiCUBE	Pfeiffer Vacuum GmbH, Aßlar, Deutschland
Horizontalschüttler	SHKE8000 – 8CE	Thermo Fisher Scientific
Ionenchromatograph	883 Basic Plus IC	Methrom GmbH & Co. KG, Herisau, Schweiz

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Kjeldahl-Aufschlussblock	Inkjel	Behr-Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland
Kjeldahl- Wasserdampfdestillation	Unit S5	Behr-Labortechnik
Kleine Zentrifuge	Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Kolbenhubpipetten (Eppendorf Research Plus)	10 mL, 5 mL, 1 mL, 200 µL, 20 µL	Eppendorf AG
Magnetrührer	MH 15	Carl Roth GmbH & Co. KG
Multi-Magnetrührerplatte	MIXdrive 15	2mag AG, München, Deutschland
Muffelofen	B180	Nabertherm GmbH, Lillenthal, Deutschland
pH-Meter	S47 – SevenMulti™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Photometer	UviLine9100	Schott Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
pneumatische Dosiereinheit	HWS-Dosiertrichter	Hans Schmidt GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland
REM	EVO LS 10 SEM (Everhart- Thornley Detektor)	Zeiss, Jena, Deutschland
Schneidmühle	SM 2000	Retsch, Haan, Deutschland
Sterilwerkbank	MSC-Advantage	Thermo Fischer Scientific
Trockenschrank	LFBW	Memmert GmbH & Co. KG
TubeConditioner	TC2	Gerstel, Mühlheim an der Ruhr, Deutschland
vollautomatische Soxtherm	E6	Behr Labor-Technik
Ultraschallbad	Emmi®-100HC 9,5 L	EMAG AG, Mörfelden- Walldorf, Deutschland
Vortexer	VTX-3000L	LMS GmbH & Co. KG, Brigachtal, Deutschland
Waage	ABT 320-4NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasserbad	ISOTEMP 205	Thermo Fisher Scientific

2.3 Verwendete Pilze

Tabelle 5 zeigt einen Überblick über alle in dieser Arbeit verwendeten Pilze. Durch Fettdruck sind diejenigen Pilze markiert, die über die Screenings hinaus für weiterführende Arbeiten verwendet wurden.

Tabelle 5: In der Arbeit verwendete Pilze der Abteilung Basidiomycota; LCB: von Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Natur isoliert; CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, NL; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DE; GÖT: Institut für Molekulare Holzbiotechnologie & Technische Mykologie, Göttingen, DE; IMD: InterMedDiscovery; MEA: Malzextrakt-Agar; MEPA: Malzextrakt-Pepton-Agar.

Name	Interne		Standardmedium
	Stammnummer & Abk.	Herkunft	
<i>Mycetinis scorodonius</i>	4-MSC	CBS 137.83	MEA
<i>Pleurotus sapidus</i>	5-PSA	DSMZ 8266	MEA
<i>Trametes suaveolens</i>	6-TSU	DSMZ 5237	MEA
<i>Wolfiporia cocos</i>	9-WCO-C	CBS 279.55	MEA
<i>Pleurotus floridanus</i>	10-PFL	GÖT 17	MEA
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13-POS	DSMZ 1020	MEA
<i>Lentinula edodes</i>	16-LED	CBS 389.89	MEA
<i>Laetiporus sulfureus</i>	24-LSU	DSMZ 1014	MEA
<i>Tyromyces chioneus</i>	44-TCH	DSMZ 5242	MEA
<i>Ganoderma anullaris</i>	47-GAN	DSMZ 9943	MEA
<i>Pleurotus calyptratus</i>	55-PCAL	DSMZ 8334	MEA
<i>Hypholoma capnoides</i>	59-HCA	DSMZ 3715	MEA
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	60-KUM	DSMZ 1013	MEA
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	70-PSCH	DSMZ 5136	MEA
<i>Suillus variegatus</i>	86-SVA	DSMZ 1752	MEA
<i>Cyathus olla</i>	97-COL	CBS FU 70665	MEA
<i>Pleurotus eryngii</i>	100-PER	DSMZ 8264	MEA
<i>Hericium erinaceus</i>	103-HER	IMD FU 70034	MEA
<i>Irpex consors</i>	111-ICO	DSMZ 7382	MEA
<i>Pholiota nameko</i>	113-PNA	DSMZ 6908	MEA
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	114-PCI	DSMZ 5341	MEPA
<i>Stereum complicatum</i>	116-SCO-D	DSMZ 5182	MEA
<i>Abortiporus biennis</i>	121-ABI	CBS 676.70	MEA
<i>Hericium coralloides</i>	128-HCO	CBS 107488	MEA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	136-FPI	CBS 483.72	MEA
<i>Pycnoporus coccineus</i>	139-PYCO	CBS 355.63	MEA
<i>Flammulina velutipes</i>	160-FVE-D	DSMZ 1658	MEA
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	161-HTE	DSMZ 23610	MEA

Name	Interne		Standardmedium
	Stammnummer & Abk.	Herkunft	
<i>Agaricus arvensis</i>	164-AARV	CBS 583.76	MEA
<i>Meripilus giganteus</i>	165-MGI	DSMZ 8693	MEA
<i>Agrocybe aegerita</i>	166-AAE	Fa. Sylvan 4022	MEA
<i>Fomes fomentarius</i>	167-FFO	LCB	MEA
<i>Lepista nuda</i>	170-LNU	DSMZ 3347	MEA
<i>Trametes gibbosa</i>	175-TGI	LCB	MEA
<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	177-PSS	GÖT 104	MEA
<i>Armillaria mellea</i>	186-AMEL	DSMZ 2941	MEA
<i>Psathyrella candolleana</i>	189-PCAN	LCB	MEPA
<i>Antrodia xantha</i>	200-AXA	LCB	MEPA
<i>Piptoporus betulinus</i>	201-PBE	LCB	MEPA
<i>Macrolepiota procera</i>	202-MPR	LCB	MEPA
<i>Psathyrella piluliformis</i>	223-PPI	LCB	MEPA
<i>Panellus stipticus</i>	230-PSTI	LCB	MEPA
<i>Sparassis crispa</i>	252-SCR-FP	LCB	MEA
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	295-PSP-FP	LCB	MEPA
<i>Gymnopus peronatus</i>	307-GPE-FP	LCB	SNL
<i>Psathyrella candolleana</i>	310-PCA-FP	LCB	MEA
<i>Coprinus comatus</i>	332-CCO-FP	LCB	MEA
<i>Strobilurus esculentus</i>	342-SES-FP	LCB	MEPA
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	345-SRU	LCB	MEA
<i>Laetiporus portentosus</i>	497-LPO	CBS 307.39	MEA
<i>Laetiporus persicinus</i>	498-LPER	CBS 274.92	MEA
<i>Grifola frondosa</i>	520-GFR	LCB	MEA
<i>Laetiporus montanus</i>	524-LMO	Nationalpark Schwarzwald (48.57337,8.24388)	MEA

2.4 Verwendete Substrate

In dieser Arbeit wurden Kakaofruchtschalen (CPH; engl. *cocoa pod husks*) und Kakaopulpe (KP) als Nebenströme der Kakaoindustrie verwendet. Kakaofruchtschalen der Sorten Sulawesi 1 und 2 (SUL 1, SUL 2) sowie Masamba Cocoa Clone 02 (MCC 02) wurden vom Indonesian Cocoa and Coffee Research Institute (ICCRI, Indonesia) zur Verfügung gestellt. Alle drei Sorten zählen zum Forastero-Kakao. Die Schalen wurden bereits sonnengetrocknet in Stücken von ca. 2 cm Kantenlänge angeliefert, anschließend bei Raumtemperatur gelagert und mittels Schneidmühle (Retsch, Deutschland, Typ SM 2000) auf eine Partikelgröße von

1 mm zerkleinert. Die Kakaopulpe wurde von der Firma Carrosse Naturals (Zürich, Schweiz) bezogen. Das Ursprungsland der Kakaopulpe ist Ecuador, die Sorte der Früchte, aus denen die Pulpe gewonnen wurde, ist unbekannt. Die Pulpe war pasteurisiert und wurde nach Aliquotieren bei -20 °C tiefgefroren gelagert. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der Substrate.



Abbildung 5: Sonnengetrocknete Kakaofruchtschalen, grob zerstückelt (links); mittels Schneidmühle auf 1 mm vermahlene Kakaofruchtschalen (mitte) und Kakaopulpe (rechts).

2.5 Herstellung der Medien

Zur Herstellung verschiedener CPH-Medien wurden die vermahlene Kakaofruchtschalen ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt. Zur Herstellung von KP-Medien wurden jeweils Aliquote der Kakaopulpe aufgetaut und anschließend eingesetzt. Im Fall der Kakaopulpe wurde aufgrund des hohen Feuchtegehaltes der Wasseranteil von der zum Medium zugegebenen Wassermenge abgezogen.

2.5.1 Agar-Medien

Zur Stammhaltung der Pilze sowie zu Emers-Screenings wurden Agar-Medien hergestellt (Tabelle 6). Dazu wurden die Medien in Laborgewindeflaschen angesetzt, für 20 min bei 121 °C autoklaviert (Tuttnauer 3870ELV-D, Niederlande) und anschließend unter sterilen Bedingungen ca. 20 mL in Einweg-Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm) gegossen. Nach Aushärten des Agars wurden sie in einer sterilen Tüte verschlossen aufbewahrt. Je nach Medium wurden die einzelnen Bestandteile getrennt oder gemeinsam autoklaviert.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Agar-Medien; alle Medien wurden mit VE-Wasser angesetzt.

Medium	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
MEA	Malzextrakt	20 g·L ⁻¹	-
	Agar-Agar	15 g·L ⁻¹	
MEPA	Malzextrakt	20 g·L ⁻¹	pH 5,6
	Sojapepton	3 g·L ⁻¹	
SNLA	Agar-Agar	15 g·L ⁻¹	pH 6,0
	Glucose-Monohydrat	30 g·L ⁻¹	
	Asparagin-Monohydrat	4,5 g·L ⁻¹	
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g·L ⁻¹	
	Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g·L ⁻¹	
	Hefeextrakt	3 g·L ⁻¹	
	Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	80 ng·L ⁻¹	
	Zink-(II)-sulfat-Heptahydrat	90 ng·L ⁻¹	
	Mangan-(II)-sulfat-Monohydrat	30 ng·L ⁻¹	
	Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	5 ng·L ⁻¹	
LBA	EDTA	400 ng·L ⁻¹	pH 7,0
	Agar-Agar	15 g·L ⁻¹	
CPHA	LB	20 g·L ⁻¹	Bestandteile getrennt autoklaviert
	Agar-Agar	15 g·L ⁻¹	
KPA	CPH	20 g·L ⁻¹	Bestandteile getrennt autoklaviert
	Agar-Agar	15 g·L ⁻¹	
KPA	Kakaopulpe	100 g·L ^{-1*}	Bestandteile getrennt autoklaviert
	Agar-Agar	15 g·L ⁻¹	

* entspricht abzüglich der Restfeuchte ca. 20 g·L⁻¹ Trockenmasse

2.5.2 Flüssigmedien

Flüssigmedien wurden direkt in 100 mL, 250 mL, 500 mL oder 5.000 mL Enghals-Erlenmeyerkolben angesetzt. Um das Verhältnis von Flüssigkeit zu Luft im Kolben konstant zu halten und damit gleiche Sauerstoff-Austauschraten voraussetzen zu können, wurden alle Kolben mit jeweils 40% ihres Gesamtvolumens befüllt (40 mL, 100 mL, 200 mL, 2.000 mL). Die jeweiligen Medien wurden in Erlenmeyerkolben gefüllt, mit einem Cellulosestopfen verschlossen und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Flüssigmedien; alle Medien wurden mit Trinkwasser angesetzt; MNA= Mono-Natrium-Aspartat Monohydrat.

Medium	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
ME	Malzextrakt	20 g·L ⁻¹	-
MEP	Malzextrakt	20 g·L ⁻¹	pH 5,6
	Sojapepton	3 g·L ⁻¹	
CPH	CPH	10/ 20/ 30 g·L ⁻¹	je nach Ansatz variabel; teilw. auch als <i>Fed-Batch</i> -Ansatz*
	MNA	6,24/ 5,00/ 3,60 g·L ⁻¹	
	Ammoniumnitrat	2,40 g·L ⁻¹	
KP	Kakaopulpe	100 g·L ^{-1**}	Zugabe von KP nach Autoklavieren unter sterilen Bedingungen

* Zugabe eines Teils an autoklavierten CPH während der Fermentation, alle anderen Bestandteile sind bereits zu Beginn der Fermentation enthalten

** entspricht abzüglich der Restfeuchte ca. 20 g·L⁻¹ Trockenmasse

2.5.2.1 Sterilkontrolle der pasteurisierten Kakaopulpe

Da die pasteurisierte Kakaopulpe vor der weiteren Verwendung in Flüssigmedien nicht erneut autoklaviert werden sollte, wurde sie auf Sterilität geprüft. Dazu wurden in Dreifachbestimmung jeweils 1 g Kakaopulpe unter sterilen Bedingungen in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 10 mL VE-Wasser verdünnt. Parallel wurden zwei Negativkontrollen lediglich mit sterilem VE-Wasser mitgeführt. Nach dem Homogenisieren wurde 1 mL der Lösung auf LB-Agar gegeben und mittels Drigalskispatel verteilt. Die Inkubation erfolgte für 48 h unter Lichtausschluss bei 37 °C.

2.6 Kultivierung

2.6.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden alle Pilze der Abteilung Basidiomycota als Emerskulturen auf ME(P)A-Platten bei 24 °C im Dunkeln kultiviert. Sobald 80% der Platte bewachsen waren, wurde ein 1 cm² großes Stück des bewachsenen Agars unter sterilen Bedingungen mithilfe eines Spatels entnommen und auf eine neue Agar-Platte gesetzt.

2.6.2 Vorkultur

Vorkulturen wurden je nach Versuchsansatz in 100 mL, 250 mL oder 500 mL Erlenmeyerkolben angesetzt. Sobald 80% der Platte bewachsen waren, wurde ein 1 cm² großes Stück des bewachsenen Agars vom äußeren Rand unter sterilen Bedingungen ausgestochen, ins Vorkulturmedium gegeben und für 30 Sekunden mittels Ultra-Turrax bei 10.000 rpm homogenisiert. Als Vorkulturmedien wurden abhängig vom Versuchsansatz ME-, MEP- oder CPH-Medien (vgl. 2.6.2) verwendet. Die Kultivierung erfolgte anschließend unter

Lichtausschluss bei 24 °C auf einem Horizontalschüttler bei 150 rpm. Die Vorkulturdauer richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Pilze. Die Vorkulturdauer betrug für 136 FPI sowie 177 PSS sechs Tage und für 498 LPER acht Tage.

2.6.3 Hauptkultur

Hauptkulturen wurden je nach Versuchsansatz in 250 mL, 500 mL, 5.000 mL Erlenmeyerkolben oder im 5 L Bioreaktor (BioFlo 320 5 L, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bzw. 150 L Bioreaktor (Biostat D 100 Fermenter, B. Braun International, Melsungen, Deutschland) angesetzt. Als Hauptkulturmedien wurden je nach Versuchsansatz die Medien aus Abschnitt 2.6.2 verwendet. Zur Kultivierung auf CPH-Medien wurde die Vorkultur nach der jeweiligen Vorkulturdauer für 30 Sekunden mittels Ultra-Turrax bei 10.000 rpm homogenisiert und anschließend 10%ig in das Hauptkulturmedium inokuliert (Ausnahme: 5%ig im 150 L Bioreaktor). Zur Kultivierung auf KP-Medien wurde die Vorkultur nach Homogenisierung in sterile 50 mL Zentrifugenröhrchen gefüllt und dreimal mit autoklaviertem Trinkwasser gewaschen. Dazu wurde die Vorkultur zentrifugiert (4000 g, 10 min, RT), der Überstand abdekantiert und mit Trinkwasser aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Kultivierung erfolgte anschließend unter Lichtausschluss bei 24 °C auf einem Horizontalschüttler bei 150 rpm.

2.6.4 Ernte von pilzlicher Biomasse

Zur Ernte der Fermentate wurde die gesamte Kultur bei Ansätzen bis 200 mL zentrifugiert (4.000 g, 10 min, RT) und der Überstand abdekantiert. Bei größeren Ansätzen (ab 2.000 mL aus Erlenmeyerkolben bzw. Bioreaktoren) erfolgte die Ernte durch ein Nylon-Passiertuch und anschließendes Nachwaschen mit Trinkwasser. Die Fermentate wurden bei -20 °C tiefgefroren und gefriergetrocknet.

2.6.5 Ernte von Kulturüberständen

Zur Ernte der Überstände wurden die Kulturen entweder zentrifugiert und der Überstand als Zielprodukt abdekantiert, oder über einen Büchnertrichter unter Vakuum filtriert. Die Kulturüberstände wurden bei -20 °C tiefgefroren.

2.6.5.1 Carbonisierung fermentierter Getränke

Die Carbonisierung erfolgte in einem 20 L Drucktank (Safer S.p.A., Castelmaggiore, Italien). Zwei Liter des Getränks wurden in den Tank gefüllt, luftdicht verschlossen und mit Kohlenstoffdioxid befüllt, bis der Druck bei 1,6 bar lag. Zur besseren Gleichgewichtseinstellung wurde der Tank geschüttelt und erneut auf 1,6 bar befüllt. Die Carbonisierung erfolgte für vier

Tage bei 4 °C. Das Getränk wurde anschließend in zuvor sterilisierte Glasflaschen gefüllt und bei 4 °C bis zur Verkostung gelagert.

2.7 Screening-Ansätze und sensorische Methoden

2.7.1 Plattenscreenings

Für die Plattenscreenings wurden die jeweiligen Pilze aus der Stammhaltung gleichzeitig auf CPHA bzw. KPA und MEA umgesetzt. MEA diente als Referenz für das Wachstum auf einem Standardmedium. Während des Plattenscreenings auf CPHA wurden die Platten täglich von zwei Personen einer einfach beschreibenden Prüfung der Geruchsattribute unterzogen sowie die Wachstumsgeschwindigkeit untersucht, indem der Radius des Myzels gemessen wurde. Für das Plattenscreening auf KPA wurden die Platten alle zwei Tage von zwei Personen für insgesamt 20 Tage auf die Geruchsattribute hin untersucht. Da auf diesem Substrat vor allem die Aromabildung untersucht werden sollte, wurde weiterhin die Intensität des Geruchs sowie die Bewertung des Geruchs nach dem folgenden Schema beurteilt: ++ (sehr intensiv bzw. sehr gut), + (intensiv bzw. gut), 0 (mittel bzw. neutral), - (schwach bzw. schlecht) und - - (sehr schwach bzw. sehr schlecht).

2.7.2 Flüssigscreenings

Im Flüssigscreening der Fermentation von CPH wurden fünf Pilze parallel auf CPH-Medium und ME-Medium kultiviert, anschließend geerntet und gefriergetrocknet. Der Erntezeitpunkt richtete sich nach dem optisch beurteilten Wachstum (Tabelle 8). Die Fermentate wurden auf Bio-Trockenmasse (vgl. 2.8.1), den Rohproteingehalt nach Kjeldahl (vgl. 2.8.2) sowie den Ergosterolgehalt (vgl. 2.8.14) hin untersucht.

Tabelle 8: Kultivierungsbedingungen des Screening-Ansatzes zur Fermentation von CPH in Submers-Kultur.

		VK-Medium	VK-Dauer [d]	HK-Medium	HK-Dauer [d]
Screening	CPH	136 FPI	ME	20 g·L ⁻¹ CPH	7
		177 PSS			
		223 PPI			
		295 PSP			
		310 PCA			
	Standard-medium	136 FPI	ME	ME	7
		177 PSS			
		223 PPI			
		295 PSP			
		310 PCA			

Im Flüssigscreening der KP wurden vier Pilze der Gattung *Laetiporus* untersucht. Dabei wurden die KP-Kulturen sowie ME-Kulturen im Abstand von 24 h geerntet und der Kulturüberstand von zwei Personen auf Geruch (olfaktorisch) und Geschmack (gustatorisch) untersucht und einer einfach beschreibenden Prüfung unterzogen. Zu jedem Erntezeitpunkt wurden der pH-Wert der Kultur sowie der Oxalsäuregehalt des Überstands (vgl. 2.8.9) bestimmt.

2.7.3 Sensorische Beschreibung im Panel

Sensorische Beschreibungen wurden vom KP-Medium sowie dem fermentierten Kakaopulpegetränk mit jeweils 10 mL der jeweiligen Lösung in 20 mL Schnapsgläsern bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurden die Proben zunächst in einem Panel von acht Prüfpersonen in einer einfach beschreibenden Prüfung (DIN 10964:2014-11) untersucht, um Attribute für Geruch und Geschmack festzulegen. Anschließend wurde eine konventionelle Profilprüfung durchgeführt, bei der eine quantitative Beschreibung der Intensitäten der jeweiligen Attribute mittels einer Bewertung von 0 (nicht erkennbar) bis 5 (sehr stark erkennbar) von zehn Prüfpersonen (zwei männlich, acht weiblich, 21 – 29 Jahre, alle Nichtraucher) abgegeben wurde (BVL L 00.90-11/1-4:2017-10). Im Anschluss erfolgte eine Gesamtbewertung der Akzeptanz der jeweiligen Probe mit Punkten von 0 (nicht ansprechend) bis 5 (sehr ansprechend). Die Ergebnisse der Verkostung wurden anschließend in einem Netzdiagramm dargestellt. Alle sensorischen Beschreibungen wurden in einem Prüflabor nach (DIN EN ISO 8589:2014-10) durchgeführt.

2.8 Methoden der Grundanalytik

2.8.1 Bestimmung der Restfeuchte

Der Restfeuchtegehalt der Substrate sowie der Fermentate, der mit dem Rohwasser korreliert, wurde in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung mittels Infrarot-Feuchtemessgerät bei 105 °C bestimmt. Dazu wurden je nach verfügbarer Biomasse zwischen 0,1 und 2 g der Proben eingewogen. Soll ein Parameter bezogen auf die Trockenmasse angegeben werden, kann der nach Formel (1) berechnete Faktor F_{TM} herangezogen werden.

$$F_{TM} = \frac{100}{(100 - \text{Restfeuchte [\%]})} \quad (1)$$

2.8.2 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl (Rohprotein)

Der Versuch wurde in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung nach Matissek et al. (2014) durchgeführt. Dazu wurden zwischen 0,4 und 1,0 g der jeweiligen Probe in ein stickstofffreies Wägeschiffchen eingewogen. Dieses wurde gemeinsam mit zwei Katalysatortabletten und

25 mL konzentrierter Schwefelsäure in einen Aufschlusskolben überführt. Der saure Aufschluss erfolgte anschließend im Aufschlussblock für 120 min (Heizleistung: 100% für 5 min, 0% für 5 min, 100% für 5 min, 0% für 5 min, 100% für 5 min, 0% für 5 min, 80% für 90 min). Anschließend erfolgte eine Wasserdampfdestillation, bei der durch Zugabe von Natronlauge Ammoniak freigesetzt und in eine borsäurehaltige Vorlage (2%) übergetrieben wurde. Der Stickstoffgehalt wurde vollautomatisch titrimetrisch mit einer 0,1 M Salzsäure-Maßlösung bestimmt. Der Rohproteingehalt der Proben wurde mittels Formel (2) berechnet.

$$RP = \frac{(V - V_{BW}) \cdot 1,4008 \cdot F}{E \cdot 10} \quad (2)$$

mit

RP = Rohproteingehalt [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]

V = Volumen an 0,1 M HCl [mL]

V_{BW} = Volumen an 0,1 M HCl im Blindwert [mL]

1,4008 = Umrechnungsfaktor von 1 mL 0,1 M HCl auf Stickstoffmenge

F = Umrechnungsfaktor von Stickstoff auf Rohprotein

E = Probeneinwaage [g]

10 = Umrechnung auf $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$

2.8.3 Bestimmung des Aminosäureprofils sowie Berechnung der biologischen Wertigkeit

Die Bestimmung proteinogener Aminosäuren erfolgte in Doppel- oder Dreifachbestimmung angelehnt an VO (EG) Nr. 152/2009. Um alle proteinogenen Aminosäuren bestimmen zu können, sind verschiedene Aufarbeitungsmethoden notwendig, da bei der sauren Hydrolyse Cystein, Methionin und Tryptophan zerstört werden. Außerdem werden Asparagin und Glutamin in Form ihrer entsprechenden Säure bestimmt, sodass sie nicht von Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure unterschieden werden können. In den folgenden Abschnitten sind die Aufarbeitungsmethoden a) Bestimmung von Cystein und Methionin, b) Bestimmung der Gesamtaminosäuren sowie c) Bestimmung von Tryptophan beschrieben.

a) Bestimmung von Cystein und Methionin

Zur Stabilisierung der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren erfolgte im ersten Schritt eine Oxidation zu Cysteinsäure bzw. Methioninsulfon durch 16-stündige Einwirkung eines Perameisensäure-Phenol-Reagenzes (0,05 mL Wasserstoffperoxid ($w = 30\%$) mit 0,45 mL phenolischer Ameisensäure (889 g Ameisensäure mit 111 g Reinstwasser und 4,73 g Phenol) bei 4 °C. Zur Zerstörung des überschüssigen Oxidationsreagenz wurden 0,084 g Natriumdisulfit zugegeben. Hierzu wurden ca. 50 mg der getrockneten, homogenisierten

Proben in 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die Proben wurden anschließend äquivalent zu b) Bestimmung der Gesamtaminosäuren aufgearbeitet.

b) Bestimmung der Gesamtaminosäuren

Zur Bestimmung der Gesamtaminosäuren wurden ca. 50 mg der getrockneten, homogenisierten Proben in 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL Hydrolyse-Mix (6 M HCl mit 1 g·L⁻¹ Phenol) versetzt. Die Totalhydrolyse erfolgte bei 110 °C für eine Stunde mit halb geöffnetem Deckel und anschließend weitere 23 Stunden mit geschlossenem Deckel. Alle nicht-proteinogenen Aminosäuren werden hierbei ebenfalls zerstört. Anschließend wurden die Röhrchen in einem Eisbad abgekühlt und zur Neutralisation 1,5 mL 7,5 M NaOH zugegeben. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 7,5 M und 1 M NaOH auf 2,20 eingestellt und die Probe quantitativ in einen 20 mL Messkolben überführt. Der Kolben wurde mit Citratpuffer nach Sykam (Tabelle 9) ad Marke aufgefüllt. Nach Membranfiltration (0,45 µm Nylon) wurden die Proben entsprechend verdünnt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Citratpuffers nach Sykam.

Chemikalie/ Parameter	Zusammensetzung
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	11,0 g·L ⁻¹
Citronensäure	6,0 g·L ⁻¹
Thiodiglycol	14 mL·L ⁻¹
HCl, 32%	12 mL·L ⁻¹
Phenol	2,0 g·L ⁻¹
pH-Wert	2,20·L ⁻¹

Die Messung der Proben erfolgte mittels Aminosäureanalysator an einer Kationenaustauschersäule und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin und anschließender photometrischen Messung bei 570 nm bzw. 440 nm für Prolin (Abbildung 6). Tabelle 10 zeigt alle relevanten Parameter der Messung. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung mit Hilfe eines Mischstandards, der mit Citratpuffer auf einen Konzentrationsbereich von 10 – 200 nmol·mL⁻¹ verdünnt wurde. Das Bestimmtheitsmaß für die Kalibriergeraden der einzelnen Aminosäuren lag zwischen 0,9994 und 0,9999 (Anhang Abbildung 41 zeigt beispielhaft die Kalibriergerade von Asparaginsäure).

Tabelle 10: Geräte- und Messparameter zur Bestimmung der Aminosäuren für Gesamtaminosäuren und Cystein und Methionin.

Parameter	Wert
Gerät	Aminosäureanalysator S433
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13/Na, 4,6 x 175 mm
Filtersäule	Ammoniakfiltersäule LCA K04/Na, 4,6 x 100 mm
Eluenten - Gradientenpumpe	A: Na-Hydrolysat I, Puffer A, pH 3,45 (Sykam) B: Na-Hydrolysat I, Puffer B, pH 10,85 (Sykam) Regenerationslösung (R): 0,5 M NaOH mit 0,68 mM EDTA
Flussrate	0,45 mL·min ⁻¹ (Gradient)
Gradient	0-5 min A: 100%, B: 0%, R: 0% 5-11 min A: 100% → 95%, B: 0% → 5%, R: 0% 11-13 min A: 95% → 80%, B: 5 → 20%, R: 0% 13-25 min A: 80% → 70%, B: 20% → 30%, R: 0% 25-29 min A: 70% → 30%, B: 30% → 70%, R: 0% 29-31 min A: 30% → 20%, B: 70% → 80%, R: 0% 31-33 min A: 20% → 10%, B: 80% → 90%, R: 0% 33-41 min A: 10% → 0%, B: 90% → 100%, R: 0% 41-49 min A: 0%, B: 100%, R: 0% 49,1-52 min A: 0%, B: 0%, R: 100% 52,1-65 min A: 100%, B: 0%, R: 0%
Eluenten - Aminopumpe	0,1 M Ninhydrin in Methanol (Sykam) Waschlösung (25% Ethanol, 25% Isopropanol, 50% Reinstwasser)
Flussrate	0,25 mL·min ⁻¹ (isokratisch: 0 min → 48 min: Ninhydrin, 48 min → 65 min Waschlösung)
Säulentemperatur	0-5 min 49 °C 5-10 min 49 °C → 56 °C 10-31 min 56 °C → 74 °C 31-55 min 74 °C 55-60 min 74 °C → 49 °C 60-65 min 49 °C
Reaktortemperatur	130 °C
Injektionsvolumen	150 µL
Detektor	UV/Vis-Detektor bei 570 nm und 440 nm
Software	Chromstar, Version 7

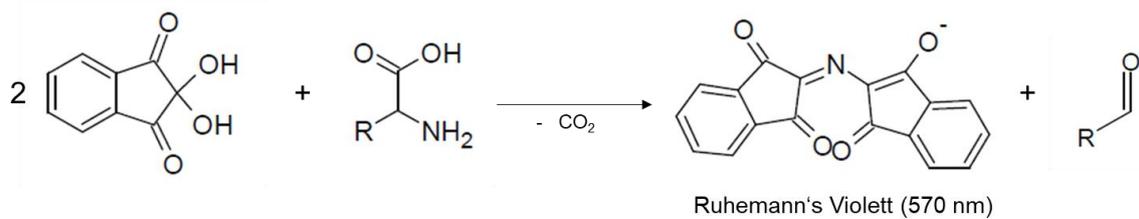


Abbildung 6: Reaktion von Ninhydrin mit Aminen zu Ruhemann's Violett, angelehnt an (Bhushan et al. 2014).

c) Bestimmung von Tryptophan

Zur Bestimmung von Tryptophan wird anstelle einer sauren Hydrolyse eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dafür werden ca. 70 mg der getrockneten, homogenisierten Proben in 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL phenolischer NaOH (5 M NaOH mit 0,1% Phenol) versetzt und analog zur sauren Hydrolyse bei 110 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL 0,5 M Phosphorsäure wurde der pH mittels 3,75 M und 1 M HCl auf 2,20 eingestellt, der Inhalt quantitativ in einen 20 mL Messkolben überführt, membranfiltriert, entsprechend verdünnt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Tabelle 11 zeigt die Parameter des Kurzprogramms der Messung für Tryptophan-Proben. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung im Bereich von 10 – 200 nmol·mL⁻¹, angesetzt aus einer selbst hergestellten Tryptophan-Stammlösung. Das Bestimmtheitsmaß für die Kalibriergerade von Tryptophan lag bei 0,9999 (Anhang Abbildung 42).

Tabelle 11: Geräte- und Messparameter zur Bestimmung von Tryptophan im Kurzprogramm.

Parameter	Wert
Gerät	Aminosäureanalysator S433
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13/Na, 4,6 x 175 mm
Filtersäule	Ammoniakfiltersäule LCA K04/Na, 4,6 x 100 mm
Eluenten - Gradientenpumpe	A: Na-Hydrolysat I, Puffer A, pH 3,45 (Sykam) B: Na-Hydrolysat I, Puffer B, pH 10,85 (Sykam) Regenerationslösung (R): 0,5 M NaOH mit 0,68 mM EDTA
Flussrate	0,45 mL·min ⁻¹ (Gradient)
Gradient	0-5 min A: 30%, B: 70%, R: 0% 5-7 min A: 10% → 90%, B: 0% → 5%, R: 0% 7-15 min A: 90% → 0%, B: 5% → 100%, R: 0% 15-20 min A: 0%, B: 100%, R: 0% 20-20,1 min A: 0%, B: 100% → 0%, R: 0% → 100% 20,1-23 min A: 0%, B: 0%, R: 100% 23-23,1 min A: 0% → 30%, B: 0% → 70%, R: 100% → 0% 23,1-30 min A: 30%, B: 70%, R: 0%
Eluenten - Aminopumpe	0,1 M Ninhydrin in Methanol (Sykam) Waschlösung (25% Ethanol, 25% Isopropanol, 50% Reinstwasser)
Flussrate	0,25 mL·min ⁻¹ (isokratisch: 0 min → 21 min: Ninhydrin, 21 min → 30 min Waschlösung)
Säulentemperatur	74 °C
Reaktortemperatur	130 °C
Injektionsvolumen	150 µL
Detektor	UV/Vis-Detektor bei 570 nm und 440 nm
Software	Chromstar, Version 7

Nach Bestimmung der Konzentration der jeweiligen Aminosäure durch lineare Regression kann der Gehalt in der Probe mittels Formel (3) bestimmt werden. Durch Einberechnung der molaren Masse der jeweiligen Aminosäure erhält man den Wert in [g·100 g TM⁻¹], ohne Einberechnung in [mol·100 g TM⁻¹]. Zur Berechnung des Reinproteins wird für jede Aminosäure der AS_{residual} berechnet, wobei der Verlust eines Wassermoleküls je Peptidbindung berücksichtigt wird (Formel (4)). Die Summe aller AS_{residual} ergibt das Reinprotein (Formel (5)). Zur Berechnung des korrigierten Kjeldahlfaktors für das Rohprotein wird zunächst für jede Aminosäure der Anteil des Stickstoffs an der molaren Masse berechnet und hierüber anschließend der Anteil des Stickstoffs in der vorliegenden Menge der jeweiligen Aminosäure (Formel (6)). Die Summe dieser Anteile ergibt den Gesamtstickstoff im Protein, über den der korrigierte Kjeldalfaktor berechnet werden kann (Formel (7)).

$$AS = \frac{c_{AS} \cdot M_{AS} \cdot 20 \cdot 100}{E \cdot 1.000.000.000} \quad (3)$$

mit

- AS = Aminosäure [g·100 g⁻¹]
- c_{AS} = Konzentration Aminosäure [nmol·mL⁻¹]
- M_{AS} = Molare Masse der jeweiligen Aminosäure [ng·nmol⁻¹]
- 20 = Gesamtvolumen der Probe [mL]
- 100 = Umrechnung auf 100 g Probe
- E = Probeneinwaage [g]
- 1.000.000.000 = Umrechnung von ng auf g

$$AS_{residual} = AS \cdot (M_{AS} - 18,015) \quad (4)$$

mit

- AS_{residual} = Aminosäurerückstand [g·100 g⁻¹]
- 18,015 = Molare Masse eines Wassermoleküls [g·mol⁻¹]

$$P_{rein} = \sum AS_{residual} \quad (5)$$

mit

- P_{rein} = Reinprotein [g·100 g⁻¹]

$$\text{Anteil N in AS} = \frac{x_{N, AS} \cdot 14,01}{M_{AS}} \cdot AS \quad (6)$$

mit

- x_{n, AS} = Anzahl der N-Atome in jeweiliger Aminosäure
- 14,01 = Molmasse eines N-Atoms [g·mol⁻¹]

$$\text{Kjeldahlfaktor}_{\text{koriert, Rohprotein}} = \frac{\sum \text{Anteil N in AS}}{\text{Reinprotein}} \quad (7)$$

Zur näherungsweisen Bewertung der Proteinqualität wurde die biologische Wertigkeit nach Oser herangezogen (Oser 1959). Zugrunde gelegt wurde das von der FAO/WHO für den Menschen definierte Referenzprotein (vgl. Tabelle 12), das den Anteil der essentiellen Aminosäuren an den Gesamtaminosäuren angibt. Zunächst wird der *Essential Amino Acid Index* (EAAI) berechnet, indem das geometrische Mittel der Verhältnisse der Mengen an essentiellen Aminosäuren im Probeprotein zu den Mengen an essentiellen Aminosäuren in einem Referenzprotein gebildet wird (Formel (8)). Dabei werden alle Verhältnisse größer eins gleich eins gesetzt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Referenzproteins nach (FAO/WHO 1973).

FAO/WHO Referenzprotein	Anteil AS an Gesamt-AS
Isoleucin (Ile)	4,0%
Leucin (Leu)	7,0%
Lysin (Lys)	5,5%
Cystein + Methionin (Cys+Met)	3,5%
Phenylalanin + Tyrosin (Phe+Tyr)	6,0%
Threonin (Thr)	4,0%
Tryptophan (Trp)	1,0%
Valin (Val)	5,0%

$$EAAI = \sqrt[8]{\frac{a_{Ile, P} \cdot a_{Leu, P} \cdot a_{Lys, P} \cdot a_{Cys+Met, P} \cdot a_{Phe+Tyr, P} \cdot a_{Thr, P} \cdot a_{Trp, P} \cdot a_{Val, P}}{a_{Ile, R} \cdot a_{Leu, R} \cdot a_{Lys, R} \cdot a_{Cys+Met, R} \cdot a_{Phe+Tyr, R} \cdot a_{Thr, R} \cdot a_{Trp, R} \cdot a_{Val, R}}} \cdot 100 \quad (8)$$

mit

$EAAI =$ Essential amino acid index

$a_{AS, P} =$ Anteil der Aminosäure an Gesamtaminosäuren in der Probe

$a_{AS, R} =$ Anteil der Aminosäure an Gesamtaminosäuren im Referenzprotein

Formel (9) beschreibt eine Methode, um die biologische Wertigkeit (BV, engl. *biological value*) zu berechnen.

$$BV = (1,09 \cdot EAAI) - 11,7 \quad (9)$$

2.8.3.1 Bestimmung von Asparaginsäure im Kulturüberstand

Zur Bestimmung des während einer Fermentation vom jeweiligen Pilz nicht verwerteten Anteils an supplementiertem Aspartat (berechnet als Asparaginsäure) wurden in Doppelbestimmung jeweils 10 mL des Überstands nach Zentrifugation gefriergetrocknet und anschließend gemäß 2.8.3 b) aufgearbeitet. Die Berechnung bezogen auf den Kulturüberstand erfolgte mittels Formel (10). Durch Bezug des erhaltenen Wertes auf die zugesetzte Menge konnte die Wiederfindung berechnet werden.

$$Asp = \frac{c_{Asp} \cdot M_{Asp} \cdot 20}{1.000.000} \cdot \frac{1}{10} \quad (10)$$

mit

Asp = Asparaginsäure [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]

c_{Asp} = Konzentration Asparaginsäure [$\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$]

M_{Asp} = Molmasse Asparaginsäure ($133,1 \text{ ng} \cdot \text{nmol}^{-1}$)

20 = Gesamtvolumen der Probe [mL]

1.000.000 = Umrechnung von ng auf mg

10 = Umrechnung auf 1 mL

2.8.4 Enzymatische Glucose-, Fructose- und Saccharosebestimmung

Die Bestimmung erfolgte mittels Saccharose/D-Fructose/D-Glucose Assay Kit von Megazyme (K-SUFRG) in Dreifachbestimmung. Zur Analyse fester Proben wurden zwischen 0,5 und 1,0 g in einen 100 mL Messkolben eingewogen und zur Analyse von flüssigen Proben wurden ca. 25 mL eingesetzt. Die Proben wurden anschließend Carrez-geklärt (5 mL Carrez I ($150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Kaliumhexacyanidoferrat (II)-Trihydrat in VE-Wasser lösen) und 5 mL Carrez II ($230 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Zinkacetat in VE-Wasser lösen) und mit 10 mL 0,1 M NaOH versetzt. Das Filtrat wurde entsprechend verdünnt und anschließend zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Pipettier- und Messschema zur enzymatischen Bestimmung des Glucose-, Fructose- und Saccharosegehaltes.

In Küvetten pipettiert	Blank Glucose/ Fructose	Glucose/ Fructose	Blank Saccharose	Saccharose
Probe	-	0,10 mL	-	0,10 mL
Suspension 6 (β -Fructosidase)	-	-	0,20 mL	0,20 mL
Die Lösungen wurden mittels Küvettenspatel gemischt und für 5 min inkubiert.				
VE-Wasser	2,20 mL	2,10 mL	2,00 mL	1,90 mL
Suspension 1 (Puffer)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
Suspension 2 (NADP ⁺ /ATP)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
Die Lösungen wurden mittels Küvettenspatel gemischt. Nach 3 Minuten wurde die Extinktion (A_1) bei 340 nm gemessen.				
Suspension 3 (HK/G6P-DH)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
Die Lösungen wurden mittels Küvettenspatel gemischt. Nach 5 Minuten wurde die Extinktion (A_2) gemessen. Zur Kontrolle, ob die Reaktion bereits vollständig abgelaufen war, wurde nach 2 Minuten erneut die Extinktion gemessen.				
Suspension 4 (PGI)	0,02 mL	0,02 mL	-	-
Die Lösungen wurden mittels Küvettenspatel gemischt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion (A_3) gemessen. Zur Kontrolle, ob die Reaktion bereits vollständig abgelaufen war, wurde nach 10 Minuten erneut die Extinktion gemessen.				

Die Konzentration c in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ von D-Glucose, D-Fructose und Saccharose wurde gemäß Formel (11) ermittelt. Bei festen Proben wurde der Gehalt G bezogen auf 100 g berechnet (Formel (12)).

$$c = \frac{V \cdot M \cdot F}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A \quad (11)$$

mit

c = Konzentration [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

V = Volumen in der Küvette [mL]

M = Molare Masse der analysierten Substanz [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

F = Verdünnungsfaktor

ε = Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm
($6.300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

v = Probenvolumen

$$\Delta A_{\text{Glucose}} = (A_2 - A_1)_{\text{Probe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blindwert}}$$

$$\Delta A_{\text{Fructose}} = (A_3 - A_2)_{\text{Probe}} - (A_3 - A_2)_{\text{Blindwert}}$$

$$\Delta A_{\text{Saccharose}} = (A_2 - A_1)_{\text{Probe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blindwert}}$$

$$G = \frac{c}{E} \cdot 100 \quad (12)$$

mit

G = Gehalt [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]

c = Konzentration [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

E = Probeneinwaage bezogen auf 1 L [g]

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g

2.8.5 Bestimmung der Rohasche

In Dreifachbestimmung wurden jeweils ca. 5 g der getrockneten Probe auf 0,1 mg genau in zuvor konstant gewogene Quarzschalen eingewogen. Nach der Vorveraschung mittels Bunsenbrenner wurde die Probe bei 550 °C im Muffelofen bis zur vollständigen Veraschung geglüht. Die Tiegel wurden im Exsikkator abgekühlt und anschließend gewogen (Matissek et al. 2014). Der Rohaschegehalt RA [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] wurde nach Formel (13) berechnet.

$$RA = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100 \quad (13)$$

mit

RA = Rohaschegehalt [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]

m_2 = Masse des geglühten Quarzriegels nach der Veraschung [g]

m_1 = Masse des leeren, geglühten Quarzriegels [g]

E = Probeneinwaage [g]

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

2.8.6 Bestimmung des Gehaltes an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

Die Bestimmung der Ballaststoffe erfolgte in Doppelbestimmung mittels Enzymkit (Total dietary fiber). Abhängig vom erwarteten Ballaststoffgehalt wurden zwischen 0,4 und 1,2 g der Probe in ein Becherglas eingewogen und mit 40 mL MES-TRIS-Puffer (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat-Tris(hydroxymethylaminomethan)-Puffer; $10,65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES und $6,10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TRIS in VE-Wasser, pH 8,3) versetzt. Der pH-Wert der Probensuspension wurde erneut auf 8,3 eingestellt. Während des enzymatischen Aufschlusses wurden die Bechergläser in einem Wasserbad unter ständiger Bewegung und mit einem Uhrglas abgedeckt inkubiert. Im ersten Schritt wurden 50 μL α -Amylase zugegeben und 30 min bei 95 bis 100 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 50 μL Protease-Lösung zugesetzt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit Hilfe von 5%-iger NaOH bzw. HCl auf 4,0 – 4,7 eingestellt und nach Zugabe von 150 μL Amyloglucosidase-Lösung erneut für 30 min bei 60 °C inkubiert (AOAC 985.29 2003). Parallel wurden zwei Blindwerte in gleicher Weise angefertigt.

Die zur Bestimmung der Ballaststoffe benötigten Glasfiltertiegel (Porengröße 2) wurden mit ca. 1 g säuregewaschenem Celite® 545 im Muffelofen bei 525 °C geglüht, und anschließend durch mehrmaliges Trocknen bei 105 °C konstant gewogen. Die Proben wurde unter Anlegen eines leichten Vakuums durch die Glasfiltertiegel filtriert. Der Rückstand in den Glasfiltertiegeln wurde zweifach mit 10 mL 70 °C warmem VE-Wasser gewaschen. Das Filtrat enthielt die löslichen Ballaststoffe und wurde vor den nachfolgenden Waschsritten bei Seite gestellt. Der Rückstand wurde weiterhin zweifach mit 15 mL 78%igem Ethanol, zweifach mit 15 mL 95%igem Ethanol und zweifach mit 15 mL Aceton gewaschen und anschließend zur Bestimmung der unlöslichen Ballaststoffe über Nacht bei 105 °C getrocknet.

Zum Filtrat wurde die vierfache Menge an 60 °C warmem Ethanol gegeben. Nach Niederschlagsbildung wurde die Suspension durch einen Glasfiltertiegel filtriert und der Rückstand dreifach mit 15 mL 78%igem Ethanol, zweifach mit 10 mL 95%igem Ethanol und dreifach mit 10 mL Aceton gewaschen und ebenfalls über Nacht bei 105 °C getrocknet. Nach

Auswiegen der getrockneten Glasfiltertiegel wurde je ein Tiegel jeder Probe und des Blindwerts zur Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl (vgl.2.8.2) und ein Tiegel zur Bestimmung der Rohasche (vgl. 2.8.5) eingesetzt. Hierzu wurden die Tiegel für 5 h bei 525 °C geglüht und der Aschegehalt durch Differenzwägung ermittelt. Der Gehalt an löslichen oder unlöslichen Ballaststoffen ergibt sich durch Formel (14). Die Summe aus löslichen und unlöslichen Ballaststoffen ergibt dabei den Gesamtballaststoffgehalt.

$$w = \frac{m_R - [(V_{P1} - V_2) \cdot 1,4008 \cdot 6,25] - m_A - [m_{R,Blind} - [(V_{B1} - V_2) \cdot 1,4008 \cdot 6,25] - m_{A,Blind}]}{m} \cdot 100 \quad (14)$$

mit

- w = Ballaststoffgehalt [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
- m_R = Mittelwert der Massen der Rückstände von der Probe [mg]
- $m_{R,Blind}$ = Mittelwert der Massen der Rückstände von der Blindprobe [mg]
- m_A = Masse der Mineralstoffe im Rückstand von der Probe [mg]
- $m_{A,Blind}$ = Masse der Mineralstoffe im Rückstand von der Blindprobe [mg]
- m = Mittelwert der Einwaagen [mg]
- V_{P1} = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung mit der Probe [mL]
- V_{B1} = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung mit der Blindprobe [mL]
- V_2 = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung mit dem Reagenzien-Blindwert [mL]
- 1,4008 = Umrechnungsfaktor von 1 mL 0,1 M HCl auf Stickstoffmenge
- 6,25 = Umrechnungsfaktor zur Berechnung des Proteingehaltes

2.8.7 Bestimmung des Gesamtfettgehaltes nach Weibull-Stoldt mittels vollautomatischer Soxtherm

Die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes erfolgte in Dreifachbestimmung. Hierzu wurden zwischen 3 und 5 g der jeweiligen Probe in ein 400 mL Becherglas eingewogen, mit 150 mL 4 M Salzsäure versetzt und bei aufgesetztem Uhrglas zum Sieden erhitzt und für 30 min am schwachen Sieden gehalten. Die noch heiße Aufschlusslösung wurde anschließend mit 100 mL heißem Wasser versetzt und durch einen Faltenfilter filtriert. Der Filter und der Rückstand wurden mit heißem Wasser neutral gewaschen und der feuchte Faltenfilter in einem Becherglas im Trockenschrank bei 105 °C für 2-3 h getrocknet.

Die Fettextraktion erfolgte anschließend mittels vollautomatischer Soxtherm. Die trockenen Faltenfilter wurden in Extraktionshülsen aus Cellulose überführt, mit Glaswolle abgedeckt und zusammen mit zuvor konstant gewogenen Extraktionsbechern mit Siedesteinen (befüllt mit 75 mL niedrig-siedendem Petrolether) in die Apparatur eingesetzt. Die Extraktion erfolgte bei 150 °C, einer Kochphase von 30 min und einer anschließenden Extraktionsphase von

120 min. Das restliche Extraktionsmittel wurde unter Stickstofffluss vollständig entfernt. Die Extraktionsbecher wurden bis zur Massenkonstanz im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet. Der Rohfettgehalt wurde nach Formel (15) berechnet. Für die Bestimmung des Fettsäureprofils (vgl. 2.8.8) wurde das gesamte Fett in 2 mL *n*-Hexan aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

$$RF = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100 \quad (15)$$

mit

- RF = Rohfettgehalt [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
- m_2 = Masse des Extraktionsbechers mit Fett [g]
- m_1 = Masse des leeren Extraktionsbechers [g]
- E = Probeneinwaage [g]
- 100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

2.8.8 Bestimmung des Fettsäureprofils

Die Bestimmung des Fettsäureprofils erfolgte mittels der Bortrifluorid-Methode in Anlehnung an Fraatz et al. (2018), um sowohl veresterte als auch freie Fettsäuren erfassen zu können. Die nach 2.8.7 vorbereiteten Fettproben wurden aufgetaut und 1 mL wurde unter Stickstofffluss abgeblasen. Nach Zugabe von 4 mL 0,5 M methanolischer NaOH erfolgte die Verseifung für 10 min im 80 °C heißen Wasserbad. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3,5 mL Bortrifluoridlösung (20% in MeOH) zugegeben, kräftig geschüttelt und für 5 min bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 2 mL Isooctan zugegeben und für 1 min bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurden 5 mL gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und kräftig geschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen und über Nacht bei 4 °C über wasserfreies Natriumsulfat getrocknet. Die Messung der Fettsäuremethylester (FSME) erfolgte mittels GC-MS (Tabelle 14). Zur Identifizierung der Fettsäuremethylester wurde ein Mischstandard herangezogen (37-Komponenten FAME-Mix, Supelco, Bad Homburg, Deutschland) sowie die Zuordnung mittels RI's (vgl. 2.9.3.2). Der Anteil jeder einzelnen Fettsäure an den Gesamtfettsäuren wurde über Formel (16) berechnet.

Tabelle 14: Parameter der FSME-Messung.

Parameter	
Gaschromatograph	Agilent 7890GC
Injektionsvolumen	1 µL
Trennsäule	VF-Wax _{ms} (30 m x 250 µm x 0,25 µm), Agilent
Temperaturprogramm	40 °C für 3 min
	3 °C·min ⁻¹ auf 240 °C
	240 °C für 12 min
Trärgas	He (5.0); Fluss: 1,56 mL·min ⁻¹ (konstant)
Back SS Inlet	
Mode	Split
Heater	250 °C
Split Ratio	200:1 bzw. 75:1
Detektor	
MSD Transfer Line	250 °C
Ionenquelle	EI (230 °C, 70 eV)
Quadrupoltemperatur	150 °C
Modus	Scan (m/z 33-330)

$$FS_x [\%] = \frac{FS_x}{\sum FS_n} \cdot 100 \quad (16)$$

mit

FS_x = Peakfläche eines FSME

$\sum FS_n$ = Summe der Peakflächen aller FSME

100 = Umrechnungsfaktor auf [%]

2.8.9 Bestimmung des Oxalsäuregehaltes

Die Bestimmung des Oxalsäuregehaltes in Fermentationsüberständen sowie der Kakaopulpe erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung. Dafür wurden von der Kakaopulpe jeweils ca. 5 g auf 0,1 mg genau in einen 50 mL Messkolben eingewogen, mit VE-Wasser ad Marke aufgefüllt und anschließend membranfiltriert (0,45 µm Nylon). Kulturüberstände wurden direkt nach Membranfiltration für die ionenchromatographische Messung eingesetzt. Die Identifizierung des Oxalsäurepeaks erfolgte durch Retentionszeitenvergleich mit Standards, die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung im Bereich von 0,14 – 69,9 mg·L⁻¹. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibriergerade betrug 0,9999 (Anhang Abbildung 43). Tabelle 15 zeigt die Parameter der ionenchromatographischen Messung.

Tabelle 15: Parameter der Oxalsäurebestimmung mittels Ionenchromatographie.

Parameter	
Ionenchromatograph	Metronom 883 Basic Plus IC
Säule	Metrosep A supp 4-350
Eluent	1,8 mM Na ₂ CO ₃ 1,7 mM NaHCO ₃ 2% Aceton (v/v)
Flussrate	1 mL·min ⁻¹
Laufzeit	22 min
Injektionsvolumen	20 µL
Suppressorlösung	50 mM H ₂ SO ₄
Temperatur	Raumtemperatur (22 °C)

2.8.10 Bestimmung organischer Säuren

Die organischen Säuren Citronensäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Weinsäure und Essigsäure wurden in Doppelbestimmung im Medium (KP_{Medium}) sowie im fermentierten Getränk (KP_{Getränk}) untersucht. Die Proben wurden dabei direkt nach Membranfiltration (0,45 µm, Nylon) und geeigneter Verdünnung zur ionenchromatographischen Messung eingesetzt (Tabelle 16). Die Identifizierung der einzelnen organischen Säuren erfolgte durch Retentionszeitenvergleich mit Standards, die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung im Bereich von 15,33 – 153,3 mg·L⁻¹ für Citronensäure, 4,04 – 40,4 mg·L⁻¹ für Äpfelsäure, 0,54 – 54,6 mg·L⁻¹ für Milchsäure, 13,16 – 131,6 mg·L⁻¹ für Weinsäure und von 10,48 – 104,8 mg·L⁻¹ für Essigsäure. Die Bestimmtheitsmaße für die Kalibriergeraden lagen zwischen 0,9985 und 0,9999 (Kalibriergerade von Citronensäure beispielhaft im Anhang Abbildung 44 dargestellt).

Tabelle 16: Parameter der Bestimmung organischer Säuren mittels Ionenchromatographie.

Parameter	
Ionenchromatograph	Metronom 883 Basic Plus IC
Säule	Metrosep Organic Acids, 250 x 7,8 mm
Eluent	0,5 mM H ₂ SO ₄ / Aceton (85/15 (v/v))
Flussrate	0,5 mL·min ⁻¹
Laufzeit	22 min
Injektionsvolumen	20 µL
Temperatur	Raumtemperatur (22 °C)

2.8.11 Bestimmung des Chitingehaltes

Die Bestimmung von Chitin erfolgte in Anlehnung an Ahlborn et al. (2019) in Dreifachbestimmung mittels photometrischer Messung für die Fermentate sowie die nicht fermentierten Kakaofruchtschalen. Dazu wurden ca. 30 mg der Fermentate und der nicht fermentierten Kakaofruchtschalen in Pyrexröhrchen eingewogen, mit 2,5 mL 6 M HCl versetzt und für 24 h bei 105 °C inkubiert, wobei Chitin zu Chitosan deacetyliert wird. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Probe mit VE-Wasser ad 10 mL aufgefüllt und über einen Faltenfilter filtriert. 100 µL der Probe wurden mit 400 µL VE-Wasser und 500 µL 0,5 M HCl versetzt (Verdünnungsfaktor 1:10) und weitere 2 h bei 110 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 mL 2,5%ige Natriumnitrit-Lösung (w/v) zugegeben, homogenisiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL 12,5%iger Ammoniumsulfamat-Lösung wurde 5 min bei RT inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe des Farbreagens 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon Hydrochlorid Monohydrat (MBTH) (1 mL einer 0,25%igen Lösung (w/v)). Während der 30-minütigen Inkubation bei 37 °C bildet sich unter Wasserabspaltung ein Addukt, welches unter Einwirkung von Eisen(III)-Ionen (1 mL einer 0,5%igen Eisen(III)chlorid-Hexahydrat-Lösung (w/v)) einen blau-grünen Farbkomplex bildet, der bei 650 nm photometrisch vermessen werden kann (Tsuji et al. 1969). Die Kalibrierung erfolgte extern mittels eines N-Acetyl-D-Glucosamin Standards im Bereich von 5,29 – 52,9 µg·mL⁻¹. Als Positivkontrolle wurde Chitin aus Krabbenschalen verwendet. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibriergerade betrug 0,9995 (Anhang Abbildung 45).

2.8.12 Bestimmung des Ligningehaltes

Der Ligningehalt nach Klason der Kakaofruchtschalen und der Fermentate wurde in Dreifachbestimmung gemäß einer modifizierten Methoden nach Dence (1992) bestimmt. Dazu wurden etwa 2 g der fein vermahlenden Probe in eine Extraktionshülse eingewogen und zweifach in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Die erste Extraktion erfolgte für 6 h mit 170 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Cyclohexan und Ethanol (2:1; (v/v)) (Fengel und Przyklenk 1983). Die zweite Extraktion erfolgte für 4 h mit 170 mL Ethanol. Die Extraktionshülsen wurden über Nacht an der Luft getrocknet und der Rückstand ausgewogen. Der Faktor, der sich aus Rückstand und Einwaage ergibt, kann später zur Berechnung des Ligningehaltes in der Ausgangsprobe herangezogen werden. Ca. 0,2 g der extraktstofffreien Probe wurden in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen und nach Zufügen von 2,5 mL 72%iger Schwefelsäure für 2,5 h unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden 160 mL VE-Wasser zugegeben und unter Rückfluss für 4 h erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde durch einen zuvor konstant gewogenen Glasfiltertiegel (Porengröße 3) filtriert. Das Filtrat wurde zur photometrischen Bestimmung des säurelöslichen Lignins (*acid soluble lignin*, ASL) eingesetzt. Die Extinktion der Probelösung wurde bei 280 nm in Quarzglasküvetten gegen einen Blindwert

(3%ige Schwefelsäure) gemessen. Der Gehalt an ASL wurde unter Zuhilfenahme des Standardabsorptionsvermögens von Lignin bei 280 nm mittels Formel (17) berechnet. Der Rückstand im Filtertiegel wurde mit etwa 500 mL heißem Wasser neutral gewaschen und dieser anschließend im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet. Der Gehalt an säureunlöslichem Lignin (*acid insoluble lignin*, AIL) wurde mittels Formel (18) berechnet. Die Summe aus ASL und AIL ergab den Gesamtgehalt an Lignin.

$$ASL = \frac{E \cdot V \cdot VF \cdot 100}{a \cdot E_P \cdot d} \cdot \frac{E_{P,E}}{R} \quad (17)$$

mit

ASL = Säurelösliches Lignin [g·100 g⁻¹]

E = Extinktion der Probelösung bei 280 nm

V = Volumen der Lösung (0,165 L)

VF = Verdünnungsfaktor bei vorheriger Probenverdünnung

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g

a = Standardabsorptionsvermögen von Lignin bei 280 nm [L·g⁻¹·cm⁻¹] (23,3 für Weichhölzer nach Iiyama und Wallis (1988))

E_P = Probeneinwaage aus extraktstofffreier Probe [g]

$E_{P,E}$ = Probeneinwaage zur Extraktion [g]

R = Auswaage des Rückstands nach Extraktion [g]

$$AIL = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100 \cdot \frac{E_{P,E}}{R} \quad (18)$$

mit

AIL = Säureunlösliches Lignin [g·100 g⁻¹]

m_2 = Masse des getrockneten Glasfiltertiegels nach Filtration [g]

m_1 = Masse des leeren Glasfiltertiegels [g]

E = Probeneinwaage [g]

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

2.8.13 Bestimmung von am Ligninabbau beteiligten Enzymen

Die Bestimmung lignolytischer Enzyme wurde für die Kultivierung von 136 FPI und 177 PSS auf CPH- und ME-Medium über einen Zeitraum von 14 Tagen in biologischer Doppelbestimmung untersucht. Dafür wurden tagesfrisch Aliquote des Überstands (1 mL) jeder Kultur entnommen, zentrifugiert (10 min, 9.500 g, 4 °C) und der Überstand anschließend bis zur Messung auf Eis gelagert.

Die Manganperoxidaseaktivität (MnP) wurde mittels 2,6-DMP-Assay, modifiziert nach Wariishi et al. (1992) bestimmt. MnP katalysiert die Oxidation von Mn^{2+} -Ionen zu Mn^{3+} -Ionen durch Wasserstoffperoxid. Als Reporter für die Bildung von Mn^{3+} -Ionen dient 2,6-Dimethoxyphenol, welches durch die Reaktion zu Cerulignon dimerisiert und anschließend photometrisch bei 468 nm und 30 °C alle 30 s über einen Zeitraum von 10 min vermessen werden kann. Als Positivkontrolle diente eine MnP und als Negativkontrolle ein Ansatz mit Puffer statt Probelösung. Neben MnP werden bei diesem Assay auch versatile Peroxidasen und Laccasen miterfasst. Tabelle 17 zeigt das Pipettierschema für 96-Well Mikrotiterplatten. Die Enzymaktivität der MnP wurde mittels Formel (19) berechnet.

Tabelle 17: Pipettierschema des MnP-Assays.

Lösung	Volumen [μ L]	finale Konzentration [mM]
Mcllvaine Puffer, pH 4,5	120	
Probe*	20	
0,4 mM H_2O_2 in 2 mM $MnSO_4$	50	0,1
10 mM 2,6-DMP in EtOH	10	0,5

* in geeigneter Verdünnung

$$A_{MnP} = \frac{\Delta E_{468 \text{ nm}} \cdot V_{\text{ges}} \cdot VF}{V_P \cdot \epsilon_{468 \text{ nm}} \cdot d} \quad (19)$$

mit

A_{MnP} = Aktivität der MnP [$U \cdot L^{-1}$]

$\Delta E_{468 \text{ nm}}$ = maximale Umsetzungsgeschwindigkeit, berechnet aus der Extinktionsänderung bei 468 nm

V_{ges} = Gesamtvolumen: 0,2 mL

VF = Verdünnungsfaktor

V_P = Probenvolumen: 0,02 mL

$\epsilon_{468 \text{ nm}}$ = Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von Cerulignon: 0,0496 $L \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d = Schichtdicke: 0,64 cm

Die Ligninperoxidaseaktivität (LiP) wurde mittels Assay nach Tien und Kirk (1984) bestimmt. LiP katalysiert mit Hilfe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Veratrylalkohol zu Veratraldehyd. Die Messung erfolgte anschließend in UV-durchlässigen Mikrotiterplatten bei 310 nm bei 30 °C alle 30 s über einen Zeitraum von 10 min. Als Positivkontrolle diente eine LiP und als Negativkontrolle ein Ansatz mit Puffer statt Probelösung. Tabelle 18 zeigt das Pipettierschema für 96-Well Mikrotiterplatten. Die Enzymaktivität der LiP wurde mittels Formel (20) berechnet.

Tabelle 18: Pipettierschema des LiP-Assays.

Lösung	Volumen [µL]	finale Konzentration [mM]
100 mM Natriumtartrat-puffer, pH 3,0	120	
Probe*	20	
1,4 mM H ₂ O ₂ in H ₂ O	50	0,35
25 mM Veratrylalkohol in 96% Ethanol	10	1,25

$$A_{LiP} = \frac{\Delta E_{310\text{ nm}} \cdot V_{ges} \cdot VF}{V_P \cdot \epsilon_{310\text{ nm}} \cdot d} \quad (20)$$

mit

A_{LiP} = Aktivität der LiP [U·L⁻¹]

$\Delta E_{310\text{ nm}}$ = maximale Umsetzungsgeschwindigkeit, berechnet aus der Extinktionsänderung bei 310 nm

V_{ges} = Gesamtvolumen: 0,2 mL

VF = Verdünnungsfaktor

V_P = Probenvolumen: 0,02 mL

$E_{310\text{ nm}}$ = Extinktionskoeffizient von Veratraldehyd: 0,0093 L·µmol⁻¹·cm⁻¹

d = Schichtdicke: 0,64 cm

2.8.14 Bestimmung des Ergosterolgehaltes sowie Biomasseabschätzung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode wurde in Anlehnung an Matissek et al. (2014) entwickelt und intern validiert (vgl. 2.10). Zur Probenvorbereitung wurden die Substrate und gefriergetrockneten Fermentate je 3 min in einer Schwingmühle (25 Hz) gemahlen. Anschließend wurden ca. 20 – 100 mg in ein Pyrexröhrchen eingewogen. Nach Zugabe von 25 mg Natriumascorbat als Antioxidans, 0,25 mL internem Standard (IST) (0,5 mg·mL⁻¹ 7-Dehydrocholesterol in 2-Butanon) und 5 mL methanolischer NaOH (5% NaOH in 95%igem Methanol) wurden die Proben gevortext und anschließend 60 min bei 80 °C im Wasserbad

alkalisch verseift, dabei wurde alle 20 min gevortext. Nach dem Abkühlen im Dunkeln wurden die Proben durch einen Membranfilter (0,45 µm) filtriert und anschließend dreimal mit 5 mL *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden in einem 15 mL Messkolben vereint, mit *n*-Hexan ad Marke aufgefüllt und über wasserfreies Natriumsulfat getrocknet. 6 mL der Probe (VF=2,5) wurden in ein frisches Pyrexröhrchen überführt und unter N₂ abgeblasen. Der Rückstand wurde in 0,5 mL THF und 0,5 mL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) als Silylierungsreagenz aufgenommen und gevortext. Nach Inkubation bei 70 °C für zweimal 1 min erfolgte die Silylierung bei Raumtemperatur über Nacht. Die Reaktionsgleichung für die Silylierung von Ergosterol ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Silylierung von 7-Dehydrocholesterol erfolgt analog. Die Messung erfolgte mittels GC-FID. Tabelle 19 zeigt die Parameter der Messung.

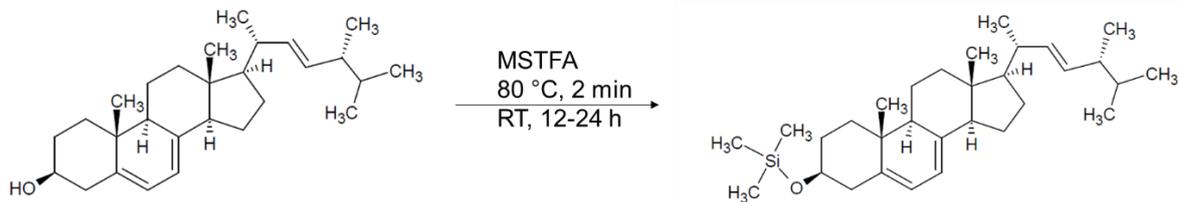


Abbildung 7: Silylierung von Ergosterol.

Tabelle 19: Parameter der Ergosterol-Messung am GC-FID.

Parameter	
Gaschromatograph	Agilent 7890GC
Autosampler	Agilent 7683B
Injektion	1 µL, splitlos (250 °C)
Trennsäule	DB5-ms (30 m x 320 µm x 0,25 µm), Agilent
Temperaturprogramm	100 °C für 3 min 30 °C/ min auf 280 °C für 12 min 30 °C/ min auf 320 °C für 5 min
Trärgas	H ₂ (5.0); Fluss: 2,2 mL·min ⁻¹ (konstant)
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID) 280 °C
Gase	Wasserstoff: 40 mL·min ⁻¹ Luft: 400 mL·min ⁻¹ Make-up-Gas: N ₂ (5.0) 25 mL·min ⁻¹

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung unter Einbeziehung des IST im Bereich von 10 – 100 µg·mL⁻¹. Dazu wurde eine Ergosterol-Stammlösung von 200 µg·mL⁻¹ in

2-Butanon angesetzt. Die einzelnen Kalibrierpunkte wurden in 10 mL Messkolben angesetzt, indem jeweils 1 mL IST und zwischen 0,5 und 5,0 mL Ergosterol-Stammlösung ad 10 mL aufgefüllt wurden. Hiervon wurde jeweils 1 mL unter N₂ eingengt und anschließend analog zu den Proben behandelt. Das Bestimmtheitsmaß der resultierenden Kalibriergerade betrug 0,9999 (Anhang Abbildung 46). Die Berechnung des Ergosterol-Gehaltes in den Proben erfolgte über Formel (21).

$$\text{Ergosterol} = \frac{\left(\frac{A_{\text{Ergosterol, Probe}}}{A_{\text{IST, Probe}}}\right) - b}{m} \cdot \frac{2,5 \cdot 100}{E} \quad (21)$$

mit

Ergosterol = Ergosterol [mg·100 g⁻¹]

*A*_{Ergosterol, Probe} = Peakfläche des Ergosterols in der Probe

*A*_{IST, Probe} = Peakfläche des IST in der Probe

b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade

m = Steigung der Kalibriergerade [1·mg⁻¹]

2,5 = Verdünnungsfaktor (6 mL aus 15 mL)

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g

E = Probeneinwaage [g]

Zur Abschätzung der durch die Fermentation gebildeten pilzlichen Biomasse wurde der Ergosterolgehalt in den Fermentaten auf einen Referenzwert bezogen, der gleich 100% gesetzt wird (Formel (22)). Für den Referenzwert wird der jeweilige Pilz zeitgleich auf ME-Medium kultiviert und am ausgewählten Referenztag (vgl. 3.3.3) ebenfalls auf Ergosterol untersucht. Um eine Verfälschung durch das Substrat auszuschließen, wurde CPH in Doppelbestimmung als Blindwert mitgeführt.

$$\text{Pilzanteil [\%]} = \frac{\text{Ergosterol}_{\text{Fermentat}} [\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}]}{\text{Ergosterol}_{\text{Referenz}} [\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}]} \cdot 100 \quad (22)$$

2.8.15 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde unter Hochvakuum durchgeführt und mittels Everhart-Thornley Detektor gemessen. Die Anregungsspannung betrug 15,00 kV. Alle Proben wurden mit Gold besputtert.

2.9 Methoden der Aromaanalytik

2.9.1 Aromaextraktion

2.9.1.1 Stir bar sorptive extraction

Aus flüssigen Proben wurden mittels *stir bar sorptive extraction* (SBSE, Handelsname Twister®, PDMS-Beschichtung) Aromastoffe extrahiert. Dazu wurden 5 mL der Probe in 20 mL GC-Vials abgefüllt und jeweils ein Twister direkt in die Lösung gegeben und für 30 min bei 1000 rpm gerührt (*direct immersion* (di)). Anschließend wurden die Twister in VE-Wasser gewaschen und mit Hilfe eines fusselfreien Tuchs getrocknet. Alle verwendeten Twister wurden vor jedem Gebrauch vorkonditioniert (TubeConditioner TC 2, Gerstel, Deutschland). Dabei wurden die Twister unter Stickstofffluss ($75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) mit $5 \text{ }^\circ\text{C}$ pro Minute auf $300 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und dort für 120 min gehalten.

2.9.1.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender SAFE

Zur Herstellung von Flüssig-Extrakten wurden 100 mL der flüssigen Probe bzw. 100 g der Kakaopulpe mit 10 g Natriumchlorid versetzt und in 250 mL Zentrifugenbechern aus Teflon dreimal mit je 100 mL Pentan-Diethylether (P/D) (1/1,12 (v/v)) extrahiert. Das verwendete P/D-Gemisch wurde zuvor destilliert, eingeeengt und mittels gaschromatographischer Analyse auf Reinheit geprüft. Zwischen den Extraktionsschritten wurden die Proben für 15 min bei 4.000 g und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und die oberen organischen Phasen vereinigt. Vor der *Solvent assisted flavor evaporation* (SAFE) wurden die vereinigten Extrakte über wasserfreies Natriumsulfat in Rundkolben filtriert.

Für die SAFE-Destillation wurde das Wasserbad auf $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und der Dom mittels Wasserumlauf auf $55 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Der Vorlagekolben und die Kältefalle wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Mittels Hochvakuumpumpe (DCU hiCUBE, Pfeiffer Vacuum GmbH, Aßlar, Deutschland) wurde ein Vakuum von $1\cdot 10^{-3} \text{ mbar}$ angelegt. Die Probenzugabe erfolgte aus einem Tropftrichter heraus mit Hilfe einer pneumatischen Dosiereinheit (HWS-Dosiertrichter, Hans Schmidt GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland), wobei alle 20 Sekunden 1 mL der Probe in den Rundkolben gegeben wurde. Zur Oberflächenvergrößerung wurde der Boden des Rundkolbens mit Raschig-Ringen gefüllt. Zunächst wurde ein P/D-Blindwert destilliert, anschließend die Probe. Nach der Destillation wurden die Proben aufgetaut, über wasserfreies Natriumsulfat in einen 250 mL Spitzkolben mit Siedeperlen filtriert und mittels Vigreux-Destillation bei $43 \text{ }^\circ\text{C}$ auf ca. 1 mL eingeeengt. Die Proben wurden in GC-Vials überführt und bis zur Messung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Alle hier verwendeten Glasgeräte wurden vor Verwendung pyrolysiert.

2.9.2 Gaschromatographische Untersuchungen

Die Methodenparameter zur Messung von Twister-Proben sind in Tabelle 20 dargestellt. Abweichend davon wurde zur Messung flüssiger Proben das Split/Splitless-Inlet bei 250 °C temperiert und ein individuelles Splitverhältnis gewählt. Das Injektionsvolumen betrug 1 µL.

Tabelle 20: Methodenparameter für die Messung von SBSE-Proben.

Parameter	
Gaschromatograph	Agilent 8890
Trennsäule	VF-WAXms (30 m x 250 µm x 0,25 µm), Agilent*
Temperaturprogramm	40 °C für 3 min 5 °C/ min auf 240 °C 240 °C für 12 min
Trägergas	He (5.0); Fluss: 1,56 mL·min ⁻¹ (konstant)
TDU	
Temperaturprogramm	40 °C für 0,5 min 120 °C/ min auf 250 °C 250 °C für 12 min
KAS	
Liner	Glaswolle
Temperaturprogramm	-70 °C für 0,5 min 12 °C/ s auf 250 °C 250 °C für 5 min
PTV Front Inlet	
Mode	Solvent Vent
Druck	121,95 kPa
Total Flow	8,87 mL·min ⁻¹
Septum Purge Flow	3 mL·min ⁻¹
Gas Saver	25 mL·min ⁻¹ nach 5 min
Purge Flow to Split Vent	4,31 mL·min ⁻¹ nach 0 min
Vent flow	50 mL·min ⁻¹
Detektor	
MSD Transfer Line	250 °C
Ionenquelle	EI (230 °C, 70 eV)
Mode	Scan (<i>m/z</i> 33 – 300)
ODP	
Transfer Line	250 °C
Mischkammerheizung	polar: 150 °C
Makeup Gas	N ₂
Splitterplatte	1:1 in ODP und MS

* oder DB-5ms (30 m x 320 µm x 0,25 µm, Agilent) mit Endtemperatur von 320 °C

Der Enantiomerenüberschuss von Linalool wurde mittels multidimensionaler Gaschromatographie analog zu Brescia et al. (2021) untersucht.

2.9.3 Identifizierung aromaaktiver Substanzen

Zur Identifizierung der Substanzen wurden verschiedene Kriterien herangezogen. Dabei galt eine Substanz als abschließend identifiziert, wenn der Retentionsindex (RI), das Massenspektrum sowie der Geruch auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität mit der jeweiligen Standardsubstanz übereinstimmten. Als vorläufig identifiziert galt eine Substanz, wenn diese Punkte auf einer Säule erfüllt waren.

2.9.3.1 Abgleich der Massenspektren

Zunächst wurden die Massenspektren der Peaks mit der hinterlegten MS-Datenbank (NIST (National Institute of Standards and Technology)) verglichen. Substanzvorschläge mit hohem R-Match (Reverse-Match, > 850) wurden (wenn möglich) mit Hilfe von authentischen Referenzverbindungen bestätigt.

2.9.3.2 Berechnung von Retentionsindices (RI's) nach van den Dool und Kratz

Mit Hilfe der RI's kann die Retentionszeit von Substanzen geräteunabhängig in Bezug auf die homologe Reihe der Alkane angegeben werden. Dazu wurde in einem Abstand von ca. 4 Wochen auf dem jeweiligen Gerät die Alkanreihe (Gemisch aus n-Alkanen im Bereich von C₇ – C₃₄) gemessen und die relative Lage einer Substanz zu den Alkanen mit Hilfe von Formel (23) berechnet. War die Standardsubstanz nicht in der hausinternen Aromastoffdatenbank, so wurden RI-Werte aus der Literatur entnommen.

$$RI = 100 \cdot \left(\frac{R_{t, \text{Analyt}} - R_{t, n}}{R_{t, (n+1)} - R_{t, n}} + n \right) \quad (23)$$

mit

RI = Retentionsindex

$R_{t, \text{Analyt}}$ = Retentionszeit des Analyten [min]

$R_{t, n}$ = Retentionszeit des vor dem Analyten eluierenden Alkans [min]

$R_{t, (n+1)}$ = Retentionszeit des nach dem Analyten eluierenden Alkans [min]

n = Anzahl an Kohlenstoffatomen des vor dem Analyten eluierenden Alkans

2.9.3.3 Abgleich der Geruchseindrücke

Mit Hilfe eines Olfactory-Detection-Ports (ODP) wurde ein Teil des Gasstroms nach der gaschromatographischen Trennung über eine Splitterplatte in das Massenspektrometer und

der andere Teil zum ODP geleitet, wobei die Gerüche der einzelnen Peaks von Probanden in Echtzeit wahrgenommen werden konnten. Diese Gerüche wurden anschließend entweder mit Literaturdaten (TGSCIS (The Good Scents Company Information System)) oder mit dem Geruch der authentischen Standardsubstanz am ODP verglichen.

2.9.4 Aromaverdünnungsanalyse (ADA)

Die ADA des fermentierten Kakaopulpegetränks wurde mittels SBSE (vgl. 2.9.1) auf einer VF-Wax Säule und GC-MS-O durchgeführt. Dabei wurde die jeweilige Verdünnungsstufe beginnend mit Flavor-Dilution-Faktor (FD) 4 über die Split-Verhältnisse an der TDU und dem KAS schrittweise 1:2 angepasst, angelehnt an Trapp et al. (2018a). Tabelle 21 zeigt die eingestellten Split-Verhältnisse. Der FD gibt mit 2^n an, ab welcher Anzahl von 1:2-Verdünnungen keine sensorische Wahrnehmung mehr möglich ist. Zu Beginn wurde die Probe von drei Probanden (w/25, w/26 und w/27, alle Nichtraucher) jeweils dreimal abgerochen. Alle Substanzen, die von mindestens zwei Personen zweimal geruchlich wahrgenommen werden konnten, wurden in die ADA aufgenommen. Zur Ermittlung des FD-Faktors jeder Substanz wurde der Median der höchsten Verdünnungsstufe gewählt, bei welcher der Aromastoff durch die Probanden noch wahrgenommen werden konnte.

Tabelle 21: GC-Parameter zur Einstellung der benötigten Splitratios (SR) und damit der Flavor-Dilution-Faktoren (FD) für die ADA an der TDU-GC-MS/MS-O; variabel sind dabei der purge flow to split vent und der vent flow.

FD-Faktor	SR _{TDU} (soll)	SR _{CIS} (soll)	SR _{TDU} (ist)	SR _{CIS} (ist)	SR _{CIS} (korrigiert)	purge flow	
						to split vent [mL · min ⁻¹] ab 0 min	vent flow [mL · min ⁻¹]
4	1	4	1,06	3,76	4,31	4,31	50,00
8	1	8	1,06	7,52	10,17	10,17	50,00
16	1	16	1,06	15,04	21,90	21,90	50,00
32	1	32	1,06	30,08	45,36	45,36	50,00
64	1	64	1,06	60,16	92,29	92,29	50,00
128	1	128	1,06	120,32	186,14	186,14	50,00
256	1	256	1,06	240,64	373,84	373,84	50,00
512	16	32	16,00	32,00	48,36	48,36	24,96
1.024	16	64	16,00	64,00	98,28	98,28	24,96
2.048	16	128	16,00	128,00	198,12	198,12	24,96

2.9.4.1 Statistische Untersuchung der Aromaverdünnungsanalyse

Zur Untersuchung und Bestätigung der Linearität der Abnahme der Konzentrationen während der ADA wurden die Flächen von drei charakteristischen Aromastoffen (logarithmisch zur Basis 2) graphisch gegen die jeweiligen FD-Faktoren aufgetragen (Trapp et al. 2018a). Die Flächen wurden aus dem Extracted-Ion-Count Chromatogramm (EIC) für das m/z -Verhältnis des ausgewählten Qualifier-Ions entnommen (m/z_{Linalool} 73; $m/z_{5\text{-Butyl-2(5H)-furanon}}$ 84; $m/z_{(E)\text{-Nerolidol}}$ 69). Die Untersuchung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.9.5 Quantifizierung ausgewählter Aromastoffe mittels Standardaddition

Zur Quantifizierung relevanter Aromastoffe wurde das Standardadditionsverfahren in Doppelbestimmung verwendet. Es wurden jeweils 100 µL Mischstandardlösung in vier Konzentrationen zu 5.000 µL Probe dotiert. Für den Standardadditionspunkt S0 wurden 100 µL VE-Wasser zugegeben (Tabelle 22). Durch lineare Regression wurde der Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit der x-Achse bestimmt, welcher der Menge des Analyten in der Probe entspricht. Die Auswertung erfolgte anhand der Fläche des jeweils größten m/z -Verhältnisses für die Substanzen im Extracted-Ion-Count-Modus (EIC).

Tabelle 22: Parameter der Quantifizierung einzelner Aromastoffe sowie Konzentrationen im Gesamtvolumen.

Substanz	EIC (m/z)	Konzentration [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]				
		S0	S1	S2	S3	S4
2-Nonanon	58	0	0,31	0,67	1,29	1,96
(R)-Linalool	93	0	48,07	96,14	144,21	192,28
(E)-Nerolidol	93	0	5,00	10,00	20,00	30,00
Methylbenzoat	105	0	0,13	0,26	0,39	0,52
1-Phenylethyl- acetat	122	0	0,19	0,39	0,58	0,77
2-Phenylethanol	91	0	14,47	28,94	43,41	57,88
5-Butyl-2(5H)- furanon	84	0	197,65	395,29	592,94	988,24

2.9.6 Berechnung des Aromawerts

Der Aromawert (OAV, *odor activity value*) des jeweiligen Aromastoffs wurde nach Formel (24) berechnet. Die Geruchsschwellenwerte wurden dabei der Literatur entnommen (Tabelle 23).

$$\text{OAV} = c \cdot \text{OT}^{-1} \quad (24)$$

mit

OAV = Aromawert (odor activity value)

c = Konzentration [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]

OT = Geruchsschwellenwert (odor threshold) [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]

Tabelle 23: Zur Berechnung des OAV verwendete Geruchsschwellenwerte

Substanz	Geruchsschwellenwert [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Literaturangabe
2-Nonanon	5	(Teranishi et al. 1974)
(R)-Linalool	0,087	(Czerny et al. 2008)
(E)-Nerolidol	0,25	(Yin et al. 2022)
Methylbenzoat	0,52	(Pino et al. 2005)
1-Phenylethylacetat	19	(Carunchia Whetstine et al. 2005)
2-Phenylethanol	140	(Czerny et al. 2008)

2.9.6.1 Bestimmung der Geruchsschwelle in Wasser für 5-Butyl-2(5H)-furanon

Da für die Substanz 5-Butyl-2(5H)furanon keine Geruchsschwelle in Wasser in der Literatur angegeben war, wurde diese in Anlehnung an Czerny et al. (2008) bestimmt. Hierzu wurde eine Stammlösung mit $c = 0,984 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in VE-Wasser angesetzt und diese in sieben

Schritten 1:3 verdünnt. Die acht Lösungen wurden jeweils 1:100 verdünnt und jeweils 10 mL der Verdünnungen in 35 mL Schnappdeckelgläschen gefüllt. Diese wurden mit einem Uhrglas abgedeckt. Die Bestimmung der Geruchsschwelle erfolgte durch ein Panel bestehend aus 21 Prüfpersonen in Form eines Dreieckstest für jede Verdünnungsstufe. Dabei wurden die Proben (A) mit jeweils zwei Referenzen (R; VE-Wasser) in absteigender Konzentration in zufälliger Anordnung den Probanden dargereicht. Alle Gläschen wurden mit dreistelligen Zufallscodes versehen. Die Probanden sollten aus jedem Triplet die abweichende Probe (A) identifizieren und zusätzlich notieren, bei welcher Verdünnungsstufe sie die Geruchsqualität noch erkennen konnten. Dies sollte der Unterscheidung zwischen Wahrnehmungs- und Erkennungsschwelle dienen.

Die Auswertung erfolgte gemäß (DIN EN ISO 4120:2021-06) bei einem gewählten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Richtige Antworten wurden nur gewertet, wenn bis zur jeweiligen Probe alle Proben ohne Unterbrechung korrekt identifiziert wurden. Der Mittelwert zwischen der niedrigsten unterscheidbaren und der höchsten nicht unterscheidbaren Konzentration bildete die jeweilige Geruchsschwelle (Formel (25)). Die Reinheit der Substanz wurde chromatographisch dreifach bestimmt und verrechnet. Sie lag bei 76 % (Anhang Abbildung 47 und Tabelle 49).

$$OT = \frac{c_x + c_{x-1}}{2} \quad (25)$$

mit

OT = Geruchsschwellenwert (odor threshold) [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]

c_x = niedrigste, unterscheidbare Konzentration

c_{x-1} = höchste, nicht unterscheidbare Konzentration

2.10 Validierung der Ergosterol-Methode

Die hier entwickelte Methode wurde mit folgenden Validierungsparametern untersucht: Grundkalibrierung und Linearität im Arbeitsbereich, Wiederfindung, Methoden- und Messpräzision sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

2.10.1 Grundkalibrierung und Linearität im Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich wurde auf $10 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in der messfertigen Lösung festgelegt. Dies entspricht bei einer Einwaage von 50 mg einem Bereich von $50 - 500 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Ergosterol in zu analysierenden Proben. Durch Verringerung der Einwaage auf 10 mg kann der Bereich entsprechend bis auf $2.500 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ erweitert werden. In diesem Bereich wurden in äquidistanten Abständen zehn Kalibrierpunkte gewählt und in drei voneinander unabhängigen Ansätzen gemäß 2.8.14 angesetzt und vermessen. Als Linearität wird die Fähigkeit einer Methode definiert, „[...] innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereichs Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind“ (Kromidas 2011). Zur Beurteilung der Linearität wurde geprüft, ob eine lineare Kalibrierfunktion oder eine Kalibrierfunktion zweiten Grades den Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal besser beschreibt. Dazu wurden beide Kalibrierfunktionen über lineare bzw. quadratische Regression sowie deren Reststandardabweichung über die Residuen berechnet. Als Residuen bezeichnet man den vertikalen Abstand eines gemessenen Punktes von der jeweiligen Geraden bzw. Kurve (Kromidas 2011). Die Residuen wurden für jeden Kalibrierpunkt mittels Formel (26) berechnet. Der Residuenplot ergibt sich durch Auftragung der Residuen gegen die Massenkonzentration β von Ergosterol. Die Reststandardabweichung errechnet sich aus den Residuen gemäß Formel (27) und ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um die lineare bzw. quadratische Kalibrierfunktion.

$$Res_{i, linear} = y_i - (b \cdot x_i + c) \quad \text{bzw.} \quad Res_{i, quadratisch} = y_i - (a \cdot x_i^2 + b \cdot x_i + c) \quad (26)$$

mit

Res_i = Residuum im jeweiligen Kalibrierpunkt

y_i = gemessenes Signal bei jeweiliger Konzentration (hier: $A_{\text{Ergosterol}} / A_{\text{IST}}$)

a, b, c = Koeffizienten der Funktionen

$$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Res}_{i, \text{linear}})^2}{N-2}} \quad \text{bzw.} \quad s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Res}_{i, \text{quadratisch}})^2}{N-3}} \quad (27)$$

mit

s_{y1} = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

s_{y2} = Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

N = Anzahl der Kalibrierpunkte

Der Vergleich der Reststandardabweichung der linearen und der quadratischen Kalibrierfunktion erfolgte rechnerisch mittels Anpassungstest nach Mandel in Anlehnung an die DIN 38402 - A51. Dazu wurde gemäß Formel (28) die Differenz der Abweichungsvarianzen DS aus den zwei Reststandardabweichungen berechnet, woraus anschließend die Prüfgröße PW mittels Formel (29) berechnet wurde. Die PW wurde mit dem Tabellenwert der F-Tabelle für ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ und den Freiheitsgraden $f_1 = 1$, $f_2 = N-3$ verglichen (Wert: 12,25). Die Linearität wurde dabei als gegeben angesehen, wenn $PW \leq 12,25$.

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{y1}^2 - (N-3) \cdot s_{y2}^2 \quad (28)$$

mit

DS^2 = Differenz der Abweichungsvarianzen

s_{y1} = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

s_{y2} = Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

N = Anzahl der Kalibrierpunkte

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (29)$$

mit

PW = Prüfgröße nach Mandel's Test

DS^2 = Differenz der Abweichungsvarianzen

s_{y2}^2 = Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

Zusätzlich zum Linearitätstest nach Mandel und dem Residuenplot wurden der Responseplot sowie der Fehlerplot für die lineare Regression angefertigt. Der Responsefaktor ergibt sich aus dem Quotienten des gemessenen Signals und der Analytkonzentration. Bei gegebener Linearität bleibt der Responsefaktor über den Bereich konstant. Mithilfe des Fehlerplots kann der relative Fehler der mathematisch berechneten Analytkonzentration im Verhältnis zur wahren Konzentration angegeben werden. Mittels Formel (30) wurde der relative Fehler für

jeden Kalibrierpunkt bei linearer Regression ermittelt. Der Fehlerplot wurde erhalten durch Auftragung der relativen Fehler gegen die Massenkonzentration β des Analyten. Dabei wurde eine Fehlertoleranz von max. 5% akzeptiert.

$$\text{Fehler}_{\text{relativ}} [\%] = \frac{C_{\text{berechnet}} - C_{\text{Standardlösung}}}{C_{\text{Standardlösung}}} \cdot 100 \quad (30)$$

mit

$C_{\text{berechnet}}$ = mittels linearer Regression berechnete Konzentration im jeweiligen Kalibrierpunkt

$C_{\text{Standardlösung}}$ = Konzentration der jeweiligen Standardlösung

2.10.2 Wiederfindung

Die Wiederfindung über den Arbeitsbereich wurde durch Dotierungsexperimente einer Nullmatrix (CPH) in allen 10 Kalibrierkonzentrationen in Dreifachbestimmung bestimmt. Dabei wurden mithilfe von Standardlösungen von Ergosterol in 2-Butanon dotiert (vgl. Tabelle 24), das Lösemittel abgedampft und anschließend nach 2.8.14 aufgearbeitet. Die Wiederfindung errechnete sich nach Formel (31). Das Akzeptanzlevel von Wiederfindungsraten liegt normalerweise zwischen 95 und 105%. Innerhalb dieses Bereichs kann die Analysenmethode für die jeweilige Konzentration als selektiv, richtig und robust angesehen werden (Kromidas 2011).

Tabelle 24: Schema der Dotierung für die Wiederfindungsrate über den Arbeitsbereich (in Dreifachbestimmung).

Wdf-Probe	je 2,5 mL auf 50 mg CPH	$c_{\text{Soll}} [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$
1	K1	10
2	K2	20
3	K3	30
4	K4	40
5	K5	50
6	K6	60
7	K7	70
8	K8	80
9	K9	90
10	K10	100

$$WDF [\%] = \frac{x_{\text{bestimmt}}}{x_{\text{dotiert}}} \cdot 100 \quad (31)$$

mit

x_{bestimmt} = mittels Analysenmethode ermittelter Gehalt

x_{dotiert} = dotierter Gehalt/ richtiger Wert

2.10.3 Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analysenergebnissen. Für die hier zu validierende Methode wurde zum einen die Messpräzision bestimmt, die auch als Gerätepräzision bezeichnet wird. Dazu wurde ein Kalibrierpunkt (K5) sechsfach vermessen. Weiterhin wurde die Methodenpräzision bestimmt, indem eine reale Probe mit einem Ergosterolgehalt von $252,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ sechsfach aufgearbeitet wurde. Als Präzisionsmaß wurde der Variationskoeffizient V_K herangezogen, der der relativen Standardabweichung entspricht (vgl. Formel (32)).

$$V_K [\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (32)$$

mit

s = Standardabweichung

\bar{x} = Mittelwert aus sechs Analysen

2.10.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Gemäß (DIN 32645:2008-11) entspricht die Nachweisgrenze (NWG) der kleinsten nachweisbaren Menge des Analyten bzw. derjenigen Konzentration, die mit 50% Irrtumswahrscheinlichkeit noch nachgewiesen werden kann. Bei der Bestimmungsgrenze (BG) handelt es sich um die kleinste Menge des Analyten, die mit der angewandten Methode bei vorgegebener Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann. Die NWG und die BG wurden nach dem Kalibriergeradenverfahren gemäß DIN 32645:2008-11 bestimmt. Dazu wurde in Dreifachbestimmung eine Kalibriergerade aus zehn Punkten in äquidistanten Abständen im Bereich von $2,5 - 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IST) angesetzt und vermessen. Die Berechnung erfolgte unter Einhaltung aller Voraussetzungen (Linearität der Kalibrierfunktion mittels Linearitätstest nach Mandel, Residuen-, Response- und Fehlerplot, Varianzhomogenität im Arbeitsbereich und Unabhängigkeit der hergestellten Kalibrierlösungen) mittels Formel (33) für die NWG und Formel (34) für die BG.

$$NWG = s_{x0} \cdot t_P \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{Q_x}} \quad (33)$$

mit

$$s_{x0} = \frac{s_{y1}}{b} \text{ mit } s_{y1} = \text{Reststandardabweichung Kalibrierfunktion und } b = \text{Steigung}$$

$$t_P = \text{Student-Faktor (einseitig für } N-2 \text{ Freiheitsgrade, } \alpha=0,01): 2,90$$

$$R = \text{Anzahl der Messungen: 1}$$

$$N = \text{Anzahl der Kalibrierpunkte: 10}$$

$$X = x - X_{\text{Mittelwert}}$$

$$Q_x = \text{Summe der Abweichungsquadrate von } x$$

$$BG = k \cdot s_{x0} \cdot t_P \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N} + \frac{X_{BG}^2}{Q_x}} \quad (34)$$

mit

$$k = \text{relative Ergebnisunsicherheit: 3 (entspricht 33,33\%)}$$

$$s_{x0} = \frac{s_{y1}}{b} \text{ mit } s_{y1} = \text{Reststandardabweichung Kalibrierfunktion und } b = \text{Steigung}$$

$$t_P = \text{Student-Faktor (zweiseitig für } N-2 \text{ Freiheitsgrade, } \alpha=0,005): 3,36$$

$$R = \text{Anzahl der Messungen: 1}$$

$$N = \text{Anzahl der Kalibrierpunkte: 10}$$

$$X_{BG} = X_{BG} - X_{BG, \text{Mittelwert}} \text{ mit } X_{BG} = 3 \cdot NWG$$

$$Q_x = \text{Summe der Abweichungsquadrate von } x$$

3. Ergebnisse

3.1 Zusammensetzung der Substrate

Voraussetzung für eine erfolgreiche Fermentation mit Pilzen ist die Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Substrats. Prinzipiell ist die Menge an Protein und die Menge an leicht zugänglichen Kohlenhydraten entscheidend für die Fermentation. Die drei vorausgewählten Kakaofruchtschalensorten SUL 1, SUL 2 und MCC 02 unterschieden sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung nur marginal (Abbildung 8). Den größten Anteil an der Trockenmasse machten unlösliche und lösliche Ballaststoffe (inklusive Lignin) aus, gefolgt von Zuckern und Asche. Der Rohproteingehalt wurde mit dem Faktor 6,39 für SUL 1, 6,25 für SUL 2 und 6,36 für MCC 02 berechnet, die durch die Aminosäureanalyse ermittelt wurden. Der Rohproteingehalt war bei SUL 1 mit $7,7 \pm 0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ am höchsten und bei der Sorte MCC 02 mit $5,5 \pm 0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ am niedrigsten. Der Wassergehalt der sonnengetrockneten Kakaofruchtschalen lag bei 10%.

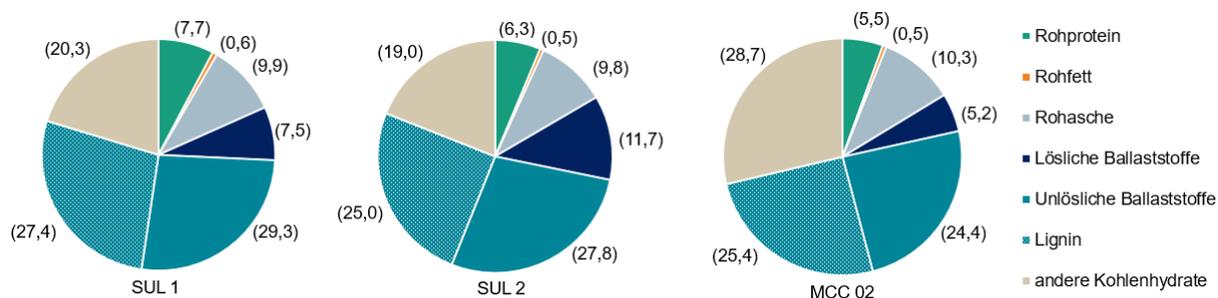


Abbildung 8: Chemische Zusammensetzung der drei Kakaofruchtschalensorten SUL 1, SUL 2 und MCC 02 (Werte in $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$; $n=3$; Ballaststoffe $n=2$).

Ebenfalls von Bedeutung für die spätere Bewertung der Fermentate ist die biologische Wertigkeit des Proteins. Diese wurde aus der Aminosäureverteilung berechnet und lag für die drei Kakaochalensorten bei 87 ± 3 . Die erste limitierende Aminosäure war Tryptophan, die zweite limitierende Aminosäure war die Summe aus Cystein und Methionin. Abbildung 9 zeigt die Aminosäureverteilung.

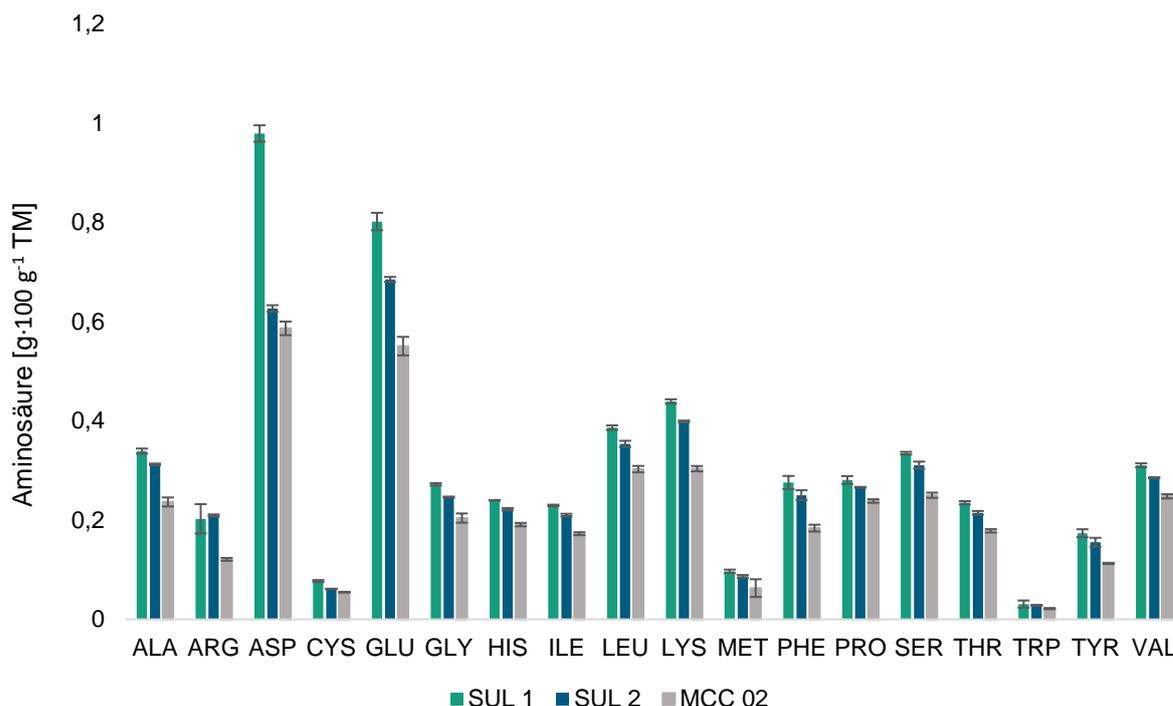


Abbildung 9: Aminosäureprofil der Kakaofruchtschalensorten SUL 1, SUL 2 und MCC 02 (Werte bezogen auf die Trockenmasse; n=3).

Im Gegensatz zu den Kakaofruchtschalen bestand die pasteurisierte Kakaopulpe zum größten Teil aus Wasser (80%) und reduzierenden Zuckern. Bezogen auf die Trockenmasse enthielt die Kakaopulpe $82,3 \pm 0,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ reduzierende Zucker (Glucose und Fructose) und $1,8 \pm 0,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ Saccharose. Der Gehalt an organischen Säuren betrug $8,6 \pm 0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ (Abbildung 10). Der Kjeldahlfaktor für die Kakaopulpe wurde nicht näher spezifiziert. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mit dem Faktor 6,25.

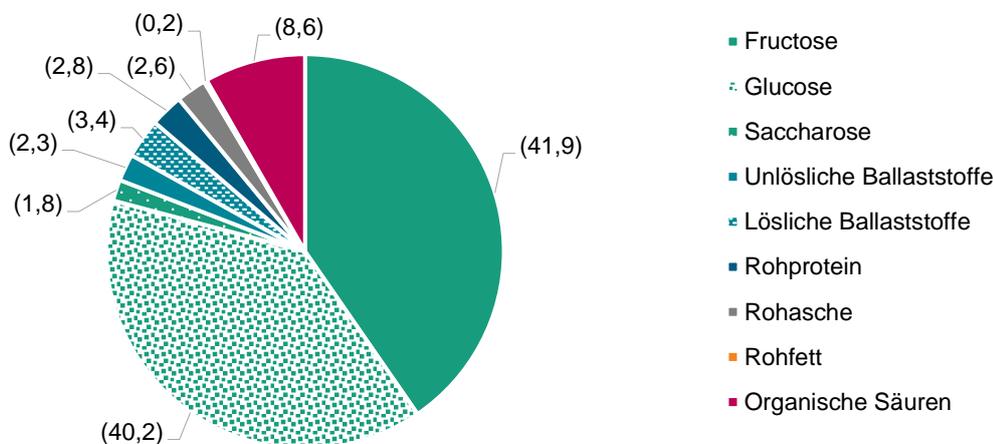


Abbildung 10: Chemische Zusammensetzung der pasteurisierten Kakaopulpe (Werte in $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$; n=3; Ballaststoffe n=2).

3.2 Validierung der Ergosterol-Methode zur Quantifizierung des Pilzanteils

3.2.1 Grundkalibrierung und Linearität im Arbeitsbereich

Die Grundkalibrierung im Arbeitsbereich von 10 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ wurde in drei voneinander unabhängigen Ansätzen untersucht. Mittels Linearitätstest nach Mandel wurde die Linearität über den Arbeitsbereich in Dreifachbestimmung nachgewiesen (Tabelle 25). Abbildung 11 zeigt die durch lineare Regression erhaltene Kalibriergerade, sowie den Response-, Residuen- und Fehlerplot für eine der Dreifachbestimmungen, die ebenfalls die Linearität belegen und die zuvor definierten Kriterien erfüllen (vgl. 2.10.1). Die Graphen der anderen beiden Bestimmungen befinden sich im Anhang (Abbildung 49 und Abbildung 50).

Tabelle 25: Daten und Kennzahlen zur Durchführung des Mandel-Linearitätstests für die Grundkalibrierung (F -Test: $\alpha=0.01$; $f_1=1$; $f_2=N-3$; $N=10$).

	a	b	c
N	10	10	10
Sy ₁	0,0041	0,0044	0,0128
Sy ₂	0,0042	0,02045	0,0118
DS ²	$1,1414 \cdot 10^{-5}$	-0,0027	0,0003
PW	0,6246	-6,6328	2,4265
F	12,25	12,25	12,25
Folgerung	linear	linear	linear

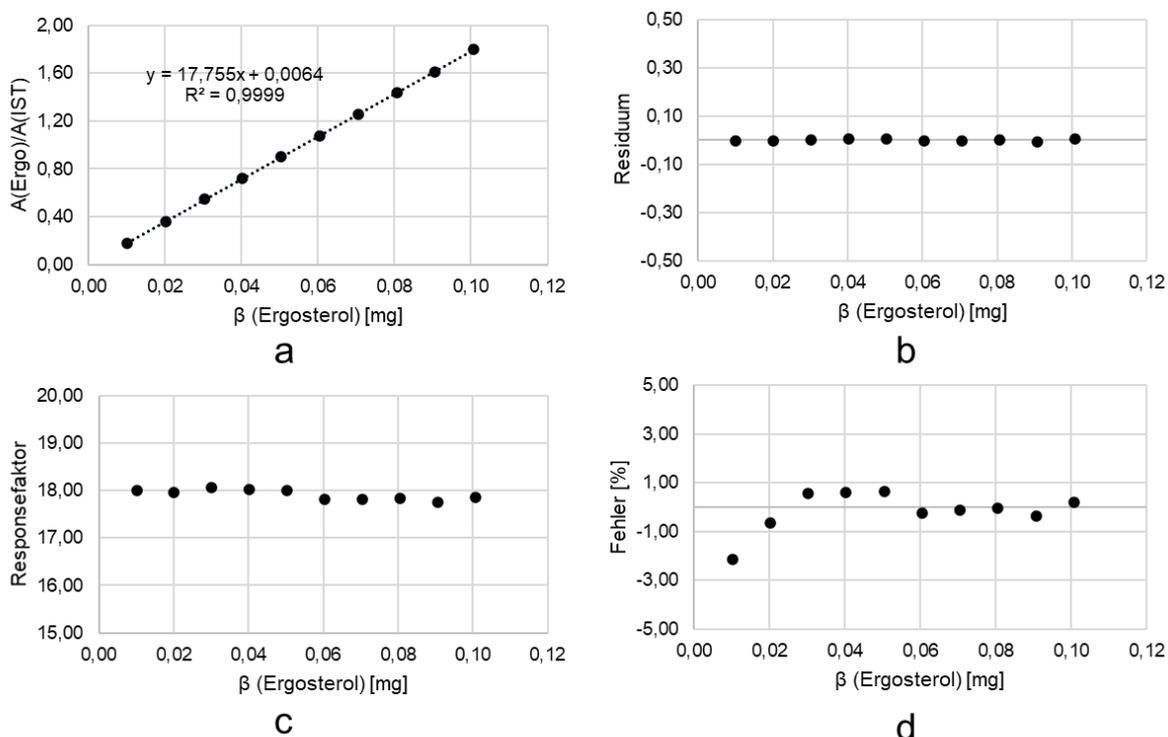


Abbildung 11: Kalibriergerade (a), Residuenplot (b), Responseplot (c) sowie Fehlerplot (d) der Grundkalibrierung A.

3.2.2 Wiederfindung

Die Wiederfindung über den Arbeitsbereich in CPH-Matrix betrug gemittelt zwischen 97,16 und 101,83% (vgl. Tabelle 26) und lag somit innerhalb der zuvor festgelegten Spezifikation (vgl. 2.10.2). Die über alle Proben gemittelte Wiederfindung lag bei $99,80 \pm 2,00\%$.

Tabelle 26: Wiederfindung über den Arbeitsbereich in CPH-Matrix.

Wdf-Probe	A) Wiederfindung [%]	B) Wiederfindung [%]	C) Wiederfindung [%]	Wiederfindung [%]
1	92,09	98,34	101,05	$97,16 \pm 4,59$
2	96,74	98,39	101,32	$98,82 \pm 2,32$
3	105,45	100,05	99,98	$101,83 \pm 3,14$
4	99,41	100,05	99,19	$99,55 \pm 0,45$
5	99,81	100,95	100,93	$100,56 \pm 0,66$
6	100,39	100,38	99,31	$100,03 \pm 0,62$
7	100,51	99,80	99,64	$99,98 \pm 0,47$
8	100,29	100,96	99,49	$100,25 \pm 0,73$
9	100,37	99,38	99,81	$99,85 \pm 0,50$
10	98,99	99,68	100,74	$99,80 \pm 0,88$
Mittelwert				$99,80 \pm 2,00$

3.2.3 Präzision

Die sechsfache Messung des Kalibrierpunktes K5 ergab eine Messpräzision mit einer relativen Standardabweichung (V_K) von 0,2%. Die sechsfache Aufarbeitung einer realen Probe ergab eine Methodenpräzision mit einer relativen Standardabweichung (V_K) von 4,0% (Tabelle 27).

Tabelle 27: Mess- und Methodenpräzision der Ergosterol-Methode.

	Probe: K5	Ergosterol [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Mittelwert [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	S [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	V_K [%]
Mess- präzision	a	46,6	46,8	0,1	0,2
	b	46,8			
	c	46,8			
	d	46,8			
	e	46,8			
	f	46,8			
	Probe: CPHF _{PSS}	Ergosterol [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]	Mittelwert [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]	S [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]	V_K [%]
Methoden- präzision	a	252,6	252,6	10,0	4,0
	b	239,8			
	c	253,8			
	d	244,0			
	e	268,1			
	f	257,6			

3.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die mittels Kalibriergeradenverfahren bestimmte Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Da hierfür ein anderer Konzentrationsbereich gewählt wurde, wurde die Linearität der Kalibriergeraden ebenfalls mittels Response-, Residuen-, Fehlerplot sowie Linearitätstest nach Mandel bestätigt. Die zugehörigen Daten befinden sich im Anhang (Tabelle 52 sowie Abbildung 51, Abbildung 52 und Abbildung 53).

Tabelle 28: Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Ergosterolmethode nach der Kalibriergeradenmethode.

	a	b	c	Mittelwert	[mg·100 g⁻¹]*
NWG [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	0,35	0,37	0,55	0,42 ± 0,11	2,12 ± 0,57
BG [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	1,20	1,24	1,88	1,44 ± 0,38	7,22 ± 1,88

* bezogen auf eine Einwaage von 50 mg

3.3 Fermentation von Kakaofruchtschalen (CPH)

3.3.1 Screening auf Agar-Platten

Um eine Vorauswahl an Pilzen für die Fermentation von CPH zu treffen, wurde ein Screening mit 41 Pilzen (Speisepilze und Nicht-Speisepilze) durchgeführt. Als wichtige Bewertungsparameter wurden die Wachstumsgeschwindigkeit auf CPH-Agar und der Geruch herangezogen. Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse des Screenings. Ein schnelles Wachstum von maximal 14 Tagen in Kombination mit ansprechenden Geruchseindrücken oder einem neutralen Geruch zeigten die Pilze 136-FPI, 177-PSS, 223-PPI, 295-PSP-FP und 310-PCA-FP.

Tabelle 29: Wachstumsdauer und Geruchseindrücke der 41 Pilze aus dem Screening auf CPH-Agar sowie deren Einteilung in Speisepilze und Nicht-Speisepilze.

Spezies	Speisepilz	Platte 100% bewachsen [d]	Geruchseindrücke auf CPH-Agar
4-MSC	✓	14	aromatisch, würzig
5-PSA	✓	7	Bittermandel, Anis
6-TSU	×	7	muffig, modrig
9-WCO-C	✓	6	süßlich, blumig, fruchtig
13-POS	✓	8	leicht pilzig, muffig
16-LED	✓	8	neutral bis aromatisch
44-TCH	×	8	säuerlich, stechend, fruchtig
47-GAN	×	>14	dumpf, modrig, pilzig
55-PCAL	✓	>14	leicht pilzig
59-HCA	✓	10	muffig, modrig
60-KUM	✓	>14	muffig, modrig
70-PSCH	×	>14	dumpf, modrig, muffig
97-COL	×	>14	fruchtig, Johannisbeerblätter, ätherisch, harzig, grün
100-PER	✓	>14	neutral
103-HER	✓	>14	modrig, muffig, pilzig
113-PNA	✓	14	muffig, pilzig
114-PCI	✓	14	pilzig
116-SCO-D	×	6	süß, fruchtig, blumig, alkoholisch
121-ABI	×	6	muffig, modrig, Morast
128-HCO	✓	>14	modrig, muffig, pilzig
136-FPI	✓	8	fruchtig, blumig, eingekochte Kirschen
160-FVE-D	✓	8	pilzig, waldig

Spezies	Speisepilz	Platte 100% bewachsen [d]	Geruchseindrücke auf CPH-Agar
161-HTE	✓	>14	neutral
164-AARV	✓	>14	neutral
166-AAE	✓	8	neutral
167-FFO	×	12	muffig
170-LNU	✓	>14	modrig, muffig
175-TGI	×	6	pilzig
177-PSS	✓	7	neutral, leicht bittermandel-artig
186-AMEL	✓	>14	neutral
189-PCAN	✓	6	pilzig, muffig, modrig
202-MPR	✓	>14	neutral
203-PSTI	×	>14	neutral
223-PPI	✓	14	süßlich, Kokos, Gebäck
252-SCR-FP	✓	>14	neutral
295-PSP-FP	✓	7	leicht fruchtig, leicht bittermandel-artig
307-GPE-FP	×	>14	waldig, holzig, pilzig
310-PCA-FP	✓	6	leicht fruchtig
332-CCO-FP	✓	>14	muffig
342-SES-FP	✓	>14	muffig, pilzig
345-SRU	✓	>14	pilzig, muffig

3.3.2 Screening in Submers-Kultur

Für eine großtechnische Biokonversion von Kakaofruchtschalen (CPH) durch Pilze der Abteilung Basidiomycota eignet sich eine Flüssig-Kultivierung. Daher wurden die zuvor ausgewählten fünf Pilze *Fomitopsis pinicola* (FPI), *Pleurotus salmoneo-stramineus* (PSS), *Psathyrella piluliformis* (PPI), *Pleurotus pulmonarius* (PSP) und *Psathyrella candolleana* (PCA) in Submers-Kultur gescreent. Als Bewertungsparameter wurden die Bio-Trockenmasse, der Rohproteingehalt nach Kjeldahl und der Ergosterolgehalt herangezogen. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die fünf ausgewählten Pilze ein deutlich langsames Wachstum zeigen, wenn die Vorkultur ebenfalls in CPH-Medium angesetzt wird. Daher wurde ein standardisiertes Verfahren verwendet, bei der die Vorkultur auf ME-Medium angesetzt wurde. Dies ermöglichte eine kürzere Gesamt-Kulturdauer. Aufgrund des dunklen Fermentationsmediums war eine optische Beurteilung des Pilzwachstums schwierig. Daher wurde im Screening eine standardisierte Wachstumsdauer von fünf Tagen in Vorkultur und sieben Tagen in Hauptkultur

für alle Pilze gewählt. Eine Optimierung erfolgte für die ausgewählten Pilze zu einem späteren Zeitpunkt.

Der Ergosterolgehalt des in gleicher Weise erzeugten reinen Pilzmyzels (Kultivierung auf ME-Medium) wurde als Referenzwert zur Abschätzung des prozentualen Pilzanteils verwendet (vgl. Anhang Tabelle 50). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Rohproteingehalte mit dem Faktor von 6,25 für Lebensmittel allgemein berechnet und erst später mit der Aminosäureanalyse näher spezifiziert.

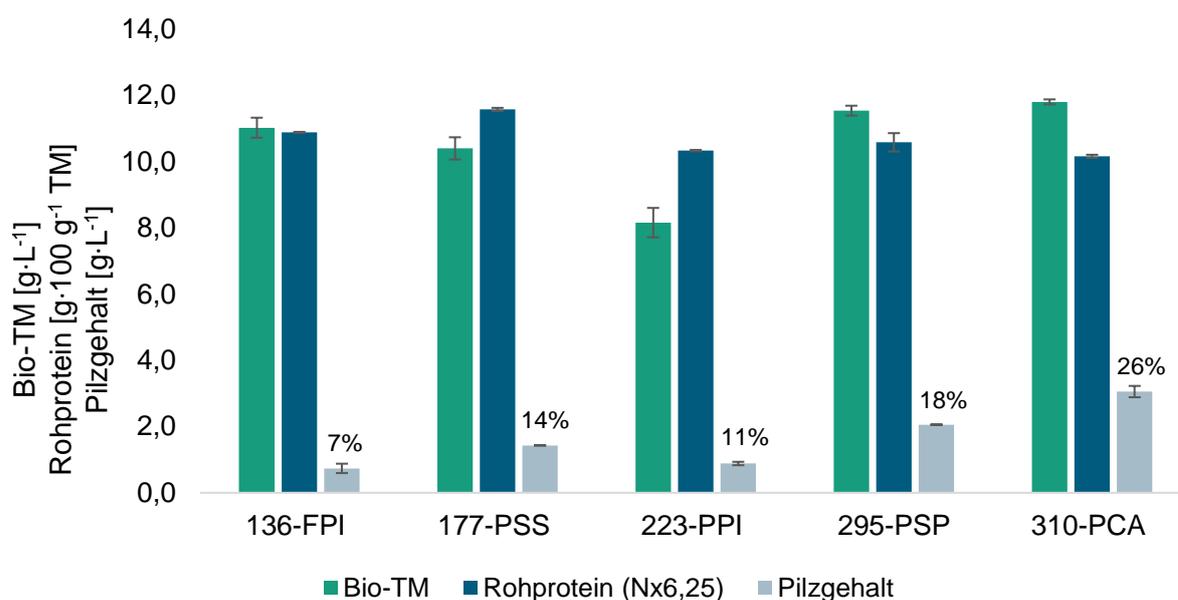


Abbildung 12: Ergebnisse des Submers-Screenings der CPH-Fermentation für die Pilze FPI, PSS, PPI, PSP und PCA; %-Angabe bezieht sich auf prozentualen Anteil des Pilzes an der Bio-Trockenmasse (n=2).

Im Screening waren alle Bio-Trockenmassen mit 10,4 bis 11,8 g·L⁻¹ vergleichbar hoch, mit Ausnahme von PPI mit 8,2 g·L⁻¹. Die Rohproteingehalte waren mit 10,2 bis 11,6 g·100 g⁻¹ TM für alle Pilze vergleichbar, wobei PSS den höchsten Wert aufwies. Den höchsten prozentualen Pilzanteil wies PCA mit 26% auf. Allerdings gestaltete sich die Quantifizierung des Pilzanteils für diesen Pilz schwierig, da dieser neben Ergosterol ein weiteres, nicht genauer identifiziertes Sterol bildete. Die Annahme, dass es sich um ein Ergosterol-Derivat handelte, wurde durch das zu Ergosterol sehr ähnliche Absorptionsspektrum (aufgenommen mittels HPLC-UV/Vis nach Ahlborn et al. (2019)) gestützt (vgl. Anhang Abbildung 48). Das Verhältnis der Peakflächen dieser beiden Substanzen zueinander war zusätzlich zwischen CPH- und ME-Kulturen nicht vergleichbar ($\frac{A_{\text{Ergosterol}}}{A_{\text{Derivat}}} = 2,7$ in CPH-Kulturen gegenüber $\frac{A_{\text{Ergosterol}}}{A_{\text{Derivat}}} = 4,3$ in ME-Kulturen). Der Pilz PCA wurde daher aufgrund der Unsicherheit bei der Quantifizierung des Pilzanteils ausgeschlossen. Da sowohl Bio-Trockenmasse, Rohproteinhalt als auch Pilzanteil bei PPI relativ gering waren, wurde dieser Pilz ebenfalls ausgeschlossen. PSS und PSP sind

relativ nah miteinander verwandt und die Ergebnisse waren vergleichbar. Aufgrund des geringfügig höheren Rohproteingehaltes und einem neutraleren gegenüber einem stark bittermandelähnlichen Geruch, wurde PSS ausgewählt. Zusätzlich wurde FPI in die Studien miteinbezogen. Der Pilzanteil mit 7% war zwar am geringsten, allerdings war aus Vorversuchen bekannt, dass FPI ein sehr hochwertiges Protein bildet.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass eine Medienoptimierung notwendig war. Der Pilzanteil in den Fermentaten war bei allen Pilzen relativ gering. Ein wichtiges Kriterium für das Pilzwachstum ist das Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis (C/N-Verhältnis). Aufgrund des geringen Proteingehaltes der CPH lag dieses bei einem C/N von 40. ME-Medium hingegen weist ein C/N-Verhältnis von 29 auf. Eine Supplementierung mit stickstoffhaltigen Additiven war daher notwendig.

3.3.3 Wachstumsreihen von FPI und PSS auf Malzextrakt-Medium

Zur Beurteilung des allgemeinen Wachstumsverhaltens der beiden Pilze FPI und PSS wurden Wachstumskurven auf dem Standardmedium (Malzextrakt-Medium) aufgenommen und auf die Bio-Trockenmasse, den Rohproteingehalt und den Ergosterolgehalt hin untersucht (Abbildung 13 und Abbildung 14). Die Bio-Trockenmasse des Pilzmyzels von FPI lag während der Kulturdauer zwischen 3,1 und 5,7 g·L⁻¹. Dabei lag der höchste Wert an Tag zwei vor. Tendenziell nahm die Bio-Trockenmasse ab Tag zwei stetig ab. Die Bio-Trockenmasse des Pilzmyzels von PSS hingegen stieg bis Tag sieben auf 4,8 g·L⁻¹ an und fiel danach langsam ab. Die Abnahme der Bio-Trockenmasse ist ein Indikator für keine weitere Biomasseproduktion bzw. das Absterben des Pilzes. Der Rohproteingehalt der Pilzmyzelien von PSS war insgesamt etwas geringer als der von FPI, unterlag allerdings weniger starken Schwankungen über die Kulturdauer. Bei beiden Pilzen war ein stetiger Anstieg des Ergosterolgehaltes zu beobachten, wobei dieser bei PSS deutlich schwächer ausfiel. Der Ergosterolgehalt bewegte sich hier zwischen 3,46 und 5,60 mg·g⁻¹ TM. Bei FPI hingegen stieg der Ergosterolgehalt von 3,45 zu 16,81 mg·g⁻¹ TM an.

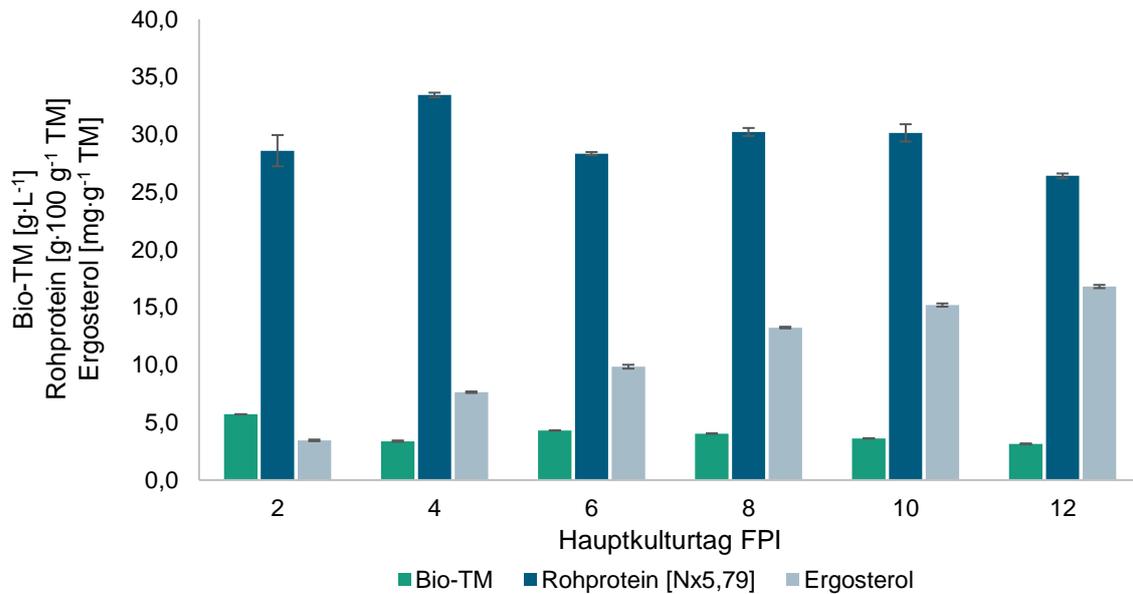


Abbildung 13: Wachstumsreihe von FPI auf ME-Medium: Bio-Trockenmasse, Rohproteingehalt des jeweiligen Fermentats und Ergosterolgehalt, aufgenommen an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 (n=2).

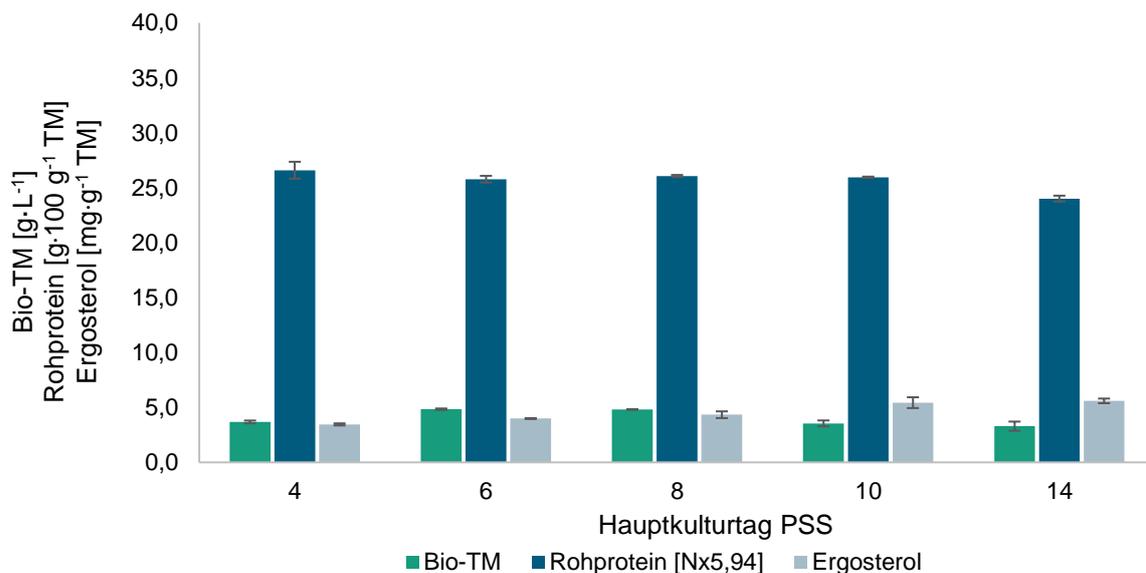


Abbildung 14: Wachstumsreihe von PSS auf ME-Medium: Bio-Trockenmasse, Rohproteingehalt des jeweiligen Fermentats und Ergosterolgehalt, aufgenommen an den Tagen 4, 6, 8, 10 und 14 (n=2).

3.3.3.1 Ermittlung des Ergosterol-Referenzwerts zur Biomassequantifizierung

Der Ergosterolgehalt dient der Abschätzung der pilzlichen Biomasse in einem Substrat-Pilzmyzel-Komplex. Da der Ergosterolgehalt über den Fermentationszeitraum nicht gleichbleibend war, wurde nicht der Durchschnittswert aller Kulturstage für die Biomassequantifizierung herangezogen. Stattdessen wurde eine alternative Bestimmung des Referenzwerts durchgeführt. Der Ergosterolgehalt wird angegeben in mg pro g Bio-

Trockenmasse-Fermentat (oder auch mg pro 100 g). Somit ist der Wert des Ergosterolgehaltes abhängig von der Ausbeute an Bio-Trockenmasse der jeweiligen Kultur. Um eine unabhängige und somit vergleichbare Größe zu erhalten, wurde der Ergosterolgehalt pro Kolben berechnet (vgl. Formel (35)). Dieser Wert gibt an, wie viel Ergosterol sich im Fermentationskolben (in 100 mL Medium) befindet (Abbildung 15). Die Vergleichbarkeit wird dadurch gewährleistet, dass jeder Ansatz mit gleichem Fermentationsvolumen durchgeführt wurde. Die Abnahme der Werte zeigt an, dass kein neues Ergosterol mehr gebildet wird.

$$\text{Ergosterol pro Kolben [mg]} = \frac{x_{\text{Ergosterol}} [\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}]}{1 \text{ g}} \cdot x_{\text{Bio-TM}} [\text{mg}] \quad (35)$$

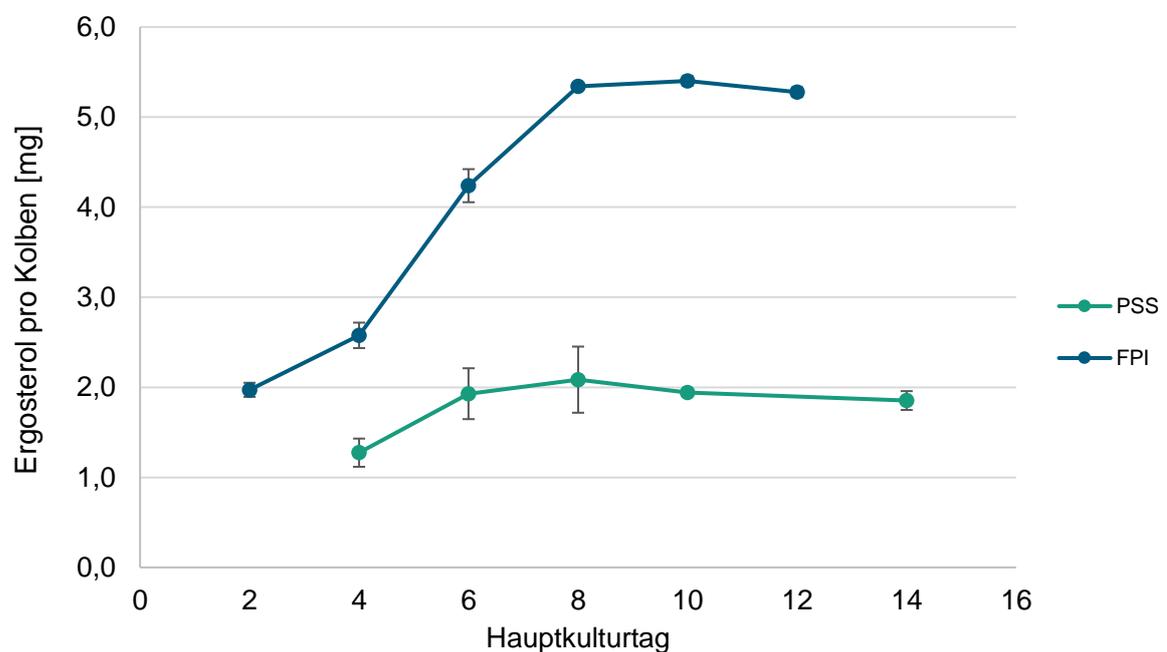


Abbildung 15: Ergosterolgehalt pro Fermentationskolben über die Kulturdauer ($n=2$).

PSS zeigte ein Maximum des Ergosterolgehaltes an Hauptkulturtag acht. FPI zeigte ein Maximum ebenfalls an Hauptkulturtag acht. Der in Abbildung 15 erkennbare Anstieg an Ergosterol pro Fermentationskolben zeigt an, dass bis Hauptkulturtag acht Ergosterol gebildet wurde, obwohl die Bio-Trockenmasse des Fermentats sank. Aus dem jeweiligen Maximum wurden die Ergosterol-Referenzwerte zur Biomassequantifizierung mit $4,34 \pm 0,31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$ (bzw. $434 \pm 31 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$) für PSS und $13,24 \pm 0,07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$ (bzw. $1324 \pm 7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$) für FPI abgeleitet.

3.3.4 Medien- und Kultivierungsoptimierung

Aufgrund des relativ niedrigen Pilzanteils in den Fermentaten im Screening wurden verschiedene Optimierungsparameter herangezogen. Um das C/N-Verhältnis zu erniedrigen, wurde eine Stickstoffsupplementierung mittels anorganischer und organischer Verbindungen untersucht sowie die jeweils vom Pilz benötigte Menge quantifiziert. Darauffolgend wurden unterschiedliche Substratmengen sowie Fütterungsversuche (*Fed-Batch*-Ansätze) durchgeführt. Mit Hilfe einer Wachstumsreihe wurde der bestmögliche Erntezeitpunkt bestimmt.

3.3.4.1 Stickstoff-Supplementierung

Der Vergleich von organischer und anorganischer Stickstoff-Supplementierung wurde für FPI durchgeführt. Die Supplementierung wurde mit $6,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Mononatriumaspargat-Monohydrat und $2,40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Ammoniumnitrat zum CPH-Medium ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CPH) durchgeführt, angelehnt an Fraatz et al. (2014). Die Bio-Trockenmasse, der Reinproteingehalt (berechnet aus der Analyse der Aminosäuren) sowie der Pilzanteil des Fermentats lagen bei der Supplementierung mit der organischen Stickstoffquelle deutlich über den Werten des Fermentats bei anorganischer Stickstoffquelle. Der Rohproteingehalt lag bei anorganischer Stickstoffquelle mit $22,5 \pm 0,1 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ leicht über dem Wert bei organischer Stickstoffquelle mit $20,4 \pm 0,1 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ (Abbildung 16).

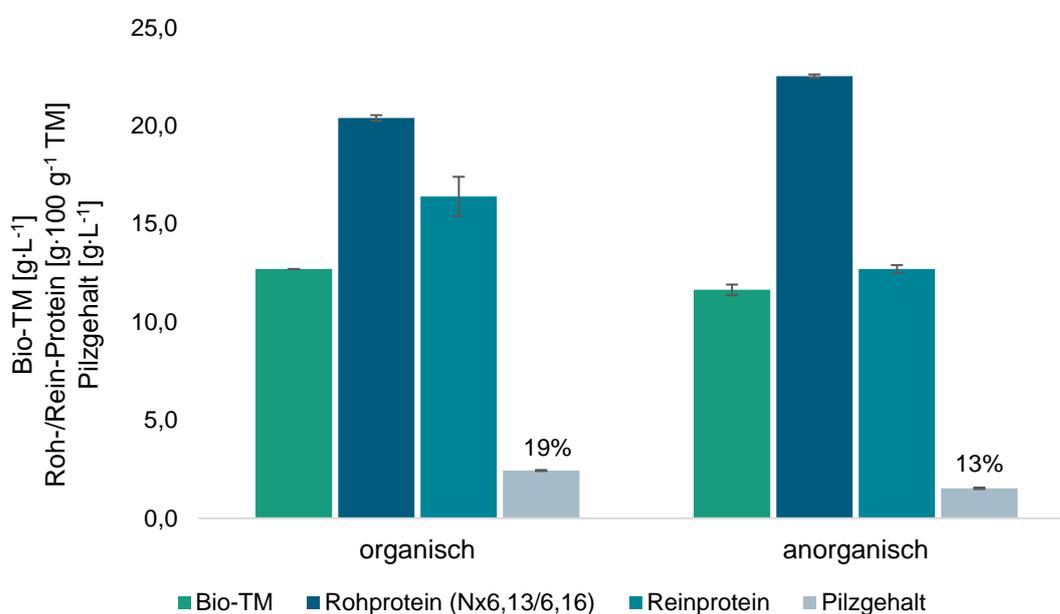


Abbildung 16: Vergleich von organischer und anorganischer Stickstoff-Supplementierung für den Pilz FPI, Hauptkulturtag 7; %-Angabe bezieht sich auf prozentualen Anteil des Pilzes an der Bio-Trockenmasse ($n=2$).

Aufgrund der ermittelten Daten wurde der Zusatz einer anorganischen Stickstoffquelle verworfen. Im nächsten Schritt wurde eine Reduzierung der Menge an Natriumaspargat auf die vom Pilz benötigte Menge vorgenommen. Ausgehend von $6,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurden Kulturen für FPI

mit $6,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (A), $3,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (B) und $2,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (C) MNA angesetzt. Umgerechnet auf die Menge an Asparaginsäure entsprach das $4,79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $1,59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nach der Kulturzeit wurden die Überstände gefriergetrocknet und zur Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse eingesetzt. Als Blindwert diente eine Kultur mit $6,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Natriumaspargat ohne Pilzinokulation. Tabelle 30 zeigt die im Überstand analysierten Mengen an Asparaginsäure, die daraus berechnete Wiederfindung sowie die ermittelten Bio-Trockenmassen und Pilzgehalte der jeweiligen Fermentate. Sowohl die Bio-Trockenmasse als auch der Pilzgehalt im Fermentat stieg mit höherer Supplementierung. Die Wiederfindung von 102,1% im Blindwert bestätigt die Richtigkeit des hier verwendeten Versuchsmodells. In den niedrig supplementierten Kulturen betrug die Wiederfindung von Asparaginsäure im Überstand 0,9 bzw. 1,2%. In der Kultur mit der höchsten Supplementierung konnten 19,4% wiedergefunden werden, sodass die Menge an Natriumaspargat um 19% reduziert wurde; von $6,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $5,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabelle 30: Ergebnisse der Fermentate von *Fomitopsis pinicola* bei reduzierter Asparaginsäurekonzentration im CPH-Medium ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CPH); A: $6,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA, B: $3,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA, C: $2,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA ($n=2$).

	Bio-TM [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Pilzgehalt [%]	Asp [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Wiederfindung Asp [%]
Blind	$10,4 \pm 0,0$	0	$4,89 \pm 0,05$	102,1
A	$12,8 \pm 0,0$	14 ± 1	$0,93 \pm 0,04$	19,4
B	$11,8 \pm 0,0$	12 ± 0	$0,02 \pm 0,00$	0,9
C	$11,6 \pm 0,0$	10 ± 1	$0,02 \pm 0,00$	1,2

Da für den Pilz PSS aus Vorversuchen bekannt war, dass dieser eine geringere Stickstoffsupplementierung benötigt als FPI, wurde hier ausgehend von $5,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $2,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $1,66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA (entsprechend $3,84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $1,92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $1,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Asparaginsäure) reduziert und analog zur Durchführung bei FPI die Menge an Asparaginsäure im Überstand nach der Fermentation bestimmt (Tabelle 31). Hierdurch wurde die Menge an Natriumaspargat um 28% auf $3,60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ reduziert.

Tabelle 31: Ergebnisse der Fermentate von *Pleurotus salmoneo-stramineus* bei reduzierter Asparaginsäurekonzentration im CPH-Medium ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CPH); A: $5,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA, B: $2,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA, C: $1,66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MNA ($n=2$).

	Bio-TM [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Pilzgehalt [%]	Asp [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Wiederfindung Asp [%]
A	$12,0 \pm 0,5$	59 ± 2	$1,10 \pm 0,08$	28,5
B	$11,9 \pm 0,5$	54 ± 4	$0,03 \pm 0,00$	1,8
C	$11,9 \pm 0,5$	42 ± 2	$0,02 \pm 0,00$	1,9

3.3.4.2 Fed-Batch Ansätze und Substratmenge

Unter einem *Fed-Batch* Ansatz versteht man die erneute Zugabe von Substrat (hier: CPH) zu einem Kulturansatz nach einer definierten Fermentationszeit. Um dem Pilz genügend Zeit zu geben, die erste Substratmenge zu verwerten, wurde bei einer Gesamtkulturdauer von sieben Tagen eine Fütterung an Hauptkulturtag vier gewählt. Tabelle 32 zeigt die jeweils eingesetzten Substratmengen und Kultivierungsbedingungen. Durch diesen Ansatz konnten Gesamtsubstratmengen von 10, 20 und 30 g·L⁻¹ verglichen werden. Durch das Mitführen eines *non-Fed-Batch* Ansatzes konnte außerdem eine Aussage über die Notwendigkeit einer Zufütterung getroffen werden.

Tabelle 32: Versuchsansätze der *Fed-Batch*-Kultivierung für die Pilze PSS und FPI; PSS Kulturen supplementiert mit 3,6 g·L⁻¹ Natriumaspartat, FPI Kulturen supplementiert mit 5,0 g·L⁻¹ Natriumaspartat; nFB= non *Fed-Batch*.

	Substratmenge CPH Beginn [g·L ⁻¹]	Substratmenge CPH Fütterung Tag vier [g·L ⁻¹]	Substratmenge CPH gesamt [g·L ⁻¹]	Ernte [d]
FB 1	15	15	30	7
FB 2	10	10	20	
FB 3	5	5	10	
nFB	20	0	20	

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse für den Pilz FPI, Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse für den Pilz PSS. Aufgrund der unterschiedlichen Gesamtsubstratmengen unterschieden sich auch die Gesamtbio-trockenmassen der Fermentate. In allen Fällen war ein Biomasseverlust von 25 bis 45% zu erkennen. Bei beiden Pilzen war außerdem zu erkennen, dass der prozentuale Pilzanteil mit abnehmender Substratmenge stieg, ebenso wie der Rohproteingehalt bezogen auf 100 g Trockenmasse des Fermentats. Grundsätzlich unterschied sich der Pilzanteil sowie der Proteingehalt zwischen den verschiedenen *Fed-Batch* Ansätzen nur gering. Demnach wurde in den FB 1 Ansätzen insgesamt am meisten Pilz und Protein erzeugt. Da das proteinreiche Myzel allerdings nicht von Schalenrückständen abgetrennt werden konnte, kam es zusätzlich zur quantitativen Ausbeute auch auf die endgültige Zusammensetzung der Endprodukte an. Aus diesem Grund wurde für beide Pilze eine Gesamtsubstratmenge von 20 g·L⁻¹ gewählt. Verglichen mit den *non-Fed-Batch* Ansätzen war der Pilzanteil sowie der Rohproteingehalt bei beiden Pilzen im *non-Fed-Batch* Ansatz höher. Daher wurden die finalen Fermentationen ohne *Fed-Batch* mit jeweils 20 g·L⁻¹ Substratmenge durchgeführt.

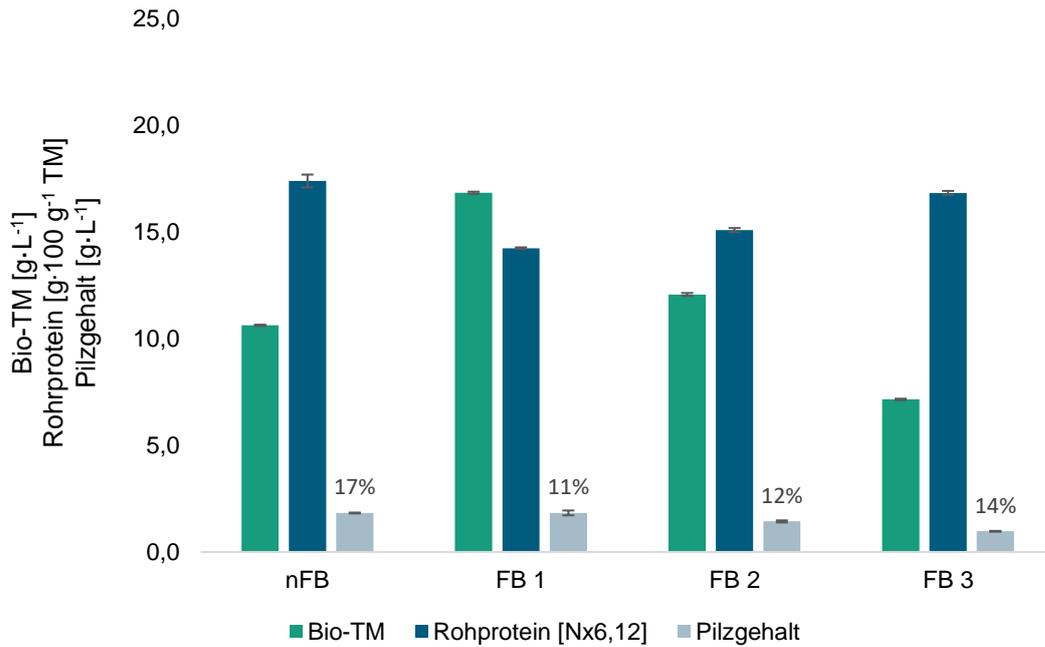


Abbildung 17: Ergebnisse der Fed-Batch-Kultivierung verglichen mit einem non-Fed-Batch Ansatz für den Pilz FPI auf CPH-Medium; %-Angabe bezieht sich auf prozentualen Anteil des Pilzes an der Bio-Trockenmasse (n=2).

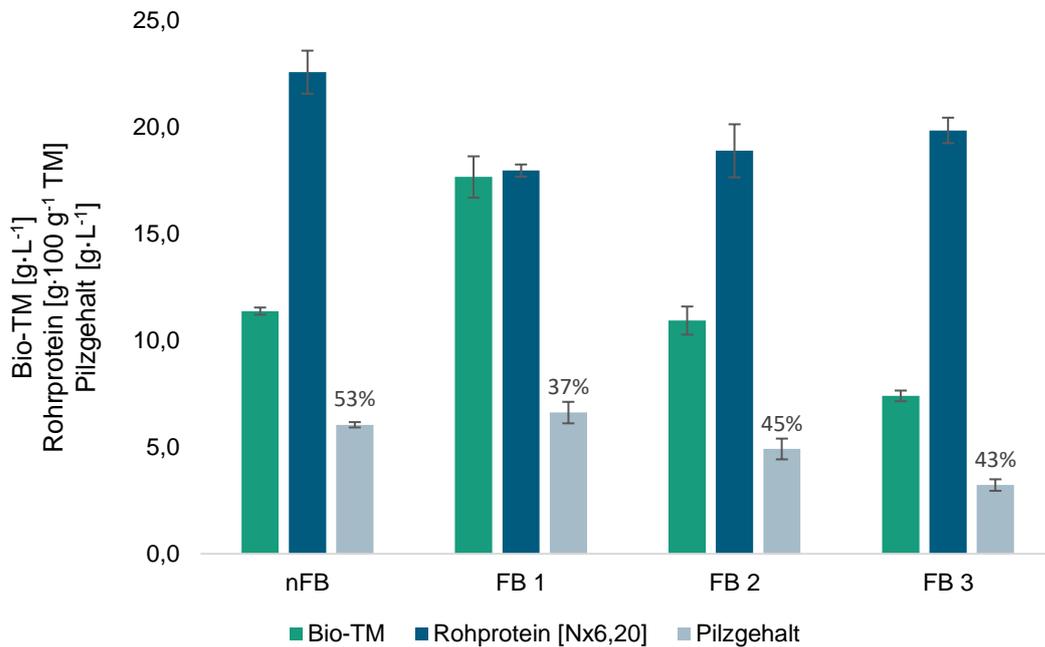


Abbildung 18: Ergebnisse der Fed-Batch-Kultivierung verglichen mit einem non-Fed-Batch Ansatz für den Pilz PSS auf CPH-Medium; %-Angabe bezieht sich auf prozentualen Anteil des Pilzes an der Bio-Trockenmasse (n=2).

3.3.4.3 Wachstumsreihen und Erntetag von FPI und PSS auf CPH-Medium

Um den Verlauf des Wachstums auf dem CPH-Medium abzubilden und den optimalen Erntezeitpunkt zu bestimmen, wurden Wachstumskurven der beiden Pilze aufgenommen. Dabei wurden verschiedene Erntezeitpunkte gewählt und die Fermentate auf ihre Bio-Trockenmasse, den Rohproteingehalt und den Pilzgehalt hin untersucht.

Für den Pilz PSS wurden die Hauptkulturtag vier, sechs, acht, zehn und 14 als Erntetage untersucht. Die Wachstumskurve ließ erkennen, dass der prozentuale Pilzgehalt von Tag vier bis Tag acht auf 54% anstieg und anschließend langsam abfiel. Die Bio-Trockenmasse nahm ebenfalls zwischen Tag acht und Tag zehn leicht ab. Der Rohproteingehalt war mit $22,2 \pm 0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ bzw. $23,4 \pm 0,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ an den Hauptkulturtagen acht und zehn vergleichbar hoch (Abbildung 19). Wie in Abschnitt 3.3.3.1 beschrieben, kann über die Berechnung des Ergosterols pro Fermentationskolben bestimmt werden, bis zu welchem Fermentationstag Ergosterol gebildet wird. Für den Pilz PSS lag dieses Maximum auf CPH-Medium ebenfalls an Tag acht (Daten nicht dargestellt), weshalb die Quantifizierung der pilzlichen Biomasse über den Ergosterolgehalt in diesem Fall vorteilhaft ist.

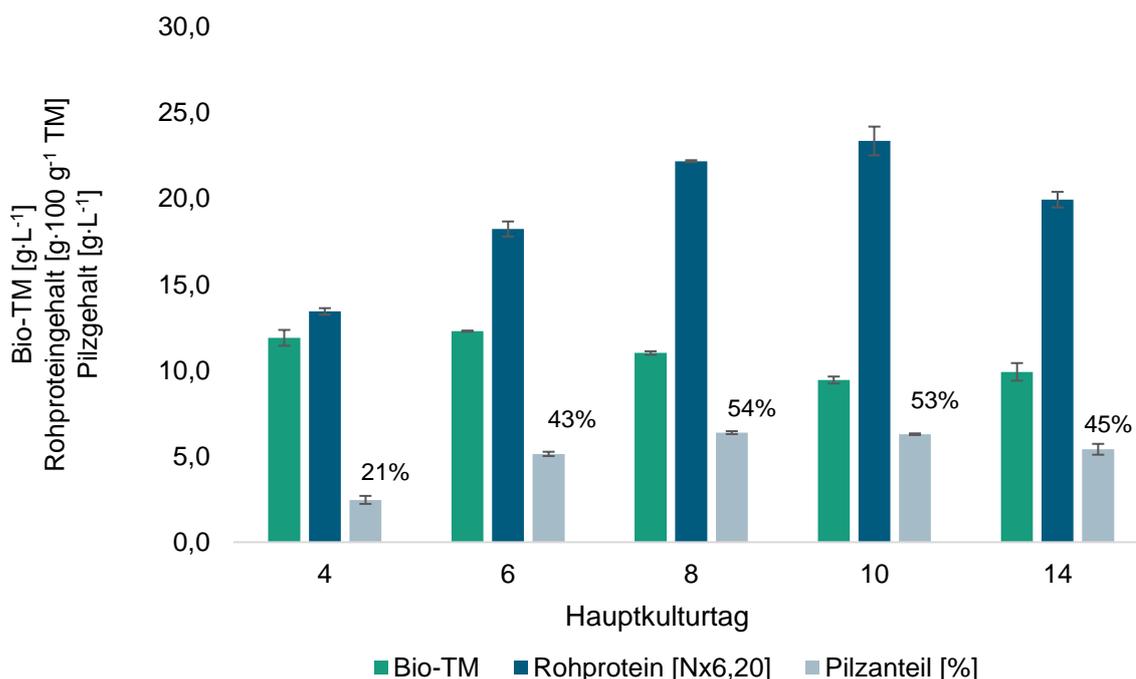


Abbildung 19: Wachstumsreihe von PSS auf CPH-Medium, aufgenommen an den Tagen 4, 6, 8, 10 und 14; %-Angabe bezieht sich auf prozentualen Anteil des Pilzes an der Bio-Trockenmasse ($n=2$).

Für den Pilz FPI wurde bereits an Hauptkulturtag zwei zum ersten Mal geerntet, da aus Vorversuchen bekannt war, dass das Maximum des Pilzwachstums relativ am Anfang der Fermentation liegt (Abbildung 20). Ebenso wie in den *Fed-Batch* Ansätzen zeigte sich auch über eine längere Kultivierungsdauer eine deutlich geringere Pilzausbeute für den Pilz FPI als für PSS. Den maximale Pilzgehalt von 17% hatte das Fermentat an Hauptkulturtag vier bei

einer Gesamtbiotrockenmasse von $11,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und einem Rohproteingehalt von $18,6 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$. Danach fielen sowohl der Rohprotein- als auch der Biotrockenmasse- und Pilzgehalt (Abbildung 20). Verglichen mit der Wachstumskurve auf ME-Medium zeigte der Pilz ein deutlich früheres Wachstumsmaximum an Tag vier gegenüber Tag acht. Aufgrund dieses Wachstumsunterschieds ist die Quantifizierung des Pilzgehaltes über den Ergosterolgehalt in diesem Fall stärker fehlerbehaftet als für den Pilz PSS.

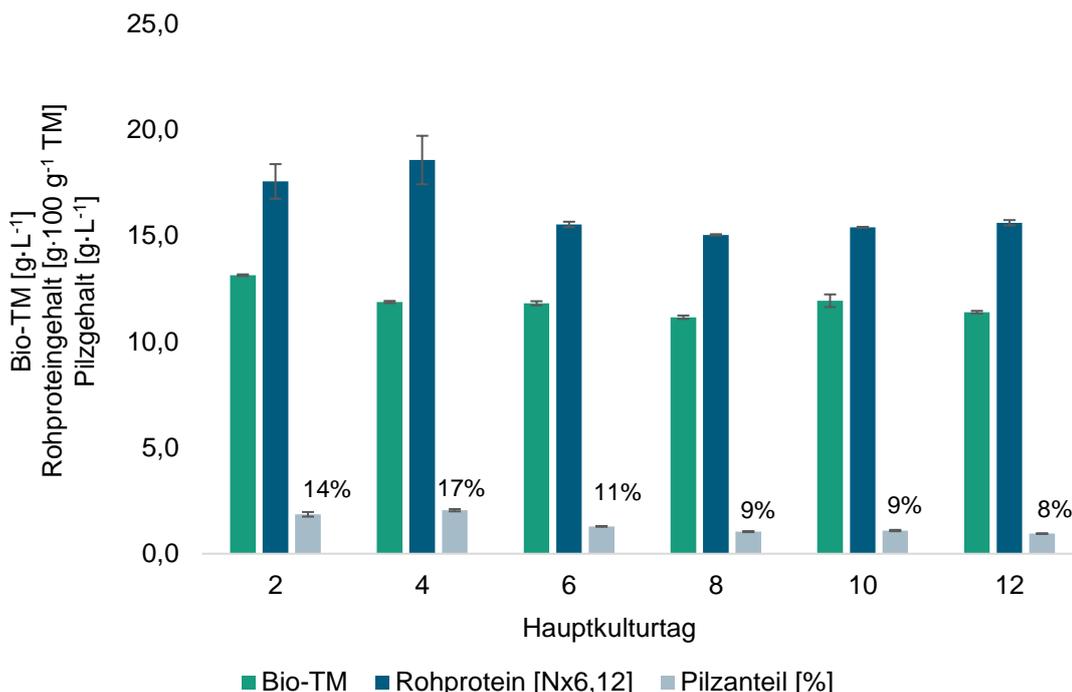


Abbildung 20: Wachstumsreihe von FPI auf CPH-Medium, aufgenommen an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12; %-Angabe bezieht sich auf prozentualen Anteil des Pilzes an der Bio-Trockenmasse ($n=2$).

3.3.5 Analytik der fermentierten Endprodukte (CPHF)

3.3.5.1 Chemische Zusammensetzung

Das FPI-Fermentat ($\text{CPHF}_{\text{FPI}}(\text{d4})$) wies nach Gefriertrocknung einen Restfeuchtegehalt von $7,88 \pm 1,86\%$, das PSS Fermentat ($\text{CPHF}_{\text{PSS}}(\text{d8})$) einen Restfeuchtegehalt von $8,46 \pm 0,25\%$ auf. Der Rohproteingehalt betrug $17,5 \pm 0,7 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ ($\text{CPHF}_{\text{FPI}}(\text{d4})$) bzw. $22,1 \pm 0,6 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ ($\text{CPHF}_{\text{PSS}}(\text{d8})$). Der Rohfettgehalt war vergleichbar gering, steigerte sich aber dennoch in beiden Fermentaten um über 100%. Der Rohaschegehalt sank von $9,9 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ in CPH auf $5,9 \pm 0,0 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ ($\text{CPHF}_{\text{FPI}}(\text{d4})$) bzw. auf $8,2 \pm 0,2 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ ($\text{CPHF}_{\text{PSS}}(\text{d8})$). Der Anteil an Ballaststoffen (inklusive Lignin und Chitin) stieg auf $75,5 \pm 0,4 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ ($\text{CPHF}_{\text{FPI}}(\text{d4})$) bzw. auf $67,2 \pm 0,5 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ ($\text{CPHF}_{\text{PSS}}(\text{d8})$) an. Beide Fermentate enthielten Chitin. Der Ligninanteil lag für $\text{CPHF}_{\text{FPI}}(\text{d4})$ bei $45,1 \pm 4,1 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ und für $\text{CPHF}_{\text{PSS}}(\text{d8})$ bei $43,3 \pm 0,5 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ (Abbildung 21). Die Summe

der hier gezeigten Komponenten ergibt 100,0% für CPHF_{FPI} (d4) und 98,77% für CPHF_{PSS} (d8).

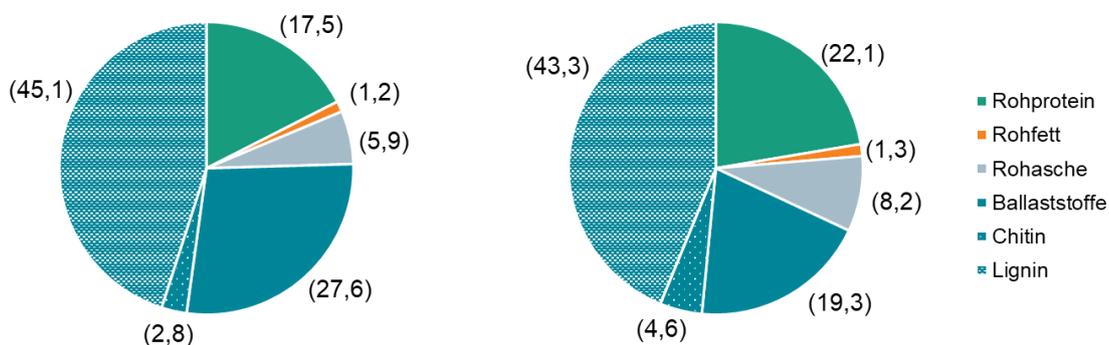


Abbildung 21: Chemische Zusammensetzung der Fermentate von CPHF_{FPI} (d4) (links) und CPHF_{PSS} (d8) (rechts); (Werte bezogen auf die Trockenmasse; n=3; Ballaststoffe n=2).

3.3.5.2 Aminosäureverteilung und biologische Wertigkeit

Die Aminosäureverteilung zeigt Unterschiede zwischen den beiden Fermentaten in Bezug auf Reinproteingehalt sowie biologische Wertigkeit und limitierende Aminosäuren. Tabelle 33 und Abbildung 22 zeigen, dass CPHF_{FPI} (d4) zwar niedrigere Aminosäuregehalte aufwies, allerdings entsprach der Anteil der jeweiligen essentiellen Aminosäuren besser dem Referenzprotein als bei CPHF_{PSS} (d8). Dies führte zu einer deutlich höheren biologischen Wertigkeit für CPHF_{FPI} (d4). Die erste limitierende Aminosäure in beiden Fermentaten war Tryptophan. Der Reinproteingehalt wich in beiden Fällen deutlich vom ermittelten Rohproteingehalt nach Kjeldahl ab (CPHF_{FPI} (d4): 17,5 gegenüber 10,6 g·100 g⁻¹ TM, CPHF_{PSS} (d8): 22,1 gegenüber 17,7 g·100 g⁻¹ TM).

Tabelle 33: Aminosäureverteilung der Fermentate CPHF_{FPI} (d4) und CPHF_{PSS} (d8) (n=3) und Gegenüberstellung zum Referenzprotein.

	Aminosäure [g·100 g ⁻¹ TM] (Anteil an Gesamtaminosäuren %)		Anteil an Gesamtaminosäuren %
	CPHF _{FPI} (d4)	CPHF _{PSS} (d8)	Referenzprotein (FAO/WHO 1973)
Alanin	0,794 ± 0,004 (6,4%)	1,278 ± 0,010 (6,2%)	-
Arginin	0,662 ± 0,010 (5,3%)	1,005 ± 0,047 (4,9%)	-
Asparaginsäure/ Asparagin	1,357 ± 0,001 (10,9%)	2,909 ± 0,145 (14,1%)	-
Cystein	0,174 ± 0,004 (1,4%)	0,296 ± 0,005 (1,4%)	-
Glutaminsäure/ Glutamin	1,480 ± 0,007 (11,9%)	3,816 ± 0,070 (18,5%)	-
Glycin	0,691 ± 0,004 (5,6%)	0,934 ± 0,040 (4,5%)	-
Histidin	0,635 ± 0,012 (5,1%)	1,418 ± 0,073 (6,9%)	-
Isoleucin	0,606 ± 0,007 (4,9%)	0,876 ± 0,047 (4,3%)	4,0%
Leucin	1,055 ± 0,001 (8,5%)	1,506 ± 0,073 (7,3%)	7,0%
Lysin	0,795 ± 0,008 (6,4%)	0,934 ± 0,045 (4,5%)	5,5%
Methionin	0,255 ± 0,011 (2,1%)	0,341 ± 0,006 (1,7%)	-
Phenylalanin	0,647 ± 0,010 (5,2%)	0,922 ± 0,046 (4,5%)	-
Prolin	0,469 ± 0,003 (3,8%)	0,782 ± 0,037 (3,8%)	-
Serin	0,789 ± 0,003 (6,4%)	1,068 ± 0,051 (5,2%)	-
Threonin	0,693 ± 0,002 (5,6%)	0,907 ± 0,045 (4,4%)	4,0%
Tryptophan	0,115 ± 0,008 (0,9%)	0,115 ± 0,007 (0,6%)	1,0%
Tyrsoin	0,361 ± 0,025 (2,9%)	0,340 ± 0,028 (1,7%)	-
Valin	0,835 ± 0,008 (6,7%)	1,132 ± 0,050 (5,5%)	5,0%
Cystein+Methionin	0,429 ± 0,015 (3,5%)	0,637 ± 0,013 (3,2%)	3,5%
Phenylalanin+Tyrosin	1,008 ± 0,035 (8,1%)	1,262 ± 0,090 (5,9%)	6%
Reinprotein (AA _{res})	10,621 ± 0,060	17,677 ± 0,749	-
BV	96 ± 1	86 ± 0	100
1. limitierende AS	Trp	Trp	-
2. limitierende AS	-	Lys	-
3. limitierende AS	-	Cys+Met	-

Zum Vergleich sind in Abbildung 23 und Tabelle 34 die Aminosäureverteilungen der Referenzmyzelien von ME_{FPI} (d4) und ME_{PSS} (d8) dargestellt. Während der Reinproteingehalt in beiden Fällen auf ME-Medium deutlich höher war als auf CPH-Medium, war die biologische Wertigkeit bei 136 FPI gleichbleibend hoch. Bei 177 PSS war die biologische Wertigkeit auf ME-Medium mit 75 deutlich niedriger als auf CPH-Medium. Anders als bei den Fermentaten war die erste limitierende Aminosäure die Summe aus Cystein und Methionin.

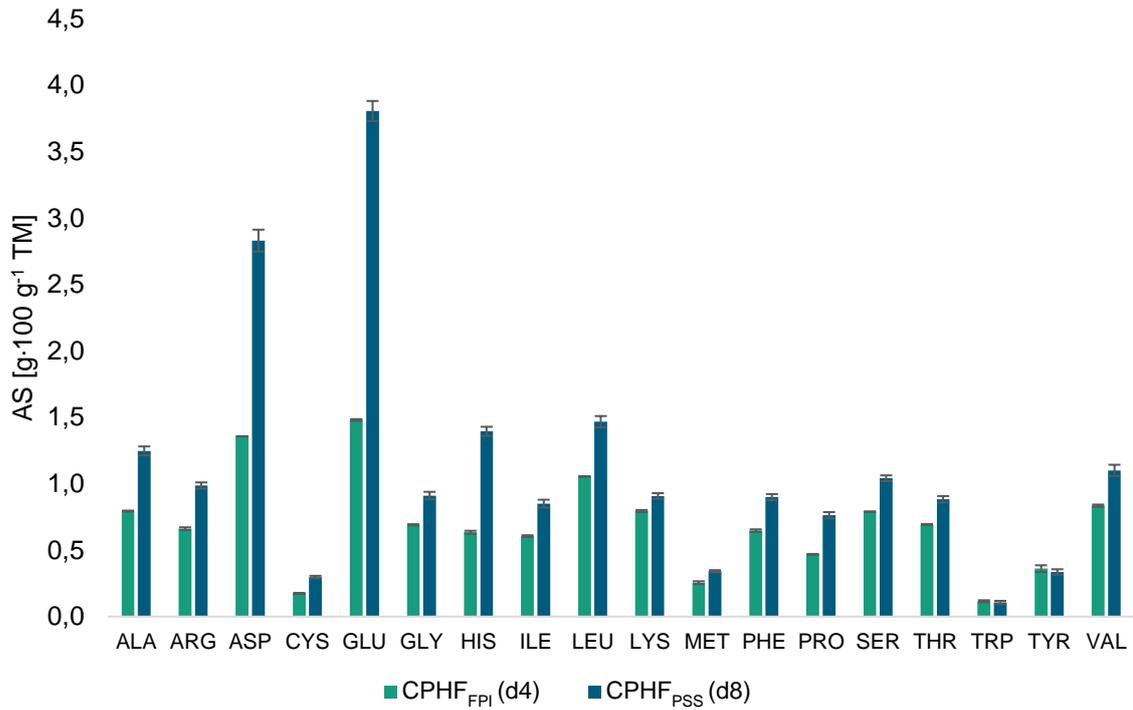


Abbildung 22: Aminosäureprofil der Fermentate CPHF_{FPI} (d4) und CPHF_{PSS} (d7) (Werte bezogen auf die Trockenmasse; n=3).

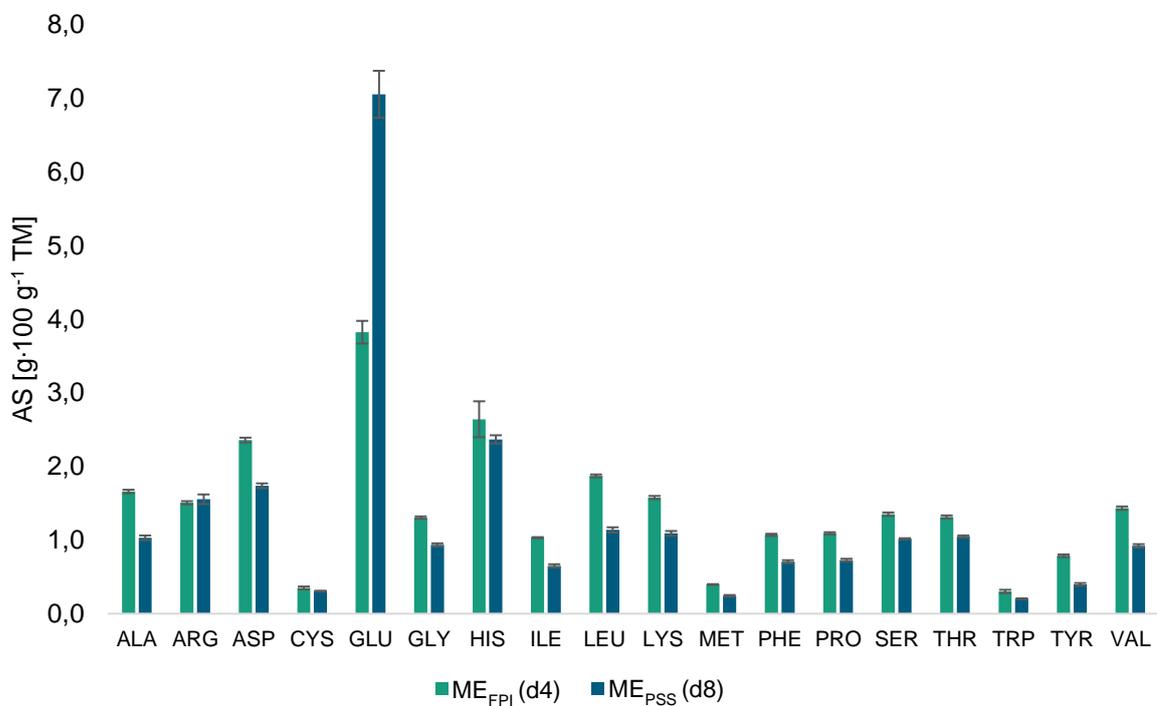


Abbildung 23: Aminosäureprofil der Myzelien ME_{FPI} (d4) und ME_{PSS} (d8) (Werte bezogen auf die Trockenmasse; n=3).

Tabelle 34: Aminosäureverteilung der Myzelien von 136 FPI und 177 PSS auf Malzextrakt-Medium (n=3).

Aminosäure [g·100 g⁻¹ TM]		
(Anteil an Gesamtaminosäuren %)		
	ME _{FPI} (d4)	ME _{PSS} (d8)
Alanin	1,660 ± 0,024 (6,4%)	1,031 ± 0,032 (4,5%)
Arginin	1,506 ± 0,022 (5,8%)	1,554 ± 0,066 (6,7%)
Asparaginsäure/ Asparagin	2,359 ± 0,032 (9,1%)	1,737 ± 0,033 (7,5%)
Cystein	0,349 ± 0,020 (1,4%)	0,307 ± 0,006 (1,3%)
Glutaminsäure/ Glutamin	3,824 ± 0,154 (14,8%)	7,054 ± 0,320 (30,5%)
Glycin	1,305 ± 0,016 (5,0%)	0,934 ± 0,022 (4,0%)
Histidin	2,614 ± 0,244 (10,2%)	2,367 ± 0,057 (10,2%)
Isoleucin	1,032 ± 0,008 (4,0%)	0,650 ± 0,022 (2,8%)
Leucin	1,872 ± 0,020 (7,2%)	1,138 ± 0,035 (4,9%)
Lysin	1,577 ± 0,023 (6,1%)	1,090 ± 0,033 (4,7%)
Methionin	0,396 ± 0,006 (1,5%)	0,242 ± 0,012 (1,0%)
Phenylalanin	1,072 ± 0,014 (4,1%)	0,706 ± 0,020 (3,1%)
Prolin	1,092 ± 0,015 (4,2%)	0,728 ± 0,018 (3,1%)
Serin	1,351 ± 0,025 (5,2%)	1,018 ± 0,007 (4,4%)
Threonin	1,314 ± 0,020 (5,1%)	1,049 ± 0,014 (4,5%)
Tryptophan	0,302 ± 0,023 (1,2%)	0,202 ± 0,005 (0,9%)
Tyrsoin	0,787 ± 0,018 (3,0%)	0,398 ± 0,019 (1,7%)
Valin	1,434 ± 0,023 (5,5%)	0,922 ± 0,023 (4,0%)
Cystein+Methionin	0,745 ± 0,026 (2,9%)	0,549 ± 0,017 (2,4%)
Phenylalanin+Tyrosin	1,008 ± 0,032 (7,2%)	1,104 ± 0,039 (4,8%)
Reinprotein (AA _{res})	22,237 ± 0,230	19,983 ± 0,196
BV	95 ± 1	75 ± 3
1. limitierende AS	Met+Cys	Met+Cys
2. limitierende AS	-	Ile
3. limitierende AS	-	Leu

3.3.5.3 Fettsäureverteilung

Die Untersuchung der Fettsäureverteilung ergab eine Änderung der Verteilung hin zu hohen Anteilen an Linolsäure durch beide Fermentationen. Die Anteile an Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure nahmen durch die Fermentation in beiden Fällen ab. Pentadecansäure wurde nur durch PSS gebildet (Tabelle 35). Das Fett der beiden Fermentate zeichnete sich durch eine geringere Menge an SFA's (*Saturated Fatty acids*) und MUFA's (*Mono Unsaturated Fatty acids*) und eine höhere Menge an PUFA's (*Poly Unsaturated Fatty acids*) aus.

Tabelle 35: Fettsäureverteilung von CPH sowie CPHF_{FPI} und CPHF_{PSS} (n=3).

Fettsäure	CPH [%]	CPHF _{FPI} (d4) [%]	CPHF _{PSS} (d8) [%]
C 15:0 (Pentadecansäure)	n.n.	n.n.	3,51 ± 0,95
C 16:0 (Palmitinsäure)	38,18 ± 2,08	26,45 ± 0,44	19,81 ± 0,90
C 16:1 (Z9) (Palmitoleinsäure)	0,49 ± 0,14	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,24
C 17:0 (Margarinsäure)	0,18 ± 0,31	0,77 ± 0,20	0,41 ± 0,10
C 18:0 (Stearinsäure)	16,59 ± 1,59	9,63 ± 1,75	4,72 ± 1,41
C 18:1 (Z9) (Ölsäure)	26,45 ± 0,83	16,42 ± 0,79	6,09 ± 1,75
C 18:1 (Z11) (Vaccensäure)	1,92 ± 0,15	1,05 ± 0,08	0,71 ± 0,31
C18:2 (Z9, Z12) (Linolsäure)	14,60 ± 0,90	44,64 ± 3,34	63,95 ± 4,91
C 18:3 (Z9, Z12, Z15) (α -Linolensäure)	0,89 ± 0,25	0,68 ± 0,16	0,22 ± 0,08
C 20:0 (Arachinsäure)	0,71 ± 0,24	0,29 ± 0,12	0,31 ± 0,06
Σ SFA	55,65	37,14	28,77
Σ MUFA	28,86	17,62	7,03
Σ PUFA	15,49	45,31	64,17

3.3.5.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CPH und CPHF

Mit Hilfe eines *Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)* wurden die Strukturen der Fermentate mit der der reinen CPH verglichen. Ebenfalls wurde die Strukturen der reinen Myzelien von FPI und PSS, kultiviert auf ME-Medium, untersucht. Die Oberflächenstruktur von CPH unterschied sich deutlich von der Struktur nach der Fermentation. Das reine PSS-Myzel zeigte Verbundstrukturen, die aus kleineren Partikeln bestanden, während die CPH-Partikel größer waren und eine einheitlichere Oberfläche aufwiesen (Abbildung 24). Die Ähnlichkeit von CPHF mit dem reinen PSS-Myzel ermöglichte den Nachweis von Pilzwachstum auf mikroskopischer Ebene.

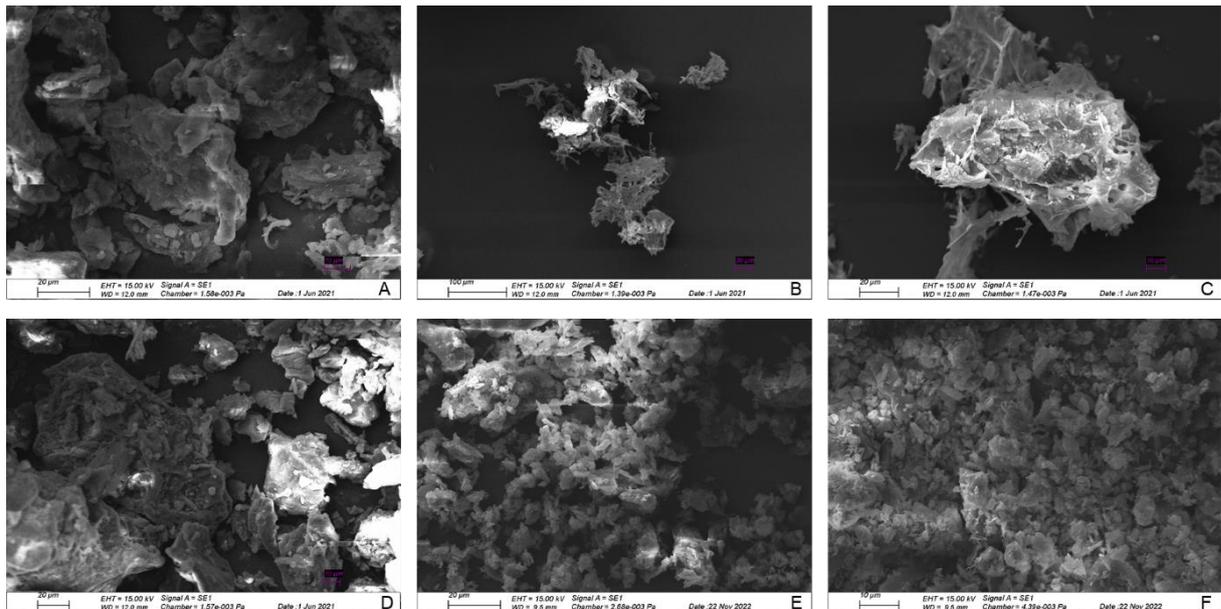


Abbildung 24: ESEM-Aufnahmen von CPH (A+D), ME_{FPI} (B), $CPHF_{FPI}$ (C), ME_{PSS} (E) und $CPHF_{PSS}$ (F).

3.3.5.5 Ligningehalt und Aktivität der am Ligninabbau beteiligten Enzyme

Aus 3.1 und 3.3.5.1 ist ersichtlich, dass es während der viertägigen Flüssigfermentation von FPI bzw. der siebentägigen Flüssigfermentation von PSS nicht zu einem Abbau von Lignin kam. Abbildung 25 zeigt den Ligningehalt der CPH sowie der beiden Fermentate im Vergleich. Während der Gesamt-Ligningehalt bezogen auf die Trockenmasse in den CPH der Sorte SUL 1 bei $27,4 \pm 0,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ lag, enthielt $CPHF_{FPI}$ (d4) $45,1 \pm 4,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ und $CPHF_{PSS}$ (d8) $43,3 \pm 0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ Lignin. Das Verhältnis von säureunlöslichem (AIL) zur säurelöslichem (ASL) Lignin lag bei CPH bei 4,8. Durch die Fermentation nahm es in beiden Fällen zu, für $CPHF_{FPI}$ (d4) lag es bei 5,9 und für $CPHF_{PSS}$ (d8) bei 10,7.

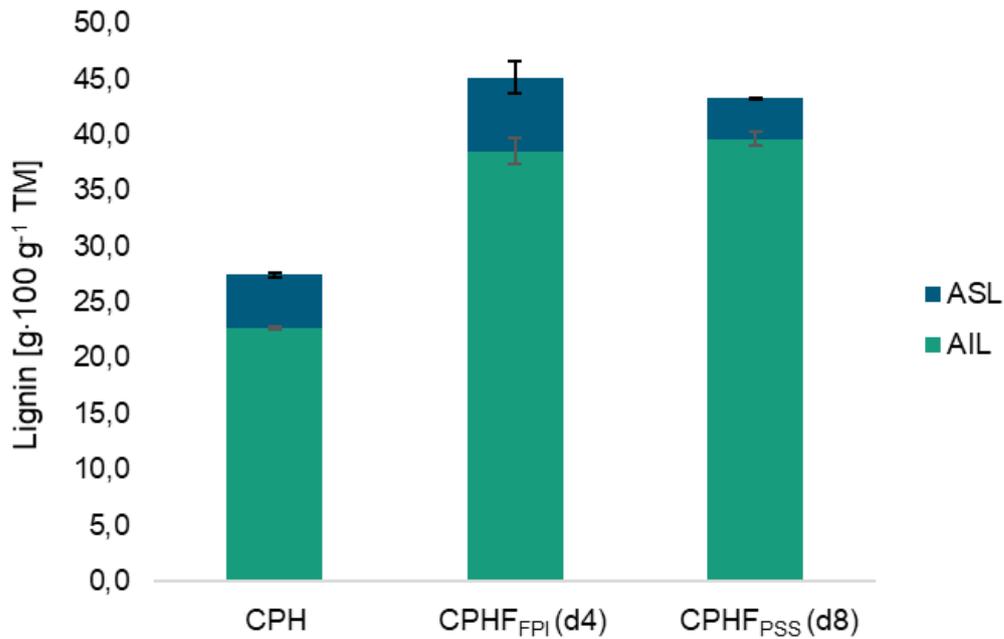


Abbildung 25: Gesamt-Ligningehalt von CPH sowie der beiden Fermentate 136 FPI und 177 PSS, aufgeteilt nach säureunlöslichem (AIL) und säurelöslichem (ASL) Lignin.

Betrachtet man den Ligningehalt absolut je Kolben (bezogen auf die Gesamt-Biotrockenmasse bzw. die Ausbeute der Fermentate und auf Einwaage der CPH in den Schüttelkolben) ergibt sich Abbildung 26. Dabei war eine geringe Abnahme des Gesamt-Lignins um 0,1 g für CPHF_{FPI} bzw. um 0,2 g für CPHF_{PSS} zu erkennen.

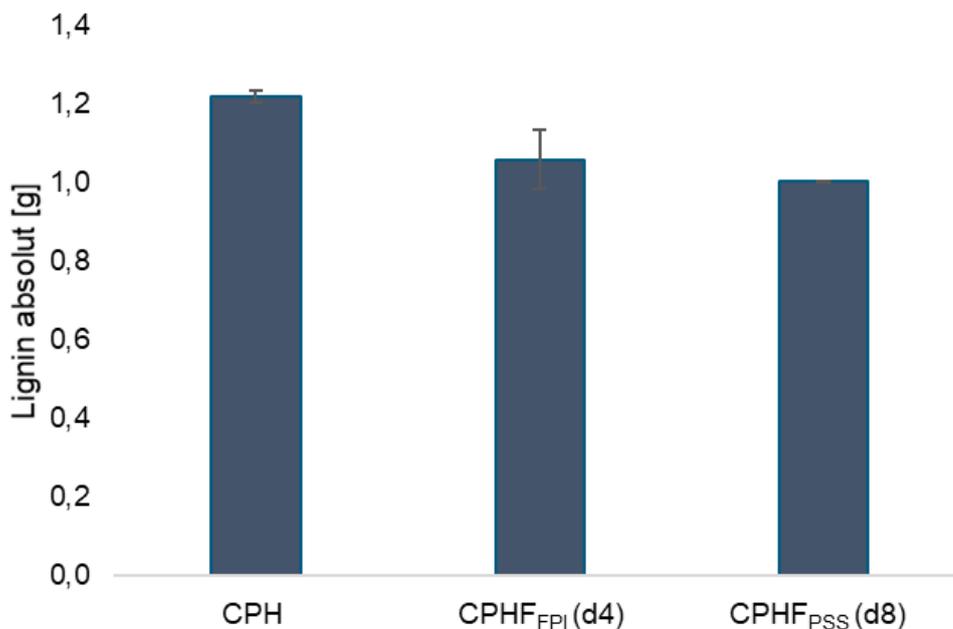


Abbildung 26: Gesamt-Ligningehalt von CPH sowie CPHF_{FPI} und CPHF_{PSS}, dargestellt als absolute Menge im Schüttelkolben (Fermentationsvolumen 200 mL).

Zusätzlich zur Bestimmung des Ligningehaltes wurde die Aktivität von am Ligninabbau beteiligten Enzymen über den Kultivierungszeitraum untersucht. Um die Substratabhängigkeit der Bildung der Enzyme zu untersuchen, wurden neben den beiden Kulturen auf CPH-Medium auch die Hauptkulturen auf ME-Medium untersucht. In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass sich die Enzymaktivität des MnP-Assays deutlich zwischen den verschiedenen Kulturen unterschied. FPI zeigte auf CPH-Medium keine Aktivität und auf ME-Medium lediglich an den Tagen fünf, sechs und sieben Aktivitäten von 42, 22 bzw. 6 U·L⁻¹. PSS zeigte auf CPH-Medium bis zu Tag fünf steigende Aktivitäten (max. 877 U·L⁻¹) und anschließend abfallende Aktivität, während die maximale Aktivität auf ME-Medium an Tag vier bei 19 U·L⁻¹ lag. Zugehörige Einzeldaten finden sich im Anhang in Tabelle 51. Eine mitgeführte Positivkontrolle zeigte eine Enzymaktivität von 11 ± 1 U·L⁻¹.

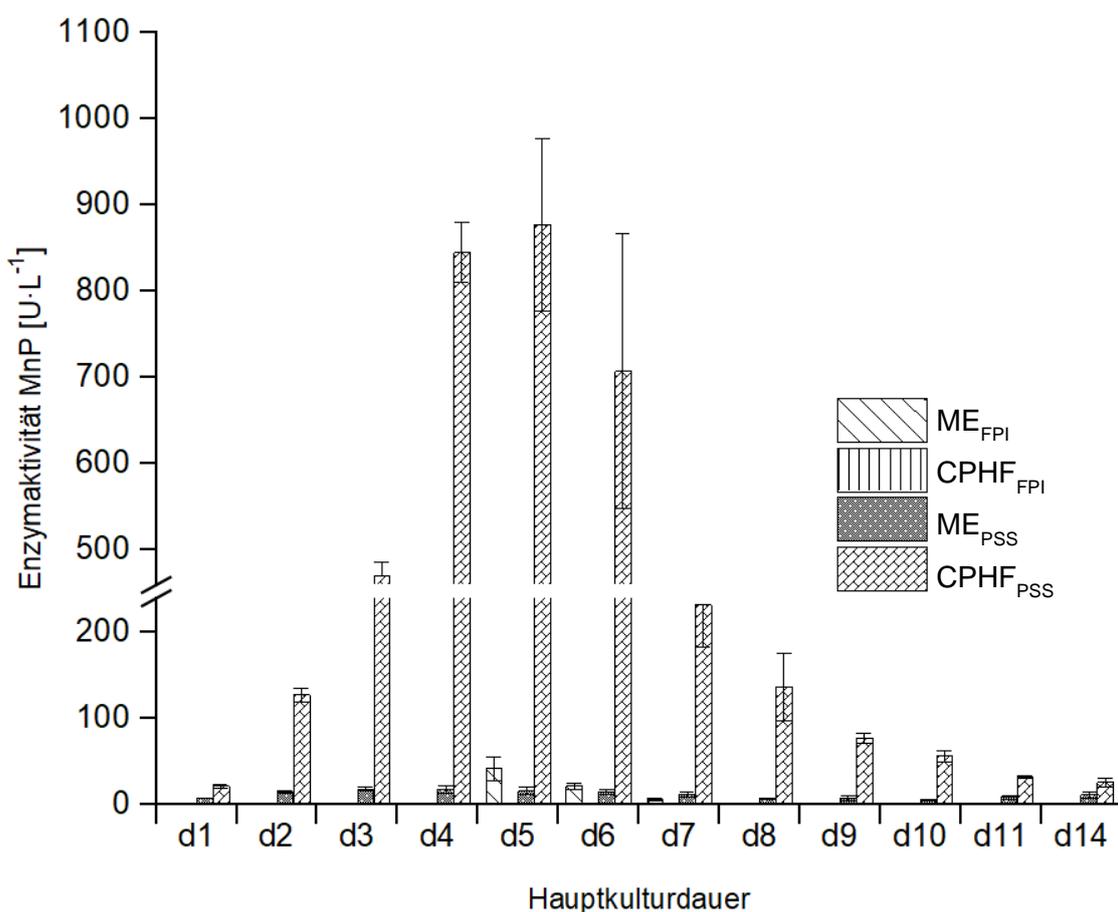


Abbildung 27: Manganperoxidase-Aktivität von FPI und PSS auf ME- und CPH-Medium (n=2).

Ligninperoxidase-Aktivität konnte lediglich für CPHF_{PSS} an den Hauptkulturtagen sieben und acht mit 26 bzw. 13 U·L⁻¹ gemessen werden. Eine mitgeführte Positivkontrolle zeigte eine Enzymaktivität von 27 ± 3 U·L⁻¹.

3.3.6 Upscaling

Der Fermentationsprozess wurde für PSS und FPI jeweils auf einen Maßstab von 4,5 L in einem Bioreaktor übertragen. Die Aufzeichnungen über Sauerstoff im Fermentationsmedium, pH-Wert, Luftzufuhr und Rührer Geschwindigkeit sind für FPI in Abbildung 28 und für PSS in Abbildung 29 dargestellt. Der Erntezeitpunkt wurde, angelehnt an die Vorversuche im Schüttelkolben (vgl. 3.3.4.3) unter Berücksichtigung des Sauerstoffverbrauchs des Pilzes sowie des pH-Werts, gewählt und lag für FPI an Tag vier (89 h) und für PSS an Tag sieben (168 h).

Der Pilz FPI verbrauchte in den ersten 39 h trotz schrittweiser Erhöhung der Luftzufuhr und der Rührer Geschwindigkeit den gesamten im Medium vorkommenden Sauerstoff und konnte erst anschließend wieder auf ein Niveau von 20 – 30% gebracht werden. Nach 46 h wurde die Luftzufuhr konstant auf $268 \text{ sL}\cdot\text{h}^{-1}$ gehalten. Die Rührergeschwindigkeit startete bei 50 rpm und wurde schrittweise erhöht. Nach 46 und 70 h wurde die Rührergeschwindigkeit für 5 min auf 500 rpm erhöht, um Medienreste von der Bioreaktorwand zurück ins Fermentationsmedium zu bringen. Die Erhöhung der Rührergeschwindigkeit ging mit dem Anstieg des Sauerstoffgehaltes einher, gefolgt von einem erneuten Abfall durch den Verbrauch des Pilzes. Der starke Anstieg der Sauerstoffkonzentration nach 72 h impliziert, dass der Pilz keinen weiteren Sauerstoff mehr verstoffwechseln kann. Der pH-Wert fiel über die Fermentationsdauer kontinuierlich, aber langsam von 4,55 auf 4,11 ab.

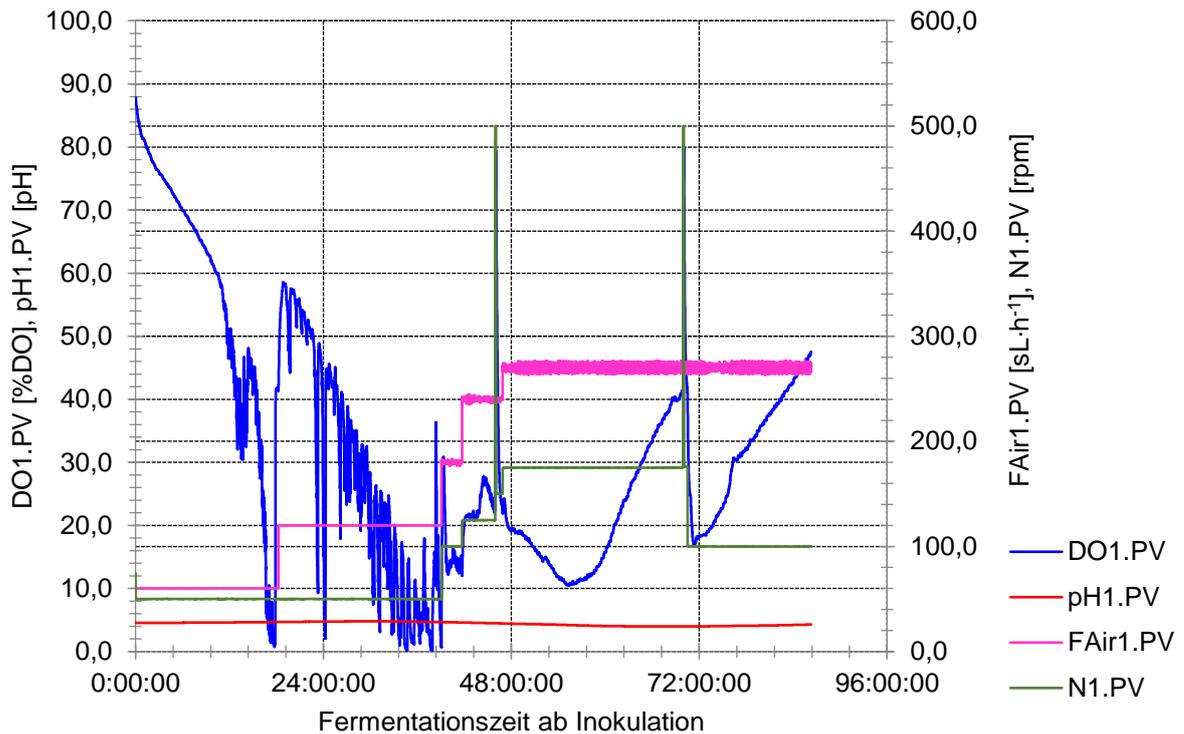


Abbildung 28: Sauerstoffgehalt (DO1), pH-Wert (pH1), Luftzufuhr (Fair1) und Rührergeschwindigkeit (N1) während der Fermentationsdauer von FPI in CPH-Medium im 5 L Bioreaktor.

Der Pilz PSS verbrauchte innerhalb der ersten 24 h ca. 60% des Sauerstoffs im Medium. Durch schrittweise Erhöhung der Luftzufuhr und der Rührergeschwindigkeit konnte der Sauerstoffgehalt anschließend zwischen 20 – 50% gehalten werden. Nach 160 h sank der Sauerstoffgehalt trotz Luftzufuhr von 600 sL·h⁻¹ und einer Rührergeschwindigkeit von 400 rpm auf unter 10% ab. Der pH-Wert stieg während der Fermentationsdauer kontinuierlich, aber langsam von 4,99 auf 7,75 an. Tabelle 36 zeigt die Bio-Trockenmasse sowie den prozentualen Pilzgehalt beider Fermentate. Diese waren für PSS mit den Fermentaten aus Schüttelkolben vergleichbar, für FPI fielen sie deutlich geringer aus.

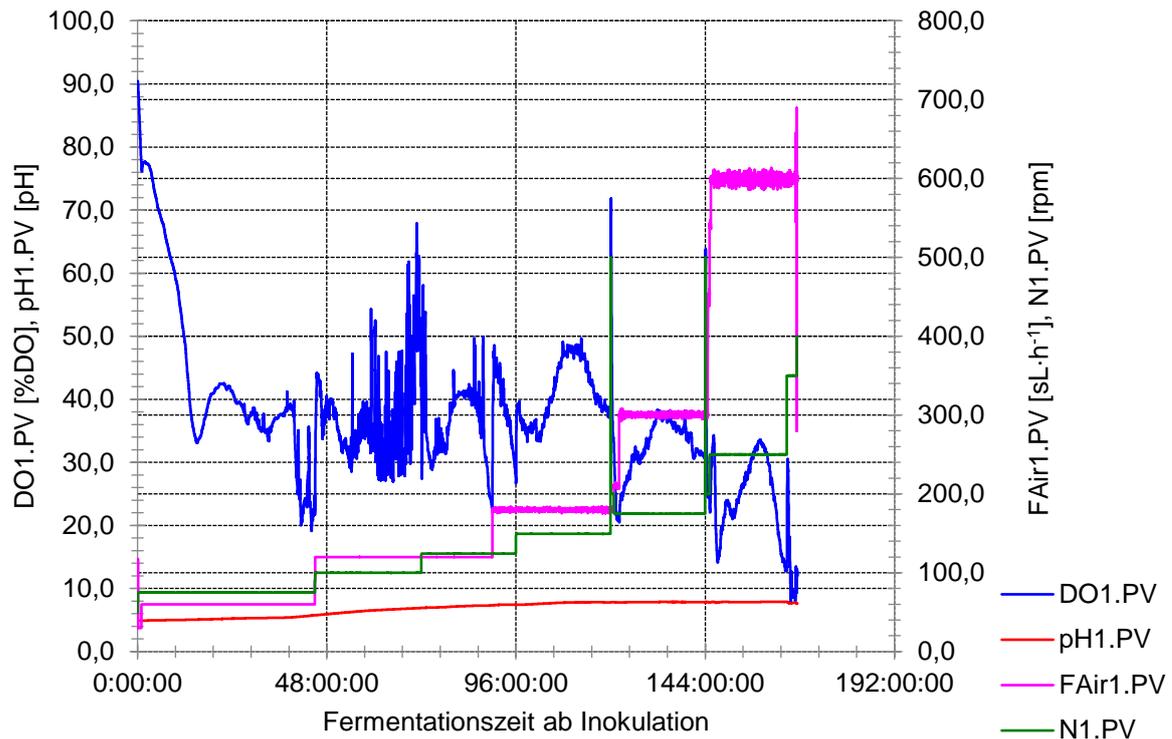


Abbildung 29: Sauerstoffgehalt (DO1), pH-Wert (pH1), Luftzufuhr (Fair1) und Rührergeschwindigkeit (N1) während der Fermentationsdauer von PSS in CPH-Medium im 5 L Bioreaktor.

Tabelle 36: Bio-Trockenmasse sowie Pilzanteil der Fermentate CPH_{FPI} und CPH_{PSS} aus dem 5 L Bioreaktor.

	CPHF _{FPI} , 5 L Bioreaktor	CPHF _{PSS} , 5 L Bioreaktor
Bio-TM [g·L ⁻¹]	5,0	10,8
Pilzanteil [%]	11 ± 1	48 ± 6

Die Fermentation durch PSS wurde weiterhin in einem 150 L Bioreaktor (Arbeitsvolumen 80 L) durchgeführt. In diesem Fall konnte aufgrund der apparativen Ausstattung die Sauerstoffkonzentration im Medium nicht mittels Sonde überwacht werden. Durch ein Verstopfen der Luftzufuhr durch CPH-Partikel kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie viel Luft ins Medium eingebracht wurde. Nach einer Fermentationszeit von 14 Tagen konnten 8,4 g·L⁻¹ Bio-Trockenmasse mit einem Rohproteingehalt von 15,4 g·100 g⁻¹ TM und einem Pilzanteil von 40% gewonnen werden.

3.4 Fermentation von Kakaopulpe (KP)

3.4.1 Sterilkontrolle der pasteurisierten Kakaopulpe

Bei der Sterilkontrolle der pasteurisierten Kakaopulpe konnten innerhalb von 48 h Inkubationszeit bei 37 °C keine Bakterien oder Pilze nachgewiesen werden (0 KBE-g⁻¹). Ausgehend von diesem Ergebnis wurde bei Flüssigkulturen auf ein vorheriges Autoklavieren der pasteurisierten Pulpe verzichtet.

3.4.2 Screening auf Agarplatten

Tabelle 37 zeigt die Ergebnisse des Screenings mit 20 Pilzen der Abteilung Basidiomycota. Dargestellt sind jeweils die Tage mit dem ansprechendsten Geruchseindruck. In diesem Screening fielen die vier Schwefelporlinge *Laetiporus sulfureus* (LSU), *Laetiporus portentosus* (LPO), *Laetiporus persicinus* (LPER) und *Laetiporus montanus* (LMO) positiv durch ihr tropisch-fruchtiges Aroma mit Kokos-, Maracuja- und Pfirsichnoten auf. Im Gegensatz dazu zeigten sich auf ME-Platten als Referenz eher würzige, fleischige Geruchsnoten, was für eine substratabhängige Aromaausbildung auf Kakaopulpe sprach. Diese Pilze wurden daher für weitere Untersuchungen verwendet.

Tabelle 37: Geruchseindrücke im Plattenscreening auf Kakaopulpeagar (KPA) und Malzextraktagar (MEA) am jeweils ansprechendsten Tag, sowie das Gesamturteil U und die Intensität des Geruchs I; ++: sehr intensiv bzw. sehr gut, +: intensiv bzw. gut, 0: mittel bzw. neutral, -: schwach bzw. schlecht und - -: sehr schwach bzw. sehr schlecht; (n=2).

Pilz	Tage [d]	Geruch KPA	U	I	Geruch MEA	U	I
5-PSA	8	bittermandelartig, süßlich, leicht pilzig	++	0	bittermandelartig, pilzig	0	0
9-WCO-C	2	fruchtig, blumig, beerig, Walderdbeere	++	++	malzig	0	0
16-LED	10	süßlich, blumig	+	0	leicht pilzig, würzig	0	--
24-LSU	4	tropisch-fruchtig, süßlich, säuerlich	++	+	würzig, malzig	0	0
100-PER	16	süßlich, fruchtig, frisch	+	+	neutral	0	--
111-ICO	6	pilzig, süßlich	0	0	pilzig, waldig, erdig	--	0
113-PNA	8	frisch, fruchtig	0	0	modrig, süßlich	--	0
114-PCI	18	süßlich, fruchtig, frisch	+	0	feucht, modrig, stechend	--	++
136-FPI	4	fruchtig, leicht pilzig	+	0	erdig, Waldboden, pilzig	0	0
160-FVE-D	18	blumig, süßlich, ätherisch, krautig	+	0	stechend, krautig, erdig, modrig	--	++
177-PSS	8	frisch, süßlich	+	-	bittermandelartig	++	--

Pilz	Tage [d]	Geruch KPA	U	I	Geruch MEA	U	I
200-AXA	4	fruchtig, säuerlich, süßlich	++	++	malzig	0	0
201-PBE	4	fruchtig, frisch, süßlich	++	++	malzig	0	0
223-PPI	12	Apfel, süßlich, säuerlich, fruchtig	++	+	süßlich, säuerlich, alkoholisch	++	++
310-PCA	18	stark süßlich, fruchtig	++	++	Stallgeruch, ekelerregend	--	++
330-POS	4	süßlich, fruchtig, blumig	++	++	Blank	0	0
345-SRU	14	süßlich, fruchtig, künstlich-parfumartig	++	++	süßlich, künstlich- parfumartig, Apfel, säuerlich, stechend	++	++
497-LPO	16	tropisch-fruchtig, Kokos, süßlich, Pfirsich	++	++	stark würzig, fleischig	0	++
498-LPER	4	tropisch-fruchtig, Pfirsich, süßlich, Passionsfrucht	++	++	malzig	0	0
524-LMO	4	tropisch-fruchtig, Pfirsich, süßlich, Passionsfrucht	++	++	malzig	0	0

3.4.3 Screening der vier Schwefelporlinge in Submers-Kultur

Ebenso wie im Platten-Screening wurden Kulturen in KP-Medium mit Kulturen in ME-Medium verglichen. In diesem Screening wurden der Geruch und der Geschmack der Kultur über fünf Tage bzw. 120 h von zwei Personen beurteilt. Tabelle 38 zeigt die Ergebnisse für die Kultivierung in KP-Medium. Der Geruchs- und Geschmackseindruck der Kultivierung in ME-Medium war für alle vier Pilze malzig, süßlich, würzig und herb (vgl. Anhang Tabelle 53).

Tabelle 38: Olfaktorische Eindrücke (o) und gustatorische Eindrücke (g) der Kultivierung der vier Schwefelporlinge auf KP-Medium an den Kulturtagen 1-5; E= Eindruck, U= Gesamturteil, I= Intensität; (n=2).

		24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
		E	U	I	E	U	I	E	U	I	E	U	I	E	U	I
LSU	o	tropisch, fruchtig, Maracuja, Kokos, süß, säuerlich	+	0	tropisch, fruchtig, Maracuja, Pfirsich, säuerlich, herb	+	+	tropisch, fruchtig, Maracuja, säuerlich, Pfirsich, Kokos	+	-	fruchtig, vergoren, alt, dumpf, säuerlich	-	0	fruchtig, würzig, stechend	-	0
	g	süß, Pfirsich, fruchtig, leicht Kokos	+	+	tropisch, fruchtig, Mango, Maracuja, Pfirsich, Kokos, säuerlich, süß	+	+	sauer, adstringier- end, leicht tropisch- fruchtig	-	+	sehr sauer	-	+	sehr sauer	-	+
LPO	o	fruchtig, säuerlich, süßlich,	+	0	süß, säuerlich, leicht tropisch, fruchtig	+	+	süßlich, säuerlich, Citrus	0	0	Citrus, süßlich, säuerlich, fruchtig	0	-	säuerlich, fruchtig, würzig	0	-
	g	sauer, fruchtig	0	-	fruchtig, säuerlich, Citrus, blumig	0	0	Citrus, blumig, fruchtig, süß, künstlich, sauer	0	0	bitter, würzig, fruchtig	-	0	bitter, sauer, würzig, fruchtig	-	+
LPER	o	tropisch, fruchtig, Maracuja, süßlich, säuerlich	+	0	tropisch, fruchtig, Mango, Maracuja, süß, säuerlich	+	+	tropisch, fruchtig, Maracuja, säuerlich, Pfirsich	+	+	Maracuja, würzig, säuerlich, süßlich, tropisch, fruchtig	+	-	tropisch, fruchtig, süßlich, säuerlich, alt	0	-
	g	säuerlich, fruchtig	0	0	tropisch, fruchtig, Mango, Maracuja, Pfirsich, Kokos, süß	+	+	tropisch, fruchtig, säuerlich, Mango, Maracuja	+	+	sauer, süß, fruchtig, Pfirsich, Maracuja	+	0	sauer, Ananas, leicht bitter	0	+
LMO	o	säuerlich, fruchtig, süßlich	0	0	tropisch, fruchtig, säuerlich	+	+	fruchtig, säuerlich, stechend, tropisch	+	0	tropisch, fruchtig, süßlich, Urin-Note	-	0	würzig, leicht fruchtig, stechend	0	0
	g	sauer, leicht fruchtig	0	-	fruchtig, sauer, Citrus, leicht tropisch, süß	+	0	sauer, tropisch, fruchtig	+	+	sauer, dumpf, leicht tropisch, fruchtig	-	0	sauer, stechend, würzig	-	+

Beim Vergleich der vier Pilze zeigte sich das ansprechendste Aroma an Kultivierungstag zwei mit den Pilzen LSU und LPER. Der Geruch und der Geschmack wurden hier als tropisch, fruchtig, süßlich und säuerlich, und an Mango, Maracuja, Pfirsich und Kokos erinnert beschrieben. LPO und LMO hingegen wiesen diese speziellen Geruchs- und Geschmackseindrücke weniger intensiv auf. Es zeigte sich auch, dass ab Kultivierungstag drei teilweise negative Eindrücke wahrgenommen wurden, wie beispielsweise extreme Säure bei LSU und LMO, sowie würzige und stechende Eindrücke bei allen Laetiporen.

Um eine Auswahl eines Pilzes zu treffen, wurden der pH-Wert sowie die Oxalsäurekonzentration über die Zeit gemessen. Die Laetiporen zählen zu den Braunfäulepilzen, weshalb die Oxalsäurekonzentration überprüft wurde. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse für die Kultivierungstage eins bis vier. Der Oxalsäuregehalt des KP-Mediums betrug $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

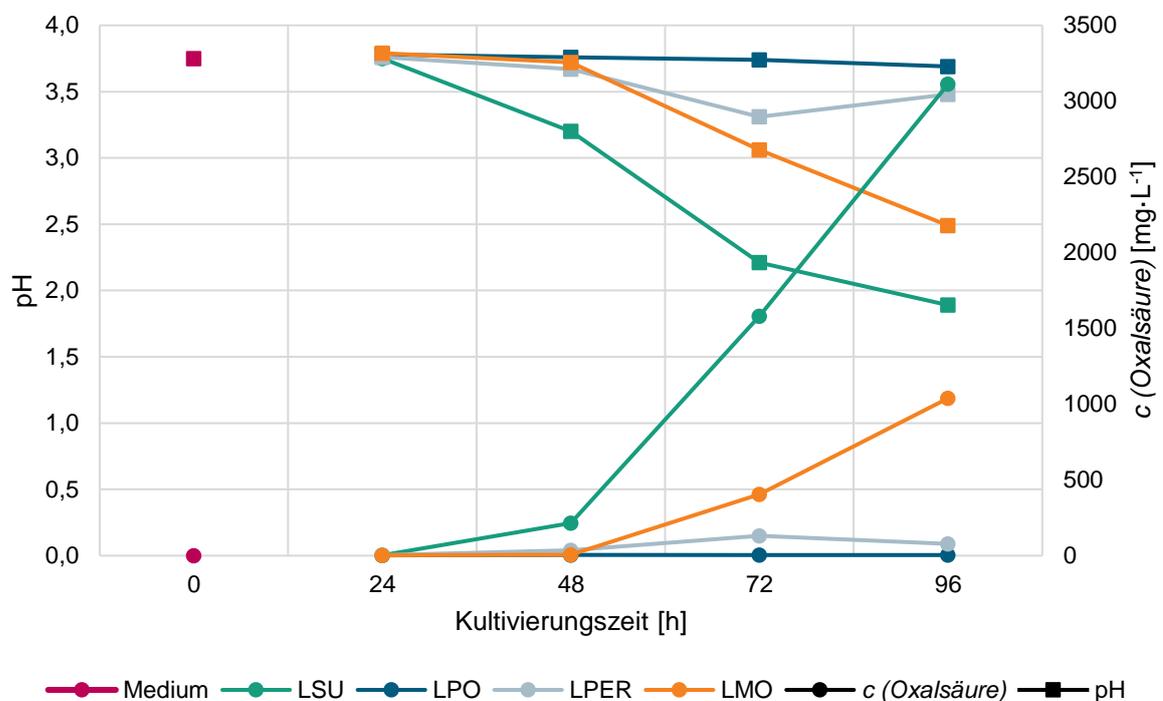


Abbildung 30: Verlauf des pH-Werts und der Oxalsäurekonzentration im Überstand nach Zentrifugation der Kultur von LSU, LPO, LPER und LMO für die ersten vier Kultivierungstage.

LSU verzeichnete den stärksten Anstieg an Oxalsäure im Vergleich zu den anderen Pilzen. Gleichzeitig war dies auch der Pilz mit dem deutlichsten Abfall des pH-Werts. Zwischen Kultivierungstag eins und vier fiel der pH-Wert von 3,75 auf 1,89, die Oxalsäurekonzentration an Tag vier betrug $3.111 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Eine ähnliche Tendenz zeigte LMO, dessen pH-Wert bis Tag vier auf 2,49 fiel. Die Oxalsäurekonzentration an Tag vier lag bei $1.038 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. LPO und LPER zeigten weder einen starken pH-Wert-Abfall, noch einen Anstieg der Oxalsäurekonzentration. Aus dem Screening ging hervor, dass das ansprechendste Aroma von LPER und LSU durch eine 48-stündige Fermentation generiert wurde. Die Oxalsäurekonzentration von LSU nach

48 h lag mit $213 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ deutlich höher als von LPER mit $37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Daher wurde LPER für die fermentative Herstellung eines Getränks aus Kakaopulpe gewählt (KP-Getränk).

3.4.4 Sensorische Beurteilung des KP-Getränks im Panel nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h

Aus dem ersten Screening ging hervor, dass LPER nach 48 h das ansprechendste Aroma generierte. Um zusätzliche Fermentationszeiten zu untersuchen, wurden Proben nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h sensorisch auf Geruch und Geschmack in einem Panel von 10 Personen beschrieben. Abbildung 31 zeigt die Geruchseindrücke, Abbildung 32 die Geschmackseindrücke.

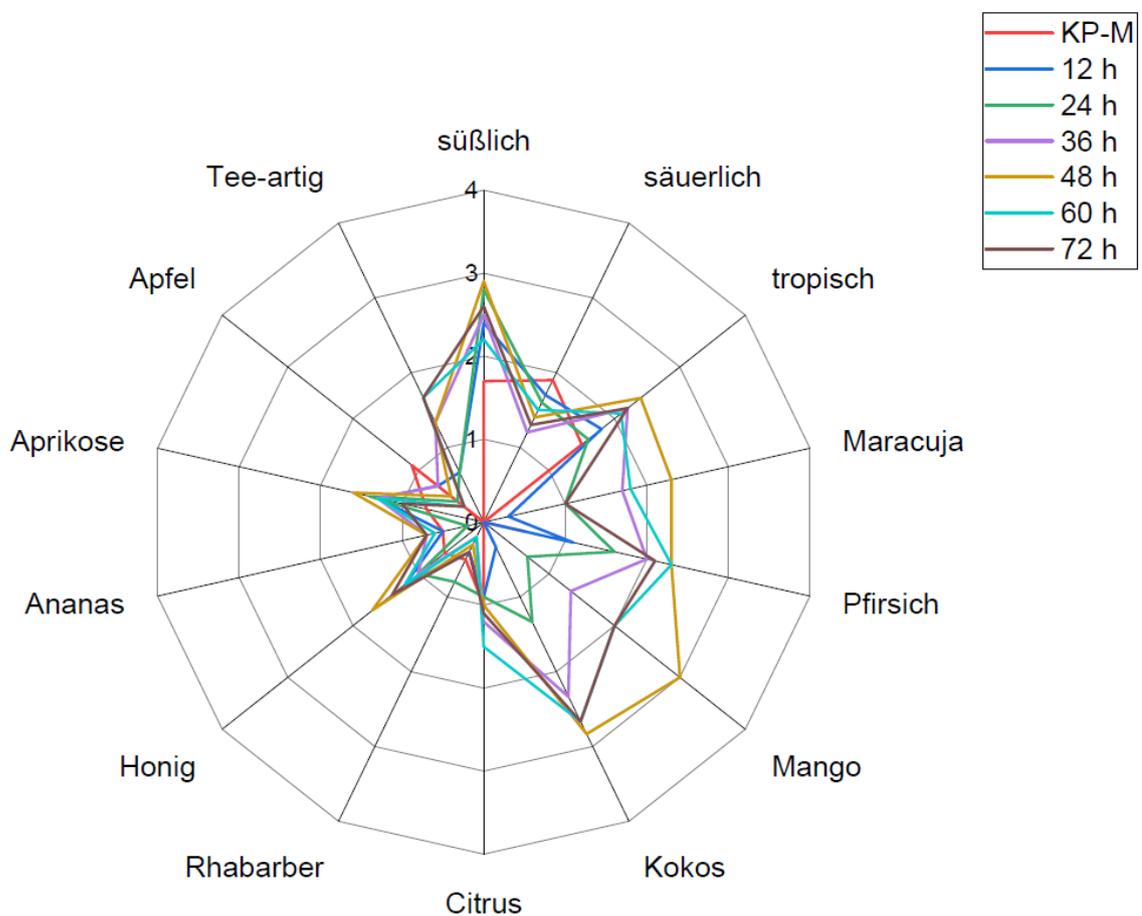


Abbildung 31: Graphische Darstellung der bewerteten Intensität der Geruchseindrücke für das KP-Medium und das KP-Getränk nach 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h; 0: nicht erkennbar, 5: sehr stark erkennbar.

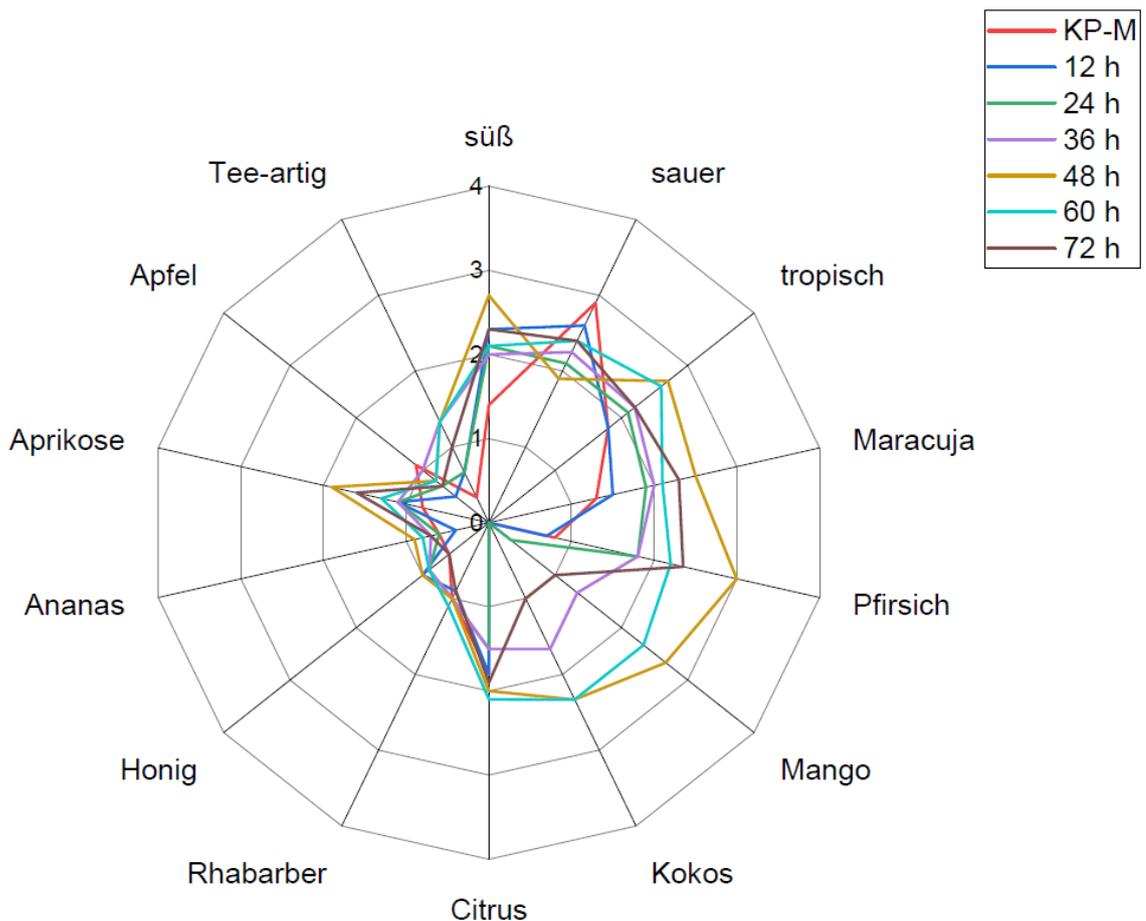


Abbildung 32: Graphische Darstellung der bewerteten Intensität der Geschmackseindrücke für das KP-Medium und das KP-Getränk nach 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h; 0: nicht erkennbar, 5: sehr stark erkennbar.

Sowohl im Geruch als auch im Geschmack wird deutlich, dass die tropisch-fruchtigen Noten wie „Pfirsich“, „Mango“, „Kokos“ und „Maracuja“ nach 48-stündiger Fermentation am stärksten ausgeprägt waren. Der saure Geschmackseindruck war im KP-Medium am stärksten ausgeprägt und nahm durch die Fermentation ab, der süße Geschmackseindruck hingegen war nach 48-stündiger Fermentation am intensivsten. Zusätzlich wurde die allgemeine Präferenz für Geruch und Geschmack bewertet (vgl. Abbildung 33). Die Bewertung des Geruchs steigerte sich durch die 48-stündige Fermentation von 2,9 auf 3,7 von möglichen 5,0 Punkten. Die Bewertung des Geschmacks steigerte sich von 2,1 auf 4,2 von 5,0 möglichen Punkten.

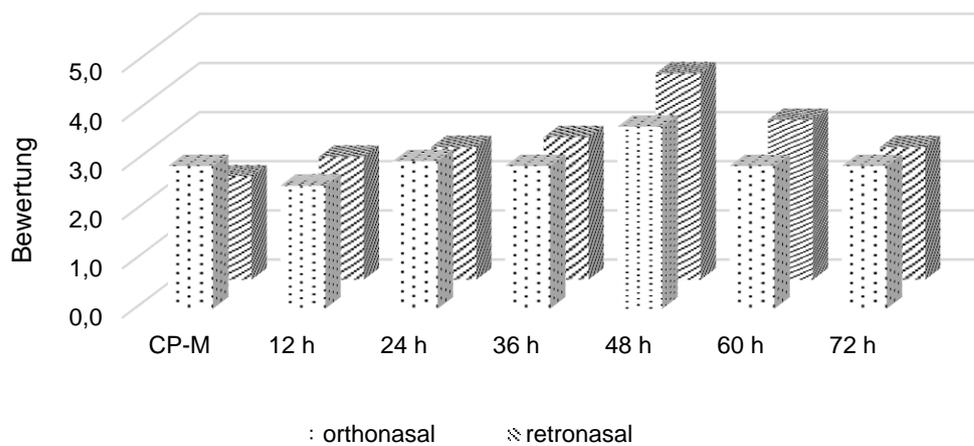


Abbildung 33: Bewertung des Geruchs (orthonasal) und des Geschmacks (retronasal) des KP-Getränks im Panel über einen Zeitraum von 72 h; 0 = nicht ansprechend, 5 = sehr ansprechend.

3.4.5 Optimierungsversuch durch Carbonisierung des KP-Getränks

Um zu untersuchen, wie eine Carbonisierung des Getränks sich auf dessen Sensorikprofil und auf die Akzeptanz auswirkt, wurde das carbonisierte Getränk in einem sensorischen Panel gegen das nicht carbonisierte Getränk untersucht (Abbildung 34 und Abbildung 35). Sowohl in den Attributen „tropisch“, „Maracuja“, „Pfirsich“, „Mango“, „Kokos“ und „Aprikose“ als auch in der allgemeinen Präferenz verlor das carbonisierte Getränk an Punktwerten. Im Geschmack wurde es als saurer bewertet. Die Gesamtpräferenz fiel durch das Carbonisieren auf 3,0 von 5,0 möglichen Punkten.

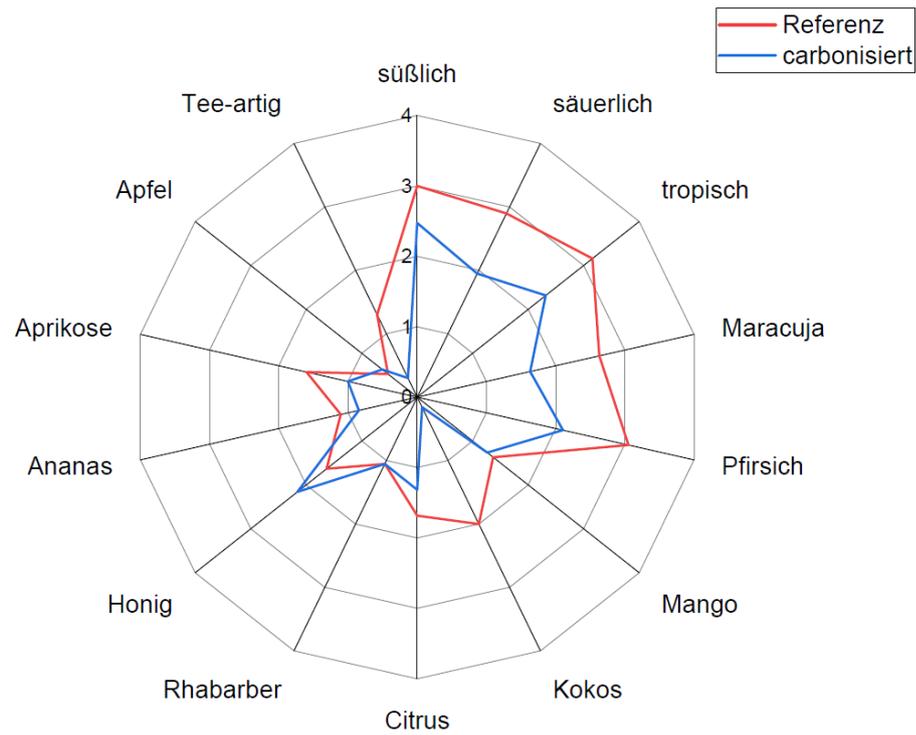


Abbildung 34: Graphische Darstellung der bewerteten Intensität der Geruchseindrücke für das KP-Getränk nach 48-stündiger Fermentation (Referenz) sowie für das carbonisierte Getränk (n=20).

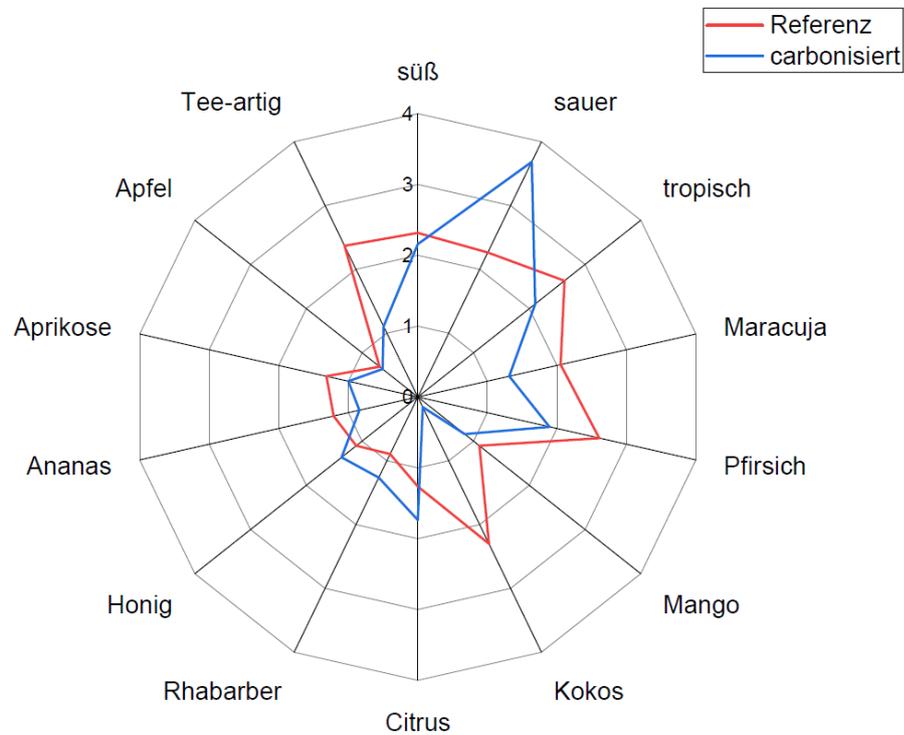


Abbildung 35: Graphische Darstellung der bewerteten Intensität der Geschmackseindrücke für das KP-Getränk nach 48-stündiger Fermentation (Referenz) sowie für das carbonisierte Getränk (n=20).

3.4.6 Analytische Untersuchung des KP-Mediums und des KP-Getränks

Das Kakaopulpe-Medium sowie das fermentierte Kakaopulpe-Getränk wurden auf ihre organischen Säuren sowie den Zuckergehalt untersucht. Der Gehalt an den organischen Säuren Citronensäure, Milchsäure, Essigsäure und Äpfelsäure sank durch die Fermentation unterschiedlich stark ab. Weinsäure konnte in beiden Proben nicht nachgewiesen werden. Die Oxalsäurekonzentration stieg auf $37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ an (vgl. 3.4.3). Der Gesamtzuckergehalt sank von $14,5$ auf $13,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, wobei der Wert für Glucose abnahm, während der Wert für Fructose konstant blieb (Tabelle 39).

Tabelle 39: Organische Säuren, Zuckergehalt sowie pH-Wert des Kakaopulpe-Mediums und des Kakaopulpe-Getränks.

		CKP-Medium	CKP-Getränk
Organische Säuren	Citronensäure [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	$1,29 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,01$
	Milchsäure [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	$12,1 \pm 0,5$	n.n.
	Weinsäure [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	n.n.	n.n.
	Essigsäure [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	$415,9 \pm 25,2$	$318,3 \pm 41,2$
	Äpfelsäure [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	$78,7 \pm 3,0$	n.n.
	Oxalsäure [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	$0,8 \pm 0,3$	$36,7 \pm 0,3$
Zucker	Glucose [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	$8,1 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$
	Fructose [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	$6,4 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,1$
	Summe [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	$14,5 \pm 0,1$	$13,4 \pm 0,1$

3.4.7 Aromanalytische Untersuchungen des Kakaopulpe-Mediums

Das Kakaopulpe-Medium wurde mittels SBSE und I/I-Extraktion mit anschließender SAFE auf seine Aromastoffe untersucht (Tabelle 40). Insgesamt wurden 38 aromaaktive Substanzen im KP-Medium nachgewiesen. 2-Heptanon, 2-Methyl-1-butanol, 6-Methyl-5-hepten-2-on, 1-Hexanol, α -Terpineol, Hexansäure, γ -Nonalacton sowie Octansäure und Decansäure konnten olfaktometrisch nicht wahrgenommen werden. Durch beide Extraktionsmethoden zusammen wurden sechs Substanzen olfaktometrisch wahrgenommen, die nicht identifiziert werden konnten. Den nicht identifizierten Substanzen n.i. 1 und n.i. 3 konnten im Chromatogramm keine Peaks zugeordnet werden.

Tabelle 40: Übersicht der identifizierten und vorläufig identifizierten Substanzen im Kakaopulpe-Medium mit Geruchseindrücken und RI-Indices nach Van-Den-Dool und Kratz; n.i. = nicht identifiziert.

Substanz	Geruchseindruck	Geruchseindruck nach Literatur*	RI _{VF-Wax}	RI _{DB-5}	MS**
Ethylacetat	fruchtig	ätherisch, fruchtig, süßlich, Traube, Rum	877 ^a	-	+
2-Pentanon	fruchtig, süßlich	süßlich, fruchtig, Banane, ätherisch	972 ^a	<700 ^a	+
2-Methyl-3-buten-2-ol	fruchtig, grün	fruchtig, blumig	1036 ^a	<700 ^a	+
2-Pentylacetat	fruchtig, süßlich	Orange, grün, fruchtig, Banane, nussig	1071 ^b	850 ^b	+
1-Hexanal	süßlich, Karamell, frisch	frisch, grün, grasig, fruchtig, süßlich, fettig	1080 ^a	801 ^a	+
n.i. 1	grün, krautig, fruchtig	-	1103	-	-
2-Pentanol	krautig, organisches Lösungsmittel	alkoholisch, fermentiert, süßlich, Banane, ölig, Lösungsmittel	1121 ^a	709 ^a	+
2-Heptanon	-	fruchtig, würzig, süßlich, Kokos	1182 ^a	892 ^a	+
2-Methyl-1-butanol	-	ätherisch, fettig, grün, Whiskey	1216 ^a	735 ^a	+
2-Heptylacetat	fruchtig, blumig	Bockshornklee, fruchtig	1264 ^b	1039 ^b	+
n.i. 2	süßlich	-	1278	-	-
Acetoin	süßlich	süßlich, buttrig, sahnig, milchig, fettig	1279 ^a	720 ^a	+
1-Octanal	süßlich, citrus	Wachs-artig, Citrus, Orangenschale, frisch, fettig	1290 ^a	1005 ^a	+
1-Octen-3-on	pilzig	pilzig, muffig, dreckig, erdig	1303 ^a	976 ^{a,c}	+
2-Heptanol	süßlich, Kokos	süßlich, blumig, frisch, Citrus, Zitronengras	1320 ^a	903 ^a	+
6-Methyl-5-hepten-2-on	-	Citrus, grün, Zitronengras, Apfel	1339 ^a	986 ^a	+
1-Hexanol	-	ätherisch, fruchtig, süßlich, grün	1350 ^a	869 ^a	+
2-Nonanon	fruchtig, frisch, krautig	frisch, grün, fruchtig, käsiger, seifig, Kokos	1390 ^a	1092 ^a	+
1-Heptanol	fruchtig	fruchtig, Apfel, Banane, muffig, scharf	1455 ^a	972 ^a	+
Linalool-oxid-furanoid (Gemisch)	süßlich, blumig	blumig, grün, erdig, würzig	1443 ^{a/} 1471 ^a	1074 ^{a/} 1089 ^a	+

Substanz	Geruchseindruck	Geruchseindruck nach Literatur*	RI _{VF-Wax}	RI _{DB-5}	MS**
Essigsäure	Essig	stechend, säuerlich, Essig	1450 ^a	<700 ^a	+
Linalool	süßlich, blumig, Citrus	Citrus, blumig, süßlich, Rose, Blaubeere	1548 ^a	1101 ^a	+
1-Octanol	süßlich, blumig	Wachs-artig, grün, Orange, Rose, pilzig	1558 ^b	-	+
Acetophenon	süßlich, fruchtig	süßlich, Kirsche, Marzipan, Mandel, Vanille	1655 ^a	1070 ^a	+
Isovaleriansäure	muffig, käsig, Banane	säuerlich, schweißig, käsig, fruchtig, fettig	1681 ^a	842 ^a	+
α -Terpineol	Citrus, holzig	Pinie, holzig, Citrus, blumig, Terpen-artig	1698 ^a	1199 ^a	+
1-Phenylethylacetat	süßlich, fruchtig, säuerlich	Beere, fruchtig, grün	1704 ^a	1191 ^a	+
Ethylphenylacetat	süßlich, fruchtig, blumig	süßlich, blumig, Honig, Rose, Kakao	1789 ^a	1245 ^a	+
Hexansäure	-	säuerlich, fettig, schweißig, käsig	1857 ^a	-	+
Benzylalkohol	süßlich, Kokos	süßlich, blumig, fruchtig, chemisch	1868 ^a	1036 ^a	+
2-Phenylethanol	süßlich, Rose, fruchtig, erfrischend, Kokos	blumig, Rose, süßlich, Honig, frisch	1901 ^a	1116 ^a	+
γ -Nonalacton	Kokos	fettig, Kokos	2039 ^a	1361 ^a	+
Octansäure	-	fettig, Wachs-artig, ranzig, käsig	2069 ^b	1174 ^b	+
n.i. 3	fruchtig, tropisch	-	2278	-	-
Decansäure	-	ranzig, fettig, unangenehm, Citrus	2281 ^a	1370 ^a	+
n.i. 4	fruchtig, säuerlich	-	2452	-	-
n.i. 5	süßlich	-	2461	-	-
n.i. 6	fruchtig, Pulpe	-	2882	-	-

* (TGSC 2023)

** die Massenspektren auf VF-Wax sind dem Anhang unter 6.7 angefügt

^a Identifiziert durch authentischen Standard

^b Identifiziert durch Abgleich mit Literaturdaten (NIST Chemistry WebBook 2022)

^c Identifiziert anhand des Geruchs zu gegebenem RI

3.4.8 Aromaanalytische Untersuchungen des Kakaopulpe-Getränks

Zur Aufklärung des durch die Fermentation gebildeten Aromas und die Gewichtung einzelner Aromastoffe für das Gesamtaroma wurden gaschromatographische Untersuchungen mit massenspektrometrischer Detektion durchgeführt. Dabei wurden aromaaktive Verbindungen zusätzlich mittels Olfaktometrie-Detektor-Port (ODP) detektiert. Es wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden geprüft. Beim Vergleich einer 30-minütige *stir bar sorptive extraction* (SBSE) bei Raumtemperatur (*head space (hs)* sowie *direct immersion (di)*) und einer klassischen flüssig-flüssig-Extraktion mit PD (Pentan/ Diethylether (1/1,12) (v/v)) mit anschließender *solvent assisted flavor evaporation* (SAFE) konnten mehr aromaaktive Substanzen mittels SBSE wahrgenommen werden. Daher wurde eine Aromaverdünnungsanalyse (ADA) mittels *di*-SBSE durchgeführt und die identifizierbaren Aromastoffe mit den höchsten *Flavor-Dilution*-Faktoren (FD-Faktoren) quantifiziert.

3.4.8.1 Aromaverdünnungsanalyse (ADA)

In der Aromaverdünnungsanalyse wurden insgesamt 37 Substanzen olfaktometrisch wahrgenommen. Von diesen in Tabelle 41 aufgeführten Stoffen konnten die Substanzen S01, S03, S04, S06, S07, S11 sowie S15 ebenfalls im nicht fermentierten KP-Medium nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden nach der Fermentation die aromaaktiven Substanzen Acetophenon, Linalooloxid-furanoid (Isomerengemisch), Hexadecansäure, Octadecansäure, Limonen, 2-Heptanon und Essigsäure-2-pentylester vorläufig identifiziert, aber olfaktometrisch nicht wahrgenommen. Abbildung 36 zeigt das zugehörige Chromatogramm auf VF-Wax-Säule mit Zuordnung der Peaks. (*R*)-Linalool zeigte den höchsten FD-Faktor (2.048), gefolgt von (*E*)-Nerolidol und 5-Butyl-2(5H)-furanon mit 1.024 und 2-Nonanon mit einem FD-Faktor von 512. Die Substanz S26 wies einen FD von 256 auf, konnte allerdings nicht identifiziert werden. Methylbenzoat und 2-Phenylethanol wiesen einen FD von 128 auf. Mit einem FD von 64 folgten mehrere Substanzen, die einen tropisch-fruchtigen Geruch nach Kokos und Pfirsich aufwiesen, allerdings ebenfalls nicht identifiziert werden konnten (S18, S21, S23 und S25). Diese konnten aufgrund ihrer Massenspektren der Gruppe der Sesquiterpenoide zugeordnet werden. Die statistische Auswertung zur Überprüfung der Linearität in der Verdünnungsanalyse ergab Bestimmtheitsmaße zwischen 0,9799 und 0,9921 (vgl. Anhang Abbildung 91).

Tabelle 41: Übersicht der olfaktometrisch wahrgenommenen Substanzen des KP-Getränks in der ADA mit FD-Faktoren, Geruchseindrücken und RI-Indices nach Van-Den-Dool und Kratz; n.i. = nicht identifiziert.

Substanznummer	Substanz	FD	Geruchseindruck	Geruchseindruck nach Literatur***	RI _{VF-WAX}	RI _{DB-5}	MS****
S01	2-Pentanon	32	krautig, grün, süßlich, blumig	süßlich, fruchtig, Banane, ätherisch, holzig	972 ^a	< 700 ^a	+
S02	2-Hexanon	32	krautig, grün	fruchtig, pilzig, buttrig	1079 ^b	-	-
S03	2-Pentanol	32	süßlich, blumig	alkoholisch, fermentiert, süßlich, Banane	1122 ^a	700 ^b	+
S04	2-Hexanol	32	grün, herb, fruchtig, Beere, würzig	fruchtig, Wein-artig, chemisch, fettig, Blumenkohl	1220 ^a	800 ^{a,c}	+
S05	n.i.	16	süßlich, krautig	-	1271	-	-
S06	Octanal	32	süßlich, blumig, Citrus	grün, Citrus, aldehydisch, Orangenschale, fettig	1290 ^a	1000 ^{a,c}	+
S07	1-Octen-3-on	32	pilzig	pilzig, muffig, würzig, erdig	1303 ^a	976 ^{a,c}	+
S08	2-Nonanon	512	fruchtig, modrig, krautig, würzig, käsig	grün, fruchtig, käsig, seifig, würzig, Kokos	1390 ^a	1097 ^a	+
S09	n.i.	16	fruchtig, blumig, Citrus, frisch, pilzig	-	1402	-	-
S10	(E)-2-Octental	32	herb, grün, schokoladig, erdig	würzig, grün, frisch, Gurke, wachsig, süßlich	1431 ^a	-	+
S11	1-Heptanol	8	fruchtig, Nagellack, würzig	fruchtig, Apfel, Banane, muffig, scharf	1455 ^a	972 ^{a,c}	+
S12	2-Acetylfuran	16	süßlich, Citrus, blumig	süßlich, Mandel, Karamell, Balsamico	1509 ^b	-	+
S13	(R)-Linalool*	2.048	süßlich, fruchtig, blumig, Citrus	Citrus, blumig, Rose, süßlich, Blaubeere	1548 ^a	1101 ^a	+

S14	Methylbenzoat	128	grün, krautig, süßlich, Popcorn	phenolisch, Mandel, blumig, Kirsche, Wintergrün	1626 ^a	1092	+
S15	1-Phenylethylacetat	64	Lavendel, blumig, fruchtig, tropisch	Beere, fruchtig, grün	1704 ^a	1191 ^a	+
S16	n.i.	16	süßlich, Popcorn, Kokos, fruchtig, Pfirsich	-	1720	-	-
S17	n.i.	64	grün, krautig, würzig	-	1750	-	-
S18	n.i. (Sesquiterpenoid)**	64	fruchtig, Kokos, süßlich, Maracuja, würzig	-	1803	1468	-
S19	n.i. (Sesquiterpenoid)	32	süßlich, fruchtig	-	1842	-	-
S20	n.i. (Sesquiterpenoid)	64	würzig, krautig, süßlich, blumig, fruchtig, grün	-	1858	-	-
S21	n.i. (Sesquiterpenoid)	32	fruchtig, Citrus, Kokos	-	1902	1701	-
S22	2-Phenylethanol	128	süßlich, Rose, fruchtig, erfrischend, Kokos	blumig, Rose, süßlich, Honig, frisch	1910 ^a	1116 ^a	+
S23	n.i. (Sesquiterpenoid)	64	süßlich, pilzig, fruchtig, Pfirsich	-	1951	-	-
S24	5-Butyl-2(5H)-furanon	1.024	Kokos, Pfirsich	-	1970 ^a	1239 ^a	+
S25	n.i. (Sesquiterpenoid)	64	süßlich, Kokos, Pfirsich	-	1995	-	-
S26	n.i. (Sesquiterpenoid)	256	würzig, herb, metallisch	-	2003	-	-
S27	(E)-Nerolidol	1.024	süßlich, Popcorn, blumig, holzig	blumig, grün, Citrus, holzig, wachsig	2039 ^a	1563 ^a	+
S28	n.i. (Sesquiterpenoid)	8	süßlich, fruchtig, würzig	-	2056	1603	-
S29	n.i. (Sesquiterpenoid)	32	fruchtig, süßlich, Karamell	-	2078	-	-
S30	n.i. (Sesquiterpenoid)	8	verbrannt, Plastik, würzig	-	2110	1572	-
S31	τ -Muurolol	16	süßlich, Maggi	würzig, Honig	2199 ^b	1662 ^b	+
S32	n.i. (Sesquiterpenoid)	8	süßlich, Karamell, Pfirsich	-	2230	1589	-

S33	n.i. (Sesquiterpenoid)	32	süßlich, Citrus, fruchtig, Karamell	-	2265	1630	-
S34	n.i. (Sesquiterpenoid)	64	Citrus, fruchtig, Popcorn, süßlich	-	2289	-	-
S35	n.i. (Sesquiterpenoid)	32	süßlich, fruchtig	-	2461	-	-
S36	n.i. (Sesquiterpenoid)	64	fruchtig, krautig, herb, süßlich, stechend	-	2491	-	-
S37	n.i. (Sesquiterpenoid)	32	süßlich, Kokos, blumig	-	2582	1756	-

* Enantiomerenüberschuss ee = 98,4%

** aufgrund des Massenspektrums wahrscheinlich der Gruppe der Sesquiterpene/ Sesquiterpenoide zuordenbar

*** (TGSC 2023)

**** alle Massenspektren sind dem Anhang unter 6.9 angefügt

^a Identifiziert durch authentischen Standard

^b Identifiziert durch Abgleich mit Literaturdaten (NIST Chemistry WebBook 2022)

^c Identifiziert anhand des Geruchs zu gegebenem RI

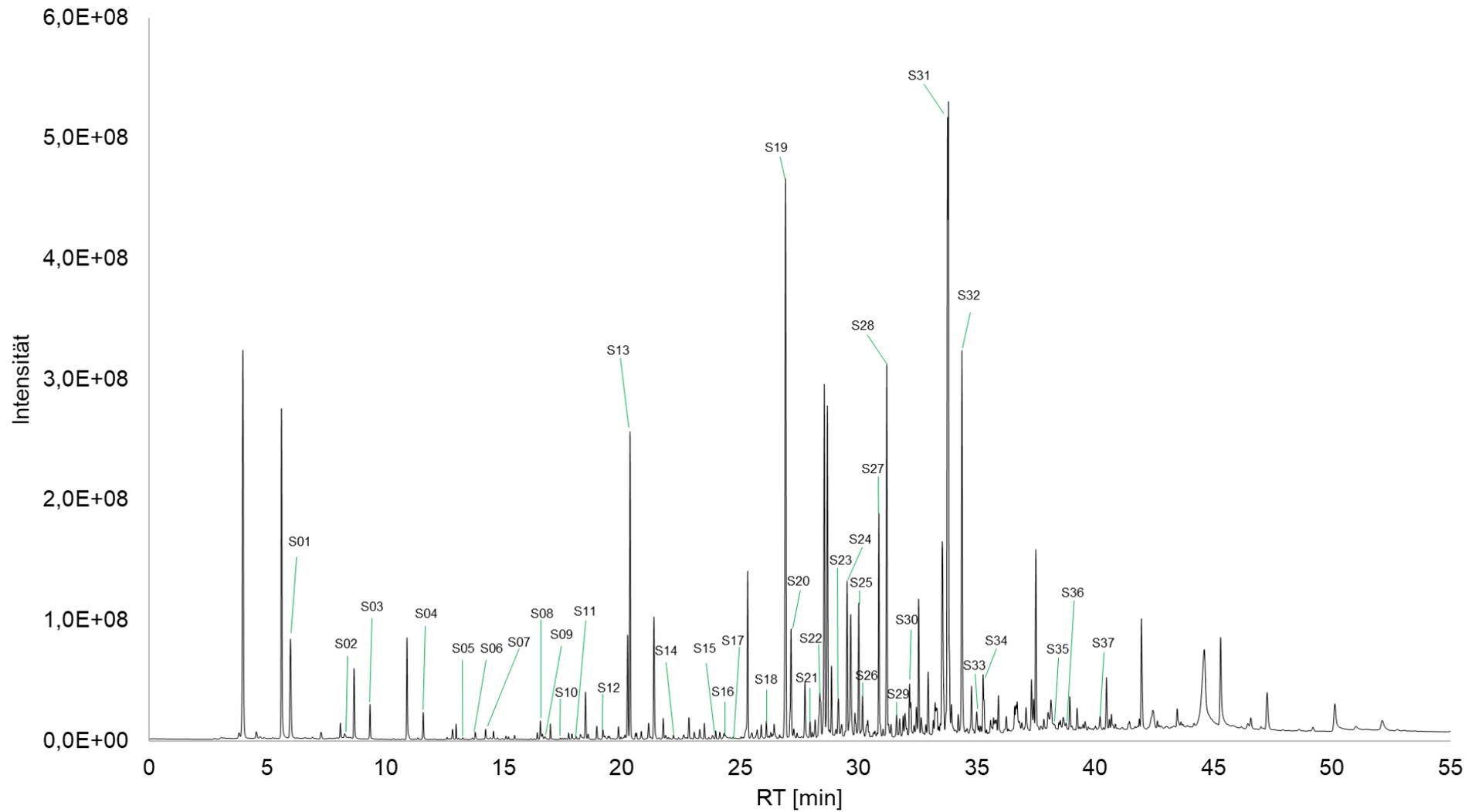


Abbildung 36: diSBSE Chromatogramm von LPER auf KP-Medium 48 h (5 °C-Rampe auf VF-Wax-Säule).

3.4.8.2 Quantifizierung von Aromastoffen und Berechnung des Aromawerts

Tabelle 42 zeigt die Konzentrationen der einzelnen Aromastoffe im KP-Getränk sowie die mit Hilfe von Tabelle 23 berechneten Aromawerte. Die zugehörigen Kalibriergeraden sind dem Anhang beigefügt (Abbildung 129). Die Substanzen (*R*)-Linalool, (*E*)-Nerolidol, 5-Butyl-2(5H)-furanon und 2-Phenylethanol wiesen Aromawerte > 1 auf, 2-Nonanon und 1-Phenylethylacetat wiesen einen Aromawert < 1 auf. Methylbenzoat lag mit einem Aromawert von 0,8 nur leicht unter einem Wert von 1. Den höchsten Aromawert wies (*R*)-Linalool mit 1.897 auf.

Tabelle 42: Konzentrationen der quantifizierten Aromastoffe im KP-Getränk sowie berechnete Aromawerte.

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Aromawert (OAV)
2-Nonanon	$1,5 \pm 0,1$	0,3
(<i>R</i>)-Linalool	$165,0 \pm 1,6$	1.897
(<i>E</i>)-Nerolidol	$42,4 \pm 5,0$	170
Methylbenzoat	$0,4 \pm 0,1$	0,8
1-Phenylethylacetat	$0,6 \pm 0,1$	0,03
2-Phenylethanol	$192,8 \pm 0,8$	1,4
5-Butyl-2(5H)-furanon	$457,4 \pm 30,6$	7,4*

* OT_{5-Butyl-2(5H)-furanon} = $62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

3.4.8.3 Kinetische Untersuchung von Aromastoffen

Zur Abschätzung der Kinetik einiger Aromastoffe wurden Fermentate nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h in gleicher Weise mittels *di*-SBSE untersucht und anhand der Peakflächen der ausgewählten *m/z*-Verhältnisse graphisch in einer Heat-Map dargestellt. Hier wurden die Peakflächen einer Substanz prozentual auf die höchste erhaltene Peakfläche, die 100% gesetzt wurde, bezogen (Abbildung 37). Zugehörige Peakflächen finden sich im Anhang in Tabelle 54.

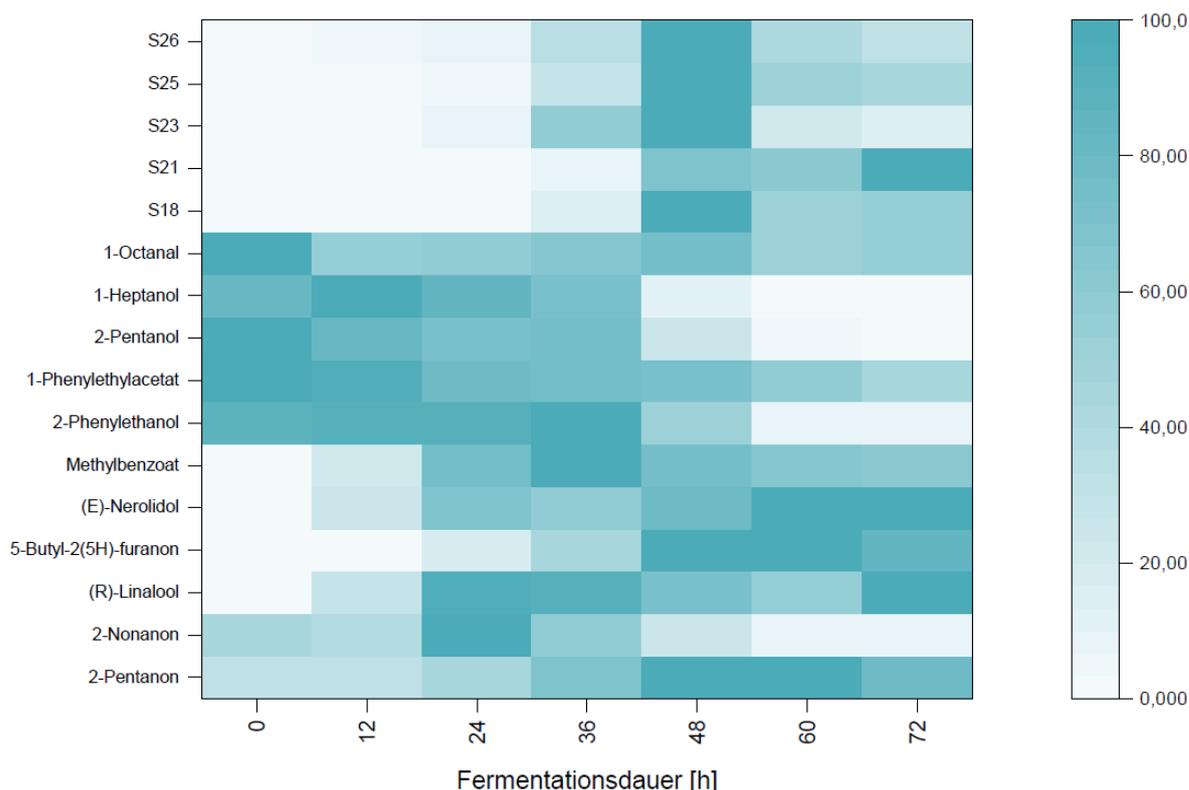


Abbildung 37: Veränderung einzelner Aromastoffe über die Zeit der Fermentation des KP-Mediums (Heatmap) ($n=3$).

1-Octanal, 1-Heptanol, 2-Pentanol, 1-Phenylethylacetat und 2-Phenylethanol waren bereits im KP-Medium vorhanden und zeigten im Laufe der Fermentation abnehmende Intensitäten. Methylbenzoat, (*E*)-Nerolidol, 5-Butyl-2(5H)-furanon und (*R*)-Linalool wurden während der Fermentation durch den Pilz gebildet, ebenso wie die nicht identifizierten Substanzen S18, S21, S23, S25 und S26. 2-Nonanon sowie 2-Pentanon kamen im KP-Medium zwar bereits vor, allerdings wurde die Intensität im Laufe der Fermentation höher, was ebenfalls zeigt, dass auch diese Aromastoffe vom Pilz gebildet oder freigesetzt wurden. Für den vom Panel präferierten Erntezeitpunkt von 48 h zeigt das Diagramm die höchsten Intensitäten für 2-Pentanon und 5-Butyl-2(5H)-furanon, sowie für S18, S23, S25 und S26. Für 1-Octanal, 1-Phenylethylacetat, 2-Phenylethanol, Methylbenzoat, (*E*)-Nerolidol und (*R*)-Linalool waren die Intensitäten nach 48 h zwar nicht am höchsten, lagen aber trotzdem nahe des Maximums.

4. Diskussion

Der Kakaoanbau steht aufgrund sozialer, ökologischer und ökonomischer Probleme vor großen Herausforderungen für die Zukunft. Der Schlüssel zur Verbesserung der Bedingungen im Kakaoanbau könnte eine nachhaltige Landwirtschaft sein, die die Verwertung der gesamten Frucht einschließt. Neuartige Produkte aus den Nebenströmen könnten positive Auswirkungen auf die Kakaobauern und -bäuerinnen und die Umwelt haben. Zu den Nebenströmen, die in den Anbauländern anfallen, zählen die Kakaofruchtschalen (CPH) und der Kakaohonig, der verflüssigte Kakaopulpesaft nach der Fermentation. Durch die unzureichende Beseitigung dieser Nebenströme entstehen ökologische und pflanzengesundheitliche Probleme, wie die Verschmutzung des Grundwassers oder die Ausbreitung von Baumkrankheiten (Vásquez et al. 2019). In dieser Arbeit wurde daher der Fokus auf die CPH sowie die frische Kakaopulpe (KP) gelegt. Auch wenn die Verwendung der CPH als natürlicher Dünger in vielen Anbaugebieten etabliert ist, übersteigt die anfallende Menge deutlich die benötigte Menge, sodass der Überschuss wertbringend genutzt werden könnte. Durch die Abtrennung eines Teils der Kakaopulpe vor der Fermentation vermindert sich die Menge des Kakaohonigs und es entsteht ein hochwertiges Ausgangsprodukt für diverse Produktentwicklungen. Die Qualität der Bohnen verschlechtert sich dadurch nicht (Schwan und Wheals 2004; Amanquah 2013). Um eine ganzheitliche Nutzung von Kakaofrüchten zu erreichen, müssten auch die Kakaobohnenschalen einer Verwendung zugeführt werden. Da es sich hierbei allerdings um den mengenmäßig geringsten Nebenstrom handelt und dieser erst in den Verarbeitungsländern anfällt, sollte das Augenmerk zunächst auf die CPH sowie die Kakaopulpe gelegt werden, um diese einer Nutzung im Lebensmittelbereich zuzuführen.

Die Fermentation durch Pilze der Abteilung Basidiomycota entweder zur Erzeugung pilzlicher Biomasse oder zur Generierung ansprechender Aromen wurde bereits für vielfältige Lebensmittelnebenströme und andere Substrate angewendet, wie beispielsweise Apfel- und Johannisbeertrester, oder Schalen von Citrusfrüchten (Ahlborn et al. 2019; Bürger et al. 2022; Sommer et al. 2023). Die Aufwertung von Nebenströmen der Kakaofrüchte durch Speisepilze zur Lebensmittelgewinnung ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und bietet daher ein neuartiges, interessantes Forschungsfeld.

4.1 Fermentation von CPH zur Erzeugung pilzlicher Biomasse

Außerhalb des Lebensmittelsektors sind viele verschiedene Anwendungen von CPH beschrieben. Hierzu zählen beispielsweise der Einsatz als Dünger, zur Seifenherstellung, zur Papierherstellung oder als Futtermittel. Der Einsatz in Futtermitteln ist allerdings nur begrenzt möglich, da die geringe Nährstoffdichte der Schalen limitierend für die Leistung der Tiere und

deren Verdaulichkeit ist (Laconi und Jayanegara 2015). Durch verschiedene Vorbehandlungsmethoden, wie die Fermentation mit Weißfäulepilzen oder die Zugabe von Harnstoff, lässt sich der Ballaststoffgehalt senken und der Proteingehalt steigern und macht somit die Verfütterung in Mischung an verschiedene Nutztiere möglich (Laconi und Jayanegara 2015; Omotoso et al. 2018). Das Vorkommen von Theobromin in den Schalen mit ca. $7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ schränkt die Verfütterung allerdings zusätzlich ein (Nguyen und Nguyen 2017). In Bezug auf die stetig wachsende Weltbevölkerung und den damit einhergehenden steigenden Nahrungsmittelbedarf ist es sinnvoll, nach Möglichkeiten zu suchen, die Nebenströme der Lebensmittelproduktion im Lebensmittelbereich einzusetzen. Die Extraktion einzelner Fraktionen aus CPH und ihre Anwendung für Lebensmittel ist beispielsweise für Pektin beschrieben und bereits patentiert (Bernaert et al. 2020). Weitere funktionale Moleküle, wie Phenole, wurden bereits erfolgreich extrahiert. Bislang existieren keine Studien, die den Einsatz der gesamten Kakaofruchtschalen in Lebensmitteln untersuchen.

4.1.1 Zusammensetzung von CPH

Die ermittelte chemische Zusammensetzung der drei Sorten SUL 1, SUL 2 und MCC 02 wich nur gering voneinander ab und stimmte gut mit der in der Literatur angegebenen Zusammensetzung überein (Tabelle 43). CPH besitzen einen hohen Aschegehalt. Die Mineralstoffzusammensetzung wurde nicht untersucht. In der Literatur wird Kalium als das Hauptmengenelement beschrieben, gefolgt von Calcium und Magnesium (Vriesmann et al. 2011). Ballaststoffe stellen die größte Fraktion der CPH dar. Die Abweichungen können auf natürliche Schwankungen oder die verwendete Methode zurückgeführt werden. Der hohe Ligningehalt mit über $27 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ TM limitiert den ernährungsphysiologischen Nutzen. Der Rohproteingehalt schwankt innerhalb der Literaturdaten deutlich, obwohl immer derselbe Stickstoff-zu-Protein Umrechnungsfaktor von 6,25 gewählt wurde. Insgesamt ist der Proteingehalt mit knapp $8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ TM relativ niedrig, wobei die Biologische Wertigkeit des Proteins mit 87 als hoch angesehen werden kann. Die Verwendung von CPH im Ganzen als Lebensmittel wird insgesamt durch die Nährstoffzusammensetzung, vor allem den niedrigen Protein- und den hohen Ligningehalt, begrenzt. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Fermentation mit Speisepilzen diese aufwerten kann.

Tabelle 43: Vergleich der chemischen Zusammensetzung von CPH mit Literaturdaten; alle Daten bezogen auf TM; KH=Kohlenhydrate.

Parameter	CPH (SUL 1)	CPH (a)	CPH (b)	CPH (c)
Protein (N x 6,25)	7,7 ± 0,0	8,6 ± 0,1	8,9 ± 0,3	4,2 ± 0,2
Fett	0,6 ± 0,0	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,1
Asche	9,9 ± 0,1	6,7 ± 0,0	7,9 ± 0,4	8,4 ± 0,1
Ballaststoffe	64,2 ± 0,9	36,6 ± 0,0	59,0 ± 0,5	56,0 ± 0,2
hiervon Lignin	27,4 ± 0,3	21,4 ± 0,6	19,4 ± 0,7	-
andere KH	20,3 ± 1,7	32,3 ± 1,8	-	29,0 ± 0,2

a (Vriesmann et al. 2011)

b (Yapo et al. 2013)

c (Martínez et al. 2012)

4.1.2 Ergosterol als Biomarker

Zur Bewertung des Pilzwachstums auf unlöslichen Medien kann nicht das Gewicht des Fermentats herangezogen werden, da es sich um eine Mischung aus gebildetem Pilzmyzel und Substratresten handelt (Ahlborn et al. 2019). Daher muss in solchen Fällen ein Biomarker für das Wachstum herangezogen werden. Ergosterol kommt als membrangebundenes Lipid fast ausschließlich in der pilzlichen Zellmembran vor, wobei es eine wichtige Rolle bei der Membranfluidität und -struktur spielt (Rodrigues 2018). Ergosterol kann daher als Biomarker zum Nachweis pilzlicher Biomasse genutzt werden (Gessner 2020; Lau et al. 2006; Djajakirana et al. 1996).

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung von Ergosterol in Pilzmyzelien und Myzel-Substrat-Komplexen entwickelt und validiert. Im Gegensatz zur zuvor verwendeten, institutsinternen Methode nach Ahlborn et al. (2018), wird mit der neu entwickelten Methode eine erhebliche Menge Lösemittel eingespart, der Probendurchsatz erhöht und die benötigte Menge an Pilzmyzel pro Analyse von 2 g auf ca. 50 mg gesenkt. Dies ist vor allem vorteilhaft für die Untersuchung von Screening-Ansätzen, bei denen meist nur wenige Hundert Milligramm einer Probe zur Verfügung stehen.

Eine Validierung dient dazu, eine Aussage darüber zu treffen, ob eine bestimmte Prüfmethode für ihren Verwendungszweck geeignet ist (Kromidas 2011). Der Zweck der hier neu entwickelten und zuvor optimierten GC-FID-Methode ist es, den Analyten Ergosterol in Pilzmyzelien sowie in Substrat-Myzel-Komplexen quantitativ mit hinreichender Genauigkeit erfassen zu können. Der Anpassungstest nach Mandel ergab einen linearen Zusammenhang im Arbeitsbereich von 10 – 100 µg·mL⁻¹ zwischen dem Peakflächenverhältnis des Analyten und des internen Standards sowie der Massenkonzentration des Analyten mit einem sehr guten Korrelationskoeffizienten von 0,9999. Bei der hier gewählten Vorgehensweise ist die absolute Menge an internem Standard in jedem Kalibrierpunkt und in der Probe identisch, sodass in der Kalibriergerade direkt das Peakflächenverhältnis gegen die

Massenkonzentration des Analyten aufgetragen werden kann. Alternativ könnte eine Auswertung über die Bestimmung des Responsefaktors durchgeführt werden. Diese würde zum selben Endergebnis führen. Im gewählten Arbeitsbereich kann durch Variation der Probeinwaage zwischen 10 und 100 mg ein Bereich von 25 – 2500 mg Ergosterol pro 100 g Probenmaterial abgedeckt werden. Dieser Bereich deckt den Großteil vieler aus der Literatur bekannten Ergosterolgehalte von Pilzen der Abteilung Basidiomycota ab (Tabelle 44).

Tabelle 44: Ergosterolgehalte verschiedener Myzelien von Pilzen der Abteilung Basidiomycota.

Spezies/ Substrat/ Kultivierungsdauer	Ergosterol [mg·100 g ⁻¹ TM]	Literatur
<i>Pleurotus sapidus</i> auf Malzextrakt-Medium für 4 Tage	715	(Ahlborn et al. 2019)
<i>Phlebia radiata</i> auf synthetischem Medium für 7 Tage	51	(Niemenmaa et al. 2008)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> auf synthetischem Medium für 7 Tage	193	
<i>Fomitopsis officinalis</i> auf synthetischem Medium für 4 Wochen	102	(Fijałkowska et al. 2020)

Die Wiederfindungsraten über den Arbeitsbereich lagen zwischen 97,16 und 101,83% und somit im zuvor spezifizierten Bereich von 95 – 105% (Kromidas 2011). Die Wiederfindung wurde in CPH-Matrix durch Dotierung mittels Ergosterol-Standards bestimmt, sodass die Wiederfindungsraten auch hinsichtlich diverser Matrixeffekte valide sind. Allerdings bezieht sich die ermittelte Wiederfindung nur auf frei vorliegendes Ergosterol. Ergosterol kann aber auch in veresterter Form vorliegen (Yuan et al. 2007). Dabei ist das Verhältnis beider Formen zueinander abhängig von der Pilzspezies (Sio et al. 2000). Die alkalische Verseifung im ersten Schritt der Probenaufarbeitung dient nicht nur der Hydrolyse von Triglyceriden, um diese vom unverseifbaren Anteil zu trennen, sondern auch der Hydrolyse des veresterten Ergosterols (Yuan et al. 2006). Diese Hydrolyse war nicht Teil der Validierung, sodass hier ein Unsicherheitsfaktor bei der Wiederfindung von verestertem Ergosterol entsteht, der nicht bewertet werden kann. Die Messpräzision ist ein gerätespezifischer Parameter. Diese lag mit einem V_K von 0,2% in einem sehr guten Bereich. Die Methodenpräzision, hier in Form der Wiederholpräzision evaluiert, zeigte einen größeren V_K mit 4,0%. Verglichen mit anderen validierten Ergosterol-Methoden liegt dieser Wert in einem tolerablen Bereich (Yuan et al. 2006; Tardieu et al. 2007). Um diesen Wert abzusichern, könnte zusätzlich die *interday*-Präzision durch verschiedene Bearbeiter bestimmt werden (Kromidas 2011). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen mit 0,42 bzw. 1,44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ deutlich niedriger als in der zuvor verwendeten institutsinternen HPLC-Methode mit einer Nachweisgrenze von 7,06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und

einer Bestimmungsgrenze von $25,10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Ahlborn et al. 2019). Aus analytischer Sicht ist die hier validierte Methode dazu geeignet, den Ergosterolgehalt in Pilzmyzel zu bestimmen. Kritisch zu betrachten ist allerdings die zu Grunde gelegte Relation zwischen dem Referenzwert aus reinem Pilzmyzel und der jeweiligen Probe.

Ergosterol wurde für diese Arbeit als Biomarker unter der Annahme ausgewählt, dass das Myzel des jeweiligen Pilzes, kultiviert auf einem 100% löslichen Medium, einen konstanten Ergosterolgehalt aufweist und somit als Referenzwert mit 100% Pilzanteil angenommen werden kann (Ahlborn et al. 2019). Voříšková et al. (2011) zeigten für den Pilz *Hypholoma fasciculare* einen gleichbleibenden Ergosterolgehalt über 21 Tage auf Malzextrakt-Medium, womit eine Quantifizierung des Pilzanteils über den Mittelwert durchgeführt werden konnte. Die Abweichung vom Mittelwert lag dabei bei 16%. Die von *F. pinicola* und *P. salmoneo-stramineus* aufgenommenen Wachstumskurven zeigten allerdings einen stetigen Anstieg des Ergosterolgehaltes über die Kultivierungsdauer auf Malzextrakt-Medium (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 14). Dieser Anstieg ist bei *F. pinicola* mit $3,5 - 16,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ TM}$ deutlicher ausgeprägt als bei *P. salmoneo-stramineus* mit $3,5 - 5,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ TM}$ Ergosterol. Bei der Verwendung des Mittelwerts als Referenzwert zur Bestimmung des Pilzanteils läge dieser bei $4,56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ TM}$ mit einer Standardabweichung von 20% für *P. salmoneo-stramineus* und bei $11,03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ TM}$ mit einer Standardabweichung von 46% für *F. pinicola*. Während diese Werte für *P. salmoneo-stramineus* annehmbar wären, ist ersichtlich, dass diese Herangehensweise für *F. pinicola* nicht zielführend ist. Ein Einflussfaktor auf den Ergosterolgehalt von Myzelpellets, der in der Literatur beschrieben ist, ist die Pelletgröße. Raviraja et al. (2004) zeigten einen zunehmenden Ergosterolgehalt bei zunehmender Pelletgröße für Pilze der Abteilung Ascomycota. Es wäre möglich, dass dieser Effekt auch bei Pilzen der Abteilung Basidiomycota eintritt. Dies könnte eine mögliche Erklärung des steigenden Ergosterolgehaltes mit zunehmender Wachstumsdauer sein.

Der Ergosterolgehalt wird angegeben in mg pro g Bio-Trockenmasse-Fermentat (oder in mg pro 100 g). Somit ist der Wert des Ergosterolgehaltes abhängig von der Ausbeute an Bio-Trockenmasse der jeweiligen Kultur. Um eine unabhängige und somit vergleichbare Größe zu erhalten, wurde der Ergosterolgehalt pro Kolben berechnet (vgl. Abbildung 15). Dieser Wert gibt an, wie viel Ergosterol sich im Fermentationskolben (in 100 mL Medium) befindet. Anhand dieser Graphik ist zu erkennen, bis zu welchem Fermentationszeitpunkt neues Ergosterol durch den Pilz gebildet wird. Die Daten zeigen außerdem, dass eine Verringerung der Bio-Trockenmasse („Biomasseverlust“) der Kultur über die Fermentationszeit nicht mit einer Abnahme an Ergosterol einhergeht. Dadurch erhöht sich der Ergosterolgehalt (angegeben in mg pro g Trockenmasse) über die Fermentationszeit nicht proportional zum tatsächlichen Pilzwachstum. Aus diesem Diagramm wurde der Zeitpunkt des maximalen Wachstums und

der damit verbundene maximale Ergosterolgehalt abgeleitet und in dieser Arbeit als Referenzwert angesehen. Somit wurden alle Berechnungen des Pilzanteils auf den höchstmöglichen Referenzwert vor Biomasseverlust bezogen. Diese Berechnung schließt allerdings nicht die zuvor beschriebene mögliche Abhängigkeit des Ergosterolgehaltes von der Pelletgröße ein und auch nicht die Abhängigkeit vom verwendeten Substrat bzw. den verfügbaren Nährstoffen (Niemenmaa et al. 2008). Die Vergleichbarkeit dieser Parameter zwischen Kulturen auf Malzextrakt-Medium und CPH-Medium kann nicht garantiert werden. Es besteht also weiterhin ein Unsicherheitsfaktor bei der Quantifizierung des Pilzanteils in den Fermentaten CPHF. Daher handelt es sich in der vorliegenden Arbeit bei allen angegebenen Pilzanteilen lediglich um eine näherungsweise Abschätzung.

Weitere in der Literatur verwendete Methoden zur Abschätzung der pilzlichen Biomasse sind die Verwendung von Chitin als Biomarker oder die Quantifizierung über die DNA-Menge mittels *q*PCR (Eikenes et al. 2005). Es wurde bereits nachgewiesen, dass unterschiedliche Methode auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Bei der Abschätzung der Biomasse von Braun- und Weißfäulepilzen mittels Ergosterol und *q*PCR, wurde mittels *q*PCR ein niedrigerer Pilzanteil bestimmt als mittels Ergosterol. Der Erfolg der *q*PCR-Methode ist dabei maßgeblich abhängig von der DNA-Extraktionsmethode (Song et al. 2014). Chitin hingegen ist ein Bestandteil der pilzlichen Zellwand. Neben Pilzen kommt es außerdem in Gliedertieren und Weichtieren vor, in Pflanzen ist es nicht bekannt (Bastiaens et al. 2020). Ebenso wie beim Ergosterol könnte der Chitingehalt abhängig von der Pelletgröße oder auch von der Nährstoffversorgung sein. Um zu prüfen, wie sich die Korrelation zwischen Chitingehalt und pilzlicher Biomasse verhält, könnte der Chitingehalt auf Malzextrakt-Medium über die Kultivierungsdauer untersucht werden. Bei einem konstanten Wert könnte Chitin als zweiter Biomarker genutzt werden. In dieser Arbeit wurde zusätzlich zum Ergosterolgehalt ein Nachweis des Pilzwachstums auf mikroskopischer Ebene durchgeführt. Dieser Nachweis basierte auf der Ähnlichkeit der Struktur zwischen CPHF und dem jeweiligen reinen Pilzmyzel, gewachsen auf Malzextrakt-Medium, gegenüber der Struktur der nicht-fermentierten CPH.

4.1.3 Zweistufiges Screening zur Auswahl vielversprechender Pilze

Um geeignete Kandidaten zur Fermentation von CPH zu finden, wurde zunächst ein Screening mit 41 Speisepilzen in Emers-Kultur auf Agar-Platten durchgeführt. Um eine Aussage über das Wachstum der einzelnen Pilze treffen zu können, diente CPH im Medium als alleinige Nährstoffquelle. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit. Die vier *Pleurotus*-Arten, *P. sapidus*, *P. ostreatus*, *P. salmoneo-stramineus* und *P. pulmonarius* zeigten eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit. Der wahrgenommene bittermandelartige Geruch kann auf die Bildung von Benzaldehyd zurückgeführt werden,

welches neben verschiedenen *Pleurotus*-Arten auch für *Ischnoderma benzoinum* nachgewiesen wurde. Der Stoffwechselweg startet dabei ausgehend von L-Phenylalanin (Krings und Berger 1998). Die Fruchtkörper der Seitlinge sind beliebte Speisepilze. Auch ihr Myzelwachstum wird in verschiedenen Studien genutzt, um erfolgreich Nebenströme der Lebensmittelindustrie aufzuwerten. Ahlborn et al. (2019) nutzten *P. sapidus* zur Erzeugung einer veganen, proteinreichen Quelle aus Apfeltrester. Aggelopoulos et al. (2018) untersuchten die Aufwertung von Mischungen von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie wie Biertreber, Kartoffelpulpe und Molke durch *P. ostreatus* und zeigten Proteinzunahmen von bis zu 26,4%. Aufgrund von in der Literatur beschriebenen positiven Eigenschaften und der schnellen Wachstumsgeschwindigkeit auf CPH-Agar wurden *P. salmoneo-stramineus* und *P. pulmonarius* für die nächste Stufe des Screenings ausgewählt. Weitere *Pleurotus*-Arten, wie *P. calyptratus*, *P. eryngii* und *P. citrinopileatus* zeigten deutlich schlechtere Wachstumsgeschwindigkeiten und wurden daher nicht weiter betrachtet. Die zwei *Psathyrella*-Arten (Mürblinge oder Faserlinge), *P. piluliformis* und *P. candolleana* wurden aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften aus dem ersten Screening ausgewählt. *P. candolleana* zeigte eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit von sechs Tagen und ein neutrales bis leicht fruchtiges Aroma. *P. piluliformis* hingegen zeigte eine niedrige Wachstumsgeschwindigkeit von 14 Tagen, aber ein sehr interessantes, süßliches Aroma, das an Kokos und Gebäck erinnerte. Beide Vertreter zählen zu den Speisepilzen. Zur Aufwertung von agroindustriellen Nebenströmen durch *Psathyrella*-Arten existieren wenige Studien. Ayodele und Okhuoya (2007) untersuchten das Myzelwachstum von *Psathyrella atroumbonata*, wobei sie das beste Myzelwachstum auf Fasern der Ölpalme und auf Maiskolben feststellten. Als fünfter Vertreter für weitere Untersuchungen wurde *Fomitopsis pinicola*, der Rotrandige Baumschwamm ausgewählt. Er zeigte sowohl ein schnelles Wachstum als auch ein angenehmes Aroma. *F. pinicola* zählt zur Ordnung der Stielporlingsarten und wird in der Literatur als Medizinalpilz beschrieben. Er wird als Quelle für medizinische Inhalts- und therapeutische Hilfsstoffe genutzt (Bishop 2020). Beschrieben sind unter anderem positive Effekte gegen Krebs und Entzündungen und eine Stärkung des Immunsystems (Dresch et al. 2015). Der Geruch junger Fruchtkörper wird als intensiv säuerlich beschrieben, der Geschmack als bitter.

Ausgehend von der Auswahl dieser fünf Pilze der Abteilung Basidiomycota wurde ein zweites Screening in Submers-Kultur angeschlossen. Hierbei wurde zunächst ein einheitliches Fermentationsverfahren im gleichen Medium und mit gleicher Fermentationsdauer für alle Pilze ohne spezifische Anpassung genutzt. Dabei zeigten sich vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Pilzanteils für *P. salmoneo-stramineus*, *P. pulmonarius* und *P. candolleana* (14 – 26%), wobei die Quantifizierung des Pilzanteils für *P. candolleana* aufgrund von gebildeten Ergosterol-Derivaten, die zwischen CPH-Medium und ME-Medium als Referenz nicht im selben Verhältnis auftraten, problematisch

war. In der Literatur sind viele verschiedene Ergosterol-Derivate für *P. candolleana* beschrieben (Liu et al. 2019). Da der Pilz aufgrund der Unsicherheit bei der Quantifizierung des Pilzanteils ausgeschlossen wurde, wurden die Derivate auch nicht abschließend identifiziert. Für die Fermentation von CPH wurden die Pilze *P. salmoneo-stramineus* und *F. pinicola* ausgewählt. Auch wenn *F. pinicola* einen sehr niedrigen Pilzanteil von 7% auf CPH aufwies, sollte der Pilz in weitere Studien aufgenommen werden, da eine hohe Biologische Wertigkeit für sein Protein aus Vorversuchen bekannt war. Für *F. pinicola* und *P. salmoneo-stramineus* (Abbildung 38) wurden Optimierungsversuche hinsichtlich Proteinsteigerung und Ausbeute (Biomasse) durchgeführt.



Abbildung 38: Fruchtkörper von *Fomitopsis pinicola* (links; Pixabay 6540941) und *Pleurotus salmoneo-stramineus* (rechts; Colourbox #9592473).

4.1.4 Optimierung der Fermentation von CPH durch FPI und PSS

Das erste Screening auf einheitlichem Medium, bestehend aus $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CPH mit gleicher Fermentationsdauer für alle Pilze führte nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen bezüglich des Protein- und Pilzanteils. Durch eine siebentägige Fermentation mit *F. pinicola* wurden $10,9 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Rohprotein in der TM bei einem Pilzanteil von 7% erreicht und durch eine siebentägige Fermentation mit *P. salmoneo-stramineus* $11,6 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Rohprotein in der TM bei einem Pilzanteil von 14%. Das Wachstum von Pilzen ist von mehreren Faktoren abhängig. Der bekannteste Parameter ist das C/N-Verhältnis. Dieses beeinflusst unter anderem die Ausbeute und den Proteingehalt des Pilzes (Hoa et al. 2015). Beim Vergleich des C/N-Verhältnisses der CPH von 40 mit in der Literatur beschriebenen Nährmedien für Pilzwachstum zeigt sich, dass niedrigere C/N-Verhältnisse prinzipiell vorteilhafter sind (Jo et al. 2009; Philippoussis und Diamantopoulou 2011). Allerdings existieren auch viele Studien, in denen Medien mit C/N-Verhältnissen ≥ 40 nicht zu einer deutlichen Einschränkung des Pilzwachstums führen (Osunde et al. 2019; Hoa et al. 2015). Neben dem C/N-Verhältnis sind auch die Art der Kohlenstoffquelle, die Art der Stickstoffquelle und die Menge an Stickstoff sowie die Temperatur entscheidend für ein gutes Pilzwachstum (Hoa und Wang 2015). Die

gewählte Temperatur von 24 °C liegt in dem in der Literatur beschriebenen Bereich des Temperaturoptimums beider Pilze und wurde daher nicht verändert (Choi et al. 2007; Zharare et al. 2010). Der größte Anteil der Kohlenhydratquellen in CPH waren Ballaststoffe mit insgesamt 64,2 g·100 g⁻¹ TM. Lediglich 7,5 g·100 g⁻¹ TM entfielen hierbei auf lösliche Ballaststoffe, wie beispielsweise Pektin. Die zu den unlöslichen Ballaststoffen zählenden Bestandteile, wie Cellulose, Hemicellulosen und Lignin sind keine leicht zugänglichen Kohlenhydrate, die in der Anfangsphase der Fermentation zum Pilzwachstum genutzt werden. Leichter zugängliche Kohlenhydrate, wie Mono- und Disaccharide, wurden nicht näher analytisch betrachtet, sie sind somit der Gruppe andere Kohlenhydrate mit 20,3 g·100 g⁻¹ TM zuzuordnen. Da der Anteil an leicht zugänglichen Kohlenhydraten in CPH relativ gering war, könnte dies zusätzlich zum geringen Stickstoffgehalt ein möglicher Grund für ein limitiertes Wachstum sein. Um eine höhere Ausbeute an Biomasse, Proteingehalt und Pilzanteil zu generieren, wurden Optimierungen hinsichtlich Substratmenge, Stickstoffsupplementierung und Wachstumsdauer durchgeführt.

Die Stickstoffsupplementierung durch eine anorganische Quelle, die zumeist deutlich günstiger ist als organische Stickstoffquellen, wurde nur für *F. pinicola* untersucht, da aus der Literatur bekannt ist, dass *Pleurotus*-Arten anorganische Stickstoffquellen schlechter annehmen (Nwokoye et al. 2010; Fraatz et al. 2014). Ein gleiches Muster zeigte sich für *F. pinicola*, sodass die Supplementierung für beide Pilze mittels organischer Stickstoffquelle untersucht wurde. Fraatz et al. (2014) zeigten, dass insbesondere die Supplementierung von Asparagin und Asparaginsäure das Wachstum von Pilzen der Abteilung Basidiomycota in Submers-Kulturen fördern kann. Die meisten anderen Aminosäuren können *in vivo* aus Glucose gebildet werden, während Asparagin und Asparaginsäure aus dem Medium aufgenommen werden. Wie viel der supplementierten Asparaginsäure von einem Pilz aufgenommen werden kann, ist Spezies-abhängig. Daher wurde der nach der Fermentation nicht verbrauchte Anteil im Überstand quantifiziert und die supplementierte Menge um den nicht verbrauchten Prozentsatz reduziert. Daraus ergab sich eine Supplementierung an Natriumaspartat von 5,0 g·L⁻¹ für *F. pinicola* und von 3,6 g·L⁻¹ für *P. salmoneo-stramineus*. Die Parameter Ausbeute, Rohproteingehalt und Pilzanteil änderten sich durch die Reduzierung nicht. Die Quantifizierung des Anteils im Überstand wurde nach Totalhydrolyse gemäß 2.8.3 b) durchgeführt, was zu einer Verfälschung des ermittelten Asparaginsäuregehaltes führen könnte. Zwar konnte durch die Wiederfindungsrate im Blindwert von 102,1% die Richtigkeit der analytischen Methode nachgewiesen werden, allerdings können während der Fermentation durch den Pilz Enzyme in den Überstand abgegeben werden. Durch die Totalhydrolyse werden diese mitbestimmt. Insgesamt wurde diese Verfälschung als vernachlässigbar betrachtet. Natriumaspartat ist ein vergleichsweise teures Supplement. Die Kosten belaufen sich auf ca. 40 € pro 100 g. Dies würde die Gesamtkosten der hier

dargestellten Fermentationen um 2,00 € pro Liter für *F. pinicola* und um 1,44€ für *P. salmoneo-stramineus* erhöhen. Ein möglicher kostengünstigerer und nachhaltigerer Weg wäre die Supplementierung mit Asparaginsäure-reichen Nebenströmen, wie beispielsweise Kartoffelfruchtwasser aus der Stärkeindustrie (Peksa und Miedzianka 2014).

Der *Fed-Batch* Modus ist in industriellen Fermentationsprozessen weit verbreitet (Birol et al. 2002; Bodizs et al. 2007; Mears et al. 2017). Dabei erfolgt eine Zufütterung der Kohlenstoffquelle ab dem Zeitpunkt, an dem die initiale Menge erschöpft ist. *Fed-Batch* Ansätze sind auch dann sinnvoll, wenn durch zu hohe Substratmengen zu Beginn einer Fermentation das Wachstum inhibiert würde (Minihane und Brown 1986). Die hier untersuchten drei *Fed-Batch* Ansätze mit unterschiedlichen Substratmengen zeigten keine vorteilhaften Ergebnisse gegenüber dem *non-Fed-Batch* Ansatz, für *P. salmoneo-stramineus* resultierte der *Fed-Batch* Ansatz sogar in niedrigeren Proteingehalten. Auch eine niedrigere oder höhere Gesamtsubstratmenge als 20 g·L⁻¹ führte nicht zu einem verbesserten Ergebnis. Zu beachten ist allerdings, dass bei diesen Versuchen die Menge an supplementiertem Natriumaspargat nicht erneut angepasst wurde und die gesamte Menge bereits zu Beginn eingesetzt wurde. Aus der Literatur sind auch für die Kultivierung von Pilzen der Abteilung Basidiomycota positive Ergebnisse für *Fed-Batch* Ansätze bekannt (Ahlborn et al. 2019). Durch eine genaue Anpassung der Supplementierungsmenge an Natriumaspargat sowie eine Zufütterung könnte erneut untersucht werden, ob ein *Fed-Batch* Ansatz zu einem verbesserten Fermentationsprodukt führen kann. Bei der großtechnischen Produktion von Pilzmyzel in Bioreaktoren ist jedoch zu beachten, dass zur Zufütterung verwendete Substrate pumpbar sein sollten. Dies stellt eine Herausforderung für CPH dar.

Aus wirtschaftlicher Sicht ist die Wahl des optimalen Erntezeitpunkts sowohl von der Ausbeute, dem Protein- und Pilzgehalt, aber auch von der Kultivierungsdauer abhängig. Bei gleichbleibenden Werten dieser Parameter wäre daher eine längere Kultivierung wirtschaftlich gesehen nicht sinnvoll. Sowohl bei der Wachstumsreihe von *F. pinicola* (Abbildung 20) als auch bei *P. salmoneo-stramineus* (Abbildung 19) wird zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Maximum an Bio-Trockenmasse, Rohproteingehalt sowie Pilzanteil erreicht. Für *P. salmoneo-stramineus* lag dieses Maximum an Hauptkulturtag acht mit 11,0 g·L⁻¹ Bio-Trockenmasse, 22,2 g·100 g⁻¹ TM Rohprotein und einem Pilzanteil von 54%. Dabei zeigte sich von Hauptkulturtag sechs auf acht noch ein deutlicher Anstieg des Rohproteingehaltes und des Pilzanteils. Beide Parameter nahmen im weiteren Verlauf bis Tag 14 ab. Petre et al. (2016) optimierten die Produktion von Pilzmyzel in Submers-Kultivierung auf Nebenströmen der Weinindustrie für die Pilze *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* und *Lentinula edodes* und gaben dabei eine optimale Wachstumsdauer zwischen sieben und zehn Tagen an, abhängig von der Pilzspezies und der Medienzusammensetzung. Die optimale

Wachstumsdauer von *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester wurde in der Literatur mit sechs Tagen angegeben (Ahlborn et al. 2019). Die maximal erreichte Bio-Trockenmasse lag bei $5,92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dabei wurde ebenfalls eine leichte Abnahme des Proteingehaltes nach dem Wachstumsoptimum beobachtet.

Für *F. pinicola* lag das Wachstumsmaximum bereits an Hauptkulturtag vier mit $11,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Bio-Trockenmasse, $18,6 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ TM Rohprotein und einem Pilzanteil von 17%. Von Hauptkulturtag vier auf sechs war eine deutliche Abnahme des Rohproteingehaltes und des Pilzanteils zu erkennen. Anschließend waren keine signifikanten Änderungen mehr zu beobachten. Cha et al. (2005) berichteten über eine maximale Biomasseerzeugung durch *F. pinicola* von $10,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nach elf Tagen Kultivierung auf einem angepassten, optimalen Medium. Das hier früh erreichte Maximum spricht für eine limitierte Nährstoffversorgung für *F. pinicola* in CPH-Medium. Ein möglicher Grund könnte der hohe Ligningehalt sein. *F. pinicola* ist ein Braunfäulepilz und somit nur bedingt in der Lage, Lignin abzubauen (Shah et al. 2018). Dies reduziert die zugänglichen Kohlenhydratquellen für diesen Pilz. Diese These wird durch die Ergebnisse zur Produktion lignolytischer Enzyme unterstützt. In den Kulturen von *F. pinicola* auf CPH-Medium war keine Manganperoxidase- bzw. Ligninperoxidaseaktivität nachweisbar, wohingegen hohen Aktivitäten für *P. salmoneo-stramineus* nachgewiesen wurden (vgl. 3.3.5.5). Bei letzterem Pilz handelt es sich um einen Weißfäulepilz. Eine detailliertere Diskussion hierzu erfolgt unter 4.1.5.3. Ein weiterer Grund für ein inhibiertes Wachstum könnte die Anwesenheit des Schwermetalls Cadmium sein (Baldrian und Gabriel 1997). Cadmium wurde bereits in Kakaofruchtschalen nachgewiesen, sodass eine Inhibierung des Wachstums von *F. pinicola* nicht ausgeschlossen werden kann (Gramlich et al. 2018).

4.1.5 Bewertung der Endprodukte

Die Erzeugung pilzlicher Biomasse in Form von Myzel bringt verschiedene Vorteile mit sich. Bei sehr guten Nährwerteigenschaften können große Mengen an Pilzmyzel ohne großen Platz- und Energieaufwand in einer kontrollierten Umgebung erzeugt werden. Dabei können kostengünstige, lignocellulosehaltige Nebenströme der agroindustriellen Lebensmittelproduktion verwendet werden, wie beispielsweise Trester oder Schalen (Berger et al. 2022; Bürger et al. 2022). Das Ziel in diesem Vorhaben war nicht allein die Erzeugung von pilzlicher Biomasse, sondern die Untersuchung der Veränderung der Nährwerteigenschaften des Myzel-Substrat-Komplexes gegenüber den nicht fermentierten CPH.

4.1.5.1 Proteingehalt und Proteinqualität

Der Proteingehalt ist ein maßgeblicher Qualitätsparameter von Lebensmitteln. Aufgrund der steigenden Weltbevölkerung und dem damit einhergehenden steigenden Nahrungsmittelbedarf rücken alternative Proteinquellen, wie beispielsweise insektenbasiertes oder pflanzenbasiertes Protein, immer mehr in den Fokus. Pilzliches Protein, auch Mykoprotein genannt, ist einerseits bekannt durch das Fleischersatzprodukt Quorn™, welches mit Hilfe von Schlauchpilzen hergestellt wird, aber auch Myzel von Ständerpilzen als Proteinquelle steht im Mittelpunkt von Forschungsarbeiten.

Das Standardverfahren zur Bestimmung von Protein ist die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl (AOAC 2001.11 2002). Unter Einbeziehung des Stickstoff-zu-Protein Umrechnungsfaktors erhält man das sogenannte Rohprotein. Der Faktor für Lebensmittel allgemein ist 6,25 unter der Annahme, dass der durchschnittliche Stickstoffgehalt im Protein 16% beträgt. Durch die Aminosäureanalyse konnte ein korrigierter Faktor für das jeweilige Fermentat ermittelt werden, indem der durchschnittliche Stickstoffgehalt der tatsächlich vorliegenden Aminosäuren berechnet wurde. Dieser hängt vom Anteil derjenigen Aminosäuren ab, die mehr als ein N-Atom haben (Arginin, Histidin, Lysin und Tryptophan) sowie dem jeweiligen Anteil des Stickstoffs an der Molaren Masse der Aminosäure. Der Faktor lag für CPHF_{FPI} bei 6,12 und für CPHF_{PSS} bei 6,20. Der ermittelte Rohproteingehalt für CPHF_{FPI} lag bei 17,5 g·100 g⁻¹ TM und für CPHF_{PSS} bei 22,1 g·100 g⁻¹ TM. Über den korrigierten Kjeldahlfaktor können so Berechnungsfehler umgangen werden, die den Stickstoffanteil im Protein betreffen. Hierbei wird allerdings nicht der Fehler berücksichtigt, der durch das Vorkommen von Nicht-Protein-Stickstoff Verbindungen entsteht. Diese können zu einer Überbestimmung des Proteins führen. Im Fall von Pilzmyzel trägt vor allem das Vorkommen von in der Zellwand gebundenem Chitin zu einer fehlerhaften Bestimmung des Proteins bei (Tshinyangu und Hennebert 1996; Di Mario et al. 2008). Weiterhin sind auch nicht-proteinogene Aminosäuren in Pilzen bekannt, die ebenfalls zu Verfälschungen führen können. Ein Vertreter ist das Ergothionein, welches *in vitro* antioxidative Eigenschaften zeigte und daher in den Fokus der Forschung gerückt ist (Berger et al. 2022; Cheah und Halliwell 2012). Der Kjeldahlfaktor ist zusätzlich abhängig vom Substrat, auf dem der Pilz wächst. Beispielsweise liegt der Faktor für ME_{FPI} mit 5,79 unter dem Faktor von CPHF_{FPI}, ebenso wie der Faktor für ME_{PSS} mit 5,94 unter dem von CPHF_{PSS} liegt.

Neben der Proteinmenge, die über die Nahrung zugeführt wird, ist auch die Qualität des Nahrungsproteins entscheidend. Die Proteinqualität wurde in der vorliegenden Arbeit über die Biologische Wertigkeit bestimmt. Diese gibt an, wie effektiv die Stickstoffbilanz im Körper durch eine definierte Menge an Nahrungsprotein erreicht werden kann, bzw. welche Menge an körpereigenem Protein aus 100 g Nahrungsprotein gebildet werden kann (WHO 2007). Bei

der in dieser Arbeit verwendeten Berechnung nach Oser (1959) handelt es sich um eine rechnerische Annäherung an die Biologische Wertigkeit, die auf Korrelationen zwischen *Essential Amino Acid Indices* (EAAI) und der wahren Biologischen Wertigkeit beruhen. Dieses vereinfachte System umgeht aufwändige Humanstudien zur Bestimmung von Proteinverdaulichkeits-Parametern, hat allerdings dafür eine größere Fehleranfälligkeit, da hierbei eine vollständige Verdauung der essentiellen Aminosäuren angenommen wird (Ihekoronye 1988). Eine genauere Methode, die von der FAO empfohlen wird, ist der *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score* (PDCAAS). Dieser Parameter berücksichtigt zusätzlich die Verdaulichkeit des Proteins (FAO 2013). In der Literatur wird für die qualitative Bewertung von Protein aus Pilzen der Abteilung Basidiomycota oftmals die Biologische Wertigkeit angegeben. Daher wurde dieser Parameter auch in dieser Arbeit verwendet. Zu beachten ist, dass das zur Berechnung verwendete Referenzprotein der FAO/WHO nur für erwachsene Personen gilt.

Die in der Literatur beschriebenen Biologischen Wertigkeiten von Pilzmyzel verschiedener Pilze der Abteilung Basidiomycota schwanken zwischen 60 für *Pleurotus djamor roseus* auf Isomaltulosemolasse, über 66 für *Lentinula edodes* auf Karottentrester, bis zu 86 für *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester (Zajul 2017; Ahlborn et al. 2019; Stephan et al. 2017). Die in dieser Arbeit ermittelten Biologischen Wertigkeiten von 96 für CPHF_{FPI} und 86 für CPHF_{PSS} liegen am oberen Rand bzw. deutlich über den in der Literatur gezeigten Daten. Auch im Vergleich zu anderen pflanzlichen Eiweißquellen und auch tierischen Eiweißquellen (außer Hühnerei) schneiden die Fermentate sehr gut ab (Tabelle 45). *P. salmoneo-stramineus* bildet eine vergleichsweise hohe Menge an Glutaminsäure bzw. Glutamin (18,5% der gesamten Aminosäuren gegenüber 11,9% bei *F. pinicola*, vgl. Tabelle 33). Da diese beiden Aminosäuren nicht zu den essentiellen Aminosäuren zählen, erhöht dieser Wert auch nicht die Biologische Wertigkeit. Während die Biologische Wertigkeit von *F. pinicola* auf CPH-Medium und auf ME-Medium gleich ist, zeigt der Unterschied zwischen ME_{PSS} (75) und CPHF_{PSS} (85) deutlich, dass die Aminosäureverteilung des vom Pilz gebildeten Proteins abhängig vom Medium ist. Die Biologische Wertigkeit von CPHF_{FPI} ist mit 96 enorm hoch. In der Literatur sind keine Parameter zur Proteinqualität von Myzel von *F. pinicola* beschrieben. Durch Berechnungen mit dem hier angewandten Modell der Aminosäureverteilung von Fruchtkörpern von *F. pinicola* ergibt sich eine Biologische Wertigkeit von 84 (Ding et al. 2006).

Tabelle 45: Vergleich von Biologischen Wertigkeiten verschiedener Proteinquellen.

Proteinquelle	BV	Literatur
<i>Pleurotus djamor roseus</i> auf Isomaltulosemolasse	60	(Stephan et al. 2017)
<i>Lentinula edodes</i> auf Karottentrester	66	(Zajul 2017)
Weizen	70	(Mitchell und Block 1978)
Rindfleisch/ Geflügelfleisch	80	(Stephan et al. 2017)
Soja	75	(Mitchell und Block 1978)
ME _{PSS}	75	-
<i>Pleurotus sapidus</i> auf Apfeltrester	86	(Ahlborn et al. 2019)
CPHF _{PSS}	86	-
CPHF _{FPI} / ME _{FPI}	96	-

Durch die Aminosäureverteilung kann zusätzlich der Reinproteingehalt bestimmt werden. Dieser gibt den wahren Proteingehalt an, ohne nicht-proteinogene Stickstoffverbindungen miteinzubeziehen. Dieser Wert kann zwar zur näheren Charakterisierung und Bewertung eines Produktes herangezogen werden, in der EU-Gesetzgebung ist der Rohproteingehalt allerdings ausreichend für die Nährwertdeklaration. Die Differenz zum Rohprotein nach Kjeldahl gibt damit Aufschluss darüber, wie hoch der Anteil an nicht-proteinogenen Stickstoffverbindungen in der Probe ist. Für CPHF_{FPI} liegt der Reinproteingehalt bei 10,6 g·100 g⁻¹ TM gegenüber einem Rohproteingehalt von 17,5 g·100 g⁻¹ TM, was einem Anteil von 61% Reinprotein am ermittelten Rohprotein entspricht. Für CPHF_{PSS} liegt der Reinproteingehalt bei 17,3 g·100 g⁻¹ TM gegenüber einem Rohproteingehalt von 22,1 g·100 g⁻¹ TM, was einem Anteil von 78% entspricht. Die Fermentate wurden auf ihren Chitingehalt untersucht. Der Anteil an Chitin im Rohprotein von CPHF_{FPI} lag bei 6%, der Anteil an Chitin im Rohprotein von CPHF_{PSS} bei 9%. Chitin trägt somit zur Differenz zwischen Roh- und Reinprotein bei, allerdings nicht als alleinige nicht-proteinogene Stickstoffquelle.

Um eine Gesamtbewertung beider Fermentate hinsichtlich des vorliegenden Proteins durchzuführen, ist das Zusammenspiel aus Proteinqualität und -quantität entscheidend. Für CPHF_{FPI} mit 10,6 g·100 g⁻¹ TM Reinprotein und einer Biologischen Wertigkeit von 96 könnten durch 100 g TM des Produktes insgesamt 10,2 g körpereigenes Protein gebildet werden. Für CPHF_{PSS} mit 17,3 g·100 g⁻¹ TM Reinprotein und einer Biologischen Wertigkeit von 86 liegt dieser hypothetische Wert bei 14,9. Wie bereits erwähnt ist zu beachten, dass bei dieser Berechnung die Bioverfügbarkeit des Proteins nicht mit einbezogen ist. Somit wäre in der Einzelbetrachtung CPHF_{PSS} als hochwertiger anzusehen. Möglich wäre auch eine Mischung beider Fermentate. Aufgrund dessen, dass in beiden Fermentaten Tryptophan die erste

limitierende Aminosäure ist, kann die Biologische Wertigkeit insgesamt nicht erhöht werden. Durch Zumischung von CPHF_{FPI} zu CPHF_{PSS} von 10 – 90% würde zwar die Biologische Wertigkeit ansteigen, allerdings bei gleichzeitiger Abnahme des Reinproteingehaltes (Tabelle 46).

Tabelle 46: Berechnete Parameter zur Proteinqualität von Mischungen aus CPHF_{FPI} und CPHF_{PSS}.

CPHF_{FPI} : CPHF_{PSS}	Reinprotein [g·100 g⁻¹ TM]	Biologische Wertigkeit	Körpereigenes Protein durch 100 g Produkt (TM)
10:90	16,7	86	14,4
20:80	16,0	87	13,9
30:70	15,3	88	13,5
40:60	14,7	89	13,1
50:50	14,0	91	12,7
60:40	13,3	92	12,2
70:30	12,6	93	11,7
80:20	12,0	94	11,3
90:10	11,3	95	10,7

Für die hier berechneten und gezeigten Werte hinsichtlich der Aminosäureverteilung kritisch zu betrachten sind die Wiederfindungsraten der einzelnen Aminosäuren durch die verwendete hausinterne Analysenmethode. In Zusammenarbeit mit Janin Pfeiffer wurde ein Testprotein mit der Methode untersucht und die Wiederfindungen berechnet. Die Wiederfindungen aller Aminosäuren, die über den Versuchsansatz der Gesamtaminosäuren bestimmt werden, lagen zwischen 76,11 und 107,06% und können daher als wenig problematisch angesehen werden. Die Aufarbeitungsmethode der schwefelhaltigen Aminosäuren mit vorheriger Oxidation führte zu Wiederfindungsraten von 76,23% für Cystein und 63,34% für Methionin. Die Aufarbeitungsmethode mit basischer Hydrolyse für Tryptophan führte lediglich zu einer Wiederfindung von 21,52% (Tabelle 47). In Anbetracht dessen, dass Tryptophan, Cystein und Methionin zur Berechnung der Biologischen Wertigkeit herangezogen wurden und diese maßgeblich als limitierende Aminosäuren angegeben wurden, ist eine erneute Validierung des Verfahrens zur verlässlichen Bewertung von Proteinqualitäten unbedingt erforderlich. Für die hier bewerteten Fermentate ergibt sich daraus wahrscheinlich eine Unterbestimmung der genannten Aminosäuren und somit auch eine niedrigere Angabe für die Biologische Wertigkeit.

Tabelle 47: Wiederfindungen aller Aminosäuren.

Aminosäure	AS-Gehalt [g·100 g ⁻¹]	WFR [%]
ALA	1,81 ± 0,12	96,06 ± 6,56
ARG	1,00 ± 0,06	81,39 ± 5,21
ASP	16,70 ± 1,01	84,99 ± 5,12
CYS	5,17 ± 0,34	76,23 ± 5,04
GLU	12,16 ± 0,71	89,56 ± 5,25
GLY	2,73 ± 0,19	85,93 ± 6,03
HIS	3,23 ± 0,21	98,25 ± 6,39
ILE	5,63 ± 0,39	76,11 ± 5,27
LEU	10,44 ± 1,01	86,73 ± 8,40
LYS	10,69 ± 0,89	86,36 ± 7,16
MET	0,67 ± 0,05	63,34 ± 5,01
PHE	4,27 ± 0,30	91,70 ± 6,42
PRO	1,74 ± 0,13	107,06 ± 7,70
SER	4,33 ± 0,30	83,49 ± 5,87
THR	5,07 ± 0,35	86,18 ± 6,02
TRP	1,24 ± 0,08	21,52 ± 1,45
TYR	4,25 ± 0,30	83,15 ± 5,83
VAL	3,70 ± 0,26	78,74 ± 5,20
Summe	95,04 ± 5,79	-

Insgesamt führte die Fermentation von CPH durch *F. pinicola* und *P. salmoneo-stramineus* in beiden Fällen zu einer deutlichen Steigerung des Proteinanteils von 7,7 in CPH auf 17,5 bzw. 22,1 g·100 g⁻¹ TM Rohprotein in CPHF. Im Fall von CPHF_{FPI} zeigte sich zusätzlich eine deutliche Steigerung der Biologischen Wertigkeit von 87 auf 96. Im Fall von CPHF_{PSS} zeigte sich eine vergleichbar hohe Biologische Wertigkeit von 86 bei einer Steigerung des Rohproteinanteils um 187%.

4.1.5.2 Fett- und Aschegehalt

Das Ausgangssubstrat CPH wies einen geringen Fettgehalt von 0,6 g·100 g⁻¹ TM auf. Der Fettgehalt erhöhte sich durch die Fermentation auf 1,2 (CPHF_{FPI}) bzw. auf 1,3 g·100 g⁻¹ TM (CPHF_{PSS}). Der Fettanteil in Fruchtkörpern verschiedener *Pleurotus*-Arten auf unterschiedlichen Nährmedien schwankt zwischen 1,43 und 4,07 g·100 g⁻¹ TM (Ali et al. 2007). Der Fettgehalt in Myzelien verschiedener *Pleurotus*-Arten liegt häufig in niedrigeren Bereichen und ist außerdem abhängig von der im Nährmedium zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle (Smiderle et al. 2012). Zurbano et al. (2017) gaben einen Fettgehalt von 1,7 g·100 g⁻¹ TM für auf verschiedenen Nebenströmen gewachsenes *P. salmoneo-stramineus* Myzel an. Die Fettsäureverteilung verschob sich durch die Fermentation hin zu einem höheren Anteil an PUFAs, hauptsächlich durch die Bildung von Linolsäure (44,64% bei CPHF_{FPI} und 63,95% bei CPHF_{PSS}). In CPH lagen nur 14,60% Linolsäure vor. Der Anteil an Palmitinsäure,

Stearinsäure und Ölsäure nahm durch die Fermentation deutlich ab. Linolsäure wird in vielen Pilzen der Abteilung Basidiomycota als Hauptfettsäure mit einem Anteil von bis zu 80% beschrieben. Prinzipiell können ungesättigte Fettsäuren für Pilze hilfreich sein, sich an niedrigere Wachstumstemperaturen zu adaptieren, da ein höherer Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei niedrigeren Temperaturen einer Verfestigung der Membran entgegenwirkt (Gutiérrez et al. 2002). Insgesamt stieg der Anteil an ungesättigten Fettsäuren durch die Fermentationen an, was hinsichtlich ernährungsphysiologischer Eigenschaften positiv zu bewerten ist.

Linolsäure und andere ungesättigte Fettsäuren spielen unter anderem eine Rolle beim Ligninabbau. Sie werden im Anfangsstadium der Fermentation durch den Pilz gebildet und ans Medium abgegeben. Initiiert durch Mangan-Peroxidasen werden sie anschließend peroxidiert, wobei die hierdurch entstandenen Peroxyradikale lignocelluloseartige Strukturen angreifen können (Enoki et al. 1999; Cunha et al. 2010).

Der Aschegehalt im Ausgangssubstrat lag bei $9,9 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ und verringerte sich in den Fermentaten auf $5,9 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ (CPHF_{FPI}) bzw. $8,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ (CPHF_{PSS}). Die Fermentation in Submers-Kultur stellt gleichzeitig eine wässrige Extraktion des Substrats dar, wodurch unter anderem Mineralstoffe ausgewaschen werden können (Achi et al. 2017). Dies kann eine Erklärung für die Abnahme des Aschegehaltes sein. Gleichzeitig bioakkumulieren Pilze Mineralstoffe über ihr Myzel (Michelot et al. 1998). Diese Bioakkumulation ist sowohl Spezies- als auch Substrat-abhängig. Natürliche, organische Medien führen dabei zu höheren Mineralstoffgehalten im Pilz als synthetische Medien (Manu-Tawiah und Martin 1987). Die unterschiedlichen Aschegehalte beider Fermentate könnten entweder auf unterschiedliche Nachwaschzeiten bei der Ernte zurückzuführen sein, oder auf unterschiedlichen Bioakkumulationsraten beider Pilze der in CPH vorliegenden Mineralstoffe beruhen. Den größten Anteil des Mineralstoffgehaltes in CPH macht Kalium aus, gefolgt von Calcium und Magnesium (Vriesmann et al. 2011). Über die Bioakkumulation von Mineralstoffen durch *F. pinicola* ist in der Literatur nichts bekannt. Gabriel et al. (1996) wiesen allerdings eine hohe Bioakkumulation des toxischen Schwermetalls Cadmium durch Myzel von *F. pinicola* nach. Jasinska et al. (2022) untersuchten Fruchtkörper von *P. salmoneo-stramineus*, gewachsen auf einem Medium aus Lebensmittelabfällen. Sie zeigten, dass vor allem Kalium, Calcium, Magnesium und Natrium vom Pilz bioakkumuliert werden. Generell spielen Mineralstoffe eine wichtige Rolle in der menschlichen Ernährung, da ihre Zufuhr über die Nahrung essentiell ist. Eine genaue Aussage über den ernährungsphysiologischen Nutzen der Fermentate hinsichtlich ihrer Mineralstoffe kann nicht getroffen werden, da die Zusammensetzung nicht näher untersucht wurde. Im Allgemeinen sind Pilze aufgrund ihrer Bioakkumulation gute Lieferanten für Mengen- und Spurenelemente (Mallikarjuna et al. 2013).

4.1.5.3 Ballaststoffe und Lignin

Die Ballaststoffe wurden in dieser Arbeit nach der AOAC Methode 991.43 untersucht. Dabei wurde eine getrennte Untersuchung der löslichen und unlöslichen Ballaststoffe durchgeführt. Durch die Fermentation änderte sich das Verhältnis von löslichen zu unlöslichen Ballaststoffen. In CPH lagen 88% unlösliche Ballaststoffe und 12% lösliche Ballaststoffe vor. In den Fermentaten konnten keine löslichen Ballaststoffe mehr nachgewiesen werden. Durch die Ernte, bei der der Rückstand von der wässrigen Phase abgetrennt wird, gehen wasserlösliche Komponenten verloren. Zur Gruppe der löslichen Ballaststoffe in CPH zählt vor allem Pektin. Wasserlösliche Pektine können wässrig unter Hitzeeinwirkung gut extrahiert werden. Vriesmann et al. (2012) extrahierten bis zu 12,6% Pektin durch wässrige Extraktion bei 100 °C. Das Autoklavieren des CPH-Mediums vor der Fermentation stellt somit eine Erklärung für den Verlust der Fraktion der löslichen Ballaststoffe dar. Pektin ist ein wertvoller Inhaltsstoff der CPH, der in diesem Fermentationsansatz verloren geht. Eine Rückgewinnung aus der wässrigen Phase ist denkbar. Die Verwendung von Pektin aus CPH ist bereits patentiert (Bernaert et al. 2020). Der Ballaststoffanteil in den Fermentaten setzt sich aus nicht verwerteten Ballaststoffen der CPH sowie Ballaststoffen aus dem gebildeten Pilzmyzel zusammen. Ballaststoffe aus Pilzen der Abteilung Basidiomycota bestehen zum größten Teil aus unlöslichen Ballaststoffen, wobei β -Glucane und Chitin den größten Anteil dieser Fraktion ausmachen (Zhao et al. 2022).

Chitin wurde in beiden Fermentaten nachgewiesen (2,8 g·100 g⁻¹ TM in CPH_{FPI} und 4,6 g·100 g⁻¹ TM in CPH_{PSS}). Kaya et al. (2015) gaben einen Chitingehalt von 30% in der TM für Fruchtkörper von *F. pinicola* an. Ob dieser Anteil auf Myzel von *F. pinicola* übertragbar ist, kann nicht mit Sicherheit angenommen werden, da sich der Chitinanteil zwischen Fruchtkörper und Myzel abhängig von der Spezies unterscheiden kann (Nitschke et al. 2011). Der hohe Wert lässt allerdings auch einen hohen Chitinanteil in der Zellwand des Myzels vermuten. Das könnte auch die hohe Diskrepanz zwischen Rohprotein nach Kjeldahl und Reinproteingehalt erklären (vgl. 4.1.5.1). Der Chitingehalt von Fruchtkörpern verschiedener *Pleurotus*-Arten wird mit 0,8 – 5,5% in der TM angegeben, wobei der direkte Vergleich zwischen Fruchtkörper und Myzel von *Pleurotus ostreatus* einen höheren Gehalt im Myzel zeigt (Zhao et al. 2022; Vetter 2007). Chitin wird vom Menschen nahezu unverdaut wieder ausgeschieden, kann aber eine präbiotische Funktion haben (Halloran et al. 2018). β -Glucane wurden in den Fermentaten nicht untersucht, aber in den Fruchtkörpern von *F. pinicola* und verschiedenen *Pleurotus*-Arten bereits nachgewiesen (Proserpio et al. 2019). Wie viele andere Parameter ist auch der β -Glucangehalt spezies- und substratabhängig (Shimizu et al. 2003; Manzi et al. 2004). Ihr Gehalt beträgt zwischen 38 und 53 mg·100 g⁻¹ TM in verschiedenen *Pleurotus*-Arten und ihnen werden gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, wie beispielsweise eine

antikarzinogene und immunstimulierende Wirkung und die Mitwirkung am Fettstoffwechsel, wobei der Gesamtcholesteringehalt im Blut gesenkt werden kann (Rop et al. 2009).

Auffällig war die Erhöhung des Ligninanteils in den Fermentaten im Vergleich zu den CPH mit $27,4 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$. Der Anteil in den Fermentaten lag bei $45,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ für CPH_{FPI} bzw. bei $43,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ TM}$ für CPH_{PSS}. Aufgrund des Biomasseverlusts durch den Erntevorgang, bei dem wasserlösliche Komponenten wie Pektin und Zucker verloren gehen, erhöht sich der Anteil der verbleibenden Komponenten prozentual. Bei der Betrachtung des absoluten Ligningehaltes, der auf ein Fermentationsvolumen von 200 mL und nicht auf 100 g Endprodukt bezogen war, zeigte sich ein Abbau von Lignin um 8% durch *F. pinicola* und um 16% durch *P. salmoneo-stramineus*. Bei *P. salmoneo-stramineus* handelt es sich um einen Weißfäulepilz. Weißfäulepilze sind in der Lage, Lignin durch verschiedene Enzyme, wie Häm-Peroxidasen (Lignin-, Mangan- und versatile Peroxidasen) und Phenoloxidasen (Laccasen) abzubauen. Peroxidasen verwenden dabei Wasserstoffperoxid als Co-Substrat während Laccasen molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzen (Dashtban et al. 2010). Das Vorkommen von Lignin- und Manganperoxidasen wurde für den Pilz *P. salmoneo-stramineus* nachgewiesen. Die jeweiligen Enzymaktivitäten waren dabei auf CPH-Medium deutlicher höher als auf ME-Medium, oder auf ME-Medium gar nicht vorhanden. Shi et al. (2021) zeigten ebenfalls, dass die Zugabe von ligninhaltigen Strukturen zu den Kulturen die Enzymaktivitäten steigern kann. Hingegen wurde in der Literatur auch beschrieben, dass eine höhere Proteinverfügbarkeit im Medium den Ligninabbau limitieren kann (Jung et al. 1992; Rouches et al. 2016). Es könnte untersucht werden, ob der Ligninabbau verbessert werden kann, indem die Stickstoffsupplementierung weggelassen wird und wie sich dies wiederum auf den Proteingehalt im Endprodukt auswirkt. In Braunfäulepilzen hingegen wurden zwar bereits Lignin-abbauende Enzyme nachgewiesen (Knežević et al. 2013), der Hauptabbauweg von lignocellulosehaltigem Material erfolgt allerdings über die Fenton-Reaktion. Hierbei wird vor allem Cellulose angegriffen, es kann aber auch zu Modifikationen am Lignin kommen (Lundell et al. 2010). In den CPH-Kulturen von *F. pinicola* konnten keine Lignin- und Manganperoxidaseaktivitäten nachgewiesen werden. Die hier nachgewiesenen Enzymaktivitäten in Verbindung mit dem partiellen Ligninabbau bei Betrachtung der absoluten Ligninmengen in den Fermentationsansätzen spielen für das Endprodukt nur eine untergeordnete Rolle. Diese Ergebnisse ändern nichts an dem hohen Ligningehalt in den hier erzeugten Fermentaten, welcher einen Einsatz in Lebensmittel erschwert.

4.1.5.4 Upscaling

Bei den Upscaling-Ansätzen im 5 L Bioreaktor konnte die Fermentation mit *P. salmoneo-stramineus* erfolgreich durchgeführt werden. Die Bio-Trockenmasse und der Pilzanteil waren

vergleichbar mit den Ansätzen im Schüttelkolben. Die Luftzufuhr und die Rührergeschwindigkeit wurden schrittweise erhöht, um Sauerstoff in das Medium einzubringen. Die Fermentation mit *F. pinicola* führte allerdings nicht zu vergleichbaren Ergebnissen mit den Schüttelkolben-Ansätzen. Auffällig war der extrem hohe Sauerstoffverbrauch innerhalb der ersten 36 h. Auch durch die schrittweise Erhöhung der Luftzufuhr und der Rührergeschwindigkeit konnte die Sauerstoffsättigung im Medium nicht über einen längeren Zeitraum auf einem Niveau von > 20% gehalten werden. Die Biomasseproduktion von Pilzen ist abhängig von der Sauerstoffsättigung im Medium (Jensen 1967). Eine unzureichende Sauerstoffversorgung könnte das frühe Absterben des Pilzes und somit die niedrige Bio-Trockenmasse und den niedrigen Pilzanteil erklären. Für eine großtechnische Anwendung könnte eine Optimierung der Parameter im Bioreaktor erfolgen. Eine Anpassung der Luftzufuhr sowie der Rührergeschwindigkeit könnte zu einer gesteigerten Biomasseproduktion führen. In der Verfahrenstechnik der Myzelproduktion in Bioreaktoren spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, wie die Art des Bioreaktors, die Belüftung und die Art sowie die Geschwindigkeit des Rührers (Rafiee et al. 2021). Durch das Rühren werden Scherkräfte auf das Myzel ausgeübt, wodurch es zu einem ungleichmäßigen Wachstum oder zur Schädigung der Zellen kommen kann (Park et al. 2002; Rafiee et al. 2021). Dieser Parameter wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und stellt einen deutlichen Unterschied zur Kultivierung in Schüttelkolben dar. Es wurde lediglich eine Rührerart verwendet (*Flat-Blade*). Diese Rührerart übt im Gegensatz zu anderen Rührerarten, wie beispielsweise *Pitched-Blade* Rührern, höhere Scherkräfte aus. Neben der niedrigen Sauerstoffsättigung könnte auch dies zu einem schlechteren Wachstum von *F. pinicola* geführt haben. Für eine mögliche großtechnische Anwendung ist die Optimierung der Fermentationen im Bioreaktormaßstab unumgänglich.

4.1.6 Mögliche Anwendungen im Lebensmittelbereich

Scholtmeijer et al. (2023) fassten die Möglichkeiten zur Anwendung von Myzel von Speisepilzen in Lebensmitteln in vier Kategorien zusammen: die Verarbeitung des Myzel-Substrat-Komplexes als Ganzes, das vom Substrat abgetrennte Myzel, das aus dem Myzel extrahierte Protein und das vom Pilz sekretierte Protein. Die hierin ausgeführten Varianten sind für Festbettfermentationen beschrieben, können aber ebenso für Flüssigfermentationen nach der Ernte angewendet werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Aufwertung von CPH durch eine Pilzfermentation, sodass diese für die menschliche Ernährung eingesetzt werden können. Relevante Parameter waren dabei die Erhöhung des Proteinanteils sowie der Abbau von Lignocellulose. Aufgrund des hohen Ligningehaltes der Fermentate von > 40% wäre ein Einsatz dieser Produkte in Lebensmitteln ernährungsphysiologisch nicht sinnvoll. Zwar sind in Lebensmitteln kleine Mengen Lignin enthalten, welchen auch gesundheitsfördernde

Eigenschaften zugeschrieben werden, allerdings ist der Anteil in den hier erzeugten Fermentaten deutlich zu hoch (Vinardell und Mitjans 2017). Dieser bewegt sich auch nach der Fermentation im Rahmen von Lebensmittelnebenströmen wie Kokosnussschalen mit 48%, Haselnussschalen mit 43% oder Pfirsichkernen mit 41% (Rossberg et al. 2015; Demirbaş 1997; Manara et al. 2014; Tao et al. 2020). Der Proteinanteil hingegen wurde durch die Fermentationen deutlich gesteigert. In Anbetracht der hohen Biologischen Wertigkeit des Proteins aus den Fermentaten und dem hohen Ligninanteil, wodurch auch die Textur des Produktes negativ beeinflusst werden kann, ist die Isolierung des Proteins aus dem Myzel-Substrat-Komplex eine sinnvolle Alternative. Für die Isolierung von Protein sind verschiedene Verfahren beschrieben, wie enzymatische Behandlungen, *Pulsed Electric Field*-Extraktion oder chemische Extraktionsmethoden (Scholtmeijer et al. 2023). Die Proteinisolierung ist abhängig von mehreren Faktoren, insbesondere vom pH-Wert, der Wahl des Extraktionsmittels und dem Extraktionsmittel-Produkt-Verhältnis (Jarpa-Parra et al. 2014; Firatligil-Durmus und Evranuz 2010; González et al. 2021). González et al. (2021) entwickelten ein Proteinkonzentrat aus Fruchtkörpern von *Pleurotus ostreatus*, verarbeitet zu einem Mehl, bei optimierten Bedingungen von pH 12 und einem Extraktionsmittel-Mehl-Verhältnis von 20:1 (v/w). Dabei zeigten sie auch, dass die *in vitro* Verdaulichkeit des Proteinkonzentrats 4,2-fach höher war als die des Fruchtkörpermehls selbst. Für die Proteinisolierung der hier entwickelten Fermentate müssten zunächst die optimalen Bedingungen untersucht werden. Durch den hohen Anteil der lignocellulose-reichen Schalenreste könnte die Isolierung erschwert werden. Scholtmeijer et al. (2023) wiesen außerdem darauf hin, dass bei der Proteinisolierung von Myzel-Substrat-Komplexen auch Proteine aus den Substratresten mitisoliert werden können. Dies stellt in diesem Fall kein Problem dar, da die CPH selbst ein hochwertiges Protein aufweisen und auch im Verbund zusammen mit dem Myzel anhand ihrer Biologischen Wertigkeit beurteilt wurden.

Bei dieser Vorgehensweise bleibt erneut ein großer Anteil an ungenutzter Biomasse zurück, bei dem es sich im Wesentlichen um Kakaofruchtschalenreste handelt. Da es durch Flüssigfermentation durch Pilze der Abteilung Basidiomycota nicht möglich war, den Ligninanteil so weit zu reduzieren, dass die CPH im Lebensmittelbereich eingesetzt werden konnten, könnte die Restbiomasse nach Proteinisolierung zur Ligningewinnung eingesetzt werden. Lignin-Isolierungen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, wobei Lignin entweder extrahiert wird, wie beispielsweise beim Kraft Lignin, gewonnen durch die Extraktion mittels Natronlauge und Natriumsulfid, oder im Rückstand verbleibt, wie beim Klason-Lignin, gewonnen durch Behandlung des Materials mit konzentrierter Schwefelsäure (Tao et al. 2020). Mögliche Einsatzmöglichkeiten von Lignin reichen von der Kraftstoffherstellung über den Einsatz in Beschichtungen bis hin zu Kohlefilter-Verbundwerkstoffen (Nadányi et al. 2022). Zwar konnte durch die Fermentationen nur ein geringer Ligninabbau erzielt werden, allerdings

sind sowohl Weiß- als auch Braunfäulepilze für ihre Fähigkeit bekannt, Lignin zu modifizieren. Die Art der Modifizierung ist dabei sowohl vom Ausgangsprodukt als auch davon abhängig, ob Weiß- oder Braunfäulepilze eingesetzt werden (Lundell et al. 2010; Yelle et al. 2008). Durch unterschiedliche Modifikationen ergeben sich auch verschiedene Anwendungen (Nadányi et al. 2022). Da in dieser Arbeit keine genaueren Untersuchungen hinsichtlich der Modifizierungen durch die Fermentationen vorgenommen wurden, kann keine weitergehende Aussage über die Anwendbarkeit des Lignins aus dem Fermentat getroffen werden. Insgesamt ist die wirtschaftliche Nutzung von Lignin begrenzt.

4.1.7 Aspekte der Lebensmittelsicherheit

Für die in dieser Arbeit erzeugten Fermentate sind einige Punkte hinsichtlich lebensmittelrechtlicher und lebensmittelsicherheitstechnischer Aspekte zu berücksichtigen. Gemäß VO (EU) 2015/2283 handelt es sich bei Myzel von Pilzen der Abteilung Basidiomycota um ein neuartige Lebensmittel im Sinne von Art. 3 Abs. 2 Nr. ii) Lebensmittel, die aus Mikroorganismen, Pilzen oder Algen bestehen oder daraus isoliert oder erzeugt wurden. Einzelne Produkte dieser Kategorie wurden bereits als *Novel Food* zugelassen, wie mit Myzelien des Shiitake-Pilzes fermentiertes Erbsen- und Reisprotein für den Einsatz in unter anderem Backwaren und Kakao- und Schokoladenerzeugnissen, oder Myzel von *Antrodia camphorata* als Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene. Weiterhin ist zum jetzigen Stand auch ein Myzelauszug aus dem Shiitake-Pilz für unter anderem Brotprodukte oder Erfrischungsgetränke zugelassen (VO (EU) 2017/2470). Für die Verwendung anderer Pilze wäre somit jeweils ein gesonderter Antrag gemäß Art. 10 – 12 VO (EU) 2015/2283 zu stellen. Zulassungsanträge müssen dabei Informationen über die Beschreibung des Lebensmittels, Verwendungszwecke, Zusammensetzung und Toxikologie enthalten. Über den Zulassungsantrag bzw. die Sicherheit des *Novel Foods* entscheidet letztendlich die Europäische Kommission unter Beteiligung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (Turck et al. 2016). Bei den in dieser Arbeit erzeugten Produkten ist außerdem zu beachten, dass CPH selbst als *Novel Food* eingestuft werden könnten, da diese laut jetzigem Kenntnisstand nicht in nennenswertem Umfang vor dem 15. Mai 1997 verzehrt wurden (VO (EU) 2015/2283). Eine Einreichung eines Antrags zu CPH ist nicht bekannt.

Essbare Speisepilze können auch Toxine enthalten. Berger et al. (2022) diskutierten das Vorkommen von Agaritin, einem Phenylhydrazinderivat, und Ostreolysin A, einem zytolytischen Protein. Während das Vorkommen von Agaritin auf Pilze der Gattung *Agaricus* beschränkt ist (Stijve und Pttet 2000), wird Ostreaolysin A von *Pleurotus ostreatus* gebildet, einem nahen Verwandten von *Pleurotus salmoneo-stramineus* (Ota et al. 2013). Über die Bildung solcher Toxine in Pilzmyzel ist in der Literatur nichts beschrieben. Da viele dieser

Toxine nicht hitzestabil sind, sollte für die Verarbeitung von Pilzmyzel zu Lebensmitteln immer eine thermische Behandlung einbezogen werden. Genauere Studien wären allerdings bei einem *Novel Food* Antrag unumgänglich und würden auch eine toxikologische Bewertung für das Pilzmyzel des jeweiligen Pilzes miteinbeziehen.

Auch mögliche Rückstände und Kontaminanten in CPH sind näher zu betrachten. Cadmium ist eine Kontaminante, die im Zusammenhang mit der Kakaoindustrie in den letzten Jahren Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat. Cadmium kann geogen vorhanden sein oder durch anthropogene Einflüsse in die Böden eingetragen werden. Es wird über die Wurzeln aus dem Boden aufgenommen und anschließend in alle Teile der Pflanze verteilt (Vanderschueren et al. 2021). Cadmium weist eine hohe Nierentoxizität auf und wurde zusätzlich als kanzerogen eingestuft (Hartwig 2010). Die nachgewiesenen Gehalte an Cadmium in CPH sind mit bis zu $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vergleichbar hoch wie in Kakaobohnen, nur der Gehalt in der Bohnenschale ist noch höher. Zwar ist der Cadmiumgehalt abhängig von der Anbauregion und dem jeweiligen Boden, allerdings kann ein hoher Cadmiumgehalt in CPH nicht ausgeschlossen werden (Vanderschueren et al. 2021). Dieser müsste vor Nutzung im Lebensmittelbereich in jedem Fall untersucht werden.

Die Anwendung von Pestiziden im Kakaoanbau, insbesondere Insektiziden und Fungiziden, ist üblich (Awudzi et al. 2022; Danso-Abbeam und Baiyegunhi 2017). Gemäß VO (EG) Nr. 396/2005 sind für fermentierte oder getrocknete Kakaobohnen nach Entfernen der Bohnenschale Rückstandshöchstmengen von Pestiziden festgelegt, um ein hohes Verbraucherschutzniveau sicherzustellen. Da Kakaofruchtschalen nicht als Lebensmittel gelten, gibt es auch keine Vorschriften zu Rückstandshöchstmengen von Pestiziden. Durch gängige Applikationstechniken, bei denen die Kakaobäume oberflächlich durch Sprühen behandelt werden, ist davon auszugehen, dass die Pestizidgehalte auf der Oberfläche der Fruchtschalen deutlich höher sind, als in den Kakaobohnen. Bei der Untersuchung der Insektizide Imidacloprid, Thiamethoxam und Acetamiprid in Bohnen und Bohnenschalen wurden durchweg höhere Gehalte in den Bohnenschalen als in den Bohnen nachgewiesen. In einzelnen Fällen wurden die Stoffe auch nur in den Bohnenschalen nachgewiesen (Dankyi et al. 2015). Diese Daten implizieren eine Abnahme der Rückstandsmengen vom äußeren zum inneren Teil der Kakaofrüchte. Auch Vertreter der stark umstrittenen Gruppe der Organochlorpestizide, wie Hexachlorcyclohexan, Aldrin und Endrin, wurden in Kakaofrüchten nachgewiesen. Dabei überstiegen die Gesamtgehalte dieser Verbindungen in den Fruchtschalen die Werte der Bohnen deutlich. Es wurden Gesamtgehalte von bis zu $10,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ nachgewiesen (Idowu et al. 2022). Für jegliche Verwendungen von CPH im Lebensmittelbereich ist daher zu beachten, dass eine Bewertung hinsichtlich Pestizidrückständen durchzuführen wäre. Detaillierte Daten zu Rückstandsmengen von Pestiziden auf Kakaofruchtschalen sind nicht bekannt.

4.1.8 Ausblick

Der Einsatz von Pilzmyzel im Lebensmittelbereich als alternative Proteinquelle erfuhr gerade in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit. Verschiedene Start-Ups, wie Mycorena oder Mushlabs konzentrieren sich auf die Herstellung von Myzel aus Speisepilzen und werden vermutlich in naher Zukunft die ersten Produkte auf den Markt bringen. Die Verwendung von agroindustriellen Nebenströmen in Nährmedien kann dabei gleichzeitig eine Kostenersparnis bringen und zu einer nachhaltigeren Lebensmittelproduktion beitragen. Die hierfür eingesetzten Nebenströme müssen allerdings auch für die entsprechende Anwendung geeignet sein. Die hier durchgeführte Flüssigfermentation nach Stickstoffsupplementierung mit zwei verschiedenen Pilzen führte zwar zu einer deutlichen Erhöhung des Proteingehaltes, aber nicht zu einem zufriedenstellenden Abbau von Lignin. Erste Anwendungsversuche des Fermentats CPHF_{PSS} in Brotteig zeigten, dass der Ersatz von Mehl zwischen 2,5 und 10% einen Einfluss auf die Härte und Elastizität des Teiges hat (Bickel Haase et al. 2023). Dieser Einfluss kann auf den hohen Ballaststoff- bzw. Ligningehalt im Fermentat zurückgeführt werden. Trotzdem kann auch durch den geringen Einsatz des Fermentats der Nährwert von Brot verbessert werden. Delgado-Ospina et al. (2021) untersuchten den Einsatz nicht fermentierter Kakaofruchtschalen in Frankfurter Würstchen. Sie wiesen bei einem Einsatz zwischen 1,5 – 3% ebenfalls einen Einfluss auf die Textur und auf sensorische Eigenschaften nach, wobei die Proben im Allgemeinen positiv bewertet wurden. Beide Ansätze sind allerdings keine Lösung für eine Verwendung von Kakaofruchtschalen im größeren Maßstab.

Neben der unter 4.1.6 beschriebenen Möglichkeit, die Proteine aus den Fermentaten zu isolieren und in Lebensmitteln einzusetzen, könnte weiterhin die Substratumsetzung durch eine Festbettfermentation untersucht werden. Festbettfermentationen von lignocellulosehaltigen Nebenströmen durch Pilze der Abteilung Basidiomycota sind vor allem im Bereich der Futtermittel beschrieben (Tripathi et al. 2008; Laconi und Jayanegara 2015). Während der Ligningehalt durch diese Art von Behandlung häufig deutlich abnimmt, erfolgt nur eine geringe Erhöhung des Proteingehaltes. Eine siebentägige Festbettfermentation von Kakaofruchtschalen durch *Phanerochaete chrysosporium* erzielte einen Ligninabbau von ca. 20% bei einer Proteinsteigerung von lediglich 19% (Laconi und Jayanegara 2015). Durch eine 14-tägige Festbettfermentation von Weizenstroh durch *Dichomitus squalens* konnte ein Ligninabbau von 35% erzielt werden (Knežević et al. 2013). Im vorliegenden Fall müsste die gebildete pilzliche Biomasse, der Ligninabbau sowie der Proteingehalt von Festbettkulturen untersucht und mit den Ergebnissen der Submers-Kultivierung verglichen werden, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine Verbesserung des Nährwerts der Schalen durch Festbettfermentation möglich wäre. Für die Untersuchungen wurden die drei CPH-Sorten SUL 1, SUL 2 und MCC02 ausgewählt, wobei in allen Ansätzen SUL 1 verwendet wurde.

Aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Zusammensetzung der drei Sorten kann von einer sehr guten Übertragbarkeit auf SUL 2 und MCC02 ausgegangen werden.

Insgesamt ist weitere Forschung notwendig, um die Kakaofruchtschalen erfolgreich in der menschlichen Ernährung einzusetzen. Die chemische Zusammensetzung, insbesondere der hohe Faseranteil und der niedrige Nährwert machen einen Einsatz schwierig, sowohl im direkten Einsatz für Lebensmittel, als auch für eine effiziente Pilzfermentation.

4.2 Fermentation von Kakaopulpe (KP) zur Erzeugung ansprechender Aromen

Im Gegensatz zu den Kakaofruchtschalen handelt es sich bei der Kakaopulpe nicht *per se* um einen Nebenstrom, sondern um ein qualitativ hochwertiges Produkt, das allerdings noch nicht im größeren Maßstab genutzt wird. Die Gewinnung neuartiger Produkte aus der Kakaopulpe ist ein vielversprechender Ansatz, um den Kakaoanbau nachhaltiger zu gestalten und den Wert der Kakaofrucht zu steigern (Vásquez et al. 2019).

Das Aroma spielt eine wichtige Rolle bei der Akzeptanz von Lebensmitteln. Zu den wichtigsten Werkzeugen der Aromaanalytik zählt die Identifizierung von Schlüsselaromastoffen und die *Off-Flavor*-Analytik. Die Identifizierung von *Off-Flavors* kann dabei helfen, Leitsubstanzen für einen mikrobiellen Verderb von Produkten zu entwickeln. So weist beispielsweise das Vorkommen von Guajacol oder Geosmin in Apfelsaft auf eine Kontamination durch *Alicyclobacillus acidoterrestris* hin (Zierler et al. 2004). Andererseits kann auch die Bestimmung von Schlüsselaromastoffen als Qualitätsnachweis eines Produktes dienen, beispielsweise von Schokolade (Toker et al. 2020). In den letzten Jahren gab es einen Trend zum Konsum von natürlichen Produkten für ein gesünderes und nachhaltigeres Leben (Kahraman und Kazançoğlu 2019). Zu diesem Trend zählt auch die erhöhte Nachfrage nach natürlichen Aromastoffen. Eine Möglichkeit, natürliche Aromastoffe zu gewinnen, ist die Extraktion aus Pflanzenmaterial. Diese Herangehensweise ist allerdings teuer und aufgrund vorkommender Ressourcen begrenzt (Berger 2007). Eine vielversprechende Alternative ist die biotechnologische Darstellung von natürlichen Aromastoffen durch Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze und Hefen. Diese Vorgehensweise ist Teil der Weißen Biotechnologie (Ben Akacha und Gargouri 2015). Pilze der Abteilung Basidiomycota sind aufgrund ihres einzigartigen extrazellulären Enzymsystems in den Fokus der Aromaforschung gerückt. Abhängig von der Spezies und dem zur Verfügung gestellten Nährsubstrat kann eine Vielzahl unterschiedlicher Aromastoffklassen über verschiedenste Synthesewege produziert werden (Püth et al. 2023; Brescia et al. 2021; Sommer et al. 2021).

Die Fermentation von Kakaopulpe mit Pilzen sollte der Generierung ansprechender Aromen bzw. der Aromatisierung dienen. Aufgrund ihres Aromaprofils und ihrer Inhaltsstoffe ist die Kakaopulpe ein vielversprechendes Ausgangssubstrat für eine Fermentation. In der Literatur ist zu diesem Ansatz bislang nichts bekannt. Die biotechnologische Darstellung von Aromastoffen durch Pilze der Abteilung Basidiomycota kann sowohl in Festbett- als auch in Submers-Kultur erfolgen. Eine Fermentation in Submers-Kultur hat den Vorteil, dass nach Abtrennung des Myzels direkt ein Getränk gewonnen werden kann (Zhang et al. 2015; Rigling et al. 2021).

4.2.1 Screening

Mittels Fermentation sollte ein neuartiges, natürlich aromatisiertes Produkt generiert werden. Im Plattenscreening wurde daher als wichtigster Bewertungsparameter der Geruch herangezogen. Zusätzlich wurde der Geruch auf Malzextrakt-Agarplatten als Referenz herangezogen, um eine substratabhängige Aromaentwicklung nachweisen zu können. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze war dabei zweitrangig.

Neben den vier ausgewählten *Laetiporus*-Arten, die durch ein starkes tropisch-fruchtiges Aroma auf KPA auffielen, bildete *Wolfiporia cocos* nach nur zwei Tagen ein blumiges, fruchtiges Aroma aus, das an Walderdbeere erinnerte. Durch Sommer et al. (2021) wurde dieser Aromaeindruck bereits aufgeklärt, wobei ebenfalls ein Walderdbeer-ähnliches Aroma durch eine Emers-Fermentation von Johannisbeertrester erhalten wurde. Als Schlüsselaromastoffe wurden (*R*)-Linalool, Methylantranilat, 2-Aminobenzaldehyd und Geraniol identifiziert. Für die vier *Laetiporus*-Arten wurde zuvor kein tropisch-fruchtiges Aroma beschrieben, außer das Vorkommen einzelner Kokosnuss-artigen Verbindungen (Yalman et al. 2023). In allen vier Fällen unterschied sich die Aromaausbildung deutlich zwischen KPA und MEA, was eine Substratabhängigkeit impliziert. Auch die Geruchseindrücke zwischen den vier *Laetiporen* unterschied sich in der Intensität des ausgeprägten Aromas und den Aromaeindrücken. Eine kokosartige Note konnte in Emers-Kultur nur bei *L. portentosus* wahrgenommen werden.

Um aus den vier *Laetiporen* den vielversprechendsten Stamm auszuwählen, wurden jeweils Submers-Kulturen angefertigt und diese in Abständen von 24 h für insgesamt fünf Tage sensorisch beurteilt. Zusätzlich wurden für jeden Erntetag der pH-Wert und der Oxalsäuregehalt bestimmt. Pilze der Gattung *Laetiporus* zählen zu den Braunfäule-Erregern, die während des Holzabbaus Oxalsäure bilden. Die Oxalsäure dient dabei der Komplexierung von Fe^{3+} -Ionen, wodurch diese in die Zellwand gelangen können. Im weiteren Verlauf wird Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert, welches mit H_2O_2 in der *Fenton*-Reaktion reagiert und Hydroxylradikale bildet. Diese sind maßgeblich für den Angriff von lignocellulosehaltigen Strukturen verantwortlich (Arantes und Goodell 2015). Das Vorkommen von Oxalsäure in Lebensmitteln ist kritisch zu betrachten, da es in hohen Konzentrationen gesundheitliche Nachteile mit sich bringen kann. So ist bekannt, dass Oxalsäure Calcium und andere Mineralstoffe bindet, was zu einer verminderten Bioverfügbarkeit führt, und dass es zur Bildung von Nierensteinen kommen kann (Noonan und Savage 1999). Für *L. sulfureus* wurde die Produktion von Oxalsäure bereits nachgewiesen (Takao 1965). Über die Kultivierungsdauer von 96 h zeigten *L. sulfureus* sowie *L. montanus* einen deutlichen Anstieg der Oxalsäurekonzentration zwischen 24 und 48 h bzw. zwischen 48 und 72 h, während *L. persicinus* und *L. portentosus* nur einen leichten bzw. keinen Anstieg zeigten (vgl. Abbildung 30). Der phylogenetische

Stammbaum der vier untersuchten *Laetiporen* zeigt eine nahe Verwandtschaft zwischen *L. sulfureus* und *L. montanus*, wohingegen *L. persicinus* und *L. portentosus* entfernter liegen (Lindner und Banik 2008; Ortiz-Santana et al. 2013). Diese Verwandtschaftsbeziehung könnte eine Erklärung für die unterschiedlich starke Oxalsäureproduktion sein. In Verbindung mit der sensorischen Beurteilung wurde *L. persicinus* für weitere Studien ausgewählt. Im Vergleich zu den anderen drei Pilzen schnitten die Kulturen durchweg gut ab, wobei erst nach 120 h ein leicht bitterer Geschmack wahrgenommen wurde. Beim direkten Vergleich der Oxalsäurekonzentrationen ist durch das Fermentat von *L. persicinus* keine gesundheitliche Beeinträchtigung zu erwarten. Über den Kultivierungszeitraum von vier Tagen schwankte der Oxalsäuregehalt zwischen 3 – 131 mg·L⁻¹. Sommer et al. (2023) wiesen in dem durch *Wolfiporia cocos* erzeugten Getränk 192 mg·L⁻¹ Oxalsäure nach und bewerteten das Getränk im Vergleich zu anderen oxalsäurehaltigen Lebensmitteln, wie Rhabarber oder Spinat, als für den menschlichen Verzehr geeignet.

4.2.2 Sensorische Beurteilung der Getränke im Panel

Um den optimalen Erntezeitpunkt für das Getränk zu finden, wurden Proben in einem zeitlichen Abstand von 12 h geerntet und in einem Sensorikpanel verkostet. Die Beschreibung des KP-Mediums mit den Attributen säuerlich, fruchtig, Citrus und Apfel stimmte mit der Beschreibung von Kakaopulpe in der Literatur überein, wobei diese als blumig, fruchtig, Honig, Citrus und tropisch beschrieben wurde (Bickel Haase et al. 2021). Die höchsten Intensitäten für die interessanten Aromaeindrücke süß, tropisch, Maracuja, Pfirsich, Mango, Kokos und Aprikose wurden nach 48-stündiger Fermentation erhalten. Für diese Fermentationsdauer wurden auch die höchste Bewertung bzw. Akzeptanz für den Geruch von 3,7/ 5,0 Punkten und für den Geschmack von 4,2/ 5,0 Punkten erhalten. Eine Verbesserung der Akzeptanz von durch Pilze der Abteilung Basidiomycota fermentierten Getränken wurde bereits in der Literatur beschrieben. Sommer et al. (2023) zeigten einen Anstieg der Gesamtakzeptanz von 2,5 auf 8,0/ 10,0 Punkten bei der Fermentation von Johannisbeertrester durch *Wolfiporia cocos* in Flüssigkultur. Wang et al. (2022) wiesen nach, dass die Fermentation von Okara mit Speisepilzen die Aromaqualität verbessern kann, indem *Off-flavor*-Komponenten reduziert und neue Aromastoffe gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit ging es nicht um die Maskierung von *Off-flavor*-Komponenten, sondern um die Aufwertung eines Nebenstroms, der zwar bereits aromatisch ansprechend ist, aber nicht in unbegrenzten Mengen zur Verfügung steht. Die Entwicklung neuartiger Produkte aus Kakaopulpe ist ein vielversprechender Ansatz für die Aufwertung von Kakaofrüchten, allerdings muss die Kakaopulpe nachhaltig eingesetzt werden. Der Anteil an frischer Kakaopulpe in Kakaofrüchten hängt von verschiedenen Faktoren ab, und kann zwischen 10 – 26% betragen (Dias et al. 2007; Tjinh et al. 2016). In

Anbetracht der Tatsache, dass ein Teil der Kakaopulpe notwendig für die Fermentation der Bohnen ist, kann auch nur ein Teil anderweitig verwendet werden, was die Menge der verfügbaren, frischen Kakaopulpe begrenzt. Im hier beschriebenen Ansatz wird ein hochwertiges Produkt mit sehr guter Gesamtakzeptanz aus lediglich 10% Kakaopulpe in Wasser gewonnen. Die sensorische Beurteilung zeigt dabei, dass die Akzeptanz ohne Fermentation deutlich niedriger wäre. In anderen Studien, in denen Kakaopulpe zur Herstellung von Bier oder Wein eingesetzt wurde, sind höhere Mengen notwendig. Zur Herstellung des Bieres mussten 30% frische Kakaopulpe eingesetzt werden, um eine höhere Akzeptanz zu erhalten (Nunes et al. 2020). Die Entwicklung des Fruchtweins startete ausgehend von 100% frischer Kakaopulpe, wobei nachträglich der °Brix mittels Saccharose-Lösung eingestellt wurde (Dias et al. 2007).

Die Carbonisierung des Getränks führte zu einer Verschlechterung der Gesamtakzeptanz, einer Verringerung des Süß-Empfindens, einer Steigerung des Säure-Empfindens, und zu einer Verringerung der entscheidenden Aromaeindrücke tropisch, Maracuja, Pfirsich, Mango und Kokos. Saint-Eve et al. (2010) wiesen nach, dass das stärkere Säure-Empfinden von carbonisierten gegenüber nicht-carbonisierten Getränken auf einen pH-Wert Abfall durch CO₂ herbeigeführt wird. Durch ein nachträgliches Einstellen des pH-Werts auf den Ausgangswert könnte die Intensität der Säure wieder aufgehoben werden. Die Daten in der Literatur zum Süß-Empfinden von Getränken durch Carbonisierung sind kontrovers, was auf eine Abhängigkeit der Zucker- und CO₂-Konzentration und die abnehmende Löslichkeit von CO₂ bei steigendem Zuckergehalt zurückzuführen ist (Saint-Eve et al. 2010; Descoins et al. 2006). Verschiedene Studien beschreiben eine intensiviertere Aromawahrnehmung in carbonisierten Getränken und eine damit erhöhte Akzeptanz (Saint-Eve et al. 2014; Saint-Eve et al. 2010; Sommer et al. 2023). In vorliegendem Fall konnte keine Verbesserung der Aromawahrnehmung durch eine Carbonisierung erzielt werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine Überlagerung der tropisch-fruchtigen Aromaeindrücke durch die starke Säure sein. Weiterhin wird in der Literatur eine Abhängigkeit der Aromaaktivität vom Luft-Wasser-Verteilungskoeffizienten beschrieben, wobei Aromastoffe mit höheren Werten zu einer Intensivierung des Aromas durch eine Carbonisierung führen (Clark et al. 2011). Durch das nachträgliche Entweichen von CO₂ können auch Aromastoffe verloren gehen (Körner 1996). Da im finalen Getränk viele Aromastoffe vorliegen, die nicht näher identifiziert werden konnten (vgl. 4.2.4), kann über einen möglichen Verlust in die Gasphase keine genaue Aussage getroffen werden. Insgesamt wurde eine Carbonisierung für das vorliegende Getränk nicht in Betracht gezogen.

4.2.3 Chemische Zusammensetzung des KP-Mediums und des finalen Getränks

Die analysierte chemische Zusammensetzung der Kakaopulpe mit einem Wassergehalt von 80%, 82,1 g·100 g⁻¹ TM reduzierenden Zuckern, 1,8 g·100 g⁻¹ TM Saccharose, 2,8 g·100 g⁻¹ TM Rohprotein, 5,7 g·100 g⁻¹ TM Ballaststoffen und 8,6 g·100 g⁻¹ TM organischen Säuren stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Pettipher 1986; Anvoh et al. 2009). Die chemische Zusammensetzung des KP-Mediums war eine zehnfache Verdünnung der Kakaopulpe. Die mikrobiologische Beschaffenheit der Kakaopulpe wurde über die Gesamtkeimzahl bewertet. Durch die vorherige Pasteurisierung konnten keine pilzlichen oder bakteriellen Kontaminationen festgestellt werden. Dies ist vorteilhaft, da die Pasteurisierung ein vergleichsweise schonendes Verfahren zur Haltbarmachung von Fruchtzubereitungen darstellt (Ağçam et al. 2018). Für das hier angewendete Fermentationsverfahren ist ein steriles Medium unumgänglich. Das Standardvorgehen wäre eine Sterilisierung durch Autoklavieren, was eine deutlich stärkere thermische Behandlung darstellt. Durch Hitzeeinwirkung kann es zu Aroma- und Farbveränderungen in Fruchtzubereitungen und -säften kommen (Wang et al. 2018). Ein Transport von frischer Kakaopulpe ist aufgrund der mikrobiologischen Belastung nur nach thermischer Stabilisierung oder Gefrierung möglich. Für eine großtechnische Anwendung in diesem Bereich ist die Pasteurisierung das Mittel der Wahl, um das Ausgangsprodukt so wenig behandelt wie möglich einsetzen zu können.

Die Zuckerkonzentration verringerte sich durch die 48-stündige Fermentation um 1,1 g·L⁻¹. Für ihr Wachstum nutzen Pilze einen Teil des Zuckers als Kohlenstoffquelle, um Biomasse und andere Substanzen zu erzeugen (Strijbis und Distel 2010). Mit insgesamt 13,4 g·L⁻¹ bzw. 1,34 g·100 mL⁻¹ Zucker liegt das Getränk deutlich unterhalb vieler Limonaden, Softdrinks, Säfte und fermentierter Getränke (Tabelle 48). Zuckerhaltige Getränke haben Einfluss auf die Übergewichtigkeit, Diabetesrate sowie die Karieshäufigkeit der Bevölkerung (Briggs et al. 2017). Vom gesundheitlichen Standpunkt ist die Reduzierung des Zuckeranteils in Getränken eine sinnvolle Maßnahme. Darunter sollten allerdings der Geschmack und die Akzeptanz des Getränks nicht leiden. Das in dieser Arbeit entwickelte Getränk ist zuckerarm und weist gleichzeitig eine hohe Akzeptanz bei den Testpersonen auf. Im Vergleich mit dem von Sommer et al. (2023) entwickelten fermentierten Getränk aus Johannisbeertrester, enthält das Kakaopulpe-Getränk 74% weniger Zucker.

Tabelle 48: Zuckergehalt verschiedener alkoholfreier Getränke; Gesamtzuckergehalt von Verpackung entnommen.

Getränk	Gesamtzucker [g·100 mL ⁻¹]
Cola, Fanta, Sprite	7,6 – 10,6
Apfelsaft	6,6 – 9,6
Limonade	gesetzlich ≥ 7,0
Fassbrause	6,2
fermentiertes Johannisbeertrester-Getränk	4,9 (Sommer et al. 2023)
fermentiertes Kakaopulpe-Getränk	1,3

Mittels GC-MS konnte kein Ethanol im Getränk nachgewiesen werden, sodass dieses als alkoholfrei bezeichnet werden kann. Der pro-Kopf-Alkoholkonsum nimmt stetig ab, was ebenfalls auf gesundheitliche Aspekte zurückgeführt werden kann (Statista Research Department 2023). Gleichzeitig vergrößert sich der Markt für alkoholfreie Getränke. Hierbei stehen fermentierte, alkoholfreie Getränke im Fokus, da sie aufgrund von erhöhter Haltbarkeit, verbesserten Geschmacks sowie der Assoziation zwischen Fermentation und gesundheitlichen Aspekten Vorteile bieten (Şanlıer et al. 2019).

Durch die Fermentation änderte sich die Konzentration an Citronen- und Essigsäure im Medium kaum. Milchsäure und Äpfelsäure hingegen wurden im KP-Medium selbst mit 12,1 bzw. 78,7 mg·L⁻¹ quantifiziert, konnten aber im finalen Getränk nicht mehr nachgewiesen werden. Milchsäurebakterien und Hefen nutzen Äpfelsäure während der malolaktischen Gärung (Volschenk et al. 2017). Es ist nicht auszuschließen, dass die organischen Säuren an Stoffwechselforgängen von *L. persicinus* beteiligt sind, und somit durch die Fermentation abgebaut werden. Die Bildung von Oxalsäure bewegt sich in einem Konzentrationsbereich, in dem keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen für den Verbraucher zu erwarten sind (vgl. 4.2.1).

4.2.4 Aromanalytische Untersuchungen des KP-Mediums und des fermentierten Getränks

4.2.4.1 Aromastoffe im KP-Medium

Das Vorkommen von Aromastoffen in Kakaopulpe hängt von verschiedenen Faktoren wie der Sorte und der Herkunft ab (Bickel Haase et al. 2021). Die in dieser Arbeit verwendete Kakaopulpe stammte aus Ecuador, die Sorte war allerdings unbekannt. Die Zusammensetzung der Aromastoffe in der Pulpe beeinflusst sowohl das Gesamtaroma des Mediums als auch die Bildung von Aromastoffen durch die Fermentation aufgrund der Anwesenheit verschiedener Präkursoren. Insgesamt wurden 37 aromaaktive Substanzen nachgewiesen, von denen 32 mittels Olfaktometrie detektiert und 32 zweifelsfrei identifiziert

werden konnten (vgl. Tabelle 40). Verglichen mit in der Literatur beschriebenen Aromaprofilen von Kakaopulpe wurden 27 der 32 abschließend identifizierten Substanzen bereits beschrieben (Bickel Haase et al. 2021). Ethylacetat, Acetoin, 1-Octanol, Hexansäure und Decansäure wurden zuvor nicht in frischer Kakaopulpe direkt nach dem Öffnen der Früchte beschrieben. Ethylacetat und Acetoin sind typische Aromastoffe, die durch Hefen oder Milchsäurebakterien während der Fermentation produziert werden (Vuyst und Leroy 2020). Im Gegensatz zu den erwähnten Studien wurde in dieser Arbeit Kakaopulpe verwendet, die pasteurisiert war. Ein vorheriger Kontakt mit Mikroorganismen kann daher nicht ausgeschlossen werden, was das Vorkommen dieser zwei Aromastoffe erklären könnte. Zusätzlich zu den hier detektierten Aromastoffen wurden weitere aromaaktive Substanzen in Kakaopulpe beschrieben. Hierzu zählen β -Damascenon (fruchtig, Weintraube), γ - und δ -Decalacton (Kokosnuss, Pfirsich) und *trans*-4,5-Epoxy-(*E*)-2-decenal (metallisch) (Bickel Haase et al. 2021; Chetschik et al. 2018; Hegmann et al. 2020). Die hohe Verdünnung der Kakaopulpe im KP-Medium, ebenso wie die Sorte, die Herkunft oder die Pasteurisierung könnten eine Erklärung dafür sein, dass nicht alle beschriebenen Aromastoffe detektiert werden konnten. Für γ -Decalacton beispielsweise wurden auch nur sehr niedrige FD-Faktoren ermittelt (Bickel Haase et al. 2021).

Das KP-Medium wurde nicht detaillierter auf die quantitative Menge an Aromastoffen oder mittels Verdünnungsanalyse untersucht. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Aromastoffe einen Beitrag zum Gesamtaroma leisten, und welche nicht. Beim Vergleich mit Literaturdaten über frische, nicht behandelte Kakaopulpe sind kaum Unterschiede bezüglich des Aromaprofils zur pasteurisierten Kakaopulpe zu erkennen.

4.2.4.2 Aromastoffe im fermentierten Getränk

Das fermentierte Getränk wurde mittels Aromaverdünnungsanalyse (ADA) untersucht. Dieses Werkzeug dient der Priorisierung einzelner Aromastoffe, die möglicherweise einen Beitrag zum Gesamtaroma einer Probe leisten. Zur statistischen Untersuchung der ADA wurden die Flächen für die drei charakteristischen Aromastoffe (*R*)-Linalool, (*E*)-Nerolidol und 5-Butyl-2(5H)-furanon aufgetragen. Dabei zeigten sich für die drei Aromastoffe Bestimmtheitsmaße zwischen 0,9799 und 0,9921. Bei allen drei Substanzen war ein leichter Einbruch der Linearität bei den $\text{Log}_2(\text{FD-Faktor})$ 7 und 8 erkennen, der ab $\text{Log}_2(\text{FD-Faktor})$ 9 wieder aufgefangen wurde (vgl. Anhang Abbildung 91). Der leichte Einbruch in der Linearität trat zeitgleich mit dem ersten Split in der TDU von 1 auf 16 auf. Dieser Effekt trat ebenfalls bei Trapp et al. (2018a) für besonders flüchtige Substanzen, wie (*E,E*)-2,4-Decadienal auf, deren Methode hier angewendet wurde. Bei der Validierung der Methode durch Trapp et al. (2018a) ergaben sich Bestimmtheitsmaße von 0,9954 für (*R*)-Linalool und 0,9976 für (*E*)-Nerolidol. Hierbei handelte

es sich allerdings um Standardlösungen, wohingegen in der vorliegenden Verdünnungsanalyse reale Proben verwendet wurden, die zusätzlich natürlichen Schwankungen unterliegen können. Zwar wurden alle Proben aus einem Fermentationsansatz gleichermaßen aliquotiert und eingefroren, Abweichungen aufgrund natürlicher Schwankungen können allerdings nicht ausgeschlossen werden. In der Verdünnungsanalyse mittels *dynamic Headspace* realer Fermentationsproben durch Sommer et al. (2021) wurden Bestimmtheitsmaße von 0,9870 für Linalool, 0,9799 für Anthranilsäuremethylester und 0,9910 für Thymol erreicht. Diese Werte sind vergleichbar mit der vorliegenden Verdünnungsanalyse, was zeigt, dass die Anwendung der Split-Einstellungen nach Trapp et al. (2018a) für die hier untersuchte Probe anwendbar war und funktionierte.

In der ADA konnten insgesamt 37 aromaaktive Substanzen mit FD-Faktoren zwischen 8 und 2.048 detektiert werden, von denen 17 Substanzen abschließend identifiziert werden konnten (Abbildung 39). Von diesen 17 Substanzen wurden diejenigen sieben Substanzen mit den höchsten FD-Faktoren mittels Standardaddition quantifiziert (2-Nonanon (FD 512), (*R*)-Linalool (FD 2.048), Methylbenzoat (FD 128), 1-Phenylethylacetat (FD 64), 2-Phenylethanol (FD 128), 5-Butyl-2(5H)-furanon (FD 1.024) sowie (*E*)-Nerolidol (FD 1.024)). Die Bestimmtheitsmaße lagen dabei zwischen 0,9367 und 0,9827 (mit Ausnahme von (*R*)-Linalool). Das Bestimmtheitsmaß für eine verlässliche Quantifizierung mittels Standardaddition sollte bei $\geq 0,95$ liegen (Ridgway et al. 2010). Dies war für den Großteil der Standardaddition der Fall, außer für (*R*)-Linalool. Hier lagen die Bestimmtheitsmaße bei 0,9049 bzw. 0,9299. Die Kalibriergeraden der Standardaddition flachten dabei bei höheren Konzentrationen ab, was möglicherweise auf eine Sättigung des Sorbensmaterials hindeuten könnte. Der lineare Bereich von PDMS-Twistern liegt im niedrigen ppm-Bereich ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Pfannkoch et al. 2002). An diesen Bereich reichen die Konzentrationen an Linalool zwar nicht heran, allerdings wurden diese Grenzen für Einzelsubstanzen ermittelt. In der vorliegenden Probe sind viele weitere Stoffe vorhanden, die sich ebenfalls an das Sorbensmaterial heften. Weiterhin ist PDMS-Sorbensmaterial für Substanzen geeignet, die einen $\log(K_{OW}) < 4$ aufweisen. Linalool liegt mit einem $\log(K_{OW})$ von 3,38 nur leicht unter diesem Wert (Ochiai et al. 2018), was zusätzlich zu einer verschlechterten Adsorption geführt haben könnte.

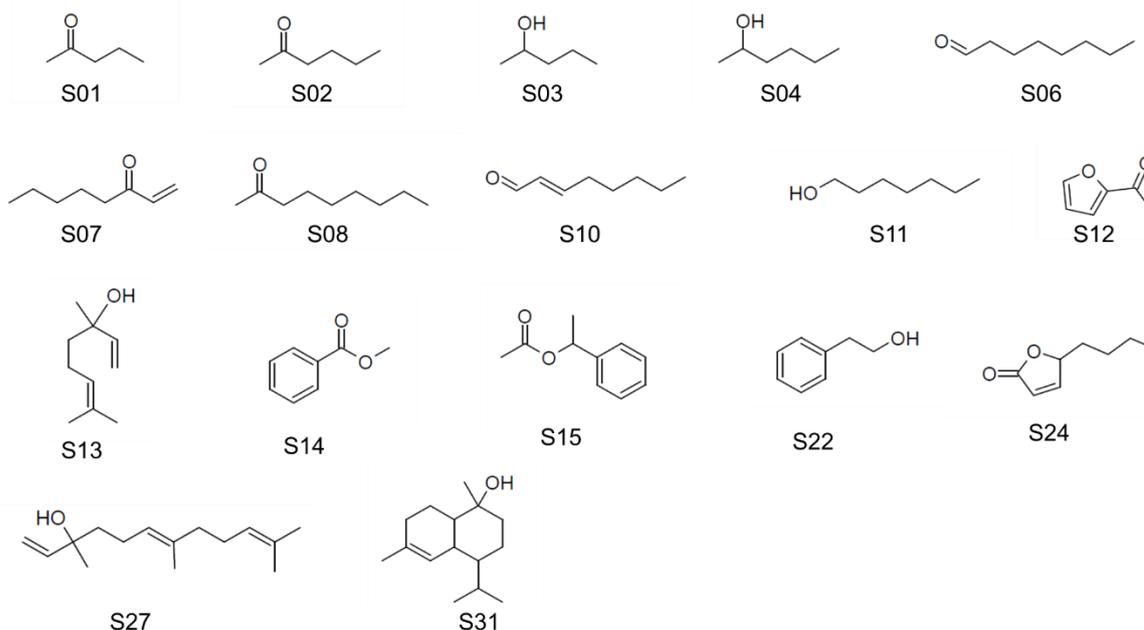


Abbildung 39: Strukturformeln der 17 identifizierten Aromastoffe im KP-Getränk; S01: 2-Pentanon; S02: 2-Hexanon; S03: 2-Pentanol; S04: 2-Hexanol; S06: Octanal; S07: 1-Octen-3-ol; S08: 2-Nonanon; S10: (E)-2-Octenal; S11: 1-Heptanol; S12: 2-Acetylfuran; S13: Linalool; S14: Methylbenzoat; S15: 1-Phenylethylacetat; S22: 2-Phenylethanol; S24: 5-Butyl-2(5H)-furanon; S27: (E)-Nerolidol; S31: τ -Muurolool.

Zur Quantifizierung von Aromastoffen bewährte sich die Bestimmung über einen internen Standard, welcher mit stabilen Isotopen markiert ist. Dieses Verfahren wird auch Stabilisotopenverdünnungsanalyse genannt (SIVA) und ist hinsichtlich Spezifität und Wiederfindung die Methode der Wahl (Rychlik und Asam 2009). Durch die sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit von Analyt und internem Standard können Analytverluste bestmöglich kompensiert werden. Problematisch ist die Verfügbarkeit von isotopenmarkierten Standards und deren hoher Preis. Aufgrund der bei der SBSE auftretenden Abhängigkeit der Wiederfindung von Analyten von unter anderem dem Verteilungskoeffizienten_{Octanol:Wasser} (K_{OW}) und diverser Matrixeffekte, ist der Einsatz eines anderen internen Standards als einem isotopenmarkierten Standard nicht möglich (Pfannkoch und Whitecavage 2002).

Insgesamt wurden für vier der sieben quantifizierten Substanzen Odor Activity Values von > 1 bestimmt. Methylbenzoat hatte einen OAV von 0,8, sodass eine Aussage über den Beitrag zum Gesamtaroma nicht klar getroffen werden konnte. 2-Nonanon und 1-Phenylethylacetat wiesen OAVs < 1 auf, was keinen oder nur einen geringen Beitrag zum Gesamtaroma vermuten lässt. 2-Nonanon hatte einen FD-Faktor von 512, sodass dieses Ergebnis unerwartet war. Zwar ist der FD-Faktor für eine Substanz aus einer Aromaverdünnungsanalyse ein erster Schritt zur Identifizierung der Schlüsselaromastoffe einer Probe, aufgrund der unterschiedlichen Geruchsschwellen lässt aber erst der OAV eine Aussage zu, ob ein Stoff wahrscheinlich zum Gesamtaroma beiträgt, oder nicht. Bei der GC-Olfaktometrie wird die

gesamte Menge eines Analyten im Aromaextrakt verdampft, während OAVs anhand von Geruchsschwellenwerten in einer Matrix bestimmt werden. Dabei wird nur die Menge eines einzelnen Geruchsstoffs berücksichtigt, die im Kopfraum über der Matrix vorhanden ist. Dadurch kann es durch die Verdünnungsanalyse zur Überschätzung von eher polaren Substanzen kommen, da diese gut wasserlöslich sind und ihr Dampfdruck vergleichsweise gering ist (Greger und Schieberle 2007).

Insgesamt konnten 20 aromaaktive Substanzen nicht abschließend identifiziert werden. Der Großteil dieser Substanzen konnte aufgrund der vorliegenden Massenspektren der Gruppe der Sesquiterpenoide zugeordnet werden. Aufgrund von interessanten Geruchseindrücken und/ oder hohen FD-Faktoren wären vor allem die Substanzen S18, S21, S23, S25 und S26 für eine Strukturaufklärung interessant. Die Identifizierung könnte nach Flüssigextraktion und präparativer HPLC mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und *high-resolution* MS erfolgen (Brescia et al. 2021).

Die Massenspektren der Substanzen S18, S21, S23, S25 und S26 (Abbildung 40) deuten aufgrund der Kombination der vorliegenden Fragmente auf Sesquiterpenoid-artige Strukturen hin. Sesquiterpene mit der Summenformel $C_{15}H_{24}$ besitzen eine molare Masse von $204,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und somit ein Molekülion M^+ mit (m/z) 204. Durch Doppelbindungen im Molekül und der daraus resultierenden geringeren Anzahl an Wasserstoffatomen kann das Molekülion auch ein niedrigeres m/z -Verhältnis haben. In den Massenspektren der fünf Substanzen sind jeweils noch größere Fragmente zu erkennen, wie (m/z) 218 bei S18 und S21, (m/z) 222 bei S23 und S25 und (m/z) 220 bei S26. Durch die Einführung einer OH-Gruppe erhöht sich die Molmasse auf beispielsweise $220,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Je nach Anzahl der Doppelbindungen im Molekül können so Molekülionen mit unterschiedlichen (m/z) -Verhältnissen entstehen. Ein (m/z) 218 könnte so vermutlich durch das Fehlen von zwei Wasserstoffatomen auf das Vorliegen einer Carbonylgruppe hindeuten. Bei den hier angestellten Vermutungen ist allerdings darauf zu achten, dass nicht mit Gewissheit gesagt werden kann, ob das größte im Massenspektrum gezeigte Fragment dem Molekülion entspricht. Am Beispiel des Fragmentierungsmusters von τ -Muurolol (Anhang Abbildung 122) wird deutlich, dass unter anderem die Fragmente (m/z) 222, 204, 179, 161 und 95 in Kombination typisch Cadinene-artige Sesquiterpene sind. Durch die initiale Abspaltung von Wasser entsteht das Fragment (m/z) 204, bei einer initialen Abspaltung einer Isopropylgruppe entsteht das Fragment (m/z) 179. Gefolgt von der anschließenden Abspaltung von Wasser bzw. der Isopropylgruppe entsteht das Fragment (m/z) 161 (Rinkel et al. 2019). Dieses Fragmentierungsmuster ist in ähnlicher Weise bei den Substanzen S18, S21, S23, S25 und S26 zu erkennen.

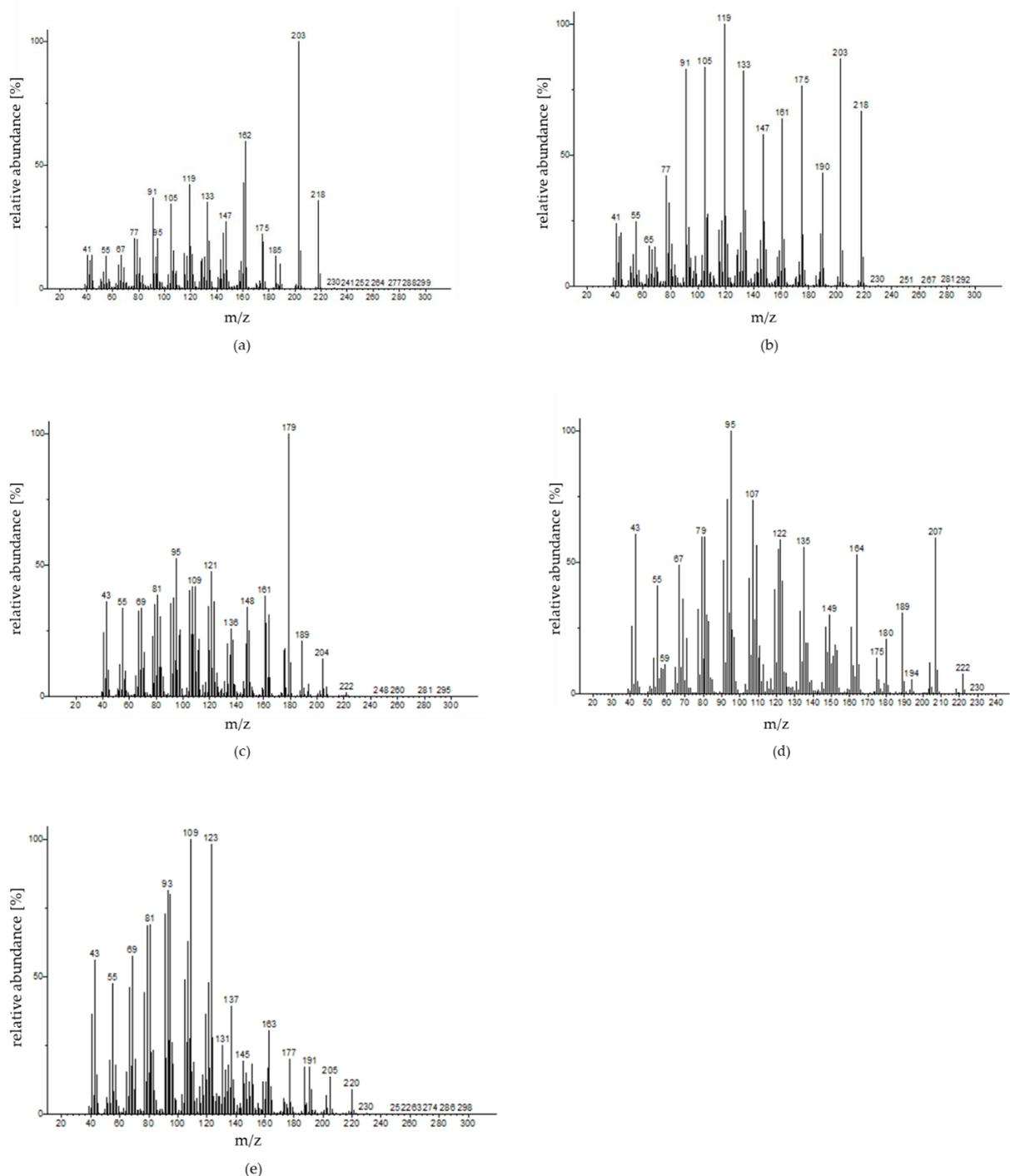


Abbildung 40: Massenspektren der nicht identifizierten Substanzen S18 (a), S21 (b), S23 (c), S25 (d) und S26 (e).

Um abschließend Schlüsselaromastoffe einer Probe identifizieren zu können, ist die Erstellung eines Aromamodells notwendig, wobei die quantifizierten Konzentrationen aller Aromastoffe mit $OAV > 1$ gemischt und sensorisch im Vergleich zur Ausgangsprobe in beschreibenden Profiltests untersucht werden (Grosch 2001; Fritsch und Schieberle 2005). Zuletzt können noch Weglassversuche durchgeführt werden (Grosch 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde kein Aromamodell erstellt. Einige Substanzen konnten nicht abschließend identifiziert werden,

sodass möglicherweise Substanzen mit OAVs > 1 für das Gesamtbild fehlen. Wie zuvor beschrieben, wiesen die Substanzen S18, S21, S23 und S25 bei hohen FD-Faktoren charakteristische Geruchsnoten, wie Kokos, Maracuja und Pfirsich auf. Lediglich die Substanz 5-Butyl-2(5H)-furanon deckte mit einem OAV von 7,4 den Kokos- und Pfirsich-artigen Geruch ab. Auch Substanz S26 könnte aufgrund des hohen FD-Faktors von 256 eine Rolle beim Gesamtaroma spielen. Es ist zu erwarten, dass einige der nicht identifizierten Substanzen ebenfalls einen Beitrag zum Gesamtaroma leisten.

Zu Aromaprofilen von *L. persicinus* sind derzeit keine Daten verfügbar. Die Aromaprofile, die für die Verwandten *L. sulfureus* und *L. montanus* beschrieben sind, zeigen würzige und fleischartige Aromaeindrücke. Verantwortlich für dieses Aroma sind maßgeblich die Aromastoffe Sotolon, (*E,E*)-2,4-Decadienal und (*E,Z*)-2,4-Decadienal (Yalman et al. 2023; Lanfermann et al. 2014). Allerdings wurden bereits auch Kokosnuss-artige Aromastoffe in Kulturen von *L. montanus* nachgewiesen, wie 5-Propyl-2(5H)-furanon und 5-Butyl-2(5H)-furanon (Yalman et al. 2023). Die Bildung von 5-Butyl-2(5H)-furanon durch Laetiporen könnte durch Biosynthese ausgehend von Octansäure und Decansäure erfolgen (Berger et al. 1986). Diese beiden Fettsäuren wurden auch im KP-Medium nachgewiesen. Aus den in dieser Arbeit erzeugten Daten geht hervor, dass die Aromaausbildung für die vier untersuchten Laetiporen sowohl in Emers- als auch Submers-Kultur Medien-abhängig ist. Lanfermann et al. (2014) wiesen nach, dass die Bildung verschiedener herzhafter, würziger und fleischartiger Aromen, wie (*S*)-Sotolon, 3-Methylbutansäure und 3-Hydroxy-3-Methylbutansäure abhängig von L-Leucin und L-Isoleucin als Präkusoren ist. Da der Proteingehalt und somit der Aminosäuregehalt im Kakaopulpe-Medium sehr gering waren, könnte dies eine mögliche Erklärung für das Fehlen dieser Aromastoffe sein. Insgesamt bietet die Aromaausbildung durch *L. persicinus* ein sehr interessantes Forschungsfeld für die Zukunft, da hierüber bislang keine Daten existieren und auch über die hier nachgewiesenen Kokos-, Maracuja- und Pfirsich-artigen Sesquiterpenoide nichts bekannt ist. Durch Variation der Medienzusammensetzung durch den Einsatz verschiedener Nebenströme könnte so möglicherweise eine neue Palette an Aromastoffen identifiziert werden.

4.2.4.3 Kinetische Untersuchung von Aromastoffen

Die kinetische Untersuchung der Aromastoffe (vgl. Abbildung 37 sowie Anhang Tabelle 54) über die Kultivierungsdauer von 72 h ließ eine Unterscheidung zwischen Substanzen, die bereits im Medium vorhanden waren, und Substanzen, die während der Fermentation neu gebildet wurden, zu. Octanal, 1-Heptanol, 2-Pentanol, 1-Phenylethylacetat sowie 2-Phenylethanol waren bereits im Medium vorhanden, sodass ihr Vorkommen nicht auf Bildung durch *L. persicinus* zurückzuführen ist. 2-Phenylethanol trug mit einem OAV von 1,4 zum

Gesamtaroma des Getränks bei. Es ist bekannt, dass Pilze der Abteilung Basidiomycota in der Lage sind, 2-Phenylethanol *de novo* oder durch Biotransformation, ausgehend von Asparagin oder L-Phenylalanin zu bilden. Die bisher nachgewiesenen Konzentrationen sind allerdings deutlich geringer, als beispielsweise bei der Produktion durch Hefen (Lomascolo et al. 1999; Chreptowicz et al. 2016). Bei der Fermentation von Bierwürze durch *Lentinula edodes* wurde ein Beitrag zum Gesamtaroma mit einem OAV von 1,3 erreicht (Özdemir et al. 2017). In der vorliegenden Probe ist der Beitrag von 2-Phenylethanol zum Gesamtaroma allerdings auf das Vorhandensein im Medium zurückzuführen.

2-Nonanon sowie 2-Pentanon konnten bereits im Medium nachgewiesen werden, die Peak-Intensität erhöhte sich allerdings im Verlauf der Fermentation. Der Bildungsweg dieser Methylketone ausgehend von mittelkettigen Fettsäuren ist vor allem aus der Käseherstellung durch beispielsweise *Penicillium roquefortii* bekannt, wobei unter anderem auch 2-Pentanon und 2-Nonanon durch β -Oxidation gebildet werden (Vandamme 2003). Die Bildung beider Aromastoffe wurde ebenfalls bereits in Flüssigkulturen von Pilzen der Abteilung Basidiomycota nachgewiesen (Abraham und Berger 1994; Gallois et al. 1990).

Die aromaaktiven Substanzen Methylbenzoat, (*E*)-Nerolidol, 5-Butyl-2(5H)-furanon, (*R*)-Linalool sowie die nicht identifizierten Substanzen S18, S21, S23, S25 und S26 wurden während der Fermentation durch *L. persicinus* gebildet. Für die vier oben genannten Aromastoffe ist eine Bildung durch Pilze bereits beschrieben (Abraham und Berger 1994; Gallois et al. 1990). Die Ausgangssubstanzen zur Bildung von Terpenen und Terpenoiden, wie dem acyclischen Monoterpenalkohol Linalool und dem Sesquiterpenalkohol Nerolidol, stellen Dimethylallyldiphosphat (DMAP) und Isopentenylidiphosphat (IPP) dar. Die Synthese dieser Grundgerüste erfolgt in höheren Organismen über den Mevalonatweg, ausgehend von Acetyl-CoA (Frank und Groll 2017). Acetyl-CoA wird in Pilzen durch den Abbau von Glucose gewonnen (Strijbis und Distel 2010). Im ersten Schritt erfolgt die Bildung von Acetoacetyl-CoA mittels des Enzyms Acetoacetyl-CoA-Thiolase, durch das Enzym 2-Hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA-Synthase erfolgt die Bindung eines weiteren Acetyl-CoA unter Ausbildung von HMG-CoA. Die HMG-CoA-Reduktase reduziert HMG-CoA zu Mevalonat, welches namensgebend für diesen Syntheseweg ist. Nach Phosphorylierung durch Mevalonat-Kinase und Phosphomevalonat-Kinase entsteht Mevalonatdiphosphat. Die Phosphomevalonat-Decarboxylase decarboxyliert Mevalonatdiphosphat, es entsteht IPP, welches durch Isopentenylidiphosphat-Isomerase zu DMAP isomerisiert wird (Frank und Groll 2017). Prenyltransferasen katalysieren eine Additionsreaktion zwischen DMAP und IPP, es entsteht Geranyldiphosphat (C₁₀), der Grundbaustein für Monoterpene und -terpenoide. Durch eine weitere Addition von IPP entsteht Farnesyldiphosphat (C₁₅), der Grundbaustein für Sesquiterpene und -terpenoide (Breitmaier 2007; Poulter und Rilling 1976). Die finale Bildung von Terpenen und Terpenoiden erfolgt anschließend unter Einfluss von verschiedenen

Terpensynthesen und der Modifikation durch unter anderem Cyclisierungen, Kondensationen oder Oxidationen. In Pilzen der Abteilung Basidiomycota wurden bereits mehrere Terpen(oid)-Synthesen nachgewiesen und charakterisiert (Zhang et al. 2020). In *L. sulfureus* wurden bereits 23 Terpensynthesen nachgewiesen, die vor allem Cyclisierungen von Farnesyldiphosphat und Nerolidyldiphosphat katalysieren (Schmidt-Dannert 2015; Nagamine et al. 2019; Duan et al. 2022). Über Terpensynthesen in *L. persicinus* ist bis heute nichts bekannt. Die neuesten Daten sind allerdings vielversprechend für den Nachweis weiterer Terpensynthesen in *Laetiporen*. (*R*)-Linalool und (*E*)-Nerolidol wiesen nach 48-stündiger Fermentation nicht die höchsten Intensitäten auf, allerdings Intensitäten nahe am Maximum. Die potentiellen Sesquiterpenoide wiesen nach 48 h die höchsten Intensitäten auf (außer S21), bei längerer Fermentation nahmen die Konzentrationen wieder ab. Diese Abnahme nach 48 h ging mit der Abnahme der Intensität der sensorischen Attribute fruchtig, Kokos, Pfirsich und Maracuja einher, was auf einen Beitrag dieser Substanzen zu benannten Aromaeindrücken hindeutet. Ebenfalls zeigte 5-Butyl-2(5H)-furanon nach 48 h die maximale Intensität.

4.2.5 Ausblick

Die Herstellung eines natürlich aromatisierten Getränks durch die Fermentation mit Speisepilzen auf Basis von Kakaopulpe ist vielversprechend und lukrativ. Für eine großtechnische Produktion ist zunächst die Übertragbarkeit des Fermentationsprozesses auf Bioreaktoren verschiedener Größen von Bedeutung. In ersten Vorversuchen im 5 L Bioreaktor wurde in einer sensorischen Beurteilung kein Unterschied hinsichtlich des Aromas zwischen Schüttelkolben und Bioreaktor festgestellt. Eine genaue Untersuchung könnte durch Abgleich der Aromastoffe mittels GC-MS-O durchgeführt werden.

Für eine großtechnische Anwendung wären weiterhin Qualitätsparameter zur Sicherstellung einer erfolgreichen Fermentation festzulegen. Sommer et al. (2023) legten hierfür einen End-pH-Wert fest, der als Indikator für die Beendigung des Fermentationsprozesses diene. Dabei stellte sich außerdem heraus, dass eine Veränderung des Fermentationsvolumens eine Anpassung der Fermentationsdauer erforderlich macht. Bei der hier untersuchten Fermentation ist der pH-Wert als Indikator allerdings weniger geeignet, da die pH-Wert-Änderung innerhalb von 48 h nur 0,08 beträgt (von 3,75 auf 3,67). Eine weitere Möglichkeit wäre die Festlegung einer (oder mehrerer) Leitsubstanzen, die mittels GC-MS in bestimmten Abständen einem Monitoring unterzogen werden könnten. Auch on-line Monitoring Ansätze sind denkbar. Hierbei ist allerdings die Auswahl der Leitsubstanz entscheidend. Im bestmöglichen Fall handelt es sich um die Schlüsselaromakomponente, die für das hier erzeugte Getränk noch nicht final bestimmt werden konnte.

Hinsichtlich des gebildeten Aromas durch *L. persicinus* ergeben sich interessante Forschungsfelder für die Zukunft, da bislang nicht identifizierte, attraktive Aromastoffe nachgewiesen wurden. Der Markt für natürliche Aromastoffe wächst rasant, sodass die finale Identifizierung der hier gebildeten maracuja-, pfirsich- und kokosnuss-artigen Aromastoffe und die Aufklärung deren Stoffwechselwege auch im Bereich der biotechnologischen Darstellung natürlicher Aromastoffe Anwendung finden könnte.

Bei einer möglichen Vermarktung des Getränks ist weiterhin die Haltbarkeitsdauer (*Shelf life*) zu untersuchen. Mittels Haltbarkeitsstudien bei verschiedenen Lagerbedingungen sollten die mikrobielle Belastung sowie Farb- und Aromaveränderungen untersucht werden. Vorteilhaft ist, dass bei erfolgreicher Fermentation in Verbindung mit einer sterilen Ernte bzw. Abfüllung, das Vorkommen von Bakterien aufgrund des sterilen Fermentationsmediums, ausgeschlossen werden kann. Allerdings muss eine Erntemethode gewählt werden, die eine vollständige Abtrennung von Pilzzellen sicherstellt. Auch bei Lagerung im Kühlschrank kann ein weiteres Wachstum des Pilzmyzels nicht ausgeschlossen werden, was wiederum zu nachträglichen Aromaänderungen führen würde. Thermische Verfahren, wie Pasteurisierung, könnten allerdings ebenfalls zu Beeinträchtigungen des Aromas führen (Silva et al. 2000). Beispielsweise könnte ein Filtrationsschritt durchgeführt werden. Sommer et al. (2023) wendeten eine *Crossflow*-Filtration zur Abtrennung des Pilzmyzels an und wiesen nach, dass diese nur geringe Auswirkungen auf das Aroma des Getränks hatte.

Ebenso wie bei den Fermentaten der CPH handelt es sich bei durch Speisepilze fermentierte Getränke um *Novel Foods*, die einer Zulassung gemäß VO (EU) 2015/2283 bedürfen. Die Kakaopulpe selbst wurde im Februar 2020 bereits als neuartiges Lebensmittel zugelassen (VO (EU) 2017/2470), was das Prozedere im Gegensatz zu fermentierten CPH erleichtert.

4.3 Fazit

Die Biotechnologie mit Speisepilzen der Abteilung Basidiomycota ist ein vielfältiges Forschungsgebiet zur Erzeugung vielversprechender, neuartiger Produkte. In Kombination mit der Verwendung von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie wird das Thema Nachhaltigkeit aufgegriffen, was in der heutigen Zeit im Fokus vieler Anwendungen steht. Der Kakaoanbau ist ein Negativbeispiel für das Thema Nachhaltigkeit. Daher wurde in dieser Arbeit die Aufwertung von Nebenströmen des Kakaoanbaus durch die Fermentation mit Speisepilzen untersucht. Das Ziel war die Anwendung im Lebensmittelbereich. Die CPH sind unbehandelt nicht für die menschliche Ernährung geeignet. Bei den hier untersuchten Fermentationen durch *P. salmoneo-stramineus* und *F. pinicola* konnte eine Aufwertung hinsichtlich Proteingehalt und -qualität nachgewiesen werden, der hohe Faser- bzw. Ligninanteil stellt allerdings auch nach Fermentation eine Herausforderung für den Einsatz des

Gesamtproduktes (Kombination aus hochwertigem Pilzmyzel und Schalenresten) in Lebensmitteln dar. Vorstellbar wären die Isolierung und der Einsatz des Pilzproteins. Die hier durchgeführten Untersuchungen und ihre Ergebnisse bieten einen wissenschaftlichen Mehrwert, sind allerdings noch nicht hinreichend für eine erfolgversprechende großtechnische Anwendung in Lebensmitteln.

Die Fermentation der Kakaopulpe hingegen führte zur Entwicklung einer vielversprechenden Anwendung als natürlich aromatisiertes Getränk. Die Kakaopulpe stellte sich als interessantes Fermentationsmedium heraus, wodurch neuartige Aromastoffe generiert werden konnten, die großes Potenzial für zukünftige Forschung bieten. In dieser Arbeit wurde ein Produkt mit hoher Akzeptanz aus einem Ausgangsmedium mit nur 10% Kakaopulpe generiert. Der Prozess dauert 48 h und benötigt neben pasteurisierter Kakaopulpe lediglich steriles Wasser, einen Bioreaktor und einen Filtrationsschritt, ohne den Zusatz von Supplementen. Diese Voraussetzungen machen das Produkt attraktiv für eine großtechnische Herstellung. Dadurch würde neben den Kakaobohnen ein weiterer Teil der Frucht wertbringend eingesetzt werden und somit den Kakaoanbau insgesamt nachhaltiger gestalten.

5. Literaturverzeichnis

- Abraham, B. G.; Berger, R. G.: Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 2344–2348.
- Achi, N. K.; Onyeabo, C.; Ekeleme-Egedigwe, C. A.; Onyeonula, J. C.: Phytochemical, Proximate Analysis, Vitamin and Mineral Composition of Aqueous Extract of *Ficus capensis* leaves in South Eastern Nigeria. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, 7 (3), 117–122.
- Adamafio, N. A.: Theobromine Toxicity and Remediation of Cocoa By-products: An Overview. *J. Biol. Sci.* **2013**, 13 (7), 570–576.
- Adamafio, N. A.; Ayombil, F.; Tano-Debra, K.: Microbial Detheobromination of Cocoa (*Theobroma cacao*) Pod Husk. *Asian J. Biochem.* **2011**, 6 (2), 200–207.
- Adejobi, K. B.; Famaye, A. O.; Adeniyi, D. O.; Orisajo, S. B.; Adeyemi, E. A.: Effect of cocoa pod husk ash and goat dung on nutrient content and growth performance of cashew (*Anacardium occidentale*). *Adv. Environ. Biol.* **2011**, 5 (7).
- Afoakwa, E. O.; Kongor, J. E.; Budu, A. S.; Mensah-Brown, H.; Takrama, J. F.: Changes in some biochemical qualities during drying of pulp pre-conditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *African J. Food Agric. Nutr. Dev.* **2015**, 15 (1), 9651–9670.
- Afoakwa, E. O.: Chocolate science and technology. **2016**, England: John Wiley & Sons, 2. Auflage.
- Afoakwa, E.O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Ryan, A.: Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, 48 (9), 840–857.
- Ağçam, E.; Akyıldız, A.; Dündar, B.: Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices. *Fruit Juices, Academic Press.* **2018**, 17, 309–339.
- Aggelopoulos, T.; Bekatorou, A.; Plessas, S.; Koutinas, A.; Nigam, P.: Upgrading of Mixed Food Industry Side-Streams by Solid-State Fermentation with *P. ostreatus*. *Recycling.* **2018**, 3 (2), 12.
- Ahlborn, J.; Calzolari, N.; Spielmeier, A.; Avci, S. S.; Zimmer, M.; Rühl, M.: Enrichment of vitamin D₂ in mycelium from submerged cultures of the agaric mushroom *Pleurotus sapidus*. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, 55 (9), 3833–3839.
- Ahlborn, J.; Stephan, A.; Meckel, T.; Maheshwari, G.; Rühl, M.; Zorn, H.: Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* **2019**, 8 (1), 447–455.
- Akanbi, O. S. O.; Famaye, A. O.; Olaniyi, O. O.; Ipinmoroti, R. R.; Iloyanomo, C. I.; Nduka, B. A.; Adeosun, S. A.: Comparative Effects of Cocoa Pod Husk and Oil Palm Bunch Ash on Nutrient Uptake, Growth and Dry Matter Yield of Cocoa (*Theobroma cacao*) in Ibadan, Southwest Nigeria. *J. Agric. Sci.* **2014**, 05 (11), 1046–1052.

- Ali, M. A.; Siddiq, M.; Ahmad, S.; Hanif, A.: Protein and Fat Contents of Various *Pleurotus* Species Raised on Different Waste Materials. *Pak. J. Agri. Sci.* **2007**, 44 (3).
- Amanquah, D. T.: Effect of Mechanical Depulping on the Biochemical, Physicochemical and Polyphenolic Constituents During Fermentation and Drying of Ghanaian Cocoa Beans. *University of Ghana.* **2013**.
- Anvoh, K.Y.B.; Bi, A. Z.; Gnakri, D.: Production and Characterization of Juice from Mucilage of Cocoa Beans and its Transformation into Marmalade. *Pak. J. Nutr.* **2009**, 8 (2), 129–133.
- AOAC 2001.11: AOAC Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds. Block Digestion Method Using Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid. *J. AOAC Int.* **2022**.
- AOAC 985.29: AOAC Official Method 985.29 Total dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method. *J. AOAC Int.* **2003**.
- Aprotosoie, A. C.; Luca, S. V.; Miron, A.: Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, 15 (1), 73–91.
- Arantes, V.; Goodell, B.: Current Understanding of Brown-Rot Fungal Biodegradation Mechanisms: A Review. In: Deterioration and protection of sustainable biomaterials (Schultz, T. P.; Goodell, B.; Nicholas, D. D.). Bd. 1158. New York: Oxford University Press (ACS Symposium Series), **2015**, 3–21.
- Arlorio, M.; Coisson, J. D.; Travaglia, F.; Varsaldi, F.; Miglio, G.; Lombardi, G.; Martelli, A.: Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Res. Int.* **2005**, 38 (8-9), 1009–1014.
- Awudzi, G. K.; Adu-Acheampong, R.; Avicor, S. W.; Bukari, Y.; Boateng, E. K. O.; Ahadzi, S. K.; Tagbor, P.: Pattern of insecticide usage in organic cocoa production in Ghana. *Org. Agric.* **2022**, 12 (1), 125–136.
- Ayodele, S. M.; Okhuoya, J.A: Cultivation Studies on *Psathyrella atroumbonata* Pegler. A Nigerian Edible Mushroom on Different Agro Industrial Wastes. *Int. J. Botany* **2007**, 3 (4), 394–397.
- Baldrian, P.; Gabriel, J.: Effect von Heavy Metals on the Growth of Selected Wood-Rotting Basidiomycetes. *Folia Microbiol.* **1997**, 42 (5), 521–523.
- Barbosa, E.; Perrone, D.; Vendramini, A. L.; Leite, S. G. F.: Vanillin Production by *Phanerochaete Chrysosporium* Grown on Green Coconut Agro-Industrial Husk in Solid State Fermentation. *BioResources.* **2008**, 3 (4), 1042–1050.
- Bastiaens, L.; Soetemans, L.; D'Hondt, E.; Elst, K.: Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation. In: Chitin and Chitosan (Broek, L. A. M.; Boeriu, C. G.; Stevens, C. V.) **2020**, John Wiley & Sons Ltd. 1–34.

- Beg, M. S.; Ahmad, S.; Jan, K.; Bashir, K.: Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, 66, 108–116.
- Beltran-Garcia, M. J.; Estarron-Espinosa, M.; Ogura, T.: Volatile Compounds Secreted by the Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and Their Antibacterial Activities. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (10), 4049–4052.
- Ben Akacha, N.; Gargouri, M.: Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modelling, and bioprocesses. *Food Bioprod. Process.* **2015**, 94, 675–706.
- Berger, R. G.; Neuhäuser K.; Drawert, F.: Biosynthesis of Flavor Compounds by microorganisms. 6. Odorous Constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes). *Z. Naturforsch.* **1986**, (41c), 963–970.
- Berger, R. G.: Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability. Berlin, Heidelberg: Springer, **2007**.
- Berger, R. G.; Bordewick, S.; Krahe, N.-K.; Ersoy, F.: Mycelium vs. Fruiting Bodies of Edible Fungi-A Comparison of Metabolites. *Microorganisms.* **2022**, 10 (7).
- Bernaert, H.; Kopp, G.; Corno, M.: Cacao Pod Husk Derived Pectin, Method of its Preparation and its Use in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Compositions. Anmeldernr: 18189812.3. Veröffentlichungsnr: EP 3 613 297 A1. **2020**.
- Bhushan, R.; Martens, J.; Batra, S.: Amino Acids: Thin-Layer (Planar) Chromatography. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, **2014**.
- Bickel Haase, T.; Schweiggert-Weisz, U.; Ortner, E.; Zorn, H.; Naumann, S.: Aroma Properties of Cocoa Fruit Pulp from Different Origins. *Molecules.* **2021**, 26 (24).
- Bickel Haase, T.; Klis, V.; Hammer, A. K.; Pinto Lopez, C.; Verheyen, C.; Naumann-Gola, S.; Zorn, H.: Fermentation of cocoa pod husks with *Pleurotus salmoneo-stramineus* for food applications. *Food Sci. Nutr.* **2023** (submitted)
- Birol, G.; Ündey, C.; Çinar, A.: A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Comput. Chem. Eng.* **2002**, 26 (11), 1553–1565.
- Bishop, K. S.: Characterisation of Extracts and Anti-Cancer Activities of *Fomitopsis pinicola*. *Nutrients.* **2020**, (12), 609.
- Boddy, L.; Watkinson, S. C.; Money, N. P.: The fungi., Academic Press, Amsterdam, **2016**, 3. Auflage
- Bodizs, L.; Titica, M.; Faria, N.; Srinivasan, B.; Dochain, D.; Bonvin, D.: Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation. *J. Process Control.* **2007**, 17 (7), 595–606.

- Bosse, A. K.; Fraatz, M. A.; Zorn, H.: Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food chem.* **2013**, 141 (3), 2952–2959.
- Breitmaier, E.: Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones. Wiley-VCH, Newark, **2007**.
- Brescia, F. F.; Pitelas, W.; Yalman, S.; Popa, F.; Hausmann, H. G.; Wende, R. C.; Fraatz, M. A.; Zorn, H.: Formation of Diastereomeric Dihydromenthofuro lactones by *Cystostereum murrayi* and Aroma Dilution Analysis Based on Dynamic Headspace Extraction. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, 69 (21), 5997–6004.
- Briggs, A. D. M.; Mytton, O. T.; Kehlbacher, A.; Tiffin, R.; Elhussein, A.; Rayner, M.; Jebb, S. A.; Blakely, T.; Scarborough, P.: Health impact assessment of the UK soft drinks industry levy: a comparative risk assessment modelling study. *Lancet Public Health.* **2017**, 2 (1), 15–22.
- Brunner, G.; Zwiefelhofer, U.; Simon, A.: Extraction of Xanthines from Cocoa Nut Shells with Carbon Dioxide. *Process Metallurgy.* **1992**, (7), 1661–1670.
- Bürger, F.; Koch, M.; Fraatz, M. A.; Omarini, A. B.; Berger, R. G.; Zorn, H.: Production of an Anise- and Woodruff-like Aroma by Monokaryotic Strains of *Pleurotus sapidus* Grown on Citrus Side Streams. *Molecules.* **2022**, 27 (3).
- BVL L 00.90-11/1-4:2017-10: Untersuchung von Lebensmitteln - Sensorische Prüfverfahren - Profilprüfung - Teil 1: Konventionelles Profil - Teil 2: Konsensprofil - Teil 3: Freies Auswahlprofil - Teil 4: Prüfpläne (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN 10967/Teil 1-4).
- Carunchia Whetstine, M. E.; Cadwallader, K. R.; Drake, M.: Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (8), 3126–3132.
- CBI - Ministry of Foreign Affairs: Entering the German market for cocoa. Online verfügbar unter <https://www.cbi.eu/market-information/cocoa-cocoa-products/germany/market-entry>. **2020**, zuletzt aufgerufen am 13.11.2023.
- Cha, W.-S.; Jilu, D.; Lee, C.-B.; Narn, H.-G.; Lee, J.-H.; Maeng, J.-M.; Lim, H.-H.: Optimization of cultural Conditions for Mycelial Growth and Exo-Polysaccharide Production in Jar Fermentation by *Fomitopsis pinicola*. *Proceeding of Current Biotechnology and Bioengineering (XVI).* **2005**.
- Cheah, I. K.; Halliwell, B.: Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, 1822 (5), 784–793.
- Chetschik, I.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Schlüter, A.; Bernath, K.; Hühn, T.: Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (10), 2467–2472.

- Choi, D.; Jeung-Moo, M.; Ji-Lu, D.; Wol-SUK, C.: Exopolysaccharide Production and Mycelial Growth in an Air-Lift Bioreactor Using *Fomitopsis pinicola*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 17 (8), 1369–1378.
- Chreptowicz, K.; Wielechowska, M.; Głowczyk-Zubek, J.; Rybak, E.; Mierzejewska, J.: Production of Natural 2-Phenylethanol: From Biotransformation to Purified Product. *Food Bioprod. Process.* **2016**, 100, 275–281.
- Chun, K. S.; Husseinsyah, S.; Yeng, C. M.: Effect of green coupling agent from waste oil fatty acid on the properties of polypropylene/cocoa pod husk composites. *Polym. Bull.* **2016**, 73 (12), 3465–3484.
- Clark, R.; Linforth, R.; Bealin-Kelly, F.; Hort, J.: Effects of Ethanol, Carbonation and Hop Acids on Volatile Delivery in a Model Beer System. *J. Inst. Brew.* **2011**, 117 (1), 74–81.
- Cunha, G. G. S.; Masarin, F.; Norambuena, M.; Freer, J.; Ferraz, A.: Linoleic acid peroxidation and lignin degradation by enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood or in submerged liquid cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, 46 (3-4), 262–267.
- Czerny, M.; Christlbauer, M.; Christlbauer, M.; Fischer, A.; Granvogl, M.; Hammer, M.; Hartl, C.; Hernandez, N. M.; Schieberle, P.: Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 228 (2), 265–273.
- Dahunsi, S. O.; Osueke, C. O.; Olayanju, T. M. A.; Lawal, A. I.: Co-digestion of *Theobroma cacao* (Cocoa) pod husk and poultry manure for energy generation: Effects of pretreatment methods. *Bioresour. Technol.* **2019**, 283, 229–241.
- Dankyi, E.; Carboo, D.; Gordon, C.; Fomsgaard, I. S.: Application of the QuEChERS procedure and LC–MS/MS for the assessment of neonicotinoid insecticide residues in cocoa beans and shells. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, 44, 149–157.
- Danso-Abbeam, G.; Baiyegunhi, L. J. S.: Adoption of agrochemical management practices among smallholder cocoa farmers in Ghana. *African J. Sci. Technol. Innov. Dev.* **2017**, 9 (6), 717–728.
- Dashtban, M.; Schraft, H.; Syed, T. A.; Qin, W.: Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, 1 (1), 36–50.
- Delgado-Ospina, J.; Martuscelli, M.; Grande-Tovar, C. D.; Lucas-González, R.; Molina-Hernandez, J. B.; Viuda-Martos, M.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. A.; Chaves-López, C.: Cacao Pod Husk Flour as an Ingredient for Reformulating Frankfurters: Effects on Quality Properties. *Foods.* **2021**, 10 (6).
- Demirbaş, A.: Calculation of higher heating values of biomass fuels. *Fuel.* **1997**, 76 (5), 431–434.
- Dence, C. W.: The Determination of Lignin. Berlin, Heidelberg: Springer, **1992**.

- Descoins, C.; Mathlouthi, M.; Le Moual, M.; Hennequin, J.: Carbonation monitoring of beverage in a laboratory scale unit with on-line measurement of dissolved CO₂. *Food chem.* **2006**, 95 (4), 541–553.
- DeVries, J. W.: On defining dietary fibre. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, 62 (1), 37–43.
- Di Mario, F.; Rapanà, P.; Tomati, U.; Galli, E.: Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 43 (1), 8–12.
- Dias, D. R.; Schwan, R. F.; Freire, E. S.; Serôdio, R.: Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2007**, 42 (3), 319–329.
- DIN 10964:2014-11: Sensorische Prüfverfahren - Einfach beschreibende Prüfung.
- DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung.
- DIN 38402 - A51: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Allgemeine Angaben (Gruppe A) - Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren - Lineare Kalibrierfunktion (A 51).
- DIN EN ISO 4120:2021-06: Sensorische Analyse - Prüfverfahren - Dreiecksprüfung.
- DIN EN ISO 8589:2014-10: Sensorische Analyse - Allgemeiner Leitfaden für die Gestaltung von Prüfräumen.
- Ding, J. L.; Shin, H. J.; Cha, W. S.: Analysis of Amino Acids, Vitamins and Minerals of Fruiting Body of *Fomitopsis pinicola*. *J. Life Sci.* **2006**, 16 (7), 1123–1126.
- Djajakirana, G.; Joergensen, R. G.; Meyer, B.: Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. *Biol. Fertil. Soils.* **1996**, 22 (4), 299–304.
- Dresch, P.; D Aguanno, M. N.; Rosam, K.; Grienke, U.; Rollinger, J. M.; Peintner, U.: Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express.* **2015**, 5 (1), 4.
- Duan, Y.; Qi, J.; Gao, J.-M.; Liu, C.: Bioactive components of *Laetiporus* species and their pharmacological effects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, 106 (18), 5929–5944.
- Duarte, W. F.; Dias, D. R.; Oliveira, J. M.; Teixeira, J. A.; Almeida e Silva, J. B.; Schwan, R. F.: Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *LWT.* **2010**, 43 (10), 1564–1572.
- Dwapanyin, A. O.; Adomako, D.; Tetteh, J. P.: The sugar content of cocoa sweatings and the effect of pressing the sweatings prior to fermentation on bean quality. *J. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, 1.
- Dzahini-Obiatey, H.; Domfeh, O.; Amoah, F. M.: Over Seventy Years of a Viral Disease of Cocoa in Ghana: From Researchers' Perspective. *African J. Agric. Res.* **2010**, 5, 476–485.

- Eikenes, M.; Hietala, A. M.; Alfredsen, G.; Gunnar F. C.; Solheim, H.: Comparison of Quantitative Real-Time PCR, Chitin and Ergosterol Assays for Monitoring Colonization of *Trametes versicolor* in Birch Wood. *Holzforschung*. **2005**, 59 (5), 568–573.
- Enoki, M.; Watanabe, T.; Nakagame, S.; Koller, K.; Messner, K.; Honda, Y.; Kuwahara, M.: Extracellular Lipid Peroxidation of Selective White-Rot Fungus, *Ceriporiopsis Subvermispora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 180 (2), 205–211.
- FAO: Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, Food and Nutrition Paper, 92, **2013**.
- FAO/WHO: Energy and Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. *WHO Tech. Rep. Series No. 522*, **1973**.
- Fengel, D.; Przyklenk, M.: Vergleichende Extraktbestimmungen zum Ersatz von Benzl durch Cyclohexan. *Holz als Roh-und Werkstoff*. **1983**, 41 (5), 193–194.
- Fijałkowska, A.; Muszyńska, B.; Sułkowska-Ziaja, K.; Kała, K.; Pawlik, A.; Stefaniuk, D.; Matuszewska, A.; Piska, K.; Pekala, E.; Kaczarczyk, P.; Pietka, J.; Jaszek, M.: Medicinal potential of mycelium and fruiting bodies of an arboreal mushroom *Fomitopsis officinalis* in therapy of lifestyle diseases. *Sci. Rep.* **2020**, 10 (1).
- Fincke, H.: Die Bedeutung von Kakaopulver und Schokolade als Nahrungs- und Genußmittel. Berlin, Heidelberg: Springer, **1936**.
- Firatligil-Durmus, E.; Evranuz, O.: Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT*. **2010**, 43 (2), 226–231.
- Fraatz, M. A.; Naeve, S.; Hausherr, V.; Zorn, H.; Blank, L. M.: A minimal growth medium for the basidiomycete *Pleurotus sapidus* for metabolic flux analysis. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2014**, 1, 9.
- Fraatz, M. A.; Goldmann, M.; Geissler, T.; Gross, E.; Backes, M.; Hilmer, J.-M.; Ley, J.; Rost, J.; Francke, A.; Zorn, H.: Biotechnological Production of Methyl-Branched Aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (10), 2387–2392.
- Frank, A.; Groll, M.: The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chem. Rev.* **2017**, 117 (8), 5675–5703.
- Frauendorfer, F.; Schieberle, P.: Key aroma compounds in fermented Forastero cocoa beans and changes induced by roasting. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, 245 (9), 1907–1915.
- Fritsch, H. T.; Schieberle, P.: Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (19), 7544–7551.
- Gabriel, J.; Vosáňlo, J.; Baldrian, P.: Biosorption of Cadmium to Mycelial Pellets of Wood-Rotting Fungi. *Biotechnol. Tech.* **1996**, 10 (5), 345–348.

- Gallois, A.; Gross, B.; Langlois, D.; Spinnler, H.-E.; Brunerie, P.: Influence of Culture Conditions on Production of Flavour Compounds by 29 Ligninolytic Basidiomycetes. *Mycol. Res.* **1990**, 94 (4), 494–504.
- Ganda-Putra, G. P.; Wartini, N. M.; Darmayanti, L. P. T.: Characteristics of cocoa vinegar from pulp liquids fermentation by various methods. *AIP Conf. Proc.* **2019**, 2155 (1).
- Gänzle, M. G.: Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, 2, 106–117.
- Gasser, C. A.; Hommes, G.; Schäffer, A.; Corvini, P. F.-X.: Multi-catalysis reactions: new prospects and challenges of biotechnology to valorize lignin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 95 (5), 1115–1134.
- Gessner, M. O. (2020): Ergosterol as a Measure of Fungal Biomass. In: Methods to Study Litter Decomposition (Graca, M. A. S.; Bärlocher, F.; Gessner, M. O.) Springer Link, **2020**.
- González, A.; Nobre, C.; Simões, L. S.; Cruz, M.; Loredó, A.; Rodríguez-Jasso, R. M.; Contreras, J.; Texeira, J.; Belmares, R.: Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Food Chem.* **2021**, 346, 128884.
- Gramlich, A.; Tandy, S.; Gauggel, C.; López, M.; Perla, D.; Gonzalez, V.; Schulin, R.: Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Sci. Total Environ.* **2018**, 612, 370–378.
- Greger, V.; Schieberle, P.: Characterization of the key aroma compounds in apricots (*Prunus armeniaca*) by application of the molecular sensory science concept. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (13), 5221–5228.
- Grosch, W.: Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses.* **2001**, 26 (5), 533–545.
- Gupta, S.; Summuna, B.; Gupta, M.; Annepu, S. K.: Edible Mushrooms: Cultivation, Bioactive Molecules, and Health Benefits. In: Bioactive Molecule in Foods (Merillon, J. M.; Ramawat, K. G.), Springer Link, **2017**, 1–33.
- Gutiérrez, A.; del Río, J. C.; Martínez-Iñigo, M. J.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T.: Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2022**, 68 (3), 1344–1350.
- Gyedu-Akoto, E.; Yabani, D.; Sefa, J.; Owusu, D.: Natural Skin-care Products: The Case of Soap Made from Cocoa Pod Husk Potash. *Air.* **2015**, 4 (6), 365–370.
- Halloran, A.; Flore, R.; Vantomme, P.; Roos, N.: Edible Insects in Sustainable Food Systems. Springer Cham, **2018**.
- Hartwig, A.: Toxikologie der Stoffe. Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, Band 2.
- Hegmann, E.; Niether, W.; Rohsius, C.; Phillips, W.; Lieberei, R.: Besides Variety, also Season and Ripening Stage have a Major Influence on Fruit Pulp Aroma of Cacao (*Theobroma cacao* L.). *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2020**, 93, 266-275

- Hoa, H. T.; Wang, C.-L.: The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiol.* **2015**, 43 (1), 14–23.
- Hoa, H. T.; Wang, C.-L.; Wang, C.-H.: The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiol.* **2015**, 43 (4), 423–434.
- Holst, H.: Kleine Kakao-Kunde. Hamburg: De Gruyter. **1961**.
- Idowu, G. A.; Aiyesanmi, A. F.; Oyegoke, F. O.: Organochlorine pesticide residues in pods and beans of cocoa (*Theobroma cacao* L.) from Ondo State Central District, Nigeria. *Environmental Advances.* **2022**, 7, 100162.
- Igbinadolor, R.; Onilude, A. A.: Bioprocess Systems Applied for the Production of Bio-ethanol from Lignocellulosic Biomass of Cocoa Pod Husk (*Theobroma cacao* L.) and other Agricultural Residues: A review. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, 12 (35), 5375–5388.
- Ihekoronye, A. I.: Estimation of the Biological Value of Food Proteins by a Modified Equation of the Essential Amino Acid Index and the Chemical Score. *Die Nahrung.* **1988**, 32 (8), 783–788.
- Iiyama, K.; Wallis, A. F. A.: An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci. Technol.* **1988**, 22 (3), 271–280.
- Janssens, L.; Pooter, H. L.; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J.: Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem.* **1992**, 27 (4), 195–215.
- Jarpa-Parra, M.; Bamdad, F.; Wang, Y.; Tian, Z.; Temelli, F.; Han, Jay; Chen, L.: Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT.* **2014**, 57 (2), 461–469.
- Jasinska, A.; Prasad, R.; Lisiecka, J.; Roszak, M.; Stoknes, K.; Mleczek, M.; Niedzielski, P.: Combined Dairy Manure-Food Waste Digestate as a Medium for *Pleurotus djamor* - Mineral Composition in Substrate and Bioaccumulation of Elements in Fruiting Bodies. *Horticulturae.* **2022**, 8 (10), 934.
- Jensen, K. F.: Oxygen and Carbon Dioxide Affect The Growth of Wood-Decaying Fungi. *For. Sci.* **1967**, 13 (4), 384–389.
- Jo, W.-S.; Cho, Y.-J.; Cho, D.-H.; Park, S.-D.; Yoo, Y.-B.; Seok, S.-J.: Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Ganoderma applanatum*. *Mycobiol.* **2009**, 37 (2), 94–102.
- Jung, H. G.; Valdez, F. R.; Abad, A. R.; Blanchette, R. A.; Hatfield, R. D.: Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and *in vitro* digestibility of oat straw and alfalfa stems. *J. Anim. Sci.* **1992**, 70 (6), 1928–1935.
- Kahraman, A.; Kazançoğlu, I.: Understanding consumers' purchase intentions toward natural-claimed products: A qualitative research in personal care products. *Bus. Strat. Env.* **2019**, 28 (6), 1218–1233.

- Kaya, M.; Akata, I.; Baran, T.; Menteş, A.: Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan Produced from Medicinal Fungus (*Fomitopsis pinicola*). *Food Biophys.* **2015**, 10 (2), 162–168.
- Kim, J.; Lee, K. W.; Lee, H. J.: Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health. In: Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R.; Patel, V. B.; Watson, R. R.) Elsevier, **2011**.
- Knežević, A.; Milovanović, I.; Stajić, M.; Lončar, N.; Brčeski, I.; Vukojević, J.; Cilerdžić, J.: Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresour. Technol.* **2013**, 138, 117–123.
- Körner, R.: Verfahren und Vorrichtung zur Rückführung von bei thermischer Entalkoholisierung anfallenden Aromastoffen. Veröffentlichungsnr: DE4429606A1, **1996**.
- Kouakou, K.; Kébé, B. I.; Kouassi, N.; Aké, S.; Cilas, C.; Muller, E.: Geographical Distribution of Cacao swollen shoot virus Molecular Variability in Côte d'Ivoire. *Plant Dis.* **2012**, 96 (10), 1445–1450.
- Krings, U.; Berger, R. G.: Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 49 (1), 1–8.
- Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Binkoski, A. E.; Hilpert, K. F.; Griel, A. E.; Etherton, T.: Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* **2002**, 113 (9), 71–88.
- Kromidas, Stavros: Handbuch Validierung in der Analytik. Weinheim: Wiley-VCH, **2011**, 2. Auflage.
- Laconi, E. B.; Jayanegara, A.: Improving Nutritional Quality of Cocoa Pod (*Theobroma cacao*) through Chemical and Biological Treatments for Ruminant Feeding: *In vitro* and *In vivo* Evaluation. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2015**, 28 (3), 343–350.
- Lanfermann, I.; Krings, U.; Schopp, S.; Berger, R. G.: Isotope Labelling Experiments on the Formation Pathway of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone from l-Isoleucine in Cultures of *Laetiporus sulphureus*. *Flavour Fragr. J.* **2014**, 29 (4), 233–239.
- Lau, A. P.S.; Lee, A. K.Y.; Chan, C. K.; Fang, M.: Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmos. Environ.* **2006**, 40 (2), 249–259.
- Lindner, D. L.; Banik, M. T.: Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America. *Mycologia.* **2008**, 100 (3), 417–430.
- Liu, J.; Vijayakumar, C.; Hall, C. A.; Hadley, M.; Wolf-Hall, C. E.: Sensory and Chemical Analyses of Oyster Mushrooms (*Pleurotus sajor-caju*) Harvested from Different Substrates. *J. Food Sci.* **2005**, 70 (9), 586-592.
- Liu, Y.-P.; Pu, C.-J.; Wang, M.; He, J.; Li, Z.-H.; Feng, T.; Xie, J.; Liu, J.-K.: Cytotoxic ergosterols from cultures of the basidiomycete *Psathyrella candolleana*. *Fitoterapia.* **2019**, 138, 104289.

- Lomascolo, A.; Stentelaire, C.; Asther, M.; Lesage-Meessen, L.: Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* **1999**, 17 (7), 282–289.
- Lopez, A. S.; Dimick, P. S.: Cocoa Fermentation. In: *Biotechnology* (Rehm, H.-J.; Reed, G.): Wiley-VCH, Weinheim, **1995**, 561–577.
- Lu, F.; Rodriguez-Garcia, J.; van Damme, I.; Westwood, N. J.; Shaw, L.; Robinson, J. S.; Warren, G.; Chatzifragkou, A.; Mason, S. M.; Gomez, L.; Faas, L.; Balcombe, K.; Srinivasan, C.; Picchioni, F.; Hadley, P. Charalamopopoulus, D.: Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, 14, 80–88.
- Lundell, T. K.; Mäkelä, M. R.; Hildén, K.: Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes--ecological, functional and phylogenetic review. *J. Basic Microbiol.* **2010**, 50 (1), 5–20.
- Mallikarjuna, S. E.; Ranjini, A.; H., Devendra J.; Vijayalakshmi, M. R.; Shashirekha, M. N.; Rajarathnam, S.: Mineral Composition of Four Edible Mushrooms. *J. Chem.* **2013**, 2013, 1–5.
- Manara, P.; Zabaniotou, A.; Vanderghem, C.; Richel, A.: Lignin extraction from Mediterranean agro-wastes: Impact of pretreatment conditions on lignin chemical structure and thermal degradation behavior. *Catal. Today.* **2014**, 223, 25–34.
- Manu-Tawiah, W.; Martin, A. M.: Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiol.* **1987**, 4, 303–310.
- Manzi, P.; Gambelli, L.; Marconi, S.; Vivanti, V.; Pizzoferrato, L.: Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem.* **1999**, 65 (4), 477–482.
- Manzi, P.; Marconi, S.; Aguzzi, A.; Pizzoferrato, L.: Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chem.* **2004**, 84 (2), 201–206.
- Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M. A.; Figueroa, J. G.; Pérez-Álvarez, J. A.; Viuda-Martos, M.: Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao L.*) co-products. *Food Res. Int.* **2012**, 49 (1), 39–45.
- Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M.: *Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg: Springer, **2014**, 5. Auflage.
- Mears, L.; Stocks, S. M.; Sin, G.; Gernaey, K. V.: A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *J. Biotechnol.* **2017**, 245, 34–46.
- Meersman, E.; Steensels, J.; Mathawan, M.; Wittcox, P.-J.; Saels, V.; Struyf, N.; Benaert, H.; Vrancken, G.; Verstrepen, K. J.: Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS ONE.* **2013**, 8 (12), e81559.

- Michelot, D.; Siobud, E.; Doré, J.-C.; Viel, C.; Poirier, F.: Update on Metal Content Profiles in Mushrooms - Toxicological Implications and Tentative Approach to the Mechanisms of Bioaccumulation. *Toxicol.* **1998**, 36 (12), 1997–2012.
- Mille-Lindblom, C.; von Wachenfeldt, E.; Tranvik, L. J.: Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *J. Microbiol. Methods.* **2004**, 59 (2), 253–262.
- Minihane, B. J.; Brown, D. E.: Fed-batch culture technology. *Biotechnol. Adv.* **1986**, 4 (2), 207–218.
- Mitchell, H. H.; Block, R. J.: Some Relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *Nutr. Rev.* **1978**, 36 (9), 281–283.
- Müller, M. T.: Einfluss freier Fettsäuren auf die kristallisationskinetischen und polymorphen Eigenschaften von Kakaobutter und -äquivalenten. Göttingen: Cuvillier Verlag, **2020**.
- Nadányi, R.; Ház, A.; Lisý, A.; Jablonský, M.; Šurina, I.; Majová, V.; Baco, A.: Lignin Modifications, Applications, and Possible Market Prices. *Energies.* **2022**, 15 (18), 6520.
- Nagamine, S.; Liu, C.; Nishishita, J.; Kozaki, T.; Sogahata, K.; Sato, Y.; Minami, A.; Ozaki, T.; Schmidt-Dannert, C.; Maruyama, J.-I.; Oiwa, H.: Ascomycete *Aspergillus oryzae* Is an Efficient Expression Host for Production of Basidiomycete Terpenes by Using Genomic DNA Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, 85 (15).
- Naik, B.; Kumar, V.: Cocoa Butter and its Alternatives: A Review. *J. Biores. Eng. Technol.* **2014**, 1, 7–17.
- Nguyen, T.; Nguyen, N. H.: Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.). *Technologies.* **2017**, 5 (2), 14.
- Niemenmaa, O.; Galkin, S.; Hatakka, A.: Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, 62 (2), 125–134.
- NIST Chemistry WebBook: NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69. **2022**.
- Nitschke, J.; Altenbach, H.-J.; Malolepszy, T.; Mölleken, H.: A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346 (11), 1307–1310.
- Noonan, S. C.; Savage, G. P.: Oxalate Content of Foods and its Effect on Humans. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **1999**, 8 (1), 64–74.
- Nowak, R.; Nowacka-Jechalke, N.; Juda, M.; Malm, A.: The preliminary study of prebiotic potential of Polish wild mushroom polysaccharides: the stimulation effect on *Lactobacillus* strains growth. *Eur. J. Nutr.* **2018**, 57 (4), 1511–1521.

- Nsor-Atindana, J.; Zhong, F.; Mothibe, K. J.; Bangoura, M. L.; Lagnika, C.: Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pak. J. Nutr.* **2012**, 11 (7), 574–579.
- Nunes, C. S. O.; da Silva, M. L. C.; Camilloto, G. P.; Machado, B. A. S.; Hodel, K. V. S.; Koblitiz, M. G. B.; Carvalho, G. B. M.; Uetanabaro, A. P. T.: Potential Applicability of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L) as an Adjunct for Beer Production. *Sci. World J.* **2020**, 3192585.
- Nwokoye, A. I.; Kuforiji, O. O.; Oni, P. I.: Studies on Mycelial Growth Requirements of *Pleurotus ostreatus*. *Int. J. Basic Appl. Sci.* **2010**, 10 (2).
- Ochiai, N.; Sasamoto, K.; David, F.; Sandra, P.: Recent Developments of Stir Bar Sorptive Extraction for Food Applications: Extension to Polar Solutes. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (28), 7249–7255.
- Oddoye, E. O. K.; Agyente-Badu, C. K.; Gyedu-Akoto, E.: Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In: Chocolate in Health and Nutrition (Watson, R. R.; Preedy, V. R.; Zibadi, S.). Totowa, NJ: Humana Press, **2013**.
- Omotoso, O. B.; Bello, I. A.; Fajemisin, A. N.: Effects of Differently Treated *Theobroma Cacao* Pod Husks Silage and Cassava Peel Meals on Nutrient Utilization and Weight Gain of West African Dwarf Goats. *Anim. Res. Int.* **2018**, 15 (2), 3020–3033.
- Ortiz-Santana, B.; Lindner, D. L.; Miettinen, O.; Justo, A.; Hibbett, David S.: A phylogenetic overview of the antrodia clade (Basidiomycota, Polyporales). *Mycologia.* **2013**, 105 (6), 1391–1411.
- Oser, B. L.: An Integrated Essential Amino Acid Index for Predicting the Biological Value of Proteins. In: Albanese Protein and amino acid nutrition. Academic Press, **1959**, 1. Auflage.
- Osunde, M. O.; Olayinka, A.; Fashina, C. D.; Torimiro, N.: Effect of Carbon-Nitrogen Ratios of Lignocellulosic Substrates on the Yield of Mushroom (*Pleurotus pulmonarius*). *OALib.* **2019**, 6 (10), 1–8.
- Ota, K.; Leonardi, A.; Mikelj, M.; Skočaj, M.; Wohlschlager, T.; Künzler, M.; Aebi, M.; Narat, M.; Krizaj, I.; Anderluh, G.; Sepcic, K.; Macek, P.: Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie.* **2013**, 95 (10), 1855–1864.
- Özdemir, S.; Heerd, D.; Quitmann, H.; Zhang, Y.; Fraatz, M.; Zorn, H.; Czermak, P.: Process Parameters Affecting the Synthesis of Natural Flavors by Shiitake (*Lentinula edodes*) during the Production of a Non-Alcoholic Beverage. *Beverages.* **2017**, 3 (4), 20.
- Park, J. P.; Kim, Y. M.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Cho, Y. J.; Lee, Y. S.; Song, C. H.; Yun, J. W.: Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, 34 (6), 433–438.

- Peksa, A.; Miedzianka, J.: Amino Acid Composition of Enzymatically Hydrolysed Potato Protein Preparations. *Czech. J. Food Sci.* **2014**, 32 (3), 265–272.
- Petre, M.; Pătrulescu, F.; Teodorescu, R. I.: Controlled Cultivation of Mushrooms on Winery and Vineyard Wastes. In: *Mushroom Biotechnology*. Elsevier, **2016**, 31–47.
- Pettipher, G. L.: Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, 37 (3), 297–309.
- Pfannkoch, E.; Whitecavage, J.: Stir Bar Sorptive Extraction from Food Simulation Solvents: Preliminary Studies. Hg. v. Gerstel Inc. Caton Research Center, **2002**. Online verfügbar unter <https://www.gerstelus.com/applications/stir-bar-sorptive-extraction-from-food-simulating-solvents-preliminary-studies/>, zuletzt geprüft am 13.11.2023.
- Pfannkoch, E.; Whitecavage, J.; Hoffmann, A.: Stir Bar Sorptive Extraction: Capacity and Competition Effects. Hg. v. Gerstel Inc., **2002**. Online verfügbar unter: https://www.gerstelus.com/wp-content/uploads/2017/07/2002-04_twister-capacity-competition-effects.pdf, zuletzt geprüft am 13.11.2023
- Philippoussis, A.; Diamantopoulou, P.: Agro-Food Industry Wastes and Agricultural Residues Conversion into High Value Products by Mushroom Cultivation. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, **2011**.
- Pino, J. A.; Mesa, J.; Muñoz, Y.; Martí, M. P.; Marbot, R.: Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (6), 2213–2223.
- Poulter, C. D.; Rilling, H. C.: Prenyltransferase: The Mechanism of the Reaction. *Biochemistry*. **1976**, 15, Artikel 5.
- Preedy, V. R.: *Coffee in health and disease prevention*. Amsterdam: Elsevier, **2015**.
- Proserpio, C.; Lavelli, V.; Laureati, M.; Pagliarini, E.: Effect of *Pleurotus ostreatus* powder addition in vegetable soup on β -glucan content, sensory perception, and acceptability. *Food Sci. Nutr.* **2019**, 7 (2), 730–737.
- Puerari, C.; Magalhães, K. T.; Schwan, R. F.: New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Res. Int.* **2012**, 48 (2), 634–640.
- Püth, N.; Ersoy, F.; Berger, R. G.; Krings, U.: Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured *Cerrena unicolor*. *Foods* **2023**, 12 (3).
- Rafiee, K.; Kaur, G.; Brar, S. K.: Fungal biocomposites: How process engineering affects composition and properties? *Bioresour. Technol.* **2021**, 14, 100692.
- Raviraja, N. S.; Nikolcheva, L. G.; Barlocher, F.: Pellet Size Affects Mycelial Ergosterol Content in Aquatic Hyphomycetes. *Mycologia*. **2004**, 96 (2), 388.
- Ridgway, K.; Lalljie, S. P. D.; Smith, R. M.: The use of stir bar sorptive extraction - a potential alternative method for the determination of furan, evaluated using two example food matrices. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 657 (2), 169–174.

- Rigling, M.; Liu, Z.; Hofele, M.; Prozmann, J.; Zhang, C.; Ni, L.; Fan, R.; Zhang, Y.: Aroma and Catechin Profile and *in vitro* Antioxidant Activity of Green Tea Infusion as Affected by Submerged Fermentation with *Wolfiporia cocos* (Fu Ling). *Food Chem.* **2021**, 361, 130065.
- Rinkel, J.; Rabe, P.; Dickschat, J. S.: The EI-MS Fragmentation Mechanisms of Bacterial Sesquiterpenes and Diterpenes. *Eur. J. Organic Chem.* **2019**, 2-3, 351–359.
- RKI: Antworten des Robert Koch-Instituts auf häufig gestellte Fragen zu Vitamin D. **2019**. Online verfügbar unter https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Vitamin_D/Vitamin_D_FAQ-Liste.html, zuletzt geprüft am 12.11.2023
- Roberts, J. S.; Teichert, A.; McHugh, T. H.: Vitamin D₂ formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (12), 4541–4544.
- Rodrigues, M. L.: The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio.* **2018**, 9 (5).
- Rojo-Poveda, O.; Barbosa-Pereira, L.; Zeppa, G.; Stévigny, C.: Cocoa Bean Shell-A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients.* **2020**, 12 (4).
- Rop, O.; Mlcek, J.; Jurikova, T.: Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* **2009**, 67 (11), 624–631.
- Rossberg, C.; Bremer, M.; Machill, S.; Koenig, S.; Kerns, G.; Boeriu, C.; Windeisen, E.; Fischer, S.: Separation and characterisation of sulphur-free lignin from different agricultural residues. *Ind. Crops Prod.* **2015**, 73, 81–89.
- Rouches, E.; Herpoël-Gimbert, I.; Steyer, J. P.; Carrere, H.: Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2016**, 59, 179–198.
- Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, A. T.: Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb. Biotechnol.* **2009**, 2 (2), 164–177.
- Rychlik, M.; Asam, S.: Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Environ. Sci. Eur.* **2009**, 21 (5), 470–482.
- Saint-Eve, A.; Délérís, I.; Feron, G.; Ibarra, D.; Guichard, E.; Souchon, I.: How trigeminal, taste and aroma perceptions are affected in mint-flavored carbonated beverages. *Food Qual. Prefer.* **2010**, 21 (8), 1026–1033.
- Saint-Eve, A.; Délérís, I.; Aubin, E.; Rabillier, J.-M.; Ibarra, D.; Souchon, I.: Influence of Composition (CO₂ and Sugar) on Aroma Release and Perception of Mint-Flavored Carbonated Beverages. In: *Flavour Science*: Elsevier, **2014**, 151–154.
- Şanlıer, N.; Gökcen, B. B.; Sezgin, A. C.: Health Benefits of Fermented Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, 59 (3), 506–527.

- Sawangwan, T.; Wansanit, W.; Pattani, L.; Noysang, C.: Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. *Agric. Nat. Resour.* **2018**, 52 (6), 519–524.
- Schmidt-Dannert, C.: Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, 148, 19–61.
- Scholtmeijer, K.; van den Broek, L. A. M.; Fischer, A. R. H.; van Peer, A.: Potential Protein Production from Lignocellulosic Materials Using Edible Mushroom Forming Fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, 71 (11), 4450–4457.
- Schrage, E. J.; Ewing, A. P.: The Cocoa Industry and Child Labour. *Journal of Corporate Citizenship.* **2005**, 18, 99–112.
- Schwan, R. F.; Wheals, A. E.: The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44 (4), 205–221.
- Serrano, L.; Sels, B.; Luque, R.: Lignin Chemistry. Hollingworth: Springer Nature Switzerland AG, **2020**.
- Shah, F.; Mali, T.; Lundell, T. K.: Polyporales Brown Rot Species *Fomitopsis pinicola*: Enzyme Activity Profiles, Oxalic Acid Production, and Fe³⁺-Reducing Metabolite Secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 84 (8).
- Shi, K.; Liu, Y.; Chen, P.; Li, Y.: Contribution of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Laccase in Lignite Degradation by Mixed White-Rot Fungi. *Waste Biomass Valor.* **2021**, 12 (7), 3753–3763.
- Shimizu, K.; Fujita, R.; Kondo, R.; Sakai, K.; Kaneko, S.: Morphological features and dietary functional components in fruit bodies of two strains of *Pholiota adiposa* grown on artificial beds. *J. Wood Sci.* **2003**, 49 (2), 193–196.
- Silva, F. M.; Sims, C.; Balaban, M. O.; Silva, C. L. M.; Keefe, S.: Kinetics of flavour and aroma changes in thermally processed cupuau (*Theobroma grandiflorum*) pulp. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80 (6), 783–787.
- Sio, F.; Laratta, B.; Giovane, A.; Quagliuolo, L.; Castaldo, D.; Servillo, L.: Analysis of free and esterified ergosterol in tomato products. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (3), 780–784.
- Smiderle, F. R.; Olsen, L. M.; Ruthes, A. C.; Czelusniak, P. A.; Santana-Filho, A. P.; Sasaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M.: Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87 (1), 368–376.
- Sobamiwa, O.; Longe, O. G.: Utilization of cocoa-pod pericarp fractions in broiler chick diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1994**, 47 (3-4), 237–244.
- Sodré, G. A.; Venturini, M. T.; Ribeiro, D. O.; Marrocos, P. C. L.: Extrato da casca do fruto do cacauzeiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacauzeiro. *Rev. Bras. Frutic.* **2012**, 34 (3), 881–887.

- Sommer, S.; Fraatz, M. A.; Büttner, J.; Salem, A. A.; Rühl, M.; Zorn, H.: Wild Strawberry-like Flavor Produced by the Fungus *Wolfiporia cocos*—Identification of Character Impact Compounds by Aroma Dilution Analysis after Dynamic Headspace Extraction. *J. Agr. Food Chem.* **2021**, 69 (47), 14222–14230.
- Sommer, S.; Hoffmann, J. L.; Fraatz, M. A.; Zorn, H.: Upcycling of black currant pomace for the production of a fermented beverage with *Wolfiporia cocos*. *J. Food Sci. Technol.* **2023**, 60, 1313-1322.
- Song, Z.; Vail, A.; Sadowsky, M. J.; Schilling, J. S.: Quantitative PCR for Measuring Biomass of Decomposer Fungi in Planta. *Fungal Ecol.* **2014**, 7, 39–46.
- Souci, S. W.; Andersen, G.: Der kleine Souci-Fachmann-Kraut. Lebensmitteltabelle für die Praxis. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2011**, 5. Auflage.
- Statista Research Department: Durchschnittlicher Preis von Kakaobohnen im Welthandel von Dezember 2020 bis Dezember 2022. Hg. v. Statista, **2022a**. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/325556/umfrage/preis-je-tonne-kakao-im-welthandel/#:~:text=Der%20durchschnittliche%20Handelspreis%20f%C3%BCr%20eine,2.319%2C35%20Euro%20pro%20Tonne>. Zuletzt geprüft am 20.02.2023.
- Statista Research Department: Entwicklung der Weltbevölkerungszahl von Christi Geburt bis zum Jahr 2021 (in Milliarden). Hg. v. Statista, **2022b**. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1694/umfrage/entwicklung-der-weltbevoelkerungszahl/#professional>. Zuletzt geprüft am 27.02.2023.
- Statista Research Department: Prognose zur Entwicklung der Weltbevölkerung von 2010 bis 2100 (in Milliarden). Hg. v. Statista, **2022c**. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1717/umfrage/prognose-zur-entwicklung-der-weltbevoelkerung/>. Zuletzt geprüft am 27.02.2023.
- Statista Research Department: Konsum von alkoholischen Getränken. Hg. v. Statista, **2023**. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/themen/22/alkohol/#topicOverview>. Zuletzt geprüft am 24.02.2023.
- Stephan, A.; Ahlborn, J.; Zajul, M.; Zorn, H.: Edible Mushroom Mycelia of *Pleurotus Sapidus* as Novel Protein Sources in a Vegan Boiled Sausage Analog System: Functionality and Sensory Tests in Comparison to Commercial Proteins and Meat Sausages. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, 244 (5), 913–924.
- Stephan, A.; Zorn, H.; Zajul, M.; Ahlborn, J.; Trapp, T.; Rühl, M.; Fraatz, M. A.: Nahrungsmittelzubereitungen mit Pilzmyzelien. Angemeldet durch Van Hees GmbH. Veröffentlichungsnr: DE 10 2016 110 653 A1, **2017**.

- Stijve, T.; Pttet, A.: Absence of agaritine in *Pleurotus* species and in other cultivated and wild-growing mushrooms not belonging to the genus *Agaricus*. *Deutsche Lebensmittelrundschau*. **2000**, 96, 251–254.
- Strijbis, K.; Distel, B.: Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic cell*. **2010**, 9 (12), 1809–1815.
- Sukha, D.: Portential Value Added Products from Trinidad and Tobago Cocoa. *Seminar/Exhibition on the revitalisation of the Trinidad and Tobago cocoa industry – Targets, Problems and Options*, **2003**, 69–73.
- Takao, S.: Organic acid production by Basidiomycetes. I. Screening of acid-producing strains. *Appl. Microbiol.* **1965**, 13 (5), 732–737.
- Tao, J.; Li, S.; Ye, F.; Zhou, Y.; Lei, L.; Zhao, G.: Lignin - An Underutilized, Renewable and Valuable Material for Food Industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, 60 (12), 2011–2033.
- Tardieu, D.; Bailly, J. D.; Benard, G.; Guerre, P.: Comparison of Two Extraction Methods for Ergosterol Determination in Vegetal Feeds. *Revue Méd. Vét.* **2007**, 158, 442–446.
- Teranishi, R.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.: Odor Quality and Chemical Structure in Fruit and Vegetable Flavors. *Annals of the New York Academy of Science*. **1974**, 237 (1), 209–2016.
- TGSC: The Good Scents Company Information System - Providing information for the Flavor, Fragrance, Food and Cosmetic industries. Online verfügbar unter <http://www.thegoodscentscompany.com/index.html>, **2023**. Zuletzt geprüft am 09.03.2023.
- The International Cocoa Organization: ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. **2021**, Abidjan, Côte d'Ivoire, 2021 (XLVIII, No. 2, Cocoa Year 2021/2022).
- Thompson, S. S.; Miller, K. B.; Lopez, A. S.; Camu, N.: Cocoa and Coffee. In: *Food Microbiology* (Doyle, M. P.; Buchanan, R.L.). Washington: ASM Press, **2012**, 881–899.
- Tien, M.; Kirk, T. K.: Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1984**, 81 (8), 2280–2284.
- Tjinh, N. T. T.; An, N. T.; Hòa, H. T. T.; Tươi, N. T.: A Study of Wine Fermentation from Mucilage of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.). *DLU JOS*. **2016**, 6 (3), 387.
- Toker, O. S.; Palabiyik, I.; Pirouzian, H. R.; Aktar, T.; Konar, N.: Chocolate aroma: Factors, importance and analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, 99, 580–592.
- Toth, J.; Lopata, J.; Schweizer, C.; Pachard, S.: Method for Production and Use of a Syrus Derived from the Fruit Pulp of the Cacao Pod. Veröffentlichungsnr: WO 2017/044610 A1, **2017**.
- Trapp, T.; Jäger, D. A.; Fraatz, M. A.; Zorn, H.: Development and Validation of a Novel Method for Aroma Dilution Analysis by Means of Stir Bar Sorptive Extraction. *Eur. Food Res. Technol.* **2018a**, 244 (5), 949–957.

- Trapp, T.; Zajul, M.; Ahlborn, J.; Stephan, A.; Zorn, H.; Fraatz, M. A.: Submerged Cultivation of *Pleurotus sapidus* with Molasses: Aroma Dilution Analyses by Means of Solid Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction. *J. Agr. Food Chem.* **2018b**, 66 (10), 2393–2402.
- Tripathi, M. K.; Mishra, A. S.; Misra, A. K.; Vaithyanathan, S.; Prasad, R.; Jakhmola, R. C.: Selection of white-rot basidiomycetes for bioconversion of mustard (*Brassica campestris*) straw under solid-state fermentation into energy substrate for rumen micro-organism. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, 46 (3), 364–370.
- Tshinyangu, K. K.; Hennebert, G. L.: Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus*. *Food Chem.* **1996**, 57 (2), 223–227.
- Tsuji, A.; Kinoshita, T.; Hoshino, M.: Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17 (7), 1505–1510.
- Turck, D.; Bresson, J.-L.; Burlingame, B.; Dean, T.; Fairweather-Tait, S.; Heinonen, M.: Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. *EFS2.* **2016**, 14 (11).
- U.S. Food and Drug Administration: GRAS Conclusion for the Use of Cacao Pulp, Juice and Concentrate in Select Foods (GRAS Notice (GRN) No. 947), **2020**.
- UNICEF: Children's Rights in the Cocoa-Growing Communities of Côte d'Ivoire - Synthesis Report. **2018**. Online verfügbar unter <https://sites.unicef.org/csr/css/synthesis-report-children-rights-cocoa-communities-en.pdf>. Zuletzt geprüft am 08.01.2023.
- van Ho, T. T.; Zhao, J.; Fleet, G.: Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, 174, 72–87.
- Vandamme, E. J.: Bioflavours and Fragrances via Fungi and their Enzymes. *Fungal Diversity.* **2003**, 13, 153–166.
- Vanderschueren, R.; Argüello, D.; Blommaert, H.; Montalvo, D.; Barraza, F.; Maurice, L.; Schreck, E.; Schulin, R.; Lewis, Caleb; Vasquez, J. L.; Umaharan, P.; Chavez, E.; Sarret, G.; Smolders, E.: Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Sci. Total Environ.* **2021**, 781, 146779.
- Vásquez, Z. S.; Carvalho N., Dão P.; Pereira, G. V. M.; Vandenberghe, L. P. S.; Oliveira, P. Z.; Tiburcio, P. B. Rogez, H. L. G.; Neto, A. G.; Socol, C. R.: Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste management.* **2019**, 90, 72–83.
- Vetter, J.: Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chem.* **2007**, 102 (1), 6–9.
- Vieira, J. B.; Kuschel, B.; Festring, D.: Foodstuff Products, Ingredients, Processes and Uses. Veröffentlichungsnr: 18212466.9, **2018**.

- Vinardell, M. P.; Mitjans, M.: Lignins and Their Derivatives with Beneficial Effects on Human Health. *Int. J. Mol.* **2017**, 18 (6).
- VO (EG) Nr. 1334/2008: Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG, zuletzt geändert am 01.03.2023 durch VO (EU) 2023/441.
- VO (EG) Nr. 152/2009: Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln. VO (EG) Nr. 152/2009, zuletzt geändert am 08.06.2022 durch die Durchführungsverordnung (EU) 2022/893 der Kommission vom 07.06.2022.
- VO (EG) Nr. 396/2005: Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates, zuletzt geändert am 30.08.2022 durch die Verordnung (EU) 2022/1435 der Kommission vom 26.08.2022.
- VO (EU) 2015/2283: Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 1852/2001 der Kommission, zuletzt geändert am 06.09.2019 durch Verordnung (EU) 2019/1381.
- VO (EU) 2017/2470: Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 der Kommission vom 20. Dezember 2017 zur Erstellung der Unionsliste der neuartigen Lebensmittel gemäß der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel (Abl. L 351 vom 30.12.2017, S. 72), zuletzt geändert am 02.08.2023 durch Durchführungsverordnung (EU) 2023/1583.
- Volschenk, H.; van Vuuren, H. J. J.; Viljoen-Bloom, M.: Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African J. Enol. Vitic.* **2017**, 27 (2).
- Voříšková, J.; Dobiášová, P.; Šnajdr, J.; Vaněk, D.; Cajthaml, T.; Šantrůčková, H.; Baldrian, P.: Chemical Composition of Litter Affects the Growth and Enzyme Production by the Saprotrophic Basidiomycete *Hypholoma fasciculare*. *Fungal Ecology.* **2011**, 4 (6), 417–426.
- Vriesmann, L. C.; Mello Castanho Amboni, R.; Oliveira Petkowicz, C. L.: Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Ind. Crops Prod.* **2011**, 34 (1), 1173–1181.

- Vriesmann, L. C.; Teófilo, R. F.; Lúcia de Oliveira Petkowicz, C.: Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. *LWT*. **2012**, 49 (1), 108–116.
- Vuyst, L.; Weckx, S.: The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, 121 (1), 5–17.
- Vuyst, L.; Leroy, F.: Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2020**, 44 (4), 432–453.
- Wang, Y.; Li, W.; Ma, Y.; Zhao, X.; Zhang, C.: Effect of Thermal Treatments on Quality and Aroma of Watermelon Juice. *J. Food Qual.* **2018**, 1–7.
- Wang, Z.; Gao, T.; He, Z.; Zeng, M.; Qin, F.; Chen, J.: Reduction of Off-Flavor Volatile Compounds in Okara by Fermentation with Four Edible Fungi. *LWT*. **2022**, 155, 112941.
- Wariishi, H.; Valli, K.; Gold, M. H.: Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267 (33), 23688–23695.
- Wessel, M.; Quist-Wessel, P. F.: Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. *NJAS-Wagen. J. Life Sci.* **2015**, 74-75 (1), 1–7.
- WHO: Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, **2007**. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=305231>. Zuletzt geprüft am 07.01.2023.
- WWF: Klimaschutz, landwirtschaftliche Fläche und natürliche Lebensräume. Unter Mitarbeit von Tanja Dräger de Teran und Tilo Suckow, **2021a**. Online verfügbar unter <https://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/Publikationen-PDF/Landwirtschaft/kulinarische-kompass-klima.pdf>. Zuletzt geprüft am 03.09.2022
- WWF: Vom Kakaobaum bis zum Konsumenten: Woher kommt der wertvolle Rohstoff? **2021b**. Online verfügbar unter <https://www.wwf.de/themen-projekte/landwirtschaft/produkte-aus-der-landwirtschaft/kakao>, zuletzt geprüft am 03.09.2022.
- Yalman, S.; Trapp, T.; Vetter, C.; Popa, F.; Fraatz, M. A.; Zorn, H.: Formation of a meat-like flavor by submerged cultivated *Laetiporus montanus*. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, 71 (21), 8083–8092.
- Yapo, B. M.; Besson, V.; Koubala, B. B.; Koffi, K. L.: Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *Am. J. Food Nutr.* **2013**, (1), 38–46.
- Yapo, B. M.; Koffi, K. L.: Extraction and Characterization of Gelling and Emulsifying Pectin Fractions from Cacao Pod Husk. *Nature*. **2013**, 4, 45–51.
- Yelle, D. J.; Ralph, J.; Lu, F.; Hammel, K. E.: Evidence for Cleavage of Lignin by a Brown Rot Basidiomycete. *Environ. Microbiol.* **2008**, 10 (7), 1844–1849.

- Yin, P.; Wang, J.-J.; Kong, Y.-S.; Zhu, Y.; Zhang, J.-W.; Liu, H.; Wang, X.; Guo, G.-M.; Liu, Z.-H.: Dynamic Changes of Volatile Compounds during the Xinyang Maojian Green Tea Manufacturing at an Industrial Scale. *Foods*. **2022**, 11 (17).
- Yuan, J.-P.; Wang, J.-H.; Liu, X.: Distribution of free and esterified ergosterols in the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 77 (1), 159–165.
- Yuan, J.-P.; Wang, J.-H.; Liu, X.; Kuang, H.-C.; Huang, X.-N.: Determination of ergosterol in ganoderma spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (17), 6172–6176.
- Zajul, M. M.: Biotechnologische Produktion von Basidiomyceten-Proteinen auf industriellen Nebensrömen zur Herstellung von Nahrungsmitteln. PhD Thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany, **2017**.
- Zhang, C.; Chen, X.; Orban, A.; Shukul, S.; Birk, F.; Too, H.-P.; Rühl, M.: *Agrocybe aegerita* Serves As a Gateway for Identifying Sesquiterpene Biosynthetic Enzymes in Higher Fungi. *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15 (5), 1268–1277.
- Zhang, Y.; Fraatz, M. A.; Müller, J.; Schmitz, H.-J.; Birk, F.; Schrenk, D.; Zorn, H.: Aroma Characterization and Safety Assessment of a Beverage Fermented by *Trametes versicolor*. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (31), 6915–6921.
- Zhao, H.; Wang, L.; Brennan, M.; Brennan, C.: How Does the Addition of Mushrooms and Their Dietary Fibre Affect Starchy Foods. *J. Future Foods*. **2022**, 2 (1), 18–24.
- Zharare, G. E.; Kabanda, S. M.; Poku, J. Z.: Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. *Sci. Hortic.* **2010**, 125 (2), 95–102.
- Zierler, B.; Siegmund, B.; Pfannhauser, W.: Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chimic. Acta.* **2004**, 520 (1-2), 3–11.
- Zurbano, L.; Bellere, A.; Savilla, L.: Mycelial Growth, Fruiting Body Production and Proximate Composition of *Pleurotus djamor* on Different Substrate. *CLSU Int. J. Sci. Technol.* **2017**, 2 (1).

6. Anhang

6.1 Kalibriergeraden quantitativer Methoden

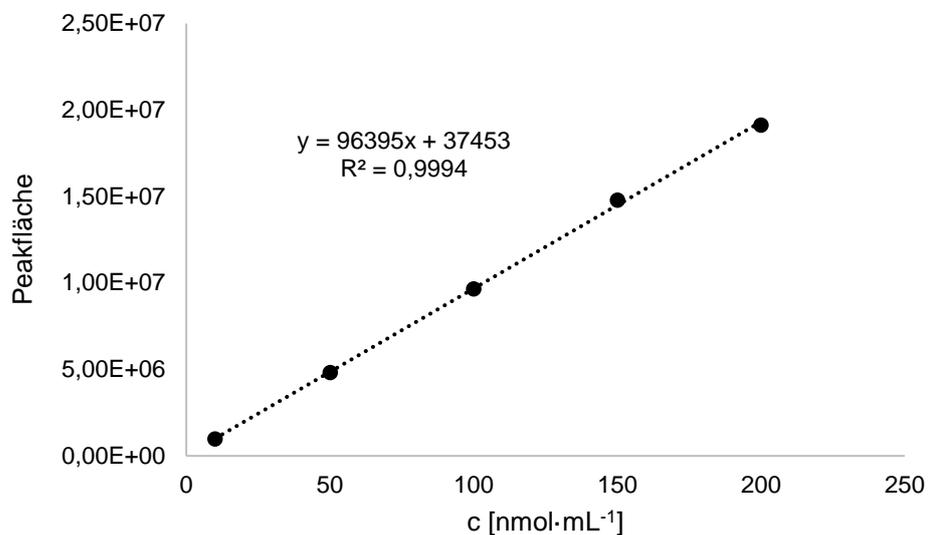


Abbildung 41: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Asparaginsäure.

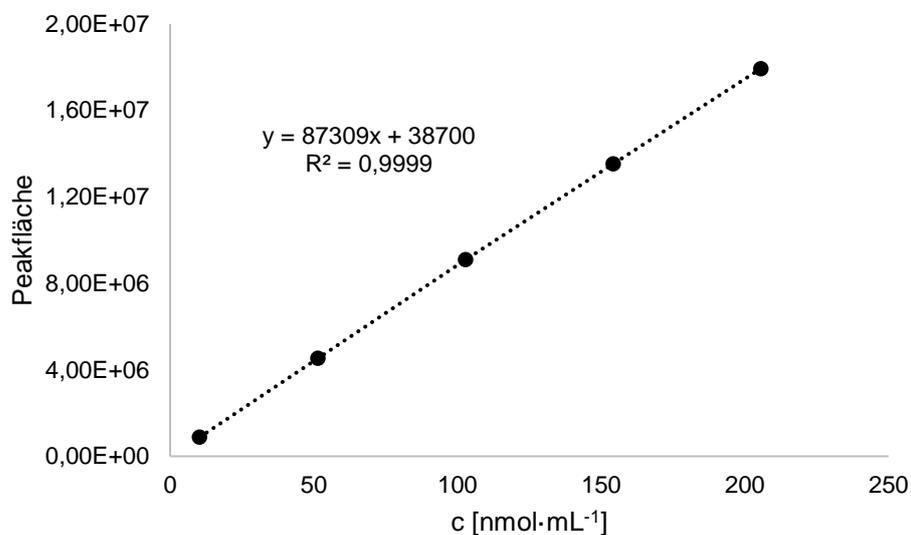


Abbildung 42: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Tryptophan.

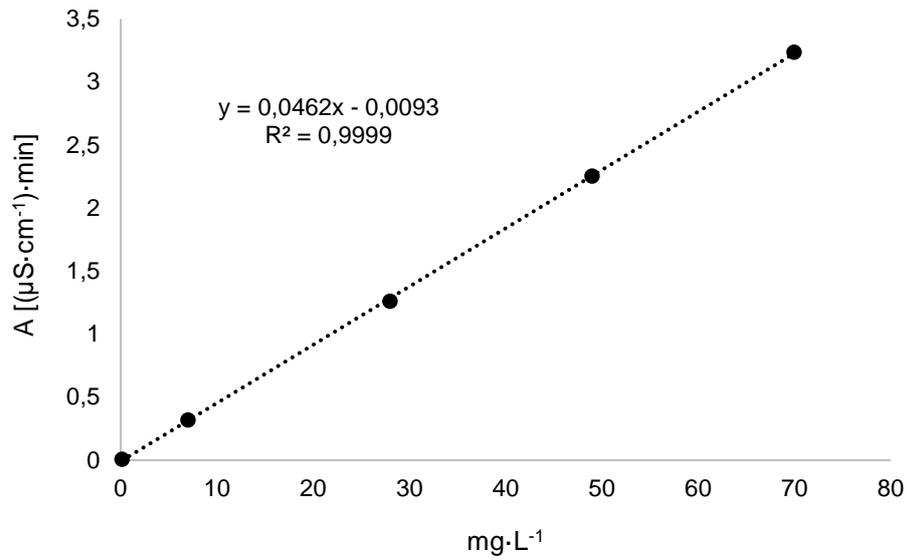


Abbildung 43: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Oxalsäure.

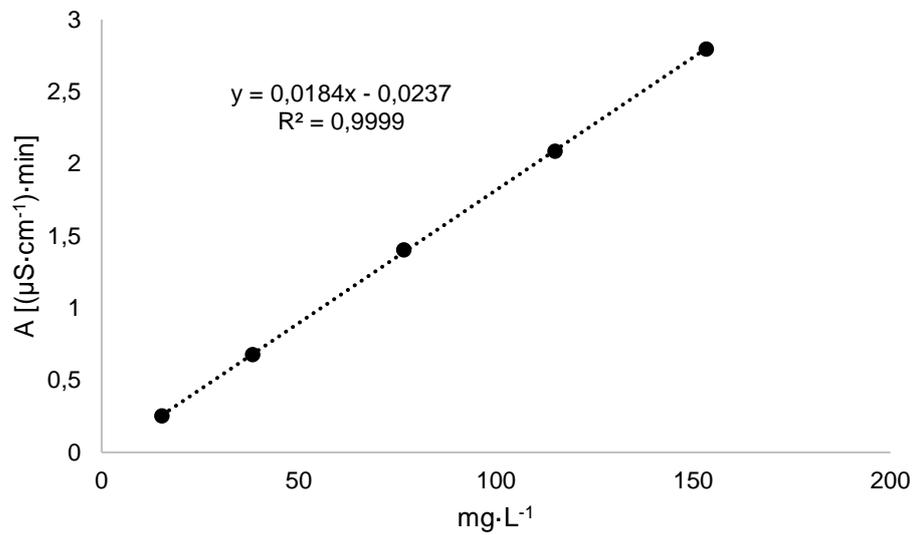


Abbildung 44: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Citronensäure.

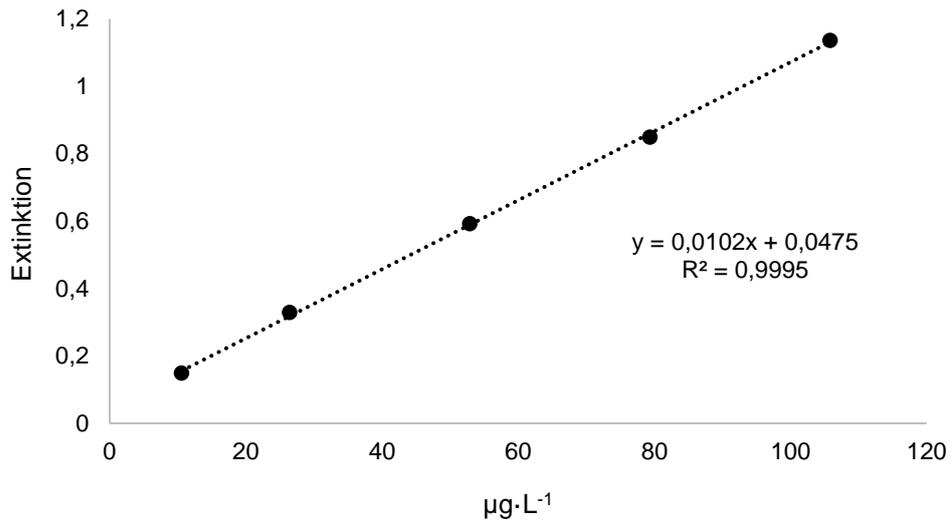


Abbildung 45: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Chitin.

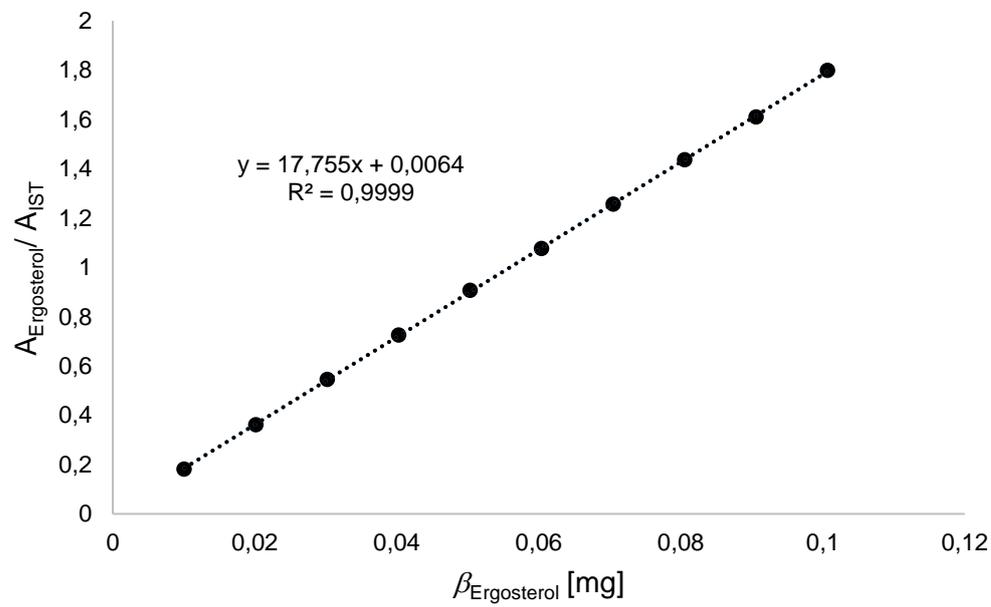


Abbildung 46: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Ergosterol.

6.2 Chromatographische Reinheit von 5-Butyl-2(5H)-furanon

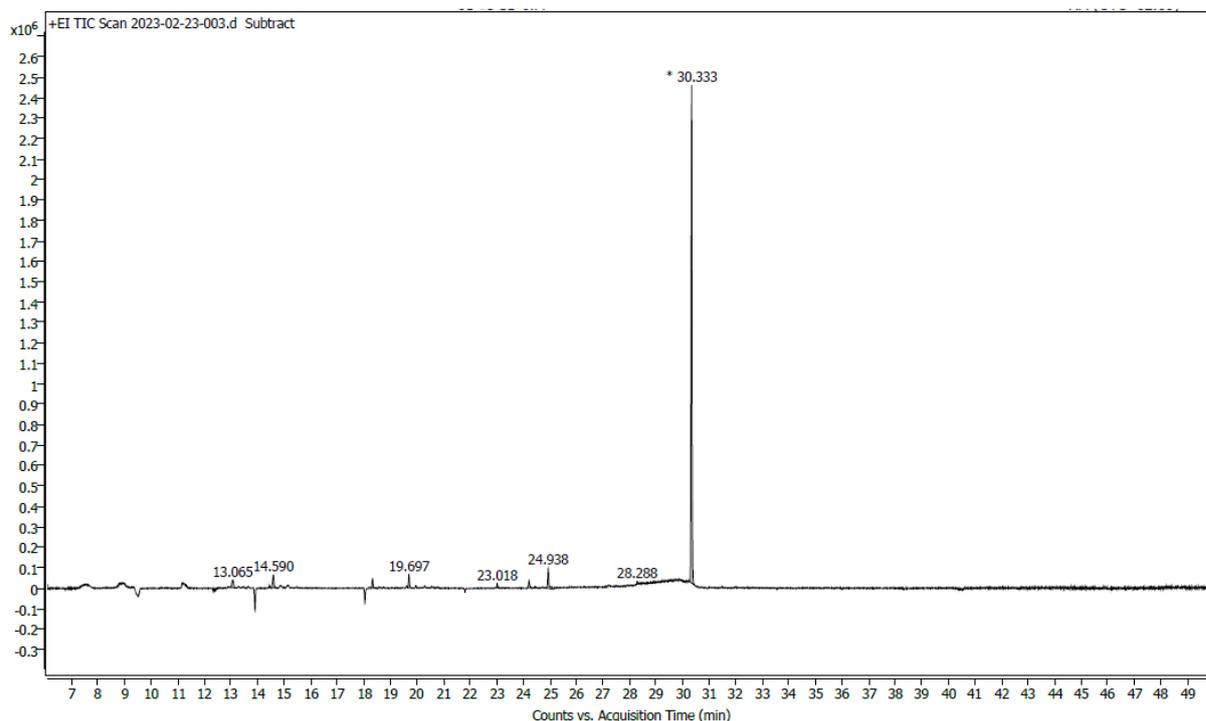


Abbildung 47: Chromatogramm zur Bestimmung der chromatographischen Reinheit von 5-Butyl-2(5H)-furanon abzüglich des Chromatogramms des Lösemittelblindwerts. Reinheit = 76%.

Tabelle 49: Dreifachbestimmung der chromatographischen Reinheit von 5-Butyl-2(5H)-furanon.

	a	b	c	MW
Anteil 5-Butyl-2(5H)-furanon [%]	74,7	77,3	76,1	76,0 ± 1,1

6.3 Fermentation von CPH – Screening in Submers-Kulturen

Tabelle 50: Ergosterol-Referenzwerte der reinen Pilzmyzelien auf ME zur Berechnung des Pilzanteils im Submers-Screening der CPH-Fermentation.

Hauptkulturtag	Ergosterol-Referenzwert [mg·g ⁻¹ TM]
136 FPI	11,18 ± 1,21
177 PSS	4,98 ± 0,45
223 PPI	4,47 ± 0,17
295 PSP	3,64 ± 0,05
310 PCA	1,17 ± 0,06

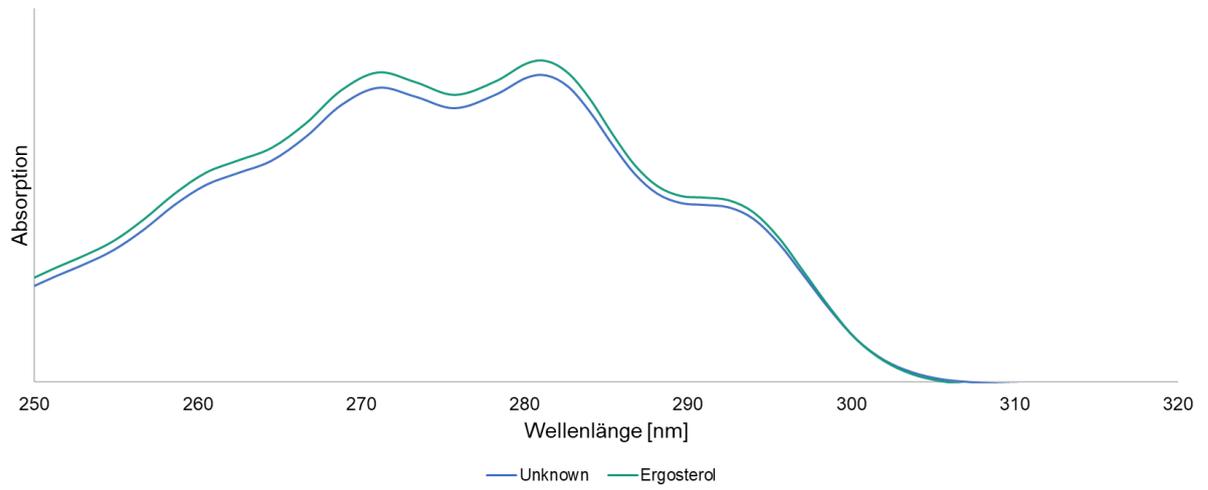


Abbildung 48: Absorptionsspektrum von Ergosterol und dem unbekanntem Ergosterol-Derivat im Myzel von 310-PCA; aufgenommen mittels HPLC-UV/Vis.

6.4 Fermentation von CPH – Analytik der Endprodukte

Tabelle 51: Werte der Enzymaktivität des MnP-Assays in $U \cdot L^{-1}$ von FPI und PSS auf ME- und CPH-Medium ($n=2$).

	ME_{FPI}	ME_{PSS}	CPHF_{FPI}	CPHF_{PSS}
VK (d6)	n.n.	10,00 ± 2,65	-	-
d1	n.n.	8,27 ± 0,30	n.n.	21,82 ± 1,91
d2	n.n.	14,73 ± 1,51	n.n.	127,58 ± 7,93
d3	n.n.	18,35 ± 2,20	n.n.	470,17 ± 15,72
d4	n.n.	18,43 ± 4,68	n.n.	845,04 ± 34,64
d5	42,06 ± 13,87	16,14 ± 4,26	n.n.	877,33 ± 100,07
d6	22,13 ± 3,81	15,59 ± 2,94	n.n.	707,22 ± 159,42
d7	6,38 ± 1,77	12,36 ± 2,81	n.n.	231,54 ± 48,36
d8	n.n.	7,88 ± 0,68	n.n.	136,32 ± 38,95
d9	n.n.	7,88 ± 2,37	n.n.	77,18 ± 6,26
d10	n.n.	5,91 ± 1,22	n.n.	56,47 ± 6,58
d11	n.n.	8,82 ± 1,65	n.n.	32,05 ± 1,44
d14	n.n.	11,97 ± 3,66	n.n.	26,07 ± 5,38

* n.n.: nicht nachweisbar

6.5 Validierung der Ergosterol-Methode

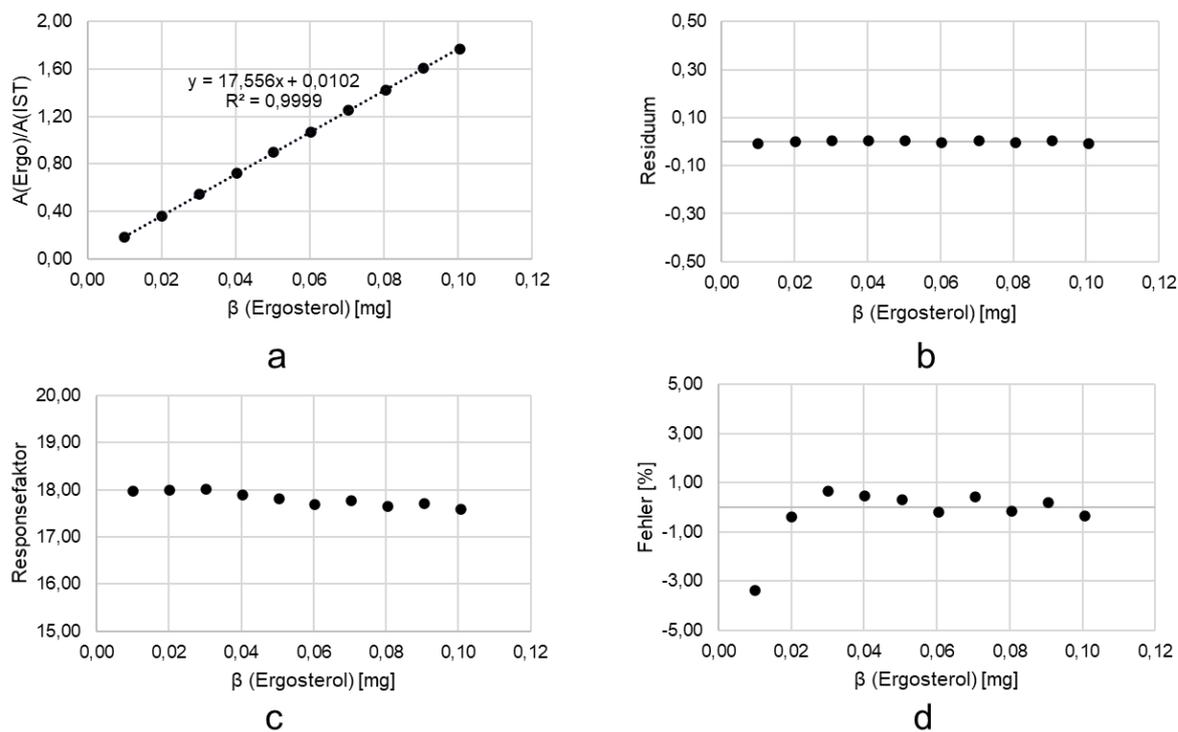


Abbildung 49: Kalibriergerade (a), Residuenplot (b), Responseplot (c) sowie Fehlerplot (d) der Grundkalibrierung B.

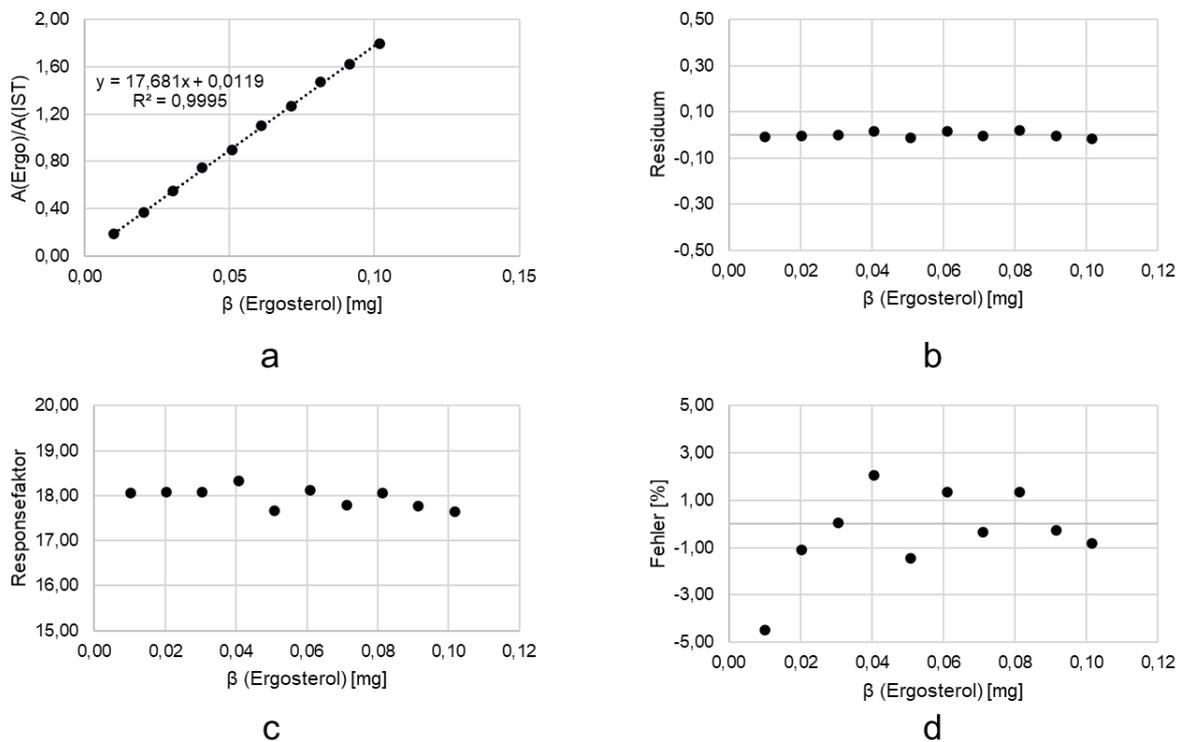
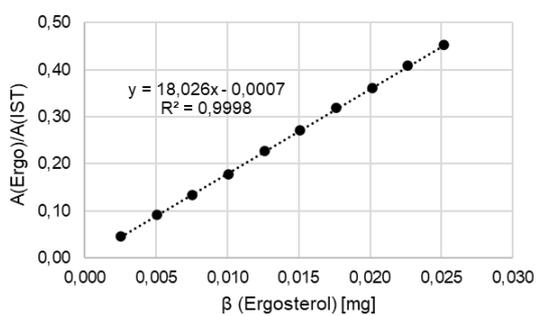


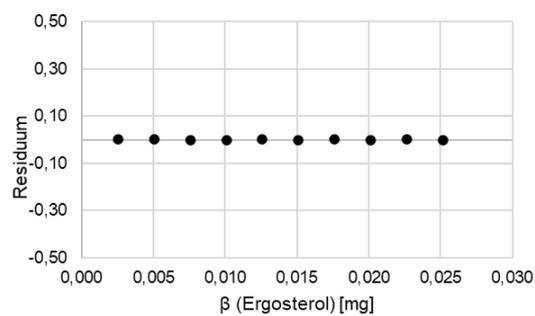
Abbildung 50: Kalibriergerade (a), Residuenplot (b), Responseplot (c) sowie Fehlerplot (d) der Grundkalibrierung C.

Tabelle 52: Daten und Kennzahlen zur Durchführung des Mandel-Linearitätstests für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (F-Test: $\alpha=0.01$; $f1=1$; $f2=N-3$; $N=10$).

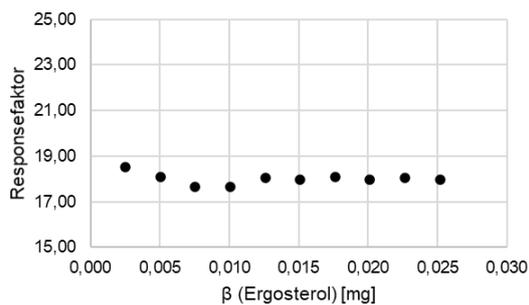
	a	b	c
N	10	10	10
S_{y1}	0,0018	0,0018	0,0028
S_{y2}	0,0017	0,0017	0,0020
DS²	$2,0928 \cdot 10^{-6}$	$7,4383 \cdot 10^{-6}$	$3,6167 \cdot 10^{-5}$
PW	0,6006	2,5391	8,9364
F	12,25	12,25	12,25
Folgerung	linear	linear	linear



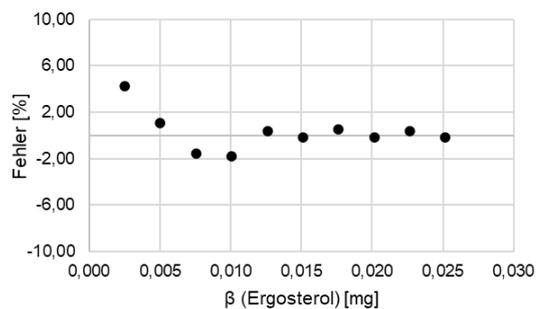
a



b

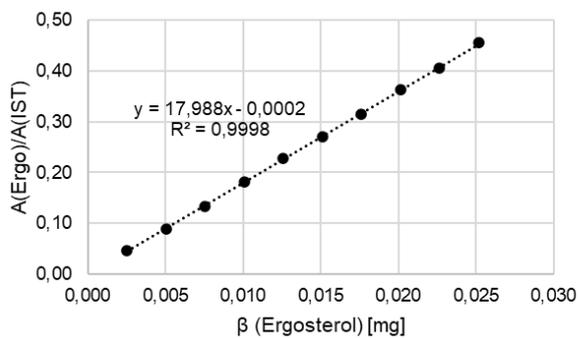


c

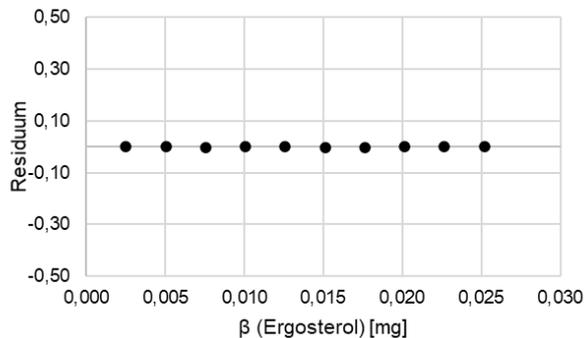


d

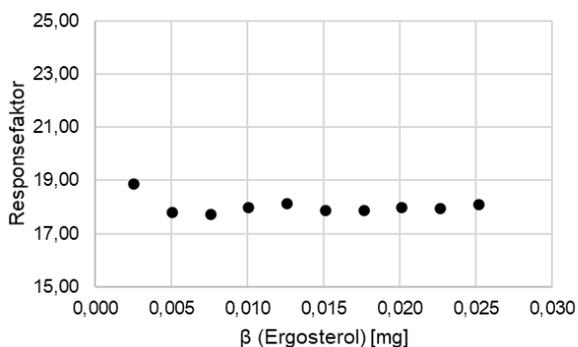
Abbildung 51: Kalibriergerade (a), Residuenplot (b), Responseplot (c) sowie Fehlerplot (d) der Kalibrierung A der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.



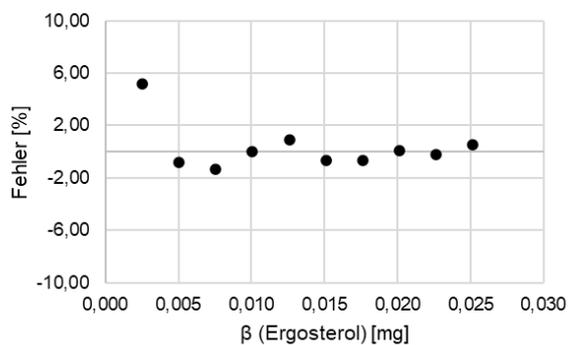
a



b

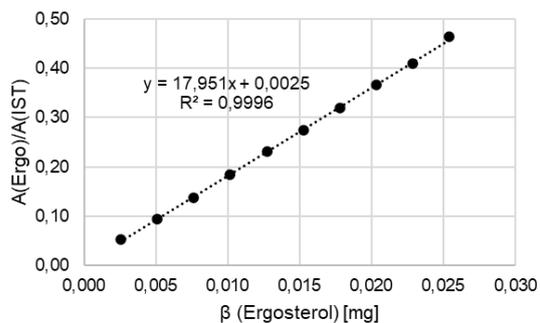


c

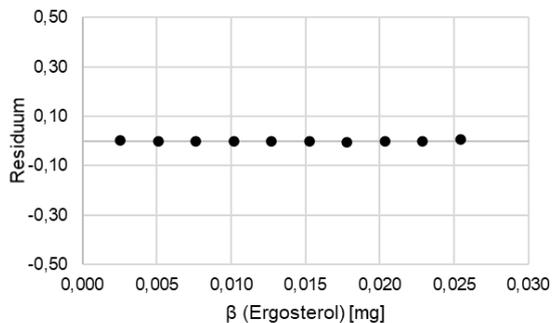


d

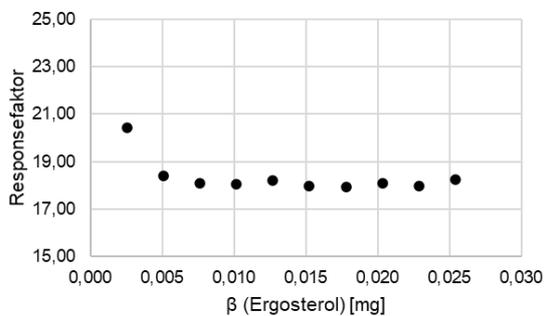
Abbildung 52: Kalibriergerade (a), Residuenplot (b), Responseplot (c) sowie Fehlerplot (d) der Kalibrierung B der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.



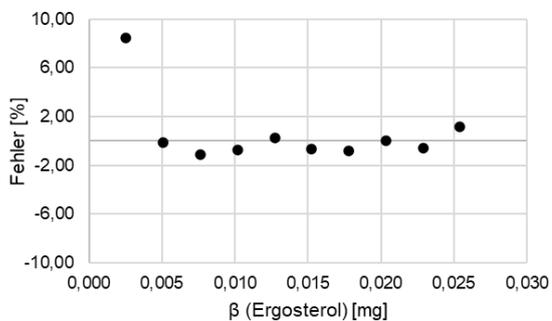
a



b



c



d

Abbildung 53: Kalibriergerade (a), Residuenplot (b), Responseplot (c) sowie Fehlerplot (d) der Kalibrierung C der Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

6.6 Fermentation von KP – Screening von Schwefelporlingen

Tabelle 53: Olfaktorische Geruchseindrücke (o) und gustatorische Geschmackseindrücke (g) der Kultivierung der vier Schwefelporlinge auf ME-Medium an den Kulturtagen 1-5; E= Eindruck, U= Gesamturteil, I= Intensität; (n=2).

		24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
		E	U	I	E	U	I	E	U	I	E	U	I	E	U	I
LSU	o	malzig, süßlich	0	0	malzig, süßlich, würzig	0	-	würzig, süßlich	0	-	würzig	0	-	malzig, würzig, süßlich	+	-
	g	malzig, dumpf, leicht süßlich, cremig	-	0	würzig, cremig, leicht malzig	+	0	würzig, kartoffelartig	+	0	würzig, Pappe- artig	0	-	süß, malzig, erdig	-	0
LPO	o	malzig, würzig	0	0	malzig, würzig, süßlich, herb	0	0	dunkel- würzig	+	+	würzig, süßlich, säuerlich	0	0	dunkel- würzig, herb	0	+
	g	malzig, würzig	-	0	stark würzig, malzig	-	+	würzig, malzig	-	0	würzig, sauer	0	-	dunkel- würzig, herb	-	+
LPER	o	malzig, würzig	0	0	malzig, würzig, modrig	-	0	dunkel- würzig, leicht malzig	0	0	dunkel- würzig, malzig, herb	0	-	krautig, grün, würzig	+	0
	g	malzig, süß	-	0	süß, malzig, würzig	-	0	süß, cremig, dunkel- würzig	-	0	würzig, süßlich	0	0	würzig, süßlich	0	-
LMO	o	malzig, süßlich, Karamell	0	0	malzig, süßlich, dumpf	0	0	würzig, malzig, süßlich	0	-	würzig, malzig, süßlich	+	0	malzig, süßlich, würzig	+	-
	g	malzig, dumpf, ekel- erregend	-	0	malzig, cremig	-	0	cremig, würzig, süß, Pappe	0	-	würzig, malzig, süß, Pappe	-	0	malzig, süßlich, erdig, würzig	-	0

6.7 Massenspektren der im KP-Medium vorkommenden Substanzen

Die folgenden Abbildungen zeigen den Abgleich der Massenspektren der identifizierten Substanzen mit der NIST und die Spektren der nicht identifizierten Substanzen in der Reihenfolge der Elution. Den nicht-identifizierten Substanzen n.i. 1 und n.i. 3 konnten keine Peaks zugeordnet werden.

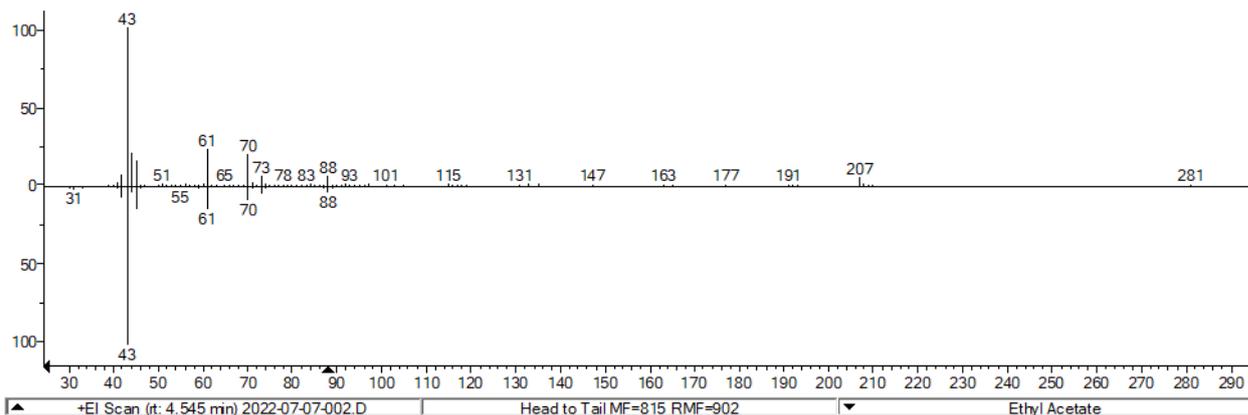


Abbildung 54: Massenspektrum von Ethylacetat auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 877.

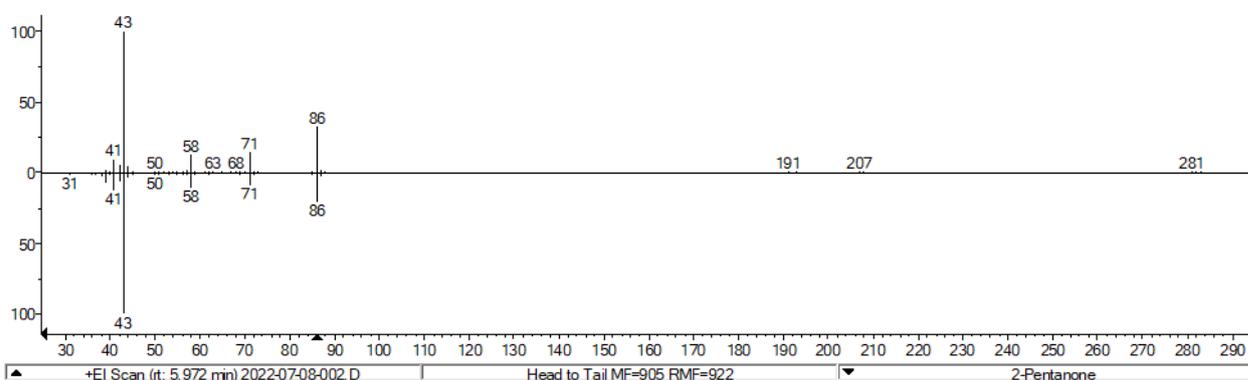


Abbildung 55: Massenspektrum von 2-Pentanon auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 972.

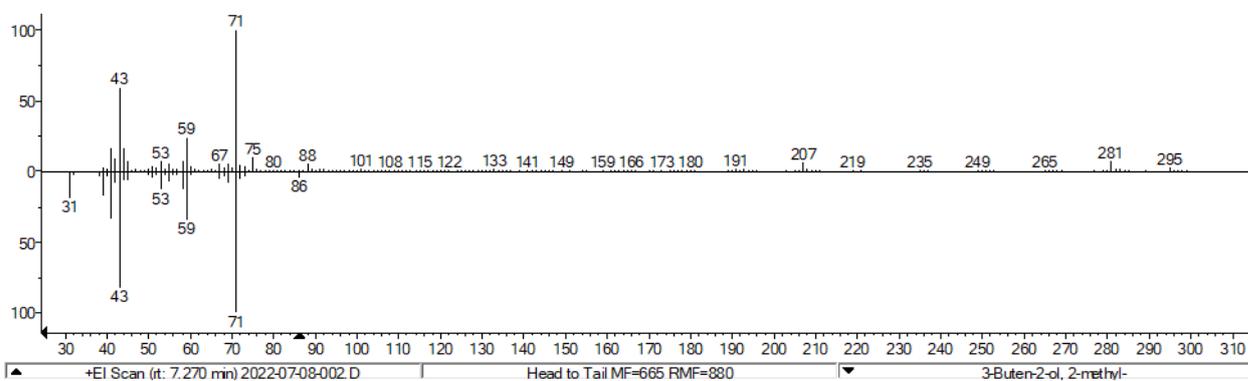


Abbildung 56: Massenspektrum von 2-Methyl-3-buten-2-ol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1036.

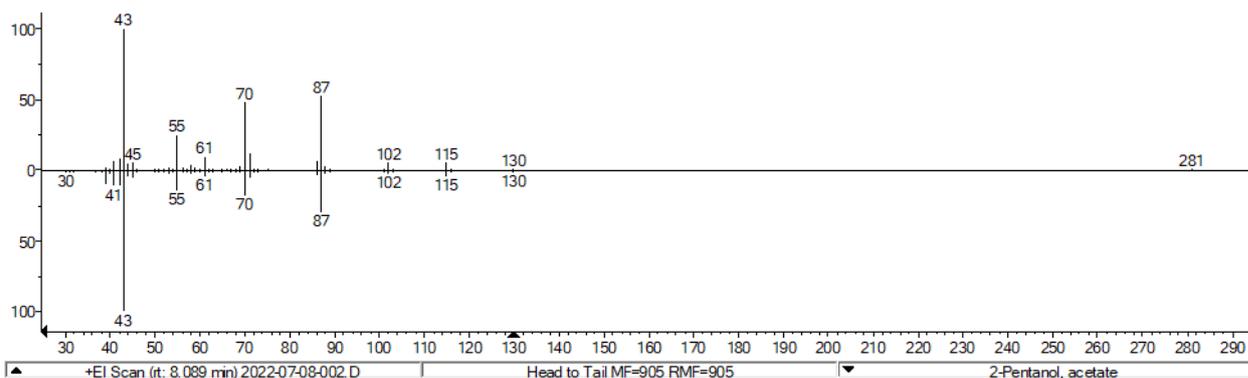


Abbildung 57: Massenspektrum von Essigsäure-2-pentylester auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1071.

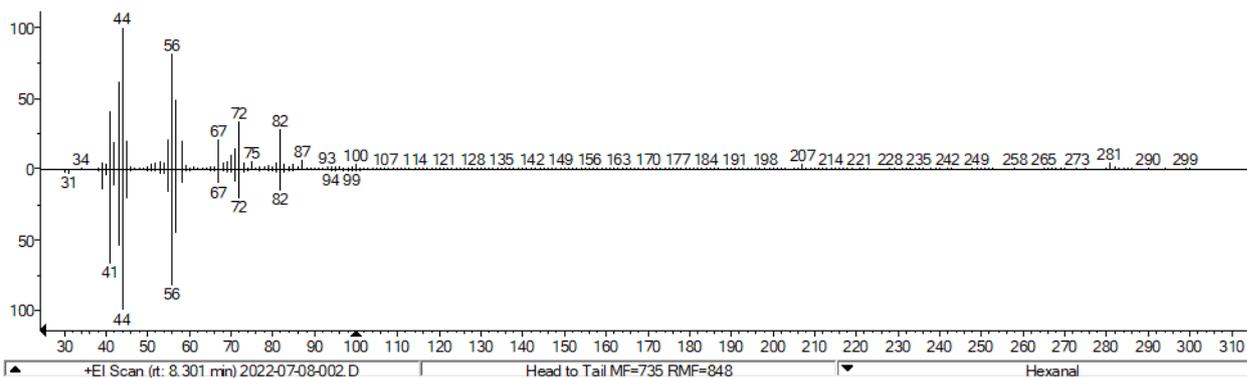


Abbildung 58: Massenspektrum von 1-Hexanal auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1080.

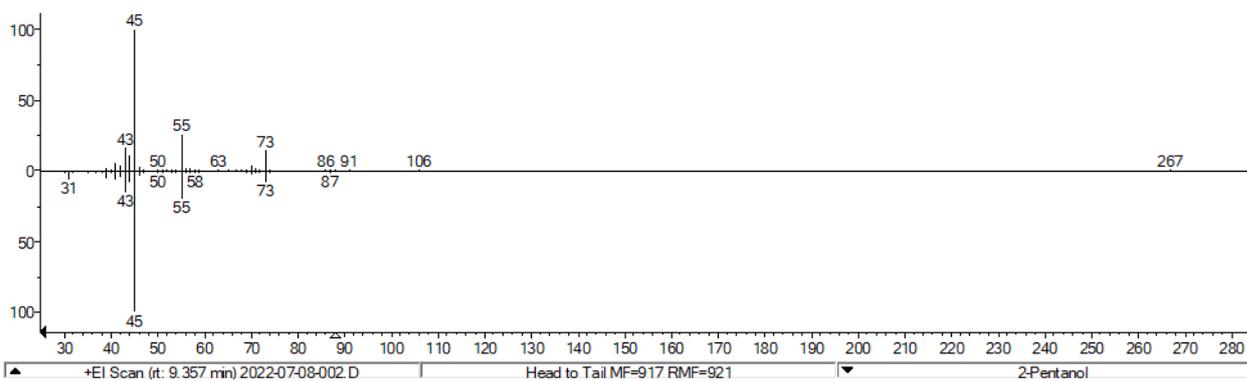


Abbildung 59: Massenspektrum von 2-Pentanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1121.

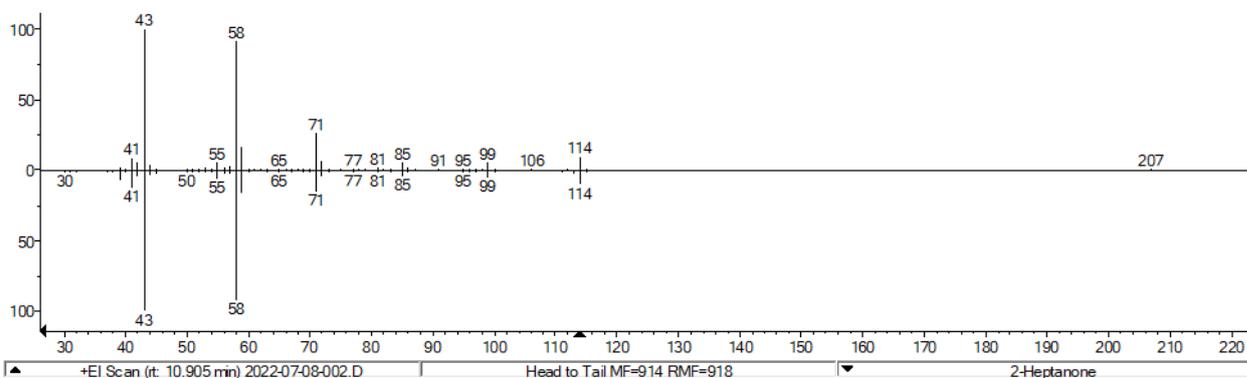


Abbildung 60: Massenspektrum von 2-Heptanon auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1182.

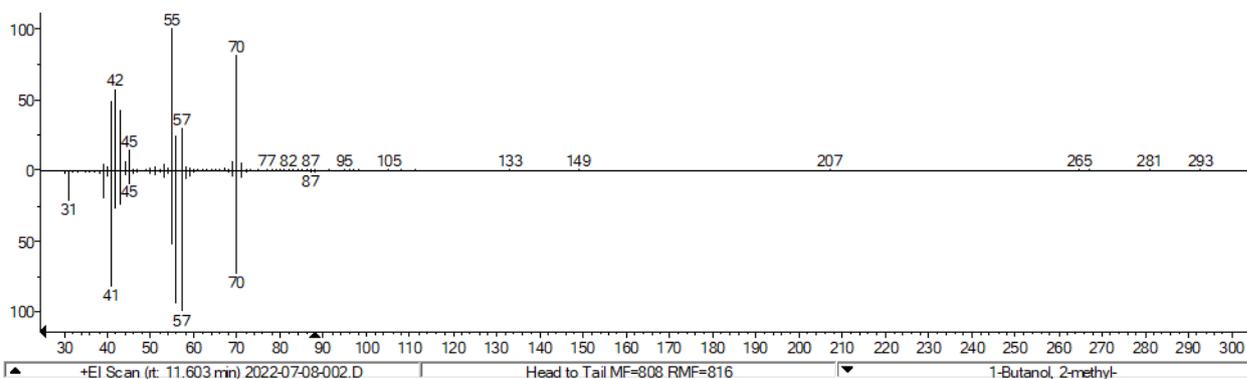


Abbildung 61: Massenspektrum von 2-Methyl-1-butanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1216.

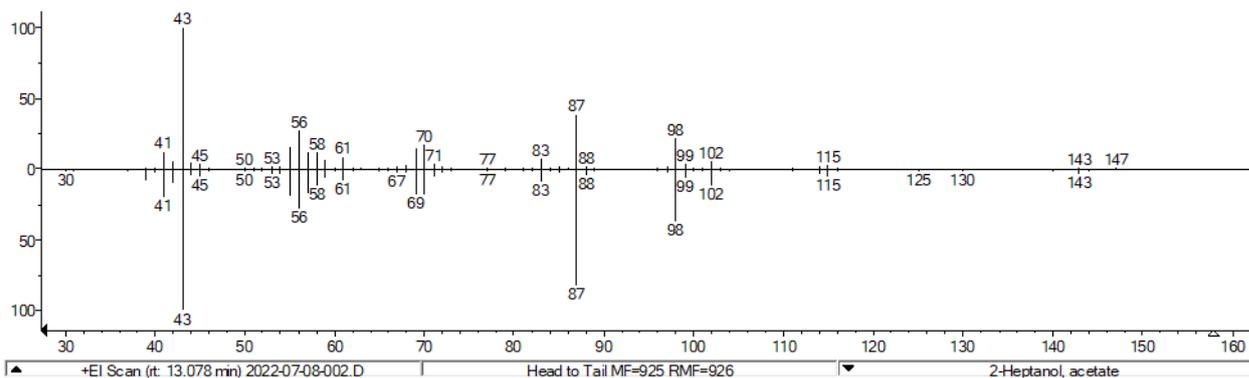


Abbildung 62: Massenspektrum von Essigsäure-2-heptylester auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1264.

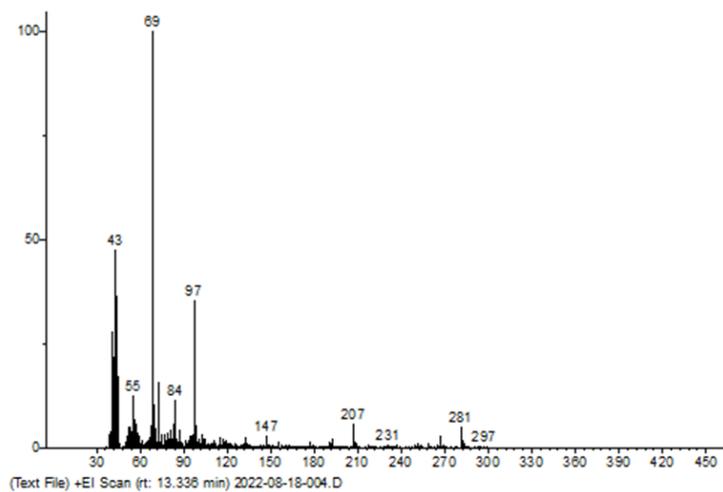


Abbildung 63: Massenspektrum der Substanz n.i. 2 im KP-Medium bei einem RI von 1278.

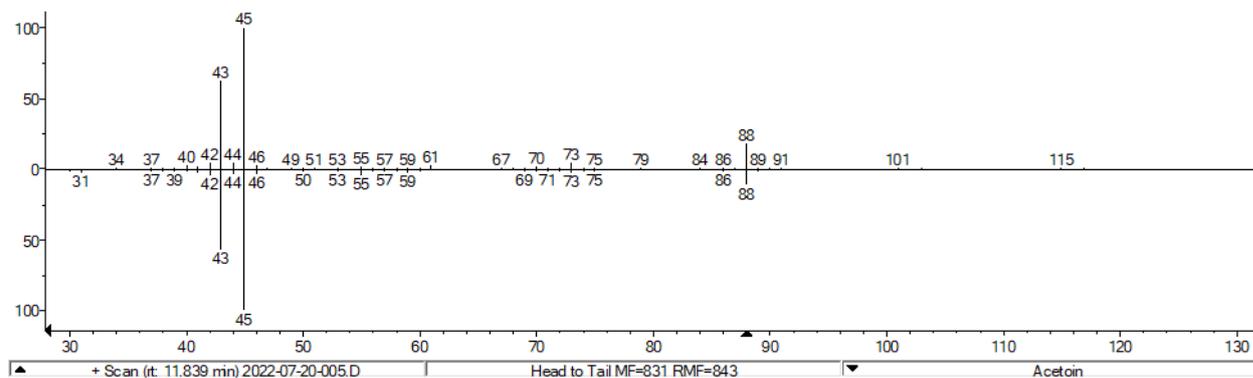


Abbildung 64: Massenspektrum von Acetoin auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1279.

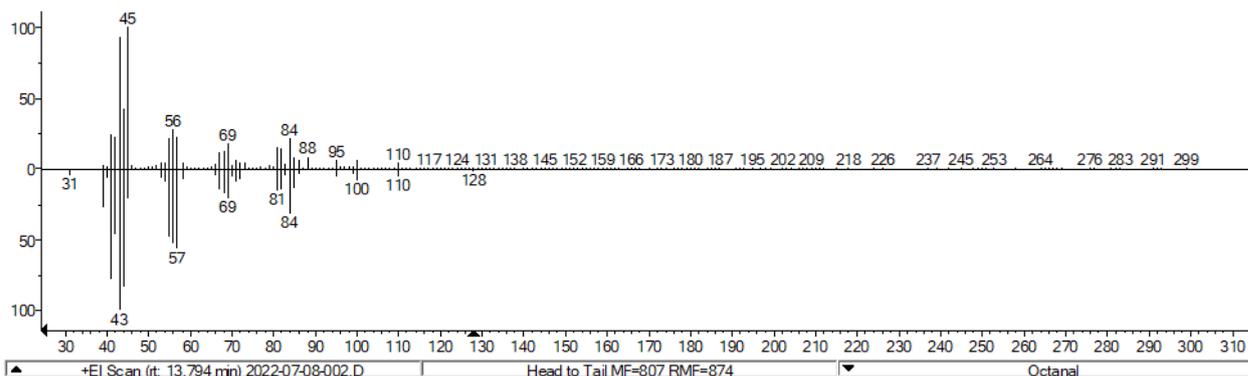


Abbildung 65: Massenspektrum von 1-Octanal auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1290.

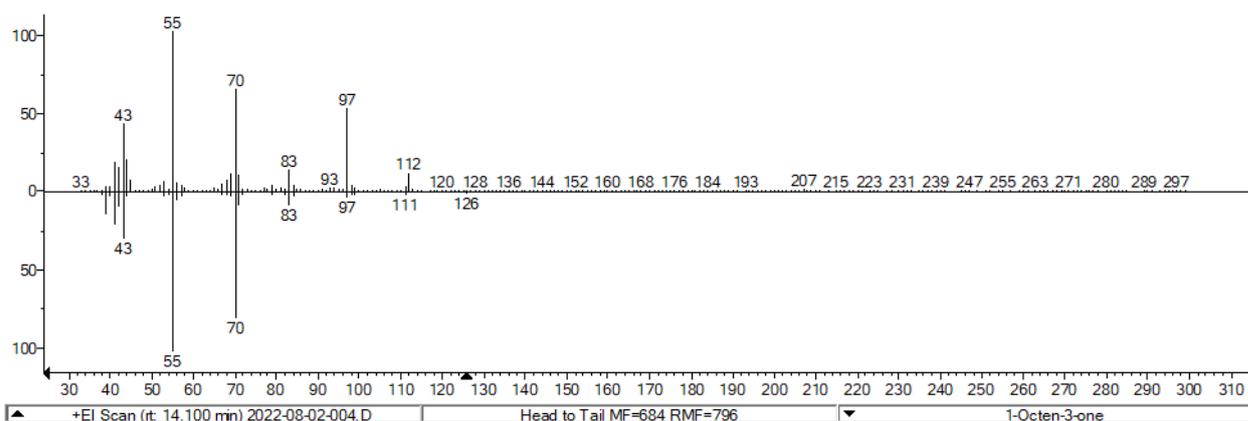


Abbildung 66: Massenspektrum von 1-Octen-3-on auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1303.

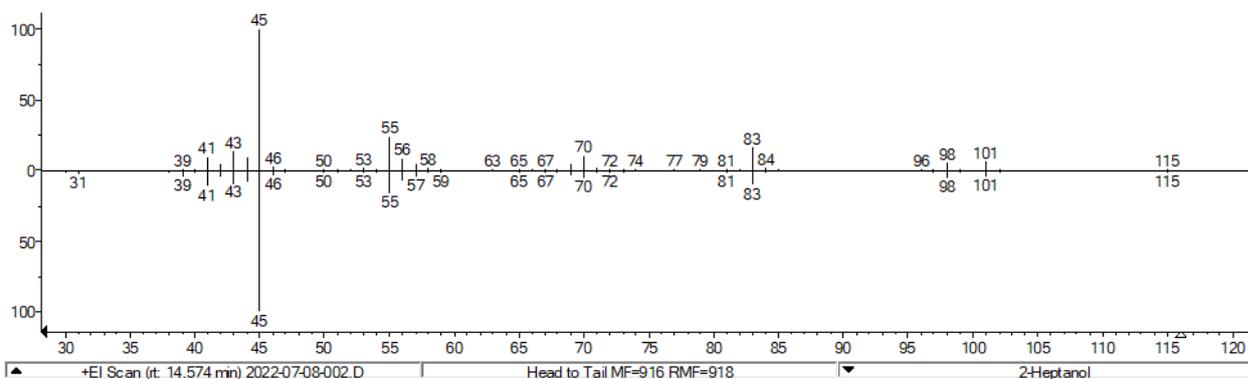


Abbildung 67: Massenspektrum von 2-Heptanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1320.

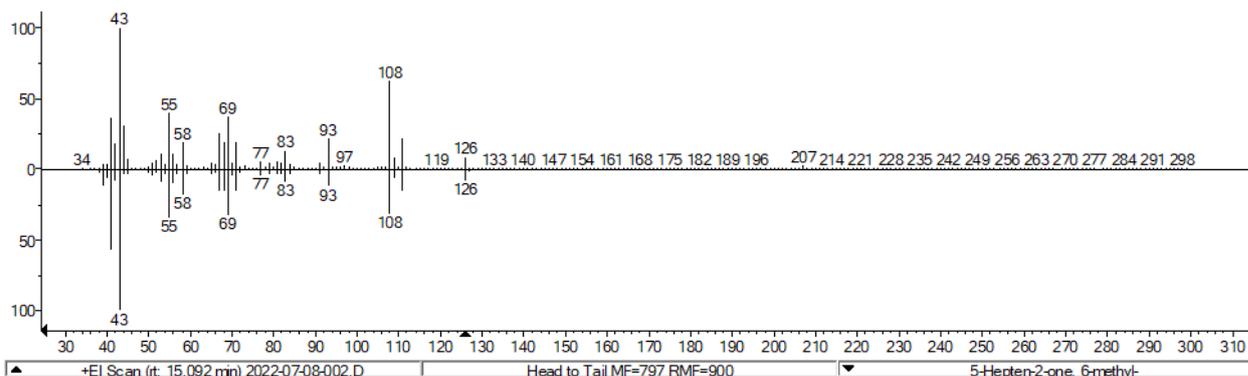


Abbildung 68: Massenspektrum von 6-Methyl-5-hepten-2-on auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1339.

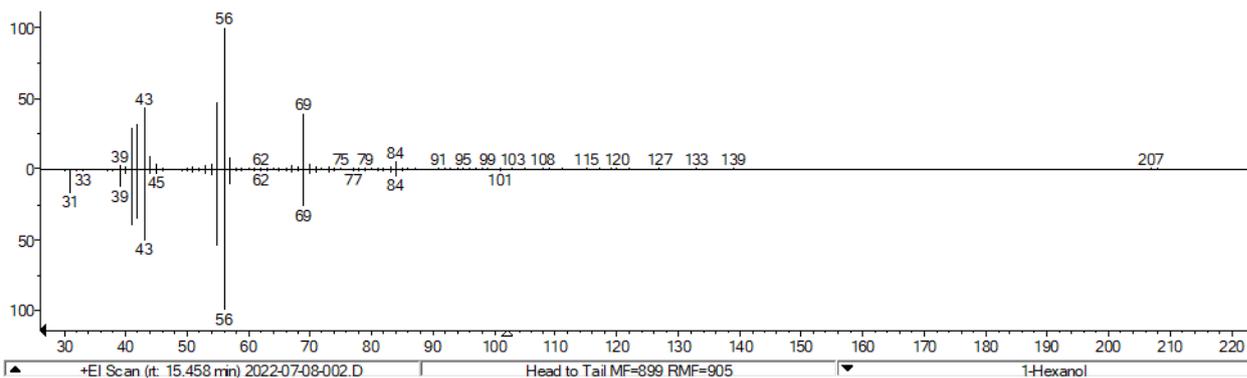


Abbildung 69: Massenspektrum von 1-Hexanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1350.

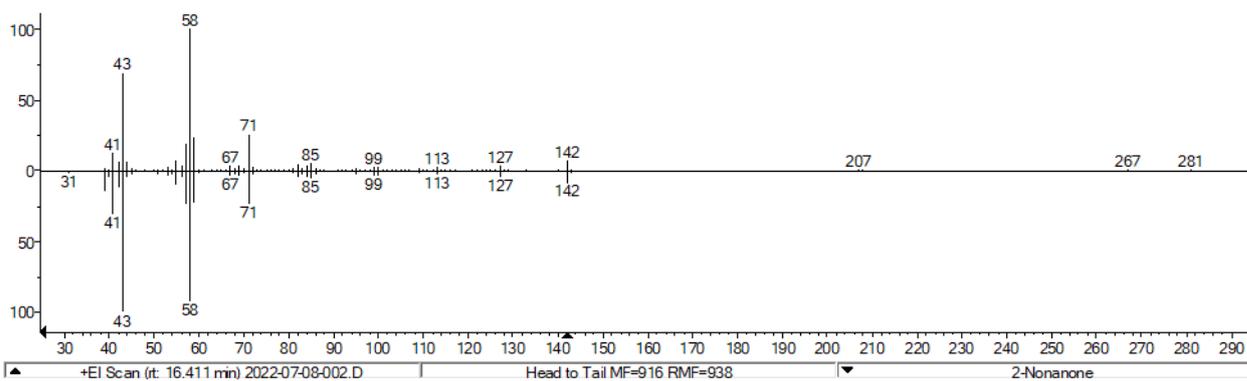


Abbildung 70: Massenspektrum von 2-Nonanon auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1390.

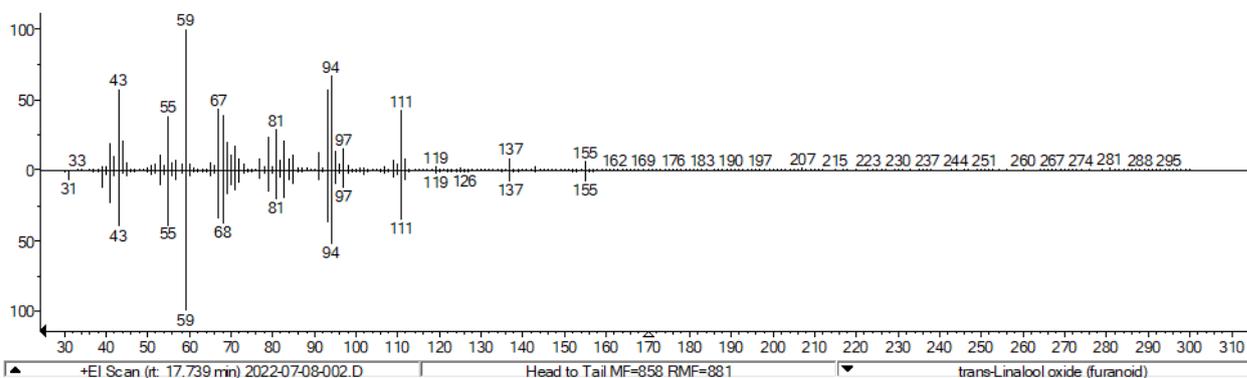


Abbildung 71: Massenspektrum von trans-Linalooloxid auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1443.

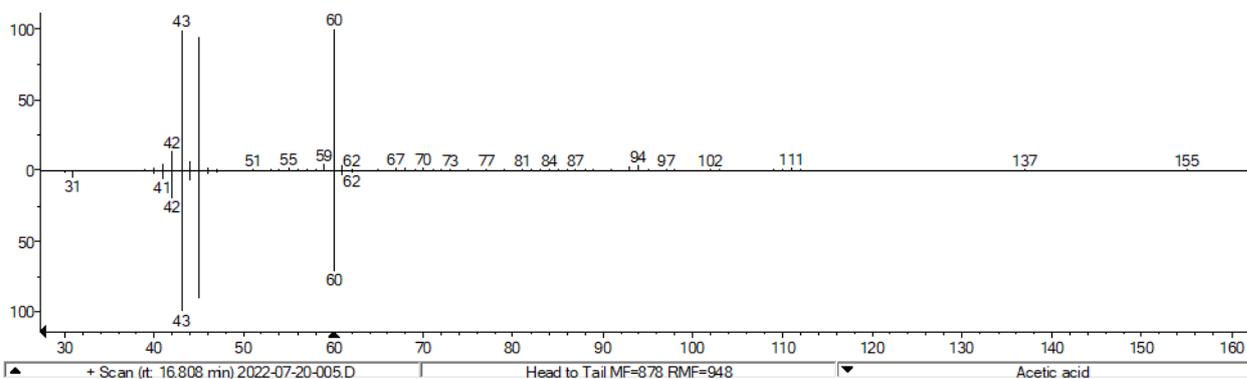


Abbildung 72: Massenspektrum von Essigsäure auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1450.

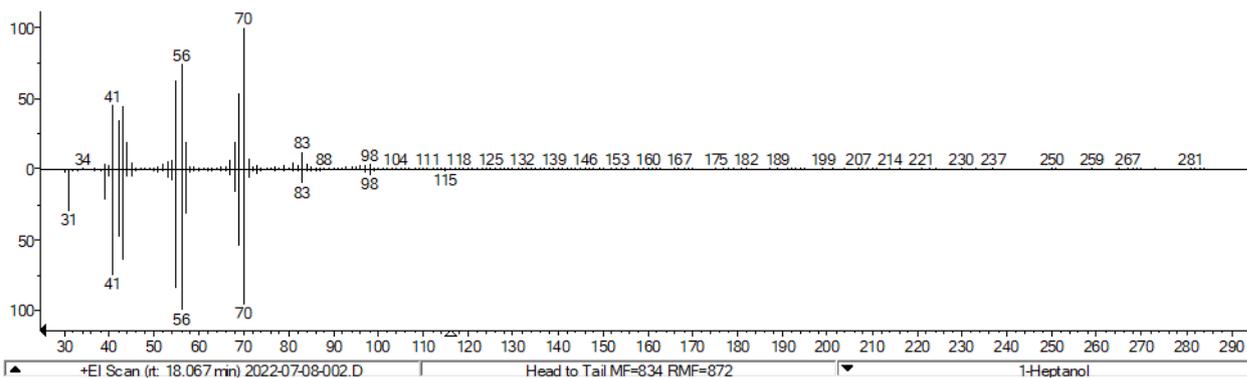


Abbildung 73: Massenspektrum von 1-Heptanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1455.

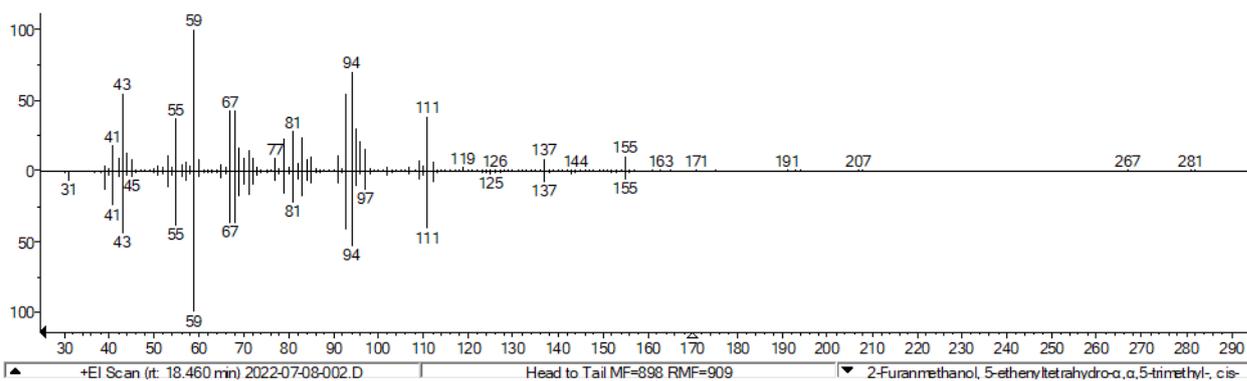


Abbildung 74: Massenspektrum von cis-Linalooloxid auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1471.

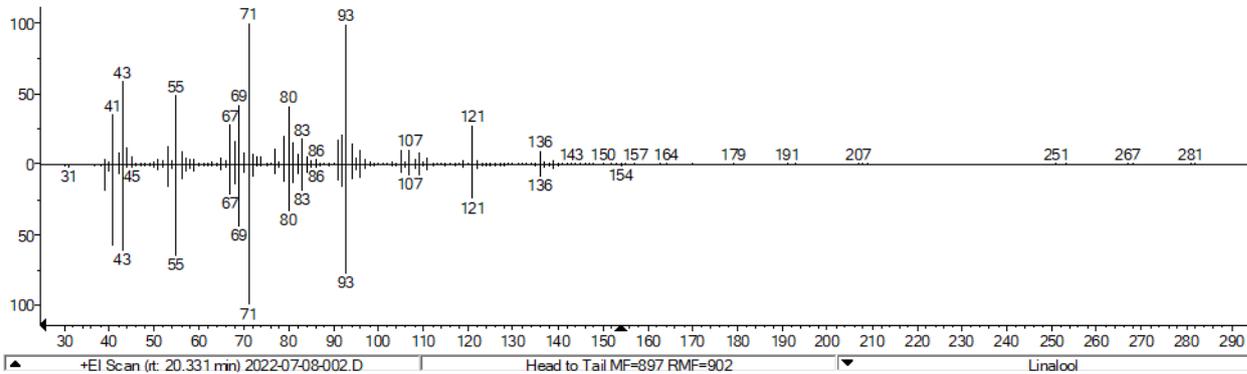


Abbildung 75: Massenspektrum von Linalool auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1548.

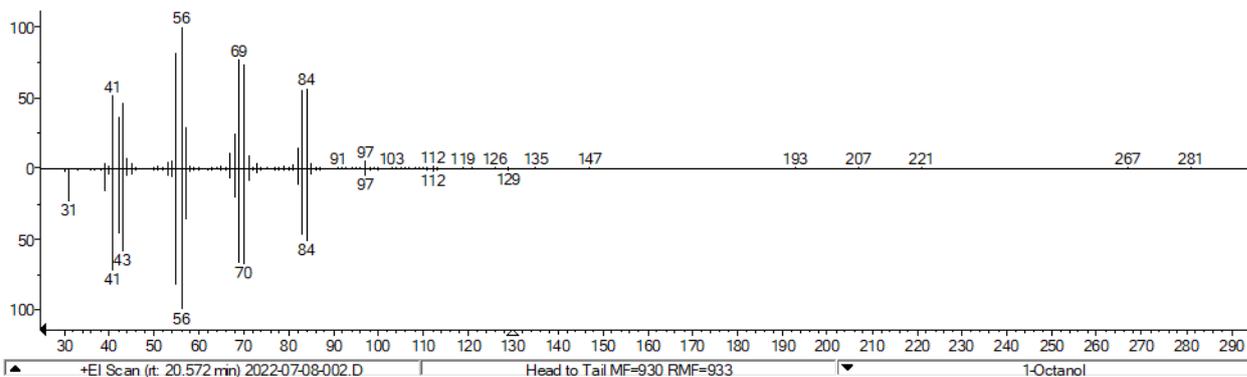


Abbildung 76: Massenspektrum von 1-Octanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1558.

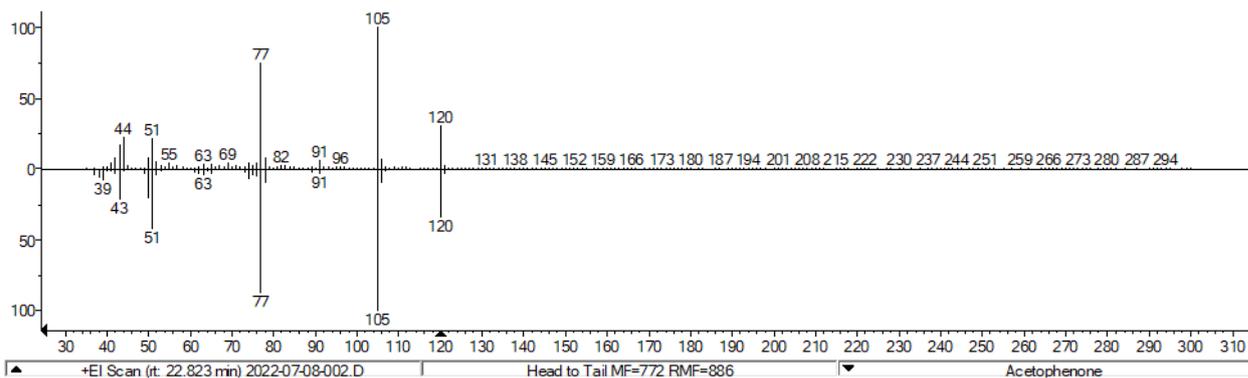


Abbildung 77: Massenspektrum von Acetophenon auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1655.

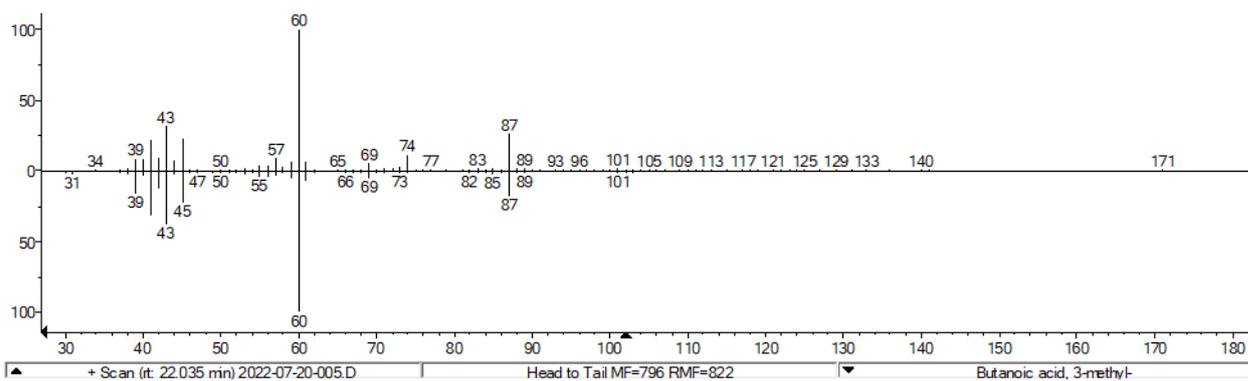


Abbildung 78: Massenspektrum von Isovaleriansäure auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1681.

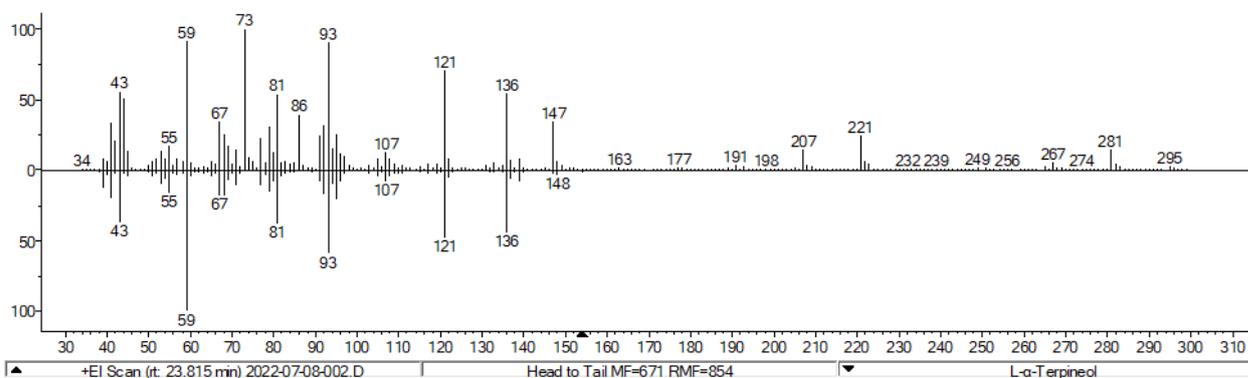


Abbildung 79: Massenspektrum von α -Terpineol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1698.

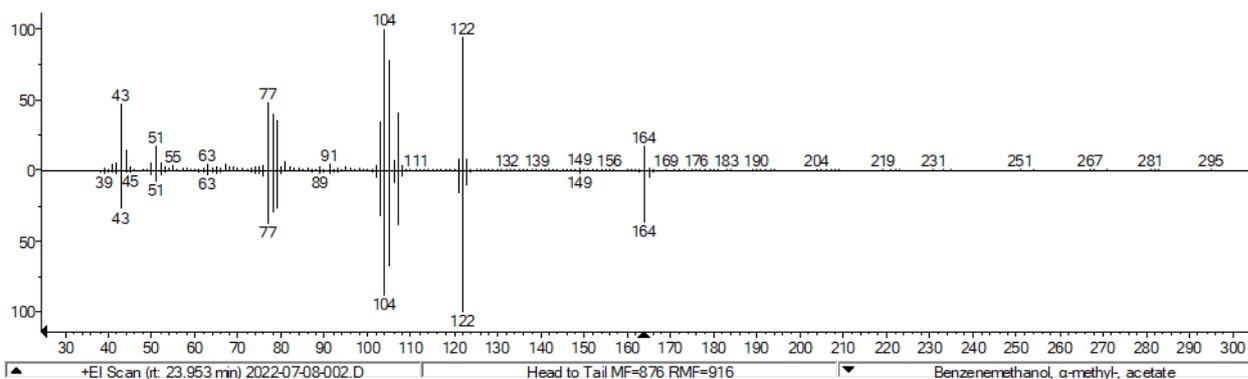


Abbildung 80: Massenspektrum von 1-Phenylethylacetat auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1704.

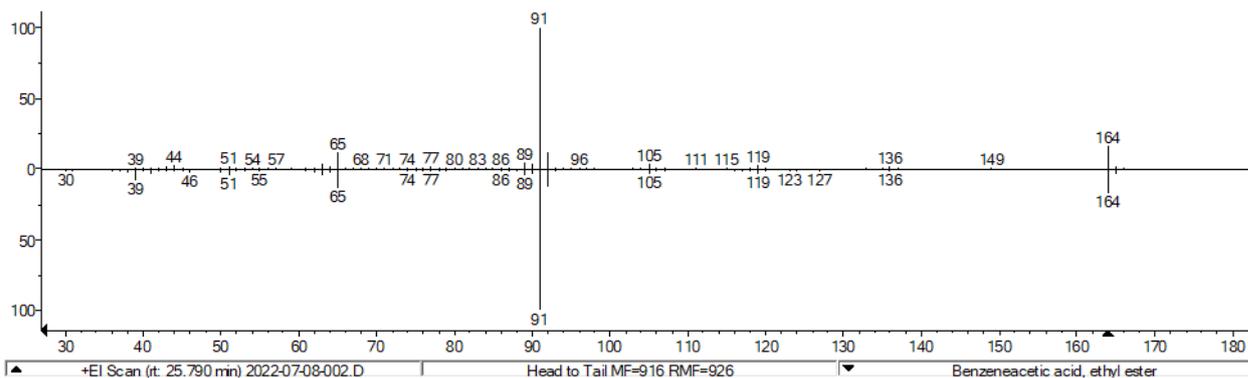


Abbildung 81: Massenspektrum von Ethylphenylacetat auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1789.

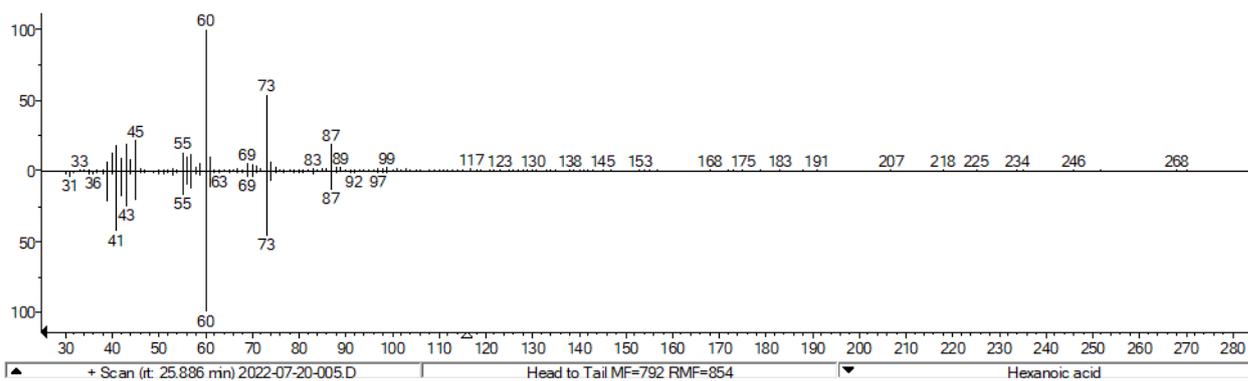


Abbildung 82: Massenspektrum von Hexansäure auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1857.

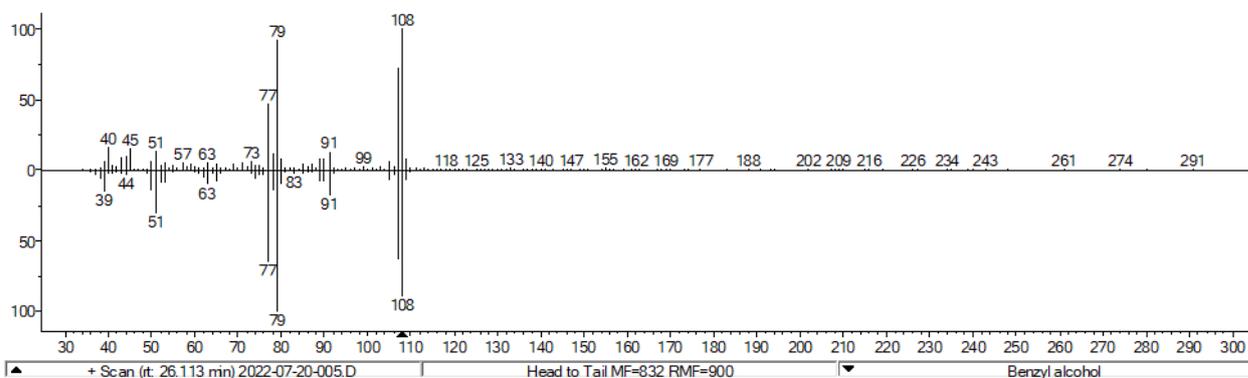


Abbildung 83: Massenspektrum von Benzylalkohol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1868.

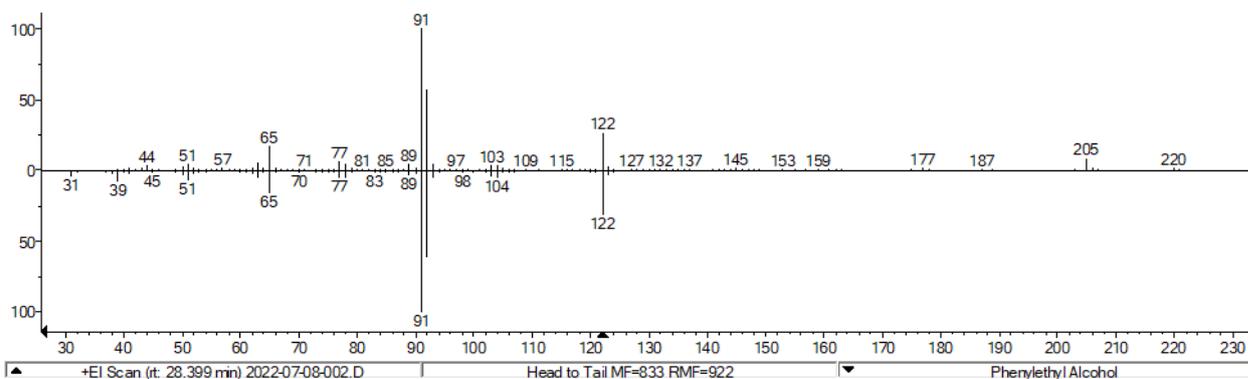


Abbildung 84: Massenspektrum von 2-Phenylethanol auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1901.

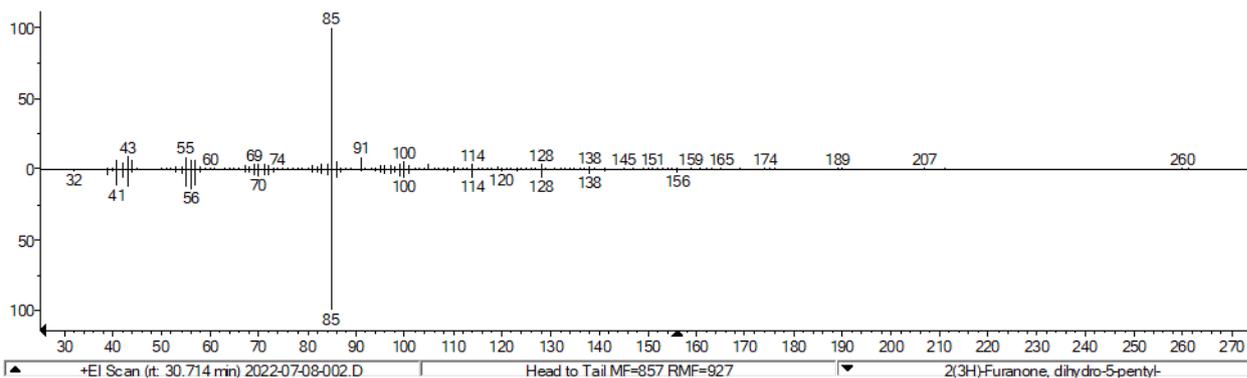


Abbildung 85: Massenspektrum von γ -Nonalacton auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2039.

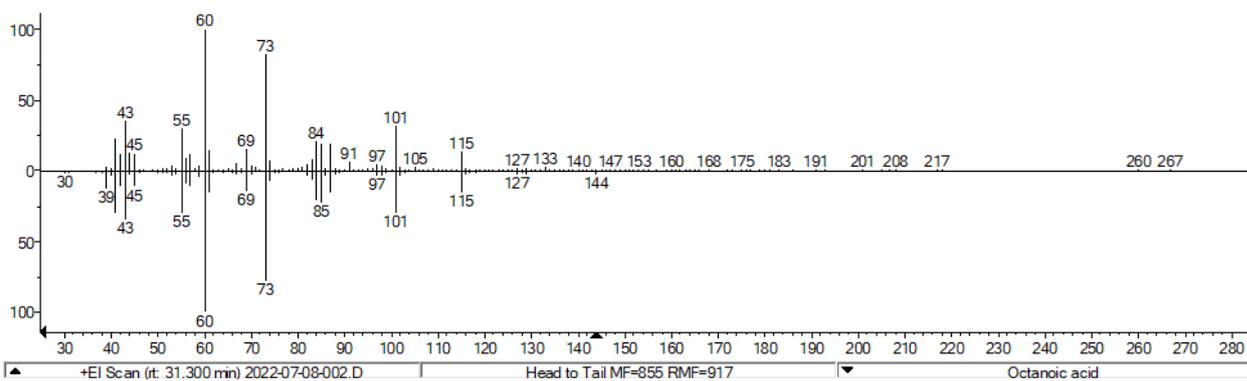


Abbildung 86: Massenspektrum von Octansäure auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2069.

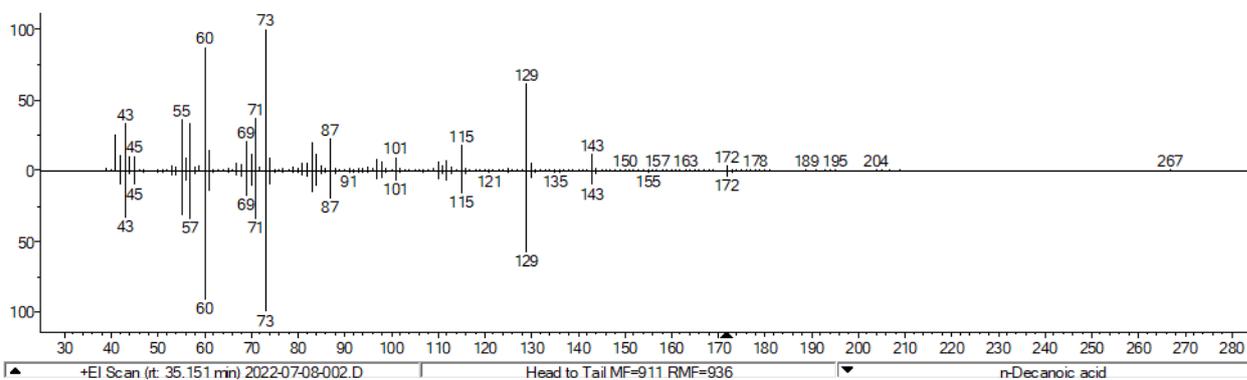


Abbildung 87: Massenspektrum von Decansäure auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2281.

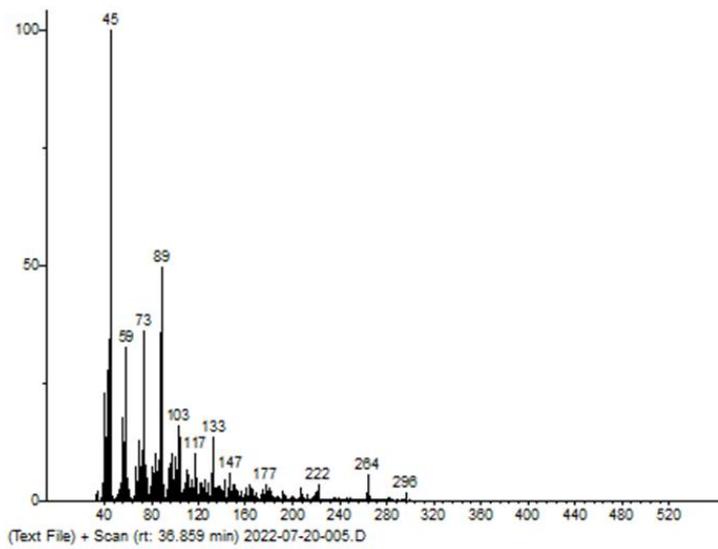


Abbildung 88: Massenspektrum der Substanz n.i. 4 im KP-Medium bei einem RI von 2452.

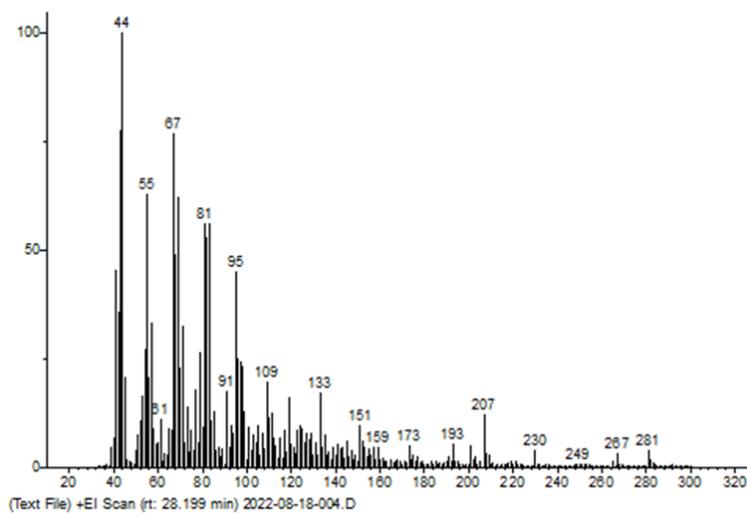


Abbildung 89: Massenspektrum der Substanz n.i. 5 im KP-Medium bei einem RI von 2461.

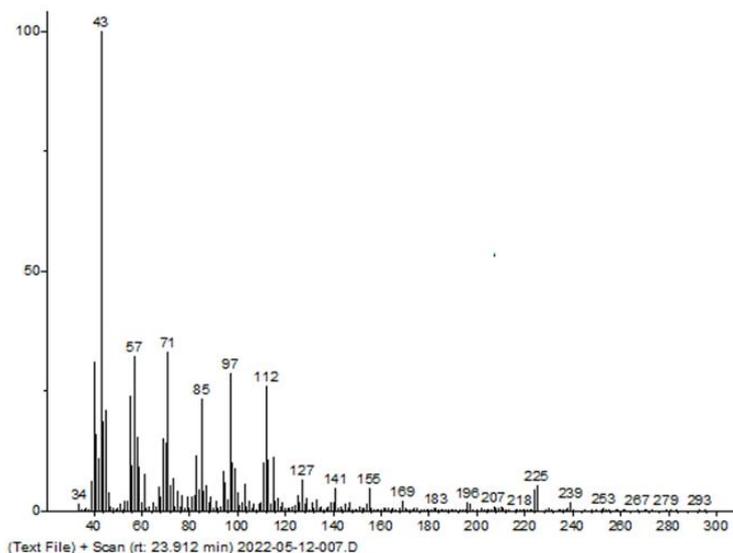


Abbildung 90: Massenspektrum der Substanz n.i. 6 im KP-Medium bei einem RI von 2882.

6.8 Statistik der Aromaverdünnungsanalyse

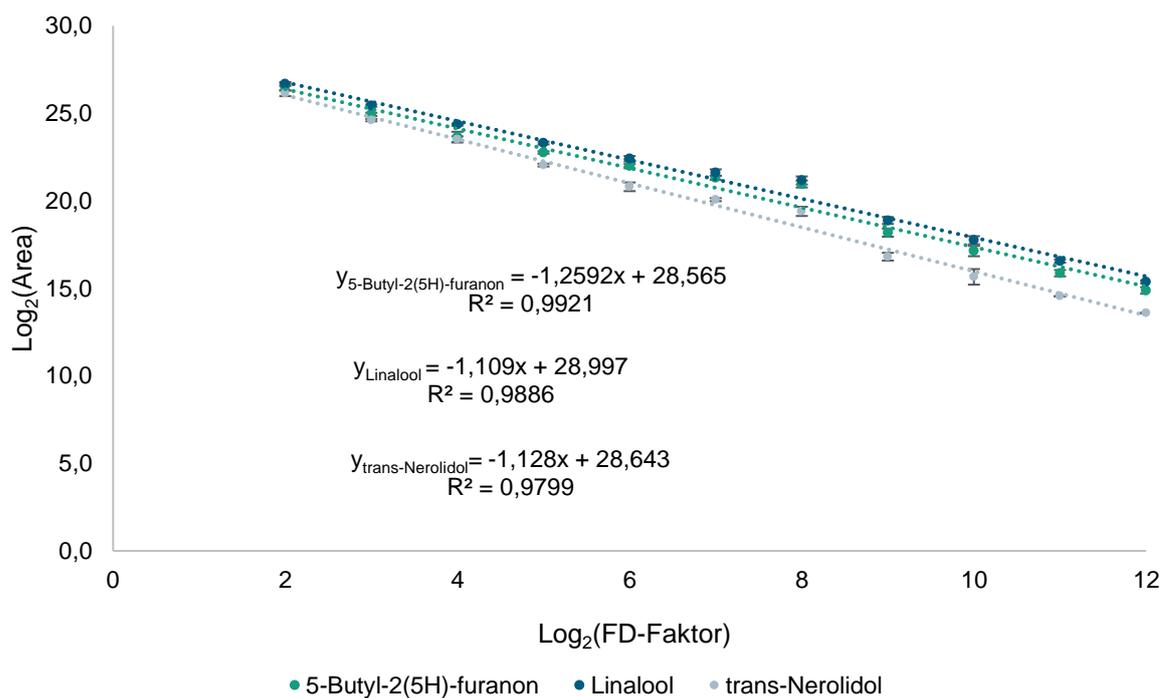


Abbildung 91: Logarithmische Auftragung der Flächen der Qualifier-Ionen im EIC für 5-Butyl-2(5H)-furanon, Linalool und (E)-Nerolidol ($n=3$).

6.9 Massenspektren der im fermentierten KP-Getränk vorkommenden Substanzen

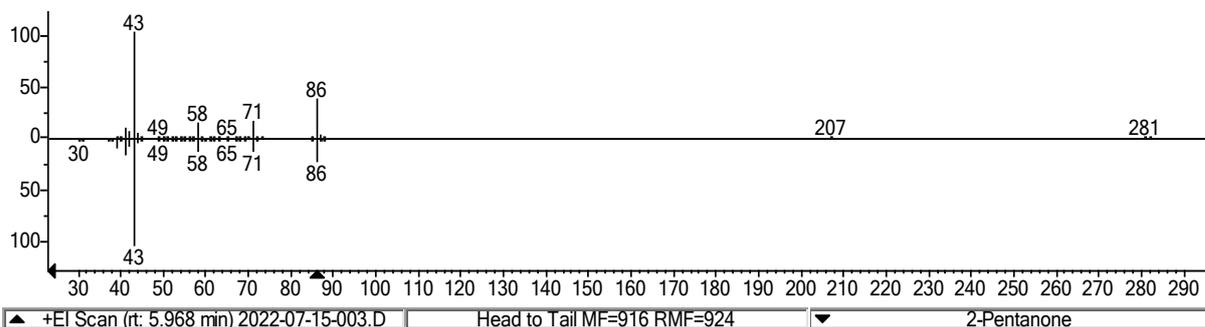


Abbildung 92: Massenspektrum von 2-Pentanone (S01) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 972.

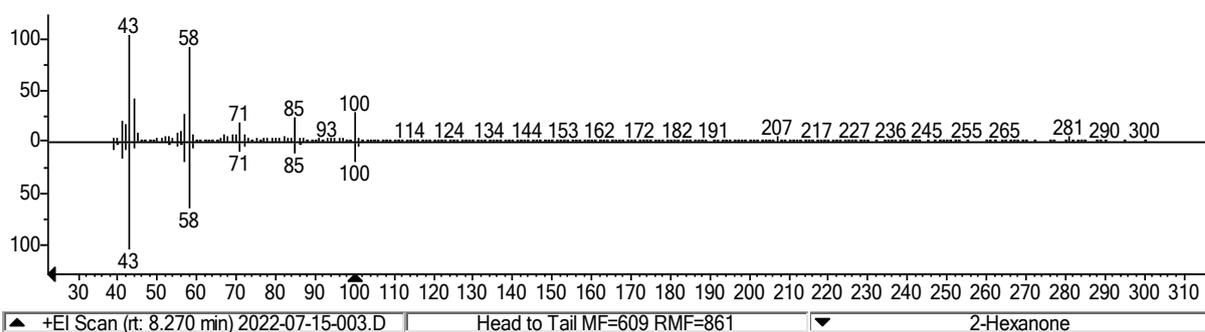


Abbildung 93: Massenspektrum von 2-Hexanon (S02) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1079.

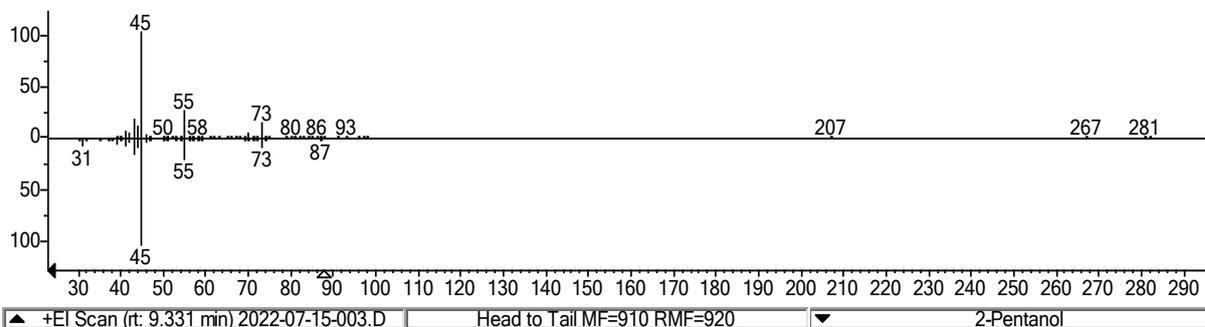


Abbildung 94: Massenspektrum von 2-Pentanol (S03) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1122.

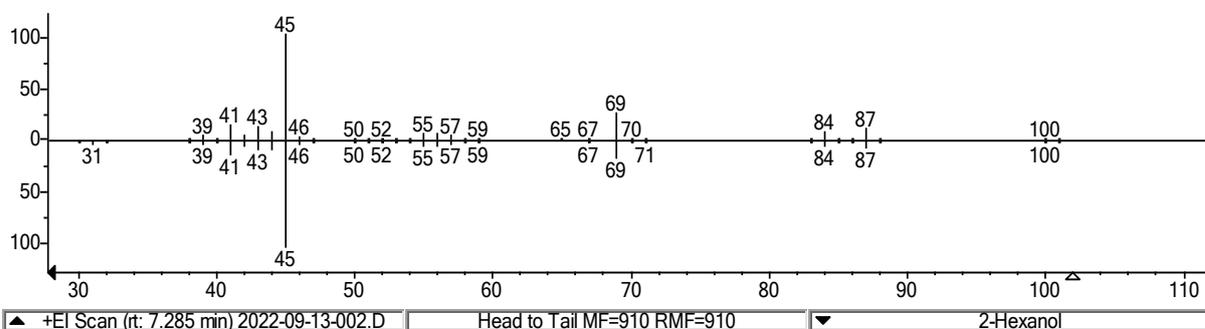


Abbildung 95: Massenspektrum von 2-Hexanol (S04) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1220.

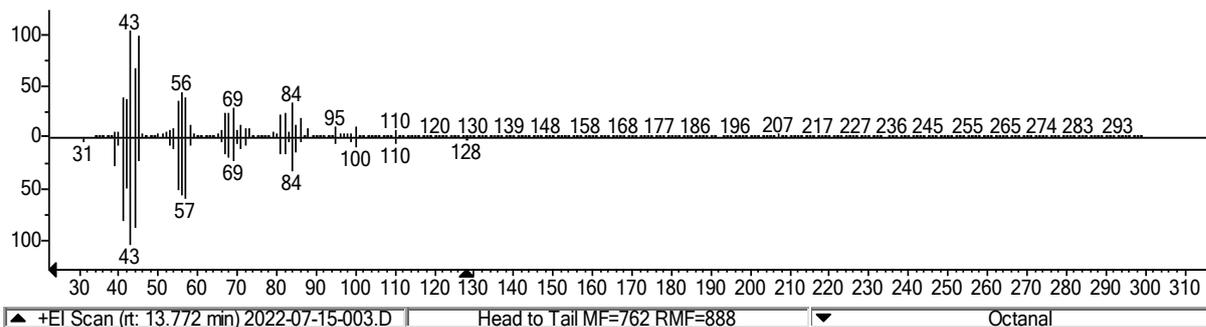


Abbildung 96: Massenspektrum von 1-Octanal (S06) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1290.

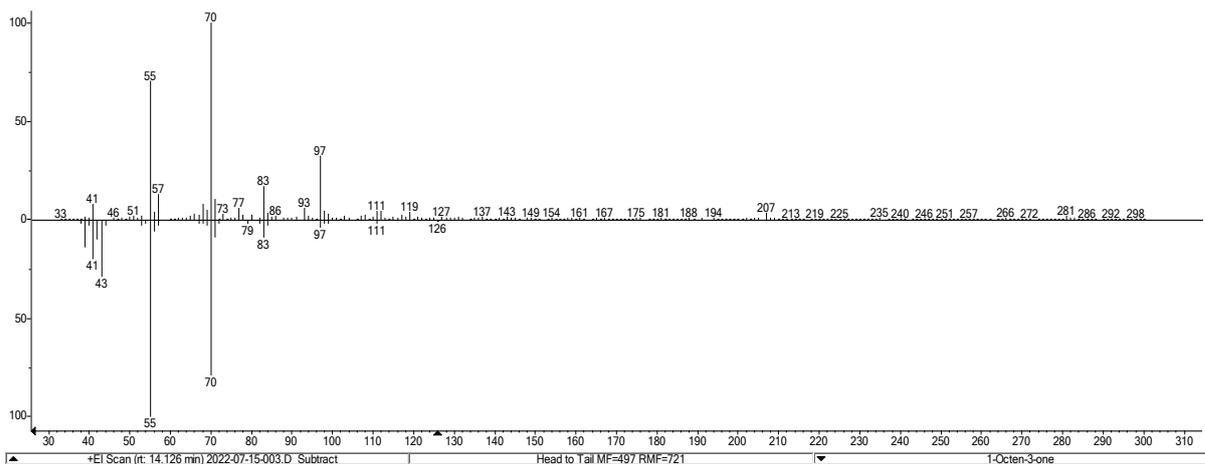


Abbildung 97: Massenspektrum von 1-Octen-3-on (S07) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1303.

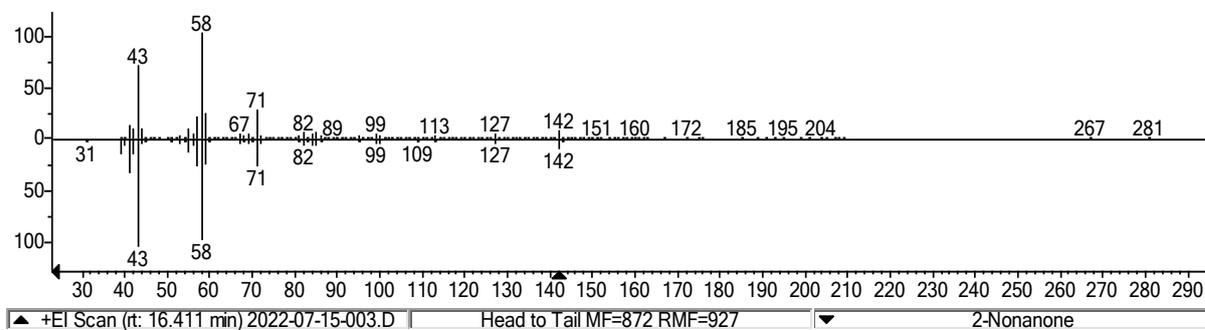


Abbildung 98: Massenspektrum von 2-Nonanon (S08) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1390.

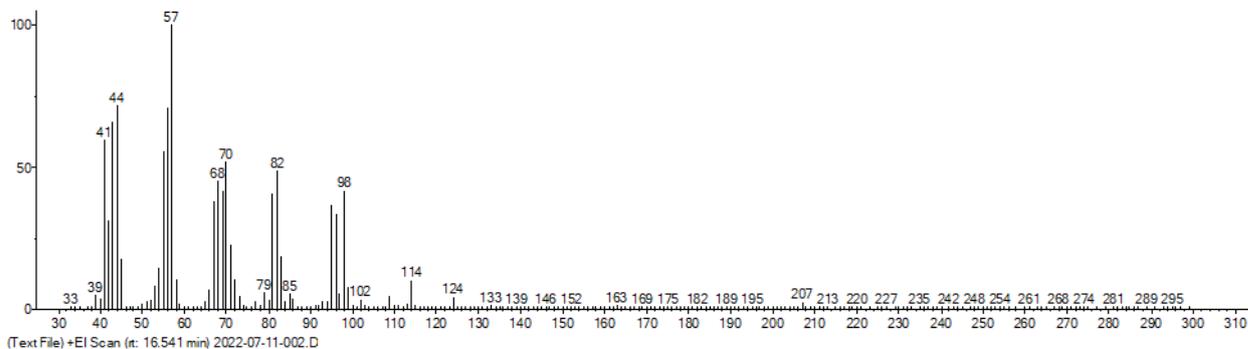


Abbildung 99: Massenspektrum von S09 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1402.

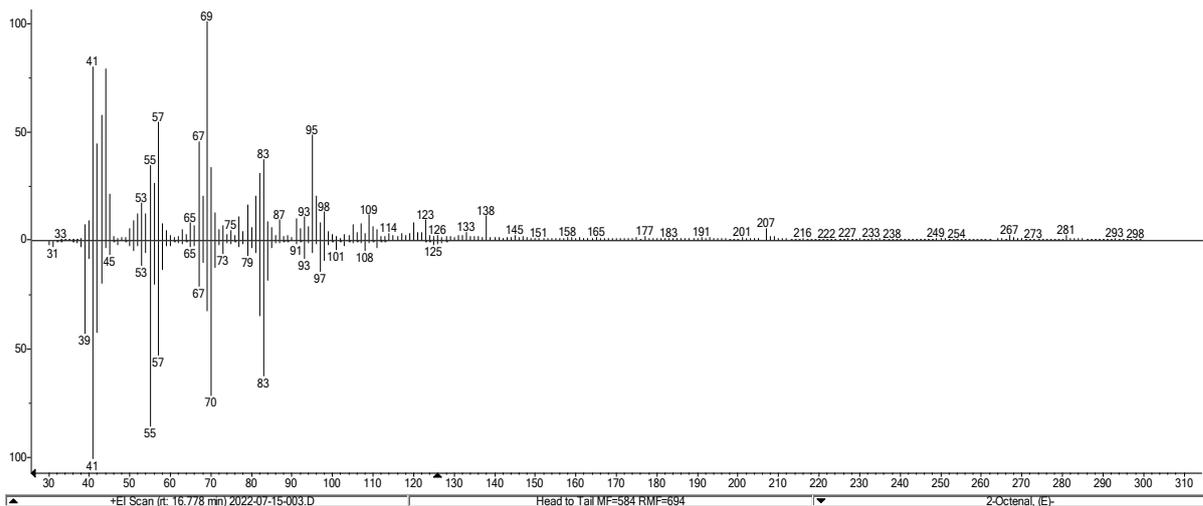


Abbildung 100: Massenspektrum von (E)-2-Octenal (S10) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1431.

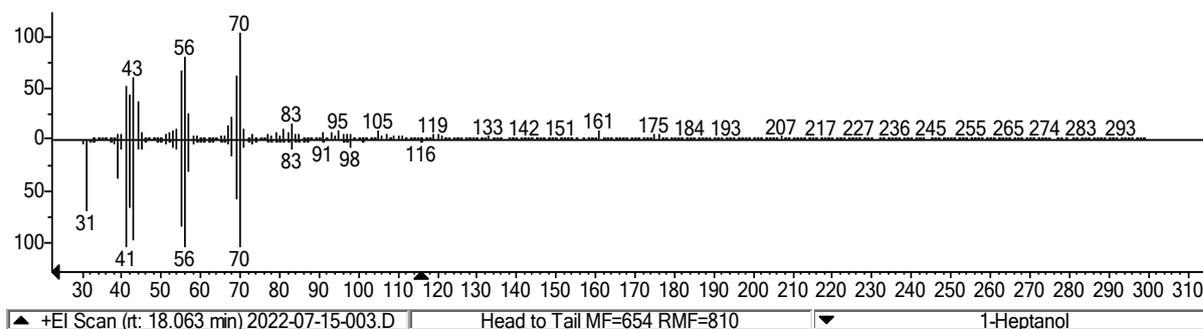


Abbildung 101: Massenspektrum von 1-Heptanol (S11) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1455.

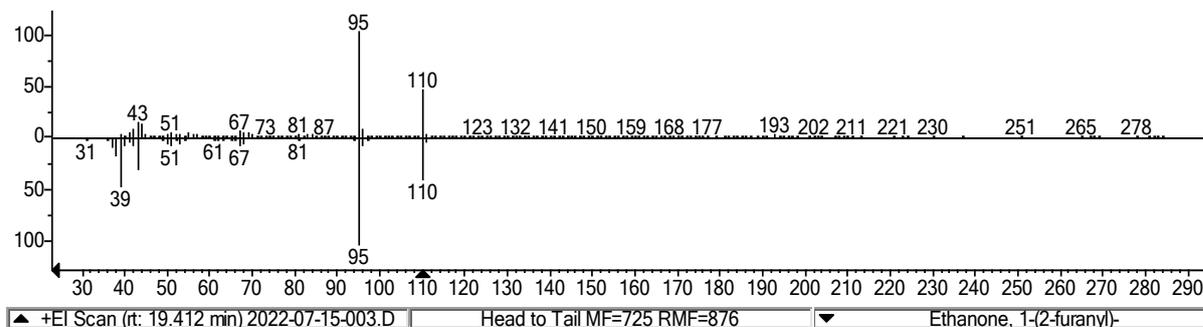


Abbildung 102: Massenspektrum von 2-Acetylfuran (S12) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1509.

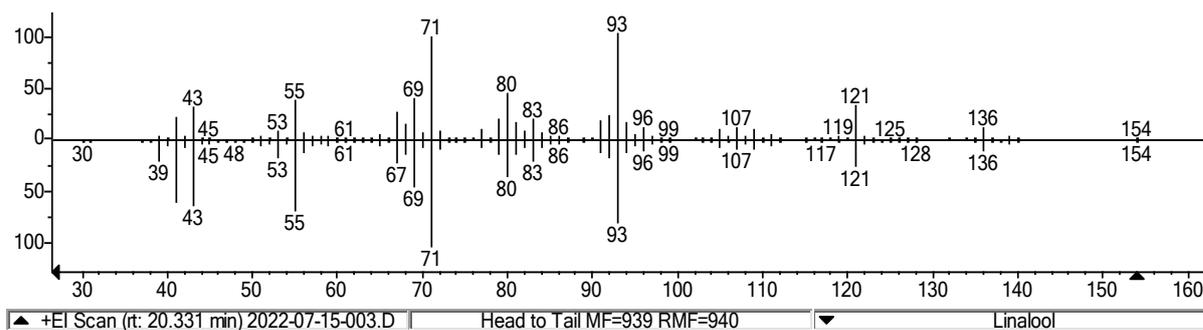


Abbildung 103: Massenspektrum von Linalool (S13) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1548.

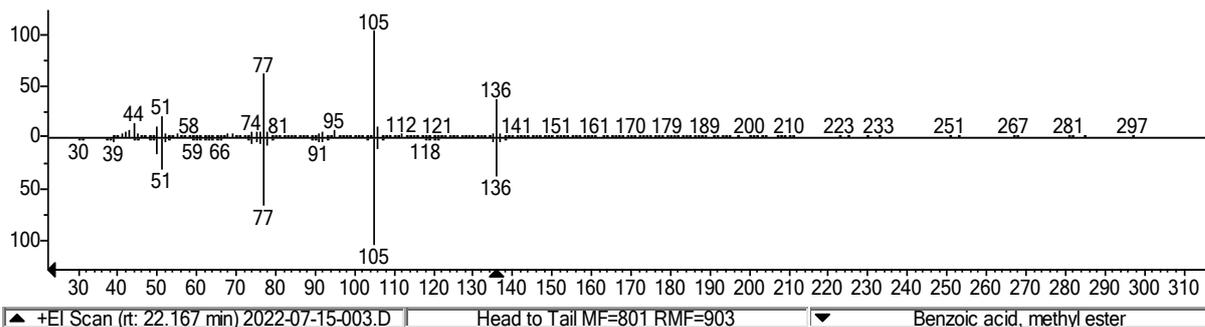


Abbildung 104: Massenspektrum von Methylbenzoat (S14) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1626.

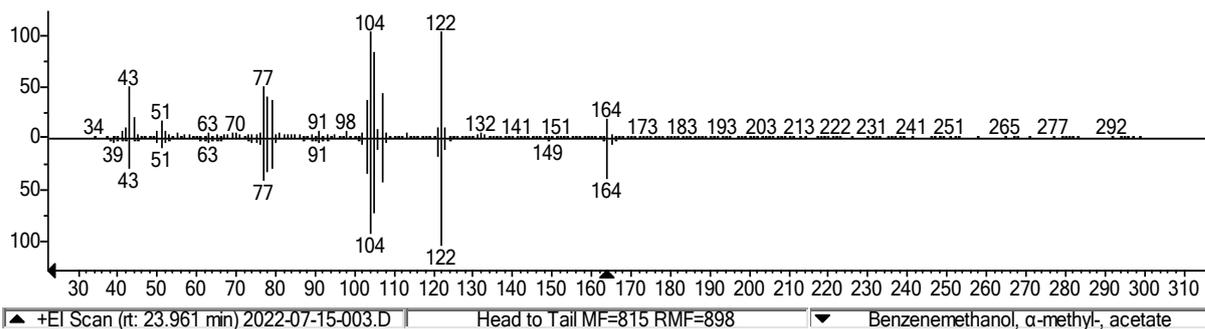


Abbildung 105: Massenspektrum von 1-Phenylethylacetat (S15) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1704.

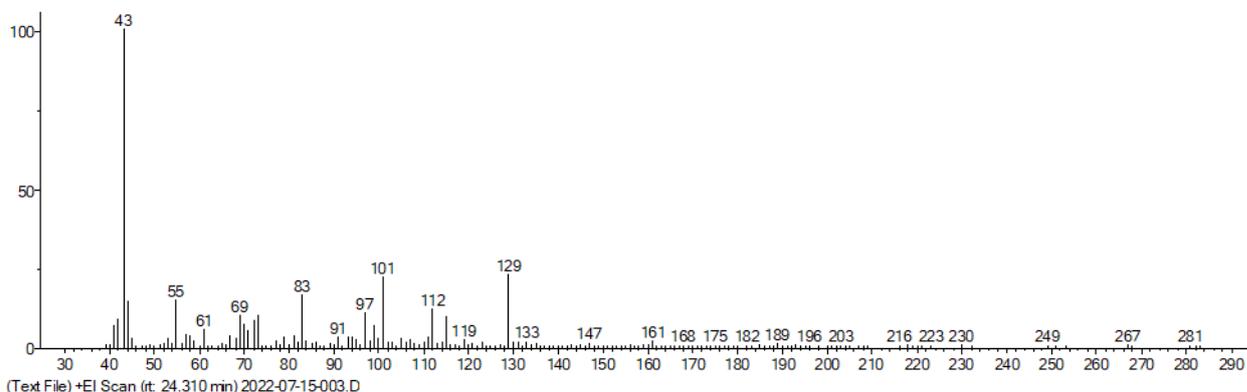


Abbildung 106: Massenspektrum von S16 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1720.

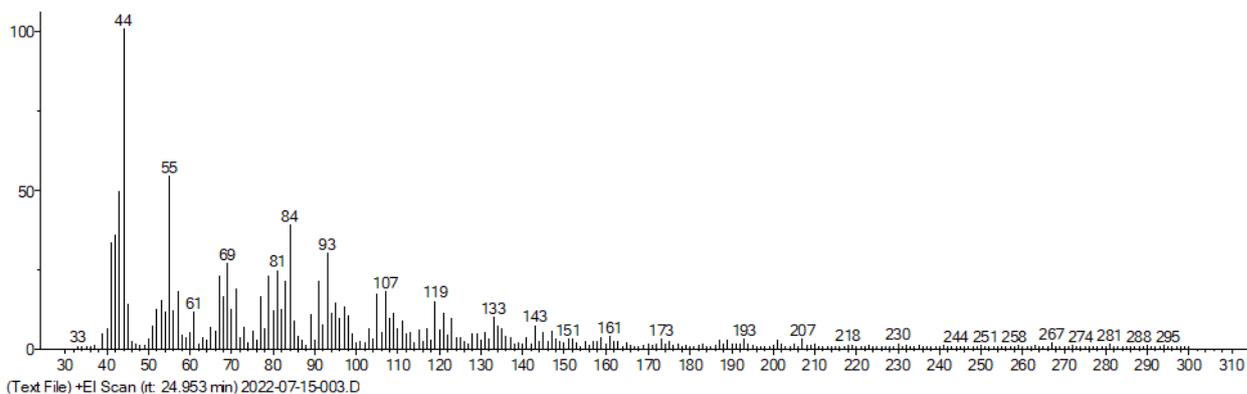


Abbildung 107: Massenspektrum von S17 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1750.

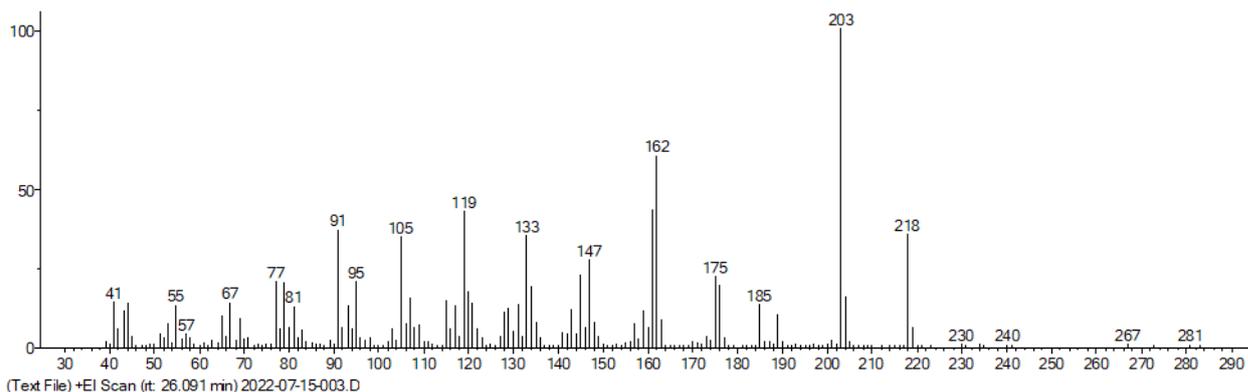


Abbildung 108: Massenspektrum von S18 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1803.

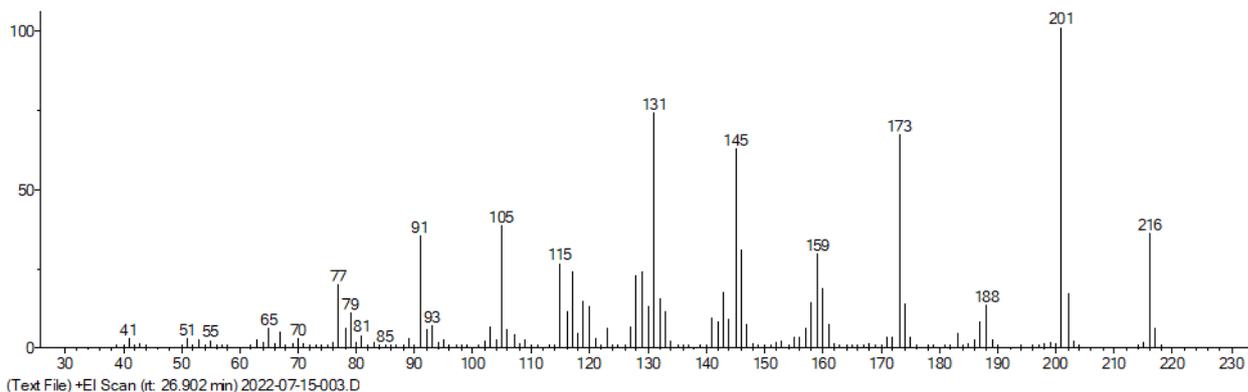


Abbildung 109: Massenspektrum von S19 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1842.

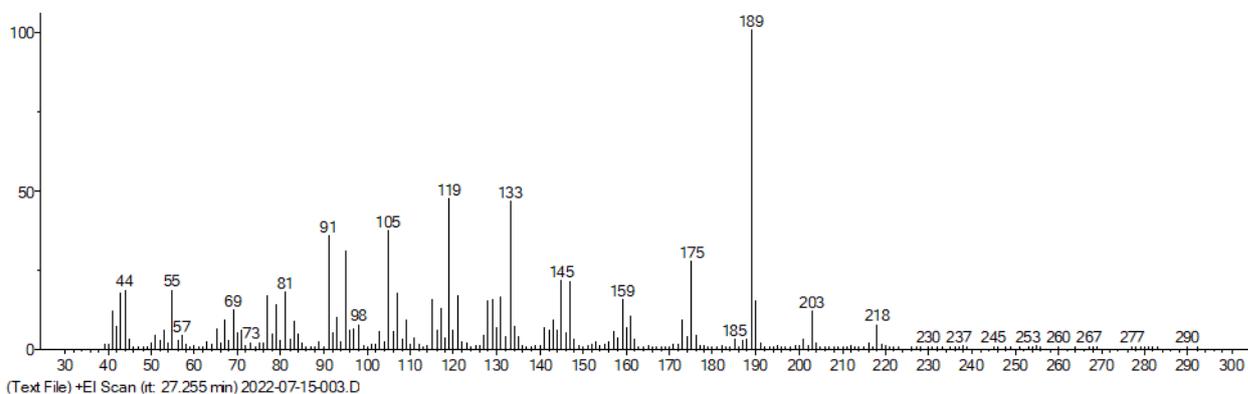


Abbildung 110: Massenspektrum von S20 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1858.

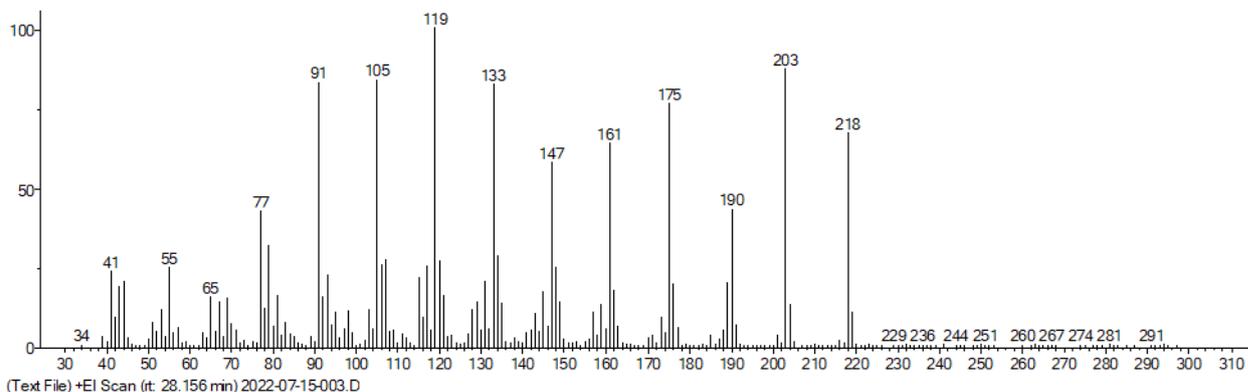


Abbildung 111: Massenspektrum von S21 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1902.

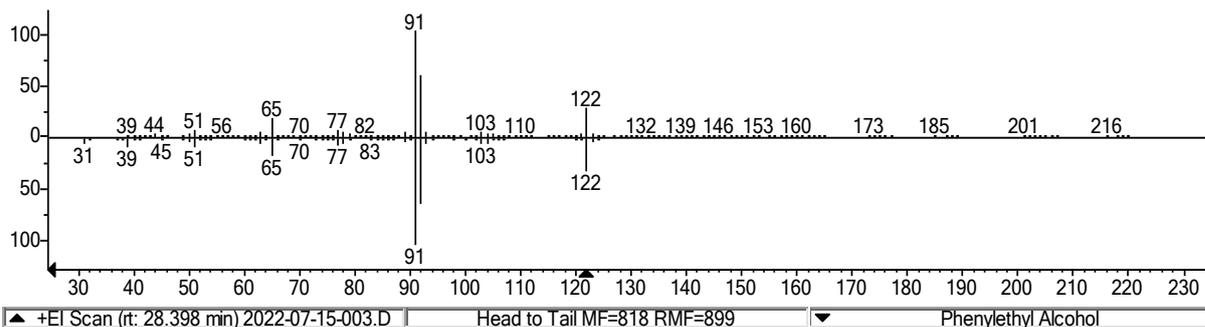


Abbildung 112: Massenspektrum von 2-Phenylethanol (S22) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1910.

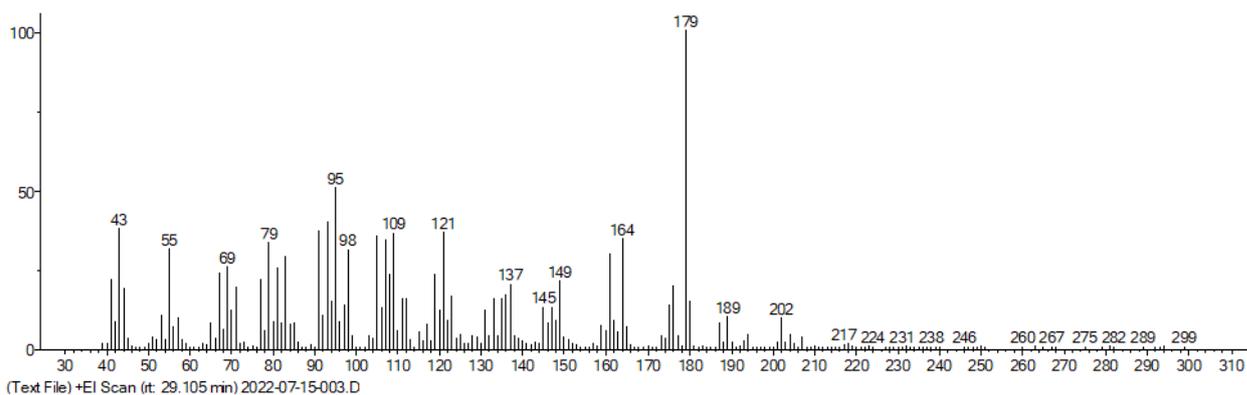


Abbildung 113: Massenspektrum von S23 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1951.

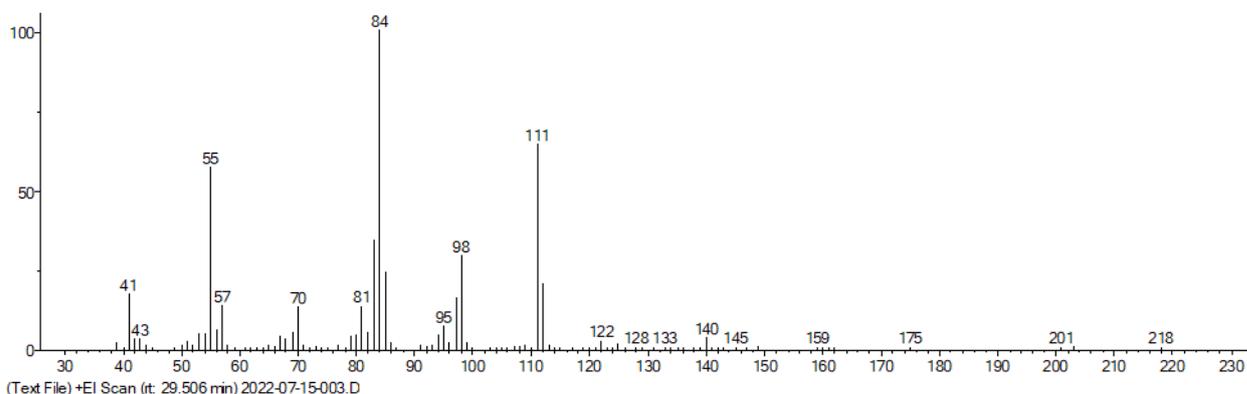


Abbildung 114: Massenspektrum von 5-Butyl-2(5H)-furanon (S24) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1970.

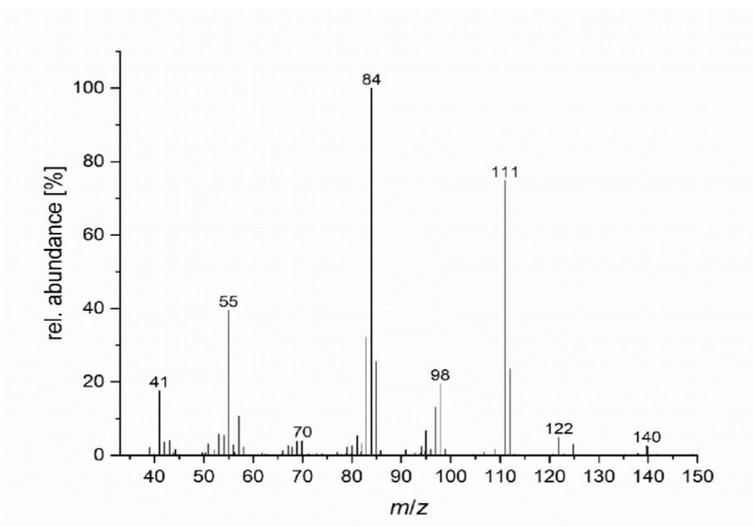


Abbildung 115: Referenzspektrum zur Substanz 5-Butyl-2(5H)-furanon des synthetisierten Standards.

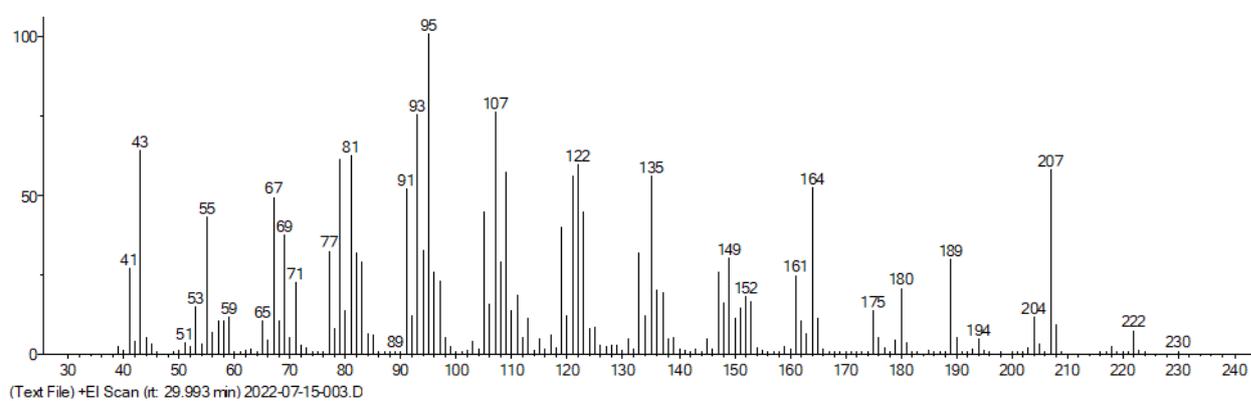


Abbildung 116: Massenspektrum von S25 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 1995.

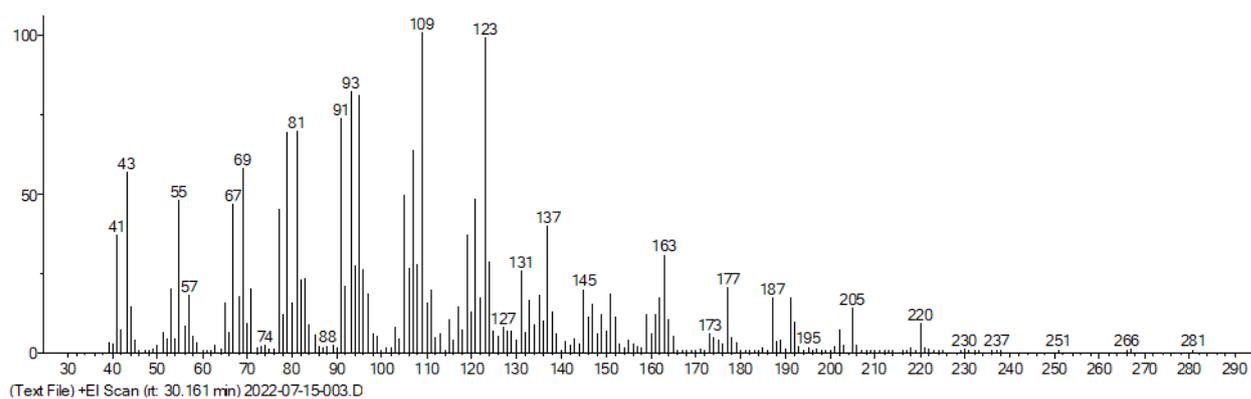


Abbildung 117: Massenspektrum von S26 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2003.

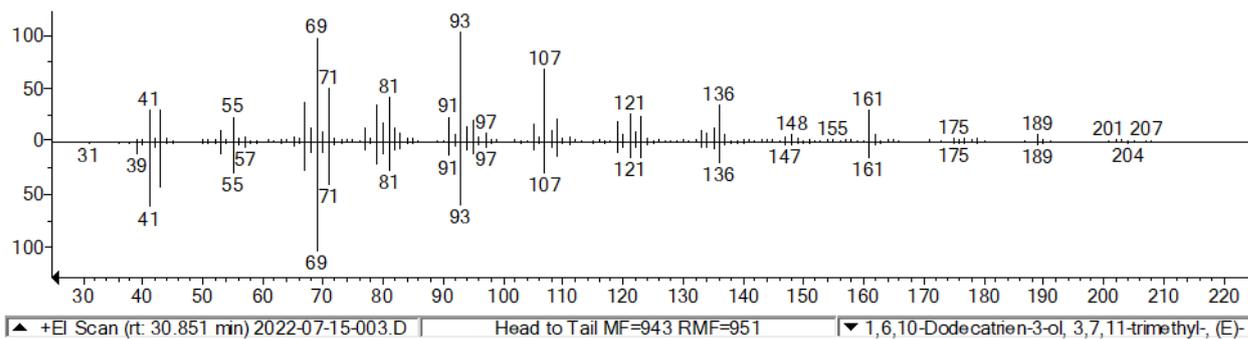


Abbildung 118: Massenspektrum von (E)-Nerolidol (S27) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2039.

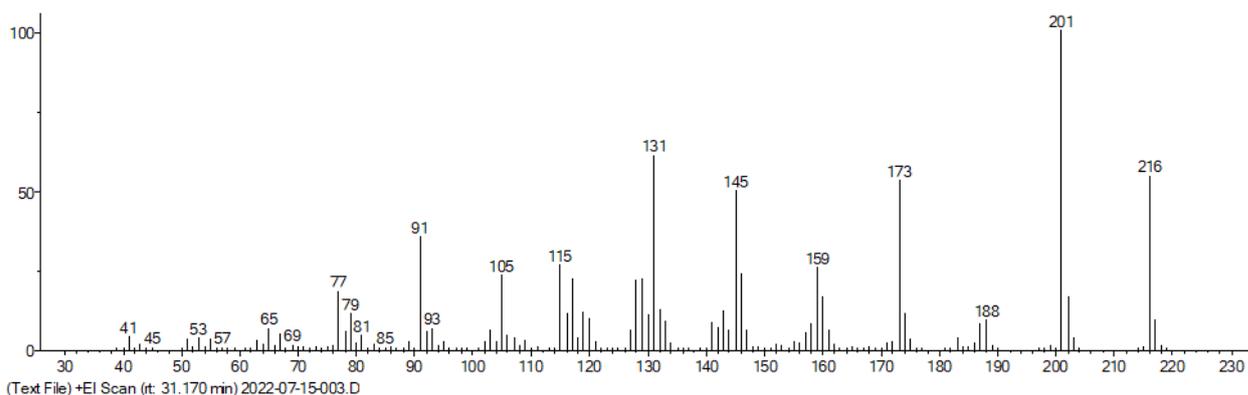


Abbildung 119: Massenspektrum von S28 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2056.

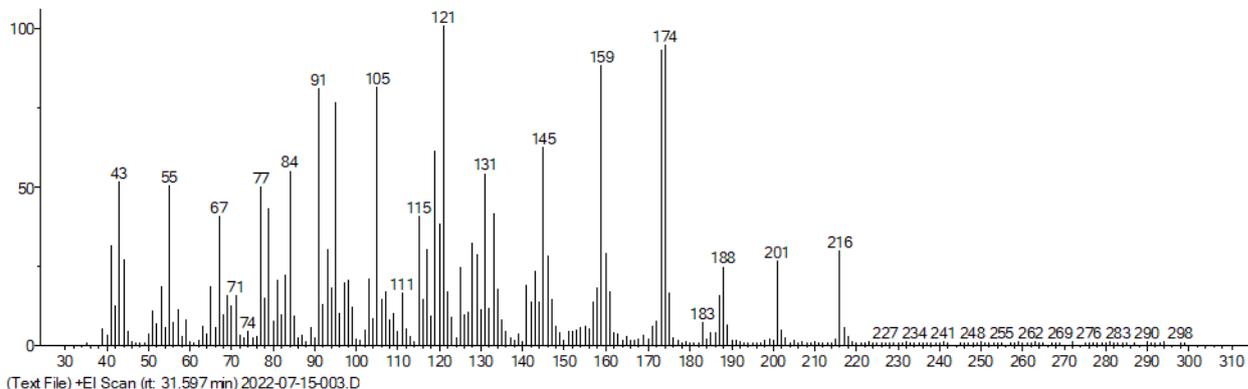


Abbildung 120: Massenspektrum von S29 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2078.

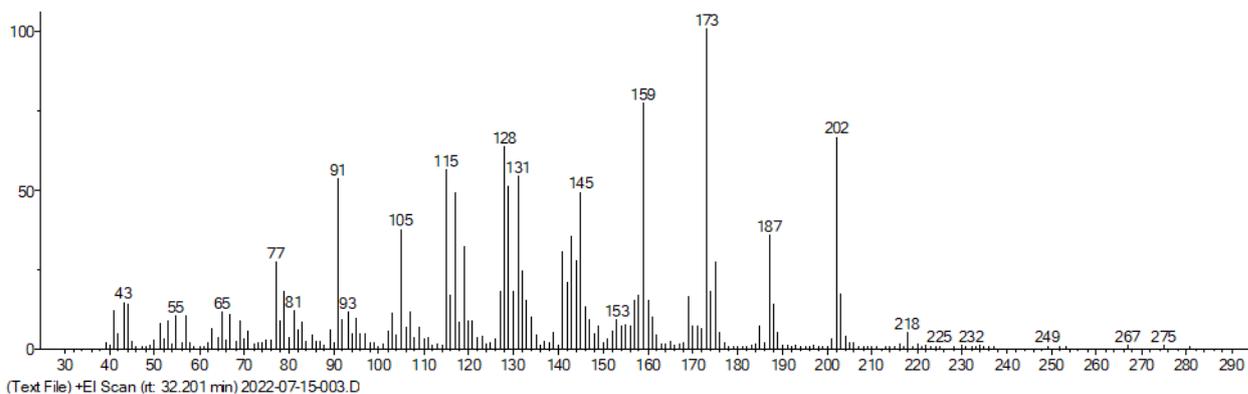


Abbildung 121: Massenspektrum von S30 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2110.

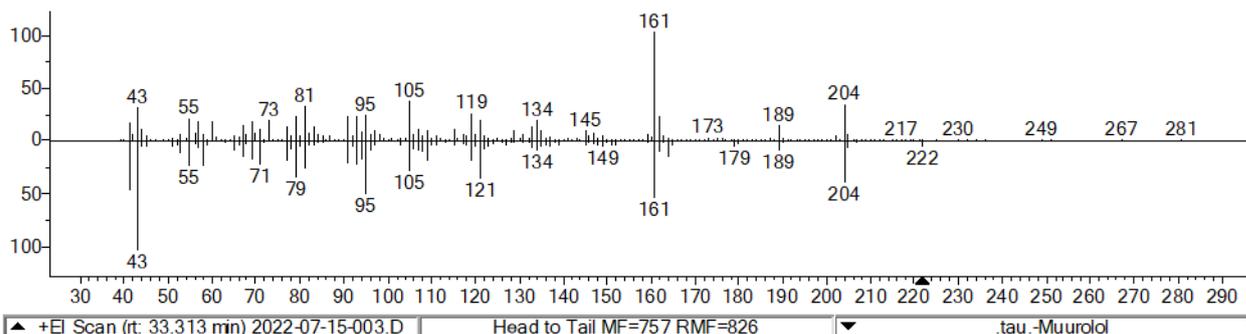


Abbildung 122: Massenspektrum von τ -Muurolol (S31) im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2199.

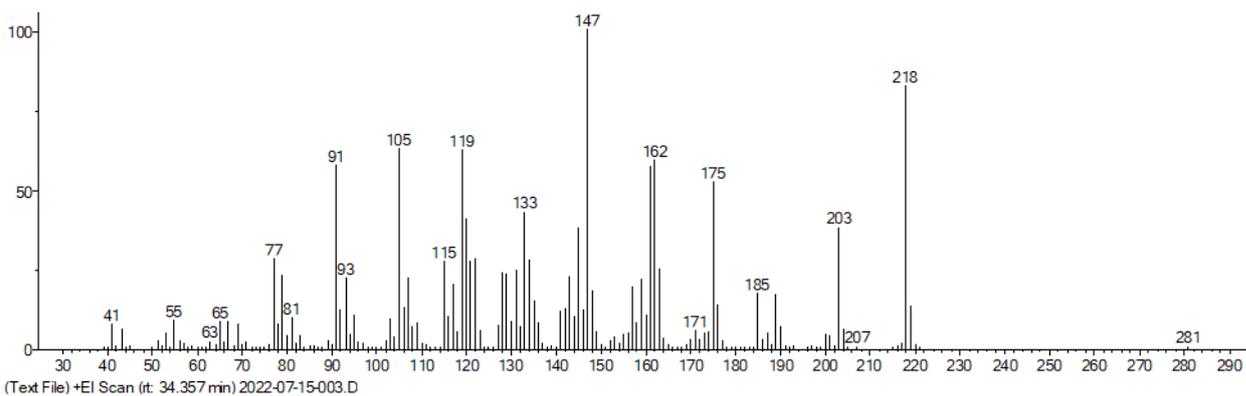


Abbildung 123: Massenspektrum von S32 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2230.

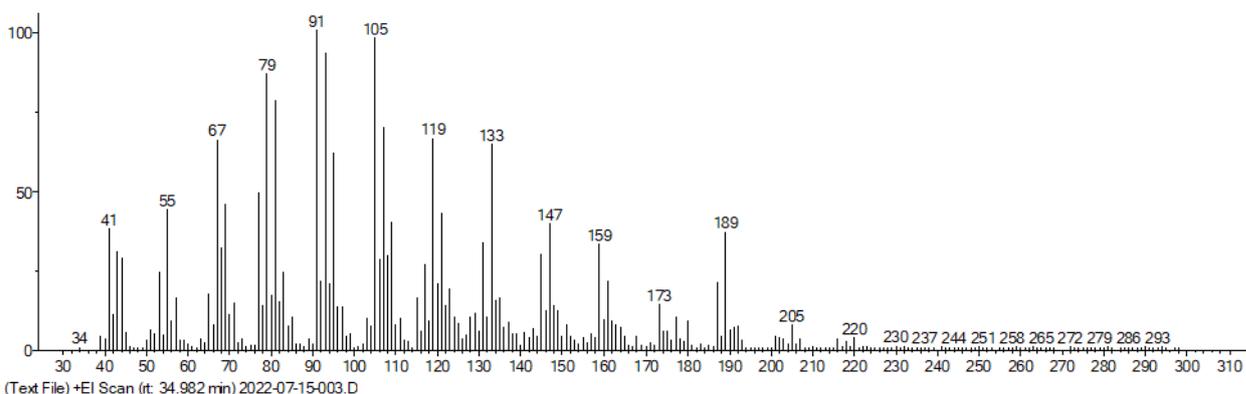


Abbildung 124: Massenspektrum von S33 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2265.

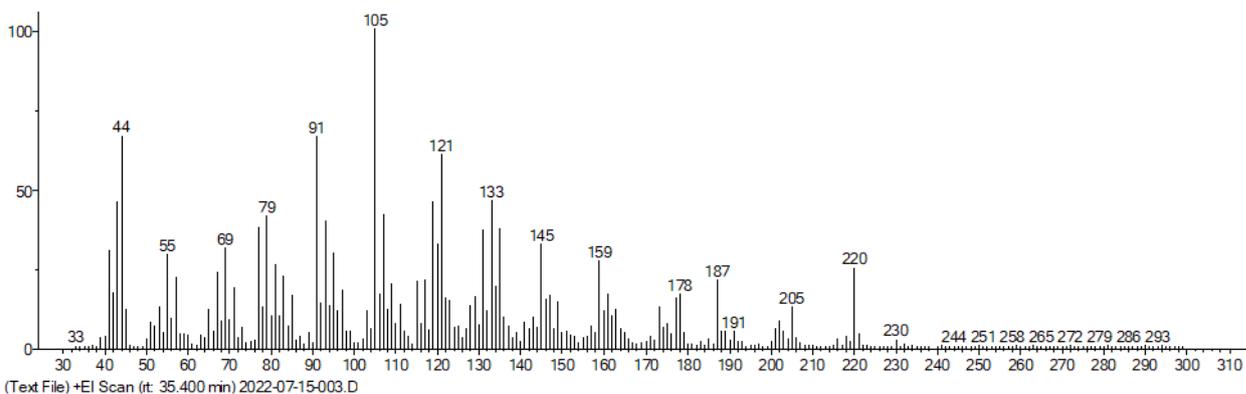


Abbildung 125: Massenspektrum von S34 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2289.

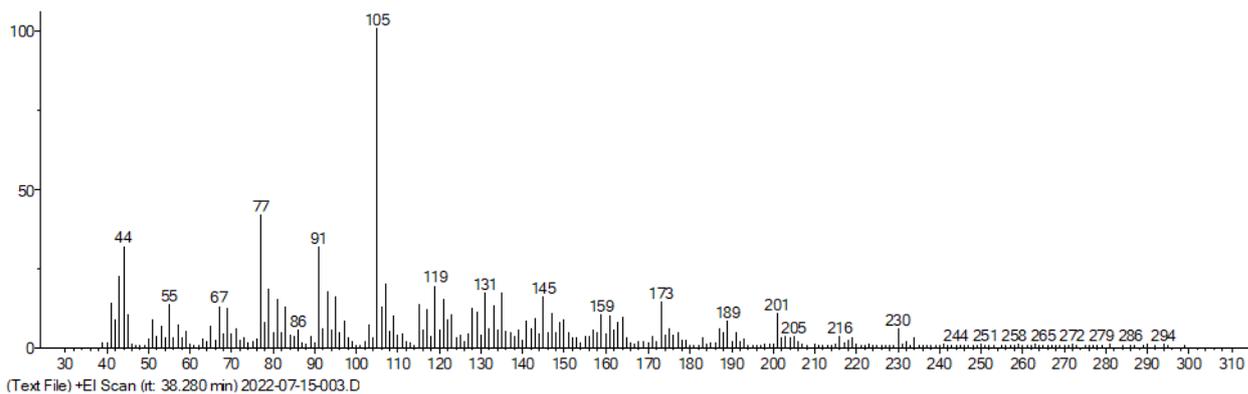


Abbildung 126: Massenspektrum von S35 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2461.

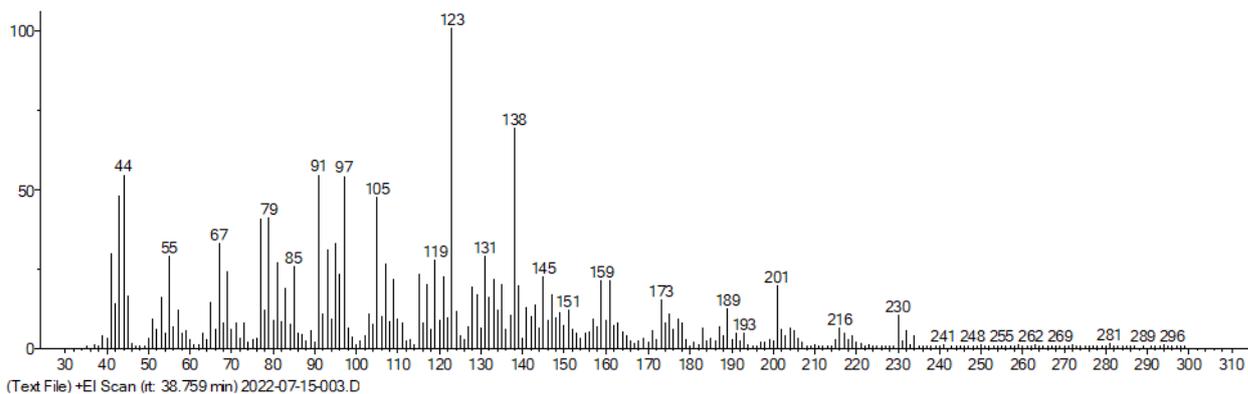


Abbildung 127: Massenspektrum von S36 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2491.

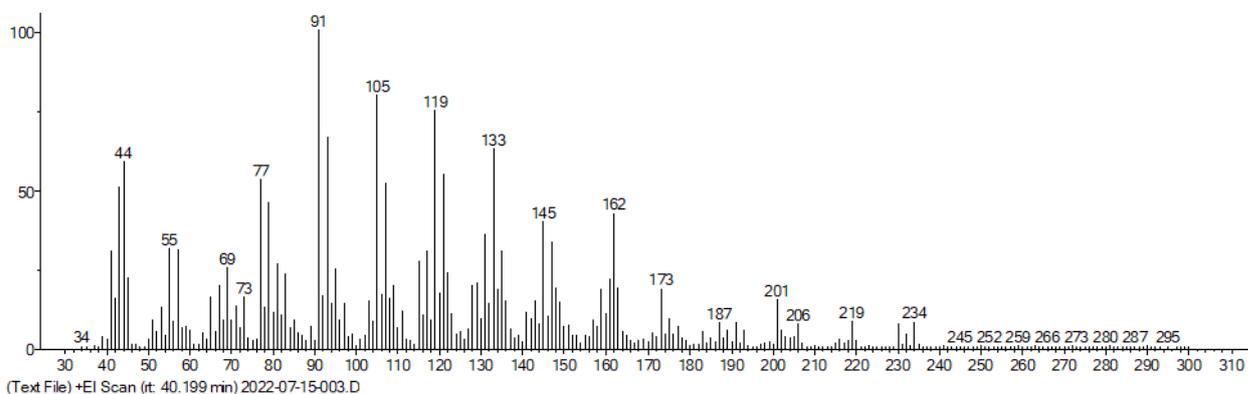
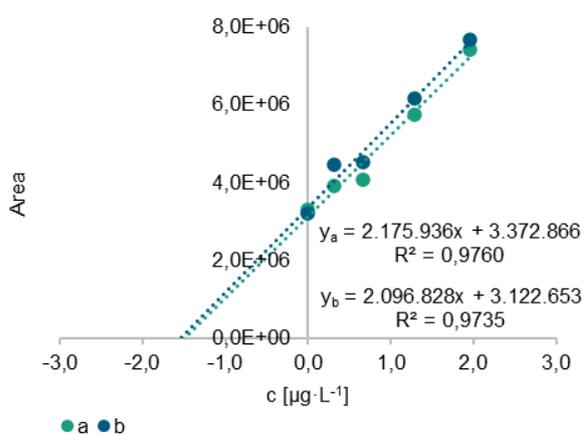
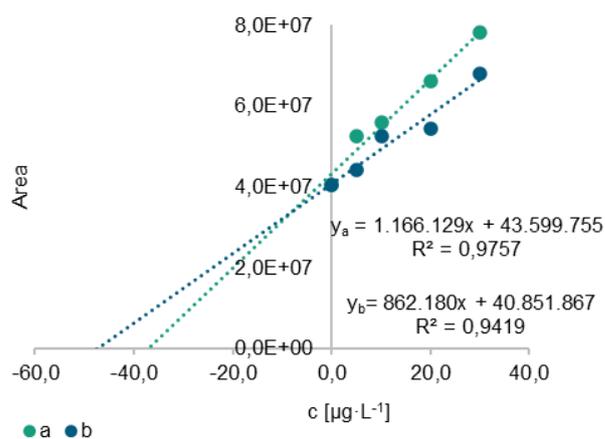


Abbildung 128: Massenspektrum von S37 im KP-Getränk auf VF-Wax-Säule bei einem RI von 2582.

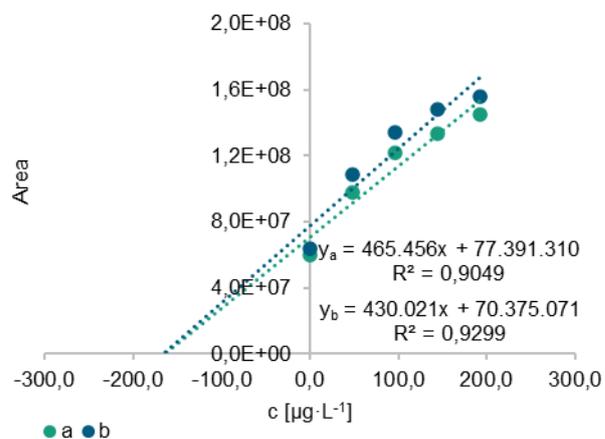
6.10 Quantifizierung von Aromastoffen im fermentierten KP-Getränk



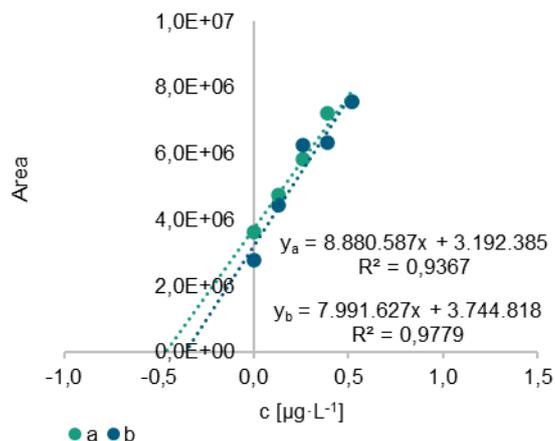
a



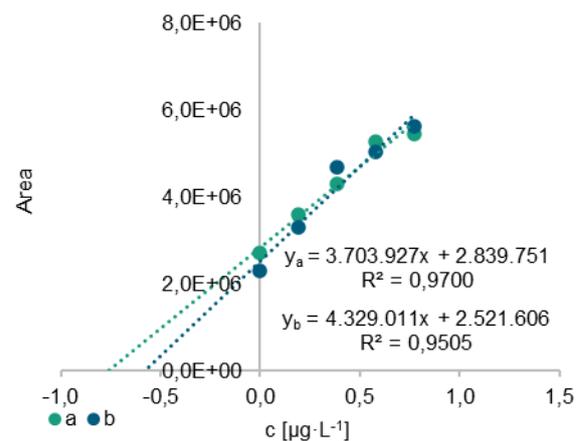
b



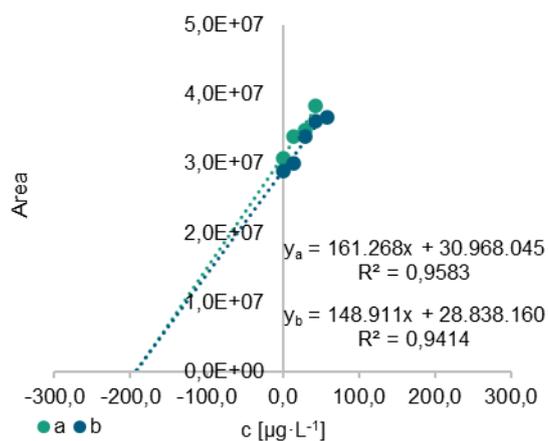
c



d



e



f

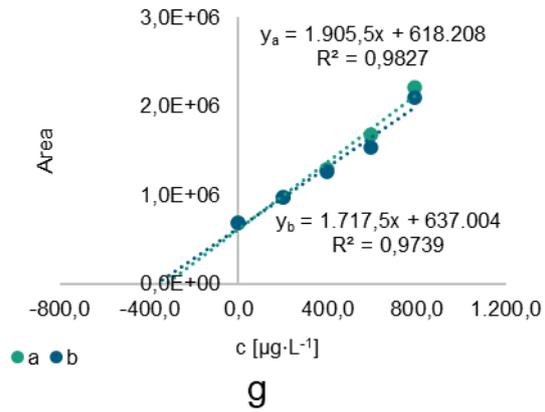


Abbildung 129: Kalibriergeraden zur Standardaddition von 2-Nonanon (a), (E)-Nerolidol (b), (R)-Linalool (c), Methylbenzoat (d), 1-Phenylethylacetat (e), 2-Phenylethanol (f) und 5-Butyl-2(5H)furanon (g) in fermentierter Kakaopulpe.

6.11 Kinetische Untersuchung von Aromastoffen im KP-Getränk über die Zeit

Tabelle 54: Peakflächen der ausgewählten m/z-Verhältnisse der Aromastoffe über die Zeit.

	KP-M	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
1-Octanal (m/z 84)	133.120	73.344	75.708	87.067	100.199	69.859	73.344
1-Heptanol (m/z 70)	772.034	935.481	792.063	673.778	96.409	17.744	22.256
2-Pentanol (m/z 45)	22.525.015	18.700.272	15.976.440	16.720.335	5.481.182	892.025	422.432
1-Phenylethyl- acetat (m/z 122)	879.669	832.086	700.849	663.539	617.308	516.845	400.442
2-Phenylethanol (m/z 91)	7.235.023	7.517.683	7.529.320	8.231.183	4.263.772	629.957	706.871
Methylbenzoat (m/z 105)	0	181.144	671.391	898.253	673.169	594.736	558.387
(E)-Nerolidol (m/z 93)	57.358	9.222.071	25.911.646	22.132.304	30.654.462	38.818.349	38.170.091
5-Butyl-2(5H)- furanon (m/z 84)	0	368.965	2.434.906	6.434.118	14.012.904	14.334.606	12.191.056
(R)-Linalool (m/z 93)	1.373.547	18.945.624	67.929.518	64.957.493	51.310.066	38.065.863	70.933.969
2-Nonanon (m/z 58)	1.609.476	1.409.167	3.557.888	2.081.514	853.453	338.763	243.373
2-Pentanon (m/z 86)	7.822.318	7.891.205	11.477.913	17.235.980	25.318.543	25.023.829	19.919.833
S18 (m/z 203)	0	0	50.546	734.589	4.992.981	2.516.484	2.718.601
S21 (m/z 160)	0	0	0	36.772	288.641	264.440	418.728
S23 (m/z 179)	0	0	38.101	261.292	454.364	96.063	62.789
S25 (m/z 95)	0	24.464	66.006	568.737	1.911.120	976.618	873.577
S26 (m/z 123)	0	30.557	37.034	181.589	534.533	227.491	177.042