

Fermentation von Kartoffelnebenströmen durch Basidiomyceten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Katharina Happel

(M.Sc. molekulare Biotechnologie)

aus Marburg

angefertigt von April 2021 – Dezember 2024 am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
angewandte Ökologie, Institutsteil Bioressourcen, Gießen

2025

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn,

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Eisner, Honorarprofessur an der Technischen Universität München (School of Life Sciences), Schwerpunkt: Verfahrenstechnik pflanzlicher Rohstoffe

Selbstständigkeitserklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung dieses Themas und seine wissenschaftliche Unterstützung bedanken. Besonders schätze ich seine investierte Zeit und die schnelle Greifbarkeit bei Problemen. Ich danke ebenfalls Professor Dr. Peter Eisner für die gute Zusammenarbeit innerhalb des FutureProteins-Projekts sowie der Übernahme des Zweitgutachtens. Zusätzlich danke ich Professor Dr. Martin Rühl und Professor Dr. Kai Thormann für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ich möchte mich bei allen Beteiligten des FutureProteins-Projekts für die enge Zusammenarbeit und den regen Austausch bedanken. Zu nennen sind hier vor allem die Partnerinnen und Partner des Fraunhofer Instituts IVV und insbesondere Dr. Stephanie Mittermaier und Anna Maria Tschigg aufgrund der guten Kommunikation sowie der Bereitstellung der verwendeten Nebenströme.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie Institutsteil Bioressourcen sowie am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanke ich mich herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch sowie die Teilnahme an den sensorischen Verkostungen. Mein Dank gilt vor allem Jeanny Jaline Jerschow-Schaumann, Dr. Victoria Steiß, Dr. Janin Pfeiffer, Dr. Andreas Hammer, Anne Steinkamp und Christopher Back für die stetige Unterstützung, eure Ratschläge und die Freundschaften die entstanden sind.

Christoph Hartwig möchte ich für die Unterstützung bei der Messung der Glykoalkaloiden danken. Weiterhin danke ich Frau Elke Landrock-Bill für die ESEM-Aufnahmen.

Zusätzlich danke ich allen Studierenden, die durch ihre Praktika und Abschlussarbeiten zur Generierung der Daten beigetragen haben. Hervorheben möchte ich besonders die Beiträge von Julian Schobert, Lea Zeller, Luisa Volpert und Luisa Müller.

Ich danke Dr. Victoria Steiß und Jeanny Jaline Jerschow-Schaumann für das Korrekturlesen dieser Arbeit und damit für ihre Zeit und die hilfreichen Anmerkungen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für ihre offenen Ohren, ihre aufbauenden Worte und die uneingeschränkte Unterstützung danken.

Danke an alle, die in irgendeiner Weise zu dieser Dissertation beigetragen haben. Diese Arbeit ist nicht nur das Ergebnis meiner Bemühungen, sondern auch das Ergebnis der Unterstützung und des Beistands von vielen Menschen.

Veröffentlichungen

Publikationen

Happel, K., Zeller, L., Hammer, A. K., & Zorn, H. (2025) Umami enhancing properties of enzymatically hydrolyzed mycelium of *Flammulina velutipes* cultured on potato pulp. *Food Science & Nutrition*, accepted.

Happel, K., Müller, L., Hartwig, C., & Zorn, H. (2025) Degradation of potato pulp glycoalkaloids by fermentation, eingereicht.

Seidel, L., Runkel, K., Albuquerque, W., Happel, K., Ghezellou, P., Spengler, B., Zorn, H., Gand, M., Freund, M., Will, F., Schweiggert, R. (2024). Investigations into the Protein Stabilization of Musts and Wines by Aspergillopepsin under Different Enzymatic and Thermal Treatments. *ACS Food Science & Technology*, **4**(9), 2124-2133.

Seidel, L., Albuquerque, W., Happel, K., Ghezellou, P., Gand, M., Spengler, B., Zorn, H., Will, F., Schweiggert, R. (2023). Composition, ζ Potential, and Molar Mass Distribution of 20 Must and Wine Colloids from Five Different Cultivars Obtained during Four Consecutive Vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **72**(4), 1938-1948.

Tagungsbeiträge

Vortrag

Happel, K., Schobert, J., Volpert, L., Zorn, H.: Future Proteins: Fermentation von Nebenströmen durch Basidiomyceten. *Regionalverband Südwest Arbeitstagung*, 2024, Kaiserslautern.

Happel, K., Zorn, H.: Potential of filamentous fungi for food production. *Insecta*, 2022, Gießen.

Poster

Happel, K., Zorn, H.: Future Proteins: Fermentation von Nebenströmen durch Basidiomyceten. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, 2022, Hamburg.

Zusammenfassung

Kartoffelnebenströme fallen in großen Mengen in der kartoffelverarbeitenden Industrie bei der Produktion von Kartoffelstärke und anderen Kartoffelerzeugnissen an. Die Verwendung dieser Nebenströme als kostengünstiges Substrat für die Produktion von hochwertigem Pilzmyzel ist hinsichtlich einer nachhaltigen Verwertung von großem Interesse. Innerhalb des Projekts wurde die Eignung der Nebenströme Kartoffelschale und Kartoffeltrester, welche beide nach der Stärke- und Proteinisolierung am Fraunhofer Institut IVV in Freising anfielen, überprüft.

Durch ein Emergsscreening mit 100 Pilzen und ein anschließendes Submersscreening mit 50 Pilzen konnten vielversprechende Pilz-Substrat-Kombinationen identifiziert werden. Besonders hohe Pilzanteile von ca. 100% wurden durch Fermentation von Kartoffeltrester mit *Flammulina velutipes* bei einer Substratkonzentration von 20 g/L und siebentägiger Kultivierung erzielt. Im Rahmen der Optimierung konnte die Substratkonzentration bei gleichbleibender Kultivierungsdauer auf 30 g/L erhöht werden. Der Pilzanteil betrug $83 \pm 3\%$ und die Biotrockenmasse wurde durch die Fermentation von $8,1 \pm 0,4$ g/L auf $9,8 \pm 0,3$ g/L gesteigert. Es wurde ein maximaler Rohproteingehalt von $17,9 \pm 0,3$ g/100 g TM und ein Reinproteingehalt von $15,4 \pm 0,2$ g/100 g TM erreicht. Die Fermentation wurde erfolgreich von Schüttelkolben in einen 7 L Fermenter (4,5 L Arbeitsvolumen) übertragen, was den Grundstein für zukünftige Maßstabsvergrößerungen legte. Die Applikation des Fermentats wurde in veganen Frikadellen getestet, wobei sich *F. velutipes* als vielversprechender Kandidat für den Einsatz in Lebensmitteln herausstellte. Die Parameter der Fermentation des Kartoffeltresters wurden auf industrielle Kartoffelpülpe übertragen. Dabei zeigte sich, dass die Viskosität bei der Medienherstellung deutlich höher war. Daher musste die Substratkonzentration auf 20 g/L gesenkt werden. Durch zusätzliche Verlängerung der Fermentation auf 11 Kultivierungstage wurde ein Pilzgehalt von ca. 65% erreicht. Zur weiteren Optimierung wurde die Supplementation mit Kartoffelfruchtwasser getestet, wodurch Pilzgehalt von ca. 60% bei einer Fermentationsdauer von nur 7 Tagen erreicht wurden. Insgesamt ergibt sich für diese Fermentation weiteres Optimierungspotential.

In den Kartoffelnebenströmen sind Glykoalkaloide enthalten, die in höheren Verzehrsmengen toxisch sein können. Daher wurde eine Methode zur Bestimmung von Glykoalkaloiden validiert und deren Gehalte über den Kultivierungszeitraum untersucht. Es zeigte sich eine Anreicherung der Glykoalkaloide nach der Abtrennung des Überstands im Rückstand bei Kultur von *F. velutipes*. Aufgrund dessen sollte der Gehalt bei Einsatz der Fermentate in den Endprodukten überprüft werden. Interessanterweise wurde bei Kultur von *Pleurotus pulmonarius* auf den Kartoffelnebenströmen ein Abbau der Glykoalkaloide beobachtet. Ab einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen auf Kartoffeltrester wurden nur noch geringe Solanidingehalte und kein α -Solanin- oder α -Chaconin nachgewiesen.

Das Fermentat von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* wurde zusätzlich mit einer kommerziellen Peptidase enzymatisch hydrolysiert. Nach Optimierung der Hydrolysebedingungen wurde ein Hydrolysegrad von $75,1 \pm 1,0\%$ erreicht. Dadurch wurde der Gehalt an freier Glutaminsäure um mehr als das 20fache von $8,7 \pm 0,1$ mg/L auf $188,7 \pm 1,2$ mg/L erhöht. Durch enzymatische Hydrolyse wurde die umami-Wahrnehmung in Wasser gesteigert sowie geschmacksverstärkende Eigenschaften in Gemüsebrühe festgestellt. Das Fermentat selbst wies Peptidase-Aktivität auf. Ohne Zugabe von zusätzlichem Enzym wurde ein Hydrolysegrad von $33,9 \pm 0,7\%$ und ein freier Glutaminsäuregehalt von $99,1 \pm 0,7$ mg/L erreicht. Für diese Hydrolysate wurde die Erhöhung der umami-Wahrnehmung nur bei Zugabe zu Gemüsebrühe und nicht zu Wasser detektiert. Dies spricht für geschmacksverstärkende Eigenschaften bei geringem umami-Eigengeschmack.

Kartoffelnebenströme eigneten sich sehr gut für die Pilzfermentation und es wurden hohe Pilzanteile und eine Steigerung des Proteingehalts erreicht. Es konnte der Einsatz von Basidiomyceten zum Abbau von Glykoalkaloiden nachgewiesen werden. Nach Hydrolyse der Pilzmyzelien mittels pilzeigener oder zugesetzter Peptidasen wurden geschmacksverstärkende Eigenschaften beobachtet.

Abstract

Potato by-products are generated in large quantities in the potato processing industry during the production of potato starch and other potato products (Grommers & van der Kogt 2009). The use of these side streams as a cost-effective substrate for the production of high-quality fungal mycelium is of great interest in terms of sustainable utilization. The project investigated the suitability of potato peels and potato pulp, both produced during starch and protein isolation at the Fraunhofer Institute IVV in Freising.

Promising fungus-substrate-combinations were identified by a surface culture screening with 100 fungi and a subsequent screening of 50 fungi in submerged cultures. Particularly high fungal contents of almost 100% were achieved by fermenting potato pulp with *Flammulina velutipes* at a substrate concentration of 20 g/L and a cultivation time of seven days. During optimization, the substrate concentration was increased to 30 g/L. The fungal content reached $83 \pm 3\%$ and the dry biomass after fermentation was increased from 8.1 ± 0.4 g/L to 9.8 ± 0.3 g/L. A maximum crude protein content of 17.9 ± 0.3 g/100 g DM and a pure protein content of 15.4 ± 0.2 g/100 g DM were achieved. The fermentation was successfully transferred from shake flasks to a 7 L fermenter (4.5 L working volume). The application of the fermentate in vegan meatballs was tested and *F. velutipes* proved to be a promising candidate for use in food. The fermentation parameters established for potato pomace from laboratory experiments were transferred to an industrial potato pulp. The viscosity of the media was significantly higher. Therefore, the substrate concentration had to be reduced to 20 g/L. By extending the fermentation to 11 days, a fungal content of approximately 65% was achieved.

The potato by-products contain glycoalkaloids, which can be toxic at high consumption levels. Therefore, a method for the quantitation of glycoalkaloids was validated and their content was analyzed over the cultivation period. An accumulation of glycoalkaloids was found after separation of the supernatant in the fungal mycelium after cultivation of *F. velutipes*. Therefore, the content in final products after integration of the fermentate in food should be checked. Interestingly, a degradation of glycoalkaloids was observed after cultivation of *Pleurotus pulmonarius* on the potato side streams. Only low levels of solanidine and no α -solanine or α -chaconine were detected after 7 days of cultivation on potato pulp.

The fermentate of potato pulp with *F. velutipes* was enzymatically hydrolyzed by a commercial peptidase. After optimization of the hydrolysis conditions, a degree of hydrolysis of $75.1 \pm 1.0\%$ was achieved. The protein hydrolysis increased the contents of free glutamate more than 20-fold from 8.7 ± 0.1 mg/L to 188.7 ± 1.2 mg/L. Elevated glutamate levels led to an umami-taste perception in aqueous solution and taste-enhancing properties in vegetable broth. Noteworthy, the fermentate itself exhibited an intrinsic peptidase activity. Without addition of auxiliary

peptidases, mycelial enzymes caused a degree of hydrolysis of $33.9 \pm 0.7\%$ and a free glutamate content of 99.1 ± 0.7 mg/L. For these samples, an increase in umami taste was only observed in vegetable broth, but not in water, indicating taste-enhancing properties but low umami taste.

Potato by-products were suitable as substrates for fungal fermentation and high fungal contents and an increase in the protein content was achieved. The use of basidiomycetes for the degradation of glycoalkaloids was demonstrated. In addition, fungal mycelium was hydrolyzed using fungal or added peptidases and the flavor-enhancing properties of the hydrolysates were shown.

Abkürzungsverzeichnis

AAS:	<i>Amino Acid Score</i>
AS:	Ammoniumsulfat
BfR:	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG:	Bestimmungsgrenze
BLE:	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMEL:	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BPC	Base Peak Chromatogramm
BTM:	Biotrockenmasse
BW:	Biologische Wertigkeit
BW AH:	Blindwert Autohydrolyse
BW M:	Blindwert Myzel
BW ME4:	Blindwert Myzel Enzym 4 mL
BZL:	Bundesinformationszentrum Landwirtschaft
CONTAM:	EFSA Panel für Kontaminanten in der Lebensmittelkette
DGfM:	Deutschen Gesellschaft für Mykologie
DH:	engl. <i>degree of hydrolysis</i> , Hydrolysegrad
DLBK:	Deutsche Lebensmittelbuch-Kommission
DO:	Gelöster Sauerstoffgehalt
E1:	Enzym 1 mL
EAAI:	<i>Essential Amino Acid Index</i>
EIC:	Extrahiertes Ionenchromatogramm
EFSA:	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ESEM:	<i>Environmental Scanning Electron Microscope</i>
ESI:	Elektrosprayionisation
FAO:	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FID:	Flammenionisationsdetektor
Fk:	Fruchtkörper
FSME:	Fettsäuremethylester
FVE:	<i>Flammulina velutipes</i>

GC:	Gaschromatograph
GB:	Gemüsebrühe
HCO:	<i>Hericium coralloides</i>
IST:	Interner Standard
ITS:	<i>Internal transcribed spacer</i>
KP:	Kartoffelpülpe-Medium
KS:	Kartoffelschalen-Medium
KSA:	Kartoffelschalen-Agar Medium
KT:	Kartoffeltrester-Medium
KTA:	Kartoffeltrester- Agar Medium
KUM:	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>
LFGB:	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LOAEL:	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
MBTH:	3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochlorid
ME:	Malzextrakt-Medium
ME1:	Myzel Enzym 1 mL
ME4:	Myzel Enzym 4 mL
MEA:	Malzextrakt-Agar Medium
MK:	Medienkontrolle
MRP:	<i>Macrolepiota procera</i>
MS:	Massenspektrometrie
MSTFA:	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
MUFA:	Einfach ungesättigte Fettsäuren
My:	Myzel
m/z:	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NA:	Natriumaspertat
n.a.	nicht angegeben
n.b.	nicht bestimmt
NOAEL:	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NWG:	Nachweisgrenze
ÖBK:	Ölbindekapazität
PSP:	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
PUFA:	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

QTOF:	<i>Quadrupole-time-of-flight</i>
qPCR:	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
R:	Rückstand
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RI:	Retentionsindex
S:	Summe
SCP:	<i>Single cell protein</i>
SEM:	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SFA:	Gesättigte Fettsäuren
SK:	Substratkontrolle
TCA:	Trichloressigsäure
THF:	Tetrahydrofuran
TM:	Trockenmasse
TS:	Trockensubstanz
Ü:	Überstand
UHPLC:	<i>Ultra-high-performance-liquid-chromatography</i>
VE-Wasser:	Vollentsalztes Wasser
WBK:	Wasserbindekapazität
WHO:	Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung.....	I
Danksagung.....	II
Zusammenfassung	IV
Abstract.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Kartoffel.....	1
1.1.1 Glykoalkaloide.....	2
1.2 Kartoffelverarbeitung und deren Nebenströme	4
1.2.1 Kartoffelpülpe.....	6
1.2.2 Kartoffelschale	9
1.3 Basidiomyceten.....	11
1.4 Geschmackswahrnehmung und -verstärkung.....	13
1.5 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Geräte	21
2.3 Pilze.....	24
2.4 Substrate	27
2.5 Nährmedien.....	27
2.6 Pilzkultivierung	29
2.6.1 Stammhaltung.....	29
2.6.2 Vorkulturen.....	29
2.6.3 Hauptkulturen.....	29
2.6.4 Kulturernte	29
2.6.5 Screening in Emerskultur	30
2.6.6 Screening in Submerskultur	30
2.6.7 Analysen der Screenings in Emers- und Submerskultur	30
2.6.8 Verwendung des Fermentationsüberstands	32
2.7 Mikroskopie.....	32
2.8 Analytische Methoden.....	32
2.8.1 Bestimmung des Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis	32
2.8.2 Bestimmung des Wassergehalts	32
2.8.3 Bestimmung der Wasseraktivität.....	33
2.8.4 Bestimmung der Wasserbindekapazität.....	33
2.8.5 Bestimmung der Ölbindekapazität	33

2.8.6	Bestimmung des Rohaschegehaltes.....	34
2.8.7	Bestimmung des Ballaststoffgehaltes	34
2.8.8	Bestimmung des Pektingehaltes	36
2.8.9	Bestimmung des Stärkegehaltes.....	37
2.8.10	Bestimmung des Fettgehaltes	38
2.8.11	Bestimmung des Fettsäureprofils.....	39
2.8.12	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes	41
2.8.13	Bestimmung des Aminosäureprofils und der biologischen Wertigkeit	42
2.8.14	Bestimmung von freier L-Glutaminsäure.....	48
2.8.15	Formol-Titration	49
2.8.16	Bestimmung des Chitingehaltes	50
2.8.17	Bestimmung des Ergosterolgehaltes	54
2.8.18	Bestimmung von Glykoalkaloiden	55
2.9	Validierung der Bestimmung von Glykoalkaloiden.....	57
2.9.1	Linearität	57
2.9.2	Mess- und Methodenpräzision	59
2.9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	59
2.10	Hydrolyse von Pilzmyzelien	61
2.10.1	Bestimmung der Proteaseaktivität mittels Azocasein-Assay	62
2.11	Sensorische Prüfungen	63
2.11.1	Standardlösungen für die sensorische Prüfung.....	63
2.11.2	Reiz- und Erkennungsschwellenprüfung.....	64
2.11.3	Prüfung auf Erkennung der Geschmacksqualitäten	65
2.11.4	Herstellung von Gemüsebrühe.....	65
2.11.5	Dreieckstest auf Unterschied	65
2.11.6	Beschreibende Prüfung.....	65
2.11.7	Produkttest.....	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Substratzusammensetzung	67
3.2	Fermentation der Kartoffelnebenströme.....	68
3.2.1	Screening in Emerskultur	68
3.2.2	Screening in Submerskultur	70
3.2.3	Vergleich der Emers- und Submerskultivierungen	73
3.2.4	Engere Pilzauswahl	74
3.2.5	Zeitreihen auf Malzextraktmedium	75
3.2.6	Bilanzierung	76
3.2.7	Optimierung	77
3.3	Analyse der Fermentate	85
3.3.1	Mikroskopie.....	85

3.3.2	Aminosäureanalytik	87
3.3.3	Bestimmung des Rohfettgehalts und Analyse der Fettsäureverteilung	89
3.3.4	Bestimmung des Chitingehalts	91
3.4	Maßstabsvergrößerung	92
3.5	Grundanalytik des optimierten Fermentats	95
3.6	Übertragung auf industrielle Kartoffelpülpe	95
3.6.1	Wachstumsreihen auf Kartoffelpülpe und Kartoffeltrester	95
3.6.2	Aminosäureverteilung nach Kultur auf Kartoffelpülpe.....	97
3.6.3	Funktionelle Eigenschaften und chemische Zusammensetzung	98
3.6.4	Kombination mit Kartoffelfruchtwasser.....	99
3.7	Bestimmung des Glykoalkaloidgehalts.....	101
3.7.1	Validierung der Methode	101
3.7.2	Glykoalkaloidgehalte der Substrate	103
3.7.3	Glykoalkaloidgehalte der Fermentate mit <i>Flammulina velutipes</i>	104
3.7.4	Glykoalkaloidgehalte der Fermentate mit <i>Pleurotus pulmonarius</i>	106
3.7.5	Chromatogramme und Massenspektren.....	108
3.8	Myzelhydrolyse.....	114
3.8.1	Azocasein-Assay	114
3.8.2	Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von Pilzmyzel.....	115
3.8.3	Totalhydrolyse und Berechnung von Hydrolysegraden	116
3.8.4	Aminosäurezusammensetzung der Hydrolyseproben	117
3.8.5	Quantifizierung von L-Glutaminsäure.....	118
3.8.6	Sensorische Prüfungen	119
3.9	Produktapplikationen	123
4	Diskussion	125
4.1	Substratanalyse	125
4.2	Screening verschiedener Basidiomyceten	126
4.3	Bilanzierung der Fermentation	130
4.4	Optimierung der Fermentation.....	131
4.4.1	Optimierung durch Stickstoffzugabe	131
4.4.2	Optimierung der Substratkonzentration	132
4.4.3	Verwertung des Kulturüberstands	133
4.4.4	Vorkultur auf Nebenströmen	135
4.4.5	Fermentationsparameter	135
4.5	Analyse der Fermentate	136
4.5.1	Proteingehalt und Aminosäureanalytik der Fermentate	136
4.5.2	Fettgehalt und Fettsäureverteilung	138
4.5.3	Zusammensetzung des optimierten Fermentats.....	139
4.5.4	Chitinbestimmung.....	141

4.5.5	Glykoalkaloide.....	143
4.6	Methoden zur Bestimmung von pilzlichem Wachstum	150
4.7	Maßstabsvergrößerung	153
4.8	Übertragung auf eine industrielle Kartoffelpülpe	153
4.9	Myzelhydrolyse	155
4.9.1	Hydrolysebedingungen	155
4.9.2	Einordnung von Hydrolysegraden	157
4.9.3	Aminosäureanalyse und Bestimmung des freien Glutaminsäuregehalts	158
4.9.4	Sensorische Prüfungen	159
4.10	Produktapplikationen	160
4.11	Ausblick.....	162
4.12	Fazit.....	164
5	Literaturverzeichnis	165
6	Anhang	189
6.1	Kalibriergraden quantitativer Methoden	189
6.2	Validierung der Methode zur Bestimmung von Glykoalkaloiden	193
6.3	Aminosäureanalytik.....	198

1 Einleitung

1.1 Kartoffel

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gehört zu den Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) und somit zur Ordnung der Nachtschattenartigen (*Solanales*) (Lieberei & Reisdorff 2012). Sie wird vom Menschen seit fast 8.000 Jahren als Nahrungsmittel genutzt und hat ihren Ursprung in den Anden Südamerikas, von wo sie im 16. Jahrhundert von spanischen Seefahrern nach Europa gebracht wurde (FAO 2009). Im Jahr 2022 betrug das Produktionsvolumen von Kartoffeln ca. 375 Millionen Tonnen weltweit. Kartoffeln liegen insgesamt auf Platz sechs der global am meisten angebaute Pflanzen. Der größte Kartoffelproduzent weltweit ist China. Deutschland belegt mit ca. 10,7 Millionen Tonnen Kartoffeln jährlich (Jahr 2022) weltweit Rang sechs und im europäischen Vergleich Rang eins (FAO 2024a). Der Trend im Konsum von Kartoffeln zeigt eine Abnahme in Industrieländern über die letzten drei Jahrzehnte und eine steigende Tendenz in Schwellen- und Entwicklungsländern. Der pro Kopf Verbrauch in Deutschland von Kartoffeln- und Kartoffelprodukten betrug im Jahr 2021/2022 56,1 kg, wobei über die Hälfte in Form von Kartoffelerzeugnissen (Pommes Frites, Chips...) verzehrt wurden. Von der Gesamtmenge der in Deutschland produzierten Kartoffeln wurden in den letzten Jahren 50-70% industriell genutzt (BLE 2023).

Kartoffeln sind Sprossknollen, da sie durch die Verdickung von Seitensprossen entstehen. Sie dienen der Pflanze zur Überwinterung und zur vegetativen Vermehrung (Lieberei & Reisdorff 2012). Wasser und Stärke machen prozentual mit $76 \pm 6\%$ und $19 \pm 6\%$ die größten Anteile bezogen auf die Frischmasse in der Zusammensetzung der Kartoffel aus (Grommers & van der Krogt 2009). Zusätzlich besteht die Kartoffel zu etwa 4% aus Protein und zu etwa 2% Ballaststoffen (Beals 2019). Kartoffelprotein zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren aus. Die Proteinqualität ist dabei aufgrund eines höheren Methioningehalts höher als die von Erbsen- oder Bohnenprotein und durch einen höheren Gehalt an Lysin höher als die von Getreideprotein (Kowalczewski et al. 2019; Rexen 1976). Das Hauptprotein der Kartoffel ist Patatin, ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von ca. 45 kDa (Racusen & Foote 1980). Patatin ist ein Speicherprotein der Knolle und macht bis zu 40% der löslichen Proteine aus. Neben Patatin besteht das Kartoffelprotein hauptsächlich aus der Oberklasse der Proteaseinhibitoren, welche ca. 50% des löslichen Proteins ausmachen. Deren Molekülmassen liegen zwischen 5 und 25 kDa. Der restliche Anteil setzt sich aus anderen Proteinen mit meist höheren Molekülmassen zusammen (Pouvreau et al. 2001).

Kartoffeln produzieren Anthocyane, Flavonoide und Phenolsäuren, wobei sich deren Gehalte zwischen den verschiedenen Pflanzenteilen und verschiedenen Kartoffelsorten unterscheiden. So liegen die Mengen an Chlorogensäure beispielsweise in der Kartoffelschale deutlich über den Mengen in der Kartoffelknolle (Lewis et al. 1998). Auch Glykoalkaloide sind

ungleich in der Kartoffelpflanze verteilt (Friedman & Dao 1992). Wenn diese in hohen Mengen konsumiert werden, weisen sie einen bitteren Geschmack auf und sind toxisch (Sinden et al. 1976). Zum Verzehr dient daher lediglich das Mark der Knolle und es sollte auf den Konsum von Schalen, Keimen und grüne Stellen verzichtet werden (BfR 2018).

1.1.1 Glykoalkaloide

Glykoalkaloide zählen zu den Sekundärmetaboliten. Die Definition für Sekundärmetabolite beruht seit langem darauf, dass diese Substanzen unter optimalen Bedingungen nicht für das Wachstum oder das Überleben von Organismen notwendig wären (Fraenkel 1959). Neuere Erkenntnisse aus genetischen und chemischen Studien zeigen jedoch, dass diese Grenzen verschwimmen. Viele Substanzen sind multifunktional und dienen teils auch dem primären Metabolismus (Erb & Kliebenstein 2020). Die Funktionen von Sekundärmetaboliten sind weitreichend und umfassen beispielsweise Kommunikations- oder Schutzmechanismen. Die Bildung kann sowohl von äußeren Gegebenheiten als auch vom Entwicklungsstadium von Organismen abhängen (Bhatla & Lal 2023).

Viele Pflanzen der *Solanaceae* produzieren Glykoalkaloide, wobei die produzierten Substanzen und Mengen variieren (Maga 1994). Seit 1954 ist bekannt, dass es sich bei dem hauptsächlich vorkommenden Glykoalkaloid der Kartoffel um eine Mischung aus α -Solanin und α -Chaconin handelt (Kuhn et al. 1955). In ihrer jeweiligen α -Form machen Solanin und Chaconin 95% der Alkaloide der kultivierten Kartoffel aus (Maga 1994).

Die Synthese der Glykoalkaloide startet mit Acetyl-CoA, welches über den Biosyntheseweg zur Bildung von Sterolen zunächst zu Cholesterol und anschließend zu Solanidin aufgebaut wird. Solanidin wird anschließend mittels Solanidin-Glykosyltransferasen zu α -Solanin und α -Chaconin glykosyliert (Ginzberg et al. 2009). Die Produktion von Glykoalkaloiden dient den Pflanzen vorwiegend dem Schutz vor Fressfeinden (Cipollini & Levey 1997) und kann durch verschiedene Stresseinwirkungen induziert werden. So wurde bereits der Einfluss von Lichteinstrahlung (Dale et al. 1993), von der Schädigung des Gewebes (Fitzpatrick et al. 1978), von der Schädigung durch Insekten (Hlywka et al. 1994) oder von Lagerbedingungen auf den Glykoalkaloidgehalt festgestellt (Love et al. 1994). Der Gehalt an Glykoalkaloiden variiert dabei stark zwischen den verschiedenen Pflanzenteilen. In der Knolle wiesen Friedman und Dao ca. 15 mg/100 g Frischgewicht nach, wohingegen sie in den Blättern ungefähr den 10fachen Gehalt quantifizierten (Friedman & Dao 1992). In der Knolle ist die Glykoalkaloidkonzentration in der Kartoffelschale höher als im Mark der Kartoffel (Ji et al. 2012).

Glykoalkaloide setzen sich aus einem Aglykon und einem charakteristischen Kohlenhydratanteil zusammen (Abbildung 1). Bei Solanin und Chaconin sind die

Zuckerbausteine β -glykosidisch an das Aglykon Solanidin gebunden. Der gebundene Zucker bei α -Solanin ist Solatriose, welcher aus je einem Molekül D-Glucose, D-Galactose und L-Rhamnose besteht. α -Chaconin beinhaltet den Zuckerbaustein Chacotriose, welcher sich aus zwei Molekülen L-Rhamnose und einem Molekül D-Glucose zusammensetzt. Durch Abspaltung der Zuckermonomere können die jeweilige β und γ -Form gebildet werden (Friedman 2006). Die Toxizität der Glykoalkaloide nimmt mit der Abspaltung der Kohlenhydrate ab (Rayburn et al. 1994).

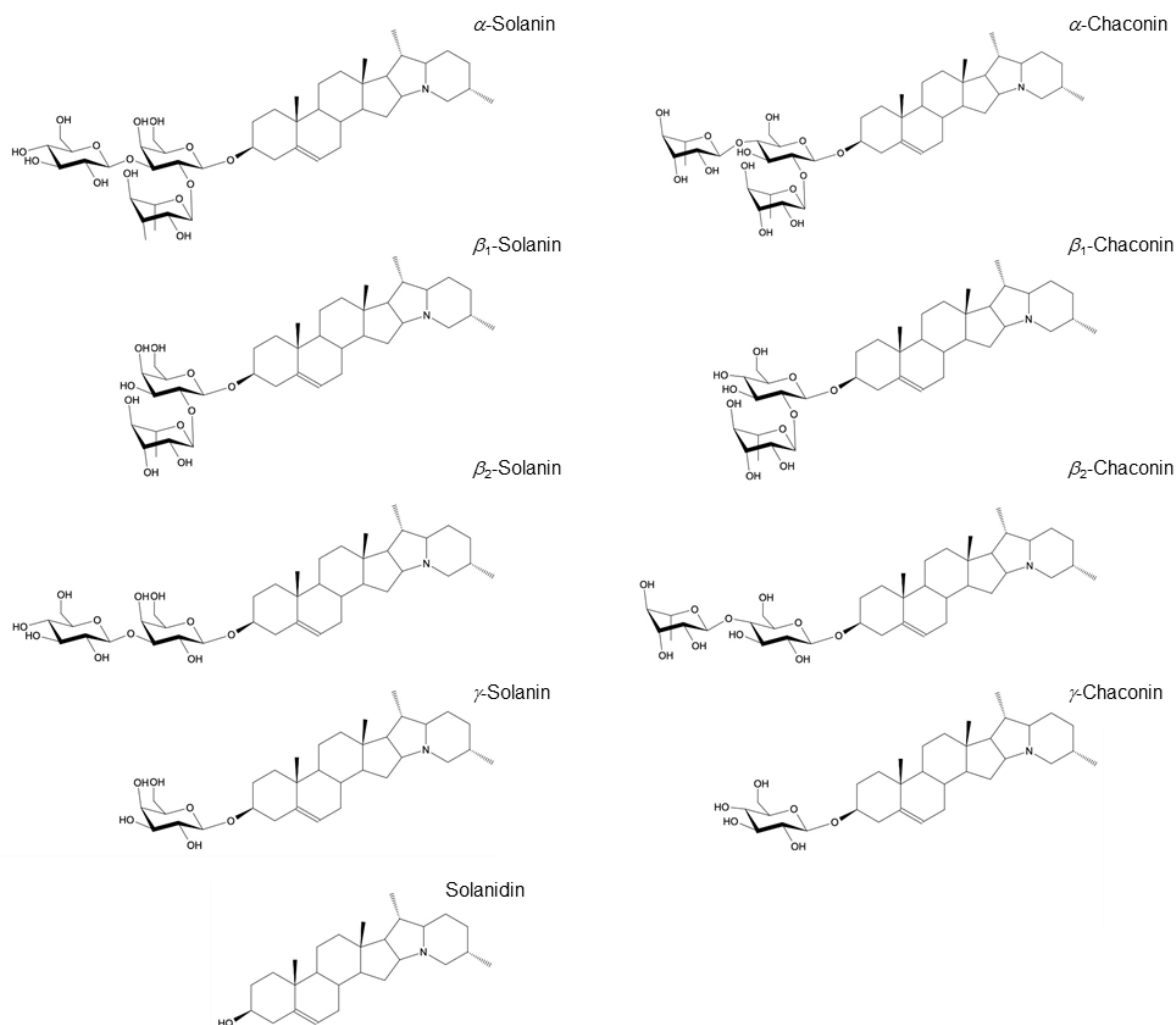


Abbildung 1: Glykoalkaloide der Kartoffel (Abbildung nach Jensen et al.2009).

Kartoffeln können grundsätzlich mit Schale verzehrt werden. Jedoch sollte aufgrund des Glykoalkaloidgehalts auf die Verwendung von frischen, unverletzten Kartoffeln ohne grüne Stellen und Sprossknospen geachtet werden (BfR 2018).

Glykoalkaloide zeichnen sich durch eine hohe Hitzebeständigkeit aus (Bushway & Ponnampalam 1981). Dennoch kommt es trotz verbreitetem Verzehr nur in seltenen Fällen zu Vergiftungen. Basierend auf Humandaten aus Fallberichten, Studien an Freiwilligen und einem *Margin of Exposure* Ansatz wurde vom EFSA-Panel für Kontaminanten in der

Lebensmittelkette (CONTAM) ein LOAEL von 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag an Gesamtglykoalkaloiden festgelegt (EFSA 2020). Leichte Vergiftungen bei Überschreitung können sich in Übelkeit, Bauchschmerzen, Erbrechen, Durchfall oder Fieber äußern. Bei schweren Vergiftungen können zusätzlich Störungen des Bewusstseins, der Hirnfunktion, der Atmung oder des Kreislaufs auftreten (BfR 2018). Die Anfälligkeit scheint dabei recht individuell zu sein (Mensinga et al. 2005).

Auf molekularer Ebene können Glykoalkaloide zur Zerstörung der Zellmembran führen, da sie stabile Komplexe mit Cholesterol bilden (Roddick 1979). Als Folge kann es zur Hämolyse kommen (Keukens et al. 1996; Glynn et al. 2017), welche beispielsweise ein Grund für die Zytotoxizität gegen die gastrointestinal Mucosa in Mäusen ist (Iablokov et al. 2010). Dies könnte eine Erklärung für die auftretenden Störungen des Magen-Darmtrakts nach Vergiftung sein (EFSA 2020). Zusätzlich ist die Inhibierung der Acetylcholinesterase-Aktivität als auch der Butyrylcholinesterase bekannt, wobei in frühen Studien kein Unterschied zwischen den beiden Enzymklassen gemacht wurde (Bushway et al. 1987; McGehee et al. 2000). Der Überschuss an Acetylcholin an neuronalen und neuromuskulären Verknüpfungen könnte neuronal bedingte Symptome erklären (EFSA 2020).

Der Stellungnahme des BfR aus dem Jahr 2018 ist zu entnehmen, dass es im Zeitraum zwischen 1990 und 2018 in Deutschland nur einen gemeldeten Fall einer eventuellen Vergiftung durch Glykoalkaloiden gab. Hier klagte eine Patientin nach dem Verzehr von Kartoffelbrei aus „grünen“ Kartoffeln über krampfartige Bauchschmerzen, welche aber bereits innerhalb eines Tages rückläufig waren. Trotz weniger gemeldeter Fälle könnte die Dunkelzahl, aufgrund ähnlicher Symptome zu einer Lebensmittelintoxikation, hoch sein (BfR 2018).

1.2 Kartoffelverarbeitung und deren Nebenströme

Die Stärkeherstellung aus Kartoffeln ist einer der wichtigsten Verwendungszwecke der Kartoffelknolle. 2021/22 wurden in Deutschland aus 17,8% der geernteten Kartoffeln Kartoffelstärke produziert. Dabei überschreitet die Produktion die deutsche Selbstversorgung, weshalb circa zwei Drittel der in Deutschland hergestellten Kartoffelstärke exportiert wurde (BLE 2023). Stärke wird während der Photosynthese aufgebaut und kann anschließend entweder als transitorische Stärke in der folgenden Nacht wieder abgebaut werden, um den Stoffwechsel und die Biosynthese in Abwesenheit der Photosynthese aufrechtzuerhalten, oder sie kann als Speicherstärke in nicht photosynthetisch aktiven Geweben wie Samen, Stängeln, Wurzeln oder Knollen gelagert werden. Die Remobilisierung der Speicherstärke findet bei der Keimung, dem Austrieb oder beim Nachwachsen der Pflanzen statt (Pfister & Zeeman 2016). Der Stärkegehalt der Kartoffeln wird durch verschiedene Faktoren wie vom Standort, der

Kartoffelsorte, dem Erntejahr und Düngemitteln beeinflusst (Šimková et al. 2013; Leonel et al. 2017). Für die Produktion von Kartoffelstärke werden die Kartoffeln mit hohem Stärkegehalt zunächst gewaschen und zermahlen. Durch diesen Schritt wird die innerhalb der Zellen in Granula vorliegende Stärke freigesetzt. Anschließend unterscheiden sich verschiedene Verfahren in der Reihenfolge der Abtrennung des Kartoffelfruchtwasser, der Kartoffelfasern (Kartoffelpülpe) und der Kartoffelstärke, wobei nach allen Verfahren diese drei Fraktionen getrennt voneinander vorliegen. Die Trennung erfolgt durch Zentrifugation, Pressen oder Sieben. Als Nebenströme der Kartoffelstärkeproduktion fallen in großen Mengen Kartoffelpülpe und Kartoffelfruchtwasser an. Die erhaltene Stärkemilch wird weiter aufkonzentriert und anschließend getrocknet. Die produzierte Kartoffelstärke zeichnet sich durch die Bildung von klaren Gelen mit neutralem Geschmack aus und kann für verschiedene Anwendungen in der Lebensmittel-, Textil- oder Papierindustrie eingesetzt werden (Grommers & van der Kogt 2009). Die Verkleisterungs- und Klebeeigenschaften sowie die Viskosität und die Gelbindung von Stärke sind wichtige funktionelle Eigenschaften für den Einsatz in Lebensmitteln. Diese können durch verschiedene physikalische, chemische oder enzymatische Modifizierungen auf die Anwendungen angepasst werden (Wiesenborn et al. 1994; Chorfa et al. 2022; Abbas et al. 2010).

Neben dem Einsatz der Kartoffel zur Stärkeproduktion wird sie in der Lebensmittelindustrie zu verschiedenen Produkten weiterverarbeitet. Bei der Herstellung von Kartoffelerzeugnissen werden oft geschälte Kartoffeln verwendet. Zur Entfernung der Kartoffelschalen von der Kartoffelknolle gibt es verschiedene Verfahren. Das Schälen durch Abrieb wird vor allem von Herstellern von Kartoffelchips verwendet, während Produzenten von Tiefkühlprodukten eher eine Dampfschälmethode einsetzen (Camire et al. 1997). Zusätzlich gibt es noch ein Verfahren zum Schälen unter Verwendung von Lauge, bei welchem jedoch ein Neutralisationsschritt erforderlich ist und große Mengen an Salz anfallen (Schieber & Saldaña 2009).

1.2.1 Kartoffelpülpe

Im Wirtschaftsjahr 2020/2021 fielen in Deutschland 425.000 t Kartoffelpülpe aus der Stärkeindustrie an (BMEL 2023). Kartoffelpülpe besteht zum Großteil aus Wasser. In der Trockenmasse machen der Stärke- und Ballaststoffgehalt die größten Anteile aus. Tabelle 1 fasst die Zusammensetzung von Kartoffelpülpe aus verschiedenen Literaturangaben zusammen.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Kartoffelpülpe. Angaben aus verschiedenen Literaturquellen. 1: Turquois et al. 1999; 2: Patelski et al. 2020; 3: Gao et al. 2012; 4: Schügerl & Rosen 1997; 5: Nebesny 1995; 6: Kryvoruchko et al. 2009; 7: Wang et al. 2010; 8: Saito et al. 2006; 9: Okine et al. 2005; 10: Klingspohn et al. 1993. Angabe der Feuchte in [%], alle weiteren Angaben in [g/100 g TM], n.a.: nicht angegeben.

Quelle	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Feuchte	n.a.	68,8 ± 0,3	n.a.	87	79,9	88,1	87-90	80,7 ± 0,8	83
Rohasche	13,3	5,7 ± 0,1	2,1	4	1,8	7,2	4-5	2,6 ± 0,1	n.a.
Rohfett	0,9	n.a.	0,3	n.a.	n.a.	0,6	3-4	0,4 ± 0,3	n.a.
Rohprotein	8,2	4,5 ± 0,1	4,1	4	6,9	8,3	3-5	4,5 ± 0,4	4,9
Stärke	n.a.	42 ± 1	35,3	37	35,7	n.a.	<5	38,9 ± 8,5	20,6
Ballaststoffe	n.a.	n.a.	50,7	55	55,4	22,2	40-50	48,6 ± 10,9	35,3
Cellulose	n.a.	n.a.	21,6	17	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Hemicellulose	n.a.	n.a.	<0,5	14	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Pektin	n.a.	n.a.	28,6	17	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	21,3
Lignin	n.a.	n.a.	1,7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Trotz des hohen Wassergehalts verhält sich Kartoffelpülpe eher wie ein Kolloid als eine Flüssigkeit (Mayer 1998). Grund hierfür ist vor allem die hohe Wasserbindekapazität von Kartoffelpülpe, welche unter anderem durch das enthaltene Pektin verursacht wird (Ramasamy et al. 2014). Aufgrund des hohen Wassergehalts ist im unverarbeiteten Zustand der Pülpe ein schneller mikrobieller Verderb möglich. Durch die Mikroorganismen kann es zur Bildung organischer Säuren kommen, welche sich teilweise negativ auf den Geruch auswirken können (Kempf 1980; Mayer & Hillebrandt 1997). Eine hohe Wasserbindekapazität beschränkt zusätzlich die Verwendung als alleiniges Futtermittel, da aufgrund des an die Matrix gebundenen Wassers die Darmkapazitätsgrenze schneller erreicht wird. Dies wirkt sich negativ auf die weitere Futteraufnahme aus (Ndou et al. 2013). Zusätzlich ist der Proteingehalt mit 3-8% in der Trockenmasse deutlich geringer als der Proteingehalt anderer Futtermittel wie beispielsweise von Sojamehl mit etwa 43% (Dei 2011).

Die Zufütterung von Kartoffelpülpe wird jedoch schon lange betrieben (Friend et al. 1963). Sie ist immer noch die Hauptanwendung der Kartoffelpülpe. Dabei wird die Pülpe meist als Futtermittel in Gegenden nahe den Stärkefabriken verwendet. Zur Verbesserung der Haltbarkeit kann die Kartoffelpülpe getrocknet werden, jedoch ist dieser Prozess aufgrund der

hohen Wasserbindekapazität sehr energieaufwändig (Wang et al. 2010). Es wurden verschiedene Methoden zur Verbesserung der Haltbarkeit getestet.

Ein Ansatz ist die Herabsetzung der Wasserbindekapazität zur Verkürzung der Trocknungszeit. Dies wurde mittels Fermentation von Kartoffelpülpe mit *Lactiplantibacillus plantarum* (vormals *Lactobacillus plantarum*) unter Zusatz von Enzymen zum Abbau der Zellwandpolysaccharide der Kartoffelpülpe erfolgreich gezeigt (Du et al. 2018). Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Haltbarkeit ist die Silierung. Durch die Fermentation von Kartoffelpülpe mit *Rhizopus oryzae* oder *Amylomyces rouxii* wurde im Labormaßstab unter anaeroben Bedingungen Milchsäure produziert und der pH-Wert gesenkt (Oda et al. 2002a; Saito et al. 2007). Die Silierung wurde auch durch die Kultivierung von *Lactococcus lactis* und *Lactococcus diolivorans* auf Kartoffelpülpe erreicht, wobei der Proteingehalt sowie die Milchsäurekonzentration durch Fermentation deutlich anstiegen (Dagaerbieke et al. 2019). Ein weiterer Ansatz ist die Fermentation von Kartoffelpülpe zur Erhöhung des Proteingehalts und zur Produktion von *single cell protein* (SCP) für Futtermittel. Es wurde die Fermentation mit verschiedenen Organismen getestet wie beispielsweise mit *Chaetomium cellulolyticum* (Schügerl & Rosen 1997) oder der Kombination mehrerer Bakterien (Liu et al. 2013). Zusätzlich wurde zuvor sauer oder enzymatisch hydrolysierte Kartoffelpülpe mit *Candida guilliermondii* und *Scheffersomyces stipitis* (vormals *Pichia stipitis*) zur Herstellung von SCP fermentiert (Patelski et al. 2020). Kartoffelpülpe kann als Tierfutter verwendet werden, jedoch ist diese Anwendung aufgrund der anfallenden Menge des Reststroms unzureichend und es wird nach weiteren Verwendungsmöglichkeiten gesucht (Mayer & Hillebrandt 1997).

Kartoffelpülpe kann in Biogasanlagen eingesetzt werden. Bei der Betrachtung der Ökobilanz wurde die Verwendung von 100% Gülle besser bewertet als die Verwendung von 100% Kartoffelpülpe. Der alleinige Einsatz von Kartoffelpülpe war jedoch vorteilhaft gegenüber einer Mischung (Yasar et al. 2017). Piekutin et al. fanden, dass eine Kombination aus Silage, Gülle, Apfeltrester und Kartoffelpülpe zu einer höheren Biogasmenge führt als eine Kombination verschiedener Tierabfälle oder Abfälle aus Kläranlagen. Dabei war jedoch bei der Verwendung von Kartoffelpülpe und Gülle eine gewisse Verweilzeit zu beobachten, bevor größere Mengen Biogas produziert wurden (Piekutin et al. 2021). Wiater und Horysz hingegen kamen zu dem Ergebnis, dass die Zugabe von größeren Mengen Kartoffelpülpe bei der Substitution von Maissilage problematisch war, da die produzierte Biogasmenge deutlich reduziert wurde (Wiater & Horysz 2017). Es wurde ebenfalls evaluiert, ob Kartoffelpülpe als guter Brennstoff in Form von Brennstoffpellets dienen könnte, wobei eine energetische Bewertung sowie eine Untersuchung der Pelletierung vorgenommen wurde. Insgesamt wurde Kartoffelpülpe als attraktives Ausgangsmaterial für Brennstoffpellets eingeschätzt, welche in der Energiewirtschaft genutzt werden könnten (Obidziński 2012).

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Kartoffelpülpe ist diese für die Produktion von Ethanol ungeeignet (Klingspohn et al. 1993). Durch eine Vorbehandlung der Kartoffelpülpe zum Abbau der Zellwandpolysaccharide wird die Ethanolproduktion möglich. Getestet wurde die Fermentation nach enzymatischer Behandlung der Pülpe mit *Talaromyces cellulolyticus* (vormals *Acremonium cellulolyticus*) und die anschließende Produktion von Ethanol (Gao et al. 2012). Wegen der hohen Kosten für die Vorbehandlung von lignocellulosehaltigen Restströmen ist die Produktion von Bioethanol aus diesen Substraten insgesamt noch nicht wirtschaftlich (Schmitz et al. 2009).

Neben der ganzheitlichen Nutzung der Kartoffelpülpe können auch einzelne Bestandteile der Pülpe isoliert und genutzt werden. Durch saure Hydrolyse kann weitgehend stärkefreies Pektin hergestellt werden, welches in unterschiedlichen Industriebereichen Anwendung finden könnte (Abousteit & Kempf 1974). Durch verschiedene saure Aufschlussverfahren konnten die Struktur und die emulgierenden Eigenschaften des Pektins verändert werden (Yang et al. 2018). Zusätzlich zur sauren Hydrolyse wurden auch alkalische und enzymatische Extraktionsmethoden getestet (Khodaei & Karboune 2013).

Kartoffelpülpe wurde in unterschiedliche Lebensmittel eingebracht. Eine Anwendung war die Verwendung der Pülpe in glutenfreiem Brot. Dabei zeichnete sich vor allem die Probe mit einem Anteil von 7,5% gefriergetrockneter Pülpe durch eine gute chemische Zusammensetzung und ansprechende sensorische sowie physikalische Eigenschaften aus (Gumul et al. 2020). Es wurde zusätzlich die Zugabe von 5% Pülpe zu Sauerteig für die Brotherstellung getestet (Litwinek et al. 2023). In diesen beiden Studien wurde jedoch Pülpe von roten Kartoffeln eingesetzt. Es wurde auch der Ersatz von Mehl durch getrocknete Kartoffelpülpe zur Herstellung von Mürbeteigplätzchen untersucht. Dabei wurde eine zunehmende Härte ab einem Ersatz von 40% des Mehls festgestellt, wobei dieses Produkt noch von den Konsumenten akzeptiert wurde (Boruczkowska et al. 2020). Aufgrund der enthaltenen Glykoalkaloide in der Kartoffelpülpe ist die Verwendung für Lebensmittel jedoch eingeschränkt und sollte überprüft werden (Kot et al. 2020).

1.2.2 Kartoffelschale

In Deutschland lag der Pro-Kopf-Verbrauch an Kartoffelerzeugnissen 2021/2022 bei 35,8 kg und stieg damit im Vergleich zu den beiden Vorjahren an (BLE 2023). Die Steigerung des Verzehrs von Kartoffelerzeugnissen geht auch mit einem Anstieg an industriell anfallenden Kartoffelschalen einher. Die Zusammensetzung von Kartoffelschalen ist in Tabelle 2 aufgeführt, wobei verschiedene Literaturwerte gegenübergestellt werden. Wie bei der Kartoffelpülpe machen die größten Anteile in der Trockenmasse die Ballaststoffe und die Stärke aus. Im Vergleich zur Kartoffelpülpe ist jedoch der Proteingehalt der Kartoffelschale etwas höher als in der Kartoffelpülpe (Tabelle 1, Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung von Kartoffelschale. Angaben aus verschiedenen Literaturquellen. Angegebene Schälmethode D: Dampfverfahren, A: Abriebverfahren; 1: Atitallah et al. 2019; 2: Arapoglou et al. 2010; 3: Scholten et al. 2001; 4: Nicholson et al. 1988; 5: Camire et al. 1997; 6: Kryvoruchko et al. 2009; 7: Camire & Flint 1991; 8: Mahmood et al. 1998. Angabe der Feuchte in [%], alle weiteren Angaben in [g/100 g TM], n.a.: nicht angegeben.

Quelle	1	2	3 ^D	4 ^D	5 ^A	5 ^D	6	7	8
Feuchte	n.a.	85	86	83-85	n.a.	n.a.	84	n.a.	82
Rohasche	n.a.	6,3	5,3	4-8	7,7	6,0	8,2	2,5	7,6
Rohfett	n.a.	2,6	1,0	n.a.	0,6	1,1	1,3	0,6	n.a.
Rohprotein	n.a.	8	12,9	12-17	16,7	18,6	16,4	10,5	14,7
Stärke	29,9 ± 0,1	52,1	60,4	n.a.	51,0	28,0	n.a.	n.a.	66,8
Ballaststoffe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	26,6 ± 0,1	56,5 ± 2,2	7,0	n.a.	n.a.
Cellulose	30,5 ± 0,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,2
Hemi-cellulose	2,0 ± 0,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Pektin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,4
Lignin	3,9 ± 0,1	n.a.	n.a.	n.a.	5,8 ± 0,2	19,5 ± 0,2	n.a.	13,0 ± 1,0	n.a.

Die Zusammensetzung der Kartoffelschalen unterscheidet sich je nach Schälmethode. Bei der Entfernung der Schalen mittels Dampfverfahren ist der Ballaststoffanteil höher und der Stärkeanteil geringer als bei der Verwendung des Abriebverfahrens (Camire et al. 1997). Kartoffelschalen und -extrakte enthalten zusätzlich Polyphenole sowie Glykoalkaloide und Flavonoide und zeigen hohe antioxidative Aktivität (Kähkönen et al. 1999; Kryvoruchko et al. 2009; Mäder et al. 2009). Der Phenolgehalt beträgt zwischen 1,02-2,92% und der Flavonoidgehalt zwischen 0,51-0,96% (Kryvoruchko et al. 2009).

Kartoffelschalen werden als Futtermittel verwendet. Dabei konnten bis zu 30% Trockensubstanz (TS) der Ernährung von Mastschweinen durch Kartoffelschalen ersetzt werden, ohne dass es zu nachteiligen Auswirkungen kam. Jedoch wurde Methionin zu den Kartoffelschalen ergänzt, da diese die erste limitierende Aminosäure war (Lunen et al. 1989). In einer anderen Studie führte die Zugabe von 25% zu einer Verringerung der Lebendgewichtszunahme und einer Erhöhung der Trockensubstanz-Futterumwandlungsrate (Edwards et al. 1986). Neben der Verfütterung an Mastschweine wurde auch die Verwendung

von Kartoffelschalen als Futter für Mastrinder untersucht. 10% Zugabe zum Futter hatten nur geringe Auswirkungen auf die Futteraufnahme, die Fettdicke und die Zartheit des Fleisches. Aufgrund der geringen Kosten für Kartoffelschalen sind sie ein attraktives Futtermittel (Radunz et al. 2003).

Kartoffelschalen können auch als Substrate in Biogasanlagen eingesetzt werden. Zur Produktion von Biogas wurde die Kombination aus Kuhmist und Kartoffelschalen in verschiedenen Mischungsverhältnissen untersucht. Dabei war der Biogasertrag mit steigendem Anteil an Kartoffelschalen erhöht (Sanaei-Moghadam et al. 2014). Der Methanertrag lag bei der Co-Vergärung höher als bei der Vergärung von reinen Kartoffelschalen. Zusätzlich wirkten sich eine vorherige Zerkleinerung oder eine saure Hydrolyse positiv auf den Biogasertrag aus (Achinas et al. 2019). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der Biogasertrag durch die Verwendung der Rückstände nach Milchsäuregärung von Kartoffelschalen im Vergleich zur Verwendung reiner Kartoffelschalen gesteigert werden kann (Liang & McDonald 2015).

In vielen verschiedenen Studien wurde der Einsatz von Kartoffelschalen zur Produktion von Bioethanol getestet, wobei an der Optimierung der Produktionsparameter wie Temperatur, pH-Wert, Feststoffanteil oder der Inkubationsdauer gearbeitet wurde (Chohan et al. 2020; Sujeeta et al. 2018). Ebenso wie bei der Kartoffelpülpe ist aufgrund der chemischen Zusammensetzung eine Vorbehandlung notwendig, wobei unterschiedliche enzymatische und chemische Methoden getestet wurden (Arapoglou et al. 2010; Taher et al. 2017). Als Alternative zur Zugabe von Enzymen zur Vorbehandlung der Kartoffelschalen, wurden diese mit *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentiert (Chintagunta et al. 2016).

Neben der Produktion von Bioethanol wurde auch die Produktion von Butanol durch Fermentation getestet, wobei verschiedene Clostridien-Stämme sowie verschiedene Methoden zur Vorbehandlung verwendet wurden (Hijosa-Valsero et al. 2018; Abedini et al. 2020). Die Produktion von Wasserstoffgas wurde als weitere Anwendungsmöglichkeit der Kartoffelschalen geprüft. Kartoffelschalen wurden als gutes Ausgangsmaterial bewertet (Mars et al. 2010; Panagiotopoulos et al. 2015). Auch in Bezug auf die Ökobilanz sind Kartoffelschalen ein attraktiver Rohstoff für die Wasserstoffproduktion (Ferreira et al. 2011).

Eine weitere Anwendung von Kartoffelschalen könnte die Adsorption von Farbstoffen als Dekontaminierungstechnologie gegen Wasserverschmutzung sein. Kartoffelschalen wurden in unterschiedlichen Studien auf ihr Potential zur Adsorption verschiedener Farbstoffe getestet, wobei die Kartoffelschalen teils zunächst chemisch modifiziert wurden (Anastopoulos & Kyzas 2014).

Kartoffelschalen können ebenfalls als Substrat für die Produktion verschiedener Enzyme mittels *solid-state* Fermentation genutzt werden. Durch die Kultivierung von *Aspergillus niger* auf Kartoffelschalen wurde α -Amylase gewonnen (Mukherjee et al. 2019). Zusätzlich konnte

gezeigt werden, dass mehr α -Amylase durch Fermentation von Kartoffelschalen mit *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* als auf Weizenkleie produziert wurde (Shukla & Kar 2006). Durch die Co-Fermentation mit *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* konnten Cellulasen produziert (Taher et al. 2017) und durch die Fermentation mit *Pleurotus ostreatus* auf Kartoffelschalen ligninolytische Enzyme gewonnen werden (Ergun & Urek 2017).

Kartoffelschalen wurden als Zugabe zu Backwaren getestet. Dabei wurden 25% des Mehls bei der Herstellung von Muffins durch extrudierte und nicht extrudierte Kartoffelschalen ersetzt, sowie 10% und 15% der Rezeptur von Haferflockenkeksen. Die Zugabe führte zur Erhöhung des Ballaststoffgehalts und zur Verlängerung der Haltbarkeit (Arora & Camire 1994). Eine längere Haltbarkeit wurde auch durch die Zugabe von aus Kartoffelschalen isolierten Ballaststoffen erreicht (Curti et al. 2016). Zusätzlich konnten durch Zugabe von 5% Kartoffelschale der Proteingehalt und der Ballaststoffgehalt von Kuchenteig erhöht werden, wobei ein insgesamt sensorisch ansprechendes Produkt hergestellt wurde (Jeddou et al. 2017).

1.3 Basidiomyceten

Aufgrund von molekularbiologischen Analysen und der Orientierung an Fossilien wird davon ausgegangen, dass das Reich der Pilze vermutlich vor 760-1.060 Millionen Jahren entstand (Watkinson et al. 2015). Ein wichtiges Fossil ist dabei ca. 400 Millionen Jahre alt und wurde 1914 gefunden. Es wurden verschiedene Pilzarten identifiziert und der Fund gibt Einblicke in die frühen Interaktionen zwischen verschiedenen Organismen (Taylor et al. 2003). Wie viele verschiedene Pilzspezies es tatsächlich gibt, kann nur geschätzt werden. Dabei schwanken die Zahlen deutlich. Wu et al. gehen aufgrund der Einbeziehung von nicht kultivierbaren Stämmen von ca. 12 Millionen Pilzspezies aus und damit von deutlich mehr Spezies als andere Einschätzungen, die zwischen 2,2 und 3,8 Millionen Spezies liegen (Wu et al. 2019a; Hawksworth & Lücking 2017). Aufgrund von phylogenetischen Analysen wurde das Reich der Pilze 2007 in 195 Taxa aufgeteilt. Ein Unterreich bilden die Dikarya, welche in der Systematik der Pilze die Abteilungen der Ascomycota und der Basidiomycota vereint (Hibbett et al. 2007). Namensgebend ist dabei die gemeinsame Eigenschaft der Pilze beider Abteilungen, in einem Teil ihres Lebenszyklus zwei Zellkerne pro Zelle zu besitzen (James et al. 2006). An zweiter Stelle nach den Ascomycota (ca. 64.000 beschriebene Arten) stehen Basidiomycota mit ca. 41.270 beschriebenen Arten (Kirk et al. 2008, He et al. 2019a). Der Großteil der verzehrten Speisepilze gehört mit etwa 92% zur Abteilung der Basidiomycota, wobei der restliche Anteil zu den Ascomycota zählt (Pérez-Moreno et al. 2021). Entsprechend der deutschen Lebensmittelbuchkommission sind Speisepilze „die essbaren Fruchtkörper von Wild- oder Kulturpilzen (Zuchtpilze), die entweder als frische Pilze oder als verarbeitete Pilzerzeugnisse

in den Verkehr gebracht werden“ (DLBK 2020). Etwa 2.190 Arten zählen zu den Speisepilzen (Li et al. 2021), wobei nur wenige kommerziell angebaut werden. Der am häufigsten angebaute Pilz ist der Zucht-Champignon (*Agaricus bisporus*), gefolgt von Shiitake (*Lentinula edodes*), Seitlingen (*Pleurotus* spp.) und dem Samtfußrübbling (*Flammulina velutipes*) (Valverde et al. 2015). Seit dem Jahr 2000 nimmt die weltweite Produktion von Pilzen stetig zu. So stieg sie von ca. 4,3 Millionen Tonnen im Jahr 1999 auf 48,3 Millionen Tonnen im Jahr 2022. Dabei werden aktuell 96% der Pilze in Asien produziert, wobei China mit 45,4 Millionen Tonnen mit großem Abstand Hauptproduzent ist (FAO 2024b).

Pilze sind eukaryotische Organismen. Sie können im Unterschied zu Pflanzen jedoch keine Photosynthese betreiben, weshalb die Energiegewinnung durch chemotrophe Prozesse erfolgt (Watkinson et al. 2015). Aus diesem Grund müssen Pilze Nährstoffe und Wasser aus ihrer direkten Umgebung aufnehmen, weshalb Sie sich durch eine große Enzymvielfalt auszeichnen. Aufgrund dieser Vielfalt haben Pilze ein hohes Adaptionsvermögen an schwer erschließbare und wechselnde Nahrungsquellen (Arntzen et al. 2020). Zur Nährstoffaufnahme dienen fadenförmige Hyphen, welche in ihrer Gesamtheit das Myzel bilden. Ascomyceten und Basidiomyceten sind zusätzlich in der Lage, sporenbildende Fruchtkörper auszubilden (Meyer et al. 2020).

Pilze haben einen Wassergehalt von etwa 80-90% und den größten Anteil der Trockenmasse machen Kohlenhydrate mit 35-70% aus (Reis et al. 2012). Der Rohproteingehalt variiert zwischen verschiedenen Pilzspezies zwischen 5-35% bezogen auf die Trockenmasse. Ebenso der Fettgehalt, der zwischen 0,2-8% der Trockenmasse ausmacht (Cheung 2010; Reis et al. 2012). In Pilzen kommen vor allem mehrfach ungesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren vor, wobei im allgemeinen Ölsäure, Linolsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure dominieren (Ribeiro et al. 2009). Pilze zeichnen sich durch eine hohe Proteinqualität aus. So können biologische Wertigkeiten von über 85 erreicht werden (Manzi et al. 1999; Ahlborn et al. 2019; Bickel Haase et al. 2024). Die Fruchtkörper kultivierter Pilze wie z. B. *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* oder *Pleurotus ostreatus* enthalten zusätzlich Vitamin B₂, Niacin sowie Folsäure und eignen sie sich als Quelle für Mineralstoffe wie Kalium, Zink oder Phosphor (Mattila et al. 2001). Charakteristisch für Pilze ist das in der Zellmembran enthaltene Ergosterol. Dieses hat die gleiche Funktion wie Cholesterol in tierischen Zellen und dient der Membranfluidität und -permeabilität (Watkinson et al. 2015). Aufgrund des pilzspezifischen Vorkommens kann Ergosterol als Biomarker zum Nachweis pilzlicher Biomasse dienen (Bickel Haase et al. 2024). Durch die Bestrahlung von Pilzmyzel mit UV-B Licht kann die Produktion von Vitamin D₂ aus Ergosterol angeregt werden (Ahlborn et al. 2018).

Die pilzliche Zellwand besteht hauptsächlich aus Chitin, Glykoproteinen und Glucanen (Watkinson et al. 2015). Vor allem β -Glucanen werden positive medizinische Wirkungen

zugesprochen, welche wahrscheinlich auf einer Aktivierung des Immunsystems beruhen. Wegen ihrer strukturellen Unterschiede können verschiedene β -Glucane unterschiedliche Wirtsreaktionen hervorrufen (Chen & Seviour 2007).

Aufgrund ihrer nutritiven Eigenschaften und der Produktion vieler pharmakologisch wirksamen Substanzen sowie interessanter Aromastoffe und Enzyme ist die Produktion von Pilzen von hohem Interesse (Devi et al. 2020; Sommer et al. 2021; Serrano et al. 2020). Die Produktion von Fruchtkörpern erfolgt traditionell auf einem festen Substrat als Festphasenfermentation. Die Vorteile liegen in der einfachen Handhabung der Medien und einem niedrigen Energieverbrauch. Als Alternative kann submers in Bioreaktoren kultiviert werden. Vorteile sind hier die gute Kontrolle der Wachstumsbedingungen, ein geringerer Platzverbrauch und eine kürzere Kultivierungsdauer. Für die Kultivierung von Pilzen ist die Nutzung von Nebenströmen ökonomisch interessant, da sie günstiger sind als synthetische Medien und zusätzlich eine teils kostspielige und aufwendige Entsorgung der Nebenströme entfällt (Fazenda et al. 2008). Es wurden verschiedenste Nebenströme erfolgreich submers fermentiert. So konnten bereits beispielsweise Apfeltrester (Ahlborn et al. 2019), Kakaofruchtschalen (Bickel Haase et al. 2024), schwarzer Johannisbeertrester (Sommer et al. 2023) oder Kakaopulpe (Klis et al. 2023) als Fermentationsmedium eingesetzt und die Fermentate teils in Lebensmittelapplikationen getestet werden.

Ein bereits seit 1980 produziertes Myzelprodukt des Ascomyceten *Fusarium venenatum* wird unter dem Handelsnamen Quorn vermarktet. Aufgrund seines Proteingehaltes von circa 11,5% und der faserigen Struktur finden Produkte aus Quorn häufig Anwendung als Fleischersatzprodukte (Denny et al. 2008).

1.4 Geschmackswahrnehmung und -verstärkung

Die Sinneswahrnehmung von Lebensmitteln ist ein komplexes Zusammenspiel der Geruchs-, Geschmacks- und Somatosensorik. Der Begriff „Flavour“ umfasst die Gesamtheit der Sinneseindrücke, die olfaktorisch und gustatorisch sowie haptisch mit Zunge, Mundhöhle und Rachen wahrgenommen werden. „Aroma“ ist das Zusammenspiel von Geruchs- und Geschmacksstoffen die von Nase und Zunge detektiert werden. Geschmacksstoffe sind meist nicht flüchtige Verbindungen, während Geruchsstoffe stets flüchtig sind (Reineccius 2005).

Der menschliche Geschmack wird in die fünf Qualitäten süß, bitter, salzig, sauer und umami eingeteilt. Dabei lösen im Allgemeinen süße, umami und salzarme Geschmäcke ein Akzeptanzverhalten aus, während bittere, saure oder salzreiche Geschmäcke zur Vermeidung führen (Scott 2005). Für die Wahrnehmung des Geschmacks sauer sind Ionenkanäle verantwortlich, welche in spezialisierten Zellen exprimiert werden. Für die Erkennung von

sauer sind dabei weniger die extrazellulären Protonen von Bedeutung, sondern mehr eine intrazelluläre Ansäuerung (Lyall et al. 2001). Welche Rezeptoren für die Erkennung von sauer zuständig sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden unter anderem die Ionenkanäle PKD1L3 und PKD2L1 vorgeschlagen (Huang et al. 2006; Ishimaru et al. 2006), jedoch zeigte eine andere Studie, dass PKD2L1 nur teilweise an der Detektion von sauer beteiligt ist und andere Rezeptoren als PKDs notwendig sind (Horio et al. 2011). Ein weiterer protonenselektiver Ionenkanal, welcher in Geschmacksrezeptorzellen exprimiert wird, ist Otop1. Auch dieser scheint in Mäusen eine Rolle bei der Erkennung von Säuren im Geschmackssystem zu spielen (Teng et al. 2019). Ionenkanäle vermitteln ebenfalls die Erkennung von salzig. Durch *knock out* Versuche der α -Untereinheit des epidermalen Natriumkanals ENaC wurde dessen Notwendigkeit für die Salzwahrnehmung in Mäusen gezeigt (Chandrashekar et al. 2010). Amilorid, ein Diuretika, vermindert die Salzwahrnehmung (Heck et al. 1984), was durch die Bindung von Amilorid an α -Untereinheit von ENaC begründet wird (Kelly et al. 2003). Es gibt zusätzlich eine Amilorid insensitive NaCl Reaktion, bei welcher Cl⁻ eine bedeutendere Rolle als Na⁺ zu spielen scheint (Roebber et al. 2019). Die Akzeptanz von geringen und die Ablehnung von hohen Salzkonzentrationen wird durch eine zusätzliche Aktivierung von sauer und bitter wahrnehmenden Rezeptorzellen bei hohen Salzkonzentrationen erklärt (Oka et al. 2013).

Süß, bitter und umami werden über eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erkannt, wobei diese zunächst für den bitter Geschmack entdeckt wurden (Adler et al. 2000; Chandrashekar et al. 2000). Verantwortlich für die Erkennung von bitter sind die T2R Rezeptoren, welche viele chemisch diverse Substanzen erkennen können (Meyerhof et al. 2010). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, zusammengesetzt aus T1R2 und T1R3, fungieren als Süßrezeptoren und reagieren ebenfalls auf eine Vielzahl an Molekülen, beispielsweise viele Mono- und Disaccharide (Nelson et al. 2001). Der Umami-Geschmack wurde zuerst 1909 in Japanisch beschrieben, wobei schon hier L-Glutaminsäure als eine auslösende Schlüsselkomponente identifiziert wurde (Ikeda 1909). Durch die Entdeckung des Rezeptors T1R1+3, welcher auf die meisten L-Aminosäuren anspricht, konnte der Grundgeschmack umami bestätigt werden (Nelson et al. 2002).

Als zusätzlicher Geschmack wird der Fettgeschmack diskutiert. CD36 könnte ein Rezeptor für langkettige Fettsäuren sein, wie beispielsweise *knock out* Experimente bei Ratten und Mäusen zeigten (Laugerette et al. 2005). Die Stimulation dieser Geschmacksknospenzellen durch langkettige Fettsäuren in Mäusen führt zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels (Gaillard et al. 2008). 2012 wurden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR40 und GPR120 als Rezeptoren vorgeschlagen und die Expression von GPR120 in den Epithelien des Geschmacksbereichs im Menschen nachgewiesen. An diese Rezeptoren können ebenfalls langkettige Fettsäuren binden (Galindo et al. 2012). Es wurde zusätzlich gezeigt,

dass es sich bei der Geschmacksempfindung von mittel- und langkettigen nicht veresterten Fettsäuren um einen separaten Eindruck handelt, welcher sich von den anderen Grundgeschmacksrichtungen unterscheidet (Running et al. 2015). Kürzerkettige Fettsäuren ähnelten im Geschmack einem sauren Eindruck, möglicherweise bedingt durch freigesetzte Protonen, weshalb die Wahrnehmung von der Kettenlänge abhängig zu sein scheint. Die Erkennung von fettig sowie die Signalweiterleitung ist noch nicht vollständig verstanden. Als Name für den fettigen Geschmack wurde oleogustus vorgeschlagen (Running et al. 2015).

Neben dem fettigen Geschmack ist auch der Eindruck von „metallisch“ bisher noch nicht im Gesamten aufgeklärt. Eine Rolle könnte der Rezeptor TRPV1 spielen, welcher durch viele strukturell unterschiedliche Substanzen aktiviert werden kann, wie beispielsweise Eisen-, Zink- oder Kupfersalze aber auch einige künstliche Süßstoffe (Riera et al. 2007). TRPV1 ist zusätzlich als polymodaler Schmerzrezeptor bekannt und spielt bei der Weiterleitung verschiedener somatosensorischer Eindrücke eine Rolle. Er reagiert auf verschiedene als scharf wahrgenommene Substanzen wie beispielsweise Capsaicin (Szallasi & Blumberg 1999) und kann durch Hitze aktiviert werden (Caterina et al. 1997).

Zusätzlich zu Substanzen, die verschiedene Geschmackseindrücke hervorrufen, gibt es auch Moleküle, die zwar einen geringen Eigengeschmack aufweisen, jedoch Einfluss auf den gesamten Geschmackseindruck haben. Ein Beispiel sind positive allosterische Modulatoren von Süßstoffrezeptoren. Sie binden an die Rezeptoren, ohne sie selbst zu aktivieren. Jedoch wird die Affinität von Süßstoffen an die Rezeptoren erhöht und somit der Süßgeschmack insgesamt verstärkt (DuBois & Prakash 2012). Ein Beispiel für die Verstärkung des Umami-Geschmacks ist die höhere Aktivität von Glutamat bei Zugabe von Nukleotidmonophosphaten, wie beispielsweise Inosinmonophosphat (Li et al. 2002). Zusätzlich wurden die schwefelhaltigen Verbindungen S-Allyl-Cysteinsulfoxid (Alliin) und Glutathion (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) in einem Knoblauchextrakt als die Substanzen identifiziert, welche für die Erhöhung der Kontinuität, des Mundgefühls und der Vollmundigkeit bei Zugabe zu einer Umami-Lösung verantwortlich sind (Ueda et al. 1990). Diese charakteristische Eigenschaft wird als Kokumi bezeichnet. Trotz geringem Eigengeschmack in Wasser wirken die Substanzen geschmacksverstärkend bei Zugabe zu verschiedenen Nahrungsmitteln (Ueda et al. 1997). Es wurde gezeigt, dass wahrscheinlich extrazelluläre Calcium-Rezeptoren (CaSR) bei der geschmacksverstärkenden Wirkung von Kokumi-Substanzen eine Rolle spielen (Ohsu et al. 2010). Unterschiedliche Agonisten des Rezeptors wiesen selbst keinen Geschmack auf und verstärkten süße, salzige und umami Geschmackseindrücke (Ohsu et al. 2010). Geschmackszellen, in denen CaSR exprimiert wurden, waren keine T1R3-exprimierenden Umami- oder Süßgeschmacksrezeptorzellen (Maruyama et al. 2012). Für manche Produkte der Maillard Reaktion ist ebenfalls eine geschmacks- und kokumiverstärkende Wirkung bekannt (Ogasawara et al. 2006). So beispielsweise auch für Maillard-Produkte von Peptiden

aus Erdnussproteinhydrolysaten. Sie wiesen höhere Umami-Intensitäten und/oder umami-verstärkende Eigenschaften auf als die Peptide selbst (Zhang et al. 2019). Zusätzlich konnte durch die Glykierung von Kollagen-Peptiden durch Glucosamin eine salzgeschmacksverstärkende Wirkung gezeigt werden (Yu et al. 2022). Salzgeschmacksverstärkende Eigenschaften wurden für verschiedene Peptide aus unterschiedlichen Nahrungsmitteln nachgewiesen. So wurden Arginyldipeptide sowie L-Arginin in fermentierter Fischsauce gefunden (Schindler et al. 2011) und weitere salzverstärkende Peptide aus hydrolysiertem Hühner-Protein (Chen et al. 2020) oder fermentierten Sojabohnenquark identifiziert (Chen et al. 2021).

Viele der beschriebenen geschmacksverstärkenden Substanzen wurden in hydrolysierten Proben gefunden (Zhang et al. 2019; Schindler et al. 2011; Chen et al. 2020). Durch den Einsatz von Peptidasen kann das sensorische Profil nicht nur durch geschmacksverstärkende Substanzen, sondern auch durch eine Erhöhung der Konzentration an freiem Glutamat verbessert werden (Imm & Lee 1999). Neben dem Einfluss auf den Geschmack können auch techno-funktionale Eigenschaften von Produkten verbessert werden. Durch enzymatische Hydrolyse von Kichererbsenprotein wurden die Emulsionskapazität und -stabilität in Abhängigkeit des Hydrolysegrads verändert und eine Verbesserung der techno-funktionellen Eigenschaften erzielt. Dies eröffnet neue Einsatzmöglichkeiten des Proteinhydrolysats (Ghribi et al. 2015). Grundsätzlich können Proteinhydrolysate die Bildung von Emulsionen oder die Schaumeigenschaften verändern, indem sie Koaleszenz oder Ausflockung verhindern. Sie können die Viskosität erhöhen und Gelbildungseigenschaften beeinflussen. Aufgrund der Mischung aus verschiedenen Peptiden und Proteinen sind bisher nur einige der verantwortlichen Peptide und Proteine aufgeklärt, die für die Änderung der Eigenschaften verantwortlich sind (Lacou et al. 2016). Proteasen finden in der Biotechnologie zahlreiche Anwendungen zur Hydrolyse. So werden sie beispielsweise eingesetzt, um die Verdaubarkeit von Produkten zu erhöhen, zur Produktion von bioaktiven Peptiden, um die technofunktionellen Eigenschaften zu verbessern, zur Zartmachung von Fleisch oder im Brauprozess (Tavano et al. 2018).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer proteinreichen und schnell wachsenden Basidiomyceten-Kultur auf Kartoffelnebenströmen. Ausgewählt wurden dafür Kartoffelschale und Kartoffeltrester, die am Fraunhofer IVV bei der Isolierung von Stäke im Labormaßstab anfielen. Mithilfe eines Screenings in Ermers- und anschließend in Submerskultur sollten geeignete Pilz-Substrat-Kombinationen identifiziert werden. Die Fermentation sollte für geeignete Kandidaten hinsichtlich der Substratkonzentration und des Erntezeitpunkts weiter optimiert werden. Als Entscheidungskriterien dienten hauptsächlich der Pilzanteil im Fermentat sowie der Proteingehalt. Zur Abschätzung des Pilzanteils sollten verschiedene Methoden verglichen werden, wie die Bestimmung anhand des Ergosterolgehalts sowie anhand des Chitingehalts. Anschließend sollten die Fermentate näher analysiert und anhand der Aminosäure- und Fettsäureverteilung charakterisiert werden. Weiterhin sollte der Glykoalkaloidgehalt anhand einer geeigneten Methode untersucht werden. Der Maßstab der Fermentation sollte außerdem von der Kultur in Schüttelkolben auf einen 7 L Fermenter (4,5 L Arbeitsvolumen) übertragen werden. Das produzierte Fermentat sollte anschließend für Applikationen in Produkten genutzt und sensorisch beurteilt werden. Zusätzlich sollten potentielle geschmacksverstärkende Eigenschaften nach Hydrolyse des Pilzmyzels untersucht werden.

Zur Steigerung der Industrierelevanz sollte ebenfalls die Übertragbarkeit der Fermentationsparameter auf die Verwendung von industriell anfallender Kartoffelpülpe überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Reinheit	Hersteller/Ort
Aceton	99,8%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Acetonitril	99,9%	VWR International, Radnor, USA
Acetylaceton		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar	Kobe I, für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>n</i> -Alkane (C ₇ -C ₃₀)		Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure	98%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumsulfamat	≥ 98%	Thermo Fisher Scientific
Ammoniumsulfat	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Azocasein		Sigma Aldrich
Borsäure	99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bortrifluorid (20% in MeOH)		VWR International
2-Butanon	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Calciumchlorid	≥ 94%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Carbazol	95%	Thermo Fisher Scientific
α -Chaconin	≥ 98%	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Celite 545		Carl Roth GmbH & Co. KG
Chitin (aus Krabbenschalen)		Carl Roth GmbH & Co. KG
Citronensäure	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Coffein	≥ 99%	Sigma Aldrich
Corolase APC		Ab Enzymes GmbH, Darmstadt, Deutschland
Corolase 7089		Ab Enzymes GmbH
Corolase 8000		Ab Enzymes GmbH
7-Dehydrocholesterol	≥ 95%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
4-Dimethylaminobenzaldehyd	≥ 99%	Sigma Aldrich

Substanz	Reinheit	Hersteller/Ort
Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ergosterol	≥ 95%	Tokyo Chemical Industry CO., Tokyo, Japan
Ethanol	≥ 99,9%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat		AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
FAME Mix (37 Komponenten)		Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	37-41%	Thermo Fisher Scientific
D-(+)-Galacturonsäure- Monohydrat	≥ 97%	Merck KGaA
Gesamtbilaststoff-Kit		Merck KGaA
D-Glucosamin Hydrochlorid	≥ 98%	Thermo Fisher Scientific
L-Glutaminsäure Kit		R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland
<i>n</i> -Hexan	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isooctan	for GC	Supelco, Merck KGaA
Isopropanol	≥ 99,9%	Honeywell International Inc.
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhexacyanidoferrat (II)- Trihydrat	≥ 99%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydrogensulfat	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	≥ 85%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Kjeldahl Katalysatortabletten Catalyst CT		Carl Roth GmbH & Co. KG
Malzextrakt, standard		Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG
3-Methyl-2-benzthiozolinon- hydrazon-hydrochlorid- Monohydrat	≥ 97%	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Haverhill, USA
Misch-Std. H-OX		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstfeldbruck, Deutschland
Mononatriumaspartat- Monohydrat	99%	Thermo Fisher Scientific

Substanz	Reinheit	Hersteller/Ort
2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
N-Acetyl-D-Glucosamin	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na-Hydrolysat Puffer A		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH
Na-Hydrolysat Puffer B		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH
NaOH Plätzchen	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumascorbat	≥ 99%	Sigma Aldrich
Natriumcarbonat Decahydrat	≥ 99%	Thermo Fisher Scientific
Natriumchlorid	≥ 99.5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdisulfid	≥ 99%	Sigma Aldrich
Natrium-L-glutamat-Monohydrat		Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumnitrit	≥ 99%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumsulfat (wasserfrei)	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natronlauge	32-33%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natronlauge 0,05 N Maßlösung		Carl Roth GmbH & Co. KG
Ninhydrin		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH
Ninhydrin-Reduktionsmittel		Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid		Fluorochem, Hadfield, UK
Petrolether	≥ 90%	Honeywell International Inc.
Phenol	99-100%	Merck KGaA
L-Phenylalanin	≥ 98%	AppliChem GmbH
Phosphorsäure	85%	Merck KGaA
Saccharose	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (rauchend)	37%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Salzsäure Maßlösung 0,1 N		Carl Roth GmbH & Co. KG
Schwefelsäure	98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Soja Schnitzel		dm-drogerie markt GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Substanz	Reinheit	Hersteller/Ort
Solanidin	≥ 99%	Extrasynthese
α-Solanin	≥ 98%	Extrasynthese
Sonnenblumenöl raffiniert		aro-Metro AG, Düsseldorf, Deutschland
Stärke-Kit		R-Biopharm AG
Tafelsalz		aro-Metro AG
Tetrahydrofuran	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiodiglycol	≥ 95%	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	≥ 99,5%	Thermo Fisher Scientific
Tris- (hydroxymethylaminomethan)	≥ 99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Tryptophan	≥ 98%	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid	30% reinst.	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG
Weizenmehl (Typ 405)		Karl Bindewald GmbH, Bischheim, Deutschland
Zinkacetat Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG

2.2 Geräte

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller/Ort
Aminosäureanalysator	S433 Kationentrennsäule: LCA K13/Na, PEEK-Säule, 4,6 x 175 mm, sphärischer Kationentauscher auf Polystyrolbasis, 7 µm Partikelgröße, 10% Quervernetzung	Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Autoklav	Tuttnauer 5075ELV	Biomedis Laborservice GmbH, Gießen, Deutschland
aw-Messgerät	LabSwift-aw	Novasina AG, Lachen, Schweiz
Bioreaktor	BioFlo 320 7 L	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Dispergierstab	S25-18G	IKA-Werke GmbH & Co. KG

Gerät	Modell	Hersteller/Ort
DO-Sonde	InPro 6000	Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
Feuchtemessgerät	MA35M-230N	Sartoris Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
GC-FID	7890A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GC-MS-O	7890B-5977B MSD	Agilent Technologies
GC-MS-O Autosampler	Multi Purpose Sampler	Gerstel GmbH & Co. KG, Mühlheim an der Ruhr, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Alpha1-4 LSC basic	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Horizontalschüttler	MaxQ 8000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	5000I	VWR International, Radnor, USA
Inkubationsschrank	IPP 260	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kjeldahl Aufschlussblock	InKjel 1225 P	Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kjeldahl Titrator	Titroline 5000	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Kjeldahl Wasserdampfdestillation	Unit S5	Behr Labor-Technik GmbH
Kugelschwingmühle	MM 400	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
LED-Mikroskop	Leica DM 2000 (Software Leica application Suite X)	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	Rotilab MH 15	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Muffelofen	L9/11	Nabertherm GmbH, Lilienthal, Deutschland
pH-Elektrode	InLab Expert Pro	Mettler Toledo AG
pH-Meter	SevenMulti	Mettler Toledo AG
Photometer	Epoch 2	BioTek Instruments, Winooski, USA

Gerät	Modell	Hersteller/Ort
Rasterelektronenmikroskop	EVO LS 10 SEM (Everhart-Thornley Detektor)	Zeiss, Jena, Germany
Reinstwasseranlage	Arium pro	Sartoris Lab Instruments GmbH & Co. KG
Rotationsverdampfer	Heating Bath B-100 Rotavapor R-100 Vacuum Pump V-100 Recirculating Chiller F-100	Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
RP-UHPLC-QTOF-HR-MS	UHPLC: Agilent 1290 infinity LC-QTOF: maXis II C18-Säule: Acquity UPLC BEH Vorsäule: Acquity UPLC BEH C18 VanGuard Pre-Column	Agilent Technologies Bruker, Billerica, USA Waters GmbH, Eschborn, Deutschland Waters GmbH
Sterilwerkbank	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific
Thermomix	TM 6	Vorwerk Deutschland Stiftung + Co. KG Wuppertal, Deutschland
Trockenschrank	ED 115 E2	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	T 5042 E	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad	Emmi-100HC	Emag AG, Mörfelden- Walldorf, Deutschland
Vakuumpumpe	DCU hiCUBE	Pfeiffer Vacuum GmbH, Aßlar, Deutschland
	ME 8SI	Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim
Vollautomatische Soxtherm	E6	Behr Labor-Technik GmbH
Vortexer	Vortex 2 S000	IKA-Werke GmbH + Co. KG
Waage	ABT 320-4NM PFP 6K0.05 ABT-220-5DNM 572-39	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasserbad	ISOTEMP 205	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Sigma 4-16KS	Sartoris Lab Instruments GmbH & Co. KG
	Mikro 220 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller/Ort
Zentrifuge	Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Zweistrahlspektrometer	SPECORD 210	Analytik Jena GmbH & Co. KG, Deutschland

2.3 Pilze

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme sowie deren Herkunft aufgeführt. Alle genannten Pilze wurden in Emerskultur-Screenings getestet (2.6.5). In der Tabelle ist angegeben, welche der Pilze zusätzlich in Submerskultur gescreent wurden (2.6.6).

Tabelle 5: In der Arbeit verwendete Pilze. CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, NL; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DE; Sylvan: Sylvan, Horst, NL; JMRC: Jena Microbial Resource Collection, Jena, DE; LCB: institutseigene Stammsammlung, Gießen, DE; IMD: InterMedDiscovery, Dortmund, DE; Mycelia: Deinze, BE; GÖT: Institut für Molekulare Holzbiotechnologie & Technische Mykologie, Göttingen, DE; LCB: institutseigene Sammlung, Gießen, DE.

Name	Interne Stamnummer	Abkürzung	Herkunft	Submers kultiviert
<i>Agaricus arvensis</i>	164	AARV	CBS- 583.76	Ja
<i>Agaricus bitorquis</i>	451	ABI	DSMZ-4135	Ja
<i>Agrocybe aegerita</i>	166	AAE	Sylvan 4022	Ja
<i>Agrocybe arvalis</i>	53	HAU	DSMZ- 9710	Nein
<i>Amylostereum areolatum</i>	150	AAR	JMRC- SF010259	Nein
<i>Antrodia xantha</i>	200	AXA	LCB	Ja
<i>Armillaria bulbosa</i>	87	ABU	DSMZ- 3732	Nein
<i>Armillaria gallica</i>	229	AGAL	LCB	Nein
<i>Armillaria mellea</i>	186	AMEL	DSMZ- 2941	Nein
<i>Byssomerulius corium</i>	236	BCO-FP	LCB	Nein
<i>Clitocybe geotropa</i>	162	CGE	CBS- 128.44	Nein
<i>Clitocybe gibba</i>	301	IGI-FP	LCB	Ja
<i>Clitocybe odora</i>	517	COD-D	DSMZ- 8518	Ja
<i>Clitopilus passeckerianus</i>	68	CLP	DSMZ- 901	Nein
<i>Coprinellus micaceus</i>	212	CHI	LCB	Ja
<i>Coprinus clastophyllus</i>	78	COL	DSMZ- 8306	Nein
<i>Coprinus comatus</i>	332	CCO-FP	LCB	Ja
<i>Coprinus erythrocephalus</i>	41	CER	DSMZ- 8830	Ja
<i>Cyathus limbatus</i>	20	CLIM	CBS- 335.81	Nein
<i>Cyathus striatus</i>	11	CSTR-D	DSMZ- 1652	Nein
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	230	DCO	LCB	Nein
<i>Diaporthe sp.</i>	352	DSP-FP	LCB	Nein
<i>Fistulina hepatica</i>	67	FHE	DSMZ- 4987	Ja

Name	Interne Stammnummer	Abkürzung	Herkunft	Submers kultiviert
<i>Flammula alnicola</i>	163	FAL	CBS- 230.62	Ja
<i>Flammulina velutipes</i>	160	FVE	DSMZ- 1658	Ja
<i>Fomes fomentarius</i>	167	FFO	LCB	Nein
<i>Fomitopsis betulinus</i>	201	PBE	LCB	Ja
<i>Fomitopsis pinicola</i>	30	FPI-D	DSMZ- 3521	Nein
<i>Ganoderma annularis</i>	47	GAN	DSMZ- 9943	Nein
<i>Ganoderma applanatum</i>	34	GAP	DSMZ- 3800	Nein
<i>Ganoderma lucidum</i>	491	GLU	DSMZ- 3515	Nein
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	76	GLO	DSMZ- 12011	Nein
<i>Grifola frondosa</i>	520	GFR	LCB	Nein
<i>Gymnopilus earlei</i>	56	GEA	DSMZ- 9842	Ja
<i>Hericium coralloides</i>	128	HCO	CBS- 107488	Ja
<i>Hericium erinaceus</i>	103	HER	IMD- FU 70034	Ja
<i>Heterobasidion araucariae</i>	129	HAR	CBS- 744.94	Nein
<i>Hymenopellis radicata</i>	289	HRA-FP	LCB	Ja
<i>Hypholoma sublateritium</i>	214	HSU	LCB	Nein
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	42	HEL	DSMZ- 8292	Ja
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	161	HTE	DSMZ- 23610	Ja
<i>Inonotus obliquus</i>	435	IOB	CBS- 314.39	Nein
<i>Irpex consors</i>	111	ICO	DSMZ- 7382	Ja
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	245	ISH-FP	LCB	Ja
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	60	KUM	DSMZ- 1013	Ja
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	194	KMU-F	LCB	Ja
<i>Laetiporus montanus</i>	524	LMO	Nationalpark Schwarzwand (48.57337,8.24388)	Ja
<i>Laetiporus persicinus</i>	498	LPER	CBS- 274.92	Ja
<i>Laetiporus portentosus</i>	497	LPO	CBS- 307.39	Ja
<i>Laetiporus sulphureus</i>	24	LSU	DSMZ- 1014	Ja
<i>Lentinellus cochleatus</i> var. <i>inolens</i>	92	LCO	CBS- 913.87	Nein
<i>Lentinula edodes</i>	16	LED	CBS- 389.89	Nein
<i>Lentinus sajor-caju</i>	38	PEO	DSMZ- 5331	Nein
<i>Lentinus squarrosulus</i>	39	LSQU	DSMZ- 9877	Nein
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	222	LPY	FAM- 76	Ja
<i>Macrolepiota procera</i>	202	MPR	LCB	Ja
<i>Macrolepiota procera</i>	183	LPR	GÖT- 163	Ja
<i>Marasmius alliaceus</i>	309	MAL-FP	LCB	Nein

Name	Interne Stammnummer	Abkürzung	Herkunft	Submers kultiviert
<i>Marasmius cohortalis</i>	40	MCO	DSMZ- 8257	Nein
<i>Marasmius rotula</i>	191	MRO	LCB	Nein
<i>Meripilus giganteus</i>	165	MGI	DSMZ- 8693	Ja
<i>Mycena epipterygia</i>	90	MEP	DSMZ- 8733	Nein
<i>Mycena galericulata</i>	433	MAG	CBS- 499.79	Nein
<i>Mycena pseudocorticola</i>	220	MPS	LCB	Nein
<i>Panellus serotinus</i>	43	PSER	DSMZ- 5204	Nein
<i>Pholiota aurivella</i>	57	PAU	DSMZ- 1018	Ja
<i>Pholiota nameko</i>	113	PNA	DSMZ- 6908	Nein
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	114	PCI	DSMZ- 5341	Nein
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	178	PCOR	GÖT- 105	Ja
<i>Pleurotus dryinus</i>	485	PPR	DSMZ 5178	Nein
<i>Pleurotus eryngii</i>	100	PER	DSMZ- 8264	Nein
<i>Pleurotus floridanus</i>	10	PFL	GÖT- 17	Nein
<i>Pleurotus ostreatus</i>	330	POS	DSMZ- 1020	Nein
<i>Pleurotus ostreatus</i>	179	PPU-G	GÖT- 508	Ja
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	295	PSP-FP	LCB	Ja
<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	177	PSS	GÖT- 104	Ja
<i>Pleurotus sapidus</i>	5	PSA	DSMZ- 8266	Ja
<i>Polyporus melanopus</i>	33	PME	DSMZ- 5109	Nein
<i>Polyporus squamosus</i>	135	POSQ	CBS- 426.48	Nein
<i>Polyporus umbellatus</i>	136	PUM	CBS- 483.72	ja
<i>Porodaedalea pini</i>	77	PHP	DSMZ- 5238	Nein
<i>Psathyrella candolleana</i>	189	PCAN	LCB	Ja
<i>Psathyrella candolleana</i>	310	PCA	LCB	Nein
<i>Psathyrella piluliformis</i>	223	PPI	LCB	Ja
<i>Punctularia atropurpurascens</i>	137	PAT	CBS- 388.66	Ja
<i>Pycnoporus coccineus</i>	139	PYCO	CBS- 355.63	Ja
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	31	PYS	DSMZ- 3023	Ja
<i>Sarcodontia crocea</i>	407	SSE	Goethe- Universität Frankfurt- P726	Nein
<i>Sparassis crispa</i>	252	SCR-FP	LCB	Ja
<i>Strobilurus esculentus</i>	342	SES-FP	LCB	Ja
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	345	SRU	Mycelia- M 5012	Ja
<i>Suillus variegatus</i>	86	SVA	DSMZ- 1752	Ja
<i>Trametes cinnabarina</i>	337	TCI-FP	LCB	Ja
<i>Trametes hirsuta</i>	190	THI-F	LCB	Nein
<i>Trametes ochracea</i>	211	TOCH-F	LCB	Nein

Name	Interne Stammnummer	Abkürzung	Herkunft	Submers kultiviert
<i>Trametes suaveolens</i>	6	AAE	DSMZ- 5237	Nein
<i>Trametes versicolor</i>	8	TVE-D	DSMZ- 11269	Ja
<i>Tyromyces chioneus</i>	44	TCH	DSMZ- 5242	Ja
<i>Ustilago maydis</i>	287	UMA	LCB	Nein
<i>Wolfiporia cocos</i>	9	WCO-C	CBS- 279.55	Nein

2.4 Substrate

Als Substrate wurden Nebenströme der Kartoffelverarbeitung verwendet. Kartoffelschale sowie Kartoffeltrester wurden vom Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV) in Freising erhalten. Dort wurden die Kartoffeln nach dem folgenden Schema verarbeitet (Abbildung 2). Die Aufarbeitung ist orientiert am industriellen Prozess zur Stärkegewinnung. Zusätzlich wurden industriell anfallende Kartoffelpülpe der Firma Südstärke und Kartoffelfruchtwasser der Firma Emslandstärke bezogen. Alle Substrate wurden bis zur Verwendung gefroren bei -20 °C gelagert.

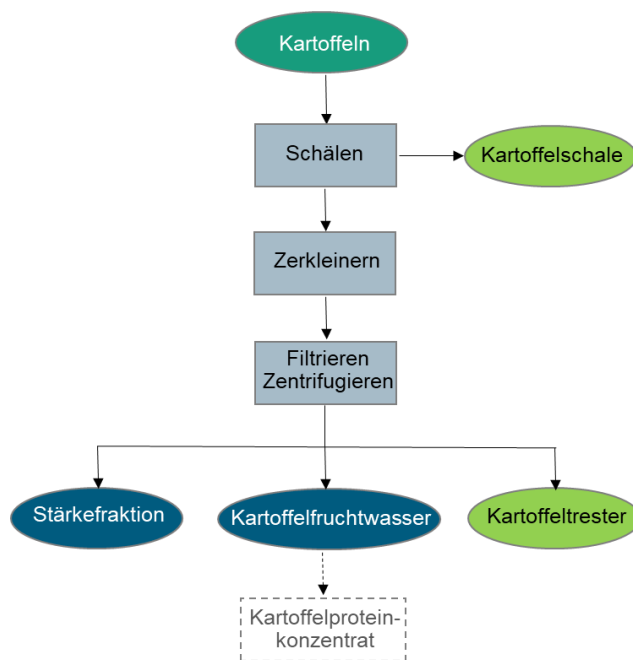


Abbildung 2: Schema der Kartoffelverarbeitung nach einem Prozess des Fraunhofer Instituts für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV) Freising.

2.5 Nährmedien

Für die Pilzkultivierung wurden verschiedene Substrate verwendet (Tabelle 6). Zur Herstellung von Nebenstrom-Medien wurde die Feuchte der Substrate bestimmt (2.8.2) und die Konzentration der Medien zur besseren Vergleichbarkeit auf die Trockenmassen bezogen. Der Wasseranteil wurde von der zum Medium zugebenden Wassermenge abgezogen.

Kartoffelschalen wurden vor der Verwendung in Nährmedien aufgetaut und in einem Thermomix fein zerkleinert. Kartoffelpülpe und Kartoffeltrester wurden aufgetaut und anschließend direkt verwendet. Alle Medien wurden mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auf ihr entsprechendes Volumen aufgefüllt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Bei Herstellung von festen Nährmedien wurde vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar zugegeben und Substratkonzentrationen von 20 g/L verwendet. Zur Herstellung von Agarplatten wurde Malzextrakt (MEA), Kartoffeltrester (KTA) und Kartoffelschale (KSA) verwendet. Nach der Sterilisation wurden je etwa 20 mL der Medien unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm) gegossen und nach dem Abkühlen in sterilen Tüten verschlossen aufbewahrt. Flüssigmedien wurden in 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L oder 2 L Enghalskolben und in einem Bioreaktor (BioFlo 320 7 L) angesetzt. Alle Enghalskolben wurden mit jeweils 40% ihres Gesamtvolumens befüllt. Bei Kultur im Bioreaktor wurde ein Arbeitsvolumen von 4,5 L verwendet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verschiedenen Medien.

Medium	Bestandteil	Konzentration [g/L]
Malzextrakt (ME)	Malzextrakt	20
Kartoffelschale (KS)	Kartoffelschale	10/20/30/40/50
Kartoffeltrester (KT)	Kartoffeltrester	10/20/30/40/50/60/70/80
Kartoffelpülpe (KP)	Kartoffelpülpe	20

Im Rahmen der Optimierung wurde eine Stickstoffzugabe zu den Medien getestet. Es wurden 5 g/L Ammoniumsulfat oder Natriumaspartat zugegeben, was aufgrund der unterschiedlichen Stickstoffanteile am Gesamtmolekül einer reinen Stickstoffzugabe von 0,94 g/L für Ammoniumsulfat und 0,48 g/L für Natriumaspartat entspricht. Die Zugabe erfolgte zu einer Substratkonzentration der Kartoffeltrester- und Kartoffelschalenmedien von 20 g/L.

Zur Optimierung der Fermentation auf Kartoffelpülpe wurde die Kombination mit Kartoffelfruchtwasser in verschiedenen Konzentrationen getestet. Die Bezeichnungen der Kombinationen sowie die Anteile der Substrate sind in Tabelle 7 dargestellt. Als K1 wird das Medium vor Optimierung bezeichnet (KP; Tabelle 6).

Tabelle 7: Bezeichnungen und Substratkonzentrationen der Kombinationen von Kartoffelfruchtwasser und Kartoffelpülpe.

Bezeichnung	Substratkonzentration Kartoffelpülpe [g/L]	Substratkonzentration Kartoffelfruchtwasser [g/L]
K1	20	0
K2	10	0
K3	10	5
K4	10	10

Bezeichnung	Substratkonzentration Kartoffelpülpe [g/L]	Substratkonzentration Kartoffelfruchtwasser [g/L]
K5	5	5
K6	5	10
K7	0	10

2.6 Pilzkultivierung

2.6.1 Stammhaltung

Die verschiedenen Pilzstämme wurden vom Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie auf Agarplatten erhalten. Zur eigenen Stammhaltung wurde, wenn Platten zu etwa 80% bewachsen waren, aus dem Randbereich ein ca. 1 cm² großes Myzelstück ausgestochen und mittig auf eine neue MEA-Platte überführt. Die Platten wurden mit Verschlussfolie verschlossen und bei 24 °C in Dunkelheit kultiviert.

2.6.2 Vorkulturen

Vorkulturen wurden in ME oder KT mit Substratkonzentrationen von 10 oder 20 g/L hergestellt. Es wurden 250 mL oder 500 mL Erlenmeyerkolben verwendet. Pro 100 mL Medium wurde ein 1 cm² großes Myzelstück einer zu ca. 80% bewachsenen Agarplatte ausgestochen und unter sterilen Bedingungen in das Medium überführt. Das Myzel wurde für 30 s mittels Ultra-Turrax-Stab dispergiert. Die Kulturen wurden bei 24 °C in Dunkelheit bei 150 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Vorkulturdauer wurde in verschiedenen Versuchen variiert, betrug jedoch standardmäßig 7 Tage.

2.6.3 Hauptkulturen

Als Hauptkulturmedien wurden ME, KT, KS und KP wie unter Abschnitt 2.5 aufgeführt verwendet. Vorkulturen wurden für 30 s mittels Ultra-Turrax dispergiert und 10%ig zur Inokulation der Hauptkulturen verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C in Dunkelheit und bei 150 rpm auf einem Horizontalschüttler oder im Bioreaktor. Die Kultivierungsdauer sowie die Fermentationsparameter variierten je nach Versuch.

2.6.4 Kulturernte

Zur Kulturernte von 100 mL, 250 mL und 500 mL Erlenmeyerkolben wurde das Kulturvolumen in vorgewogene 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur und 4.000 g für 10 min. Der Überstand wurde abdekantiert und die Biofeuchtmasse bestimmt.

Bei Ansätzen über 200 mL Fermentationsvolumen und der Fermentation im Bioreaktor wurde die Kulturbrühe zur Abtrennung des Myzels durch ein Nylon-Passiertuch gepresst. Die Fermentate wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gefroren gelagert. Biotrockenmassen wurden durch Rückwiegen nach Lyophilisation bestimmt.

2.6.5 Screening in Emerskultur

Verschiedene Basidiomyceten (Tabelle 5) wurden in einem Plattenscreening auf KSA und KTA sowie MEA als Kontrollmedium gescreent. Wie bei der Stammhaltung (2.6.1) wurde ein ca. 1 cm² großes Myzelstück ausgestochen und mittig auf eine Agarplatten aufgesetzt. Während der Screenings wurden für 24 Tage jeden zweiten Tag der Geruchseindruck und das Wachstum der Emerskulturen bestimmt. Dazu wurde der Geruch beschrieben und das Geruchs Urteil sowie die Geruchsintensität auf einer Scala von 1-5 bewertet (1=negativ/schwach; 5=positiv/intensiv). Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde der Radius des Myzels gemessen und der Tag, an welchem die Agarplatten vollständig bewachsen waren, notiert. Zusätzlich wurde eine Literaturrecherche zu den verwendeten Basidiomyceten durchgeführt und interessante Kandidaten mit neutralem oder positiv bewertetem Geruch sowie einer akzeptablen bis guten Wachstumsgeschwindigkeit für das Screening in Submerskultur ausgewählt.

2.6.6 Screening in Submerskultur

Die vielversprechendsten Pilze aus dem Plattenscreening sowie der Literaturrecherche wurden submers kultiviert (s. Tabelle 5). Die Vorkulturen wuchsen eine Woche in ME (20 g/L). Als Hauptkulturmedien wurden 100 mL KT und KS mit einer Substratkonzentration von 20 g/L verwendet und die Fermentation nach einer Woche beendet. Zur Beurteilung des Screenings wurde der Geruch der Kulturen an den Kulturtagen 3, 5 und 7 beschrieben und das Geruchs Urteil und die Geruchsintensität auf einer Skala von 1-5 bewertet (1=negativ/schwach; 5=positiv/intensiv). Zusätzlich wurden die Biofeucht- sowie die Biotrockenmassen und der Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt (2.8.12). Die fünf besten Kandidaten wurden für weitere Analysen ausgewählt.

2.6.7 Analysen der Screenings in Emers- und Submerskultur

Zur weiteren Analyse der Daten der Screenings in Emers- und Submerskultur wurden die häufigsten genannten Geruchsattribute der einzelnen Pilze über die Zeit zu einer Beschreibung zusammengefasst. Aufgrund der Angaben zu Geruchs Urteil und Geruchsintensität sowie der Geruchsbeschreibung über die Screeningzeit wurde ein

Gesamturteil über den Geruchseindruck durch die Einteilung in „positiv“, „neutral“ oder „negativ“ vorgenommen. Durch diese Einteilung konnten die Gesamtbewertung der einzelnen Pilze auf verschiedenen Medien oder verschiedenen Kultivierungsformen (emers/submers) untereinander verglichen werden. Abweichungen in der Bewertung zweier Vergleichswerte können in fünf Szenarien eingeteilt werden, welche in Tabelle 8 aufgeführt sind.

Tabelle 8: Bewertungen von verschiedenen Szenarien nach dem Vergleich zweier Gesamtbewertungen .

Bewertung	Optionen		
Deutlich negativer	positiv→ negativ		
Gering negativer	positiv→ neutral	neutral→ negativ	
Unverändert	positiv→ positiv	neutral→ neutral	negativ→ negativ
Gering positiver	neutral→ positiv		negativ→ neutral
Deutlich positiver	negativ→ positiv		

Nach ähnlichem Prinzip können auch das Wachstum und der Stickstoffgehalt auf verschiedenen Medien oder das Wachstum in Emers- und Submerskultur miteinander verglichen werden. Dazu wurden zunächst der Median sowie die Grenzwerte für das erste und dritte Quartil der Tage bis zum Vollbewuchs der Agarplatten sowie der Biotrockenmassen und Stickstoffgehalte nach Submerskultivierung auf unterschiedlichen Medien bestimmt. Verglichen wurden anschließend die Zugehörigkeit zu den Quartilen der einzelnen Pilze bezogen auf die verschiedenen Parameter. Durch die Einteilung in Viertel sind sechs unterschiedliche Szenarien möglich (Tabelle 9).

Tabelle 9: Bewertungen von verschiedenen Szenarien nach dem Vergleich eines Pilzes bezogen auf zwei Parameter. Einteilung der Datensätze in Viertel durch die Bestimmung der Quartile (1-4).

Bewertung	Optionen			
Deutlich negativer	1→ 4			
negativer	1→ 3	2→ 4		
Gering negativer	1→ 2	2→ 3	3→ 4	
Unverändert	1→ 1	2→ 2	3→ 3	4→ 4
Gering positiver	2→ 1		3→ 2	4→ 3
positiver	3→ 1		4→ 2	
Deutlich positiver	4→ 1			

Für die Parameter des Screenings in Submerskultur wurden dem ersten Viertel 13 Proben, dem zweiten und dritten 12 Proben und dem vierten Viertel 13 Proben für alle Parameter zugeteilt. Bei der Bestimmung der Tage bis zum Vollbewuchs der Agarplatten ist die Zuteilung nur zu den vorgegeben Messtagen möglich. Dadurch ist keine gleichgroße Abtrennung durch die Quartilbestimmung möglich. Von den Pilzen, die im Emers- und Submersscreening auf

Kartoffelschale getestet wurden, wurden dem ersten Abschnitt 16, dem zweiten 10 und dem dritten und vierten 12 Proben zugeteilt. Für die Pilze, welche in beiden Screenings auf Kartoffeltrester wuchsen, wurden 16 dem ersten, 12 dem zweiten, 10 dem dritten und 12 Proben dem vierten Abschnitt zugewiesen. Der Fehler, der durch die ungleich großen Stichproben höchstens entsteht, liegt bei der Verschiebung um eine Position in den Zeilen in Tabelle 9.

2.6.8 Verwendung des Fermentationsüberstands

Es wurde die Wiederverwendung des Fermentationsüberstands getestet. Dazu wurde auf Kartoffeltrester bei einer Substratkonzentration von 30 g/L fermentiert. Nach 7 Tagen wurde die Fermentation beendet, der Überstand aufgefangen und dieser anstatt 90% des Wassers für die neue Medienherstellung eingesetzt. Der Prozess wurde für vier Zyklen wiederholt.

2.7 Mikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden in 20facher Vergrößerung mit einem Leica DM 2000 LED Mikroskop und der Software Leica application Suite X (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurden Fermentationsbrühen sowie Flüssigmedien zur Kontrolle verwendet. Zusätzlich wurden Aufnahmen von gefriergetrockneten Fermentaten und Substraten mittels Rasterelektronenmikroskopie unter Hochvakuum aufgenommen. Es wurde ein EVO LS 10 SEM (Zeiss, Jena, Germany) mit einem sekundären Elektronen-Detektor (Everhart-Thornley Detektor) zur Messung verwendet. Die Anregungsspannung betrug 15,00 kV und alle Proben wurden mit Gold besputtert.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Bestimmung des Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis

Das C/N-Verhältnis der verschiedenen Substrate wurde durch Elementaranalyse am Institut für organische Chemie der JLU Gießen (Zentrale Analytik) bestimmt.

2.8.2 Bestimmung des Wassergehalts

Die Restfeuchte der Substrate sowie der Fermentate wurden mittels Infrarot-Feuchtemessgerät bei 105 °C bestimmt. Je nach vorhandener Probenmenge wurde zwischen 0,1 und 2,0 g Probe für die Messung eingesetzt. Die Restfeuchte wurde in Doppel- oder Dreifachbestimmung bestimmt. Wenn Analysen auf die Trockenmasse von Proben bezogen

werden sollten, wurde ein Korrekturfaktor (F_{RF}) zur Einbeziehung der Restfeuchte verwendet (Formel (1)).

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

2.8.3 Bestimmung der Wasseraktivität

Die Wasseraktivität der Substrate wurde in Dreifachbestimmung mit einem Novasina LabSwift- a_w -Messgeräts bestimmt. Pro Messung wurde ca. 1 g Probe eingesetzt.

2.8.4 Bestimmung der Wasserbindekapazität

Die Bestimmung der Wasserbindekapazität (WBK) erfolgte in Anlehnung an die Methode 56-20 der *American Association of Cereal Chemists* (AACC 2000). Das gefriergetrocknete Probenmaterial wurde vor der Bestimmung in einer Kugelschwingmühle für 3 min bei einer Frequenz von 30 s^{-1} fein zermahlen. Anschließend wurde 1 g Probe in ein tariertes 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und 40 mL VE-Wasser hinzugegeben. Die Suspension wurde durch Vortexen homogenisiert und bei Raumtemperatur für 15 min und 4.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zentrifugenröhrchen zusätzlich für 10 min in einem Neigungswinkel von 30° zum Abtropfen aufgestellt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen zurückgewogen und die WBK nach Formel (2) berechnet. Die WBK wurde in Dreifachbestimmung ermittelt.

$$WBK = \frac{m_2 - m_1 - E}{E} \cdot F_{RF} \quad (2)$$

mit

WBK = Wasserbindekapazität [mL/g TM]

m_2 = Masse nach dem Abtropfen [g]

m_1 = Masse des leeren Zentrifugenröhrchens [g]

E = Probeneinwaage [g]

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.5 Bestimmung der Ölbindekapazität

Die Ölbindekapazität (ÖBK) wurde nach Stephan 2018 in Dreifachbestimmung für zuvor in der Kugelmühle gemahlene, gefriergetrocknete Proben (3 min bei 30 s^{-1}) ermittelt. 1 g Probe wurde in ein tariertes 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 12 mL Sonnenblumenöl versetzt. Es folgten die Homogenisierung durch Vortexen und die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 30°C im Wasserbad

temperiert und erneut gevortext. Die Suspensionen wurden für 15 min bei Raumtemperatur und 4.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur weiteren Entfernung von Öl wurden die Zentrifugenröhrchen für 10 min im Neigungswinkel von 30° mit der Öffnung nach unten aufgestellt. Das Zentrifugenröhrchen wurde zurückgewogen und die ÖBK entsprechend Formel (3) berechnet.

$$\text{ÖBK} = \frac{m_2 - m_1 - E}{E} \cdot F_{\text{RF}} \quad (3)$$

mit

- ÖBK = Ölbindekazität [g/g TM]
- m_2 = Masse nach dem Abtropfen [g]
- m_1 = Masse des leeren Zentrifugenröhrchens [g]
- E = Probeneinwaage [g]
- F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.6 Bestimmung des Rohaschegehaltes

Zur Bestimmung des Rohaschegehaltes nach LFGB (2024) wurden ca. 1,5 g der gefriergetrockneten Proben in zuvor konstant gewogene Quarztiegel auf 0,1 mg genau eingewogen. Anschließend wurden die Proben über einem Bunsenbrenner verascht und für 7 h bei 550 °C im Muffelofen geglüht. Die Quarztiegel wurden nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen und der Rohaschegehalt nach Formel (4) berechnet. Die Bestimmung der Rohasche erfolgte in Dreifachbestimmung.

$$A = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot F_{\text{RF}} \cdot 100 \quad (4)$$

mit

- A = Rohaschegehalt [g/100 g TM]
- m_2 = Masse des Quarztiegels nach Veraschung [g]
- m_1 = Masse des leeren, geglühten Quarztiegels [g]
- E = Probeneinwaage [g]
- F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))
- 100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

2.8.7 Bestimmung des Ballaststoffgehaltes

Die getrennte Bestimmung von unlöslichen und löslichen Ballaststoffen erfolgte mittels enzymatisch-gravimetrischem Verfahren (*total dietary fiber assay kit*, Merck). 0,5 g gefriergetrocknetes Probenmaterial wurde in 250 mL Bechergläsern auf 0,1 mg genau eingewogen. Die Einwaagen der verschiedenen Proben wichen dabei maximal um 20 mg voneinander ab und es wurden zwei Blindwerte ohne Probeneinwaage mitgeführt.

40 mL MES-TRIS-Puffer (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat-Tris(hydroxymethylaminomethan)-Puffer; 10,65 g/L MES, 6,10 g/L TRIS in VE-Wasser, pH 8,3) wurden den Proben zugegeben und der pH-Wert erneut auf pH 8,3 eingestellt. Es folgte die Zugabe von 50 μ L α -Amylase-Lösung und der enzymatische Aufschluss mit aufgelegtem Uhrglas für 30 min bei 95-100 °C unter ständiger Bewegung im Wasserbad. Nach der Abkühlung auf 60 °C wurden 50 μ L Protease-Lösung zugegeben sowie bei 60 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 5 mL 0,56 M Salzsäure zugesetzt und der pH-Wert mit 5%iger Natronlauge bzw. Salzsäure auf pH 4,0-4,7 bei 60 °C eingestellt. Für den letzten Inkubationsschritt wurden 150 μ L Amyloglucosidase-Lösung zugefügt und erneut für 30 min bei 60 °C inkubiert.

Vorbereitend wurden ausgeglühte Glasfiltertiegel der Porengröße 2 (1 h, 550 °C) mit ca. 1 g ausgeglühtem Celite 545 (7 h, 550 °C) bestückt, über Nacht bei 105 °C im Trockenschrank gelagert und anschließend ausgewogen. Die Probenlösungen wurden durch die vorgewogenen Glasfiltertiegel unter angelegtem Vakuum filtriert. Das Becherglas sowie die Rückstände wurden zweimal mit 10 mL 70 °C heißem Wasser gewaschen und Filtrat und Waschwasser vereint.

Zur Bestimmung der unlöslichen Ballaststoffe wurden die Rückstände in den Glasfiltertiegeln unter Vakuum zweimal mit je 15 mL 75%igem und 95%igem Ethanol sowie Aceton gewaschen.

Für die Bestimmung der löslichen Ballaststoffe wurde das vereinte Filtrat unter Nachspülen mit der vierfachen Menge an 60 °C warmen Ethanol (95%) versetzt. Mit einem Teil des Ethanols wurde die verwendete Saugflasche nachgespült. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 45 °C für 1 h im Wasserbad. Die Probenlösung mit dem entstandenen Niederschlag wurde durch einen Glasfiltertiegel vakuumfiltriert und das Becherglas mit Ethanol (78%) nachgespült. Der Rückstand wurde unter Vakuum dreifach mit je 15 mL 78%igem und 95%igem Ethanol und Aceton gewaschen. Die Glasfiltertiegel mit den löslichen und unlöslichen Ballaststoffen wurden über Nacht bei 105 °C getrocknet und nach dem Auskühlen ausgewogen. Je ein Tiegel einer Probe wurde zur Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes (2.8.12) und der andere zur Bestimmung der Rohasche (2.8.6) eingesetzt. Der Gehalt der löslichen sowie der unlöslichen Ballaststoffe wurde nach Formel (5) berechnet. Der Gesamtballaststoffgehalt wurde durch die Summe der löslichen und unlöslichen Ballaststoffe bestimmt.

$$w = \frac{m_P - [(V_P - V_{RBW}) \cdot 1,4007 \cdot 6,25] - m_{A_P} - m_{B_W} - [(V_{B_W} - V_{RBW}) \cdot 1,4007 \cdot 6,25] - m_{A_{B_W}}}{E} \cdot 100 \cdot F_{RF} \quad (5)$$

mit

w = Ballaststoffgehalt [g/100 g TM]

m_P = Mittelwert der Massen der Probenrückstände [mg]

- V_P = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für die Probe
 V_{RBW} = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für den Reagenzien-Blindwert
 1,4007 = Umrechnungsfaktor von 1 mL 0,1 M HCl auf Stickstoffmenge
 6,25 = Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Proteingehaltes
 m_{AP} = Masse des Probenrückstands nach Veraschung [mg]
 m_{BW} = Mittelwert der Massen der Rückstände der Blindwerte [mg]
 V_{BW} = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für den aufgearbeiteten Blindwert
 m_{ABW} = Masse der Rückstände des Blindwertes nach Veraschung [mg]
 E = Mittelwert der Probeneinwaage [mg]
 100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe
 F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.8 Bestimmung des Pektingehaltes

Der Pektingehalt wurde nach Matissek & Fischer 2021 in Dreifachbestimmung photometrisch bestimmt. 1 g der gefriergetrockneten Proben wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und 12 mL VE-Wasser zugegeben. Die Suspension wurde mit 75 °C heißem Ethanol (96%) auf 40 mL aufgefüllt und für 10 min bei 85 °C im Wasserbad unter mehrfachem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Probenvolumen mit Ethanol (96%) auf 50 mL aufgefüllt und bei 4500 g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die vorherigen Schritte mit 63%igem Ethanol wiederholt.

Unter Nachspülen mit VE-Wasser wurde der Probenrückstand quantitativ in einen 100 mL Messkolben überführt, mit 5 mL Natronlauge (1 M) versetzt und mit VE-Wasser ad Marke aufgefüllt. Die Lösung wurde 15 min unter gelegentlichem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend filtriert und das Filtrat zur Farbreaktion eingesetzt.

Je 1 mL des gegebenenfalls verdünnten Filtrats wurde in ein Derivatisierungsröhrchen überführt und mit 0,5 mL ethanolischer Carbazol-Lösung (0,1%) versetzt. Innerhalb von 7 s wurden 6 mL konzentrierte Schwefelsäure (98%) zugesetzt, wobei die Temperatur der Lösungen auf ca. 85 °C steigen sollte. Die Derivatisierungsröhrchen wurden anschließend für 5 min in einem Wasserbad bei 85 °C inkubiert und zum Abbruch der Reaktion kurzzeitig in ein Eisbad gestellt. Die Lösungen wurden für 15 min auf Raumtemperatur abgekühlt und zur photometrischen Messung bei 525 nm eingesetzt. Analog zu jeder Probe wurde ein Blindwert mitgeführt, zu welchem anstelle der Carbazol-Lösung Ethanol (96%) zugegeben wurde. Zur Bestimmung des Blindwertes der Carbazol-Lösung wurde 1 mL VE-Wasser anstatt des Filtrats eingesetzt.

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung mit einer Galacturonsäureanhydrid-Konzentrationsreihe. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 120,5 mg Galacturonsäure-Monohydrat mit 0,5 mL Natriumhydroxid-Lösung (1 M) versetzt, mit VE-Wasser auf 1 L aufgefüllt und über Nacht stehen gelassen. Aus der Stammlösung (100 mg/L) wurde am Folgetag eine Konzentrationsreihe (5-100 mg/L) in 100 mL Messkolben hergestellt und die Lösung analog zu den Filtraten für die Farbreaktion eingesetzt. Kalibriergrade und Bestimmtheitsmaß einer Kalibrierung sind in Anhang Abbildung 74 dargestellt. Die Berechnung der Pektinkonzentration erfolgte nach Formel (6).

$$P = \frac{E_P - E_{BW} - b}{m} \cdot \frac{100}{E} \cdot F_{RF} \quad (6)$$

mit

- P = Pektingehalt [g /100 g TM]
- E_P = Extinktion der Probenlösung
- E_{BW} = Extinktion der Blindwertlösung
- b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade
- m = Steigung der Kalibriergerade [L/mg]
- E = Probeneinwaage [g]
- 100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe
- F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.9 Bestimmung des Stärkegehaltes

2.8.9.1 *Enzymatische Stärkebestimmung*

Die enzymatische Stärkebestimmung wurde mit dem Stärke-Kit von R-Biopharm durchgeführt. 0,1-0,2 g der gefriergetrockneten und gemörserten Probe wurden in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 15 mL Ethanol (40%) versetzt. Die Probenlösung wurde für 20 min extrahiert, wobei die Probe alle 2 min gevortext wurde. Die Proben wurden für 10 min bei 4500 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Extraktionsschritte wurden drei Mal wiederholt. Anschließend wurden 10 mL Salzsäure (10,7%ig) zugegeben und die Proben für 60 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, wobei alle 5 min gevortext wurde. Die Lösungen wurden auf pH 4,5 eingestellt. In einem 100 mL Kolben wurden die Lösungen mit VE-Wasser ad Marke aufgefüllt und filtriert. Analog zum Probenfiltrat wurden zwei Blindwerte (BW) mit VE-Wasser mitgeführt. Zur Vorbereitung des Stärke-Kits wurden die enthaltenen Reagenzien entsprechend Tabelle 10 behandelt. In die Küvetten wurden 200 µL von Lösung 1 und 100 µL Probenfiltrat oder Reinstwasser (BW) pipettiert. Die Küvetten wurden mit Verschlussfolie verschlossen und gevortext. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei einer Temperatur von 55-60 °C im Wasserbad. Anschließend wurden je 1 mL von Lösung 2 und 1 mL Reinstwasser zur Blindwert- und Probenlösung gegeben. Die Küvetten wurden

erneut mit Verschlussfolie verschlossen und gevortext. Nach 3 min wurde die Extinktion (E_1) bei 340 nm gemessen. Nach der Messung erfolgte die Zugabe von 20 μ L der Lösung 3. Die Küvetten wurden erneut mit Verschlussfolie verschlossen, gevortext und die Extinktion nach 15 min bei 340 nm gemessen (E_2). Der Stärkegehalt wurde anhand von Formel (7) berechnet.

Tabelle 10: Im Test-Set enthaltene Lösungen und deren Verdünnungen zur Stärkebestimmung.

	Inhalt	Vorbereitung
Lösung 1	Ca. 100 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citrat-Puffer (pH ca. 4,6), AGS (ca. 84 U)	Lösung in 6 mL Reinstwasser
Lösung 2	Ca. 5 g Pulvergemisch, zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer (pH ca. 7,6), NADP (ca. 75 mg), ATP (ca. 190 mg), Magnesiumsulfat	Lösung in 27 mL Reinstwasser
Lösung 3	Ca. 0,7 mL Suspension, zusammengesetzt aus: Hexokinase (ca. 200 U), G6P-DH (ca. 100 U)	Unverdünnt verwenden

$$S = \frac{V \cdot M \cdot 100}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot E} \cdot [(E_2 - E_1)_P - (E_2 - E_1)_{Bw}] \cdot F_{RF} \quad (7)$$

mit

S = Stärkegehalt [g/100 g TM]

V = Testvolumen [mL]

M = Molare Masse der zu bestimmenden Substanz [g/mol] ($M_{D\text{-Glucose-}}$
 $M_{\text{Wasser}} = 162,1$ g/mol)

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

ε = Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von NADPH bei
340 nm (6,3 L/(mol cm))

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

v = Probenvolumen [mL]

E = Einwaage [g]

E_2 = Extinktion nach Zugabe von Lösung 3

E_1 = Extinktion nach Zugabe von Lösung 2

P = Probe

Bw = Blindwert

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.10 Bestimmung des Fettgehaltes

Die Bestimmung des Fettgehaltes erfolgte nach Weibull-Stoldt in Dreifachbestimmung. 4-5 g der gefriergetrockneten Probe wurden in ein 400 mL Becherglas auf 1 mg genau eingewogen und mit 150 mL 4 M Salzsäure versetzt. Die Probenlösung wurde mit aufgesetztem Uhrglas

bis zum Sieden erhitzt und unter Rühren 30 min am schwachen Sieden gehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe von ca. 100 mL heißem VE-Wasser und die Filtration der Lösung durch einen Faltenfilter. Der Filter und der Rückstand wurden mit heißem Wasser neutral gewaschen und im Trockenschrank bei 105 °C für 2-3 h getrocknet. Für die Fettextraktion wurde eine vollautomatische Soxhlet-Apparatur verwendet. Die getrockneten Faltenfilter mit der Probe wurden in Extraktionshülsen überführt, welche mit Glaswolle verschlossen wurden. Die Hülsen sowie konstant gewogene Extraktionsbecher mit Siedesteinen und 75 mL Petrolether wurden in die Soxhlet-Apparatur eingesetzt. Die Extraktion erfolgte bei 150 °C mit einer 30-minütigen Kochphase, bei welcher sich die Extraktionshülsen in siedendem Petrolether befanden. Anschließend wurde das Fett für 2 h extrahiert, indem die Hülsen nach oben gefahren wurden und der kondensierte Petrolether durch die Probe zurück ins Becherglas lief. Das restliche Extraktionsmittel wurde unter Stickstofffluss vollständig entfernt. Die Extraktionsbecher wurden bis zur Massenkonstanz bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Berechnung des Gesamtfettgehalts erfolgte entsprechend Formel (8). Für die Bestimmung des Fettsäureprofils (2.8.11) wurde das Fett in 2 mL n-Hexan aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

$$F = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot F_{RF} \cdot 100 \quad (8)$$

mit

F = Rohfettgehalt [g/100 g TM]

m_2 = Masse des Extraktionsbechers mit Fett [g]

m_1 = Masse des leeren Extraktionsbechers [g]

E = Probeneinwaage [g]

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

2.8.11 Bestimmung des Fettsäureprofils

Fettsäureprofile wurden in Dreifachbestimmung nach Fraatz et. al. 2016 bestimmt. Die nach 2.8.10 isolierten Fettproben wurden aufgetaut, 1 mL des in Hexan gelösten Fetts entnommen und unter Stickstofffluss abgeblasen. Es erfolgte die Zugabe von 4 mL einer 0,5 M methanolischen NaOH-Lösung und die Verseifung für 10 min bei 80 °C im Wasserbad. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, 3,5 mL Bortrifluoridlösung (20% in MeOH) zugesetzt und durch Schütteln vermischt. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 80 °C erhitzt, erneut auf Raumtemperatur abgekühlt und 2 mL Isooctan zugegeben. Nach einem weiteren Erhitzungsschritt für 1 min auf 80 °C wurden 5 mL gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und die Proben erneut geschüttelt. Die organische Phase wurde über Nacht bei 4 °C über Natriumsulfat getrocknet und anschließend für die gaschromatographische Analyse eingesetzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: GC-MS Parameter der FSME Messung.

Gaschromatograph	Agilent 7890GC
Trennsäule	VF-Wax _{ms} (30 m x 250 µm x 0,25 µm), Agilent
Trägergas	Helium; Fluss: 1,56,2 mL/min (konstant)
Temperaturprogramm	40 °C für 3 min 3 °C/min bis 240 °C 240 °C für 12 min
Injektion	Injektionsvolumen: 1 µL
	Injektionsmodus: Split
	Splitratio: 200:1 bzw, 75:1
	Temperatur: 250 °C
Detektor	5977B MSD
	MSD Transfer Line: 250 °C
	Ionenquelle: EI (230 °C, 70 eV)
	Quadrupoltemperatur: 150 °C
	Modus: Scan (m/z 33-330)

Zur Identifizierung der Fettsäuremethylester (FSME) wurde ein Mischstandard gemessen (37-Komponenten FAME-Mix) sowie der Vergleich über Retentionsindices (RI's) herangezogen. Für die Bestimmung der Retentionsindices (RI's) wurde eine Alkanreihe (n-Alkane zwischen C₇-C₃₀) gemessen und die relative Lage der Analyten zu den Alkanen berechnet (Formel (9)). Durch diese Berechnung nach van den Dool und Kratz ist eine unabhängige Angabe von benutzten Geräten möglich und somit der Vergleich von RI's mit den in der Literatur angegebenen Werten (van den Dool & Kratz 1963).

$$RI = 100 \cdot \left(n + \frac{t_{\text{Substanz}} - t_{C_n}}{t_{C_{n+1}} - t_{C_n}} \right) \quad (9)$$

mit

RI = Retentionsindex

t_{Substanz} = Retentionszeit der zu untersuchenden Substanz [min]

t_{C_n} = Retentionszeit des vor der Substanz eluierenden Alkans [min]

$t_{C_{n+1}}$ = Retentionszeit des nach der Substanz eluierenden Alkans [min]

n = Anzahl C-Atome des vor dem Analyten eluierenden Alkans

Der prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren wurde durch den Vergleich der Peakflächen nach Formel (10) berechnet.

$$FS_i = \frac{A_i}{\sum A_n} \cdot 100 \quad (10)$$

mit

- FS_i = Anteil eines FSME an der Summe aller FSME [%]
- A_i = Peakfläche des zugehörigen FSME
- $\sum A_n$ = Summe der Peakflächen aller FSME
- 100 = Umrechnungsfaktor auf %

2.8.12 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes

Der Gesamtstickstoffgehalt wurde in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung nach Kjeldahl bestimmt (Matissek & Fischer 2021). Hierzu wurden 0,2-0,5 g der gefriergetrockneten Proben in ein stickstofffreies Wägeschiffchen eingewogen und in einen Aufschlusskolben überführt. Nach Zusatz von 3-4 Siedesteinen, zwei Katalysator-Tabletten sowie 25 mL konzentrierter Schwefelsäure erfolgte der Aufschluss im Aufschlussblock für 120 min (Heizleistung: 100% für 5 min, 0% für 5 min, 100% für 5 min, 0% für 5 min, 100% für 5 min, 0% für 5 min, 80% für 90 min). Nach dem Abkühlen der Aufschlusskolben wurden diese in eine Destillationsapparatur zur Wasserdampfdestillation mittels folgenden Programms eingesetzt (Tabelle 12). Es folgte die vollautomatische Titration mit 0,1 M Salzsäure. Der Gesamtstickstoffgehalt wurde nach Formel (11) bestimmt. Bei Berechnung des Gesamtstickstoffgehalts von Fermentaten in g/L wurde der Gesamtstickstoffgehalt in g/100 g TM mit dem der Biotrockenmasse nach Kulturernte multipliziert.

Tabelle 12: Programmparameter der Destillationsapparatur zur Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts.

Parameter	Einstellung
Zugabe H ₂ O [mL]	90
Zugabe NaOH [mL]	80
Destillationszeit [s]	300
Reaktionszeit [s]	30
Dampfleistung [%]	80
Absaugen der Probe [s]	40
AutoEndPkt	Ein
Absaugen Destillat [s]	30
Zugabe H ₃ BO ₃ [mL]	80
Messzeit [s]	0,3
Rühren [%]	40

$$N = \frac{1,4007 \cdot (V - V_{Bw})}{E \cdot 10} \cdot F_{RF} \quad (11)$$

mit

N = Gesamtstickstoffgehalt [g/100 g TM]

1,4007 = Umrechnungsfaktor von 1 mL 0,1 M HCl auf Stickstoffmenge

V = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für die Probe

V_{Bw} = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für den Blindwert

E = Probeneinwaage [g]

10 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.13 Bestimmung des Aminosäureprofils und der biologischen Wertigkeit

Die Aminosäurezusammensetzung wurde in Doppel- oder Dreifachbestimmung mittels Aminosäureanalysator angelehnt an Ahlborn et al. 2019 bestimmt. Bis auf Cystein, Methionin und Tryptophan können die proteinogenen Aminosäuren nach saurer Hydrolyse aufgearbeitet werden. Da anschließend Asparagin und Glutamin als ihre entsprechende Säure vorliegen, wird bei diesen Aminosäuren die Summe aus Asparaginsäure und Asparagin bzw. Glutaminsäure und Glutamin detektiert. Um eine Unterbestimmung von Methionin und Cystein zu verhindern, ist ein separater Aufschluss zur Stabilisierung mit einer vorherigen Oxidation zu Methioninsulfon bzw. Cysteinsäure notwendig (Jennings & Lewis 1969, Spindler et al 1984). Die Bestimmung von Tryptophan erfolgte nach alkalischer Hydrolyse. Somit ergeben sich drei Aufarbeitungsmethoden zur Bestimmung der proteinogenen Aminosäuren. Für alle Aufarbeitungen wurde Citratpuffer nach Sykam benötigt (Tabelle 13). Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH 2,2 eingestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Citratpuffers nach Sykam.

Substanz	Konzentration
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	11 g/L
Citronensäure	6 g/l
Thiodiglycol	14 mL/L
HCl (32%)	12 mL/L
Phenol	2 g/L

2.8.13.1 *Aufarbeitung der Gesamtaminosäuren*

25-30 mg getrocknetes Probenmaterial wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL 6 M phenolischer Salzsäure (0,1% Phenol) versetzt. Die Probenlösungen wurden für 24 h bei 110 °C inkubiert, wobei die Deckel der Zentrifugenröhrchen in der ersten Stunde nur leicht aufgesetzt waren, bevor sie fest zuge dreht wurden. Die Proben wurden in

einem Eisbad abgekühlt und unter konstantem Umschwenken 1,5 mL Natronlauge (7,5 M) zur Neutralisation zugegeben. Der pH-Wert wurde auf pH 2,2 eingestellt und die Proben quantitativ in einen 20 mL Messkolben überführt. Die Proben wurden mit Citratpuffer (Tabelle 13) ad Marke aufgefüllt. Anschließend folgte eine Membranfiltration (0,45 μ m Nylon), die Überführung der Proben in ein Vial und die Lagerung bis zur Analyse bei 4 °C.

2.8.13.2 Aufarbeitung zur Bestimmung von Cystein und Methionin

Zur Herstellung der Oxidationslösung wurden 0,05 mL Wasserstoffperoxid (32%) mit 0,45 mL Ameisensäure (889 g Ameisensäure, 111 g Reinstwasser, 4,73 g Phenol) zusammengegeben und für 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung für 15 min im Eisbad gekühlt und 0,5 mL zu 25-30 mg getrocknetem Probenmaterial in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Oxidation erfolgte für 16 h bei 4 °C. Durch die Zugabe von 0,084 g Natriumdisulfit wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden 2,5 mL 6 M phenolische Salzsäure (0,1% Phenol) zugegeben und mit der weiteren Aufarbeitung analog zu der Aufarbeitung der Gesamtaminosäuren (2.8.13.1) vorgegangen.

2.8.13.3 Aufarbeitung zur Bestimmung von Tryptophan

Für die Bestimmung von Tryptophan wurden 40-90 mg Probe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL einer phenolischer Natronlauge (5 M NaOH; 0,1% Phenol) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 110 °C. Während der ersten Stunde wurden die Deckel nur leicht aufgesetzt und erst danach fest zugezogen. Nach der Inkubation wurde unter konstantem Umschwenken tropfenweise 1,5 mL Phosphorsäure (0,5 M) zugegeben und die Probenlösung anschließend auf pH 2,2 eingestellt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zur Aufarbeitung der Gesamtaminosäuren (2.8.13.1).

2.8.13.4 Messparameter der Aminosäureanalyse

Die Auftrennung der proteinogenen Aminosäuren erfolgte anschließend chromatographisch an einer Kationenaustauschersäule. Es folgte die Nachsäulen-Derivatisierung mit Ninhydrin und die Detektion bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Ausnahme von Prolin (440 nm). Für die Messung nach Aufarbeitung der Gesamtaminosäuren und der Aufarbeitung der oxidierten Aminosäuren wurden andere Messparameter als für die Messung von Tryptophan verwendet. Die Geräte- und Messparameter sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Geräte und Messparameter des Aminosäureanalysators.

Parameter Aminosäureanalysator							
Gerät	Aminosäureanalysator S433 (Sykam)						
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13/Na, 4,6 x 175 mm						
Filtersäule	Ammoniakfiltersäule LCA K04/Na, 4,6 x 100 mm						
Detektor	UV/Vis-Detektor bei 570 nm und 440 nm						
Software	Chromstar, Version 7						
Eluenten	A: Puffer A, pH 3,45 (Sykam) B: Puffer B, pH 10,85 (Sykam) Regenerationslösung (D): 0,5 M NaOH mit 0,68 mM EDTA						
Aminomodul	N: 0,1 M Ninhydrin in Methanol (Sykam) Waschlösung (W): 25% Ethanol, 25% Isopropanol, 50% Reinstwasser						
Reaktortemperatur	130 °C						
Injektionsvolumen	150 µL						
Flussrate	Eluenten (A, B, D): 0,45 mL/min Aminomodul (N, W): 0,25 mL/min						
Modus	Eluenten (A, B, D): Gradient, Aminomodul (N, W): isokratisch						
Messung der Gesamtaminosäuren und oxidierten Aminosäuren							
Eluenten-Gradient	Zeit [min]	A [%]		B [%]		D [%]	
	0-5	100		0		0	
	5,1-11	100→95		0→5		0	
	11,1-13	95→80		5→20		0	
	13,1-25	80→70		20→30		0	
	25,1-29	70→30		30→70		0	
	29,1-31	30→20		70→80		0	
	31,1-33	20→10		80→90		0	
	33,1-41	10→0		90→100		0	
	41,1-49	0		100		0	
49,1-52	0		0		100		
52,1-65	100		0		0		
Säulenofentemperatur	Zeit [min]	0-5	5,1-10	10,1-26	26,1-31	31,1-55	55,1-60
	T [°C]	49	49→56	56	56→74	74	74→50
Messung von Tryptophanproben							
Gradient	Zeit [min]	A [%]		B [%]		D [%]	
	0-5	30		70		0	
	5,1-7	30→10		70→90		0	
	7,1-15	10→0		90→100		0	
	15,1-20	0		100		0	
	20,1-23	0		0		100	
23,1-32	30		70		0		
Säulenofentemperatur	74 °C						

2.8.13.5 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung mittels einer H-Ox-Standardlösung von Sykam sowie einem hergestellten Tryptophan-Standard (20 mg Tryptophan in 100 mL Citratpuffer). Beide Standards wurden auf einen Konzentrationsbereich von 10-200 nmol/mL verdünnt. Durch Integration der Peaks und lineare Regression wurde die Konzentration der Aminosäuren in [nmol/mL] bestimmt. Chromatogramme sowie Kalibriergraden und Bestimmtheitsmaße sind im Anhang Abbildung 75-Abbildung 78 aufgeführt. Nach Berücksichtigung der molaren Masse der jeweiligen Aminosäure und der Probeneinwaage, wurde die Menge der Aminosäuren in [g/100 g TM] berechnet (Formel (12)).

$$AS = \frac{c \cdot M_{AS} \cdot V \cdot 100}{E \cdot 10^9} \cdot F_{RF} \quad (12)$$

mit

- AS = Aminosäuregehalt [g/100 g TM]
- c = Konzentration der Aminosäure [nmol/mL]
- M_{AS} = Molare Masse der jeweiligen Aminosäure [ng/nmol]
- V = Gesamtvolumen [mL] (hier: 20 mL)
- 100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe
- E = Probeneinwaage [g]
- 10⁹ = Umrechnungsfaktor auf g
- F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

Die Aminosäuren liegen zum Zeitpunkt der Messung hydrolysiert vor. Zur Näherung an den Reinproteingehalt wird angenommen, dass alle Aminosäuren gebunden als Proteine vorliegen (AS_{res}). Daher wird bei Berechnung der Wasserverlust bei Peptidbindung berücksichtigt (Formel (13)). Aus der Summe der AS_{res} ergibt sich der Reinproteingehalt (Formel (14)).

$$AS_{res} = \frac{c \cdot (M_{AS} - M_{H_2O}) \cdot V \cdot 100}{E \cdot 10^9} \cdot F_{RF} \quad (13)$$

mit

- AS_{res} = Aminosäuregehalt einer Aminosäure [g/100 g TM]
- c = Konzentration der Aminosäure [nmol/mL]
- M_{AS} = Molare Masse der jeweiligen Aminosäure [ng/nmol]
- M_{H₂O} = Molare Masse von H₂O [ng/nmol]
- V = Gesamtvolumen [mL] (hier: 20 mL)
- 100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe
- E = Probeneinwaage [g]
- 10⁹ = Umrechnungsfaktor auf g
- F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

$$P_{\text{rein}} = \sum AS_{\text{res}} \quad (14)$$

mit

P_{rein} = Reinproteingehalt [g/100 g TM]

AS_{res} = Aminosäuregehalt einer Aminosäure [g/ 100 g TM]

2.8.13.6 Bestimmung der Kjeldahlfaktoren

Über die Bestimmung eines Probenmatrix-spezifischen Faktors lassen sich Roh- und Reinproteingehalt aus dem nach Kjeldahl bestimmten Gesamtstickstoff (2.8.12) berechnen. Zur Bestimmung des Faktors zur Rohproteinberechnung wird zunächst der Stickstoffgehalt pro Aminosäure in der Probe berechnet (Formel (15)). Anschließend kann die Summe des in Aminosäuren gebundenen Stickstoffgehalts bestimmt werden. Für den Faktor zur Bestimmung des Rohproteingehalts wird dieser Wert auf die Summe der AS_{res} bezogen (Formel (16)). Zur Bestimmung des Faktors für den Reinproteingehalt wird die Summe der AS_{res} durch den nach Kjeldahl bestimmten Gesamtstickstoff der Probe geteilt (Formel (17)).

$$N_{AS} = \frac{x_{N, AS} \cdot 14,01}{M_{AS}} \cdot AS \quad (15)$$

mit

N_{AS} = Stickstoffgehalt je Aminosäure in der Probe [g/100 g TM]

$x_{N, AS}$ = Anzahl der Stickstoffatome der jeweiligen Aminosäure

14,01 = Molare Masse eines Stickstoffatoms [g/mol]

M_{AS} = Molare Masse der Aminosäure

AS = Aminosäuregehalt [g/100 g TM]

$$F_{\text{Roh}} = \frac{P_{\text{rein}}}{\sum N_{AS}} \quad (16)$$

mit

F_{Roh} = Kjeldahlfaktor zur Bestimmung des Rohproteingehalts

N_{AS} = Stickstoffgehalt je Aminosäure in der Probe [g/100 g TM]

P_{rein} = Reinproteingehalt [g/100 g TM]

$$F_{\text{Rein}} = \frac{\sum A_{\text{res}}}{N} \quad (17)$$

mit

F_{Rein} = Kjeldahlfaktor zur Bestimmung des Reinproteingehalts

AS_{res} = Aminosäuregehalt einer Aminosäure [g/100 g TM]

N = Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt [g/100 g TM]

2.8.13.7 Berechnung der biologischen Wertigkeit

Zur Bewertung der Proteinqualität wurde die biologische Wertigkeit berechnet (Ahlborn et al. 2019). Die Aminosäurezusammensetzung der Probe wurde mit einem 1973 von der FAO/WHO festgelegtem Referenzprotein verglichen, welches die optimale Zusammensetzung der essentiellen, aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren für die menschliche Ernährung abbilden soll (FAO/WHO 1973). Die Zusammensetzung des Referenzproteins ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des FAO/WHO 1973 Referenzproteins.

Aminosäure	Gehalt im Referenzprotein [%]
Isoleucin	4,0
Leucin	7,0
Lysin	5,5
Methionin und Cystein	3,5
Phenylalanin und Tyrosin	6,0
Threonin	4,0
Tryptophan	1,0
Valin	5,0

Zunächst wurde der *Amino Acid Score* (AAS) bestimmt, indem der Anteil einer bestimmten Aminosäure durch den Anteil dieser Aminosäure im Referenzprotein geteilt wurde (Formel (18)). Die Aminosäuren mit dem geringsten AAS stellen die limitierenden AS dar. Proben mit einem AAS von über 1 wurden auf 1 gesetzt. Der AAS wurde zur Berechnung des *Essential Amino Acid Index* (EAAI) herangezogen (Formel (19)). Die biologische Wertigkeit (BW) wurde anhand von Formel (20) bestimmt.

$$\text{AAS} = \frac{a_{\text{AS, P}}}{a_{\text{AS, R}}} \quad (18)$$

mit

AAS = *Amino Acid Score*

$a_{\text{AS, P}}$ = Anteil einer Aminosäure der Probe an der Summe der Aminosäuren der Probe

$a_{\text{AS, R}}$ = Anteil einer Aminosäure im Referenzprotein an den Gesamtamino­säuren des Referenzproteins

$$EAAI = \sqrt[8]{AAS_{Ile} \cdot AAS_{Leu} \cdot AAS_{Lys} \cdot AAS_{Met+Cys} \cdot AAS_{Phe+Tyr} \cdot AAS_{Thr} \cdot AAS_{Trp} \cdot AAS_{Val}} \cdot 100 \quad (19)$$

mit

EAAI = *Essential Amino Acid Index*

AAS_x = *Amino Acid Score* der jeweiligen Aminosäuren

$$BW = (1,09 \cdot EAAI) - 11,7 \quad (20)$$

mit

BW = *Biologische Wertigkeit*

EAAI = *Essential Amino Acid Index*

2.8.14 Bestimmung von freier L-Glutaminsäure

Nach der Gesamthydrolyse und der Messung mittels Aminosäureanalysator kann nicht zwischen Asparaginsäure und Asparagin bzw. Glutaminsäure und Glutamin unterschieden werden, da beide als entsprechende Säure vorliegen. Zur Bestimmung von freier L-Glutaminsäure in den Überständen der Hydrolyseproben wurde ein Test-Kit von R-Biopharm verwendet. Die im Test-Kit enthaltenen Lösungen und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Im Test-Kit enthaltene Lösungen und deren Verdünnungen zur L-Glutaminsäure Bestimmung.

Inhalt		Vorbereitung
Lösung 1	Ca. 25 mL Lösung, zusammengesetzt aus Kaliumphosphat/Triethanolamin-Puffer (pH ca. 6,8), Polidocanol	Unverdünnte Verwendung
Lösung 2	Ca. 35 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus Diphorase (ca. 4 U), NAD (ca. 28 mg)	Lösung in 2,5 mL. Reinstwasser
Lösung 3	Ca. 2,5 mL Jodnitrotetrazoliumchlorid-Lösung	Lösung in 6 mL. Reinstwasser
Lösung 4	Ca. 1,2 mL Glutamat-Dehydrogenase-Lösung (ca. 1080 U)	Unverdünnte Verwendung
Lösung 5	L-Glutaminsäure-Testkontroll-Lösung (0,071 g/L)	Unverdünnte Verwendung

Zu 300 µL von Lösung 1 wurden jeweils 100 µL von Lösung 2 und Lösung 3 in eine Küvette pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µL des Überstands und 900 µL Reinstwasser. Für den Blindwert wurden 1 mL Reinstwasser und keine Probenlösung verwendet. Der Inhalt der Küvetten wurde gemischt und die Extinktion nach 2 min bei 492 nm gemessen (E_1). Nach 2 min wurde die Extinktion erneut gemessen wobei die Abweichung zur ersten Messung nicht größer als 0,01 sein sollte. Anschließend wurden 15 µL von Lösung 4

zugegeben und die Probenlösung erneut gemischt. Nach 15 min wurde erneut die Extinktion bei 492 nm gemessen (E_2). Nach 2 min wurde die Messung wiederholt. Wenn die Reaktion noch nicht zum Stillstand gekommen war, wurden die Extinktion in Abständen von 2 min gemessen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min zu beobachten war. Die Konzentration an L-Glutaminsäure wurde über Formel (21) bestimmt.

$$Glu = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot [(E_2 - E_1)_P - (E_2 - E_1)_{Bw}] \quad (21)$$

mit

- Glu = L-Glutaminsäure [g/L]
- V = Testvolumen [mL] (hier: 1,515 mL)
- M = Molare Masse der zu bestimmenden Substanz [g/mol] (hier 147,13 g/mol)
- ε = Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von Formazan bei 492 nm [L/(nmol·cm)] (hier: 19,9 L/(nmol·cm))
- d = Schichtdicke der Küvette [cm] (hier: 1 cm)
- v = Probenvolumen [mL] (hier: 0,2 mL)
- E_2 = Extinktion nach Zugabe von Lösung 4
- E_1 = Extinktion nach Zugabe von Lösung 3
- P = Probe
- Bw = Blindwert

2.8.15 Formol-Titration

Die Formol-Titration wurde nach LFGB (2024) mit leichter Modifikation durchgeführt. 25 mL der erhaltenen Überstände der Blindwerte bzw. der Hydrolyseproben (2.10) wurden mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 8,1 eingestellt. Anschließend wurden 10 mL Formaldehyd-Lösung (37%; pH 8,1) zugegeben. Eine Minute nach Zugabe der Lösung wurde mit 0,05 M Natriumhydroxid-Maßlösung auf pH 8,1 rücktitriert. Zusätzlich zu den Probenlösungen wurde ein Blindwert für die Titration des für die Hydrolyse verwendeten Phosphatpuffers bestimmt. Die Titrationen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.8.15.1 *Überprüfung der Linearität*

Zur Überprüfung der Linearität der Formol-Titration wurde zunächst eine 50 mM Phenylalanin-Stammlösung in Phosphatpuffer (200 mM, pH 7,5) hergestellt. Anschließend wurden zur Erstellung einer Messkurve Probenlösungen mit 5, 10, 15, 20, 25, und 30 mM Phenylalanin titriert. Die Titrationen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.8.15.2 Totalhydrolyse und Bestimmung des Hydrolysegrades

Die Titrationsergebnisse der Proben wurden mit denen einer Totalhydrolyse verglichen. Dafür wurden 0,25 g lyophilisiertes Myzel eingesetzt und mit 12,5 mL 6 M HCl vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 110 °C wurden 12,5 mL Phosphatpuffer (0,2 M; pH 7,5) sowie 7,5 mL 7,5 M NaOH zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 8,1 eingestellt und der Ansatz anschließend für die Formol-Titration eingesetzt (2.8.15). Analog zu den Probenlösungen wurde ein Blindwert ohne Myzel mitgeführt.

Der Hydrolysegrad (DH engl. *degree of hydrolysis*) der Probenlösungen wurde anhand Formel (22) berechnet.

$$DH = \frac{(a_P - a_{Bw})}{(a_T - a_{T, Bw})} \cdot 100 \quad (22)$$

mit

- DH = Hydrolysegrad [%]
- a_P = Verbrauch an 0,05 M Natriumhydroxid-Maßlösung pro 25 mL Probe [mL]
- a_{Bw} = Verbrauch an 0,05 M Natriumhydroxid-Maßlösung pro 25 mL Blindwerts Myzel (Bw M) [mL]
- a_T = Verbrauch an 0,05 M Natriumhydroxid-Maßlösung pro 25 mL der Totalhydrolyse-Probe [mL]
- $a_{T, Bw}$ = Verbrauch an 0,05 M Natriumhydroxid-Maßlösung pro 25 mL Totalhydrolyse-Blindwert [mL]
- 100 = Umrechnungsfaktor auf %

2.8.16 Bestimmung des Chitingehalts

Es wurden mehrere Methoden zur Chitin-Bestimmung getestet und miteinander verglichen. Die Methoden basieren einerseits auf photometrischen Bestimmungen und andererseits auf der Ermittlung des Stickstoffgehalts. Kalibriergraden und Bestimmtheitsmaße der photometrischen Bestimmungen sind im Anhang in Abbildung 79-Abbildung 81 aufgeführt.

2.8.16.1 Chitinbestimmung nach Vetter und Siller

Die Chitinbestimmung erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Vetter und Siller indirekt über den Glucosamingehalt nach saurem Aufschluss (Vetter & Siller 1991) mit anschließender Färbereaktion (Smith & Gilkerson 1979). 40 bis 50 mg Probenmaterial wurde in ein Glasröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL 6 M HCl versetzt. Parallel dazu wurde eine Positivkontrolle aufgearbeitet, für die ca. 12 mg reines Chitin eingewogen wurde. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 105 °C im Ofen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert auf pH 6-7 eingestellt. Die Probenlösung wurde in einen 20 mL Messkolben

überführt, mit VE-Wasser ad Marke aufgefüllt und über einen trockenen Faltenfilter filtriert. 500 μL des Filtrats wurden mit 500 μL 0,5 M HCl in ein Glasröhrchen gegeben und für 2 h bei 110 °C im Ofen erhitzt. Zusätzlich wurde eine Blindwertprobe mit 500 μL Wasser anstatt des Filtrats mitgeführt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 mL 2,5%iger Natriumnitritlösung versetzt, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 1 mL 0,25%ige 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-Hydrochlorid (MBTH)-Lösung zu den Probelösungen gegeben, erneut gevortext und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Färbung wurde 1 mL 0,5%ige Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat-Lösung (frisch hergestellt) zupipettiert und nach dem Vortexen für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und leichtem Schwenken wurde die Extinktion bei 650 nm photometrisch gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Kalibrierung mit einer N-Acetyl-D-Glucosamin-Stammlösung (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit fünf Kalibrierpunkten im Konzentrationsbereich von 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die Aufarbeitung der Kalibrierreihe startete mit der Zugabe von 2 mL 2,5%iger Natriumnitritlösung und erfolgte anschließend analog zur Aufarbeitung der Probelösungen. Die Chitinkonzentration wurde nach Formel (23) bestimmt.

2.8.16.2 Chitinbestimmung nach Ride und Drysdale

Bei der Methode nach Ride und Drysdale wird Chitin nach basischer Hydrolyse ebenfalls indirekt bestimmt (Ride & Drysdale 1972).

120 mg Probe wurden in Dreifachbestimmung in 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 3 mL konzentrierter KOH (21 M) versetzt. Nach kurzem Vortexen erfolgte der Aufschluss im Ofen bei 130 °C für 1 h. Analog wurde eine Positivkontrolle mit 12 mg reinem Chitin mitgeführt. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 8 mL kaltem 75%igem Ethanol versetzt. Die Probelösungen wurden gevortext und für 15 min in ein Eisbad gestellt. 0,9 mL des Überstands einer Celite-Suspension (1 g Celite vermischt in 20 mL kaltem 75%igem Ethanol) wurden zugegeben und die Proben 10 min bei 2 °C und 4500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und der Rückstand in 8 mL kaltem 40%igem Ethanol durch Vortexen gelöst. Die Probelösung wurde wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal mit kaltem VE-Wasser wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand in einen 10 mL Messkolben überführt und mit VE-Wasser ad Marke aufgefüllt. Die Probelösung wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit je 10 mL 5%iger Natriumnitrit-Lösung und 5%iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung versetzt. Die Probe wurde für 15 min geschüttelt und 2 min bei 2 °C und 4500 g zentrifugiert. 150 μL des Überstands wurden mit 1,35 mL VE-Wasser in einem Glasröhrchen verdünnt. Für die Positivkontrollen wurden 40 μL des Überstands mit 1,46 mL VE-Wasser verdünnt.

Alle Proben wurden mit 0,5 mL 12,5%iger Ammoniumsulfamat-Lösung versetzt und 5 min geschüttelt. Anschließend folgte die Zugabe von 0,5 mL 0,5%iger MBTH-Lösung, das Vortexen und die Erwärmung für 3 min in kochendem Wasser. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 0,5 mL 0,5%ige Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat-Lösung (frisch hergestellt) versetzt und gevortext. Nach 30 min wurde die Extinktion bei 650 nm photometrisch gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Fünfpunktkalibrierung mit einer Glucosamin-Hydrochlorid-Stammlösung (250 µg/mL) in einem Konzentrationsbereich von 5-50 µg/mL hergestellt. Je 1,5 mL 5%ige Natriumnitrit-Lösung und 5%ige Kaliumhydrogensulfat-Lösung wurden zu 1,5 mL Standardlösungen gegeben und anschließend analog zu den Probenlösungen verfahren. Für die Farbreaktion wurde ein Blindwert mit 1,5 mL VE-Wasser mitgeführt. Zur Berechnung wurde die (Formel (23)) verwendet.

2.8.16.3 Chitinbestimmung nach Nilsson und Bjurman

Es wurde eine Methode zur Bestimmung des Glucosamingehalts nach saurer Hydrolyse und einer von den vorherigen abweichenden Färbereaktion durchgeführt (Nilsson & Bjurman, 1998).

Etwa 10 mg Probe wurden in ein Glasröhrchen eingewogen, mit 5 mL 6 M HCl versetzt, leicht geschwenkt und für 48 h bei 90 °C im Ofen inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben über einen trockenen Faltenfilter filtriert und 2 mL im Rotationsverdampfer bei 60 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 mL VE-Wasser aufgenommen. Für die Farbreaktion wurde 1 mL dieser Lösung mit 0,25 mL Acetylaceton-Lösung (4% Acetylaceton in 1,25 M Na₂CO₃-Lösung) versetzt, gevortext und für 1 h bei 90 °C im Ofen erwärmt. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und 2 mL Ethanol (90%) und 0,25 mL Ehrlich-Reagenz (1,6 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 30 mL Ethanol (96%) und 30 mL 37%iger HCl) zugegeben. Die Proben wurden erneut gevortext und für 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Extinktion bei 530 nm gemessen. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit fünf Punkten einer Glucosamin-Hydrochlorid-Stammlösung (200 µg/mL) im Konzentrationsbereich von 10-100 µg/mL hergestellt. Die Farbreaktion der Standardreihe wurde analog zu den Proben durchgeführt und es wurde ein Blindwert mit 1 mL VE-Wasser mitgeführt. Die Berechnung erfolgte nach (Formel (23)).

$$\text{Chitin} = \frac{c_{\text{Glu}} \cdot F \cdot V \cdot 100 \cdot W}{E \cdot 10^6} \cdot F_{\text{RF}} \quad (23)$$

mit

$$\text{Chitin} = \text{Chitingehalt [g/100 g TM]}$$

c_{Glu} = Aus Kalibriergrade entnommene N-Acetyl-D-Glucosamin-Konzentration/ Glucosamin-Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]

F = Verdünnungsfaktor

V = Volumen [mL]

(für 2.8.16.1: 20 mL; 2.8.16.2: 10 mL; 2.8.16.3: 30 mL)

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

W = Wiederfindung (Berechnet durch Positivkontrolle)

E = Probeneinwaage [g]

10^6 = Umrechnungsfaktor von μg auf g

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.16.4 Chitinbestimmung über den Stickstoffgehalt

Der Chitingehalt wurde über den Stickstoffgehalt des Rückstands nach alkalischer Hydrolyse bestimmt. Diese Methode wurde angelehnt an Gerhardt 2023 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass kein automatisierter Aufschluss erfolgte. Etwa 1 g Probe wurde in eine 250 mL Schottflasche eingewogen und mit 100 mL 5 M NaOH versetzt. Es folgte der Aufschluss bei 110 °C für 24 h. Der Deckel der Flasche wurde zunächst nur aufgesetzt und nach 1 h fest zugedreht. Nach der Abkühlung wurde über einen Faltenfilter filtriert und mit kochendem VE-Wasser neutral gewaschen. Der Filter wurde über Nacht bei 103 °C getrocknet. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden für den Filter mit Rückstand der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl (2.8.12) bestimmt. Der Chitingehalt wurde nach Formel (24) berechnet.

$$\text{Chitin} = \frac{(V - V_{\text{Bw}}) \cdot F_{\text{C}}}{E \cdot 10} \cdot F_{\text{RF}} \quad (24)$$

mit

Chitin = Chitingehalt [$\text{g}/100 \text{ g TM}$]

1,4007 = Umrechnungsfaktor von 1 mL 0,1 M HCl auf Stickstoffmenge

V = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für die Probe

V_{Bw} = Verbrauch an 0,1 M HCl [mL] für den Blindwert

F_{C} = Umrechnungsfaktor auf den Chitingehalt (20,319)

E = Probeneinwaage [g]

10 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.8.17 Bestimmung des Ergosterolgehaltes

Die Bestimmung des Ergosterolgehaltes erfolgte mittels Gaschromatographie nach einer Methode von Bickel Haase et al. 2024 in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung. 20 bis 100 mg der pulverförmigen, gefriergetrockneten Proben wurden in Pyrexröhrchen eingewogen und mit 50 mg Natriumascorbat versetzt. Zusätzlich wurden 5 mL methanolische Natriumhydroxid-Lösung (5% Natriumhydroxid in 95% Methanol) und 0,25 mL interner Standard (0,5 mg/mL 7-Dehydrocholesterol in 2-Butanon) zugegeben, die Proben gevortext und anschließend für 60 min bei 80 °C im Wasserbad alkalisch verseift. Dabei wurden die Proben alle 20 min gevortext. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde der Überstand membranfiltriert (0,45 µm) und dreimal mit je 5 mL n-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden in einen 15 mL Messkolben überführt und mit n-Hexan ad Marke aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und 6 mL in ein sauberes Pyrexröhrchen überführt. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstofffluss vollständig entfernt, der Rückstand in 0,5 mL Tetrahydrofuran (THF) und 0,5 mL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde durch Vortexen homogenisiert und 2 min bei 70 °C im Wasserbad erwärmt, wobei nach 1 min erneut gevortext wurde. Die Silylierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Etwa 1 mL wurde in ein GC-Vial überführt. Die Messung erfolgte mittels GC-FID unter den nachstehenden Parametern (Tabelle 17).

Tabelle 17: GC-FID Parameter der Ergosterol-Messung.

Parameter GC-FID	
Gaschromatograph	Agilent 7890GC
Autosampler	Agilent 7683B
Trennsäule	DB5-ms (30 m x 320 µm x 0,25 µm), Agilent
Trärgas	Wasserstoff; Fluss: 2,2 mL/min
Temperaturprogramm	100 °C für 3 min 30 °C/min bis 280 °C für 12 min 30 °C/min bis 320 °C für 5 min
Injektion	Injektionsvolumen: 1 µL Injektionsmodus: Splitlos Temperatur: 250 °C
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID) Temperatur: 280 °C Wasserstofffluss: 40 mL/min Luftfluss: 400 mL/min Make-up-Gas: Stickstoff; Fluss 25 mL/min

Die Quantifizierung erfolgte über das Peakflächenverhältnis von Ergosterol zum internen Standard über eine externe Kalibrierung. Es wurden je 1 mL des internen Standards und zwischen 0,5 und 5,0 mL Ergosterolstammlösung (200 µg/mL in 2-Butanon) als Kalibrierlösungen in 10 mL Messkolben hergestellt. Je 1 mL der Lösungen wurde unter Stickstofffluss eingeeengt und anschließend analog zu den Proben behandelt. Kalibriergrade und Bestimmtheitsmaß einer Kalibrierung sind in Anhang Abbildung 82 aufgeführt. Der Ergosterol-Gehalt der Proben wurde nach Formel (25) berechnet.

$$Ergo = \frac{\left(\frac{A_{Ergo, Probe}}{A_{IST, Probe}}\right) - b}{m} \cdot \frac{2,5 \cdot 100}{E} \cdot F_{RF} \quad (25)$$

mit

$Ergo$ = Ergosterol [mg/100 g TM]

$A_{Ergo, Probe}$ = Peakfläche von Ergosterol in der Probe

$A_{IST, Probe}$ = Peakfläche vom internen Standard (IST) in der Probe

b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade

m = Steigung der Kalibriergerade [1/mg]

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

100 = Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe

E = Probeneinwaage [g]

F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

Bei der Fermentation von nicht löslichen Substraten wurde der Anteil an gebildeter pilzlicher Biomasse über den Ergosterolgehalt abgeschätzt. Dafür wurde der Pilzanteil über den Vergleich mit dem Ergosterolgehalt einer Referenzkultur berechnet. Als Referenzwert diente der Ergosterolgehalt von Kulturen, welche auf ME-Medien kultiviert wurden. Die Berechnung des prozentualen Pilzanteils erfolgte nach Formel (26).

$$Pilzanteil [\%] = \frac{Ergo_{Fermentat}}{Ergo_{Referenz}} \cdot 100 \quad (26)$$

mit

$Ergo_{Fermentat}$ = Ergosterolgehalt des Fermentats [mg/100 g]

$Ergo_{Referenz}$ = Ergosterolgehalt der ME-Referenzkultur [mg/100 g]

100 = Umrechnungsfaktor auf %

2.8.18 Bestimmung von Glykoalkaloiden

Zur Bestimmung der Glykoalkaloide wurden 0,10-0,15 g Probe in eine braune 100 mL Schottflasche eingewogen und mit 20 mL MeOH versetzt. Es folgte ein Extraktionsschritt für 2 h bei 28 °C in einem Schüttelinkubator bei 300 rpm. Die Probenlösung wurde anschließend

in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4500 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Membranfilter (0,45 µm Nylon) filtriert.

Die Messung erfolgte mittels (+)-ESI-RP-UHPLC-QTOF-HR-MS (positive electrospray-ionization reversed-phase ultra-high-performance-liquid-chromatography quadrupole-time-of-flight high-resolution mass-spectrometry). Es wurde das Agilent 1290 infinity UHPLC-System genutzt, welches mit DAD, ELSD und LC-QTOF (maXis II) ausgestattet war. Es wurde eine C18-Säule (Acquity UPLC BEH 130 Å C18 1.7 µm 2.1 mm x 100 mm) mit einer Vorsäule (Acquity UPLC BEH C18 VanGuard Pre-Column 130 Å 1.7 µm 2.1 mm x 5mm) verwendet. Die Säulenofentemperatur betrug 45 °C. Als Eluenten wurden Wasser mit 0,1% Ameisensäure (Eluent A) und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (Eluent B) genutzt. Die Flussrate betrug 0,6 mL/min. Es wurde folgender linearer Gradient verwendet: 0 min 95% A, 0,30 min 95% A, 18,00 min 4,75% A, 18,10 min 0% A, 22,50 min 0% A, 22,60 min 95% A, 25,00 min 95% A. Der Scanbereich erstreckte sich von 50 bis 2.000 m/z, die Scanrate betrug 1 Hz.

Zur Auswertung wurde ein Extracted-Ion-Chromatogramm (EIC) der verschiedenen Massen-zu-Ladungsverhältnisse (m/z-Verhältnis) der Analyten erstellt (Bruker Compass Data Analysis 5.3). Die Identifizierung der Analyten erfolgte durch den Vergleich mit Standards der Einzelsubstanzen. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe 10-Punkt-Kalibrierung eines Mischstandards (α -Solanin und α -Chaconin: 0,083 µg/mL - 0,833 µg/mL; Solanidin: 0,008 µg/mL - 0,083 µg/mL in Methanol). Die Peakflächen des EIC wurden gegen die jeweilige Konzentration der 10-Punkt Kalibrierung aufgetragen. Der Analytgehalt der Proben wurde über Formel (27) berechnet.

$$c_{\text{Ga}} = \frac{A_{\text{Ga}} - b}{m} \cdot \frac{F \cdot V \cdot F_{\text{RF}}}{E} \quad (27)$$

mit

- c_{Ga} = Gehalt des Analyten [µg/g TM]
- A_{Ga} = Peakfläche des Analyten in der Probe
- b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade
- m = Steigung der Kalibriergerade
- F = Verdünnungsfaktor
- V = Volumen in mL (20 mL)
- E = Probeneinwaage [g]
- F_{RF} = Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse (Formel (1))

2.9 Validierung der Bestimmung von Glykoalkaloiden

Die Methode zur Bestimmung von Glykoalkaloiden wurde hinsichtlich der Validierungsparameter Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie Methoden- und Messpräzision untersucht.

2.9.1 Linearität

Für die Bestimmung von α -Solanin und α -Chaconin wurde die Methode im Bereich von 0,083 $\mu\text{g/mL}$ - 0,833 $\mu\text{g/mL}$ und Solanidin von 0,008 $\mu\text{g/mL}$ - 0,083 $\mu\text{g/mL}$ analysiert. Die Abstände von 10 untersuchten Kalibrierpunkten wurde äquidistant gewählt. Zum Nachweis der Linearität und somit der direkten Proportionalität von Flächen zu Konzentration wurde die Beschreibung über eine lineare und eine Funktion zweiten Grades überprüft. Zur Beurteilung wurden durch lineare und quadratische Regression Kalibrierfunktionen, Residuen und deren Reststandardabweichung berechnet. Anschließend wurde ein Anpassungstest nach Mandel durchgeführt. Residuen bezeichnen den vertikalen Abstand eines Messpunkts zur Kalibrierfunktion und wurden für jeden Kalibrierpunkt nach Formel (28) berechnet (Kromidas 2011).

$$Res_{i, \text{lin.}} = A_i - (m \cdot c_i + b) \quad (28)$$

$$Res_{i, \text{quad.}} = A_i - (d \cdot c_i^2 + e \cdot c_i + f)$$

mit

$Res_{i, \text{lin.}}$ = Residuum des jeweiligen Kalibrierpunkts i (linear)

$Res_{i, \text{quad.}}$ = Residuum des jeweiligen Kalibrierpunkts i (quadratisch)

A_i = Bestimmte Integrationsfläche des Kalibrierpunkts i

c_i = Konzentration des Kalibrierpunkts i

m = Steigung der linearen Kalibriergerade

b = y-Achsenabschnitt der linearen Kalibriergerade

d, e, f = Koeffizienten der quadratischen Kalibriergerade

Durch die Auftragung der berechneten Residuen gegen die Konzentration der Kalibrierpunkte wurde ein Residuenplot erstellt. Als Maß für die Streuung der Signale um die Regressionsgraden wurde die Reststandardabweichung der Residuen nach Formel (29) bestimmt.

$$s_{A, \text{lin.}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Res}_{i, \text{lin.}})^2}{N-2}} \quad (29)$$

$$s_{A, \text{quad.}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Res}_{i, \text{quad.}})^2}{N-3}}$$

mit

$s_{A, \text{lin.}}$ = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

$s_{A, \text{quad.}}$ = Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

$\text{Res}_{i, \text{lin.}}$ = Residuum des jeweiligen Kalibrierpunkts i (linear)

$\text{Res}_{i, \text{quad.}}$ = Residuum des jeweiligen Kalibrierpunkts i (quadratisch)

N = Anzahl der Kalibrierpunkte (hier 10)

Zur Berechnung des Anpassungstest nach Mandel wurde zunächst die Abweichungsvarianz DS^2 aus den Reststandardabweichungen bestimmt (Formel (30)), um anschließend den Prüfwert PW zu berechnen (Formel (31)) (Kromidas 2011). Der Prüfwert wurde mit der F-Tabelle für ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$ mit den Freiheitsgraden $f_1 = 1$, $f_2 = N-3$ verglichen. Daraus ergab sich die Annahme der Linearität bei $PW \leq 12,25$.

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{A, \text{lin.}}^2 - (N-3) \cdot s_{A, \text{quad.}}^2 \quad (30)$$

mit

DS^2 = Differenz der Abweichungsvarianz

$s_{A, \text{lin.}}$ = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

$s_{A, \text{quad.}}$ = Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

N = Anzahl der Kalibrierpunkte (hier 10)

$$PW = \frac{DS^2}{s_{A, \text{quad.}}^2} \quad (31)$$

mit

PW = Prüfwert

DS^2 = Differenz der Abweichungsvarianz

$s_{A, \text{quad.}}$ = Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

Neben dem Linearitätstest nach Mandel wurden die Responsefaktoren über die Quotienten aus gemessenen Signalen der Kalibrierpunkte und der Konzentrationen der Kalibrierpunkte bestimmt. Durch Auftragung der Responsefaktoren gegen die Konzentration der Kalibrierpunkte ergibt sich der Responseplot. Bei gegebener Linearität sollten die Responsefaktoren konstant bleiben (Kromidas 2011). Zusätzlich wurden die relativen Fehler

nach Formel (32) bestimmt. Durch Auftragung der Fehler gegen die Konzentration des Kalibrierpunkts ergibt sich der Fehlerplot, wobei eine maximale Fehlertoleranz von 5% akzeptiert wurde (Kromidas 2011).

$$Fehler_{rel.} = \frac{C_{i, \text{ berechnet}} - C_{i, \text{ Stan.}}}{C_{i, \text{ Stan.}}} \cdot 100 \quad (32)$$

mit

$Fehler_{rel.}$ = Relativer Fehler [%]

$C_{i, \text{ berechnet}}$ = Über die Kalibrierfunktion berechnete Konzentration des Kalibrierpunkts i

$C_{i, \text{ Stan.}}$ = Konzentration des Kalibrierpunkts i

100 = Umrechnungsfaktor auf %

2.9.2 Mess- und Methodenpräzision

Als Maß für die Streuung der Analysenergebnisse wurden die Mess- und Methodenpräzision bestimmt (Kromidas 2011). Zur Ermittlung der Messpräzision wurde ein Kalibrierpunkt sechsfach vermessen. Die Methodenpräzision wurde durch die sechsfache Aufarbeitung einer Realprobe bestimmt. Als Präzisionsmaß wurden die Varianzkoeffizienten der Mess- und Methodenpräzision nach Formel (33) berechnet.

$$V_k = \frac{s}{\bar{c}} \cdot 100 \quad (33)$$

mit

V_k = Varianzkoeffizient [%]

s = Standardabweichung

\bar{c} = Mittelwert der bestimmten Konzentrationen

100 = Umrechnungsfaktor auf %

2.9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (NWG) entspricht der geringsten Analytenmenge, welche mit einer 50%igen Irrtumswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann (DIN 32645). Die Bestimmungsgrenze (BG) beschreibt die kleinste quantifizierbare Menge bei vorgegebener Richtigkeit und Präzision der Methode (DIN 32645). Zur Bestimmung wurden 10-Punkt Kalibrierreihen von α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin dreifach vermessen. Die NWG wurde anhand von Formel (34) und die BG nach Formel (35) berechnet.

$$NWG = \frac{s_{A, \text{lin.}}}{m} \cdot t_p \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{c}_{\text{Stan.}}^2}{Q_c}} \quad (34)$$

$$Q_c = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c}_{\text{Stan.}})^2$$

mit

NWG = Nachweisgrenze

$s_{A, \text{lin.}}$ = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

m = Steigung der linearen Kalibriergerade

t_p = Student-Faktor (Freiheitsgrade: $N-2$, $\alpha = 0,01$; daher 2,90)

R = Anzahl der Messungen: 1

N = Anzahl der Kalibrierpunkte (hier 10)

$\bar{c}_{\text{Stan.}}$ = Mittelwert der Konzentration der Kalibrierpunkte

Q_c = Summe der Abweichungsquadrate der Konzentrationen der Kalibriergrade von den mittleren Standardkonzentration

$c_{i, \text{Stan.}}$ = Konzentration des Kalibrierpunkts i

$$BG = k \cdot \frac{s_{A, \text{lin.}}}{m} \cdot t_p \cdot \sqrt{\frac{1}{R} + \frac{1}{N} + \frac{c_{BG}^2}{Q_c}} \quad (35)$$

mit

BG = Bestimmungsgrenze

k = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

$s_{A, \text{lin.}}$ = Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

m = Steigung der linearen Kalibriergerade

t_p = Student-Faktor (Freiheitsgrade: $N-2$, $\alpha = 0,005$; daher 3,36)

R = Anzahl der Messungen: 1

N = Anzahl der Kalibrierpunkte (hier 10)

c_{BG} = $3 \cdot NWG - \bar{c}_{\text{Stan.}}$

Q_c = Summe der Abweichungsquadrate der Konzentrationen der Kalibriergrade von den mittleren Standardkonzentration

NWG = Nachweisgrenze

$\bar{c}_{\text{Stan.}}$ = Mittelwert der Konzentration der Kalibrierpunkte

2.10 Hydrolyse von Pilzmyzelien

Für die Hydrolyse des Pilzmyzels wurden 2 g gefriergetrocknetes Probenmaterial mit 100 mL Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,5) versetzt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Corolase APC, wobei die Zugabe Menge im Rahmen der Optimierung im Bereich zwischen 0,25 und 4,00 mL variiert wurde (Tabelle 18). Die anschließende Inkubation erfolgte auf einem Inkubationsschüttler bei 200 rpm unter Variation der Inkubationszeit sowie der Inkubationstemperatur (Tabelle 18). Optimierungsversuche wurden in Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 18: Variation der Reaktionsparameter bei der Hydrolyse von Pilzmyzel.

Enzymzugabe [mL/100 mL]	Inkubationstemperatur [°C]	Inkubationsdauer [h]
Variation der Inkubationstemperatur		
1,00	30	20
1,00	40	20
1,00	50	20
1,00	60	20
Variation der Inkubationsdauer		
1,00	40	5
1,00	40	10
1,00	40	15
1,00	40	20
Variation der Enzymzugabe		
0,50	40	20
1,00	40	20
2,00	40	20
3,00	40	20
4,00	40	20

Zur Herstellung von Probenmaterial für die sensorischen Verkostungen wurde die Hydrolyse in vergrößertem Maßstab durchgeführt. Dafür wurden 10 g gefriergetrocknetes und gemörsertes Pilzmyzel in einem 1 L-Erlenmeyerkolben mit 500 mL Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,5) versetzt und, je nach Probe, Corolase APC hinzugegeben. Die Erlenmeyerkolben wurden mit einem Cellulosestopfen verschlossen und zusätzlich mit Verschlussfolie umhüllt. Die enzymatische Hydrolyse erfolgte bei 40 °C für 10 h.

Nach der Inkubation wurden die enzymatischen Reaktionen durch eine 10-minütige Hitzebehandlung der Proben bei 95 °C gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min bei 4500 g und Raumtemperatur zentrifugiert und Überstand und Rückstand voneinander getrennt.

Es wurden Blindwerte ohne Enzymzugabe mitgeführt. Ein Blindwert wurde vor der Inkubation hitzebehandelt (Blindwert Myzel (BW M)) und ein weiterer Blindwert nach der Inkubationszeit (Blindwert Autohydrolyse (BW AH)). Mit den Blindwerten wurde ansonsten analog zu den Proben mit Enzymzugabe verfahren. Eine Übersicht aller verwendeten Probenbezeichnungen ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Übersicht der Hydrolyseproben und Kontrollen.

Abkürzung	Probe	Enzymzugabe [mL/ 100 mL]	Hitzeinaktivierung
BW M	Blindwert Myzel	-	Vor der Inkubation
BW AH	Blindwert Autohydrolyse	-	Nach der Inkubation
BW ME4	Blindwert Myzel Enzym 4 mL	4 mL	Vor der Inkubation
ME1	Myzel Enzym 1 mL	1 mL	Nach der Inkubation
ME4	Myzel Enzym 4 mL	4 mL	Nach der Inkubation
E1	Enzym 1 mL	1 mL	Vor der Verwendung, keine Inkubation

2.10.1 Bestimmung der Proteaseaktivität mittels Azocasein-Assay

Proteaseaktivitäten wurden für den Kulturüberstand nach Kultivierung von *F. velutipes* auf KT (KT FVE) sowie für die Enzyme Corolase APC, Corolase 7089 und Corolase 8000 bestimmt. Dazu wurde ein Azocasein-Assay nach Kilcawley et al. durchgeführt (Kilcawley et al. 2002). Es wurden Stammlösungen mit 1,25 μL für Corolase APC sowie Corolase 8000 und 5 μL für Corolase 7089 und 100 mL Phosphatpuffer (39,39 g di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, 3,73 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 L mit VE-Wasser, pH 7,5) hergestellt. 160 μL der auf 40 °C temperierten Azocasein-Lösung (0,01 g Azocasein, 100 mL 1 mM Calciumchlorid-Lösung, 900 mL 100 mM Phosphatpuffer) wurden zu 40 μL Enzym-Puffer-Lösung oder 40 μL des Kulturüberstands gegeben. Der pH-Wert des für die Azocasein-Lösung verwendeten Puffers wurde im Rahmen der Optimierung variiert (2.10.1.1). Nach der Zugabe wurde der Ansatz mittels Vortex-Schüttelgerät für 30 s homogenisiert und für 15 min bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde das nicht umgesetzte Azocasein mit 300 μL 5%iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt und die Lösung 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 366 nm.

Es wurde ein Blindwert mitgeführt, bei dem vor der Inkubation 5%ige TCA-Lösung zugesetzt und ansonsten analog zu den Proben verfahren wurde. Alle Bestimmungen erfolgten in Triplikaten. Die Einheit der Enzymaktivität wurde definiert als die Enzymmenge, die unter den verwendeten Bedingungen eine Extinktionsänderung von 0,01 pro Minute bedingt.

Die Peptidaseaktivität A_P wurde mit Formel (36) bestimmt.

$$A_P = \frac{(E_P - E_{Bw}) \cdot 1}{V_P \cdot t \cdot 0,01} \quad (36)$$

mit

A_P = Proteaseaktivität [U/mL]

E_P = Extinktion der Probenlösung

E_{Bw} = Extinktion der Blindwertlösung

1 = 1 min

V_P = Eingesetztes Probenvolumen (hier 0,04 mL)

t = Inkubationszeit [min]

0,01 = Extinktionsdifferenz, welche bei 1 U erreicht wird

2.10.1.1 Bestimmung der pH-Optima

Die pH-Optima von Corolase APC, Corolase 7089 und Corolase 8000 wurden bei einer Temperatur von 40 °C und einer Inkubationszeit von 15 min bestimmt. Untersucht wurde der Bereich zwischen pH-Wert 5 und 12 (0,1 M Phosphatpuffer eingestellt mit Phosphorsäure).

2.10.1.2 Bestimmung der Temperatur-Optima

Die Bestimmung der Temperatur-Optima der Enzyme Corolase APC, Corolase 7089 und Corolase 8000 erfolgte bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Inkubationszeit von 15 min. Es wurden Inkubationstemperaturen von 30, 40, 50, 60, 70 und 80 °C untersucht.

2.11 Sensorische Prüfungen

Die sensorischen Prüfungen wurden in einem Prüflabor nach DIN 10962 durchgeführt. Der Prüfraum war geruchsneutral und frei von Lärm. Zur Neutralisation wurden in allen sensorischen Prüfungen Leitungswasser und Matzen zur Verfügung gestellt. Alle zur sensorischen Prüfung vorgelegten Proben waren mit einem zufälligen dreistelligen Zahlencode kodiert. Das zuvor geschulte Panel umfasste 24 Prüfpersonen und setzte sich aus 11 Männern und 13 Frauen im Alter von 23 bis 44 Jahren zusammen. Das Durchschnittsalter betrug 28 Jahre und alle Prüfpersonen waren Nichtraucher. Bei den Verkostungen wurden Nasenklammern verwendet.

2.11.1 Standardlösungen für die sensorische Prüfung

Für Schulungszwecke und als Vergleichsproben wurden Stammlösungen der Grundgeschmacksarten hergestellt. Die restlichen Substanzen wurden direkt in Trinkwasser gelöst (Tabelle 20).

Tabelle 20: Verwendete Substanzen für die Herstellung der Stammlösungen der Grundgeschmacksrichtungen und deren Konzentrationen.

Geschmacksart	Substanz	Konzentration
Bitter	Coffein	10 g/L
Salzig	Natriumchlorid	100 g/L
Sauer	Citronensäure Monohydrat	10 g/L
Süß	Saccharose	100 g/L
Umami	Natrium-L-glutamat Monohydrat	20 g/L

Die Stammlösungen wurden auf zehn verschiedene Konzentrationen (D10-D1) mit Trinkwasser verdünnt (Tabelle 21). Diese wurden für die Bestimmung der Reiz- und Erkennungsschwellenwerte benötigt (2.11.2). Zusätzlich wurden Lösungen für die Prüfung auf Erkennung der verschiedenen Geschmacksarten angesetzt (E) (2.11.3), welche auch als Vergleichslösungen bei der Bewertung der Hydrolyseproben eingesetzt wurden (2.11.6).

Tabelle 21: Konzentrationen der Geschmacksstofflösungen (D10-D1; E) bitter, salzig, sauer, süß und umami. D10-D1: Für die Bestimmung der Reiz- und Erkennungsschwellen; E: zur Prüfung auf Erkennung/Vergleichslösungen.

Verdünnung	Bitter [g/L]	Salzig [g/L]	Sauer [g/L]	Süß [g/L]	Umami [g/L]
D10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
D9	0,025	0,050	0,050	0,500	0,080
D8	0,050	0,200	0,100	1,000	0,120
D7	0,075	0,350	0,150	2,000	0,180
D6	0,100	0,500	0,200	3,000	0,240
D5	0,125	0,650	0,250	4,000	0,360
D4	0,150	0,800	0,300	5,000	0,500
D3	0,175	0,950	0,350	6,000	0,700
D2	0,200	1,100	0,400	7,000	1,000
D1	0,225	1,250	0,450	8,000	1,300

2.11.2 Reiz- und Erkennungsschwellenprüfung

Die Reiz- und Erkennungsschwellen der Grundgeschmacksarten. Die Proben wurden in durchsichtigen Plastikgefäßen bereitgestellt. Für die Reiz- und Erkennungsschwellenprüfungen wurden die Proben als zehn Triaden in aufsteigender Konzentration (Tabelle 21, D10-D1) vorgelegt. Jede Triade bestand aus zwei Blindwertproben (Trinkwasser) und einer Probe mit Geschmacksstoff. Die Prüfproben sollten in der vorgegebenen Reihenfolge und bis zur höchsten Konzentrationsstufe verkostet werden, wobei Rückverkostungen nicht gestattet waren. Zur Berechnung der Schwellenwerte wurde der Mittelwert zwischen der erkannten Konzentrationsstufe und der darunter liegenden Konzentrationsstufe für jede Prüfperson bestimmt. Anschließend wurde aus diesen Werten

der Mittelwert aller Prüfpersonen berechnet. Die Spannweiten geben den insgesamt niedrigsten und insgesamt höchsten Schwellenwert an.

2.11.3 Prüfung auf Erkennung der Geschmacksqualitäten

Bei der Geschmackserkennungsprüfung wurden die Geschmacksqualitäten salzig, bitter, sauer und umami in festgelegten Konzentrationen vorgelegt (Tabelle 21, E). Die Proben sollten anschließend bezüglich ihres Geschmacks richtig zugeordnet werden.

2.11.4 Herstellung von Gemüsebrühe

Für die Zubereitung von Gemüsebrühe wurden 10 Möhren, 10 Pastinaken, 6 Zwiebeln, 3 Staudensellerie, 6 Lauch und 6 Bund Petersilie gewaschen und in Würfel oder Ringe geschnitten. Das Gemüse wurde für 4 min mit 120 mL Sonnenblumenöl bei starker Hitze gedünstet. Anschließend wurden 8 L Wasser hinzugegeben. Die Brühe wurde aufgekocht und bei geschlossenem Deckel für 1 Stunde bei geringer Hitze gekocht. Das Gemüse wurde mit einem Sieb von der Flüssigkeit getrennt und 5 g/L Tafelsalz zugegeben. Die Gemüsebrühe wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.11.5 Dreieckstest auf Unterschied

Im Dreieckstest auf Unterschied wurden die Proben BW M, BW AH, ME1, ME4 und BW E4 untersucht. Die verschiedenen Proben sind unter Tabelle 19 beschrieben.

Es wurden je zwei Gemüsebrühe-Proben (GB) mit 8 mL Gemüsebrühe und 2 mL Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,5) gereicht sowie eine abweichende Probe (8 mL Gemüsebrühe, 2 mL Probenlösung). Alle Proben wurden im Backofen auf 60 °C temperiert und anschließend erwärmt ausgegeben. Die Prüfpersonen sollten die abweichende Probe bestimmen. Zur Auswertung des Dreieckstests wurde ein α -Risiko von 0,05 definiert.

2.11.6 Beschreibende Prüfung

Die hydrolysierten Proben in Gemüsebrühe und die Gemüsebrühe des Dreieckstests wurden in einer beschreibenden Prüfung bewertet. Für eine beschreibende Prüfung in Wasser wurden die Hydrolysate und Kontrollen 1:5 mit Trinkwasser verdünnt und es wurden ca. 10 mL pro Probe ausgegeben. Zusätzlich wurden Standardlösungen für die Geschmacksattribute bitter, salzig, sauer, süß und umami gereicht (Tabelle 21, E). Die Prüfpersonen sollten anschließend die Intensitäten der abweichenden Probe sowie der Gemüsebrühe-Probe mit den Standardlösungen in Bezug auf die Geschmacksattribute vergleichen, wobei die Intensitäten

der Standardlösungen auf 5 festgelegt wurden. Die Intensitäten wurden auf einer Skala von 0 bis 10 eingeordnet. Zusätzlich sollten die Vollmundigkeit und der Gesamteindruck der Proben auf der gleichen Skala bewertet werden.

2.11.7 Produkttest

Für eine Produktentwicklung wurden die Biomassen von *F. velutipes* und *P. pulmonarius* nach Kultivierung auf Kartoffeltrester mit einer Substratkonzentration von 30 g/L verwendet. Der Kartoffeltrester wurde im Bioreaktor fermentiert. Nach der Ernte wurde die Biomasse bis zur Verwendung tiefgekühlt gelagert und anschließend im warmen Wasserbad aufgetaut. Zu 50 g Biomasse wurden 10 g grobes Sojamehl, 5 g Weizenmehl (Typ 405) und 0,5 g Tafelsalz gegeben. Anschließend wurden die Zutaten im Thermomix für 15 min auf Stufe 2 zu einem Teig vermischt. Als Kontrolle wurde Kartoffeltrester anstelle der Biomasse verwendet. Aus dem Teig wurden frikadellenförmige Portionen mit ca. 4 cm Durchmesser geformt und von beiden Seiten in einer Pfanne mit Sonnenblumenöl angebraten.

Die Produkte wurden von 10 Probanden sensorisch geprüft, wobei Aussehen, Mundgefühl, Geschmack, Geruch und Gesamteindruck auf einer Skala von 0-7 bewertet wurden. Die Proben wurden mit einem dreistelligen Prüfcode versehen und parallel in der Prüfkammer gereicht.

3 Ergebnisse

3.1 Substratzusammensetzung

Den größten Anteil der Substrate machte der Wassergehalt aus (KS: $82,8 \pm 3,5\%$; KT: $71,5 \pm 1,1\%$; KP: $86,5 \pm 0,2\%$). Die lyophilisierten Substrate wurden hinsichtlich ihres Stickstoff-, Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalts mittels Elementaranalyse untersucht (Tabelle 22). Angegeben ist zusätzlich das C/N-Verhältnis.

Tabelle 22: Elementaranalyse der Substrate Kartoffelschale, Kartoffeltrester und Kartoffelpülpe. Angegeben sind der Stickstoffgehalt (N), der Kohlenstoffgehalt (C) und der Wasserstoffgehalt (H) [%] sowie das C/N-Verhältnis ($n=2$).

	N%	C%	H%	C/N-Verhältnis
Kartoffelschale	$1,76 \pm 0,01$	$39,83 \pm 0,04$	$6,32 \pm 0,04$	22,6
Kartoffeltrester	$1,17 \pm 0,01$	$40,80 \pm 0,04$	$6,36 \pm 0,01$	34,9
Kartoffelpülpe	$1,23 \pm 0,06$	$40,03 \pm 0,03$	$6,38 \pm 0,02$	32,7

Es wurden Rohasche, Rohfettgehalt, Rohproteingehalt, Reinproteingehalt, Stärkegehalt und Ballaststoffgehalt (mit Unterteilung in unlösliche und lösliche Ballaststoffe) der getrockneten Substrate bestimmt (Tabelle 23). Die Faktoren zur Bestimmung des Rohproteingehalts (KS: 6,53; KT: 6,53; KP: 6,58) sowie die Reinproteingehalte wurden mittels Aminosäureanalytik ermittelt.

Tabelle 23: Chemische Zusammensetzung von Kartoffelschalen, Kartoffeltrester und industrieller Kartoffelpülpe; n.b.: nicht bestimmt, ($n=3$).

	Kartoffelschale [g/100 g TM]	Kartoffeltrester [g/100 g TM]	Kartoffelpülpe [g/100 g TM]
Rohasche	$6,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$
Rohfett	$0,3 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
Rohprotein	$13,0 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,2$
Reinprotein	$9,5 \pm 1,3$	$5,3 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,1$
Stärke	$51,9 \pm 4,3$	$69,0 \pm 0,8$	$14,9 \pm 0,7$
Ballaststoffe	$28,3 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,3$	$66,4 \pm 0,8$
davon unlöslich	$25,3 \pm 0,3$	$13,6 \pm 0,1$	$54,5 \pm 0,1$
davon löslich	$3,0 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,2$	$11,9 \pm 0,7$
davon Pektin	n.b.	$0,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,3$

Der verwendete Kartoffeltrester hatte einen deutlich höheren Stärkegehalt als die industrielle Kartoffelpülpe, wohingegen der Ballaststoffgehalt von Kartoffelpülpe höher als der von Kartoffeltrester war. Für Kartoffeltrester und Kartoffelpülpe wurden zusätzlich der Pektingehalt und der a_w -Wert bestimmt. Der a_w -Wert der Kartoffelpülpe betrug $0,92 \pm 0,01$ und der a_w -Wert für Kartoffeltrester $0,91 \pm 0,00$.

3.2 Fermentation der Kartoffelnebenströme

3.2.1 Screening in Emerskultur

Um Basidiomyceten für die Fermentation der Nebenströme auszuwählen, wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt. 100 verschiedene Pilzstämmen wurden aus der hauseigenen Stammsammlung ausgewählt, welche anschließend in einem Screening in Emerskultur getestet wurden (Tabelle 5). Nach Ende des Screenings wurde aufgrund der Angaben zu Geruchsurteil und Geruchsintensität sowie der Geruchsbeschreibung über die Screeningzeit ein Gesamturteil über den Geruchseindruck durch die Einteilung in „positiv“, „neutral“ oder „negativ“ vorgenommen (2.6.5). Abbildung 3 zeigt die prozentualen Anteile der positiv, neutral und negativ bewerteten Pilze auf den Medien MEA, KSA und KTA.

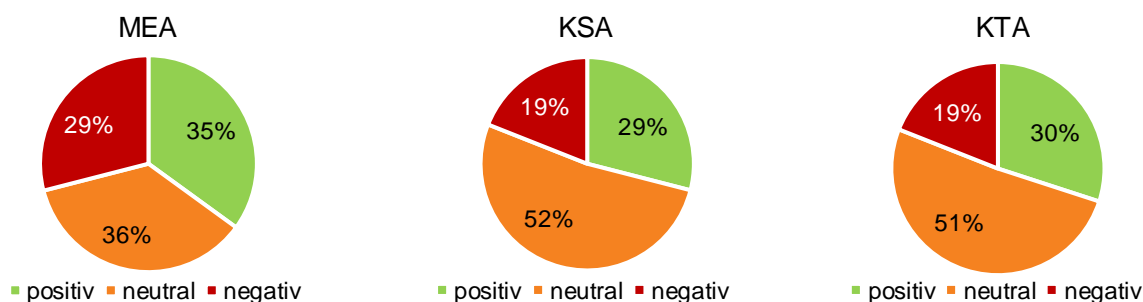


Abbildung 3: Prozentuale Anteile der Geruchsbewertungen der Pilzstämmen bei Kultur auf verschiedenen Substraten. MEA: Malzextrakt-Agar; KSA: Kartoffelschalen-Agar; KTA: Kartoffeltrester-Agar.

Die Gesamtbewertungen für den Geruchseindruck waren insgesamt auf KSA und KTA sehr ähnlich. 80% der Pilze wurden in der Gesamtbewertung auf KTA und KSA gleich bewertet und bei 19% ergaben sich leicht unterschiedliche Bewertungen (Tabelle 24). Beim Vergleich der Pilze auf MEA und den Kartoffelmedien wurden insgesamt 68% gleich bewertet und bei 29% kam es zu geringen Abweichungen in der Gesamtbewertung. Der Anteil der mit „neutral“ bewerteten Pilze war auf den Kartoffelmedien deutlich höher als auf MEA. Der prozentuale Anteil der negativ bewerteten Pilzstämmen war auf MEA um 10% höher und der Anteil der positiv bewerteten Stämme um 5-6% höher als auf KSA und KTA.

Zusätzlich wurde die Geruchsbewertung auf verschiedenen Substraten hinsichtlich der einzelnen Pilze bewertet (Tabelle 24). Dafür wurden die Bewertungen für jeden Pilz auf den drei Substraten verglichen. Die genaue Vorgehensweise ist unter 2.6.7 beschrieben.

Tabelle 24: Vergleich der Geruchsbewertung der einzelnen Pilze bei Emerskultivierung auf verschiedenen Medien. MEA: Malzextrakt-Agar; KSA: Kartoffelschalen-Agar; KTA: Kartoffeltrester-Agar.

	KSA im Vergleich zu MEA	KTA im Vergleich zu MEA	KTA im Vergleich zu KSA
deutlich negativer	1%	0%	0%
gering negativer	14%	15%	10%
unverändert	68%	68%	80%
gering positiver	15%	14%	9%
deutlich positiver	2%	3%	1%

Für die Gesamtbeschreibung des Geruchs wurden die über 24 Tage genannten Attribute in einer Beschreibung zusammengefasst. Für den Vergleich der Gerüche auf verschiedenen Medien wurde der prozentuelle Anteil für die häufigsten genannten Attribute in Abhängigkeit zum Medium bestimmt (Abbildung 4).

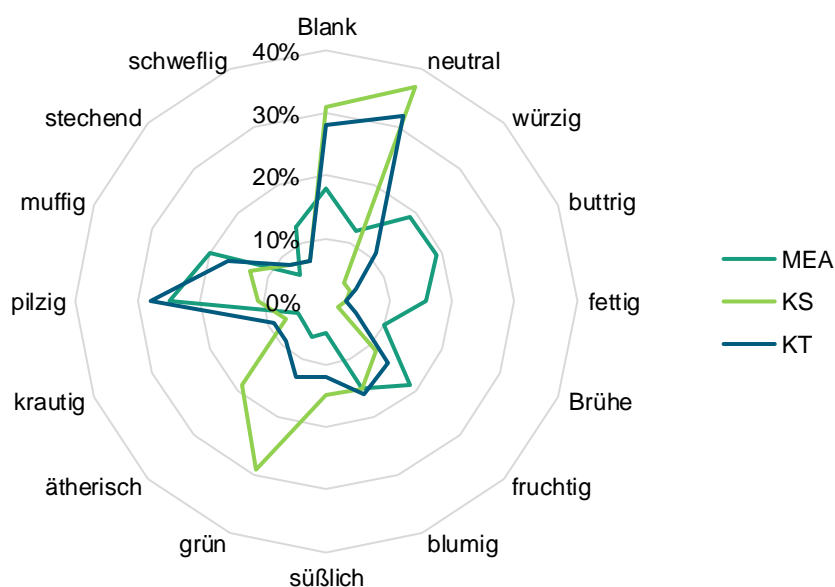


Abbildung 4: Prozentuale Anteile der am häufigsten verwendeten Geruchsattribute nach Wachstum auf den verschiedenen Medien. MEA: Malzextrakt-Agar; KSA: Kartoffelschalen-Agar; KTA: Kartoffeltrester-Agar.

Um das Wachstum der Pilzstämmen auf den verschiedenen Medien zu beurteilen, wurde jeden zweiten Tag der Durchmesser des Pilzmyzels in der Emerskultur gemessen sowie der Tag festgehalten, an dem die Agarplatten vollständig bewachsen waren. Um die Wachstumsgeschwindigkeiten vergleichen zu können, wurde der prozentuale Anteil der Pilzstämmen bestimmt, die an den verschiedenen Messzeitpunkten die Platte vollständig bewachsen hatten (Abbildung 5). Bis zum 24. Kulturtag bewachsen 34% der Pilzstämmen auf MEA die Platten nicht vollständig, 32% bewachsen sie auf KSA nicht vollständig und 29% auf KTA.

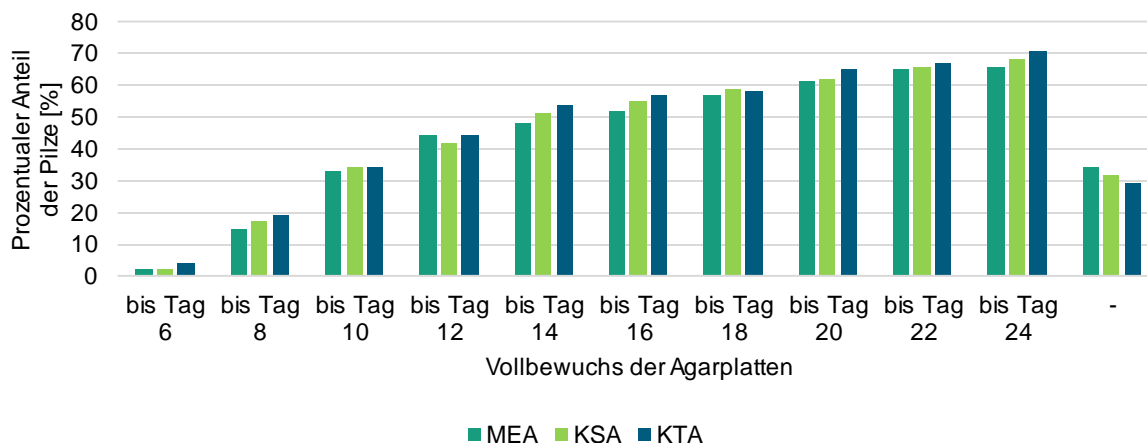


Abbildung 5: Wachstum in Emerskultur auf den verschiedenen Medien. Prozentuale Anteile der Pilzstämmen, die bis zu den verschiedenen Messzeitpunkten die Agarplatten vollständig bewuchsen (Tag 2-24); -: kein vollständiger Bewuchs über die Versuchsdauer.

Das Wachstum wurde zusätzlich für die einzelnen Pilze auf KSA und KTA miteinander verglichen. Hierzu erfolgte die Einteilung der gesamten Datensätze zunächst in Viertel, anschließend folgte der Vergleich der Zugehörigkeit einzelner Pilze zu diesen Vierteln auf verschiedenen Medien (2.6.7). Bei 72% der Pilze lag das Wachstum im Vergleich zur Gesamtgruppe auf beiden Substraten im selben Viertel und bei 24% wurde eine geringe Abweichung beobachtet. Bei keinem Pilz lag das Wachstum auf einem Substrat im untersten Viertel im Vergleich zur Gesamtgruppe und auf dem anderen Substrat im obersten Viertel. Für das Screening in Submerskultur wurden 50 Pilze ausgewählt (Tabelle 5), welche schnelles Wachstum auf Agarplatten zeigten, eine neutrale oder positive Geruchsbewertung aufwiesen oder aufgrund der Literaturrecherche von besonderem Interesse waren.

3.2.2 Screening in Submerskultur

Alle Vorkulturen wurden von einer zu ca. dreiviertel bewachsenen Agarplatte beimpft, die Vorkulturen für eine Woche inkubiert, die Hauptkulturen in KS und KT (20 g/L Substratkonzentration) angesetzt und diese ebenfalls für eine Woche inkubiert (2.6.2-2.6.4). Die Geruchsbewertungen der Kulturen über den Kultivierungszeitraum wurden in „positiv“, „neutral“ und „negativ“ eingeteilt (Abbildung 6).

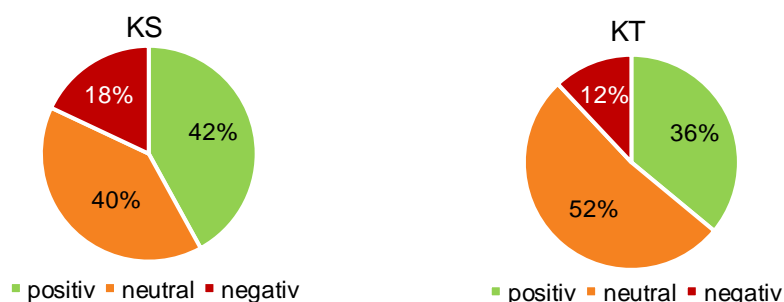


Abbildung 6: Prozentuale Anteile der Geruchsbewertungen der Pilzstämmen bei Wachstum auf verschiedenen Substraten. KS: Kartoffelschalenmedium; KT: Kartoffeltrestmedium.

Die Geruchsbewertung nach Kultur auf KS fiel zu größeren Teilen positiv oder negativ aus, als auf KT. Auf KS wurden 40% der Kulturen als neutral bewertet, während auf KT insgesamt 52% der Kulturen als neutral bewertet wurden. Zusätzlich zur Gesamtbewertung wurde die Häufigkeit der Geruchsattribute bei der Beschreibung der Kulturen analysiert (Abbildung 7).

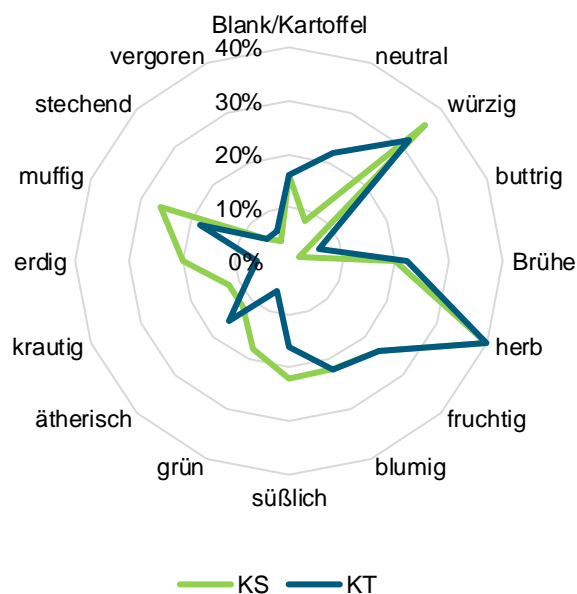


Abbildung 7: Prozentuale Anteile der am häufigsten verwendeten Geruchsattribute bei Wachstum auf verschiedenen Substraten. KS: Kartoffelschalenmedium; KT: Kartoffeltrestermedium.

Die Gerüche der Kulturen auf KS wurden insgesamt häufiger mit den Attributen muffig, erdig, grün und süßlich beschrieben. Nach Wachstum auf KT wurde öfter ein neutraler Geruch oder der Geruch des Medienblanks wahrgenommen.

Nach Submerskultivierung wurde die Biotrockenmasse (BTM) für alle Pilze und für die Kontrollmedien bestimmt (Abbildung 8).

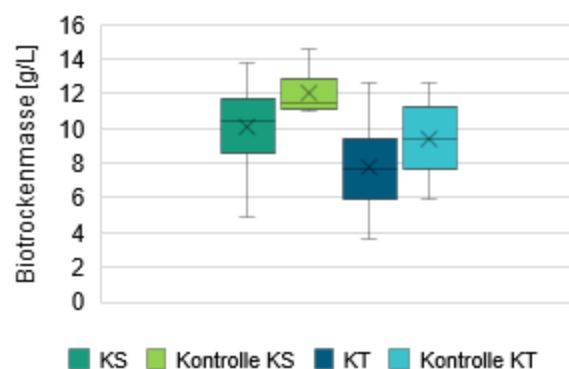


Abbildung 8: Verteilung der Biotrockenmassen bei Kultur auf Kartoffelschalenmedium (KS) und Kartoffeltrestermedium (KT) sowie der Kontrollmedien [g/L].

Insgesamt lagen die BTM mit KS sowohl für die Fermentate ($P: < 0.0001$) als auch für die Medienkontrollen ($P: 0.0101$) signifikant über denen mit KT. Die BTM der Kontrollmedien

lagen höher als die BTM nach Kultivierung. Für die Fermentate auf KS und deren Kontrolle war dieser Unterschied signifikant ($P: 0.0023$), für die Fermentate auf KT und die Medienkontrolle KT war der Unterschied nicht signifikant ($P: 0.0642$).

Zusätzlich wurde der Stickstoffgehalt der Kulturen betrachtet, wobei dieser sowohl in g/100 g TM als auch in g/L berechnet wurde (Abbildung 9). Der Stickstoffgehalt berechnet in g/L bezieht in der Rechnung zusätzlich die Biotrockenmasse ein (Methode 2.8.12).

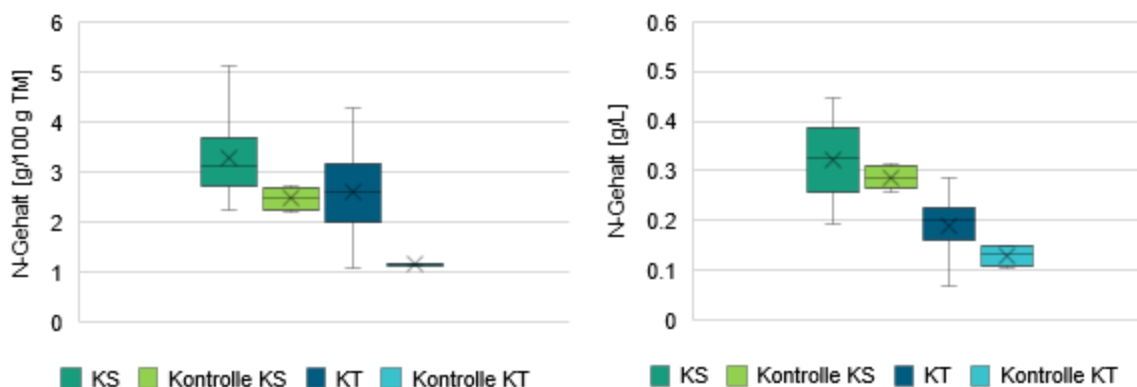


Abbildung 9: Verteilung der Stickstoffgehalte nach Kultivierung in Kartoffelschalenmedium (KS) und Kartoffeltrestermedium (KT) sowie der Kontrollmedien [g/100 g TM; g/L].

Die Stickstoffgehalte in Bezug auf die Trockenmasse waren nach Fermentation signifikant höher als die Stickstoffgehalte der Kontrollmedien (P für KS und KT <0.0001). Bei der Betrachtung des Stickstoffgehalts in g/L war eine Erhöhung des Stickstoffgehalts nach Kultur auf KT signifikant, bei Kultur auf KS nicht.

Die Datensätze wurden für die Parameter Biotrockenmasse, Stickstoffgehalt [g/100 g TM] und Stickstoffgehalt [g/L] in Viertel eingeteilt und die Zugehörigkeiten der verschiedenen Pilze auf den Medien KT und KS miteinander verglichen (Tabelle 25; Vorgehensweise unter 2.6.7).

Tabelle 25: Vergleich der Parameter Biotrockenmasse [g/L] und Stickstoffgehalt [g/100 g TM; g/L] der einzelnen Pilze bei Submerskultivierung auf verschiedenen Substraten. KS: Kartoffelschalenmedium; KT: Kartoffeltrestermedium. Kategorien zur Einteilung unter 2.6.7.

	Biotrockenmasse auf KT im Vergleich zu KS	N-Gehalt [g/100 g TM] KT im Vergleich zu KS	N-Gehalt [g/L] KT im Vergleich zu KS
deutlich niedriger	0%	0%	12%
niedriger	6%	4%	8%
gering niedriger	22%	26%	14%
unverändert	46%	52%	22%
gering höher	8%	4%	26%
höher	18%	14%	14%
deutlich höher	0%	0%	4%

Durch dieses Vorgehen konnte der Einfluss des Substrats auf die verschiedenen Parameter analysiert werden. Für die Betrachtung der Biotrockenmasse wurden 46% der Pilze dem gleichen Viertel im Vergleich zur gesamten Stichprobe zugeteilt und es kam in keinem Fall zu deutlichen Änderungen in der Gruppeneinteilung. Dies war auch der Fall bei Betrachtung des Stickstoffgehalts [g/100 g TM]. Hier wurden 52% unabhängig vom Substrat in das gleiche Viertel eingeteilt. Zu größeren Änderungen in der Einteilung kam es bei Betrachtung des Stickstoffgehalts in [g/L]. Die Einteilung war nur in 22% substratunabhängig.

3.2.3 Vergleich der Emers- und Submerskultivierungen

Um zu untersuchen, ob die Ergebnisse des Emersscreenings Vorhersagen über die Ergebnisse des Submersscreenings zulassen, wurden die Daten zur Bewertung des Geruchseindrucks sowie die Bewertungen des Wachstums beider Screenings miteinander verglichen (Tabelle 26). Die Kriterien zur Einteilung in die Gruppenzugehörigkeiten sind unter Methode 2.6.7 aufgeführt.

Tabelle 26: Vergleich der Geruchsbewertung und des Wachstums der einzelnen Pilze nach Emerskultivierung und Submerskultivierung auf den Kartoffelmedien. KSA: Kartoffelschalen-Agar; KS: Kartoffelschalenmedium; KTA: Kartoffeltrester-Agar; KT: Kartoffeltrestermedium. Kategorien zur Einteilung unter 2.6.7.

	Geruchseindruck KS (submers) im Vergleich zu KSA (emers)	Geruchseindruck KT (submers) im Vergleich zu KTA (emers)
deutlich negativer	4%	0%
gering negativer	16%	22%
unverändert	46%	48%
gering positiver	24%	28%
deutlich positiver	10%	2%
	Wachstum KS (submers) im Vergleich zu KSA (emers)	Wachstum KT (submers) im Vergleich zu KTA (emers)
deutlich niedriger	4%	4%
niedriger	6%	10%
gering niedriger	20%	22%
unverändert	38%	26%
gering höher	16%	20%
höher	10%	12%
deutlich höher	6%	6%

Die Gruppeneinteilung eines Fermentats nach Bewertung des Geruchseindrucks unterschied sich zwischen Submers- und Emerskultivierung mit 46% (KS) und 48% (KT) nicht. Bei der Bewertung des Wachstums im Vergleich zur Gesamtstichprobe kam es in 38% (KS) und 26% (KT) zu keiner Änderung in Abhängigkeit der Kultivierungsform.

3.2.4 Engere Pilzauswahl

Aufgrund der erhobenen Daten wurden *Kuehneromyces mutabilis* (KUM), *Hericium coralloides* (HCO), *Flammulina velutipes* (FVE), *Macrolepiota procera* (MRP) und *Pleurotus pulmonarius* (PSP) für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Es wurden sechs Personen gebeten, den Geruch der Kulturen zu beschreiben und den Gesamteindruck zu bewerten (1=negativ; 5=positiv). Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Geruchsbeschreibung und Bewertung nach Kultivierung der Basidiomyceten *Macrolepiota procera* (MRP), *Kuehneromyces mutabilis* (KUM), *Hericium coralloides* (HCO), *Flammulina velutipes* (FVE) und *Pleurotus pulmonarius* (PSP) auf Kartoffelschalenmedium (KS) und Kartoffelrestmedium (KT), ($n=6$).

Pilz	KS		KT	
	Beschreibung	Bewertung	Beschreibung	Bewertung
MPR	würzig, Gemüse, Brot, neutral, pilzig, leicht modrig	3,4 ± 0,7	würzig, Gemüse, süßlich, pilzig	3,2 ± 0,5
KUM	fruchtig, blumig, erdig, leicht pilzig	3,4 ± 1,4	pilzig, muffig, würzig, süßlich	3,0 ± 1,0
HCO	herb, muffig, erdig, pilzig, würzig, süßlich	2,1 ± 1,7	süßlich, Vanille, getreideartig, strohig, später muffig	3,2 ± 1,0
FVE	würzig, herb, grün, leicht muffig, neutral, erdig	3,0 ± 0,8	erst herb, würzig, neutral, dann grün, frisch	3,2 ± 1,3
PSP	Waldmeister, süßlich, Bittermandel, Kirschwasser, blumig	4,6 ± 0,6	Waldmeister, Mandel, süßlich Bittermandel, Kirschwasser, frisch	4,6 ± 1,0

Zur näheren Analyse wurden die Pilzgehalte der Fermentate von KS und KT mit KUM, MPR, FVE und PSP bestimmt. Dazu wurden die Ergosterolgehalte nach Kultivierung auf KS und KT bestimmt und in Bezug auf die Ergosterolgehalte nach Kultivierung auf ME gesetzt (Methode 2.8.17). Neben den Pilzanteilen sind in Abbildung 10 die Biotrockenmassen und die Stickstoffgehalte der Fermentate dargestellt. Die Rohproteingehalte wurden durch die Multiplikation der Stickstoffgehalt mit dem Faktor 6,25 abgeschätzt. Für die weitere Arbeit wurden *F. velutipes* und *P. pulmonarius* ausgewählt.

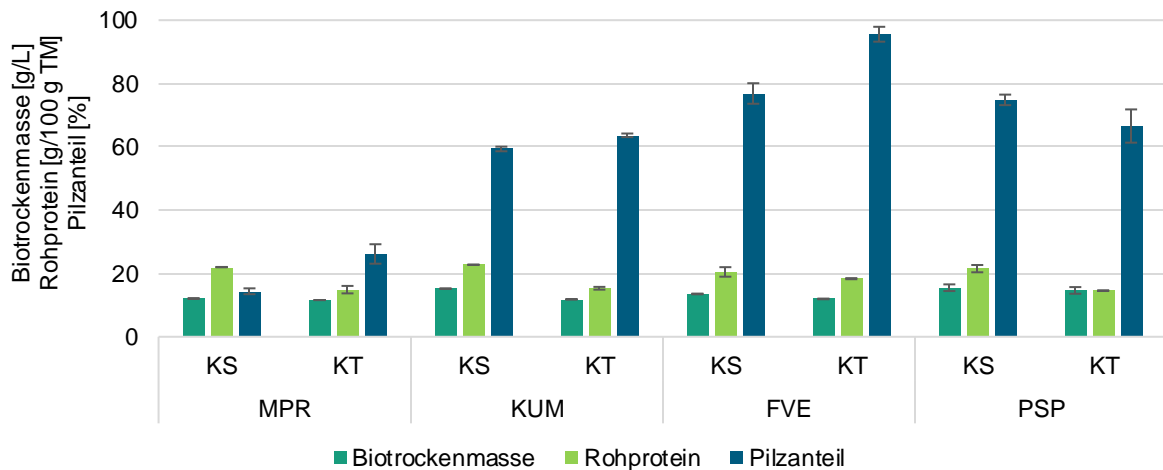


Abbildung 10: Prozentuale Pilzanteile, Biotrockenmassen [g/L] und Rohproteingehalte [g/100 g TM] nach Kultur auf Kartoffelschalenmedium (KS) und Kartoffeltrestermedium (KT). Bestimmung der Pilzanteile durch den Vergleich mit dem Ergosterolgehalt auf Malzextrakt (ME). MPR: *Macrolepiota procera* KUM: *Kuehneromyces mutabilis*, FVE: *Flammulina velutipes*, PSP: *Pleurotus pulmonarius*, (n=2).

3.2.5 Zeitreihen auf Malzextraktmedium

Um das Pilzwachstum bewerten zu können, wurde der Biomarker Ergosterol zur Bestimmung des Pilzanteils verwendet (Methode 2.8.17). Der Ergosterolgehalt der Fermentate der Pilze *P. pulmonarius* und *F. velutipes* auf Malzextrakt wurde für die Kulturtage 2-12 bestimmt. Die Ergosterolgehalte nach Kultur von *P. pulmonarius* sind in Abbildung 11 dargestellt.

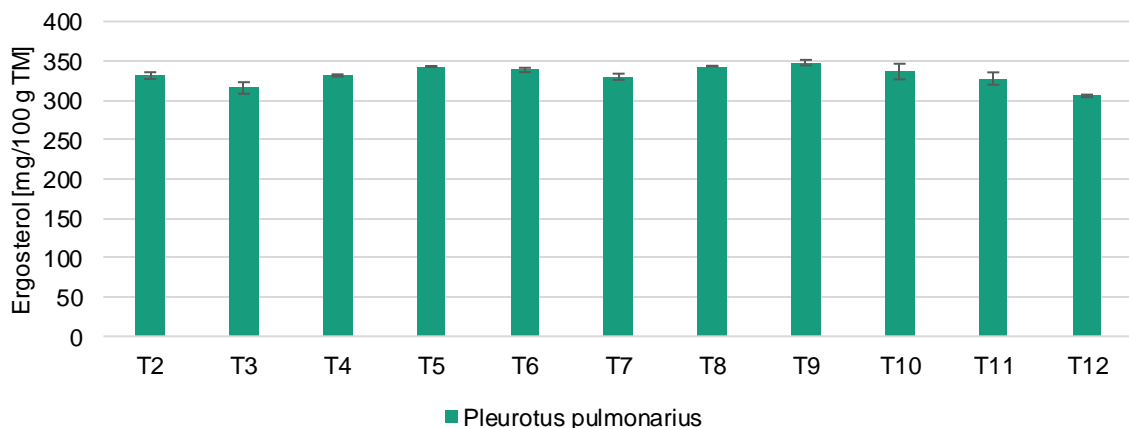


Abbildung 11: Zeitreihe auf Malzextrakt von *Pleurotus pulmonarius* an den Kulturtagen 2-12 (T2-T12). Gezeigt ist der Ergosterolgehalt [mg/100 g TM], (n=2).

Die Ergosterolgehalte nach Kultur von *P. pulmonarius* auf Malzextrakt blieben über den Kultivierungszeitraum weitgehend konstant. Der Mittelwert der Ergosterolgehalte über alle Kulturtage betrug $332,79 \pm 12,46$ mg/100 g TM. Der höchste Ergosterolgehalt wurde an Tag neun bestimmt und wich mit $347,7 \pm 3,5$ mg/100 g TM nur leicht vom Mittelwert der Ergosterolgehalte ab. Daher wurde der Mittelwert der Ergosterolgehalte über den gesamten

Kultivierungszeitraum als 100% Pilzanteil angenommen und die Pilzanteile auf den Nebenströmen prozentual zu diesem Wert bestimmt.

Die Ergosterolgehalte nach Kultur von *F. velutipes* auf Malzextrakt waren insgesamt deutlich höher als die Ergosterolgehalte nach Kultivierung von *P. pulmonarius* (Abbildung 12).

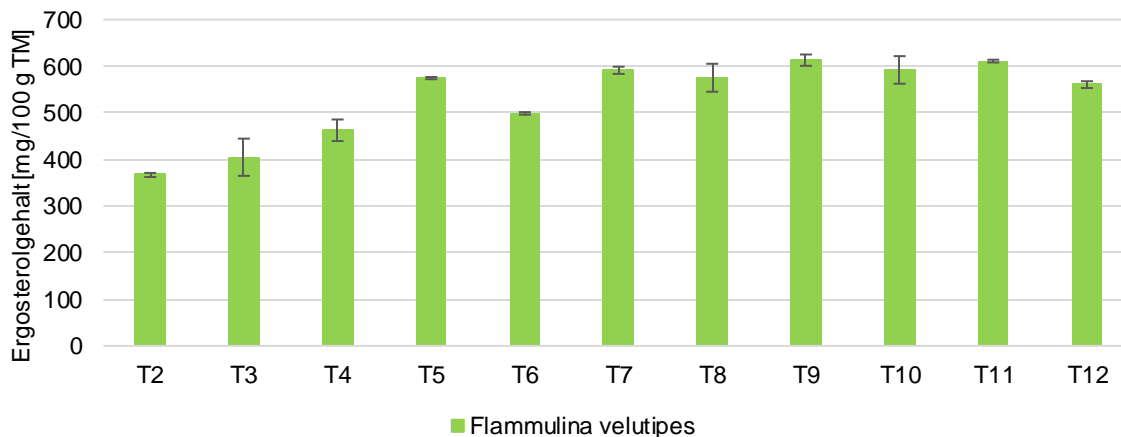


Abbildung 12: Zeitreihe auf Malzextrakt von *Flammulina velutipes* an den Kulturtagen 2-12 (T2-T12). Gezeigt ist der Ergosterolgehalt [mg/100 g TM], ($n=2$).

Zu erkennen ist, dass die Ergosterolgehalte bis Tag 5 zunächst anstiegen und, mit Ausnahme des Ergosterolgehalts an Tag 6, anschließend annähernd konstant blieben. Der Mittelwert der Ergosterolgehalte von Tag 7 bis Tag 12 betrug $590,5 \pm 20,3$ mg/100 g TM und der höchste Ergosterolgehalt wurde an Tag 9 mit einem Wert von $613,0 \pm 12,1$ mg/100 g TM bestimmt. Zur Bestimmung der Pilzgehalte wurde der Mittelwert zwischen Tag 7 und 12 verwendet.

3.2.6 Bilanzierung

P. pulmonarius und *F. velutipes* wurden für 7 Tage auf Kartoffelschalen, Kartoffeltrester und Malzextrakt mit einer Substratkonzentration von 20 g/L kultiviert. Zur näheren Untersuchung der Fermentation wurden die Biotrockenmassen und die Stickstoffgehalte nach Trennung in Rückstand und Überstand für beide Fraktionen bestimmt (Tabelle 28). Mit den Medienkontrollen für Kartoffeltrester und Kartoffelschale wurde ebenso verfahren.

Tabelle 28: Biotrockenmassen und Stickstoffgehalte von Rückständen (R) und Überständen (Ü) nach Kultur von *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE) auf Kartoffelschalen (KS), Kartoffeltrester (KT) und Malzextrakt (ME) sowie den Medienkontrollen von Kartoffelschalen und Kartoffeltrester. Substratkonzentration 20 g/L, ($n=6$).

		Biotrockenmasse [g/L]	Stickstoffgehalt [g/100 g TM]	Stickstoffgehalt [g/L]
Medienkontrolle KS	R	$11,53 \pm 0,31$	$2,47 \pm 0,22$	$0,29 \pm 0,02$
	Ü	$9,78 \pm 2,28$	$1,99 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,05$
	Σ	$21,31 \pm 2,33$		$0,53 \pm 0,03$

		Biotrockenmasse [g/L]	Stickstoffgehalt [g/100 g TM]	Stickstoffgehalt [g/L]
KS PSP	R	11,20 ± 2,08	3,52 ± 0,32	0,39 ± 0,05
	Ü	4,59 ± 1,53	1,74 ± 0,67	0,08 ± 0,03
	Σ	15,78 ± 0,73		0,47 ± 0,04
KS FVE	R	13,09 ± 3,72	3,36 ± 0,22	0,45 ± 0,15
	Ü	5,45 ± 1,52	1,10 ± 0,54	0,06 ± 0,03
	Σ	18,54 ± 4,07		0,51 ± 0,17
Medienkontrolle KT	R	10,61 ± 1,60	1,16 ± 0,02	0,13 ± 0,02
	Ü	10,48 ± 2,16	1,78 ± 0,25	0,17 ± 0,03
	Σ	20,93 ± 2,20		0,30 ± 0,01
KT PSP	R	12,49 ± 1,05	2,22 ± 0,43	0,23 ± 0,03
	Ü	5,51 ± 1,68	0,69 ± 0,07	0,04 ± 0,01
	Σ	18,00 ± 1,17		0,27 ± 0,03
KT FVE	R	10,31 ± 1,51	2,95 ± 0,41	0,34 ± 0,08
	Ü	5,56 ± 1,52	0,56 ± 0,03	0,03 ± 0,01
	Σ	15,94 ± 2,15		0,38 ± 0,10
ME PSP	R	8,70 ± 0,18	2,87 ± 0,03	0,25 ± 0,01
	Ü	6,70 ± 0,57	0,90 ± 0,10	0,06 ± 0,01
	Σ	15,53 ± 0,75		0,31 ± 0,01
ME FVE	R	6,34 ± 0,75	3,89 ± 0,31	0,24 ± 0,03
	Ü	5,35 ± 0,76	1,27 ± 0,35	0,07 ± 0,03
	Σ	11,77 ± 1,22		0,31 ± 0,05

3.2.7 Optimierung

3.2.7.1 Stickstoffzugabe

Um den Proteingehalt zu erhöhen, wurde die Zugabe von Ammoniumsulfat oder Natriumaspertat als Stickstoffquellen getestet (Methode 2.5). Der Geruch wurde mit und ohne Supplementierung über die Kultivierungsdauer verglichen, wobei keine deutlichen Unterschiede detektiert wurden. Die Zufütterung mit Ammoniumsulfat und Natriumaspertat führte zu einem Anstieg des Stickstoffgehalts in den Kontrollmedien und den Fermentaten (Abbildung 13, Methode 2.8.12). Die Stickstoffgehalte der Fermentate waren in allen Fällen im Vergleich zu den jeweils zugehörigen Kontrollen erhöht. Auf Kartoffeltrester mit oder ohne Zusatz von Ammoniumsulfat oder Natriumaspertat waren die Stickstoffgehalte nach Fermentation mit *F. velutipes* höher als nach Fermentation mit *P. pulmonarius*. Nach Kultur auf Kartoffelschalen mit und ohne Supplementierung wurden keine deutlichen Unterschiede der Stickstoffgehalte zwischen den beiden Pilzen detektiert.

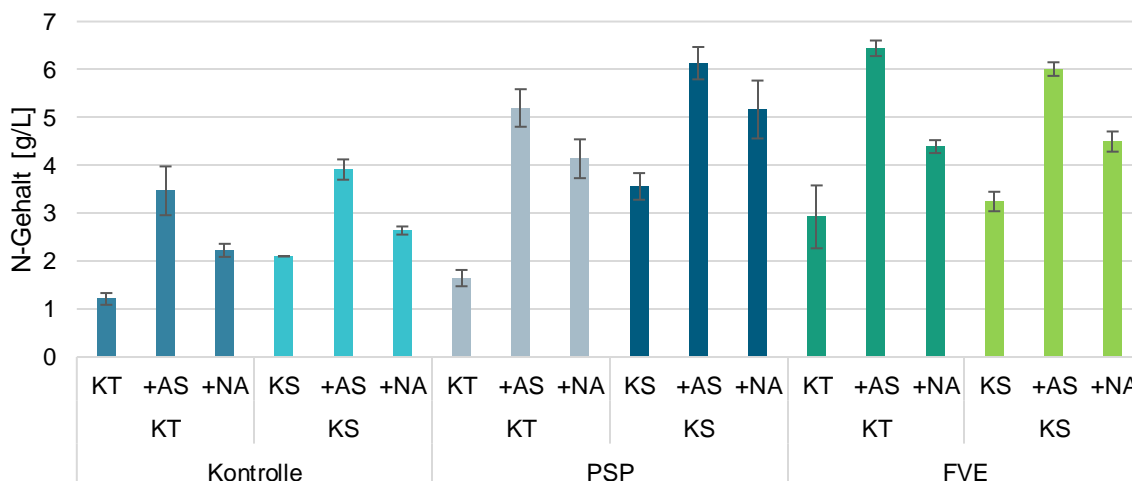


Abbildung 13: Stickstoffgehalte (nach Kjeldahl) der Rückstände nach Kultur von *F. velutipes* und *P. pulmonarius* auf verschiedenen Substraten mit und ohne Zusatz von Ammoniumsulfat (AS) und Natriumaspertat (NA). KT: Kartoffeltrester, KS: Kartoffelschalen; 160: *F. velutipes*, 295: *P. pulmonarius*, (n=2).

Neben den Stickstoffgehalten wurden auch die Pilzanteile bestimmt (Abbildung 14, Methode 2.8.17). Nach Zugabe von Natriumaspertat zu Kartoffeltrester stieg der Pilzgehalt von *P. pulmonarius* zwar von ca. 64% auf 77% an, jedoch war dieser Anstieg nicht signifikant (P: 0,06). Die Zugabe von Ammoniumsulfat oder Natriumaspertat zu Kartoffelschalen führte ebenfalls zu keinem signifikanten Anstieg des Pilzgehalts im Fermentat mit *P. pulmonarius*. Durch die Zugabe von Ammoniumsulfat oder Natriumaspertat zu Kartoffeltrester änderte sich der Pilzgehalt von *F. velutipes* nicht signifikant, jedoch war er nach der Zugabe von Ammoniumsulfat oder Natriumaspertat zu Kartoffelschalen leicht verringert.

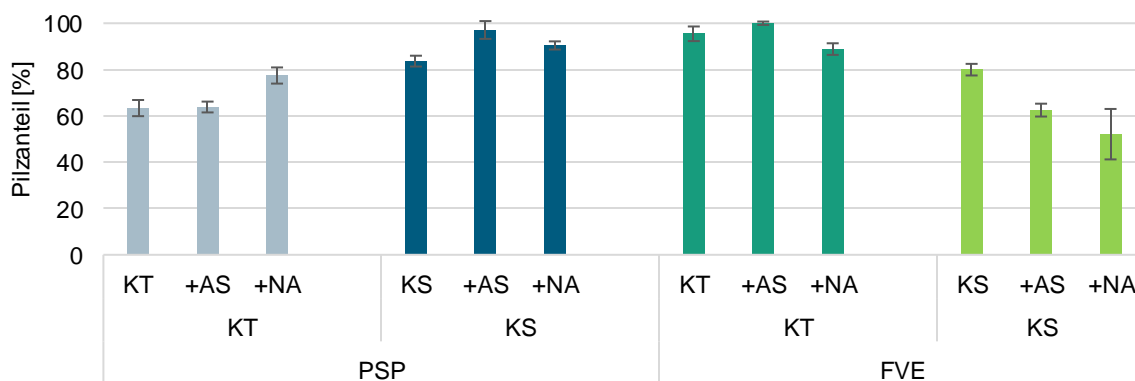


Abbildung 14: Ergosterolgehalte nach Kultur von *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE) auf verschiedenen Substraten mit und ohne Zusatz von Ammoniumsulfat (AS) und Natriumaspertat (NA). KT: Kartoffeltrester, KS: Kartoffelschale, (n=2).

Um die Reinproteingehalte zu bestimmen, wurden Aminosäureanalysen der Proben durchgeführt (Methode 2.8.13). Der Reinproteingehalt konnte durch die Supplementierung mit den Stickstoffquellen deutlich erhöht werden (Tabelle 29).

Tabelle 29: Reinproteingehalte sowie biologische Wertigkeiten vor und nach der Fermentation der Kartoffelschalen- (KS) und Kartoffeltrestermedien (KT) mit und ohne Stickstoffsupplementierung. ASP: Asparaginsäure, ASN: Asparagin, PSP: *P. pulmonarius*, FVE: *F. velutipes*, * freier Asparaginsäure-Gehalt wurde nicht bestimmt und abgezogen ($n=2$).

	Ohne Zusatz [g/ 100 g TM]		Mit Ammoniumsulfat [g/ 100 g TM]		Mit Natriumaspartat [g/ 100 g TM]	
	Reinprotein	ASP+ASN	Reinprotein	ASP+ASN	Reinprotein*	ASP+ASN
KS	9,5 ± 1,3	2,6 ± 0,3	7,5 ± 0,2	1,4 ± 0,0	13,1 ± 0,5*	7,5 ± 0,4
KS PSP	14,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	19,8 ± 0,5	3,4 ± 1,5	17,6 ± 0,7	2,8 ± 1,4
KS FVE	16,6 ± 0,3	1,6 ± 0,1	18,0 ± 0,8	1,7 ± 0,1	20,9 ± 0,3	4,5 ± 0,9
KT	5,3 ± 0,4	1,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	0,8 ± 0,0	13,0 ± 0,7	9,7 ± 0,4
KT PSP	7,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	15,1 ± 1,8	1,5 ± 0,2	20,1 ± 1,3	7,9 ± 0,2
KT FVE	13,5 ± 0,8	1,3 ± 0,2	17,8 ± 0,8	1,9 ± 0,1	22,2 ± 0,1	7,7 ± 1,0

Der höchste Reinproteingehalt wurde mit Zusatz von Natriumaspartat zur Fermentation von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* erzielt ($22,2 \pm 0,1$ g/100 g TM). Insgesamt lagen die Reinproteingehalte der Fermentate mit *F. velutipes*, mit Ausnahme der Fermentation von Kartoffelschalen mit Ammoniumsulfat, über denen der Fermentate von *P. pulmonarius*. Zu beachten ist, dass bei der verwendeten Methode zwischen freien und im Protein gebunden Aminosäuren nicht unterschieden wird, wodurch der Wert für den Reinproteingehalt auch bei der Zugabe von Natriumaspartat zur Kontrolle erhöht wurde. In Tabelle 29 sind zusätzlich die Asparaginsäure- und Asparagingehalte vor und nach Supplementierung in den Kontrollen sowie den Fermentaten aufgeführt. Der Gehalt an Asparaginsäure und Asparagin stieg in den Fermentaten nach Zugabe beider Stickstoffquellen an. In Kartoffelschalenkontrollmedium mit Supplementierung von Natriumaspartat sowie in dessen Fermentaten war der Gehalt an Asparaginsäure und Asparagin geringer und als nach Supplementierung zum Kartoffeltrestermedium. Durch die Zugabe von Natriumaspartat sank die biologische Wertigkeit der Fermentate deutlich ab (KT FVE: 89 ± 2 ; KT NA FVE: 77 ± 6).

3.2.7.2 Substratkonzentration

Für die Fermentation der Kartoffelmedien mit *P. pulmonarius* und *F. velutipes* wurden verschiedene Substratkonzentrationen getestet. Die Pilzanteile wurden für die Kulturtag 5, 7, 9, 11 und 13 bestimmt. Dargestellt sind die Biotrockenmassen, die Rohproteingehalte sowie die Pilzanteile der Fermentate an Kulturtag 7 (Methoden: 2.6.4, 2.8.12, 2.8.17). Die Rohproteingehalte wurden über die Kjeldahl-Faktoren bestimmt, welche durch die Aminosäureanalyse ermittelt wurden (Tabelle 31). Die Biotrockenmassen der Fermentate waren bei höheren eingesetzten Konzentrationen ebenfalls höher. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse für die Fermentation von Kartoffelschalen mit *P. pulmonarius* dargestellt. Die Fermentate bei 10, 20 und 30 g/L Substratkonzentration unterschieden sich nicht deutlich

hinsichtlich ihres Pilzanteils (ca. 75%) und der Rohproteingehalte (ca. 19 g/100 g TM). Die Rohproteingehalte der Fermentate bei Substratkonzentrationen 40 g/L und 50 g/L waren deutlich geringer (ca. 13 g/100 g TM). Der Pilzanteil betrug bei einer Substratkonzentration von 40 g/L $66 \pm 1\%$, jedoch stieg er auch bei längerer Kultivierung nicht weiter an (stagnierend ab Tag 7 bis Tag 13). Dies war auch bei der Fermentation von Kartoffelschalen bei einer Substratkonzentration von 50 g/L der Fall.

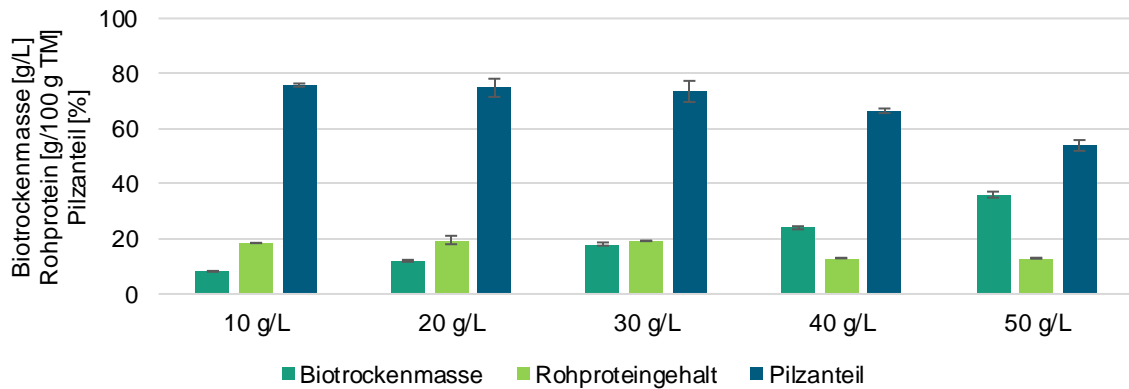


Abbildung 15: Biotrockenmassen, Rohproteingehalte und Pilzanteile bei Kultur von *P. pulmonarius* auf Kartoffelschalen bei verschiedenen Substratkonzentrationen an Kulturtag 7, ($n=2$).

Der Pilzanteil des Fermentats von Kartoffeltrester mit *P. pulmonarius* bei einer Substratkonzentration 10 g/L lag mit fast $90 \pm 3\%$ über dem Wert des Fermentats von Kartoffelschalen bei gleicher Konzentration (Abbildung 16). Die Pilzanteile bei den Substratkonzentrationen 20 g/L und 30 g/L Kartoffeltrester waren mit $66 \pm 5\%$ und $56 \pm 5\%$ geringer als die Werte für Kartoffelschalen (20 g/L: $75 \pm 3\%$; 30 g/L $74 \pm 4\%$). Bei einer Substratkonzentration von 40 g/L Kartoffeltrester wurde ein Pilzanteil von $61 \pm 3\%$ erreicht. Der Pilzgehalt bei 50 g/L Substratkonzentration war mit $35 \pm 1\%$ geringer als der Pilzgehalt der Fermentate von Kartoffelschalen bei gleicher Substratkonzentration ($54 \pm 2\%$). Der höchste Rohproteingehalt wurde mit $13,7 \pm 0,3$ g/100 g TM für das Fermentat bei einer Substratkonzentration von 30 g/L bestimmt. Insgesamt lagen die Rohproteingehalte bei Kultur von *P. pulmonarius* auf Kartoffelschalen über denen nach Kultur auf Kartoffeltrester.

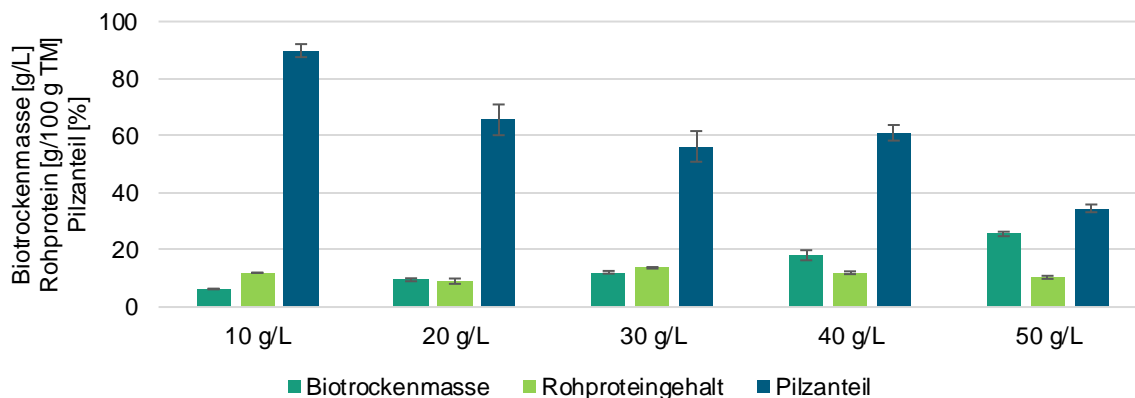


Abbildung 16: Biotrockenmassen, Rohproteingehalte und Pilzanteile bei Kultur von *P. pulmonarius* auf Kartoffeltrester bei verschiedenen Substratkonzentrationen an Kulturtag 7, ($n=2$).

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse nach Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffelschalen bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Dabei wurden höhere Rohproteingehalte erreicht als nach Kultur von *P. pulmonarius*. Der maximale Rohproteingehalt wurde bei Kultivierung auf Kartoffelschalen mit einer Substratkonzentration von 30 g/L bestimmt ($23,0 \pm 1,0$ g/100 g TM). Bei dieser Substratkonzentration betrug der Pilzgehalt $53 \pm 6\%$. Mit Pilzanteilen zwischen $81 \pm 2\%$ und $77 \pm 2\%$ bei Substratkonzentrationen von 10 g/L bzw. 20 g/L lagen die Pilzgehalte in einem vergleichbaren Bereich wie nach Kultur von *P. pulmonarius* auf Kartoffelschalen. Die Pilzanteile von $43 \pm 2\%$ und $34 \pm 2\%$ bei Substratkonzentrationen von 40 g/L und 50 g/L konnten auch bei längerer Kultivierungsdauer nicht deutlich gesteigert werden.

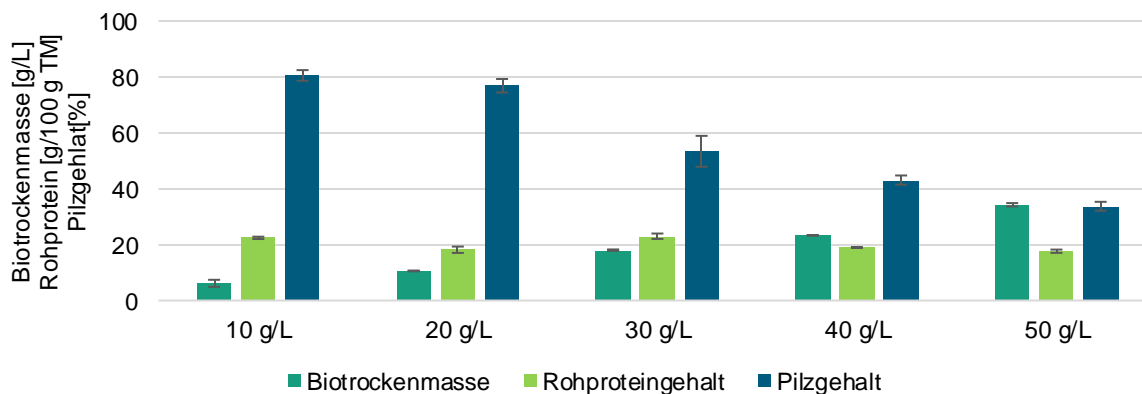


Abbildung 17: Biotrockenmassen, Rohproteingehalte und Pilzanteile bei Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffelschalen bei verschiedenen Substratkonzentrationen an Kulturtag 7, ($n=2$).

Für die Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester wurde der höchste Rohproteingehalt bei Substratkonzentrationen von 30 g/L zu $17,9 \pm 0,3$ g/100 g TM bestimmt (Abbildung 18). Wegen der insgesamt sehr hohen Pilzanteile wurden zusätzlich die Konzentrationen 60 g/L, 70 g/L und 80 g/L getestet, wobei die Pilzanteile jedoch niedriger waren und die Fermentate daher nicht weiter untersucht wurden (60 g/L: $42 \pm 2\%$; $34 \pm 1\%$ bei 70 g/L und 80 g/L).

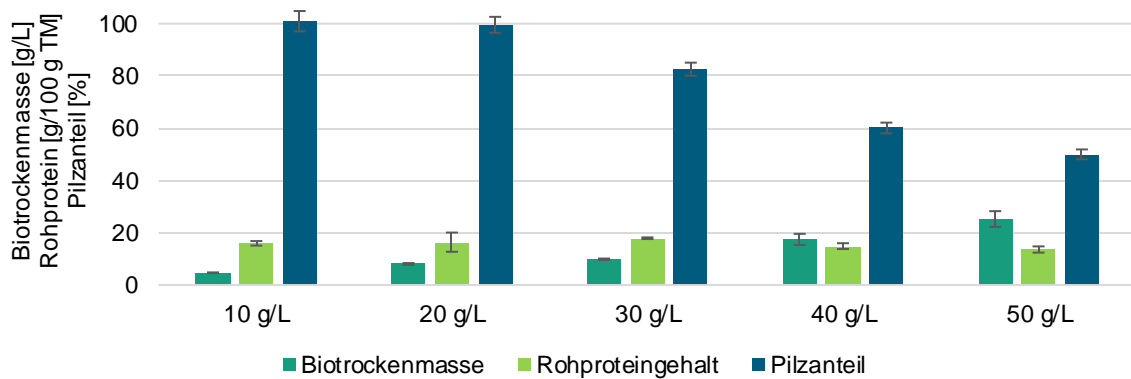


Abbildung 18: Biotrockenmassen, Rohproteingehalte und Pilzanteile bei Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester bei verschiedenen Substratkonzentrationen an Kulturtag 7, (n=2).

Aufgrund der insgesamt höchsten erreichten Pilzanteile sowie den höheren Rohproteingehalten im Vergleich zu *P. pulmonarius* wurde *F. velutipes* für weitere Optimierungen ausgewählt. Um die optimalen Erntezeitpunkte zu bestimmen, wurden Wachstumskurven bei verschiedenen Substratkonzentrationen aufgenommen (Abbildung 19).

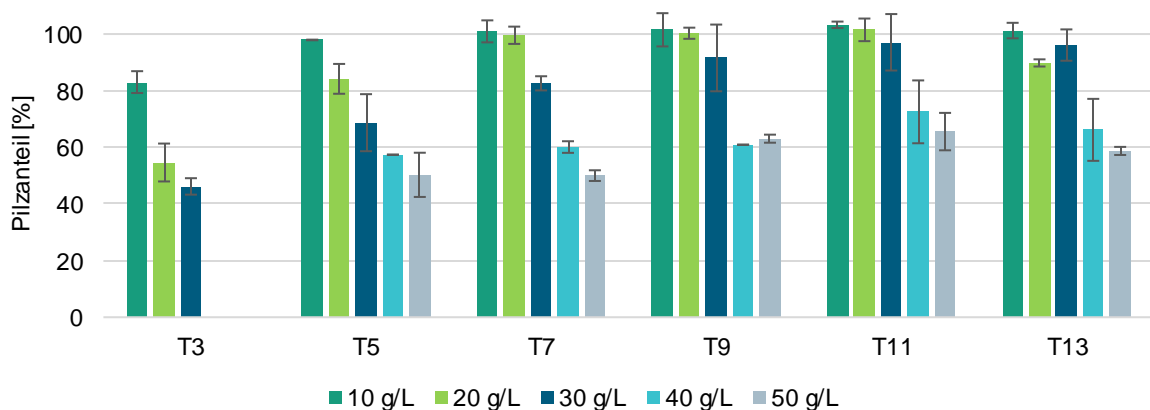


Abbildung 19: Pilzanteile bei Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester bei verschiedenen Substratkonzentrationen an verschiedenen Kulturtagen, (n=2).

Zu erkennen ist der Abfall des Pilzanteils mit steigender Substratkonzentration. Dennoch wurden bei den Substratkonzentrationen 10, 20 und 30 g/L ca. 100% Pilzanteil erreicht. Mit 10 und 20 g/L bereits an Kulturtag 7, mit 30 g/L an Kulturtag 9. Bei 40 g/L Substratkonzentration wurde der maximale Pilzanteil an Tag 11 erreicht. Der Pilzanteil bei 50 g/L stieg über den Versuchszeitraum hinweg maximal auf $66 \pm 7\%$ an. Für Substratkonzentrationen von 20 und 30 g/L wurde der Erntezeitpunkt auf Kulturtag 7 festgelegt, da auch bei 30 g/L an diesem Tag schon ca. 90% Pilzanteil erreicht wurden.

3.2.7.3 Verwertung des Überstands

Versuche zur Wiederverwendung des Fermentationsüberstandes von KT FVE (30 g/L Substratkonzentration) wurden in vier Zyklen durchgeführt. Schon zu Beginn der Versuche war nach dem Autoklavieren die dunklere Farbe der Medien mit wiederverwendetem Überstand zu erkennen (Abbildung 20). Die Farbe der Medien wurde durch die Fermentation heller, jedoch war das Fermentat mit dem wiederverwendeten Überstand dunkler und die Kultur weniger stark bewachsen (optisch bewertet).



Abbildung 20: Abbildung links: Kartoffeltrester mit Wasser (links) und Kartoffeltrester mit Überstandsrückführung (rechts); Abbildung rechts: Fermentat des Kartoffeltresters mit Wasser (links) und Fermentat des Kartoffeltresters mit Überstandsrückführung (rechts). Fermentiert wurde mit *F. velutipes*.

Die Biotrockenmassen sowie die Pilzanteile wurden für die Myzelien bestimmt. Die Biotrockenmassen änderten sich nach der Wiederverwendung des Rückstands nicht signifikant. Die Pilzanteile sind in Abbildung 21 dargestellt.

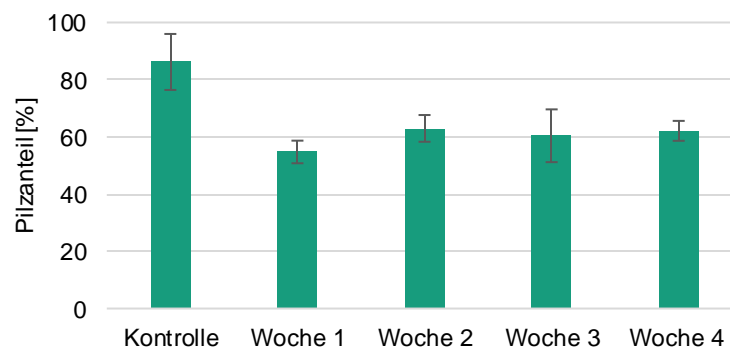


Abbildung 21: Pilzanteile bei Wiederverwendung der Fermentationsüberstände sowie der Kontrolle mit Zugabe von Wasser. Substrat: Kartoffeltrester mit 30 g/L Substratkonzentration; Pilz: *F. velutipes*, ($n=6$).

Zu erkennen ist, dass der Pilzanteil aufgrund der Wiederverwendung des Überstands deutlich verringert wurde. Der Pilzanteil der Kontrolle betrug ca. 86%. Schon nach der ersten Wiederverwendung des Überstands lag der Pilzanteil nur noch bei ca. 55%. In den weiteren Wochen wurde der Pilzanteil jedoch durch die erneute Wiederverwendung des Überstands nicht weiter gesenkt. Der Pilzanteil betrug nach der vierten Woche ca. 61%.

3.2.7.4 Nebenströme als Vorkulturmedien

Aufgrund des guten Wachstums von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester wurde die Verwendung von Kartoffeltrester als Vorkulturmedium getestet. Dafür wurden zunächst Vorkulturzeitreihen auf Kartoffeltrester mit Substratkonzentrationen von 10 und 20 g/L untersucht und mit der Vorkulturen auf Malzextrakt (20 g/L) verglichen. Für die Fermentate der verschiedenen Erntetage wurden die Biofeuchtmassen, die Biotrockenmasse und der Ergosterolgehalt bestimmt (Abbildung 22, Methoden: 2.6.4, 2.8.17). Die Kulturreihen ME 20 g/L sowie KT 20 g/L wurden an den Tagen 3, 5, 7, 9, 11 und 13 geerntet, KT 10 g/L an den Tagen 5, 7, 9, 11 und 13.

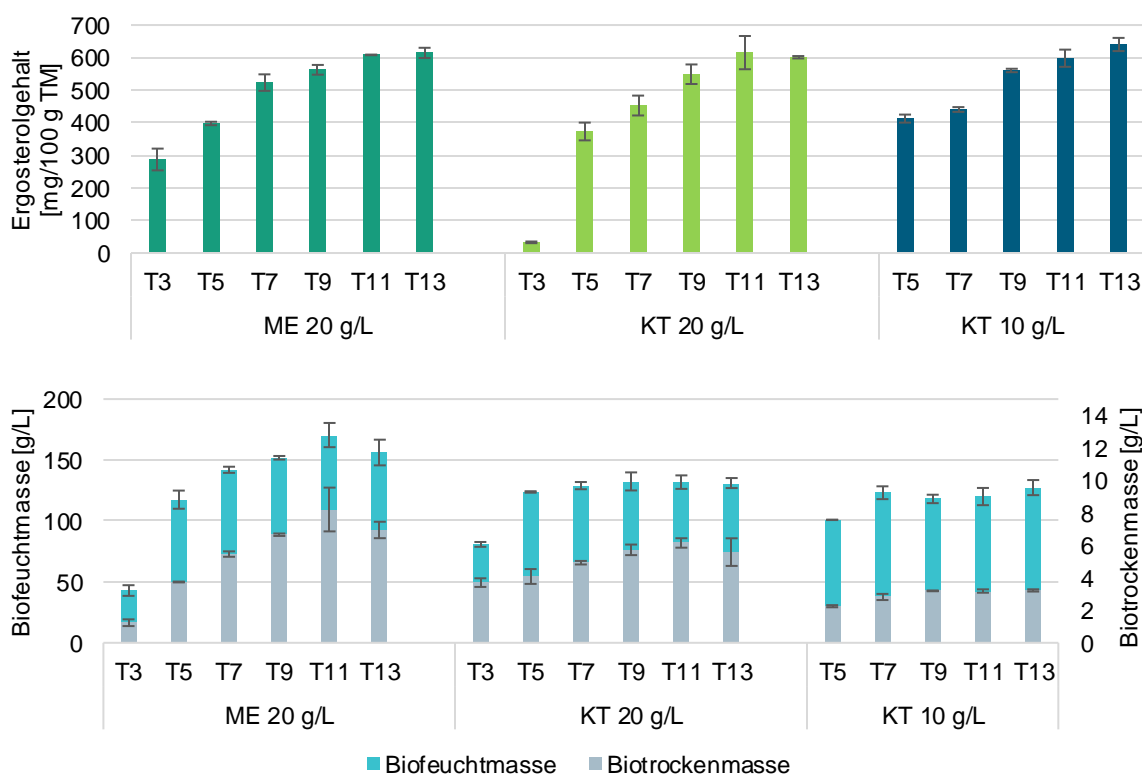


Abbildung 22: Ergosterolgehalte, Biofeuchtmassen und Biotrockenmassen der Vorkulturen von *F. velutipes* an verschiedenen Erntetagen. ME: Malzextrakt; KT: Kartoffeltrester; Substratkonzentrationen 10 g/L und 20 g/L; Kulturtag 3, 5, 7, 9, 11 und 13, ($n=3$).

Die Biofeucht- und Biotrockenmassen der Malzextraktvorkulturen stiegen bis Tag 11 an und sanken an Tag 13 wieder ab. Die Biofeuchtmassen der Vorkulturen auf Kartoffeltrester waren bis auf eine geringere Biofeuchtmasse an Tag 3 bzw. Tag 5 annähernd konstant. Die Biotrockenmassen stiegen bei einer Substratkonzentration von 10 g/L bis Tag 9 und bei einer Substratkonzentration von 20 g/L bis Tag 11 an. Die Ergosterolgehalte der Kulturen auf KT waren vergleichbar hoch wie die Ergosterolgehalte der Malzextraktkulturen und überstiegen diese an Tag 11 und Tag 13. Der Ergosterolgehalt bei 20 g/L Substratkonzentration KT und ME stieg bis Tag 11 an. Es wurden Hauptkulturen auf Kartoffeltrester mit 30 g/L Substratkonzentration mit für 7 Tage kultivierten Vorkulturen (ME und KT 20 g/L) inokuliert. Zusätzlich wurde eine Vorkultur auf KT 20 g/L getestet, welche zuvor für 14 Tage kultiviert

wurde. Alle Hauptkulturen wurden nach 7 Tagen geerntet. Bestimmt wurden die Biotrockenmassen, die Pilzanteile sowie die Stickstoffgehalte (Abbildung 23). Die Pilzanteile nach der Verwendung von Vorkulturen auf Kartoffeltrester waren tendenziell niedriger als nach Verwendung einer Malzextraktvorkultur, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (T7 P: 0,0907; T14 P: 0,0818). Die Stickstoffgehalte lagen ebenfalls nicht signifikant unterhalb der Werte nach Kultivierung mit Inokulation aus einer Malzextraktvorkultur (T7 P: 0,0597; T14 P: 0,1489).

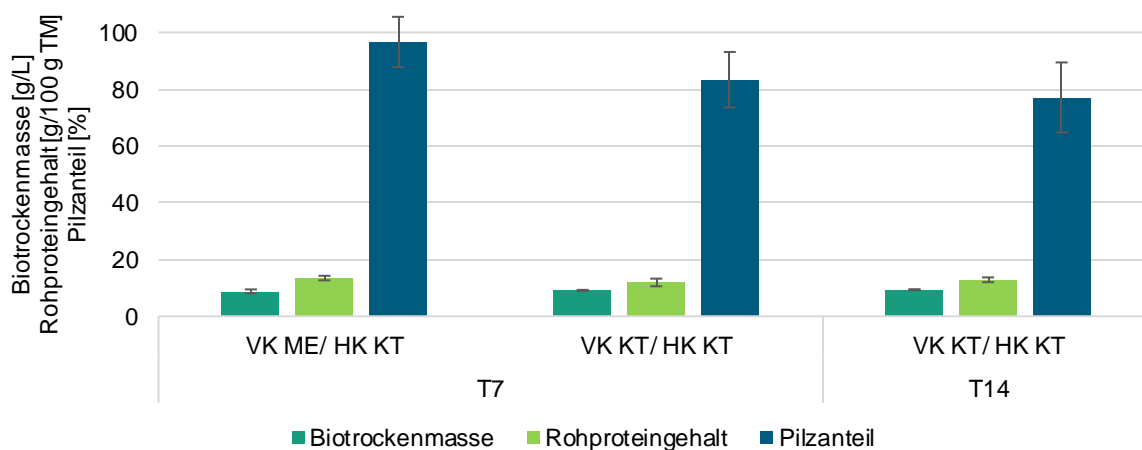


Abbildung 23: Pilzanteile, Biotrockenmassen und Stickstoffgehalte von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester (30 g/L Substratkonzentration) nach Inokulation aus verschiedenen Vorkulturen. VK: Vorkultur; HK: Hauptkultur; ME: Malzextrakt; KT: Kartoffeltrester; Substratkonzentrationen VK 20 g/L; T7: 7 Tage Vorkultur; T14: 14 Tage Vorkultur, ($n=3$).

3.3 Analyse der Fermentate

3.3.1 Mikroskopie

Neben der Bestimmung des Pilzanteils mittels Ergosterol wurden die Kulturen mikroskopiert (Methode 2.7). Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden bei einer Vergrößerung um den Faktor 20 erstellt (Abbildung 24). Die Kontrollen von Kartoffeltrester und Kartoffelschale wiesen helle, fädige Strukturen auf. Zusätzlich waren dunkle Bereiche mit Zellstrukturen bei Mikroskopie von Kartoffelschalen zu erkennen. Die Myzelien der beiden Pilze auf Malzextrakt unterschieden sich nicht deutlich voneinander. Die beobachtete fadenförmige Struktur ließ sich schlecht von der fädigen Struktur der Kartoffelmedien unterscheiden. Nach der Fermentation von Kartoffelschalen waren die dunkleren Bereiche teilweise noch zu erkennen, wobei der Anteil an hellen fädigen Strukturen deutlich zunahm.

Zusätzlich zu den lichtmikroskopischen Bildern wurden Aufnahmen mittels *Environmental Scanning Electron Microscopy* (ESEM) erstellt (Abbildung 25).

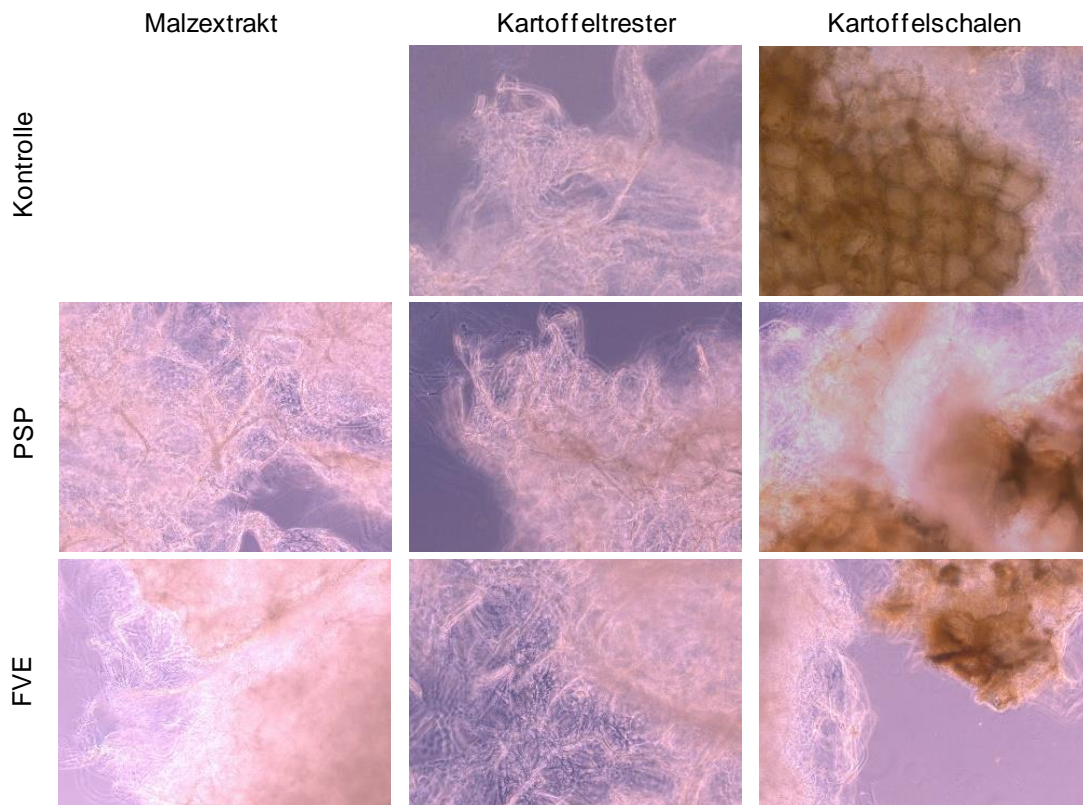


Abbildung 24: Lichtmikroskopische Aufnahme von Kartoffeltrester, Kartoffelschalen und der Fermentate mit *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE) sowie dem Myzel von PSP und FVE nach Wachstum auf Malzextrakt. 20fache Vergrößerung, Substratkonzentration 20 g/L.

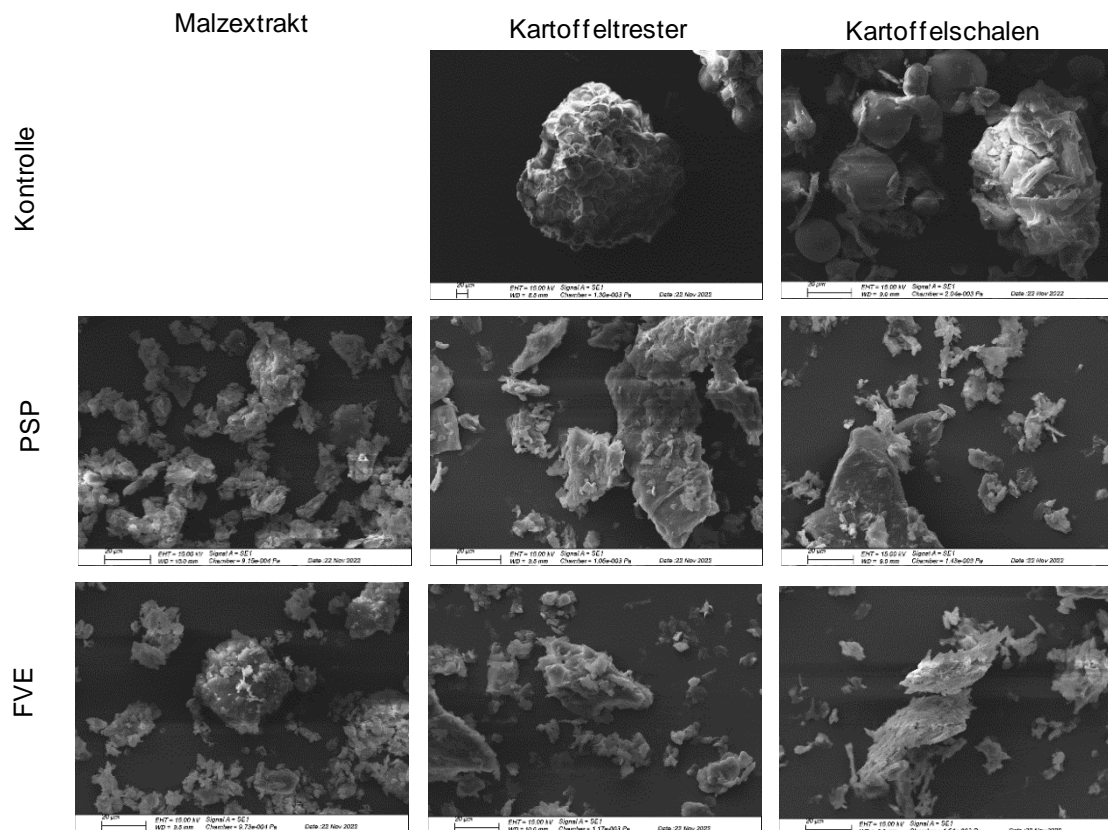


Abbildung 25: ESEM-Aufnahmen von Kartoffeltrester, Kartoffelschalen und der Fermentate mit *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE) sowie dem Myzel von PSP und FVE nach Wachstum auf Malzextrakt. Maßstab 20 µm, Substratkonzentration 20 g/L.

In den ESEM-Aufnahmen waren Unterschiede zwischen den Fermentaten und der Kontrolle deutlich zu erkennen. In beiden Kontrollen sind deutliche kugelförmige Strukturen erkennbar, wobei diese bei Kartoffelschalen größer als bei Kartoffeltrester waren. Hier waren die kugelförmigen Strukturen deutlicher an andere Partikel gebunden. Nach Fermentation sind die kugelförmigen Strukturen nicht mehr erkennbar und die Oberflächen der Fermentate unterschieden sich nicht deutlich von den Aufnahmen nach Wachstum auf Malzextrakt.

3.3.2 Aminosäureanalytik

Die Aminosäureverteilungen der beiden Pilze wurden nach Kultur auf Kartoffelschalen (Abbildung 26) und Kartoffeltrester (Abbildung 27) bestimmt (Methode 2.8.13). Insgesamt ähnelte sich die Aminosäureverteilung der beiden Pilze. Nach Fermentation von Kartoffelschalen und Kartoffeltrester mit beiden Pilzen stieg der Gehalt aller Aminosäuren bis auf Asparagin + Asparaginsäure an. Ein Anstieg des Asparagin- + Asparaginsäure-Gehalts wurde nur nach Fermentation von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* beobachtet. Nach Kultur beider Pilze auf Kartoffeltrester (Abbildung 27) wurden deutlich höhere Aminosäuregehalte durch Fermentation mit *F. velutipes* als mit *P. pulmonarius* erreicht. Der Glutamin- + Glutaminsäuregehalt war nach Kultur von *P. pulmonarius* im Vergleich zu *F. velutipes* leicht erhöht (Abbildung 26). Bei allen anderen Aminosäuren waren die Aminosäuregehalte ähnlich oder nach Kultur von *F. velutipes* etwas höher. Für beide Pilze wurden die höchsten Gehalte nach Kultur auf Kartoffelschalen erreicht.

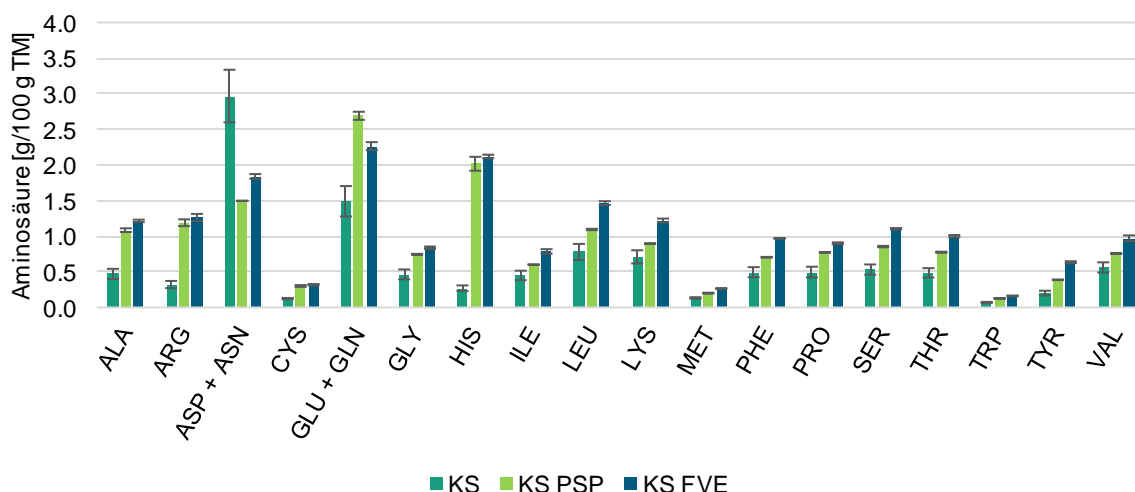


Abbildung 26: Aminosäureverteilung von Kartoffelschalen (KS) und deren Fermentate mit *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE). Substratkonzentration 20 g/L; Kulturtag 7; (KS: $n=3$; Fermentate: $n=2$).

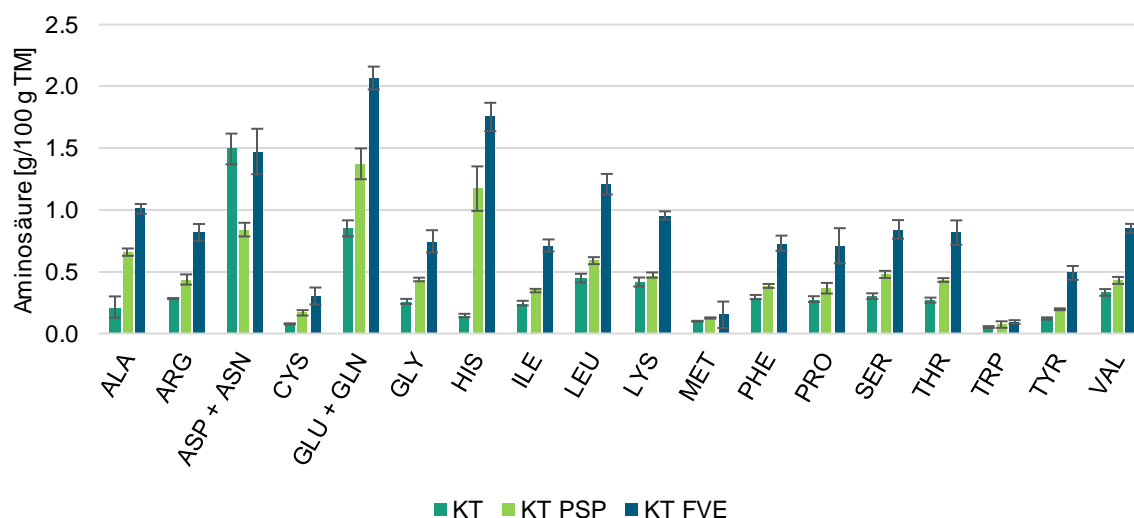


Abbildung 27: Aminosäureverteilung von Kartoffeltrester (KT) und dessen Fermentate mit *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE). Substratkonzentration 20 g/L; Kulturtag 7, ($n=3$).

Die Reinproteingehalte wurden nach Fermentation der Medien deutlich erhöht (Tabelle 30). Dabei wurden durch Fermentation der Kartoffelmedien mit *F. velutipes* höhere Werte erreicht als mit *P. pulmonarius*. Die biologischen Wertigkeiten von *F. velutipes* waren insgesamt signifikant höher als die von *P. pulmonarius* auf dem jeweils gleichen Medium.

Tabelle 30: Reinproteingehalte und biologische Wertigkeiten von Kartoffelschalen (KS) und Kartoffeltrester (KT) sowie deren Fermentate und der Fermentate von Malzextrakt. Substratkonzentration 20 g/L, Kulturtag 7, FVE: *F. velutipes*, PSP: *P. pulmonarius*. (Medien und Fermentate von KT und ME: $n=3$; Fermentate von KS: $n=2$).

	Reinproteingehalt [g/100 g TM]	Biologische Wertigkeit
KS	9,45 ± 1,25	87 ± 3
KS PSP	14,37 ± 0,04	88 ± 1
KS FVE	16,64 ± 0,28	91 ± 2
KT	5,32 ± 0,42	90 ± 2
KT PSP	7,71 ± 0,25	84 ± 1
KT FVE	13,51 ± 0,75	89 ± 2

Durch die Ergebnisse der Aminosäureanalyse und dem bestimmten Stickstoffgehalt nach Kjeldahl wurden Faktoren zur Berechnung des Roh- und Reinproteingehalts für beide Pilze auf Kartoffelschalen und Kartoffeltrester bestimmt (Tabelle 31).

Tabelle 31: Kjeldahlfaktoren zur Ermittlung von Roh- und Reinproteingehalten, (KT: $n=3$; KS: $n=2$).

	Kjeldahlfaktor (Rohprotein)	Kjeldahlfaktor (Reinprotein)
KS PSP	5,46 ± 0,13	3,95 ± 0,08
KT PSP	5,51 ± 0,13	4,49 ± 0,40
KS FVE	5,60 ± 0,08	4,92 ± 0,22
KT FVE	5,65 ± 0,16	4,93 ± 0,17

3.3.3 Bestimmung des Rohfettgehalts und Analyse der Fettsäureverteilung

Der Rohfettgehalt wurde für die Fermentate KS PSP, KS FVE, KT PSP und KT FVE bestimmt (Tabelle 32, Methode 2.8.10). Die Fettgehalte der Fermentate mit *F. velutipes* lagen deutlich über den Gehalten mit *P. pulmonarius*. Insgesamt stieg der Rohfettgehalt bei allen Pilz-Substrat-Kombinationen im Vergleich zu den Substraten (Tabelle 23) an.

Tabelle 32: Rohfettgehalte der Fermentate nach Kultivierung mit *Flammulina velutipes* (FVE) und *Pleurotus pulmonarius* (PSP). KS: Kartoffelschale; KT: Kartoffeltrester, (n=3).

	KS PSP	KS FVE	KT PSP	KT FVE
Rohfettgehalt [g/100 g TM]	1,63 ± 0,12	4,99 ± 0,23	1,43 ± 0,07	4,61 ± 0,13

Zur genaueren Analyse des Fettgehalts nach Fermentation wurden die Fettsäureverteilungen der Substrate und Fermentate bestimmt (Methode 2.8.11). Tabelle 33 zeigt die prozentualen Anteile der gesättigten sowie einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Tabelle 33: Prozentuale Anteile der gesättigten Fettsäuren (Σ SFA), der einfach ungesättigten Fettsäuren (Σ MUFA) und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Σ PUFA). KS: Kartoffelschale; KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*; PSP: *P. pulmonarius*, (n=3).

	KS	KS FVE	KS PSP	KT	KT FVE	KT PSP
Σ SFA	76,5%	31,7%	19,0%	85,3%	32,5%	23,0%
Σ MUFA	9,9%	10,7%	11,7%	4,9%	11,7%	12,5%
Σ PUFA	13,9%	57,6%	69,6%	9,8%	56,0%	64,6%

Insgesamt ist zu erkennen, dass der Anteil der gesättigten Fettsäuren vor der Fermentation der Kartoffelmedien deutlich höher war. Vor Fermentation betragen die prozentualen Anteile der gesättigten Fettsäuren am Gesamtfett ca. 77% für Kartoffelschale und 85% für Kartoffeltrester. Nach Kultur von *F. velutipes* sanken die Anteile auf 32-33% und nach Kultur von *P. pulmonarius* auf 19-23% ab. Der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren nahm insgesamt nach Fermentation deutlich zu.

Die Fettsäureverteilung für die Substrate KS und KT sowie deren Fermentate mit *F. velutipes* und *P. pulmonarius* sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Fettsäureverteilung von Kartoffelschalen (KS) und Kartoffeltrester (KT) sowie deren Fermentate mit *F. velutipes* (FVE) und *P. pulmonarius* (PSP), (n=3).

Fettsäure		Prozentueller Anteil der Fettsäure [%]		
		KS	KS PSP	KS FVE
11:0	Undecansäure	0,09 ± 0,06	n.d	0,05 ± 0,06
12:0	Laurinsäure	0,04 ± 0,03	n.d	3,60 ± 0,11
13:0	Tridecansäure	n.d.	n.d	0,13 ± 0,01
14:0	Myristinsäure	0,63 ± 0,06	0,08 ± 0,02	0,66 ± 0,01
15:0	Pentadecansäure	0,28 ± 0,20	1,14 ± 0,04	2,32 ± 0,06
16:0	Palmitinsäure	56,61 ± 4,41	13,23 ± 0,05	19,99 ± 0,1
16:1 (9Z)	Palmitoleinsäure	0,43 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,01
16:1 (11Z)	Hexadec-11-ensäure	n.d	3,10 ± 0,06	0,08 ± 0,01
17:0	Margarinsäure	0,55 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,30 ± 0,01
18:0	Stearinsäure	16,00 ± 1,11	4,08 ± 0,38	4,32 ± 0,12
18:1 (9Z)	Ölsäure	7,39 ± 6,67	8,22 ± 0,33	9,89 ± 0,22
18:1 (11Z)	Vaccensäure	2,26 ± 0,86	0,34 ± 0,12	0,47 ± 0,03
18:2 (9Z, 12Z)	Linolsäure	11,65 ± 7,18	69,16 ± 2,02	53,78 ± 0,18
18:2 (6Z, 9Z)	Octadecan-6,9-diensäure	n.d.	n.d.	0,76 ± 0,01
18:3 (9Z, 12Z, 15Z)	Linolensäure	2,26 ± 0,49	0,44 ± 0,03	2,12 ± 0,05
20:0	Arachinsäure	2,33 ± 0,58	0,19 ± 0,14	0,10 ± 0,03
Fettsäure		Prozentueller Anteil der Fettsäure [%]		
		KT	KT PSP	KT FVE
11:0	Undecansäure	0,93 ± 0,32	n.d	n.d.
12:0	Laurinsäure	n.d.	0,10 ± 0,15	5,57 ± 0,41
13:0	Tridecansäure	n.d	n.d	0,60 ± 0,65
14:0	Myristinsäure	0,14 ± 0,10	0,14 ± 0,03	1,06 ± 0,04
15:0	Pentadecansäure	0,19 ± 0,13	1,08 ± 0,03	2,21 ± 0,14
16:0	Palmitinsäure	63,70 ± 1,65	15,34 ± 0,32	19,67 ± 0,03
16:1 (9Z)	Palmitoleinsäure	0,03 ± 0,05	n.d	0,17 ± 0,02
16:1 (11Z)	Hexadec-11-ensäure	n.d.	1,35 ± 0,03	0,11 ± 0,01
17:0	Margarinsäure	0,60 ± 0,11	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,4
18:0	Stearinsäure	17,08 ± 1,16	5,97 ± 0,14	3,08 ± 0,19
18:1 (9Z)	Ölsäure	4,06 ± 0,40	11,04 ± 0,44	10,83 ± 0,20
18:1 (11Z)	Vaccensäure	0,80 ± 0,01	0,09 ± 0,12	0,62 ± 0,05
18:2 (9Z, 12Z)	Linolsäure	7,46 ± 0,48	64,43 ± 1,29	53,11 ± 0,75
18:2 (6Z, 9Z)	Octadecan-6,9-diensäure	n.d.	n.d.	0,76 ± 0,03
18:3 (9Z, 12Z, 15Z)	Linolensäure	2,36 ± 0,18	0,12 ± 0,03	2,12 ± 0,22
20:0	Arachinsäure	2,70 ± 0,43	0,19 ± 0,14	0,10 ± 0,07

In den Kartoffelsubstraten machte Palmitinsäure den größten Anteil aus (ca. 57% für Kartoffelschalen und 64% für Kartoffeltrester). Der prozentuale Anteil der Palmitinsäure am Gesamtfett sank nach Fermentation auf ca. 20% für *F. velutipes* und 13-15% für *P. pulmonarius*. Den zweithöchsten Anteil machte Stearinsäure in den Kartoffelmedien aus (16-17%). Dieser Anteil sank nach den Fermentationen auf 3-6% ab. Der prozentuale Anteil von Linolsäure am Gesamtfett stieg durch Fermentation mit beiden Basidiomyceten hingegen deutlich an. Die Anteile stiegen von ca. 12% für Kartoffelschalen und 8% für Kartoffeltrester auf 53% nach der Kultur von *F. velutipes* und auf 65-69% nach Kultur von *P. pulmonarius* an. Nach der Fermentation der Kartoffelmedien stieg der Anteil an Ölsäure ebenfalls an. Hervorzuheben ist Laurinsäure, welche nach Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffelschalen ca. 4% und auf Kartoffeltrester 6% am Gesamtfett betrug. Laurinsäure wurde in den anderen Proben nur in sehr geringen Mengen detektiert ($\leq 0,1\%$).

3.3.4 Bestimmung des Chitingehalts

3.3.4.1 *Vergleich photometrischer Bestimmungen*

Zur Bestimmung des Chitingehalts wurden die photometrischen Methoden nach Vetter und Siller, nach Ride und Drysdale und nach Nilsson und Bjurman miteinander verglichen (Methode 2.8.16). Dazu wurden die Wiederfindungen und der Chitingehalt eines Fermentats von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester (30 g/L Substratkonzentration) bestimmt (Tabelle 35). Die Kalibriergeraden der verschiedenen Methoden sind im Anhang in Abbildung 79 bis Abbildung 81 dargestellt.

Tabelle 35: Vergleich der Wiederfindungen und des bestimmten Chitingehalts des Fermentats von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* (KT FVE) bei 30 g/L Substratkonzentration [g/100 g TM], Methode nach Vetter und Siller: Wiederfindung: 10fach wiederholt mit je $n=3$; KT FVE: 5fach wiederholt mit je $n=3$; Methode nach Ride und Drysdale: Wiederfindung: 5fach wiederholt mit je $n=3$; KT FVE: 2fach wiederholt mit je $n=3$; Methode nach Nilsson und Bjurman: Wiederfindung: 3fach wiederholt mit je $n=3$.

Methode	Wiederfindung [%]	KT FVE [g/100 g TM]
Methode nach Vetter und Siller	102,3 \pm 14,5	5,1 \pm 0,7
Methode nach Ride und Drysdale	83,6 \pm 26,4	1,8 \pm 0,3
Methode nach Nilsson und Bjurman	102,2 \pm 12,6	n.a.

Aufgrund des deutlich höheren Zeitaufwands der Methode nach Nilsson und Bjurman wurden lediglich die Wiederfindungen bestimmt. Die Standardabweichung bei der Bestimmung der Wiederfindung war bei der Methode nach Ride und Drysdale deutlich höher als bei der Methode nach Vetter und Siller. Zusätzlich wurden niedrigere Chitingehalte für die untersuchten Fermentate bestimmt. Für den Blindwert Kartoffeltrester wurde über die Methode nach Vetter und Siller ein Wert von 1,2 \pm 0,2 g/100 g TM ermittelt.

3.3.4.2 Bestimmung von Chitin über den Stickstoffgehalt

Für die Bestimmung des Chitingehalts über den Stickstoffgehalt wurden die Proben zunächst alkalisch aufgeschlossen und der Stickstoffgehalt des Rückstands anschließend analysiert (Methode 2.8.16.4). Für das Substrat wurde ein Wert von $0,3 \pm 0,2$ g/100 g TM bestimmt. Der Chitingehalt für KT FVE betrug $2,7 \pm 0,3$ g/100 g TM.

3.3.4.3 Wachstumskurven durch Bestimmung des Chitingehalts

Um Chitin als Biomarker zur Bestimmung des Pilzanteils zu testen, wurde der Chitingehalt an verschiedenen Erntetagen der Fermentation von Malzextrakt und Kartoffelpülpe (30 g/L) mit *F. velutipes* bestimmt. Dafür wurde die Methode nach Vetter und Siller verwendet (Methode 2.8.16.1). Dargestellt ist der Verlauf der Chitingehalts für ME FVE und KT FVE (Abbildung 28). Bei Kultur auf Malzextrakt und Kartoffeltrester stieg der Chitingehalt bis Kulturtag 9 an und stagnierte anschließend. Durch den Bezug des Chitingehalts von KT FVE auf ME FVE wurde der Pilzanteil abgeschätzt. Der berechnete Pilzanteil an Kulturtag 9 betrug 79%. Würde man den Blindwert für KT von KT FVE abziehen, errechnet sich für denselben Kulturtag ein Pilzgehalt von 54%.

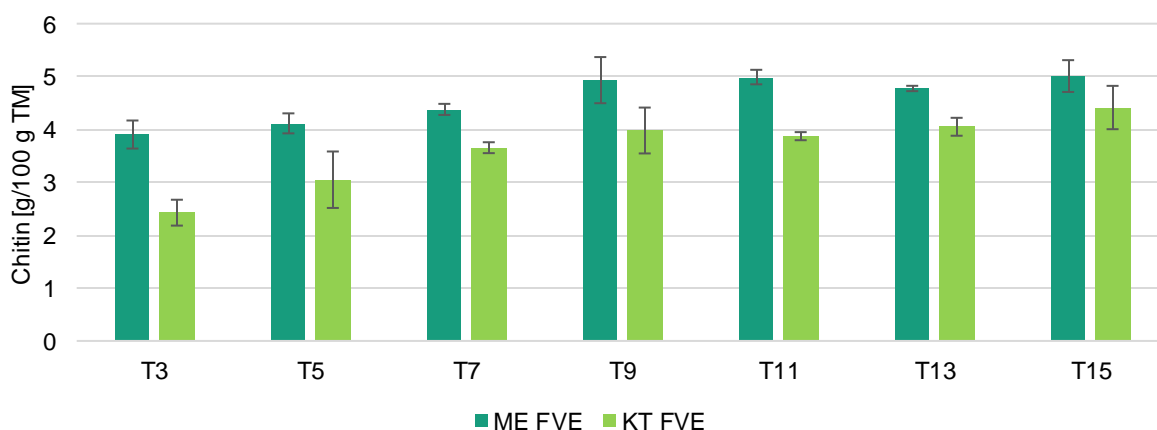


Abbildung 28: Chitingehalte nach Kultur von *F. velutipes* (FVE) auf Malzextrakt (ME) und Kartoffeltrester (KT), ($n=3$).

3.4 Maßstabsvergrößerung

Der Fermentationsprozess wurde auf die Fermentation von KS und KT in einem 7 L Bioreaktor (4,5 L Arbeitsvolumen) übertragen (Methoden: 2.6.3, 2.6.4). Die Sauerstoffzufuhr im Fermenter wurde zunächst manuell nachreguliert, im Rahmen von Optimierungsschritten jedoch automatisiert auf einen Sollwert des gelösten Sauerstoffs von 30% eingestellt. Zusätzlich wurden die Rührergeschwindigkeiten sowie die Verwendung und Häufigkeit von Rührerdrehstößen variiert. Diese dienen dem Ablösen von an Fermenterteilen festgewachsenem Myzel. Der Erntezeitpunkt wurde aufgrund der Erfahrungen aus

Versuchen in Schüttelkolben sowie der Beobachtung des pH-Werts und des Sauerstoffverbrauchs bestimmt. In Tabelle 36 sind die Fermentationsparameter und der Pilzgehalt (Methode 2.8.17) nach Beendigung der Fermentation für KS FVE, KS PSP und KT PSP dargestellt.

Tabelle 36: Maßstabsvergrößerung im 7 L Bioreaktor für KS FVE, KS PSP und KT PSP. Angaben zu Fermentationsparametern und dem Pilzgehalt. KS: Kartoffelschale; KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*; PSP: *P. pulmonarius*.

Pilz	FVE	PSP	PSP
Medium	KS	KS	KT
Konzentration	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Sauerstoffzufuhr	manuell	automatisiert	automatisiert
Rührergeschwindigkeit Start	200 rpm	100 rpm	100 rpm
Rührergeschwindigkeit Ende	300 rpm	150 rpm	200 rpm
Rührerdrehstöße	nein	nein	nein
Versuchsdauer	10 Tage	6 Tage	7 Tage
Pilzgehalt	52%	67%	57%

Die Fermentation von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* wurde im 7 L Fermenter optimiert. Tabelle 37 zeigt die Kenndaten verschiedener Fermenterläufe. Im Rahmen der Optimierung wurden geringere Rührergeschwindigkeiten, weniger Rührerdrehstöße und eine automatisierte Sauerstoffzufuhr verwendet.

Tabelle 37: Maßstabsvergrößerung im 7 L Bioreaktor für KT FVE. Angaben zu Fermentationsparametern und Pilzgehalten für verschiedene Optimierungsschritte. KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*.

Versuch	V1	V2	V3	V4	V5
Konzentration	20 g/L	20 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Sauerstoffzufuhr	manuell	manuell	manuell	automatisiert	automatisiert
Rührergeschwindigkeit Start	100 rpm	100 rpm	150 rpm	100 rpm	100 rpm
Rührergeschwindigkeit Ende	300 rpm	300 rpm	250 rpm	200 rpm	200 rpm
Rührerdrehstöße	ab Tag 2	Tag 4-6	nein	Tag 3 und 5	Tag 3 und 5
Versuchsdauer	7 Tage	10 Tage	8 Tage	6 Tage	6 Tage
Pilzgehalt	36%	72%	95%	89%	98%

In Abbildung 29 ist der erste Fermentationslauf für KT FVE (V1) dargestellt. Die Regelung der Sauerstoffzufuhr wurde manuell eingestellt und bereits in den ersten 12 h fiel der gelöste Sauerstoff auf ca. 0% ab. Durch die automatisierte Sauerstoffzufuhr konnte der gelöste

Sauerstoffgehalt auf 30% gehalten werden (Abbildung 30). Im Vergleich der beiden Fermentationsläufe sind zusätzlich die geringeren Rührergeschwindigkeiten und die Reduktion der Rührerdrehstöße zu erkennen.

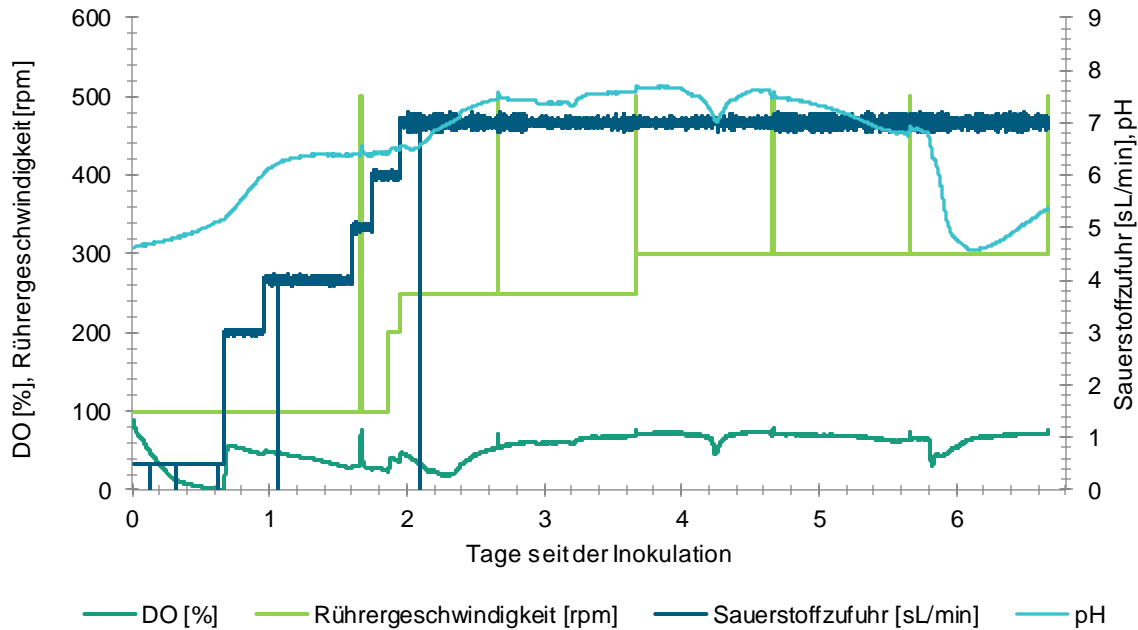


Abbildung 29: Gelöster Sauerstoffgehalt (DO), Rührergeschwindigkeit, Sauerstoffzufuhr und pH-Wert des ersten Fermentationslaufs (V1) von KT FVE im 7 L Bioreaktor. KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*.

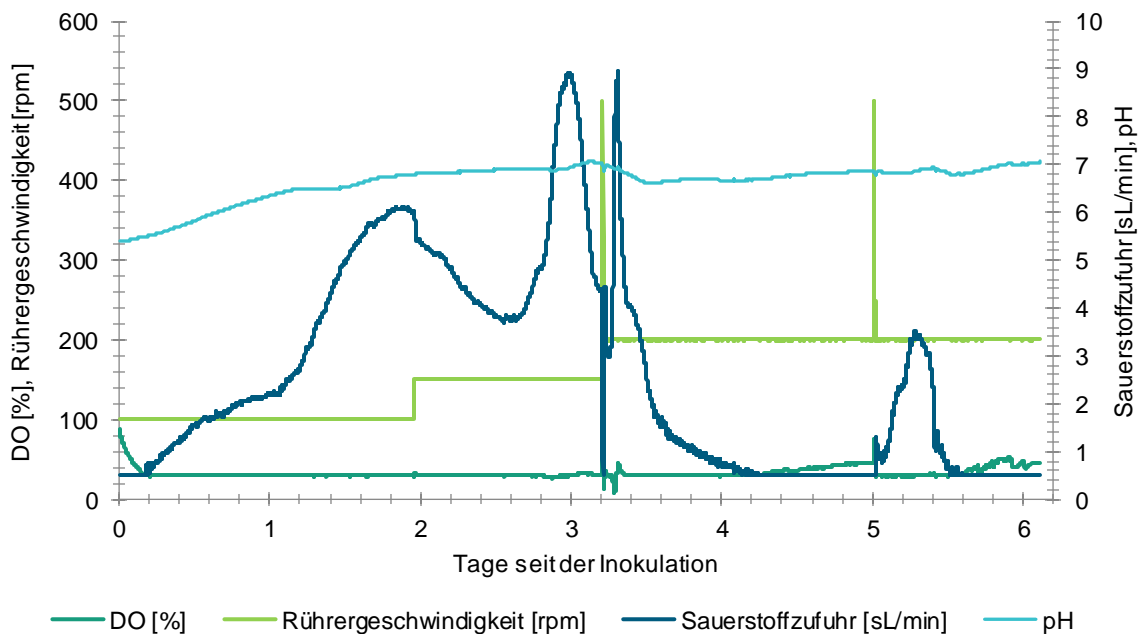


Abbildung 30: Gelöster Sauerstoffgehalt (DO), Rührergeschwindigkeit, Sauerstoffzufuhr und pH-Wert des optimierten Fermentationslaufs (V5) von KT FVE im 7 L Bioreaktor. KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*.

3.5 Grundanalytik des optimierten Fermentats

Aufgrund der höchsten Pilzgehalte von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester wurde KT FVE als bevorzugte Kombination für weitere Versuche verwendet. Da auch bei einer Substratkonzentration von 30 g/L noch ein hoher Pilzanteil (>80%) erreicht wurde, wurde das Fermentat näher untersucht. Es wurde ein Rohproteingehalt von $17,6 \pm 0,2$ g/100 g TM und ein Reinproteingehalt von $15,4 \pm 0,2$ g/100 g TM bestimmt. Die Aminosäureverteilung bei einer Substratkonzentration von 30 g/L anstatt 20 g/L unterschied sich nicht wesentlich von der Aminosäureverteilung bei 20 g/L (Anhang, Abbildung 93). Der Rohfettgehalt bei einer Substratkonzentration von 30 g/L betrug $3,2 \pm 0,1$ g/100 g TM. Der Rohaschegehalt betrug $2,9 \pm 0,1$ g/100 g TM. Damit entfielen auf die Kohlenhydratfraktion insgesamt ca. 76%. Der Anteil der unlöslichen Ballaststoffe wurde auf $34,9 \pm 1,7$ g/100 g TM und der Anteil der löslichen Ballaststoffe auf $1,3 \pm 0,3$ g/100 g TM bestimmt.

3.6 Übertragung auf industrielle Kartoffelpülpe

Die erzielten Erkenntnisse aus der Verwendung von Kartoffeltrester wurden auf die Kultivierung von industriell anfallender Kartoffelpülpe übertragen. Die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung zwischen Kartoffelpülpe und Kartoffeltrester sind unter 3.1 aufgeführt.

3.6.1 Wachstumsreihen auf Kartoffelpülpe und Kartoffeltrester

Für die Kultur von *F. velutipes* und *P. pulmonarius* auf industrieller Kartoffelpülpe wurde eine Substratkonzentration von 20 g/L gewählt. Zur Inokulation der Hauptkulturen wurden Vorkulturen auf Malzextrakt (7 Tage) verwendet und die Hauptkulturen an den Tagen 5, 7, 11 und 13 geerntet. Bestimmt wurden die Biotrockenmassen (Abbildung 31) und Ergosterolgehalte (Abbildung 32, Methoden: 2.6.4, 2.8.17).

Die Biotrockenmassen bei Kultur von *P. pulmonarius* auf Malzextrakt und Kartoffeltrester lagen insgesamt über den Biotrockenmassen nach Kultur von *F. velutipes*. Auf Kartoffelpülpe wurden für die Fermentate beider Pilze ähnliche Biotrockenmassen bestimmt. Diese lagen mit dem höchsten Biotrockenmassegehalt von $11,79 \pm 0,02$ g/L an Tag 11 für *P. pulmonarius* und $11,18 \pm 0,02$ g/L an Tag 9 für *F. velutipes* insgesamt über den Biotrockenmassen bei Kultur auf Kartoffelpülpe.

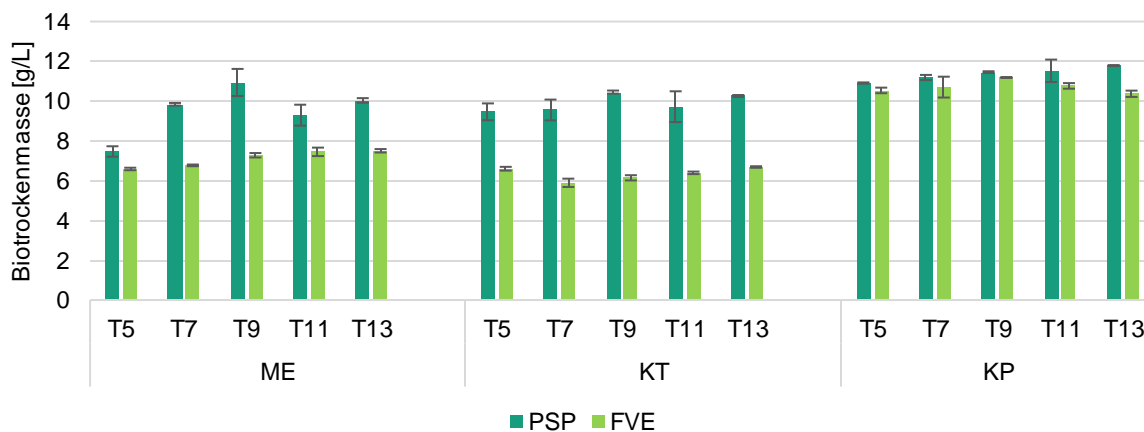


Abbildung 31: Biotrockenmasse [g/L] nach Kultur von *F. velutipes* (FVE) und *P. pulmonarius* (PSP) auf Malzextrakt (ME), Kartoffeltrester (KT) und Kartoffelpülpe (KP) bei einer Substratkonzentration von 20 g/L, (n=2).

Die erreichten Pilzanteile lagen nach Kultur von *P. pulmonarius* auf Kartoffelpülpe insgesamt unter den Werten nach Kultur auf Kartoffeltrester (Abbildung 32). Der höchste Pilzanteil wurde auf beiden Substraten an Tag 11 erreicht und betrug nach Kultur auf Kartoffeltrester $75 \pm 2\%$ und auf Kartoffelpülpe $61 \pm 1\%$. Insgesamt zeigten die Wachstumskurven auf beiden Substraten einen ähnlichen Verlauf.

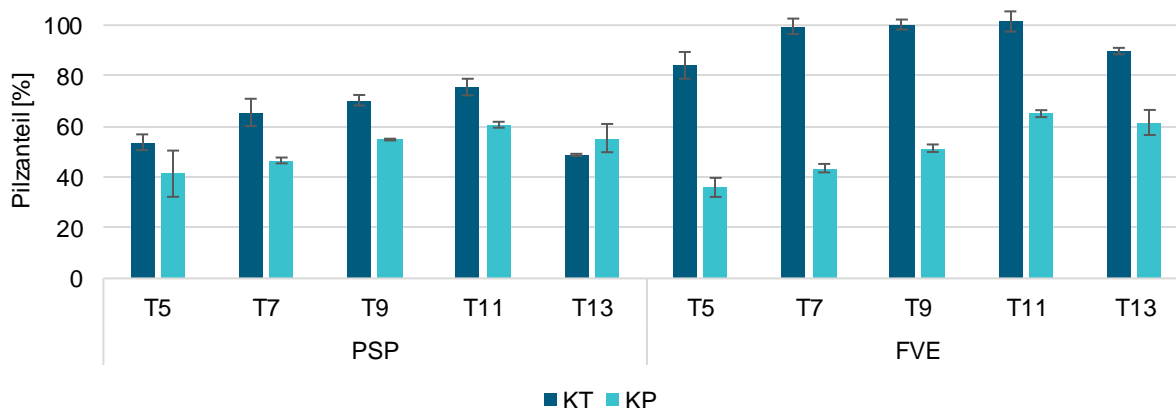


Abbildung 32: Pilzanteile [%] nach Kultur von *F. velutipes* (FVE) und *P. pulmonarius* (PSP) auf Kartoffeltrester (KT) und Kartoffelpülpe (KP) bei einer Substratkonzentration von 20 g/L, (n=2).

Bei der Fermentation von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* wurden, wie bereits zuvor beobachtet, sehr hohe Pilzgehalte erzielt, wobei der maximale Pilzanteil für Kulturtag 7 bestimmt wurde. Die Pilzanteile bei Fermentation von Kartoffelpülpe mit *F. velutipes* lagen deutlich unter den Pilzgehalten auf Kartoffeltrester. Der maximale Pilzanteil wurde an Tag 11 erreicht und betrug $65 \pm 1\%$.

Da die höchsten Pilzanteile für beide Pilze auf Kartoffelpülpe an Tag 11 bestimmt wurden, wurden die Fermentate für diesen Kulturtag auf beiden Medien näher analysiert.

3.6.2 Aminosäureverteilung nach Kultur auf Kartoffelpülpe

Die Aminosäurezusammensetzungen von Kartoffelpülpe sowie deren Fermentate wurden nach Kultur von *P. pulmonarius* und *F. velutipes* bei 20 g/L Substratkonzentration an Kulturtag 11 bestimmt (Abbildung 33).

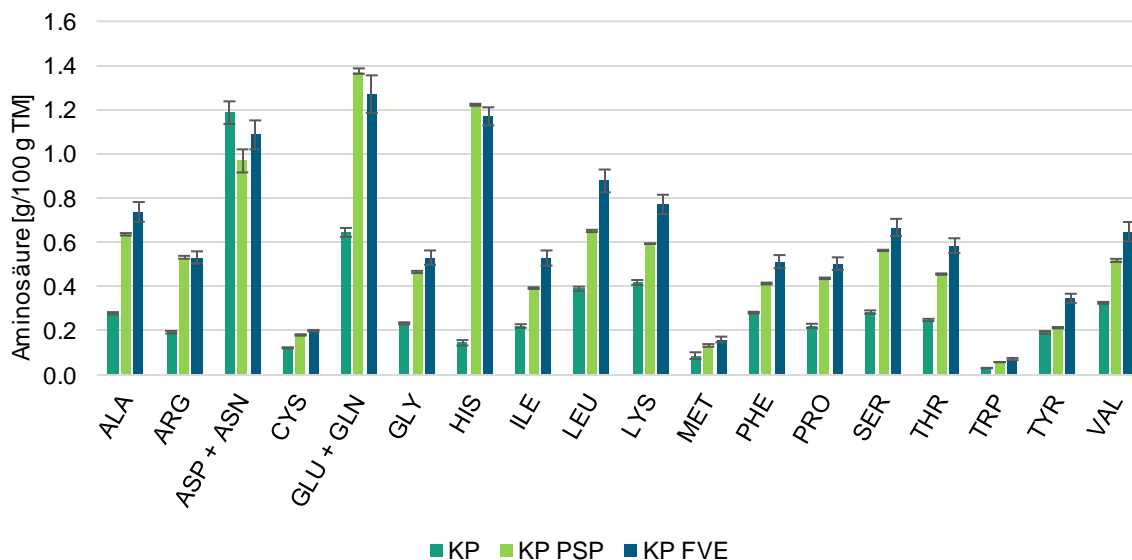


Abbildung 33: Aminosäureverteilung von Kartoffelpülpe (KP) sowie nach Kultur von *P. pulmonarius* (PSP) und *F. velutipes* (FVE) auf Kartoffelpülpe. Substratkonzentration 20 g/L, Kulturtag 11, (KP: $n=3$, Fermentate $n=2$).

Die Aminosäureverteilung beider Pilze ähnelte sich sehr, wobei die Aminosäuregehalte von *F. velutipes* zum Teil über den Gehalten von *P. pulmonarius* lagen. Bei den Aminosäuren Arginin, Asparaginsäure + Asparagin, Cystein, Glutaminsäure + Glutamin, Histidin und Methionin lagen die Gehalte in einem ähnlichen Bereich. Im Vergleich zur Medienkontrolle stieg nur der Gehalt an Asparaginsäure + Asparagin durch die Fermentation nicht an.

Über die Aminosäureverteilung wurden der Reinproteingehalt sowie die Biologische Wertigkeit bestimmt (Tabelle 38).

Tabelle 38: Reinproteingehalte und biologische Wertigkeiten von Kartoffelpülpe (KP) sowie der Fermentate. Substratkonzentration 20 g/L, Kulturtag 11, FVE: *F. velutipes*, PSP: *P. pulmonarius*, (KP: $n=3$, Fermentate $n=2$).

	Reinproteingehalt [g/100 g TM]	Biologische Wertigkeit
KP	4,74 ± 0,08	90 ± 1
KP PSP	8,43 ± 0,08	89 ± 1
KP FVE	9,62 ± 0,55	90 ± 1

3.6.3 Funktionelle Eigenschaften und chemische Zusammensetzung

Aufgrund des etwas höheren Pilzgehaltes und des höheren Proteingehalts auf Kartoffelpülpe sowie der besseren Ergebnisse auf Kartoffeltrester wurden die Fermentate von *F. velutipes* auf beiden Substraten näher analysiert.



Abbildung 34: Kulturbrühe sowie gefriergetrocknetes Fermentat von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester (links) und Kartoffelpülpe (rechts).

In Abbildung 34 sind die Submerskulturen und die lyophilisierten Fermentate von *F. velutipes* auf beiden Kartoffelmedien dargestellt. Zu erkennen ist die deutlich hellere Farbe nach Kultur auf Kartoffeltrester, sowohl der Kulturbrühe als auch des gefriergetrockneten Fermentats. Zusätzlich wurden die Submerskulturen mikroskopiert (Methode 2.7). Abbildung 35 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Kartoffelpülpe und der Fermentate mit *F. velutipes* sowie die Kontrolle von *F. velutipes* auf Malzextrakt. Die Aufnahmen von Kartoffeltrester und der Fermentate von Kartoffeltrester sind in Abbildung 24 dargestellt.

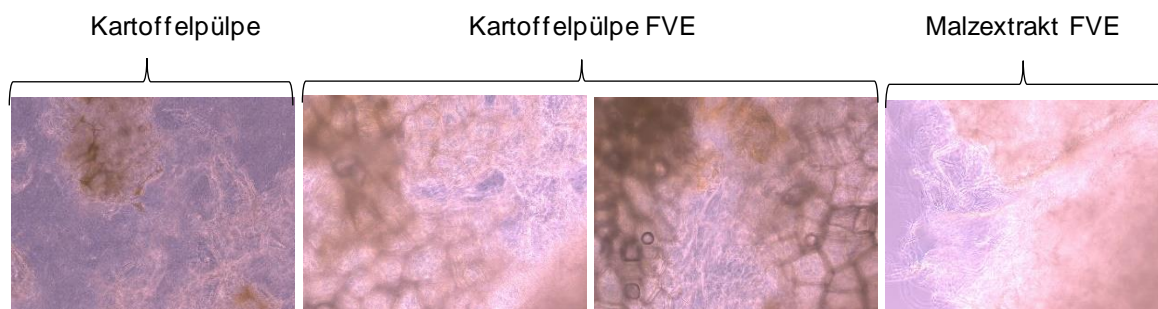


Abbildung 35: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kartoffelpülpe, dem Fermentat von Kartoffelpülpe mit *F. velutipes* und dem Myzel von *F. velutipes* nach Wachstum auf Malzextrakt. 20fache Vergrößerung, Substratkonzentration 20 g/L.

Wie bei den Aufnahmen des Kartoffeltresters waren bereits in der Medienkontrolle fädige Strukturen erkennbar. Die Unterscheidung von Medium und Pilz war dadurch erschwert. Dennoch nahm der Anteil an fädigen, hellen Strukturen deutlich zu. Im Unterschied zu Kartoffeltrester waren bei der Kartoffelpülpe dunklere Strukturen mit Zellabgrenzungen in der Kontrolle sowie dem Fermentat erkennbar.

Zusätzlich wurden die Wasser- und Ölbindekapazität der Substrate und der Fermentate bestimmt (Tabelle 39, Methoden: 2.8.4, 2.8.5).

Tabelle 39: Wasser- (WBK) und Ölbindekapazitäten (ÖBK) von Kartoffeltrester und Kartoffelpülpe vor und nach Fermentation mit *F. velutipes* (FVE). 20g/L Substratkonzentration, Kulturtag 11, (Medien: $n=3$; Fermentate: $n=2$).

	WBK [mL/g 100 TM]	ÖBK [g/g 100 TM]
Kartoffeltrester	4,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Kartoffeltrester FVE	3,6 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Kartoffelpülpe	10,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1
Kartoffelpülpe FVE	6,4 ± 0,0	6,2 ± 0,2

Durch die Fermentation des entsprechenden Mediums mit *F. velutipes* sank die Wasserbindekapazität, während die Ölbindekapazität stieg. Neben den Reinproteingehalten und biologischen Wertigkeiten (Tabelle 38), wurden der Aschegehalt (KP FVE: 3,1 ± 0,0 g/100 g TM) und der Fettgehalt (KP FVE: 2,9 ± 0,7 g/100 g TM) der Fermentate von Kartoffelpülpe ermittelt.

3.6.4 Kombination mit Kartoffelfruchtwasser

Als Optimierungsversuch zur Verbesserung der Fermentation von Kartoffelpülpe wurde die Kombination von industrieller Kartoffelpülpe mit Kartoffelfruchtwasser (KW) für die Kultur von *F. velutipes* getestet. Zusätzlich wurde die Substratkonzentration der eingesetzten Kartoffelpülpe auf 10 g/L reduziert. Die Bezeichnung für die verschiedenen Kombinationen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Ernte erfolgte an Tag 7. K1 bezieht sich dabei auf die Daten der ersten aufgenommenen Wachstumsreihe (3.6.1). In Abbildung 36 sind die Biofecht- und Biotrockenmassen nach Fermentation der verschiedenen Substratkombinationen dargestellt. Zusätzlich wurden der Pilzanteil (Methode 2.8.17) sowie der Reinproteingehalt über eine Aminosäureanalyse ermittelt (Methode 2.8.13). Für die Medienkontrolle KW wurde ein Reinproteingehalt von 54,74 ± 2,91 g/100 g TM bestimmt. Die Biotrockenmasse der Medienkontrolle betrug 0,7 ± 0,1 g/L bei eingesetzter Substratkonzentration von 10 g/L. Die Aminosäureprofile der verschiedenen Kombinationen, sowie der Medienkontrolle KW sind in Abbildung 37 dargestellt. Zu beachten ist, dass aufgrund einer nicht ausreichend guten Trennung bei dieser Analyse der Gehalt an Methionin nicht mitbestimmt wurde und dadurch der Einfluss der Zugabe von KW auf die biologische Wertigkeit nicht ermittelt werden konnte.

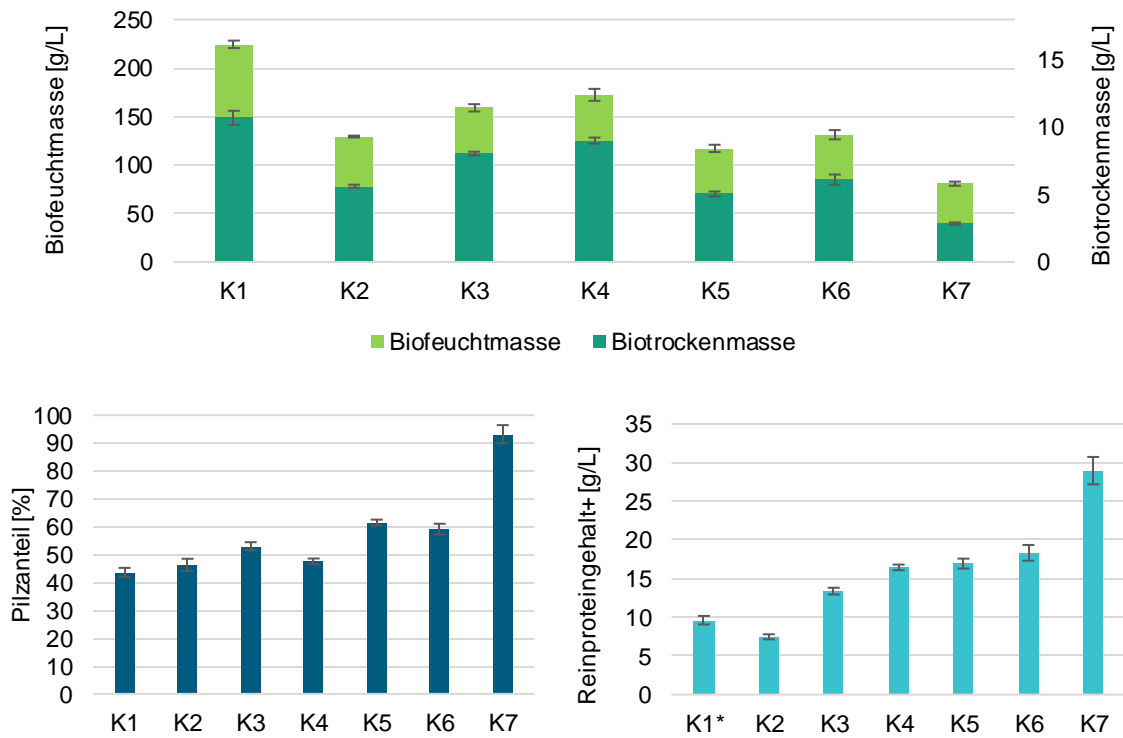


Abbildung 36: Biofeucht-, Biotrockenmassen, Pilzanteile und Reinproteingehalte nach Fermentation verschiedener Konzentrationen und Kombinationen aus Kartoffelfruchtwasser und Kartoffelpülp (K1-K7). +: Reinproteingehalt ohne Methionin, *K1: Reinproteingehalt von Tag 9 anstatt Tag 7, (K1: n=2; K2-7: n=3).

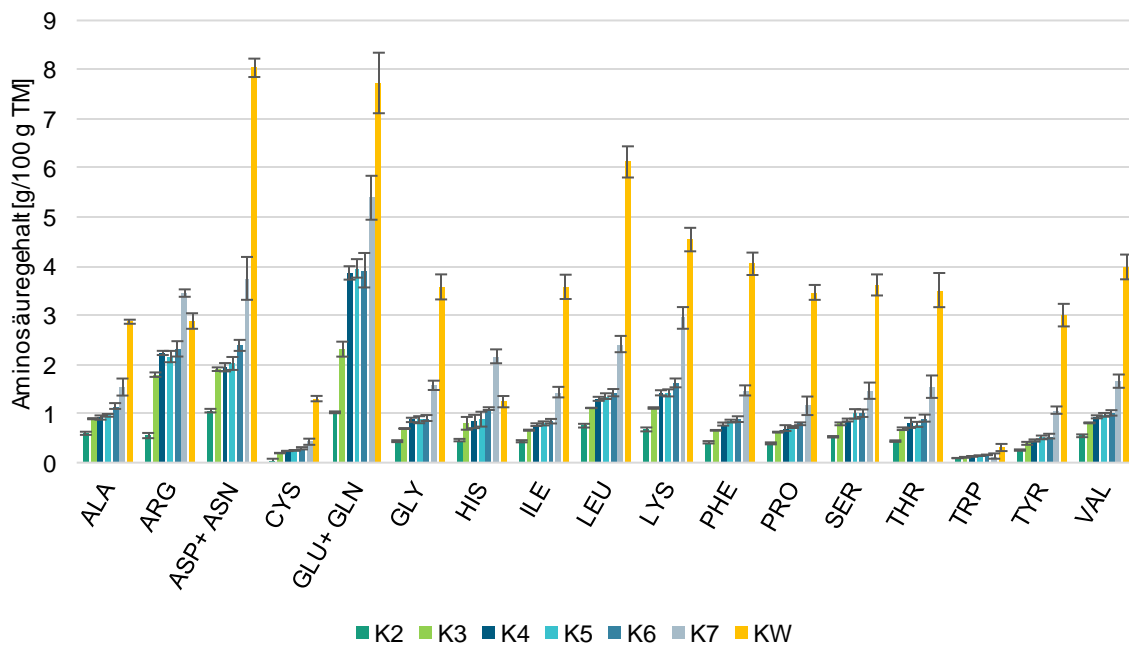


Abbildung 37: Aminosäureprofile nach Fermentation verschiedener Konzentrationen und Kombinationen aus Kartoffelfruchtwasser und Kartoffelpülp (K2-K7) sowie von Kartoffelfruchtwasser, (n=3).

3.7 Bestimmung des Glykoalkaloidgehalts

3.7.1 Validierung der Methode

Für die Validierung der Methode zur Bestimmung des Glykoalkaloidgehalts wurde für α -Solanin und α -Chaconin der Arbeitsbereich von 0,250 $\mu\text{g/mL}$ bis 0,833 $\mu\text{g/mL}$ und für Solanidin von 0,017 $\mu\text{g/mL}$ bis 0,083 $\mu\text{g/mL}$ überprüft (Methoden: 2.8.18, 2.9). Abbildung 38 zeigt die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) der Kalibrierpunkte bei den Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z -Verhältnissen) von 868,5 (α -Solanin), 885,5 (α -Chaconin) und 398,3 (Solanidin).

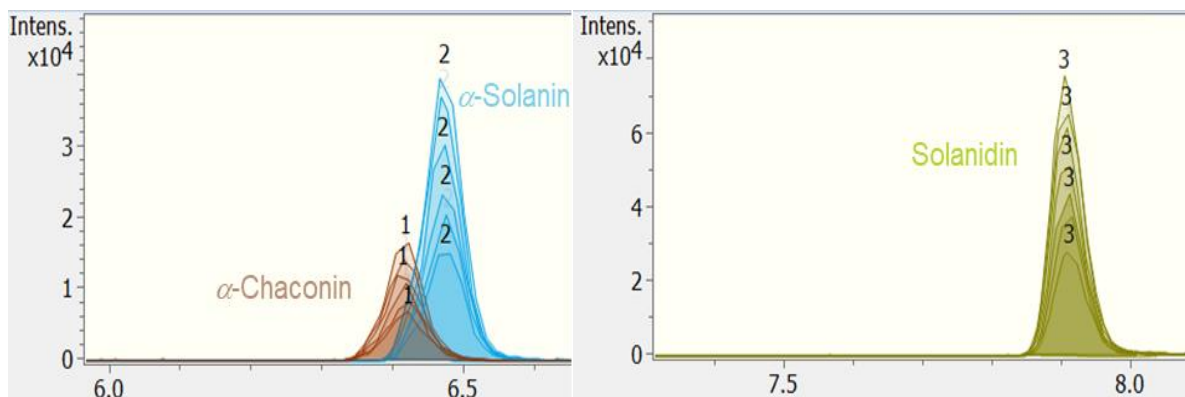


Abbildung 38: Extrahierte Ionenchromatogramme der Kalibrierpunkte bei m/z -Verhältnissen von 868,5 (α -Solanin, blau), 885,5 (α -Chaconin, rot) und 398,3 (Solanidin, grün).

3.7.1.1 Überprüfung der Linearität

Die Linearität wurde über den Arbeitsbereich für drei unabhängige Kalibrierreihen mittels Linearitätstest nach Mandel nachgewiesen (Methode 2.9.1). Die berechneten Parameter zur Durchführung des Linearitätstests sind im Anhang in Tabelle 56 aufgeführt. Beispielhaft sind in Abbildung 39 sind Kalibrierreihen für die drei Analyten dargestellt. Im Anhang in Abbildung 84-Abbildung 92 sind zusätzlich Kalibriergraden, Response-, Residuen- und Fehlerplots je in Dreifachbestimmung für α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin aufgeführt.

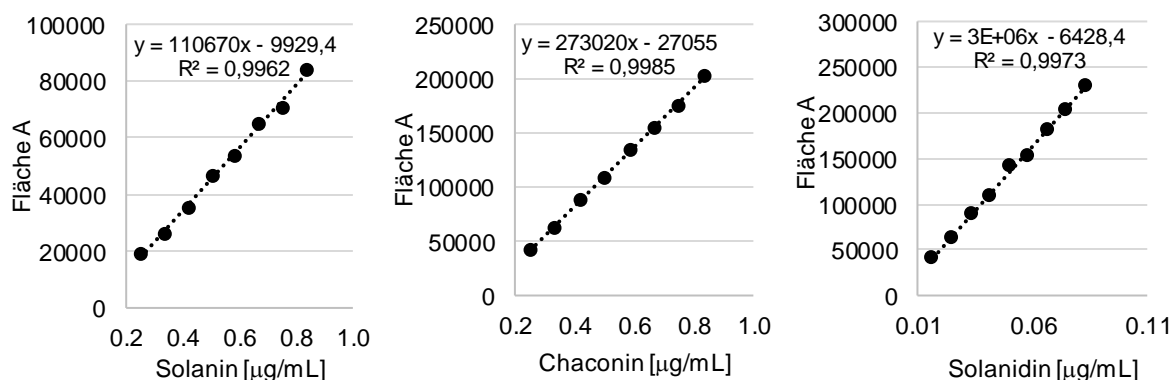


Abbildung 39: Kalibriergraden zur Bestimmung von α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin.

3.7.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden anhand von drei Kalibrierreihen für die Analyten α -Solamin, α -Chaconin und Solanidin bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 40 aufgeführt.

Tabelle 40: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Substanzen α -Solamin, α -Chaconin und Solanidin, ($n=3$).

	α -Solamin [$\mu\text{g/mL}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/mL}$]	Solanidin [$\mu\text{g/mL}$]
Nachweisgrenze	0,057 \pm 0,004	0,067 \pm 0,005	0,004 \pm 0,002
Bestimmungsgrenze	0,175 \pm 0,012	0,199 \pm 0,012	0,014 \pm 0,005

3.7.1.3 Präzision

Für die Bestimmung der Präzision wurde Kalibrierpunkt drei (Abbildung 39) sechsfach vermessen sowie eine reale Probe sechsfach aufgearbeitet (Methode 2.9.2). Die Ergebnisse der Mess- und Methodenpräzision sind in Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 41: Messpräzision und Methodenpräzision zur Bestimmung von α -Solamin, α -Chaconin und Solanidin unter Angabe des Mittelwerts, der Standardabweichung und dem Varianzkoeffizient, ($n=6$).

Messpräzision	Probe	α -Solamin [$\mu\text{g/mL}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/mL}$]	Solanidin [$\mu\text{g/mL}$]
	1	0,56	0,60	0,065
	2	0,60	0,60	0,065
	3	0,60	0,62	0,065
	4	0,56	0,64	0,067
	5	0,57	0,62	0,069
	6	0,57	0,59	0,062
	Mittelwert	0,58	0,61	0,066
	Standardabweichung	0,02	0,02	0,002
Varianzkoeffizient	3,4%	2,9%	3,6%	
Methodenpräzision	Probe	α -Solamin [$\mu\text{g/g}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/g}$]	Solanidin [$\mu\text{g/g}$]
	1	84,13	72,61	5,85
	2	88,37	74,15	5,74
	3	81,94	73,21	4,88
	4	78,21	76,08	5,46
	5	83,56	77,55	5,28
	6	84,60	77,25	5,49
	Mittelwert	83,47	75,14	5,45
	Standardabweichung	3,34	2,11	0,35
Varianzkoeffizient	4,0%	2,8%	6,4%	

3.7.1.4 Überprüfung der Stabilität

Zur Beurteilung der Stabilität extrahierter Proben wurden diese in der ersten Woche, vier Wochen sowie sechs Wochen nach Aufarbeitung gemessen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Über den betrachteten Zeitraum blieben die Glykoalkaloidgehalte innerhalb der Standardabweichungen konstant (Abbildung 40).

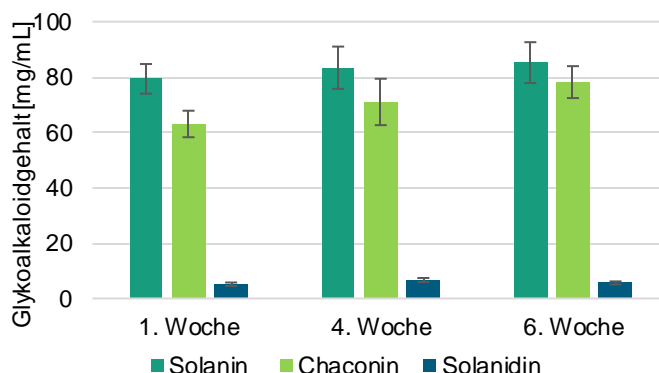


Abbildung 40: Ermittelter α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalt [$\mu\text{g/g}$] in Abhängigkeit der Lagerzeit bei 4 °C, ($n=3$).

3.7.2 Glykoalkaloidgehalte der Substrate

Die Substrate Kartoffeltrester und Kartoffelpülpe wurden auf ihre α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte untersucht (Abbildung 41). Diese Ergebnisse werden als Substratkontrolle bezeichnet (SK). Zusätzlich wurden Medienkontrollen ohne Inokulation mitgeführt (MK), die anschließend analog zu den Fermentaten, in Rückstand (R) und Überstand (Ü) getrennt wurden. Es wurde die Summe (S) des Gehalts [$\mu\text{g/L}$] von Rückstand und Überstand berechnet.

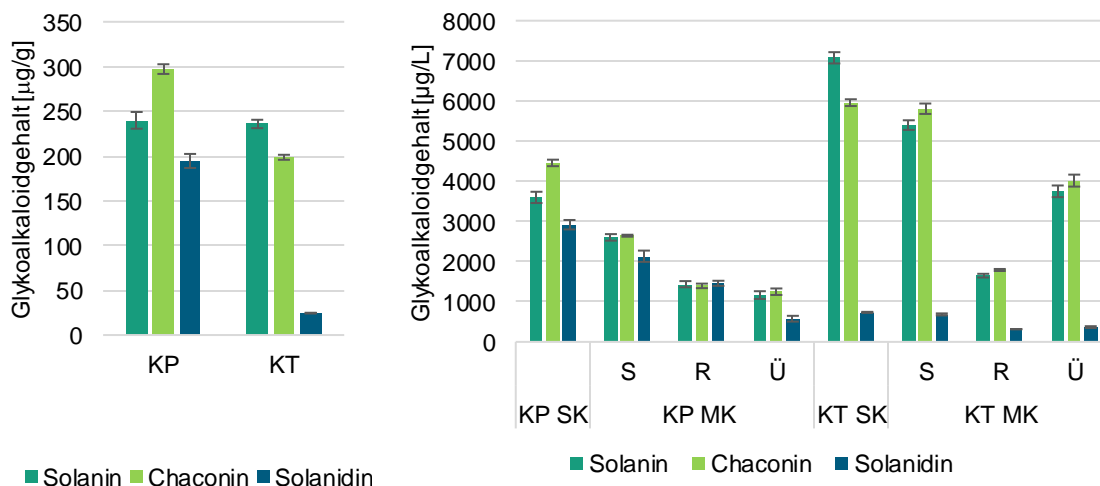


Abbildung 41: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substrate (links, [$\mu\text{g/g}$]), sowie der Vergleich mit den Medienkontrollen (MK) und der Aufteilung in Rückstand (R) und Überstand (Ü) (rechts, [$\mu\text{g/L}$]). KP: Kartoffelpülpe; KT: Kartoffeltrester; SK: Substratkontrolle; S: Summe aus Rückstand und Überstand, ($n=3$).

Der α -Solanin-Gehalt der beiden Substrate war ähnlich, wohingegen in Kartoffelpülpe höhere Gehalte an α -Chaconin und Solanidin enthalten waren. Unter Einbezug der Biotrockenmassen und damit der Berechnung in [$\mu\text{g/L}$] waren höhere Gehalte in Kolben mit Kartoffeltrester als Substrat vorhanden, da hier eine Substratkonzentration von 30 g/L anstatt 15 g/L für Kartoffelpülpe genutzt wurde. Die Werte der Medien- und Substratkontrolle bei

Kartoffeltrester ähnelten sich für α -Chaconin und Solanidin sehr. Der α -Solanin-Gehalt war in der Medienkontrolle verringert. Die α -Solanin und α -Chaconingehalte für KP MK teilten sich in ähnlichen Anteilen in Rückstand und Überstand auf, bei KT MK war der Gehalt an α -Solanin und α -Chaconin im Überstand höher als im Rückstand.

3.7.3 Glykoalkaloidgehalte der Fermentate mit *Flammulina velutipes*

Die α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte wurden nach der Fermentation von Kartoffelpülpe und Kartoffeltrester mit *F. velutipes* an den Kulturtagen 3, 5, 7, und 9 bestimmt (Methode 2.8.18). Die Gehalte der Fermentate im Vergleich zu den Kontrollen sind in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substrat- und Medienkontrollen (SK/MK) sowie der Fermentate von Kartoffelpülpe (KP) und Kartoffeltrester (KT) mit *F. velutipes* (FVE) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9), R: Rückstand, ($n=3$).

Kartoffelpülpe		α -Solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/g}$]	Solanidin [$\mu\text{g/g}$]
Kontrollen	SK	234 \pm 11	297 \pm 7	195 \pm 8
	MK (R)	199 \pm 8	194 \pm 3	202 \pm 3
KP FVE	T3 (R)	200 \pm 29	242 \pm 52	138 \pm 70
	T5 (R)	154 \pm 11	147 \pm 10	106 \pm 12
	T7 (R)	143 \pm 5	127 \pm 10	110 \pm 6
	T9 (R)	139 \pm 18	121 \pm 8	95 \pm 2
Kartoffeltrester		α -Solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/g}$]	Solanidin [$\mu\text{g/g}$]
Kontrollen	SK	236 \pm 6	199 \pm 3	25 \pm 1
	MK (R)	180 \pm 1	196 \pm 3	35 \pm 2
KT FVE	T3 (R)	406 \pm 56	461 \pm 102	66 \pm 49
	T5 (R)	214 \pm 18	328 \pm 17	5 \pm 2
	T7 (R)	265 \pm 30	366 \pm 41	3 \pm 1
	T9 (R)	161 \pm 12	247 \pm 25	3 \pm 1

Zu erkennen ist, dass die Gehalte bei Fermentation auf Kartoffelpülpe im Vergleich zur Substrat- und Medienkontrolle geringer ausfallen. Bei Fermentation von Kartoffeltrester ist der Gehalt der α -Solanin- und α -Chaconingehalt in den Fermentaten überwiegend erhöht. Zur genaueren Betrachtung wurde die Verteilung in Rückstand und Überstand der Fermentate analysiert (Abbildung 42) sowie die Summe aus beidem (Abbildung 43).

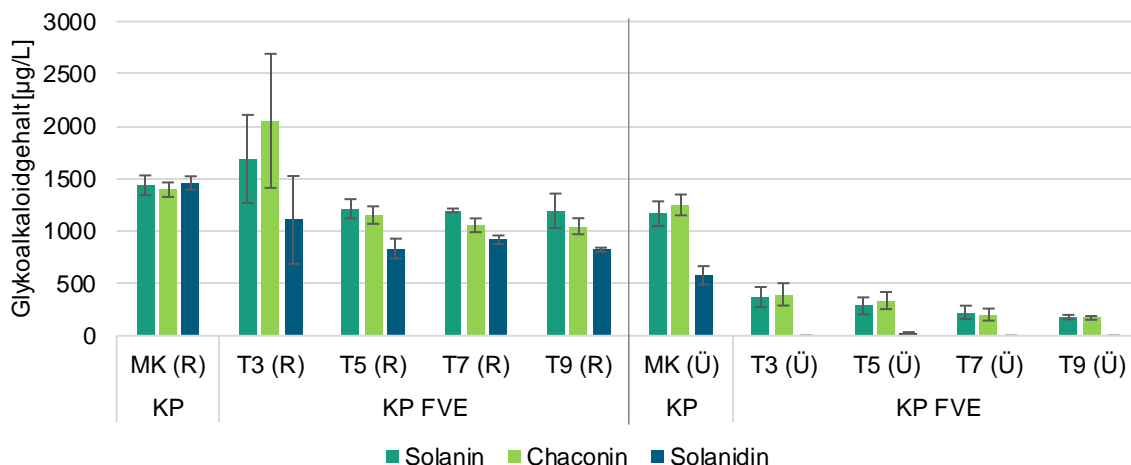


Abbildung 42: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Rückstände (R) und Überstände (Ü) der Medienkontrolle (MK) sowie der Fermentate von Kartoffelpülpe (KP) mit *F. velutipes* (FVE) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9), ($n=3$).

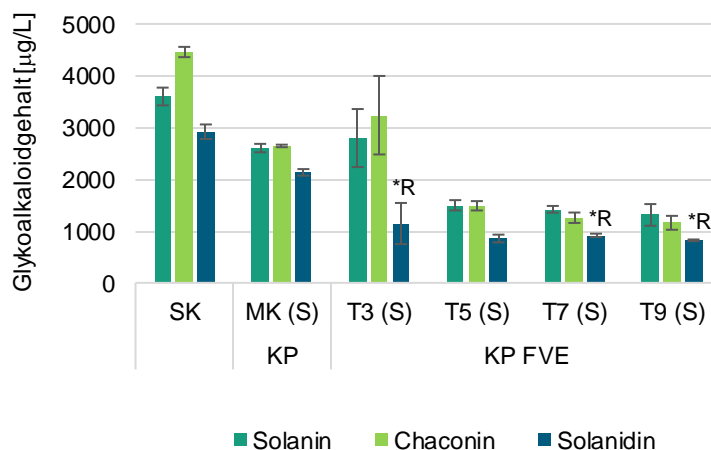


Abbildung 43: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substratkontrolle (SK) sowie die Summen (S) aus Rückstand und Überstand der Medienkontrolle (MK) und der Fermentate von Kartoffelpülpe (KP) mit *F. velutipes* (FVE) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9). *R: nur der Gehalt des Rückstands, ($n=3$).

Die Summen der Rückstände und Überstände der Fermentate lagen bis auf Tag drei unter den Medien- und Substratkontrollen (Abbildung 43). Der Gehalt der Rückstände waren dabei nur geringfügig niedriger als die der Medienkontrolle (Abbildung 42). Die Glykoalkaloidgehalte der Überstände sanken durch die Fermentation hingegen deutlich. Die Solanidin-Gehalte der Überstände an Tag 3, 7 und 9 lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Bei Fermentation von Kartoffelpülpe mit *F. velutipes* wurde ebenfalls eine deutliche Verringerung der α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte in den Überständen im Vergleich zur Medienkontrolle beobachtet (Abbildung 44). Die Solanidin-Gehalte an allen Fermentationstagen sowie die α -Chaconin-Gehalte an Kulturtag 5 und 7 konnten nicht

bestimmt werden, da sie unter der Nachweisgrenze lagen. Die Gehalte in den Rückständen stiegen bis auf die Solanidin-Gehalte deutlich an. In Summe lagen die Gehalte der Fermentate unter den Gehalten der Substrat- und Medienkontrollen (Abbildung 45).

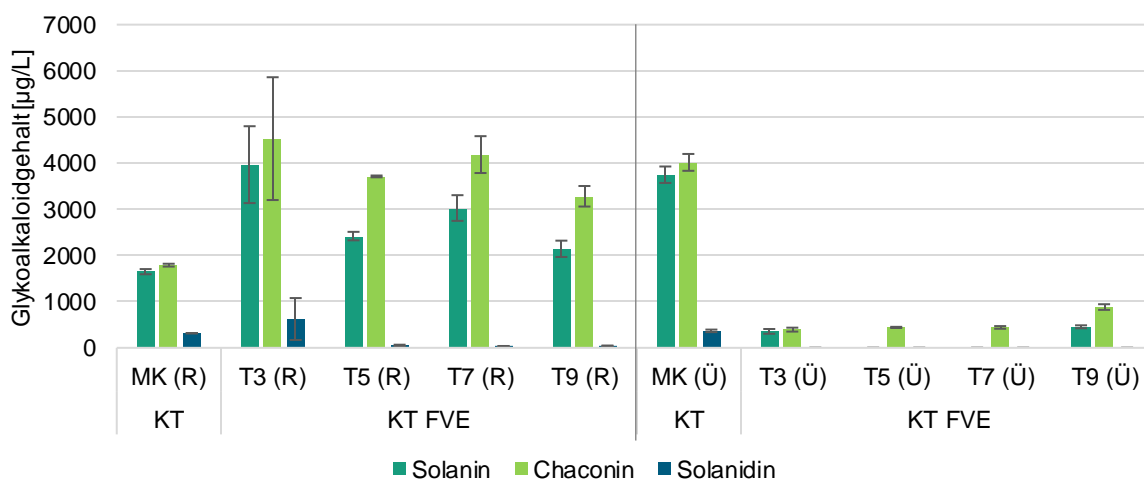


Abbildung 44: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Rückstände (R) und Überstände (Ü) der Medienkontrolle (MK) sowie der Fermentate von Kartoffeltrester (KT) mit *F. velutipes* (FVE) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9), ($n=3$).

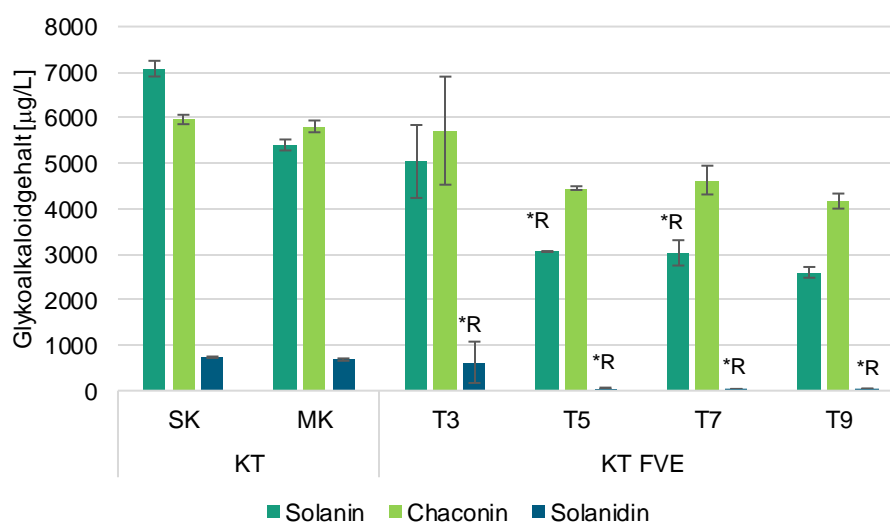


Abbildung 45: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substratkontrolle (SK) sowie die Summen der Glykoalkaloidgehalte aus Rückstand und Überstand der Medienkontrolle (MK) und der Fermentate von Kartoffeltrester (KT) mit *F. velutipes* (FVE) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9). *R: nur der Gehalt des Rückstands, ($n=3$).

3.7.4 Glykoalkaloidgehalte der Fermentate mit *Pleurotus pulmonarius*

Die α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Fermentate von Kartoffeltrester und Kartoffelpülpe mit *P. pulmonarius* an verschiedenen Kultivierungstagen im Vergleich zu den Kontrollen sind in Tabelle 43 dargestellt. Die α -Solanin- und α -Chaconin-Gehalte nach Fermentation von Kartoffeltrester an Kulturtag 7 und 9 sowie die Gehalte aller

Fermentationsüberstände lagen unter der Nachweisgrenze. Durch die Fermentation beider Medien wurde der Glykoalkaloidgehalt gesenkt.

Tabelle 43: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substrat- und Medienkontrollen (SK/MK) sowie der Fermentate von Kartoffelpülpe (KP) und Kartoffeltrester (KT) mit *P. pulmonarius* (PSP) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9). R: Rückstand, ($n=3$).

Kartoffelpülpe		α -Solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/g}$]	Solanidin [$\mu\text{g/g}$]
Kontrollen	SK	240 \pm 11	297 \pm 7	195 \pm 8
	MK (R)	194 \pm 8	310 \pm 3	202 \pm 3
KP PSP	T3 (R)	139 \pm 15	84 \pm 3	123 \pm 8
	T5 (R)	134 \pm 11	75 \pm 10	95 \pm 3
	T7 (R)	69 \pm 6	54 \pm 3	75 \pm 11
	T9 (R)	73 \pm 4	52 \pm 2	68 \pm 2
Kartoffeltrester		α -Solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -Chaconin [$\mu\text{g/g}$]	Solanidin [$\mu\text{g/g}$]
Kontrollen	SK	236 \pm 6	199 \pm 3	25 \pm 1
	MK (R)	180 \pm 1	196 \pm 3	35 \pm 2
KT PSP	T3 (R)	95 \pm 5	91 \pm 2	10 \pm 1
	T5 (R)	44 \pm 7	39 \pm 4	5 \pm 1
	T7 (R)	unter der NWG	unter der NWG	2 \pm 1
	T9 (R)	unter der NWG	unter der NWG	2 \pm 1

Die Gehalte der Rückstände nach Fermentation beider Medien lagen unter den Medien- und Substratkontrollen (Abbildung 46, Abbildung 47). Bei Fermentation von Kartoffeltrester konnte an Kulturtag 7 und 9 kein α -Solanin- und α -Chaconin-Gehalt bestimmt werden, da diese unter der Bestimmungsgrenze lagen.

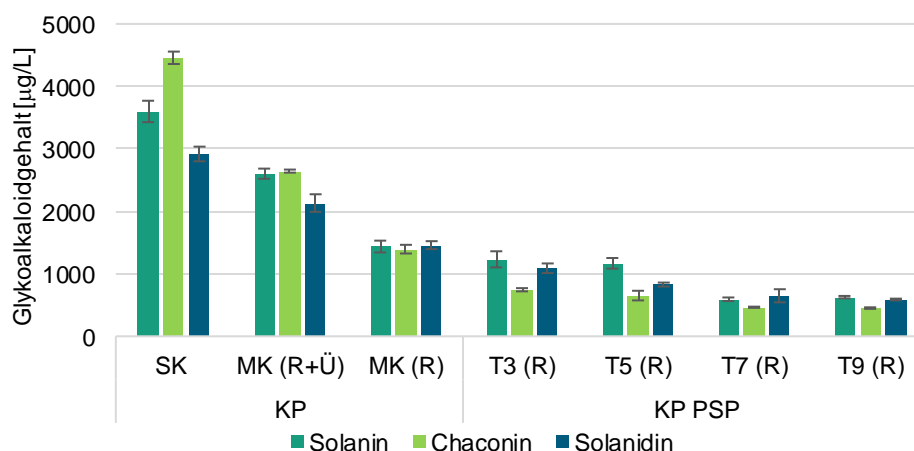


Abbildung 46: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substratkontrolle (SK) sowie die Summen der Glykoalkaloidgehalte aus Rückstand (R) und Überstand (Ü) der Medienkontrolle (MK) und der Rückstände der Fermentate von Kartoffelpülpe (KP) mit *P. pulmonarius* (PSP) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9), ($n=3$).

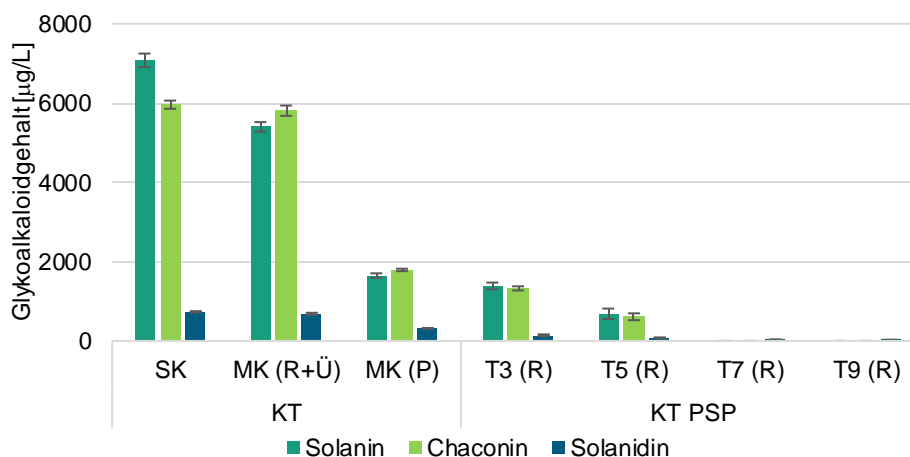


Abbildung 47: α -Solanin-, α -Chaconin- und Solanidingehalte der Substratkontrolle (SK) sowie die Summen der aus Rückstand (R) und Überstand (Ü) der Medienkontrolle (MK) und der Rückstände der Fermentate von Kartoffeltrester (KT) mit *P. pulmonarius* (PSP) an verschiedenen Kulturtagen (T3-9), ($n=3$).

3.7.5 Chromatogramme und Massenspektren

Um Rückschlüsse auf mögliche Metabolite der Glykoalkaloide oder von Solanidin ziehen zu können, wurden die Base Peak Chromatogramme (BPC) der Fermentate von KT mit der Medienkontrolle sowie mit der Kultur auf Malzextrakt für *F. velutipes* (Abbildung 48) und *P. pulmonarius* (Abbildung 51) verglichen. Dabei wurden der Rückstand und der Überstand betrachtet. Zusätzlich wurden die Chromatogramme an den verschiedenen Kultivierungstagen für die Rückstände miteinander verglichen (Abbildung 49; Abbildung 52). Abschließend erfolgte ein Abgleich mit den Fermentaten von Kartoffelpülpe anstelle von Kartoffeltrester (Abbildung 50; Abbildung 53). Zusätzliche Peaks, welche weder in der Malzextraktkultur noch in der Medienkontrolle zu finden waren, wurden mit einer Nummer versehen. Bei abweichenden Massenspektren von Kontrolle und Fermentaten zur selben Retentionszeit, wurde der Peak der Kontrolle ebenfalls nummeriert. Die Massenspektren aller nummerierten Peaks sowie von α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin sind in den Abbildungen 54-57 dargestellt. Bei Kultur auf Kartoffeltrester wurden weniger zusätzliche Peaks nach Kultur mit *F. velutipes* (Abbildung 48; Abbildung 49) als mit *P. pulmonarius* (Abbildung 51; Abbildung 52) detektiert. Bei Kultur auf KP wurden von den zusätzlichen Peaks 7-13 für KP FVE (Abbildung 51) die Peaks 7,8,10 und 13 ebenso bei KP PSP gefunden (Abbildung 52) Bei KP PSP trat zusätzlich der Peak 31 auf.

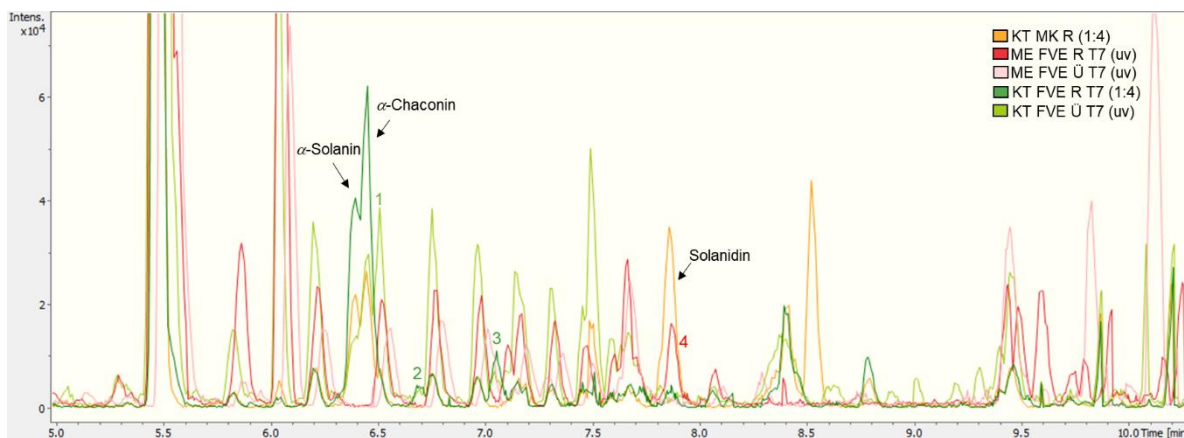


Abbildung 48: Ausschnitt der Base Peak Chromatogramme der Medienkontrolle Kartoffeltrester (KT MK) sowie der Rückstände (R) und Überstände (Ü) nach Kultur von *F. velutipes* (FVE) auf Malzextrakt (ME) und Kartoffeltrester (KT). T: Kulturtag; Verdünnung in Klammern angegeben; uv: unverdünnt, zusätzliche Peaks sind nummeriert.

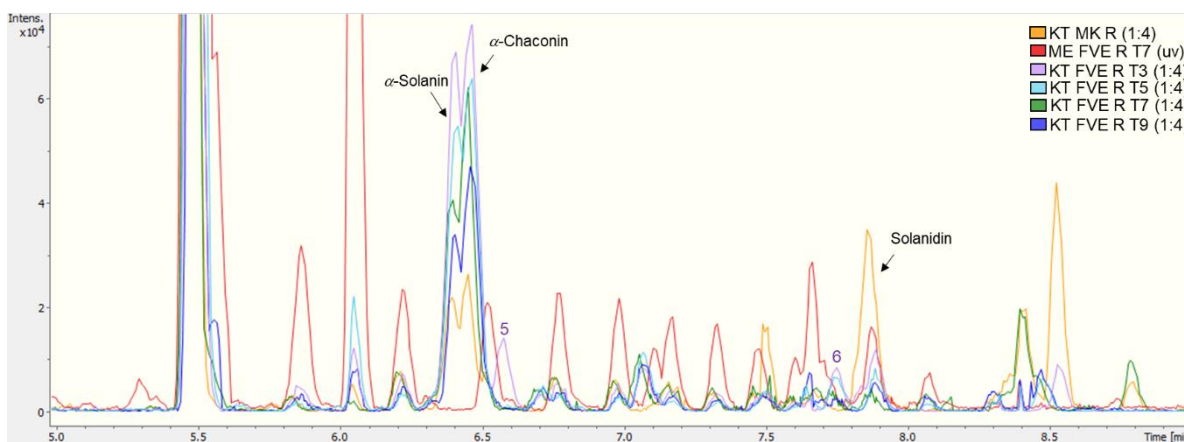


Abbildung 49: Ausschnitt der Base Peak Chromatogramme der Medienkontrolle Kartoffeltrester (KT MK) sowie der Rückstände (R) nach Kultur von *F. velutipes* (FVE) auf Malzextrakt (ME) und Kartoffeltrester (KT). T: Kulturtag; Verdünnung in Klammern angegeben; uv: unverdünnt, zusätzliche Peaks sind nummeriert.

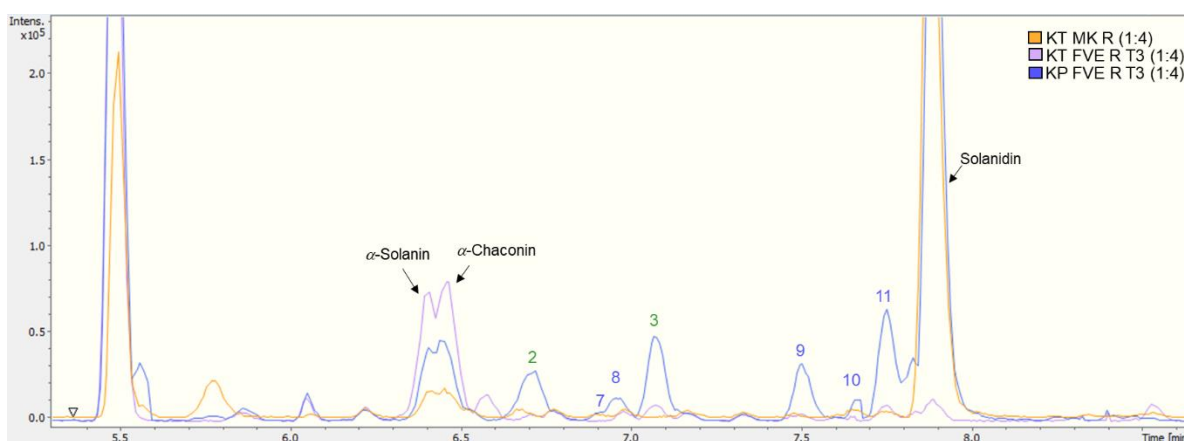


Abbildung 50: Base Peak Chromatogramme der Medienkontrolle Kartoffelpülpe (KP MK) sowie der Rückstände (R) nach Kultur von *F. velutipes* (FVE) auf Kartoffeltrester (KT) und Kartoffelpülpe (KP). T: Kulturtag; Verdünnung in Klammern angegeben; zusätzliche Peaks sind nummeriert.

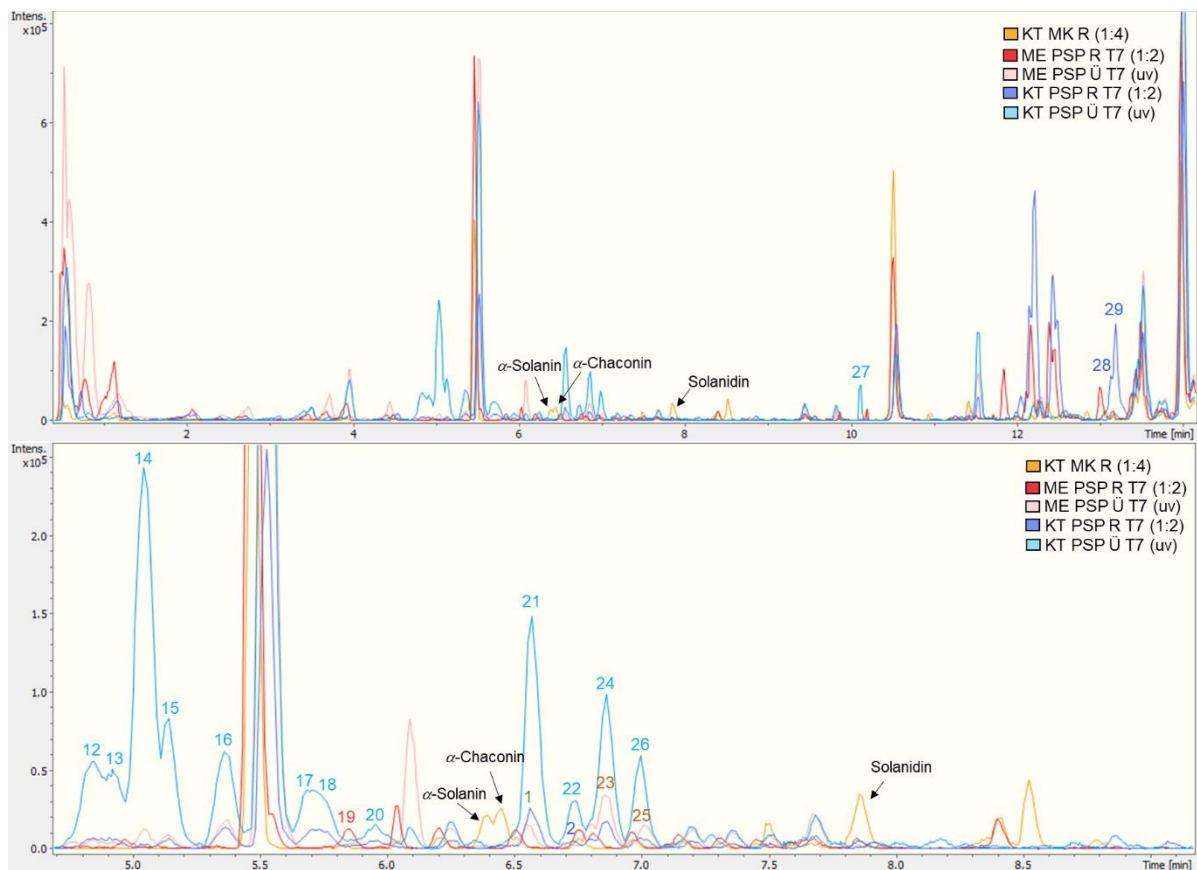


Abbildung 51: Ausschnitte der Base Peak Chromatogramme der Medienkontrolle Kartoffeltrester (KT MK) sowie der Rückstände (R) und Überstände (Ü) nach Kultur von *P. pulmonarius* (PSP) auf Malzextrakt (ME) und Kartoffeltrester (KT). Untere Abbildung ist weiter vergrößert. T: Kulturtag; Verdünnung in Klammern angegeben; uv: unverdünnt, zusätzliche Peaks sind nummeriert.

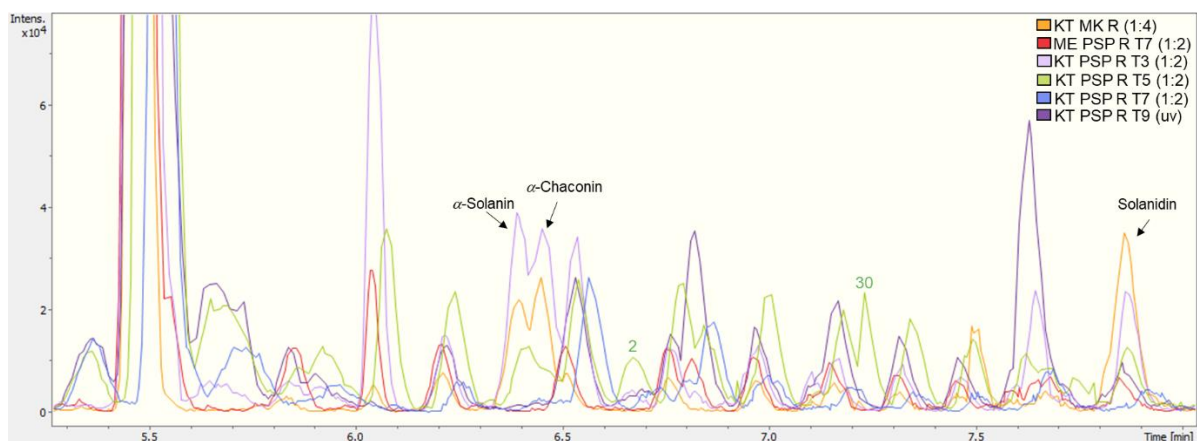


Abbildung 52: Ausschnitte der Base Peak Chromatogramme der Medienkontrolle Kartoffeltrester (KT MK) sowie der Rückstände (R) nach Kultur von *P. pulmonarius* (PSP) auf Malzextrakt (ME) und Kartoffeltrester (KT). T: Kulturtag; Verdünnung in Klammern angegeben; uv: unverdünnt, zusätzliche Peaks sind nummeriert.

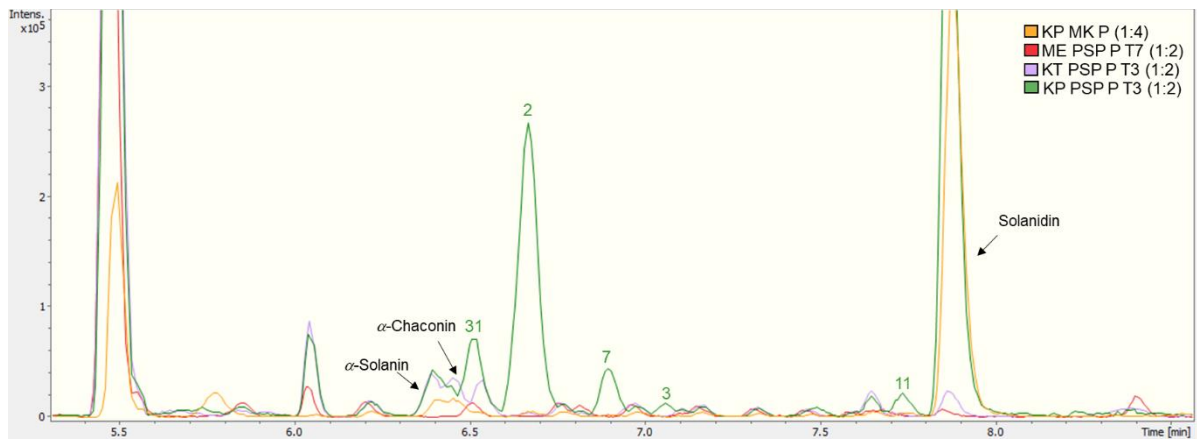


Abbildung 53: Ausschnitte der Base Peak Chromatogramme der Medienkontrolle Kartoffeltrester (KT MK) sowie der Rückstände (R) nach Kultur von *P. pulmonarius* (PSP) auf Kartoffeltrester (KT) und Kartoffelpülpe (KP). T: Kulturtag; Verdünnung in Klammern angegeben; zusätzliche Peaks sind nummeriert.

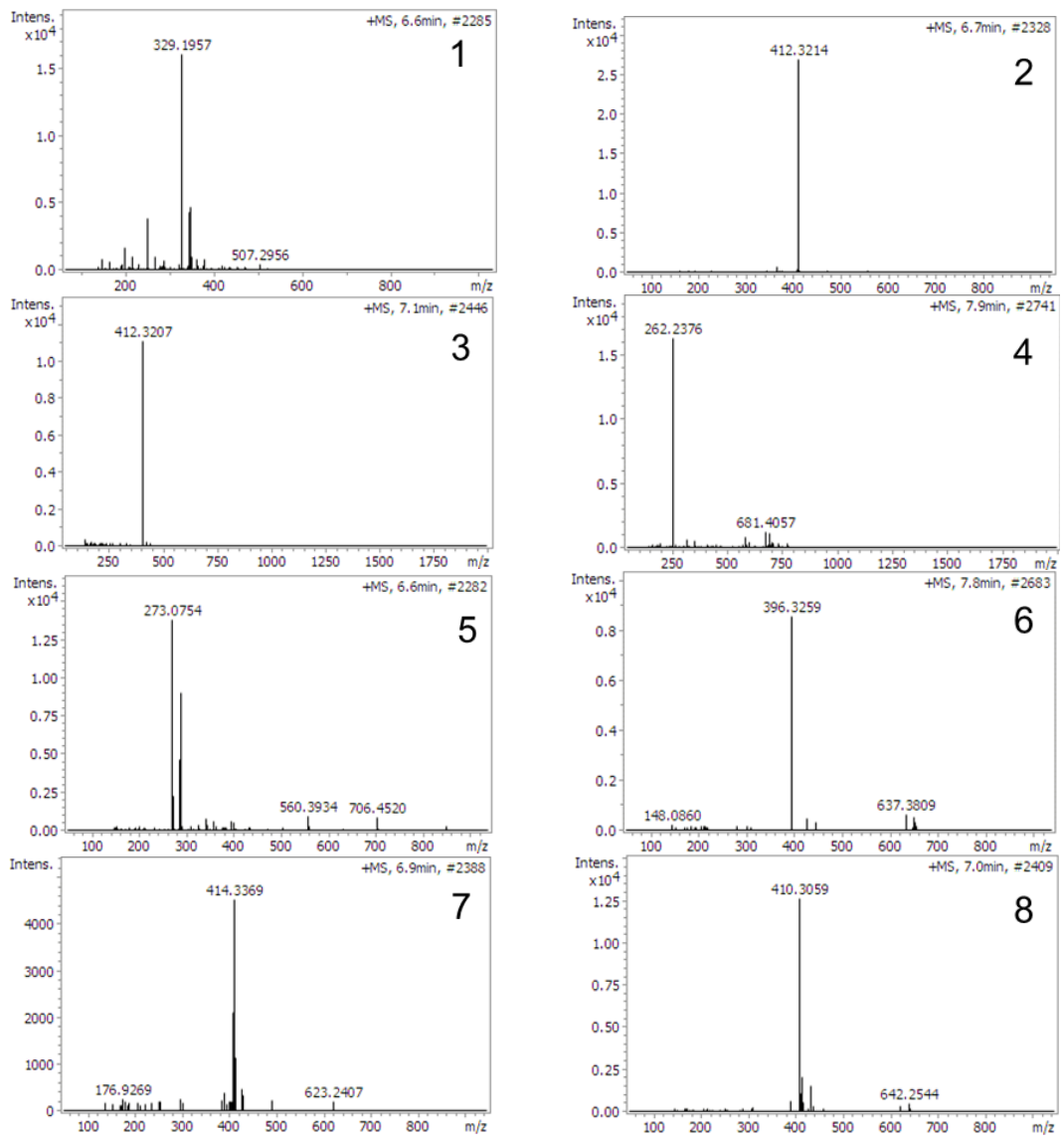


Abbildung 54: Massenspektren der Peaks 1-8.

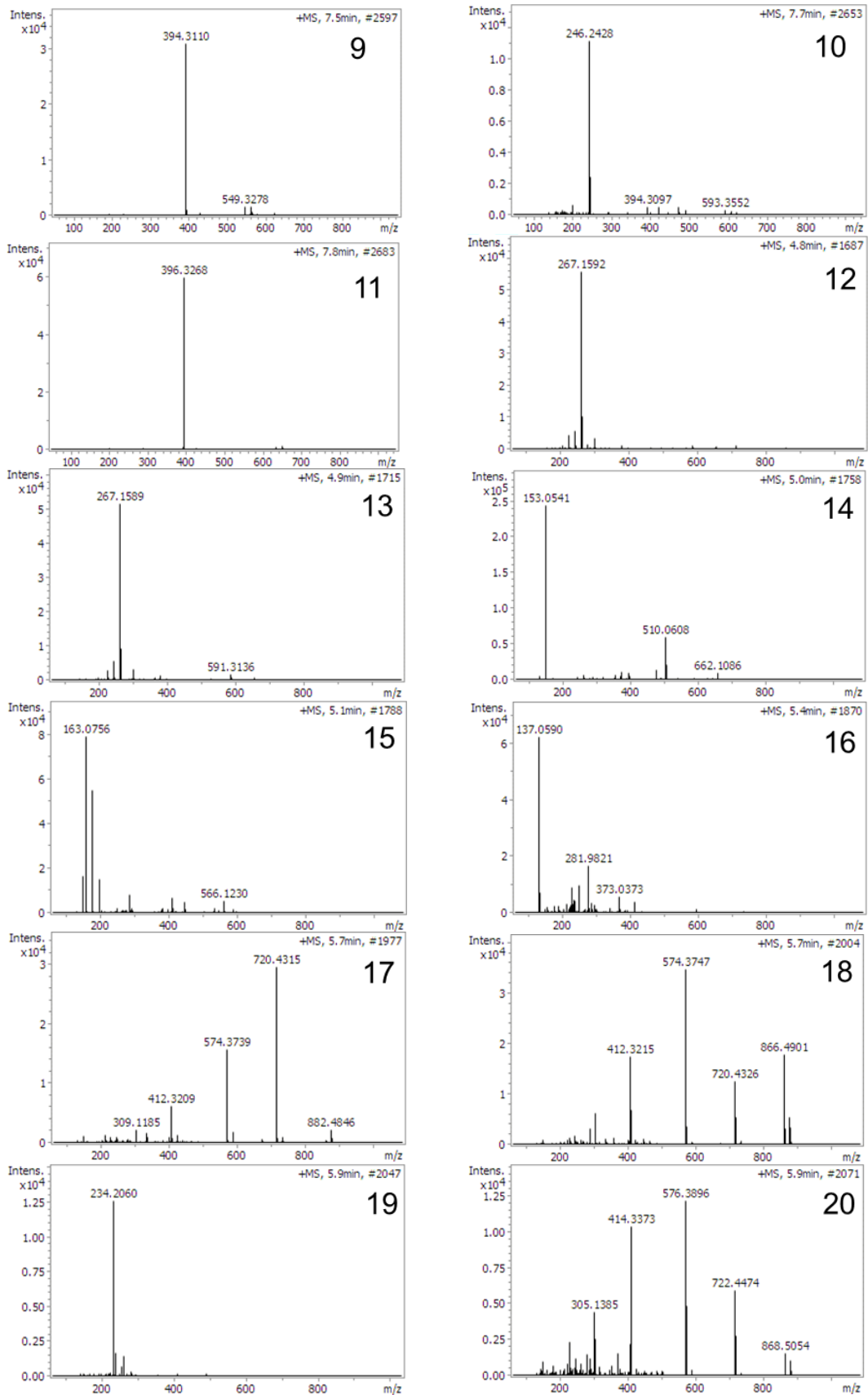


Abbildung 55: Massenspektren der Peaks 9-20.

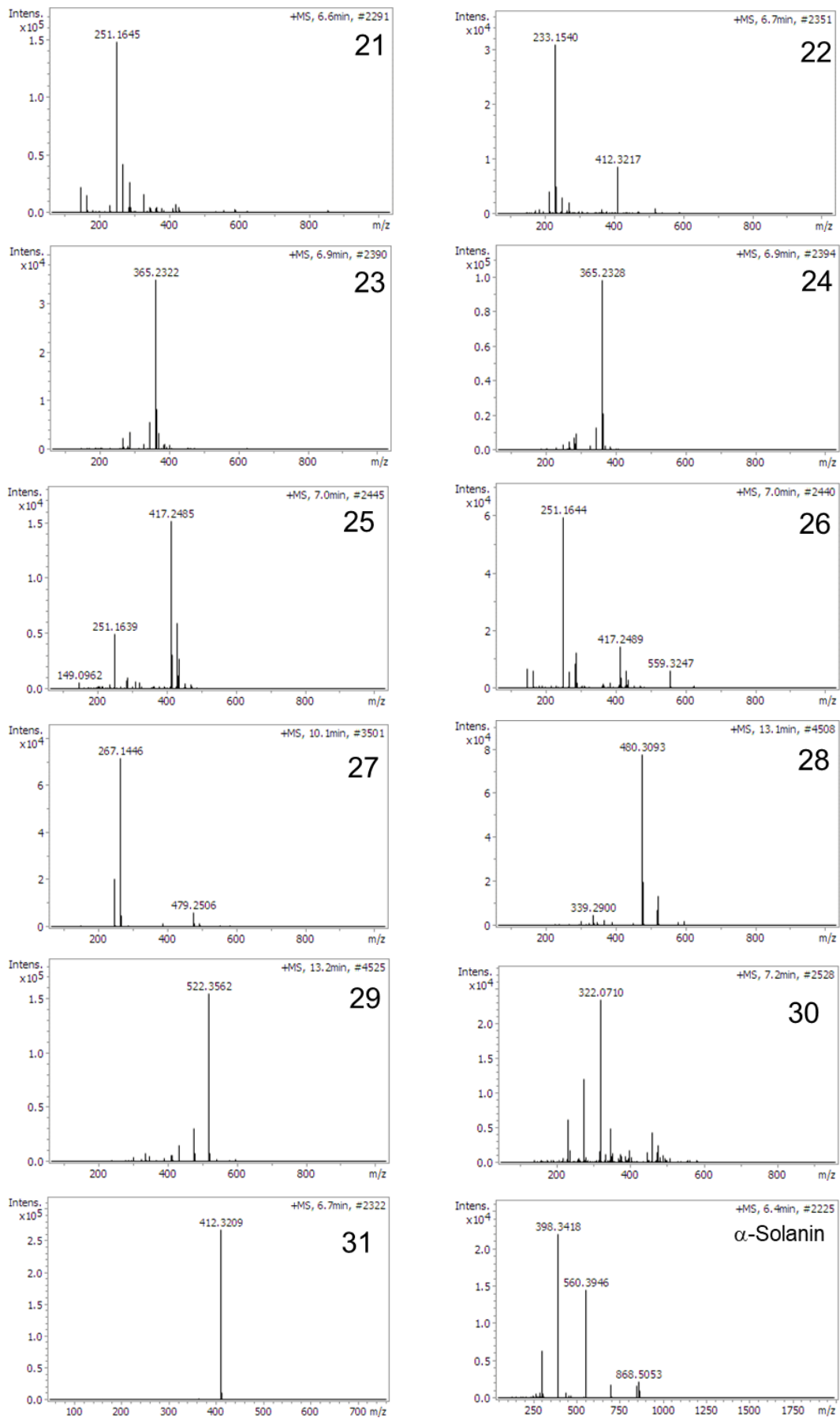
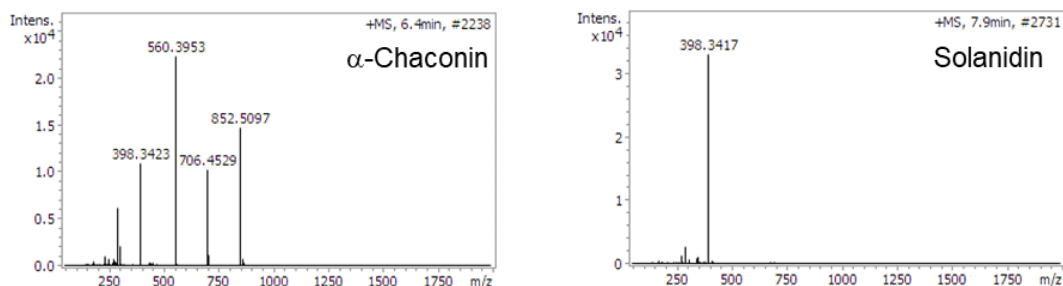


Abbildung 56: Massenspektren der Peaks 21-31 sowie von α -Solanin.

Abbildung 57: Massenspektren von α -Chaconin und Solanidin.

3.8 Myzelhydrolyse.

3.8.1 Azocasein-Assay

3.8.1.1 Bestimmung der pH-Optima

Zur Charakterisierung der Enzyme Corolase APC, 7089 und 8000 wurden die pH-Optima in Dreifachbestimmung untersucht (Abbildung 58, Methode 2.10.1).

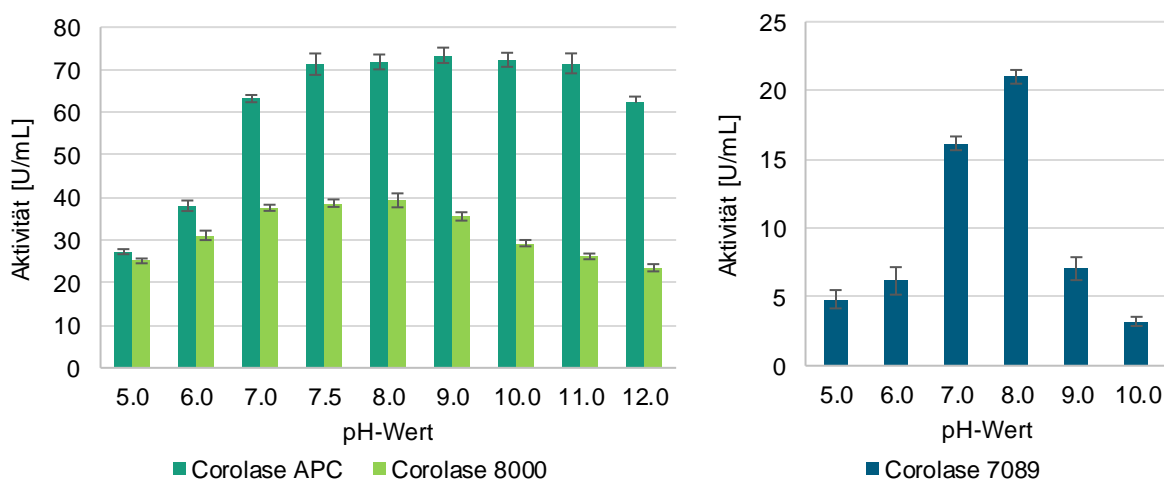


Abbildung 58: Aktivität [U/mL] der Enzyme Corolase APC, 8000 und 7089 in Abhängigkeit des pH-Werts. Eingesetzt: 1,25 μ L Corolase APC und 8000 und 5 μ L Corolase 7089 pro 100 mL Probenlösung; Temperatur: 40 $^{\circ}$ C, ($n=3$).

Die höchsten Aktivitäten wurden mit Corolase APC gemessen. Die Aktivität war über einen pH-Bereich von 7,5-11 gleichbleibend hoch. Die höchsten Aktivitäten für Corolase 7089 und 8000 wurden in einem engeren pH-Bereich von pH 7-8 erreicht. Die Aktivität von Corolase 7089 war deutlich niedriger als die anderen ermittelten Aktivitäten.

3.8.1.2 Bestimmung der Temperatur-Optima

Neben den pH-Optima wurden auch die Temperatur-Optima der Enzyme Corolase APC, 7089 und 8000 bestimmt (Abbildung 59, Methode 2.10.1.2).

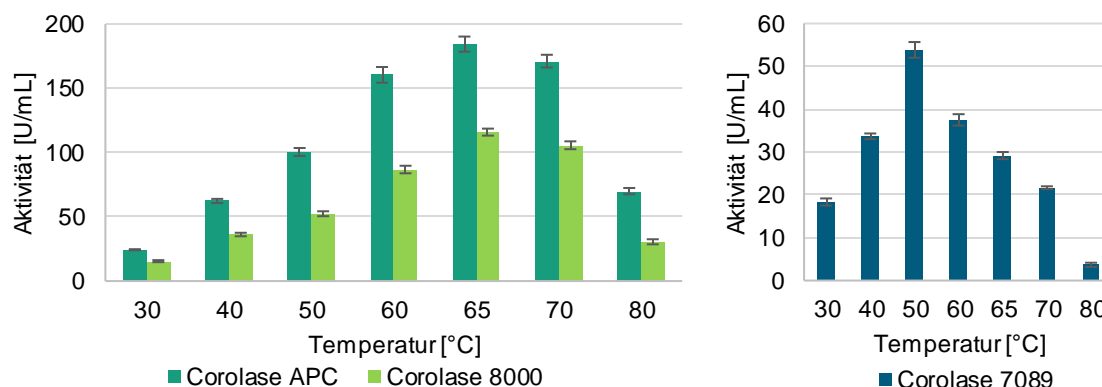


Abbildung 59: Aktivität [U/mL] der Enzyme Corolase APC und 8000 in Abhängigkeit der Temperatur [°C]. Eingesetzt: 1,25 μ L Corolase APC und 8000 und 5 μ L Corolase 7089 pro 100 mL Puffer; pH-Wert: 7,5, ($n=3$).

3.8.1.3 Aktivitätsbestimmung des Kulturüberstands

Nach Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester bei einer Substratkonzentration von 30 g/L wurde der Überstand abgetrennt und anschließend die azocaseinolytische Aktivität dreier biologischer Replikate gemessen (Methode 2.10.1). Es wurde eine Aktivität von $118,9 \pm 2,3$ U/mL bestimmt.

3.8.2 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von Pilzmyzel

Die enzymatische Hydrolyse wurde aufgrund der höchsten Enzymaktivitäten mit Corolase APC durchgeführt. Für die Optimierungen wurde das Fermentat nach Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester bei einer Substratkonzentration von 30 g/L verwendet. Die Hydrolyse wurde in Bezug auf die Parameter Temperatur, Inkubationszeit und Enzymzugabe optimiert. Eine Übersicht der verwendeten Probenbezeichnungen ist in Tabelle 19 aufgeführt. Es wurde eine Formol-Titration zur Bewertung der Hydrolyseparameter durchgeführt (Methode 2.8.15). Der Nachweis der Linearität der Methode ist im Anhang Abbildung 83 dargestellt.

3.8.2.1 Variation der Inkubationstemperatur und -dauer

Variationen der Hydrolysebedingungen wurden bei einer Enzymzugabe von 1 mL auf 100 mL Probenlösung getestet. Die Inkubationstemperatur wurde bei einer Inkubationsdauer von 20 h optimiert und ein Maximum bei 40 °C ermittelt (Abbildung 60). Ab einer Inkubationsdauer von 10 h Inkubation wurde keine weitere signifikante Erhöhung des NaOH-Verbrauchs erzielt. Die enzymatische Hydrolyse wurde in weiteren Versuchen unter den experimentell ermittelten optimierten Bedingungen bei 40 °C für 10 h durchgeführt.

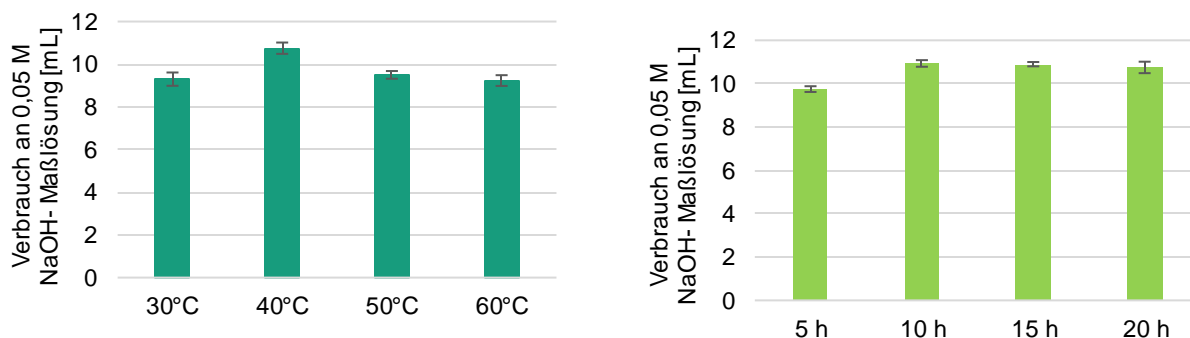


Abbildung 60: Verbrauch an 0,05 M NaOH-Maßlösung [mL] bei Formol-Titration in Abhängigkeit der Temperatur [°C] (Inkubationsdauer 20 h; links) sowie in Abhängigkeit der Inkubationsdauer (Temperatur: 40 °C; rechts), ($n=3$).

3.8.2.2 Variation der Enzymmenge

Die Enzymzugabe wurde im Bereich von 0,5 bis 4,0 mL Enzym auf 100 mL Probenlösung variiert (Abbildung 61). Der Verbrauch an 0,05 M NaOH-Maßlösung stieg bis zur Enzymzugabe von 4 mL an. Zusätzlich sind die Titrationsergebnisse der Myzel-Blindwerte ohne Enzymzugabe dargestellt (BW M; BW AH), der Blindwert des verwendeten Puffers sowie der Kontrolle von 1 mL Enzym in 100 mL Puffer (E1).

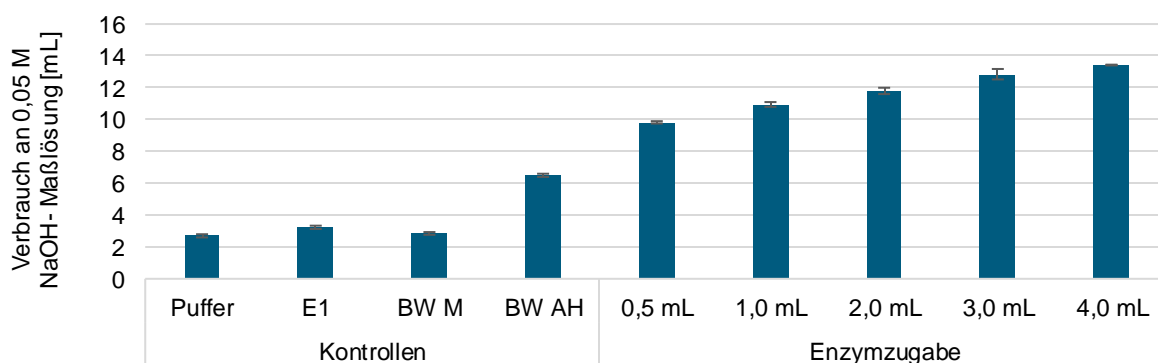


Abbildung 61: Verbrauch an 0,05 M NaOH-Maßlösung [mL] bei Formol-Titration der verschiedenen Kontrollen sowie in Abhängigkeit der Enzymzugabe zu 100 mL Probenlösung [mL]. Temperatur: 40 °C; Inkubationsdauer: 10 h; E1: 1 mL Enzym in 100 mL Puffer; BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; BW AH: inkubiertes Myzel ohne Enzym, (für Kontrollen: $n=3$, sonst $n=2$).

3.8.3 Totalhydrolyse und Berechnung von Hydrolysegraden

Die Titrationsergebnisse wurden mit der Totalhydrolyse des Pilzmyzels verglichen und daraus der Hydrolysegrad abgeschätzt (

Tabelle 44). Für die Totalhydrolyse wurde nach Abzug des Salzsäure Blindwerts, ein NaOH-Verbrauch von $10,9 \pm 0,2$ mL ermittelt ($n=5$). Nach Zugabe von 4 mL Enzym zu 100 mL Probenlösung war der NaOH-Verbrauch nahezu so hoch wie bei der Totalhydrolyse.

Tabelle 44: Ermittelte Hydrolysegrade [%] der Proben mit unterschiedlichen Enzymmengen [mL] pro 100 mL sowie der Kontrolle ohne Enzymzugabe (BW AH). Temperatur: 40 °C; Inkubationsdauer: 10 h, (für Kontrollen: $n=3$, sonst $n=2$).

Enzymmenge [mL]	Hydrolysegrad [%]
0 (BW AH)	33,9 ± 0,7
0,5	64,7 ± 0,5
1,0	75,1 ± 1,0
2,0	83,0 ± 1,4
3,0	92,8 ± 2,0
4,0	98,1 ± 0,2

3.8.4 Aminosäurezusammensetzung der Hydrolyseproben

Durch die Aminosäureanalyse konnte die Summe der Aminosäuren in Rückstand und Überstand nach Hydrolyse und Zentrifugation ermittelt werden (Tabelle 45, Methode 2.8.13). Zum Vergleich wurde der Aminosäuregehalt des selben Fermentats vor der Hydrolyse analysiert (KT FVE). Nach der enzymatischen Hydrolyse wurde das Enzym mitbestimmt. Es wurde zusätzlich die Aminosäureverteilung des Enzyms bestimmt und von den Aminosäuregehalten der Myzelprobe mit Enzymzugabe abgezogen (ME1-E1). Die Menge an Aminosäuren im Überstand stieg bei höherem Hydrolysegrad, wohingegen sie im Rückstand sank.

Tabelle 45: Summe der Aminosäuren (AS_{Sum}) des Fermentats KT FVE und der Fraktionen nach Hydrolyse und Zentrifugation. R: Rückstand; Ü: Überstand; G: Gesamt; BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; BW AH: inkubiertes Myzel ohne Enzym, ME1: enzymatisch hydrolysiert mit 1 mL Enzym; E1: Enzym in Puffer, ($n=2$).

	KT FVE	BW M	BW AH	ME1-E1
R AS_{Sum} [g/100 g TM]	-	8,2 ± 0,1	7,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2
Ü AS_{Sum} [g/100 g TM]	-	5,5 ± 0,3	7,0 ± 0,2	9,9 ± 0,2
G AS_{Sum} [g/100 g TM]	13,9 ± 0,1	13,7 ± 0,2	13,9 ± 0,1	13,9 ± 0,1

Neben der Summe der Aminosäuren wurde auch die Aminosäureverteilung betrachtet. In Abbildung 62 sind die Aminosäuregehalte der Rückstände und in Abbildung 63 die Aminosäuregehalt der Überstände gezeigt.

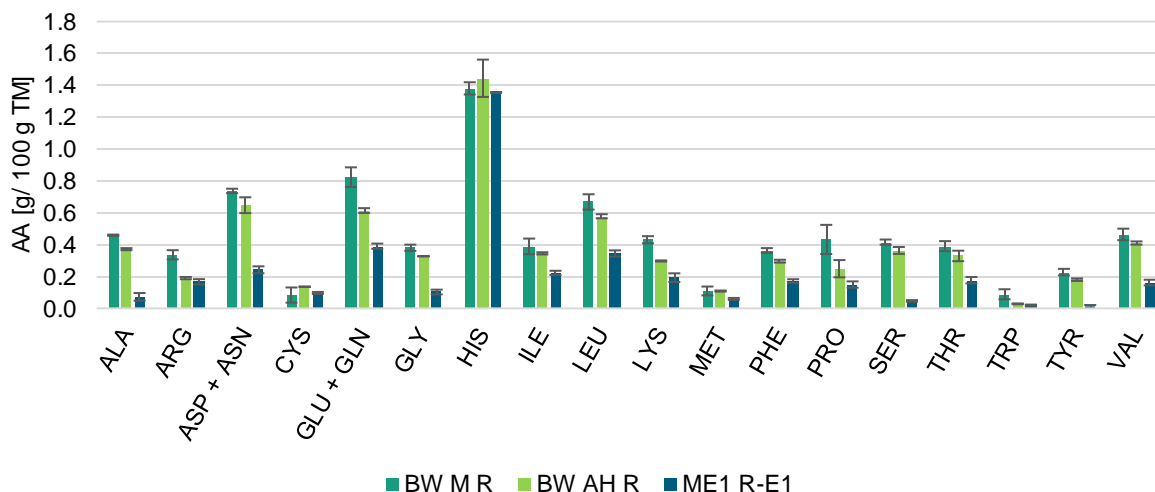


Abbildung 62 Aminosäuregehalte der gefriergetrockneten Rückstände nach Hydrolyse und Zentrifugation. R: Rückstand; BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; BW AH: inkubiertes Myzel ohne Enzym, ME1: enzymatisch hydrolysiert mit 1 mL Enzym; E1: Enzym in Puffer, ($n=2$).

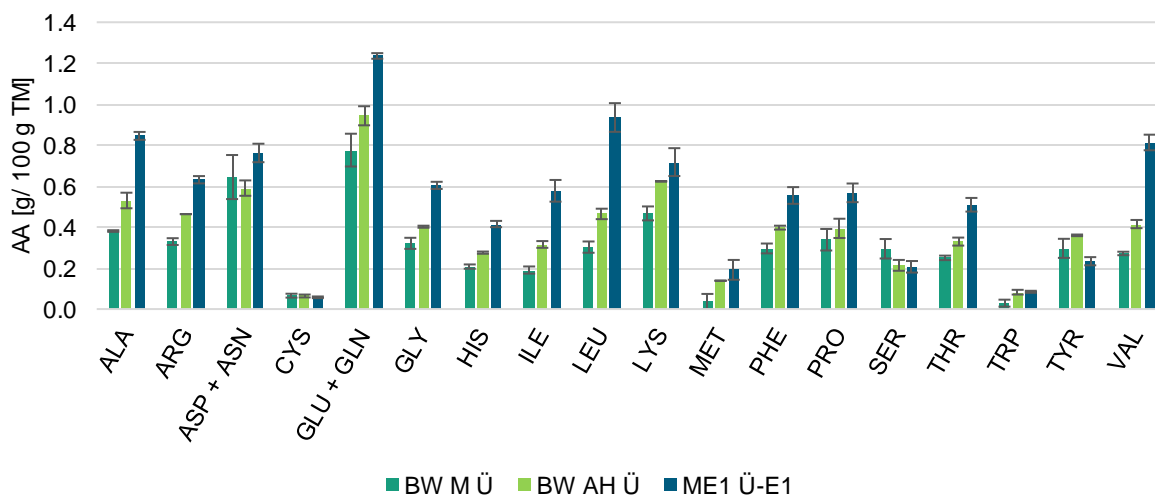


Abbildung 63: Aminosäuregehalte der gefriergetrockneten Überstände nach Hydrolyse und Zentrifugation. Ü: Überstand; BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; BW AH: inkubiertes Myzel ohne Enzym, ME1: enzymatisch hydrolysiert mit 1 mL Enzym; E1: Enzym in Puffer, ($n=2$).

3.8.5 Quantifizierung von L-Glutaminsäure

Der L-Glutaminsäuregehalt der Hydrolyseproben von KT FVE, der Blindwerte ohne Enzymzugabe (BW M; BW AH) sowie der für die sensorische Prüfung verwendeten Gemüsebrühe wurden bestimmt (Tabelle 46).

Tabelle 46: Konzentration an L-Glutaminsäure der Hydrolyseproben, der Kontrollen, sowie der Gemüsebrühe. BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; BW AH: inkubiertes Myzel ohne Enzym, ME1: enzymatisch hydrolysiert mit 1 mL Enzym; ME4: enzymatisch hydrolysiert mit 4 mL Enzym; n.b.: nicht bestimmt, ($n=3$).

L-Glutaminsäure	BW M	Gemüsebrühe	BW AH	ME1	ME4
[mg/L]	8,7 ± 0,1	52,1 ± 1,6	99,1 ± 0,7	188,7 ± 1,2	214,9 ± 3,9
[mg/g]	0,56 ± 0,01	n.b.	6,23 ± 0,04	11,31 ± 0,71	10,69 ± 0,20

3.8.6 Sensorische Prüfungen

3.8.6.1 Reiz- und Erkennungsschwellen und Geschmackserkennungsprüfung

Die Reiz- (Tabelle 47) und Erkennungsschwellen (Tabelle 48) des aus 24 Prüfpersonen bestehenden Panels wurden für die Attribute bitter, salzig, sauer, süß und umami bestimmt (Methode 2.11.2). Zusätzlich wurden Standardlösungen für eine Geschmackserkennungsprüfung gereicht (Methode 2.11.1). Die Ergebnisse der Erkennungsprüfung sind in Tabelle 49 aufgeführt.

Tabelle 47: Reizschwellen des Panels, ($n=24$).

Geschmacksattribute	Reizschwellen	
	Mittelwert	Spannweite
bitter	0,108 ± 0,024 g/L	0,013–0,212 g/L
salzig	0,26 ± 0,09 g/L	0,25–0,73 g/L
sauer	0,18 ± 0,08 g/L	0,03–0,28 g/L
süß	3,7 ± 1,1 g/L	0,3–5,5 g/L
umami	0,22 ± 0,09 g/L	0,04–0,60 g/L

Tabelle 48: Erkennungsschwellen des Panels, ($n=24$).

Geschmacksattribute	Erkennungsschwellen	
	Mittelwert	Spannweite
bitter	0,153 ± 0,034 g/L	0,063–0,212 g/L
salzig	0,58 ± 0,20 g/L	0,35–1,18 g/L
sauer	0,26 ± 0,05 g/L	0,23–0,43 g/L
süß	4,0 ± 0,9 g/L	1,5–7,5 g/L
umami	0,39 ± 0,10 g/L	0,10–1,15 g/L

Tabelle 49: Anteil der richtigen Ergebnisse in der Geschmackserkennungsprüfung, ($n=24$).

Richtiges Ergebnis [%]	bitter	salzig	sauer	süß	umami
	96	88	100	100	92

3.8.6.2 Dreieckstest mit beschreibender Prüfung (in Gemüsebrühe)

Es wurde eine Dreieckstest auf Unterschied mit den Hydrolyseproben und den Kontrollen gegen die Gemüsebrühe (GB) durchgeführt (Methode 2.11.5). Für alle Proben konnte mit 95%iger Sicherheit ein Unterschied zu der reinen Gemüsebrühe erkannt werden (α -Risiko: 0,05).

Die abweichenden Proben in Gemüsebrühe und die Gemüsebrühe wurden in einer beschreibenden Prüfung getestet (Methode 2.11.6). Da die Gemüsebrühe gegen jede

abweichende Probe geprüft und beschrieben wurde, lagen fünf Bewertungen der Gemüsebrühe vor. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bewertungen.

Die GB BW M Probe wurde ähnlich der Gemüsebrüheprobe beschrieben. Die GB BW AH Probe hatte eine höhere Bewertung des Attributs umami (Abbildung 64).

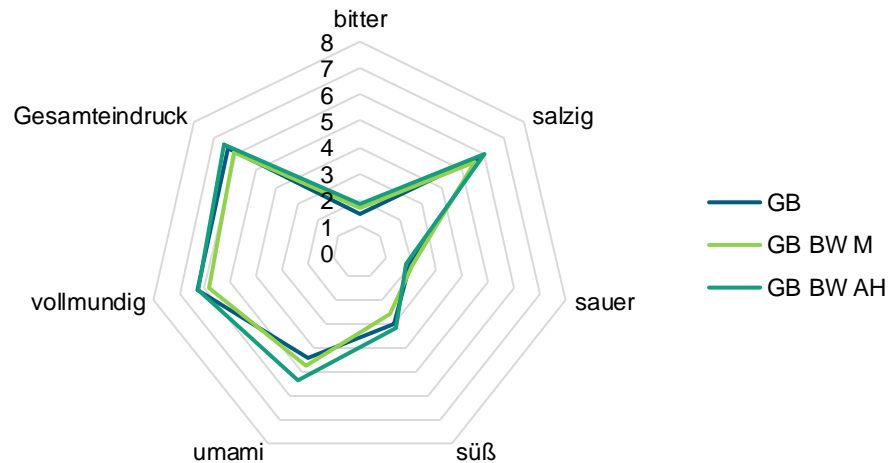


Abbildung 64: Beschreibende Prüfung der Blindwertproben ohne Enzymzugabe (BW M und BW AH) gegen die Gemüsebrühe (GB), ($n=19$).

Nach der enzymatischen Hydrolyse wurde das Attribut umami bei der Probe GB ME1 ebenfalls höher bewertet als bei der Probe Gemüsebrühe (Abbildung 65). Der Mittelwert der Umami-Bewertung der 5 Gemüsebrühe-Bewertungen lag bei 4,4. Bei der Probe GB BW AH und bei der Probe GB ME1 wurde eine Bewertung von 5,4 erreicht. Die übrigen Bewertungen der Probe GB ME1 waren ähnlich der Bewertung für die Gemüsebrühe.

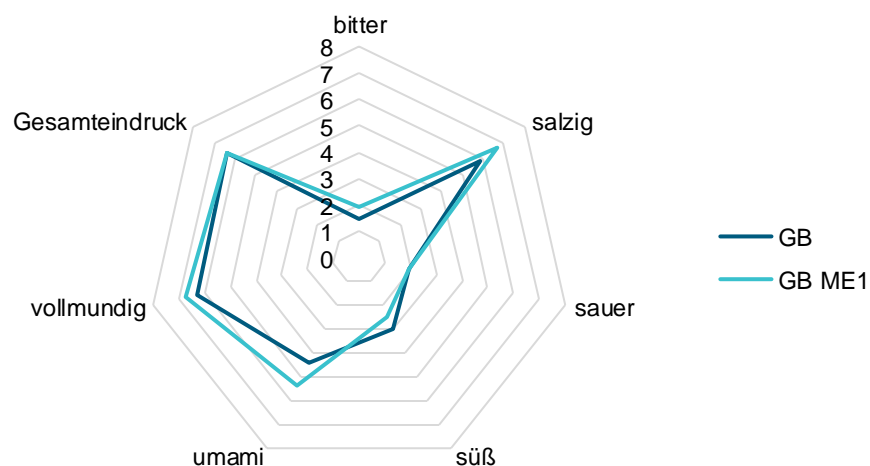


Abbildung 65 Beschreibende Prüfung des Myzel-Hydrolysats ME1 (1mL Enzymzugabe) gegen die Gemüsebrühe (GB), ($n=19$).

Wurde mehr Enzym zur Hydrolyse eingesetzt, stieg die Bitterbewertung deutlich an und die Werte für Gesamteindruck und Vollmundigkeit fielen ab (Abbildung 66). Die hohen

Bitterbewertungen wurden auch bei der Verkostung der Probe GB BW ME4 (Myzel+ 4 mL Enzym, hitzeinaktiviert) beobachtet.

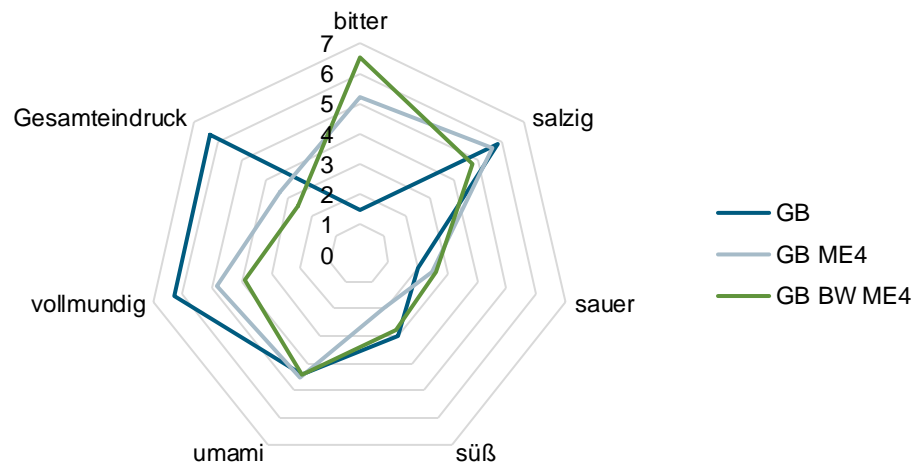


Abbildung 66: Beschreibende Prüfung des Myzelhydrolysats ME4 und des Blindwerts BW ME4 gegen die Gemüsebrühe. ME4: enzymatisch hydrolysiert mit 4 mL Enzym; BW ME4: hitzeinaktivierte 4 mL Enzym + Myzel, ($n=19$).

3.8.6.3 Beschreibende Prüfung (in Wasser)

Zusätzlich zur beschreibenden Prüfung in Gemüsebrühe wurde eine beschreibende Prüfung durchgeführt, bei der die Proben mit Wasser verdünnt wurden. Gegenüber der Probe BW M war die Bewertung der Probe ME1 für bitter leicht erhöht, ebenso die Bewertungen salzig, Gesamteindruck und Vollmundigkeit der Proben BW AH und ME1 (Abbildung 67). Eine deutliche Erhöhung konnte bei der Bewertung des Attributs umami der Probe ME1 beobachtet werden.

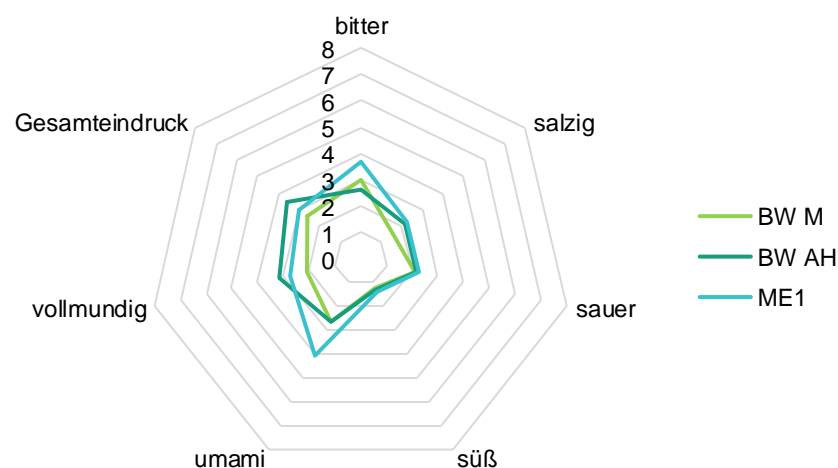


Abbildung 67: Beschreibende Prüfung der Blindwertproben BW M und BW AH sowie des Myzelhydrolysats ME1 in Wasser. BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; BW AH: inkubiertes Myzel ohne Enzym, ME1: enzymatisch hydrolysiert mit 1 mL Enzym, ($n=19$).

Beim Vergleich der ME1 Probe mit der Kontrollprobe E1 zeigte sich ebenfalls der Unterschied in der Bewertung für das Attribut umami. Die anderen Attribute wurden bei beiden Proben ähnlich bewertet (Abbildung 68).

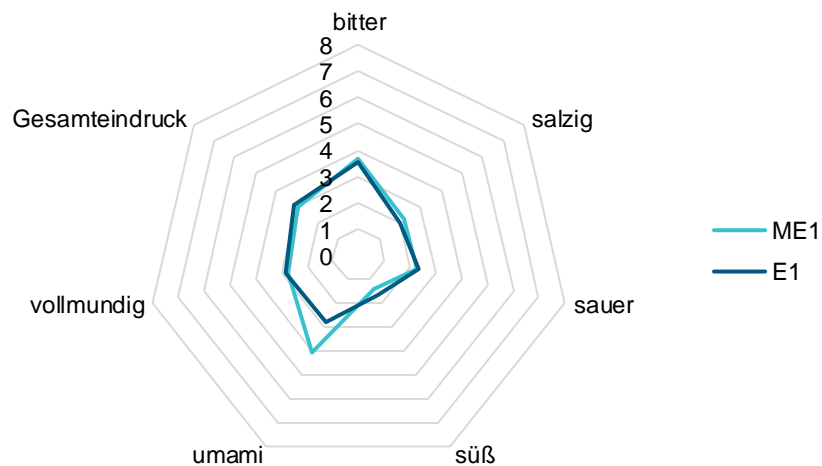


Abbildung 68: Beschreibende Prüfung des Myzelhydrolysats ME1 sowie der Enzymkontrolle. E1: Enzym in Wasser; ME1: enzymatisch hydrolysiert mit 1 mL Enzym, ($n=19$).

Das Myzelhydrolysats mit höherer Enzymzugabe (ME4) sowie die Kontrolle BW ME4 wurden in Wasser ebenfalls als deutlich bitterer als die Probe BW M Probe empfunden (Abbildung 69). Außerdem war die Bewertung des Gesamteindrucks niedriger. Zwischen den Proben ME4 und der BW ME4 gab es keine deutlichen Unterschiede in der Bewertung.

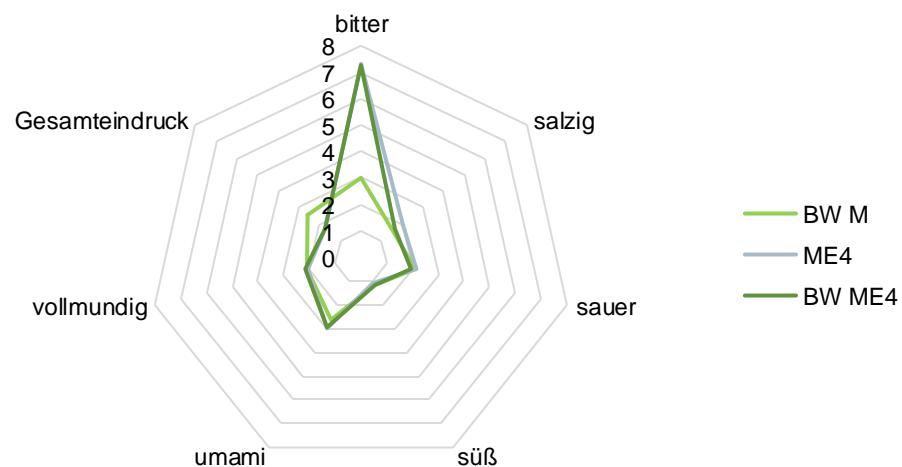


Abbildung 69: Beschreibende Prüfung des Myzelhydrolysats ME4 sowie der Kontrollen BW M und BW ME4 in Wasser. BW M: vor der Inkubation hitzeinaktiviert; ME4: enzymatisch hydrolysiert mit 4 mL Enzym; BW ME4: hitzeinaktivierte 4 mL Enzym + Myzel, ($n=19$).

3.9 Produktapplikationen

Produkte wurden in Form von veganen Frikadellen aus den Fermentaten von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* und *P. pulmonarius* hergestellt. Als Kontrolle wurde Kartoffeltrester anstelle der Fermentate zur Produktmasse zugegeben. Bilder der verschiedenen veganen Frikadellen sind in Abbildung 70 dargestellt.

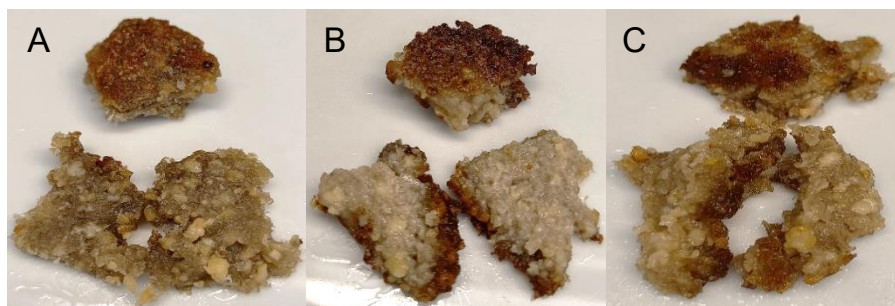


Abbildung 70: Vegane Frikadellen mit Zusatz von Kartoffeltrester (A), Fermentat mit *F. velutipes* (B) oder Fermentat mit *P. pulmonarius* (C).

Das Aussehen der Produkte wurde nicht signifikant unterschiedlich bewertet (Mittelwerte 3,8-4,5). Das Produkt mit Zugabe von *F. velutipes* war etwas heller als das Kontrollprodukt. Zu erkennen sind in den Bildern deutlich die Stücke des Sojamehls (helle Stücke), welche der Wasserbindung und der Texturverbesserung dienen sollten.

Insgesamt wurde das Produkt mit *P. pulmonarius* in der Gesamtbewertung deutlich schlechter bewertet als die Kontrolle und das Produkt mit *F. velutipes* ($P: 0,0001$; Abbildung 71). Die veganen Frikadellen mit *P. pulmonarius* wurde dabei vor allem als blumig, seifig und bitter bewertet. KT FVE wurde insgesamt ähnlich zur Medienkontrolle bewertet, wobei die Produkte mit *F. velutipes* als röstiger und weniger nach Kartoffel schmeckend wahrgenommen wurden.

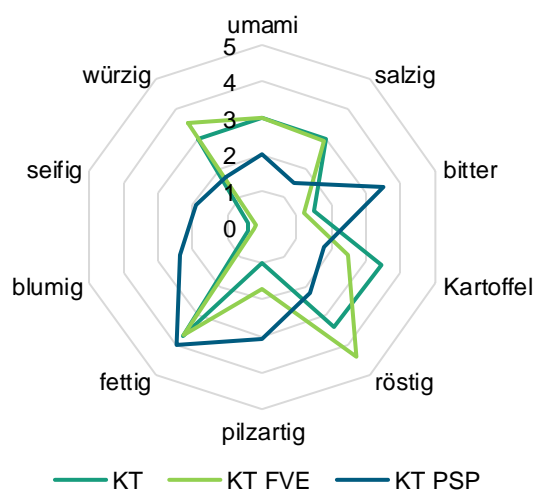


Abbildung 71: Sensorische Beschreibung der veganen Frikadellen. KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*; PSP: *P. pulmonarius*, ($n=10$).

Die Produkte mit zugesetztem Fermentat wurden als weniger fest und dafür als weicher wahrgenommen (Abbildung 72). Der Zusatz von *F. velutipes* führte zu einer geringeren Bewertung für das Attribut „trocken“.

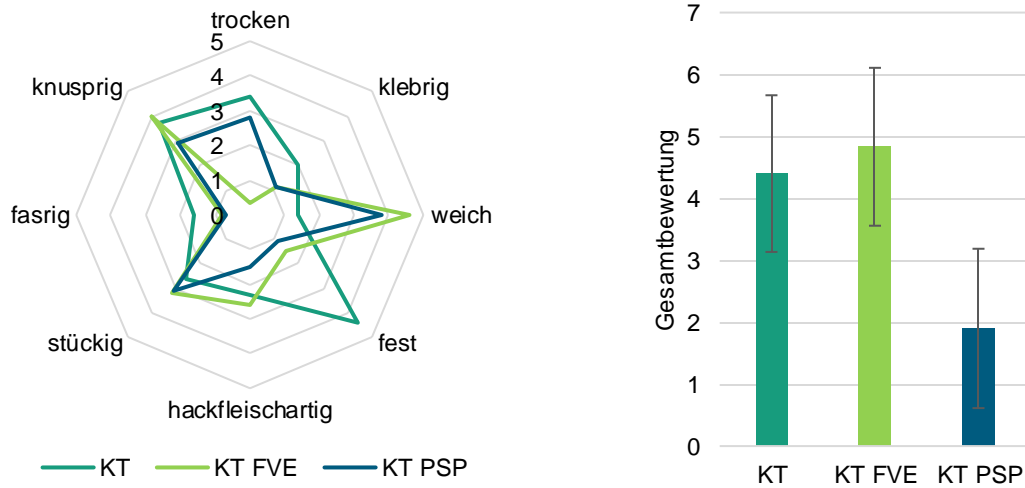


Abbildung 72: Bewertung des Mundgefühls (links) und die Gesamtbewertung (rechts) der veganen Frikadellen. KT: Kartoffeltrester; FVE: *F. velutipes*; PSP: *P. pulmonarius*, ($n=10$).

Die Gesamtbewertung des Produkts mit *F. velutipes* war höher als die der Medienkontrolle, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war.

4 Diskussion

Die Nutzung von Nebenströmen der kartoffelverarbeitenden Industrie zur Produktion von Pilzmyzel stellt eine vielversprechende Option zur Verwertung dar. Aufgrund der guten nutritiven Eigenschaften von Pilzmyzel (Devi et al. 2020; Ahlborn et al. 2019; Bickel Haase et al. 2024) und der großen jährlich anfallenden Mengen an Kartoffelpülpe und -schale (BMEL 2023), sowie der damit verbundenen geringen Kosten bei Nutzung als Kulturmedium, ergeben sich breite Einsatzmöglichkeiten für das fermentierte Produkt. Die Auswahl geeigneter Pilz-Substrat-Kombinationen, die Optimierung der Fermentation, eine Analyse des Fermentats und die Maßstabsvergrößerung waren Teil dieser Arbeit. Zusätzlich wurde der Einsatz in Lebensmitteln getestet, das Pilzmyzel hydrolysiert und auf geschmacksverstärkende Eigenschaften hin untersucht.

4.1 Substratanalyse

Die bestimmten Zusammensetzungen von Kartoffelschale und Kartoffelpülpe sind mit Literaturwerten sehr gut vergleichbar (Tabelle 1; Tabelle 2). Deutlich wird jedoch der Unterschied zwischen Kartoffeltrester und Kartoffelpülpe bei Betrachtung des Stärkegehalts (Stärke KT: $69,0 \pm 0,8$ g/100 g TM; KP: $14,9 \pm 0,7$ g/100 g TM). Der Extraktionsprozess sowie der Aufbau der verwendeten Maschinen bei der Stärkeextraktion können den Reststärkegehalt von Kartoffelpülpe beeinflussen (Bergthaller et al. 1999). Kartoffelpülpe wurde aus industriellen Stärkefabriken bezogen, wo der Isolationsschritt der Stärke optimiert und somit effizienter möglich ist als im Labormaßstab. Dies kann den deutlich höheren Stärkeanteil des Kartoffeltresters im Vergleich zur Kartoffelpülpe erklären. Der Stärkegehalt der Kartoffelpülpe wurde mit ca. 15% jedoch geringer bestimmt als in der Literatur beschrieben (ca. 20-40% Tabelle 1). Der Ballaststoffgehalt von Kartoffelpülpe betrug $66,4 \pm 0,8$ g/100 g TM und lag somit über den Literaturwerten (Tabelle 1, maximal $55,4$ g/100 g TM). Der Ballaststoffgehalt des Kartoffeltresters betrug $16,11 \pm 0,1$ g/100 g TM. Durch den prozentual höheren Anteil, welchen die Stärke an der Trockenmasse des Kartoffeltresters ausmacht, ist der prozentuale Anteil des restlichen Kohlenhydratanteils verringert. Dies kann die Differenz zu dem deutlich höheren Ballaststoffgehalt der Kartoffelpülpe erklären. Der Unterschied im Rohaschegehalt (KT: $4,1 \pm 0,1$ g/100 g; KP: $5,6 \pm 0,1$ g/100 g) ist durch natürliche Schwankungen, Anbaubedingungen oder die Kartoffelsorte erklärbar (Tabelle 1; 1,8-13,3 g/100 g). Der Proteingehalt könnte zusätzlich von der Methode zur Abtrennung des Kartoffelfruchtwassers abhängen, welche bei der Stärkeisolation die Hauptproteinfraktion beinhaltet (Grommers & van der Kogt 2009).

Das C/N-Verhältnis von Kartoffelschale lag mit 22,6 unter den C/N-Verhältnissen von Kartoffelpülpe und -trester (32,7; 34,9). Es ist eine Korrelation des C/N-Verhältnisses mit der

Kultivierungszeit, der Ausbeute und dem Proteingehalt bekannt (Hoa et al. 2015). Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass die optimalen C/N-Verhältnisse verschiedener Pilzspezies variieren, aber viele Pilze weite Bereiche im C/N-Verhältnis tolerieren (Wu et al. 2004; Gao et al. 2007). Für *Pleurotus tuber-regium* wurde beispielsweise ein optimaler Bereich des C/N-Verhältnisses zwischen 18 bis 36 ermittelt (Wu et al. 2004). Verschiedene Pilze zeigten jedoch gutes Wachstum in einer Spanne des C/N-Verhältnisses von 10-80 (Gao et al. 2007). Somit lagen die C/N-Verhältnisse der Nebenströme in einem von Pilzen tolerierten Bereich.

4.2 Screening verschiedener Basidiomyceten

Um die optimale Pilz-Substrat-Kombinationen für die Kartoffelnebenströme zu finden, wurden zunächst 100 Basidiomyceten in Emerskultur gescreent und mit der Kultur auf MEA-Platten verglichen. Es wurden mehr Pilze mit „neutral“ als Gesamtbewertung für den Geruch nach Wachstum auf den Kartoffelnebenströmen als auf MEA bewertet (Abbildung 3). Ein Grund für diese Abweichung könnte sein, dass die Gerüche der Kontrollplatten KSA und KTA im Vergleich zur Kontrollplatte MEA intensiver wahrgenommen wurden und somit die pilzeigenen Aromastoffe weniger intensiv herausstachen. Die häufigere Nennung des Attributes „Blank“ bei der Beschreibung der Geruchseindrücke unterstützt ebenfalls diese These (Abbildung 4). Eine Vielzahl von Aromakomponenten aus Kartoffeln wie beispielsweise Methional sind bereits bekannt, wobei das volatile Profil stark von der Verarbeitungsmethode abhängt (Comandini et al. 2011). Bei der Sterilisation des Mediums durch das Autoklavieren kommt es zur Erhitzung, was zur Bildung von Aromastoffen, aber auch zu deren Verlust durch Volatilisierung führen kann (de Roos 2006). Die Beschreibung „grün“ und „frisch“ wurde am häufigsten nach Wachstum auf KSA genannt. Auffällig war, dass vor allem die Beschreibung „grün“ oft nach fortschreitender Kultivierungsdauer auf KSA auftrat, wohingegen ältere Platten auf KTA häufiger mit den Attributen „pilzig“ und „muffig“ assoziiert wurden. Die Produktion von Aromastoffen kann durch Medienkomponenten beeinflusst werden (Kanter et al. 2023), was eine Erklärung für die unterschiedlichen Geruchseindrücke geben kann. Um den Geruch und die unterschiedliche Produktion von Aromastoffen auf verschiedenen Medien näher zu untersuchen, müssten die produzierten Aromastoffe beispielsweise mittels GC-MS-O analysiert werden. Da für das Projekt jedoch vor allem positive oder neutrale Gerüche und Pilze mit schnellem Wachstum in den Emerskulturen ausgewählt werden sollten, wurde dem Gesamtvergleich von potentiell medienspezifisch produzierten Aromastoffen nicht weiter nachgegangen.

Der prozentuale Anteil der Pilze, die die Agarplatten bis zu den Messzeitpunkten vollständig bewachsen hatten, war auf allen Medien ähnlich. Das Wachstum wurde somit nicht ausschlaggebend durch Verwendung der Kartoffelnebenströme gehemmt. Auf KTA bewachsen weniger Pilze die Platten nicht vollständig (29%) als auf MEA (34%). Diese

Versuche in Emerskultur deuteten auf die gute Eignung von Kartoffelnebenströmen als Kulturmedien für Pilze hin.

Von den 50 Pilzen, die aufgrund ihres Wachstums und ihres Geruchs für das Screening in Submerskultur ausgewählt wurden, wurde der Geruchseindruck bei Submerskultivierung auf KS für mehr Pilze als „positiv“ bewertet als auf KT (42% gegen 36%; Abbildung 6). Jedoch war auch der Anteil der negativ bewerteten Pilze höher. Bei Betrachtung der Einteilungen einzelner Pilze bezogen auf unterschiedliche Medien, war die Einteilung für 70% medienunabhängig, was etwas geringer war als bei dem Vergleich der Emerskulturen (80%). Bei Submerskultur auf KS wurde wie in Emerskultur häufig ein grüner und süßlicher Geruch wahrgenommen, zusätzlich jedoch auch ein muffiger und erdiger Geruch beschrieben. Kulturen auf KT wurden im Unterschied zur Bewertung in Emerskultur häufiger als „neutral“ beschrieben. Dies zeigt, dass die Bildung von Aromastoffen nicht nur medienabhängig, sondern auch abhängig von der Kultivierungsform sein kann. Es ist bekannt, dass das Volatilom von Pilzen von deren Entwicklungsstadien in Bezug auf die Fruktifizierung abhängt (Orban et al. 2020; Orban et al. 2021). Bei der Emers- und Submerskultivierung wird das vegetative Wachstum betrachtet, jedoch kommt es auch hier zu unterschiedlichen Wachstumsformen (Myzelpellets und oberflächliches Myzelwachstum). Dies könnte die Bildung von Aromastoffen beeinflussen.

Neben der Geruchsbewertung wurden die Biotrockenmassen (BTM) nach Submerskultivierung aufgenommen, wobei die BTM durch Kultivierung nicht gesteigert wurde (Abbildung 8). Nach Zentrifugation befanden sich teils noch feste Partikel im Überstand was die Abtrennung erschwerte und sich in den hohen Spannweiten der Medienkontrollen widerspiegelte. Durch Fermentation war der Rückstand kompakter und somit leichter abzutrennen.

Die Stickstoffgehalte in der Trockenmasse waren nach Fermentation auf beiden Medien signifikant erhöht. Es wurde bereits für andere Pilz-Substrat-Kombinationen gezeigt, dass der Proteingehalt durch Fermentation gesteigert werden kann (Ahlborn et al. 2019; Bickel Haase et al. 2024). Der Vergleich der gesamten Stichprobe mit den Kontrollen in diesem Screening macht deutlich, wie effektiv eine Fermentation als Methode zur Stickstoffhöhung ist. Der durchschnittliche Stickstoffgehalt nach Fermentation von KS lag im Rückstand um ca. 32% über dem Stickstoffgehalt von KS. Durch Kultur auf KT konnte der Stickstoffgehalt im Rückstand im Mittel um 124% gesteigert werden. Wird der Stickstoffgehalt in g/L berechnet und somit die unterschiedlichen BTM miteinbezogen, ist die Erhöhung bei Vergleich der Fermentate auf KT mit der Medienkontrolle KT immer noch signifikant, jedoch nicht bei Kultur auf KS (Abbildung 9). Dies kann an der Verteilung des Stickstoffs im Kolben liegen. Von dem eingewogenen Substrat für die Medienherstellung befanden sich ca. 55% des vorhandenen Stickstoffs im Rückstand der Medienkontrolle KS, bei Kartoffeltrester waren es nur ca. 39% (Tabelle 28). Dadurch ist das Potential zur Erhöhung des Stickstoffgehalts in der festen Phase

bei KT durch Fixierung von Stickstoff aus der flüssigen Phase höher. Zusätzlich könnte dies auf besseres Wachstum auf KT als auf KS hindeuten, was jedoch durch die Berechnung der Korrelationen zwischen Pilzanteil und Stickstoffgehalt für die gesamte Stichprobe überprüft werden müsste. Insgesamt lagen die Stickstoffgehalte bei Kultur auf KT unter denen bei Kultur auf KS ($P < 0.0001$). Zu beachten ist, dass das Substrat Kartoffelschale einen höheren Stickstoffgehalt als Kartoffeltrester hatte (Tabelle 23) und somit insgesamt weniger Stickstoff bei Kultur auf KT zur Verfügung stand. Im Vergleich der Stickstoffgehalte einzelner Pilze in g/100 g zur Gesamtstichprobe wurden 52% auf KS und KT gleich eingeteilt und bei 82% kam es zu keiner oder nur geringer Änderung in der Einteilung (Tabelle 25). Betrachtet man den Stickstoffgehalt in g/L, kommt es in 22% zu keiner Änderung in der Gruppeneinteilung und in 62% zu keiner oder einer geringen Änderung.

Es zeigte sich im direkten Vergleich bei Kultivierung auf KS und KT und von Emers- und Submerskultivierung eine bedingte Form der Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Medien und Kultivierungsformen. Die Ergebnisse unterstreichen die Möglichkeit eines Emersscreenings vor einem zeitaufwendigeren Submersscreening, um die Pilzauswahl einzugrenzen. Eine Medienunabhängigkeit der Einteilung der Pilze im Vergleich zur gesamten Stichprobe zeigte sich zwar auch im Emersscreening im Vergleich von MEA zu KSA/KTA für einen Großteil der Pilze, diese sollte jedoch vor allem im Submersscreening noch weiter untersucht werden, da die beobachtete Unabhängigkeit dort auch auf eine Ähnlichkeit der Kartoffelmedien zurückzuführen sein könnte. Durch einen groß angelegten Vergleich von Screeningdaten auf verschiedenen Medien könnte zukünftig für die Suche nach einer geeigneter Pilz-Substrat-Kombination mit der Aufgabenstellung der Produktion von Biomasse mit neutralem/positivem Geruch und hohem Proteingehalt eine Vorauswahl von geeigneten Kandidaten getroffen werden. Für Fragestellungen nach hervorstechenden Aromastoffen wäre ein großangelegtes Screening weiterhin notwendig, da die Vorgehensweise nur eine Einteilung des Gesamteindrucks des Geruchs miteinbezieht.

Die Kartoffelnebenstrommedien eigneten sich insgesamt sehr gut zur Pilzkultivierung. Für die meisten getesteten Pilze konnte Wachstum in Emers- und Submerskultur sowie eine Erhöhung des Stickstoffgehalts durch Fermentation beobachtet werden. Pilze sind aufgrund ihrer Enzymausstattung in der Lage, eine Vielzahl von Substraten zu verwerten (Watkinson et al. 2015). Die Verwendung von Kartoffelnebenströmen ist neben den großen Mengen, in denen sie anfallen, interessant, weil Standardmedien mit Kartoffeln bereits für die Pilzkultivierung etabliert sind (BMEL 2023; Griffith et al. 2007). Hierbei ist vor allem Kartoffel-Dextrose Medium zu nennen, welches aus ungeschälten, geriebenen und gekochten Kartoffeln hergestellt wird (Westphal et al. 2021). Der Ersatz durch Kartoffelnebenströme könnte für bestehende Kultivierungen getestet werden, um diese Prozesse durch den Einsatz eines günstigen Fermentationsmediums in Bezug auf deren Nachhaltigkeit zu verbessern.

Um die Pilzauswahl weiter einzugrenzen, wurden fünf Pilze aufgrund der Daten der Screenings ausgewählt und der Geruch der Submerskulturen von einem Panel von sechs Personen auf einer Skala von 1 bis 5 eingeordnet (Tabelle 27). Die getesteten Basidiomyceten wurden mit Wertungen zwischen 3,0 und 3,4 beschrieben, mit Ausnahme der Kultur von *Hericium coralloides* auf KS, welche mit einem Wert von 2,1 die niedrigste Bewertung erhielt und *Pleurotus pulmonarius* mit der besten Bewertung auf beiden Substraten (Wertung 4,6). Die Gerüche für *P. pulmonarius* nach Waldmeister, Bittermandel und Kirschwasser passen sehr gut zu den typischen Gerüchen, die für Vertreter der Gattung *Pleurotus* beschrieben wurden (Bürger et al. 2022; Venkateshwarlu et al. 2000).

Nach Fermentation von nicht löslichen Fermentationsmedien handelt es sich bei Fermentaten um eine Mischung aus Pilzmyzel und Substratresten (Ahlborn et al. 2019). Folglich wurde das Mycosterol Ergosterol als Biomarker zur Bestimmung des Pilzanteils verwendet (Bickel Haase et al. 2024). Seine Eignung als Biomarker liegt darin begründet, dass Ergosterol in tierischen, pflanzlichen sowie bakteriellen Zellen nahezu nicht vorkommt. Sein Auftreten ist fast ausschließlich auf die Zellmembran von Pilzen beschränkt (Rodrigues 2018). In den Substraten wurde kein Ergosterol gefunden. Zur Bestimmung des Pilzanteils wurde der Ergosterolgehalt der Fermentate mit dem Ergosterolgehalt auf einem löslichen Medium verglichen. Zu erkennen ist ein hoher Pilzanteil von über 90% nach Kultivierung von *F. velutipes* auf Kartoffeltrestermedium (Abbildung 10). Ebenfalls sehr hohe Pilzanteile wurden für die Fermentate von *P. pulmonarius* und *Kuehneromyces mutabilis* auf beiden Nebenstrommedien bestimmt (ca. 60-75%). Diese erzielten Pilzgehalte lagen über den erreichten 54% Pilzgehalten nach Fermentation von Kakaoschalen (Bickel Haase et al. 2023) und für KT FVE in einem ähnlichen Bereich wie nach Fed Batch Kultivierung von *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester (Ahlborn et al. 2019). Aufgrund der höchsten Pilzanteile wurde *F. velutipes* und wegen hoher Pilzanteile sowie dem Geruchseindruck wurde *P. pulmonarius* für die weitere Optimierung der Fermentation ausgewählt. Beide Pilze stehen auf der Positivliste der Speisepilze der Deutschen Gesellschaft für Mykologie (DGfM 2024).

F. velutipes ist der europäische nahe Verwandte des asiatischen Enokitake Pilzes *Flammulina filiformis*. Lange wurden beide unter dem Namen *F. velutipes* geführt, jedoch bestätigte eine DNA-Sequenzierung, dass es sich um zwei getrennte phylogenetische Arten handelt (Wang et al. 2018). Die Bezeichnungen werden jedoch noch oft synonym verwendet. *F. velutipes* ist für die Forschung von großem Interesse. Zusätzlich zu seiner Nutzung als essbarer Speisepilz ist bekannt, dass *F. velutipes* Fettsäuren als Präkursoren für Aromastoffe sowie viele bioaktive sekundäre Metabolite und Polysaccharide bilden kann (Hammer et al. 2020; Fukushima-Sakuno 2020; Wang & Zhang 2021).

Für *P. pulmonarius* konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Nebenströme erfolgreich als Substrate zur Fruchtkörperproduktion verwendet werden können (Silva et al.

2002; Velázquez-Cedeño et al. 2002; Wu et al. 2019b). Dabei konnten eine hohe Aktivität von lignocellulolytischen Enzymen (Velázquez-Cedeño et al. 2002) sowie antiproliferative und antiadhäsive Eigenschaften für Polysaccharide aus Myzel und Fruchtkörpern von *P. pulmonarius* (Lavi et al. 2010) nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Auswahl von *P. pulmonarius* als interessanten Kandidaten für die Fermentation von Kartoffelnebenströmen.

4.3 Bilanzierung der Fermentation

Die BTM sowie die Stickstoffgehalte der Fermentate von KT, KS und ME wurden mit den Medienkontrollen bei 20 g/L Substratkonzentration verglichen (Tabelle 28). Mehr als die Hälfte der BTM verblieb bei Verwendung der Kartoffelmedien als unlöslicher Rückstand (KS: $11,53 \pm 0,31$ g/L; KT: $10,61 \pm 1,60$ g/L). Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei Bestimmung der BTM zwischen Medienkontrollen und Fermentaten bestimmt. Es wurden insgesamt höhere BTM nach Kultivierung auf den Kartoffelmedien ($10,31$ - $13,09$ g/L) als auf Malzextrakt erhalten (ME FVE: $6,34 \pm 0,75$ g/L; ME PSP: $8,70 \pm 0,18$ g/L). Auf Malzextrakt lag die BTM von PSP deutlich über der BTM von FVE. Dies war für das Fermentat von KT auch der Fall, nicht aber für das Fermentat von KS. Obwohl es sich bei den Fermentaten der Kartoffelnebenströme um Substrat/Pilz-Gemische handelt und nach Kultur auf ME um reines Pilzmyzel, kann eine hohe BTM bei guter nutritiver Zusammensetzung und ansprechender Sensorik wirtschaftlich von größerem Interesse sein. Die erreichten BTM mit FVE lagen höher als bei Kultur auf manchen Standardmedien (Hassan et al. 2012: $7,6$ g/L bei Substratkonzentration von 23 g/L; Kozhemyakina et al. 2010: $5,5$ g/L bei Substratkonzentration von 10 g/L). Bei einer Substratkonzentration eines Glucose-basierten Standardmediums von 30 g/L wurde bei Kultur von FVE eine BTM von $12,08 \pm 0,60$ g/L und nach Kultur von PSP von $13,90 \pm 0,86$ g/L erreicht (Diamantopoulou et al. 2014). Diese BTM liegen zwar etwas über den erreichten Werten nach Fermentation der Kartoffelnebenströme, jedoch wurden in dieser Studie eine höhere Substratkonzentration verwendet und die Fermentationsdauer überschritt mit 24 Tagen deutlich die hier verwendete Inkubationszeit von 7 Tagen. Wie schon im Screening beobachtet, wurde der Stickstoffgehalt durch Fermentation im Pellet im Vergleich zur Medienkontrolle deutlich erhöht. Nach Fermentation befand sich beinahe der gesamte Stickstoff der Medien in der festen Phase, wobei in den Überständen maximal $0,08 \pm 0,03$ g/L (KS PSP) verblieben. Die Kartoffelmedien als Stickstoffquellen wurden dabei genauso gut angenommen wie bei Kultur auf ME. Der Stickstoffgehalt für KS PSP überstieg mit $3,52 \pm 0,32$ g/100 g sogar den Stickstoffgehalt von $2,87 \pm 0,03$ g/100 g für ME PSP. Insgesamt wurde der höchste Stickstoffgehalt mit $3,89 \pm 0,31$ g/100 g für ME FVE erreicht. Die Bilanzierungen und der Vergleich zur Kultur auf ME unterstützen die sehr gute Eignung der Kartoffelnebenströme als Fermentationsmedium.

4.4 Optimierung der Fermentation

4.4.1 Optimierung durch Stickstoffzugabe

Da bei der Fermentation der Kartoffelnebenströme der Großteil des vorhandenen Stickstoffs aus dem Überstand in der festen Phase fixiert wurde (Tabelle 28), wäre es möglich, dass es im Fermentationsprozess zur Stickstofflimitierung kam. Höhere Wachstumsraten von Pilzen wurden zuvor bei höheren verfügbaren Stickstoffgehalten beobachtet (Di Lonardo et al. 2020). Es wurde beschrieben, dass die Zugabe von anorganischen Stickstoffquellen (Natrium- und Ammoniumsulfat) nicht die Biomassenproduktion bei Submerskultivierung von *F. velutipes* im Gegensatz zur Zugabe von organischen Stickstoffquellen (Hefeextrakt und Hefeautolysat) erhöhte (Kozhemyakina et al. 2010). Zu beachten ist hier, dass es sich bei den zugegebenen organischen Stickstoffquellen um komplexe Medienbestandteile handelt und die Effekte auf die Biomasse auch unabhängig von der Erhöhung des Stickstoffgehalts sein könnten. In einer anderen Studie wurde der Einfluss verschiedener anorganischer Stickstoffquellen auf die Biotrockenmasse von *F. velutipes* getestet (Shin et al. 2007). Die höchste Biotrockenmassen wurden mit Zugabe von Ammoniumphosphat erzielt.

Daher wurde die Zugabe von Natriumaspartat (NA; reine Stickstoffzugabe: 0,48 g/L) sowie Ammoniumsulfat (AS; reine Stickstoffzugabe: 0,94 g/L) zu den Kartoffelnebenströmen getestet. Es konnte eine Erhöhung der Stickstoffgehalte in den Pellets nach Kultivierung erzielt werden, wobei die höchsten Stickstoffgehalte bei Zugabe zu KT FVE erreicht wurden (Abbildung 13; KT FVE: $2,92 \pm 0,66$ g/100 g; KT FVE+AS: $6,4 \pm 0,16$ g/100 g; KT FVE+NA: $4,39 \pm 0,13$ g/100 g). Durch die Erhöhung des Stickstoffgehalts kam es in den Fermentaten mit *P. pulmonarius* und *F. velutipes* zu keiner signifikanten Erhöhung des Pilzanteils (Abbildung 14). Nach Zugabe zu KS FVE war der Pilzgehalt im Vergleich zur Kontrolle verringert. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass für die Fermentation wahrscheinlich keine stickstoffbedingte Wachstumslimitierung vorlag. Um zu überprüfen, ob der Proteingehalt der Fermentate gesteigert wurde, wurden die Reinproteingehalte mittels Aminosäureanalyse bestimmt (Tabelle 29). Durch die Zugabe von AS erhöhten sich die Reinproteingehalte in allen Fermentaten (Bsp.: KT FVE: $13,5 \pm 0,8$ g/100 g; KT FVE+AS: $17,8 \pm 0,8$ g/100 g). Die Zugabe von NA führt zu noch höheren Werten, dabei muss jedoch beachtet werden, dass bei der verwendeten Methode zwischen freien und im Protein gebundenen Aminosäuren nicht unterschieden wird, wodurch der Wert für den Reinproteingehalt auch bei der Zugabe von Natriumaspartat zur Kontrolle erhöht wurde. Sichtbar wird dies auch bei dem Vergleich der Asparaginsäure/Asparagin-Werte mit und ohne Zugabe von Ammoniumsulfat. Durch die Fermentation von KS+AS oder KT+AS war der Asparaginsäure/Asparagin-Gehalt in den Fermentaten im Vergleich zu den Medienkontrollen verringert. Asparaginsäure kann von Pilzen zum Aufbau anderer Aminosäuren genutzt werden (Fraatz et al. 2014), wodurch dessen Gehalt bei Fermentation sinkt. Zusätzlich könnte nicht verbrauchtes Aspartat durch

den Aufbau von pilzlicher Biomasse nicht mehr im Rückstand, sondern gelöst im Überstand vorliegen. Um zwischen verwendetem und ungenutztem Aspartat zu unterscheiden, müsste somit der Gehalt im Fermentationsüberstand überprüft werden. Zusätzlich könnte der freie Asparaginsäure-Gehalt ermittelt werden, um die Natriumaspartat-Zugabe der tatsächlich verwendeten Menge anzupassen (Bickel Hasse et al. 2024). Die biologische Wertigkeit nach Zufütterung von Natriumaspartat sank deutlich ab (KT FVE: 89 ± 2 ; KT FVE+NA: 77 ± 6). Dies kann durch das zusätzliche Einbringen von Aspartat erklärt werden, wodurch der prozentuale Anteil der essenziellen Aminosäuren am Proteingehalt verringert wurde.

Im Rahmen des Gesamtprojekts wurde ein Kulturmedium aus Kartoffelnebenströmen ohne externe Zusätze aufgrund der Kosten und der Nachhaltigkeit bevorzugt. Dabei stand die Nutzung des ganzheitlichen Myzels und nicht nur einer isolierten Proteinfraction im Vordergrund. Da keine stickstoffbedingte Wachstumslimitierung festgestellt wurde, sehr hohe Pilzgehalte ohne Zugabe von externen Stickstoffquellen erzielt wurden und eine hohe Proteinqualität vorlag, wurde sich gegen die Zugabe von zusätzlichem Stickstoff zur Fermentation entschieden.

4.4.2 Optimierung der Substratkonzentration

Die verwendete Substratkonzentration konnte von 20 g/L auf 30 g/L für KS PSP (Abbildung 15) und KT FVE (Abbildung 18) gesteigert werden. Durch diese Erhöhung der Substratkonzentration kam es nur zu geringfügig niedrigeren Pilzanteilen, zu gleichen Proteinanteilen und höheren Biotrockenmassen bei gleicher Kultivierungsdauer. *P. pulmonarius* wuchs auf Kartoffelschalen besser als auf Kartoffeltrester. Bei KT PSP führte schon die Erhöhung der Substratkonzentration von 10 g/L auf 20 g/L zur deutlichen Verringerung des Pilzanteils (Abbildung 16). Mit *F. velutipes* hingegen wurden deutlich geringere Pilzanteile auf KS erzielt als auf KT und eine Abnahme des Pilzanteils auf KS war bei der Erhöhung der Substratkonzentration bei KS von 20 g/L auf 30 g/L zu erkennen (Abbildung 17). Es konnte zuvor gezeigt werden, dass eine gewisse Medienunabhängigkeit einzelner Pilze im Vergleich zur gesamten Pilzauswahl besteht (4.2). Die Pilzanteile sowie die Rohproteingehalte nach Kultur mit *F. velutipes* lagen tendenziell höher als nach Kultur mit *P. pulmonarius*, was diese Vermutung bestätigt. Dass KT für *F. velutipes* und KS für *P. pulmonarius* das jeweils bevorzugte Substrat war, unterstreicht dennoch die Notwendigkeit einer Pilz-Substrat-spezifischen Optimierung. Aufgrund der höchsten Pilzanteile wurde der Fokus nachfolgend auf KT FVE gelegt. Die Wachstumsreihen bei verschiedenen Substratkonzentrationen zeigten, dass mit steigender Substratkonzentration bis 30 g/L der maximale Pilzanteil jeweils später erreicht wurde (Abbildung 19). Ab einer Substratkonzentration von 40 g/L wurden auch zu späteren Erntezeitpunkten bei allen Fermentationen keine vergleichbar hohen Pilzgehalte erzielt. Dies kann unterschiedliche

Gründe haben. Zum einen nimmt bei Zunahme der Substratkonzentration die Konzentration der für den Pilz möglicherweise toxischen Substanzen zu. Zu nennen sind hier insbesondere die Glykoalkaloide der Kartoffel, für welche bereits eine antimykotische Wirkung gezeigt wurde (Fewell & Roddick 1993; Sánchez-Maldonado et al. 2016). Dabei wurde eine synergistische antimykotische Aktivität von α -Chaconin und α -Solanin (Fewell & Roddick 1993) sowie von α -Chaconin und Kaffeesäure festgestellt (Sánchez-Maldonado et al. 2016). Die Resistenz von Pilzen ist speziesabhängig und hängt aufgrund des Wirkmechanismus gegen die Membran möglicherweise mit deren Sterolmuster zusammen (Sánchez-Maldonado et al. 2016). Neben der antimykotischen Wirkung mancher Sekundärmetabolite der Kartoffel wurde diese auch für manche Proteine und Peptide der Kartoffelknolle gegen pathogene Pilzspezies beschrieben (Bártová et al. 2019). Eine antimykotische Wirkung verschiedener Inhaltsstoffe der Kartoffel gegen *F. velutipes* oder *P. pulmonarius* wäre somit bei zu hoher Substratkonzentration denkbar. Ein anderer Grund könnte eine Zunahme der Viskosität bei erhöhter Substratkonzentration und damit eine schlechtere Durchmischung sein. Dies könnte negative Auswirkungen auf die Sauerstoffversorgung und damit das Pilzwachstum haben.

Als weitere Optimierung könnten alternative Fütterungsstrategien zu dem bisher verwendeten Batch Verfahren überprüft werden. Im Vergleich einer gepulsten und einer kontinuierlichen Zufütterung zu einer *Aspergillus oryzae* Kultur war die Viskosität bei der gepulsten Fermentation geringer (Bhargava et al. 2003). Durch ein Fed Batch Verfahren konnte der Pilzgehalt bei der Fermentation von Apfeltrester gesteigert werden (Ahlborn et al. 2019). Anzumerken ist jedoch, dass bei der Zufütterung von Substrat zu Bioreaktoren im Vergleich zu Schüttelkolben darauf geachtet werden muss, dass dieses „pumpbar“ ist. Dies wurde in Vorversuchen getestet und stellt eine Herausforderung dar, wenn das Substrat in hoher Konzentration zugegeben werden soll, um das Fermentationsvolumen nicht zu sehr zu erhöhen. Aufgrund der sich ergebenden Probleme für die Maßstabsvergrößerung und der bereits erzielten sehr guten Pilzgehalte im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen wurde sich gegen ein Fed Batch Verfahren entschieden.

4.4.3 Verwertung des Kulturüberstands

Bei der Produktion von pilzlicher Biomasse durch Submersfermentation fällt der Fermentationsüberstand als neuer Nebenstrom an. Es wurde getestet, ob dieser als Ersatz des Wassers bei erneuter Medienherstellung genutzt werden kann. Es zeigte sich, dass das Wachstum schon bei einmaliger Wiederverwendung des Überstands inhibiert wurde (55% Pilzanteil anstatt 86%; Abbildung 21). Zusätzlich waren die Medien nach dem Autoklavieren deutlich dunkler als bei Verwendung von Wasser (Abbildung 20). Ein Grund hierfür könnten Maillard Produkte sein. Die Maillardreaktion beschreibt die nicht-enzymatische

Bräunungsreaktion, bei welcher Aminoverbindungen unter Hitzeeinwirkung mit reduzierenden Verbindungen reagieren und eine Vielzahl von Produkten entstehen, die teils farbgebend sind (Rizzi 1997). Die Maillardreaktion kann auch induziert werden, um beispielsweise geschmacksaktive Substanzen zu generieren (Yan et al. 2021; Yu et al. 2018; Zhang et al. 2019). Bei der Reaktion kann es zur Bildung von Acrylamid kommen, für welches verschiedene toxische Eigenschaften beschrieben wurden (Stadler et al. 2002; EFSA 2015). Interessanterweise wurde für filamentöse Pilze gezeigt, dass diese teilweise Acrylamid abbauen können (Wakaizumi et al. 2009) und pilzliche L-Asparaginase genutzt werden kann, um Asparagin zu Asparaginsäure zu hydrolysieren und so potenziell den Acrylamidgehalt zu reduzieren (Hendriksen et al. 2009). Acrylamid sollte in dem abgetrennten Rückstand keine große Rolle spielen, da es wasserlöslich ist und somit zum Großteil im Überstand verbleiben sollte. Je nach Art der Weiterverarbeitung der Biomasse, sollte der Gehalt jedoch im Endprodukt überprüft werden. Für Maillardprodukte allgemein wurde bereits antimikrobielle Aktivität gezeigt (Habinshuti et al. 2019). Möglicherweise könnte die hemmende Wirkung bei Wiederverwendung des Überstands auf Maillardprodukte zurückzuführen sein.

Eine weitere Option für die Wachstumsverringernach erneuter Überstandsverwertung wären potentiell hemmende Substanzen aus dem Substrat, welche bereits unter 4.4.2 beschrieben wurden. Zusätzlich könnten produzierte und sekretierte Metabolite des Pilzes durch die Aufkonzentration das Wachstum hemmen. Bei Fermentation mit *F. velutipes* sind hier die Enokipodine zu nennen. Für verschiedene Enokipodine wurde gezeigt, dass sie sich nach Submerkultivering im Überstand befinden und antimykotisch wirken können (Ishikawa et al. 2000; Ishikawa et al. 2001). Ob sie in erhöhter Konzentration auch gegen *F. velutipes* selbst toxisch sind, wurde nicht untersucht. Es wurden weitere Sekundärmetabolite für *F. velutipes*, wie beispielsweise verschiedene Flammulinolide, beschrieben, die teils bioaktiv sind (Fukushima-Sakuno 2020, Wang et al. 2012). Um genauere Aussagen zu treffen, welche Substanzen alleine oder in Kombination das Pilzwachstum hemmen, müssten weiterführende Analysen durchgeführt werden.

Da die Überstandsrückführung nicht erfolgreich war, könnte der Überstand anderweitig verwertet werden. Es gibt beispielsweise verschiedene Ansätze, um medizinisch interessante Polysaccharide aus den Fermentationsüberständen von *F. velutipes*-Kulturen zu isolieren (Lavi et al. 2010; Kim et al. 2002a). Durch Nutzung des Myzels und des Überstands könnte die Wirtschaftlichkeit des Prozesses gesteigert werden.

4.4.4 Vorkultur auf Nebenströmen

Die Vorkulturführung kann einen großen Einfluss auf die Hauptkultur und die Ausbeute von verschiedenen Produkten haben (Huang et al. 2018; Keil et al. 2019). Durch die Verwendung von Nebenströmen für die Vorkultur könnten Fermentationen günstiger und nachhaltiger werden. Durch die Nutzung eines Nebenstroms der Tabakindustrie als günstiges Vorkulturmedium für *Rhizopus oryzae* konnten die Xylose-Verbrauchsrate und die Milchsäure-Ausbeute erhöht werden (Zheng et al. 2016). Aufgrund der sehr hohen Pilzgehalte auf Kartoffeltrester wurde dessen Verwendung als Vorkulturmedium getestet. Der Ergosterolgehalt nach Vorkultur auf Malzextrakt stieg etwas schneller an als auf Kartoffeltrester (Abbildung 22; >500 mg/100 g TM an Tag 7 statt Tag 9) und es wurden bei Verwendung des Nebenstroms niedrigere Biofeucht- und Biotrockenmassen erzielt. Dies könnte auf einfacher verfügbare Kohlenstoffquellen im Malzextrakt im Vergleich zum Kartoffeltrester zurückzuführen sein. Die Hauptkulturen wurden somit insgesamt mit einer geringeren Pilzmenge inokuliert. Der Proteingehalt sowie der Pilzanteil nach Verwendung der Nebenstrommedien lagen unter den Werten nach Verwendung der Malzextrakt-Vorkultur (Abbildung 23), jedoch war dieser Unterschied bei Annahme eines Signifikanzniveaus von 0,05 nicht signifikant (P: 0,0907 für den Pilzanteil, P: 0,0597 für den Proteingehalt an Kulturtag 7). Da beide Parameter niedriger waren, könnte dies dennoch auf geringeres Wachstum nach Vorkultur auf Kartoffeltrester hindeuten. Daher wurde im weiteren Verlauf Malzextrakt als Vorkulturmedium verwendet. Eine Verwendung von Kartoffeltrester ist dennoch ebenfalls vielversprechend und könnte weiter optimiert werden.

4.4.5 Fermentationsparameter

F. velutipes wurde bereits auf verschiedenen Standardmedien submers kultiviert (Tabelle 50). Es wurden meist Fermentationstemperaturen zwischen 20-26 °C gewählt. Bei einem Vergleich von Temperaturen zwischen 15-40 °C bzw. 10-35 °C wurde eine optimale Fermentationstemperatur von 25 °C bestimmt (Hassan et al. 2012; Kong et al. 2004). Die gewählte Fermentationstemperatur von 24 °C für KT FVE und KP FVE liegt in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Tabelle 50).

Meist wurde eine 4-14 Tage kultivierte Vorkultur verwendet und 1-10%ig inokuliert. Die ermittelte Vorkulturdauer von 7 Tagen für FVE auf KT und ME (Abbildung 22) und die 10%ige Inokulation liegt in diesem Bereich. Als optimale Fermentationsdauer wurden 5 Tage (Shin et al. 2007), 8-10 Tage (Mau & Ma 2001) und 15 Tage (Hassan et al. 2012) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass der optimale Erntezeitpunkt von dem verwendeten Substrat und dessen Konzentration abhängt (Abbildung 18, Abbildung 19) wodurch ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. Optimale pH-Werte für Fermentation mit *F. velutipes* wurden im Bereich zwischen pH 4-7 bestimmt (Tabelle 50). Die pH-Werte der Kartoffelmedien wurden nicht eingestellt,

lagen jedoch mit pH 5,9 für KT und 4,7 für KP in diesem Bereich. Insgesamt stimmen die ermittelten Fermentationsparameter sehr gut mit den Literaturwerten überein.

Tabelle 50: Fermentationsparameter aus verschiedenen Literaturquellen sowie für KP/KT FVE. 1: Hassan et al. 2012; 2: Kozhemyakina et al. 2010; 3: Kim et al. 2002a; 4: Diamantopoulou et al. 2014; 5: Shin et al. 2007; 6: Kim et al. 2002b; 7: Mau & Ma 2001; opt.: optimal; n.a.: nicht angegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	KP/ KT FVE
VK	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
Dauer VK [Tage]	7	4	7	n.a.	5	n.a.	14	7
Inokulation [%]	1-10	10	4%	n.a.	4	n.a.	5	10
Konz. HK [g/L]	23	10	n.a.	30	20	n.a.	n.a.	20/ 30
Temperatur [°C]	15-40	24	25	26	25	20	25	24
Dauer HK [Tage]	5-20 opt. 15	14	0-15	0-24	0-8 opt. 5	0-16 opt. 8-10	0-14	7
pH	4-8 opt. 6-7	n.a.	5	6,2	3,5-7,5 opt. 4,5-5,5	2-8 opt. 4-7	n.a.	n.a.

4.5 Analyse der Fermentate

Die Fermentate wurden hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung analysiert. Für den Vergleich der beiden ausgewählten Pilzstämme wurden Rohproteingehalt, Aminosäureprofil, Rohfettgehalt und Fettsäureverteilung bei einer Substratkonzentration von 20 g/L für alle Pilz-Substrat-Kombinationen verglichen. Für die weitere Grundanalytik wurde das Fermentat von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* bei der optimierten Substratkombination von 30 g/L untersucht.

4.5.1 Proteingehalt und Aminosäureanalytik der Fermentate

Die Aminosäureprofile der beiden Pilze auf beiden Medien ähnelten sich sehr, wobei in der Regel höhere Reinproteingehalte für die Fermentate mit *F. velutipes* bestimmt wurden. Die Aminosäureverteilungen der Substrate waren erwartungsgemäß ebenfalls ähnlich (Abbildung 26, Abbildung 27). Die Wahl des Mediums für die Fermentation hatte somit Einfluss auf den absoluten Proteingehalt, jedoch weniger auf die Aminosäureverhältnisse zueinander. In allen Fermentaten wurde der Gehalt aller Aminosäuren bis auf Asparaginsäure/Asparagin im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Der Asparaginsäure/Asparagingehalt nahm in allen Fermentaten bis auf KT FVE im Vergleich zur Kontrolle ab. Im Fermentat KT FVE war er gleichbleibend. Diese Aminosäuren scheinen somit unter anderem für den Aufbau anderer Aminosäuren verwendet worden zu sein, wobei aufgrund der verwendeten Methode über die Anteile von Asparaginsäure und Asparagin an deren Summe keine Aussage getroffen werden kann. Die Supplementierung von Asparaginsäure und Asparagin führte bei Submerskultur von *Pleurotus sapidus* zu verbessertem Wachstum und es wurde gezeigt (Fraatz et al. 2014). Die

Bildung anderer Aminosäuren aus Asparaginsäure/Asparagin kann für die Pilzstämme *F. velutipes* und *P. pulmonarius* vermutet werden. Durch alle Fermentationen wurde der Reinproteingehalt erhöht, wobei der höchste Reinproteingehalt für KS FVE erzielt wurde ($16,64 \pm 0,28$ g/100 g TM). Dies entspricht einer Steigerung des Reinproteingehalts um 76% im Vergleich zum Substrat. Der Reinproteingehalt von KS FVE war zwar höher als der von KT FVE ($13,51 \pm 0,75$ g/100 g TM), jedoch war auch der Proteingehalt des Substrats Kartoffelschalen höher (KS: $9,45 \pm 1,25$ g/100 g TM; KT: $5,32 \pm 0,42$ g/100 g TM). Die Steigerung des Proteingehalts durch Fermentation von Kartoffeltrester mit *F. velutipes* entsprach 153% und somit der höchsten erzielten Steigerung des Proteingehalts. Diese deutlich höhere Steigerung könnte teilweise durch den höheren Pilzgehalt von *F. velutipes* auf KT als auf KS erklärt werden. Dieser betrug für KT FVE ca. 100% und für KS FVE ca. 77%. Der Proteingehalt von Fermentaten hängt von den verwendeten Substraten ab, wobei neben deren Stickstoffgehalt auch Faktoren wie die Partikelgröße (Schmidt & Furlong 2012) und damit einhergehend deren Bioverfügbarkeit sowie der verwendete Pilzstamm (Zhang et al. 2008) ausschlaggebend sind. Dies zeigte sich auch bei dem Vergleich mit den Fermentaten mit *P. pulmonarius*. Trotz der ähnlichen Pilzanteile von KS FVE und KS PSP (ca. 75%) wurde mit KS FVE ein deutlich höherer Proteingehalt erzielt. Für KS PSP kam es zu einer Steigerung des Proteingehalts von 52% ($14,37 \pm 0,04$ g/100 g TM).

Im Gegensatz zur Fermentation mit *F. velutipes* war die Steigerung des Proteingehalts bei Fermentation von KT mit *P. pulmonarius* mit 45% ($7,71 \pm 0,25$ g/100 g TM) geringer als für die Fermentation von KS. Dies könnte ebenfalls mit einem höheren Pilzanteil bei Fermentation von KS anstelle von KT erklärt werden (KS PSP: ca. 75%; KT PSP: ca. 66%).

Durch die zusätzliche Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ließen sich Kjeldahlfaktoren zur Berechnung des Roh- und Reinproteingehalt ableiten. Die bestimmten Kjeldahlfaktoren für die Fermentate (5,46-5,65) wichen von dem Standardfaktor 6,25 für Lebensmittel ab (Matissek & Fischer 2021). Der Faktor ist abhängig von dem Anteil an Aminosäuren mit mehr als einem Stickstoffatom (Arginin, Histidin, Lysin und Tryptophan). Durch Fermentation stieg der Gehalt aller Aminosäuren an, jedoch war diese Steigung für Histidin besonders hoch (Histidinanteil im Gesamtprotein KT: 2,4% KT FVE: 11,1%). Durch den größeren Anteil an Histidin im Gesamtprotein können die geringeren Kjeldahlfaktoren für den Rohproteingehalt erklärt werden. Der Kjeldahlfaktor zur Bestimmung des Reinproteingehalts variiert je nach Lebensmittel und liegt unter dem Faktor zur Bestimmung des Rohproteingehalts (Saloväänänen & Koivistoinen 1996). Bei der Bestimmung des Rohproteingehalts wird der Proteingehalt somit in der Regel überbestimmt. Der Unterschied zwischen Roh- und Reinproteingehalt wird durch andere stickstoffhaltige Verbindungen als proteinogene Aminosäuren bedingt. Bei der Analyse von Pilz- und Insektenproben ist dabei vor allem Chitin zu nennen (Merzendorfer 2011). Der Chitingehalt wurde für KT FVE zwischen 1,8-

5,1 g/100 g TM bestimmt, wobei auf die Methoden zur Chitinbestimmung unter 4.5.4 näher eingegangen wird. Zusätzlich sind in Pilzen nicht proteinogene Aminosäuren bekannt, welche in geringen Maßen zur Differenz zwischen Roh- und Reinproteingehalt beitragen können. Beispiele für nicht proteinogene Aminosäuren in Pilzen sind Ornithin (Beckmann et al. 2013), γ -Aminobuttersäure (Cai et al. 2014) oder Ergothionein (Fujitani et al. 2018).

Aus der Aminosäureverteilung lässt sich die biologische Wertigkeit bestimmen, welche der Bewertung der Proteinqualität dient. Sie gibt die Menge an körpereigenem Protein an, welche durch 100 g Nahrungsprotein ersetzt werden kann. Dabei wird die Ähnlichkeit des Nahrungsproteins zum körpereigenen Protein bezogen auf die essentiellen Aminosäuren bewertet. Als Referenzwert dient mit einer festgelegten biologischen Wertigkeit von 100 die Aminosäureverteilung von Vollei (FAO/WHO 1973; WHO 2007). Die biologischen Wertigkeiten der Kartoffelproteine waren bereits sehr hoch (KS: 87 ± 3 ; KT: 90 ± 2). Für KS FVE wurde die insgesamt höchste biologische Wertigkeit mit 91 ± 2 erzielt und die biologischen Wertigkeiten für Fermentate mit *F. velutipes* lagen über denen der Fermentate mit *P. pulmonarius*. Diese Wertigkeiten waren höher als die Vergleichsdaten von Proteinquellen pflanzlichen Ursprungs und über oder im Bereich von Proteinquellen tierischen Ursprungs. Die biologische Wertigkeit von Rindfleisch beträgt 80, von Milch 91, von Soja 74 und von Weizen 64 (Hoffman & Falvo 2004). Viele Pilze produzieren Protein mit hohen biologischen Wertigkeiten. Das Protein von *P. sapidus* nach Kultur auf Apfeltrester und das Protein von *P. salmoneo-stramineus* kultiviert auf Kakaofruchtschalen hatten eine ähnlich hohe biologische Wertigkeit von 86 (Ahlborn et al. 2019; Bickel Haase et al. 2024). Bei dem Vergleich des Proteins von Fruchtkörpern drei verschiedener *Pleurotus*-Stämme war die höchste erreichte biologische Wertigkeit 88 (del Toro et al. 2006).

4.5.2 Fettgehalt und Fettsäureverteilung

Durch Fermentation wurde der Rohfettgehalt im Vergleich zu den Substraten deutlich gesteigert. Dabei wurden nach Kultur auf KS ähnliche Gehalte erreicht (KS PSP: $1,63 \pm 0,12$ g/100 g TM; KS FVE: $4,99 \pm 0,23$ g/100 g TM) wie nach Kultur auf KT (KT PSP: $1,43 \pm 0,07$ g/100 g TM; KT FVE: $4,61 \pm 0,13$ g/100 g TM). Es fällt der deutlich höhere Fettgehalt der Fermentate mit *F. velutipes* im Vergleich zu *P. pulmonarius* auf. Dieser Unterschied ist zu groß, als dass er mit besserem Wachstum von *F. velutipes* auf den Nebenströmen erklärbar wäre. Es ist bekannt, dass sich der Fettgehalt in Pilzen zwischen Stämmen unterscheiden kann, wie durch einen Vergleich von 23 Fruchtkörpern gezeigt wurde (Fettgehalte 0,46-3,89 g/100 g TM; Yu et al. 2020). Zusätzlich sind unterschiedliche Fettgehalte für Fruchtkörper von *F. velutipes* in der Spanne von $1,84 \pm 0,14$ g/100 g TM (Pereira et al. 2012) bis $9,23 \pm 0,59$ g/100 g TM (Yang et al. 2001) angegeben, was die Abhängigkeit von Kultivierungsparametern unterstreicht. Die meisten Studien beziehen sich

ausschließlich auf die Analyse von Fruchtkörpern. Bei einem Vergleich von *F. velutipes* Fruchtkörpern und Myzel wurde für die Fruchtkörper ein Fettgehalt von $2,38 \pm 0,21$ g/100 g TM und für das Myzel von $2,91 \pm 0,15$ g/100 g TM bestimmt (Kim et al. 2014).

In den Substraten machten die gesättigten Fettsäuren den größten Anteil aus (KS: 76,5%; KT: 83,3%), wobei die dominierende Fettsäure Palmitinsäure war (KS: $56,6 \pm 4,4\%$; KT: $63,7 \pm 1,7\%$). Die Fettsäureverteilung änderte sich durch die Fermentation deutlich. Der Anteil an Palmitinsäure sank je nach Fermentat auf ca. 13-20% und der Anteil an Linolsäure stieg in Fermentaten mit *F. velutipes* auf 53-54% und in Fermentaten mit *P. pulmonarius* auf 64-69% an (Tabelle 34). In Pilzen sind Palmitinsäure, Ölsäure oder Linolsäure die häufigsten Fettsäuren (Cohen et al. 2014; Dimou et al. 2002; Ribeiro et al. 2009; Diamantopoulou et al. 2012; Diez & Alvarez 2001). Für Myzel von *P. pulmonarius*, kultiviert in Kartoffel-Dextrose-Medium, wurde der Anteil an Linolsäure auf ca. 45-59% bestimmt (Dimou et al. 2002). In einer anderen Studie wurde der Anteil von Ölsäure für Myzel von *F. velutipes* auf 17,2% und von Linolsäure auf 49,4% bestimmt (Diamantopoulou et al. 2012). Durch die Fermentation wurde der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Fermentaten, vor allem bedingt durch den steigenden Anteil an Linolsäure, deutlich erhöht. Der deutlich höhere Anteil an ungesättigten Fettsäuren ist im ernährungsphysiologischen Kontext als positiv zu bewerten.

Die Produktion interessanter Fettsäuren mit Pilzen trägt großes biotechnologische Potential. So konnten bereits pilzliche Fettsäuren zu 12-Methyltridecanal umgesetzt werden, welches als Aromastoff mit einem Geruchseindruck nach gekochtem Fleisch und Talg für herzhaftes Lebensmittel von Interesse ist (Fraatz et al. 2016). In *F. velutipes* wurden zusätzlich verschiedene seltene Fettsäuren, wie beispielsweise Dodec-11-ensäure und zwei- und dreifach ungesättigte C16-Isomere, gefunden (Hammer et al. 2020). Durch den Einsatz einer Carbonsäurereductase konnten die Fettsäuren in die entsprechenden Aldehyde, welche grüne Geruchsqualitäten aufwiesen, umgesetzt werden. Der Bildungsweg von Dodec-11-ensäure wird von den Autoren ausgehend von Laurinsäure vorgeschlagen. Der Anteil von Laurinsäure betrug unter den Kultivierungsbedingungen in dieser Studie $32,2 \pm 1,9\%$ und der Anteil der Dodec-11-ensäure $2,9 \pm 0,0\%$. In den Fermentaten der Kartoffelnebenströme wurde der Anteil der Laurinsäure auf 3,6-5,6% bestimmt, was möglicherweise erklärt, warum Dodec-11-ensäure nicht detektiert werden konnte.

4.5.3 Zusammensetzung des optimierten Fermentats

Für *F. velutipes* auf Kartoffeltrester wurde der höchste Pilzgehalt erzielt und zusätzlich höhere Proteingehalte als bei Fermentation mit *P. pulmonarius*. Aufgrund dessen wurde dieses Fermentat bei einer optimierten Substratkonzentration von 30 g/L weiter analysiert. Es existieren wenige Studien, die sich mit der Zusammensetzung des Myzels von *F. velutipes* beschäftigen, weshalb zum Vergleich zusätzlich die Zusammensetzung von Fruchtkörpern

herangezogen wurde (Tabelle 51). Der Rohproteingehalt wurde in den meisten Studien auf 17-20 g/100 g TM bestimmt. In Fruchtkörpern wurden teils höhere Gehalte von bis zu $27,9 \pm 0,3$ g/100 g TM erzielt (Beluhan & Ranogajec 2011). Der Proteingehalt hängt von verschiedenen Parametern, wie beispielsweise dem C/N-Verhältnis des Substrats oder den Kultivierungsbedingungen, ab (Hoa et al. 2015). Der Rohproteingehalt des optimierten Fermentats lag mit $17,6 \pm 0,2$ g/100 g TM unter den Proteingehalten in der Literatur. Durch die Zugabe externer Stickstoffquellen konnte der Proteingehalt zwar gesteigert werden, jedoch wurde sich für die Fermentation des Nebenstroms ohne externe Zusätze entschieden (4.4.1). Der Fettgehalt lag bei einer Substratkonzentration von 30 g/L mit $3,2 \pm 0,1$ g/100 g TM unter dem Fettgehalt von $4,6 \pm 0,1$ g/100 g TM bei einer Substratkonzentration von 20 g/L. Der Unterschied kann eventuell mit dem etwas geringeren Pilzgehalt bei der höheren Substratkonzentration sowie natürlichen Schwankungen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen erklärt werden. Beide Werte liegen im Bereich, der für *F. velutipes* beschrieben wurde (1,84-8,89 g/100 g TM; Tabelle 51).

Tabelle 51: Zusammensetzung von Fruchtkörpern (Fk) und Myzel (My) von *F. velutipes*. 1: Cohen et al. 2014; 2: Yang et al. 2001; 3: Pereira et al. 2012; 4: Bach et al. 2017; 5: Beluhan & Ranogajec 2011; 6: Kim et al. 2014; 7: Kozhemyakina et al. 2010; 8: Hassan et al. 2012; n.a.: nicht angegeben.

	1	2	3	4	5	6	6	7	8
Kultivierung	Fk	Fk	Fk	Fk	Fk	Fk	My	My	My
Rohprotein [g/100 g TM]	$23,4 \pm 0,2$	$20,0-26,7$	$17,9 \pm 0,0$	$19,0 \pm 0,7$	$27,9 \pm 0,3$	$19,2 \pm 0,7$	$18,2 \pm 1,3$	17,5	$17,4-18,7$
Rohfett [g/100 g TM]	$2,1 \pm 0,1$	$8,9-9,2$	$1,8 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,2$	n.a.	n.a.
Rohasche [g/100 g TM]	$8,3 \pm 0,1$	$6,9-7,5$	$9,4 \pm 0,7$	$8,5 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,5$	1,4	$4,0-4,9$
Kohlenhydrate [g/100 g TM]	$61,2 \pm 4,3$	n.a.	$70,9 \pm 0,4$	$70,5 \pm 1,0$	n.a.	n.a.	n.a.	56,0	$74,9-75,6$

Bei Betrachtung der Aschegehalte ist auffällig, dass diese im Pilzmyzel niedriger waren als in Fruchtkörpern. Dies zeigte sich auch in einer Studie von Kim et al. (2014), bei welcher beide Kultivierungsformen analysiert wurden. Im optimierten Fermentat wurde ein Aschegehalt von $2,9 \pm 0,1$ g/100 g TM bestimmt. Der Aschegehalt war im Fermentat geringer als im KT Substrat ($4,1 \pm 0,1$ g/100 g TM). Da bei Herstellung des Fermentationsmediums Wasser zugegeben und der Überstand bei der Ernte vom Fermentationspellet abgetrennt wird, befinden sich wahrscheinlich Mineralstoffe im Überstand. Dies kann den geringeren Aschegehalt des Fermentats im Vergleich zum Substrat erklären. Die genaue Zusammensetzung des Mineralstoffgehalts wurde nicht bestimmt. In der Literatur wurde diese vor allem für Fruchtkörper angegeben, wobei die Zusammensetzung des Kultursubstrats einen großen Einfluss hat. Bach et al. gaben Phosphor, Kalium, Eisen, Kupfer und Zink als häufigste Mineralien in Fruchtkörpern von *F. velutipes* an (Bach et al. 2017), Lee et al. Kalium,

Magnesium, Calcium und Natrium (Lee et al. 2009a) und Cohen et al. Calcium, Kalium, Phosphor und Zink (Cohen et al. 2014). Der Kohlenhydratanteil lag für KT FVE bei ca. 76% und passte damit ebenfalls sehr gut zu den Literaturwerten. Der Anteil der löslichen Ballaststoffgehalte wurde für KT FVE auf $1,3 \pm 0,3$ g/100 g TM und der Anteil der unlöslichen Ballaststoffe auf $34,9 \pm 1,7$ g/100 g TM bestimmt. Der Gesamtballaststoffgehalt lag damit im Bereich, welcher für Fruchtkörper von *F. velutipes* auf $32,1 \pm 1,0$ g/100 g TM bestimmt wurde (Bach et al. 2017).

Inwieweit sich die Zusammensetzung von Fruchtkörpern und Myzel ähnelt, ist nicht nur aus einer wissenschaftlichen Perspektive interessant, sondern könnte auch bei zukünftigen Entscheidungen zur Zulassung von Pilzmyzel als Novel Food eine Rolle spielen. Werden die Fruchtkörper als gängige Lebensmittel in großen Mengen bereits verzehrt, könnte eine ähnliche Zusammensetzung des zulassungspflichtigen Myzels als Argument für eine Zulassung genutzt werden. In diesem Bereich ist weitere Forschung notwendig. Auf die Zulassung von Pilzmyzel für den menschlichen Verzehr wird unter 4.10 näher eingegangen.

Bei dem Vergleich von Fruchtkörpern und Myzel von *Hypsizygus marmoreus* wurden höhere Kohlenhydrat-, Asche- und Ballaststoffgehalte für die Fruchtkörper bestimmt, dafür hingegen höhere Protein- und Fettgehalte im Myzel (Lee et al. 2009b). Im Vergleich der Zusammensetzung von Fruchtkörpern und Myzel von *Pleurotus ostreatus* waren die Gehalte an Stickstoff, Protein, Glykogen, RNA, Asche, Fettsäuren und die Zellwandzusammensetzung ähnlich. Das Myzel enthielt mehr gesättigte Fettsäuren und höhere Anteile an Cystein, Phenylalanin und Leucin, während die Fruchtkörper höhere Gehalte an Valin und Isoleucin aufwiesen (Hadar & Cohen-Arazi 1986). Berger et al. fassten die Erkenntnisse zu Unterschieden von Fruchtkörpern und Myzel zusammen und kamen zu dem Schluss, dass sich die Zusammensetzung aufgrund der Substrate, des Entwicklungsstadiums und ökologischen Wechselwirkungen auch unabhängig von der Kultivierungsform unterscheiden (Berger et al. 2022). Es bleibt zu beobachten, inwieweit sich Studien zur Ähnlichkeit von Fruchtkörpern und Myzel auf die Zulassung von myzelbasierten Produkten auswirken.

4.5.4 Chitinbestimmung

Chitin gehört zu den unlöslichen Ballaststoffen und kommt in Krebsen, Insekten und Pilzen vor. Dabei spielt Chitin in Pilzen vor allem in deren Zellwand eine strukturgebende Rolle (Lenardon et al. 2010). Zusätzlich ist bekannt, dass Chitin antimikrobielle Eigenschaften aufweist und wichtig für die Vermittlung der Immunreaktion auf Pilze und Insekten in Pflanzen ist (Wu et al. 2005). Die Bestimmung des Chitingehalts ist zum einen von Bedeutung, um das Pilzmyzel chemisch zu analysieren, zum anderen könnte der Chitingehalt zur Ermittlung des Pilzanteils genutzt werden (Gay 1991). Der Chitingehalt wurde nach saurem oder basischem Aufschluss photometrisch bestimmt. Bei dem Vergleich verschiedener Methoden war die

Wiederfindung nach basischem Aufschluss deutlich geringer und schwankte stärker ($83,6 \pm 26,4\%$). Insgesamt wurde der Chitingehalt nach basischem Aufschluss trotz Einberechnung der Wiederfindung für das Fermentat deutlich niedriger bestimmt. Geringere Gehalte nach basischem Aufschluss wurden bereits in der Literatur beschrieben (Ride & Drysdale 1972; Plassard et al. 1982). Als Grund wird aufgeführt, dass bei basischer Hydrolyse der Abbau zu Glucosamin-Resten möglicherweise unvollständig abläuft (Plassard et al. 1982). Ein zusätzlicher Nachteil der Methode ist die höhere benötigte Probenmenge im Vergleich zur Methode nach Vetter und Siller. Die Färbereaktion verläuft nach Vetter und Siller und nach Ride und Drysdale über die Reaktion mit MBTH. Als alternative Färbereaktion wurde die Methode nach Nilsson und Bjurman unter Verwendung des Ehrlich-Reagenz nach saurer Hydrolyse getestet. Die Wiederfindungen waren ähnlich zur Wiederfindung der Methode nach Vetter und Siller (Vetter und Siller: $102,3 \pm 14,5\%$; Nilsson und Bjurman: $102,2 \pm 12,6\%$). Aufgrund der ähnlichen Wiederfindung aber dem deutlich aufwendigeren Verfahren wurde die Methode nach Nilsson und Bjurman nicht weiterverfolgt. Durch den Schritt der Evaporation der Flüssigkeit am Rotationsverdampfer ist diese Methode nicht für hohe Probendurchsätze geeignet. Chitin ist aus β -(1,4)-glycosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Monomeren aufgebaut, weshalb der Chitingehalt zum Gesamtstickstoffgehalt der Fermentate beiträgt. Daher wurde eine Methode getestet, bei welcher der Stickstoffgehalt des Rückstands nach alkalischem Aufschluss und Filtration bestimmt wurde. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass sich die Aminosäuren nach Hydrolyse im abgetrennten Überstand befinden. Diese Methode ist angelehnt an eine Methode zur Chitinbestimmung in Insekten (Gerhardt 2023). Der bestimmte Chitingehalt für KT FVE betrug $3,8 \pm 0,3$ g/100 g TM und lag somit unter dem bestimmten Gehalt nach Vetter und Siller ($5,1 \pm 0,7$ g/100 g TM). Positiv ist der geringere Blindwert des Substrats zu bewerten ($0,7 \pm 0,2$ g/100 g TM; Vetter und Siller: $1,2 \pm 0,2$ g/100 g TM). Diese Methode stellt eine vielversprechende Option dar, um den Chitingehalt zu bestimmen und könnte für diese Zecke validiert werden. Jedoch eignet sie sich nicht zur Bestimmung des Chitingehalts mit dem Ziel der Pilzgehaltbestimmung in Screening- oder Optimierungsversuchen. Der benötigte Probeneinsatz beträgt 1 g getrocknete Probe, was bei vielen Fermentationen im 100 mL Ansatz der gesamten Biotrockenmassenausbeute entspricht.

Wird angenommen, dass sich der Stickstoffgehalt hauptsächlich aus dem Stickstoff der Aminosäuren und dem Stickstoff des Chitins zusammensetzt, könnte der Gehalt auch über die Differenz des gesamten Stickstoffgehalts und dem Stickstoff der Aminosäuren (bestimmt durch Aminosäureanalyse) abschätzen lassen. Im Falle des Fermentats betrug diese Differenz $0,55$ g/100 g TM und war somit höher als der bestimmte Stickstoffgehalt des Rückstands nach basischem Aufschluss ($0,19 \pm 0,02$ g/100 g TM). Der in Chitin enthaltene Stickstoff betrug für die Methode nach Vetter und Siller auf $0,35 \pm 0,05$ g/100 g TM und nach Ride und Drysdale auf $0,12 \pm 0,02$ g/100 g TM. Eine Überbestimmung des Chitingehalts kann nicht

ausgeschlossen werden, jedoch liegt der bestimmte Stickstoffgehalt aus Chitin mit allen Methoden unter der Differenz des gesamten Stickstoffgehalts und des Stickstoffgehalts aus proteinogenen Aminosäuren und somit im Bereich des Möglichen. Auf die Verwendung des Chitingehalts zur Bestimmung des Pilzanteils wird unter 4.6 näher eingegangen.

4.5.5 Glykoalkaloide

4.5.5.1 Validierung der Methode

Es wurde eine Methode zur Bestimmung von α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin für geringe Probeneinwaagen (ca. 0,14 g) und geringen Arbeitsaufwand validiert (Abschnitt 3.7.1). Der Arbeitsbereich wurde auf 0,250 – 0,833 $\mu\text{g/mL}$ für α -Solanin und α -Chaconin und auf 0,017-0,083 $\mu\text{g/mL}$ für Solanidin festgelegt. Es wurde eine NWG von $0,057 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$ für α -Solanin, $0,067 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$ für α -Chaconin und $0,004 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$ für Solanidin ermittelt. Ähnliche lineare Bereiche und NWG für α -Solanin und α -Chaconin sowie im Verhältnis dazu niedrigere Bereiche für Solanidin wurden ebenfalls von Nielsen et al. bestimmt (Nielsen et al. 2020). Mittels Anpassungstest nach Mandel konnte der lineare Zusammenhang in dem gewählten Bereich zwischen Peakflächen und Analytkonzentration nachgewiesen werden. Die Korrelationskoeffizienten lagen im Bereich von 0,995-0,999 und waren somit vergleichbar zu beschriebenen Methoden (Tabelle 52). Der maximale Varianzkoeffizient der Methodenpräzision wurde für Solanidin mit 6,4% bestimmt. Die Literaturwerte lagen mit bis zu 15,4% Abweichung deutlich über der erreichten Präzision. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden in der Literatur geringer bestimmt und auch die Kalibrierreihen starteten bei niedrigeren Gehalten. Da als Maximalkonzentration für den linearen Bereich 2 $\mu\text{g/mL}$ ermittelt wurden (Jensen et al. 2008), könnte überprüft werden, ob der gewählte Arbeitsbereich durch höhere Standardkonzentrationen erweitert werden kann.

Tabelle 52: Methoden zur Bestimmung von α -Solanin und α -Chaconin 1: Distl et al. 2009; 2: Jensen et al. 2008; 3: Nielson et al. 2020; 4: Nie & Guo 2017; 5: Hossain et al. 2015; n.a.: nicht angegeben.

	Messung	Linearer Bereich [$\mu\text{g/mL}$]	R ²	Methoden- präzision [%]	NWG [$\mu\text{g/mL}$]	BG [$\mu\text{g/mL}$]
1	LC-MS	0,01-1	0,995-0,994	5,3-15,4	0,003-0,005	n.a.
2	LC-ESI- TOF-MS	0,01-2	0,998-0,999	1,8-10,3	0,002-0,005	n.a.
3	LC- ESI/MS	0,03-3	0,994-0,997	n.a.	0,012	0,01-0,03
3	UHPLC- MS/MS	0,002-0,4	0,999	1,9-9,0	0,003	0,01
4	UHPLC- MS/MS	0,02-0,1	0,980-0,995	4,9-8,6	n.a.	0,001-0,002

Neben den Validierungsparametern wurde die Stabilität von bei 4 °C gelagerten Proben überprüft (Abbildung 40). Die Lagerung, Lichteinstrahlung oder die Schädigung von Gewebe kann den Glykoalkaloidgehalt in Kartoffeln beeinflussen (Love et al. 1994; Dale et al. 1993; Fitzpatrick et al. 1978). Nach ihrer Bildung weisen Glykoalkaloide jedoch eine hohe Stabilität auf und sind beispielsweise sehr hitzebeständig (Bushway & Ponnampalam 1981). Da die Proben in der Dunkelheit und bei einer niedrigen Temperatur gelagert wurden, wurden äußere Einflüsse minimiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die extrahierten Proben und Standards im Kühlschrank stabil waren. Die Glykoalkaloidgehalte einer bei 4 °C im Kühlschrank gelagerten Probe waren nach sechs Wochen nicht signifikant verringert (Abbildung 40). Zusätzlich wurde über die Zeit kein Abbau der Standards beobachtet.

4.5.5.2 Glykoalkaloidgehalte der Substrate und Fermentate

Der Glykoalkaloidgehalt von Kartoffeln hängt neben Lagerbedingungen und Lichtexposition (Love et al. 1994; Dale et al. 1993) stark von der Kartoffelsorte ab. Die Summe aus α -Solanin und α -Chaconin von acht verschiedenen Sorten schwankte im Bereich von 40-883 mg/kg bezogen auf die Trockenmasse der gesamten Kartoffel (Friedman et al. 2003). Interessant ist, dass sich dabei das Verhältnis von α -Solanin zu α -Chaconin zwischen den Sorten, aber auch im Vergleich von Kartoffelmark zu Kartoffelschale unterschied. Bei vielen Sorten war der Anteil von α -Chaconin im Vergleich zu α -Solanin in der Schale höher als im Mark (Friedman et al. 2003). Die Glykoalkaloidgehalte von Kartoffelpülpe und Kartoffeltrester lagen in Bezug auf α -Solanin mit $234 \pm 11 \mu\text{g/g}$ (KP) und $236 \pm 6 \mu\text{g/g}$ nah beieinander. Der Gehalt an α -Chaconin war in der Pülpe höher als im Trester (KP: $297 \pm 7 \mu\text{g/g}$; KT: $199 \pm 7 \mu\text{g/g}$). Dies könnte, neben den natürlichen Schwankungen bei Verwendung unterschiedlicher Kartoffeln, auch mit einem höheren Anteil an Kartoffelschale in der Kartoffelpülpe zusammenhängen, da die Kartoffeln zur Herstellung des Kartoffeltresters zuvor geschält wurden. Auffällig ist zusätzlich der deutlich höhere Solanidingehalt der Kartoffelpülpe im Vergleich zum Kartoffeltrester (KP: $195 \pm 25 \mu\text{g/g}$; KT: $25 \pm 1 \mu\text{g/g}$). Grenzwerte für den Glykoalkaloidgehalt beziehen sich aufgrund der höheren Toxizität nur auf die Summe von α -Solanin und α -Chaconin. Der Richtwert des BfRs für Speisekartoffeln liegt bei 100 mg/kg Frischgewicht (BfR 2018). Dies entspricht bei einem Wassergehalt von ca. 78% (Steinhaus et al. 2023) $455 \mu\text{g/g}$ in der Trockenmasse. Damit lag der Glykoalkaloidgehalt des Kartoffeltresters ($434 \pm 6 \mu\text{g/g}$) noch innerhalb des empfohlenen Bereichs und der der Kartoffelpülpe mit $537 \pm 6 \mu\text{g/g}$ über dem Richtwert. Insgesamt passen die ermittelten Glykoalkaloidgehalte sehr gut zu den Werten, die in der Literatur beschrieben werden.

Bei der KP Medienkontrolle war die Verteilung von α -Solanin und α -Chaconin in Rückstand und Überstand sehr ausgeglichen (Abbildung 41). Im Gegensatz dazu waren die Gehalte im

Überstand der KT Medienkontrolle ca. doppelt so hoch wie im Rückstand. Dieser Unterschied könnte unter anderem mit der Verteilung der Biotrockenmassen in Rückstand und Überstand zusammenhängen. Der lösliche Anteil der Kartoffelpülpe lag bei 47% und der des Kartoffeltresters bei ca. 66%. Die Summe des Gehalts an α -Chaconin und Solanidin aus Rückstand und Überstand der KT Medienkontrolle passte sehr gut zur Substratkontrolle. Für α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin der KP Medienkontrolle wurden geringere Werte als für die der Substratkontrolle bestimmt. Als mögliche Begründung sind Ernteverluste sowie eine gewisse Ungenauigkeit bei Bestimmung des Restfeuchtegehalts und der Biotrockenmassen zu nennen. Dies zeigt die Wichtigkeit der Mitführung einer Medienkontrolle, da so die Gehalte der Fermentate besser beurteilt werden können.

Da das Ziel besteht, die Fermentate der Kartoffelnebenströme zu verzehren, sollte der Glykoalkaloidgehalt zwingend überprüft werden. Zusätzlich ist auch aus wissenschaftlicher Sicht interessant zu untersuchen, ob eine Fermentation den Glykoalkaloidgehalt beeinflusst. Für verschiedene Mikroorganismen konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, α -Solanin und α -Chaconin zu Solanidin abzubauen (Oda et al. 2002b; Weltring et al. 1997; Hennessy et al. 2018; Jensen et al. 2009). Der Abbau ist dabei abhängig von den Mikroorganismen und wurde nicht für alle untersuchten Stämme beobachtet (Hennessy et al. 2018). Die Analysen bezogen sich insgesamt hauptsächlich auf Pathogene der Kartoffelpflanze sowie Mikroorganismen, die aus dem Umfeld der Pflanzen isoliert wurden. *F. velutipes* ist aufgrund eines abweichenden Lebensraums nicht an die Präsenz von Glykoalkaloiden angepasst. Nach Fermentation von Kartoffelpülpe wurden im Vergleich zur Substrat- und Medienkontrolle dennoch geringere Gehalte für die Summe aus Rückstand und Überstand bestimmt (Abbildung 43). Dabei war eine deutliche Abnahme von Tag 3 zu Tag 5 zu beobachten und eine maximale Abnahme von α -Solanin um ca. 47% (T9) und von α -Chaconin um ca. 54% (T9). Bei Fermentation von Kartoffeltrester betrug die Abnahme in der Summe aus Rückstand und Überstand für α -Solanin ca. 55% (T5) und für α -Chaconin ca. 32% (T5) (Abbildung 45). Der Solanidingehalt war bei KT FVE im Überstand so gering, dass er bereits ab Tag 3 nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 42). Die Abnahme des Gesamtgehalts an Glykoalkaloiden nach Fermentation kann zwar insgesamt als positiv bewertet werden, jedoch ist in diesem Fall der Gehalt im Rückstand nach Fermentation ausschlaggebend für eine Bewertung hinsichtlich des Verzehrs. Bei Betrachtung der Verteilung in Rückstand und Überstand zeigte sich, dass sich die Abnahme der Glykoalkaloide vor allem auf den Überstand bezog. Der Gehalt des KP FVE Rückstands lag dennoch ab Tag 5 etwas unter dem Gehalt der Medienkontrolle (Abbildung 42). Ein anderes Bild zeigte sich bei Fermentation von Kartoffeltrester. Hier stieg der Gehalt an α -Solanin und α -Chaconin in den Rückständen im Vergleich zur Medienkontrolle deutlich an (Abbildung 44). Nur der Gehalt an Solanidin sank insgesamt und konnte im Überstand nicht mehr bestimmt werden. Der Abbau

des Kohlenhydratanteils führt zur Detoxifizierung, was vor allem mit der geringeren Interaktion von Solanidin mit Zellmembranen und damit einer geringeren Zellyse begründet wird (Rayburn et al. 1994; Keukens et al. 1995). Jedoch wurde für *Phytophthora infestans* gezeigt, dass die Toxizität von α -Solanin und α -Chaconin zunächst durch die schrittweise Abspaltung der Zucker sinkt, jedoch für Solanidin höher ist (Dahlin et al. 2017). Wie bei der Kultivierung von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester wurde in dieser Studie die Integration von Glykoalkaloiden in das pilzliche Myzel beobachtet. Es könnte daher untersucht werden, wie sich α -Solanin, α -Chaconin und Solanidin in ihrer Toxizität gegenüber *F. velutipes* unterscheiden. Eine höhere Toxizität von Solanidin oder eine grundsätzlich hohe Toleranz gegen Glykoalkaloide könnte ebenfalls einen fehlenden Abbau zu Solanidin im Pellet erklären.

Für die Resistenz verschiedener Pilze gegenüber α -Chaconin wurde bereits gezeigt, dass diese speziesabhängig ist und mit der Sterolmenge und -zusammensetzung korreliert (Sánchez-Maldonado et al. 2016). Durch statistische Auswertungen wurde ein Zusammenhang von Resistenz und dem Ergosterolgehalt vorgeschlagen (Sánchez-Maldonado et al. 2016). Die Ergosterolgehalte von ME FVE lagen mit durchschnittlich $590,5 \pm 20,3$ mg/100 g TM (T7-12, Abbildung 12) deutlich über dem Gehalt von $332,79 \pm 12,46$ mg/100 g TM für ME PSP (T2-12, Abbildung 11). Interessant wäre somit zusätzlich ein Vergleich der Toxizität der Glykoalkaloide gegenüber *P. pulmonarius* und *F. velutipes*.

Die Glykoalkaloidgehalte der Überstände waren bei der Fermentation beider Substrate mit *P. pulmonarius* so gering, dass sie unter der Nachweisgrenze lagen. Für KP PSP kam es insgesamt zu einer maximalen Abnahme von 77% für α -Solanin (T7) und von 83% (T9) für α -Chaconin. Für KT PSP konnte der Gehalt an α -Solanin und α -Chaconin ab Tag 7 auf Grund von zu geringen Werten nicht mehr bestimmt werden. Die Zwischenprodukte bei dem Abbau von α -Solanin und α -Chaconin zu Solanidin können sich je nach Mikroorganismus unterscheiden (Weltring et al. 1997). Für drei filamentöse Pilze wurde nachgewiesen, dass diese nur α -Chaconin und nicht α -Solanin abbauen können (Oda et al. 2002b). Für Bakterien, die aus der Erde nahe grüner Kartoffeln isoliert wurden, konnte der Abbau von α -Solanin und α -Chaconin ebenfalls gezeigt werden. Dieser unterschied sich je nach Isolat und war für Bakterien der Gattung *Arthrobacter* am effektivsten (Hennessy et al. 2018). Das Gencluster, welches in *Arthrobacter* für eine α -Rhamnosidase (RhaA), eine β -Glucosidase (GluA), and eine β -Galactosidase (GalA) zum Abbau von α -Solanin und α -Chaconin zu Solanidin kodiert, ist identifiziert worden (Hennessy et al. 2020). Ein weiteres Gencluster, kodierend für RhaA, GluA, und GalA wurde in *Glutamicibacter halophytocola*, einem Darmbakterium des Kartoffelkäfers, entdeckt (Wang et al. 2022a). Diese Enzyme zeigten multifunktionale Aktivitäten, wobei RhaA und GluA α -Rhamnose, β -Glucose und β -Galactose hydrolysieren

konnten und GalA β -Glucose sowie β -Galactose. RhaA- oder GluA-Zugabe reichte aus, um α -Solanin und α -Chaconin zu Solanidin abzubauen (Wang et al. 2022b). β -Glucosidase-Aktivität konnte für *P. pulmonarius* nach Festphasenkultivierung (Ekundayo et al. 2017; Yunan et al. 2021) sowie nach Submerskultivierung (Inácio et al. 2015) nachgewiesen werden. Aufgrund der Genomanalyse von *F. velutipes* wurden sechs putative β -Glucosidasen vorgeschlagen (Park et al. 2014). Zusätzlich wurde β -Glucosidase-Aktivität vor und nach der Fruktifizierung von *F. velutipes* nachgewiesen (Xie et al. 2017). Zum Abbau von Glykoalkaloiden durch diese Pilze oder die Rolle dieser Enzyme ist bisher nichts bekannt.

Die BPCs der Fermentate wurden mit denen der Medienkontrolle sowie nach Kultur auf Malzextrakt verglichen (3.7.5). Durch Zuckerabspaltung verringert sich die Polarität der Glykoalkaloide, weshalb sich diese Abbauprodukte auf einer Umkehrphase zwischen α -Solanin bzw. α -Chaconin und Solanidin eluieren sollten. Peak 1 bei KT FVE Ü ist von Interesse, da er auch bei KT PSP P deutlich hervortritt, nahe der Glykoalkaloide eluiert und nicht in den Malzextrakt-Kulturen vorkommt. Peak 5 bei KT FVE R T3 und Peak 21 aus KT PSP Ü eluieren ebenfalls in diesem Bereich. Die m/z-Verhältnisse dieser Peaks lagen jedoch mit 329,2 (1), 273,1 (5) und 251,2 (21) unter dem von Solanidin und lassen keine Vermutungen über zugehörige Substanzen zu. Es wurde nach den m/z-Verhältnissen der β - und γ -Formen der Glykoalkaloide gesucht und es konnten keine Peaks mit passenden m/z-Verhältnissen gefunden werden. Im BPC des Überstands von KT PSP sind deutlich die zusätzlichen Peaks 12-16 zu erkennen. Die m/z-Verhältnisse lagen im Bereich zwischen 137,1-267,2 und es lässt sich kein Rückschluss auf zugehörige Substanzen ziehen. Interessant sind jedoch die Peaks 17,18 und 20. Alle m/z-Verhältnisse im Massenspektrum von Peak 17 waren im Vergleich zu α -Solanin um +14 erhöht. Dabei sind auch die m/z-Verhältnisse der β_1 - und γ -Form von Solanin sowie von Solanidin+14 zu finden. Bei Peak 18 kommt anstatt des m/z-Verhältnisses von α -Solanin+14 das m/z-Verhältnis von α -Chaconin+14 vor. Auffällig ist hier, dass wie bei den Substanzen α -Solanin und α -Chaconin, α -Solanin+14 vor α -Chaconin+14 eluiert. Das Massenspektrum zu Peak 20 weist die m/z-Verhältnisse von Solanidin+16 sowie der α -, β - und γ -Form von Chaconin+16 auf. In Tabelle 53 sind die erwarteten m/z-Verhältnisse der Analyten sowie nach Addition von 14 und 16 aufgeführt. Diese Übereinstimmungen deuten stark darauf hin, dass es sich um Metabolite der Glykoalkaloide handelt. Da die Zunahme im m/z-Verhältnis bereits bei Solanidin vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer Veränderung am Aglykon kam. Eine Zunahme des m/z-Verhältnisses von +14 könnte grundsätzlich auf eine Methylierung hindeuten. Die frühere Elution der Substanzen mit der m/z-Zunahme von +14 widerspricht dieser Option. Denkbar wäre zunächst eine Hydroxylierung (+16) mit anschließender Oxidation zu einer Carbonylgruppe (-2H, d.h. +14).

Tabelle 53: m/z-Verhältnisse der Massenspektren der verschiedenen Glykoalkaloide, sowie nach Addition von 14 oder 16. Glu: Glucose, Gal: Galactose, Rham: Rhamnose.

Substanz		m/z-Verhältnis		
			+14	+16
Solanidin		398,3	412,3	414,3
Solanidin+Glu/Gal	γ -Solanin/ γ -Chaconin	560,4	574,4	576,4
Solanidin+Glu/Gal+Rham	β_1 -Solanin/ β_1 -, β_2 -Chaconin	706,5	720,5	722,5
Solanidin+Glu+Gal	β_2 -Solanin	722,5	736,5	738,5
Solanidin+Glu+Rham+Rham	α -Chaconin	852,5	866,5	868,5
Solanidin+Glu+Gal+Rham	α -Solanin	868,5	882,5	884,5

Neben geringeren Gehalten an α -Solanin und α -Chaconin nach Fermentation wurde für *F. velutipes* und *P. pulmonarius* eine Verringerung des Solanidingehalts beobachtet. Bei Untersuchung der Mikroorganismen aus Grundwasser unterhalb eines Kartoffelfelds wurde neben der schrittweisen Entfernung der Kohlenhydrateinheiten von α -Solanin und α -Chaconin zu Solanidin ebenfalls ein Abbau von Solanidin beobachtet, jedoch konnten keine Abbauprodukte identifiziert werden (Jensen et al. 2009). Auch für das Kartoffelpathogen *Gibberella pulicaris* wurde gezeigt, dass dieses Solanidin metabolisieren kann, wobei der weitere Abbau nicht weiter aufgeklärt werden konnte (Weltring et al. 1997). Bei Zugabe von Solanidin zum Mikrobiom isoliert aus einem Schweineblinddarm wurde eine teilweise Metabolisierung von Solanidin über den Versuchszeitraum beobachtet, jedoch wurden auch hier Abbauprodukte nicht weiter identifiziert (Kasimir et al. 2023). Der Abbau von α -Solanin und α -Chaconin zu Solanidin wurde bereits in vielen Studien untersucht und involvierte Gencluster und Enzyme konnten identifiziert werden. Jedoch zeigt sich, dass zwar teilweise ebenfalls ein Abbau von Solanidin beobachtet wurde (Jensen et al. 2009; Weltring et al. 1997; Kasimir et al. 2023), jedoch unzureichende Angaben zu involvierten Abbauprozessen vorhanden sind.

Da der Solanidin-Gehalt in KP deutlich über dem Solanidin-Gehalt von KT lag, wurden die BPC der Fermentate von KP und KT miteinander verglichen. Peak 2 und 3 traten bei KT FVE P zusätzlich auf und zeigten beide das m/z-Verhältnis 412,3. Beide Peaks sind auch bei KP FVE sowie bei KP PSP deutlich zu erkennen, wobei Peak 2 bei KP PSP als höchster Peak in diesem Bereich hervorsticht. Bei KP PSP tritt zusätzlich Peak 31 mit ebenfalls einem m/z-Verhältnis von 412,3 auf. Dieses Massenspektrum passt zum m/z-Verhältnis von Solanidin+14 (Tabelle 53).

Peak 7 (414,3) und Peak 11 (396,3) kommen auch in den BPCs zu KP FVE und KP PSP vor, sowie Peak 8 (410,3), Peak 9 (394,3) und Peak 10 (246,2) bei KP PSP. Es ist auffällig, dass die m/z-Verhältnisse von Peak 9 und Peak 11 nahe Solanidin (398,3) lagen, wobei die

Substanzen mit geringerem m/z-Verhältnis früher eluieren. Dies spricht jedoch gegen eine Dehydrierung, welche die Differenz von -2 oder -4 erklären könnte, da dies zu einer späteren Elution führen sollte. Mehrere Peaks (2, 3, 31) mit einem m/z-Verhältnis von 412,3 sowie Peak 7 und Peak 8 mit ähnlichen m/z-Verhältnissen (410,3 und 414,3) traten auf. Die Differenz der m/z-Verhältnisse von Peak 8 (410,3) und Peak 9 (394,3), der Peaks mit einem m/z-Verhältnis von 412,3 und Peak 11 (396,3) sowie Peak 7 (414,3) und Solanidin (398,3) entsprechen jeweils +16. Dies würde könnte auf eine Reduktion der Masse und anschließend eine Oxidation hindeuten. Die genauen Prozesse bleiben jedoch unklar.

Die Peaks mit einem m/z-Verhältnissen von 412,3 sowie Peak 7 mit 414,3 passen zum m/z-Verhältnis von Solanidin+14 bzw. +16 (Tabelle 53). Es könnte sich hierbei um die Aglykone der Glykoalkaloide+14 oder +16 handeln. Das verstärkte Vorkommen dieser Substanzen bei Fermentaten von KP unterstreicht auf Grund des höheren Solanidin-Gehalts diese These. Die nähere Untersuchung des Abbaus der Glykoalkaloide durch Fermentation mit *F. velutipes* oder *P. pulmonarius*, die Identifizierung der Metaboliten und der beteiligten Enzyme stellt ein sehr interessantes Themengebiet dar, welches weiterführend untersucht werden sollte.

Für die Beurteilung des Verzehrs der Fermentate spielt jedoch vor allem der Glykoalkaloidgehalt in den Rückständen eine Rolle. Für die Summe aus α -Solanin und α -Chaconin wird ein LOAEL von 1 mg/kg KG, ein NOAEL von 0,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag sowie ein maximaler Gehalt von 100 mg/kg Frischgewicht Kartoffel (ca. 455 μ g/g TM) empfohlen (BfR 2018). Die Summe aus α -Solanin und α -Chaconin sowie die daraus errechneten Verzehrsmengen für trockenes und feuchtes Fermentat sind in Tabelle 54 dargestellt. Berechnet wurden die Verzehrsmengen pro Tag anhand des NOAEL für eine 60 kg schwere Person. Es wurden die Daten des Fermentationstags 7 für KP FVE, KT FVE und KP PSP genutzt. Da die Gehalte von KT PSP an diesem Kulturtag unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurde hier Kulturtag 5 verwendet.

Tabelle 54: Summe aus α -Solanin und α -Chaconin [mg/g TM] sowie die Verzehrsmengen für feuchtes und getrocknetes Fermentat. Berechnet mittels NOAEL von 0,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag für eine Person mit 60 kg Körpergewicht. Fermentate des Kulturtags 7 sowie des Kulturtags 5 für KT PSP; NG: Nachweisgrenze.

	Summe aus α -Solanin und α -Chaconin [μ g/g TM]	Verzehrmenge trocken	Verzehrmenge feucht
KP FVE	270 \pm 15	ca. 111 g	ca. 2,22 kg
KT FVE	631 \pm 70	ca. 48 g	ca. 0,96 kg
KP PSP	123 \pm 9	ca. 244 g	ca. 4,88 kg
KT PSP	T7: <NG T5: 83 \pm 11	T5: ca. 366 g	T5: ca. 7,32 kg

Die Summe aus α -Solanin und α -Chaconin lag für KP FVE, KP PSP und KT PSP unter der Vorgabe für Kartoffeln von 100 mg/kg Frischgewicht bzw. 455 μ g/g TM (BfR 2018). Für KT FVE wurde ein deutlich höherer Wert quantifiziert. Für die Anwendung in Lebensmitteln wird, aufgrund eines hohen benötigten Energieeintrags für eine Trocknung und der damit verbundenen Kosten, die Verwendung der feuchten Biomasse angestrebt. Daher könnten von einer 60 kg schweren Person 960 g des feuchten Myzels von KT FVE pro Tag verzehrt werden. Dies liegt über einem zu erwartenden Konsum, weshalb der Einsatz der Fermentate für Lebensmittel durch die enthaltenen Glykoalkaloide nicht eingeschränkt sein sollte. Dennoch sollte der Glykoalkaloidgehalt bei der Entwicklung neuer Produkte aus Fermentaten von Kartoffelnebenströmen weiterhin beachtet werden, da Substrate mit höheren Glykoalkaloidgehalten auch zu höheren Gehalten in den Fermentaten führen könnten.

4.6 Methoden zur Bestimmung von pilzlichem Wachstum

Aufgrund des Anteils an nicht löslichen Medienbestandteilen müssen Alternativen zur Biotrockenmassebestimmung für den Nachweis und die Quantifizierung von pilzlichem Wachstum herangezogen werden.

Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen waren die filamentösen Strukturen der Pilze auf Malzextraktgut zu erkennen (Abbildung 24). Die Pilzstrukturen waren jedoch schlecht von den Fasern des Kartoffeltresters zu unterscheiden. Kartoffelschale wies im Unterschied zu Kartoffeltrester dunkle Zellstrukturen auf und durch Fermentation nahm der Anteil der fadenförmigen Strukturen deutlich zu. Bei ESEM-Aufnahmen waren für die Kontrollen runde Strukturen erkennbar (Abbildung 25). Sie ähnelten in Form und Größe sehr den SEM (*scanning electron microscopy*)-Aufnahmen von Kartoffelstärke (Ollett et al. 1993), weshalb es sich dabei wahrscheinlich um Stärke-Granula handelte. Die ESEM-Aufnahmen von *F. velutipes* und *P. pulmonarius* auf Malzextrakt zeigten feine Strukturen, die vergleichbar mit Aufnahmen von *Pleurotus salmoneo-stramineus* waren (Bickel Haase et al. 2024). Nach Fermentation der Kartoffelnebenströme waren keine Stärke-Granula erkennbar und es zeigten sich teils größere Strukturen sowie Strukturen, die den Myzelaufnahmen ähnelten. Es konnte somit ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden, wodurch zwar Wachstum gezeigt wurde, jedoch keine quantitativen Aussagen getroffen werden konnten.

Als Hauptmethode zur Quantifizierung von Pilzmyzel wurde in dieser Arbeit die Bestimmung von Ergosterol genutzt, jedoch wurde auch die Verwendung des Biomarkers Chitin überprüft. Von den getesteten Methoden zur Chitinbestimmung eignete sich die Methode nach Vetter und Siller (2.8.16.1) aufgrund des geringsten Probeneinsatzes, einer im Verhältnis guten Wiederfindung und dem vergleichsweise geringen methodischen Aufwand am besten zur Chitinbestimmung in Fermentaten mit geringer Biomasseausbeute. Die Problematik der

Methode stellt der hohe Blindwert des Substrats dar ($1,2 \pm 0,2$ g/100 g TM). Als Begründung wird die Mitbestimmung von anderen Zellwandpolysacchariden angenommen (Plassard et al. 1982). Da das Substrat und damit auch die potentiell mitbestimmten Substanzen während der Fermentation abgebaut werden, ist die Sinnhaftigkeit des Abzugs des Substratblindwerts kritisch zu hinterfragen. Dies macht die genaue Bestimmung des Pilzanteils schwierig. Bei Betrachtung der Chitingehalte der Kultur auf Malzextrakt zeigte sich die gleiche Tendenz wie bei der Bestimmung des Ergosterolgehalts. Trotz 100% Pilzanteil in den Malzextraktkulturen stieg der Chitingehalt mit steigender Kultivierungsdauer bis Tag 9 an (Abbildung 28) und damit länger als der Ergosterolgehalt (Anstieg bis Tag 7; Abbildung 19). Der beobachtete Anstieg des Ergosterolgehalts über die Kultivierungszeit war speziesabhängig und konnte für die Kultur von *P. pulmonarius* auf Malzextrakt nicht beobachtet werden. Ergosterol ist Teil der pilzlichen Membran (Watkinson et al. 2015) und Chitin der Zellwand (Lenardon et al. 2010). Beide Parameter könnten somit mit dem Oberflächen/Volumen-Verhältnis der Myzel-Pellets zusammenhängen. Bei kleineren Zellen sollte die Oberfläche und damit der Anteil an Zellwand und Membran an der gesamten Biomasse einen größeren Anteil ausmachen. Jedoch konnte optisch kein Unterschied zwischen der Wuchsform an verschiedenen Kultivierungstagen detektiert werden. Eine Korrelation zwischen Pelletgröße und Ergosterolgehalt konnte bereits gezeigt werden, wobei sich die Ergebnisse für verschiedene Pilzspezies unterschieden (Raviraja et al. 2004). Eine weitere Hypothese könnte eine je nach Wachstumsphase unterschiedliche Membran- und Zellwandzusammensetzung sein. Für die Kultur von Ascomyceten wurde gezeigt, dass der Ergosterolgehalt abhängig von der Wachstumsphase ist (Gutarowska & Żakowska 2009; Charcosset & Chauvet 2001). Zusätzlich wurde für Submerskulturen eine Abhängigkeit des Ergosterolgehalts von Kultivierungsbedingungen gefunden (Charcosset & Chauvet 2001). Dennoch konnte die Korrelation zwischen Biotrockenmasse und Ergosterolgehalt bestätigt und eine Abschätzung des Pilzgehalts über Ergosterol bei ähnlichen Kultivierungsbedingungen weiterhin empfohlen werden (Charcosset & Chauvet 2001). Beachtet werden sollte jedoch bei allen Methoden zur Bestimmung des Pilzanteils, dass es sich hierbei um eine Abschätzung handelt.

Neben einem ähnlichen Verlauf des Ergosterol- und Chitingehalts auf Malzextrakt konnte dies auch für die Kultur auf Kartoffeltrester beobachtet werden (Abbildung 73). Kulturtag 7 wurde aufgrund des bereits sehr hohen Pilzanteils von $83 \pm 3\%$ (bestimmt über Ergosterol) und keinem signifikanten Unterschied zum Pilzanteil an Kulturtag 9 für das finale Fermentat ausgewählt. Für diesen Kulturtag wurde über den Chitingehalt ein Pilzanteil von $73 \pm 2\%$ ermittelt. Die Abschätzung des Pilzanteils über den Chitingehalt bestätigten eine sehr gute Substratverwertung durch die Pilze. Die Pilzgehalte, welche über den Chitingehalt ermittelt wurden, lagen ab Tag 5 zwar unter den Pilzanteilen ermittelt über den Ergosterolgehalt, jedoch unterschieden sie sich teils nicht signifikant. Der ansteigende Verlauf beider Biomarker ähnelte

sich stark. Der Fermentationsverlauf über die Kultivierungszeit konnte somit über die Bestimmung von Chitin bestätigt werden.

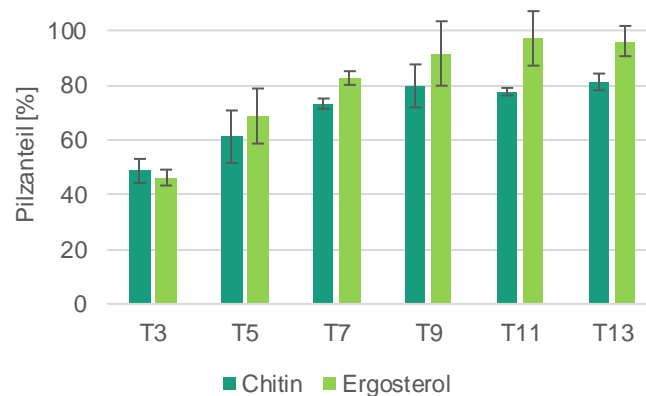


Abbildung 73: Pilzanteile bestimmt über den Chitin- oder Ergosterolgehalt bei Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester (Substratkonzentration 30 g/L) an verschiedenen Kulturtagen, ($n=3$).

Als alternative Methode könnte der Pilzanteil über die Quantifizierung von DNA mittels *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) erfolgen (Landeweert et al. 2003). Der Vorteil dieser Methode besteht vor allem bei der Analyse von mit mehreren Pilzspezies bewachsenem Material. Bei Verwendung von spezifischen Genen zum qualitativen und quantitativen Nachweis kann im Gegensatz zur Verwendung von Chitin oder Ergosterol als Biomarker eine differenzierte Bestimmung erfolgen. Der amplifizierte Genbereich muss hierbei jedoch spezifisch auf den Zielorganismus angepasst werden. Durch die Verwendung von *internal transcribed spacer* (ITS)-Primern kann die Methode an viele Pilzarten angepasst werden, jedoch machen individuelle genetische Variabilitäten eine quantitative Artenbestimmung nach Sequenzierung schwierig (Manter & Vivanco 2007). Zusätzlich können sich die Kopien der ITS-Region selbst zwischen Pilzstämmen stark unterscheiden (Herrera et al. 2009). Bei dem Vergleich der Quantifizierung von Ergosterol und ribosomaler Desoxyribonukleinsäure (rDNA) wurden geringere Pilzanteile mittels qPCR bestimmt (Song et al. 2014; Baldrian et al. 2013). Zusätzlich waren die Schwankungen bei der Verwendung von Ergosterol als Biomarker deutlich geringer (Baldrian et al. 2013).

Mittels der Bestimmung von Chitin und Ergosterol als Biomarker konnten in dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Wegen des deutlich höheren Probendurchsatzes mittels Ergosterolbestimmung sowie auf Basis der durchgeführten Literaturrecherche ist diese Methode weiterhin als bevorzugte Methode zur Bewertung von Screening- und Optimierungsversuchen anzusehen.

4.7 Maßstabsvergrößerung

Bei dem Übertrag von der Fermentation im Schüttelkolben in einen Fermenter müssen viele Faktoren beachtet werden. Ein kritischer Punkt ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung, welche von der Luftzufuhr und der Rührergeschwindigkeit abhängt (Fazenda et al. 2008). Die Rührergeschwindigkeit beeinflusst die Fluidodynamik, welche für die notwendige Sauerstoff-, Nährstoff- und Produktverteilung notwendig ist. Zusätzlich kann sie Auswirkungen auf die morphologischen Merkmale von Myzelien in Submerskultur und deren Enzymproduktion haben (Kelly et al. 2006; Oh et al. 2007; Ibrahim et al. 2015). Dabei kommt es bei zu hohen Drehzahlen aufgrund von Scherkräften zur Beschädigung von Zellstrukturen, wodurch das Wachstum eingeschränkt wird (Kelly et al. 2006). Während der Fermentation von KT im Fermenter wurden Rührerdrehstöße eingesetzt, um festgewachsenes Myzel vom Rand zu lösen. Im Rahmen der Optimierung wurden deren Anzahl reduziert und geringere Rührerdrehzahlen genutzt, wodurch der Pilzgehalt in Kombination mit einer automatisierten Sauerstoffzufuhr von 36% im ersten Versuch auf 89-98% gesteigert, die Substratkonzentration von 20 g/L auf 30 g/L erhöht und die Fermentationsdauer von 10 auf 6 Tage verkürzt werden konnte (Tabelle 37). Somit verlief die Maßstabsvergrößerung sehr erfolgreich und es konnten hohe Pilzgehalte bei gleicher Substratkonzentration wie im Schüttelkolben erzielt werden. Für KS PSP wurde ebenfalls ein hoher Pilzgehalt erreicht (67%). Bei KS FVE und KT PSP lagen die Pilzgehalte unter den Werten aus den Schüttelkolben (Tabelle 36). Da der Fokus auf KT FVE lag, wurden die Fermentationen der anderen Pilz-Substrat-Kombinationen nicht weiter optimiert.

Da im Fall einer weitergehenden Maßstabsvergrößerung über eine Fermenterkaskade große Vorkulturmengen bei 10%iger Inokulation benötigt würden, könnte als weitergehende Optimierung die Auswirkung einer geringeren Inokulationsmenge getestet werden. Geringere Inokulationsvolumina wurden bereits für Fermentationen mit *F. velutipes* getestet (Tabelle 50). Bei Kultur anderer filamentöser Pilze wurde gezeigt, dass die Inokulationsmenge die Morphologie und damit die Pelletbildung beeinflussen kann (Domingues et al. 2000). Welche Auswirkungen dies auf die Konsistenz des Endprodukts hat, müsste untersucht werden.

4.8 Übertragung auf eine industrielle Kartoffelpülpe

Um die Relevanz für eine industrielle Umsetzung des Projekts zu steigern, wurde der Fermentationsprozess von der Nutzung des projektintern anfallenden Kartoffeltresters auf industrielle Kartoffelpülpe übertragen. Bei der Herstellung der Medien zeigte sich, dass Medien mit Kartoffelpülpe deutlich dickflüssiger waren als mit Kartoffeltrester. Aufgrund dessen wurde die Wasserbindekapazität bestimmt, welche für Kartoffelpülpe höher als für Kartoffeltrester war (Tabelle 39; $10,47 \pm 0,22$ mL/g TM anstatt $4,29 \pm 0,08$ mL/g TM). Dies könnte auf Zellwandpolysaccharide wie Cellulose, Hemicellulose und Pektin zurückzuführen sein. Der

Pektin Gehalt der Kartoffelpülpe war deutlich höher als der Gehalt in Kartoffeltrester (Tabelle 23; $5,6 \pm 0,3$ g/100 g TM anstatt $0,6 \pm 0,2$ g/100 g TM). Da eine zu hohe Viskosität zu einer schlechteren Sauerstoffversorgung der Kultur führen kann, wurde eine Substratkonzentration von 20 g/L statt der für KT FVE optimierten 30 g/L gewählt. Die Biotrockenmassen von KP FVE lagen bei gleicher Substratkonzentration deutlich über den Biotrockenmassen von KT FVE (Abbildung 31). Grundsätzlich sind höhere Biotrockenmassen von Vorteil, da so pro Fermentationslauf mehr Material erhalten wird. Bei dem Vergleich des Pilzanteils zeigte sich, dass dieser bei Nutzung von KP anstatt von KT deutlich verringert war. Zusätzlich wurde der maximale Pilzanteil für KP FVE erst an Tag 11 (ca. 65%) statt an Tag 7 (ca. 100%) erreicht (Abbildung 32). Die geringeren Pilzgehalte auf KP lassen sich eventuell durch die höhere Viskosität des Mediums und eine damit einhergehende geringere Sauerstoffversorgung erklären. Zusätzlich ist in Kartoffelpülpe weniger Stärke vorhanden (Tabelle 23), welche möglicherweise vor komplexen Kohlenhydraten für die Verstoffwechslung bevorzugt wird. Grundsätzlich verfügt *F. velutipes* über Enzyme für den Abbau unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (Ko et al. 2005). Eine andere Begründung könnte ein höherer Glykoalkaloidgehalt in KP als in KT sein (Abbildung 41), welcher sich möglicherweise wachstumsinhibierend auswirkt. Bei Kultur von *P. pulmonarius* war der Unterschied zwischen KT PSP und KP PSP in der Biotrockenmasse und im Pilzanteil nicht so deutlich zu erkennen wie bei Kultur von *F. velutipes*. KP PSP und KP FVE wiesen ähnliche Biotrockenmassen und Pilzgehalte auf. Der Reinproteingehalt war jedoch für KP FVE höher als für KP PSP (Tabelle 38; $9,62 \pm 0,55$ g/100 g TM anstatt $8,43 \pm 0,08$ g/100 g TM) was die Auswahl von *F. velutipes* für weitere Versuche bestätigte. Die erreichten Proteingehalte für KP FVE lagen unter denen für KT FVE ($13,51 \pm 0,75$ g/100 g TM), möglicherweise bedingt durch den geringeren Pilzgehalt. Um die Fermentation von KP zu optimieren und möglicherweise den Proteingehalt zu steigern, wurde die Supplementierung mit Kartoffelfruchtwasser getestet, welches ebenfalls bei der Stärkeproduktion als Nebenstrom anfällt und die Proteinfraction beinhaltet (Grommers & van der Kogt 2009). Kartoffelfruchtwasser wird unter anderem verwendet, um die darin enthaltenen Proteine zu isolieren (Waglay et al. 2014). Die Fermentation der Kombination aus Kartoffelpülpe und Kartoffelfruchtwasser wurde bereits mit *Chaetomium cellulolyticum* getestet (Schügerl & Rosen 1997). Zusätzlich wurden verschiedene Bakterien auf der Kombination der beiden Nebenströme zur Produktion von Single-cell Protein kultiviert (Liu et al. 2013). Für erste Optimierungsversuche wurde die Substratkombination von Kartoffelpülpe variiert und Kartoffelfruchtwasser in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (Tabelle 7). Bei alleiniger Verwendung des Kartoffelfruchtwassers (K7) wurde der höchste Pilzanteil und Reinproteingehalt erreicht, jedoch war die Biotrockenmasse mit $2,8 \pm 0,1$ g/L am geringsten. Die Biotrockenmasse der KW Medienkontrolle bei 10 g/L Substratkonzentration betrug $0,7 \pm 0,1$ g/L, womit deutlich wird, dass KW hauptsächlich aus löslichen Bestandteilen besteht. Dies erklärt den hohen Pilzanteil bei Verwendung des reinen Kartoffelfruchtwassers zur

Fermentation. Der Pilzanteil wurde durch die Kombination von KP und KW im Vergleich zur alleinigen Verwendung von KP gesteigert, wobei ein maximaler Pilzanteil von $61 \pm 1\%$ für die Addition von 5 g/L KW zu 5 g/L KP (K5) bzw. $59 \pm 2\%$ bei Zugabe von 10 g/L KW zu 5 g/L KP (K6) erreicht wurden (Abbildung 36). Durch Zugabe von KW konnte zusätzlich vor allem der Reinproteingehalt deutlich gesteigert werden. Aufgrund der Ergebnisse für Biotrockenmassen, Pilzanteile und Reinproteingehalte könnte die Zugabe von 5 g/L KW zu 10 g/L KP (K3) sowie von 10 g/L KW zu 5 g/L KP (K6) weitergehend untersucht werden. Interessant wäre hier vor allem der Vergleich an verschiedenen Kultivierungstagen, da bei eingesetzter Substratkonzentration von 20 g/L KP höhere Pilzanteile durch eine Verlängerung der Kultivierung erreicht wurden (Abbildung 36). Für das Substrat Kartoffelfruchtwasser wurde die Biotrockenmasse bestimmt sowie eine Aminosäureanalyse durchgeführt (Abbildung 37). Vor allem der hohe Gehalt an Asparaginsäure/Asparagin des Kartoffelfruchtwassers ist für den Zusatz zu Fermentationen interessant, da Asparaginsäure von Pilzen zum Aufbau anderer Aminosäuren genutzt werden kann (Fraatz et al. 2014, Abschnitt 4.4.1). Dies zeigte sich auch bei den Aminosäureanalysen der Fermentate auf den anderen Nebenströmen (Abbildung 26, Abbildung 27). Meist stieg der Gehalt aller Aminosäuren, wobei der Asparaginsäure/Asparagin-Gehalt gleich blieb oder sank. Bei Verwendung dieses Substrats für weiterführende Kultivierungen sollte eine umfassende Grundanalytik von Substrat und Fermentat erfolgen. Insgesamt war die Fermentation von KT erfolgreicher als die Fermentation von KP. Die Fermentation von Kartoffelpülpe könnte weiter optimiert werden, wobei die Kombination mit KW eine vielversprechende Option darstellt.

4.9 Myzelhydrolyse

4.9.1 Hydrolysebedingungen

Aufgrund der höchsten Enzymaktivitäten von Corolase APC im Vergleich zu den anderen beiden getesteten Enzymen wurde dieses für die Hydrolyse ausgewählt (Abbildung 58). Die Effizienz von enzymatischen Hydrolysen hängt von vielen Faktoren, wie beispielsweise der Spezifität des genutzten Enzyms, dem Substrat, dem pH-Wert, der Temperatur und der Inkubationszeit ab (Arteaga et al. 2020; Guan et al. 2018; Noman et al. 2018). Für die Hydrolyse des Pilzmyzels wurde ein Temperaturoptimum von 40 °C bestimmt (Abbildung 60). Die höchste Enzymaktivität von Corolase APC wurde hingegen mittels Azocasein Assay bei 65 °C ermittelt (Abbildung 59). Die Inkubationszeit der Hydrolyse von bis zu 20 h ist deutlich länger als die Inkubationszeit von 15 min im Enzym-Assay. Bei höheren Temperaturen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Stabilität von Enzymen aufgrund von Denaturierung über die Zeit abnimmt. Zusätzlich ist die Hydrolyse, neben der Zugabe der kommerziellen Peptidase, auch von endogenen pilzlichen Peptidasen abhängig. Dadurch kann es zu additiven oder synergetischen Effekten kommen. Synergetische Effekte wurden beispielsweise bei der

Kombination von verschiedenen Peptidasen für die Hydrolyse von Sojaprotein-Isolaten beobachtet (de Castro & Sato 2015). Da die optimale Wachstumstemperatur von *F. velutipes* auf 25 °C bestimmt wurde (Kong et al. 2004), sind die pilzlichen Peptidasen möglicherweise bei optimalen Wachstumsbedingungen des Pilzes aktiver. Dies könnte zu höheren Hydrolysegraden bei Inkubationstemperaturen unter dem Optimum von Corolase APC führen. Da der Verbrauch an NaOH-Maßlösung nach 10 h Inkubation nicht weiter anstieg (Abbildung 60), wurden für die weiteren Experimente eine Inkubationstemperatur von 40 °C und eine Inkubationszeit von 10 h verwendet.

Um zu überprüfen, ob die Enzymaddition (E1) oder das Myzel (BW M) die Formol-Titration beeinflusst, wurden diese Kontrollen mit der Kontrolle des verwendeten Puffers verglichen und es konnte kein signifikanter Unterschied und somit keine Beeinflussung festgestellt werden (Abbildung 61). Dies zeigt auch, dass der Inaktivierungsschritt von 90 °C für 10 min für die Inaktivierung der pilzlichen Peptidasen ausreichend war. Deren proteolytische Aktivität wurde durch die Inkubation ohne Enzymzugabe überprüft (BW AH) und es wurde ein signifikanter Unterschied zu BW M und E1 festgestellt (Abbildung 61). Basidiomyceten können eine Vielzahl von verschiedenen Hydrolasen inklusive Peptidasen exprimieren (Sabotič et al. 2007). Zusätzlich zeigte der Überstand bei Submerskultivierung von *F. velutipes* hohe proteolytische Aktivität im Vergleich zu anderen Basidiomyceten (Grimrath et al. 2011). Mittels Azocasein-Assay wurde die proteolytische Aktivität des Überstands von KP FVE auf $118,9 \pm 2,3$ U/mL bestimmt und daher geringer als die Aktivität der extrazellulären Peptidasen nach Kultur von *F. velutipes* kultiviert auf Gluten (maximale Aktivität: 269,8 U/mL; Grimrath et al. 2011). Im Vergleich zu anderen Basidiomyceten in dieser Studie ist diese Aktivität jedoch hoch und vergleichbar zu Aktivitäten von kommerziellen Enzymen wie Flavourzym (153 U/mL) oder Papain (139 U/mL) (Waglay & Karboune 2016). Manche Peptidasen von *F. velutipes* wurden bereits identifiziert (Schulz et al. 2018; Iketani et al. 2013), dennoch wäre eine molekulare Charakterisierung der Peptidasen im Überstand und die Suche nach weiteren Peptidasen von Interesse. Zusätzlich zur gezielten Nutzung identifizierter Peptidasen könnte der Fermentationsüberstand als Enzymmischung eingesetzt werden. Dieses Prinzip wurde bereits für *Aspergillus oryzae* demonstriert, da hier der lyophilisierte Überstand für die Hydrolyse von Erdnussprotein eingesetzt wurde (Su et al. 2011; Zhang et al. 2019). Zusätzlich wurden der Überstand und die gesamte Fermentationsbrühe von *Trichoderma reesei* und *Trichoderma atroviride* für die Hydrolyse von vorbehandeltem Fichtenholz eingesetzt (Kovács et al. 2009).

4.9.2 Einordnung von Hydrolysegraden

Es wurde ein Hydrolysegrad (DH) von $33,9 \pm 0,7\%$ für BW AH, $75,1 \pm 1,0\%$ für ME1 und $98,1 \pm 0,2\%$ für ME4 erreicht (Tabelle 44). Das Pilzmyzel wurde vor der Hydrolyse lyophilisiert und zerkleinert. Für Fruchtkörper von *F. velutipes* wurde der Einfluss verschiedener Trocknungsmethoden auf den freien Aminosäuregehalt untersucht, wobei die höchsten Gehalte nach Lyophilisation gefunden wurden (Wang et al. 2023). Da jedoch kein Unterschied zwischen der Pufferkontrolle und BW M detektiert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die Vorbehandlung des Myzels Einfluss auf den Hydrolysegrad hatte (Abbildung 61). Proteine aus verschiedenen tierischen und pflanzlichen Quellen wurden bereits mit unterschiedlichen Enzymen hydrolysiert. Durch die Zugabe einer Mixtur aus Endo- und Exopeptidasen zu Okara Proteinkonzentrat wurde ein DH von 22% und eine Zunahme der antioxidativen Kapazität erreicht (Pereira et al. 2019). Die Hydrolyse von Casein und Molkenprotein resultierte in einem DH von 24% und hatte Auswirkungen auf die Emulsionseigenschaften (van der Ven et al. 2001). Ein DH von bis 9,2% wurde bei der Hydrolyse von Erbsenprotein mit verschiedenen Enzymen erreicht, wobei Corolase 7089 ebenfalls getestet wurde und zu einem DH von nur 4,7% führte (Arteaga et al. 2020). Die proteolytische Aktivität von Corolase 7089 war im Vergleich zu Corolase APC deutlich geringer (Abbildung 58). Der maximale DH von Sojaprotein nach Corolase PP Zugabe und einer Inkubationszeit von 4 h unter Variation verschiedener Bedingungen betrug 30,6% (Guan et al. 2018). Durch Hydrolyse von vorbehandelten entfetteten Sojaflocken mit verschiedenen Proteasen wurde ein DH von 49,3% (Chae et al. 1998) und bei der Hydrolyse von löslichem Fischkonzentrat ein DH von 68% erreicht (Nilsang et al. 2005). Kartoffelfruchtwasser ist ein weiterer Nebenstrom der Stärkeproduktion und beinhaltet die Hauptproteinfraktion (Kot et al. 2020). Unter Variation der Enzyme und Bedingungen wurde ein DH von 44% für Kartoffelfruchtwasser erzielt (Kamnerdpetch et al. 2007). In einer anderen Studie wurde durch Hydrolyse von Kartoffelfruchtwasser der Anstieg zytotoxischer *in vitro* Aktivität spezifisch gegen Krebszelllinien beobachtet sowie eine Erhöhung der antioxidative Aktivität festgestellt (Kowalczewski et al. 2021). Bei der Hydrolyse von isoliertem Kartoffelprotein wurden bei Zugabe unterschiedlicher Enzyme und verschiedenen Konditionen DHs von bis zu 100% erreicht (Waglay & Karboune 2016). Fruchtkörper von Pilzen wurden ebenfalls bereits hydrolysiert mit maximalen DHs von 28% (Poojary et al. 2017), 37% (Gao et al. 2021) oder 67% (Ang & Ismail-Fitry 2019), je nach verwendeter Enzym- und Pilzkombination. Der DH der meisten Studien wurde unter oder im Bereich von BW AH bestimmt. Dies unterstreicht das Potential der Peptidasen aus *F. velutipes*.

4.9.3 Aminosäureanalyse und Bestimmung des freien Glutaminsäuregehalts

Der Aminosäuregehalt der hydrolysierten Proben stieg im Überstand mit steigendem DH an und nahm im Rückstand gleichzeitig ab (Tabelle 45). Den größten Anteil machte die Summe aus Glutaminsäure und Glutamin im Überstand nach Hydrolyse aus, was aufgrund der Rolle von Glutamat für den Umami- und Gesamtgeschmack besonders interessant ist (Ikeda 1909). Verschiedene Aminosäuren führen zu unterschiedlichen Geschmackseindrücken. Während Leucin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Glycin in wässriger Lösung bitter schmecken, weisen Alanin, Glycin, Prolin und Methionin einen süßen Geschmack auf. Zusätzlich wird für Methionin ein schwefeliger, fleischiger und für Cystein ein schwefeliger Eindruck beschrieben (Solms 1969; Schiffman et al. 1981). Glutamat spielt eine wichtige Rolle für den Geschmack und wurde bereits im Jahr 1909 als Schlüsselkomponente für den Umamigeschmack beschrieben (Ikeda 1909). Daher wurde zusätzlich der freie Glutaminsäuregehalt der Proben bestimmt (Tabelle 46). Dieser war mit steigendem Hydrolysegrad signifikant erhöht. Der freie Glutaminsäuregehalt der BWAH Probe war bereits doppelt so hoch wie der Glutaminsäuregehalt der Gemüsebrühe. Um die freien Glutaminsäuregehalte mit Literaturwerten und der Aminosäureanalyse vergleichen zu können, wurden diese auf die Trockenmasse bezogen. Da der Überstand von ME4 eine höhere Masse hatte als der von ME1, stieg der freie Glutaminsäuregehalt bezogen auf die Trockenmasse durch Zugabe von 4 mL Enzym anstelle von 1 mL Enzym nicht weiter an. Bei dem Vergleich des Glutaminsäuregehalts im Überstand mit dem gesamten Glutamin- und Glutaminsäuregehalt machte der freie Glutaminsäuregehalt bei BW M ca. 4%, bei BW AH ca. 40% und bei ME1 ca. 67% des gesamten Gehalts aus. Diese Anteile passen sehr gut zu den Hydrolysegraden der zugehörigen Proben, wodurch angenommen werden kann, dass Glutaminsäure den größeren Anteil der Summe aus Glutaminsäure und Glutamin ausmacht. Dies kann zum einen an einem höheren Vorkommen von Glutaminsäure als von Glutamin im Pilzprotein liegen oder auf endogene Glutaminaseaktivität hinweisen. Glutaminasen wurden bereits in verschiedenen Pilzen detektiert (Amobonye et al. 2022) und eine Asparaginase mit zusätzlicher Glutaminaseaktivität konnte bereits in *F. velutipes* identifiziert werden (Eisele et al. 2011). Aufgrund der Rolle von Glutamat für den Geschmackseindruck werden Glutaminasen beispielsweise in der Produktion von Sojasauce eingesetzt (Wakayama et al. 2005). Die Annahme, dass Glutaminsäure den Hauptanteil am Glutaminsäure/Glutamin-Gehalt ausmacht, zeigt, dass bei der Verwendung der pilzlichen Hydrolysate kein weiterer Einsatz von Glutaminasen notwendig wäre.

Der Gehalt an freier Glutaminsäure in Fruchtkörpern von *F. velutipes* wurde bereits in verschiedenen Studien bestimmt. In zwei Studien wurden Gehalte von 31,5 mg/g (Kim et al. 2009) bzw. 30,0 mg/g (Beluhan & Ranogajec 2011) gefunden. In weiteren Studien lagen die freien Glutaminsäuregehalte im Bereich von 0,745-1,679 mg/g (Donglu et al. 2017), 2,1-

4,1 mg/g (Wang et al. 2023) und 1,5-6,8 mg/g (Yang et al. 2001). Durch enzymatische Hydrolyse der Fruchtkörper verschiedener Pilze wurde der freie Glutaminsäuregehalt von 2,6 mg/g TM auf 7,1 mg/g (Shiitake, geringste Werte) und von 14,0 mg/g auf 19,6 mg/g (weißer Champignon, höchste Werte) gesteigert (Poojary et al. 2017). Der Gehalt an freier Glutaminsäure in Pilzen hängt von verschiedenen Faktoren, wie dem Pilzstamm, dem Erntezeitpunkt und der weiteren Verarbeitung und Lagerung ab (Zhang et al. 2013). Dennoch passen die Daten von KP FVE und dessen Hydrolyse gut zu den beschriebenen Werten.

4.9.4 Sensorische Prüfungen

Obwohl BW M signifikant als abweichende Probe im Dreieckstest auf Unterschied detektiert wurde, unterschied sich die Bewertung nicht signifikant von der Bewertung der Gemüsebrühe (Abbildung 64). Interessanterweise führte die Zugabe von BW AH und ME1 zu einer Zunahme der Umamiwahrnehmung in Gemüsebrühe (Abbildung 64, Abbildung 65), jedoch zeigte sich dies bei Zugabe zu Wasser nur für ME1 (Abbildung 68).

Dies weist auf einen umamiverstärkenden Effekt ohne eigenen Umamigeschmack für BW AH hin. Dieser könnte auf umamiverstärkende Peptide zurückzuführen sein, von welchen manche bereits in Fruchtkörpern von Pilzen nachgewiesen wurden (Kong et al. 2019; Chen et al. 2022; Xu et al. 2019). Die höhere Bewertung für die Vollmundigkeit in Wasser von BW AH im Vergleich zu BW M könnte ein Hinweis auf die Anwesenheit von kokumi-aktiven Substanzen sein. Die Kokumiwahrnehmung kann durch die Anwesenheit von Glutamat beeinflusst werden, da dieses möglicherweise die Bindung von kokumi-Substanzen an kokumi-Rezeptoren unterstützt (Yamamoto & Inui-Yamamoto 2023).

Die höhere Wertung für umami von ME1 in Wasser im Vergleich zu den Kontrollen könnte mit dem höheren Gehalt an freier Glutaminsäure zusammenhängen (Tabelle 46). Zusätzlich sind einige Peptide unter 3 kDa mit der Umamiwahrnehmung korreliert (Gao et al. 2021). Dies indiziert, dass ein höherer Hydrolysegrad bis zu einem gewissen Maß vor der Totalhydrolyse mit einer gesteigerten Umamiwahrnehmung einhergeht. Um die Umamiwahrnehmung weiter zu steigern, könnten BW AH und ME1 in einer Maillard Reaktion umgesetzt werden (Zhang et al. 2019; Yan et al. 2021; Yu et al. 2018). Es wurde bereits gezeigt, dass kleine Peptide von 1–3 kDa einen größeren verstärkenden Effekt nach Maillard-Reaktion auf die Umami-, Salzig- und Kokumiwahrnehmung hatten als größere Peptide (Yu et al. 2018; Yan et al. 2021). Aufgrund des höheren DH macht dies ME1 zum guten Kandidaten für den Einsatz in einer Maillard-Reaktion zur Generierung von geschmacksverstärkenden Substanzen.

Bei Zugabe einer höheren Enzymmenge stieg die Bitterkeit der Proben in Gemüsebrühe und Wasser deutlich an und die Gesamtbewertung sowie die Bewertung für vollmundig nahmen ab (Abbildung 66, Abbildung 69). Die hohe Bitterbewertung wurde auch bei der Kontrolle

BW ME4 in Wasser und Gemüsebrühe beobachtet. Daraus geht hervor, dass der Bittergeschmack teils durch das Enzym selbst verursacht wird. Bitterkeit kann grundsätzlich ein Problem bei Hydrolysaten darstellen. Sie kann durch den Eigengeschmack der verwendeten Enzyme oder die Freisetzung von bitteren Aminosäuren oder Peptiden hervorgerufen werden (Fávaro-Trindade et al. 2010; Su et al. 2011; Spellman et al. 2009). Es gibt verschiedene Methoden zur Reduktion von Bitterkeit, wie beispielsweise durch Deamidierung (He et al. 2019b; Liu et al. 2017). Bitterkeit kann auch ein Problem für die Applikation von Pilzen in Lebensmitteln darstellen. Bei dem Vergleich verschiedener Fruchtkörper zeigen bei Analyse mittels elektrischer Zunge alle relativ hohe Werte für Bitterkeit (Phat et al. 2016). In dieser Analyse zeigten Fruchtkörper von *F. velutipes* zusätzlich die höchste Wertung für umami und die geringste für sauer. Bei Verwendung von getrocknetem Shiitake-Extrakt als Geschmacksverstärker in Fleischformulierungen wurde ein signifikant höherer Bittergeschmack wahrgenommen (Dermiki et al. 2013) und bei Hydrolyse der Fruchtkörper von *Morchella sextelata* war die Bitterkeit in Abhängigkeit von dem verwendeten Enzym erhöht (Gao et al. 2021). Da die E1 Kontrolle in Wasser keine erhöhte Wertung für Bitterkeit im Vergleich zu BW M aufwies, kann angenommen werden, dass die Enzymaddition in dieser Konzentration keinen Effekt auf die Bewertung hatte. Die Myzelkontrollen (BW M, BW AH) sowie ME1 zeigten keine Zunahme der Bitterkeit in Gemüsebrühe oder Wasser, was vorteilhaft für eine zukünftige Anwendung ist. Da durch Zugabe von BW AH und ME1 zu Gemüsebrühe die Bewertung für umami erhöht wurde, ohne dass die Gesamtbewertung reduziert war, ist die Übertragung in andere Lebensmittelsysteme vielversprechend.

4.10 Produktapplikationen

Alternativen für tierische Produkte haben sich in wenigen Jahren im Konsumverhalten etablieren können und das Wachstumspotential dieses Sektors ist noch nicht ausgeschöpft. Dabei werden Szenarien angenommen, in welchen der Markt für Proteinalternativen von ca. 13 Millionen Tonnen pro Jahr im Jahr 2021 auf 97 Millionen Tonnen pro Jahr bis zum Jahr 2035 anwachsen wird und ca. 11% des gesamten Proteinmarktes ausmachen soll (Morach et al. 2021). Die Produktion von Pilzmyzel für den Einsatz in Lebensmitteln ist Gegenstand aktueller Forschung (Ulziijargal et al. 2013; Stephan et al. 2018; Bickel Haase et al. 2024) und in den letzten Jahren wurden innerhalb und außerhalb Europas mehrere Startups gegründet, die sich mit der Thematik beschäftigen, wie beispielsweise Infinite Roots (ehemals Mushlabs), Walding Foods, Mycotechnology oder Bosque Foods (Molitorisová et al. 2021). Das erste Myzelprodukt auf dem europäischen Markt war Quorn, welches bereits Anfang der 1960er Jahre in England entwickelt wurde und aus dem Myzel des Schimmelpilzes *Fusarium venenatum* besteht (Wiebe 2002). Aufgrund der für viele Applikationen ungeeigneten technofunktionellen Eigenschaften der *Fusarium*-Proteine müssen die Produkte

häufig mit Ei-Proteinen kombiniert werden. Daher können viele Produkte nicht als »vegan« gekennzeichnet werden, weshalb die Herstellung von Pilzprotein mit verbesserten Eigenschaften ökonomisch von hohem Interesse ist. Da Quorn vor der Novel Food Regulierung auf den europäischen Markt kam, musste hierfür keine gesonderte Zulassung erfolgen (Wiebe 2004). Für die Kultivierung von *Fusarium venenatum* zur Produktion von Quorn werden zudem keine Nebenströme der Lebensmittelproduktion, sondern definierte Medien verwendet (Wiebe 2002). Die Integration von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie in die Myzelproduktion, wie beispielsweise Kartoffelnebenströme, würde die Ressourceneffizienz erhöhen und Abfallmengen reduzieren.

Bei dem Ersatz von 5% des Mehls durch verschiedene Pilzmyzelien in der Herstellung von Weißbrot konnten zwar die Umamiintensitäten erhöht werden, jedoch war die Gesamtakzeptanz reduziert (Ulzijargal et al. 2013). Fleischanaloga mit Pilzmyzel von *Agaricus bisporus* zeichneten sich ebenfalls durch höhere Umamiintensitäten als das Vergleichsprodukt mit Sojaprotein aus und wurden zusätzlich mit einer besseren Gesamtakzeptanz bewertet, jedoch schlechter als Rinderhackfleischpasteten (Kim et al. 2011). In dieser Studie wurden die Burger-Pattys mit 27% Pilzmyzel hergestellt, wohingegen die veganen Frikadellen mit KT FVE oder KT PSP etwa 76% Fermentat enthielten. Bei dieser Produktapplikation handelte es sich um einen ersten Versuch und die Formulierung sollte weitergehend optimiert werden. Als positiv können vor allem der relativ neutrale Geschmackseindruck von KT FVE ohne negative Beschreibungen (Abbildung 72) sowie die helle Farbe des Myzels (Abbildung 70, Abbildung 20) angesehen werden. Dadurch ergeben sich verschiedene Applikationsmöglichkeiten. Die getesteten veganen Frikadellen mit KT PSP schnitten in der Bewertung insgesamt schlecht ab (Abbildung 72), wobei deren Geschmack als blumig, seifig und bitter beschrieben wurde. Bitterkeit kann ein großes Problem bei der Applikation von Pilzen in Lebensmitteln sein, wie bereits unter 4.9.4 beschrieben. Umso positiver kann bewertet werden, dass bei Zugabe von KT FVE kein Off-Flavour beschrieben wurde.

Zur Nutzung von Pilzfermentaten der Kartoffelpülpe als Lebensmittel ist bisher nichts bekannt. Alle neu entwickelten Myzel-Produkte, die vor dem 15. Mai 1997 nicht in signifikanten Mengen in der EU konsumiert wurden, gelten als Novel Food und müssen für den Verzehr durch die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) zugelassen werden (Verordnung (EU) 2015/2283). Pilzmyzel fällt dabei unter die Kategorie „Art. 3 Abs. 2 Nr. ii) Lebensmittel, die aus Mikroorganismen, Pilzen oder Algen bestehen oder daraus isoliert oder erzeugt wurden“.

Es wurden bereits Konsultationsverfahren zum Novel Food Status verschiedener Pilz- oder Myzelprodukte durchgeführt (Molitorisová et al. 2021). Eine Übersicht der verschiedenen Myzelprodukte ist in Tabelle 55 dargestellt.

Tabelle 55: Übersicht zum Novel Food-Status verschiedener Myzelprodukte (Molitorisová et al. 2021; EFSA 2022a, EFSA 2022b, EFSA 2010, EFSA 2011).

Organismus	Produkt	Status
<i>Agaricus blazei</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Coprinus comatus</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Ganoderma lucidum</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Grifola frondosa</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Hericium erinaceus</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Lentinula edodes</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Pleurotus eryngii</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Polyporus umbellatus</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Noch nicht zugelassen
<i>Antrodia camphorata</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Zugelassen (EFSA 2022a)
<i>Lentinus edodes</i>	Getrocknetes Myzel Pulver	Zugelassen (EFSA 2022b)
<i>Lentinus edodes</i>	Überstand nach Fermentation	Zugelassen (EFSA 2010)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Getrockneter Extrakt	Zugelassen (EFSA 2011)

Zwar wurde das Myzel von *Antrodia camphorata* zugelassen, jedoch bezog sich die Zulassung nicht auf den Einsatz als Lebensmittelzutat. Hier ist die Vermarktung in Kapseln zur Einnahme als Nahrungsergänzungsmittel vorgesehen (EFSA 2022a). Ein weiteres zugelassenes Produkt dieser Kategorie ist das Myzel des Shiitake-Pilzes (*Lentinula edodes*), kultiviert auf Erbsen- und Reisprotein mit sehr geringen Pilzgehalten der Firma Mycotechnology zum Einsatz in verschiedenen Lebensmittelkategorien (EFSA 2022b). Unter Verwendung desselben Pilzes ist ein Myzelauszug der Firma GlycaNova ebenfalls für verschiedene Produkte zugelassen (EFSA 2010). Es wurde zusätzlich ein Extrakt von mit *Aspergillus oryzae* fermentierten Bohnen mit einer Verzehrempfehlung von 0,9-1,2 g zugelassen (EFSA 2011). Für den ausgewählten Pilz *Flammulina velutipes* wurde bislang kein Antrag auf Zulassung genehmigt oder gestellt.

4.11 Ausblick

Aktuell arbeiten Startups bereits an der Integration von Pilzmyzel in Lebensmitteln (Molitorisová et al. 2021). Die Verwendung von Nebenströmen als Substrat könnte die Kosten senken und zur Nachhaltigkeit beitragen. Der projektintern anfallende Kartoffeltrester eignete sich sehr gut zur Pilzkultivierung und es konnten hohe Pilzanteile erreicht werden. Da es sich um Kartoffelnebenströme handelt, sollte bei Verwendung in Lebensmitteln der Glykoalkaloidgehalt der Produkte beachtet werden. Bei Fermentation mit *Pleurotus pulmonarius* wurde der Abbau von Glykoalkaloiden beobachtet. Hier wäre es von großem Interesse, die Metabolisierung näher zu untersuchen. Die bessere Trennung der möglichen Abbauprodukte sowie eine Fraktionierung dieser könnte ein erster Schritt sein. Der Einsatz

von Standards als Fermentationszusatz zu glykoalkaloidfreiem Medium könnte die Identifikation von Abbauprodukten erleichtern. Da vor allem zum Abbau von Solanidin bisher wenig bekannt ist, stellt dies ein interessantes Forschungsgebiet da. Der Abbau war abhängig von dem verwendeten Pilzstamm, weshalb weitere Pilze untersucht werden könnten. Die Toleranzgrenzen der Pilze für die verschiedenen Glykoalkaloide wären in diesem Kontext ebenfalls interessant. Zur Identifizierung von beteiligten Enzymen könnten beispielsweise Zellextrakte hergestellt, diese fraktioniert und näher charakterisiert werden.

Das Fermentat KT FVE wurde enzymatisch hydrolysiert. Bei Zugabe von Enzym kam es zu hohen Hydrolysegraden und in Verkostungen zeigte sich ein Umami-Geschmack sowie geschmacksverstärkende Eigenschaften des Hydrolysats. Im nächsten Schritt könnten beteiligte geschmacksaktive Peptide identifiziert werden. Möglich wäre dies beispielsweise über die Separation mittels Ultrafiltration, Gelfiltrationschromatographie und anschließender RP-HPLC (Xu et al. 2019; Kong et al. 2019) oder UPLC-MS/MS (Xu et al. 2019; Zhang et al. 2019). Bei Inkubation ohne zugegebenes Enzym wurde aufgrund von nativen Peptidasen bereits ein Hydrolysegrad von ca. 34% erreicht, der damit im Bereich vieler weiterer enzymatischer Hydrolysen lag (Pereira et al. 2019, van der Ven et al. 2001, Guan et al. 2018). Zwar wurden bereits Peptidasen aus *F. velutipes* identifiziert (Schulz et al. 2018; Iketani et al. 2013), jedoch wäre die Suche nach weiteren Peptidasen in KT FVE interessant. Da dieses Hydrolysat ebenfalls geschmacksverstärkende Eigenschaften aufwies, könnte auch hier die Identifizierung von geschmacksverstärkenden Substanzen angeschlossen werden.

Zur Erhöhung der Industrierelevanz wurden die Erkenntnisse von dem intern anfallenden Kartoffeltrester auf industrielle Pülpe übertragen. Bedingt durch die höhere Viskosität der Medien mit industrieller Kartoffelpülpe musste eine geringere Substratkonzentration verwendet werden und es wurden insgesamt geringere Pilzanteile und Proteingehalte erreicht. Die Kombination von Kartoffelpülpe und Kartoffelfruchtwasser, als weiterer Nebenstrom der Stärkeindustrie, stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Optimierung des Prozesses dar. Dieser Ansatz könnte weiterverfolgt und optimiert werden. Anschließend müssten die Fermentate chemisch charakterisiert, der Maßstab für diese Fermentation erhöht und die Reproduzierbarkeit des Prozesses nachgewiesen werden.

Für die Vermarktung dieses Fermentats ist eine Novel Food Zulassung notwendig (Verordnung (EU) 2015/2283). Für den Zulassungsantrag muss vor allem die Sicherheit des Lebensmittels nachgewiesen werden. Dazu ist eine aufwendige Prüfung notwendig, die die Analyse der Zusammensetzung, Stabilitätstests, verschiedene Toxizitätstests, eine ausführliche Recherche, Berechnungen zu Dosierung, den detaillierten Prozessverlauf sowie weitere Unterpunkte einschließt (EFSA 2016). Viele notwendige Schritte auf dem Weg zu einer Novel Food Zulassung gehen über die durchgeführten Arbeiten hinaus. So müsste der Produktionsmaßstab auf die spätere industrielle Produktion erhöht und anschließend fünf

repräsentative Chargen umfassend analysiert werden. Zusätzlich wären Toxizitätsstudien und eine Rattenfütterungsstudie notwendig (EFSA 2016).

4.12 Fazit

Es wurde nachgewiesen, dass Kartoffelnebenströme ein großes Potential als Substrat für die Pilzkultivierung haben. Es konnten vielversprechende Pilz-Substrat-Kombinationen identifiziert und hohe Pilzanteile erzielt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass für die Medienherstellung keine externen Stickstoff- oder Kohlenstoffquellen verwendet werden mussten, sondern lediglich Wasser zu den Nebenströmen gegeben wurde. Die Biomarker Chitin und Ergosterol wurden hinsichtlich ihrer Verwendung zur Ermittlung des Pilzanteils miteinander verglichen. Durch Fermentation wurde eine Aufwertung hinsichtlich der Fettsäureverteilung, des Proteingehalts sowie der biologischen Wertigkeit erreicht. Die erste Maßstabsvergrößerung lieferte vielversprechende Ergebnisse. Da der Einsatz von *F. velutipes* zu hellen Myzelien mit hohem Pilzanteil und mit positivem Geschmackseindruck führte, ist dieser Pilz von großem Interesse für den Einsatz in Lebensmitteln. Beachtet werden sollte jedoch zwingend der Glykoalkaloidgehalt bei Verwendung der Kartoffelnebenströme. Die beobachtete Metabolisierung der Glykoalkaloide durch *P. pulmonarius* eröffnet ein weiteres interessantes Forschungsgebiet. Zwar zeigten die Fermentate keine gute Bewertung bei Verkostung, jedoch wäre die Aufklärung der Abbauprozesse aus wissenschaftlicher Sicht interessant. Die Erkenntnisse aus der Fermentation von projektinternen Kartoffelnebenströmen wurden auf industrielle Kartoffelpülpe übertragen. Erste Optimierungsschritte, wie die Kombination mit Kartoffelfruchtwasser, konnten bereits getestet werden.

Durch Versuche zur Hydrolyse der Pilzmyzelien wurde zusätzlich das Potential von pilzeigenen Peptidasen aus *F. velutipes* aufgezeigt. Bereits durch Inkubation ohne zusätzliche Enzymzugabe konnten ein Hydrolysegrad von 34% erzielt und geschmacksverstärkende Eigenschaften der Hydrolysate nachgewiesen werden. Zwar waren die Hydrolysegrade nach Enzymzugabe noch deutlich erhöht, jedoch wäre möglicherweise eine Hydrolyse ohne externe Zugabe wissenschaftlich und wirtschaftlich von größerem Interesse. Die Identifizierung von geschmacksverstärkenden Peptiden wäre aus beiden Hydrolysaten spannend. Insgesamt wurden durch diese Arbeit vielseitige Einsatzmöglichkeiten der Fermentation mit Basidiomyceten aufgezeigt. So konnte die Verwendung zur Aufwertung von Nebenströmen, der Einsatz in Lebensmitteln, die Metabolisierung von toxischen Glykoalkaloiden, das Potential von pilzeigenen Peptidasen sowie die Generierung von geschmacksverstärkenden Substanzen nachgewiesen werden.

5 Literaturverzeichnis

AACC. 2000. Method 56-20. Hydration capacity of pregelatinized cereal products. In Chemists AAoC, ed. Approved methods of the AACC. 10th ed. American Association for Clinical Chemistry (AACC), St. Paul.

Abbas, K. A., Khalil, S. K., & Hussin, A. S. M. (2010). Modified starches and their usages in selected food products: A review study. *Journal of Agricultural Science*, **2**(2), 90.

Abedini, A., Amiri, H., & Karimi, K. (2020). Efficient biobutanol production from potato peel wastes by separate and simultaneous inhibitors removal and pretreatment. *Renewable Energy*, **160**, 269-277.

Abousteit, O., & Kempf, W. (1974). Pektinengewinnung aus Kartoffelpülpe und ihre mögliche Bedeutung für die Kartoffelstärkeindustrie. *Starch-Stärke*, **26**(12), 417-421.

Achinas, S., Li, Y., Achinas, V., & Euverink, G. J. W. (2019). Biogas potential from the anaerobic digestion of potato peels: Process performance and kinetics evaluation. *Energies*, **12**(12), 2311.

Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, **100**(6), 693-702.

Ahlborn, J., Calzolari, N., Spielmeyer, A., Avci, S. S., Zimmer, M., & Rühl, M. (2018). Enrichment of vitamin D₂ in mycelium from submerged cultures of the agaric mushroom *Pleurotus sapidus*. *Journal of food science and technology*, **55**, 3833-3839.

Ahlborn, J., Stephan, A., Meckel, T., Maheshwari, G., Rühl, M., & Zorn, H. (2019). Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. *International journal of recycling of organic waste in agriculture*, **8**, 447-455.

Amobonye, A., Singh, S., Mukherjee, K., Jobichen, C., Qureshi, I. A., & Pillai, S. (2022). Structural and functional insights into fungal glutaminase using a computational approach. *Process Biochemistry*, **117**, 76-89.

Anastopoulos, I., & Kyzas, G. Z. (2014). Agricultural peels for dye adsorption: a review of recent literature. *Journal of Molecular Liquids*, **200**, 381-389.

Ang, S. S., & Ismail-Fitry, M. R. (2019). Production of different mushroom protein hydrolysates as potential flavourings in chicken soup using stem bromelain hydrolysis. *Food technology and biotechnology*, **57**(4), 472.

Arapoglou, D., Varzakas, T., Vlyssides, A., & Israilides, C. J. W. M. (2010). Ethanol production from potato peel waste (PPW). *Waste Management*, **30**(10), 1898-1902.

Arntzen, M. Ø., Bengtsson, O., Várnai, A., Delogu, F., Mathiesen, G., & Eijsink, V. G. (2020). Quantitative comparison of the biomass-degrading enzyme repertoires of five filamentous fungi. *Scientific Reports*, **10**(1), 20267.

Arora, A., & Camire, M. E. (1994). Performance of potato peels in muffins and cookies. *Food Research International*, **27**(1), 15-22.

Arteaga, V. G., Guardia, M. A., Muranyi, I., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **65**, 102449.

- Atitallah, I. B., Antonopoulou, G., Ntaikou, I., Alexandropoulou, M., Nasri, M., Mechichi, T., & Lyberatos, G. (2019). On the evaluation of different saccharification schemes for enhanced bioethanol production from potato peels waste via a newly isolated yeast strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *Bioresource technology*, **289**, 121614.
- Bach, F., Helm, C. V., Bellettini, M. B., Maciel, G. M., & Haminiuk, C. W. I. (2017). Edible mushrooms: A potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science & Technology*, **52**(11), 2382-2392.
- Baldrian, P., Větrovský, T., Cajthaml, T., Dobiášová, P., Petránková, M., Šnajdr, J., & Eichlerová, I. (2013). Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. *Fungal ecology*, **6**(1), 1-11.
- Bártová, V., Bárta, J., & Jarošová, M. (2019). Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 5533-5547.
- Beals, K. A. (2019). Potatoes, nutrition and health. *American journal of potato research*, **96**(2), 102-110.
- Beckmann, N., Schafferer, L., Schrettl, M., Binder, U., Talasz, H., Lindner, H., & Haas, H. (2013). Characterization of the link between ornithine, arginine, polyamine and siderophore metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS one*, **8**(6), e67426.
- Beluhan, S., & Ranogajec, A. (2011). Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food chemistry*, **124**(3), 1076-1082.
- Berger, R. G., Bordewick, S., Krahe, N. K., & Ersoy, F. (2022). Mycelium vs. fruiting bodies of edible fungi—A comparison of metabolites. *Microorganisms*, **10**(7), 1379.
- Bergthaller, W., Witt, W., & Goldau, H. P. (1999). Potato starch technology. *Starch-Stärke*, **51**(7), 235-242.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2018) Speisekartoffeln sollten niedrige Gehalte an Glykoalkaloiden (Solanin) enthalten, Stellungnahme Nr. 010/2018 des BfR vom 23. April 2018. DOI: 10.17590/20180423-085250.
- Bhargava, S., Nandakumar, M. P., Roy, A., Wenger, K. S., & Marten, M. R. (2003). Pulsed feeding during fed-batch fungal fermentation leads to reduced viscosity without detrimentally affecting protein expression. *Biotechnology and bioengineering*, **81**(3), 341-347.
- Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2023). Secondary metabolites. *Plant physiology, development and metabolism*. Springer Nature Singapore, Singapore, 765-808.
- Bickel Haase, T., Klis, V., Hammer, A. K., Pinto Lopez, C., Verheyen, C., Naumann-Gola, S., & Zorn, H. (2024). Fermentation of cocoa pod husks with *Pleurotus salmoneo-stramineus* for food applications. *Food Science & Nutrition*, **12**(4), 2551-2566.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) (2023). Bericht zur Markt- und Versorgungslage Kartoffeln. April 2023. https://www.ble.de/DE/BZL/Daten-Berichte/Kartoffeln/Kartoffeln_node.html (letzter Zugriff 17.10.2024).
- BMEL (2003) Statistisches Jahrbuch über Ernährung Landwirtschaft und Forsten 2023. <https://www.bmel-statistik.de/archiv/statistisches-jahrbuch> (letzter Zugriff 17.10.2024).
- Boruckowska, H., Boruckowski, T., Figurska-Ciura, D., & Drożdż, W. (2020). Effect of addition of dried potato pulp on selected quality characteristics of shortcrust pastry cookies. *Open Life Sciences*, **15**(1), 735-741.

- Bürger, F., Koch, M., Fraatz, M. A., Omarini, A. B., Berger, R. G., & Zorn, H. (2022). Production of an anise-and woodruff-like aroma by monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus* grown on citrus side streams. *Molecules*, **27**(3), 651.
- Bushway, R. J., & Ponnampalam, R. (1981). alpha-Chaconine and alpha-solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**(4), 814-817.
- Bushway, R. J., Savage, S. A., & Ferguson, B. S. (1987). Inhibition of acetyl cholinesterase by solanaceous glycoalkaloids and alkaloids. *American potato journal*, **64**, 409-413.
- Cai, S., Gao, F., Zhang, X., Wang, O., Wu, W., Zhu, S., ... & Ji, B. (2014). Evaluation of γ -aminobutyric acid, phytate and antioxidant activity of tempeh-like fermented oats (*Avena sativa* L.) prepared with different filamentous fungi. *Journal of food science and technology*, **51**, 2544-2551.
- Camire, M. E., Violette, D., Dougherty, M. P., & McLaughlin, M. A. (1997). Potato peel dietary fiber composition: effects of peeling and extrusion cooking processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(4), 1404-1408.
- Camire, M. E., & Flint, S. I. (1991). Thermal processing effects on dietary fiber composition and hydration capacity in corn meal, oat meal, and potato peels. *Cereal Chemistry*, **68**(6), 645-647.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**(6653), 816-824.
- Chae, H. J., In, M. J., & Kim, M. H. (1998). Process development for the enzymatic hydrolysis of food protein: effects of pre-treatment and post-treatments on degree of hydrolysis and other product characteristics. *Biotechnology and bioprocess engineering*, **3**, 35-39.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., ... & Ryba, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, **100**(6), 703-711.
- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, **464**(7286), 297-301.
- Charcosset, J. Y., & Chauvet, E. (2001). Effect of culture conditions on ergosterol as an indicator of biomass in the aquatic hyphomycetes. *Applied and environmental microbiology*, **67**(5), 2051-2055.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological research*, **111**(6), 635-652.
- Chen, R. X., Sun, S. Y., Xiang, Y., Sun, C. F., & Sun, W. Z. (2020). Optimization of enzymatic hydrolysis for rejected hen protein for salt-enhanced peptides preparation. *Food and Fermentation Industries*, **46**(1), 166-171.
- Chen, Y. P., Wang, M., Blank, I., Xu, J., & Chung, H. Y. (2021). Saltiness-enhancing peptides isolated from the Chinese commercial fermented soybean curds with potential applications in salt reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**(35), 10272-10280.
- Chen, W., Li, W., Wu, D., Zhang, Z., Chen, H., Zhang, J., ... & Yang, Y. (2022). Characterization of novel umami-active peptides from *Stropharia rugoso-annulata* mushroom and in silico study on action mechanism. *Journal of Food Composition and Analysis*, **110**, 104530.
- Cheung, P. C. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, **35**(4), 292-299.

- Chintagunta, A. D., Jacob, S., & Banerjee, R. (2016). Integrated bioethanol and biomanure production from potato waste. *Waste Management*, **49**, 320-325.
- Chohan, N. A., Aruwajoye, G. S., Sewsynker-Sukai, Y., & Kana, E. G. (2020). Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: process optimization and kinetic assessment. *Renewable Energy*, **146**, 1031-1040.
- Chorfa, N., Nlandu, H., Belkacemi, K., & Hamoudi, S. (2022). Physical and enzymatic hydrolysis modifications of potato starch granules. *Polymers*, **14**(10), 2027.
- Cipollini, M. L., & Levey, D. J. (1997). Why are some fruits toxic? Glycoalkaloids in solanum and fruit choice by vertebrates. *Ecology*, **78**(3), 782-798.
- Cohen, N., Cohen, J., Asatiani, M. D., Varshney, V. K., Yu, H. T., Yang, Y. C., ... & Wasser, S. P. (2014). Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher Basidiomycetes mushrooms. *International journal of medicinal mushrooms*, **16**(3), 1521-9437.
- Comandini, P., Cerretani, L., Blanda, G., Bendini, A., & Toschi, T. G. (2011). Characterization of potato flavours: An overview of volatile profiles and analytical procedures. *Food*, **5**, 1-14.
- Curti, E., Carini, E., Diantom, A., & Vittadini, E. (2016). The use of potato fibre to improve bread physico-chemical properties during storage. *Food chemistry*, **195**, 64-70.
- Dagaerbieke, A., Ganzorig, O., Miyazaki, K., & Yoshida, T. (2019). Inoculation of potato pulp with antibacterial lactic acid bacterium to improve the quality of livestock feed. *Journal of Advances in Agriculture*, **10**, 1705-1712.
- Dahlin, P., Müller, M. C., Ekengren, S., McKee, L. S., & Bulone, V. (2017). The impact of steroidal glycoalkaloids on the physiology of *Phytophthora infestans*, the causative agent of potato late blight. *Molecular plant-microbe interactions*, **30**(7), 531-542.
- Dale, M. F. B., Griffiths, D. W., Bain, H., & Todd, D. (1993). Glycoalkaloid increase in *Solanum tuberosum* on exposure to light. *Annals of applied biology*, **123**(2), 411-418.
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, **74**, 185-198.
- de Roos, K. B. (2006). Understanding and controlling the behaviour of aroma compounds in thermally processed foods. *Trends in food science & technology*, **17**(5), 236-243.
- Dei, H. K. (2011). Soybean as a feed ingredient for livestock and poultry. *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*, London: IntechOpen. 215-226.
- del Toro, G. V., Vega, R. C., Garín-Aguilar, M. E., & Lara, H. L. (2006). Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. *Food Chemistry*, **94**(4), 494-497.
- Denny, A., Aisbitt, B., & Lunn, J. (2008). Mycoprotein and health. *Nutrition bulletin*, **33**(4), 298-310.
- Dermiki, M., Phanphensophon, N., Mottram, D. S., & Methven, L. (2013). Contributions of non-volatile and volatile compounds to the umami taste and overall flavour of shiitake mushroom extracts and their application as flavour enhancers in cooked minced meat. *Food chemistry*, **141**(1), 77-83.

- Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., ... & Saxena, A. K. (2020). Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, Elsevier, 147-161.
- Deutsche Gesellschaft für Mykologie (DGfM) https://www.dgfm-ev.de/pilzesammeln-und-vergiftungen/speisepilze?name=Positivliste-Speisepilze_20240121.pdf&reattachment=ea4c697403712b7146e6f70b4b6fd960 (Letzter Zugriff: 17.10.2024)
- Di Lonardo, D. P., van der Wal, A., Harkes, P., & De Boer, W. (2020). Effect of nitrogen on fungal growth efficiency. *Plant Biosystems-an International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **154**(4), 433-437.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied biochemistry and biotechnology*, **167**, 536-551.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2014). Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **37**, 1385-1400.
- Diez, V. A., & Alvarez, A. (2001). Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food chemistry*, **75**(4), 417-422.
- Dimou, D. M., Georgala, A., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2002). Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, **106**(8), 925-929.
- DIN 10962 Prüfbereiche für sensorische Prüfungen-Anforderungen an Prüfräume; 1997.
- DIN 32645 Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; 2008.
- Distl, M., Sibum, M., & Wink, M. (2009). Combination of on-line solid-phase extraction with LC-MS for the determination of potentially hazardous glycoalkaloids in potato products. *Potato Research*, **52**, 39-56.
- Deutsche Lebensmittelbuchkommission (DLBK) (2020) Leitsätze für Speisepilze und Speisepilzerzeugnisse, Neufassung 02.07.2020 (BANz AT 18.08.2020 B4, GMBI2020 S. 547).
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., & Fonseca, L. P. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**(5-6), 394-401.
- Donglu, F., Wenjian, Y., Kimatu, B. M., Liyan, Z., Xinxin, A., & Qihui, H. (2017). Comparison of flavour qualities of mushrooms (*Flammulina velutipes*) packed with different packaging materials. *Food Chemistry*, **232**, 1-9.
- Du, J., Cheng, L., Hong, Y., Deng, Y., Li, Z., Li, C., & Gu, Z. (2018). Enzyme assisted fermentation of potato pulp: An effective way to reduce water holding capacity and improve drying efficiency. *Food chemistry*, **258**, 118-123.
- DuBois, G. E., & Prakash, I. (2012). Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annual review of food science and technology*, **3**, 353-380.
- Edwards, S. A., Fairbairn, C. B., & Capper, A. L. (1986). Liquid potato feed for finishing pigs: feeding value, inclusion rate and storage properties. *Animal Feed Science and Technology*, **15**(2), 129-139.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2010) Scientific Opinion on the safety of “Lentinus edodes extract” as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal*, **8**(7),1685.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2011) Scientific Opinion on the safety of “fermented black bean extract’ (Touchi)’ as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal*, **9**(5):2136.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, **13**(6), 4104.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck, D., Bresson, J. L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., ... & van Loveren, H. (2016). Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, **14**(11), e04594.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., ... & Grasl-Kraupp, B. (2020). Risk assessment of glycoalkaloids in feed and food, in particular in potatoes and potato-derived products. *EFSA Journal*, **18**(8), e06222.

EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., ... (2022) Safety of freeze-dried mycelia of *Antrodia camphorata* as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, **20**, e07380.

EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., ... (2022) Safety of pea and rice protein fermented by Shiitake (*Lentinula edodes*) mycelia as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, **20**, e07205.

Eisele, N., Linke, D., Bitzer, K., Na’amnieh, S., Nimtz, M., & Berger, R. G. (2011). The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresource technology*, **102**(3), 3316-3321.

Ekundayo, F. O., Ekundayo, E. A., & Ayodele, B. B. (2017). Comparative studies on glucanases and β -glucosidase activities of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* in solid state fermentation. *Mycosphere*, **8**(8), 1051-1059.

Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, **184**(1), 39-52.

Ergun, S. O., & Urek, R. O. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, **15**(2), 273-277.

Food and Agricultural Organization (FAO) (2009). International year of the potato 2008. The potato. <https://www.fao.org/4/i0500e/i0500e02.pdf> (letzter Zugriff: 17.10.2024).

Food and Agricultural Organization (FAO) (2023). Crops and livestock products - Potatoes. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (letzter Zugriff: 17.10.2024).

Food and Agricultural Organization (FAO) (2024). Crops and livestock products - mushrooms and truffels <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (letzter Zugriff: 17.10.2024).

Food and Agricultural Organization (FAO)/ Health Organization (WHO) (1973). Energy and protein requirements: Report of a joint FAO/WHO Ad hoc expert committee. *WHO Tech Rep. Series No. 522*

- Fávaro-Trindade, C. S., Santana, A. D. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., & Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food hydrocolloids*, **24**(4), 336-340.
- Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged culture fermentation of "higher fungi": the macrofungi. *Advances in applied microbiology*, **63**, 33-103.
- Ferreira, A. F., Ribau, J. P., & Silva, C. M. (2011). Energy consumption and CO₂ emissions of potato peel and sugarcane biohydrogen production pathways, applied to Portuguese road transportation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**(21), 13547-13558.
- Fewell, A. M., & Roddick, J. G. (1993). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine. *Phytochemistry*, **33**(2), 323-328.
- Fitzpatrick, T. J., McDermott, J. A., & Osman, S. F. (1978). Evaluation of injured commercial potato samples for total glycoalkaloid content. *Journal of Food Science*, **43**(5), 1417-1418.
- Fraatz, M. A., Naeve, S., Hausherr, V., Zorn, H., & Blank, L. M. (2014). A minimal growth medium for the basidiomycete *Pleurotus sapidus* for metabolic flux analysis. *Fungal Biology and Biotechnology*, **1**, 1-8.
- Fraatz, M. A., Goldmann, M., Geissler, T., Gross, E., Backes, M., Hilmer, J. M., ... & Zorn, H. (2016). Biotechnological production of methyl-branched aldehydes. *Journal of agricultural and food chemistry*, **66**(10), 2387-2392.
- Fraenkel, G. S. (1959). The Raison d'Étre of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science*, **129**(3361), 1466-1470.
- Friedman, M., & Dao, L. (1992). Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. *Journal of agricultural and food chemistry*, **40**(3), 419-423.
- Friedman, M., Roitman, J. N., & Kozukue, N. (2003). Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**(10), 2964-2973.
- Friedman, M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**(23), 8655-8681.
- Friend, D. W., Cunningham, H. M., & Nicholson, J. W. G. (1963). The feeding value of dried potato pulp for pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, **43**(2), 241-251.
- Fujitani, Y., Alamgir, K. M., & Tani, A. (2018). Ergothioneine production using *Methylobacterium* species, yeast, and fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, **126**(6), 715-722.
- Fukushima-Sakuno, E. (2020). Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. *The Journal of antibiotics*, **73**(10), 687-696.
- Gaillard, D., Laugerette, F., Darcel, N., El-Yassimi, A., Passilly-Degrace, P., Hichami, A., ... & Besnard, P. (2008). The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *The FASEB Journal*, **22**(5), 1458-1468.
- Galindo, M. M., Voigt, N., Stein, J., van Lengerich, J., Raguse, J. D., Hofmann, T., ... & Behrens, M. (2012). G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chemical senses*, **37**(2), 123-139.
- Gao, L., Sun, M. H., Liu, X. Z., & Che, Y. S. (2007). Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological research*, **111**(1), 87-92.

- Gao, M. T., Yano, S., Inoue, H., & Sakanishi, K. (2012). Production of ethanol from potato pulp: investigation of the role of the enzyme from *Acremonium cellulolyticus* in conversion of potato pulp into ethanol. *Process biochemistry*, **47**(12), 2110-2115.
- Gao, J., Fang, D., Kimatu, B. M., Chen, X., Wu, X., Du, J., ... & Hu, Q. (2021). Analysis of umami taste substances of morel mushroom (*Morchella sextelata*) hydrolysates derived from different enzymatic systems. *Food Chemistry*, **362**, 130192.
- Gay, L. (1991). Chitin content and chitin synthase activity as indicators of the growth of three different anaerobic rumen fungi. *FEMS microbiology letters*, **80**(1), 99-102.
- Gerhardt Analytical Systems (2023) https://www.gerhardt.de/fileadmin/Redaktion/downloads/Applikationen/Application_note_Chitin_in_insects_DE.pdf (letzter Zugriff: 17.10.2024).
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., ... & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food chemistry*, **187**, 322-330.
- Ginzberg, I., Tokuhisa, J. G., & Veilleux, R. E. (2009). Potato steroidal glycoalkaloids: biosynthesis and genetic manipulation. *Potato Research*, **52**, 1-15.
- Glynn, A., Igra, A. M., Sand, S., Ilbäck, N. G., Hellenäs, K. E., Rosén, J., & Aspenström-Fagerlund, B. (2017). Are additive effects of dietary surfactants on intestinal tight junction integrity an overlooked human health risk?—A mixture study on Caco-2 monolayers. *Food and chemical toxicology*, **106**, 314-323.
- Griffith, G. W., Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H. J., ... & Perkins, W. T. (2007). Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS microbiology letters*, **276**(2), 165-171.
- Grimrath, A., Berends, P., Rabe, S., Berger, R. G., & Linke, D. (2011). Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *European Food Research and Technology*, **232**, 415-424.
- Grommers, H. E., & van der Krogt, D. A. (2009). Potato starch: production, modifications and uses. *Starch*, 511-539.
- Guan, H., Diao, X., Jiang, F., Han, J., & Kong, B. (2018). The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chemistry*, **245**, 89-96.
- Gumul, D., Korus, J., Surma, M., & Ziobro, R. (2020). Pulp obtained after isolation of starch from red and purple potatoes (*Solanum tuberosum* L.) as an innovative ingredient in the production of gluten-free bread. *Plos one*, **15**(9), e0229841.
- Gutarowska, B., & Żakowska, Z. (2009). Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. *Letters in Applied Microbiology*, **48**(5), 605-610.
- Habinshuti, I., Chen, X., Yu, J., Mukeshimana, O., Duhoranimana, E., Karangwa, E., ... & Zhang, X. (2019). Antimicrobial, antioxidant and sensory properties of Maillard reaction products (MRPs) derived from sunflower, soybean and corn meal hydrolysates. *Lwt*, **101**, 694-702.
- Hadar, Y., & Cohen-Arazi, E. (1986). Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**(6), 1352-1354.

- Hammer, A. K., Emrich, N. O., Ott, J., Birk, F., Fraatz, M. A., Ley, J. P., ... & Zorn, H. (2020). Biotechnological production and sensory evaluation of ω 1-unsaturated aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**(1), 345-353.
- Hassan, F. R. H., Ghada, M., & El-Kady, A. T. M. (2012). Mycelial biomass production of enoke mushroom (*Flammulina velutipes*) by submerged culture. *Australian Journal of Basic and Applied Science*, **6**(7), 603-610.
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, **5**(4), 10-1128.
- He, W., Yang, R., & Zhao, W. (2019). Effect of acid deamidation- α -glucosidase hydrolysis induced modification on functional and bitter-masking properties of wheat gluten hydrolysates. *Food chemistry*, **277**, 655-663.
- He, M. Q., Zhao, R. L., Hyde, K. D., Begerow, D., Kemler, M., Yurkov, A., ... & Kirk, P. M. (2019). Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal diversity*, **99**, 105-367.
- Heck, G. L., Mierson, S., & DeSimone, J. A. (1984). Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*, **223**(4634), 403-405.
- Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R., & Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**(10), 4168-4176.
- Hennessy, R. C., Jørgensen, N. O., Scavenius, C., Enghild, J. J., Greve-Poulsen, M., Sørensen, O. B., & Stougaard, P. (2018). A screening method for the isolation of bacteria capable of degrading toxic steroidal glycoalkaloids present in potato. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2648.
- Hennessy, R. C., Nielsen, S. D., Greve-Poulsen, M., Larsen, L. B., Sørensen, O. B., & Stougaard, P. (2020). Discovery of a bacterial gene cluster for deglycosylation of toxic potato steroidal glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine. *Journal of agricultural and food chemistry*, **68**(5), 1390-1396.
- Herrera, M. L., Vallor, A. C., Gelfond, J. A., Patterson, T. F., & Wickes, B. L. (2009). Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, **47**(5), 1325-1332.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, **111**(5), 509-547.
- Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2018). Industrial potato peel as a feedstock for biobutanol production. *New biotechnology*, **46**, 54-60.
- Hlywka, J. J., Stephenson, G. R., Sears, M. K., & Yada, R. Y. (1994). Effects of insect damage on glycoalkaloid content in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**(11), 2545-2550.
- Hoa, H. T., Wang, C. L., & Wang, C. H. (2015). The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, **43**(4), 423-434.
- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). Protein—which is best? *Journal of sports science & medicine*, **3**(3), 118.

- Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., Matsunami, H., & Ninomiya, Y. (2011). Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS one*, **6**(5), e20007.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. P. (2015). Optimisation and validation of ultra-high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of potato steroidal alkaloids. *Journal of Chromatography b*, **997**, 110-115.
- Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., ... & Zuker, C. S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, **442**(7105), 934-938.
- Huang, X. F., Shen, Y., Luo, H. J., Liu, J. N., & Liu, J. (2018). Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresource technology*, **247**, 395-401.
- Iablokov, V., Sydora, B. C., Foshaug, R., Meddings, J., Driedger, D., Churchill, T., & Fedorak, R. N. (2010). Naturally occurring glycoalkaloids in potatoes aggravate intestinal inflammation in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, **55**, 3078-3085.
- Ibrahim, D., Weloosamy, H., & Lim, S. H. (2015). Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*, **6**(3), 265.
- Ikeda, K. (1909). On a new seasoning. *Journal of the Tokyo Chemical Society*, **30**, 820-836.
- Iketani, A., Nakamura, M., Suzuki, Y., Awai, K., & Shioi, Y. (2013). A novel serine protease with caspase-and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Fungal biology*, **117**(3), 173-181.
- Imm, J. Y., & Lee, C. M. (1999). Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **47**(6), 2360-2366.
- Inácio, F. D., Ferreira, R. O., De Araujo, C. A. V., Peralta, R. M., & De Souza, C. G. M. (2015). Production of enzymes and biotransformation of orange waste by oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. *Advances in Microbiology*, **5**(1), 1-8.
- Ishikawa, N. K., Yamaji, K., Tahara, S., Fukushi, Y., & Takahashi, K. (2000). Highly oxidized cuparene-type sesquiterpenes from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, **54**(8), 777-782.
- Ishikawa, N. K., Fukushi, Y., Yamaji, K., Tahara, S., & Takahashi, K. (2001). Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Journal of Natural Products*, **64**(7), 932-934.
- Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., & Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(33), 12569-12574.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., ... & Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, **443**(7113), 818-822.
- Jeddou, K. B., Bouaziz, F., Zouari-Ellouzi, S., Chaari, F., Ellouz-Chaabouni, S., Ellouz-Ghorbel, R., & Nouri-Ellouz, O. (2017). Improvement of texture and sensory properties of cakes by addition of potato peel powder with high level of dietary fiber and protein. *Food chemistry*, **217**, 668-677.

- Jennings, D. M., & Lewis, O. A. M. (1969). Methionine loss during protein hydrolysis of plant material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**(3), 668-669.
- Jensen, P. H., Juhler, R. K., Nielsen, N. J., Hansen, T. H., Strobel, B. W., Jacobsen, O. S., ... & Hansen, H. C. B. (2008). Potato glycoalkaloids in soil-optimising liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry for quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, **1182**(1), 65-71.
- Jensen, P. H., Jacobsen, O. S., Henriksen, T., Strobel, B. W., & Hansen, H. C. B. (2009). Degradation of the Potato Glycoalkaloids— α -Solanine and α -Chaconine in Groundwater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **82**, 668-672.
- Ji, X., Rivers, L., Zielinski, Z., Xu, M., MacDougall, E., Stephen, J., ... & Zhang, J. (2012). Quantitative analysis of phenolic components and glycoalkaloids from 20 potato clones and *in vitro* evaluation of antioxidant, cholesterol uptake, and neuroprotective activities. *Food Chemistry*, **133**(4), 1177-1187.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, **47**(10), 3954-3962.
- Kamnerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C., & Scheper, T. (2007). An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**(4), 508-514.
- Kanter, J. P., Honold, P. J., Luh, D., Heiles, S., Spengler, B., Fraatz, M. A., ... & Hammer, A. K. (2023). Biocatalytic production of odor-active fatty aldehydes from fungal lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **71**(21), 8112-8120.
- Kasimir, M., Wolbeck, A., Behrens, M., & Humpf, H. U. (2023). Intestinal metabolism of selected steroidal glycoalkaloids in the pig cecum model. *ACS omega*, **8**(20), 18266-18274.
- Keil, T., Landenberger, M., Dittrich, B., Selzer, S., & Büchs, J. (2019). Precultures grown under fed-batch conditions increase the reliability and reproducibility of high-throughput screening results. *Biotechnology journal*, **14**(11), 1800727.
- Kelly, O., Lin, C., Ramkumar, M., Saxena, N. C., Kleyman, T. R., & Eaton, D. C. (2003). Characterization of an amiloride binding region in the α -subunit of ENaC. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **285**(6), F1279-F1290.
- Kelly, S., Grimm, L. H., Bendig, C., Hempel, D. C., & Krull, R. (2006). Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochemistry*, **41**(10), 2113-2117.
- Kempf, W. (1980). Beitrag zur mechanischen Entwässerung von Kartoffelpülpe. *Starch-Stärke*, **32**(1), 14-20.
- Keukens, E. A., de Vrije, T., van den Boom, C., de Waard, P., Plasman, H. H., Thiel, F., ... & de Kruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1240**(2), 216-228.
- Keukens, E. A., de Vrije, T., Jansen, L. A., de Boer, H., Janssen, M., de Kroon, A. I., ... & de Kruijff, B. (1996). Glycoalkaloids selectively permeabilize cholesterol containing biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1279**(2), 243-250.
- Khodaei, N., & Karboune, S. (2013). Extraction and structural characterisation of rhamnogalacturonan I-type pectic polysaccharides from potato cell wall. *Food chemistry*, **139**(1-4), 617-623.

- Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., & Fox, P. F. (2002). Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial technology*, **31**(3), 310-320.
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*, **34**(1), 56-61.
- Kim, J. M., Ra, K. S., Noh, D. O., & Suh, H. J. (2002). Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutipes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **29**(5), 292-295.
- Kim, M. Y., Lee, S. J., Ahn, J. K., Kim, E. H., Kim, M. J., Kim, S. L., ... & Song, H. K. (2009). Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chemistry*, **113**(2), 386-393.
- Kim, K., Choi, B., Lee, I., Lee, H., Kwon, S., Oh, K., & Kim, A. Y. (2011). Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**(9), 1561-1568.
- Kim, Y. D., Kwak, S. H., Kim, K. J., Seo, K. S., Park, T. Y., Yu, K. Y., & Jin, S. W. (2014). The analysis of useful components in *Flammulina velutipes* fruit body, *Flammulina velutipes* mycelium and *Cordyceps militaris* mycelium. *Journal of Mushroom*, **12**(3), 193-200.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., & Stalpers, J. A. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. Cabi CAB International, Wallingford, 9th edition.
- Klingspohn, U., Bader, J., Kruse, B., Kishore, P. V., Schügerl, K., Kracke-Helm, H. A., & Likidis, Z. (1993). Utilization of potato pulp from potato starch processing. *Process Biochemistry*, **28**(2), 91-98.
- Klis, V., Pühn, E., Jerschow, J. J., Fraatz, M. A., & Zorn, H. (2023). Fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp by *Laetiporus persicinus* yields a novel beverage with tropical aroma. *Fermentation*, **9**(6), 533.
- Ko, H. G., Park, S. H., Kim, S. H., Park, H. G., & Park, W. M. (2005). Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. *Folia Microbiologica*, **50**, 103-106.
- Kong, W. S., Cho, Y. H., Jhune, C. S., Yoo, Y. B., & Kim, K. H. (2004). Breeding of *Flammulina velutipes* strains adaptable to elevated-temperature. *Mycobiology*, **32**(1), 11-16.
- Kong, Y., Zhang, L. L., Zhao, J., Zhang, Y. Y., Sun, B. G., & Chen, H. T. (2019). Isolation and identification of the umami peptides from shiitake mushroom by consecutive chromatography and LC-Q-TOF-MS. *Food Research International*, **121**, 463-470.
- Kot, A. M., Pobiega, K., Piwowarek, K., Kieliszek, M., Błażej, S., Gniewosz, M., & Lipińska, E. (2020). Biotechnological methods of management and utilization of potato industry waste—a review. *Potato research*, **63**, 431-447.
- Kovács, K., Szakacs, G., & Zacchi, G. (2009). Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresource Technology*, **100**(3), 1350-1357.
- Kowalczewski, P. Ł., Olejnik, A., Białas, W., Rybicka, I., Zielińska-Dawidziak, M., Siger, A., ... & Lewandowicz, G. (2019). The nutritional value and biological activity of concentrated protein fraction of potato juice. *Nutrients*, **11**(7), 1523.

- Kowalczewski, P. Ł., Olejnik, A., Rybicka, I., Zielińska-Dawidziak, M., Białas, W., & Lewandowicz, G. (2021). Membrane filtration-assisted enzymatic hydrolysis affects the biological activity of potato juice. *Molecules*, **26**(4), 852.
- Kozhemyakina, N. V., Ananyeva, E. P., Gurina, S. V., & Galynkin, V. A. (2010). Conditions of cultivation, composition, and biological activity of mycelium of *Flammulina velutipes* (Fr.) P. Karst. *Applied biochemistry and microbiology*, **46**, 536-539.
- Kromidas, S. (Ed.). (2011). *Handbuch Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH, 2. Auflage.
- Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Bodirosa, V., Amon, B., & Amon, T. (2009). Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. *Biomass and bioenergy*, **33**(4), 620-627.
- Kuhn, R., Löw, I., & Trischmann, H. (1955). Die Konstitution des solanins. *Chemische Berichte*, **88**(10), 1492-1507.
- Lacou, L., Léonil, J., & Gagnaire, V. (2016). Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocolloids*, **57**, 187-199.
- Landeweert, R., Veenman, C., Kuyper, T. W., Fritze, H., Wernars, K., & Smit, E. (2003). Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. *FEMS Microbiology Ecology*, **45**(3), 283-292.
- Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P., & Besnard, P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *The Journal of clinical investigation*, **115**(11), 3177-3184.
- Lavi, I., Levinson, D., Peri, I., Tekoah, Y., Hadar, Y., & Schwartz, B. (2010). Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Applied microbiology and biotechnology*, **85**, 1977-1990.
- Lee, C. Y., Park, J. E., Kim, B. B., Kim, S. M., & Ro, H. S. (2009a). Determination of mineral components in the cultivation substrates of edible mushrooms and their uptake into fruiting bodies. *Mycobiology*, **37**(2), 109-113.
- Lee, Y. L., Jian, S. Y., & Mau, J. L. (2009b). Composition and non-volatile taste components of *Hypsizigus marmoreus*. *LWT-Food Science and Technology*, **42**(2), 594-598.
- Lenardon, M. D., Munro, C. A., & Gow, N. A. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, **13**(4), 416-423.
- Leonel, M., Do Carmo, E. L., Fernandes, A. M., Soratto, R. P., Ebúrneo, J. A. M., Garcia, É. L., & Dos Santos, T. P. R. (2017). Chemical composition of potato tubers: the effect of cultivars and growth conditions. *Journal of food science and technology*, **54**, 2372-2378.
- Lewis, C. E., Walker, J. R., Lancaster, J. E., & Sutton, K. H. (1998). Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**(1), 45-57.
- LFGB (2024) Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. September 2021 (BGBl. I S. 4253; 2022 I S. 28) letzte Änderung durch Artikel 11 des Gesetzes vom 6. Mai 2024 (BGBl. 2024 I Nr. 149).
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(7), 4692-4696.

- Li, H., Tian, Y., Menolli Jr, N., Ye, L., Karunarathna, S. C., Perez-Moreno, J., ... & Mortimer, P. E. (2021). Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence-based classification system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **20**(2), 1982-2014.
- Liang, S., & McDonald, A. G. (2015). Anaerobic digestion of pre-fermented potato peel wastes for methane production. *Waste management*, **46**, 197-200.
- Lieberei, R.; Reisdorff, C. (2012) *Nutzpflanzen*, Thieme: Stuttgart, 8, überarbeitete Auflage.
- Litwinek, D., Gumul, D., Łukasiewicz, M., Zięba, T., & Kowalski, S. (2023). The effect of red potato pulp preparation and stage of its incorporation into sourdough or dough on the quality and health-promoting value of bread. *Applied Sciences*, **13**(13), 7670.
- Liu, B., Song, J., Li, Y., Niu, J., Wang, Z., & Yang, Q. (2013). Towards industrially feasible treatment of potato starch processing waste by mixed cultures. *Applied biochemistry and biotechnology*, **171**, 1001-1010.
- Liu, B. Y., Zhu, K. X., Guo, X. N., Peng, W., & Zhou, H. M. (2017). Effect of deamidation-induced modification on umami and bitter taste of wheat gluten hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **97**(10), 3181-3188.
- Love, S. L., Herrman, T. J., Thompsonjohns, A., & Baker, T. P. (1994). Effect and interaction of crop management factors on the glycoalkaloid concentration of potato tubers. *Potato Research*, **37**, 77-85.
- Lunen, T. V., Anderson, D. M., St. Laurent, A. M., Nicholson, J. W. G., & Dean, P. R. (1989). The feeding value of potato steam peel for growing-finishing pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, **69**(1), 225-234.
- Lyall, V., Alam, R. I., Phan, D. Q., Ereso, G. L., Phan, T. H. T., Malik, S. A., ... & DeSimone, J. A. (2001). Decrease in rat taste receptor cell intracellular pH is the proximate stimulus in sour taste transduction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **281**(3), C1005-C1013.
- Mäder, J., Rawel, H., & Kroh, L. W. (2009). Composition of phenolic compounds and glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine during commercial potato processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(14), 6292-6297.
- Maga, J. A. (1994). Glycoalkaloids in *solanaceae*. *Food Reviews International*, **10**(4), 385-418.
- Mahmood, A. U., Greenman, J., & Scragg, A. H. (1998). Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and microbial technology*, **22**(2), 130-137.
- Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of microbiological methods*, **71**(1), 7-14.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food chemistry*, **65**(4), 477-482.
- Mars, A. E., Veuskens, T., Budde, M. A., Van Doeveren, P. F., Lips, S. J., Bakker, R. R., ... & Claassen, P. A. (2010). Biohydrogen production from untreated and hydrolyzed potato steam peels by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *International journal of hydrogen energy*, **35**(15), 7730-7737.

- Maruyama, Y., Yasuda, R., Kuroda, M., & Eto, Y. (2012). Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. *PLoS One*, **7**(4), e34489.
- Matissek, R., & Fischer, M. (2021) *Lebensmittelanalytik*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 7. Auflage.
- Mattila, P., Könkö, K., Euroala, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., ... & Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, **49**(5), 2343-2348.
- Mau, J. L., & Ma, J. T. (2001). Effect of 10-oxo-trans-8-decenoic acid on growth of several mushroom mycelia. *Fungi Science*, **16**(3), 4.
- Mayer, F., & Hillebrandt, J. O. (1997). Potato pulp: microbiological characterization, physical modification, and application of this agricultural waste product. *Applied microbiology and biotechnology*, **48**, 435-440.
- Mayer, F. (1998). Potato pulp: properties, physical modification and applications. *Polymer degradation and stability*, **59**(1-3), 231-235.
- McGehee, D. S., Krasowski, M. D., Fung, D. L., Wilson, B., Gronert, G. A., & Moss, J. (2000). Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, **93**(2), 510-519.
- Mensinga, T. T., Sips, A. J., Rompelberg, C. J., van Twillert, K., Meulenbelt, J., van den Top, H. J., & van Egmond, H. P. (2005). Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Regulatory toxicology and pharmacology*, **41**(1), 66-72.
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *European journal of cell biology*, **90**(9), 759-769.
- Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., ... & Wösten, H. A. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal biology and biotechnology*, **7**(1), 5.
- Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., ... & Behrens, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical senses*, **35**(2), 157-170.
- Molitorisová, A., Monaco, A., & Purnhagen, K. P. (2021). An analysis of the regulatory framework applicable to products obtained from mushroom and mycelium. *SSRN*, 3955899.
- Morach, B., Witte, B., Walker, D., von Koeller, E., Grosse-Holz, F., Rogg, J., ... & Schulze, U. (2021). Food for thought: the protein transformation. *Industrial Biotechnology*, **17**(3), 125-133.
- Mukherjee, R., Paul, T., Soren, J. P., Halder, S. K., Mondal, K. C., Pati, B. R., & Das Mohapatra, P. K. (2019). Acidophilic α -amylase production from *Aspergillus niger* RBP7 using potato peel as substrate: a waste to value added approach. *Waste and biomass valorization*, **10**, 851-863.
- Ndou, S. P., Gous, R. M., & Chimonyo, M. (2013). Prediction of scaled feed intake in weaner pigs using physico-chemical properties of fibrous feeds. *British Journal of Nutrition*, **110**(4), 774-780.
- Nebesny, E. (1995). Utilization of potato pulp for baking of bread. *Starch-Stärke*, **47**(1), 36-39.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**(3), 381-390.

- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature*, **416**(6877), 199-202.
- Nicholson, J. W. G., Snoddon, P. M., & Dean, P. R. (1988). Digestibility and acceptability of potato steam peel by pigs. *Canadian journal of animal science*, **68**(1), 233-239.
- Nie, X. H., & Guo, H. C. (2017). An ultra-high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for the detection of steroidal glycoalkaloids in potato samples. *Analytical Methods*, **9**(47), 6613-6621.
- Nielsen, S. D., Schmidt, J. M., Kristiansen, G. H., Dalsgaard, T. K., & Larsen, L. B. (2020). Liquid chromatography mass spectrometry quantification of α -solanine, α -chaconine, and solanidine in potato protein isolates. *Foods*, **9**(4), 416.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*, **70**(4), 571-578.
- Nilsson, K., & Bjurman, J. (1998). Chitin as an indicator of the biomass of two wood-decay fungi in relation to temperature, incubation time, and media composition. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**(6), 575-581.
- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, **67**, 19-28.
- Obidziński, S. (2012). Analysis of usability of potato pulp as solid fuel. *Fuel Processing Technology*, **94**(1), 67-74.
- Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H., & Mori, M. (2002a). Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Current Microbiology*, **45**, 1-4.
- Oda, Y., Saito, K., Ohara-Takada, A., & Mori, M. (2002b). Hydrolysis of the potato glycoalkaloid α -chaconine by filamentous fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, **94**(4), 321-325.
- Ogasawara, M., Katsumata, T., & Egi, M. (2006). Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide. *Food Chemistry*, **99**(3), 600-604.
- Oh, J. Y., Cho, E. J., Nam, S. H., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2007). Production of polysaccharide-peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. *Process Biochemistry*, **42**(3), 352-362.
- Ohsu, T., Amino, Y., Nagasaki, H., Yamanaka, T., Takeshita, S., Hatanaka, T., ... & Eto, Y. (2010). Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(2), 1016-1022.
- Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2013). High salt recruits aversive taste pathways. *Nature*, **494**(7438), 472-475.
- Okine, A., Hanada, M., Aibibula, Y., & Okamoto, M. (2005). Ensiling of potato pulp with or without bacterial inoculants and its effect on fermentation quality, nutrient composition and nutritive value. *Animal feed science and technology*, **121**(3-4), 329-343.
- Ollett, A. L., Kirby, A. R., Clark, S. A., Parker, R., & Smith, A. C. (1993). The effect of water content on the compaction behaviour of potato starch. *Starch-Stärke*, **45**(2), 51-55.
- Orban, A., Hennicke, F., & Rühl, M. (2020). Volatilomes of *Cyclocybe aegerita* during different stages of monokaryotic and dikaryotic fruiting. *Biological Chemistry*, **401**(8), 995-1004.

- Orban, A., Weber, A., Herzog, R., Hennicke, F., & Rühl, M. (2021). Transcriptome of different fruiting stages in the cultivated mushroom *Cyclocybe aegerita* suggests a complex regulation of fruiting and reveals enzymes putatively involved in fungal oxylipin biosynthesis. *BMC genomics*, **22**, 1-23.
- Panagiotopoulos, I. A., Karaoglanoglou, L. S., Koullas, D. P., Bakker, R. R., Claassen, P. A., & Koukios, E. G. (2015). Technical suitability mapping of feedstocks for biological hydrogen production. *Journal of Cleaner Production*, **102**, 521-528.
- Park, Y. J., Baek, J. H., Lee, S., Kim, C., Rhee, H., Kim, H., ... & Kong, W. S. (2014). Whole genome and global gene expression analyses of the model mushroom *Flammulina velutipes* reveal a high capacity for lignocellulose degradation. *PloS one*, **9**(4), e93560.
- Patelski, P., Berłowska, J., Balcerek, M., Dziekońska-Kubczak, U., Pielech-Przybylska, K., Dygas, D., & Jędrasik, J. (2020). Conversion of potato industry waste into fodder yeast biomass. *Processes*, **8**(4), 453.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, **130**(2), 394-403.
- Pereira, D. G., Justus, A., Falcão, H. G., Rocha, T. D. S., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2019). Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. *Journal of food processing and preservation*, **43**(10), e14134.
- Pérez-Moreno, J., Mortimer, P. E., Xu, J., Karunarathna, S. C., & Li, H. (2021). Global perspectives on the ecological, cultural and socioeconomic relevance of wild edible fungi. *Studies in Fungi*, **6**(1), 408-424.
- Pfister, B., & Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and molecular life sciences*, **73**, 2781-2807.
- Phat, C., Moon, B., & Lee, C. (2016). Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. *Food chemistry*, **192**, 1068-1077.
- Piekutin, J., Puchlik, M., Haczykowski, M., & Dyczewska, K. (2021). The efficiency of the biogas plant operation depending on the substrate used. *Energies*, **14**(11), 3157.
- Plassard, C. S., Mousain, D. G., & Salsac, L. E. (1982). Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. *Phytochemistry*, **21**(2), 345-348.
- Poojary, M. M., Orlie, V., Passamonti, P., & Olsen, K. (2017). Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, **234**, 236-244.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., Van den Broek, L. A. M., Van Koningsveld, G. A., & Voragen, A. G. J. (2001). Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(6), 2864-2874.
- Racusen, D., Foote, M. (1980). A major soluble glycoprotein of potato tubers. 1. *Journal of Food Biochemistry*, **4**(1), 43-52.
- Radunz, A. E., Lardy, G. P., Bauer, M. L., Marchello, M. J., Loe, E. R., & Berg, P. T. (2003). Influence of steam-peeled potato-processing waste inclusion level in beef finishing diets: Effects on digestion, feedlot performance, and meat quality. *Journal of animal science*, **81**(11), 2675-2685.

- Ramasamy, U. R., Lips, S., Bakker, R., Gruppen, H., & Kabel, M. A. (2014). Improved starch recovery from potatoes by enzymes and reduced water holding of the residual fibres. *Carbohydrate polymers*, **113**, 256-263.
- Raviraja, N. S., Nikolcheva, L. G., & Bärlocher, F. (2004). Pellet size affects mycelial ergosterol content in aquatic hyphomycetes. *Mycologia*, **96**(2), 388-392.
- Rayburn, J. R., Bantle, J. A., & Friedman, M. (1994). Role of carbohydrate side chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**(7), 1511-1515.
- Reineccius, G. (2005). *Flavor chemistry and technology*. CRC press, Boca Raton, 2. Edition.
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, **50**(2), 191-197.
- Rexen, B. (1976). Studies of protein of potatoes. *Potato Research*, **19**, 189-202.
- Ribeiro, B., de Pinho, P. G., Andrade, P. B., Baptista, P., & Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, **93**(1), 29-35.
- Ride, J. P., & Drysdale, R. B. (1971). A chemical method for estimating *Fusarium oxysporum f. lycopersici* in infected tomato plants. *Physiological Plant Pathology*, **1**(4), 409-420.
- Riera, C. E., Vogel, H., Simon, S. A., & Coutre, J. L. (2007). Artificial sweeteners and salts producing a metallic taste sensation activate TRPV1 receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **293**(2), R626-R634.
- Rizzi, G. P. (1997). Chemical structure of colored Maillard reaction products. *Food Reviews International*, **13**(1), 1-28.
- Roddick, J. G. (1979). Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols *in vitro*. *Phytochemistry*, **18**(9), 1467-1470.
- Rodrigues, M. L. (2018). The multifunctional fungal ergosterol. *MBio*, **9**(5), 10-1128.
- Roebber, J. K., Roper, S. D., & Chaudhari, N. (2019). The role of the anion in salt (NaCl) detection by mouse taste buds. *Journal of Neuroscience*, **39**(32), 6224-6232.
- Running, C. A., Craig, B. A., & Mattes, R. D. (2015). Oleogustus: the unique taste of fat. *Chemical senses*, **40**(7), 507-516.
- Sabotič, J., Trček, T., Popovič, T., & Brzin, J. (2007). Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, **128**(2), 297-307.
- Saito, K., Noda, T., Tsuda, S., Mori, M., Hasa, Y., Kito, H., & Oda, Y. (2006). Effect of the dates of extraction on the quality of potato pulp. *Bioresource technology*, **97**(18), 2470-2473.
- Saito, K., Abe, A., Sujaya, I. N., Sone, T., & Oda, Y. (2007). Comparison of *Amylomyces rouxii* and *Rhizopus oryzae* in lactic acid fermentation of potato pulp. *Food science and technology research*, **10**(2), 224-226.
- Salo-väänänen, P. P., & Koivistoinen, P. E. (1996). Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein (N× 6.25) values. *Food chemistry*, **57**(1), 27-31.
- Sanaei-Moghadam, A., Abbaspour-Fard, M. H., Aghel, H., Aghkhani, M. H., & Abedini-Torghabeh, J. (2014). Enhancement of biogas production by co-digestion of potato pulp with cow manure in a CSTR system. *Applied biochemistry and biotechnology*, **173**, 1858-1869.

- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (2016). Antifungal activity of secondary plant metabolites from potatoes (*Solanum tuberosum* L.): Glycoalkaloids and phenolic acids show synergistic effects. *Journal of Applied Microbiology*, **120**(4), 955-965.
- Schieber, A., & Saldaña, M. D. (2009). Potato peels: a source of nutritionally and pharmacologically interesting compounds-a review. *Food*, **3**(2), 23-29.
- Schiffman, S. S., Sennewald, K., & Gagnon, J. (1981). Comparison of taste qualities and thresholds of D-and L-amino acids. *Physiology & behavior*, **27**(1), 51-59.
- Schindler, A., Dunkel, A., Stähler, F., Backes, M., Ley, J., Meyerhof, W., & Hofmann, T. (2011). Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, **59**(23), 12578-12588.
- Schmidt, C. G., & Furlong, E. B. (2012). Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, **123**, 36-41.
- Schmitz, N., Henke, J. M., & Klepper, G. (2009). Biokraftstoffe: eine vergleichende Analyse. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe. <https://mediathek.fnr.de/biokraftstoffe-eine-vergleichende-analyse.html> (Letzter Zugriff: 17.10.2024).
- Scholten, R. H., Rijnen, M. M., Schrama, J. W., Boer, H., Vesseur, P. C., Den Hartog, L. A., ... & Verstegen, M. W. (2001). Fermentation of liquid coproducts and liquid compound diets: Part 1. Effects on chemical composition during a 6-day storage period. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **85**(5-6), 111-123.
- Schügerl, K., & Rosen, W. (1997). Investigation of the use of agricultural byproducts for fungal protein production. *Process biochemistry*, **32**(8), 705-714.
- Schulz, K., Giesler, L., Linke, D., & Berger, R. G. (2018). A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking toxic peptides in cereal proteins. *Process biochemistry*, **73**, 47-55.
- Scott, K. (2005). Taste recognition: food for thought. *Neuron*, **48**(3), 455-464.
- Serrano, L., Luque, R., Sels, B. F., & Agirre, I. (Eds.). (2020). *Lignin Chemistry*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer International Publishing.
- Shin, K. S., Yu, K. W., Lee, H. K., Lee, H., Cho, W. D., & Suh, H. J. (2007). Production of anti-complementary exopolysaccharides from submerged culture of *Flammulina velutipes*. *Food Technology & Biotechnology*, **45**(3), 319-326.
- Shukla, J., & Kar, R. (2006). Potato peel as a solid state substrate for thermostable α -amylase production by thermophilic *Bacillus isolates*. *World Journal of microbiology and Biotechnology*, **22**, 417-422.
- Silva, S. O., Costa, S. M. G. D., & Clemente, E. (2002). Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué., substrates and residue after cultivation. *Brazilian archives of biology and technology*, **45**, 531-535.
- Šimková, D., Lachman, J., Hamouz, K., & Vokál, B. (2013). Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorus content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. *Food chemistry*, **141**(4), 3872-3880.
- Sinden, S. L., Deahl, K. L., & Aulenbach, B. B. (1976). Effect of glycoalkaloids and phenolics on potato flavor. *Journal of Food Science*, **41**(3), 520-523.

- Smith, R. L., & Gilkerson, E. (1979). Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Analytical biochemistry*, **98**(2), 478-480.
- Solms, J. (1969). Taste of amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**(4), 686-688.
- Sommer, S., Fraatz, M. A., Büttner, J., Salem, A. A., Rühl, M., & Zorn, H. (2021). Wild strawberry-like flavor produced by the fungus *Wolfiporia cocos*— identification of character impact compounds by aroma dilution analysis after dynamic headspace extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**(47), 14222-14230.
- Sommer, S., Hoffmann, J. L., Fraatz, M. A., & Zorn, H. (2023). Upcycling of black currant pomace for the production of a fermented beverage with *Wolfiporia cocos*. *Journal of Food Science and Technology*, **60**(4), 1313-1322.
- Song, Z., Vail, A., Sadowsky, M. J., & Schilling, J. S. (2014). Quantitative PCR for measuring biomass of decomposer fungi in planta. *Fungal Ecology*, **7**, 39-46.
- Spellman, D., O'cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2009). Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry*, **114**(2), 440-446.
- Spindler, M., Stadler, R., & Tanner, H. (1984). Amino acid analysis of feedstuffs: determination of methionine and cystine after oxidation with performic acid and hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **32**(6), 1366-1371.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., ... & Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, **419**(6906), 449-450.
- Steinhaus, P., Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. *Lebensmitteltabelle für die Praxis*, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2023.
- Stephan, A. (2018). *Produktentwicklung von innovativen Lebensmitteln auf Basis einer alternativen Proteinquelle aus Basidiomyceten*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Stephan, A., Ahlborn, J., Zajul, M., & Zorn, H. (2018). Edible mushroom mycelia of *Pleurotus sapidus* as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory tests in comparison to commercial proteins and meat sausages. *European Food Research and Technology*, **244**, 913-924.
- Su, G., Ren, J., Yang, B., Cui, C., & Zhao, M. (2011). Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus oryzae* and commercial proteases. *Food Chemistry*, **126**(3), 1306-1311
- Sujeeta, K. M., Mehta, S., & Sihag, K. (2018). Optimization of conditions for bioethanol production from potato peel waste. *International Journal Chemical Studies*, **6**(1), 2021-2024.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews*, **51**(2), 159-212.
- Taher, B. I., Bennour, H., Fickers, P., & Hassouna, M. (2017). Valorization of potato peels residues on cellulase production using a mixed culture of *Aspergillus niger* ATCC 16404 and *Trichoderma reesei* DSMZ 970. *Waste and biomass valorization*, **8**, 183-192.
- Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **17**(2), 412-436.

- Taylor, T. N., Klavins, S. D., Krings, M., Taylor, E. L., Kerp, H., & Hass, H. (2003). Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, **94**(4), 457-473.
- Teng, B., Wilson, C. E., Tu, Y. H., Joshi, N. R., Kinnamon, S. C., & Liman, E. R. (2019). Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otop1. *Current Biology*, **29**(21), 3647-3656.
- Turquois, T., Rinaudo, M., Taravel, F. R., & Heyraud, A. (1999). Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*, **13**(3), 255-262.
- Ueda, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R., & Kimizuka, A. (1990). Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**(1), 163-169.
- Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M., & Miyajima, R. (1997). Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **61**(12), 1977-1980.
- Ulzijiargal, E., Yang, J. H., Lin, L. Y., Chen, C. P., & Mau, J. L. (2013). Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food Chemistry*, **138**(1), 70-76.
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology*, **1**, 376387.
- van den Dool, H. & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of chromatography*.
- van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B., & Voragen, A. G. (2001). Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(10), 5005-5012
- Velázquez-Cedeño, M. A., Mata, G., & Savoie, J. M. (2002). Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 201-207.
- Venkateshwarlu, G., Chandradhana, M. V., Pandey, M., Tewari, R. P., & Selvaraj, Y. (2000). Volatile flavour compounds from oyster mushroom (*Pleurotus florida*) in submerged culture. *Flavour and fragrance journal*, **15**(5), 320-322.
- 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, zuletzt geändert am 06.09.2019 durch Verordnung (EU) 2019/1381.
- Vetter, J., & Siller, I. (1991). Chitingehalt von höheren Pilzen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **193**(1), 36-38.
- Waglay, A., Karboune, S., & Alli, I. (2014). Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. *Food chemistry*, **142**, 373-382.

- Waglay, A., & Karboune, S. (2016). Enzymatic generation of peptides from potato proteins by selected proteases and characterization of their structural properties. *Biotechnology progress*, **32**(2), 420-429.
- Wakaizumi, M., Yamamoto, H., Fujimoto, N., & Ozeki, K. (2009). Acrylamide degradation by filamentous fungi used in food and beverage industries. *Journal of bioscience and bioengineering*, **108**(5), 391-393.
- Wakayama, M., Yamagata, T., Kamemura, A., Bootim, N., Yano, S., Tachiki, T., ... & Moriguchi, M. (2005). Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32**(9), 383-390.
- Wang, T. Y., Wu, Y. H., Jiang, C. Y., & Liu, Y. (2010). Solid state fermented potato pulp can be used as poultry feed. *British poultry science*, **51**(2), 229-234.
- Wang, W. H., Zhang, J. S., Feng, T., Deng, J., Lin, C. C., Fan, H., ... & Jia, W. (2018). Structural elucidation of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* and its immunomodulation activities on mouse B lymphocytes. *Scientific Reports*, **8**(1), 3120.
- Wang, Y., & Zhang, H. (2021). Advances in the extraction, purification, structural-property relationships and bioactive molecular mechanism of *Flammulina velutipes* polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **167**, 528-538.
- Wang, W., Xiao, G., Du, G., Chang, L., Yang, Y., Ye, J., & Chen, B. (2022a). *Glutamicibacter halophytocola*-mediated host fitness of potato tuber moth on *Solanaceae* crops. *Pest Management Science*, **78**(9), 3920-3930.
- Wang, W., Du, G., Yang, G., Zhang, K., Chen, B., & Xiao, G. (2022b). A multifunctional enzyme portfolio for α -chaconine and α -solanine degradation in the *Phthorimaea operculella* gut bacterium *Glutamicibacter halophytocola* S2 encoded in a trisaccharide utilization locus. *Frontiers in Microbiology*, **13**, 1023698.
- Wang, J., Jiang, S., Miao, S., Zhang, L., Deng, K., & Zheng, B. (2023). Effects of drying on the quality characteristics and release of umami substances of *Flammulina velutipes*. *Food Bioscience*, **51**, 102338.
- Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. (2015). *The fungi*. Academic Press, Waltham.
- Weltring, K. M., Wessels, J., & Geyer, R. (1997). Metabolism of the potato saponins α -chaconine and α -solanine by *Gibberella pilularis*. *Phytochemistry*, **46**(6), 1005-1009.
- Westphal, K. R., Heidelbach, S., Zeuner, E. J., Riisgaard-Jensen, M., Nielsen, M. E., Vestergaard, S. Z., ... & Sondergaard, T. E. (2021). The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, **347**, 109171.
- WHO (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organization technical report series*, **935**, 1-265.
- Wiater, J., & Horysz, M. (2017). Organic waste as a substrat in biogas production. *Journal of Ecological Engineering*, **18**(5), 226-234.
- Wiebe, M. (2002). Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied microbiology and biotechnology*, **58**, 421-427.
- Wiebe, M. G. (2004). Quorn Myco-protein-Overview of a successful fungal product. *Mycologist*, **18**(1), 17-20.

- Wiesenborn, D. P., Orr, P. H., Casper, H. H., & Tacke, B. K. (1994). Potato starch paste behavior as related to some physical/chemical properties. *Journal of Food Science*, **59**(3), 644-648.
- Wu, J. Z., Cheung, P. C., Wong, K. H., & Huang, N. L. (2004). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food chemistry*, **85**(1), 101-105.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., & Sams, C. E. (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**(10), 3888-3894.
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, **10**(3), 127-140.
- Wu, N., Tian, F., Moodley, O., Song, B., Jia, C., Ye, J., ... & Li, C. (2019). Optimization of agro-residues as substrates for *Pleurotus pulmonarius* production. *Amb Express*, **9**, 1-9.
- Xie, C., Gong, W., Yan, L., Zhu, Z., Hu, Z., & Peng, Y. (2017). Biodegradation of ramie stalk by *Flammulina velutipes*: mushroom production and substrate utilization. *Amb Express*, **7**, 1-8.
- Xu, X., Xu, R., Song, Z., Jia, Q., Feng, T., Huang, M., & Song, S. (2019). Identification of umami-tasting peptides from *Volvariella volvacea* using ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and sensory-guided separation techniques. *Journal of Chromatography A*, **1596**, 96-103
- Yamamoto, T., & Inui-Yamamoto, C. (2023). The flavor-enhancing action of glutamate and its mechanism involving the notion of kokumi. *npj Science of Food*, **7**(1), 3.
- Yan, F., Cui, H., Zhang, Q., Hayat, K., Yu, J., Hussain, S., ... & Ho, C. T. (2021). Small peptides hydrolyzed from pea protein and their Maillard reaction products as taste modifiers: Saltiness, umami, and kokumi enhancement. *Food and Bioprocess Technology*, **14**, 1132-1141.
- Yang, J. H., Lin, H. C., & Mau, J. L. (2001). Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food chemistry*, **72**(4), 465-471.
- Yang, J. S., Mu, T. H., & Ma, M. M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food chemistry*, **244**, 197-205.
- Yasar, A., Rasheed, R., Tabinda, A. B., Tahir, A., & Sarwar, F. (2017). Life cycle assessment of a medium commercial scale biogas plant and nutritional assessment of effluent slurry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **67**, 364-371.
- Yu, M., He, S., Tang, M., Zhang, Z., Zhu, Y., & Sun, H. (2018). Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate. *Food Chemistry*, **243**, 249-257.
- Yu, Q., Guo, M., Zhang, B., Wu, H., Zhang, Y., & Zhang, L. (2020). Analysis of nutritional composition in 23 kinds of edible fungi. *Journal of Food Quality*, **2020**(1), 8821315.
- Yu, B., Wu, W., Wang, B., Zhang, N., Bak, K. H., Soladoye, O. P., ... & Fu, Y. (2022). Maillard-reacted peptides from glucosamine-induced glycation exhibit a pronounced salt taste-enhancing effect. *Food Chemistry*, **374**, 131776.
- Yunan, N. A. M., Shin, T. Y., & Sabaratnam, V. (2021). Upcycling the spent mushroom substrate of the grey oyster mushroom *Pleurotus pulmonarius* as a source of lignocellulolytic

enzymes for palm oil mill effluent hydrolysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**(6), 823.

Zhang, Z. Y., Jin, B., Bai, Z. H., & Wang, X. Y. (2008). Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. *Bioresource Technology*, **99**(9), 3871-3876.

Zhang, Y., Venkitasamy, C., Pan, Z., & Wang, W. (2013). Recent developments on umami ingredients of edible mushrooms—A review. *Trends in food science & technology*, **33**(2), 78-92.

Zheng, Y., Wang, Y., Zhang, J., & Pan, J. (2016). Using tobacco waste extract in pre-culture medium to improve xylose utilization for l-lactic acid production from cellulosic waste by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, **218**, 344-350.

Zhang, J., Sun-Waterhouse, D., Feng, Y., Su, G., Zhao, M., & Lin, L. (2019). The umami intensity enhancement of peanut protein isolate hydrolysate and its derived fractions and peptides by Maillard reaction and the analysis of peptide (EP) Maillard products. *Food research international*, **120**, 895-903.

6 Anhang

6.1 Kalibriergraden quantitativer Methoden

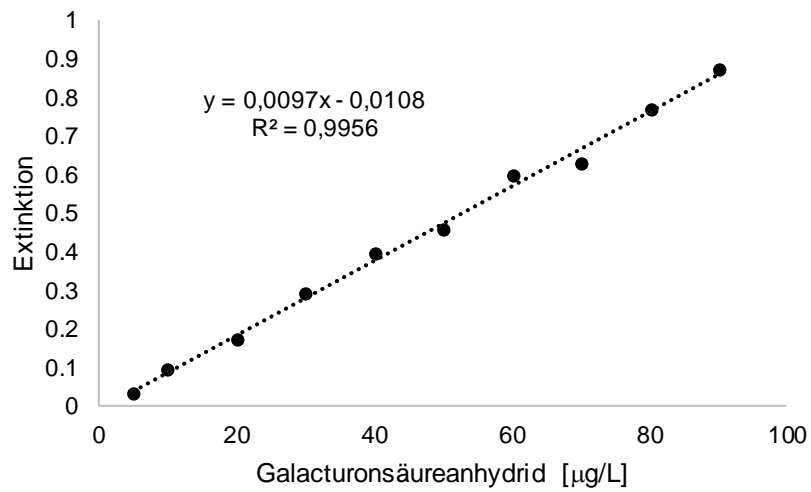


Abbildung 74: Kalibriergerade und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Pektin.

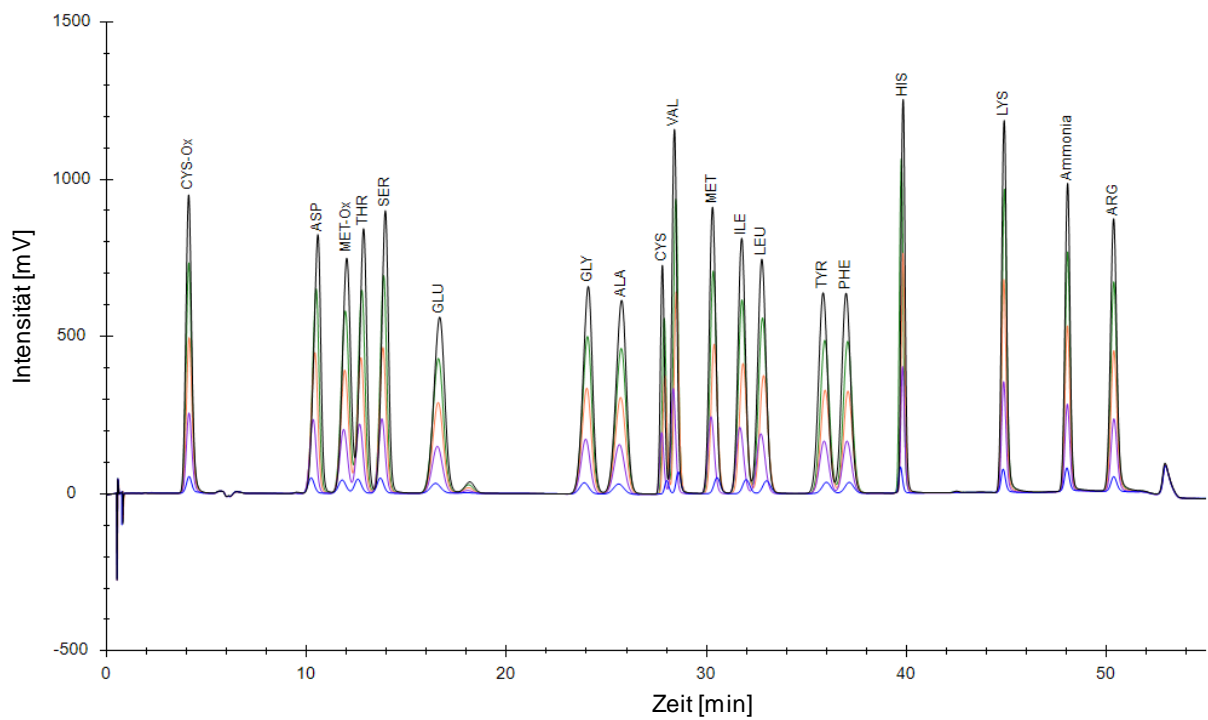


Abbildung 75: Chromatogramm der Kalibrierung der Gesamtaminosäuren sowie der oxidierten Aminosäuren mittels H-Ox-Standardlösung (Sykam).

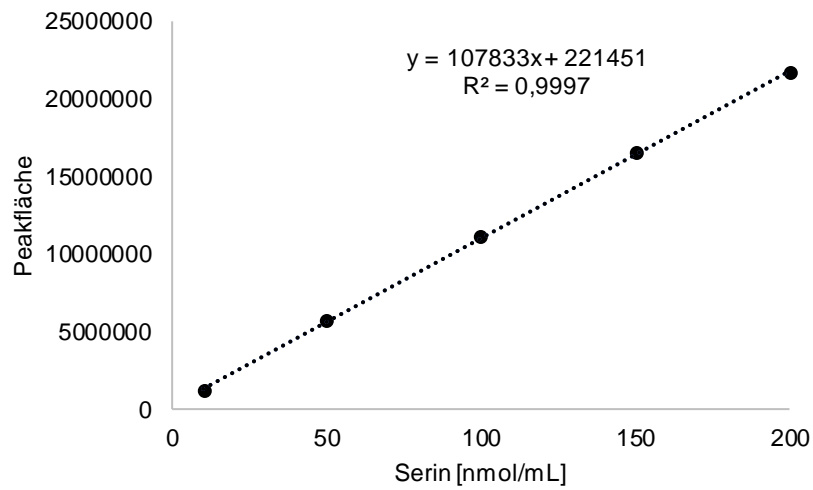


Abbildung 76: Kalibriergrade und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Serin als Beispiel für die Kalibrierung mittels H-Ox-Standardlösung (Sykam) für die Gesamtamino-säuren sowie die oxidierten Aminosäuren.

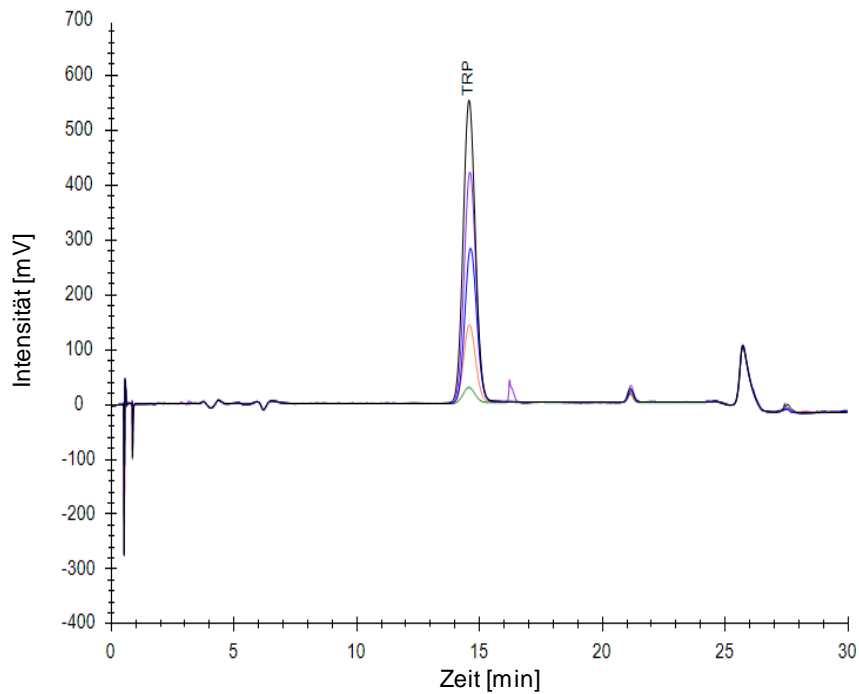


Abbildung 77: Chromatogramm der Kalibrierung von Tryptophan.

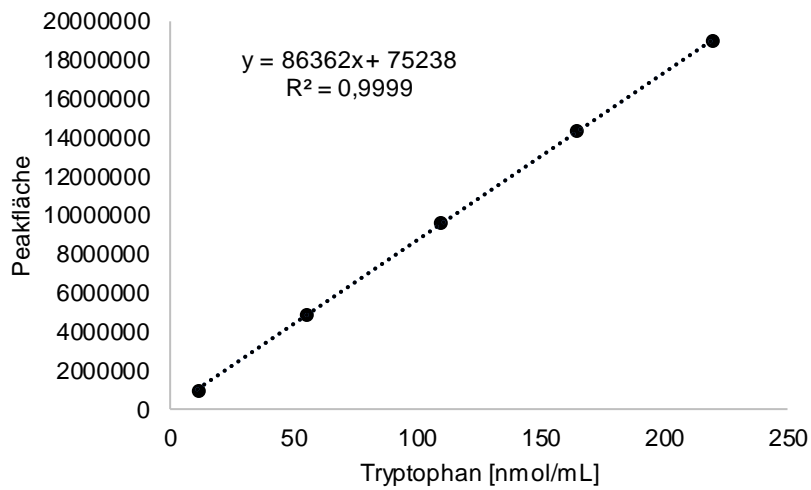


Abbildung 78: Kalibriergrade und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Tryptophan.

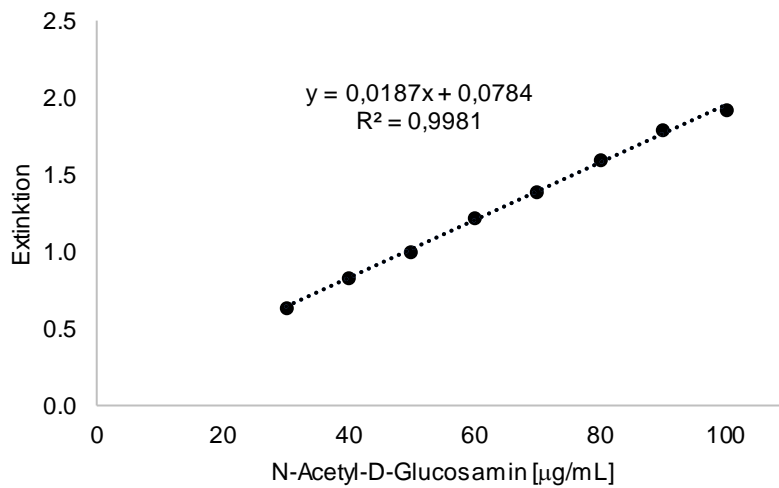


Abbildung 79: Kalibrierung und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Chitin nach Vetter und Siller.

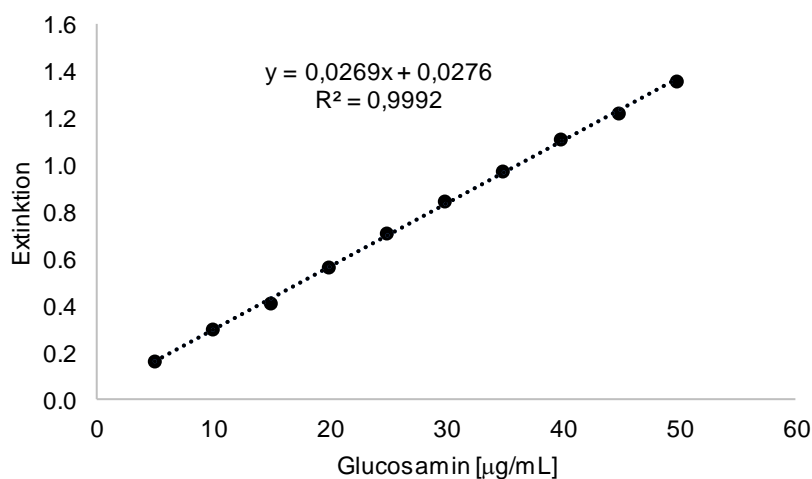


Abbildung 80: Kalibrierung und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Chitin nach Ride und Drysdale.

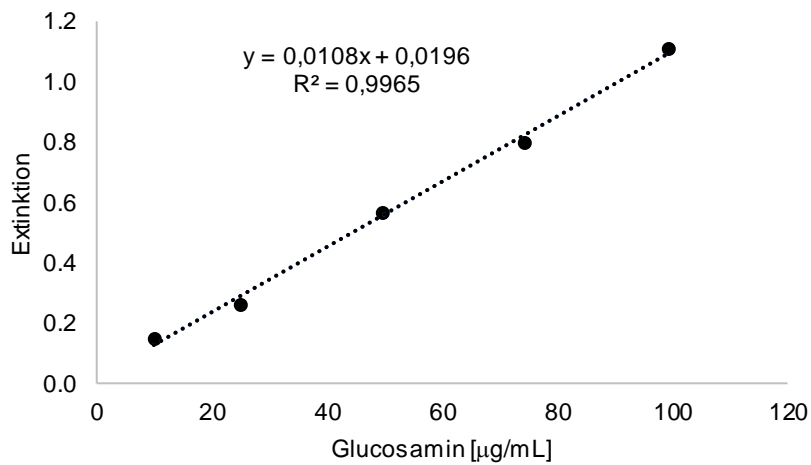


Abbildung 81: Kalibrierung und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Chitin nach Nilsson und Bjurman.

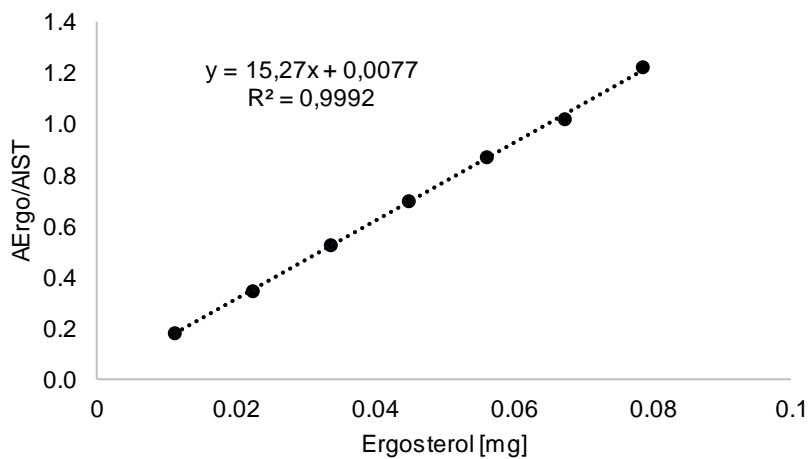


Abbildung 82: Kalibriergerade und Bestimmtheitsmaß zur Quantifizierung von Ergosterol.

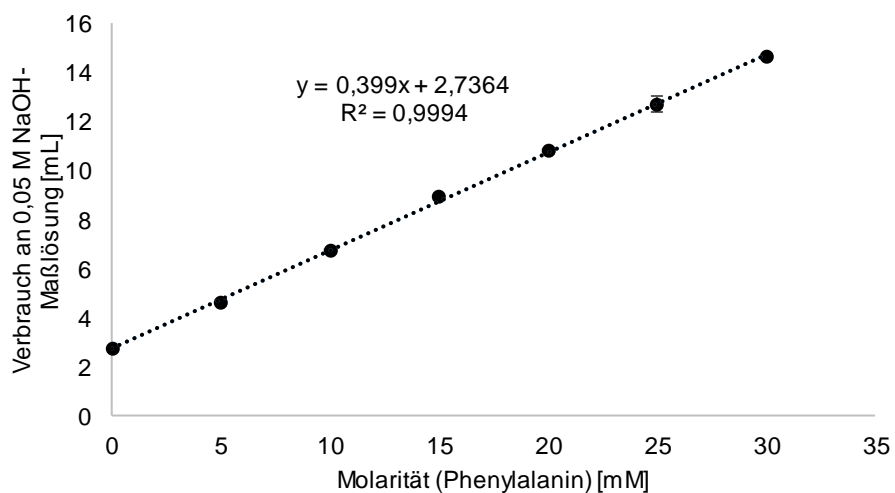


Abbildung 83: Verbrauch an 0,05 M NaOH-Maßlösung [mL] der Formol-Titration in Abhängigkeit zur Molarität [mM] einer Phenylalanin-Lösungen sowie die Funktion und das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade.

6.2 Validierung der Methode zur Bestimmung von Glykoalkaloiden

Tabelle 56: Zur Überprüfung der Linearität herangezogene Parameter dreier Ansätze; N : Anzahl der Kalibrierpunkte; s_{y1} : Reststandardabweichung (linear); s_{y2} : Reststandardabweichung (quadratisch), DS^2 : Differenz der Abweichungsvarianzen; PW : Prüfwert ($\leq 12,25$).

Ansatz 1			
Parameter	α -Solанин	α -Chaconin	Solanidin
N	8	8	9
s_{y1}	1053	3261	6181
s_{y2}	823	3572	6236
DS^2	3260400	966	34104989
PW	4,8	7,6	0,9
Folgerung	linear	linear	linear
Ansatz 2			
Parameter	α -Solанин	α -Chaconin	Solanidin
N	8	8	9
s_{y1}	1505	3414	2486
s_{y2}	1597	3035	4131
DS^2	844475	23879179	-59149123
PW	0,3	2,6	-3,5
Folgerung	linear	linear	linear
Ansatz 3			
Parameter	α -Solанин	α -Chaconin	Solanidin
N	8	8	9
s_{y1}	1150	3093	2018
s_{y2}	1114	1967	1854
DS^2	1741146	38049535	7872218
PW	1,4	9,8	2,3
Folgerung	linear	linear	linear

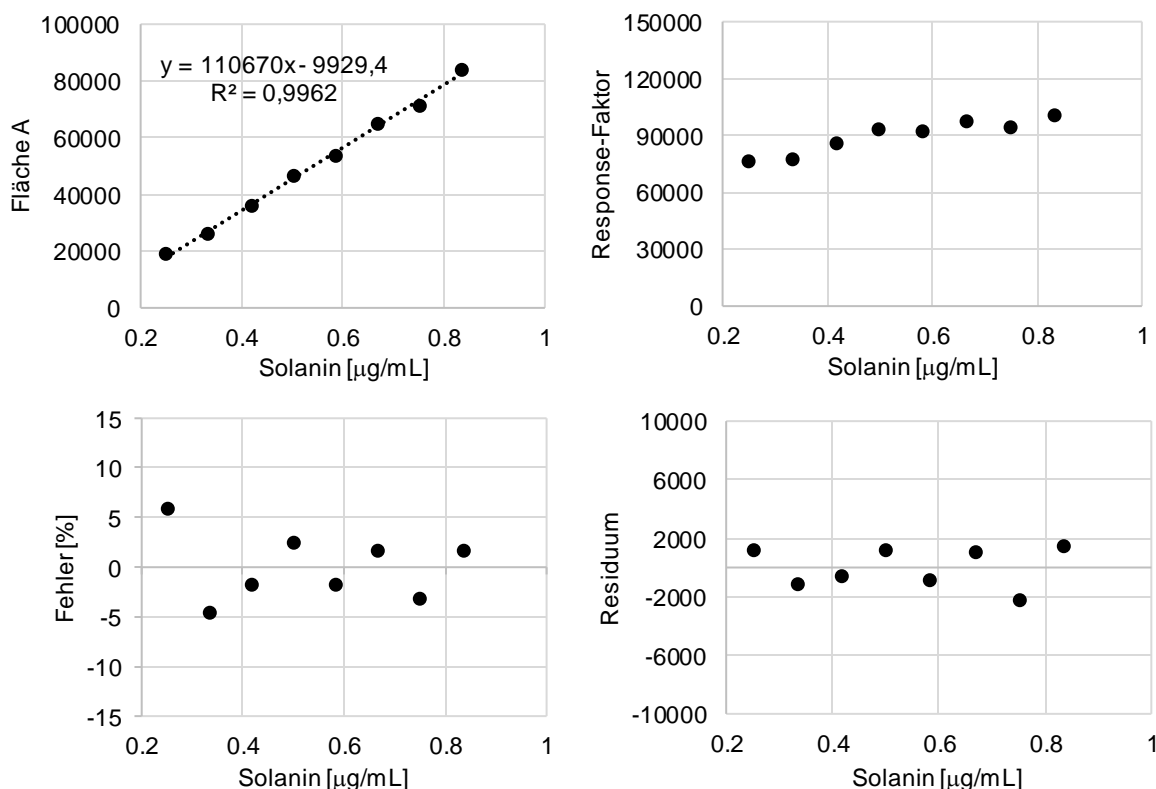


Abbildung 84: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 1 zur Bestimmung von α -Solанин.

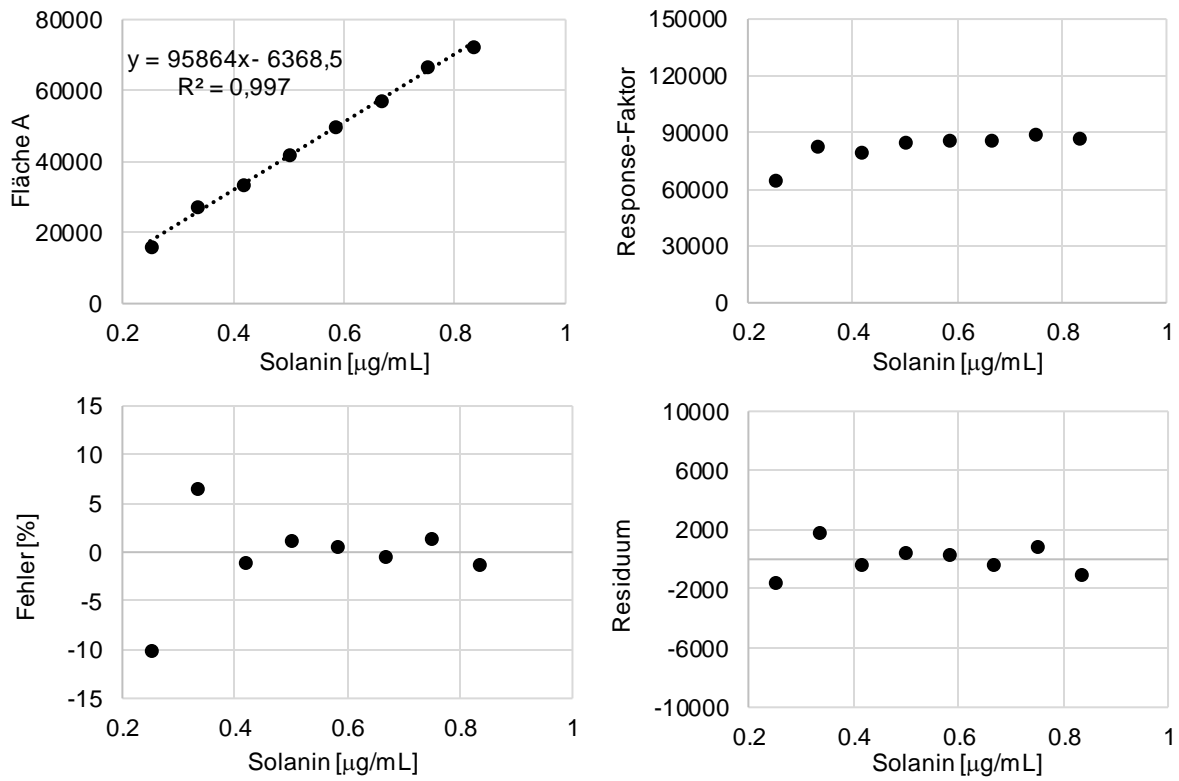


Abbildung 85: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 2 zur Bestimmung von α -Solanin

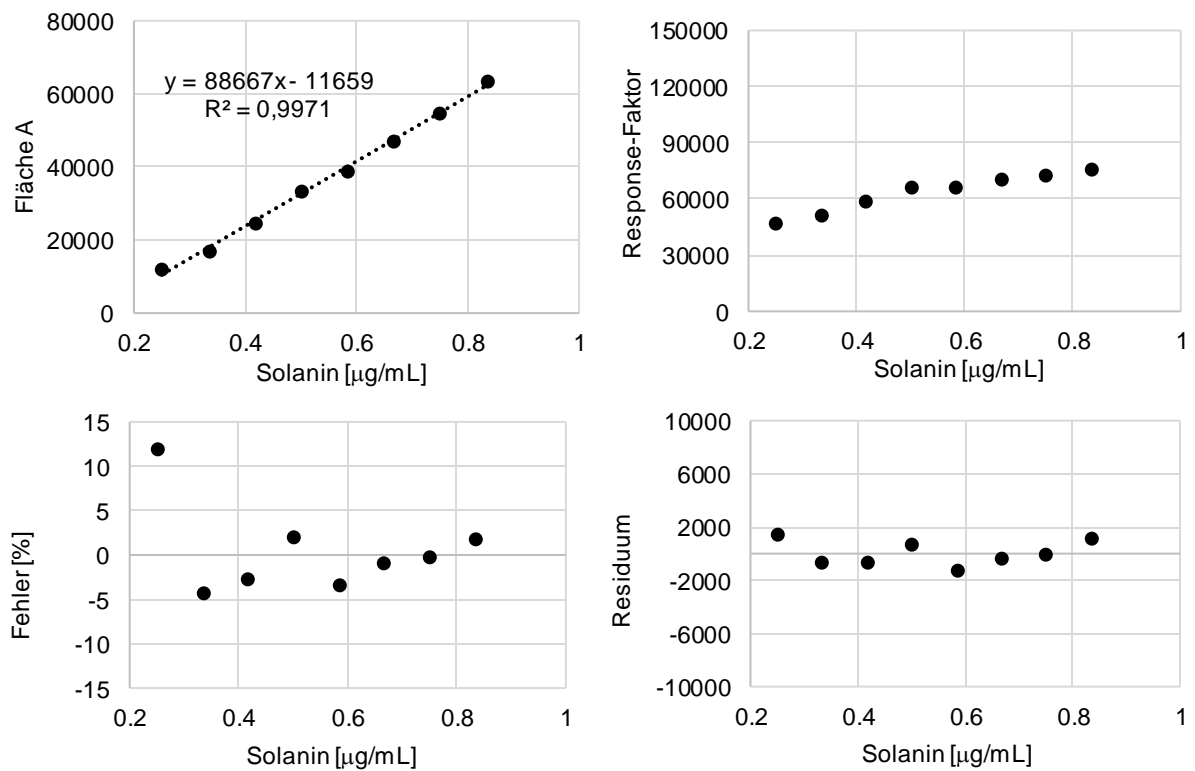


Abbildung 86: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 3 zur Bestimmung von α -Solanin.

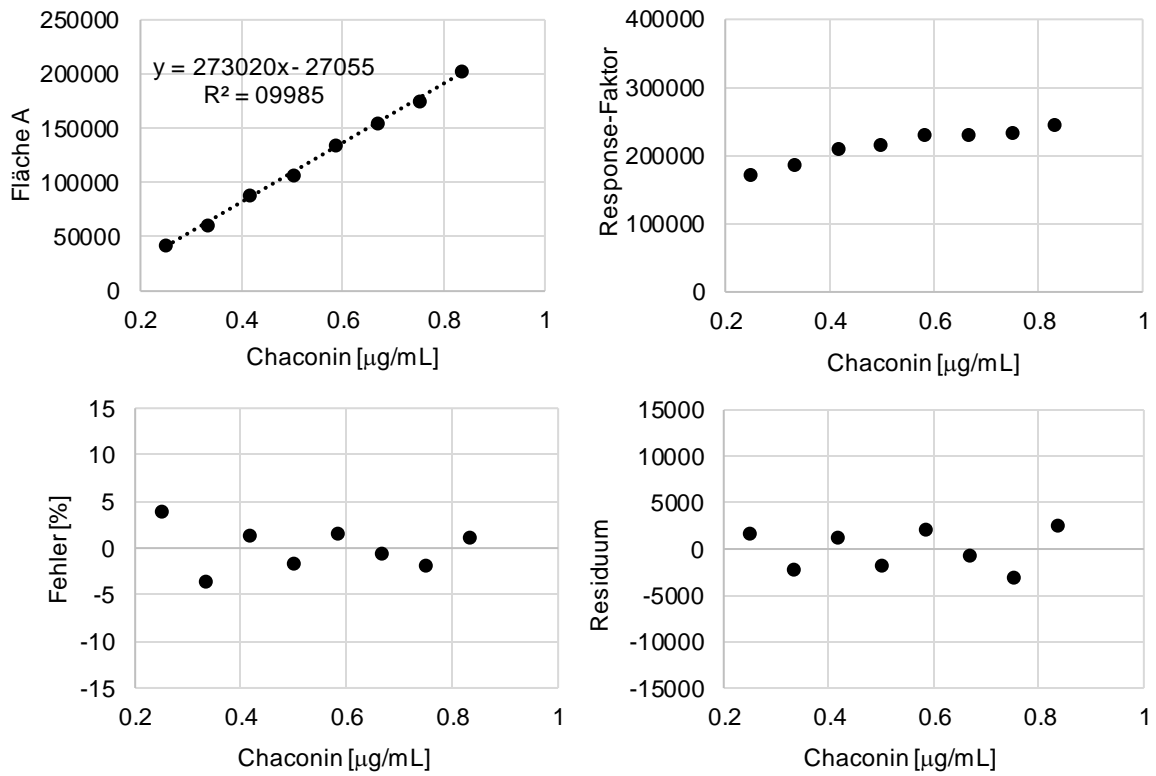


Abbildung 87: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 1 zur Bestimmung von α -Chaconin.

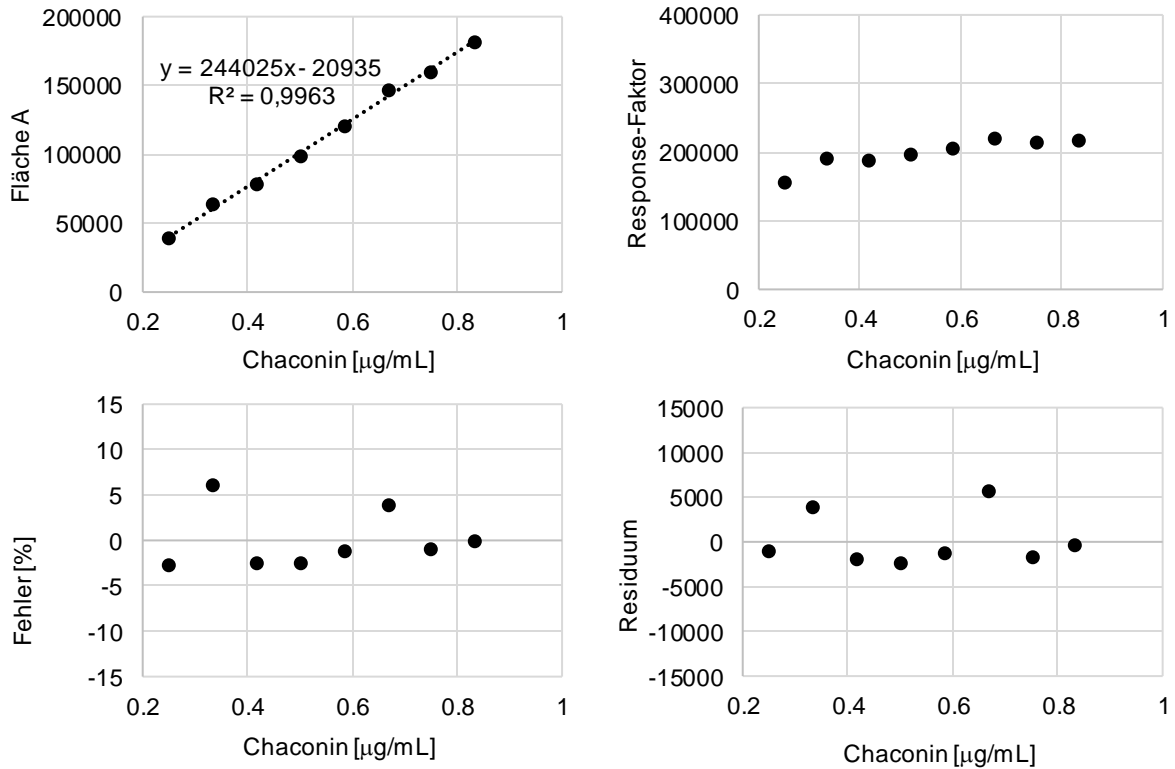


Abbildung 88: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 2 zur Bestimmung von α -Chaconin.

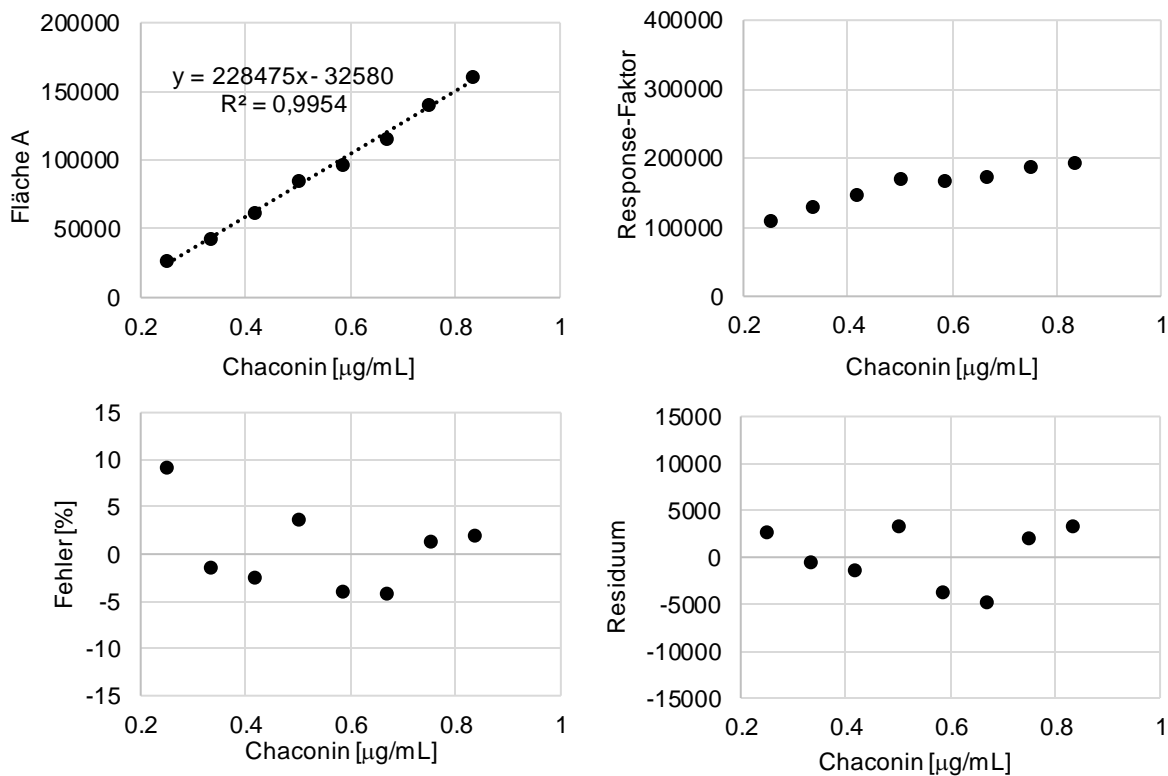


Abbildung 89: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 3 zur Bestimmung von α -Chaconin.

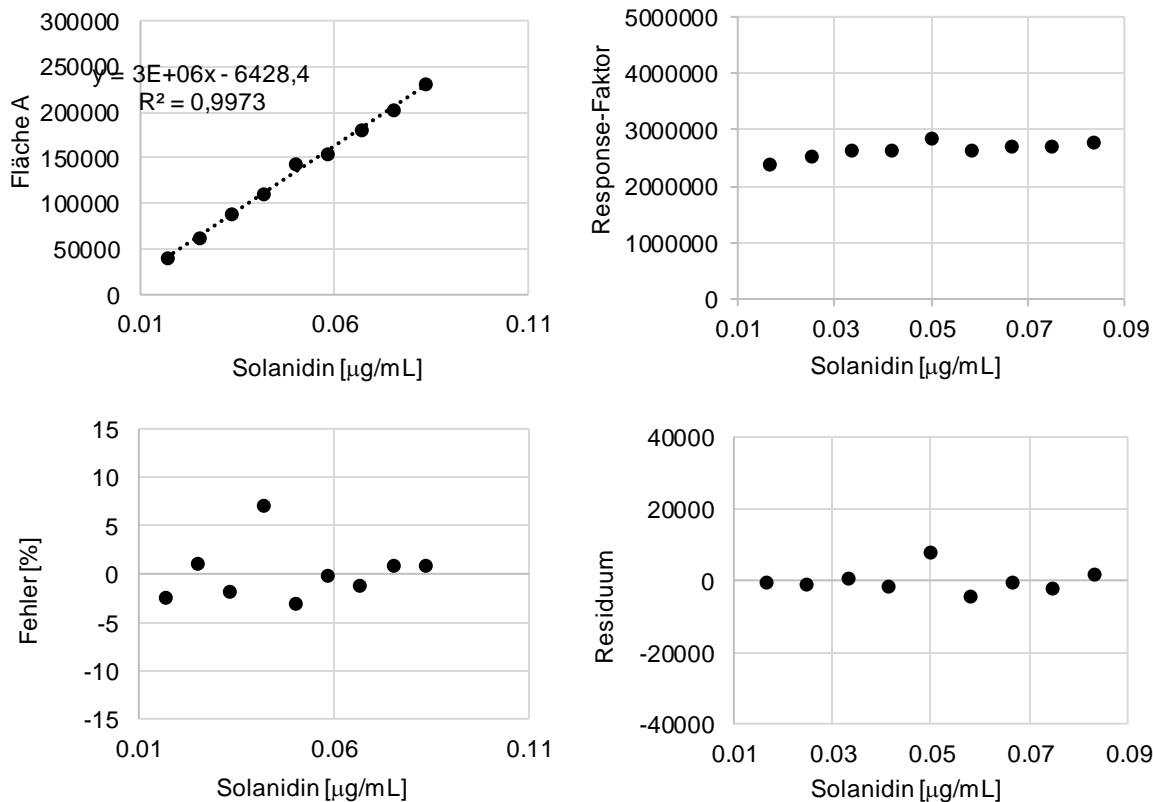


Abbildung 90: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 1 zur Bestimmung von Solanidin.

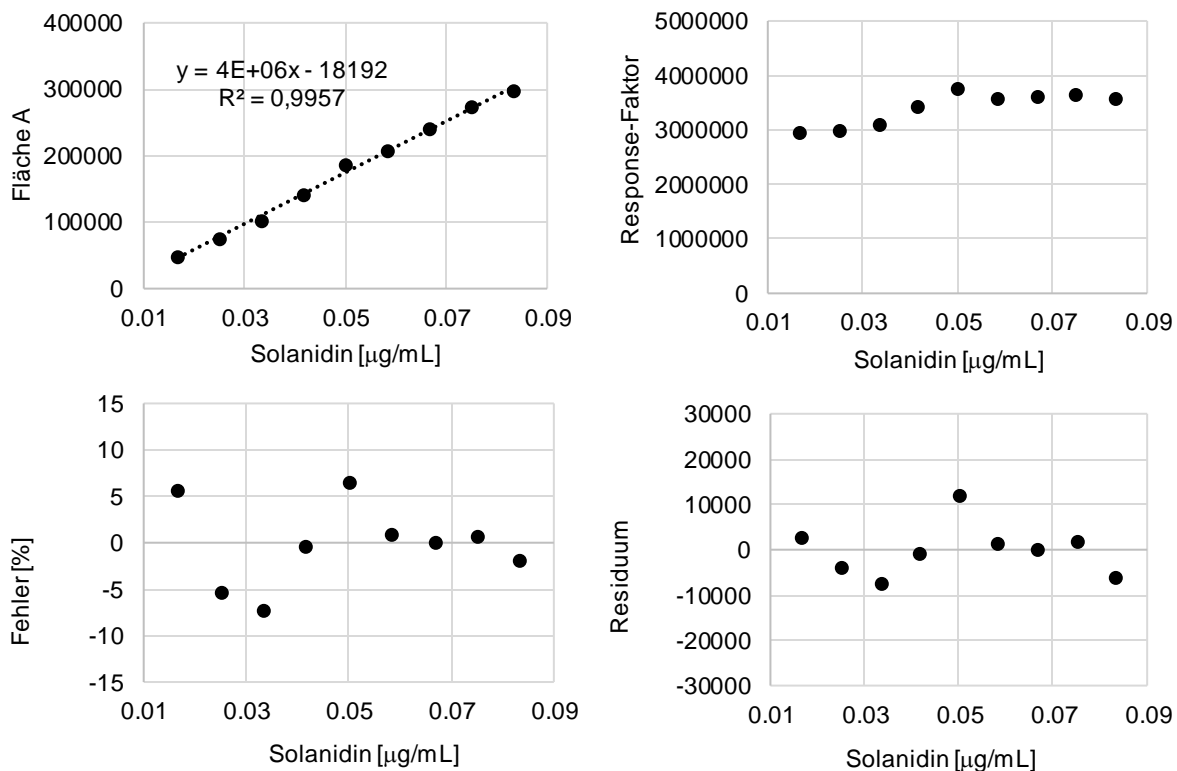


Abbildung 91: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 2 zur Bestimmung von Solanidin.

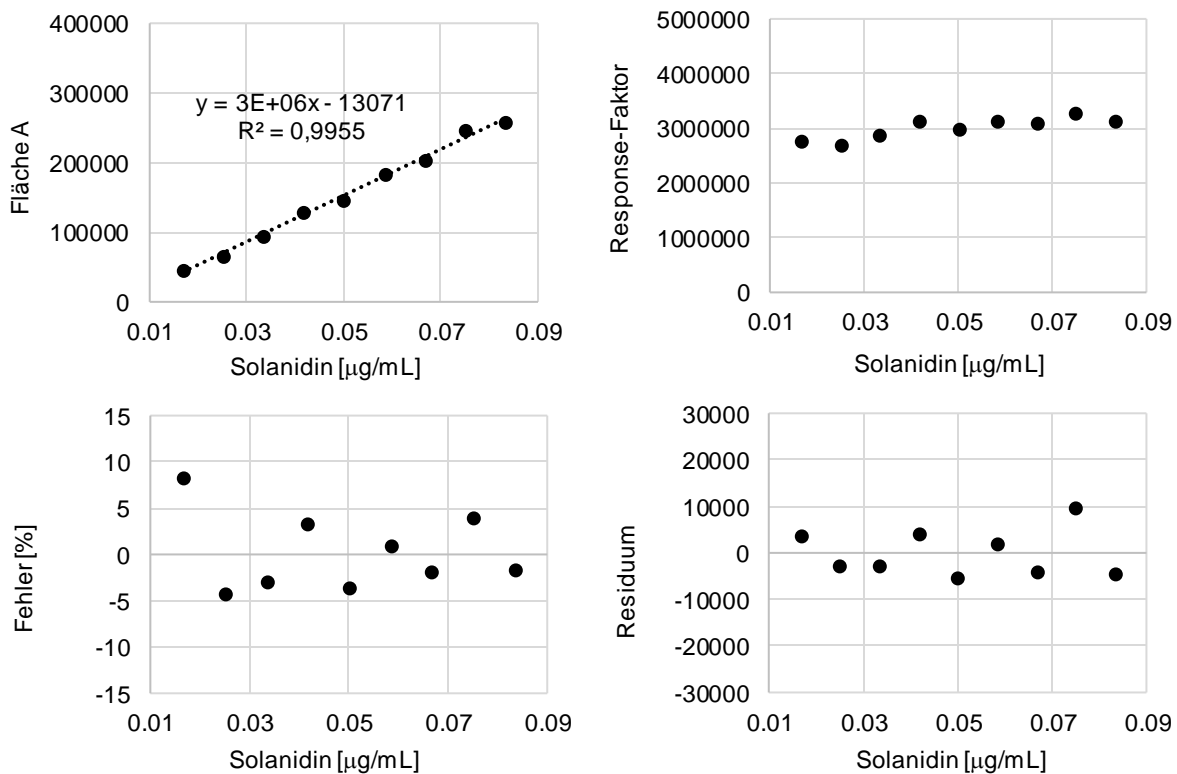


Abbildung 92: Kalibriergrade, Responseplot, Fehlerplot und Residuenplot der Kalibrierreihe 3 zur Bestimmung von Solanidin.

6.3 Aminosäureanalytik

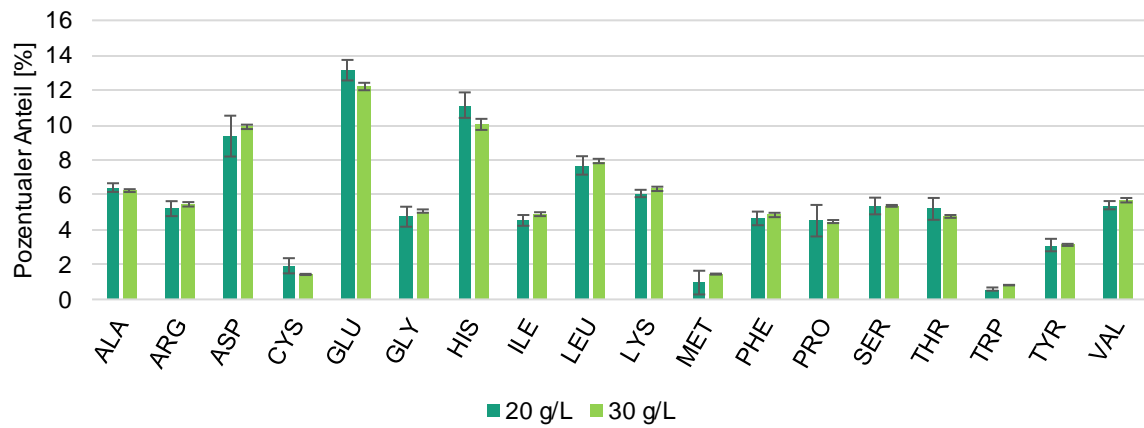


Abbildung 93: Anteile der Aminosäuren an der Summe aller Aminosäuren [%] nach Kultur von *F. velutipes* auf Kartoffeltrester bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (20 g/L, 30 g/L), ($n=3$).