

Fermentation unterschiedlicher Seitenströme der Lebensmittelin- dustrie zur Produktion alternati- ver Proteinquellen für die Futter- und Lebensmittelindustrie

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin

Janin Pfeiffer

2024

Dekan Professor Dr. Thomas Wilke

Gutachter

Erstgutachter: Professor Dr. Holger Zorn
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Professor Dr. Martin Rühl
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Erklärung zum eigenständigen Arbeiten

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.

Hamburg, den

Janin Pfeiffer

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während meiner Zeit in Gießen bedanken. Ich konnte viel von ihm lernen und bin sehr dankbar für all die Unterstützung, Ratschläge und das entgegengebrachte Vertrauen während meiner Promotion. Außerdem danke ich Professor Dr. Martin Rühl für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine wertvollen Ratschläge, insbesondere im Bereich der Pilzkultivierung. Ich danke auch Professor Dr. Till Schäberle und Professor Dr. Siegfried Schindler für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Für die Bereitstellung der Substrate und die Kooperation möchte ich mich bei *PT Alternative Protein Indonesia*, bei der Störtebeker Braumanufaktur und bei der PROLupin GmbH bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei dem Hessischen Ministerium für Wissenschaft und Forschung, Kunst und Kultur für die finanzielle Förderung durch die Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE).

Ich möchte mich herzlich für die Unterstützung und Expertise mit den Bestimmungen der Mineralstoffe mittels ICP-OES bei Professor Dr. Rolf-Alexander Düring und Frau Elke Schneidenwind vom Institut für Bodenkunde bedanken.

Für die Aufnahme der Bilder mittels ESEM möchte ich mich bei Dr. Mehrdad Ebrahimi von der Technischen Hochschule Mittelhessen bedanken.

Ich danke allen Studierenden, insbesondere Emily Schreiner, Annika Scheerer, Laura Stork, Cindy Flauaus und Stefanie Weiss, die mit ihren Bachelor- und Masterarbeiten zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ich möchte mich für ihre Motivation, die Zusammenarbeit und den Spaß den wir zusammen hatten bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Patrick Klüber für die hervorragende Zusammenarbeit. Egal vor welcher Herausforderung wir standen, es war mir immer eine Freude! Wir haben nicht nur eng zusammengearbeitet, sondern auch ein Büro geteilt und dabei eine Freundschaft aufgebaut, die die Arbeitszeit bereichert hat.

Ich danke Dr. Daniel Bakonyi dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte. Sein Fachwissen, seine Bereitschaft dieses zu teilen und seine Unterstützung, insbesondere bei Fragen im Bereich der molekularbiologischen Forschung, vor allem zu Enzymen haben mir enorm geholfen.

Bei Christopher Back möchte ich mich ganz herzlich für die technische Unterstützung während der Fermentationen und die Hilfe bedanken, es hat Spaß gemacht mit ihm zu arbeiten.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Fraunhofer IME. Besonders möchte ich mich bei Dr. Marco Fraatz, Dr. Martin Gand, Dr. Andreas Hammer, Dr. Florian Birk, Dr. Axel Orban, Dr. Dominik Karrer, Friederike Bürger, Julia Büttner, Annika Wagner, Sandra Breuer und Nikolas Hoberg für die wissenschaftlichen Diskussionen, die tollen Mittagspausen und die Unterstützung bedanken. Bei Bianka Daubertshäuser und Peter Seum möchte ich mich für ihre Hilfe und Unterstützung bedanken.

Bei Dr. Andreas Hammer und Dr. Patrick Klüber möchte ich mich zusätzlich für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Bei Dr. Svenja Sommer, Dr. Victoria Steiß, Katharina Happel, Jeanny Jerschow-Schaumann und Carolin Mewe möchte ich mich nicht nur für die tolle Zusammenarbeit als Arbeitskolleginnen, Teilnahme an sensorischen Bewertungen und all die GC-MS-O-Analysen bedanken, sondern auch für die Freundschaft, die wir geschlossen haben, die Gießen für mich zu einem besseren Ort gemacht hat. Danke euch!

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Freundinnen, Freunden und meinem Partner, die für mich da waren und Verständnis hatten, wenn ich mich mal wieder um die Pilze kümmern musste.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Klüber P., Tegtmeier D., Hurka S., Pfeiffer J., Vilcinskas A., Rühl M., Zorn, H.: Diet Fermentation Leads to Microbial Adaption in Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*; Linnaeus, 1758) Larvae Reared on Palm Oil Side Streams. Sustainability **2022**, 14 (9), 5626

Hong L., Spielmeyer A., Pfeiffer J., Wegner, H. A.: Domino lignin depolymerization and reconnection to complex molecules mediated by boryl radicals. Catalysis Science & Technology, **2020**, 10, 3008-3014

Tagungsbeitrag

Poster

Pfeiffer J., Back C., Rühl M., Zorn H.: Modifikation Lignin-haltiger Nebenströme der Lebensmittelindustrie durch Pilze der Abteilung Basidiomycota. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag **2019**, Dresden

Patente

Klüber P., Zorn H., Rühl M., Bakonyi D., Pfeiffer J., Vilcinskas A.: Process for the production of an insect substrate, insect substrate and uses thereof. Application number EP22152265.9.

Pfeiffer J., Zorn H., Fraatz M. A., Störtebeker Braumanufaktur: Verfahren zum Herstellen von Bier oder einem anderen Getränk und eines proteinhaltigen Produktes. AS3868-22

Pfeiffer J., Zorn H., Fraatz M. A., Störtebeker Braumanufaktur: Verfahren zum Herstellen von Proteinen auf der Basis von Stofffraktionen aus der Nahrungsmittelindustrie. AS3868-22

Zusammenfassung

Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung, des anhaltenden Klimawandels und der damit einhergehenden Folgen wie Hungersnöten oder Naturkatastrophen steigt die Nachfrage nach nachhaltig und zuverlässig produzierbaren alternativen Proteinquellen. Insekten, wie die Larven der Schwarze Soldatenfliege (engl.: *black soldier fly larvae* (BSFL)), spielen hierbei besonders in der Futtermittelindustrie eine große Rolle. Aber auch die Forschung an Alternativen für die Humanernährung ist weit verbreitet. In diesem Zusammenhang könnten Pilze der Abteilung Basidiomycota in der Zukunft eine tragende Rolle einnehmen. Die Fruchtkörper verschiedenster Speisepilze werden weltweit in großen Mengen verzehrt und aufgrund ihres einzigartigen Geschmacks geschätzt, doch auch das Myzel erfährt ein immer größer werdendes Interesse in der Lebensmittelindustrie. Durch ihr einzigartiges Enzymportfolio sind die Pilze im Stande, lignocellulosehaltige Biomasse, zu der eine Vielzahl der Seitenströme der Lebensmittelindustrie gehören, zu verwerten und in proteinreiche Lebensmittel umzuwandeln.

Die Seitenströme der Palmölindustrie, *empty fruit bunches* (EFB) und Palmkernmehl (PKM) sind reich an lignocellulosehaltigen Fasern und sollten als Futtersubstrat für die BSFL eingesetzt werden. Diese können nachfolgend als Futtermittel verwendet werden. Es wurde eine Fermentation mit den Weißfäulepilzen *Bjerkandera adusta*, *Marasmius palmivorus* und *Irpex consors* auf einer Mischung dieser Seitenströme in Festbettkultur durchgeführt, um die Verdaulichkeit für die BSFL zu steigern.

Zur Optimierung der Fermentation wurden das Pilzwachstum, der Lignin- sowie der Proteingehalt der Substrate und Fermentationsprodukte analysiert. Im Zuge dessen zeigte sich, dass lediglich eine Fermentation der EFB zielführend war. Durch nachträgliche Beimischung des PKM wurde verhindert, dass die Pilze wertvolle Nährstoffe aus dem PKM metabolisierten und das Lignin der EFB zum Biomasseaufbau nutzten. Der Gesamtligningehalt wurde durch die Pilze nicht verringert. Allerdings wurde ein Teil des säureunlöslichen Lignins in säurelösliches Lignin abgebaut. In Fütterungsversuchen stellte sich heraus, dass die BSFL das mit *B. adusta* fermentierte Futtersubstrat bevorzugten und sich signifikant schneller entwickelten.

Das Myzel von Pilzen der Abteilung Basidiomycota könnte allerdings aufgrund der erhöhten Nachfrage nach alternativen Proteinquellen in der Humanernährung auch als Lebensmittel eingesetzt werden. Auch hierbei können lignocellulosehaltige Seitenströme als Wachstumssubstrat dienen.

Nach einem Screening mit 22 Speisepilzen auf Agarmedien aus unterschiedlichen Biertreibersorten als alleiniger Nährstoffquelle wurden *Pleurotus eryngii* und *Pholiota nameko* auf Grundlage ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und Geruchseindrücke ausgewählt und submers in unter-

schiedlichen Pilsener-Treber- und Weizenbierdreber-Medien kultiviert. Die Fermentationen wurden teils optimiert und die erhaltenen Produkte unter Berücksichtigung unterschiedlicher Aspekte näher charakterisiert:

Für den Pilz *P. eryngii* wurde das Kulturmedium optimiert, um einen möglichst hohen Pilzgehalt und eine gute Proteinqualität im Fermentat zu erhalten. Der höchste Pilzgehalt mit über 65% wurde bei einem Substrateinsatz von 2,5 g Bierdreber pro Liter erreicht. Bei einer so geringen verwendeten Menge ist allerdings der Recyclingaspekt von in Tonnen anfallenden Nebenströmen zu hinterfragen. Die biologische Wertigkeit unterschied sich in Abhängigkeit der Substratkonzentration dagegen kaum und lag bei 88 bis 89.

Die Medienoptimierung für *P. nameko* wurde analog zu den Experimenten mit *P. eryngii* durchgeführt. Darüber hinaus wurde das Aroma der Kulturen mit ansprechenden Geruchseindrücken mittels GC-MS-O analysiert. Im Anschluss wurde der Glutengehalt analysiert, welcher innerhalb von 14 Kulturtagen um 99,55% abnahm. Dies senkt das allergene Potential der Fermentationsprodukte und erhöht somit ihr Anwendungsspektrum.

Aufgrund des geringen allergenen Potentials von Speisepilzen und der nachgewiesenen hohen Proteinqualität der Fermentate eignet sich neben den Fruchtkörpern auch das ressourcenschonend produzierbare Myzel als alternative Proteinquelle. Bei der Produktion von Myzel ist, wie bei der BSFL ein vertikales, platzsparendes System denkbar, jedoch steht die Zulassung der Mycelien als *Novel Food* durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) noch aus. Mit der Zulassung der BSFL als Futtermittel in der Europäischen Union wurden die rechtlichen Voraussetzungen der Umsetzung des Projekts zum Recycling der Palmölseitenströme geschaffen. Das *Upscaling* der Fermentation in Metallcontainern konnte erfolgreich durchgeführt werden. Fermentation und Insektenzucht könnten direkt in den Palmöl-produzierenden Ländern erfolgen, um eine Wertschöpfung vor Ort zu erzielen und Transportkosten der Rohstoffe EFB und PKM zu vermeiden. Die Insektenzucht ist durch ein vertikales Zuchtsystem platzsparender als der Anbau pflanzlicher Futtermittel für die Nutztierhaltung. Auf diese Weise ließe sich auch die Konkurrenz um die Nutzung von Agrarflächen (Nutztier- vs. Humanernährung) minimieren.

Abstract

With a growing world population, the climate change and its consequences such as famine and natural disasters, there is an increasing demand for sustainable and reliable alternative protein sources. Insects, such as the larvae of the black soldier fly (BSFL), play an important role in the feed industry. But research addressing alternatives for human nutrition is also widespread. Fungi from the division Basidiomycota could play a leading role in the future. The fruiting bodies of various edible mushrooms are consumed in large quantities worldwide and appreciated for their unique taste. But the mycelium is also attracting increasing interest from the food industry. Due to their unique enzyme portfolio, fungi are able to utilise lignocellulosic biomass, including many side streams of the food industry, and convert it into protein-rich food.

The palm oil industry side streams, empty fruit bunches (EFB) and palm kernel meal (PKM), are rich in lignocellulosic fibre and should be used as a rearing substrate for BSFL. These may subsequently be used as feed. Solid state fermentation with the white rot fungi *Bjerkandera adusta*, *Marasmius palmivorus* and *Irpex consors* was carried out on a mixture of these side streams to increase the digestibility for BSFL.

To optimize the fermentation process, fungal growth, lignin and protein contents of the substrates and fermentation products were analyzed. It was found that only fermentation of the EFB was effective. The subsequent addition of PKM prevented the fungi from metabolizing valuable nutrients from the PKM and ensured that the lignin from the EFB was used to build biomass. The total lignin content was not reduced by the fungi. However, some of the acid-insoluble lignin was converted to acid-soluble lignin. Feeding trials showed that BSFL preferred the fermented substrate with *B. adusta* and developed significantly faster.

Apart from that, the mycelia of fungi from the division Basidiomycota could also be used as food due to the increasing demand for alternative protein sources in human nutrition. Again, agro-industrial lignocellulosic side streams can be used as growth substrates.

After screening 22 edible fungi on agar media prepared from different brewer's spent grains as sole nutrient source, *Pleurotus eryngii* and *Pholiota nameko* were selected on the basis of their fast growth and attractive odour impressions and cultivated submerged in different pilsner and wheat beer spent grain media. The media were optimized and the products obtained were characterized in more detail, taking into account various aspects:

For the fungus *P. eryngii*, the culture medium was optimized to achieve the highest fungal content and a high protein quality of the fermentate. The highest fungal content of over 65% was achieved with a substrate concentration of 2.5 g brewer's spent grains per liter. However, with such a low input, the recycling aspect of the side streams products produced in tons is questionable. On the

other hand, the biological value did not vary much with substrate concentration, ranging from 88 to 89.

Medium optimization for *P. nameko* was carried out in the same way as for *P. eryngii*. In addition, the aroma of the cultures was analysed by GC-MS-O. The gluten content was reduced by 99.55% within 14 days of cultivation. This reduces the allergenic potential of the fermentation products and thus increases the range of applications.

Due to the low allergenic potential of edible mushrooms and the proven high protein quality of the fermentates, the mycelia, which can be produced in a sustainable manner, are suitable as an alternative protein source. The production of mycelium can be done in a vertical, space-saving system, as with BSFL, but the EFSA has yet to approve mycelium as a novel food. With the approval of BSFL as an animal feed in the European Union, the legal requirements for the implementation of the palm oil side stream recycling process have been met. The upscaling of the fermentation in metal containers was successfully completed. Fermentation and insect breeding could be carried out directly in palm oil producing countries to add value locally and avoid transport costs of the raw materials EFB and PKM. Insect farming is more space efficient than growing vegetable feed for livestock because of the vertical farming system. This would also minimize the competition for agricultural land (livestock vs. human food).

Inhalt

Erklärung zum eigenständigen Arbeiten.....	I
Danksagung	II
Publikationen und Tagungsbeiträge.....	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract.....	VII
Inhalt	IX
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund.....	1
1.2 Organische Nebenströme der Lebensmittelindustrie.....	3
1.2.1 Nebenströme der Palmölindustrie.....	5
1.2.2 Biertreber	6
1.3 Pilze der Abteilung Basidiomycota	7
1.4 Zielsetzung.....	9
2. Experimenteller Teil	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Chemikalien und Kits.....	10
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Software	16
2.1.4 Organismen	17
2.1.5 Substrate.....	18
2.2 Kultivierung von Pilzen.....	19
2.2.1 Stammhaltung.....	19
2.2.2 Vorkulturführung.....	19
2.2.3 Hauptkulturführung auf Palmölseitenströmen	20
2.2.3.1 Emerskultivierung auf Palmölseitenströmen.....	20
2.2.3.2 Emerskultivierung zur Ergosterolbestimmung.....	20
2.2.3.3 <i>Upscaling</i> der Emerskultivierung.....	20
2.2.4 Hauptkulturführung in Medien aus Biertreber und Lupinenseitenströmen	20
2.2.4.1 Screening auf unterschiedlichen Agarmedien.....	20
2.2.4.2 Hauptkulturführung in Submersmedien mit Biertreber und Lupinenseitenströmen	21
2.2.4.3 Optimierung der Hauptkulturmedien	22
2.2.5 Ernte des Myzels aus Submerskulturen	23
2.3 Analytische Methoden	23
2.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	23
2.3.2 Feuchtebestimmung	23
2.3.3 Elementaranalyse.....	23

2.3.4	Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.....	24
2.3.5	Aminosäureanalytik.....	24
2.3.5.1	Bestimmung der Gesamtaminosäuren nach saurer Hydrolyse.....	25
2.3.5.2	Bestimmung von Cystein und Methionin nach Oxidation.....	25
2.3.5.3	Bestimmung von Tryptophan nach alkalischer Hydrolyse	26
2.3.5.4	Geräteparameter Aminosäureanalysator	26
2.3.5.5	Bestimmung des Aminosäuregehalts, des Kjeldahlfaktors und der Proteinqualität	28
2.3.6	Bestimmung des Fettgehalts nach Weibull-Stoldt	31
2.3.7	Bestimmung der Fettsäureverteilung.....	31
2.3.7.1	Umesterung der Fettsäuren.....	32
2.3.7.2	Gaschromatographische Analyse des Fettsäureprofils	32
2.3.8	Bestimmung des Ligningehaltes nach Klason	33
2.3.9	Bestimmung des Ergosterolgehalts	35
2.3.9.1	Ergosterolbestimmung mittels HPLC-DAD.....	35
2.3.9.2	Ergosterolbestimmung mittels GC-FID.....	37
2.3.9.3	Quantifizierung des Pilzgehalts.....	38
2.3.10	Aschebestimmung.....	38
2.3.11	Mineralstoffbestimmung mittels ICP-OES.....	39
2.3.12	Bestimmung des Glutengehalts mittels kompetitivem <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	39
2.4	Aromanalytik.....	40
2.4.1	Geruchsbeurteilung der Kulturüberstände	40
2.4.2	GC-MS-O-Analytik von <i>P. nameko</i> -Kulturen	40
3.	Ergebnisse.....	45
3.1	Fermentation von EFB und PKM	45
3.1.1	Analytik der Substrate	45
3.1.2	Screening	46
3.1.3	Ergosterolbestimmung der Festbettkulturen	47
3.1.4	Optimierung der Kultivierungsbedingungen.....	48
3.1.4.1	Kultivierung auf EFB und PKM.....	48
3.1.4.2	<i>Upscaling</i> und Optimierung der Kultivierungsdauer.....	49
3.1.5	Analytik der finalen Larvensubstrate	50
3.2	Fermentation von unterschiedlichen Nebenströmen der Bier- und Lupinenproteinindustrie	53
3.2.1	Wiederfindungsraten der Aminosäureanalytik.....	53
3.2.2	Analytik der Substrate	54
3.2.3	Screening von Speisepilzen in Emerskulturen.....	56
3.2.4	Screening in Submerskulturen.....	58
3.2.5	<i>Pleurotus eryngii</i>	62

3.2.6	<i>Pholiota nameko</i>	70
4.	Diskussion	89
4.1	<i>Palmölseitenströme</i>	89
4.1.1	Fermentation von EFB und PKM	93
4.1.2	Ergosterolbestimmung in Festbettkulturen	94
4.1.3	Optimierung der Kultivierungsbedingungen	96
4.1.3.1	Mischung von PKM und EFB	96
4.1.4	<i>Upscaling</i> der Festbettkultivierung und abschließende Analytik	96
4.2	Fermentation von Biertreber	100
4.2.1	Wiederfindungsraten der Aminosäureanalytik	100
4.2.2	Analytik der Substrate	101
4.2.3	Screening	103
4.2.4	<i>Pleurotus eryngii</i>	105
4.2.5	<i>Pholiota nameko</i>	109
4.2.5.1	Aromanalytik	111
4.2.5.2	Glutenanalytik	113
5.	Ausblick	117
6.	Literatur	119
7.	Anhang	136
7.1	Kalibrierreihen der Ergosterolbestimmung	136
7.2	Ergosterolgehalte	137
7.2.1	Ergosterolgehalte von <i>P. eryngii</i>	137
7.2.2	Ergosterolgehalte von <i>P. nameko</i>	137
7.3	Aromanalytik	138
7.3.1	Massenspektren der in den Medien vorläufig identifizierten Aromastoffe	138
7.3.2	Massenspektren der in den Kulturen mit <i>P. nameko</i> vorläufig identifizierten Aromastoffe	140
7.3.3	Chromatogramme der Messungen mittels SBSE-GC-MS-O anhand der DB-5ms-Trennsäule	143
7.3.4	GC-MS-O-Messung von <i>P. nameko</i> in Biertrebermedien nach Extraktion mittels SPME	146

Abkürzungsverzeichnis

Alle verwendeten Abkürzungen, mit Ausnahme der in Tabelle 5 aufgeführten Organismen, sind im Folgenden aufgeführt.

AA _{Res}	Aminosäurerest, wenn aus dem Gehalt das Wassermolekül der Peptidbindung subtrahiert wurde (engl.: <i>Amino Acid Residue</i>)
AAS	Aminosäureindex (engl.: <i>Amino Acid Score</i>)
AIL	säureunlösliches Lignin (engl.: <i>Acid-insoluble Lignin</i>)
API	<i>Alternative Protein Indonesia</i>
AS	Aminosäure
ASL	säurelösliches Lignin (engl.: <i>Acid-soluble lignin</i>)
BSF	Schwarze Soldatenfliege (engl.: <i>Black soldier fly</i>)
BSFL	Larve der Schwarzen Soldatenfliege (engl.: <i>Black soldier fly larvae</i>)
BSG	Biertreber (engl.: <i>Brewer's Spent Grains</i>)
BW	Biologische Wertigkeit
CAR	Carboxen
CBS	<i>Westerdijk Fungal Biodiversity Institute</i>
CIS	Kaltaufgabesystem (engl.: <i>Cold Injection System</i>)
CMC	Carboxymethylcellulose
CS	Chemischer Index (engl.: <i>Chemical Score</i>)
DAD	Diodenarraydetector
dd	bidestilliert
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
DIN	Deutsches Institut für Normung
2,6-DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DNS	Dinitrosalicylsäure
DPQ	3,3'-5,5'-Tetramethyl-4,4-biphenylchinon
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVB	Divinylbenzol
EAAI	Essentieller Aminosäure-Index (engl.: <i>Essential Amino Acid Index</i>)
EFB	Leere Fruchtstände (engl.: <i>empty fruit bunches</i>)
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl.: <i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESEM	Rasterelektronenmikroskop (engl.: <i>Environmental Scanning Electron Microscope</i>)

FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl.: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FAM	Falk Amelung
FB	<i>Fed-Batch</i> (engl. <i>fed</i> für „gefüttert“ und <i>batch</i> für „Stapel“)
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FKW	Fluorkohlenwasserstoffe
FID	Flammenionisationsdetektor
FPR	Florian Prell
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICP-OES	Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl.: <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>)
ISO	Internationale Organisation für Normung (engl.: <i>International Organization for Standardization</i>)
IST	Interner Standard
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
LCB	Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
LiP	Lignin-Peroxidase
LKL	Lupinenklarlauf
ME	Malzextrakt
MEA	Malzextrakt-Agar
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
O	Olfaktometrie
ODP	Olfaktorischer Detektorport
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> ; Konzentration der Protonen
PKM	Palmkernmehl (engl.: <i>Palm Kernel Meal</i>)
RI	Retentionsindex
SBSE	Magnetrührstab Sorptions-Extraktion (engl.: <i>Stir bar Sorptive Extraction</i>)
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl.: <i>Solid Phase Microextraction</i>)
TDU	Thermodesorptionseinheit (engl.: <i>Thermodesorption Unit</i>)

TGSC	<i>The Good Scents Company</i>
THF	Tetrahydrofuran
THM	Technische Hochschule Mittelhessen
TL	Gesamtlinin (engl.: <i>Total Lignin</i>)
TM	Trockenmasse
TW	Trinkwasser
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VE	Vollständig entsalzt
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organization</i>)
z.A.	zur Analyse

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Im Jahr 2019 lag die Weltbevölkerung bei 7,7 Milliarden Menschen. Von 1994 bis 2019 sind zwei Milliarden Menschen hinzugekommen, was an der erhöhten Geburtenrate, im Vergleich zur Sterberate vor allem in den Entwicklungsländern lag. Bis 2030 soll die Weltbevölkerung laut Vorhersagen der UN auf 9,7 Milliarden Menschen ansteigen. (United Nations 2019) Um dem mit diesem Wachstum einhergehenden anhaltenden Hunger auf der Welt entgegenzuwirken, bedarf es nachhaltiger Alternativen der Lebens- und Futtermittelproduktion. Von den 35,7 Mio. ha Fläche in Deutschland werden zurzeit 46% (entsprechen 16,6 Mio. ha) landwirtschaftlich genutzt und davon wiederum werden auf über 60% der Felder Futtermittel zur Versorgung der mehr als 200 Millionen Nutztiere in Deutschland produziert. (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2020) Die FAO der UN hat sich vorgenommen, den Hunger auf der Welt bis zum Jahr 2030 zu beenden. Doch die Covid-19 Pandemie hat dafür gesorgt, dass der Fortschritt der bis 2020 erzielt werden konnte rückläufig wurde, sodass der Hunger sich 2020 sogar verstärkte. Im Jahr 2020 waren 720-811 Millionen Menschen von Hunger betroffen, das sind ca. 118 Millionen mehr als 2019. (FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO 2021) Eine Perspektive, dem anhaltenden Hunger entgegenzuwirken ist es flächeneffizientere Futtermittel zu produzieren, um die landwirtschaftlich genutzten Flächen auch für den Anbau von Pflanzen zu nutzen, die für den menschlichen Verzehr gedacht sind. Eine alternative Proteinquelle sind beispielsweise Insekten, die als Futtermittel eingesetzt werden können. (Bava et al. 2019) Insekten sind in der Lage, eine Vielzahl organischer Seitenströme als Futtersubstrat zu verwerten und dadurch zu einem protein- und fettreichen Futtermittel umzuwandeln. Die Schwarze Soldatenfliege (engl.: *Black Soldier Fly* (BSF); *Hermetia illucens*) gewann als Biokonverter für organische Materialien in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit. Ihre Aufzucht erfordert weniger Wasser und Landressourcen als der Anbau pflanzlicher Futtermittel. (Purkayastha und Sarkar 2021)

Ein weiteres Problem der landwirtschaftlichen Nutzung der Flächen für die Nutztieraufzucht ist die Treibhausgasemission. Der Klimawandel, also die Veränderung der durchschnittlichen globalen und lokalen Witterungsverhältnisse und der Extremereignisse, ist durch den anthropogenen Einfluss auf die Treibhausgasemission stark vorangeschritten. Zu den Treibhausgasen gehören Kohlenstoffdioxid, Methan und Distickstoffoxid. Sie lassen die von der Sonne ausgehende energiereiche Strahlung ungehindert auf die Erde treffen und absorbieren von der Erde remittierte langwelligere Strahlung, welche dafür sorgt, dass die Gasmoleküle in einen angeregten Zustand gehoben werden. Wenn sie in den Grundzustand zurückkehren wird Strahlung in alle Himmelsrichtungen abgegeben, auch auf die Erdoberfläche. Der natürliche Treibhauseffekt allerdings sorgt le-

diglich dafür, dass Menschen auf der Erde leben können, denn ohne ihn hätte die Erde eine Temperatur von $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seit dem Zeitalter der Industrialisierung sorgen anthropogene Einflüsse dafür, dass sich die Stoffzusammensetzung der Atmosphäre stetig ändert. Von 1750 – 2019 ist die Konzentration an CO_2 in der Atmosphäre um 48% gestiegen, die Konzentration von Methan ist sogar um den Faktor 2,6 gestiegen. Außerdem sorgt der Mensch dafür, dass auch synthetische Stoffe in die Atmosphäre gelangen, wie Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW), Halone und Fluorkohlenwasserstoffe (FKW). Die anthropogenen Einflüsse sind die Hauptursache für den Klimawandel und sorgen dafür, dass die Gletscher schmelzen, die Ozeane sich erwärmen und der Meeresspiegel ansteigt. Das Jahr 2016 war das wärmste Jahr seit Beginn der Wetteraufzeichnungen. (World Meteorological Organization 2019)

Methan steht nach CO_2 an zweiter Stelle der Menge an Treibhausgasen in der Atmosphäre, aber hat einen 21-25-fach höheren Einfluss auf den Treibhauseffekt. Methan wird bei anaerober Zersetzung organischer Materialien in der Natur gebildet. Natürliche Quellen sind beispielsweise Seen, Lauffeuer und Termiten. Zu den anthropogenen Quellen gehören Mülldeponien, Reisplantagen und vor allem die Nutztierhaltung. Insgesamt 53% des Methanausstoßes stammen aus der Landwirtschaft. Davon wiederum über die Hälfte aus der enterischen Gärung bei der Verdauung von Nutztieren. (Yusuf et al. 2012)

Vor diesem Hintergrund ist es neben alternativen Futtermitteln auch sinnvoll, den Fleischkonsum in der Humanernährung zu reduzieren. Die Nachfrage nach alternativen, veganen Proteinquellen steigt dank eines stärkeren Bewusstseins für den Klimawandel und die damit verbundenen Folgen, stetig. Hierbei dienen oft die verschiedenen Hülsenfrüchte, aber auch Weizenprotein als Basis für Lebensmittel. Doch sowohl Soja als auch Gluten könnten aufgrund ihres allergenen Potentials kritisch gesehen werden. Als weitere Alternative können Pilze, vor allem diejenigen der Abteilung Basidiomycota, dienen, welche schnell Biomasse aufbauen, hochwertige Proteine bilden und bei denen ein geringes allergenes Potential nachgewiesen wurde. Ein Vorteil der Pilze ist außerdem, dass diese ebenfalls in der Lage sind, unterschiedliche Seitenströme der Lebensmittelindustrie, wie beispielsweise Apfeltrester aus der Saftproduktion als Wachstumssubstrat zu nutzen. (Ahlborn et al. 2019)

1.2 Organische Nebenströme der Lebensmittelindustrie

Lignocellulosehaltige Biomasse ist der auf der Welt am meisten vorkommende, nachwachsende Rohstoff, welcher aus CO₂, Wasser und Sonnenlicht durch die Photosynthese der Pflanzen gebildet wird und sich aus den Zuckern, Polyphenolen und Proteinen der Pflanzenzellwände zusammensetzt. (Sánchez 2009) Die Energie, die so auf der Erde in Form von Kohlenstoff gespeichert wird ist zehn Mal höher als die weltweit benötigte Menge. (Kumar et al. 2008)

Die lignocellulosehaltige Biomasse wird in drei Kategorien unterteilt, die Nebenstrom-Biomasse, unbehandelte Biomasse und energieliefernde Pflanzen, welche nur zu dem Zweck der Energieproduktion angebaut werden und so in einem direkten Wettbewerb um die Fläche zur Lebensmittelproduktion stehen. (Yousuf 2012) Die unbehandelte Biomasse umfasst Bäume und Pflanzen in der Natur; zu den Nebenströmen zählen die Abfälle der Agrar- und Lebensmittelindustrie. (Yousuf et al. 2020) Ein Großteil der pflanzlichen Nebenströme wird aktuell verworfen beziehungsweise ohne Recycling entsorgt. (Sánchez 2009)

Die Biomasse setzt sich aus den Kohlenhydraten Cellulose und Hemicellulose und aus einem Ligningerüst zusammen. Die Cellulosefibrillen bilden bei diesem Polymer kristalline Strukturen mit amorphen Abschnitten, die von Hemicellulose und dem Ligningerüst umgeben sind. (Sánchez 2009) Cellulose setzt sich aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch gebundenen Glucopyranoseeinheiten zusammen. In Pflanzen liegt sie in parallelen Mikrofibrillen vor, welche eine kristalline Struktur ausbilden können und sich so durch eine hohe Stabilität auszeichnen. (Béguin und Aubert 1994) Hemicellulosen sind heterogene, verzweigt-kettige Polymermoleküle, die die Cellulose in Pflanzenzellen umgeben und aus Pentosen, Hexosen und Uronsäuren bestehen, die hauptsächlich β -(1 \rightarrow 4)- oder β -(1 \rightarrow 3)-glykosidisch verknüpft sind. (Sánchez 2009)

Lignin stellt neben Cellulose das wichtigste Biopolymer dar; es wird bei der Verholzung von Pflanzen in die Zwischenräume der Zellmembranen eingelagert und sorgt so für Druckfestigkeit und Stabilität. (Kirk und Farrell 1987) Vorherrschende Strukturelemente des Lignins sind die Phenylpropanoide Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol (siehe Abbildung 1), welche über unterschiedlichste C-O (Ether-) beziehungsweise C-C-Bindungen verknüpft sind. (Asina et al. 2017)

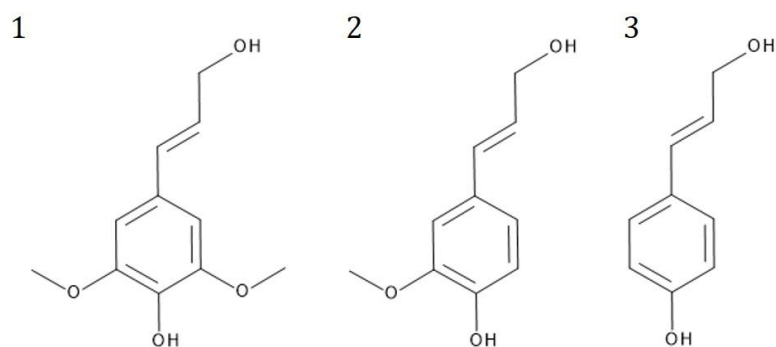


Abbildung 1: Strukturformeln der Phenylpropanoide: 1: Sinapylalkohol; 2 Coniferylalkohol; 3 Cumarylalkohol.

Mithilfe geeigneter Vorbehandlungsmethoden ist es möglich, Lignin abzubauen, sodass die lignocellulosehaltige Biomasse zur Gewinnung von Bioethanol genutzt werden kann. (Sindhu et al. 2016) Doch die Zusammensetzung der Verknüpfungen im Lignin variieren stark, sodass die Methoden je nach Herkunft der Biomasse optimiert werden müssen. (Gao et al. 2022) Die Individualität der Substrate stellt die Industrie auch vor wirtschaftliche Herausforderungen hinsichtlich der Transportkosten und gegebenenfalls Trocknungsmethoden beziehungsweise Lagerbedingungen. (Gil 2021)

Eine weitere Methode zum Recycling der pflanzlichen Seitenströme, wie vor allem Biertreber, ist der Einsatz als Futtermittel in der Nutztierhaltung (Xiros und Christakopoulos 2012) oder zur Produktion von Insekten für die Lebensmittelindustrie. Der Mehlwurm (*Tenebrio molitor*), welcher als alternative Proteinquelle in der Humanernährung eine immer größere Rolle spielt, wurde bereits mit Biertreber und Seitenströmen der Brotindustrie als Futtersubstrat gezüchtet. (Mancini et al. 2022) Auch die Larven des Glänzendschwarzen Getreideschimmelkäfer (*Alphitobius diaperinus*), welche zukünftig ebenfalls als Proteinquelle für die menschliche Ernährung dienen könnten, wurden auf unterschiedlichen pflanzlichen Seitenströmen wie Biertreber, Reiskleie und Rapssamen-Mehl gezüchtet. (Gianotten et al. 2020)

Sowohl die Lebensmittelindustrie als auch die Wissenschaft haben Interesse daran gewonnen, verschiedenste pflanzliche Nebenströme mit wertvollen Inhaltsstoffen als Lebensmittel beziehungsweise Zutat zu recyceln. (Schieber 2017)

Verschiedene Forschungsansätze, die sich mit dem Recycling von Seitenströmen der Lebensmittelindustrie beschäftigen, versuchen einzelne gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe zu extrahieren, um diese dann im großen Maßstab zu produzieren und in Lebensmitteln anzuwenden. Ein Beispiel hierfür sind Polyphenole aus den unterschiedlichsten Früchten wie dem Granatapfel. (Kumar et al. 2022) Auch aus dem Presskuchen der schwarzen Johannisbeere können mithilfe von Enzymen Inhaltsstoffe wie Anthocyane gewonnen werden, welche anschließend in *Functional Foods* oder Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt werden können. (Granato et al. 2022)

1.2.1 Nebenströme der Palmölindustrie

Weltweit wurden von 2020 bis 2021 73,08 Millionen Tonnen Palmöl produziert. (United States Department of Agriculture (USDA) 2022) Die Ölpalme (*Elaeis guineensis*) ist aufgrund ihrer hohen Erträge die meistgenutzte ölproduzierende Pflanze. (Basiron 2007) Der Palmölproduktion entstammen verschiedene Nebenströme und organische Biomasse, wie Stämme, Palmwedel, leere Fruchtstände (engl.: *empty fruit bunches* (EFB)), Palmkerne, und Fasern. Allein in Malaysia wurden 2019 5,9 Mio. ha Land für den Palmölanbau genutzt. Hierbei wurden 17,19 t Fruchtstände pro Hektar produziert (Parveez et al. 2021), woraus sich insgesamt 101,4 Mio. t ergeben, von denen ein Drittel der Biomasse den EFB entspricht (Adu et al. 2022). Aus den Palmkernen wird im Anschluss an die Extraktion des Palmöls das Palmkernöl extrahiert.

Die Verbrennung der pflanzlichen Nebenströme als Energiequelle kann durchaus als hilfreich angesehen werden, da Länder wie Malaysia und Indonesien auf diese Weise weniger von fossilen Energiequellen abhängig sind und einige Arbeitsplätze geschaffen werden. (Shuit et al. 2009) Allerdings ist langfristig ein Recycling beziehungsweise Upcycling der Nebenströme mit weniger CO₂-Ausstoß notwendig.

Die chemische Zusammensetzung der Biopolymere der EFB schwankt abhängig vom Alter und der Wachstumsphase der Palmen, der Bodenbeschaffenheit und der klimatischen Verhältnisse. (Hassan et al. 2013) Die leeren Fruchtstände bestehen zu großen Anteilen aus Lignocellulose.

Die EFB werden durchaus als Futtersubstrat für Nutztiere in Erwägung gezogen, doch aufgrund der widerstandsfähigen Struktur und des hohen Ligningehalts können Nutztiere, Mikroorganismen und Insekten die eingelagerte Cellulose und Hemicellulose nicht optimal als Energiequelle nutzen. Daher sind Vorbehandlungsmethoden vonnöten, die durch den Abbau von Lignin die Porosität erhöhen und damit die Bioverfügbarkeit der Nährstoffe steigern. (Mosier et al. 2005)

Denkbar hierfür sind physikalische Methoden, wie das Zerkleinern und Mahlen, physikalisch-chemische Methoden, mit heißem Wasser oder Wasserdampf, sowie chemische Methoden, mit saurer oder alkalischer Hydrolyse. (Magalhães et al. 2019) Eine weitere Möglichkeit der des Ligninabbaus wären biologische Verfahren wie Enzymbehandlungen und die Fermentation mit Pilzen zum Abbau von Lignin. (Kirk und Farrell 1987)

1.2.2 Biertreber

Der Bierabsatz betrug im Jahr 2020 in Deutschland über 87 Mio. hL. Die Produktion erreichte 2015 ein Maximum von über 95 Mio. hL und ist somit leicht rückläufig. Dennoch gehört Bier in Deutschland zu den meist verzehrten Getränken. (The Brewers of Europe 2021) Bei der Bierproduktion fallen unterschiedlichste Nebenströme an. Der Biertreber bildet davon mit 85 gew.-% mit Abstand den größten Anteil. (Mussatto und Roberto 2006)

Der erste Schritt beim Bierbrauen ist die Würzebereitung, welche im weiteren Prozess zur Fermentation genutzt wird. Hierfür wird das jeweilige Malz mit Wasser versetzt und von 37 °C auf 78 °C erhitzt, um durch die Aktivierung der unterschiedlichen Enzyme die im Malz enthaltene Stärke in die für die nachfolgende Fermentation benötigten Zucker zu zerlegen. Für die Fermentation eignen sich die Zucker Maltose und Maltotriose. Auch einzelne Proteine werden in Polypeptide beziehungsweise Aminosäuren zersetzt. (Mussatto 2014) Die festen Rückstände, welche nicht in die flüssige Würze übergehen, bleiben zurück und werden als Biertreber bezeichnet. (Mussatto und Roberto 2006) Wenn man alle beim Brauen anfallenden Seitenströme betrachtet, sollten auch Gersten-Stroh und -Wurzeln (je ein Drittel der Pflanze), Malz-Reste, Althefen, Filterrückstände, Bier und große Mengen Wasser nicht außer Acht gelassen werden. (Garcia-Garcia et al. 2019)

Biertreber findet aktuell vor allem als Futter von Nutztieren auf der jeweiligen Brauerei nahegelegenen Höfen Anwendung. (Xiros und Christakopoulos 2012) Da der Wassergehalt der Treber ca. 70-80% beträgt, ist es sinnvoll lediglich kurze Transportwege und die Verwendung innerhalb von zwei bis drei Tagen als Futtermittel zu wählen. (Jackowski et al. 2020) Jedoch übersteigt die Biertreberproduktion oft die Nachfrage der lokalen Landwirtschaft, wodurch dieser zu Teilen ungenutzt entsorgt wird. (Bianco et al. 2020) Eine weitere Anwendung von Biertreber, die in der Vergangenheit untersucht wurde, ist beispielsweise die Verwendung als Baumaterial. (Russ et al. 2005) Auch die Möglichkeiten der Biokonversion von Biertreber zu Bioethanol wurde untersucht, um dem Konflikt mit der Lebensmittelindustrie durch die Gewinnung von Bioethanol beispielsweise aus Mais entgegen zu wirken. (White et al. 2008) Biotechnologisch ist die Fermentation von Biertreber aufgrund seines hohen Nährstoffgehalts mithilfe unterschiedlicher Mikroorganismen zur Produktion von Enzymen wie Amylasen, Cellulasen und Hemicellulasen erforscht. (Hashemi et al. 2011; Xiros et al. 2008)

In unterschiedlichen Lebensmitteln wie Brot, Keksen, extrudierten Produkten (bspw. im Müsli), Snacks und Kräckern wurde Biertreber bereits als Lebensmittelzutat eingesetzt und die Anwendung unter Betrachtung verschiedener Aspekte, wie gesundheitsfördernder und sensorischer Eigenschaften untersucht. (Naibaho und Korzeniowska 2021) Jedoch ist der direkte Einsatz als Le-

bensmittelzutat durch den Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften, wie Textur und Geschmack, aber auch auf die mechanischen Eigenschaften des Produkts bis zu einem bestimmten Anteil des Getreideersatzes von ca. 20% begrenzt. (Żelaziński et al. 2017; Nascimento et al. 2017)

1.3 Pilze der Abteilung Basidiomycota

Pilze stellen eines der eukaryotischen Reiche dar. Von schätzungsweise 2,2 bis 3,8 Millionen Pilzen sind ca. 140.000 bekannt. Pilze sind ubiquitär und haben sich während der Evolution mehrfach unabhängig voneinander entwickelt. (Lücking et al. 2020) Pilze spielen eine wichtige Rolle als Zersetzer organischen Materials, für Nährstoffzyklen, in parasitären Gemeinschaften und in Gemeinschaften autotropher Organismen wie beispielsweise als Endophyten oder Flechten. Sie besitzen außerdem als Pflanzen- und Tierpathogene einen großen Einfluss in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie. (Lücking et al. 2020)

Pilze der Abteilung Basidiomycota R.T. MOORE (1980) bilden ein Phylum der Pilze mit 41.270 bekannten Arten. (He et al. 2022) Durch die Zersetzung der unterschiedlichsten organischen Materialien und ihre Anpassungsfähigkeit an die verschiedensten Substrate trägt eine große Vielfalt an Pilzen der Abteilung der Basidiomycota zum globalen Kohlenstoffzyklus und zum Erhalt der Ökosysteme, vor allem von Wäldern, bei. (Taylor et al. 2015)

Holzzersetzende Pilze der Abteilung Basidiomycota weisen unterschiedlichste kohlenhydrataktive Enzymsets auf, um die Materialien zu zersetzen. Sie lassen sich je nach Enzymportfolio in Weiß- und Braunfäulepilze unterscheiden, wovon ca. 90% Weißfäulepilze sind. (Rytioja et al. 2014) Weißfäulepilze bauen präferiert Lignin ab, manche auch die anderen Zellwandkomponenten Cellulose und Hemicellulosen und in beiden Fällen wirkt das fermentierte Holz weiß. Außerdem ist es meist feucht, weich und faserig. (Dashtban et al. 2010) Braunfäulepilze zersetzen bevorzugt die Kohlenhydrate Cellulose und Hemicellulosen, meist im Gymnospermen-Holz. (Taylor et al. 2015) Sie zersetzen das Holz zu brüchigen braunen ‚Cracks‘, die oft als würfelförmige Blöcke im Totholz erscheinen. (Dashtban et al. 2010) Sie können Lignin nicht zersetzen, es aber mit einem speziellen Mechanismus, der Fenton-Reaktion, modifizieren. (Arantes et al. 2012) Halliwell hat 1965 erstmals eine Reaktion von freien Radikalen aus der Fenton-Reaktion mit Cellulose nachgewiesen und stellte die Theorie auf, dass diese auch am Abbau beziehungsweise der Modifikation von lignocellulosehaltigen Materialien beteiligt sind. (Halliwell 1965)

Zu den Pilzen der Abteilung Basidiomycota gehören auch die meisten der bekannten Speise- und Medizinalpilze, von denen traditionell die vegetativen Fruchtkörper verzehrt werden. (Zhang et al. 2021) Als Lebensmittel sind Pilze aufgrund ihres Geschmacks, des hochwertigen Protein- und ihres Ballaststoffgehalts beliebt. Die Proteine zeichnen sich außerdem durch ihre hohe biologische Wertigkeit aus. (Valverde et al. 2015) Doch sind auch die enthaltenen Mikronährstoffe, wie Vitamin D₂, in einigen Pilzen in relevanten Mengen vorhanden. (Cardwell et al. 2018) Aufgrund

der Vielfalt ihrer positiven Gesundheitseffekte ist die Abgrenzung zwischen Medizin- und Speisepilz oft nicht eindeutig, wie beispielsweise beim Judasohr (*Auricularia auricula-judae*). (Liu et al. 2021)

Von den über 2.000 essbaren Pilzen sind nur wenige als Fruchtkörper kommerziell oder auch nur experimentell kultiviert worden. (Zhang et al. 2021) Durch ihre gute Anpassungsfähigkeit an die unterschiedlichsten organischen Substrate und ihren hohen Proteingehalt ist das Myzel der Pilze der Abteilung der Basidiomycota aktuell auch als alternative Proteinquelle nicht-tierischer Herkunft im Gespräch. (Ahlborn et al. 2019; Berger et al. 2022) Die Pilze werden hierfür im Bioreaktor unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und anschließend geerntet. Aus den Myzelien können dann Proteinisolate gewonnen werden. (Ahlborn et al. 2019) Die Myzelien gelten allerdings als *Novel Food* oder neuartiges Lebensmittel, was bedeutet, dass sie einen aufwendigen Zulassungsprozess durchlaufen müssen. *Novel Foods* sind definiert als Lebensmittel, die vor Inkrafttreten der ersten Novel-Food-Verordnung am 15. Mai 1997 innerhalb der EU nicht in einem nennenswerten Umfang zum Verzehr vermarktet wurden. (Europäisches Parlament und der Rat 25.11.2015) In der Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 der Kommission vom 20. Dezember 2017 ist ein Myzelauszug des Shiitake-Pilzes als *Novel Food* gelistet. (Europäische Kommission 20.12.2017) Außerdem sind das dehydrierte Mycel von *P. ostreatus* und *P. eryngii* auf der Liste der als *Novel Food* geltenden Lebensmittel vom 29. Oktober 2019 aufgeführt. Die Biomasse von *Paecilomyces variotii* ist seit dem 2. September 2022 als *Novel Food* gelistet. Auch weitere Schimmelpilze sind in der Liste genannt.

1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Upcycling von Seitenströmen der Lebensmittelindustrie für den Einsatz als Futter- beziehungsweise Lebensmittel. Hierzu sollten Pilze der Abteilung Basidiomycota genutzt werden, um die pflanzlichen Seitenströme zu recyceln und aufzuwerten. Im ersten Teil der Arbeit sollten EFB der Palmölproduktion mittels Festbettfermentation durch die Pilze fermentiert werden. Hierbei war das Ziel, ein Fermentat als Futtersubstrat für die Larven der Schwarzen Soldatenfliege zu entwickeln. Es wurde ein Fokus auf den Ligninabbau im Substrat gelegt. Außerdem wurde das PKM, was ebenfalls bei der Palmölproduktion anfällt, für die Medienoptimierung hinsichtlich Pilzwachstum und Proteingehalt evaluiert.

Die Substrate wurden nicht nur auf ihre Zusammensetzung, das Pilzwachstums und den Ligningehalt analysiert, sondern auch im Rahmen eines Kooperationsprojektes an die Larven verfüttert, um eine Präferenz der BSFL für einen der Pilze feststellen zu können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden weitere pflanzliche Seitenströme, wie Biertreber und Lupinenklarlauf aus der Proteinisolierung aus der Süßlupine, genutzt um mithilfe von Speisepilzen ein proteinreiches Produkt herzustellen, welches als veganes Lebensmittel, als Lebensmittelzutat oder als Proteinquelle genutzt werden könnte. Es sollte ein möglichst hoher Pilzgehalt während der Submersfermentation erzielt werden und auf diese Weise die Proteinqualität der Seitenströme durch den Metabolismus der Pilze gesteigert werden. Da es sich bei dem Biertreber um einen Seitenstrom aus Getreide handelt, ist in der Proteinfraction ein hoher Glutenanteil enthalten. Es sollte unter dem Gesichtspunkt der in der Gesellschaft immer relevanter werdenden Zöliakie der Einfluss der Pilze auf den Glutengehalt analysiert werden.

Für die spätere Verwendung eines Produkts in der Lebensmittelindustrie ist es außerdem von Vorteil, wenn es einen ansprechenden Geruch beziehungsweise Geschmack aufweist. Hierfür diene die Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Olfaktometrie. Bei interessanten Aromastoffen, welche in größeren Mengen von den Pilzen gebildet wurden, wäre eine Extraktion und Anwendung dieser als natürliche Aromastoffe in der Lebensmittelindustrie denkbar.

2. Experimenteller Teil

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit / Konzentration	Hersteller
Acetonitril	Mind. 99,9%, <i>gradient grade</i> für HPLC	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Agar-Agar	Kobe I, für Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Alkanreihe C7-C30	n/a	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
α -Lactalbumin	Rein; Referenzstandard	United States Pharmacopeia (USP), Rockville, Maryland, USA
Ameisensäure	99-100% z.A.	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Asparagin Monohydrat	$\geq 99\%$, Cellpure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Borsäure	Mind. 99,8%, p.a.	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
2-Butanon	$\geq 99,5\%$ für die Synthese	Carl Roth GmbH & Co. KG
Carvon	99	Acros <i>Organics</i> TM , Part of Thermo Fisher Scientific
Citronensäure	$\geq 99,5\%$; wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cyclohexan	$\geq 99,5\%$, extra pure	Acros <i>Organics</i> TM , Part of Thermo Fisher Scientific
2,4-Decadienal (<i>E,E</i> -)	95%	Thermo Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA
7-Dehydrocholesterol	$\geq 95,0\%$ für HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Diethylether	Keine Angaben	Interne Abfüllung
2,6-Dimethoxyphenol	$\geq 97\%$	Fluka TM Analytical (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheit / Konzentration	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	≥ 99% USP	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ergosterol	≥ 95%	Tokyo Chemical Industry (TCI), Tokio, Japan
Ethanol	99,5%	Otto E. Kober KG, Marburg, Deutsch- land
	96%	VWR International, Radnor, Penn- sylvania, USA
FAME-Mix (37 Component)	n/a	Supelco®, Bellefonte/PA, USA
Fischgelatine, flüssig	n/a	SERVA Electrophoresis GmbH, Hei- delberg, Deutschland
D(+)-Glucose	Wasserfrei, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
D(+)-Glucose Monohydrat	Für die Mikrobiologie	
Hefeextrakt	Für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
1-Hexanal	98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isooctan	For Gas Chromatog- raphy ECD & FID; Su- pra Solv	Supelco®
Isopropanol	≥ 99,8%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydroxid	≥ 85%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
L-Kaliumnatriumtartrat Tetra- hydrat	≥ 99% USP	Carl Roth GmbH & Co. KG
Katalysatortabletten für Kjeldahl	CT 5,3 g K ₂ SO ₄ : 5 g CuSO ₄ 5 H ₂ O: 0,15 g TiO ₂ : 0,15 g	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Linalool	97%	Acros <i>Organics</i> TM , Part of Thermo Fisher Scientific
<i>cis</i> -Linalooloxid	100%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Rennin- gen, Deutschland
Magnesiumsulfat-Monohydrat	≥ 97%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Malzextrakt	Für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheit / Konzentration	Hersteller
Mangan(II)-Sulfat Monohydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	≥ 99,9%, für die HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-Methylbutanal	Pur; z.A.	Tokyo Chemical Industry (TCI)
<i>n</i> -Hexan	Mind 95,0%, für die HPLC	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
N-Methyl-N-trimethylsilyltri-fluoracetamid (MSTFA)	100%	Fluorochem Ltd, Hadfield, Derbyshire, UK
<i>n</i> -Pentan	n/a	Eigene Abfüllung
Natrium-L-Ascorbat	≥ 99,0%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	≥ 99,5% p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	≥ 98% Ph. Eur., USP	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdisulfit	≥ 97%	Acros <i>Organics</i> TM , Part of Thermo Fisher Scientific
Natriumhydrolysat-Puffer A	0,12 N; pH 3,45	SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Natriumhydrolysat-Puffer B	0,20 N; pH 10,85	SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH
Natriumhydroxid, Plätzchen	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumsulfat	≥ 99%; wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natronlauge	32-33% z.a.	Th. Geyer GmbH & Co. KG
<i>trans</i> -Nerolidol	100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ninhydrin Reagenz mit Reduziermittel	0,1 M in Methanol	SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH
2,4-Nonadienal (<i>E,E</i> -)	89%; pur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-Octenal (<i>E</i> -)	94%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1-Octen-3-on	96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1-Pentanol	98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phenol	p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure	85%, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salpetersäure	65%, Suprapur [®]	Supelco [®]
Salzsäure	0,1 M Maßlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG
	37%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Schwefelsäure	98%, p.a.	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Tetrahydrofuran (THF)	Rotipuran [®]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiodiglycol	≥ 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	≥ 99,5%	Thermo Fisher Scientific
L-Tryptophan	reinst	AppliChem GmbH

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Chemikalie	Reinheit / Konzentration	Hersteller
Vanillin	100%	Fluka™ Analytical
Wasserstoffperoxid	30%	Acros <i>Organics</i> ™, Part of Thermo Fisher Scientific
<i>trans</i> -Zimtaldehyd	99%	Acros <i>Organics</i> ™, Part of Thermo Fisher Scientific
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	z. A.	AppliChem Gmb

Das verwendete Kit ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendetes Kit.

Kit	Verwendung	Hersteller
RIDASCREEN® Gliadin competitive R7021	Bestimmung des Glutengehalts	R-Biopharm AG, Pfungstadt, Deutschland

2.1.2 Geräte

Die in der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Aminosäureanalysator	S433; S7130 Amino Acid Reagent Organizer, S5200 Sample Injector, S4300 Amino Acid Reaction Module, S2100 Solvent Delivery System	Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Analysenwaagen	Pioneer Semi-Micro PX85	OHAUS Europe GmbH, Nännikon, Schweiz
	ABT 320-4NM	Kern & Sohn GmbH, Ballingen, Deutschland
	BP 211D	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Autoklaven	Tuttnauer 5075ELV	Biomedis Laborservice GmbH, Gießen, Deutschland
	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik AG, Satulle, Deutschland
	Laboklav 25 B	
Brutschrank	IPP 5000	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Gerät	Modell	Hersteller
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25	JANKE & KUNKEL IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
GC-FID	7890A GC System mit 7683B Series Injector	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
GC-MS	7890A GC-System mit 5975C VL MSD; Triple-Axis Detector; MultiPurpose Sampler	Agilent Technologies, Inc.; GERSTEL GmbH & Co. KG, Mülheim a. d. Ruhr, Deutsch- land
GC-MS/MS-O	8890 GC System, 7010B GC/QT; MultiPurpose Sampler	Agilent Technologies, Inc. GERSTEL GmbH & Co. KG,
GC-MS/MS-O	7890B GC System, 5977B MSD; MultiPurpose Sampler	Agilent Technologies, Inc.; GERSTEL GmbH & Co. KG,
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LSCbasic;	Martin Christ Gefriertrock- nungsanlagen GmbH, Oste- rode am Harz, Deutschland
	Alpha 1-2 LDplus	
Hochleistungsflüssig-chroma- tographie-System	Communications Bus Module; CBM-20A Degassing Unit; DGU-20A5R Prominence Liquid Chroma- tograph; LC-20AD Prominence Autosampler SIL-20AC HT Prominence Column Oven CTO-20AC Prominence Diode Array De- tector SPD-M20A	Shimadzu, Kyoto, Japan
ICP-OES	720 ES	Varian Inc.; Agilent Technolo- gies Inc., Palo Alto, USA
Infrarot-Feuchtebestimmer	MA35M-230N	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Inkubator	KT 115 E6	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kjeldahl Aufschlussblock	behrotest® InKjel	Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Absaugapparatur	behrosog 3 Neutralizer	
Wasserdampfdestillation mit	Distillation unit S5	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Titratoren	mit Titratoren TitroLine® 5000	

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Gerät	Modell	Hersteller
Kreisschüttler	Vortex 2;	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
	IKA® KS 130 basic	
Laborheizplatten	Laborheizer mit 6 Heizplatten und Sandbädern	Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Deutschland
Magnetrührplatte	IP68	Thermo Fisher scientific GmbH, Waltham, USA
Mikroplatten-Photometer	EPOCH2;	BioTek Instruments GmbH (heute: Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
	Eon Microtec Spectrophotometer	
Muffelofen	L15/11/B510 mit Controller B180	Nabertherm GmbH, Lilienthal, Deutschland
Multipipette	Research® Pro 100/1200	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	RAININ Pipet-Lite XLS	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Orbitalschüttler	MAXQ8000	Thermo Fisher scientific GmbH
	Infors HT Orbitron	Infors AG, Bottmingen, Deutschland
Organische Elementaranalyse	Thermo FlashEA; 1112 Series	Thermo Fisher scientific
pH-Meter	765 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
	Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH
Photometer	Schott UviLine 9400	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
	Spekord 50	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Reinstwasseranlage	Arium pro	Sartorius AG
Rotationsverdampfer mit Vakuumpumpe	Rotavapor® R-300 V-300	BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Rotator	L099	Kisker biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Fettextraktionsapparatur	Soxtherm	Gerhardt Analytical Systems
Schwingmühle	MM 200; MM 400 mit Kugelgröße	RETSCH GmbH, Haan, Deutschland
Sterilwerkbank	MSC-Advantage; Safe 2020; HeraSafe KS 18	Thermo Fisher scientific GmbH
Thermomix®	TM6	Vorwerk SE & Co. KG, Wuppertal, Deutschland

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Gerät	Modell	Hersteller
Twister® Conditioner & Controller	TC 2; C200	GERSTEL GmbH & Co. KG
Umlaufkühler	minichiller	Peter Huber Kältemaschinenbau AG, Offenburg
Ultraschallbad	Emmi®-100HC	EMAG AG, Mörfelden-Walldorf
Vakuumpumpe	RZ6	VACUUBRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Waage	PFB 6000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
	Atilon AccuLab	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	ISOTEMP 205	Thermo Fisher scientific GmbH
Zentrifugen	4-16 KS	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
	ROTINA 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
	Allegra X-I5R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	Microfuge 33R	
	Microfuge 22 R	

2.1.3 Software

Die in dieser Arbeit zum Aufnehmen und Auswerten der Daten verwendete Software sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Software der Thesis.

Anwendung	Software
Analytik der Aminosäurezusammensetzung	Chromstar 7.14; SCPA GmbH; Weyhe-Leeste
Auswertung der Kalibrierung dritten Grades	Origin 2020; OriginLab Corporation
Fettextraktion mittels Soxtherm	Soxtherm Manager SXPC; C. Gerhard GmbH & Co. KG
Gaschromatographische Analysen	MassHunter GC/MS Acquisition B 10.0.384.1; Agilent Technologies Inc.
GC Autosampler-Steuerung	Maestro 1 Version 1.5.3.81/3.5; Gerstel GmbH & Co. KG
Datenauswertung	MassHunter <i>Workstation Qualitativ Analysis</i> B 10.0.10305.0; Agilent Technologies Inc.
Datenbankabgleich	NIST <i>Mass Spectral Search</i> 2.2; FairCom Corporation; USA
Datenbank	NIST <i>Mass Spectral Library Version</i> 2.2; 2014; FairCom Corporation

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Anwendung	Software
Sprachsoftware	ODP-Recorder 3.2.0.2; Gerstel
ODP-Datenauswertung	Data Viewer 1.0.2.8; Gerstel
HPLC-Analytik	Lab Solutions 2008-2017; Shimadzu
Messung von Enzymaktivitäten am <i>Plate Reader</i>	BioTek Gen5 All-In-One; Microplate Reader Software Version 2.09; Agilent Technologies
Photometrische Messungen	Win ASPECT Version 2.3.1.0; Analytik Jena AG 1998-2002

2.1.4 Organismen

Die in der Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Pilze wurden entweder von ehemaligen Mitarbeitenden des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie (LCB) der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) isoliert (Florian Prell (FPR) und Falk Amelung (FAM)), über eines der gelisteten Institute bezogen: *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (CBS) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), oder bei einem der Produzenten erworben.

Tabelle 5: Verwendete Pilze der Abteilung Basidiomycota.

Stamm	Trivialname	Abkürzung	Interne Stamm-Nr.	Herkunft	Stamm-Nr.
<i>Agaricus arvensis</i>	Weißer Wiesenchampignon	AARV	164	CBS	583.76
<i>Bjerkandera adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	BAD	12	DSMZ	4708
<i>Coprinus comatus</i>	Schopf-Tintling	CCO-FP	332	FPR	FP91
<i>Cyclocybe aegerita</i>	Südlicher Ackerling	CAE	166	Fa. Sylvan inc., America	4022
<i>Flammulina velutipes</i>	Gemeiner Samtfußröbling	FVE-D	160	DSMZ	1658
<i>Grifola frondosa</i>	Gemeiner Klaperschwamm	-	520	Mycelia, Deinze, BE	-
<i>Hericium erinaceus</i>	Igel-Stachelbart	HER	103	InterMed Discovery GmbH, Dortmund	FU 70034
<i>Hypholoma capnoides</i>	Graublättriger Schwefelkopf	HCA	59	DSMZ	3715
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	Buchenrasling	HTE	161	DSMZ	23610
<i>Irpex consors</i>	-	ICO	111	DSMZ	7382
<i>Irpex lacteus</i>	-	ILA	500	CBS	431.48
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Gemeines Stockschwämmchen	KUM	60	DSMZ	1013
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	LED	16	CBS	389.89

Tabelle 5 (Fortsetzung).

Stamm	Trivialname	Abkürzung	Interne Stamm-Nr.	Herkunft	Stamm-Nr.
<i>Lepista nuda</i>	Violetter Rötlerling	LNU	170	DSMZ	3347
<i>Marasmius palmivorus</i> (<i>Marasmiellus palmivorus</i>)	-	MCO	40	DSMZ	8257
<i>Macrolepiota procera</i>	Gemeiner Riesenschirmling	MPR	202	FAM	-
<i>Pholiota nameko</i>	Japanisches Stockschwämmchen	PNA	113	DSMZ	6908
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Zitronengelber Seitling	PCI	114	DSMZ	5341
<i>Pleurotus eryngii</i>	Brauner Kräutlerseitling	PER	100	DSMZ	8264
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austernseitling	POS	13	DSMZ	1020
<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	Rosen-Seitling	PSS	177	Göttingen	Gö 104
<i>Psathyrella candolleana</i>	Behangener Mürbling	PCA-FP	310	FPR	FP80
<i>Rhizopus oligosporus</i>	-	ROL	406	Brasilien (E. Morales)	-
<i>Sparassis crispa</i>	Krause Glucke	SCR-FP	252	FPR	FP32
<i>Strobilurus esculentus</i>	Fichten-Zapfenrübbling	SES-FP	342	FPR	FP110
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Riesen-Träuschling	SRU	345	Mycelia, Deinze, BE	M 5012

2.1.5 Substrate

Die EFB und das PKM wurden vom Projektpartner *Alternative Protein Indonesia* (API) zur Verfügung gestellt. Die EFB kamen in großen Büscheln an, die homogenisiert werden mussten. Das PKM war bereits zerkleinert. Die trockenen Substrate wurden bei Raumtemperatur in Kunststoff-Fässern gelagert.

Zu Beginn der Arbeiten wurden die EFB mittels Retsch-Mühle auf eine Partikelgröße von ca. 1 mm mit dem dafür geeigneten Sieb homogenisiert. Die Substrate wurden in diesem Zustand für die nachfolgenden Fermentationen eingesetzt. Um die Analytik auf die unterschiedlichen Nährstoffe der Substrate durchzuführen, wurden sie mittels Kugelmühle und den dazugehörigen Kugeln mit 7 mm Durchmesser für 5 min bei 30 hz gemahlen, sodass ein homogenes Pulver entstand.

Die Treber von Weizen-, Schwarz- und Pilsener Bier wurden von der Störtebeker Braumanufaktur GmbH zur Verfügung gestellt. Die Treber wurden im Thermomix® homogenisiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Trockenmasse der Biertreber betrug ca. 20%, für die Medien wurde dieser feucht eingesetzt.

Der Lupinenklarlauf 1 wurde von der Firma PROLupin geliefert, gefroren bei -20 °C gelagert und vor der Verwendung durch Schütteln homogenisiert. Der Trockenmassegehalt des Lupinenklarlaufs 1 betrug 2,8 g L⁻¹. Auch die Lupinenfasern wurden von der Firma PROLupin zur Verfügung gestellt. Diese wurden bis zur Verwendung in den Medien ebenfalls bei -20 °C gelagert. Aufgrund ihrer Homogenität wurde keine weitere Zerkleinerung oder Homogenisierung durchgeführt.

2.2 Kultivierung von Pilzen

Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Alle im Folgenden beschriebenen Medien wurden vor der Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Kulturführung fand, sofern nicht anders beschrieben, unter Lichtausschluss bei 24 °C statt. Submerskulturen wurden bei 150 rpm geschüttelt.

2.2.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung der verwendeten Pilze der Abteilung Basidiomycota erfolgte in Emerskulturen auf Malzextrakt-Agar-Platten (MEA; 20 g L⁻¹ Malzextrakt und 15 g L⁻¹ Agar-Agar in vollentsalztem Wasser). Es wurden jeweils 0,25 cm² frisches Myzel aus einer zu 80% bewachsenen Agarplatte ausgestochen und auf eine neue Platte transferiert. Dieser Vorgang wurde jeweils bei einem Bewuchs von 80% der Agarplatten wiederholt.

2.2.2 Vorkulturführung

Die Vorkulturen wurden in Malzextraktmedium angesetzt. Als Medium diente 20 g L⁻¹ Malzextrakt (ME), wenn nicht anders beschrieben, in VE-Wasser. Die Pilze wurden in Erlenmeyerkolben kultiviert, welche zu 40% ihres Volumens mit flüssigem Medium gefüllt wurden. Es wurden 0,25 cm² frisches Myzel einer zu 80% bewachsenen Agarplatte ausgestochen, in das Medium überführt und mittels Ultra-Turrax Dispergiergerät bei 10.000 U min⁻¹ für 30 s homogenisiert. Die Vorkultur wurde, wenn nicht anders beschrieben, für sieben Tage kultiviert.

2.2.3 Hauptkulturführung auf Palmölseitenströmen

2.2.3.1 Emerskultivierung auf Palmölseitenströmen

Für die Festbettkultivierung auf EFB und PKM wurde das Substrat auf 65% Feuchte eingestellt, sterilisiert und mit 10 wt.-% (bspw. 1 mL auf 10 g EFB) mittels Ultra-Turrax (10000 U s^{-1} und 30 s) homogener Vorkultur beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Lichtausschluss.

2.2.3.2 Emerskultivierung zur Ergosterolbestimmung

Bei dem in Emerskulturen gewachsenen Pilzmyzel handelt es sich um das Hyphen-Geflecht, welches wegen seiner abweichenden Beschaffenheit als Vergleich für die Festbettfermentationen analysiert wurde. Für die Bestimmung der Ergosterolgehalte der Emerskulturen wurden sterile, permeable Cellophanfolien auf MEA-Platten ausgelegt und die Platten anschließend mit den Pilzen *B. adusta*, *I. consors* und *M. palmivorus* beimpft. Nach einer Woche waren die Agarplatten vollständig bewachsen. Das Myzel wurde von je zehn Agarplatten mithilfe eines Spatels geerntet und als biologische Doppelbestimmung gehandhabt, von der zusätzlich technische Duplikate analysiert wurden.

2.2.3.3 *Upscaling* der Emerskultivierung






Es wurden 25 g EFB (65% Feuchtegehalt) mit einem $0,25 \text{ cm}^2$ der bewachsenen Agarplatte beimpft und für zwei Wochen inkubiert. Von dieser emersen Vorkultur wurden 10 g verwendet, um 285 g EFB-Medium (100 g Trockenmasse) zu beimpfen. Die Kultivierung erfolgte in Metall-Containern (GN 1/6, rostfreier Stahl, $176 \times 162 \times 65 \text{ mm}$). Die Kulturen wurden jeden zweiten Tag unter sterilen Bedingungen für 30 min belüftet und mit einem sterilen Spatel durchmischt. Nach zwei Wochen wurden die Hauptkulturen geerntet.

2.2.4 Hauptkulturführung in Medien aus Biertreber und Lupinenseitenströmen

2.2.4.1 Screening auf unterschiedlichen Agarmedien

Die Medienzusammensetzung für das Screening auf Agarplatten ist in Tabelle 6 mit den jeweiligen Fotos gezeigt. Es wurden jeweils $0,25 \text{ cm}^2$ frisches Myzel aus einer zu 80% bewachsenen Agarplatte der Stammhaltung ausgestochen und umgesetzt. Die Pilze wurden parallel zu den fünf Medien ebenfalls auf dem Standardmedium aus Malzextrakt-Agarplatten geführt, um einen Vergleich für das Wachstum und den Geruchseindruck der Pilze auf einem Standardmedium zu erhalten.

Tabelle 6: Für das Emers-Screening verwendete Agar-Medien.

Pilsener-Treber-Agar	Weizenbier-treber-Agar	Schwarzbier-treber-Agar	Lupinen-Agar	Lupinen-Pilse-ner-Agar
				
15 g·L ⁻¹ Agar-Agar	15 g·L ⁻¹ Agar-Agar	15 g·L ⁻¹ Agar-Agar	15 g·L ⁻¹ Agar-Agar	15 g·L ⁻¹ Agar-Agar
175 g·L ⁻¹ Biertreber	175 g·L ⁻¹ Biertreber	175 g·L ⁻¹ Biertreber	-	87,5 g·L ⁻¹ Biertreber
-	-	-	233 g·L ⁻¹ Lupi-nen-faser	116 g·L ⁻¹ Lupi-nen-faser
VE-Wasser <i>ad</i> 1 L	VE-Wasser <i>ad</i> 1 L	VE-Wasser <i>ad</i> 1 L	Lupinen-klarlauf 1 <i>ad</i> 1 L	Lupinen-klarlauf 1 <i>ad</i> 1 L

2.2.4.2 Hauptkulturführung in Submersmedien mit Biertreber und Lupinenseitenströmen

Die Submersmedien wurden mit 20 g L⁻¹ Trockenmasse der Substrate angesetzt. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Medien für das Submersscreening ist in Tabelle 7 gezeigt. Das Biertrebermedium wurde mit VE-Wasser angesetzt, auch hier wurde der Wassergehalt des Biertreibers abgezogen und es wurden für einen Liter Medium 920 mL VE-Wasser verwendet.

Tabelle 7: Medienzusammensetzung für das Submersscreening mit 20 g L⁻¹ Trockenmasse.

	Biertreber [g L⁻¹]	Lupinenfaser [g L⁻¹]	Lupinenklarlauf 1 [mL]
Biertreber-medium	100	-	-
Lupinen-Weizen-biertreber-Medium	60	70	933

Die für die Kultivierung verwendeten Erlenmeyerkolben wurden zu 40 vol.-% mit flüssigen Medien gefüllt und anschließend sterilisiert (20 min, 121 °C). Die Vorkulturen wurden nach der jeweiligen Kultivierungsdauer mittels Ultra-Turrax-Dispergiergerät homogenisiert (30 s, 10.000 rpm) und anschließend zwei Mal mit sterilisiertem Wasser, je nach Pilz mit VE- oder Trinkwasser, gewaschen. Hierfür wurden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt, um das

Medium abzuzentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das Wasser zu dem Pellet gegeben; dieser Vorgang der Zentrifugation bei 4.310 g , für 10 min wurde zwei Mal wiederholt. Die Hauptkulturmedien wurden im Anschluss mit 10 vol.-% der gewaschenen Vorkultur beimpft.

2.2.4.3 Optimierung der Hauptkulturmedien

Den Medien, welche zur Optimierung des Pilzwachstums verwendet wurden, wurde zu Beginn der Kultivierung weniger Biertreber zugesetzt; im Laufe der Kultivierung wurde an unterschiedlichen Kulturtagen bestimmte Mengen an Biertreber hinzugefügt. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der *Fed-Batch*-Medien (FB 1 bis FB 4) bestehend aus Weizenbiertreber und Lupinenklarlauf 1, in denen *P. eryngii* für sieben Tage gezüchtet wurde.

Tabelle 8: Zusammensetzung der *Fed-Batch*-Medien für *P. eryngii* aus Weizenbiertreber und Lupinenklarlauf 1.

Kulturtag	FB 1	FB 2	FB 3	FB 4
0	10 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	10 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	5 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	5 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber
2	10 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	-	5 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	-
4	-	10 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	5 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	5 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber
Summe	20 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	20 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	15 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber	10 g TM L ⁻¹ Weizenbiertreber

Die *Fed-Batch*-Medien FB 5 bis FB 8 (Tabelle 9) wurden mit VE-Wasser und Weizenbiertreber für die Kultivierung von *P. eryngii*, ebenfalls für sieben Tage verwendet.

Tabelle 9: Zusammensetzung der *Fed-Batch* Medien aus Biertreber und VE-Wasser.

Kulturtag	FB 5	FB 6	FB 7	FB 8
0	5 g TM L ⁻¹ Biertreber	5 g TM L ⁻¹ Biertreber	5 g TM L ⁻¹ Biertreber	5 g TM L ⁻¹ Biertreber
2	5 g TM L ⁻¹ Biertreber	-	-	-
3	-	5 g TM L ⁻¹ Biertreber	-	-
4	-	-	5 g TM L ⁻¹ Biertreber	-
5	-	-	-	5 g TM L ⁻¹ Biertreber
Summe	10 g TM L ⁻¹ Biertreber	10 g TM L ⁻¹ Biertreber	10 g TM L ⁻¹ Biertreber	10 g TM L ⁻¹ Biertreber

Der Pilz *P. eryngii* wurde ebenfalls in Medien mit Mangansulfat als Supplement kultiviert. Hierfür wurden 10 g L^{-1} Weizenbiertreber genutzt, $1 \text{ g L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ hinzugefügt und die Medien im Anschluss autoklaviert.

2.2.5 Ernte des Myzels aus Submerskulturen

Nach Ende der jeweiligen Kultivierungsdauer wurde der Inhalt der Erlenmeyerkolben in ausgewogene Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4.310 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugenröhrchen erneut gewogen um die Biofeuchtmasse zu bestimmen. Anschließend wurden die Fermentate gefriergetrocknet. Die Zentrifugenröhrchen wurden erneut gewogen, um die Biotrockenmasse zu ermitteln. Für die weiteren Analysen wurden die Myzelien in Biertrebermedien mittels RETSCH-Kugelmühle (5 min ; 30 s^{-1}) gemahlen und zu Pulver weiterverarbeitet. Die Myzelien aus ME-Medium wurden gemörsert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurde das gefriergetrocknete Myzel im zuvor leer gewogenen Zentrifugenröhrchen ausgewogen und die Masse durch Differenzbildung bestimmt.

2.3.2 Feuchtebestimmung

Die Bestimmung der Restfeuchte des gefriergetrockneten Pilzmyzels beziehungsweise der Substrate erfolgte, sofern genug Material vorhanden war, in Doppelbestimmung mittels Infrarot-Feuchtemessgerät der Firma Sartorius nach Herstellerangaben. Für die Analytik wurde die Restfeuchte der jeweiligen Probe von der Einwaage gemäß Gleichung (1) subtrahiert. Die nachfolgenden Ergebnisse sind, wenn nicht anders beschrieben, auf die Trockenmasse der Proben bezogen.

$$E = P - \left(\frac{RF}{100} \right) \cdot P \quad (1)$$

Mit: E : Einwaage korrigiert um die Restfeuchte [g]

P : Probeneinwaage [g]

RF : Restfeuchte [%]

100: Umrechnungsfaktor von %

2.3.3 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse von Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff wurde in einer Dreifachbestimmung pro Probe mit dem Thermo FlashEA – 1112 Series durchgeführt.

2.3.4 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Für die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wurde die Probe mit 25 mL konzentrierter Schwefelsäure (98%) unter Zusatz eines Katalysatorgemischs aus Kupfer- und Kaliumsulfat oxidativ aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte nach dem Heizprogramm in Tabelle 10.

Tabelle 10: Heizprogramm des Kjeldahlaufschlusses.

Heizleistung [%]	100	0	100	0	100	0	85
Dauer [min]	5	5	5	5	5	8	90

Nach vollständigem Aufschluss (Grünfärbung der Proben) wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt, bei der 32%ige Natronlauge zur aufgeschlossenen Probe gegeben wurde. Der freigesetzte Ammoniak wurde in eine 2%ige (*w/v*) borsäurehaltige Vorlage übergetrieben. Die titrimetrische Bestimmung des Stickstoffgehaltes erfolgte mit 0,1 M Salzsäure-Maßlösung. Anhand von Gleichung (2) wurde der Stickstoffgehalt der Proben berechnet.

$$N = \frac{1,4007 \cdot (V - V_B)}{E \cdot 10} \quad (2)$$

Mit: N : Stickstoffgehalt [g (100 g)^{-1}]

1,4007: Umrechnungsfaktor; 1 mL Salzsäure-Maßlösung entspricht 1,4007 mg Stickstoff

V : Verbrauch an Salzsäure [mL]

V_B : Verbrauch an Salzsäure für den Blindwert [mL]

E : Einwaage der Probe (TM) [g]

10: Umrechnungsfaktor auf [g (100 g)^{-1}]

Um den Rohproteingehalt zu berechnen, wurde der Stickstoffgehalt mit dem jeweiligen Kjeldahlfaktor multipliziert (siehe Gleichung (3)).

$$RP = N \cdot F \quad (3)$$

Mit: RP : Rohproteingehalt [g (100 g)^{-1}]

N : Stickstoffgehalt [g (100 g)^{-1}]

F : Kjeldahlfaktor

2.3.5 Aminosäureanalytik

Die Hydrolyse der Proben zur Aminosäureanalytik erfolgte auf drei unterschiedliche Weisen. Zum einen mittels saurer Totalhydrolyse, dabei werden alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein, Methionin und Tryptophan erfasst. Asparagin und Glutamin werden hierbei in Form ihrer korrespondierenden Säure bestimmt.

Für die Bestimmung von Cystein und Methionin wurde ein oxidativer Aufschluss durchgeführt, damit diese als Cysteinsäure und Methioninsulfon bzw. Methioninsulfoxid analysiert werden können. Für die Bestimmung von Tryptophan wurde eine basische Hydrolyse durchgeführt.

2.3.5.1 Bestimmung der Gesamtaminosäuren nach saurer Hydrolyse

Die Proben wurden in Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL phenolischer Salzsäure (6 M; 0,1% Phenol (w/v)) versetzt und für 24 h bei 110 °C inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch die Zugabe der Natronlauge (7,5 M) gestoppt und der pH-Wert auf 2,2 eingestellt. Anschließend wurden die Proben mit Citratpuffer *ad* 20 mL aufgefüllt, filtriert und vermessen. Die Zusammensetzung des Citratpuffers ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Citratpuffers.

Substanz	Menge pro Liter
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	11 g
Citronensäure	6 g
Thiodiglycol	14 mL
Salzsäure (32%)	12 mL
Phenol	2 g
pH	2,2

2.3.5.2 Bestimmung von Cystein und Methionin nach Oxidation

Zu Beginn wurde die frisch hergestellte Oxidationslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend für 15 min im Eisbad inkubiert. Von der Oxidationslösung wurden pro Probe 0,5 mL benötigt, welche sich aus 0,05 mL Wasserstoffperoxid (30%) und 0,45 mL Ameisensäure (889 g Ameisensäure, 111 mL VE-Wasser und 4,73 g Phenol) zusammensetzt. Die Proben wurden in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und im Eisbad gekühlt. Je 0,5 mL der Oxidationslösung wurden zu den Proben gegeben und diese anschließend für 16 h im Eisbad bei 4 °C inkubiert.

Die Oxidation wurde durch die Zugabe von ca. 0,08 g Natriumdisulfit gestoppt. Anschließend wurden 2,5 mL phenolhaltige Salzsäure (6 M; 0,1% (w/v) Phenol) hinzugegeben und die Proben für 24 h bei 110 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Citratpuffer *ad* 20 mL aufgefüllt, filtriert und mittels Aminosäureanalysator gemessen.

2.3.5.3 Bestimmung von Tryptophan nach alkalischer Hydrolyse

Die Proben wurden in Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL phenolischer Natronlauge (5 M; 0,1% Phenol(w/v)) versetzt. Die Inkubation erfolgte analog zur sauren Hydrolyse bei 110 °C für 24 h. Nach dem Abkühlen der Proben wurde 1 mL Phosphorsäure (0,5 M) hinzugefügt, der pH-Wert auf 2,2 eingestellt und die Proben mit Citratpuffer *ad* 20 mL aufgefüllt, filtriert und mittels Aminosäureanalysator gemessen.

2.3.5.4 Geräteparameter Aminosäureanalysator

Die freigesetzten Aminosäuren wurden an einer Kationenaustauschersäule getrennt und mittels Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin bei 440 nm (Prolin) bzw. 570 nm (restliche Aminosäuren) detektiert. Die Analyse erfolgt mittels Aminosäureanalysator S433 (SYKAM Vertriebs GmbH). Die Kalibration erfolgte über eine Ein- (Abschnitte 3.1 und 0) oder über eine Mehrpunktkalibration mit vier bis fünf Punkten (Abschnitte 3.2.1, 3.2.5 und 3.2.6). Die Parameter für die Analyse der Aminosäuren nach saurer Hydrolyse und Oxidation sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die Parameter der Tryptophan-Analyse sind in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 12: Geräteparameter der Aminosäureanalytik für die Gesamtaminosäuren und die oxidierten Aminosäuren.

Parameter						
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13/Na für das erweiterte Hydrolysatprogramm; 4,6 x 175 mm					
Vorsäule	Ammoniakfiltersäule LCA K13/Na für Protein-Hydrolysat; 4,6 x 100 mm					
Eluenten	A: Natrium-Citratpuffer; 0,12 N; pH 3,45 (SYKAM) B: Natrium-Citratpuffer; 0,20 N; pH 10,85 (SYKAM) C: Regenerationslösung: Natronlauge; 0,5 M mit 0,68 mM EDTA					
Flussrate	0,45 mL/min					
Aminomodul	Ninhydrin; 0,1 M in Methanol					
Flussrate	Waschlösung: Isopropanol/Ethanol/bidestilliertes (dd) Wasser (1/1/2; (v/v/v)) 0,25 mL/min					
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Ninhydrin	Waschlösung.
	0	100	0	0	100	0
	11	95	5	0	100	0
	13	80	20	0	100	0
	25	70	30	0	100	0
	29	30	70	0	100	0
	31	20	80	0	100	0
	33	10	90	0	100	0
	41	0	100	0	100	0
	49,1	0	0	100	100	0
	50	0	0	100	0	100
	52,1	100	0	0	0	100
	65	100	0	0	100	0
Säulenofen	Zeit [min]					Temperatur [°C]
	0					49
	5					49
	10					56
	23					25
	28					74
	34					74
	39					50
	65					50
Reaktortemperatur	130 °C					
Injektionsvolumen	50 µL					
Detektor	UV/Vis bei 440 nm und 570 nm					

Tabelle 13: Geräteparameter der Aminosäureanalytik von Tryptophan.

Parameter																																																	
Eluenten	A: Natrium-Citratpuffer; 0,12 N; pH 3,45 (SYKAM) B: Natrium-Citratpuffer; 0,20 N; pH 10,85 (SYKAM) C: Regenerationslösung: Natronlauge; 0,5 M mit 0,68 mM EDTA																																																
Flussrate	0,45 mL/min																																																
Aminomodul	Ninhydrin; 0,1 M in Methanol Waschlösung: Isopropanol/Ethanol/dd Wasser (1/1/2; (v/v/v))																																																
Flussrate	0,25 mL/min																																																
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> <th>C [%]</th> <th>Ninhydrin</th> <th>Waschlösung.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>30</td> <td>70</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>10</td> <td>90</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20,1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>23,1</td> <td>30</td> <td>70</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>30</td> <td>70</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Ninhydrin	Waschlösung.	0	30	70	0	100	0	7	10	90	0	100	0	15	0	100	0	100	0	20,1	0	0	100	100	0	21	0	0	100	0	100	23,1	30	70	0	0	100	32	30	70	0	100	0
Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Ninhydrin	Waschlösung.																																												
0	30	70	0	100	0																																												
7	10	90	0	100	0																																												
15	0	100	0	100	0																																												
20,1	0	0	100	100	0																																												
21	0	0	100	0	100																																												
23,1	30	70	0	0	100																																												
32	30	70	0	100	0																																												
Säulenofen	74 °C																																																
Reaktortemperatur	130 °C																																																
Injektionsvolumen	50 µL																																																
Detektor	UV/Vis bei 570 nm																																																

2.3.5.5 Bestimmung des Aminosäuregehalts, des Kjeldahlfaktors und der Proteinqualität

Die Bestimmung des Gehalts der einzelnen Aminosäuren erfolgte nach Gleichung (4). Es wurde hierbei angenommen, dass die Aminosäuren frei in der Probe vorliegen.

$$AS = \frac{c \cdot V \cdot M \cdot 100}{E_p \cdot 10^9} \quad (4)$$

Mit: AS: Gehalt an der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)⁻¹]

c: Konzentration der Aminosäure [nmol mL⁻¹]

V: Volumen der Probelösung [mL], hier 20 mL

M: Molekülmasse der jeweiligen Aminosäure [g mol⁻¹]

100: Umrechnungsfaktor auf g (100g TM)⁻¹

E_p: Probeneinwaage (TM) [g]

10⁹: Umrechnungsfaktor von nmol in mol

Unter der Annahme, dass die Aminosäuren im Protein gebunden vorliegen, wurde der Gehalt der Aminosäuren (AA_{res}, *Amino Acid Residue*) gemäß Gleichung (5) bestimmt. Hierbei wurde berücksichtigt, dass bei der Bildung einer Peptidbindung ein Wassermolekül abgespalten wird.

$$AA_{\text{res}} = \frac{c \cdot V \cdot (M - M_{\text{H}_2\text{O}}) \cdot 100}{E_P \cdot 10^9} \quad (5)$$

Mit: AA_{res} : Gehalt an der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)^{-1}]

c : Konzentration der Aminosäure [nmol mL^{-1}]

V : Volumen der Probelösung [mL], hier 20 mL

M : Molekülmasse der jeweiligen Aminosäure [g mol^{-1}]

$M_{\text{H}_2\text{O}}$: Molekülmasse von Wasser [g mol^{-1}], hier 18,01 g mol^{-1}

100: Umrechnungsfaktor auf g (100g TM) $^{-1}$

E_P : Probeneinwaage (TM) [g]

10^9 : Umrechnung von nmol in mol

Für die Bestimmung des Kjeldahlfaktors wurde neben dem AA_{res} außerdem der Stickstoffgehalt aller Aminosäuren benötigt. Nach Gleichung (6) wurde hierfür zunächst der Stickstoffanteil der einzelnen Aminosäuren bestimmt, aus dem im Anschluss die Summe berechnet wurde.

$$N = \frac{A_N \cdot AS}{100} \quad (6)$$

Mit: N : Stickstoffgehalt der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)^{-1}]

A_N : Anteil von Stickstoff an der Molekülmasse der jeweiligen Aminosäure [%]

AS : Gehalt an der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)^{-1}]

100: Umrechnungsfaktor

Nun ließ sich nach Gleichung (7) der Kjeldahlfaktor berechnen, welcher nach der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl dazu dient, den Stickstoffgehalt in den Rohproteingehalt umzurechnen.

$$F_{\text{Roh}} = \frac{\sum AA_{\text{res}}}{N_{\text{ges}}} \quad (7)$$

Mit: F_{Roh} : Kjeldahlfaktor; Rohproteingehalt

AA_{res} : Gehalt an der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)^{-1}]

N_{ges} : Summe der Stickstoffgehalte der Aminosäuren [g (100 g TM)^{-1}]

Auch der Reinproteingehalt lässt sich mithilfe eines Faktors berechnen, welcher sich aus dem Quotienten des AA_{res} und dem Stickstoffgehalt nach Kjeldahl gemäß Gleichung (8) zusammensetzt. Dieser ist geringer als der Faktor für den Rohproteingehalt, da der Stickstoffgehalt nach der Bestimmung nach Kjeldahl durch die Mitbestimmung anderer stickstoffhaltiger Substanzen meist höher ist als der, der in der Probe enthaltenen Proteine.

$$F_{\text{Rein}} = \frac{\sum AA_{\text{res}}}{N_{\text{Kjeldahl}}} \quad (8)$$

Mit: F_{Rein} : Kjeldahlfaktor; Reinproteingehalt

AA_{res} : Gehalt an der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)⁻¹]

N_{Kjeldahl} : Stickstoffgehalt nach der Methode nach Kjeldahl [g (100 g TM)⁻¹]

Im nächsten Schritt wurde mit den Ergebnissen der Aminosäureanalytik die Proteinqualität bestimmt. Hierfür wurden der *Amino Acid Score* (AAS) und der *Chemical Score* (CS) für die verschiedenen essentiellen und semiessentiellen Aminosäuren berechnet, um die limitierende Aminosäure zu identifizieren. Der AAS ergab sich aus Gleichung (9) und daraus mithilfe von Gleichung (10) der CS.

$$\text{AAS} = \frac{AS_{\text{Protein}}}{AS_{\text{Referenz}}} \quad (9)$$

Mit: AAS: *Amino Acid Score*

AS_{Protein} : Aminosäure im Protein der Probe [g (100 g TM)⁻¹]

AS_{Referenz} : Aminosäure im Referenzprotein [g (100 g TM)⁻¹]

$$\text{CS} = \text{AAS} \cdot 100 \quad (10)$$

Mit: CS: *Chemical Score*

AAS: *Amino Acid Score*

100: Umrechnungsfaktor

Das verwendete Referenzprotein wurde 1973 von der FAO/WHO festgelegt und stellt die optimale Zusammensetzung essentieller, schwefelhaltiger und aromatischer Aminosäuren dar. (Food and Agriculture Organization/World Health Organization 1973)

Die Biologische Wertigkeit wurde über den essentiellen Aminosäure-Index (EAAI; engl. *Essential Amino Acid Index*), welcher sich aus Gleichung (11) ergibt, berechnet.

$$\text{EAAI} = \sqrt[8]{CS_{\text{Ile}} \cdot CS_{\text{Leu}} \cdot CS_{\text{Lys}} \cdot CS_{\text{Met+Cys}} \cdot CS_{\text{Phe+Tyr}} \cdot CS_{\text{Thr}} \cdot CS_{\text{Trp}} \cdot CS_{\text{Val}}} \quad (11)$$

Mit: EAAI: *Essential Amino Acid Index*

CS_{AS} : *Chemical Score* der jeweiligen Aminosäure

Mithilfe des EAAI wurde im nächsten Schritt die Biologische Wertigkeit (BW) gemäß Gleichung (12) berechnet. Die Biologische Wertigkeit gibt an, wie effizient das Nahrungsprotein zum Aufbau körpereigener Proteine genutzt werden kann.

$$BW = (1,09 \cdot EAAI) - 11,7 \quad (12)$$

Mit: BW: Biologische Wertigkeit

EAAI: *Essential Amino Acid Index*

2.3.6 Bestimmung des Fettgehalts nach Weibull-Stoldt

Die Probe wurde auf 1 mg genau eingewogen und mit 150 mL Salzsäure (4 M) versetzt. Die Lösung wurde erhitzt und für 30 min am Sieden gehalten. Im Anschluss wurden 100 mL heißes VE-Wasser hinzugefügt und die Lösung filtriert. Filter und Probe wurden unter Verwendung von ausreichend heißem Wasser neutral gewaschen und im Anschluss bei 105 °C getrocknet.

Die Extraktion des Fettes aus der Probe erfolgte an der Soxtherm®-Extraktionsapparatur. Hierfür wurden die aufgeschlossenen, getrockneten Proben in Extraktionshülsen gegeben und diese mit Glaswolle abgedichtet. Die konstant gewogenen Extraktionsbecher enthielten Siedesteine und wurden mit den befüllten Extraktionshülsen in die Apparatur eingehängt. Die Extraktion erfolgte nach dem in Tabelle 14 aufgeführten Prozess mit 160 mL *n*-Hexan.

Tabelle 14: Geräteparameter der Soxtherm®-Apparatur.

Parameter	Einstellung
T-Klasse	200 °C
Extraktionstemperatur	165 °C
Absenintervall	3 min 30 s
Absenkimpuls	2 s
Kochphase	0 min
Abdestillieren AA	6x Intervall
Extraktionszeit	2 h 0 min
Abdestillieren AB	3x Intervall
Abdestillieren AC	5 min
Programmdauer	2 h 36 min

Das Lösungsmittel wurde nach der Extraktion mit Stickstoff abgeblasen und die Extraktionsbecher bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Fettgehalt der Proben wurde durch Differenzwägung der Soxtherm®-Extraktionsbecher bestimmt. Die extrahierten Lipide wurden in 3 mL Isooctan aufgenommen und bis zur weiteren Analyse der Fettsäureverteilung in Braunglasvials bei -20 °C gelagert.

2.3.7 Bestimmung der Fettsäureverteilung

Die Analyse der Fettsäureverteilung erfolgte nach der Umesterung der Triglyceride in Fettsäuremethylester (FSME) gemäß 2.3.7.1.

2.3.7.1 Umesterung der Fettsäuren

Die Umesterung der Fettsäuren wurde in Anlehnung an das Schnellverfahren für die Transmethylierung unter alkali-katalysierten Bedingungen der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren durchgeführt. (BVL) Ein Anteil von 0,1 mL der in Isooctan gelösten Lipide wurde 20fach mit Isooctan verdünnt und in einem Reaktionsgefäß mit Teflonkappe mit 0,1 mL methanolischer KOH (2 M) versetzt, verschlossen und homogenisiert. Nach 2 min Standzeit wurden 2 mL gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben und die Lösung erneut geschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen und über NaSO₄ über Nacht bei 4 °C getrocknet. Im Anschluss wurde die organische Phase 1:10 verdünnt, in Kurzgewindeflaschen überführt und zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt.

2.3.7.2 Gaschromatographische Analyse des Fettsäureprofils

Die Analyse der verdünnten Fettsäuremethylester erfolgte mittels GC-MS. Die Geräteparameter sind in Tabelle 15 aufgeführt. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte anhand authentischer Referenzsubstanzen im 37 Komponenten-Mix von Supelco® über die Retentionsindices nach van den Dool und Kratz (siehe Gleichung (13)) mithilfe einer homologen Reihe von *n*-Alkanen (van den Dool und Kratz 1963). Zwei der FSME, welche nicht im Mischstandard enthalten waren, wurden anhand von Literaturdaten identifiziert. (Hammer 2021)

$$RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \left[\frac{t_R(\text{Substanz}) - t_R(C_n)}{t_R(C_{n+1}) - t_R(C_n)} \right] \quad (13)$$

Mit: RI: Retentionsindex [-]

n: Anzahl an Kohlenstoffatomen im nächstkleineren *n*-Alkan [-]

t_R (Substanz): Retentionszeit der Substanz [min]

t_R (*C_n*): Retentionszeit des nächstkleineren *n*-Alkans [min]

t_R (*C_{n+1}*): Retentionszeit des nächstgrößeren *n*-Alkans [min]

100: Umrechnungsfaktor

Tabelle 15: Geräteparameter der GC-MS-Analytik für die Bestimmung der Fettsäuremethylester.

Parameter	Einstellung
GC-System	Agilent Technologies 7890A GC-System (Santa Clara, USA) mit dem 5975C VL MSD Triple Axis Detector und dem Gerstel MultiPurpose Sampler
Injektion	<i>Split/Splitless</i> -Injektor (250 °C)
Liner	Flüssigliner; Focusliner®, 4 mm ID; SGE Analytical Science, Crownhill, UK
Modus	Split 10:1
Injektionsvolumen	1 µL
Trennsäule	VF-WAXms (Agilent)
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	40 °C (3 min); 3 °C min ⁻¹ ; 240 °C (12 min)
Trägergas	Helium (5.0)
Flussgeschwindigkeit	1,2 mL min ⁻¹ (konstant)
<i>Gas Saver</i>	20 mL min ⁻¹ nach 2 min
MS	
Ionisation	70 eV
Temperatur Ionenquelle	230 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C
Temperatur Transferline	250 °C
Solvent Delay	0,0 min
Ionisierungsenergie	70 eV
Solvent Delay	5,0 min
Totalionenscan	<i>m/z</i> 33–425
Software	
Datenaufnahme	MassHunter GC/MS <i>Acquisition</i> B 10.0.384.1
Datenbankabgleich	NIST <i>MS Search</i> 2.2
Datenbank	NIST <i>MS Library</i> Version 2.2

2.3.8 Bestimmung des Ligningehaltes nach Klason

Der Ligningehalt wurde gemäß einer modifizierten Methode nach Lin und Dence (1992) bestimmt. (Lin und Dence 1992) Etwa 2 g der gemahlten Probe wurden in eine Extraktionshülse eingewogen und zweifach in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert, zu Beginn für 6 h in 170 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Cyclohexan und Ethanol (2:1 (v/v)) (Fengel und Przyklenk 1983). Die zweite Extraktion wurde mit 170 mL Ethanol (mind. 99,8%) für 4 h durchgeführt. Durch Differenzwägung der vorher konstant gewogenen Rundkolben wurde der Extraktstoffgehalt der Probe bestimmt.

Nach dem Trocknen der Probe in der Extraktionshülse an der Luft wurden 0,2 g der extraktstofffreien Probe in einen 250 mL Iodzahlkolben eingewogen, mit 5 mL 72%iger Schwefelsäure (v/v) versetzt und für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurden 160 mL VE-Wasser hinzugefügt und die Mischung unter Rühren für 4 h am Sieden gehalten. Die abgekühlte Lösung wurde dann über

einen konstant gewogenen Glasfiliertiegel (Porengröße 3) filtriert. Das Filtrat wurde zur photometrischen Bestimmung des säurelöslichen Lignins bei 280 nm eingesetzt. Nach Gleichung (14) wurde der Gehalt an säurelöslichem Lignin (engl.: *acid-soluble lignin*, (ASL)) bestimmt. Als Blindwert für die Photometrie wird 3%ige Schwefelsäure (v/v) genutzt.

Die Trockenmasse der Probeneinwaage wurde für die Berechnung um den Extraktstoffgehalt und die Restfeuchte korrigiert.

$$ASL = \frac{E \cdot V \cdot F_V \cdot 100}{a \cdot E_P \cdot d} \quad (14)$$

Mit: ASL: Gehalt an säurelöslichem Lignin [%]

E: Extinktion der Probe bei 280 nm

V: Volumen der Lösung [L], hier 0,165 L

F_V: Verdünnungsfaktor, hier 1

100: Bezug der Einwaage auf 100% [%]

a: Standardabsorptionsvermögen von Lignin bei 280 nm [L g⁻¹ cm⁻¹], 23,3 L g⁻¹ cm⁻¹

E_P: Probeneinwaage (TM), korrigiert um den Extraktstoffgehalt [g]

d: Schichtdicke der Küvette [cm], hier 1 cm

Der Rückstand wurde mit 500 mL heißem VE-Wasser neutral gewaschen und anschließend bei 105 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet. Der Gehalt an säureunlöslichem Lignin (engl.: *acid-insoluble lignin*, (AIL)) wurde mittels Gleichung (15) berechnet

$$AIL = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{E_P} \quad (15)$$

Mit: AIL: Gehalt an säureunlöslichem Lignin [%]

m₁: Masse des konstant gewogenen, leeren Filtertiegels [g]

m₂: Masse des konstant gewogenen Filtertiegels mit Probe [g]

100: Bezug der Einwaage auf 100% [%]

E_P: Probeneinwaage (TM), korrigiert um den Extraktstoffgehalt [g]

Der Gesamtgehalt an Lignin (engl.: *total lignin*, TL) wurde aus der Summe von ASL und AIL bestimmt (vgl. Gleichung (16))

$$TL = ASL + AIL \quad (16)$$

Mit: TL: Gehalt an Gesamtlignin in der Probe [%]

ASL: Gehalt an säurelöslichem Lignin [%]

AIL: Gehalt an säureunlöslichem Lignin [%]

2.3.9 Bestimmung des Ergosterolgehalts

Die Bestimmung von Ergosterol erfolgte in dieser Arbeit durch die folgenden unterschiedlichen Methoden.

2.3.9.1 Ergosterolbestimmung mittels HPLC-DAD

Die Ergosterolbestimmung mittels HPLC-DAD erfolgte gemäß der modifizierten Methode nach (Zelles et al. 1987). Etwa 1 g der gemahlene Probe wurden in einen Rundkolben aus Braunglas eingewogen und mit 50 mL Ethanol, 4 L Natriumascorbatlösung (8,75 g in 1 M NaOH) und 10 mL Kaliumhydroxidlösung (50/50 (w/w)) versetzt. Als interner Standard dienten 150 mL 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) in Methanol (1 mg mL⁻¹). Die Probelösung wurde für eine Stunde unter Rückfluss im Wasserbad bei 80 °C unter dreimaligem Umschwenken nach je 20 min verseift. Anschließend wurden 50 mL VE-Wasser hinzugefügt und die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurde die Probe viermal mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahiert. Zu Beginn wurde mit 50 mL Diethylether, dann mit 50 mL *n*-Pentan, einer Mischung aus 10 mL Ethanol und 50 mL *n*-Pentan und zuletzt mit 20 mL *n*-Pentan extrahiert. Nach jeder Extraktion wurden die organischen Phasen abgetrennt. Im Anschluss wurden die vereinten organischen Phasen dreimal mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (18 g KOH in 582 g 5%igem Ethanol (w/w)) gewaschen, mit VE-Wasser neutral gewaschen und in einen Iodzahlkolben überführt. Die Extrakte wurden über Nacht bei 4 °C über Natriumsulfat getrocknet.

Die Proben wurden im Anschluss in Rundkolben aus Braunglas filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in 1,5 mL Methanol aufgenommen und für 5 min im Ultraschallbad gelöst. Die gelösten Proben wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 18.000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Die Lösungen wurden membranfiltriert (0,45 µm) und für die HPLC-Analyse eingesetzt. Die Parameter der Analyse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Parameter der HPLC-Analyse zur Bestimmung des Ergosterolgehalts.

Parameter	Einstellung			
Säulenofentemperatur	40 °C			
Säulen	Chromolith® Performance RP-18e Nucleosil® C18			
Fluss	1 mL min ⁻¹			
Laufmittel	A: Methanol B: Acetonitril C: Ameisensäure (0,05% (v/v))			
Gradient	Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]
	0	0	70	30
	2	0	100	0
	10	0	100	0
	20	5	95	0
	30	5	95	0
	35	0	100	0
	40	0	70	30
Druck	89 bar			
Detektor	Diodenarraydetektor (DAD)			
Wellenlängenbereich	250–310 nm			
Wellenlänge	282 nm			
Dauer	40 min			

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung über den internen Standard. Eine Kalibrierreihe ist im Anhang, Abschnitt 7.1, Abbildung 42 beispielhaft dargestellt. Durch Umstellen der Geradengleichung der externen Kalibrierung zur Massenkonzentration von Ergosterol wurde diese durch das Einsetzen der Peakflächen von Ergosterol und 7-DHC berechnet. Im Anschluss wurde aus der Massenkonzentration mithilfe von Gleichung (17) der Ergosterolgehalt berechnet.

$$\omega_{\text{Erg}} = \frac{\beta_{\text{Erg}} \cdot V_{\text{P}} \cdot 1000}{E} \quad (17)$$

Mit: ω_{Erg} : Ergosterolgehalt [mg (g TM)⁻¹]

β_{Erg} : Massenkonzentration an Ergosterol [mg mL⁻¹]

V_{P} : Volumen der Probelösung [mL], hier 1,5 mL

E : Einwaage der Probe [mg]

1000: Bezug des Gehalts auf 1g Probe [mg g⁻¹]

2.3.9.2 Ergosterolbestimmung mittels GC-FID

Etwa 200 mg Probe wurden in einem Pyrex-Reaktionsgefäß mit Teflonkappe mit 50 mg Natriumascorbat versetzt. Es wurden außerdem 250 µL des internen Standards ((IST), 7-DHC; 2 mg mL⁻¹; in 2-Butanon) und 5 mL methanolische Natriumhydroxid-Lösung (5% NaOH (w/v) in 95% MeOH (v/v)) hinzugefügt, die Lösung homogenisiert und im Wasserbad bei 80 °C inkubiert. Die Lösung wurde alle 20 min mittels Vortexer homogenisiert und nach einer Stunde Inkubationszeit unter Lichtausschluss auf Raumtemperatur abgekühlt. Mittels Membranfiltration (0,45 µm) wurde die Probe in ein Derivatisierungsröhrchen überführt und dreimal mit je 5 mL *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden in einem 15 mL Messkolben vereint und *ad* Marke aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Probe über Natriumsulfat getrocknet. Davon wurden 6 mL entnommen, in ein weiteres Pyrex-Glas überführt und das Lösemittel unter Stickstoff abgelassen. Zur trockenen Probe wurden 500 µL Tetrahydrofuran (THF) und 500 µL N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) hinzugegeben. Die Silylierung erfolgte für 2 min im Wasserbad, bei 70 °C. Die Lösung wurde nach einer Minute gevortext und dann bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss über Nacht abgekühlt, um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten.

Für die Quantifizierung wurde eine externe Kalibrierreihe genutzt, welche mit 1 mL IST pro Standard versetzt wurde. Die Standards wurden in 10 mL Messkolben in 2-Butanon angesetzt. Davon wurde jeweils 1 mL entnommen, unter Stickstoff verdampft und anschließend analog zur Probenvorbereitung silyliert.

Die silylierten Proben und Standards wurden in Kurzgewindeflaschen überführt und für die Bestimmung mittels GC-FID verwendet. Die Geräteparameter sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Geräteparameter der Ergosterolbestimmung mittels GC-FID.

Parameter	Einstellungen
GC	Agilent Technologies 7890A GC-System mit 7683B Series Injector (Santa Clara, USA)
Injektion	
Liner	Flüssigliner; Focusliner®, 4 mm ID; SGE Analytical Science, Crownhill, UK
Modus	Split 10:1
Injektionsvolumen	1 µL
Trennsäule	DB-5ms (Agilent)
Temperaturprogramm ∅ [°C] (Dauer)	100 °C (3 min); 30 °C min ⁻¹ auf 280 °C (12min); 30 °C min ⁻¹ auf 320 °C (5 min)
Trägergas	Wasserstoff (5,0)
Flussgeschwindigkeit	1,2 mL min ⁻¹ (konstant)
<i>Gas Saver</i>	30 mL min ⁻¹ nach 5 min
FID	
Temperatur	280 °C
Gas	Druckluft

Das Flächen-Verhältnis der 7-DHC- und Ergosterol-Peaks wurden gegen die Konzentration von Ergosterol aufgetragen. Eine Kalibriergerade ist beispielhaft im Anhang, in Abschnitt 7.1, Abbildung 43 dargestellt. Durch Umstellen der Geradengleichung und Einsetzen der Versuchsparameter wurde nach Gleichung (18) der Ergosterolgehalt der Probe berechnet.

$$\omega_{\text{Erg}} = \frac{V_f \cdot \left(\frac{A_{\text{Erg}}}{A_{\text{IST}}} \right) - b}{E} \quad (18)$$

Mit: ω_{Erg} : Ergosterolgehalt der Probe [mg (g TM)⁻¹]

V_f : Verdünnungsfaktor [-]

A_{Erg} : Peak-Area von Ergosterol [Counts min⁻¹]

A_{IST} : Peak-Area vom IST [Counts min⁻¹]

b : y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden [Counts]

m : Steigung der Kalibriergeraden [Counts mg⁻¹]

E : Probeneinwaage, TM [g]

2.3.9.3 Quantifizierung des Pilzgehalts

Für die Quantifizierung des Pilzgehalts eines Fermentats ist es notwendig, den jeweiligen Pilz in einem löslichen Medium zu kultivieren. Hierfür wurde als Standardmedium Malzextraktmedium (20 g L⁻¹) genutzt. Die submerse Hauptkulturführung in ME-Medium erfolgte analog zu Abschnitt 2.2.4.2. Die Berechnung der Pilzgehalte erfolgte mittels Dreisatz nach Gleichung (19).

$$P = \frac{\omega_{\text{Erg,Substrat}} \cdot 100}{\omega_{\text{Erg,ME}}} \quad (19)$$

Mit: P : Pilzgehalt [g (100 g TM)⁻¹]

$\omega_{\text{Erg,Substrat}}$: Ergosterolgehalt des Pilzes im Medium aus den Substraten [mg (g TM)⁻¹]

$\omega_{\text{Erg,ME}}$: Ergosterolgehalt des Pilzes im ME-Medium [mg (g TM)⁻¹]

100: Umrechnung auf

Für die Bestimmung der Pilzgehalte der Emerskulturen wurden die Pilze auf MEA-Platten gemäß Abschnitt 2.2.3.2 kultiviert und im Anschluss extrahiert.

2.3.10 Aschebestimmung

Die Probe wurde in einen konstant gewogenen Quarztiegel eingewogen und über der Flamme eines Bunsenbrenners vorverascht. Im Anschluss wurde sie im Muffelofen bei 550 °C unter regelmäßigem Hinzufügen von Wasserstoffperoxid vollständig verascht. Der Aschegehalt wurde nach Differenzwägung der Tiegel nach Gleichung (20) berechnet.

$$A = \frac{\Delta_{\text{Tiegel}} \cdot 100}{E} \quad (20)$$

Mit: A: Aschegehalt [g (100 g TM)⁻¹]

Δ_{Tiegel} : Differenz der vollen und leeren Tiegel [g]

E: Einwaage der Probe [g] in TM

100: Umrechnung auf g (100 g)⁻¹

2.3.11 Mineralstoffbestimmung mittels ICP-OES

Die Mineralstoffbestimmung erfolgte nach der Aschebestimmung mittels ICP-OES (engl.: *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*). Die aus 2.3.10 erhaltene Asche wurde in 100 mL Salpetersäure (10%ig (v/v)) aufgenommen und filtriert. Anschließend wurden die in Tabelle 18 aufgelisteten Mineralstoffe anhand ihrer spezifischen Emissionswellenlänge mittels ICP-OES (Varian 720 ES) am Institut für Bodenkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen nach DIN ISO 22036 gemessen.

Tabelle 18: Bestimmte Ionen mit der zugehörigen Emissionswellenlänge.

Metall	Emissionswellenlänge [nm]
Calcium	220,861
Eisen	240,489
Kalium	766,491
Magnesium	182,731
Natrium	589,592
Zink	213,857

2.3.12 Bestimmung des Glutengehalts mittels kompetitivem

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Zur Bestimmung der Glutengehalte der Fermentate von Biertreber wurden 100 mg Probe in 15 mL Zentrifugenröhrchen auf 0,1 mg genau eingewogen und mit 10 mL einer Lösung von Fischgelatine in 60%igem Ethanol (10% (w/w), pH 8,5) versetzt. Die Lösung wurde für 30 s auf einem Kreisschüttler (IKA, VORTEX 2; Stufe 5) und anschließend für 10 min an einem *Test Tube Rotator* (50 rpm) homogenisiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 3.363 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand membranfiltriert (0,45 µm). Das Filtrat wurde 1:10 mit 60%igem Ethanol verdünnt.

Die Lösungen des Ridascreen®-ELISA-Kits (r-biopharm 2021) wurden nach Herstellerangaben verdünnt und die extrahierte Probe anschließend nach der Vorschrift des Kits vorbereitet und für die photometrische Messung des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eingesetzt. Die Messung erfolgte mit einem *Plate-Reader* bei 450 nm und wurde anhand externer Kalibrierlösungen aus Gliadin mit einer kubischen Regression ausgewertet.

2.4 Aromaanalytik

2.4.1 Geruchsbeurteilung der Kulturüberstände

Die Geruchseindrücke der Überstände wurden von Tag 1 bis Tag 5 von zwei Personen bestimmt. Außerdem wurden die Geruchseindrücke und ihre Intensität der Fermentationstage fünf bis sieben von einem Panel, bestehend aus 8 Probanden, bewertet. Dazu wurden je 2 mL des Überstandes in ein Schnappdeckelglas pipettiert und mit einer zweistelligen Zufallsnummer beschriftet.

2.4.2 GC-MS-O-Analytik von *P. nameko*-Kulturen

Zur besseren Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen an unterschiedlichen Tagen wurden alle Vials vor der Analyse bei -20 °C gelagert und vor Analysenbeginn innerhalb von 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Als Extraktionsverfahren wurde die *stir bar sorptive extraction* (SBSE) mit Hilfe von Twistern® gewählt. Die mit Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichteten Twister® (Länge: 10 mm; Filmdicke: 0,5 mm) wurden in einem Twister®Conditioner mit dem in Tabelle 19 aufgeführten Temperaturprogramm vorkonditioniert.

Tabelle 19: Temperaturprogramm zur Vorkonditionierung der Twister®.

	Temperatur ϑ (Dauer)
Start	30 °C (20 min)
Rampe	5 °C min ⁻¹
End	280 °C (480 min)
Standby	30 °C

Die Extraktion erfolgte direkt in der Probe für 30 min bei 150 rpm. Nach der Extraktion wurden die Twister® mit entmineralisiertem Wasser gereinigt, getrocknet und in Desorptionsliner überführt.

Die Twister®-Desorptionsliner wurden zur Analyse mittels TDU-GC-MS-O eingesetzt. Die verwendete Methode ist in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Parameter der GC-MS-O-Analytik mit polarer Säule von P. nameko in unterschiedlichen Biertreber-Medien.

Parameter	Einstellung
Gaschromatograph	Agilent Technologies 8890 GC-System (Santa Clara, USA) mit 7010B GC/TQ und MultiPurpose Sampler von Gerstel
TDU	
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	40 °C (0,5 min); 120 °C min ⁻¹ ; 250 °C (12,0 min)
Transferliner	250 °C
Sample mode	Retain Tube-Standby Cooling
Modus	splitless
CIS	
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	-70 °C (0,5 min); 12 °C s ⁻¹ ; 250 °C (5,0 min)
Modus	Split 10:1
Injektion	
Liner	Glasverdampfrohre gefüllt mit silanisierter Glaswolle
Trennung	
Trennsäule	VF-WAXms (Agilent)
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	40 °C (3 min); 5 °C min ⁻¹ ; 240 °C (12 min)
Trärgas	Helium (5.0)
Flussgeschwindigkeit	1,56 mL min ⁻¹ (konstant)
MS (Triple Quadrupol)	
Modus	Scan (m/z 30-300)
Ionisation	70 eV
Temperatur Ionenquelle	230 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C
Temperatur Transferline	250 °C
Solvent Delay	0,0 min
Olfaktometrie Detektor Port	
Transferline	250 °C
Mischkammerheizung	150 °C
Make-Up Gas	Stickstoff
Software	
Datenaufnahme	MassHunter GC/MS Acquisition B 10.0.384.1
Autosampler-Steuerung	Maestro 1 Version 1.5.3.81/3.5
Datenauswertung	MassHunter Workstation Qualitativ Analysis B 10.0.10305.0
Datenbankabgleich	NIST MS Search Version 2.2
Datenbank	NIST MS Library Version 2.2
Sprachsoftware	ODP-Recorder 3.2.0.2
ODP-Datenauswertung	Data Viewer 1.0.2.8

Zur vorläufigen Identifizierung der flüchtigen Verbindungen wurde eine Gaschromatographie-Olfaktometrie an einer polaren VF-WAXms-Säule durchgeführt. Für geruchsaktive Substanzen wurden die Retentionsindices nach van den Dool und Kratz berechnet (vgl. Gleichung (13)) und mit denen der NIST-Datenbank (*National Institute of Standards and Technology*) und der Standard-Datenbank des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der JLU Gießen verglichen (van den Dool und Kratz 1963). Außerdem wurden die Übereinstimmungen der Massenspektren mit den Referenzen der NIST-Datenbank beurteilt (Linstrom 1997). Die Geruchseindrücke wurden mit den Datensätzen der *The Good Scents Company* (TGSC) überprüft (The Good Scents Company 2022).

Die Messungen an einer unpolaren DB-5-Säule erfolgten mit den GC-MS-Parametern, welche in Tabelle 21 aufgeführt sind.

Tabelle 21: Parameter der GC-MS-O-Analytik mit unpolarer Säule von *P. nameko* in unterschiedlichen Biertreber-Medien

Parameter	Einstellung
Gaschromatograph	Agilent Technologies 7890B GC-System (Santa Clara, USA) mit 5977B MSD und MultiPurpose Sampler von Gerstel
TDU	
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	40 °C (0,5 min); 120 °C min ⁻¹ ; 250 °C (12,0 min)
Transferliner	250 °C
<i>Sample mode</i>	<i>Retain Tube –Standby Cooling</i>
Modus	<i>splitless</i>
CIS	
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	-70 °C (0,5 min); 12 °C s ⁻¹ ; 250 °C (5,0 min)
Modus	Split 10:1
Injektion	
Liner	Glasverdampfrohr, gefüllt mit silanisierter Glaswolle
Modus	Split 4:1
Trennung	
Trennsäule	DB-5ms (Agilent)
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	40 °C (3 min); 5 °C min ⁻¹ ; 240 °C (12 min)
Trärgas	Helium
Flussgeschwindigkeit	1,56 mL min ⁻¹ (konstant)
<i>Gas Saver</i>	25 mL min ⁻¹ nach 5 min
MS (Triple Quadrupol)	
Modus	Scan (m/z 30–300)
Ionisation	70 eV
Temperatur Ionenquelle	230 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C

Tabelle 21 (Fortsetzung).

Parameter	Einstellung
MS (Triple Quadrupol)	
Temperatur Transferline	250 °C
Solvent Delay	0,0 min
Olfaktometrie Detektor Port	
Transferline	250 °C
Mischkammerheizung	150 °C
Make-Up Gas	N ₂
Software	
Datenaufnahme	MassHunter <i>GC/MS Acquisition</i> B 10.0.384.1
Autosampler-Steuerung	Maestro 1 Version 1.5.3.81/3.5
Datenauswertung	MassHunter <i>Workstation Qualitativ Analysis</i> B 10.0.10305.0
Datenbankabgleich	NIST MS <i>Search Version 2.2</i>
Datenbank	NIST MS <i>Library Version 2.2</i>

Neben der Extraktion der Aromastoffe mittels SBSE wurde eine Extraktion mittels *Solid Phase Microextraction* (SPME) durchgeführt. Auch hier wurden 4 mL Kulturüberstand verwendet und mit den in Tabelle 22 angegebenen Parametern extrahiert und gemessen.

Tabelle 22: Parameter der GC-MS-O-Analytik mit polarer Säule von Kulturüberstand von *P. nameko* in unterschiedlichen Biertreber-Medien.

Parameter	
GC	Agilent Technologies 7890B GC System mit 5977B MSD (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland); Gerstel MPS Robotic
Extraktion	
SPME-Faser	Divinylbenzol (DVB) / Carboxen (CAR) / Polydimethylsiloxan (PDMS); 50/30 µm dick; 1 cm lang; Supelco
Agitator	Inkubation: 40 °C (10 min) Agitator an: 30 s Agitator aus: 3 s Agitator Geschwindigkeit: 250 rpm Extraktion: 40 °C (30 min) Desorption: 250 °C (300 s)
Injektion	
Liner	SPME-Liner / Glasverdampfrohr; Gerstel
Modus	<i>splitless</i>
Trennung	
Trennsäule	VF-WAXms (Agilent)
Temperaturprogramm ϑ [°C] (Dauer)	40 °C (3 min); 5 °C min ⁻¹ ; 240 °C (7 min)
Trärgas	Helium (5.0)
Fluss	1,56 mL min ⁻¹ (konstant)

Tabelle 22 (Fortsetzung).

MS – Single Quadrupole	
Modus	<i>scan (m/z 30–300)</i>
Ionisation	70 eV
Temperatur Ionenquelle	230 °C
Temperatur Quadrupol	150 °C
Temperatur Transferline	250 °C
Solvent Delay	0,0 min
Olfaktometrie Detektor Port (ODP)	
Transferline	250 °C
Mischkammerheizung	150 °C
Make-Up Gas	Stickstoff
Software	
Datenaufnahme	MassHunter GC/MS Aquisition B 07.05.2479
Autosampler-Steuerung	Maestro 1 Version 1.5.3.81/3.5
Datenauswertung	MassHunter <i>Workstation Qualitative Analysis</i> Version B.07.00
Datenbankabgleich	NIST MS <i>Search</i> 2.2
Datenbank	NIST MS <i>Library</i> Version 2.2

3. Ergebnisse

3.1 Fermentation von EFB und PKM

3.1.1 Analytik der Substrate

Bei den durchgeführten Analysen handelte es sich um die Bestimmung des Stickstoffgehalts nach Kjeldahl (2.3.4), die Bestimmung der Aminosäuregehalte und -verteilung (2.3.5), die Bestimmung des Fettgehaltes nach Weibull-Stoldt (2.3.6), sowie die Bestimmung des Aschegehalts (2.3.10). Beide Substrate hatten einen geringen Wassergehalt von unter 10%, sodass keine Trocknung vor der Analyse durchgeführt werden musste. Alle nachfolgenden Daten wurden auf die Trockenmasse der Substrate bezogen. In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der Analysen beider Substrate aufgeführt. Die EFB wiesen einen geringen Stickstoff- beziehungsweise Aminosäuregehalt auf, während der Aschegehalt höher war als von PKM. Der Fettgehalt beider Substrate war vergleichbar.

Tabelle 23: Ergebnisse der Analytik der nicht-fermentierten Substrate $n=3$ (\pm Standardabweichung).

	EFB	PKM
	[g (100 g TM) ⁻¹]	
Stickstoffgehalt	0,8 (\pm 0,0)	2,3 (\pm 0,0)
Aminosäuregehalt	4,0 (\pm 0,4)	6,6 (\pm 0,4)
Aschegehalt	5,5 (\pm 0,3)	4,1 (\pm 0,5)
Fettgehalt	11,9 (\pm 0,2)	11,2 (\pm 0,1)

Die Fettsäureverteilung der EFB ist in Abbildung 3 im Vergleich zu den fermentierten Substraten dargestellt, die Aminosäureverteilung ist in Abbildung 4 gezeigt. Der Ligningehalt wurde als Summe aus dem säurelöslichen und säureunlöslichen Lignin, welche mit der Methode nach Klason bestimmt wurden, berechnet (Tabelle 24).

Tabelle 24: Ligningehalte der nicht-fermentierten Substrate; $n=3$ (\pm Standardabweichung).

	EFB	PKM
	[g (100 g TM) ⁻¹]	
Säureunlösliches Lignin (AIL)	21,94 (\pm 0,96)	21,18 (\pm 3,47)
Säurelösliches Lignin (ASL)	4,27 (\pm 0,77)	1,67 (\pm 0,13)
Gesamt-Lignin	26,21 (\pm 1,73)	22,85 (\pm 3,60)

3.1.2 Screening

Es wurde ein Screening in Festbettkulturen durchgeführt, welches dieser Arbeit voranging, in dem 69 Pilze gezüchtet wurden, darunter 61 Pilze der Abteilung Basidiomycota und acht Pilze der Abteilung Ascomycota. Von diesen waren 29 Pilze gar nicht angewachsen. Die Vertreter der Seitlinge (*Pleurotus*) zeigten generell ein relativ schnelles Wachstum. Die fünf Pilze, die optisch als am besten wachsend beurteilt wurden, waren *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *Irpex consors*, *Marasmius palmivorus* und *Bjerkandera adusta*. Es wurde bei der Auswahl außerdem das Aufhellen des Mediums als Zeichen für einen Abbau von Lignin optisch beurteilt.

Die Kultivierung der fünf ausgewählten Pilze erfolgte in Erlenmeyerkolben mit 10 g Medium gemäß Abschnitt 2.2.3 für zwei Wochen, bis sie vollständig bewachsen waren. Um die Eignung als Larvensubstrat zu untersuchen, wurden der Stickstoffgehalt und die Aminosäurezusammensetzung analysiert. Die Stickstoff- und Aminosäuregehalte sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Stickstoff- und Aminosäuregehalte von fermentierten EFB; n=3 (\pm Standardabweichung).

Probe	Stickstoffgehalt [g (100 g TM) ⁻¹]	Aminosäuregehalt [g (100 g TM) ⁻¹]
<i>B. adusta</i>	0,92 (\pm 0,05)	3,8 (\pm 0,30)
<i>I. consors</i>	0,85 (\pm 0,04)	3,6 (\pm 0,28)
<i>I. lacteus</i>	0,81 (\pm 0,08)	3,7 (\pm 0,15)
<i>M. palmivorus</i>	0,82 (\pm 0,04)	3,3 (\pm 0,22)
<i>P. ostreatus</i>	0,77 (\pm 0,06)	3,2 (\pm 0,17)

Die nachfolgenden Experimente wurden anhand der Ergebnisse der Stickstoff- und Aminosäuregehalte mit den Pilzen *I. consors*, *B. adusta* und *M. palmivorus* durchgeführt. Diese erwiesen sich auch aufgrund ihres Wachstums als die vielversprechendsten Kandidaten.

3.1.3 Ergosterolbestimmung der Festbettkulturen

Die Pilze *B. adusta*, *I. consors* und *M. palmivorus* wurden in einer zeitabhängigen Kulturreihe gemäß 2.2.3 kultiviert. Die Kulturen wurden nach 2.3.9.1 auf den Ergosterolgehalt untersucht (Tabelle 26).

Tabelle 26: Ergosterolgehalte der kinetischen Reihe der drei Pilze; n=3 (\pm Standardabweichung).

	Ergosterolgehalt [mg (g TM) ⁻¹]			
	2 Wochen	4 Wochen	6 Wochen	8 Wochen
<i>B. adusta</i>	0,02 (\pm 0,00)	0,11 (\pm 0,01)	0,20* (\pm 0,01)	0,11 (\pm 0,02)
<i>I. consors</i>	0,03 (\pm 0,01)	0,50 (\pm 0,02)	0,72 (\pm 0,06)	0,94 (\pm 0,01)
<i>M. palmivorus</i>	0,02 (\pm 0,00)	0,07 (\pm 0,02)	0,06 (\pm 0,02)	0,12 (\pm 0,04)

*Doppelbestimmung (\pm halbe Spannweite)

Für die Bestimmung des Pilzgehalts von Submerskulturen wurden die jeweiligen Pilze standardmäßig im ME-Medium gezüchtet und anschließend auf den Ergosterolgehalt analysiert. Dieser Gehalt wurde als Bezugswert für 100% Pilz genutzt um den Pilzanteil in fermentierten Proben mit unlöslichen Substraten zu quantifizieren. Da in diesem Projekt hauptsächlich mit Emerskulturen gearbeitet wurde, wurde im nächsten Schritt der Ergosterolgehalt von Submerskulturen in ME-Medium und in Emerskulturen verglichen.

Die Ergebnisse der mittels HPLC-DAD analysierten Ergosterolgehalte in ME-Submersmedien beziehungsweise von auf Agar-Platten gewachsenem Myzel (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27: Ergosterolgehalte von *B. adusta*, *I. consors* und *M. palmivorus* in ME-Kulturen; n=3 (\pm Standardabweichung).

	Submerskultur 8 d	Submerskultur 10 d	Submerskultur 12 d	Submerskultur 14 d	Emerskulturen 7 d
	Ergosterolgehalt [mg (g TM) ⁻¹]				
<i>B. adusta</i>	2,31 (\pm 1,48)	1,93 (\pm 1,18)	1,46 (\pm 0,11)	3,05 (\pm 0,98)	13,15 (\pm 0,77)
<i>I. consors</i>	2,73 (\pm 2,83)	3,46 (\pm 2,45)	3,59 (\pm 2,53)	3,72 (\pm 2,52)	12,85 (\pm 1,09)*
<i>M. palmivorus</i>	4,62 (\pm 1,40)*	5,31 (1,40)	6,08**	6,80 (\pm 0,73)*	10,48 (\pm 1,33)

*Doppelbestimmung (\pm halbe Spannweite); **Einfachbestimmung

Im Anschluss wurden die Pilzgehalte der Fermentate gemäß Gleichung (19) mithilfe der Ergosterolgehalte von 100% emers gewachsenem Pilzmyzel berechnet (Tabelle 28).

Tabelle 28: Pilzgehalte der kinetischen Reihe der drei Pilze; n=3 (\pm Standardabweichung).

	Pilzgehalte [%]			
	2 Wochen	4 Wochen	6 Wochen	8 Wochen
<i>B. adusta</i>	0,14 (\pm 0,01)	0,87 (\pm 0,08)	1,5 (\pm 0,05)	0,84 (\pm 0,12)
<i>I. consors</i>	0,25 (\pm 0,05)	3,9 (\pm 0,16)	5,6 (\pm 0,48)	7,3 (\pm 0,12)
<i>M. palmivorus</i>	0,24 (\pm 0,01)	0,68 (\pm 0,17)	0,60 (\pm 0,23)	1,1 (\pm 0,37)

Die Pilzgehalte stiegen im Verlauf der Kultivierung, mit Ausnahme vom *B. adusta*, an. Als Kompromiss zwischen Pilzgehalt und Kulturdauer wurde für die folgenden Experimente maximal vier Wochen Kulturdauer festgelegt.

3.1.4 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

3.1.4.1 Kultivierung auf EFB und PKM

Zur Optimierung der Kultivierung und damit zur Steigerung des Pilzgehalts wurde zunächst eine Mischung aus EFB und PKM im Verhältnis von 7:3 (w/w) eingesetzt. Hierbei wurde der Einfluss des Inokulumvolumens bei vierwöchiger Fermentation analysiert. In Tabelle 29 sind die Ergosterolgehalte und die daraus berechneten Pilzgehalte aufgeführt.

Tabelle 29: Ergosterol- und Pilzgehalte der fermentierten Substrate; n=3 (\pm Standardabweichung).

	5%ig beimpft		10%ig beimpft	
	Ergosterolgehalt [mg (g TM) ⁻¹]	Pilzgehalt [%]	Ergosterolgehalt [mg (g TM) ⁻¹]	Pilzgehalt [%]
<i>B. adusta</i>	0,11 (\pm 0,03)	0,8 (\pm 0,2)	0,08 (\pm 0,01)	0,6 (\pm 0,1)
<i>I. consors</i>	0,51 (\pm 0,04)*	4,0 (\pm 0,3)	0,66 (\pm 0,07)	5,1 (\pm 0,54)
<i>M. palmivorus</i>	0,06 (\pm 0,00)	0,5 (\pm 0,01)	0,06 (\pm 0,01)	0,6 (\pm 0,1)

*nur eine Doppelbestimmung, (\pm halbe Spannweite).

Es konnte keine Verbesserung des Pilzwachstums durch die Mischung der EFB mit PKM oder die 10%ige Beimpfung gezeigt werden.

3.1.4.2 *Upscaling* und Optimierung der Kultivierungsdauer

Als Ansatz für die Optimierung der Kultivierungsdauer wurden emerse Vorkulturen zum Inokulieren der Substrate zu verwenden. Es wurde beobachtet, dass das Pilzwachstum während des *Upscalings* mit Emerskultur als Vorkultur deutlich schneller erfolgte und das Fermentat bereits nach zwei Wochen geerntet werden konnte.

Für die Folgekultivierung wurde dieses Fermentat direkt als Vorkultur verwendet, sodass hinreichende Mengen an Larvensubstrat hergestellt werden konnte.



Abbildung 2: Mit *B. adusta* fermentierte EFB in Festbettkultur.

3.1.5 Analytik der finalen Larvensubstrate

Von den mit emerser Vorkultur angeimpften und unter optimierten Kulturbedingungen produzierten Fermentaten wurden der Protein-, Lignin- und der Fettgehalt analysiert. Außerdem wurden die Amino- und Fettsäureverteilungen bestimmt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Ergebnisse der Analytik der fermentierten EFB im Vergleich zur nicht-fermentierten Referenz; n=3 (\pm Standardabweichung).

Parameter	Nicht-fermentierte EFB	EFB mit <i>B. adusta</i>	EFB mit <i>I. consors</i>	EFB mit <i>M. palmivorus</i>
Stickstoffgehalt [g (100 g TM) ⁻¹]	0,764 (\pm 0,003)	0,905 (\pm 0,005)	0,846 (\pm 0,012)	0,767 (\pm 0,013)
Aminosäuregehalt [g (100 g TM) ⁻¹]	4,01 (\pm 0,35)	3,82 (\pm 0,07)	3,60 (\pm 0,09)	3,66 (\pm 0,06)
Kjeldahlfaktor Rohprotein	6,12 (\pm 0,13)	6,03 (\pm 0,04)	6,13 (\pm 0,07)	6,22 (\pm 0,12)
Kjeldahlfaktor Reinprotein	4,49 (\pm 0,58)	3,60 (\pm 0,08)	3,64 (\pm 0,09)	4,08 (\pm 0,08)
ASL [g (100 g TM) ⁻¹]	4,27 (\pm 0,77)	7,20 (\pm 0,21)	7,04 (\pm 0,88)	5,95 (\pm 0,52)
AIL [g (100 g TM) ⁻¹]	21,94 (\pm 0,96)	20,28 (\pm 0,28)	21,25 (\pm 1,12)	22,69 (\pm 0,45)
TL [g (100 g TM) ⁻¹]	26,21 (\pm 1,73)	27,48 (\pm 0,49)	28,29 (\pm 2,00)	28,64 (\pm 0,97)
Fettgehalt [g (100 g TM) ⁻¹]	11,94 (\pm 0,17)	4,66 (\pm 0,19)	6,80 (\pm 0,17)	6,03 (\pm 0,27)
Ergosterolgehalt [mg (g TM) ⁻¹]	-	0,0318 (\pm 0,0022)	0,0246 (\pm 0,0008)	0,0805 (\pm 0,0028)
Andere [g (100 g TM) ⁻¹]	57,78	64,04	61,31	61,67

Abbildung 3 zeigt die Fettsäureprofile der unterschiedlichen fermentierten Substrate im Vergleich zur nicht-fermentierten Referenz.

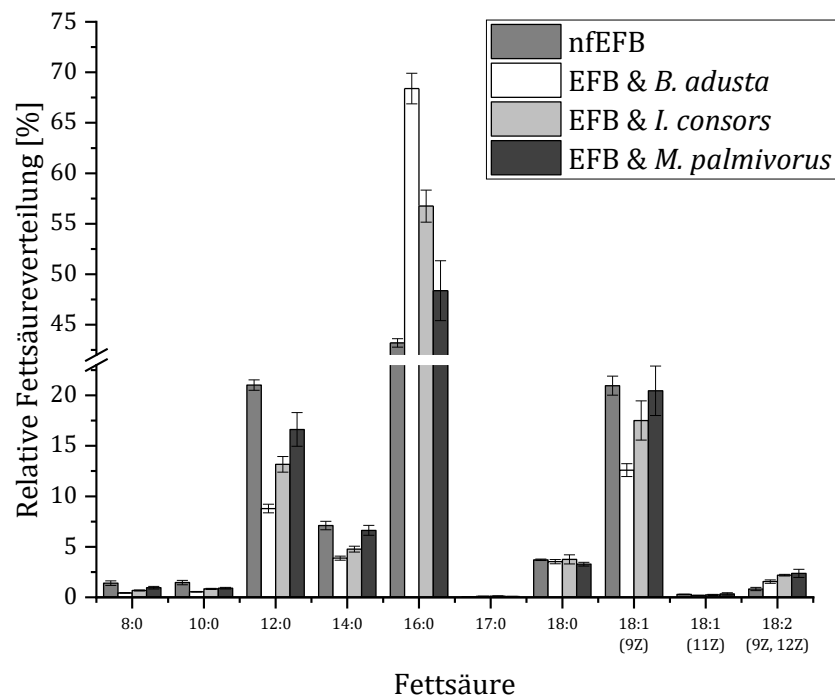


Abbildung 3: Fettsäureprofile der fermentierten EFB im Vergleich zur nicht-fermentierten Referenz; n=3 (\pm Standardabweichung).

In Abbildung 4 sind die Aminosäureprofile der unterschiedlichen Larvensubstrate dargestellt.

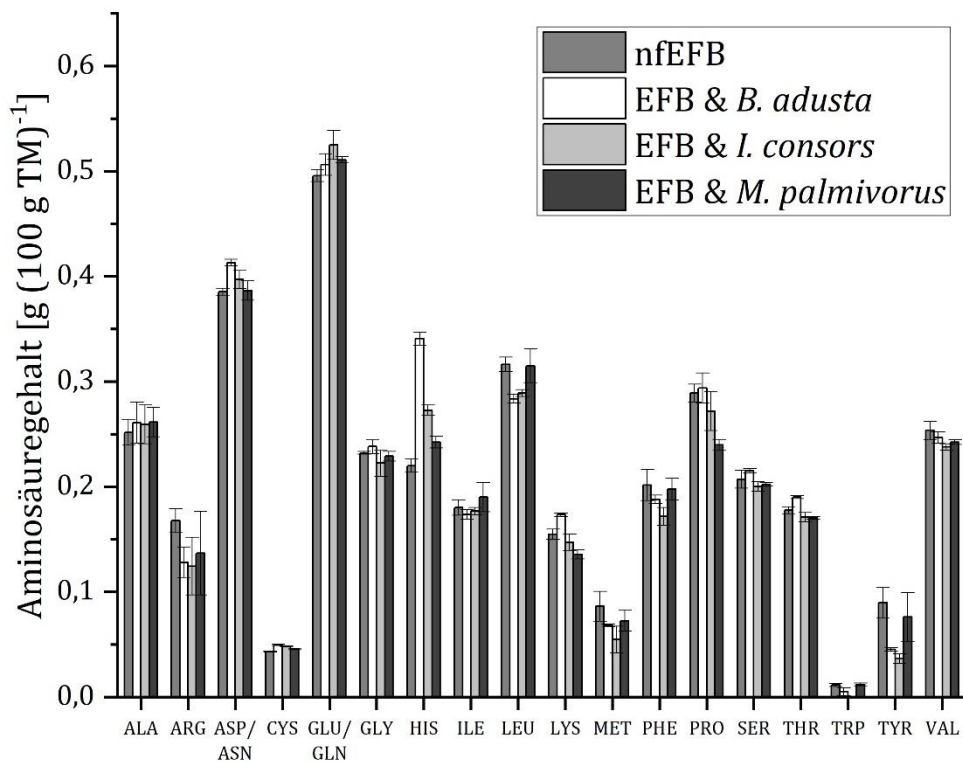


Abbildung 4: Aminosäureprofile der fermentierten EFB im Vergleich zur nicht-fermentierten Referenz; n=3 (\pm Standardabweichung) mit ASP als Summe aus ASP und ASN und GLU als Summe aus GLU und GLN.

Um das Pilzwachstum von *B. adusta* optisch nachzuweisen, wurden in Kooperation mit der THM, Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskop (engl.: *Environmental Scanning Electron Microscopy*; ESEM) durchgeführt. Nachstehend sind in Abbildung 5 die Aufnahmen der nicht-fermentierten EFB gezeigt.

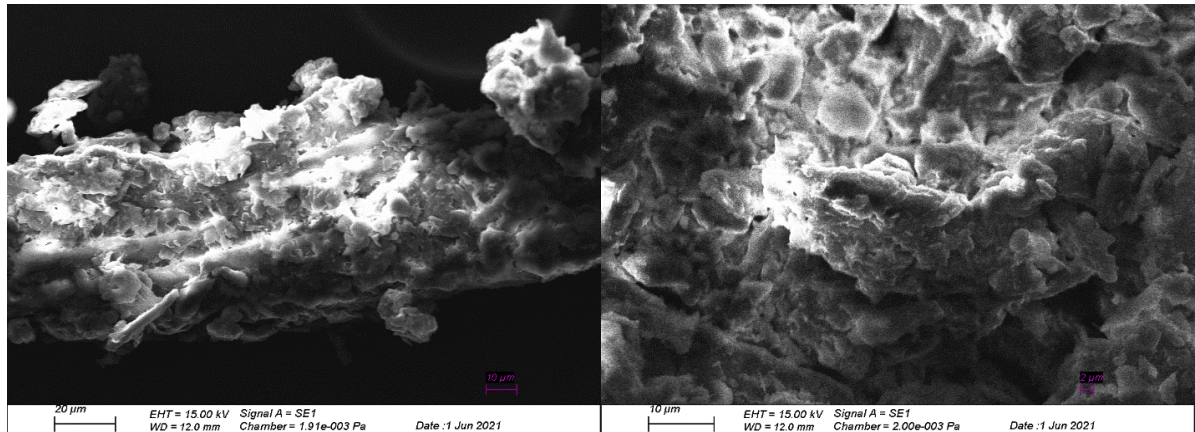


Abbildung 5: ESEM-Aufnahmen der nicht-fermentierten EFB.

Die Aufnahmen der fermentierten EFB sind in Abbildung 6 dargestellt. Um die faserigen Strukturen der EFB ist deutlich das gewachsene Pilzmyzel zu erkennen.

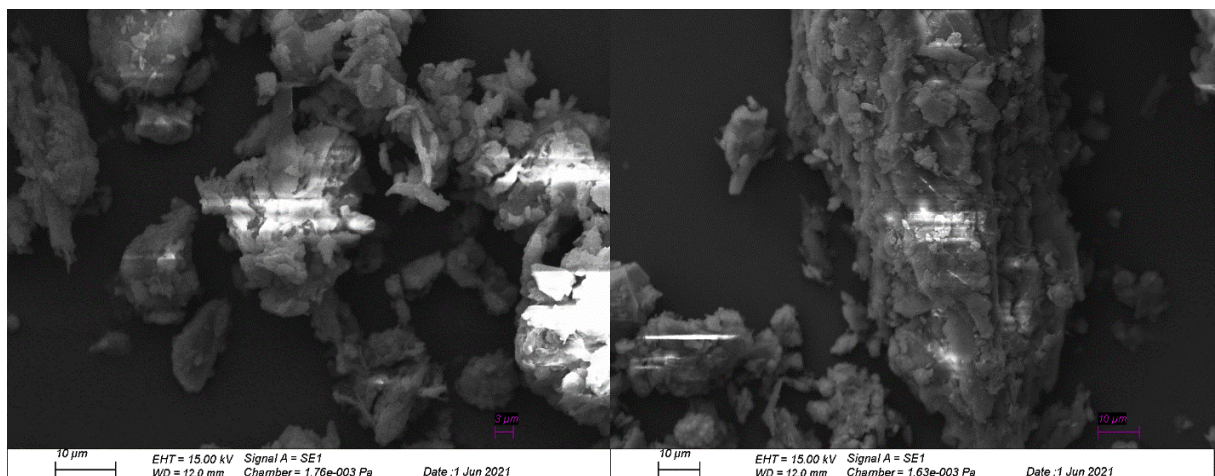


Abbildung 6: ESEM-Aufnahmen der mit *B. adusta* fermentierten EFB.

3.2 Fermentation von unterschiedlichen Nebenströmen der Bier- und Lupinenproteinindustrie

3.2.1 Wiederfindungsraten der Aminosäureanalytik

Für die Beurteilung der Proteinqualität der Substrate und Myzelien ist die Bestimmung der Aminosäureverteilung notwendig. Zur Qualitätskontrolle der Analytik wurde das Referenzprotein α -Lactalbumin aufgearbeitet und für die Bestimmung von Wiederfindungsraten verwendet. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Aminosäuren in Tabelle 31 aufgeführt. Tryptophan wies eine sehr geringe Wiederfindungsrate (WFR) von 21,5% auf. Die übrigen betragen bis auf Methionin (63,3%), mindestens 75%.

Tabelle 31: Aminosäuregehalte des Referenzproteins und daraus berechnete Wiederfindungsraten, $n=3$ (\pm Standardabweichung).

Aminosäure	AS-Gehalt [g (100 g) ⁻¹]	WFR [%]
ALA	1,8 (\pm 0,1)	96,1 (\pm 6,6)
ARG	1,0 (\pm 0,1)	81,4 (\pm 5,2)
ASN/ASP	16,7 (\pm 1,0)	85,0 (\pm 5,1)
CYS	5,2 (\pm 0,3)	76,2 (\pm 5,0)
GLN/GLU	12,2 (\pm 0,7)	89,6 (\pm 5,3)
GLY	2,7 (\pm 0,2)	85,9 (\pm 6,0)
HIS	3,2 (\pm 0,2)	98,3 (\pm 6,4)
ILE	5,6 (\pm 0,4)	76,1 (\pm 5,3)
LEU	10,4 (\pm 1,0)	86,7 (\pm 8,4)
LYS	10,7 (\pm 0,9)	86,4 (\pm 7,2)
MET	0,7 (\pm 0,1)	63,3 (\pm 5,0)
PHE	4,3 (\pm 0,3)	91,7 (\pm 6,4)
PRO	1,7 (\pm 0,1)	107,1 (\pm 7,7)
SER	4,3 (\pm 0,3)	83,5 (\pm 5,9)
THR	5,1 (\pm 0,4)	86,2 (\pm 6,0)
TRP	1,2 (\pm 0,1)	21,5 (\pm 1,5)
TYR	4,3 (\pm 0,3)	83,2 (\pm 5,8)
VAL	3,7 (\pm 0,3)	78,7 (\pm 5,2)

3.2.2 Analytik der Substrate

Die von der Störtebeker Braumanufaktur GmbH zur Verfügung gestellten Substrate Pilsener-, Weizenbier- und Schwarzbierdreber, wie auch die Seitenströme Lupinenklarlauf 1 und Lupinenfaser der PROLupin GmbH wurden auf ihre Nährstoffe untersucht. Eine Elementaranalyse wurde nach Abschnitt 2.3.3 durchgeführt. Außerdem wurden der Wasser- und Rohaschegehalt nach 2.3.2 beziehungsweise 2.3.10 bestimmt. Die Wassergehalte der Lupinenseitenströme wurden gravimetrisch nach Gefrier Trocknung bestimmt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Analytik der Substrate; $n=3$ (\pm Standardabweichung).

	Wassergehalt [%]	C [% TM]	N [% TM]	H [% TM]	Aschegehalt [% TM]
Pilsener-Treber	78,23 \pm 0,620	48,66 \pm 0,06	3,74 \pm 0,12	6,98 \pm 0,02	2,90 \pm 1,13
Schwarzbierdreber	79,39 \pm 0,467	47,36 \pm 0,14	3,15 \pm 0,09	6,94 \pm 0,03	3,31 \pm 0,02
Weizenbierdreber	82,00 \pm 2,09	47,92 \pm 0,23	3,23 \pm 0,12	7,17 \pm 0,03	2,80 \pm 0,03
Lupinenklarlauf 1	97,18 \pm 0,02676	-	-	-	2,12 \pm 0,05
Lupinenfaser	84,68 \pm 0,1010	-	-	-	11,44 \pm 0,21

Die Medien zur Pilzkultivierung wurden mit 20 g L⁻¹ Trockenmasse der jeweiligen Substrate angesetzt. Hierfür wurde die Trockenmasse des Trebers auf 20% und die der Lupinenfasern auf 15% gerundet. Der Lupinenklarlauf wurde anstelle von Wasser verwendet und die ermittelte Trockenmasse von ca. 2.8% aufgrund der Inhomogenität nicht bei der Berechnung der Trockenmasse des Mediums berücksichtigt.

Zusätzlich zur gravimetrischen Aschebestimmung wurde die Asche mittels ICP-OES nach Abschnitt 2.3.11 analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. In den Substraten wurde wenig Eisen und Zink nachgewiesen, der größte Anteil an Kalium und Magnesium wurde im Lupinenklarlauf 1 nachgewiesen. Die Mineralstoffgehalte der drei Bierdrebersorten waren vergleichbar.

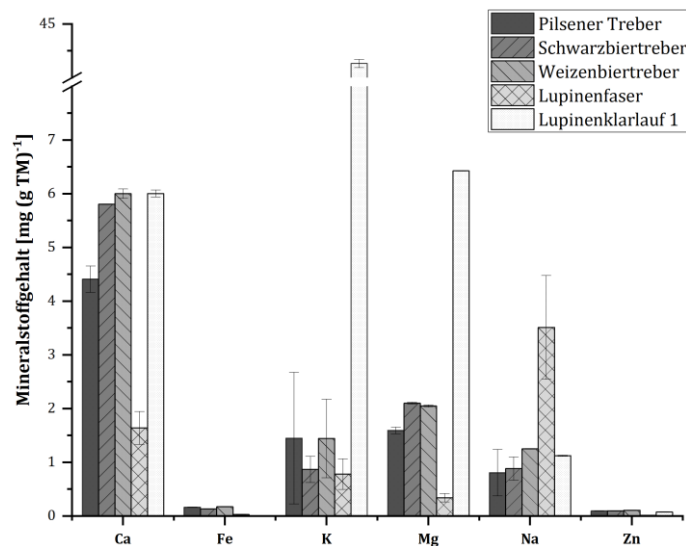


Abbildung 7: Mineralstoffgehalte der unterschiedlichen Treber und Lupinenprotein-Seitenströme; $n=3$ (\pm Standardabweichung).

Der Stickstoff- und Rohproteingehalt aller Substrate wurde mittels Kjeldahl (Abschnitt 2.3.4) bestimmt. Außerdem wurden der Aminosäuregehalt und die Proteinqualität der Substrate nach Abschnitt 2.3.5 bestimmt. Die Ergebnisse der Proteinanalytik sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Ergebnisse der Proteinanalytik der Substrate; $n=3$ (\pm Standardabweichung). Für die Biertreber wurde der Kjeldahlfaktor 5,8 für Getreide und Getreideprodukte und für die Lupinenprotein-Seitenströme der Kjeldahlfaktor 6,25 verwendet (Matissek und Fischer 2021).

	Stickstoffgehalt (Kjeldahl) [g (100 g TM) ⁻¹]	Rohproteingehalt (Kjeldahl) [g (100 g TM) ⁻¹]	Aminosäuregehalt [g (100 g TM) ⁻¹]	Biologische Wertigkeit
Pilsener-Treber	4,081 \pm 0,213	23,67 \pm 1,24	21,03 \pm 0,59	84 \pm 1
Schwarz- bier treber	3,185 \pm 0,153	18,47 \pm 0,89	16,09 \pm 0,30	84 \pm 3
Weizenbier treber	3,353 \pm 0,158	19,24 \pm 0,71	18,01 \pm 0,61	84 \pm 3
Lupinenklar- lauf 1	4,314 \pm 0,0228	26,96 \pm 0,10	26,94 \pm 1,58	74 \pm 4
Lupinenfaser	2,735 \pm 0,0173	17,09 \pm 0,077	14,59 \pm 0,38	87 \pm 1

Die Aminosäureverteilung ist in Abbildung 8 dargestellt.

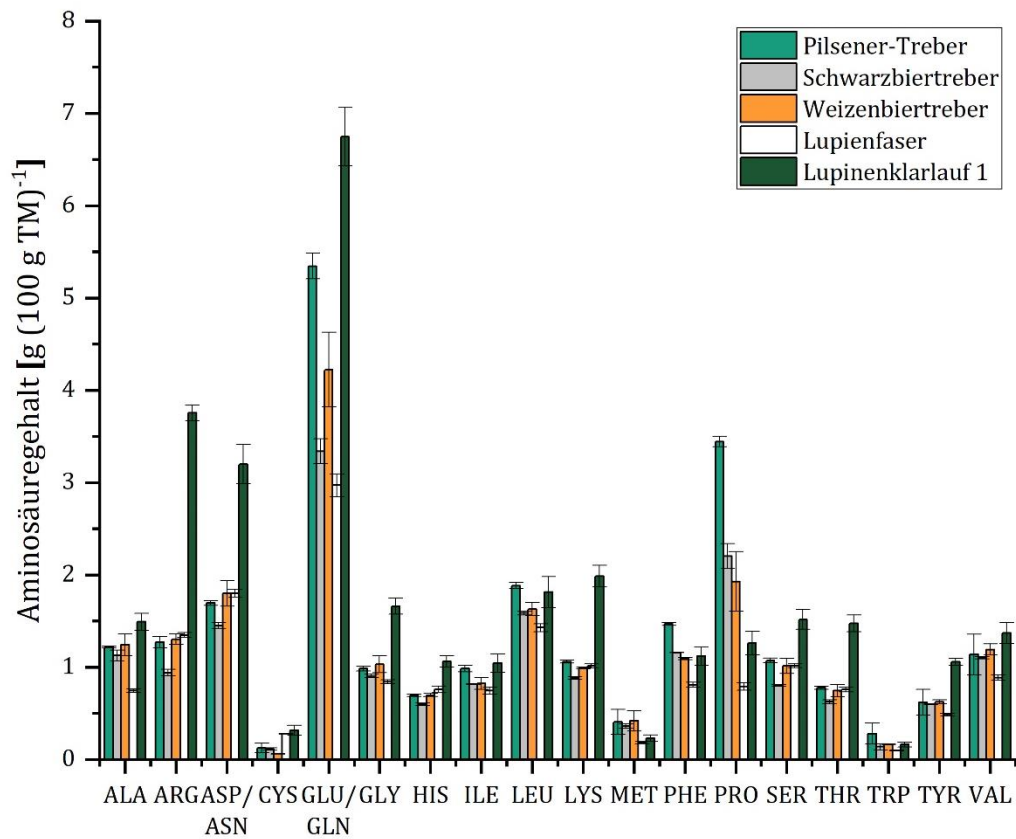


Abbildung 8: Aminosäurezusammensetzung der Substrate; $n=3$ (\pm Standardabweichung).

3.2.3 Screening von Speisepilzen in Emerskulturen

Für das Screening der Speisepilze wurden fünf unterschiedliche Agar-Medien mit den unterschiedlichen Seitenströmen verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). Nachstehend ist die Wachstumsgeschwindigkeit schnell wachsender Pilze auf den Seitenströmen im Vergleich zu Malzextrakt-Agar gezeigt (Abbildung 9 bis Abbildung 11). *P. eryngii* zeigte auf allen fünf Medien ein schnelleres Wachstum als auf dem Standardmedium aus Malzextrakt.

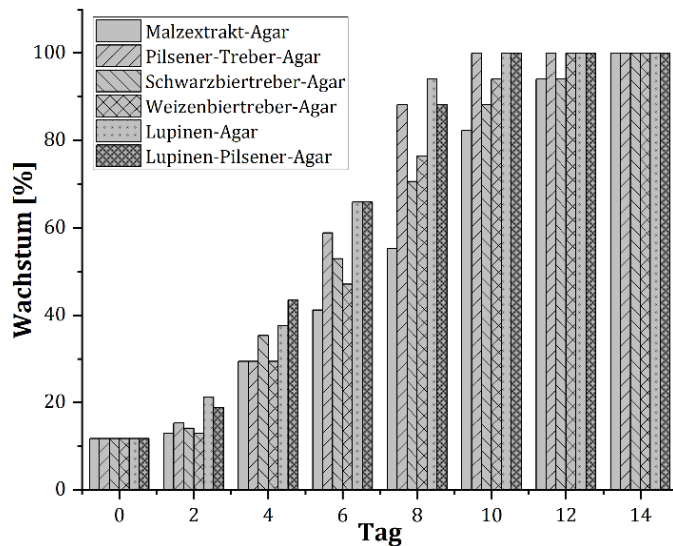


Abbildung 9: Wachstumsverhalten von *P. eryngii* in Emerskulturen bis Kulturtag 14 (links) und Foto der Agarplatte von *P. eryngii* auf Pilsener-Treber-Agar an Kulturtag acht (rechts). Das Wachstum gibt an, wie viel Prozent der Agarplatte (Durchmesser von 8 cm) bewachsen war.

Die Geruchseindrücke der Biertreber-Agarplatten mit *P. eryngii* waren überwiegend neutral, ab Tag acht zeigten sich süße, honigartige Noten. Auch auf den Agar-Medien mit Lupinenseitenströmen wies *P. eryngii* einen angenehmen Geruchseindruck auf, der jedoch im Vergleich zu den reinen Biertreber-Medien deutlich fruchtiger erschien. Abbildung 10 zeigt das Wachstumsverhalten von *P. nameko* und ein Foto des Pilzes auf Pilsener-Treber-Medium.

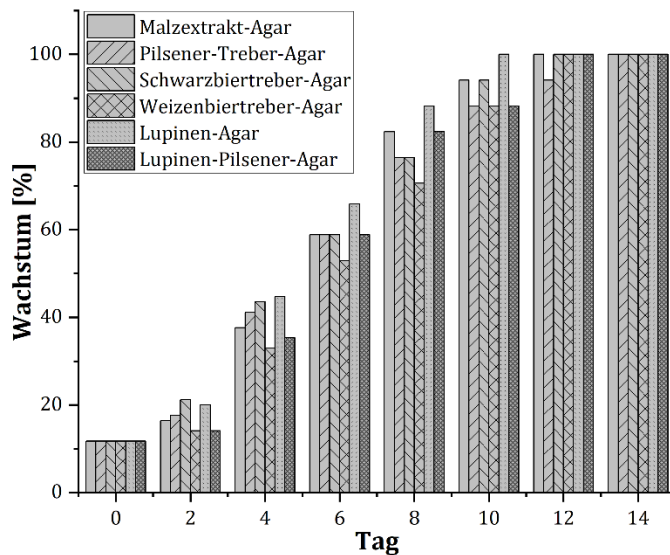


Abbildung 10: Wachstumsverhalten von *P. nameko* in Emerskulturen bis Kulturtag 14 (links) und Foto der Agarplatte von *P. nameko* auf Pilsener-Treber-Agar an Kulturtag zehn (rechts). Das Wachstum gibt an, wie viel Prozent der Agarplatte (Durchmesser von 8 cm) bewachsen war.

P. nameko wies auf den Agarplatten mit Biertreber ein durchweg neutrales Aroma auf und zeigte ein vergleichbar schnelles Wachstum auf allen Agar-Medien. Auf den Agarplatten, welche Lupinenseitenströme enthielten, waren die Geruchseindrücke pilzartig bis erdig.

Abbildung 11 zeigt das Wachstumsverhalten von *P. salmoneo-stramineus*.

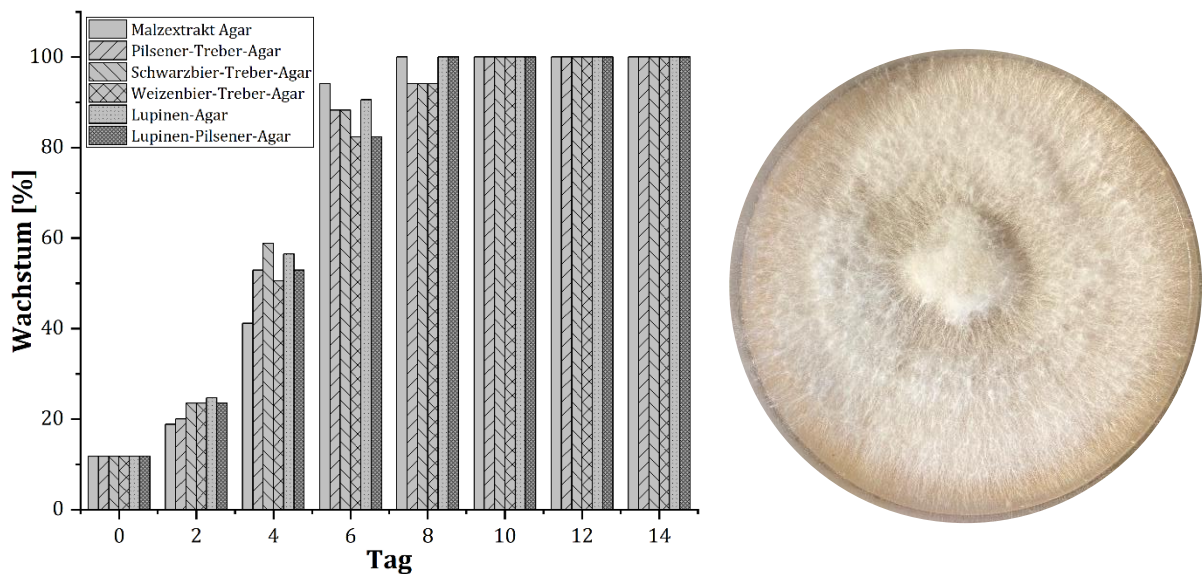


Abbildung 11: Wachstumsverhalten von *P. salmoneo-stramineus* in Emerskulturen bis Kulturtag 14 (links) und Foto der Agarplatte von *P. salmoneo-stramineus* auf Pilsener-Treber-Medium an Kulturtag acht (rechts). Das Wachstum gibt an, wie viel Prozent der Agarplatte (Durchmesser von 8 cm) bewachsen war.

P. salmoneo-stramineus zeigte auf allen Medien ein schnelles Wachstum. Der Pilz wies vor allem zu Beginn der Kultivierung einen anisartigen, fruchtigen und frischen Geruchseindruck auf den Medien mit Lupinenseitenströmen auf. Im Folgenden wurden die drei Pilze in submers kultiviert, um das Wachstum, die Rohproteingehalte und die Geruchseindrücke zu bestimmen.

3.2.4 Screening in Submerskulturen

Nach dem Screening auf Agar-Platten wurden ausgewählte Pilze, die besonders schnelles Wachstum zeigten, submers kultiviert. Als Hauptkulturmedium wurde 20 g L^{-1} Trockenmasse Biertreber (100 g L^{-1}) in vollständig entsalztem Wasser genutzt (Abschnitt 2.2.4.2). Die Kulturen wurden ab Tag drei an jedem zweiten Tag bis zum Kulturtag elf geerntet und die Biotrockenmasse sowie der Rohproteingehalt der Kulturen bestimmt. Für die Berechnung des Rohproteingehalts der Fermentate wurde ein Kjeldahlfaktor von 6,25 genutzt. Für Kulturtag null wurde der Proteingehalt der Treber genutzt (Abschnitt 2.3.1). Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Biomasse- und Rohproteingehalte der Kulturen von *P. eryngii* in Submerskultur mit Pilsener-Treber-Medium. Die Biotrockenmasse nahm im Kulturverlauf ab, der Proteingehalt betrug konstant 22 bis $24 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$.

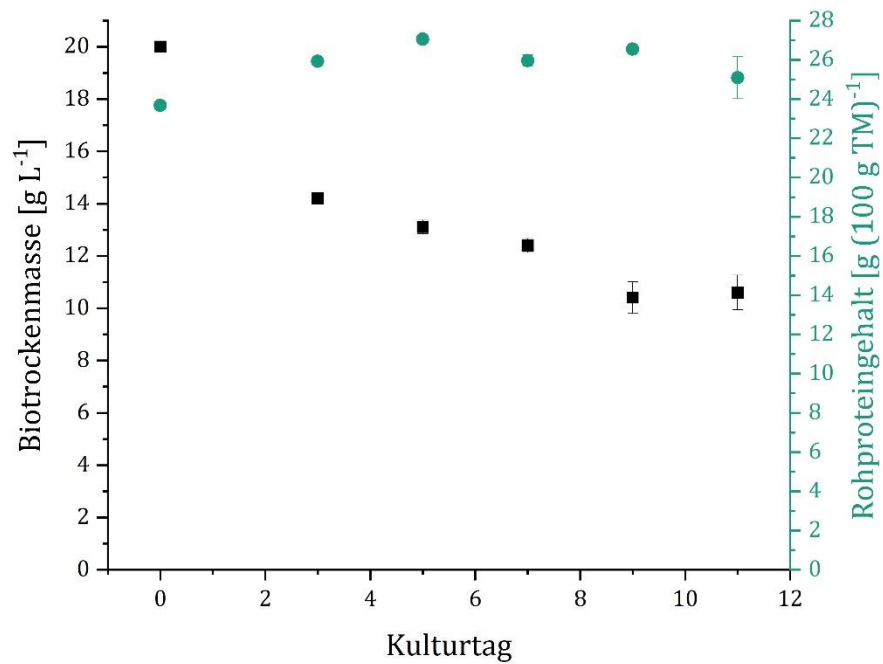


Abbildung 12: Biotrockenmasse und Rohproteingehalt von submers kultiviertem *P. eryngii* mit Pilsener-Treber-Medium in VE-Wasser in Abhängigkeit von der Kulturdauer; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

P. nameko wurde in Weizenbiertreber-Medium submers kultiviert. Die Ergebnisse der Biotrockenmasse- und Rohprotein-Bestimmung sind in Abbildung 13 dargestellt. Der Proteingehalt wurde während der Fermentation im Vergleich zum Biertreber leicht gesteigert.

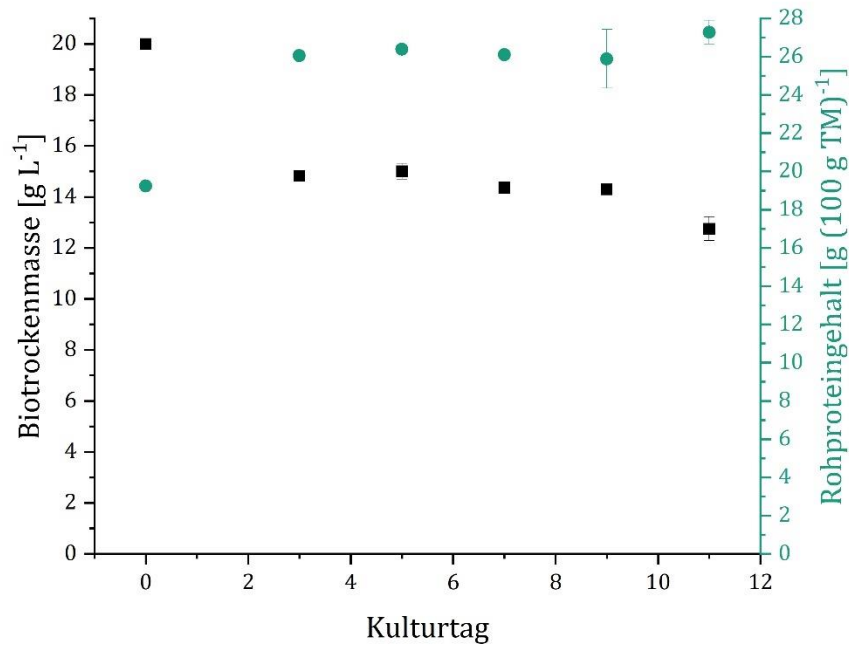


Abbildung 13: Biotrockenmasse und Rohproteingehalt von *submers* in Weizenbiertreber-Medium kultiviertem *P. nameko* in Abhängigkeit von der Kulturdauer; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Außerdem wurden die Pilze in Flüssigmedien mit den Seitenströmen der Lupinenproteinindustrie gezüchtet. *P. eryngii* wurde in einem Medium aus 100 g L^{-1} Weizenbiertreber mit Lupinenklarlauf 1 anstelle von VE-Wasser (920 mL) kultiviert. Die Kulturen von *P. eryngii* zeigten einen sehr ansprechenden, fruchtigen, himbeer- und honigartigen Geruch.

Auch die Medien mit Lupinenfasern wurden für das Submersscreening genutzt. Der Pilz *Pleurotus salmoneo-stramineus* wurde in dem Lupinen-Weizenbiertreber-Medium (Tabelle 7) kultiviert, welches neben Weizenbiertreber auch Lupinenfasern und Lupinenklarlauf 1 enthielt. Die Biotrockenmassen und Rohproteingehalte (Kjeldahlfaktor 6,25) sind in Abbildung 14 gezeigt.

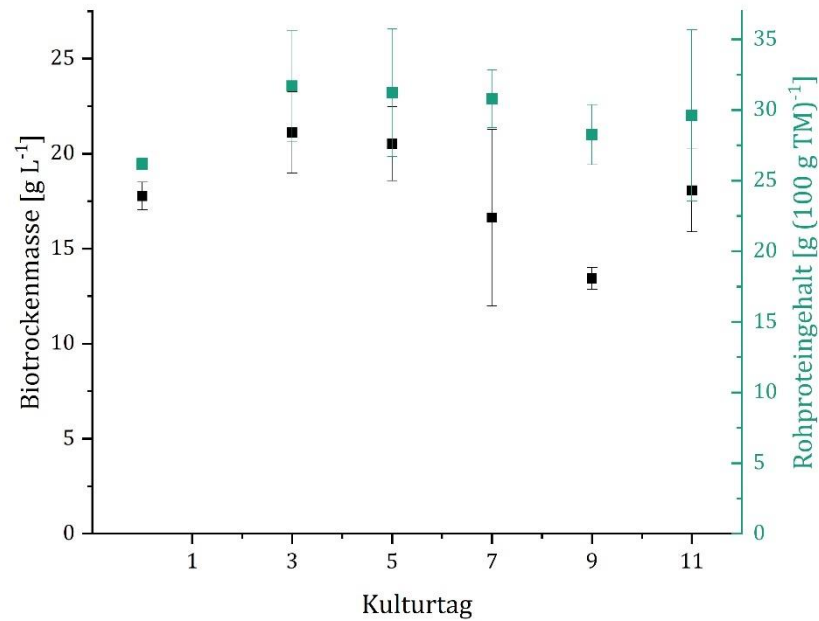


Abbildung 14: Biotrockenmasse und Rohproteingehalt von submers kultiviertem *P. salmoneo-stramineus* in Lupinen-Weizenbierreber-Medium in Abhängigkeit von der Kulturdauer; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Der Rohproteingehalt des Fermentats wurde durch die Fermentation angehoben. Dennoch wurde der Ansatz mit dem Lupinen-Weizenbierreber-Medium, mit Lupinenfasern und Lupinenklarlauf 1 als Zusatz zu den Medien nicht weiterverfolgt, da die Geruchseindrücke bei den getesteten Pilzen nicht ansprechend waren. *P. salmoneo-stramineus* wies beispielsweise einen typischen Anis-artigen, leicht fruchtigen Geruchseindruck auf und roch ab Kulturtag 7 säuerlich-muffig. Außerdem waren die biologischen Schwankungen des Wachstums und Proteingehalts größer als bei Kulturen ohne Zusatz von Lupinenfasern. Auch die Medien, welche sich ausschließlich aus Lupinenseitenströmen zusammensetzten, (Tabelle 7) wiesen bei Fermentation mit unterschiedlichen Pilzen wie *P. ostreatus* oder *P. eryngii* ab Kulturtag 7 muffige Geruchseindrücke auf.

3.2.5 *Pleurotus eryngii*

Die Medien wurden variiert, um den Pilz- und Proteingehalt der Kulturen zu optimieren. Das Medium aus Lupinenklarlauf 1 und Weizenbiertreber, welches im vorangegangenen Screening zu einem ansprechenden Geruchseindruck führte wurde wiederholt. Die Zusammensetzung des Mediums mit Weizenbiertreber in Lupinenklarlauf 1 ist in Tabelle 7 aufgeführt. Das Medium enthielt 20 g L^{-1} Trockenmasse Weizenbiertreber und Lupinenklarlauf 1 als Ersatz für VE-Wasser. Die Hauptkulturen wurden nach Abschnitt 2.2.4.2 angesetzt. Hierbei sollte der Geruchseindruck reproduziert, das Pilzwachstum und der Proteingehalt analysiert werden. Parallel dazu wurden die in Tabelle 8 aufgeführten *Fed-Batch*-Ansätze als Medium getestet und analysiert. Die Ergebnisse der Rohprotein- und Pilzgehalte der Kulturen ist in Abbildung 15 gezeigt.

Die Rohproteingehalte der Proben wurde aufgrund des Zusatzes von Lupinenklarlauf mit dem Kjeldahlfaktor 6,25 berechnet. Die Ergosterolbestimmung erfolgte mit der Methode nach Abschnitt 2.3.9.1. Die Ergosterolgehalte, aus denen sich die Pilzgehalte nach Gleichung (19) mithilfe der Kulturen in Malzextrakt-Medium, ebenfalls an Kulturtag 7 geerntet ergaben, sind im Anhang, Abschnitt 7.2.1, Tabelle 54 aufgeführt. Der Ergosterolgehalt von *P. eryngii* in Malzextrakt-Medium, mit dem die Pilzgehalte berechnet wurden betrug $7,30 (\pm 0,28) \text{ mg g}^{-1} \text{ TM}$

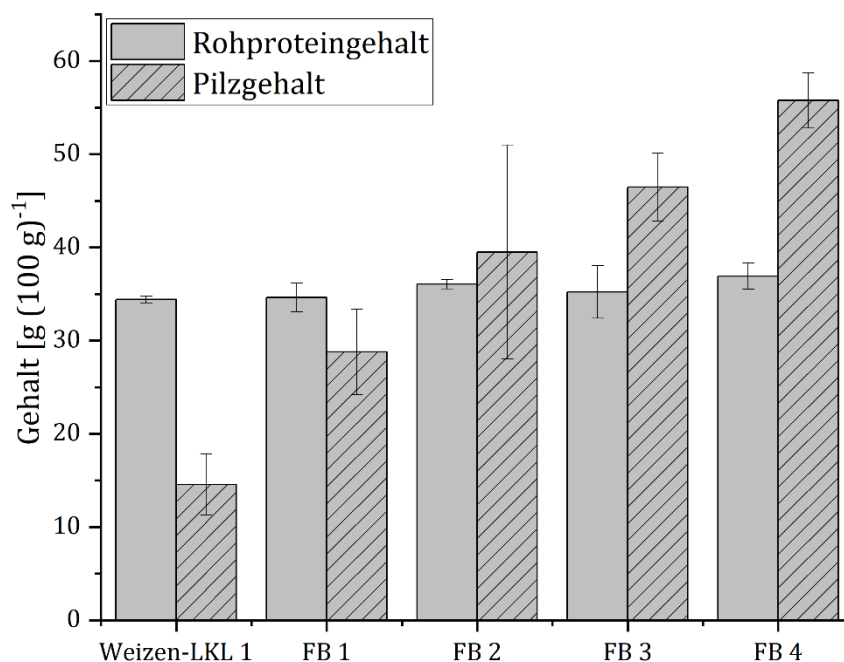


Abbildung 15: Rohprotein- und Pilzgehalte der *Fed-Batch* (FB)-Kulturen von *P. eryngii* im Vergleich mit der nicht gefütterten Kultur; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Die Aminosäureverteilung der Myzelien aus den *Fed-Batch*-Kulturen sind in Abbildung 16 gezeigt.

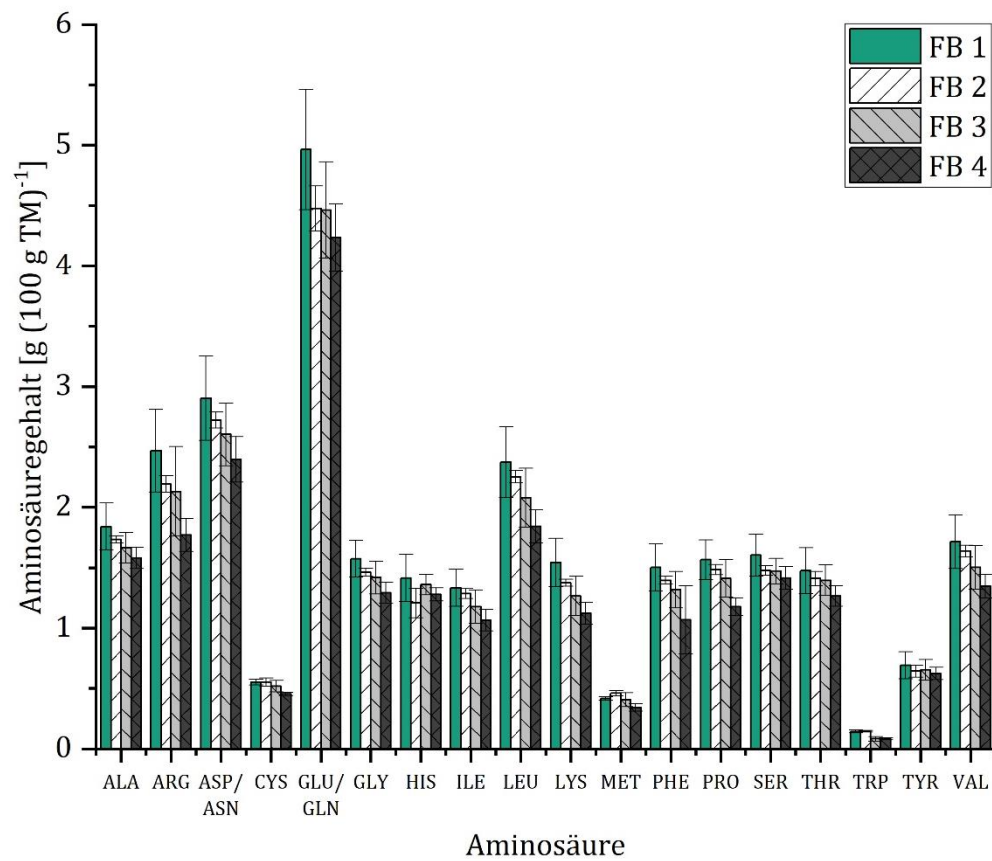


Abbildung 16: Aminosäureverteilung der Myzelien von *P. eryngii* in den Fed-Batch Kulturen, $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Die berechneten Kennzahlen zur Proteinqualität und die Kjeldahlfaktoren sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Biotrockenmassen, Stickstoff-, Aminosäuregehalte und daraus berechnete Kjeldahlfaktoren und die berechneten Kennzahlen der Proteinqualität von *P. eryngii* in den unterschiedlichen FB-Medien; n=2 (\pm halbe Spannweite).

	FB 1	FB 2	FB 3	FB 4
Biotrockenmassen [g L⁻¹]	28,19 (\pm 0,62)	27,37 (\pm 0,20)	22,09 (\pm 0,21)	19,22 (\pm 0,19)
Stickstoffgehalt nach Kjeldahl [g (100 g)⁻¹]	4,91 (\pm 0,17)	4,97 (\pm 0,15)	4,74 (\pm 0,16)	5,06 (\pm 0,20)
Kjeldahlfaktor Rohprotein	5,98 (\pm 0,03)	6,04 (\pm 0,06)	6,00 (\pm 0,03)	6,03 (\pm 0,04)
Kjeldahlfaktor Reinprotein	5,23 (\pm 0,62)	4,83 (\pm 0,12)	4,87 (\pm 0,33)	4,12 (\pm 0,14)
Aminosäuregehalt [g (100 g)⁻¹]	30,08 (\pm 3,10)	27,91 (\pm 0,50)	26,92 (\pm 2,54)	24,35 (\pm 1,59)
Amino acid residue [g (100 g)⁻¹]	25,83 (\pm 2,67)	23,95 (\pm 0,43)	23,11 (\pm 2,19)	20,89 (\pm 1,37)
EAAI	99 (\pm 0)	99 (\pm 0)	98 (\pm 0)	98 (\pm 1)
BW	96 (\pm 0)	96 (\pm 0)	95 (\pm 0)	95 (\pm 1)
Limitierende AS	Lysin	Lysin	Lysin	Lysin

Weitere *Fed-Batch*-Kulturen wurden mit lediglich 10 g TM Biotreber pro Liter Medium mit VE-Wasser anstelle des Lupinenklarlaufs angesetzt, da diese in den vorherigen Experimenten einen höheren Pilzgehalt zeigten als die Kulturen mit 20 g Trockenmasse Treber pro Liter Medium. Die Medienzusammensetzung ist in Tabelle 9 aufgeführt, die Vorkulturen wurden ebenfalls zweimal mit VE-Wasser gewaschen. Es wurden die Biotrockenmassen, Rohproteingehalte und die Ergosterolgehalte der Kulturen bestimmt. Die Kultur von *P. eryngii* in Malzextrakt hatte einen Ergosterolgehalt von 3,524 (\pm 0,065) mg (g TM)⁻¹. Die Trockenmasse, der Rohproteingehalt ($f=6,25$) nach Kjeldahl und der Ergosterolgehalt mit dem daraus resultierenden Pilzgehalt sind in Tabelle 35 aufgeführt. Der Pilzanteil war signifikant geringer als mit Lupinenklarlauf als Wasserersatz.

Tabelle 35: Ergebnisse der Analytik der *Fed-Batch*-Kulturen von *P. eryngii* in VE-Wasser; n=2 (\pm halbe Spannweite).

	FB 5	FB 6	FB 7	FB 8
Biotrockenmasse [g L⁻¹]	7,978 (\pm 0,354)	7,659 (\pm 0,166)	7,540 (\pm 0,520)	7,784 (\pm 0,238)
Rohproteingehalt [g (100 g)⁻¹]	23,44 (\pm 1,71)	24,83 (\pm 0,137)	24,75 (\pm 0,450)	26,72 (\pm 0,204)
Ergosterolgehalt [mg (g TM)⁻¹]	0,6*	0,752 (\pm 0,0682)	0,697 (\pm 0,116)	0,567 (\pm 0,0099)
Pilzgehalt [%]	16,5	19,7 (\pm 1,94)	18,2 (\pm 3,29)	14,8 (\pm 0,28)

*Nur eine Einfachbestimmung

Als nächstes wurden Vorkulturen von *P. eryngii* auf ihren Ergosterolgehalt untersucht, um den Einfluss auf den Pilzgehalt in den Hauptkulturen zu analysieren. Hierfür wurden Vorkulturen von

P. eryngii an verschiedenen Kulturtagen geerntet und auf den Ergosterolgehalt analysiert. Die Ergebnisse der Biotrockenmassen und der Ergosterolgehalte, sowohl pro Gramm Biotrockenmasse als auch pro 100 mL Kulturvolumen sind in Abbildung 17 gezeigt.

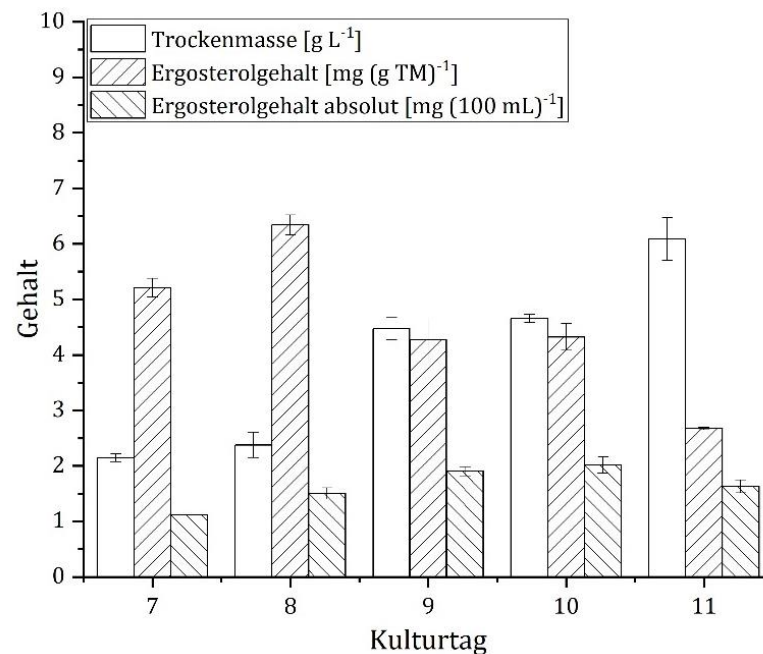


Abbildung 17: Biotrockenmassen und Ergosterolgehalte der Vorkulturen von *P. eryngii*; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Die Biomasse der Vorkulturen stieg bis Tag elf kontinuierlich an. Der Ergosterolgehalt war an Tag acht am höchsten. Der absolute Ergosterolgehalt der Kulturen wies an Tag zehn das Maximum auf.

Die Hauptkulturen in Malzextraktmedium und Weizenbiertreber-Medium mit 10 g Trockenmasse Biertreber pro Liter Medium wurden mit den unterschiedlichen Vorkulturen angesetzt und an Kulturtag fünf bzw. sieben geerntet. Es wurden hierfür Vorkulturen genutzt, die sieben, acht beziehungsweise zehn Tage alt waren. Die Biotrockenmassen und Ergosterolgehalte der Malzextrakt-Kulturen sind in Tabelle 36 aufgeführt.

Tabelle 36: Ergebnisse der Analytik von *P. eryngii* in Malzextraktmedium mit unterschiedlichen Vorkulturen; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

	Kulturtag	Vorkultur 7 Tage	Vorkultur 8 Tage	Vorkultur 10 Tage
Biotrockenmasse [g L⁻¹]	5	5,79 (\pm 0,48)	5,71 (\pm 0,17)	4,95 (\pm 0,46)
Ergosterolgehalt [mg (g TM)⁻¹]		3,41 (\pm 0,09)	3,68 (\pm 0,008)	4,69 (\pm 0,13)
Biotrockenmasse [g L⁻¹]	7	6,64 (\pm 0,22)	8,20 (\pm 1,52)	6,71 (\pm 0,060)
Ergosterolgehalt [mg (g TM)⁻¹]		3,83 (\pm 0,03)	4,55 (\pm 0,34)	4,68 (\pm 0,03)

Die Biotrockenmassen und Pilzgehalte der Kulturen mit Weizenbiertreber-Medium sind in Tabelle 37 gezeigt. Zur Berechnung der Pilzgehalte wurde jeweils der Ergosterolgehalt der parallel angesetzten Kultur in ME-Medium an Tag sieben (Tabelle 36) genutzt. Dieser betrug bei Verwendung der siebentägigen Vorkultur $3,8 \text{ mg (g TM)}^{-1}$.

Tabelle 37: Ergebnisse der Analytik von *P. eryngii* in Weizenbiertreber und VE-Wasser mit unterschiedlichen Vorkulturen; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

	Kulturtag	Vorkultur 7 Tage	Vorkultur 8 Tage	Vorkultur 10 Tage
Biotrockenmasse [g L⁻¹]	5	7,00 ($\pm 0,458$)	5,71 ($\pm 0,170$)	4,95 ($\pm 0,460$)
Pilzgehalt [g (100 g TM)⁻¹]		37 ($\pm 1,8$)	31 ($\pm 1,6$)	($\pm 1,0$)
Biotrockenmasse [g L⁻¹]	7	6,41 ($\pm 0,0384$)	8,20 ($\pm 1,52$)	6,71 ($\pm 0,06$)
Pilzgehalt [g (100 g TM)⁻¹]		38 ($\pm 1,3$)	35 ($\pm 1,7$)	36 ($\pm 0,2$)

Zur Optimierung des Kulturmediums wurde Mangansulfat als Supplement getestet. Die Biotrockenmassen, Rohproteingehalte und Ergosterolgehalte sind in Tabelle 38 aufgeführt. Die Ergosterolgehalte der Kulturen in supplementierten Medien waren im Vergleich zu denen der Kulturen ohne Mangansulfat sehr gering.

Tabelle 38: Ergebnisse der Analytik der supplementierten Kulturen von *P. eryngii* mit Mangansulfat im Vergleich zu den nicht supplementierten Kulturen; verwendeter Kjeldahlfaktor 6,25; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

	Ernte nach fünf Kulturtagen		Ernte nach sieben Kulturtagen	
	Weizenbiertreber-Medium	Weizenbiertreber-Medium und MnSO ₄	Weizenbiertreber-Medium	Weizenbiertreber-Medium und MnSO ₄
Biotrockenmasse [g L⁻¹]	8,15 ($\pm 0,092$)	8,46 ($\pm 0,27$)	7,96 ($\pm 0,082$)	8,43 ($\pm 0,23$)
Rohproteingehalt [g (100 g)⁻¹]	22,02 ($\pm 0,32$)	23,74 ($\pm 0,24$)	20,65 ($\pm 0,13$)	23,22 ($\pm 0,038$)
Ergosterolgehalt [mg (g TM)⁻¹]	0,85 ($\pm 0,06$)	0,008 ($\pm 0,00$)	0,79 ($\pm 0,05$)	0,10 ($\pm 0,09$)
Pilzgehalt [%]	23 ($\pm 1,6$)	0,2 ($\pm 0,05$)	21 ($\pm 1,3$)	5 ($\pm 2,4$)

Als weitere Medienoptimierung wurde die Menge an Weizenbiertreber im Medium von 2,5 bis 100 g L^{-1} getestet und die Kulturen nach sieben Tagen auf ihre Pilz- und Rohproteingehalte analysiert. Die Biotrockenmassen und die Ergosterolgehalte sind in Tabelle 39 aufgeführt.

Tabelle 39: Biotrockenmassen und Ergosterolgehalte der Kulturen von *P. eryngii* in unterschiedlichen Weizenbiertreber-Medien; n=3 (\pm Standardabweichung).

Menge an Biertreber [g TM L ⁻¹]	Biotrockenmasse [g L ⁻¹]	Ergosterolgehalt [mg g ⁻¹]
2,5	1,81 (\pm 0,131)	2,50 (\pm 0,0199)
5	2,95 (\pm 0,151)	2,22 (\pm 0,116)
10	6,65 (\pm 0,109)	1,28 (\pm 0,0733)
20	13,87 (\pm 0,165)	0,996 (\pm 0,0215)
30	21,73 (\pm 0,195)	0,844 (\pm 0,0178)
40	28,73 (\pm 0,904)	0,785 (\pm 0,0290)
50	36,19 (\pm 0,755)	0,642 (\pm 0,0378)
60	35,91 (\pm 0,692)	0,640 (\pm 0,0144)
70	46,12 (\pm 0,468)	0,549 (\pm 0,0605)
80	52,58 (\pm 3,55)	0,533 (\pm 0,0244)
90	52,90 (\pm 3,80)	0,588 (\pm 0,0155)
100	62,58 (\pm 0,0733)	0,544 (\pm 0,0133)

Die sich aus Tabelle 39 in Verbindung mit Gleichung (19) ergebenden Pilzgehalte sind in Abbildung 18 gezeigt. Der Pilzgehalt wurde jeweils mit dem Ergosterolgehalt von 3,8 mg g⁻¹ reinem Pilz berechnet.

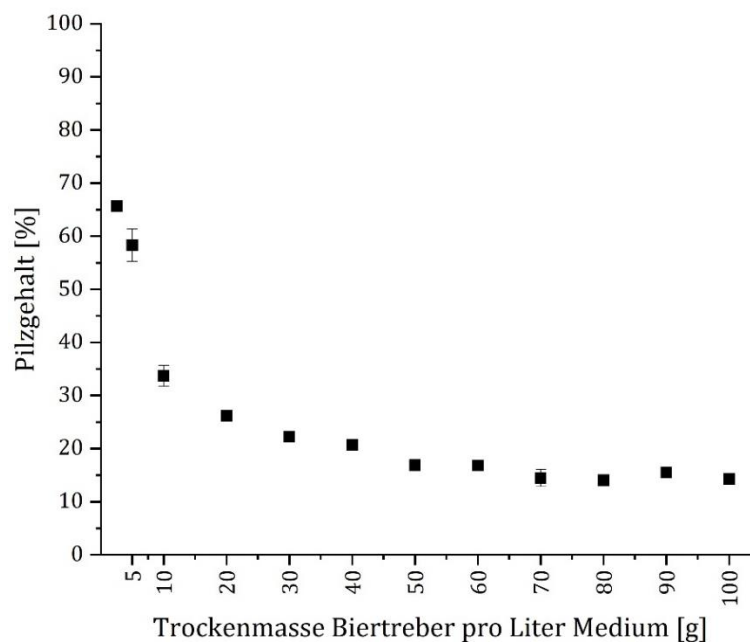


Abbildung 18: Pilzgehalte der Kulturen von *P. eryngii* in Weizenbiertreber-Medium mit unterschiedlichen Mengen an Weizenbiertreber; n=3; als Fehler sind die Standardabweichungen angegeben.

Die Rohproteingehalte der Fermentate sind in Abbildung 19 gezeigt. Für die Bestimmung der Rohproteingehalte wurde der Kjeldahlfaktor von 6,25 genutzt.

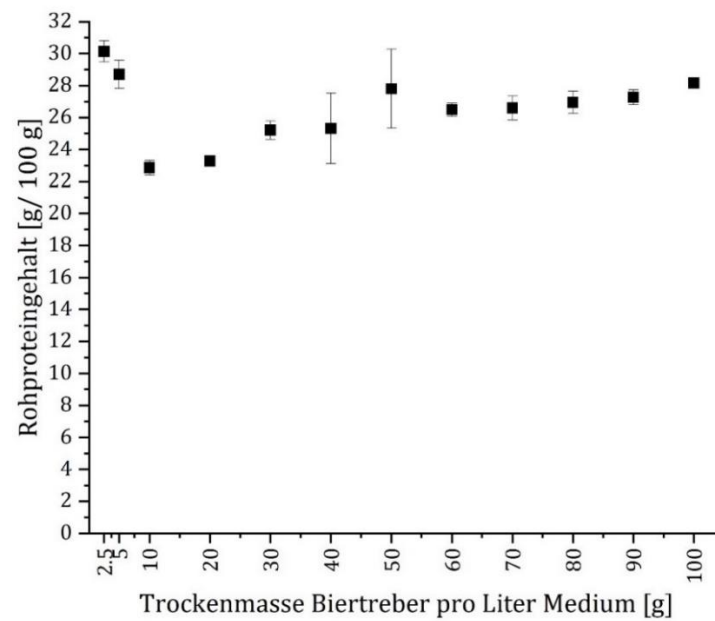


Abbildung 19: Rohproteingehalte der Kulturen von *P. eryngii* in Weizenbiertreber-Medium mit unterschiedlichen Gehalten an Weizenbiertreber; $n=3$ (\pm Standardabweichung).

Um die Proteinqualität zu bewerten, wurde von den drei Proben mit dem höchsten Pilzgehalt die Aminosäureverteilung bestimmt (Abbildung 20).

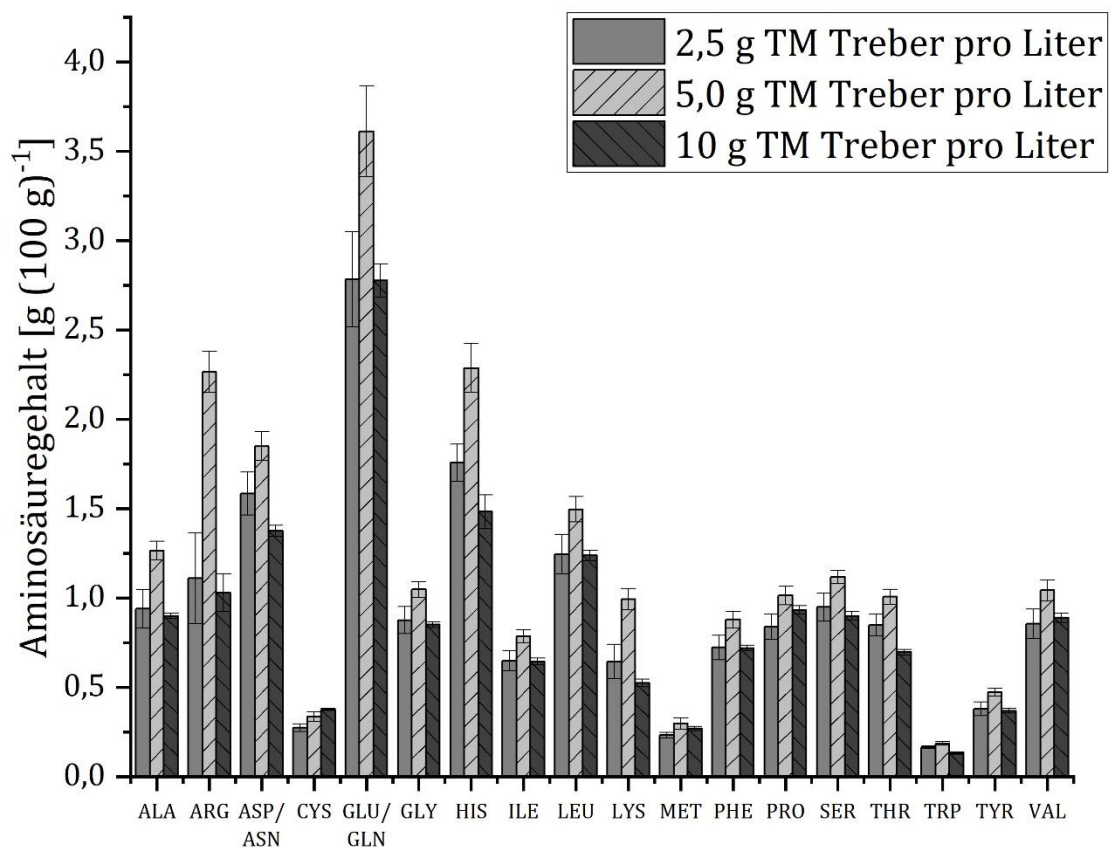


Abbildung 20: Aminosäuregehalte von *P. eryngii* in Weizenbiertreber-Medium mit unterschiedlichen Gehalten Treber, $n=3$ (\pm Standardabweichung).

Tabelle 40: Kjeldahlfaktoren und Kennzahlen zur Proteinqualität der Kulturen von *P. eryngii* in Weizenbier treber-Medien; n=3 (\pm Standardabweichung).

	2,5 g TM Treber pro Liter Medium	5 g TM Treber pro Liter Medium	10 g TM Treber pro Liter Medium
Stickstoffgehalt nach Kjeldahl [g (100 g)⁻¹]	4,823 (\pm 0,105)	4,593 (\pm 0,142)	3,657 (\pm 0,075)
Kjeldahlfaktor Rohprotein	5,80 (\pm 0,06)	5,51 (\pm 0,02)	5,91 (\pm 0,03)
Kjeldahlfaktor Reinprotein	3,00 (\pm 0,27)	4,12 (\pm 0,27)	3,78 (\pm 0,04)
Aminosäuregehalt [g (100 g)⁻¹]	16,85 (\pm 1,93)	21,94 (\pm 1,13)	16,09 (\pm 0,50)
Amino acid residue [g (100 g)⁻¹]	14,48 (\pm 1,36)	18,90 (\pm 0,80)	13,82 (\pm 0,35)
EAAI	93 \pm 1	91 \pm 2	91 \pm 1
BW	89 \pm 1	88 \pm 2	88 \pm 1
Limitierende AS	Lysin	Lysin	Lysin

Abbildung 21 zeigt ESEM-Aufnahmen von *P. eryngii* welcher in in Malzextraktmedium kultiviert wurden.

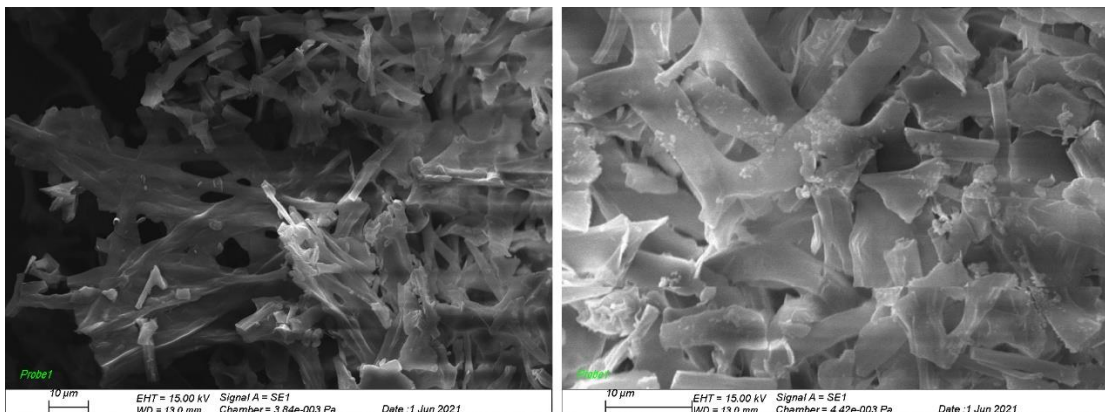


Abbildung 21: ESEM-Aufnahme von *P. eryngii*-Myzel, kultiviert in Malzextraktmedium.

Abbildung 22 zeigt die Aufnahmen von reinem Weizenbier treber, unbewachsen.

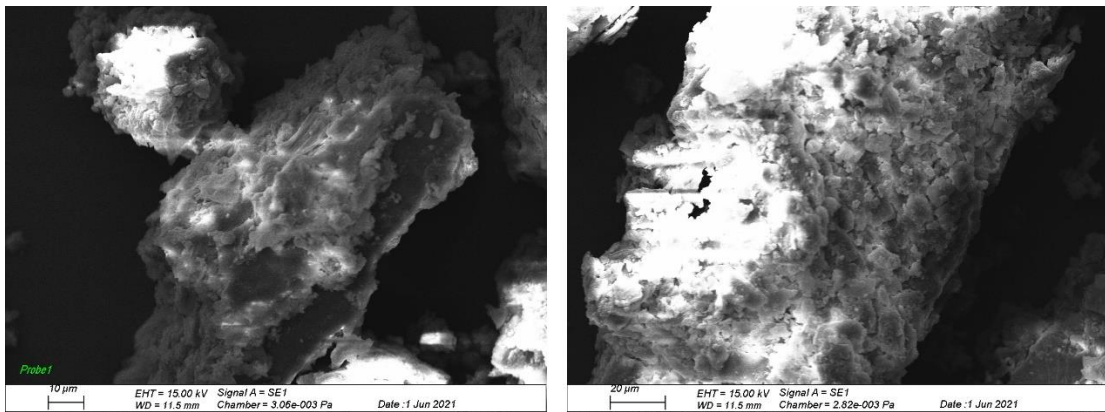


Abbildung 22: ESEM-Aufnahme von Weizenbiertreber.

Abbildung 23 zeigt den fermentierten Biertreber mit einem Myzel-Netzwerk umwachsen; die Kultivierung erfolgte hier in 20 g TM L⁻¹ Medium.

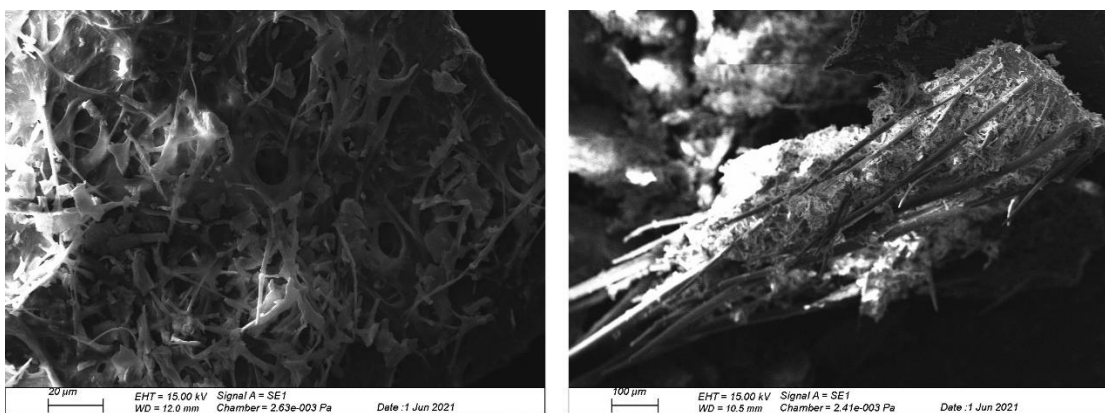


Abbildung 23: ESEM-Aufnahme von *P. eryngii*-Myzel, kultiviert in Weizenbiertreber-Medium.

3.2.6 *Pholiota nameko*

Nachdem in ersten Versuchen bei der Fermentation mit *Pholiota nameko* um ca. 20% gesteigerte Proteingehalte im Vergleich zum reinen Biertreber nachgewiesen wurden (Abbildung 13), wurde der Pilz in Weizenbiertreber- und Pilsener-Treber-Medium kultiviert und an unterschiedlichen Kulturtagen geerntet. Die Biotrockenmassen und Rohproteingehalte sind jeweils im Vergleich zum Malzextrakt-Medium dargestellt. Alle drei Medien wurden mit 20 g L⁻¹ Trockensubstanz angesetzt. In den Biertreber-Medien wurde der Pilz in zwei zeitlich unabhängigen biologischen Doppelbestimmungen kultiviert. Die Biotrockenmassen der ersten Kultivierung in Doppelbestimmung von *P. nameko* in den drei unterschiedlichen Medien sind in Abbildung 24 gezeigt.

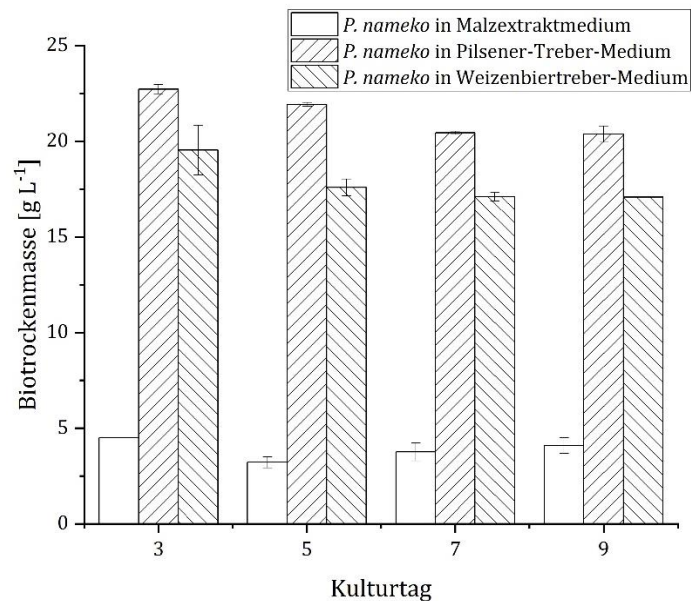


Abbildung 24: Biotrockenmassen der Kultur-Reihen von *P. nameko*, $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Die zweite zeitlich unabhängige Doppelbestimmung führte zu deutlich niedrigeren Biotrockenmassen. In Weizenbiertreber-Medium betragen die Gehalte der Biotrockenmassen durchschnittlich 65,3% der ersten Doppelbestimmung und im Pilsener-Treber-Medium wurden an den jeweiligen Kulturtagen durchschnittlich 62,0% der ersten Bestimmung ermittelt.

Der Rohproteingehalt nach Kjeldahl wurde mit dem Faktor 6,25 bestimmt. Beim Pilsener-Treber-Medium wurde ein Ausreißer bei den Werten an Kulturtag drei identifiziert, außerdem konnte in diesem Medium aufgrund einer Kontamination an Tag neun ebenfalls nur eine Dreifachbestimmung durchgeführt werden. In der Kulturreihe in Malzextrakt-Medium wurde aufgrund von mangelnder Probensubstanz von Kulturtag 3 nur eine Einfachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse der Rohproteingehalte sind in Abbildung 25 gezeigt.

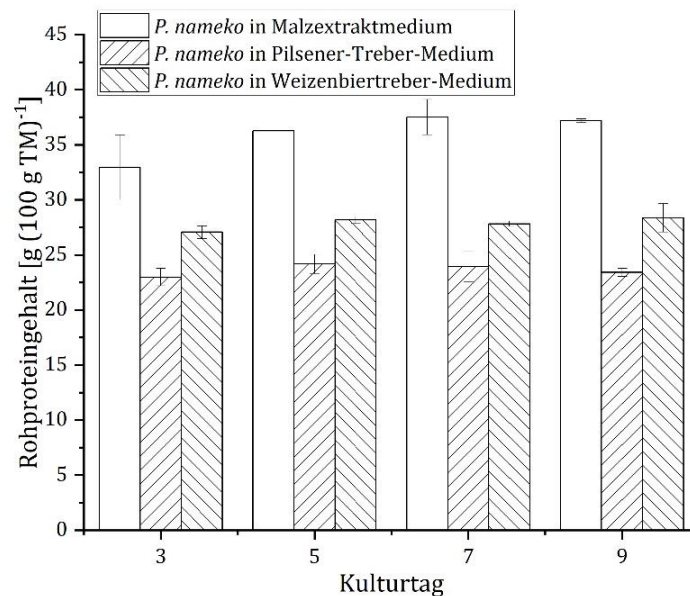


Abbildung 25: Rohproteingehalte der Kultur-Reihen von *P. nameko* in ME-Medium $n=2$ (\pm halbe Spannweite), an Tag 5 nur eine Einfachbestimmung; in Biertreber-Medium: $n=4$, außer an Tag 9 und 3 in Pilsener-Treber-Medium, da $n=3$ (\pm Standardabweichung).

Durch Ergosterolbestimmung mittels GC-FID (2.3.9.2) wurden die Ergosterolgehalte der kinetischen Reihen von *P. nameko* bestimmt. Die Gehalte der Malzextrakt-Kulturen, welche in einer biologischen Doppelbestimmung kultiviert wurden und in Abbildung 26 als Punkte dargestellt sind, wurden als Bezugswerte genutzt. Für die Berechnung der Pilzgehalte wurde der Wert vom fünften Kulturtag verwendet, welcher das Maximum der Wachstumskurve darstellt. Der höchste Pilzgehalt wurde in den Biertreber-Medien an Kulturtag fünf nachgewiesen; er betrug in beiden Medien ca. 11%. An Tag neun konnte nur eine Dreifachbestimmung durchgeführt werden; im Pilsener-Treber-Medium wegen einer Kontamination und in dem Medium mit Weizenbier-Treber aufgrund zu geringer Ausbeute.

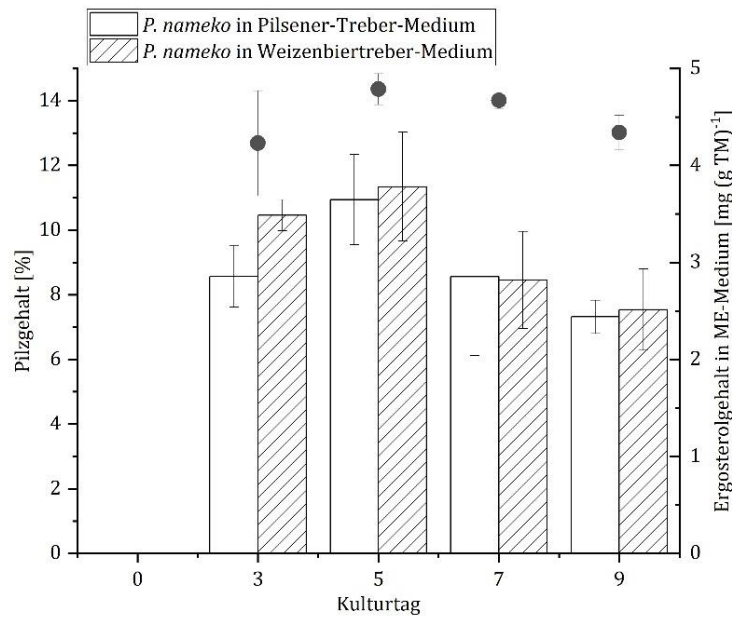


Abbildung 26: Pilzgehalte von *P. nameko* in Biertreber-Medien (Balken; $n=4$, außer an Kulturtag 9, da $n=3$; (\pm Standardabweichung)), und Ergosterolgehalte in Malzextraktmedium (Punkte; $n=2$, (\pm halbe Spannweite)).

Von einer biologischen Doppelbestimmung der Zeitreihen in Pilsener-Treber- und Weizenbier-Treber-Medium wurde außerdem nach Abschnitt 2.3.5 die Aminosäureverteilung und bestimmt. Abbildung 27 zeigt die Aminosäureverteilung von Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium. Die daraus berechneten Kjeldahlfaktoren, biologische Wertigkeit und weitere Kennzahlen sind in Tabelle 41 aufgeführt.

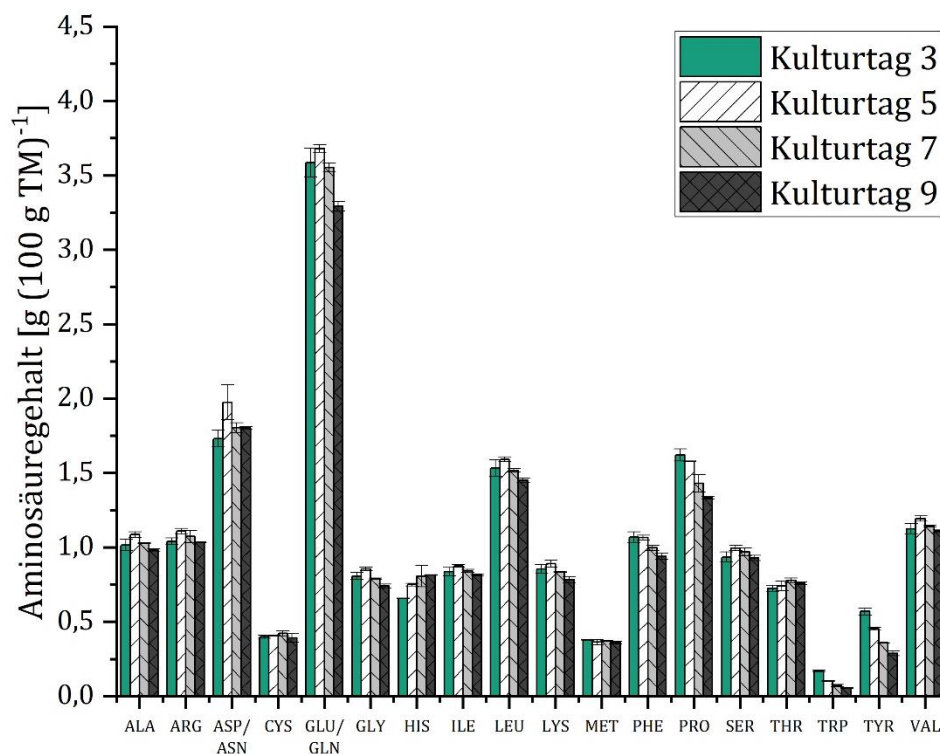


Abbildung 27: Aminosäureverteilung von *P. nameko* in 20 g L⁻¹ Pilsener-Treber-Medium; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Tabelle 41: Stickstoff-, Aminosäuregehalte und daraus berechnete Kjeldahlfaktoren und die berechneten Kennzahlen der Proteinqualität von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

	Kulturtag 3	Kulturtag 5	Kulturtag 7	Kulturtag 9
Stickstoffgehalt nach Kjeldahl [g (100 g)⁻¹]	3,73 (\pm 0,08)	3,98 (\pm 0,037)	3,97 (\pm 0,017)	3,77 (\pm 0,026)
Kjeldahlfaktor Rohprotein	6,42 (\pm 0,02)	6,37 (\pm 0,03)	6,33 (\pm 0,04)	6,30 (\pm 0,02)
Kjeldahlfaktor Reinprotein	4,36 (\pm 0,19)	4,25 (\pm 0,14)	4,05 (\pm 0,13)	4,07 (\pm 0,13)
Aminosäuregehalt [g (100 g)⁻¹]	18,92 (\pm 0,98)	19,70 (\pm 0,53)	18,78 (\pm 0,62)	17,87 (\pm 0,53)
Amino acid residue [g (100 g)⁻¹]	16,26 (\pm 0,84)	16,92 (\pm 0,46)	16,13 (\pm 0,54)	15,35 (\pm 0,46)
EAAI	94 (\pm 2)	90 (\pm 1)	87 (\pm 3)	84 (\pm 1)
BW	91 (\pm 2)	87 (\pm 1)	82 (\pm 2)	80 (\pm 1)
Limitierende AS	Lysin	Tryptophan	Tryptophan	Tryptophan

Abbildung 28 zeigt die Aminosäureverteilung von Kulturen von *P. nameko* in Weizenbiertreber-Medium. Die daraus berechneten Kjeldahlfaktoren, die biologische Wertigkeit und weitere Kennzahlen sind in Tabelle 42 aufgeführt.

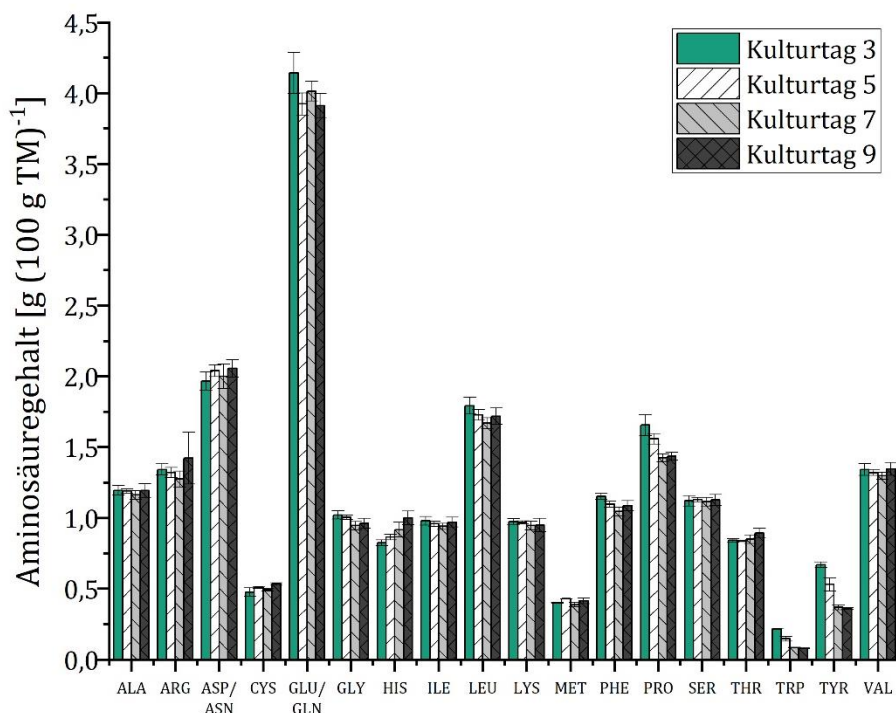


Abbildung 28: Aminosäureverteilung von *P. nameko* in 20 g L⁻¹ Weizenbiertreber-Medium; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Tabelle 42: Stickstoff-, Aminosäuregehalte und daraus berechnete Kjeldahlfaktoren und die berechneten Kennzahlen der Proteinqualität von *P. nameko* in Weizenbiertreber-Medium; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

	Kulturtag 3	Kulturtag 5	Kulturtag 7	Kulturtag 9
Stickstoffgehalt nach Kjeldahl [g (100 g)⁻¹]	4,32 (\pm 0,077)	4,46 (\pm 0,025)	4,45 (\pm 0,034)	4,66 (\pm 0,14)
Kjeldahlfaktor Rohprotein	6,33 (\pm 0,01)	6,29 (\pm 0,01)	6,26 (\pm 0,02)	6,20 (\pm 0,09)
Kjeldahlfaktor Reinprotein	4,38 (\pm 0,17)	4,15 (\pm 0,10)	4,04 (\pm 0,12)	3,96 (\pm 0,16)
Aminosäuregehalt [g (100 g)⁻¹]	22,05 (\pm 1,06)	21,55 (\pm 0,61)	20,93 (\pm 0,75)	21,45 (\pm 1,16)
Amino acid residue [g (100 g)⁻¹]	18,94 (\pm 0,91)	18,51 (\pm 0,53)	17,97 (\pm 0,65)	18,42 (\pm 1,00)
EAAI	96 (\pm 1)	93 (\pm 1)	87 (\pm 1)	86 (\pm 1)
BW	93 (\pm 1)	89 (\pm 1)	84 (\pm 1)	81 (\pm 1)
Limitierende AS	Lysin	Tryptophan	Tryptophan	Tryptophan

Analog zu *P. eryngii* wurden die Vorkulturen von *P. nameko* in Malzextrakt-Medium in biologischer Doppelbestimmung kultiviert, an unterschiedlichen Kulturtagen geerntet und auf ihre Ergosterolgehalte analysiert. Diese sind mit den Biotrockenmassen in Abbildung 29 dargestellt.

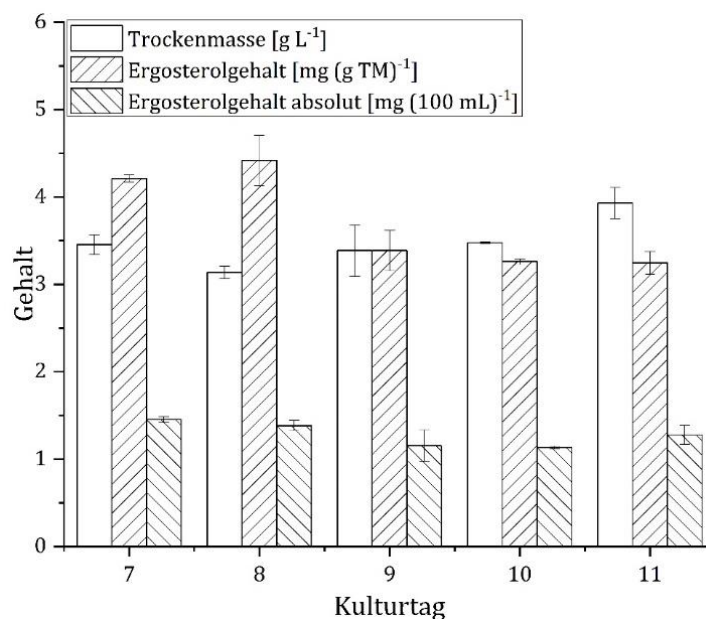


Abbildung 29: Biotrockenmassen und Ergosterolgehalte der Vorkulturen von *P. nameko* in Malzextraktmedium; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Es wurde weiterhin mit den für sieben Tage kultivierten Vorkulturen gearbeitet, da diese den höchsten absoluten Ergosterolgehalt aufwiesen und sich bei *P. eryngii* herausgestellt hatte, dass die Verwendung von Vorkulturen unterschiedlicher Kulturtage keinen Einfluss auf das Pilzwachstum in Hauptkultur hat.

Optimierungsansätze der Medienzusammensetzung wurden analog zu den *Fed-Batch*-Kulturen von *P. eryngii* und mit verringerter Trockenmasse von 10 g L^{-1} Biertreber durchgeführt. Diese Optimierungen sollten dazu beitragen, den Pilzgehalt des Fermentats zu steigern.

Die Biotrockenmassen und Rohproteingehalte der Kulturreihen in 10 g L^{-1} Biertreber-Medium sind in Abbildung 30 gezeigt. Der Rohproteingehalt war in den Medien mit Pilsener-Treber höher als der im Medium mit Weizenbiertreber.

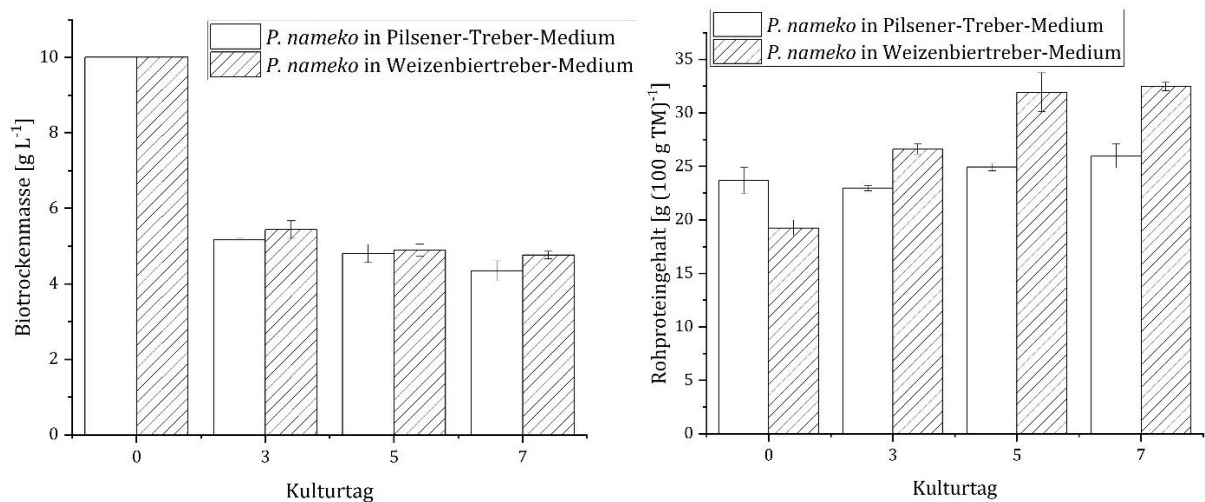


Abbildung 30: Biotrockenmassen und Rohproteingehalte ($F=6,25$) der Kulturreihen von *P. nameko* in 10 g L^{-1} Pilsener-Treber und Weizenbiertreber in Trinkwasser; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Ein weiterer Optimierungsversuch war die Kultivierung in Fed-Batch-Ansätzen mit 10 g L^{-1} Biertreber. Die Medienzusammensetzung ist in Tabelle 9, Abschnitt 2.2.4.3 dargestellt. Es wurden die Medien FB 5, FB 6 und FB 7 für die Kultivierung von *P. nameko* genutzt. Alle Versuchsreihen wurden mit Pilsener-Treber- und Weizenbiertreber-Medium durchgeführt. Die Ergebnisse der Biotrockenmassen und Rohproteingehalte sind in Abbildung 31 dargestellt.

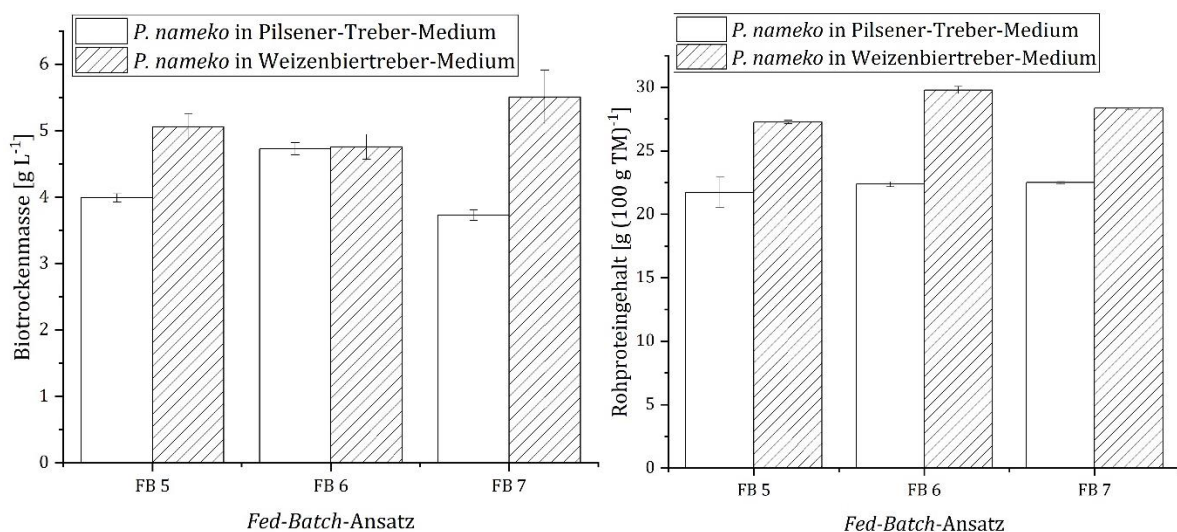


Abbildung 31: Biotrockenmassen und Rohproteingehalte ($F=6,25$) der Fed-Batch-Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber und Weizenbiertreber in Trinkwasser; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

Die Ergosterolgehalte der Proben sind im Anhang, Abschnitt 7.2.2, Tabelle 55 aufgeführt. Die Pilzgehalte wurden einheitlich mit dem Faktor 4,8 von Tag 5 berechnet (vgl. Abbildung 26) und in Abbildung 32 dargestellt.

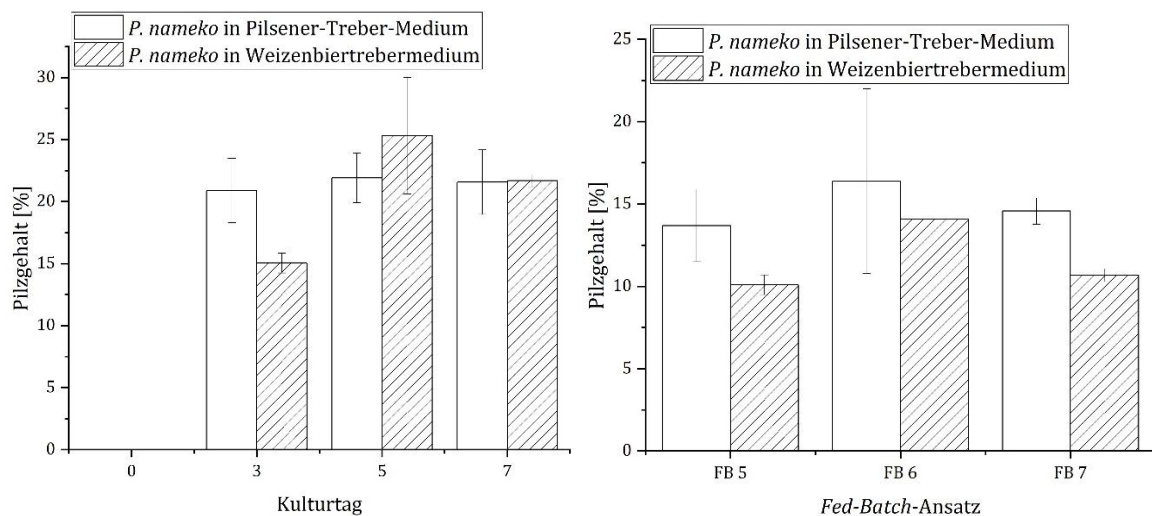


Abbildung 32: Pilzgehalte von *P. nameko* in Pilsener-Treber- und Weizenbiertreber-Medium in den unterschiedlichen Optimierungsansätzen; ($n=2$, als Fehler ist die halbe Spannweite angegeben).

Der höchste Pilzgehalt wurde in den Kulturen mit 10 g L^{-1} Pilsener-Treber-Medium mit rund 22% nachgewiesen. Im Weizenbiertreber-Medium wurde der höchste Pilzgehalt mit etwa 25% an Kulturtag 5 erreicht. Die *Fed-Batch*-Ansätze, welche an Kulturtag 7 geerntet wurden, zeigten keine Steigerung des Pilzgehaltes.

Zur Bestimmung der sensorischen Eigenschaften von *P. nameko* in Pilsener-Treber beziehungsweise Weizenbiertreber wurde der Pilz in den Biertreber-Medien mit 20 beziehungsweise 10 g L^{-1} Treber gezüchtet und die Kulturen an den Kulturtagen fünf bis sieben von einem Panel aus acht Personen olfaktorisch evaluiert. Das Pilsener-Treber-Medium wies süßliche, honigartige, brotartige, frische aber auch säuerliche, an Vergorenes erinnernde Geruchseindrücke auf. Die Geruchseindrücke von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium an den Kulturtagen fünf bis sieben sind in Tabelle 43 aufgeführt.

Tabelle 43: Geruchseindrücke von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium (A und B: biologische Doppelbestimmung der Kulturen).

Kulturtag	<i>P. nameko</i> in 10 g L ⁻¹ Pilsener-Treber-Medium		<i>P. nameko</i> in 20 g L ⁻¹ Pilsener-Treber-Medium	
	A	B	A	B
5	erdig, pilzig, süßlich, würzig, kunststoffartig	erdig, pilzig, süßlich, würzig, kunststoffartig	erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig	erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig
6	frisch, erdig, blumig, süßlich, vergoren, kunststoffartig	erdig, blumig, süßlich, vergoren, kunststoffartig	frisch, erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig	erdig, blumig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig
7	erdig, blumig, süßlich, brotartig, würzig, kunststoffartig	frisch, erdig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig	frisch, erdig, vergoren, kunststoffartig	Erdig, süßlich, würzig, kunststoffartig

Das nicht-fermentierte Weizenbier-Treber-Medium wies frische, blumige, süßliche und an Honig erinnernde Geruchseindrücke auf.

Die Geruchseindrücke der Kulturen von *P. nameko* in dem Medium aus 10 beziehungsweise 20 g L⁻¹ Weizenbier-Treber sind in Tabelle 44 aufgeführt.

Tabelle 44: Geruchseindrücke von *P. nameko* in Weizenbier-Treber-Medium (A und B: biologische Doppelbestimmung der Kulturen).

Kulturtag	<i>P. nameko</i> in 10 g L ⁻¹ Weizenbier-Treber-Medium		<i>P. nameko</i> in 20 g L ⁻¹ Weizenbier-Treber-Medium	
	A	B	A	B
5	Frisch, erdig, pilzig, süßlich, kunststoffartig	Frisch, erdig, pilzig, süßlich, kunststoffartig	erdig, pilzig, süßlich, brotartig, würzig, vergoren, kunststoffartig	frisch, erdig, pilzig, süßlich, brotartig, würzig, vergoren, kunststoffartig
6	frisch, erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig	frisch, erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig	frisch, erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig	frisch, erdig, süßlich, würzig, vergoren, kunststoffartig
7	erdig, pilzig, süßlich, würzig, vergoren	frisch, erdig, kunststoffartig	frisch, erdig, pilzig, kunststoffartig	frisch, erdig, würzig, kunststoffartig

Die Kulturen von *P. nameko* in 10 g L⁻¹ Pilsener-Treber und in 20 g L⁻¹ Weizenbiertreber wurden am besten bewertet.

Die Kulturen wurden erneut von zwei Probandinnen an Tag eins bis fünf abgerochen, da die späteren Kulturtage einen pilzartigen Geruch aufwiesen. Dabei wurden ansprechendere Geruchseindrücke festgestellt. Die Geruchseindrücke der biologischen Doppelbestimmung sind in Tabelle 45 dargestellt.

Tabelle 45: Geruchseindrücke der Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber- und Weizenbiertreber-Medium; n=2; die Ergebnisse der biologischen Doppelbestimmung sind getrennt aufgeführt (A und B).

Kulturtag	<i>P. nameko</i> in 10 g L ⁻¹ Pilsener-Treber-Medium		<i>P. nameko</i> in 20 g L ⁻¹ Weizenbiertreber-Medium	
	A	B	A	B
1	waldartig, fruchtig, frisch, süßlich	waldartig, fruchtig, frisch, süßlich	muffig, salzig, gebäckartig, würzig, herb	laugengebäckartig, würzig
2	waldartig, blumig	waldartig, blumig	seifig, gebäckartig, herb	seifig
3	waldartig, grasig, erdig, blumig	waldartig, grasartig, erdig, blumig	blumig, seifig	blumig, seifig
4	waldartig, leicht blumig	waldartig, kunststoffartig	kunststoffartig, erdig, waldartig	kunststoffartig, erdig
5	waldartig, erdig, muffig	waldartig, erdig, muffig	kunststoffartig, frisch	kunststoffartig, frisch

Die Kulturüberstände von Kulturtag drei wiesen den ansprechendsten Geruchseindruck auf und wurden im Anschluss durch SBSE extrahiert und mittels GC-MS-O anhand einer VF-Wax-Säule nach Abschnitt 2.4.2 analysiert und von drei Probandinnen olfaktorisch analysiert. Als Blindwerte wurden die beiden verwendeten Medien analysiert. Die geruchsaktiven Peaks sind in Abbildung 33 im Chromatogramm des Pilsener-Treber-Mediums markiert, welches ebenfalls drei Tage inkubiert wurde.

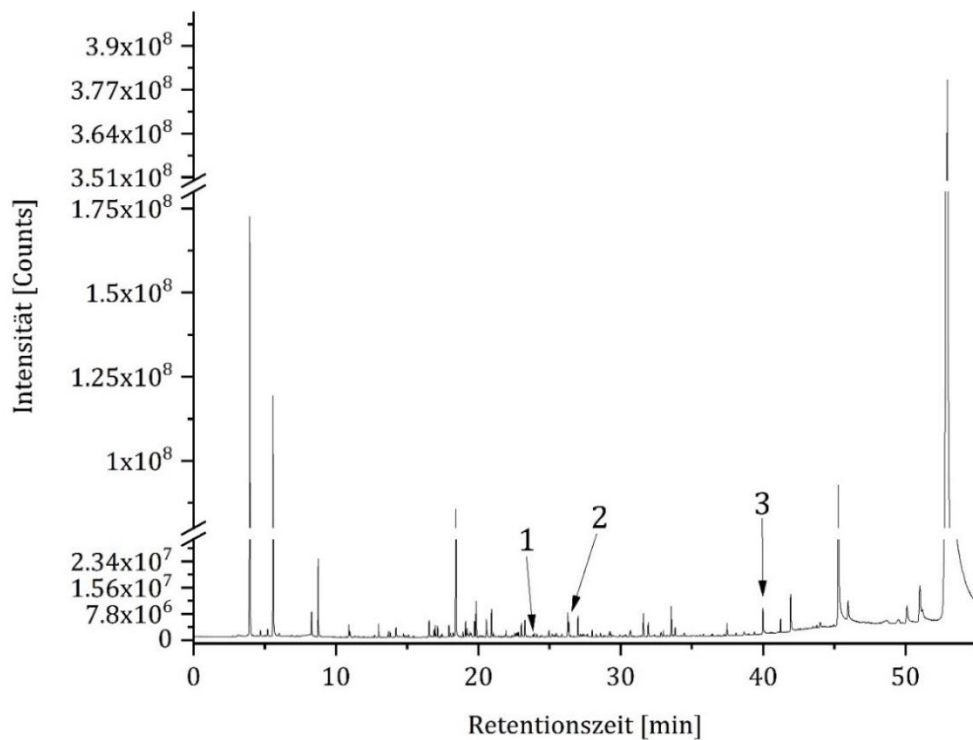


Abbildung 33: GC-MS-O-Chromatogramm (VF-WAXms-Trennsäule) des Pilsener-Treber-Mediums (10 g L⁻¹).

Für eine Identifizierung der geruchsaktiven Substanzen wurde das Medium zusätzlich mithilfe einer DB-5ms-Trennsäule analysiert. Das Chromatogramm ist im Anhang, Abschnitt 7.3.3, Abbildung 57 dargestellt. Nachfolgend sind die Geruchseindrücke der markierten Peaks und deren RIs (Abschnitt 2.3.7.2, Gleichung (13)) mit zugehörigem Strukturvorschlag der NIST-Datenbank aufgeführt (Tabelle 46). Außerdem sind RIs aus der Literatur und von Standards (RI Std) der internen Aromastoffdatenbank des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angegeben.

Tabelle 46: Geruchseindrücke im Pilsener-Treber-Medium nach der GC-MS-O-Analyse mit SBSE (VF-WAXms- und DB5ms-Trennsäule). (Fadel et al. 2006; Aubert und Pitrat 2006; Petersen et al. 1998; Adams et al. 2005)

Nr.	Geruchseindrücke	VF-WAXms Trennsäule			Vorschlag NIST-Datenbank	DB-5ms Trennsäule		
		RI	RI Literatur	RI Std		RI	RI Literatur	RI Std
1	brotartig, pilzartig, wachsig	1704	1700 ^a	1709	2,4-Nonadienal, (E,E)-	1217*	1215 ^c	1214
2	malzig, würzig	1812	1811 ^a	1819	2,4-Decadienal, (E,E)-	1315*	1317 ^d	1319
3	Vanille, Schokolade, süßlich	2569	2563 ^b	2565	Vanillin	1400	1394 ^c	1390

*Massenspektrometrisch trotz des kleinstmöglichen Splits kein Peak detektierbar. Berechnung anhand des am ODP wahrgenommenen Geruchs.

Im Weizenbiertreber-Medium wurden bei der GC-MS-O-Analyse die identischen Substanzen wahrgenommen. Das Chromatogramm ist in Abbildung 34 gezeigt.

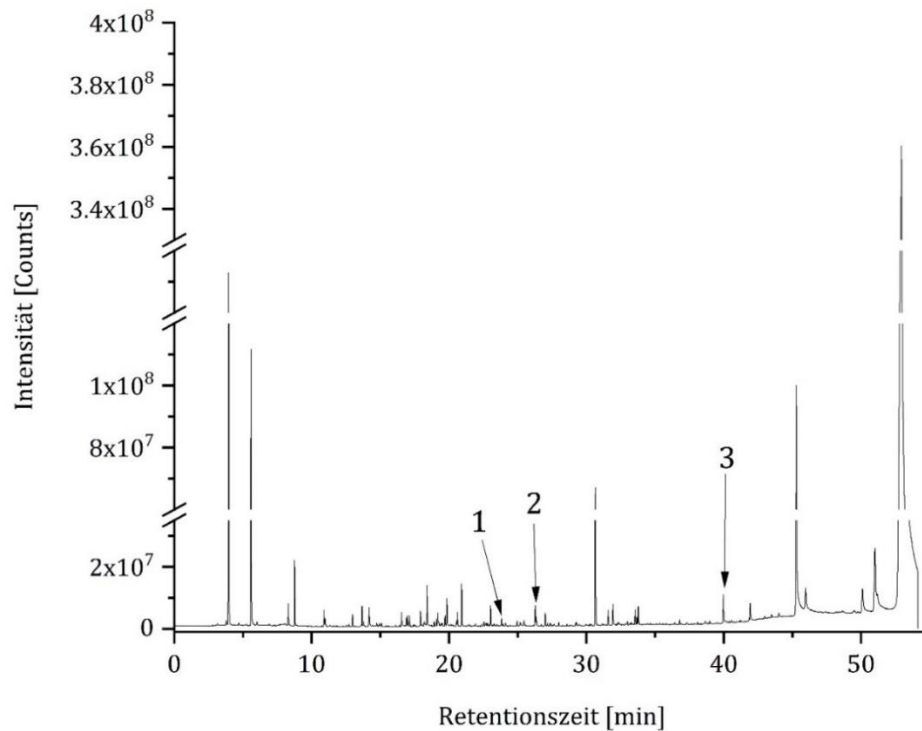


Abbildung 34: Chromatogramm (VF-WAXms-Trennsäule) des Weizenbiertreber-Mediums (20 g L⁻¹).

Das Weizenbiertreber-Medium wurde ebenfalls mithilfe einer DB-5ms-Säule analysiert, das Chromatogramm ist in Abschnitt 7.3.3, Abbildung 58 gezeigt. In Tabelle 47 sind die Geruchseindrücke der Peaks mit den dazugehörigen RIs und Strukturvorschlägen der NIST-Datenbank aufgeführt.

Tabelle 47: Geruchseindrücke im Weizenbiertreber-Medium nach GC-MS-O-Analyse mit SBSE (VF-WAXms-Trennsäule). (Fadel et al. 2006; Aubert und Pitrat 2006; Petersen et al. 1998; Adams et al. 2005)

Nr.	Geruchseindrücke	VF-WAXms Trennsäule			Vorschlag NIST-Datenbank	DB-5ms Trennsäule		
		RI	RI Literatur	RI Std		RI	RI Literatur	RI Std
1	brotartig, haferartig, muffig	1704	1700 ^a	1709	2,4-Nonadienal, (E,E)-	1217*	1215 ^c	1214
2	malzig, würzig	1812	1811 ^a	1819	2,4-Decadienal, (E,E)-	1315*	1317 ^d	1319
3	vanilleartig, schokoladenartig, süßlich	2569	2563 ^b	2565	Vanillin	1400	1394 ^c	1390

*Massenspektrometrisch trotz des kleinstmöglichen Splits kein Peak detektierbar. Berechnung anhand des am ODP wahrgenommenen Geruchs.

Abbildung 35 zeigt die identifizierten olfaktorisch aktiven Verbindungen der Biertreber-Medien. Im Anhang in Abschnitt 7.3.1, Abbildung 44 bis Abbildung 49 sind die Massenspektren dieser Verbindungen aus beiden Medien gezeigt.

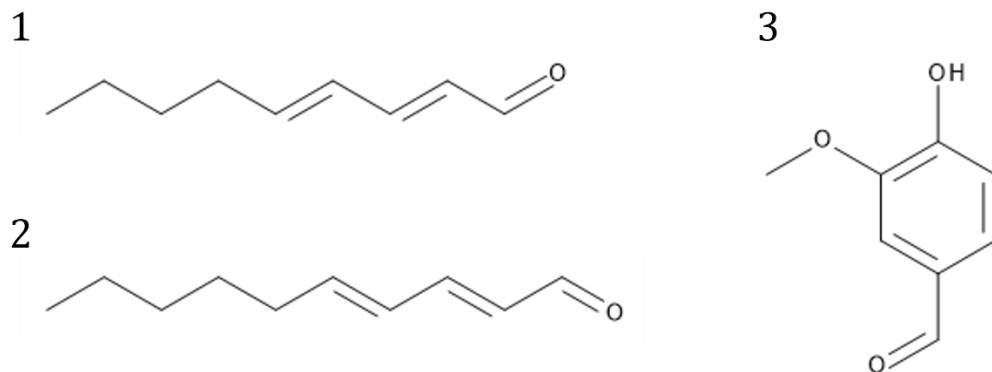


Abbildung 35: In den Biertrebermedien identifizierte olfaktorisch aktive Substanzen, 1 (*E,E*)-2,4-Nonadienal; 2 (*E,E*)-2,4-Decadienal; 3 Vanillin.

Die an Kulturtag drei von drei Personen in biologischer Doppelbestimmung abgerochenen Proben wiesen die nachfolgenden olfaktorisch aktiven Substanzen (1–7) auf. Das Chromatogramm von *P. nameko* in Pilsener-Treber, an einer VF-WAXms-Säule gemessen, ist in Abbildung 36 dargestellt.

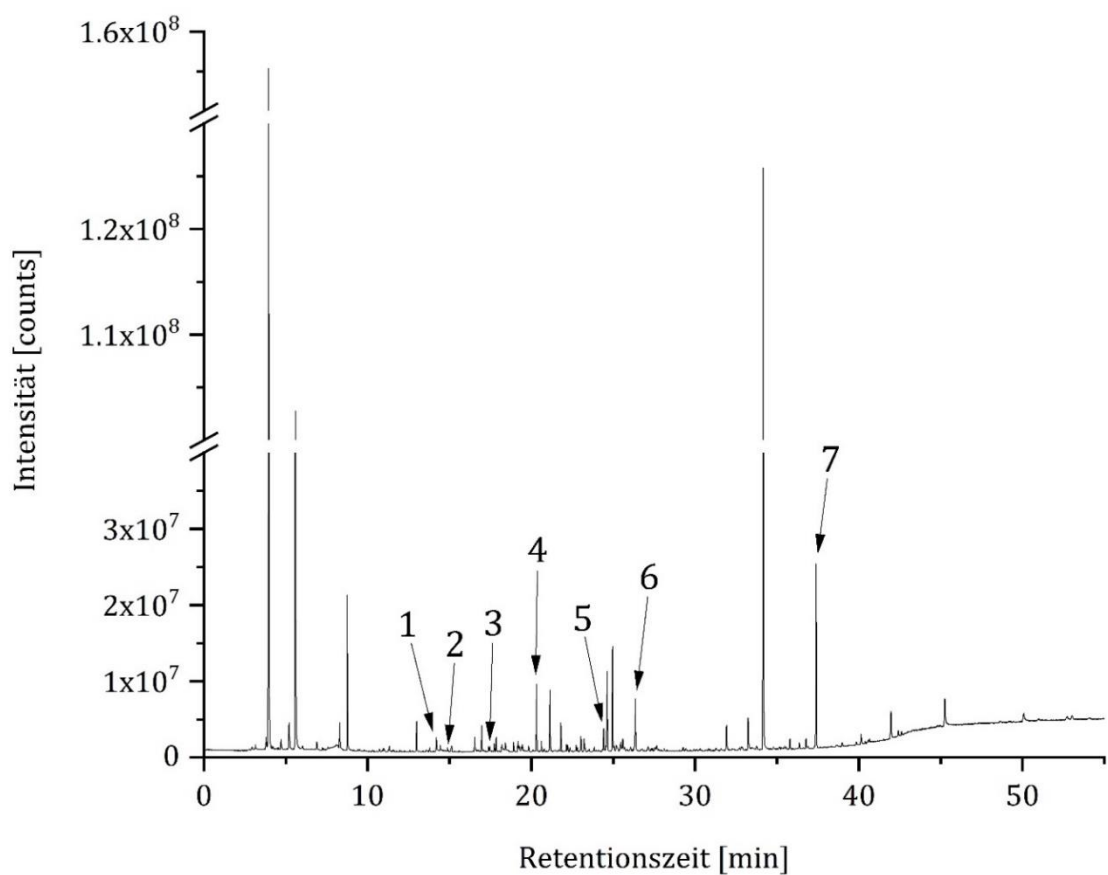


Abbildung 36: Chromatogramm (VF-WAXms-Trennsäule) des mit *P. nameko* für drei Tage fermentierten Pilsener-Treber-Medium (10 g L^{-1}).

Das Chromatogramm auf der unpolaren Säule ist im Anhang, Abschnitt 7.3.3, in Abbildung 59 gezeigt. In Tabelle 48 sind die Geruchseindrücke der Peaks, die Substanzvorschläge der NIST-Datenbank und deren RIs auf beiden Säulen und aus der Literatur aufgeführt.

Tabelle 48: Geruchsaktive Substanzen der Proben von *P. nameko* in Pilsener-Treber. (Zeng et al. 2011; Brophy et al. 1998; Smallfield et al. 1994; Alizadeh und Shaabani 2012; Chung 1999; Medina et al. 2005; Merle et al. 2004; Palá-Paúl et al. 2007; Jordán et al. 2017)

Nr.	Geruchseindrücke	VF-WAXms Trennsäule			Vorschlag NIST-Datenbank	DB-5ms Trennsäule		
		RI	RI Literatur	RI Std		RI	RI Literatur	RI Std
1	pilzartig, frisch	1306			nicht identifiziert			
2	würzig, pfeffrig, ge- bäckartig	1342			nicht identifiziert			
3	erdig, grasig, kaffeeartig	1443	1471 ^a	1442 / 1471	Linalooloxid (Isomere)	1072	1076 ^c	1072/ 1088
4	blumig, sei- fig, süßlich, blaubeerart- tig	1548	1545 ^b	1539	Linalool	1100	1099 ^d	1102
5	süß, minzar- tig	1736	1735 ^b	1726	Carvon	1248	1248 ^e	1243
6	blumig, fruchtig, sei- fig	1815			nicht identifiziert			
7	chlorartig, waldig	2408	-	-	2-Chlor-4,5- dimethoxy- benzalde- hyd	1542	-	-

Die identifizierten Substanzen sind in Abbildung 37 gezeigt.

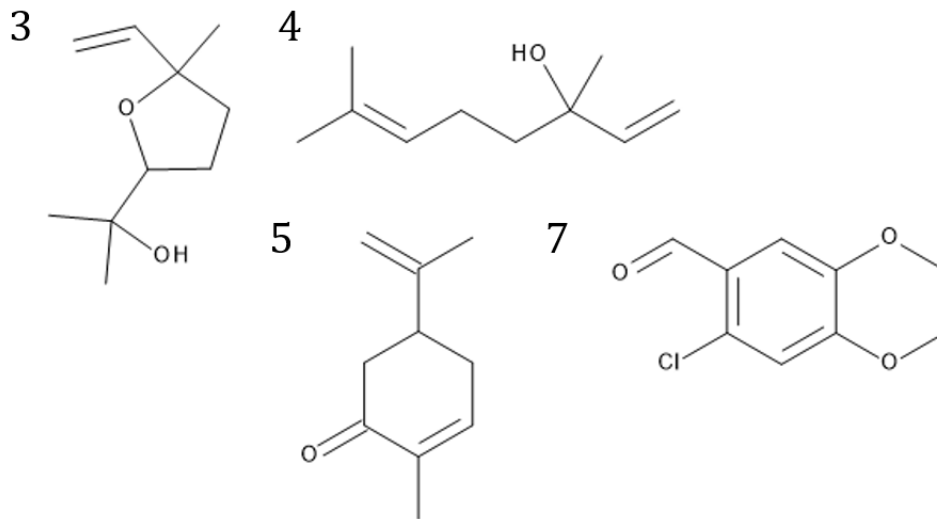


Abbildung 37: Volatile Substanzen, die im Kulturüberstand von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium nach drei Kulturtagen vorläufig identifiziert wurden, 3 Linalooloxid; 4 Linalool; 5 Carvon; 7 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd.

Abbildung 38 zeigt das Chromatogramm der Analyse von dem Kulturüberstand von *P. nameko* in Weizenbierdreber-Medium nach drei Kulturtagen. Die nachgewiesenen geruchsaktiven Substanzen stimmen, mit Ausnahme von Carvon, mit denen der Kultur in Pilsener-Treber-Medium überein. Daher entspricht die Verbindung 6 in Abbildung 38 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd. Das Chromatogramm, welches mittels DB-5ms-Säule aufgenommen wurde, ist im Anhang, Abschnitt 7.3.3, Abbildung 60 gezeigt.

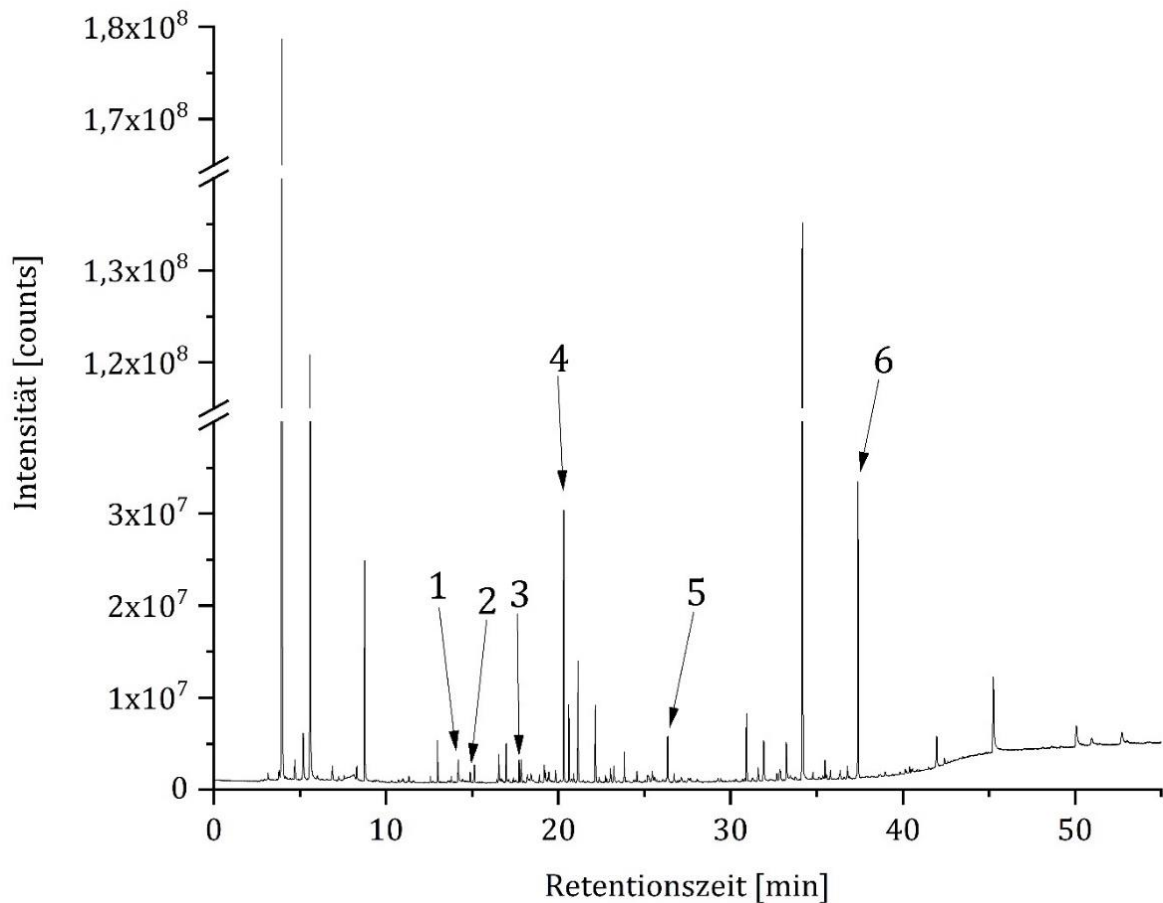


Abbildung 38: Chromatogramm (VF-WAXms-Trennsäule) des mit *P. nameko* für drei Tage fermentierten Weizenbier- treber-Mediums (20 g L^{-1}).

Für Substanz 7 (2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd) sind in der Literatur keine Retentionsindices bekannt und es wurde keine Standardsubstanz gemessen, um die Anwesenheit dieser Substanz zu bestätigen. Allerdings betragen die *R-Matches* der NIST-Datenbank über 900. Die Massenspektren der identifizierten Substanzen, inklusive 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd, sind im Anhang, Abschnitt 7.3.2, in Abbildung 50 bis Abbildung 56 gezeigt.

Im Massenspektrum von 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd ist das Signal des Molekülions bei einem m/z -Verhältnis 200 ist deutlich zu erkennen. Aufgrund der Isotopenverteilung von Chlor, welche sich aus ca. 75% ^{35}Cl und 25% ^{37}Cl zusammensetzt ist bei einem m/z -Verhältnis von 202 ein zweites, um zwei Drittel kleineres Signal zu erkennen.

Neben der SBSE-Extraktion wurde von den Kulturen von *P. nameko* in Weizenbier- treber-Medium (20 g L^{-1}) ebenfalls die Extraktion mittels SPME durchgeführt und anschließend mittels GC-MS-O analysiert und abgerochen. Die Parameter dieser Messungen auf einer VF-WAXms-Säule sind in Tabelle 22 aufgeführt. Bei diesen Messungen wurden deutlich mehr Geruchseindrücke wahrgenommen, die nachfolgend in Tabelle 49 aufgeführt sind. Auffallend ist, dass 1-Octen-3-on vorläu-

fig identifiziert werden konnte. Auch Linalool und Linalooloxid konnten mit dieser Methode bestätigt werden. Die RIs, welche in der Probe und den Standards der Aromastoffdatenbank des LCB bestimmt wurden, sind mit RIs aus der Literatur verglichen. Das dazugehörige Chromatogramm mit den markierten Peaks ist in Abschnitt 7.3.4, Abbildung 61 gezeigt.

Tabelle 49: Geruchseindrücke und vorläufig identifizierte Substanzen der GC-MS-O-Messungen von *P. nameko* in Weizenbierreber-Medium mit SPME an einer polaren VF-Wax-Säule. (Hidenobu et al. 1994; Aubert und Chanforan 2007; Peterson und Reineccius 2003; Cho et al. 2007; Zeng et al. 2011; Brophy et al. 2000; Wu et al. 2007; Romeo et al. 2007)

RI	Substanzvorschlag NIST Datenbank	RI Literatur	Geruchseindruck	RI Std
918	2-Methylbutanal	912 ^a	süßlich	914
1081	Hexanal	1080 ^b	krautig	1082
1249	1-Pentanol	1256 ^a	leicht pilzig	1251
1304	1-Octen-3-on	1302 ^c	pilzig	1301/1302
1431	2-(<i>E</i>)-Octenal	1430 ^d	herb	1434
1441	Linalooloxid	1471 ^e	grün	1471
1547	Linalool	1545 ^f	blumig, süßlich	1549
1836	Calamenen	1832 ^f	Lakritz, würzig	-
2030	γ -Nonalacton	2028 ^b	süßlich	2014
2038	(<i>E</i>)-Nerolidol	2033 ^g	frisch	2042
2042	(<i>E</i>)-Zimtaldehyd	2044 ^h		2046

Die Substanzen, welche mit RIs aus der Literatur und der Standards vorläufig identifiziert wurden, sind in Abbildung 39 gezeigt.

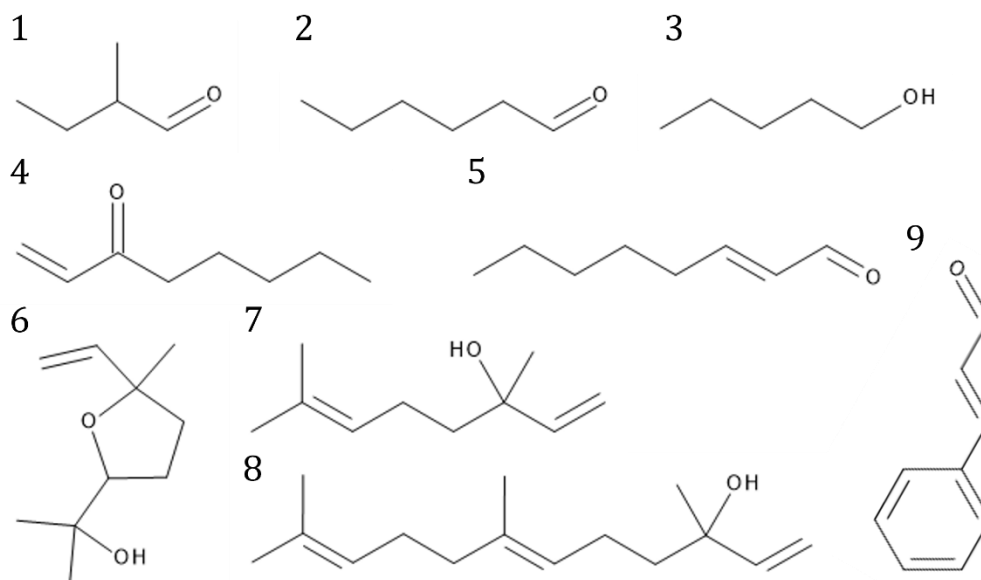


Abbildung 39: Vorläufig identifizierte Substanzen im Kulturüberstand von *P. nameko*, kultiviert in Weizenbierreber-Medium: 1 2-Methylbutanal; 2 Hexanal; 3 1-Pentanol; 4 1-Octen-3-on; 5 2-(*E*)-Octenal; 6 Linalooloxid; 7 Linalool; 8 (*E*)-Nerolidol; 9 (*E*)-Zimtaldehyd

Die Fermentate von *P. nameko* wurden auf ihren Glutengehalt untersucht. Die Extinktionen der Gliadin-Standards wurden prozentual zum Standard mit der Konzentration 0 ng mL⁻¹ berechnet und gegen die Konzentration aufgetragen.

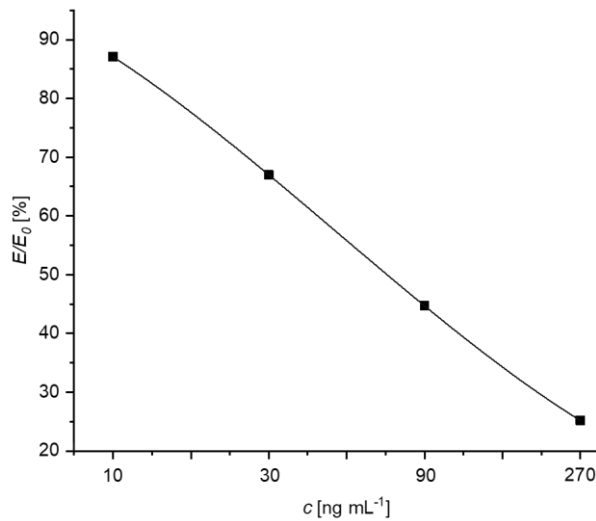


Abbildung 40: Kalibrierfunktion zur Glutenbestimmung mit $R^2=1$ und der Gleichung der Regression:
 $E/E_0=94,76-0,66c-0,012c^2+1,04\cdot 10^{-4}c^3$.

Die Glutengehalte wurden von Weizenbiertreber, von Weizenbier und den Fermentaten von *P. nameko* in Weizenbiertreber-Medium (20 g L⁻¹) der Kulturtage 3, 5, 7, 9, 12 und 14 bestimmt. Die Treber wurden direkt, sowie als autoklavierte Medien nach sieben Inkubationstagen extrahiert und gemessen (Tabelle 50).

Tabelle 50: Glutengehalte von Weizenbier, Weizenbiertreber und den Fermentaten mit *P. nameko*; n=2 (\pm halbe Spannweite).

	Verdünnungs- faktor	Glutengehalt	Glutenab- bau [%]
Weizenbier	50.000	4,8 \pm 0,6 g L ⁻¹	-
Treber	1.200.000	461,0 \pm 32,1 g (kg ⁻¹ TM)	-
Medium	1.200.000	191,3 \pm 15,2 g (kg ⁻¹ TM)	0
<i>P. nameko</i> in Weizenbier- Treber-Medium d3	50.000	26,5 \pm 0,0 g (kg ⁻¹ TM)	86,2
<i>P. nameko</i> in Weizenbier- Treber-Medium d5	500.000	14,4 \pm 1,8 g (kg ⁻¹ TM)	92,5
<i>P. nameko</i> in Weizenbier- Treber-Medium d7	50.000	5,5 \pm 0,1 g (kg ⁻¹ TM)	97,1
<i>P. nameko</i> in Weizenbier- Treber-Medium d9	50.000	2,7 \pm 0,1 g (kg ⁻¹ TM)	98,6
<i>P. nameko</i> in Weizenbier- Treber-Medium d12	30.000	1,3 \pm 0,0 g (kg ⁻¹ TM)	99,3
<i>P. nameko</i> in Weizenbier- Treber-Medium d14	30.000	0,9 \pm 0,2 g (kg ⁻¹ TM)	99,5

Der Abbau des Glutengehalts in Weizenbiertreber ist in Abbildung 41 gezeigt. Hier ist ein deutlicher Abbau zu erkennen und der Glutengehalt am 14. Kulturtag war so gering, dass er in der Graphik nicht mehr erkennbar ist.

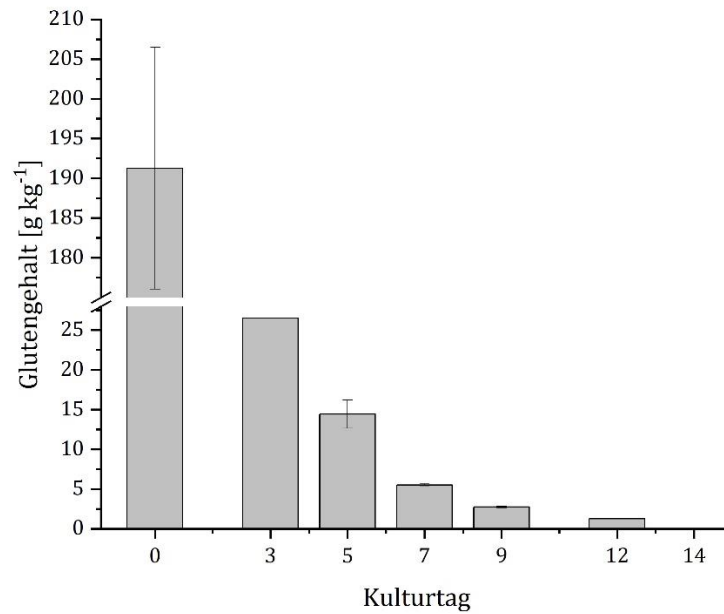


Abbildung 41: Glutenabbau durch *P. nameko* in Weizenbiertreber; $n=2$ (\pm halbe Spannweite).

4. Diskussion

4.1 *Palmölseitenströme*

Mit 75,95 Millionen Tonnen Palmöl ist es das meistproduzierte pflanzliche Öl für die Lebensmittelindustrie. (Ahrens 2022) Die Produktionsmenge steigt stetig und die Palmölproduktion wird aufgrund negativer Einflüsse auf die Biodiversität und Abholzung der Regenwälder in den tropische Anbauregionen häufig kritisiert. In Malaysia wurden in den Jahren von 1972 bis 2015 47% der vorhandenen Wälder abgeholzt. Doch es wird nicht nur bewaldetes Land für die Palmölproduktion genutzt, sondern auch ehemaliges Weideland oder Anbauland anderer Nutzpflanzen wird in Palmölplantagen umgewandelt. (Meijaard et al. 2018)

Um die Abholzung der Regenwälder zu minimieren und die Biodiversität zu schützen, sollte zukünftig mehr Acht auf nachhaltigen Anbau von Ölpalmen gegeben werden, da es nicht denkbar ist, ganz auf Palmöl zu verzichten. Durch die stark wachsende Bevölkerung und der damit verbundenen Nachfrage nach Pflanzenölen als Ernährungsgrundlage ist die Palmölproduktion notwendig, um den Bedarf zu decken. (United Nations 2019) Bei einem Verzicht auf Palmöl müsste der Bedarf an Öl mit Pflanzen wie Raps, Soja oder Sonnenblumen, welche weniger als eine Tonne Öl pro Hektar Land und Jahr liefern gedeckt werden. Sie würden somit stärker zur Abholzung von Wäldern und zum Rückgang der Biodiversität auf dieser Erde beitragen, da die Ölpalme pro Hektar 3,8 t Palmöl liefert.

Eine Chance für einen nachhaltigeren Palmölanbau ist das Recycling der bei der Produktion anfallenden Seitenströme. Die *empty fruit bunches* und das Palmkernmehl sind die Hauptseitenströme, welche bis heute in großen Mengen verbrannt werden, woraus ein Anstieg der CO₂-Emissionen resultiert. Eine Alternative ist das Ausbringen der EFB auf den Plantagen, um den organischen Kohlenstoffgehalt im Boden zu wahren und sie so als natürlichen Dünger zu nutzen. Dies ist allerdings nur realisierbar, wenn die Ölmühle sich in der Nähe der Plantage befindet, da es sonst zu einem Anstieg der Produktionskosten durch den Rücktransport kommt. Außerdem fallen auf den meisten Plantagen mehr EFB an, als Dünger benötigt wird. (Tao et al. 2017; Noirot et al. 2022) Die Verwendung der EFB als Ausgangsmaterial für die Biogas- beziehungsweise Biodieselproduktion ist ebenfalls denkbar und wird weltweit erforscht. (Wiloso et al. 2015) Hierzu werden teilweise energie- und kostenaufwändige Vorbehandlungsmethoden, wie eine Pyrolyse benötigt, um die Cellulose der Seitenströme zugänglich zu machen. (Chew und Bhatia 2008)

Die in dieser Arbeit verwendete Vorbehandlungsmethode für die lignocellulosehaltigen Seitenströme der Ölpalme ist die Festbettfermentation mit Weißfäulepilzen. Weißfäulepilze leben unter natürlichen Bedingungen auf unterschiedlichen Hölzern und sind somit in der Lage, ihre Bestandteile zu metabolisieren. Typische Enzyme für den Ligninabbau sind Laccasen, Mangan- und Lignin-Peroxidasen. (Xu et al. 2013; Songulashvili et al. 2007) Die EFB sollten nach der Fermentation

als Futtermittel für Larven der Schwarzen Soldatenfliege dienen und durch die Vorbehandlung eine bessere Verdaubarkeit für diese aufweisen. Die für diese Forschungsarbeit benötigten Seitenströme der Ölpalme wurden aus Indonesien bezogen. Das PKM wurde bereits zerkleinert angeliefert; hier musste keine weitere Homogenisierung durchgeführt werden. Die EFB wurden in großen Büscheln erhalten und über zwei Siebe in einer Mühle gemahlen, um die Oberfläche zu vergrößern und eine bessere Verfügbarkeit für die Pilzfermentation zu erzielen. Außerdem kann das Substrat auf diese Weise im Anschluss an die Fermentation direkt zur Fütterung der BSFL eingesetzt werden. Die beiden Substrate wurden aufgrund ihrer geringen Feuchte ungekühlt nach Deutschland versendet. Vor der Verwendung als Pilzsubstrat wurden die Seitenströme sterilisiert, um das Austreiben von Sporen unerwünschter Pilze bei der Befeuchtung und gezielten Kultivierung mit den Weißfäulepilzen zu verhindern.

Vor der Analytik der Substrate wurden diese in einer Kugelmühle homogenisiert, um eine möglichst homogene Stichprobenmenge zu erhalten. Es wurden der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl, der Aminosäuregehalt, der Aschegehalt, der Fettgehalt nach Weibull-Stoldt und der Ligningehalt nach Klason bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 dargestellt. Bei der Forschung zum Recycling der Seitenströme der Palmölproduktion, vor allem der EFB, liegt der Fokus aktuell auf der Produktion von Biogas beziehungsweise Bioethanol und der dafür erforderlichen Vorbehandlung des widerstandsfähigen Materials. (Chew und Bhatia 2008) Aus diesem Grund ist die Analytik des Stickstoff- beziehungsweise Aminosäuregehalts oft irrelevant und der Vergleich mit der Fachliteratur konnte an dieser Stelle nicht erfolgen. Für die EFB wurde ein Stickstoffgehalt von unter 1% analysiert, was nahelegt, dass sich dieses Substrat nicht für den direkten Einsatz als Futtermittel eignet.

Bei dem bestimmten Fettgehalt der Seitenströme war davon auszugehen, dass es sich zu einem großen Teil um Rückstände der Früchte von der Ernte handelte, vor allem beim Palmkernmehl waren gewisse Rückstände zu erwarten, da die Palmkerne das Palmkernöl enthalten und geöffnet werden, damit das Öl extrahiert werden kann. (Hashim et al. 2012) In Tabelle 51 ist ein Vergleich der in den EFB und im PKM nachgewiesenen Fettsäureverteilung mit der Literatur aufgeführt.

Tabelle 51: Vergleich der Fettsäurezusammensetzung von Palmöl, EFB und PKM.

Fettsäure	Palmöl ¹	Palmöl Destillate ²	Palmöl (DG Fett) ³	Palmkernöl ⁴	EFB	PKM
	Anteil [%]					
8:0	-	0,2 (± 0,08)	-	3,0	1,4 (± 0,22)	3,59 (± 0,17)
10:0	-	0,17 (± 0,06)	-	3,0	1,46 (± 0,21)	3,24 (± 0,09)
12:0	-	0,46 (± 0,61)	nn-0,5	45,6	21,02 (± 0,51)	64,10 (± 1,02)
14:0	1,23 (± 0,28)	1,2 (± 0,20)	0,5-2,0	16,0	7,11 (± 0,42)	16,62 (± 0,45)
16:0	41,78 (± 1,27)	46,9 (± 1,46)	39,9-47,5	9,5	43,20 (± 0,42)	4,05 (± 0,25)
17:0	-	-	nn-0,2		0,05 (± 0,005)	-
18:0	3,39 (± 0,65)	4,30 (± 0,13)	3,5-6,0	2,4	3,70 (± 0,07)	0,62 (± 0,02)
18:1 (9Z)	41,90 (± 1,20)	36,7 (± 1,13)	36,0-44,0	17,3	20,96 (± 0,94)	7,31 (± 0,64)
18:1 (11Z)	-	-	-		0,28	
18:2 (9Z, 12Z)	11,03 (± 0,02)	9,03 (± 0,28)	9,0-12	2,9	0,82 (± 0,16)	0,47 (± 0,07)
Andere	0,67	1,04	≤11,1	0,3	-	

¹ (Chowdhury et al. 2007); ² (Ping und Yusof 2009); ³ (DGF 2023); ⁴ (Valencia et al. 1993)

Bei einem Palmöl Destillat oder auch Palmöl Fettsäure Destillaten handelt es sich um Nebenprodukte der Raffination von rohem Palmöl.

Beim Vergleich der Fettsäureverteilungen fällt auf, dass im extrahierten Fett der EFB größere Mengen kurzkettige Fettsäuren wie Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure, nachgewiesen wurden als im Palmöl. Den größten Unterschied macht hier die Laurinsäure, welche mit über 20% zu den Hauptfettsäuren gehörte und in Palmöl zum Teil gar nicht nachgewiesen wurde. (Chowdhury et al. 2007) Im Palmkernöl gehört diese Fettsäure mit 45,6% hingegen zu den Hauptfettsäuren (Valencia et al. 1993). Auch im PKM stellt Laurinsäure mit Abstand die Hauptfettsäure mit über 60% dar, was die Annahme, dass es sich um Rückstände der Palmkernölproduktion handelt unterstützt. Die weiteren Hauptfettsäuren in den EFB waren Palmitin- und Ölsäure, wobei die Palmitinsäure einen vergleichbaren Anteil zum Palmöl aufwies und der Anteil der Ölsäure nur ca. die Hälfte des Anteils im Öl betrug. Auch die in den EFB nachgewiesene Menge an Linolsäure war deutlich kleiner als im Vergleich zum Palmöl erwartet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem Öl nicht ausschließlich um Rückstände des Palmöls, sondern auch um Reste des Palmkernöls handelte. Natürliche Schwankungen aufgrund der Umweltbedingungen der jeweiligen Anbaugebiete sind bei diesen Analysen ebenfalls zu erwarten.

Die ermittelten Gesamtligningehalte der EFB mit 26,21% und PKM mit 22,85% lagen nah beieinander, was für eine ähnlich schlechte Verdaulichkeit der Substrate als Futtermittel für die Insekten spricht. In Tabelle 52 sind die analysierten Werte für die EFB mit Ligningehalten der Literatur verglichen.

Tabelle 52: Ligningehalte der EFB aus unterschiedlichen Studien.

	EFB	(Ishola et al. 2014)	(Law et al. 2007)	(Sudiyani et al. 2013)	(Triwahyuni et al. 2015)
	[g (100 g TM)⁻¹]				
AIL	21,9 (± 1,0)	26,6 (± 0,1)	18,8 (± 0,3)	n.a.	n.a.
ASL	4,3 (± 0,8)	7,8 (± 0,0)	n.a.	n.a.	n.a.
Gesamtlignin	26,2 (± 1,73)	34,4 (± 0,2)	n.a.	31,7	26,5

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien liegen alle zwischen 26% und 35%, was hinsichtlich der natürlichen und geographischen Schwankungen der Pflanzen zu erwarten ist. Außerdem wurden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Ligningehalte verwendet, was auch bedingte, dass teilweise nur der Gesamtligningehalt beziehungsweise nur das AIL bestimmt wurde. Aus den Analysen ließ sich in den EFB ein Gesamtkohlenhydratgehalt an Cellulose und Hemicellulose von ca. 52,3% berechnen, auch dieser ist mit den unterschiedlichen Studien aus Tabelle 52 vergleichbar. Sudiyani et al. wiesen 51,9% Kohlenhydrate nach, Triwahyuni et al. einen etwas höheren Gehalt von 61,6%. Doch hier waren sowohl Lignin, als auch Aschegehalt mit lediglich 1,8% deutlich niedriger. Der in dieser Arbeit analysierte Aschegehalt von 5,5 (± 0,3) % ist mit dem von Sudiyani et al. mit 6,7% vergleichbar.

Palmkernmehl wurde bereits in einigen Studien als Futtermittel für Hühner untersucht. (Abdollahi et al. 2015) Der von Abdollahi und Kollegen ermittelte Stickstoffgehalt von 2,54 g (100 g TM)⁻¹ ist mit den in dieser Arbeit bestimmten 2,3 g (100 g)⁻¹ gut vergleichbar. Der Aminosäuregehalt war mit 12,42 g (100 g)⁻¹ allerdings doppelt so hoch, wie der in dieser Arbeit bestimmte Gehalt von 6,6 g (100 g)⁻¹. Auch in einer Studie von Son et al. wurde ein höherer Aminosäuregehalt von 13,68 g (100 g)⁻¹ nachgewiesen. (Son et al. 2019) Die geringen Werte der Aminosäuregehalte sprechen für natürliche Schwankungen im Substrat oder Probleme beim Aufschluss des Palmkernmehls für die Aminosäureanalyse.

Die Asche- und Fettgehalte sind mit 3,9 g (100 g)⁻¹ beziehungsweise 9,4 g (100 g)⁻¹ (Abdollahi et al. 2015) im Vergleich zu 4,1 (± 0,5) g (100 g)⁻¹ beziehungsweise 11,2 (± 0,1) g (100 g)⁻¹ gut vergleichbar. Son et al. wiesen ebenfalls einen Aschegehalt in vergleichbarer Größenordnung von 4,7 g (100 g)⁻¹ nach. (Son et al. 2019)

Die Kohlenhydrat- beziehungsweise Ballaststoff-Fraktionen wurden in einigen Studien zur Eignung von PKM als Futtermittel für die Nutztierhaltung ebenfalls untersucht; die Ergebnisse von Abdollahi und Kollegen wurden dabei in nicht-Stärke Polysacchariden angegeben (58,4% unlöslich und 2,57% löslich, außerdem 5,7% Stärke). Außerdem wurden in der Studie säurelösliche Ballaststoffe und in neutralem Lösemittel lösliche Ballaststoffe analysiert. (Abdollahi et al. 2015) Son et al. wiesen 17,0% Rohfasergehalt nach. *Palm Kernel Cake*, also der nicht gemahlene Rückstand der Palmkernöl-Produktion wies in der Studie von Cheirsilp und Kollegen einen Ligningehalt von $15,7\% \pm 1,2\%$ auf. (Cheirsilp und Kiticha 2015)

4.1.1 Fermentation von EFB und PKM

In einem Screening, welches dieser Arbeit voranging, wurden 69 Pilze auf den EFB kultiviert und das Wachstum der Pilze optisch beurteilt. Eine große Rolle bei der Beurteilung spielte die Schnelligkeit des Wachstums, was für eine spätere Anwendung des Verfahrens in der Industrie wichtig ist. Außerdem wurde die Bleichung der EFB durch die Weißfäulepilze beurteilt. Je heller, desto eher konnte davon ausgegangen werden, dass Lignin tatsächlich angegriffen beziehungsweise abgebaut wurde. (Novotný et al. 2004) Für die Festbettkultivierung wurde ein Feuchtigkeitsgehalt von 65% gewählt. In unterschiedlichsten Studien, in denen bereits Festbettfermentationen mit Weißfäulepilzen durchgeführt wurden, lagen die optimalen Feuchtigkeitsgehalte meist zwischen 65% und 75%. (Dinis et al. 2009; Zadrazil und Brunnert 1981; Baker et al. 2019)

Für die Festbettkultivierung wurde die Standardtemperatur von 24 °C, welche am Institut üblich ist, auf 28 °C erhöht. Dies sollte dazu dienen nach Pilzen zu screenen, die auch in tropischen Gegenden, in denen Tagestemperaturen von über 30 °C herrschen, ein gutes Wachstum zeigen.

Die fünf aus diesem Screening hervorgegangenen Pilze wurden im Anschluss für zwei Wochen im Erlenmeyerkolben auf 10 g Substrat mit 15 g Leitungswasser (ca. 65% Feuchtigkeit, weil das Substrat ebenfalls 5-10% Restfeuchte enthielt) kultiviert und hinsichtlich der Stickstoff- und Aminosäuregehalte untersucht (Tabelle 25). Der Stickstoffgehalt stieg im Vergleich zu den nicht-fermentierten EFB leicht an, was gegebenenfalls auf den Biomasseverlust und die stickstoffhaltigen Metaboliten der Pilze wie das Polymer Chitin, welches für den Aufbau der Zellwände von Pilzen benötigt wird, zurückzuführen ist. So lässt sich auch ein geringerer Aminosäuregehalt trotz des erhöhten Stickstoffgehaltes erklären.

Nachdem sich die fünf Pilze zuvor bewährt hatten, wurden drei Vertreter zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen mit den Palmöl-Seitenströmen ausgewählt. *Irpex consors* bildet eine aktive Peroxidase, die in vorausgegangenen Arbeiten isoliert und charakterisiert werden konnte. (Imami et al. 2015) Daher wurden die Fermentationen mit *Irpex lacteus* nicht weiter verfolgt um eine möglichst große Vielfalt der Gattungen mit den Experimenten abzudecken. Außerdem wurde *Marasmius palmivorus* (*Marasmiellus palmivorus*) ausgewählt, welcher sich ebenfalls durch die

Aktivität ligninolytischer Enzyme auszeichnet (Chenthamarakshan et al. 2017) und von Stämmen der Ölpalme isoliert wurde. (Schneider et al. 2018) Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass er besonders gut geeignet ist, die Palmöl-Seitenströme als Nährstoffquelle zu nutzen und das Lignin abzubauen. Außerdem wurde *Bjerkandera adusta* ausgewählt, da dieser nicht nur für die Bildung ligninolytischer Enzyme bekannt ist, sondern auch in einzelnen Studien schnelles Wachstum auf lignocellulosehaltiger Biomasse gezeigt hat und die Bildung von Cellulasen nachgewiesen wurde. (Quiroz-Castañeda et al. 2011; Nakamura et al. 1999) Trotz der in der Literatur bereits erfolgreich gezeigten Bildung von Fruchtkörpern von *Pleurotus ostreatus* auf Palmölseitenströmen wurde dieser Pilz hier nicht ausgewählt. (Mohd Tabi et al. 2008)

4.1.2 Ergosterolbestimmung in Festbettkulturen

Im Anschluss an das Screening sollte das Pilzwachstum anhand des Biomarkers Ergosterol analysiert werden. Hierbei handelt es sich um eine Substanz, die ausschließlich von Pilzen gebildet wird und sich in ihrer Zellmembran befindet.

Um die Pilzgehalte der fermentierten EFB zu bestimmen, wurde zuvor ein Referenzwert für reines Pilzmyzel benötigt. Jedoch wurde dieser nicht wie üblich durch Kultivieren der Pilze in einem löslichen Submersmedium generiert. Durch die Unterscheidungen in der Beschaffenheit der Hyphen des Emersmyzels im Vergleich zu den Pellets in Submerskulturen wurde davon ausgegangen, dass sich der Ergosterolgehalt der Myzelien unterscheidet. Dies wurde auch durch den Vergleich der Ergosterolgehalte der beiden Kultivierungsformen gezeigt. Mit einem anderen Vertreter der Abteilung Basidiomycota, *Agaricus brasiliensis*, welcher unter anderem auf Ananas-Schalen kultiviert wurde, konnte dies ebenfalls gezeigt werden. (Nakamura et al. 1999; Mokochinski et al. 2015) Bei Ananas-Schalen handelt es sich ebenfalls um einen lignocellulosehaltigen Seitenstrom der Lebensmittelindustrie. (Roda und Lambri 2019) In dieser Studie wurde in Emerskulturen ein sehr geringer Gehalt an Ergosterol nachgewiesen, welcher mit den Gehalten in EFB vergleichbar ist (vgl. Tabelle 26). Die verwendeten Seitenströme wie Ananas-Schalen oder auch Apfeltrester weisen einen gewissen Gehalt an löslichen, fermentierbaren Zuckern auf, weshalb die Submerskultivierung ein besseres Pilzwachstum zeigte, welches mit den EFB nicht realisierbar gewesen wäre. Daher wurde in dieser Arbeit lediglich die Festbettfermentation durchgeführt.

Asther et al. untersuchten die Esteraseproduktion von *Aspergillus niger* in Zuckerrüben-Schnitzel-Medien, sowohl in Sub- als auch in Emerskultur und bestimmten die Pilzbiomasse ebenfalls über die Ergosterolgehalte. Die Gehalte in den Festbettfermentationen erreichten an Tag fünf ein Maximum, welches in einem Plateau anhielt. Dieses lag bei ca. 2 mg g⁻¹ Fermentat. In den Submerskulturen war das Maximum bereits nach vier Tagen mit 1 mg g⁻¹ erreicht und die Kurve fiel im Kulturverlauf ab. (Asther et al. 2002) Diese Ergebnisse sind mit den in dieser Studie auf Malzextrakt-

Medium bestimmten Ergosterolgehalten vergleichbar; auch hier wurde ein deutlich höherer Ergosterolgehalt nachgewiesen (vgl. Tabelle 27). Bei *A. niger* handelt es sich allerdings um einen Pilz der Abteilung Ascomycota, trotzdem wird die These, dass die Pilze unterschiedliche Mengen Ergosterol in den verschiedenen Kulturen bilden durch die Ergebnisse unterstützt. Somit wurde es als sinnvoll erachtet, zur Berechnung des Pilzgehaltes von Emerskulturen ebenfalls emers gezüchtetes Pilzmyzel als Referenzwert zu nutzen.

Für die Ernte von reinem Pilzmyzel von den ME-Agarplatten wurden sterilisierte, durchlässige Cellophanfolien genutzt, die auf den Agarplatten ausgebreitet und im Anschluss mit dem Inokulum beimpft wurden. So konnte nach sieben Kulturtagen Myzel der vollständig bewachsenen Agarplatten geerntet werden. Hierfür könnte beispielsweise auch ein Nylongewebe verwendet werden. (Steudler und Bley 2015)

Die Ergosterol- und die daraus berechneten Pilzgehalte der fermentierten, getrockneten und gemahlten EFB sind aufgrund des großen Unterschieds der Trockenmasse des Substrats und Myzels sehr gering (vgl. Tabelle 28). Ein weiterer Einflussfaktor auf den Ergosterolgehalt von Pilzmyzelien könnte der Sauerstoffgehalt der Kulturen sein; Nout et al. analysierten den Ergosterolgehalt in Submerskulturen von *Rhizopus oligosporus* mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Sie zeigten, dass 3% Sauerstoff zu einem Ergosterolgehalt von $2,1 \mu\text{g mg}^{-1}$ Biomasse führten, während die Ergosterolgehalte bei 21% Sauerstoffzufuhr in den 14 Kulturtagen auf über $20 \mu\text{g mg}^{-1}$ Biomasse anstiegen. (Nout et al. 1987) Sie bezogen diese Ergebnisse auch auf die Tempeh-Produktion mit *R. oligosporus* und führten die Fermentation von Sojabohnen lediglich in Petrischalen durch, um den Einfluss der Sauerstoffabnahme in der stationären Festbettfermentation auszuschließen. In dieser Arbeit wurde das Substrat in Erlenmeyerkolben fermentiert, somit war lediglich durch den mit einem sterilen Cellulose-Stopfen verschlossenen Hals des Kolbens an der Oberfläche eine Sauerstoffzufuhr sichergestellt. Es ist davon auszugehen, dass der Sauerstoffgehalt in diesem Fall ebenfalls innerhalb des Substrats abgenommen hatte und dies einen signifikanten Einfluss auf den Ergosterolgehalt und den daraus berechneten Pilzgehalt hatte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Biomarker Ergosterol für die Abschätzung des Pilzanteils einer Probe eignet. Es gibt jedoch einige Einflüsse auf die Bildung von Ergosterol, wie die unterschiedlichen Kultivierungsformen (submers und emers) und die Schwankungen des Sauerstoffgehalts beziehungsweise der Sauerstoffzufuhr welche nicht außer Acht gelassen werden sollten.

4.1.3 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

4.1.3.1 Mischung von PKM und EFB

Im nächsten Schritt sollten die Kultivierungsbedingungen optimiert werden, um das Pilzwachstum und den Nährstoffgehalt der Palmöl-Seitenströme für die Nutzung als Futtersubstrat für die Larven der Schwarzen Soldatenfliege zu steigern. Der erste Ansatz der Optimierung war die Beimischung von Palmkernmehl zu den Festbettkulturmedien aus *empty fruit bunches*. Von jedem geernteten Fruchtstand der Ölpalme verbleiben nach dem Ablösen der Palmfrüchte 25 gew.-% EFB (Chew et al. 2021) und 10,5 gew.-% Schalen und Palmkerne (Corley und Tinker 2016) die zum Palmkernmehl verarbeitet werden. Aus diesem natürlich anfallenden Verhältnis von ca. 7:3 ergab sich das Mischungsverhältnis für die Optimierung der Festbettkultivierung. Die Ergebnisse der Ergosterolgehalte (vgl. Tabelle 29) zeigten keine deutliche Steigerung des Pilzwachstums. Es wurde die zuvor verwendete 10%ige Inokulation der Festbettkultivierung mit 5% Inokulationsvolumen verglichen. Die Verringerung der Menge an Vorkultur zeigte keine Veränderung der Ergosterolgehalte, sodass die folgenden Versuche mit dem Inokulationsvolumen von 5% durchgeführt werden konnten, ohne eine Verringerung des Pilzwachstums in Kauf nehmen zu müssen. Im weiteren Verlauf sollten ebenfalls Inokulationsmethoden mit fermentierten EFB getestet werden, um die großtechnische Handhabung zu vereinfachen.

Die fermentierten, gemischten Seitenströme wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Patrick Klüber an die BSFL verfüttert, um eine Präferenz hinsichtlich eines der drei verwendeten Weißfäulepilze zu ermitteln. Das Ergebnis dieser Versuche wird in der abschließenden Diskussion dieses Projekts dargestellt.

4.1.4 *Upscaling* der Festbettkultivierung und abschließende Analytik

Das *Upscaling* der Festbettkultivierung der Pilze *M. palmivorus*, *B. adusta* und *I. consors* wurde ausschließlich mit EFB und Leitungswasser als Medium durchgeführt. Es wurde darauf verzichtet, das PKM vor der Fermentation mit den EFB zu mischen, da sich gezeigt hat, dass die Pilze den zusätzlichen Stickstoff nicht zum Aufbau von wertvollem Protein nutzten, sondern lediglich mehr Nährstoffe metabolisierten. Die Kultivierung sollte nicht mehr mit flüssigen Vorkulturen durchgeführt werden, welche das Handling des Prozesses im industriellen Maßstab erschweren würden. Daher wurde eine frische, sterilisierte Charge EFB in Metallbehältern mit bereits fermentierten EFB beimpft. Die Metallcontainer wurden regelmäßig belüftet und das Substrat gelegentlich mit einem sterilen Spatel umgewälzt, um einen Luftaustausch zu gewährleisten. Die finalen Larvensubstrate wurden hinsichtlich des Fettgehalts, dem Fettsäureprofil, ihrer Aminosäureverteilung, des Lignin-, Asche- und Ergosterolgehalts analysiert.

Die Stickstoffgehalte der fermentierten Substrate wurden von *B. adusta* und *I. consors* leicht erhöht; dies ist allerdings auf den gegebenenfalls entstandenen Biomasseverlust durch den Stoffwechsel der Pilze oder die natürlichen Schwankungen im Substrat zurückzuführen. Die Fermentation mit *M. palmivorus* lieferte keine Veränderung des Stickstoffgehalts im Vergleich zur nicht-fermentierten Referenz. Die gemessenen Aminosäuregehalte der fermentierten Substrate waren im Vergleich zu EFB im Mittel etwas geringer. Dies könnte auf den Aufbau der Pilzbiomasse zurückzuführen sein, da das Zellwandpolymer Chitin aus dem Monomer N-Acetylglucosamin gebildet wird. Dieses enthält im Gegensatz zu Cellulose Stickstoff. (Kumar, Ravi Majeti N. V. 2000)

Es konnte in den Versuchen kein Abbau des Gesamtlignins der fermentierten Substrate nachgewiesen werden. Lediglich eine Steigerung des säurelöslichen Anteils des Lignins wurde gezeigt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Pilze größere Polymere in kleine Fragmente metabolisieren und diese dann säurelöslich sind. Die gleichzeitige Zunahme des säureunlöslichen Lignins lässt sich durch die Mitbestimmung von weiteren potentiell säureunlöslichen, hochmolekularen Inhaltsstoffen erklären. In der Literatur wurde bei der Ligninbestimmung von Weizenkörnern und Maiskleie gezeigt, dass sowohl ein Teil des Stickstoffgehalts der Proben als auch ein Teil der pflanzlichen Fett- und Wachs-Bestandteile im Rückstand für die Bestimmung des säureunlöslichen Lignins nach der Extraktion mit Schwefelsäure verbleiben. (Bunzel et al. 2011)

Auch die Pilze können zu geringen Anteilen dazu beigetragen haben, dass es zu einer Überbestimmung des Lignins kam. Für Chitin wurde beispielsweise gezeigt, dass es sich bei mehrstündigem Kochen in 2%iger (w/w) Schwefelsäure nicht löst. In der Methode für die Ligninbestimmung wurden die Proben für lediglich 2,5 h in 72%iger (w/w) Schwefelsäure bei Raumtemperatur inkubiert. (Zamani et al. 2007) Auch in anderen Studien wurden die harschen Bedingungen genannt unter denen das Chitin in Schwefelsäure löslich ist, was davon ausgehen lässt, dass 2,5 h bei Raumtemperatur in der konzentrierten Schwefelsäure nicht ausreichen. (Kumar, Ravi Majeti N. V. 1999)

Eine weitere von einigen Weißfäulepilzen gebildete hochmolekulare Stoffgruppe sind die Melanine, welche sich ebenfalls durch ihre Widerstandsfähigkeit auszeichnen und die Pilze vor Umwelteinflüssen schützen. (Eisenman und Casadevall 2012) Sie lassen sich nicht mithilfe von Säuren lösen oder fragmentieren. (Nosanchuk und Casadevall 2003) Melanine zeichnen sich durch ihre braune oder schwarze Färbung aus. Da die Festbettkulturen aufgrund der Färbung der EFB eine braune Farbe aufwiesen ist nicht auszuschließen, dass während der Fermentation Melanine gebildet wurden, welche bei der Ligninbestimmung des säureunlöslichen Lignins das Ergebnis verfälschen könnten.

Die Ergosterolgehalten der Festbettfermentationen betragen abgesehen von Kulturen mit *M. palmivorus*, der einen vergleichbaren Ergosterolgehalt aufwies nur einen Bruchteil der Ergosterolgehalte der Kulturen in Erlenmeyerkolben, welche mit einer submersen Vorkultur beimpft wurden.

B. adusta bildete in den Upscale-Kulturen lediglich ein Viertel des zuvor nachgewiesenen Ergosterolgehalts und *I. consors* sogar nur ein Zwanzigstel (Tabelle 26; Tabelle 30). Dies könnte auf einen geringeren Ergosterolgehalt der festen Vorkulturen, die im *Scale-Up*-Prozess verwendet wurden, zurückzuführen sein. Durch den geringeren Sauerstoffgehalt, durch das Wegfallen des Schüttelns beziehungsweise Umwälzens der Vorkulturen im festen Medium kann davon ausgegangen werden, dass der Pilz weniger Ergosterol gebildet hat und sich dies auf die Festbettkulturen in den Metallcontainern übertragen hat. (Nout et al. 1987)

Die Fettgehalte der Fermentate lassen darauf schließen, dass die Pilze in der Lage sind, das Fett abzubauen und zu verstoffwechseln um andere Fettsäuren aufzubauen.

B. adusta verstoffwechselte die in den EFB enthaltene Ölsäure, sodass ihr relativer Anteil an den Fettsäuren von ca. 21% auf 15% sank, die anderen Pilze verstoffwechselten diese kaum. Palmitinsäure wurde von allen drei Pilzen aufgebaut, ihr relativer Anteil in den Fermentaten erhöhte sich auf 50-70% durch den Abbau anderer Fettsäuren. Der Gehalt an Stearinsäure war in den Fermentaten vergleichbar zu dem Gehalt, der in den EFB nachgewiesen wurde. Linolsäure, welche in den EFB kaum nachweisbar war, wurde von allen drei Pilzen gebildet.

Cheirsilp und Kollegen haben aus Palmölseitenströmen und den Palmölproduktionsanlagen assoziierten Böden Cellulose-abbauende Pilze isoliert und ebenfalls eine Festbettfermentation der EFB durchgeführt. Die Fettsäuren der Pilze sollten zur Biogasproduktion dienen. Die Fermentation erfolgte unter Zusatz einer Mineralstofflösung und im Anschluss an eine Vorbehandlung mit 10%iger Natronlauge, welche zum Ligninabbau beitragen sollte. Außerdem wurden die Pilze in der Studie nicht in ihre Phyla eingeordnet, sondern lediglich mit Stammnummern bezeichnet. Zum Vergleich wurde ein Pilz der Abteilung Ascomycota und ein Vertreter der Mucoromycota herangezogen. Die gebildeten Fettsäuren der Palmölproduktions-assozierten Pilze umfassten vor allem Öl-, Palmitin-, Linol- und Stearinsäure. Sie wiesen bei der Fermentation der EFB 32-42% Ölsäure nach. Linolsäure, die in dieser Arbeit von den Pilzen gebildet wurde, konnte von Cheirsilp et al. ebenfalls nachgewiesen werden. Palmitinsäure wurde lediglich zu 21-30% nachgewiesen.

Aufgrund der hohen Abweichung der von den Pilzen gebildeten Anteilen an Öl- und Palmitinsäure ist davon auszugehen, dass es sich bei denen von Cheirsilp et al. isolierten Pilzen vor allem um Pilze der Abteilung Ascomycota handelte und diese sich in ihrem Fettsäurespektrum von Pilzen der Abteilung Basidiomycota unterschieden. (Cheirsilp und Kitcha 2015)

Die Fettsäuren Laurin-, Myristin- und Ölsäure wiesen alle ein ähnliches Muster auf, was den Abbau durch die Pilze der Abteilung Basidiomycota angeht. *B. adusta* baute die drei Fettsäuren von den drei Pilzen am stärksten ab, während die Gehalte in den Fermentaten mit *M. palmivorus* im Vergleich zu den nicht-fermentierten EFB fast unverändert waren.

Aufgrund des Mangels an Informationen darüber, welche Aminosäuren für das Wachstum der Larven der Schwarzen Soldatenfliege essentiell sind, lässt sich keine Aussage über die biologische Wertigkeit der Proteine beziehungsweise über limitierende Aminosäuren für die Insekten treffen. Abbildung 8 zeigt, dass einige Aminosäuren wie Aspartat beziehungsweise Asparagin und Histidin in dem mit *B. adusta* fermentierten Substrat zu größeren Anteilen vorkommen als im nicht-fermentierten Substrat. Es hat sich aber auch gezeigt, dass der Pilz Arginin, Leucin, Tryptophan und Tyrosin verstoffwechselt. Bei den Pilzen *I. consors* und *M. palmivorus* konnte keine auffällige Veränderung in der Zusammensetzung des Aminosäureprofils festgestellt werden. Der Gehalt an Histidin wurde von *I. consors* leicht angehoben, Tryptophan war hingegen in dem fermentierten Larven-Substrat nicht mehr nachweisbar.

Trotz des geringen Ligninabbaus und den geringen Ergosterolgehalten der Festbettkulturen wurde innerhalb dieses Projekts ein alternatives Futtersubstrat für die Larve der Schwarzen Soldatenfliege entwickelt. Das Pilzwachstum ist auf den ESEM-Aufnahmen als Netzwerk, welches sich um die Fasern legt zu erkennen. Die Festbettfermentation der EFB mit dem Pilz der Gattung Basidiomycota *B. adusta*, welcher von den Larven präferiert wurde, eignet sich für die Vorbehandlung des Substrats mit anschließender Zugabe des proteinreicheren PKMs. Festbettfermentationen haben einige Vorteile gegenüber der submersen Kultivierung in technisch aufwendigen Bioreaktoren. Sie imitieren das natürliche Habitat der Pilze, welche auf Totholz wachsen, haben einen geringeren Energieaufwand und produzieren kein Abwasser. Es wird lediglich Trinkwasser benötigt, um die EFB zu befeuchten und den Pilzen ein Medium mit 65-70% Feuchtigkeit bereitzustellen. Das Larven-Substrat wurde im Anschluss an die Fermentation bei -20 °C gelagert und ohne weitere Aufbereitungsschritte an die Larven verfüttert.

Die Larven haben das faserhaltige, fermentierte Substrat genutzt und es konnte eine Anpassung des Darmmikrobioms beobachtet werden. Es war ein Shift der bakteriellen Gemeinschaft hin zu Cellulase-produzierenden Taxa zu erkennen. (Klüber et al. 2022) Im Rahmen des Projekts wurden im Anschluss weitere Fütterungsversuche von mit *B. adusta* fermentierten EFB und anschließender Beimischung von PKM durchgeführt. Die larvale Entwicklung wies im Vergleich zu den BSFL, die mit der fermentierten Mischung gefüttert wurden keinen Unterschied auf.

4.2 Fermentation von Biertreber

Weltweit wurden 2018 190 Milliarden Liter Bier produziert; hierfür wurden 90% der weltweit angebauten Gerste verwendet. Nachdem die Würze abfiltriert wurde, bleibt der Biertreber als fester Rückstand. (Castro und Colpini 2021) Biertreber bildet mit 85% den größten Anteil der Seitenströme, die bei der Bierproduktion anfallen. Aktuell wird ein großer Teil der Treber an Nutztiere verfüttert. Aufgrund der hohen Verderblichkeit durch einen Wassergehalt von 75–80% kann der Treber nur kurze Zeit nach dem Brauen gelagert und anschließend verfüttert werden. (Buffington 2014; Robertson et al. 2010b)

Aufgrund des hohen Protein-, Ballaststoff-, und Feuchtigkeitsgehalt sind viele Anwendungen von Biertreber als Kulturmedium von Mikroorganismen erforscht. (Aliyu und Bala 2011) Durch ihr spezifisches Enzymportfolio ist es den Mikroorganismen möglich, die Inhaltsstoffe wie beispielsweise Kohlenhydrate von Biertreber zu verwerten. Hierzu gehören Xylanasen und Esterasen, welche von *Talaromyces stipitatus* und *Humicola grisea* auf Biertreber-Medien gebildet werden. (Mandalari et al. 2008) Biertreber wurde ebenfalls als Medienbestandteil für die Zucht von Fruchtkörpern des Austernseitlings *P. ostreatus* verwendet. (Gregori et al. 2008) Die Verwendung zur Produktion von Milchsäure durch *Lactobacillus delbrueckii* (Mussatto et al. 2007b) oder Ferulasäure, welche als natürliche Antioxidans Anwendung in der Lebensmittelindustrie findet, ist ebenfalls erforscht (Mussatto et al. 2007a). Viele der Anwendungen von Biertreber besitzen das Potential zum nachhaltigen Recycling des Seitenstroms, sind allerdings lediglich im Labormaßstab erforscht. (Aliyu und Bala 2011) Außerdem ist zu bedenken, dass bei der Produktion von Enzymen oder Substanzen durch Mikroorganismen erneut Seitenströme anfallen, welche nach der Extraktion zurückbleiben. Größere Mengen Biertreber könnten Anwendung finden, wenn sie zum Beispiel für die Proteinisolierung genutzt werden oder direkt als Lebensmittelzutat eingesetzt würden. Doch auch hier gibt es Herausforderungen und die Verwendung ist nicht trivial. (Amoriello et al. 2020)

4.2.1 Wiederfindungsraten der Aminosäureanalytik

Bei der Bestimmung der Aminosäuregehalte beziehungsweise -verteilung wurde mit einer externen Kalibrierreihe mit fünf Punkten gearbeitet, welche für die einzelnen Aminosäuren ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 0,99 besaß. Mithilfe des Referenzproteins α -Lactalbumin wurden die Wiederfindungsraten für die einzelnen Aminosäuren bestimmt, welche in Tabelle 31 aufgeführt sind. Die Aufarbeitung und Analyse der Aminosäuren erfolgte in Anlehnung an Anhang III, F, Bestimmung des Gehalts an Aminosäuren (außer Tryptophan) und G Bestimmung des Tryptophangehalts der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln. Der Tryptophangehalt wurde separat nach basischer Hydrolyse bestimmt. Allerdings

soll der pH-Wert laut der Methode nach VO (EG) 152/2009 auf 3,0 eingestellt werden. (Europäische Kommission 27.01.2009) In der am Institut etablierten Methode wird der pH-Wert auf 2,2 eingestellt, da dies von der chromatographischen Methode und Pufferzusammensetzung erfordert wird. Tryptophan wies die geringste Wiederfindungsrate von $21,52\% \pm 1,45\%$ auf. Gegebenenfalls kann die Änderung des pH-Werts während der Aufarbeitung für hohe Verluste von Tryptophan sorgen.

Methionin und Cystein, die durch eine der Hydrolyse vorangegangene Oxidation einem weiteren Aufarbeitungsschritt unterliegen, wiesen Wiederfindungsraten von $63,34\% \pm 5,01\%$ beziehungsweise $76,23\% \pm 5,04\%$ auf. Diese Werte sind mit den Wiederfindungsraten der übrigen Aminosäuren, die alle zwischen 76% und 107% lagen, vergleichbar. In der Literatur werden Cystein und Methionin zum Teil nicht analysiert, oder die Wiederfindungsraten weichen stark von denen der anderen Aminosäuren ab. Dies zeigt, dass sich die Aufarbeitung mit vorangegangener Oxidation für die Analyse der schwefelhaltigen Aminosäuren eignet. In der Literatur wurde mit bovinem Serumalbumin als Referenz eine Wiederfindungsrate von 25% für Cystein ermittelt. Dabei wurde mithilfe einer UHPLC und einer Derivatisierung mit Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) gearbeitet. (Meussen et al. 2014) Die übrigen Wiederfindungsraten lagen zwischen 80% und 100%. In einer weiteren Studie, in der die Hydrolyse mit der sauren Hydrolyse vergleichbar ist und die Messung ebenfalls mit einer Ionenaustauscher-Säule stattfand, wurden hohe Wiederfindungsraten zwischen 90% und 115% bestimmt. Tryptophan und Cystein wurden hier jedoch nicht analysiert. (Shim et al. 2013) Auch Zeng und Kollegen, die mit einem Lithium-Puffersystem arbeiteten, analysierten sowohl Tryptophan als auch Cystein und Methionin nicht. Sie bestimmten lediglich Wiederfindungsraten freier Aminosäuren. Diese waren mit 95%-110%, vergleichbar hoch. (Zeng et al. 2015)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aminosäuren relativ hohe Wiederfindungsraten aufweisen. Lediglich die Methode zur Bestimmung von Tryptophan wies eine deutlich niedrigere Wiederfindungsrate auf, jedoch kann das auf die Instabilität der Aminosäure zurückzuführen sein, weshalb sie oft auch außer Acht gelassen wird.

4.2.2 Analytik der Substrate

Zu Beginn des Projekts wurden die zur Verfügung gestellten Biertreber der Störtebeker Braumanufaktur und die Lupinenseitenströme auf ihre Zusammensetzung und hinsichtlich ihrer Proteingehalte und -qualität untersucht. In Tabelle 53 sind die Ergebnisse im Vergleich zur Literatur aufgeführt. Die Ergebnisse für den Protein- und Aschegehalt der drei unterschiedlichen Biertreber wurde in der Tabelle als Spannweite angegeben.

Tabelle 53: Vergleich der unterschiedlichen Analysen von Biertreber.

	Biertre- ber	(Robertson et al. 2010b)	(Mussatto und Roberto 2006)	(Xiros und Christako- poulos 2012)	(Kabel et al. 2002)	(Kanauchi et al. 2001)
[g (100 g TM)⁻¹]						
Hemi- cellu- lose	n.a.	n.a.	28,4	40,0	38 (nicht- stärke Poly- saccharide)	21,8
Cellu- lose	n.a.	19,7 2,7	16,8	11,5		25,3
Stärke	n.a.	6,7 ± 4,1		2,9	4	n.a.
Lignin	n.a.	14,5 ± 1,7	27,8 Klason: 23 ASL: 4,8	11,9	n.a.	11,9
Protein	16–21	18,6 ± 4,5	15,3 (N = 6,25)	14,0	30	24,0
Fett	n.a.	n.a.	n.a.	13,0	n.a.	10,6
Asche	2,8–3,3	n.a.	4,6	3,2	n.a.	2,4

Bei den Mineralstoffen der Biertreber war der Calciumgehalt mit 5 mg (g TM)⁻¹ im Durchschnitt dominierend, die Kalium- und Natriumgehalte lagen zwischen 1 und 1,5 mg (g TM)⁻¹ und die Magnesiumgehalte zwischen 1,5 und 2 mg (g TM)⁻¹. In der Literatur wurde in Biertreber 3,5 mg (g TM)⁻¹ Calcium nachgewiesen, was unter dem in dieser Arbeit nachgewiesenen Gehalt liegt. Der Magnesiumgehalt mit 2,0 mg (g TM)⁻¹ der Literatur ist mit dem in dieser Arbeit bestimmten vergleichbar. Die Kalium- und Natriumgehalte lagen in der Literatur mit 0,25-0,31 mg (g TM)⁻¹ weit unter den in dieser Arbeit nachgewiesenen Gehalten. (Mussatto und Roberto 2006) Eisen und Zink wurden in dieser Arbeit lediglich in geringen Mengen von 0,1 bis 0,2 mg (g TM)⁻¹ nachgewiesen, bei Mussato und Roberto lagen die Konzentrationen ebenfalls bei unter 0,2 mg (g TM)⁻¹ und waren somit vergleichbar. Die Mineralstoffzusammensetzung von Getreide unterliegt stark den äußeren Einflüssen während des Anbaus. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass ein geringer Wassergehalt des Bodens zu einer Akkumulation der Mineralstoffe Phosphor, Calcium, Magnesium und Zink führt. (Zhao et al. 2009)

Die Bodenbeschaffenheit und die Anbaubedingungen können auch einen Einfluss auf weitere Inhaltsstoffe von Getreide, wie den Proteingehalt haben. Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Stickstoffdünger das Wurzelwachstum stimuliert, die Produktion von Speicherproteinen steigert und die Speicherung von Mineralstoffen in Weizen begünstigt. Dies ist aber von weiteren äußeren Faktoren wie dem pH-Wert des Bodens abhängig. (Caldelas et al. 2023)

Robertson und Kollegen analysierten Lager- und Ale-Biertreber. Der typische Feuchtigkeitsgehalt der Treber betrug 75-80%. Außerdem analysierten sie die Aminosäuregehalte. Für den Glutamin-gehalt wurden für Pilsener-Treber, Schwarzbierdreber und Weizenbierdreber in dieser Arbeit zwischen 17,6 und 23,4 g (100 g AS)⁻¹ und damit die größten Anteile nachgewiesen, dies deckt sich mit der Literatur. Hier sind Gehalte zwischen 19 und 20 g (100 g AS)⁻¹ angegeben. An zweiter Stelle steht der Prolingehalt mit einem Maximum von 13,8 g (100 g AS)⁻¹ im Pilsener-Treber und einem Minimum von 9,4 g (100 g AS)⁻¹ im Weizenbierdreber, verglichen mit ca. 9,5% gemittelt in Ale und Lager Bierdreber. (Robertson et al. 2010b) Die Aminosäureverteilung scheint zwischen den Sorten aus Gerste und Weizen zu variieren, ist jedoch gut mit der Literatur vergleichbar.

Die biologische Wertigkeit der Proteine im Bierdreber betrug 84, die des Lupinenklarlaufs 74 und die des Substrats, das als Lupinenfasern bezeichnet wurde sogar 87. Diese haben im Vergleich den geringsten Proteingehalt von ca. 15%, was, wie die Bezeichnung vermuten lässt, darauf zurückzuführen ist, dass sie sich größtenteils aus Fasern zusammensetzen.

4.2.3 Screening

Das Screening von 22 Speisepilzen erfolgte auf fünf unterschiedlichen Agarmedien im Vergleich zum Standardmedium Malzextrakt-Agar. Die meisten der 22 getesteten Pilze zeigten auf den Medien mit Seitenströmen ein ähnliches Wachstum wie auf Malzextrakt-Agar. Die Geruchseindrücke unterschieden sich jedoch deutlich. Die Agarplatten mit Bierdreber wiesen meist brotartige Geruchseindrücke auf, die mit den Pilzaromen, wie im Fall des *C. aegerita*, ein ansprechendes Aroma bildeten. Die Agarplatten mit dem Lupinenklarlauf und anteilig Bierdreber zeichneten sich bei einigen Pilzen, wie *P. eryngii* und *P. salmoneo-stramineus* zusätzlich durch fruchtige Noten aus. Das Medium aus Lupinenklarlauf und -faser ohne Bierdreberzusatz schlug während der Fermentation hingegen schnell in säuerliche, unangenehme Noten um. Diese Kultivierungsansätze wurden daher nicht weiterverfolgt.

Für die weiteren Versuche wurden nach dem Screening einige Pilze ausgewählt, die die Agarplatten nach 14 Tagen vollständig bewachsen hatten. *P. eryngii* zeichnete sich auf dem Pilsener-Treber- und Weizenbierdreber-Medium durch schnelleres Wachstum als auf dem Vergleichsmedium aus. Außerdem wiesen die bewachsenen Agarplatten ein Aroma mit neutralen bis leicht honigartige Noten auf. *P. nameko* wuchs auf allen Medien mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit und zeichnete sich durch seine neutralen Geruchseindrücke auf den Bierdreber-Medien aus.

P. salmoneo-stramineus zeichnete sich durch ein schnelles Wachstum und fruchtig, frische Geruchseindrücke auf den Medien mit Lupinenseitenströmen aus.

Im nächsten Schritt wurden Submerskulturen hinsichtlich Pilzwachstum und Rohproteingehalt analysiert. Die Substrate wurden nicht vorbehandelt, sondern gefroren von der Brauerei erhalten

und feucht für die Medienbereitung genutzt. Dies sparte einen Arbeitsschritt und den Zeit- beziehungsweise Energieaufwand für die jeweilige Trocknungsmethode.

Eine Gefriertrocknung der großen Mengen Treber, die für die Medien vor allem in der industriellen Anwendung des Verfahrens benötigt würden, wäre vor dem Hintergrund des nachhaltigen Recyclings der Seitenströme nicht sinnvoll. Eine Gefriertrocknung würde den Energieaufwand des Prozesses enorm steigern. (Aliyu und Bala 2011) Die Trocknung würde zwar das Volumen und Gewicht des Biertrebers verringern und so einen positiven Einfluss auf die Transportkosten haben, allerdings ist auch eine unerwünschte Veränderung des Aromas denkbar. (Robertson et al. 2010a) Die Lagerung der Substrate erfolgte stets gefroren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Biertreber sollte keinesfalls bei Raumtemperatur gelagert werden, da die mikrobiologische Aktivität bereits beim Abkühlen nach dem Brauen einsetzt. (Bianco et al. 2020) Durch Gefrieren kann das mikrobielle Wachstum gehemmt werden und es kommt nicht zu Verlusten in der Zusammensetzung des alkoholunlöslichen Rückstandes, wie der Polysaccharide, oder zum Abbau der phenolischen Säuren, wie es bei Autoklavieren und anschließender Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ der Fall war. (Robertson et al. 2010a) Allerdings ist zu beachten, dass die Substrate im Rahmen der Medienbereitung autoklaviert wurden und Veränderungen dadurch nicht auszuschließen sind. Die Kohlenhydratzusammensetzung vor und nach dem Autoklavieren wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.

Aus dem Screening in Submersmedien mit Biertreber in vollständig entsalztem Wasser ging hervor, dass *P. eryngii* und *P. nameko* eine Steigerung des Proteingehalts in Verbindung mit dem Verlust an Biotrockenmasse des Mediums erzielten. Bei *P. eryngii* war die Steigerung geringer, und lag bei ca. 2-3,5 g Protein $(100\text{ g TM})^{-1}$ im Vergleich zum nicht-fermentierten Pilsener-Treber. Der Biomasseverlust betrug nach neun Kulturtagen fast 50%, von den eingesetzten 20 g L^{-1} wurden nach neun und elf Tagen nur noch $10,4\text{-}10,6\text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen. Der Biomasseverlust von *P. nameko* in Weizenbiertreber und vollständig entsalztem Wasser betrug ca. 25%, von 20 g L^{-1} auf $14,3\text{ g L}^{-1}$ an Kulturtag neun. Am elften Tag betrug der Gehalt noch $12,8\text{ g L}^{-1}$. Die Steigerung des Proteingehalts erfolgte von $19,2\text{ g (}100\text{ g TM)}^{-1}$ des nicht fermentierten Weizenbiertrebers auf $27,3\text{ g (}100\text{ g TM)}^{-1}$ an Kulturtag elf. Aufgrund der Steigerung des Proteingehalts in Kulturen mit *P. nameko* wurde *P. eryngii* ebenfalls im Weizenbiertreber-Medium gezüchtet; hierbei wurde im nächsten Schritt das Wasser durch Lupinenklarlauf ersetzt. Der Fokus lag auf der Verwendung eines weiteren Nebenstroms, damit auf den Zusatz von Frischwasser verzichtet werden konnte. Diese Kulturen wiesen einen sehr fruchtigen, himbeerartigen Geruchseindruck auf, weshalb die Kultivierung von *P. eryngii* in Weizenbiertreber-Medium mit Lupinenklarlauf 1 weitergeführt wurde.

Die Lupinenfasern wurden in Kombination mit Weizenbiertreber und dem Lupinenklarlauf 1 ebenfalls zu einigen Submerskulturen hinzugefügt; der Kulturverlauf von *P. salmoneo-stramineus* ist in Abbildung 14 gezeigt. Zu Beginn war eine Steigerung der Biomasse pro Liter zu erkennen,

was auf die Inhomogenität der Substrate beziehungsweise des Prozesswassers zurückgeführt werden könnte. An Kulturtag neun verringerte sich die Biomasse und lag bei unter $13,4 \text{ g L}^{-1}$. Der Rohproteingehalt wurde von $26,2 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ leicht gesteigert, auf $31,7 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ und fiel danach wieder auf $28,25 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ ab. Allerdings waren die Fehler bei dieser Kultivierung mit Prozesswasser größer, was auf sehr große biologische Schwankungen hindeutet. Außerdem waren die Geruchseindrücke von *P. salmoneo-stramineus* nicht ansprechender als die vom *P. eryngii*.

4.2.4 *Pleurotus eryngii*

Mit den aus dem Screening hervorgegangenen Pilzen wurde zunächst die Medienoptimierung durchgeführt, um einen möglichst hohen Proteingehalt und eine hohe Biomasseausbeute zu erhalten. Begonnen wurde mit *Fed-Batch*-Ansätzen mit *P. eryngii*. In einer vorangegangenen Arbeit wurden vergleichbare Versuche bereits mit *Pleurotus sapidus* in einem nicht-vollständig löslichen Medium aus Seitenströmen der Lebensmittelindustrie durchgeführt. Diese Versuche sorgten für ein besseres Pilzwachstum und eine bessere Biokonversion der Seitenströme als *Batch*-Ansätze. (Ahlborn 2019) Die Zusammensetzung der *Fed-Batch*-Medien mit einer Substratmenge von insgesamt 20 g L^{-1} orientierte sich an den vorangegangenen Arbeiten. Die Medien sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Ergebnisse wurden jeweils mit denen von *P. eryngii* in 20 g L^{-1} Trockenmasse Weizenbier treber verglichen. Abbildung 15 zeigt den Pilz- und Rohproteingehalt der Kulturen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Pilzgehalt bei relativ stabilem Rohproteingehalt in den unterschiedlichen *Fed-Batch*-Kulturen stark gesteigert werden konnte.

Parallel zu den Kulturen mit Weizenbier treber und Lupinenklarlauf 1 wurde *P. eryngii* in Malzextraktmedium kultiviert, um den Pilzgehalt abzuschätzen. In dieser Arbeit wurde *P. eryngii* mehrfach in ME-Medium kultiviert und analysiert. Außerdem wurde nach der Methodvalidierung der GC-FID Methode (Bickel Haase et al. 2024) überprüft, ob die beiden Methoden zur Analyse der Ergosterolgehalte vergleichbare Ergebnisse lieferten. Nachdem dies sichergestellt wurde, wurden die ME-Kulturen von *P. eryngii* stets parallel zu den Kulturen in Bier treber-Medium kultiviert. Die Werte lagen, bis auf einen biologischen Ausreißer von ca. $7,3 \text{ mg (g TM)}^{-1}$ bei $3,2\text{-}3,8 \text{ mg (g TM)}^{-1}$.

Bereits 1993 wurden erste Bezugswerte des Ergosterolgehalts von Hyphomyceten analysiert. Bei diesen Pilzen konnte kein Einfluss des Kulturmediums auf die Ergosterolgehalte gezeigt werden. Allerdings unterschieden sich die Gehalte von zwei verschiedenen Stämmen von *Alatospora acuminata* im gleichen Medium. Der gleiche Stamm wiederum bildete zeitlich unabhängig eine reproduzierbare Menge Ergosterol. (Gessner und Chauvet 1993) Des Weiteren wurde in Submerskulturen von vier unterschiedlichen aquatischen Hyphomyceten nachgewiesen, dass der Ergosterolgehalt mit der Pelletgröße korreliert. (Raviraja et al. 2004) Der Ergosterolgehalt ist in festen Medien wie Bodenproben oder Pflanzengewebe als Parameter zum Nachweis von Pilzwachstum

etabliert. (Gessner und Schmitt 1996; Mille-Lindblom et al. 2004) Hierbei handelt es sich allerdings nicht primär um Speisepilze. Es wurde ebenfalls ein Anstieg im Ergosterolgehalt während der exponentiellen Wachstumsphase von Hyphomyceten und zu Beginn der stationären Phase des Wachstums nachgewiesen. (Charcosset und Chauvet 2001) Dieser Anstieg zeigte sich auch bei Pilzen der Abteilung Basidiomycota. Charcosset und Chauvet verglichen das Wachstum der Pilze in Erlenmeyer- und Schikane-Kolben und zeigten einen vergleichbaren Glucoseabbau, jedoch eine langsamere Steigerung des Ergosterolgehalts durch die geringere Sauerstoffverfügbarkeit in Erlenmeyerkolben. Dies ist allerdings nicht auf den Sauerstoffgehalt zurückzuführen, der in beiden Kolben vergleichbar war, sondern auch auf die Pelletgröße, die in den Erlenmeyerkolben größer war. So gelangt weniger Sauerstoff an die Zellen im Inneren der Pellets. Ein Pilz der Abteilung der Basidiomycota, *Hebeloma crustuliniforme* wurde in einer Studie aus dem Jahr 1990 bereits auf den Ergosterolgehalt untersucht. Dieser variierte mit dem Glucosegehalt des Mediums. Bei Abwesenheit von Glucose wurde mehr Ergosterol gebildet. Das zeigt, dass ein Einfluss des löslichen Mediums nicht vernachlässigt werden kann. Dennoch wurde der Ergosterolgehalt unter vergleichbaren Bedingungen als Biomarker für den Pilzgehalt und das Wachstum des Pilzes gewählt. (Johnson und McGill 1990) Gegebenenfalls unterscheidet sich die Abhängigkeit des Ergosterolgehalts vom Medium je nach Pilz oder ist von weiteren äußeren Faktoren abhängig. Wie Ahlborn zeigte, wurde von *P. sapidus* zum Beispiel ein vergleichbarer Ergosterolgehalt in Minimalmedium wie im Malzextraktmedium gebildet. (Ahlborn 2019) Dort hatte das Medium keinen wesentlichen Einfluss auf das gebildete Ergosterol. Grundsätzlich ist es möglich, den Ergosterolgehalt als Marker für die Biokonversion zu nutzen und somit den Pilzgehalt der Kulturen abzuschätzen, wenn die äußeren Bedingungen vergleichbar sind.

Das Pilzwachstum in den Medien mit Lupinenklarlauf 1 ließ sich nur bedingt reproduzieren. Diese Probleme können gegebenenfalls auf Inhaltsstoffe im Lupinenklarlauf 1 zurückgeführt werden. Der Lupinenklarlauf wurde lediglich auf seinen Protein- und Mineralstoffgehalt untersucht und nicht auf weitere pflanzliche Sekundärmetabolite. Die Ansätze der *Fed-Batch*-Kulturen wurden dann in VE-Wasser wiederholt. Hierbei wurden die Medien beziehungsweise Ansätze FB 5 bis FB 8 verwendet (Tabelle 9). Bei der Kultivierung von *P. eryngii* wurde erneut eine Kultivierungsdauer von sieben Tagen gewählt, da sich diese im Screening als Kompromiss zwischen Biomasseverlust und Proteingehalt erwies. Ein weiterer Vorteil der Kultivierungsdauer von sieben Tagen war der ansprechende Geruchseindruck von *P. eryngii*, welcher als fruchtig wahrgenommen wurde. Tabelle 37 zeigt, dass die Pilzgehalte nicht wie zuvor in Kulturen mit Lupinenklarlauf bei über 50% lagen, sondern bei unter 20%; daher wurden weitere Experimente zur Steigerung der Biokonversion durchgeführt.

In einem Optimierungsansatz wurden die Vorkulturen von *P. eryngii* an unterschiedlichen Kulturtagen auf ihren Ergosterolgehalt analysiert. Standardmäßig wurden die Vorkulturen nach sieben

Tagen verwendet. Um sicherzugehen, dass der Ergosterolgehalt entsprechend hoch ist und der Pilz sich an diesem Tag im Wachstum befindet, wurden die Vorkulturen von Tag sieben bis elf geerntet und auf ihren Ergosterolgehalt untersucht.

Einen früheren Zeitpunkt zu wählen wurde nicht in Erwägung gezogen, da erst ab Tag sieben eine ausreichende Menge Pellets gebildet wurde, die sich durch Homogenisieren als Inokulum eignete. Basierend auf Erfahrungswerten wurde als Minimum die Pellet-Menge gewählt, die etwa einem Drittel des Medien-Volumens entsprach, welches optisch beurteilt wurde.

Abbildung 17 zeigt, dass die Biotrockenmasse der Vorkulturen von Tag sieben bis elf anstieg. Der Ergosterolgehalt erreichte sein Maximum am achten Kulturtag. Das Maximum des absoluten Ergosterolgehalts in einem Kolben (100 mL Vorkultur) war an Tag zehn erreicht. Es wurden aus Vorkulturen, welche unterschiedlich lange kultiviert wurden (sieben, acht und zehn Tage) Hauptkulturen in Malzextrakt- und Weizenbiertreber-Medium angesetzt. Hierfür wurde 10 g L^{-1} Trockenmasse Biertreber verwendet, da sich diese Menge in den *Fed-Batch*-Versuchen im Vergleich zu 20 g L^{-1} als vorteilhafter erwiesen hatte (vgl. Tabelle 35). Die Kulturen wurden an den Kulturtagen fünf und sieben geerntet. Tabelle 37 zeigt, dass die Ergosterolgehalte der Hauptkulturen von Tag fünf auf Tag sieben im Weizenbiertreber-Medium anstiegen, der Pilz also weiterhin gewachsen ist. Mit siebentägiger Vorkultur konnten nach sieben Tagen in Malzextraktmedium erneut $3,8 \text{ mg (g TM)}^{-1}$ Ergosterol nachgewiesen werden, was für die Reproduzierbarkeit dieser Werte sprach (Tabelle 36).

Bei der Berechnung der Pilzgehalte der unterschiedlichen Kulturen in Weizenbiertreber-Medium konnte kein Unterschied festgestellt werden, der darauf hindeutet, dass die Vorkultur-Dauer beziehungsweise der Ergosterolgehalt der Vorkulturen einen Einfluss auf den Pilzgehalt der Hauptkulturen hatte. Die Vorkulturdauer von sieben Tagen wurde daher beibehalten. Man könnte kürzere Kultivierungsdauern untersuchen, allerdings sollte aufgrund der geringen Menge an Pellets in einem größeren Maßstab als 100 mL kultiviert werden. Sieben Tage eignen sich als Kompromiss zwischen Ergosterolgehalt und Pellet-Menge sehr gut.

Mit Mangansulfat wurde in der Literatur bereits bei einer Supplementierung von $50 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Substrat eine Steigerung des Pilzwachstums bei der Fruchtkörperzucht von *P. eryngii* erzielt. (Stajić et al. 2009) Dies wurde mit dem positiven Einfluss von Mangan auf die Transkription und Aktivierung der Mn-Peroxidasen des Pilzes erklärt. Da es sich bei Biertreber um einen lignocellulosehaltigen Nebenstrom handelt, wurde davon ausgegangen, dass sich die Supplementierung mit Mangan auch positiv auf das Pilzwachstum in den Submerskulturen auswirken könnte, wenn die Transkription und Aktivierung der Mn-Peroxidasen gefördert werden. Als Menge wurden mit $32,5 \text{ mg Mn g}^{-1}$ Biertreber eine deutlich höhere als die in der Literatur vorgegebene gewählt. Die Menge sollte im kleineren Maßstab applizierbar sein. Außerdem handelte es sich um Submerskulturen, in denen sowohl das Medium als auch das Inokulum verdünnter vorliegen, als

in einer Festbettkultur. Das Mangansulfat beeinflusste das Pilzwachstum jedoch negativ. Die Kulturen mit MnSO_4 verfärbten sich dunkel und der Pilz wurde im Wachstum gehemmt oder abgetötet.

Mit der Erkenntnis, dass das Alter der Vorkultur keinen Einfluss auf die Biokonversion der Seitenströme hatte, und sich Mangansulfat in der eingesetzten hohen Konzentration als Supplement im Medium negativ auf das Pilzwachstum auswirkte wurde im nächsten Ansatz die eingesetzte Menge an Weizenbiertreber variiert. Die Versuchsreihe wurde in einer Dreifachbestimmung mit 2,5 bis 100 g L^{-1} Treber angesetzt und sieben Tage kultiviert. Der Pilzgehalt in den Kulturen mit dem geringsten Treber-Anteil lag nach sieben Tagen bei über 55%. Der Pilzgehalt in dem Medium mit 10 g L^{-1} Treber betrug etwa 35%, was mit den zuvor bestimmten Werten (Tabelle 37) vergleichbar war. Um eine möglichst große Menge des Seitenstroms Biertreber zu verwerten, ist es nicht sinnvoll, weniger als 10 g TM L^{-1} als Medium einzusetzen. Hinzukommt der hohe Biomasseverlust. Bei $2,5 \text{ g}$ eingesetztem Treber blieben lediglich $1,8 \text{ g L}^{-1}$ Fermentat zurück, was 70% entspricht. Dies bedeutet, dass ein Fermenter für eine Produktion von 1 kg Trockenmasse über 500 Liter Volumen fassen müsste.

Im Anschluss an die Bestimmung des Pilzgehalts wurden die Stickstoff- und Aminosäuregehalte der drei vielversprechendsten Kulturen, also der Medien mit $2,5$; 5 und 10 g L^{-1} Treber, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 aufgeführt. Die Fermentation von $2,5 \text{ g L}^{-1}$ Treber führte zu keinem signifikanten Unterschied im Aminosäuregehalt im Vergleich zu 10 g L^{-1} Treber. Der Aminosäuregehalt von 5 g L^{-1} Treber unterschied sich dagegen signifikant ($\alpha=0,05$) von den anderen beiden Medien. Die biologische Wertigkeit und der *essential amino acid index* unterschieden sich jedoch nicht. Der Aminosäuregehalt fiel bei $2,5 \text{ g L}^{-1}$ Biertreber im Medium mit weniger als $17 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ gering aus und in Verbindung mit dem Stickstoffgehalt nach Kjeldahl von $4,8 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ zu einem geringen Kjeldahlfaktor für den Reinproteingehalt von 3 geführt hat. Dies lässt sich damit erklären, dass der Pilz bei einer stärkeren Limitierung des Substrats ($2,5 \text{ g L}^{-1}$ im Vergleich zu 10 g L^{-1}) in einem anderen Stoffwechselstadium gewesen zu sein scheint. Es wurde ein größerer Anteil der Stickstoffverbindungen aus dem Biertreber in pilzeigene Stoffe umgebaut, bei denen es sich neben Proteinen auch um Chitin handelt, welches bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl mitbestimmt wurde und so zu einem vergleichbaren Stickstoffgehalt bei einem geringeren Aminosäuregehalt führt. Bei einem Überangebot an Biertreber im Medium können durch die Kultivierungsbedingungen wiederum auch stickstoffhaltige Substanzen in Lösung gegangen sein, was zu einem leicht verringerten Stickstoffgehalt führte.

Der Kräuterseitling *P. eryngii* ist ein weit verbreiteter Speisepilz und die Fruchtkörper sind in Europa, Asien und Nord-Amerika beliebt. In Japan stieg die Produktion von 1995 mit 60 t innerhalb von 8 Jahren auf 29.000 t . (Rodriguez Estrada und Royse 2007) Die Fruchtkörper wurden bereits auf unterschiedlichsten Substraten gezüchtet. Dazu gehören Sägespäne, Reiskleie und auch

Biertreber. (Peng et al. 2000) Der Pilz wird nicht nur wegen seines Geschmacks geschätzt, sondern auch aufgrund der positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Fruchtkörper. Schon 1999 wurde eine Studie veröffentlicht, die in Fruchtkörpern von *P. eryngii* einen Stickstoffgehalt von $5,2 \pm 0,03 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ und ein Aminosäuregehalt von $22,3 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ nachwies. (Manzi et al. 1999) Außerdem wurde gezeigt, dass der Pilz für die Humanernährung essentielle Spurenelemente wie Selen aus anorganischen Salzen akkumuliert und so als wichtige Mineralstoffquelle dienen kann. (Stajić et al. 2009) Durch die Aktivität von Manganperoxidasen und Arylalkoholoxidasen konnte bereits 1994 ein Ligninabbau von 47% von Weizenstroh durch die Fermentation mit *P. eryngii* erzielt werden. (Camarero et al. 1994) Dies spricht dafür, dass sich der Pilz auch für den Abbau von in Biertreber enthaltenem Lignin und dadurch für die Generierung eines höherwertigen Produktes eignet. Hierfür sollte zukünftig auch der Ligningehalt beziehungsweise -abbau bestimmt werden.

Dem submers kultivierten Myzel des Pilzes wurde in der Literatur bisher kaum Aufmerksamkeit gewidmet. Nur eine Studie enthält Nährwerte. Der Proteingehalt betrug $24,52 \pm 0,53\%$. Als Ergosterolgehalt wurden $2,51 \pm 0,24 \text{ mg g}^{-1}$ nachgewiesen und mit Werten der Fruchtkörper verglichen. Es wurde ein Rohrzucker-Pepton-Medium mit einem C/N-Verhältnis von 14 verwendet, welches sich als optimal für *P. eryngii* herausstellte. Das Wachstum war dabei Kohlenstoff-limitiert. Saccharose und Glucose waren präferierte C-Quellen für eine hohe Ausbeute an Myzel. (Singh et al. 2020) Das C/N-Verhältnis von Weizenbiertreber beträgt 14,8. Auf diesen Grundlagen könnten weitere Optimierungsschritte des Mediums erfolgen.

4.2.5 *Pholiota nameko*

Der zweite Pilz, der für die Biomasse- und Proteinproduktion in Biertrebermedien genutzt wurde, war *P. nameko*. Dieser soll vor allem in einem dieser Arbeit folgenden Projekt für das *Upscaling* der Fermentation genutzt werden. Zu Beginn wurde der Pilz in 20 g L^{-1} Trockenmasse Biertreber kultiviert, die Kulturen an unterschiedlichen Tagen geerntet und auf ihre Biomassen und Rohproteingehalte analysiert. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurde diese Zeitreihe in zwei zeitlich unabhängigen Doppelbestimmung durchgeführt. Die Biotrockenmassen der ersten Kultivierung sind in Abbildung 24 dargestellt. Die Biotrockenmasse war über den Zeitraum von Tag drei bis neun in Pilsener-Treber-Medium relativ konstant bei $20\text{-}22 \text{ g L}^{-1}$. In Weizenbiertreber-Medium sank die Biomasse allerdings ab Kulturtag fünf auf $17,5 \text{ g L}^{-1}$. Die zeitlich unabhängige Kultivierung sorgte für stark variierende Biotrockenmassen in beiden Zeitreihen. Im Pilsener-Treber-Medium wurden lediglich 62% der Biotrockenmassen nachgewiesen und im Weizenbiertreber-Medium waren es 65,3%, was auf die biologische Variabilität des Biertreibers zurückzuführen sein könnte. Der große Biomasseverlust kann von unterschiedlichen Wassergehalten der Biertreber-Chargen stammen, da der Feuchtigkeitsgehalt nicht vor jeder Medienzubereitung überprüft wurde.

Der Rohproteingehalt von Pilsener-Treber ($23,67 \pm 1,24 \text{ g (100 g)}^{-1}$) wurde während der Kultivierung mit *P. nameko* auf $23-24,2 \text{ g (100 g)}^{-1}$ kaum beeinflusst. Der Rohproteingehalt von Weizenbiertreber von $19,24 \text{ g} \pm 0,71 \text{ g (100 g)}^{-1}$ wurde durch die Fermentation mit *P. nameko* bis zum Kulturtag neun um fast 50% auf $28,4 \text{ g (100 g)}^{-1}$ angehoben. Im Malzextraktmedium wies die Pilzbiomasse einen Rohproteingehalt von $37,5 \text{ g (100 g)}^{-1}$ auf.

Als Bezugswert für die Berechnung der Pilzgehalte wurde der Ergosterolgehalt in Malzextraktmedium am fünften Kulturtag gewählt. Der Ergosterolgehalt war sowohl in den zwei Biertrebermedien also auch in Malzextraktmedium an Kulturtag fünf am höchsten. Der Pilzgehalt der kinetischen Reihe betrug jedoch maximal 12%, was deutlich unter den Gehalten von *P. eryngii* liegt.

Analog zu *P. eryngii* wurden im nächsten Schritt Versuche zur Medienoptimierung durchgeführt. Zuerst wurden die Vorkulturen von *P. nameko* auf ihre Trockenmassen und Ergosterolgehalte untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 gezeigt. Im Vergleich zu *P. eryngii* (Abbildung 17) stieg die Biotrockenmasse der Vorkulturen nicht so stark von Kulturtag sieben bis elf an. Die Werte lagen konstant zwischen $3 \text{ und } 4 \text{ g L}^{-1}$ und stiegen erst am elften Tag auf über 4 g L^{-1} an. Auch die Ergosterolgehalte schwankten zwischen den Kulturen nur wenig. Ein Maximum wurde an Kulturtag acht mit $3,85 \pm 0,29 \text{ mg (g TM)}^{-1}$ nachgewiesen, welcher sich aufgrund des großen Fehlers nicht signifikant von dem Wert an Kulturtag sieben unterschied. Daher wurden die Vorkulturen im Folgenden weiterhin für sieben Tage kultiviert.

Im nächsten Schritt wurde eine Optimierung der eingesetzten Menge an Treber analog zu *P. eryngii* durchgeführt. Es wurden sowohl mit Pilsener-Treber als auch mit Weizenbiertreber eine Zeitreihe mit 10 g L^{-1} und verschiedene *Fed-Batch*-Kulturen angesetzt. Es wurden erneut die Ansätze FB 5, FB 6 und FB 7 (Tabelle 9) verwendet. Da bei diesem Pilz der Fokus auf das *Upscaling* gelegt werden sollte, wurde in diesen Ansätzen Leitungswasser verwendet. Es wurden erneut die Biotrockenmassen und Rohproteingehalte analysiert, welche in Abbildung 30 beziehungsweise Abbildung 31 gezeigt sind. In 10 g L^{-1} Weizenbiertreber wurde der höchste Rohproteingehalt von $31,9$ beziehungsweise $32,4 \text{ g (100 g)}^{-1}$ an den Kulturtagen fünf beziehungsweise sieben bestimmt. Auch in den *Fed-Batch*-Ansätzen konnte im Weizenbiertreber eine große Steigerung des Rohproteingehalts von über 50% auf $29,78 \text{ g (100 g)}^{-1}$ in der *Fed-Batch*-Kultur FB6 im Vergleich zu reinem Weizenbiertreber erzielt werden. Der Biomasseverlust lag allerdings bei fast allen untersuchten Kulturen bei mindestens 50%, sodass der absolute Proteingehalt der Fermentate vergleichbar mit dem der Biertreber ist.

Für die Berechnung der Pilzgehalte wurde der Bezugswert von $4,8 \text{ mg Ergosterol (g TM)}^{-1}$ verwendet, welcher nach der ersten Zeitreihe in Malzextraktmedium (Abbildung 26) reproduzierbar gebildet wurde. Während der Pilzgehalt in Pilsener-Treber während der Kultivierung von Tag drei

bis sieben relativ konstant bei rund 22% lag, zeigte der Pilz im Weizenbiertreber-Medium ein Maximum mit 25% Pilzgehalt nach fünf Kulturtagen. Die *Fed-Batch*-Ansätze führten nicht zu einer Steigerung des Pilzgehalts, sondern eher zu einer Verschlechterung des Wachstums.

Mithilfe der Fermentation mit *P. nameko* wurde eine Steigerung des Rohproteingehalts des Weizenbiertreibers erzielt. Allerdings deutet der relativ geringe Pilzgehalt darauf hin, dass dies eher auf eine Anreicherung durch in Lösung gehende Medienbestandteile zurückzuführen sein könnte.

4.2.5.1 Aromaanalytik

Da es für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie auch von Interesse ist einen ansprechenden Geruchseindruck des Fermentats zu erzielen, wurden im Anschluss an die Analytik von Protein- und Pilzgehalt die Geruchseindrücke von *P. nameko* in Pilsener-Treber und Weizenbiertreber-Medium ermittelt. Die unbeimpften Medien wiesen nach dem Autoklavieren einen leicht süßlichen, an Pflanzendrink erinnernden, getreideartigen Geruch auf.

Die Kultivierung von *P. nameko* erfolgte mit 10 g L⁻¹ beziehungsweise 20 g L⁻¹ der Substrate. Die Kulturen mit 10 g L⁻¹ Weizenbiertreber und 20 g L⁻¹ Pilsener-Treber wiesen wenig ansprechende Geruchseindrücke auf. Die Kulturen von *P. nameko* in 10 g L⁻¹ Pilsener-Treber hatten an den ersten vier Kulturtagen waldartige, fruchtige und süßliche Aromen. In 20 g L⁻¹ Weizenbiertreber wurden in den ersten drei Kulturtagen vor allem brotartige und seifige Gerüche wahrgenommen. Am Tag vier schlug der Geruchseindruck ins Kunststoffartige um. Ab dem fünften Kulturtag wurden sowohl in den Kulturen mit 10 g L⁻¹ Pilsener-Treber als auch mit 20 g L⁻¹ Weizenbiertreber säuerliche und stechende Geruchseindrücke wahrgenommen. Trotz dieser Veränderungen des Aromas zeigten beide Kulturansätze potentiell interessante Aromen, sodass diese für die weitere Analytik gewählt wurden.

Die Überstände der nicht fermentierten Medien und die Kulturüberstände von Kulturtag 3 wurden mittels SBSE extrahiert und mittels GC-MS-O analysiert. Die von drei Probandinnen olfaktorisch nachgewiesenen Substanzen wurden mithilfe der RIs auf zwei unterschiedlichen Säulen, einer polaren VF-Wax und einer unpolaren DB-5 identifiziert. Im autoklavierten Medium fielen vor allem die brotartigen, wachsartigen, frischen und süßen, vanilleartigen Geruchseindrücke auf. Mithilfe des Vergleichs mit der NIST-Datenbank und Referenzverbindungen konnten die drei geruchsaktiven Substanzen (*E,E*)-2,4-Nonadienal, (*E,E*)-2,4-Decadienal und Vanillin im Medium identifiziert werden. In der Literatur wurden in Biertreber 26 aromaaktive Substanzen nachgewiesen; hierzu zählten vor allem Aldehyde und Ketone. Die Extraktion erfolgte mittels *in-tube extraction technique* mit anschließender GC-MS-Analyse. (Farcas et al. 2021) In dieser Studie wurde der Biertreber allerdings nicht erhitzt, wie beim Autoklavieren. In der Studie wurden Gebäckartige Produkte aus Biertreber hergestellt und auf volatile Substanzen untersucht. Auch diese

waren nicht vergleichbar mit den wenigen in dieser Arbeit nachgewiesenen. Ein Grund der geringen Menge an volatilen Substanzen kann die Verdünnung des Trebers in Wasser sein beziehungsweise dass nicht der Treber direkt extrahiert wurde.

In den für drei Tage fermentierten Proben wurden in beiden Biertrebermedien mit Ausnahme von Carvon, welches nur im Pilsener-Treber-Medium gebildet wurde dieselben sechs Substanzen olfaktorisch nachgewiesen. Diese sind in Tabelle 48 aufgeführt. Die Substanzen 1 und 2 wurden olfaktorisch wahrgenommen, konnten jedoch mittels SBSE-GC-MS-O nicht identifiziert werden. Vollständig identifiziert wurden Linalooloxid, Linalool, Carvon. Die Substanz 7, welche nach Chlor, aber auch waldig roch, wurde anhand der Retentionsindices auf den unterschiedlichen Säulen mithilfe der NIST-Datenbank vorläufig als 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd identifiziert. Hierfür konnte kein Standard gemessen und somit kein Referenz-RI bestimmt werden. Die R-Matches dieser Substanz mit den Vorschlägen der Datenbank lagen in allen Proben auf beiden Säulen bei über 900, was deren Identität sehr wahrscheinlich macht.

Die Bildung chlorhaltiger Substanzen durch Pilze ist in der Literatur belegt. Der erste Nachweis eines chlororganischen Metaboliten von Pilzen erfolgte 1952 mit Drosophilin A (Tetrachlor-4-methoxyphenol) aus dem Organismus *Psathyrella subatrata* (Syn. *Drosophila subatrata*). (Anchel 1952; Kavanagh et al. 1952) Bis zum Jahr 1997 wurden insgesamt 81 halogenierte aliphatische und aromatische Metabolite in Pilzen der Abteilung Basidiomycota nachgewiesen, von denen die meisten chloriert sind. (Field et al. 1995; Jong und Field 1997) Insgesamt wurden diese in 68 Gattungen aus 20 unterschiedlichen Familien nachgewiesen. Die Stoffgruppe, welche am häufigsten vorkommt, sind die chlorierten Anisyl-Metabolite (CAM). (Verhagen et al. 1998) Veratrylchlorid (3,4-Dimethoxybenzylchlorid) wurde beispielsweise in den 1990er Jahren in Kulturen von *Bjerkandera adusta* nachgewiesen. (Swarts et al. 1997) Einige Vertreter der Gattung *Hypholoma* bilden bis zu 3% ihrer Biotrockenmasse als organohalogenierte Metabolite, welche unterschiedliche Zwecke erfüllen können. Sie können antibiotisch wirken und Konkurrenz für die Pilze in einem Medium ausschalten. (Sonnenbichler et al. 1994) Eine weitere wichtige Rolle spielen CAM im Lignin-Abbau der Weißfäulepilze. 3-Chlor- und 3,5-Dichlor-*p*-anisylalkohol sind beispielsweise Substrate für Arylalkoholoxidasen (AAO) und sorgen so für die extrazelluläre Wasserstoffperoxidproduktion. AAOs sind dafür verantwortlich, dass Arylalkohole zu Arylaldehyden oxidiert werden, während Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Die CAM haben den Vorteil, dass sie zur Bereitstellung von H₂O₂ dienen, aber durch ihre Chlor-Funktion vor Ligninperoxidasen geschützt sind, während Veratrylalkohol und *p*-Anisalkohol auch Substrate für Ligninperoxidasen (LiPs) sind. (Jong et al. 1994) Jong und Kollegen haben auch CAM in Spezies von *Pholiota* nachgewiesen. Es spricht also vieles dafür, dass in dieser Arbeit tatsächlich 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd nachgewiesen wurde.

Die Substanz Linalool und das dazugehörige Oxid, die ebenfalls in den Kulturen von *P. nameko* nachgewiesen wurden, sind als Metabolite von Pilzen der Abteilung Basidiomycota bekannt. (Rigling et al. 2021; Sommer et al. 2023)

Neben der Extraktion mittels SBSE wurden die Kulturüberstände auch mittels SPME extrahiert. Hierbei sollten vor allem die nicht identifizierten Substanzen nachgewiesen werden. Die Messung erfolgte anhand einer polaren Säule und es konnte mit einem RI von 1300 das frisch, nach Champignon riechende 1-Octen-3-on vorläufig identifiziert werden (Tabelle 49). Die Geruchseindrücke decken sich mit denen der Substanz 1, welche mittels SBSE nicht identifiziert werden konnte. Da die mittels SPME extrahierte Probe allerdings nur von einer Person olfaktorisch analysiert wurde, sollten weitere Schritte zur Identifizierung durchgeführt werden. C₈-Aromen sind in Pilzen weit verbreitet und sorgen auch in *P. ostreatus* und *P. eryngii* für den typischen pilzartigen Geruchseindruck. In diesen Austernpilzen sind 44-97% der volatilen Metabolite den C₈-Alkoholen, -Aldehyden oder -Ketonen zuzuordnen. (Tagkouli et al. 2021)

In der Literatur wurde beschrieben, dass Aromastoffe besser extrahiert werden können, wenn sich das Adsorbensmaterial in der Probe befindet, wie es bei den Twistern® während der SBSE der Fall ist. Die *direct immersion solid-phase microextraction* (DI-SPME) sorgte in der Literatur bereits für eine effektivere Extraktion der volatilen Verbindungen als die SBSE beziehungsweise SPME. (Gamero et al. 2013) Bei der Analyse von volatilen Substanzen von Tomaten wurde eine gute Extraktionseffektivität von Aldehyden, Olefinen und Ketonen mittels SPME im Vergleich zur Extraktion mittels SBSE nachgewiesen. (Li et al. 2020) Dies unterstützt die These, dass ausreichend 1-Octen-3-on mittels SPME extrahiert werden konnte, um die Substanz nachzuweisen. Ihr Geruchsschwellenwert in Wasser liegt bei 0,016 µg kg⁻¹ (Grimm und Steinhaus 2020), was darauf hindeutet, dass sie schon in geringen Mengen wahrgenommen werden kann, gegebenenfalls aber nicht mittels SBSE-GC-MS-O nachweisbar ist.

Zusammenfassend wies *P. nameko* zu Beginn der Kultivierung süßliche, brotartige Geruchseindrücke auf. Aromastoffe mit entsprechenden Geruchsqualitäten wurden mittels GC-MS-O detektiert. In den Medien wurden drei und in den Kulturüberständen vier Substanzen vollständig identifiziert. Der Pilz eignet sich aufgrund der wenigen, recht neutralen volatilen Substanzen, die im Biertrebermedium gebildet werden, in dieser Kombination für eine breite Anwendungen in der Lebensmittelbranche.

4.2.5.2 Glutenanalytik

Bei Biertreber handelt es sich um den unlöslichen Getreiderückstand, welcher aus Teilen der Samenschale und des Perikarps besteht. Chemisch setzt sich der Treber hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin zusammen, wobei der Proteingehalt zwischen 14% und 30% beträgt

(Tabelle 53). Ein Teil der Speicherproteine von Weizen, Gerste, Roggen und Hafer wird als Prolamine bezeichnet. Prolamine zeichnen sich durch ihre Primärstruktur aus, welche eine große Menge Glutamin und Prolin aufweist. Sie bilden das Hauptspeicherprotein im Endosperm. (Balakireva und Zamyatnin 2016)

Die Prolamine im Weizen waren die ersten, die als Gluten identifiziert und bezeichnet wurden. Weizen-Gluten wird gemäß der Osborne-Fraktionen in zwei Klassen von Proteinen unterteilt, die alkohollöslichen Prolamine (Gliadine) und die nicht-löslichen Gluteline, beim Weizen Glutenin genannt. Das Gluten ist für die Backfähigkeiten von Weizen und die Teigeigenschaften des daraus hergestellten Teigs verantwortlich. (Wieser 2007)

Gluten hat also einerseits positive Eigenschaften bei der Gebäck-Produktion. Doch etwa 1% der Weltbevölkerung leidet an einer Glutenunverträglichkeit, welche auch als Zöliakie bezeichnet wird. Dabei wird bei Verzehr von glutenhaltigen Lebensmitteln eine Immunreaktion ausgelöst, welche insbesondere von gastrointestinalen Beschwerden geprägt ist. Menschen, die unter dieser Unverträglichkeit leiden müssen auf eine glutenfreie Ernährung achten. (Rubin und Crowe 2020) Seit den 1990er Jahren ist die Nachfrage nach glutenfreien Produkten rapide angestiegen, da die Weizenproteine auch bei Menschen ohne nachgewiesene Zöliakie, Symptome einer Unverträglichkeit auslösen können. (Catassi et al. 1994) Neben der Zöliakie gibt es weitere Arten der Unverträglichkeiten, die ebenfalls zu Magen-Darm-Beschwerden führen. (Shahbazkhani et al. 2015) Aufgrund der weiterhin steigenden Nachfrage war es interessant zu untersuchen, wie die Pilze zum Glutenabbau des Weizenbiertrebers beitragen, da sie die Proteine im Treber metabolisieren und Pilzbiomasse aufbauen. Es wurde ein kompetitiver ELISA genutzt, um die Glutengehalte von Biertreber und den unterschiedlichen Fermentaten zu bestimmen.

Die fermentierten Proben wurden geerntet und gefriergetrocknet. Anschließend wurden sie mit einer Kugelmühle gemahlen und für die Extraktion für malzhaltige Proben mit ethanolischer Fischgelatine-Lösung eingesetzt. Das RIDASCREEN® Gliadin competitive R7021 Kit wurde zum Nachweis von Gluten in glutenfreien Lebensmitteln entwickelt und optimiert. Zu Beginn wurden unterschiedliche Verdünnungsfaktoren getestet, um im Kalibrierbereich des für sehr kleine Gluten-Mengen konzipierten Kits zu messen.

Die Ergebnisse der Glutengehalte sind mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren in Tabelle 50 aufgeführt. Zum Vergleich wurde das nicht-inokulierte Weizenbiertreber-Medium nach sieben Tagen Inkubation, der Treber vor dem Autoklavieren sowie das Weizen-Bier der Störtebeker Braumanufaktur analysiert. Es war deutlich zu sehen, dass schon bei der Medienbereitung ein Glutenabbau der Treber stattfand. Das Autoklavieren kann zu einer Veränderung des Glutens geführt haben. In der Literatur wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Arginin die Löslichkeit von Gluten erhöhen kann, (Arakawa et al. 2008) was im Biertreber durchaus denkbar wäre. In dieser Ar-

beit wurden lediglich hydrolysierte Proteine analysiert und es kann keine Aussage über das Vorhandensein von freien Aminosäuren getroffen werden, welche das Lösungsverhalten von Gluten beeinflussen würden. Das Erhitzen beim Sterilisieren der Medien kann auch zu einer teilweisen Denaturierung der Proteine geführt haben, die die Ergebnisse des ELISA beeinflusst haben. Durch unzugänglichere Epitope könnten die Ergebnisse beeinflusst worden sein.

In der Literatur wurde der Einfluss einer Mikrowellenbehandlung auf den Glutengehalt untersucht. Durch eine Veränderung der Proteinkonformation wurde die Funktionalität des ELISAs beeinflusst. Bei einer Behandlung mit 40 W wurde eine höhere Antigenität als bei 200 W nachgewiesen, was auf freiliegende Antikörper durch denaturierte Proteine zurückzuführen sein könnte. Bei einer Vorbehandlung mit 800 W wurde der geringste Gehalt an Gluten bestimmt, was auf eine Zerstörung der Disulfidbrücken zwischen Gliadin und Glutenin hindeuten könnte, welche die Denaturierung einiger Epitope zur Folge hätten. (Gazikalović et al. 2021) Die Studie zeigte auch einen Abbau des Glutens bei Erhitzen auf 90 °C ohne Mikrowellen-Einfluss. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen einer steigenden Temperatur während der Vorbehandlung und dem Glutengehalt nachgewiesen werden.

Proben mit sehr hohen Glutengehalten müssen zur Analyse stark verdünnt werden, wobei zwangsläufig Verdünnungsfehler auftreten. Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden 1:1.200.000 verdünnt. Dies könnte erklären, dass die nachgewiesenen Glutengehalte des Trebers über den zuvor bestimmten Proteingehalten lagen. Daneben kann dies auch zu den unterschiedlichen Ergebnissen der autoklavierten und nicht-autoklavierten Treber beigetragen haben. Die geringen Fehler der Doppelbestimmungen untereinander sprechen allerdings dagegen, dass das Verdünnen fehleranfällig war.

Das Kit verwendet einen R5-Antikörper, welcher spezifisch für Gliadin, Secalin und Hordein ist. Für die Auswertung der Glutengehalte wird ein Verhältnis von 1:1 zwischen Gliadinen und Gluteninen angenommen. Die Gliadinkonzentration wird nach dem Codex Alimentarius „*Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten*“ mit dem Faktor zwei multipliziert. (CODEX STAN 118) Es wurden in der Literatur allerdings mittels RP-HPLC unterschiedliche Faktoren von Gliadinen zu Gluteninen in verschiedenen Weizenmehlsorten bestimmt. Diese lagen zwischen 1,74 und 3,14. (Wieser und Kieffer 2001) Gegebenenfalls eignet sich der Faktor von zwei mit hohen Anteilen an Gluten in den Proben nicht und kann lediglich als Annäherung für glutenfreie Lebensmittel genutzt werden.

Alternative Kits, die auf G12-Antikörpern basieren, zeigten in Studien bereits eine Anwendbarkeit auf unterschiedliche Biersorten. Es wurden im Weizenbier höhere Glutengehalte nachgewiesen als in dem aus Gerstenmalz. (Comino et al. 2013) Die Bestimmungsgrenze der G12-Antikörper für Gliadin in Bier betrug in der Literatur 0,0015 g L⁻¹ während die der R5-Antikörper bei 0,005 g L⁻¹ lag. (Moreno et al. 2016) Für die Biertreber könnte die Verwendung der G12-Antikörper also auch

denkbar sein. Weizenbier weist im Allgemeinen ein deutlich höheres immunogenes Potential als Biere aus Gerstenmalz auf. Der Brauprozess hat jedoch ebenfalls einen Einfluss auf den Glutengehalt. So können sich auch unterschiedliche Biere der gleichen Sorte in ihrem Glutengehalt unterscheiden. (Berner et al. 2013)

Die Daten zum Glutenabbau von Weizenbiertreber durch den Pilz *P. nameko* (Tabelle 50) sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt. Zu Beginn wurde der Glutengehalt von Kulturen bestimmt, die alle zwei Tage geerntet wurden. Dieser Abstand wurde dann ab Tag neun vergrößert um die Fermentate an Tag 12 und 14 analysieren zu können. Als Blindwert (d0) wurde der Gehalt vom autoklavierten, für sieben Tage inkubierten Biertreber genutzt. Im Weizenbiertreber-Medium ist ein deutlicher Abbau des Glutens zu erkennen. An Kulturtag 14 wurde weniger als 1% des Glutens in den Proben nachgewiesen (Abbildung 41).

Die Glutengehalte der Fermentate erreichen nicht die Grenzen für die nach der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 828/2014 der Kommission vom 30. Juli 2014 über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nicht-Vorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln, Anhang A vorgeschriebenen Werte für die Deklaration eines Produkts als glutenfrei von 20 mg kg⁻¹ beziehungsweise 100 mg kg⁻¹ wenn die Deklaration ‚sehr geringer Glutengehalt‘ vorgesehen ist. (Europäische Kommission 30.07.2014) Hierfür ist eine gezielte Kultivierungsoptimierung notwendig, denn nach der zweiwöchigen Fermentation mit *P. nameko* betrug der Glutengehalt noch 860 mg kg⁻¹.

5. Ausblick

Die Fermentation der *empty fruit bunches* erfolgte mit den drei Pilzen *M. palmivorus*, *I. consors* und *B. adusta*. Es zeigte sich, dass die BSFL das mit dem Pilz *B. adusta* fermentierte Substrat am besten zum Wachstum nutzen konnten. Allerdings wurden die Fütterungsstudien mit dem gemischten, fermentierten Substrat aus EFB und PKM durchgeführt. Es sollten für die industrielle Anwendung der Fermentation der EFB ebenfalls Fütterungsstudien mit fermentierten EFB und dem anschließend hinzugefügtem PKM durchgeführt werden. Des Weiteren ist eine Optimierung des Ligninabbaus denkbar. Diese sollte allerdings im Hinblick auf das *Upscaling* möglichst ressourcenschonend und kostengünstig durchzuführen sein. Gegebenenfalls könnten Nährsalze supplementiert werden, welche dem Pilz zum Wachstum verhelfen oder die Enzymaktivitäten der ligninolytischen Enzyme stimulieren. (Zhu et al. 2016) Es wäre außerdem denkbar, die lignocellulosehaltigen Seitenströme, wie in der Literatur beschrieben, vor der Fermentation mit Wasserdampf und einer auf diese Weise stattfindenden Hydrolyse vorzubehandeln. Dies würde allerdings zu einem höheren Kostenaufwand führen. (Sun et al. 2016)

Die Substrate könnten auf die Zusammensetzung ihrer Kohlenhydratfraktion untersucht werden. Hierfür ist es denkbar, die Methode zur Ligninbestimmung zu optimieren und im Anschluss den Cellulose- und Hemicellulosegehalt zu ermitteln. Dies könnte zu einer gezielten Anwendung von Enzymen verhelfen. Auch die simultane Fermentation mit einem Braun- und einem Weißfäulepilz zur Verwertung der Kohlenhydrate und des Lignins wäre möglich. In der Literatur wurden bereits Kombinationen aus Pilzen der Abteilung der *Ascomycota* genutzt, um lignocellulosehaltige Substrate zu fermentieren. (Brijwani et al. 2010)

Die Kultivierung der Pilze in den Biertrebermedien sollte hinsichtlich des *Upscalings* im Bioreaktor optimiert werden. Bei erfolgreicher Biomasseproduktion ist eine direkte Anwendung in der Lebensmittelindustrie anzustreben.

Die Fermentate von *P. eryngii* und *P. nameko* mit Biertreber sollten auf ihre weiteren Nährstoffe untersucht werden. Hierzu gehören die Fettsäurezusammensetzung und der Kohlenhydratgehalt. Die Glutenanalytik sollte mit einem weiteren Kit getestet und gegebenenfalls optimiert werden. Im Anschluss könnten die weiteren Fermentate mit den anderen Pilzen ebenfalls analysiert werden, um Aussagen über das allergene Potential treffen zu können. Hinsichtlich des Glutenabbaus könnten auch Optimierungsansätze durchgeführt werden, um im Anschluss ein glutenfreies Produkt gemäß VO (EU) Nr. 828/2014 der Kommission zu erhalten. (Europäische Kommission 30.07.2014)

Ob sich das Myzel beziehungsweise Fermentat als *Functional Food* eignet, könnte anhand der β -Glucangehalte ermittelt werden. Weitere, sich positiv auf die menschliche Ernährung auswirkenden Inhaltsstoffe, könnten beispielsweise Vitamin D₂ sein, welches aus Ergosterol unter Einfluss von UV-Licht gebildet wird. (Ahlborn et al. 2019)

Für die Anwendung der Pilzproteine ist denkbar, dass diese isoliert werden und hinsichtlich der Struktur und Anwendungsmöglichkeiten analysiert werden. Unterschiedliche Extraktionsmöglichkeiten, die evaluiert werden könnten, wären beispielsweise eine alkalische Extraktion, die trockene Fraktionierung oder eine enzymatische Extraktion. (Kumar et al. 2021) Die extrahierten Proteine könnten Anwendung in der Lebensmittelindustrie in Fleischersatzprodukten finden.

Bei der Anwendung von Myzel von Speisepilzen oder daraus isolierten Proteinen ist zu beachten, dass es sich dabei um ein *Novel Food* handeln würde. Diese Produkte müssen vor dem Inverkehrbringen zugelassen werden. *Novel Food* sind definiert als Lebensmittel, die vor dem 15. Mai 1997 nicht in nennenswertem Umfang in der Europäischen Union für den menschlichen Verzehr verwendet wurden. Diese Lebensmittel müssen außerdem in mindestens eine der in Artikel 3 der Novel Food-Verordnung (EU) 2015/2283 aufgeführten Kategorien gehören. (Europäisches Parlament und der Rat 25.11.2015) Es ist also zu bedenken, dass eine Zulassung beantragt werden muss. Das Verfahren der Zulassung ist in der Durchführungsverordnung (EU) 2018/456 der Kommission vom 19. März 2018 festgehalten. (Europäische Kommission 19.03.2018)

6. Literatur

- Abdollahi, M. Reza; Hosking, Brenton; Ravindran, Velmurugu (2015): Nutrient analysis, metabolisable energy and ileal amino acid digestibility of palm kernel meal for broilers. In: *Anim. Feed Sci. Technol.* (206), S. 119–125.
- Adams, Robert P.; Morris, Julie A.; Pandey, Ram N.; Schwarzbach, Andrea E. (2005): Cryptic speciation between *Juniperus deltooides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. In: *Biochem. Syst. Ecol.* 33 (8), S. 771–787. DOI: 10.1016/j.bse.2005.01.001.
- Adu, Michael Osei; Atia, Kofi; Arthur, Emmanuel; Asare, Paul Agu; Obour, Peter Bilson; Danso, Eric Oppong et al. (2022): The use of oil palm empty fruit bunches as a soil amendment to improve growth and yield of crops. A meta-analysis. In: *Agron. Sustain. Dev.* 42 (2). DOI: 10.1007/s13593-022-00753-z.
- Ahlborn, Jenny (2019): Biotechnologische Produktion einer Vitamin D reichen, alternativen Proteinquelle durch Basidiomyceten auf industriellen Nebenströmen. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, zuletzt geprüft am 07.03.2023.
- Ahlborn, Jenny; Stephan, Alexander; Meckel, Theresa; Maheshwari, Garima; Rühl, Martin; Zorn, Holger (2019): Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. In: *Int. J. Recycl. Org. Waste Agricult. (International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture)* 8 (S1), S. 447–455. DOI: 10.1007/s40093-019-00317-4.
- Ahrens, Sandra (2022): Produktion von Palmöl weltweit bis 2022/2023. Statista GmbH. Online verfügbar unter de.statista.com/statistik/daten/studie/443045/umfrage/produktion-von-palm-oel, zuletzt aktualisiert am 28.10.2022, zuletzt geprüft am 07.02.2023.
- Aliyu, Salihu; Bala, Muntari (2011): Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. In: *Afr. J. Biotechnol.* (10), S. 324–331.
- Alizadeh, A.; Shaabani, M. (2012): Essential Oil Composition, Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity in *Salvia officinalis* L. Cultivated in Iran. In: *Adv. Environ. Biol.* 6 (1), S. 221–226.
- Amoriello, Tiziana; Mellara, Francesco; Galli, Vincenzo; Amoriello, Monica; Ciccoritti, Roberto (2020): Technological Properties and Consumer Acceptability of Bakery Products Enriched with Brewers' Spent Grains. In: *Foods* 9. DOI: 10.3390/foods9101492.
- Anchel, Marjorie (1952): Identification of Drosophilin A as p-Methoxytetrachlorophenol¹. In: *J. Am. Chem. Soc.* (74), S. 2943.
- Arakawa, Tsutomu; Kita, Yoshiko; Koyama, A. Hajime (2008): Solubility enhancement of gluten and organic compounds by arginine. In: *Int. J. Pharm.* (355), S. 220–223.

- Arantes, Valdeir; Jellison, Jody; Goodell, Barry (2012): Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2), S. 323–338. DOI: 10.1007/s00253-012-3954-y.
- Asina, F. N.U.; Brzonova, Ivana; Kozliak, Evguenii; Kubátová, Alena; Ji, Yun (2017): Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. In: *Renew. Sust. Energ. Rev.* 77, S. 1179–1205. DOI: 10.1016/j.rser.2017.03.098.
- Asther, Michèle; Haon, Mireille; Roussos, Sevastianos; Record, Eric; Delattre, Michel; Lesage-Meessen, Laurence et al. (2002): Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. In: *Process Biochem.* (38), S. 685–691.
- Aubert, Christophe; Chanforan, Céline (2007): Postharvest Changes in Physicochemical Properties and Volatile Constituents of Apricot (*Prunus armeniaca* L.). Characterization of 28 Cultivars. In: *J. Agric. Food Chem.* 55 (8), S. 3074–3082. DOI: 10.1021/jf063476w.
- Aubert, Christophe; Pitrat, Michel (2006): Volatile Compounds in the Skin and Pulp of Queen Anne's Pocket Melon. In: *J. Agric. Food Chem.* 54 (21), S. 8177–8182. DOI: 10.1021/jf061415s.
- Baker, P. W.; Charlton, A.; Hale, M. D. C. (2019): Fibre degradation of wheat straw by *Pleurotus eryngii* under low moisture conditions during solid-state fermentation. In: *Lett. Appl. Microbiol.* 68 (2), S. 182–187. DOI: 10.1111/lam.13104.
- Balakireva, Anastasia V.; Zamyatnin, Andrey A. (2016): Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. In: *Nutrients* 8 (10). DOI: 10.3390/nu8100644.
- Basiron, Yusof (2007): Palm oil production through sustainable plantations. In: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (4), S. 289–295. DOI: 10.1002/ejlt.200600223.
- Bava, Luciana; Jucker, Costanza; Gislón, Giulia; Lupi, Daniela; Savoldelli, Sara; Zucali, Maddalena; Colombini, Stefania (2019): Rearing of *Hermetia Illucens* on Different Organic By-Products: Influence on Growth, Waste Reduction, and Environmental Impact. In: *Animals* 9 (6). DOI: 10.3390/ani9060289.
- Béguin, Pierre; Aubert, Jean-Paul (1994): The biological degradation of cellulose. In: *FEMS Microbiol. Rev.* (13).
- Berger, Ralf G.; Bordewick, Sven; Krahe, Nina-Katharina; Ersoy, Franziska (2022): Mycelium vs. Fruiting Bodies of Edible Fungi-A Comparison of Metabolites. In: *Microorganisms* 10 (7). DOI: 10.3390/microorganisms10071379.
- Berner, Torben Sune; Jacobsen, Susanne; Arneborg, Nils (2013): The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. In: *BMC Microbiol.* 13, Artikel 215. DOI: 10.1186/1471-2180-13-215.
- Bianco, Angela; Budroni, Marilena; Zara, Severino; Mannazzu, Ilaria; Fancello, Francesco; Zara, Giacomo (2020): The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (20), S. 8661–8678. DOI: 10.1007/s00253-020-10843-1.

- Bickel Haase, Thomas; Klis, Victoria; Hammer, Andreas Klaus; Pinto Lopez, Claudia; Verheyen, Christoph; Naumann-Gola, Susanne; Zorn, Holger (2024): Fermentation of cocoa pod husks with *Pleurotus salmoneo-stramineus* for food applications. In: *Food Sci Nutr* (accepted).
- Brijwani, Khushal; Oberoi, Harinder Singh; Vadlani, Praveen V. (2010): Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. In: *Process Biochem.* 45 (1), S. 120–128. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.08.015.
- Brophy, Joseph J.; Goldsack, Robert J.; Bean, Anthony R.; Forster, Paul I.; Lepschi, Brendan J. (1998): Leaf essential oils of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in eastern Australia. Part 2. *Leptospermum blakelyi* and allies. In: *Flavour Fragr. J.* 13 (5), S. 353–358. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199809)13:5<353::AID-FFJ759>3.0.CO;2-1.
- Brophy, Joseph J.; Goldsack, Robert J.; Forster, Paul I. (2000): Essential oils of the genus *Lophostemon* (Myrtaceae). In: *Flavour Fragr. J.* 15 (1), S. 17–20. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(200001/02)15:1<17::AID-FFJ859>3.0.CO;2-D.
- Buffington, Jack (2014): The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. In: *Adv. Chem. Eng. Sci.* 04 (03), S. 308–318. DOI: 10.4236/aces.2014.43034.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2020): Landwirtschaft verstehen. Fakten und Hintergründe, zuletzt geprüft am 03.05.2022.
- Bunzel, Mirko; Schüssler, Anne; Tchetssebu Saha, Gérard (2011): Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods. In: *J. Agric. Food Chem.* 59 (23), S. 12506–12513. DOI: 10.1021/jf2031378.
- BVL: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 38 TabakerzG, § 28b GenTG. Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln (Band I(L)), vom 13.00-27/2.
- Caldelas, Cristina; Rezzouk, Fatima Zahra; Aparicio Gutiérrez, Nieves; Diez-Fraile, Maria Carmen; Araus Ortega, José Luis (2023): Interaction of genotype, water availability, and nitrogen fertilization on the mineral content of wheat grain. In: *Food Chem.* 404 (Pt A), S. 134565. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134565.
- Camarero, S.; Galletti, G. C.; Martínez, A. T. (1994): Preferential Degradation of Phenolic Lignin Units by Two White Rot Fungi. In: *Appl. Environ. Microbiol.* (60), Artikel 12, S. 4509–4516.
- Cardwell, Glenn; Bornman, Janet F.; James, Anthony P.; Black, Lucinda J. (2018): A Review of Mushrooms as a Potential Source of Dietary Vitamin D. In: *Nutrients* 10 (10). DOI: 10.3390/nu10101498.
- Castro, Luiz Eduardo Nochi; Colpini, Leda Maria Saragiotto (2021): All-around characterization of brewers' spent grain. In: *Eur. Food Res. Technol.* 247 (12), S. 3013–3021. DOI: 10.1007/s00217-021-03860-5.
- Catassi, C.; Rättsch, I.-M.; Fabiani, E.; Rossini, M.; Bordicchia, F.; Candela, F. et al. (1994): Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. In: *Lancet* (343), S. 200–203.

- Charcosset, J. Y.; Chauvet, E. (2001): Effect of culture conditions on ergosterol as an indicator of biomass in the aquatic hyphomycetes. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (5), S. 2051–2055. DOI: 10.1128/AEM.67.5.2051-2055.2001.
- Cheirsilp, Benjamas; Kittha, Suleeporn (2015): Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. In: *Ind. Crops Prod.* 66, S. 73–80. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.12.035.
- Chenthamarakshan, Aiswarya; Parambayil, Nayana; Miziriya, Nafeesathul; Soumya, P. S.; Lakshmi, M. S. Kiran; Ramgopal, Anala et al. (2017): Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. In: *BMC Biotechnol.* 17 (1), S. 12. DOI: 10.1186/s12896-017-0333-x.
- Chew, Chien Lye; Ng, Chun Yong; Hong, Wai Onn; Wu, Ta Yeong; Lee, Yee-Ying; Low, Liang Ee et al. (2021): Improving Sustainability of Palm Oil Production by Increasing Oil Extraction Rate: a Review. In: *Food Bioprocess Technol.* 14 (4), S. 573–586. DOI: 10.1007/s11947-020-02555-1.
- Chew, Thiam Leng; Bhatia, Subhash (2008): Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. In: *Bioresour. Technol.* 99 (17), S. 7911–7922. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.03.009.
- Cho, In Hee; Lee, Soh Min; Kim, Se Young; Choi, Hyung-Kyoon; Kim, Kwang-Ok; Kim, Young-Suk (2007): Differentiation of aroma characteristics of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) of different grades using gas chromatography-olfactometry and sensory analysis. In: *J. Agric. Food Chem.* 55 (6), S. 2323–2328. DOI: 10.1021/jf062702z.
- Chowdhury, K.; Banu, L. A.; Khan, S.; Latif, A. (2007): Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil. In: *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 42 (3), S. 311–316.
- Chung, H. Y. (1999): Volatile components in crabmeats of *Charybdis feriatus*. In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (6), S. 2280–2287. DOI: 10.1021/jf981027t.
- CODEX STAN 118, 1997: Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten.
- Comino, Isabel; Real, Ana; Moreno, Maria de Lourdes; Montes, Raquel; Cebolla, Angel; Sousa, Carolina (2013): Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. In: *J. Sci. Food Agric.* 93 (4), S. 933–943. DOI: 10.1002/jsfa.5830.
- Corley, R. H. V.; Tinker, P. B. (2016): *The Oil Palm*. 5. Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Dashtban, Mehdi; Schraft, Heidi; Syed, Tarannum A.; Qin, Wensheng (2010): Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. In: *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* (1), S. 36–50.
- DGF (2023): Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und -öle. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. Online verfügbar unter www.dgfett.de/material/fszus.php, zuletzt aktualisiert am 04.01.2023, zuletzt geprüft am 23.01.2023.

- Dinis, Maria J.; Bezerra, Rui M. F.; Nunes, Fernando; Dias, Albino A.; Guedes, Cristina V.; Ferreira, Luís M. M. et al. (2009): Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. In: *Bioresour. Technol.* 100 (20), S. 4829–4835. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.04.036.
- Eisenman, Helene C.; Casadevall, Arturo (2012): Synthesis and assembly of fungal melanin. In: *Applied microbiology and biotechnology* 93 (3), S. 931–940. DOI: 10.1007/s00253-011-3777-2.
- Europäische Kommission (27.01.2009): 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.
- Europäische Kommission (30.07.2014): Durchführungsverordnung (EU) Nr. 828/2014 der Kommission vom 30. Juli 2014 über die Anforderungen an die Bereitstellung von Informationen für Verbraucher über das Nichtvorhandensein oder das reduzierte Vorhandensein von Gluten in Lebensmitteln. Durchführungsverordnung (EU) Nr. 828/2014.
- Europäische Kommission (20.12.2017): 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. VO (EU) 2017/2470 Der Kommission, vom Konsolidierte Fassung vom 06.02.2023, zuletzt geprüft am 23.03.2023.
- Europäische Kommission (19.03.2018): Durchführungsverordnung (EU) 2018/456 der Kommission vom 19. März 2018 über die Verfahrensschritte bei der Konsultation zur Bestimmung des Status als neuartiges Lebensmittel gemäß der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel. Durchführungsverordnung (EU) 2018/456. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32018R0456>, zuletzt geprüft am 23.03.2023.
- Europäisches Parlament und der Rat (25.11.2015): 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. VO (EU) 2015/2283, vom Konsolidierte Fassung vom 27.02.2021. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32015R2283>, zuletzt geprüft am 22.03.2023.
- Fadel, Hoda H. M.; Abdel Mageed, Magda A.; Abdel Samad, Abdel Kader M. E.; Lotfy, Shereen N. (2006): Cocoa substitute: Evaluation of sensory qualities and flavour stability. In: *Eur. Food Res. Technol.* 223 (1), S. 125–131. DOI: 10.1007/s00217-005-0162-3.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO (2021): The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Rome.

- Farcas, Anca Corina; Socaci, Sonia Ancuța; Chiș, Maria Simona; Pop, Oana Lelia; Fogarasi, Melinda; Păucean, Adriana et al. (2021): Reintegration of Brewers Spent Grains in the Food Chain: Nutritional, Functional and Sensorial Aspects. In: *Plants* 10 (11). DOI: 10.3390/plants10112504.
- Fengel, D.; Przyklenk, M. (1983): Vergleichende Extraktbestimmungen zum Ersatz von Benzol durch Cyclohexan. In: *Holz als Roh- und Werkstoff*.
- Field, Jim A.; Verhagen, Frank J. M.; Jong, Ed de (1995): Natural organohalogen production by basidiomycetes. In: *Trends Biotechnol.* (13), S. 451–456.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1973): Energy and Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. WHO Tech. Rep. Series No. 522, WHO, Geneva, Switzerland.
- Gamero, Amparo; Wesselink, Wilma; Jong, Catrienus de (2013): Comparison of the sensitivity of different aroma extraction techniques in combination with gas chromatography-mass spectrometry to detect minor aroma compounds in wine. In: *J. Chromatogr. A* 1272, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.11.032.
- Gao, Zhenghui; Alshehri, Khaled; Li, Yuan; Qian, Hang; Sapsford, Devin; Cleall, Peter; Harbottle, Michael (2022): Advances in biological techniques for sustainable lignocellulosic waste utilization in biogas production. In: *Renew. Sust. Energ. Rev.* 170, Artikel 112995. DOI: 10.1016/j.rser.2022.112995.
- Garcia-Garcia, Guillermo; Stone, Jamie; Rahimifard, Shahin (2019): Opportunities for waste valorisation in the food industry – A case study with four UK food manufacturers. In: *J. Clean. Prod.* 211, S. 1339–1356. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.11.269.
- Gazikalović, Ivana; Mijalković, Jelena; Šekuljica, Nataša; Jakovetić Tanasković, Sonja; Đukić Vuković, Aleksandra; Mojović, Ljiljana; Knežević-Jugović, Zorica (2021): Synergistic Effect of Enzyme Hydrolysis and Microwave Reactor Pretreatment as an Efficient Procedure for Gluten Content Reduction. In: *Foods* 10 (9). DOI: 10.3390/foods10092214.
- Gessner, Marc O.; Chauvet, Eric (1993): Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (2), S. 502–507.
- Gessner, Mark O.; Schmitt, Anja L. (1996): Use of Solid-Phase Extraction To Determine Ergosterol Concentrations in Plant Tissue Colonized by Fungi. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (2), S. 415–419.
- Gianotten, Natasja; Soetemans, Lise; Bastiaens, Leen (2020): Agri-Food Side-Stream Inclusions in the Diet of *Alphitobius diaperinus* Part 1: Impact on Larvae Growth Performance Parameters. In: *Insects* 11 (2). DOI: 10.3390/insects11020079.
- Gil, A. (2021): Current insights into lignocellulose related waste valorization. In: *Chem. Eng. J. Adv.* 8, S. 100186. DOI: 10.1016/j.ceja.2021.100186.

- Granato, Daniel; Fidelis, Marina; Haapakoski, Marjo; Dos Santos Lima, Amanda; Viil, Janeli; Hellström, Jarkko et al. (2022): Enzyme-assisted extraction of anthocyanins and other phenolic compounds from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) press cake: From processing to bioactivities. In: *Food Chem.* (391), Artikel 133240. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133240.
- Gregori, Andrej; Svagelj, Mirjan; Pahor, Bojan; Berovic, Marin; Pohleven, Franc (2008): The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. In: *New Biotechnol.* 25 (2/3), S. 157–161. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.08.003.
- Grimm, Johanna E.; Steinhaus, Martin (2020): Characterization of the Major Odorants in Cempedak-Differences to Jackfruit. In: *J. Agric. Food Chem.* 68 (1), S. 258–266. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b06564.
- Halliwell, G. (1965): Catalytic Decomposition of Cellulose under Biological Conditions. In: *Biochem. J.* 95 (1), S. 35–40. DOI: 10.1042/bj0950035.
- Hammer, Andreas Klaus (2021): Biotechnologische Darstellung und analytische Charakterisierung aromaaktiver Fettaldehyde. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, zuletzt geprüft am 07.03.2023.
- Hashemi, Maryam; Razavi, Seyed Hadi; Shojaosadati, Seyed Abbas; Mousavi, Seyyed Mohammad (2011): The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. In: *New Biotechnol.* 28 (2), S. 165–172. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.10.009.
- Hashim, Khairudin; Tahiruddin, Shawaluddin; Asis, Ahmad Jaril (2012): Palm and Palm Kernel Oil Production and Processing in Malaysia and Indonesia. In: *Palm Oil: Elsevier*, S. 235–250.
- Hassan, Osman; Ling, Tang Pei; Maskat, Mohammad Yusof; Illias, Rosli Md.; Badri, Khairiah; Jahim, Jamaliah; Mahadi, Nor Muhammad (2013): Optimization of pretreatments for the hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber (EFBF) using enzyme mixtures. In: *Biomass Bioenergy* 56, S. 137–146. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.04.021.
- He, Mao-Qiang; Zhao, Rui-Lin; Liu, Dong-Mei; Denchev, Teodor T.; Begerow, Dominik; Yurkov, Andrey et al. (2022): Species diversity of Basidiomycota. In: *Fungal Divers.* DOI: 10.1007/s13225-021-00497-3.
- Hidenobu, Sumitani; Suekane, Sachiko; Nakatani, Aya; Tatsuka, Kiyooki (1994): Changes In Composition of Volatile Compounds in High Pressure Treated Peach. In: *J. Agric. Food Chem.* 42, S. 785–790.
- Imami, A.; Riemer, S.; Schulze, M.; Amelung, F.; Gorshkov, V.; Rühl, M. et al. (2015): Depolymerization of lignosulfonates by submerged cultures of the basidiomycete *Irpex consors* and cloning of a putative versatile peroxidase. In: *Enzyme Microb. Technol.* 81, S. 8–15. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.07.007.

- Ishola, Mofoluwake M.; Isroi; Taherzadeh, Mohammad J. (2014): Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). In: *Biores. Technol.* 165, S. 9–12. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.053.
- Jackowski, Mateusz; Niedźwiecki, Łukasz; Jagiełło, Kacper; Uchańska, Oliwia; Trusek, Anna (2020): Brewer's Spent Grains-Valuable Beer Industry By-Product. In: *Biomolecules* 10 (12). DOI: 10.3390/biom10121669.
- Johnson, B. N.; McGill, W. B. (1990): Ontological and environmental influences on ergosterol content and activities of polyamine biosynthesis enzymes in *Hebeloma crustuliniforme* mycelia. In: *Can. J. Microbiol.* (36), S. 682–689.
- Jong, E. de; Field, J. A. (1997): Sulfur Tuft and Turkey Tail: Biosynthesis and Biodegradation of Organohalogenes by Basidiomycetes. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 51, S. 375–414. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.375.
- Jong, Ed de; Field, Jim A.; Spinnler, Henri-Eric; Wijnberg, Joannes B. P. A.; Bont, Jan A. M. de (1994): Significant Biogenesis of Chlorinated Aromatics by Fungi in Natural Environments. In: *Appl. Environ. Microbiol.* (60), S. 264–270.
- Jordán, María J.; Quílez, María; Luna, María C.; Bekhradi, Farzaneh; Sotomayor, José A.; Sánchez-Gómez, Pedro; Gil, María I. (2017): Influence of water stress and storage time on preservation of the fresh volatile profile of three basil genotypes. In: *Food chemistry* 221, S. 169–177. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.059.
- Kabel, M. A.; Carvalheiro, F.; Garrote, G.; Avgerinos, E.; Koukios, E.; Parajó, J. C. et al. (2002): Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. In: *Carbohydr. Polym.* 50 (1), S. 47–56. DOI: 10.1016/S0144-8617(02)00045-0.
- Kanauchi, Osamu; Mitsuyama, Keiichi; Araki, Yoshio (2001): Development of a Functional Germinated Barley Foodstuff from Brewer's Spent Grain for the Treatment of Ulcerative Colitis. In: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* (59), Artikel 2, S. 59–62.
- Kavanagh, Frederick; Hervey, Annette; Robbins, William J. (1952): Antibiotic Substances from Basidiomycetes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (38), Artikel 7, S. 555–560.
- Kirk, T. Kent; Farrell, Roberta L. (1987): Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. In: *Ann. Rev. Microbiol.* (41), S. 465–505.
- Klüber, Patrick; Tegtmeier, Dorothee; Hurka, Sabine; Pfeiffer, Janin; Vilcinskis, Andreas; Rühl, Martin; Zorn, Holger (2022): Diet Fermentation Leads to Microbial Adaptation in Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*; Linnaeus, 1758) Larvae Reared on Palm Oil Side Streams. In: *Sustainability* 14 (9), S. 5626. DOI: 10.3390/su14095626.
- Kumar, Lokesh; Sehrawat, Rachna; Kong, Yanzhuo (2021): Oat proteins: A perspective on functional properties. In: *LWT - Food Sci. Technol.* 152, Artikel 112307. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112307.

- Kumar, Nishant; Pratibha; Neeraj; Sami, Rokayya; Khojah, Ebtihal; Aljahani, Amani H.; Al-Mushhin, Amina A. M. (2022): Effects of drying methods and solvent extraction on quantification of major bioactive compounds in pomegranate peel waste using HPLC. In: *Sci. Rep.* 12, Artikel 8000. DOI: 10.1038/s41598-022-11881-7.
- Kumar, Raj; Singh, Sompal; Singh, Om V. (2008): Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (5), S. 377–391. DOI: 10.1007/s10295-008-0327-8.
- Kumar, Ravi Majeti N. V. (1999): Chitin and chitosan fibres: A review. In: *Bull. Mater. Svi.* (22), Artikel 5, S. 906–915.
- Kumar, Ravi Majeti N. V. (2000): A review of chitin and chitosan applications. In: *React. Funct. Polym.* (46), S. 1–27.
- Law, Kwei-Nam; Wan Daud, Wan Rosli; Ghazali, Arniza (2007): Morphological and chemical nature of fiber strands of Oil Palm Empty-Fruit-Bunch (OPEFB). In: *Bioresour.* 2 (3), S. 351–362.
- Li, Jian; Fu, Yingli; Bao, Xiaolin; Li, He; Zuo, Jinhua; Zhang, Muqing; Wang, Jing (2020): Comparison and analysis of tomato flavor compounds using different extraction methods. In: *J. Food Meas. Charact.* 14 (1), S. 465–475. DOI: 10.1007/s11694-019-00102-x.
- Lin, S. Y.; Dence, C. W. (1992): The determination of lignin. In: *Methods in lignin chemistry*, S. 33–61.
- Linstrom, Peter (1997): NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69.
- Liu, Enchao; Ji, Yuan; Zhang, Fang; Liu, Bingjie; Meng, Xianghong (2021): Review on *Auricularia auricula-judae* as a Functional Food: Growth, Chemical Composition, and Biological Activities. In: *J. Agric. Food Chem.* 69 (6), S. 1739–1750. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c05934.
- Lücking, Robert; Aime, M. Catherine; Robbertse, Barbara; Miller, Andrew N.; Ariyawansa, Hiran A.; Aoki, Takayuki et al. (2020): Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? In: *IMA Fungus* 11 (14). DOI: 10.1186/s43008-020-00033-z.
- Magalhães, Antonio Irineudo; Carvalho, Júlio Cesar; Melo Pereira, Gilberto Vinícius; Karp, Susan Grace; Câmara, Marcela Candido; Medina, Jesus David Coral; Soccol, Carlos Ricardo (2019): Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. In: *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 13 (6), S. 1505–1519. DOI: 10.1002/bbb.2048.
- Mancini, Simone; Fratini, Filippo; Provera, Isabella; Dovicchi, Jessica; Tuccinardi, Tiziano; Minieri, Sara et al. (2022): Growth performances, chemical composition, and microbiological loads of mealworm reared with brewery spent grains and bread leftovers. In: *Ital. J. Anim. Sci.* 21 (1), S. 1419–1429. DOI: 10.1080/1828051X.2022.2120422.
- Mandalari, G.; Bisignano, G.; Lo Curto, R. B.; Waldron, K. W.; Faulds, C.B (2008): Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisera* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. In: *Biores. Technol.* 99, S. 5130–5133.

- Manzi, Pamela; Gambelli, Loretta; Marconi, Stefania; Vivanti, Vittorio; Pizzoferrato, Laura (1999): Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. In: *Food Chem.* 65 (4), S. 477–482. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00212-X.
- Matissek, Reinhard; Fischer, Markus (2021): *Lebensmittelanalytik*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Medina, Andrea L.; Lucero, Mary E.; Holguin, F. Omar; Estell, Rick E.; Posakony, Jeff J.; Simon, Julian; O'Connell, Mary A. (2005): Composition and Antimicrobial Activity of *Anemopsis californica* leaf oil. In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (22), S. 8694–8698. DOI: 10.1021/jf0511244.
- Meijaard, E.; Garcia-Ulloa, J.; Sheil, D.; Carlson, K. M.; Wich, S. A.; Juffe-Bignoli, D.; Brooks, T. M. (2018): Oil palm and biodiversity. A situation analysis by the IUCN Oil Palm Task Force: IUCN, International Union for Conservation of Nature.
- Merle, Hugo; Morón, Montserrat; Blázquez, M.Amparo; Boira, Herminio (2004): Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. In: *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (5), S. 491–497. DOI: 10.1016/j.bse.2003.09.010.
- Meussen, Bas J.; van Zeeland, Albert N. T.; Bruins, Marieke E.; Sanders, Johan P. M. (2014): A Fast and Accurate UPLC Method for Analysis of Proteinogenic Amino Acids. In: *Food Anal. Methods* 7 (5), S. 1047–1055. DOI: 10.1007/s12161-013-9712-7.
- Mille-Lindblom, Cecilia; Wachenfeldt, Eddie von; Tranvik, Lars J. (2004): Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. In: *J. Microbiol. Methods* 59 (2), S. 253–262. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.07.010.
- Mohd Tabi, Amal Nafissa; Zakil, Fathie Ahmad; Mohd Fauzai, Wan Nur Fauzan; Ali, Noorhalieza; Hassan, Onn (2008): The Usage of Empty Fruit Bunch (EFB) and Palm Pressed Fibre (PPF) as Substrates for the Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. In: *J. Teknol.* 49, S. 189–196.
- Mokochinski, João Benhur; Sovrani, Vanessa; Dalla Santa, Herta Stutz; Felsner, Maria Lurdes; Sawaya, Alexandra Christine Helena Franklan; González-Borrero, Pedro Pablo et al. (2015): Biomass and Sterol Production from Vegetal Substrate Fermentation Using *Agaricus brasiliensis*. In: *J. Food Qual.* 38 (3), S. 221–229. DOI: 10.1111/jfq.12137.
- Moreno, María de Lourdes; Muñoz-Suano, Alba; López-Casado, Miguel Ángel; Torres, María Isabel; Sousa, Carolina; Cebolla, Ángel (2016): Selective capture of most celiac immunogenic peptides from hydrolyzed gluten proteins. In: *Food Chem.* 205, S. 36–42. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.066.
- Mosier, Nathan; Wyman, Charles; Dale, Bruce; Elander, Richard; Lee, Y. Y.; Holtzapple, Mark; Ladisch, Michael (2005): Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. In: *Bioresour. Technol.* 96 (6), S. 673–686. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.025.
- Mussatto, S. I. (2014): Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. In: *J. Sci. Food Agric.* 94 (7), S. 1264–1275. DOI: 10.1002/jsfa.6486.

- Mussatto, S. I.; Dragone, G.; Roberto, I. C. (2007a): Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. In: *Ind. Crops Prod.* 25 (2), S. 231–237. DOI: 10.1016/j.indcrop.2006.11.001.
- Mussatto, Solange I.; Fernandes, Marcela; Dragone, Giuliano; Mancilha, Ismael M.; Roberto, Inês C. (2007b): Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. In: *Biotechnol. Lett.* 29 (12), S. 1973–1976. DOI: 10.1007/s10529-007-9494-3.
- Mussatto, Solange I.; Roberto, Inês C. (2006): Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (3), S. 268–274. DOI: 10.1002/jctb.1374.
- Naibaho, Joncer; Korzeniowska, Małgorzata (2021): Brewers' spent grain in food systems: Processing and final products quality as a function of fiber modification treatment. In: *J. Food Sci.* DOI: 10.1111/1750-3841.15714.
- Nakamura, Yoshitoshi; Sungusia, Mtui Godliving; Sawada, Tatsuro; Kuwahara, Masaaki (1999): Lignin-Degrading Enzyme Production by *Bjerkandera adusta* Immobilized on Polyurethane Foam. In: *J. Biosci. Bioeng.* (88), Artikel 1, S. 41–47.
- Nascimento, Talita A.; Calado, Verônica; Carvalho, Carlos W.P. (2017): Effect of Brewer's spent grain and temperature on physical properties of expanded extrudates from rice. In: *LWT - Food Sci. Technol.* 79, S. 145–151. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.01.035.
- Noirot, Lauriane Marie; Müller-Stöver, Dorette Sophie; Wahyuningsih, Resti; Sørensen, Helle; Sudarno; Simamora, Abedgeno et al. (2022): Impacts of empty fruit bunch applications on soil organic carbon in an industrial oil palm plantation. In: *J. Environ. Manage.* (317), Artikel 115373. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115373.
- Nosanchuk, Joshua D.; Casadevall, Arturo (2003): The contribution of melanin to microbial pathogenesis. In: *Cellular microbiology* 5 (4), S. 203–223. DOI: 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x.
- Nout, M. J. R.; Bonants-van Laarhoven, T. M. G.; Jong, P. de; Koster, P. G. de (1987): Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (26), S. 456–461.
- Novotný, Čeněk; Svobodová, Kateřina; Erbanová, Pavla; Cajthaml, Tomáš; Kasinath, Aparna; Lang, Elke; Šašek, Václav (2004): Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. In: *Soil Biol. Biochem.* 36 (10), S. 1545–1551. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.07.019.
- Palá-Paúl, Jesús; Brophy, Joseph J.; Pérez-Alonso, M. José; Usano, Jaime; Soria, S. Cristina (2007): Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain. In: *J. Chromatogr. A* 1175 (2), S. 289–293. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.061.

- Parveez, Ghulam Kadir Ahmad; Tarmizi, Azmil Haizam Ahmad; Sundram, Shamala; Loh, Soh Kheang; Ong-Abdullah, Meilina; Palam, Kosheela Devi Poo et al. (2021): Oil palm economic performance in Malaysia and R&D progress in 2020. In: *J. Oil Palm Res.* 33 (2), S. 181–214. DOI: 10.21894/jopr.2021.0026.
- Peng, Jin-Torng; Lee, Chien-Ming; Tsai, Yin-Fung (2000): Effect of Rice Bran on the Production of Different King Oyster Mushroom Strains During Bottle Cultivation. In: *J. Agric. Res. China* (49), Artikel 3, S. 60–67.
- Petersen, M. A.; Poll, L.; Larsen, L., M. (1998): Comparison of volatiles in raw and boiled potatoes using a mild extraction technique combined with GC odour profiling and GC-MS. In: *Food Chem.* (61), Artikel 4, S. 461–466.
- Peterson, D. G.; Reineccius, G. A. (2003): Characterization of the volatile compounds that constitute fresh sweet cream butter aroma. In: *Flavour Fragr. J.* 18 (3), S. 215–220. DOI: 10.1002/ffj.1192.
- Ping, Bonnie Tay Yen; Yusof, Mohtar (2009): Characteristics and Properties of Fatty Acid Distillates from Palm Oil. In: *Oil Palm Bulletin* (59), S. 5–11.
- Purkayastha, D.; Sarkar, S. (2021): Sustainable waste management using black soldier fly larva: a review. In: *Int. J. Environ. Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13762-021-03524-7.
- Quiroz-Castañeda, Rosa Estela; Pérez-Mejía, Nancy; Martínez-Anaya, Claudia; Acosta-Urdapilleta, Lourdes; Folch-Mallol, Jorge (2011): Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. In: *Biodegradation* 22 (3), S. 565–572. DOI: 10.1007/s10532-010-9428-y.
- Raviraja, Neelavar S.; Nikolcheva, Liliya G.; Bärlocher, Felix (2004): Pellet size affects mycelial ergosterol content in aquatic hyphomycetes. In: *Mycologia* 96 (2), S. 388–392. DOI: 10.1080/15572536.2005.11832983.
- Rigling, Marina; Yadav, Mayuri; Yagishita, Manami; Nedele, Ann-Kathrin; Sun, Jinyuan; Zhang, Yan-yan (2021): Biosynthesis of pleasant aroma by enokitake (*Flammulina velutipes*) with a potential use in a novel tea drink. In: *LWT - Food Sci. Technol.* 140, Artikel 110646. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110646.
- Robertson, James A.; I'Anson, Kerry J. A.; Brocklehurst, Tim F.; Faulds, Craig B.; Waldron, Keith W. (2010a): Effect of storage conditions on the microbial ecology and biochemical stability of cell wall components in brewers' spent grain. In: *J. Agric. Food Chem.* 58 (12), S. 7266–7272. DOI: 10.1021/jf1001099.
- Robertson, James A.; I'Anson, Kerry J.A.; Treimo, Janneke; Faulds, Craig B.; Brocklehurst, Tim F.; Eijsink, Vincent G.H.; Waldron, Keith W. (2010b): Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. In: *LWT - Food Sci. Technol.* 43 (6), S. 890–896. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.01.019.

- Roda, Anna; Lambri, Milena (2019): Food uses of pineapple waste and by-products: a review. In: *Int. J. Food Sci. Technol.* 54, S. 1009–1017.
- Rodriguez Estrada, A. E.; Royse, D. J. (2007): Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. In: *Biores. Technol.* 98 (10), S. 1898–1906. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.07.027.
- Romeo, Vincenza; Ziino, Marisa; Giuffrida, Daniele; Conduro, Cettina; Verzera, Antonella (2007): Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS. In: *Food Chem.* 101 (3), S. 1272–1278. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.12.029.
- Rubin, Joshua Elliott; Crowe, Sheila E. (2020): Celiac Disease. In: *Ann. Intern. Med.* 172 (1), 1-6. DOI: 10.7326/AITC202001070.
- Russ, Winfried; Mörtel, Heinrich; Meyer-Pittroff, Roland (2005): Application of spent grains to increase porosity in bricks. In: *Constr. Build. Mater.* 19 (2), S. 117–126. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2004.05.014.
- Rytioja, Johanna; Hildén, Kristiina; Yuzon, Jennifer; Hatakka, Annele; Vries, Ronald P. de; Mäkelä, Miia R. (2014): Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78 (4), S. 614–649. DOI: 10.1128/MMBR.00035-14.
- Sánchez, Carmen (2009): Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. In: *Biotechnol. Adv.* 27 (2), S. 185–194. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.001.
- Schieber, Andreas (2017): Side Streams of Plant Food Processing As a Source of Valuable Compounds: Selected Examples. In: *Annu. Rev Food Sci. Technol.* 8, S. 97–112. DOI: 10.1146/annurev-food-030216-030135.
- Schneider, Willian Daniel Hahn; Fontana, Roselei Claudete; Mendonça, Simone; Siqueira, Félix Gonçalves de; Dillon, Aldo José Pinheiro; Camassola, Marli (2018): High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. In: *Process Biochem.* 69, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.03.005.
- Shahbazkhani, Bijan; Sadeghi, Amirsaeid; Malekzadeh, Reza; Khatavi, Fatima; Etemadi, Mehrnoosh; Kalantri, Ebrahim et al. (2015): Non-Celiac Gluten Sensitivity Has Narrowed the Spectrum of Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. In: *Nutrients* 7 (6), S. 4542–4554. DOI: 10.3390/nu7064542.
- Shim, You-Shin; Yoon, Won-Jin; Ha, Jaeho; Seo, Dongwon; Lee, Kwang-Won; Lee, Woo-Young et al. (2013): Method validation of 16 types of structural amino acids using an automated amino acid analyzer. In: *Food Sci. Biotechnol.* 22 (6), S. 1567–1571. DOI: 10.1007/s10068-013-0252-0.
- Shuit, S. H.; Tan, K. T.; Lee, K. T.; Kamaruddin, A. H. (2009): Oil palm biomass as a sustainable energy source: A Malaysian case study. In: *Energy* 34 (9), S. 1225–1235. DOI: 10.1016/j.energy.2009.05.008.

- Sindhu, Raveendran; Binod, Parameswaran; Pandey, Ashok (2016): Biological pretreatment of lignocellulosic biomass -An overview. In: *Biores. Technol.* 199, S. 76–82. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.030.
- Singh, Umesh; Gautam, Ashwani; Singha, Tapan Kumar; Tiwari, Abhay; Tiwari, Pooja; Sahai, Vikram; Sharma, Satyawati (2020): Mass production of *Pleurotus eryngii* mycelia under submerged culture conditions with improved minerals and vitamin D₂. In: *LWT - Food Sci. Technol.* (131), Artikel 109665. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109665.
- Smallfield, Bruce M.; Perry, Nigel B.; Beauregard, Daniel A.; Foster, Lysa M.; Dodds, Kenneth G. (1994): Effects of Postharvest Treatments on Yield and Composition of Coriander Herb Oil. In: *J. Agric. Food Chem.* 42, S. 354–359.
- Sommer, Svenja; Hoffmann, Janine Laura; Fraatz, Marco Alexander; Zorn, Holger (2023): Upcycling of black currant pomace for the production of a fermented beverage with *Wolfiporia cocos*. In: *J. Food Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13197-023-05677-4.
- Son, Ah Reum; Park, Chan Sol; Park, Kyu Ree; Kim, Beob Gyun (2019): Amino acid digestibility in plant protein sources fed to growing pigs. In: *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 32 (11), S. 1745–1752. DOI: 10.5713/ajas.19.0037.
- Songulashvili, Giorgi; Elisashvili, Vladimir; Wasser, Solomon P.; Nevo, Eviatar; Hadar, Yitzhak (2007): Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. In: *Enzyme Microb. Technol.* 41 (1-2), S. 57–61. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.11.024.
- Sonnenbichler, Johann; Dietrich, Jürgen; Peipp, Heinrich (1994): Secondary Fungal Metabolites and Their Biological Activities, V. Investigations Concerning the Induction of the Biosynthesis of Toxic Secondary Metabolites in Basidiomycetes. In: *Biol. Chem.* (375), S. 71–79.
- Stajić, Mirjana; Vukojević, Jelena; Duletić-Lausević, Sonja (2009): Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: a review. In: *Crit. Rev. Biotechnol.* 29 (1), S. 55–66. DOI: 10.1080/07388550802688821.
- Stuedler, Susanne; Bley, Thomas (2015): Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. In: *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (7), S. 1313–1323. DOI: 10.1007/s00449-015-1372-0.
- Sudiyani, Yanni; Styarini, Dyah; Triwahyuni, Eka; Sudiyarmanto; Sembiring, Kiky C.; Aristiawan, Yosi et al. (2013): Utilization of Biomass Waste Empty Fruit Bunch Fiber of Palm Oil for Bioethanol Production Using Pilot-Scale Unit. In: *Energy Procedia* 32, S. 31–38. DOI: 10.1016/j.egypro.2013.05.005.
- Sun, Shaoni; Sun, Shaolong; Cao, Xuefei; Sun, Runcang (2016): The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. In: *Biores. Technol.* 199, S. 49–58. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.061.

- Swarts, Henk J.; Mester, Tünde; Verhagen, Frank J.M.; Field, Jim A.; Wijnberg, Joannes B.P.A. (1997): The formation of veratryl chloride by *Bjerkandera* sp. strain BOS55. In: *Phytochemistry* 46 (6), S. 1011–1013. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00368-3.
- Tagkouli, Dimitra; Bekiaris, Georgios; Pantazi, Stella; Anastasopoulou, Maria Eleni; Koutrotsios, Georgios; Mallouchos, Athanasios et al. (2021): Volatile Profiling of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus* Mushrooms Cultivated on Agricultural and Agro-Industrial By-Products. In: *Foods* 10 (6). DOI: 10.3390/foods10061287.
- Tao, Hsiao-Hang; Snaddon, Jake L.; Slade, Eleanor M.; Caliman, Jean-Pierre; Widodo, Rudi H.; Suhardi; Willis, Kathrine J. (2017): Long-term crop residue application maintains oil palm yield and temporal stability of production. In: *Agron. Sustain. Dev.* 37 (33). DOI: 10.1007/s13593-017-0439-5.
- Taylor, Thomas N.; Krings, Michael; Taylor, Edith L. (2015): Basidiomycota. In: *Fossil Fungi*: Elsevier, S. 173–199.
- The Brewers of Europe (2021): European Beer Trends. Statistics Report. 2021 Edition. Online verfügbar unter brauer-bund.de/wp-content/uploads/2022/02/european-beer-statistics-2020.pdf, zuletzt geprüft am 05.04.2023.
- The Good Scents Company (2022): The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients information. Online verfügbar unter www.thegoodscentscompany.com/, zuletzt aktualisiert am 2022, zuletzt geprüft am 10.11.2022.
- Triwahyuni, Eka; Muryanto; Sudiyani, Yanni; Abimanyu, Haznan (2015): The Effect of Substrate Loading On Simultaneous Saccharification And Fermentation Process For Bioethanol Production from Oil Palm Empty Fruit Bunches. In: *Energy Procedia* 68, S. 138–146. DOI: 10.1016/j.egypro.2015.03.242.
- United Nations (2019): World Population Prospects 2019: Highlights. Unter Mitarbeit von Department of Economic and Social Affairs und Population Division. New York: United Nations (Statistical Papers - United Nations (Ser. A), Population and Vital Statistics Report).
- United States Department of Agriculture (USDA) (2022): World Agricultural Production.
- Valencia, M. E.; Watkins S. E.; Waldroup, A. L.; Waldroup, P. W. (1993): Utilization of Crude and Refined Palm and Palm Kernel Oils in Broiler Diets. In: *Poultry Science* (72), S. 2200–2215.
- Valverde, María Elena; Hernández-Pérez, Talía; Paredes-López, Octavio (2015): Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. In: *Int. J. Microbiol.*
- van den Dool, H.; Kratz, P. (1963): A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. In: *J. Chromatogr. A* 11, S. 463–471. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- Verhagen, Frank J.M.; Assema, Friso B.J.; Boekema, Bouke K.H.L.; Swarts, Henk J.; Wijnberg, Joannes B.P.A.; Field, Jim A. (1998): Dynamics of organohalogen production by the ecologically important

- fungus *Hypholoma fasciculare*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 158 (2), S. 167–178. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12816.x.
- White, Jane S.; Yohannan, Biju K.; Walker, Graeme M. (2008): Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. In: *FEMS Yeast Res.* 8 (7), S. 1175–1184. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x.
- Wieser, H. (2007): Chemistry of gluten proteins. In: *Food Microbiol.* 24 (2), S. 115–119. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004.
- Wieser, H.; Kieffer, R. (2001): Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. In: *J. Cereal Sci.* (34), S. 19–27.
- Wiloso, Edi Iswanto; Bessou, Cécile; Heijungs, Reinout (2015): Methodological issues in comparative life cycle assessment: treatment options for empty fruit bunches in a palm oil system. In: *Int. J. Life Cycle Assess.* 20 (2), S. 204–216. DOI: 10.1007/s11367-014-0815-1.
- World Meteorological Organization (2019): WMO statement on the state of the global climate in 2018. Unter Mitarbeit von António Guterres. Genf: World Meteorological Organization (WMO) (WMO, 1233). Online verfügbar unter library.wmo.int/index.php?lvl=notice_display&id=20799.
- Wu, Shimin; Zorn, Holger; Krings, Ulrich; Berger, Ralf G. (2007): Volatiles from submerged and surface-cultured beefsteak fungus, *Fistulina hepatica*. In: *Flavour Fragr. J.* 22 (1), S. 53–60. DOI: 10.1002/ffj.1758.
- Xiros, Charilaos; Christakopoulos, Paul (2012): Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. In: *Waste Biomass Valor.* 3 (2), S. 213–232. DOI: 10.1007/s12649-012-9108-8.
- Xiros, Charilaos; Topakas, Evangelos; Katapodis, Petros; Christakopoulos, Paul (2008): Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. In: *Industrial Crops and Products* 28 (2), S. 213–224. DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.02.004.
- Xu, Jian Z.; Zhang, Jun L.; Hu, Kai H.; Zhang, Wei G. (2013): The relationship between lignin peroxidase and manganese peroxidase production capacities and cultivation periods of mushrooms. In: *Microb. Biotechnol.* 6 (3), S. 241–247. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2012.00365.x.
- Yousuf, A. (2012): Biodiesel from lignocellulosic biomass - Prospects and challenges. In: *Waste Manage.* 32 (11), S. 2061–2067. DOI: 10.1016/j.wasman.2012.03.008.
- Yousuf, Abu; Pirozzi, Domenico; Sannino, Filomena (2020): Fundamentals of lignocellulosic biomass. In: *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*: Elsevier, S. 1–15.
- Yusuf, Rafiu O.; Noor, Zainura Z.; Abba, Ahmad H.; Hassan, Mohd Ariffin Abu; Din, Mohd Fadhil Mohd (2012): Methane emission by sectors: A comprehensive review of emission sources and mitigation methods. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (7), S. 5059–5070. DOI: 10.1016/j.rser.2012.04.008.

- Zadrazil, F.; Brunnert, H. (1981): Investigation of Physical Parameters Important for the Solid State Fermentation of Straw by White Rot Fungi. In: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (11), S. 183–188.
- Zamani, Akram; Edebo, Lars; Sjöström, Björn; Taherzadeh, Mohammad J. (2007): Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. In: *Biomacromolecules* 8 (12), S. 3786–3790. DOI: 10.1021/bm700701w.
- Żelaziński, Tomasz; Ekielski, Adam; Siwek, Adam; Dardziński, Leszek (2017): Characterisation of corn extrudates with the addition of brewers' spent grain as a raw material for the production of functional batters [pdf]. In: *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 16 (3), S. 247–254. DOI: 10.17306/J.AFS.2017.0487.
- Zelles, Laszlo; Hund, Kerstin; Stepper, Kai (1987): Methoden zur relativen Quantifizierung der pilzlichen Biomasse im Boden. In: *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 150 (4), S. 249–252. DOI: 10.1002/jpln.19871500410.
- Zeng, Yihang; Cai, Wensheng; Shao, Xueguang (2015): Quantitative analysis of 17 amino acids in tobacco leaves using an amino acid analyzer and chemometric resolution. In: *J. Sep. Sci.* 38 (12), S. 2053–2058. DOI: 10.1002/jssc.201500090.
- Zeng, Z.; Xie, R.; Zhang, T.; Zhang, H.; Chen, J. Y. (2011): Analysis of Volatile Compositions of *Magnolia biondii* Pamp by Steam Distillation and Headspace Solid Phase Micro-extraction. In: *J. Oleo Sci.* 60 (12), S. 591–596.
- Zhang, Yanrong; Wang, Dawei; Chen, Yuetong; Liu, Tingting; Zhang, Shanshan; Fan, Hongxiu et al. (2021): Healthy function and high valued utilization of edible fungi. In: *Food Sci. Hum. Wellness* 10 (4), S. 408–420. DOI: 10.1016/j.fshw.2021.04.003.
- Zhao, Chang-Xing; He, Ming-Rong; Wang, Zhen-Lin; Wang, Yue-Fu; Lin, Qi (2009): Effects of different water availability at post-anthesis stage on grain nutrition and quality in strong-gluten winter wheat. In: *C. R. Biol.* 332 (8), S. 759–764. DOI: 10.1016/j.crv.2009.03.003.
- Zhu, Changwei; Bao, Guangwen; Huang, Shun (2016): Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper. In: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 30 (2), S. 270–276. DOI: 10.1080/13102818.2015.1135081.

7. Anhang

7.1 Kalibrierreihen der Ergosterolbestimmung

Abbildung 42 zeigt eine Kalibriergerade, die mit der Methode mittels HPLC-DAD aufgenommen wurde.

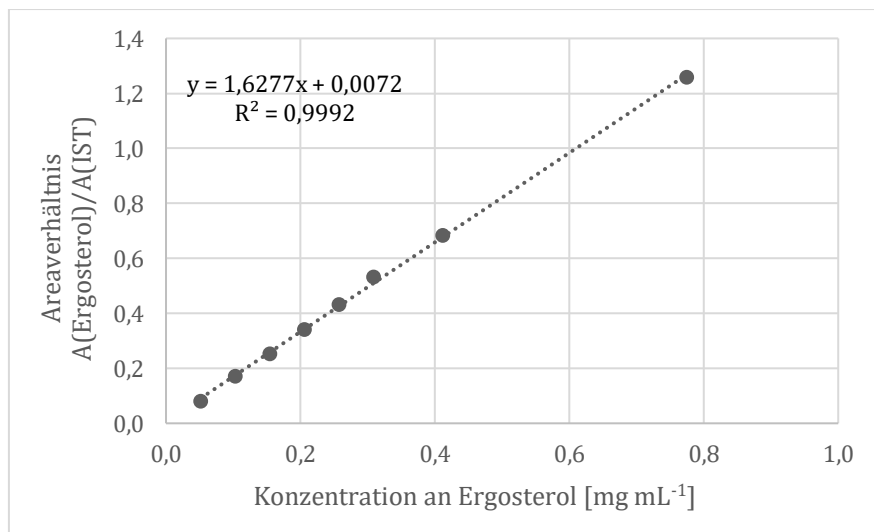


Abbildung 42: Kalibriergerade der Ergosterolbestimmung mittels HPLC-DAD.

In Abbildung 43 ist eine Kalibriergerade der Methode mittels GC-FID dargestellt.

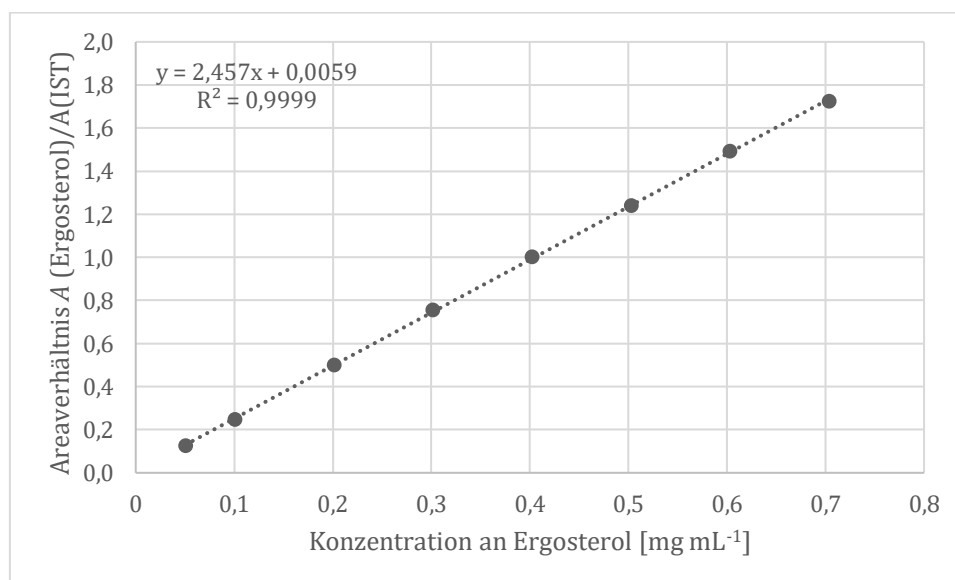


Abbildung 43: Kalibriergerade der Ergosterolbestimmung mittels GC-FID.

7.2 Ergosterolgehalte

7.2.1 Ergosterolgehalte von *P. eryngii*

Die Ergosterolgehalte der Kulturen von *P. eryngii* in Kulturen mit Lupinenklarlauf 1 und Weizenbiertreber sind in Tabelle 54 aufgeführt.

Tabelle 54: Ergosterolgehalte von *P. eryngii* in Weizenbiertreber und Lupinenklarlauf 1 (n=2). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm halbe Spannweiten).

	Ergosterolgehalt [mg g⁻¹]
Weizen-LKL 1	1,062 (\pm 0,239)
FB 1	2,099 (\pm 0,336)
FB 2	2,882 (\pm 0,839)
FB 3	4,069 (\pm 0,267)
FB 4	3,390 (\pm 0,216)
ME (7d)	7,297 (\pm 0,280)

7.2.2 Ergosterolgehalte von *P. nameko*

Die Ergosterolgehalte von *P. nameko* in Medien mit Weizenbier- und Pilsener-Treber und Trinkwasser sind in Tabelle 55 aufgeführt. Hieraus ergeben sich die in Abbildung 32 gezeigten Pilzgehalte.

Tabelle 55: Ergosterolgehalte von *P. nameko* in Weizenbier- und Pilsener-Treber-Medien mit 10 g L⁻¹ Trockenmasse (n=2). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm halbe Spannweiten).

	Ergosterolgehalt [mg g⁻¹]
10 g L⁻¹ TM Pilsener-Treber d3	1,003 (\pm 0,125)
10 g L⁻¹ TM Pilsener-Treber d5	1,052 (\pm 0,098)
10 g L⁻¹ TM Pilsener-Treber d7	1,035 (\pm 0,126)
10 g L⁻¹ TM Weizenbiertreber d3	0,722 (\pm 0,039)
10 g L⁻¹ TM Weizenbiertreber d5	1,214 (\pm 0,224)
10 g L⁻¹ TM Weizenbiertreber d7	1,041 (\pm 0,022)
FB 5 Pilsener-Treber	0,657 (\pm 0,105)
FB 6 Pilsener-Treber	0,787 (\pm 0,268)
FB 7 Pilsener-Treber	0,699 (\pm 0,038)
FB 5 Weizenbiertreber	0,484 (\pm 0,029)
FB 6 Weizenbiertreber	0,677 (\pm 0,105)
FB 7 Weizenbiertreber	0,512 (\pm 0,020)

7.3 Aromaanalytik

7.3.1 Massenspektren der in den Medien vorläufig identifizierten Aromastoffe

Nachfolgend sind die Massenspektren der drei in den Medien mit 10 g L⁻¹ Pilsener-Treber vorläufig identifizierten Substanzen gezeigt. Oben in rot ist jeweils das Spektrum des Peaks der Messung dargestellt und in blau das Spektrum der Referenzsubstanz. Abbildung 44 zeigt die Spektren von (E,E)-2,4-Nonadienal im Vergleich.

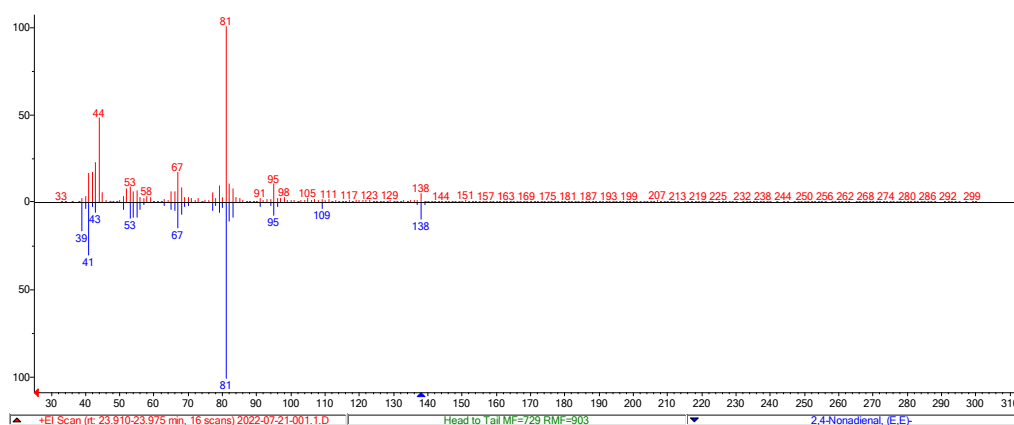


Abbildung 44: Massenspektrum von (E,E)-2,4-Nonadienal in Pilsener-Treber-Medium auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 45 zeigt die Spektren von (E,E)-2,4-Decadienal im Vergleich.

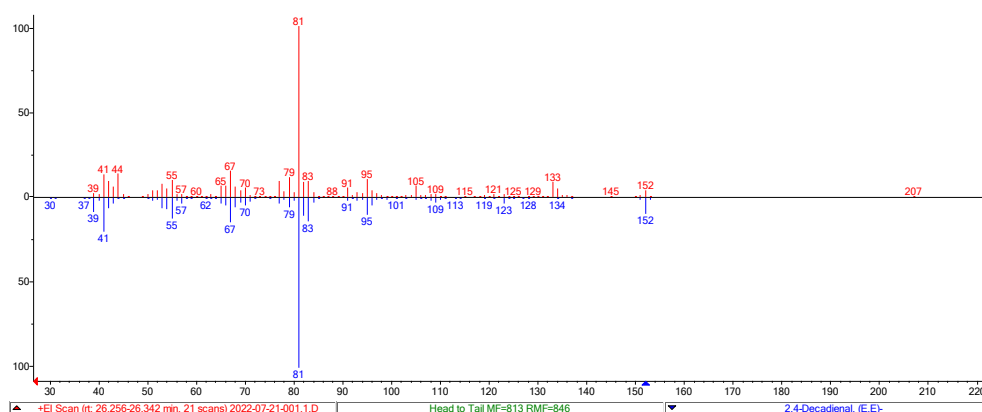


Abbildung 45: Massenspektrum von (E,E)-2,4-Decadienal im Pilsener-Treber-Medium auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 46 zeigt das Massenspektrum von Vanillin im Pilsener-Treber-Medium im Vergleich mit einem Standard-Spektrum.

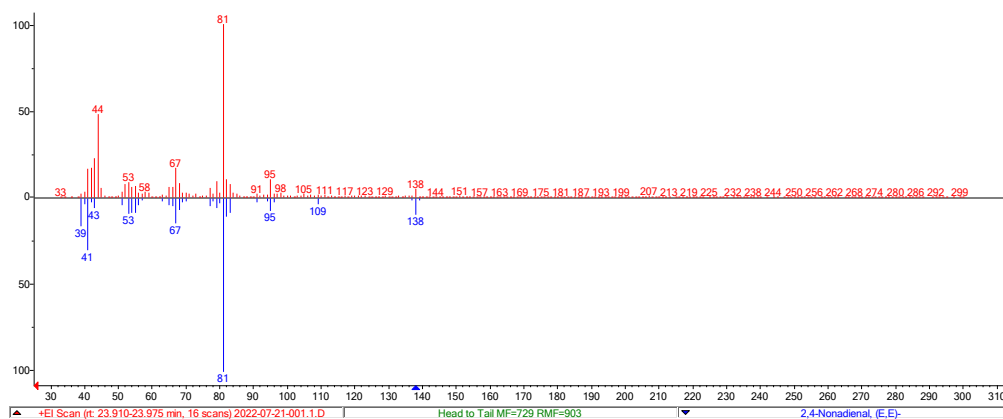


Abbildung 46: Massenspektrum von Vanillin im Pilsener-Treber-Medium auf der VF-WAXms-Säule.

Die gleichen Substanzen wurden im Weizenbierdreber-Medium mit 20 g L^{-1} Trockenmasse Dreber nachgewiesen, auch die Massenspektren sind nachfolgend im Vergleich dargestellt. Abbildung 47 zeigt die Spektren von (*E,E*)-2,4-Nonadienal im Vergleich.

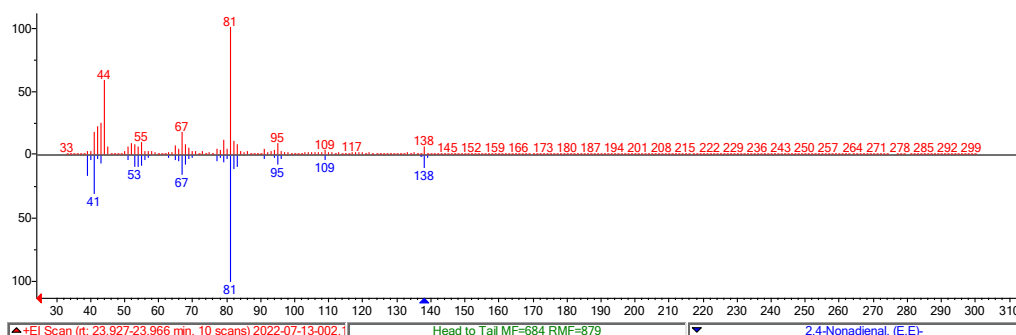


Abbildung 47: Massenspektrum von (*E,E*)-2,4-Nonadienal in Weizenbierdreber-Medium auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 48 zeigt das Spektrum von (*E,E*)-2,4-Decadienal im Weizenbierdreber-Medium, welches auf einer VF-WAXms-Säule gemessen wurde im Vergleich mit einem Standard.

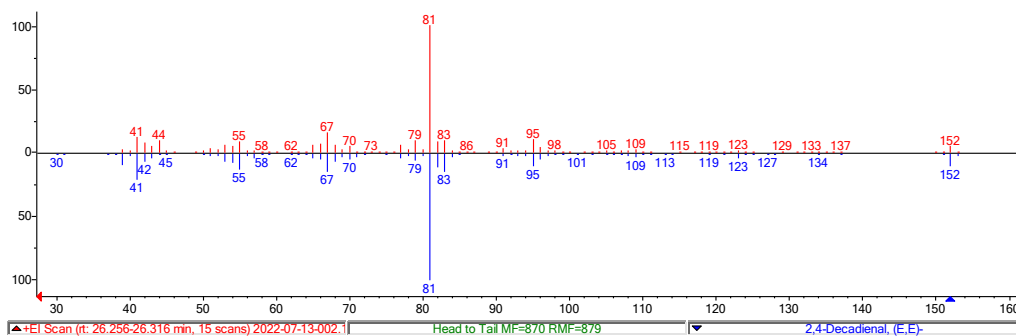


Abbildung 48: Massenspektrum von (*E,E*)-2,4-Decadienal in Weizenbierdreber-Medium auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 49 zeigt die Spektren von Vanillin im Weizenbiertreber-Medium im Vergleich.

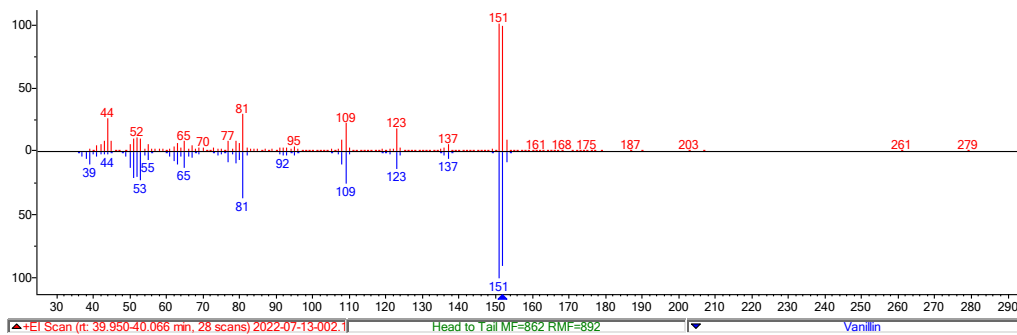


Abbildung 49: Massenspektrum von Vanillin in Weizenbiertreber-Medium auf der VF-WAXms-Säule.

7.3.2 Massenspektren der in den Kulturen mit *P. nameko* vorläufig identifizierten Aromastoffe

Nachfolgend sind die MS-Spektren von Kulturüberständen des *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage gezeigt. Diese wurden aus den Messungen auf der VF-WAXms-Säule extrahiert. Abbildung 50 zeigt die Spektren von Linalooloxid im Vergleich. Das obere Spektrum stammt aus dem Proben-Chromatogramm, unten ist ein Standardspektrum gezeigt.

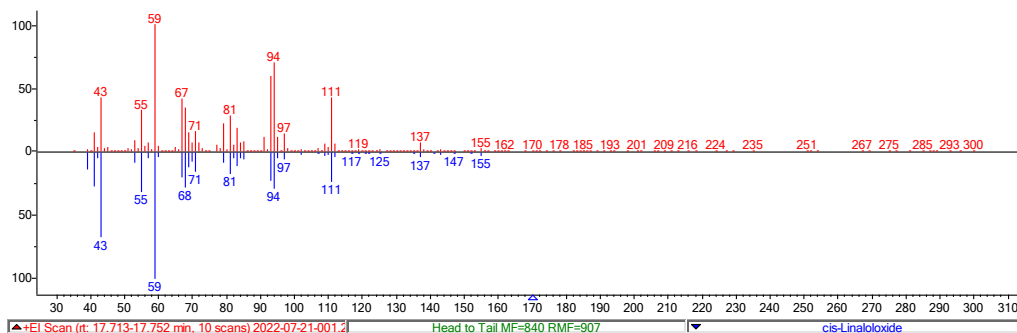


Abbildung 50: Massenspektren von Linalooloxid in Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 51 zeigt die Spektren von Linalool im Vergleich.

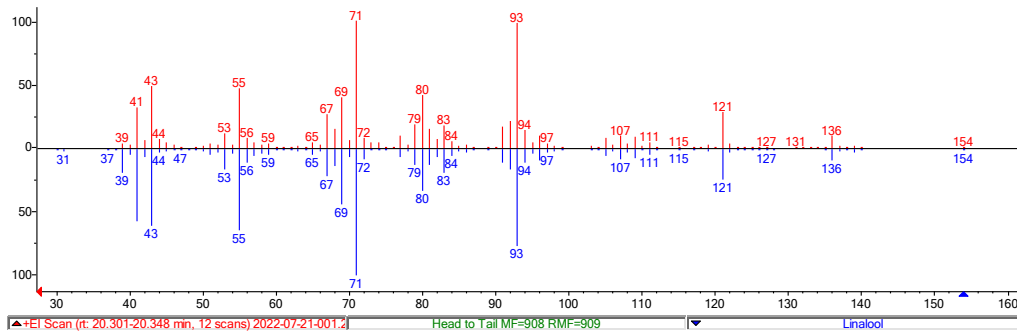


Abbildung 51: Massenspektren von Linalool in Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 52 zeigt die Spektren von Carvon.

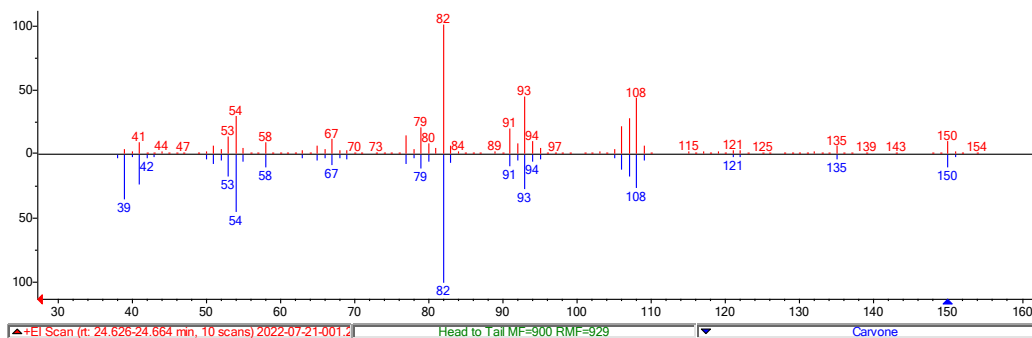


Abbildung 52: Massenspektren von Carvon in Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 53 zeigt die MS-Spektren des Peaks, bei dem es sich vermutlich um die Substanz 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd handelt und des Standards.

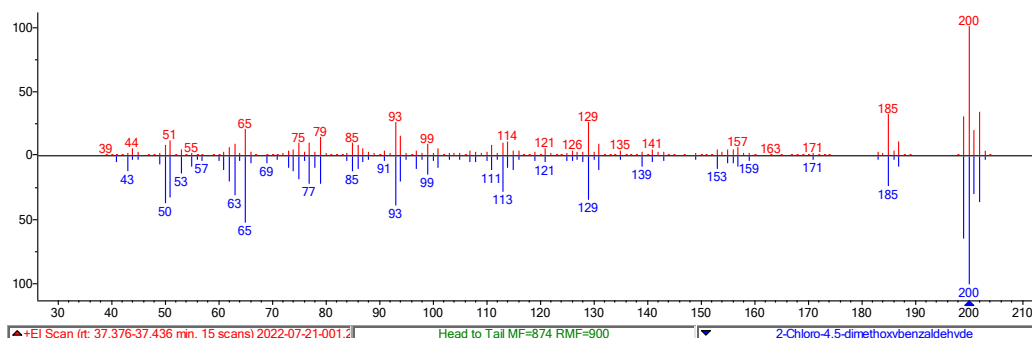


Abbildung 53: Massenspektren von 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd in Kulturen von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

Auch die MS-Spektren der Substanzen, die in Kulturen von *P. nameko* in 20 g L⁻¹ Weizenbier- treber-Medium sind nachfolgend gezeigt. Diese stimmen mit denen im Pilsener-Treber-Medium

überein, nur Carvon wurde im Weizenbiertreber-Medium nicht nachgewiesen. Abbildung 54 zeigt die MS-Spektren von Linalooloxid im Vergleich.

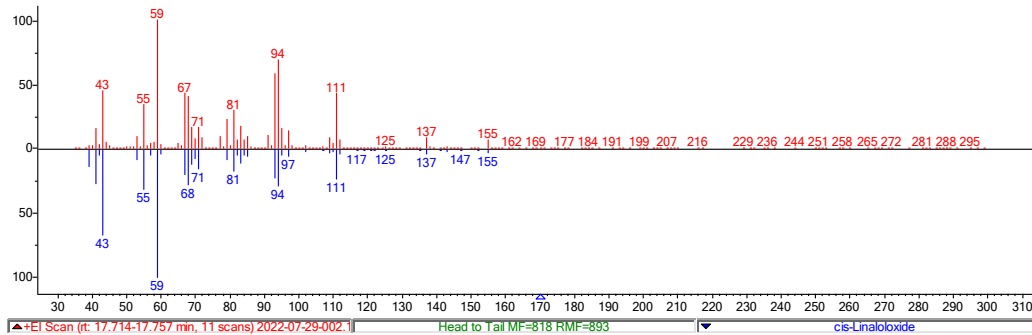


Abbildung 54: Massenspektren von Linalooloxid in Kulturen von *P. nameko* in Weizenbiertreber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 55 zeigt die MS-Spektren von Linalool von fermentiertem Weizenbiertreber.

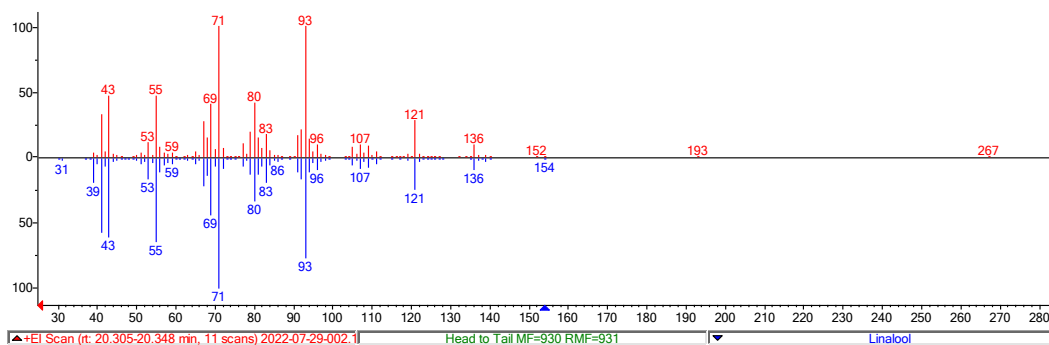


Abbildung 55: Massenspektren von Linalool in Kulturen von *P. nameko* in Weizenbiertreber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

Abbildung 56 zeigt die MS-Spektren der vermutlich in den Kulturen enthaltenen Substanz 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd im Vergleich zum Standard-Spektrum.

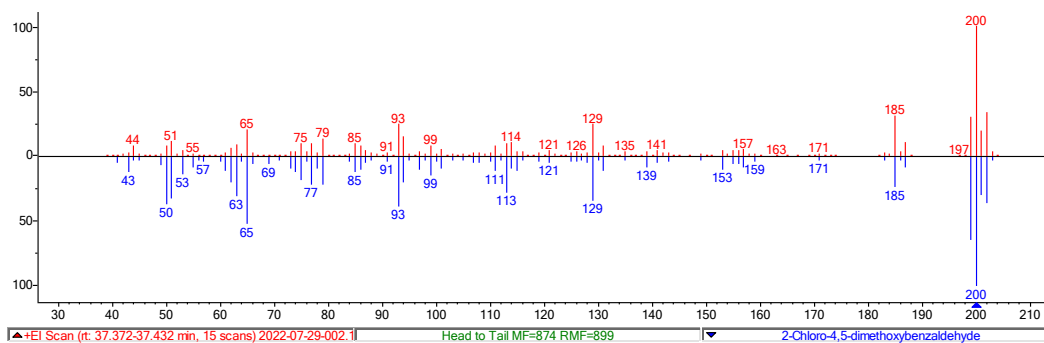


Abbildung 56: Massenspektren von 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd in Kulturen von *P. nameko* in Weizenbiertreber-Medium für drei Tage, auf der VF-WAXms-Säule.

7.3.3 Chromatogramme der Messungen mittels SBSE-GC-MS- O anhand der DB-5ms-Trennsäule

Um die geruchsaktiven Substanzen zu identifizieren ist eine Messung und damit verbundene Bestimmung der RIs auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität notwendig. Nachfolgend sind die Chromatogramme, welche mit einer DB-5ms-Trennsäule aufgenommen wurden gezeigt. Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen die Chromatogramme der beiden Medien, in denen Vanillin (3) markiert wurde.

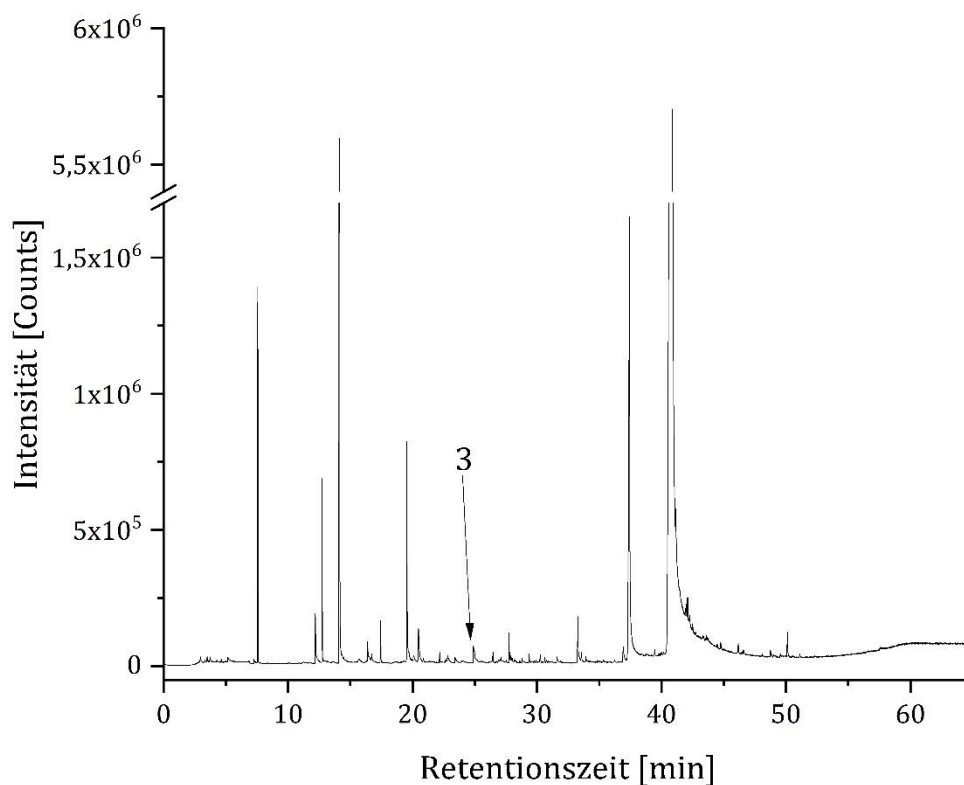


Abbildung 57: Chromatogramm (DB-5ms Trennsäule) des Pilsener-Treber-Medium (10 g L^{-1}).

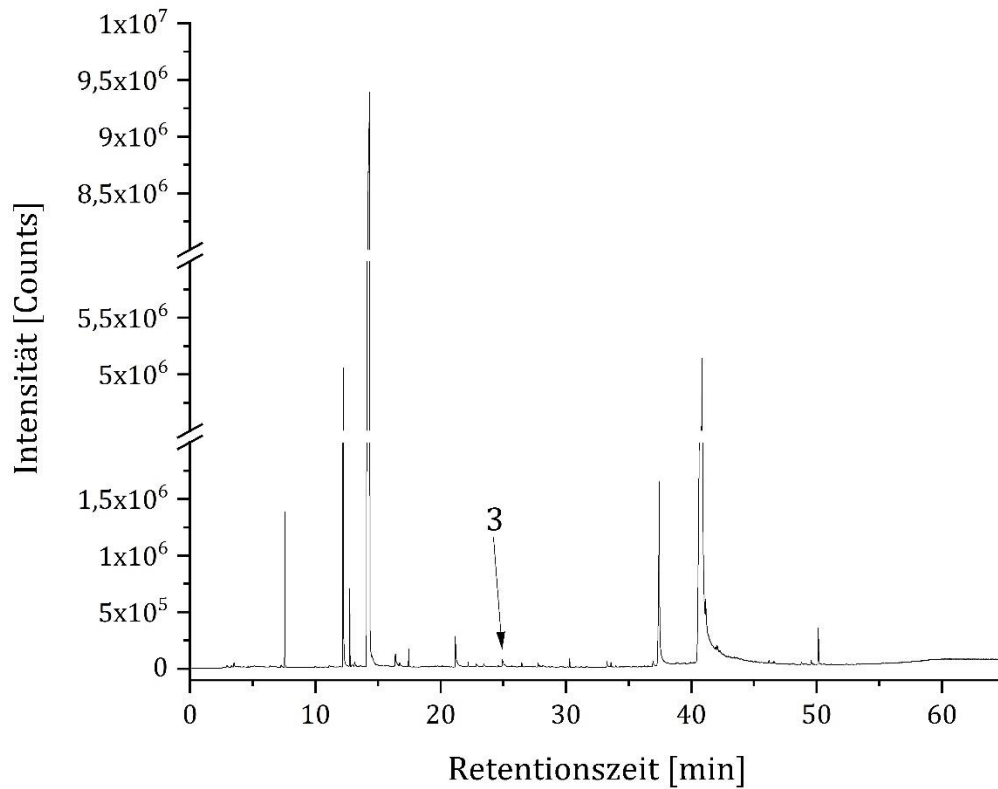


Abbildung 58: Chromatogramm (DB-5ms Trennsäule) des Weizenbiertreber-Mediums (20 g L⁻¹).

Abbildung 59 zeigt das Chromatogramm von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage. Bei der Messung konnten die Geruchseindrücke der Substanzen 1 und 2, welche auf der VF-Wax-Säule nachgewiesen wurden nicht erkannt oder zugeordnet werden.

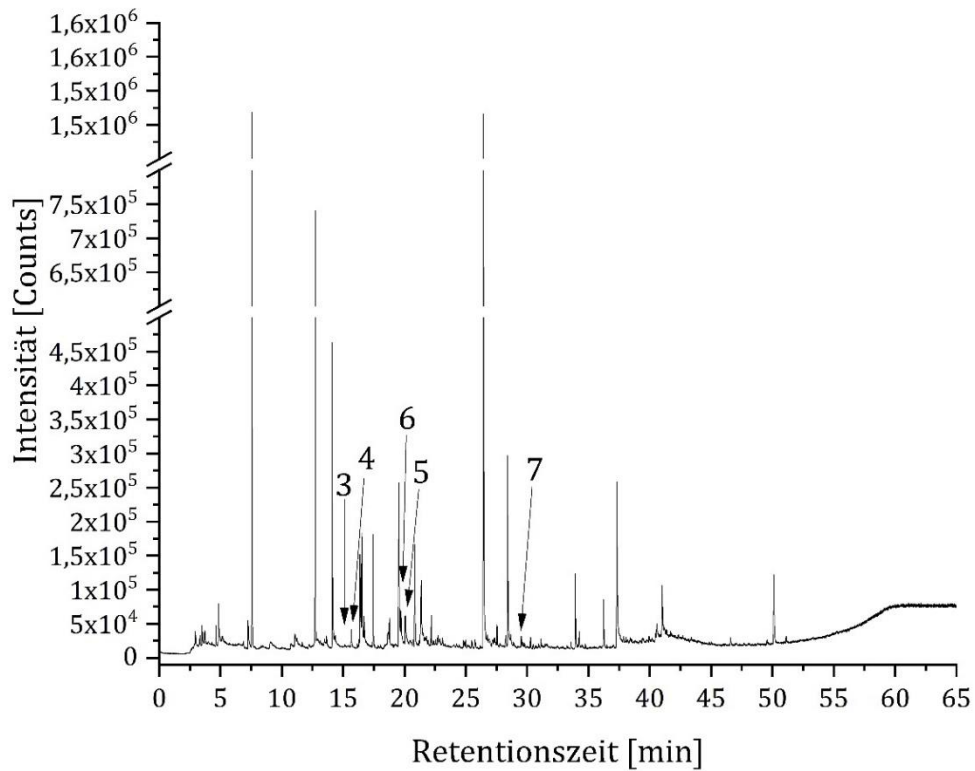


Abbildung 59: Chromatogramm (DB-5ms-Trennsäule) des mit *P. nameko* für drei Tage fermentierten Pilsener-Treber-Medium (10 g L^{-1}).

Abbildung 60 zeigt das Chromatogramm von *P. nameko* in Pilsener-Treber-Medium für drei Tage. Auch hier fehlen die Substanzen 1 und 2 und auch Carvon wurde wie schon auf der VF-Wax-Säule mit Weizenbiertreber nicht nachgewiesen.

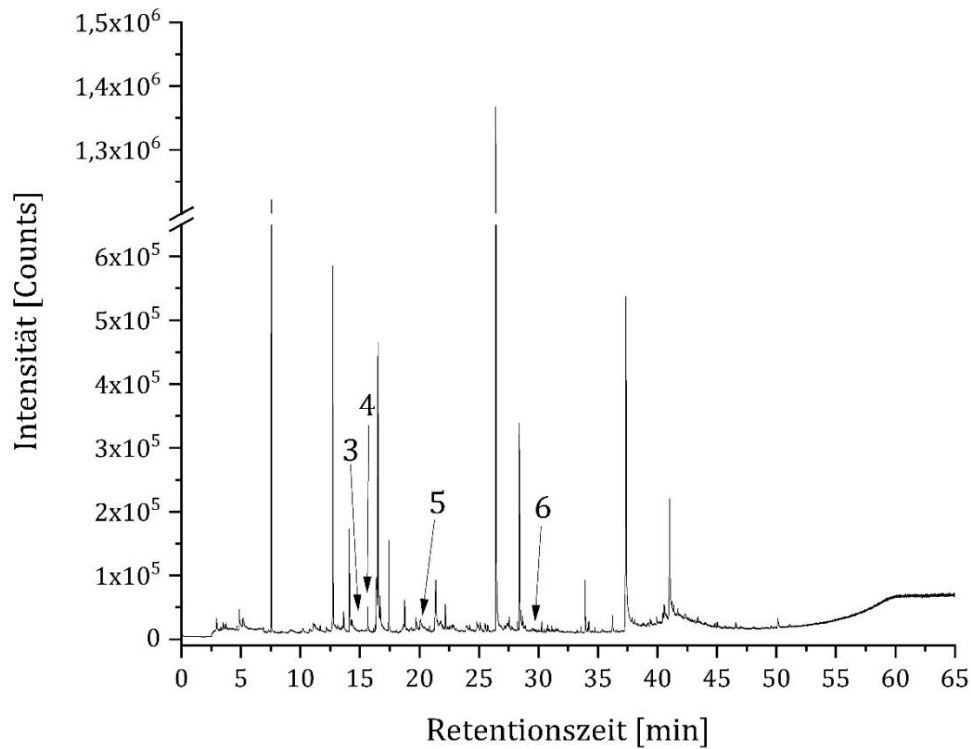


Abbildung 60: Chromatogramm (DB-5ms-Trennsäule) des mit *P. nameko* für drei Tage fermentierten Weizenbiertreber-Mediums (20 g L^{-1}).

7.3.4 GC-MS-O-Messung von *P. nameko* in Biertrebermedien nach Extraktion mittels SPME

Nachfolgend, in Abbildung 61, ist das Chromatogramm der Messung des Kulturüberstandes von *P. nameko* in 20 g L^{-1} Trockenmasse Weizenbiertreber nach drei Kulturtagen mittels SPME-GC-MS-O dargestellt. Die Peaks der in Tabelle 49 aufgeführten vorläufig identifizierten Substanzen sind markiert.

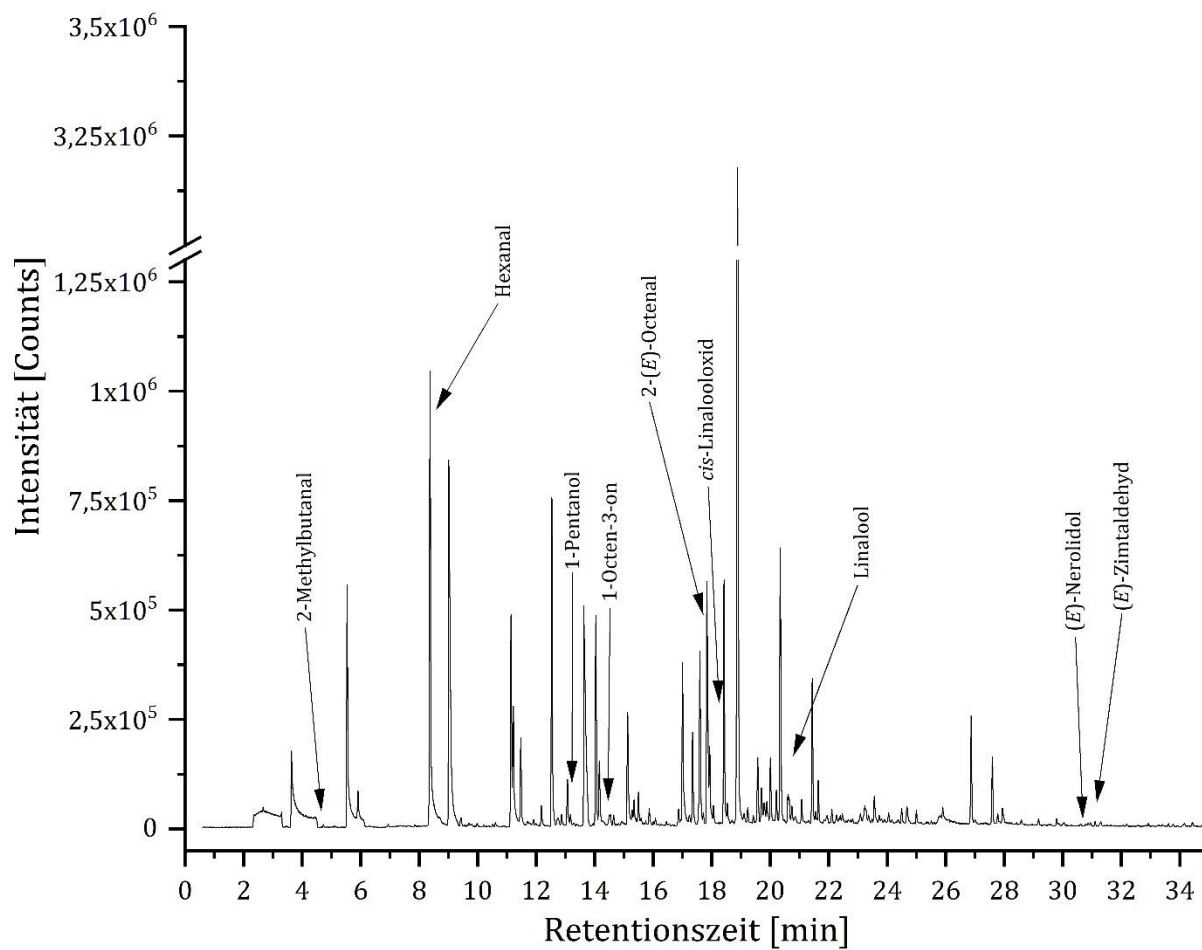


Abbildung 61: Chromatogramm (VF-WAXms-Trennsäule) des mit *P. nameko* für drei Tage fermentierten Weizenbiertreber-Mediums (20 g L^{-1}); extrahiert mittels SPME.