

**Biotechnologische Produktion von  
Basidiomyceten-Proteinen auf industriellen  
Nebenströmen zur Herstellung von  
Nahrungsmitteln**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**M.Sc. Martina Maria Zajul**

geboren am 11. Juli 1986 in Rybnik, Polen

2017

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

*Für meine Eltern*

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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. 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.“

Gießen, Oktober 2017

---

Martina Zajul

## Veröffentlichungen

Ahlborn J, Zajul M, Avci S, Stephan A, Frettlöh M, Calzolari N, Rühl M, Zorn H (2017) Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source; submitted.

Trapp T, Zajul M, Ahlborn J, Stephan A, Zorn H, Fraatz MA (2017) Aroma analysis of a meat-substitute based on basidiomycetous protein. Journal of Agricultural Food Chemistry; im Druck.

## Tagungsbeiträge

### Vorträge

Zajul M, Stephan A, Ahlborn J, Zorn H (2016) Herstellung einer alternativen Proteinquelle durch Submerskultivierung von Basidiomyceten auf industriellen Nebenströmen als Nahrungsmittelrohstoff mit technofunktionellen Applikationen im veganen Modellsystem. Regionalverbandstagung Freiburg, Deutschland, März 2016.

### Poster

Zajul M, Stephan A, Ahlborn J, Trapp T, Zorn H (2016) Herstellung einer alternativen Proteinquelle durch Submerskultivierung von Basidiomyceten auf industriellen Nebenströmen als Rohstoff für vegane Lebensmittel. 45. Deutscher Lebensmittelchemiker Tag Freising, Deutschland, September 2016.

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2014 bis August 2017 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Zorn angefertigt. Finanziell unterstützt wurde das Projekt vom Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand.

Viele Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und ich möchte mich bei allen herzlichst bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Holger Zorn, für die Möglichkeit zur Promotion, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die stete Gesprächsbereitschaft; Herrn Juniorprof. Dr. Martin Rühl für die anregenden Diskussionen und guten Tipps; allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Düring von dem Institut für Bodenkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Messung der Mineralstoffe der Pilzmycelien mittels ICP-OES;

Der Südzucker AG in Mannheim für die Bereitstellung der Isomaltulose-Melasse und der Firma Döhler aus Darmstadt für die Bereitstellung des Karottentresters.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei den MvB Maria Förstner, Madeleine Petri, Nadja Kreuter und Nicole Mika für die tollen Mittagspausen mit vielen anregenden Gesprächen;

Bei Marco Binsch, Marcus Schulze und Michael Goldmann für ihre Hilfe und für die humorvolle Abwechslung im Labor.

Last but not least danke ich meiner Familie, die mich auf all meinen Wegen nach Kräften unterstützt und immer an mich geglaubt hat;

Meinem Freund Mathias für seine Liebe, seine Geduld und seinen Beistand während der gesamten Zeit.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hintergrund .....	1
1.2 Auswirkungen auf den Markt .....	2
1.3 Bedeutung von Pilzen in der Lebensmittelindustrie.....	3
1.3 Zielsetzung .....	5
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Chemikalien.....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Verwendete Chemikalien .....	6
<b>2.2 Verwendete Kits .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 <i>RNeasy® Plant Mini Kit</i> (50) von Qiagen .....	8
2.2.2 QIAxcel RNA von Qiagen.....	9
2.2.3 UV Test zur Bestimmung von D-Glucose/ D-Fructose von Roche .....	9
2.2.4 Assay Kit zur Bestimmung der Gesamtglucane von Megazyme .....	10
<b>2.3 Geräte.....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Verwendete Geräte .....	11
2.3.2 Bioreaktoren.....	13
<b>2.4 Verwendete Basidiomyceten .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Screening.....	14
<b>2.5 Substrate .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6 Kultivierung von Basidiomyceten .....</b>	<b>16</b>
2.6.1 Nährmedien und Lösungen .....	16
2.6.2 Stammhaltung der Basidiomyceten.....	17
2.6.3 Vorkultur.....	18
2.6.4 Hauptkulturen.....	18
2.6.5 Ernte des Mycels.....	19
2.6.6 Kultivierung im 7,5 L Bioreaktor .....	19
2.6.7 Kultivierung im 150 L-Bioreaktor .....	19
<b>2.7 Nährwert-Analytik .....</b>	<b>20</b>
2.7.1 Bestimmung des Feuchtegehalts .....	20
2.7.2 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts nach Kjeldahl .....	20
2.7.3 Bestimmung des Aschegehalts .....	21
2.7.3.1 Mineralstoffe .....	21

2.7.3.1.1	Probenvorbereitung .....	21
2.7.3.1.2	Quantifizierung mittels ICP-OES .....	22
2.7.3.2	Schwermetalle .....	23
2.7.3.2.1	Probenvorbereitung .....	23
2.7.3.2.2	Bestimmung von Blei mittels AAS .....	23
2.7.3.3.3	Bestimmung von Cadmium mittels AAS .....	25
2.7.3.3.4	Berechnung des Biokonzentrationsfaktors .....	26
2.7.4	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts .....	27
2.7.4.1	Bestimmung von Trehalose und Saccharose mittels Hochleistungs- Anionenaustausch-Flüssigkeits-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAE-PAD) .....	27
2.7.4.2	Enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose.....	29
2.7.4.3	Bestimmung des Glucangehalts .....	30
2.7.4.3.1	Bestimmung der Gesamtglucane .....	31
2.7.4.3.2	Bestimmung des $\alpha$ -Glucangehalts.....	32
2.7.4.4	Bestimmung des Chitingehalts.....	32
2.7.5	Bestimmung des Rohfettgehalts .....	34
<b>2.8</b>	<b>Chromatographische Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.8.1	Bestimmung der Gesamtaminosäurezusammensetzung .....	34
2.8.1.1	Saure Hydrolyse .....	35
2.8.1.2	Bestimmung von Methionin und Cystein .....	36
2.8.1.3	Bestimmung von Tryptophan .....	36
2.8.1.4	Ein-Punkt-Kalibrierung .....	37
2.8.2	Bestimmung der Fettsäureverteilung .....	39
2.8.3	Vitamin D <sub>2</sub> - Analytik .....	40
2.8.3.1	Probenvorbereitung .....	41
2.8.3.2	Kalibrierung.....	41
2.8.4	Ermittlung des Pilzgehalts im Lyophilisat .....	43
2.8.4.1	Kalibrierung.....	43
<b>2.9</b>	<b>Berechnungen zur Proteinqualität.....</b>	<b>44</b>
2.9.1	Chemical Score.....	44
2.9.2	Essentieller Aminosäure-Index .....	45
2.9.3	Biologische Wertigkeit.....	45
2.9.4	Berechnung des <i>N:P conversion factors</i> .....	46

---

<b>2.10 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>46</b>
2.10.1 Hitzebehandlung .....	46
2.10.2 Probenvorbereitung.....	47
2.10.3 Extraktion der RNA aus dem Pilzmycel.....	47
2.10.4 Quantifizierung der RNA mittels Kapillargelelektrophorese.....	47
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Screening verschiedener Pilz-Substrat-Kombinationen .....</b>	<b>49</b>
3.1.1 Substratanalytik.....	49
3.1.2 Medienoptimierung.....	50
<b>3.2 Nährwert-Analytik .....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Nährstoff-Zusammensetzung der Pilz-Substrat-Kombinationen .....	51
3.2.2 Zusammensetzung der Kohlenhydrate und Ballaststoffe .....	52
3.2.2.1 Chromatographische Bestimmung von Trehalose und Saccharose ..	52
3.2.2.2 Enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose.....	53
3.2.2.3 Bestimmung des $\beta$ -Glucan-Gehalts .....	54
3.2.2.4 Bestimmung des Chitin-Gehalts.....	55
3.2.3 Fettsäureverteilung der Pilz-Substrat-Kombinationen .....	57
3.2.4 Mineralstoffe und Schwermetalle .....	57
3.2.5 Aminosäureanalytik.....	60
3.2.6 Vitamin D <sub>2</sub> -Analytik .....	63
3.2.6.1 Bestimmung des Mycelanteils im Lyophilisat .....	64
<b>3.3 Bestimmung der Proteinqualität.....</b>	<b>64</b>
3.3.1 Berechnung des Chemical Scores .....	64
3.3.2 Berechnung des Aminosäureindices und der biologischen Wertigkeit ..	66
3.3.3 Berechnung des <i>N:P-Conversion Factors</i> .....	67
<b>3.4 Maßstabsvergrößerung in den 7,5 L- und 150 L-Maßstab .....</b>	<b>67</b>
<b>3.5 Abbau von RNA.....</b>	<b>69</b>
3.5.1 Auswirkungen auf den Proteingehalt.....	69
3.5.3 QIAxcel RNA – Kapillargelelektrophorese.....	71
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Screening geeigneter Pilz-Substrat-Kombinationen.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2 Nährwert-Analytik .....</b>	<b>74</b>
4.2.1 Rohprotein .....	75
4.2.1.1 Aminosäuren.....	75

---

4.2.1.2 Biologische Wertigkeit des Basidiomyceten-Proteins .....	76
4.2.1.3 <i>N:P Conversion factor</i> .....	78
4.2.3 Kohlenhydrate .....	79
4.2.3.1 Mono- und Disaccharide .....	79
4.2.3.2 Ballaststoffe .....	81
4.2.4 Rohfett .....	83
4.2.4.1 Fettsäuremethylester .....	84
4.2.5 Asche .....	85
<b>4.3 Maßstabsvergrößerung .....</b>	<b>89</b>
<b>4.4 Vitamin D<sub>2</sub> Analytik .....</b>	<b>90</b>
4.4.1 Bestimmung des Mycelanteils im Lyophilisat .....	92
<b>4.5 Abbau der RNA.....</b>	<b>92</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>96</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>99</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>114</b>

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalysator
b	Base(n)
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
E	Extinktion
FID	Flammenionisationsdetektor
Fru	Fructose
FSME	Fettsäuremethylester
g	Gramm
Glu	Glucose
GC	Gaschromatographie
HK	Hauptkultur
IM	Isomaltulose-Melasse
IST	Interner Standard
ICP-OES	Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma
konz.	konzentriert
K	Karottentrester
Kg	Kilogramm
L	Liter
MEA	Malzextraktagar
MEM	Malzextraktmedium
mL	Milliliter
mg	Milligramm
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MG	Molekulargewicht
nt	Nucleotide
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
Sac	Saccharose
SE	Spurenelementlösung
spp.	Spezies
Std	Standard

## Abkürzungsverzeichnis

---

techn.	technisch
TM	Trockenmasse
Tre	Trehalose
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichtes
VE	vollentsalzt
VK	Vorkultur

Aminosäuren wurden nach dem internationalen Drei-Buchstaben-Code abgekürzt.

Mineralstoffe wurden entsprechend der Elementsymbole abgekürzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Wozu benötigen wir in der heutigen Zeit alternative Proteinquellen? Eine berechtigte Frage, bedenkt man, dass es ein Überangebot an tierischen Proteinen auf dem Markt gibt, sei es aus Fleisch, Fisch, Milchprodukten oder Eiern. Alternative Proteinquellen sind besonders in Bezug auf die ökologischen Auswirkungen von Nöten. Der Klimawandel schreitet voran, die Meere sind überfischt und die Weltbevölkerung steigt rasant an. Die zunehmende Bevölkerungsdichte führt zwangsläufig zum Rückgang der landwirtschaftlichen Nutzflächen. Die weltweite Abnahme an verfügbarer Ackerfläche ist in Abbildung 1 dargestellt. Von 1965- 2005 hat sich die verfügbare Nutzfläche um ca. 44% verringert, bis 2050 erwartet man einen Rückgang um weitere 45%.

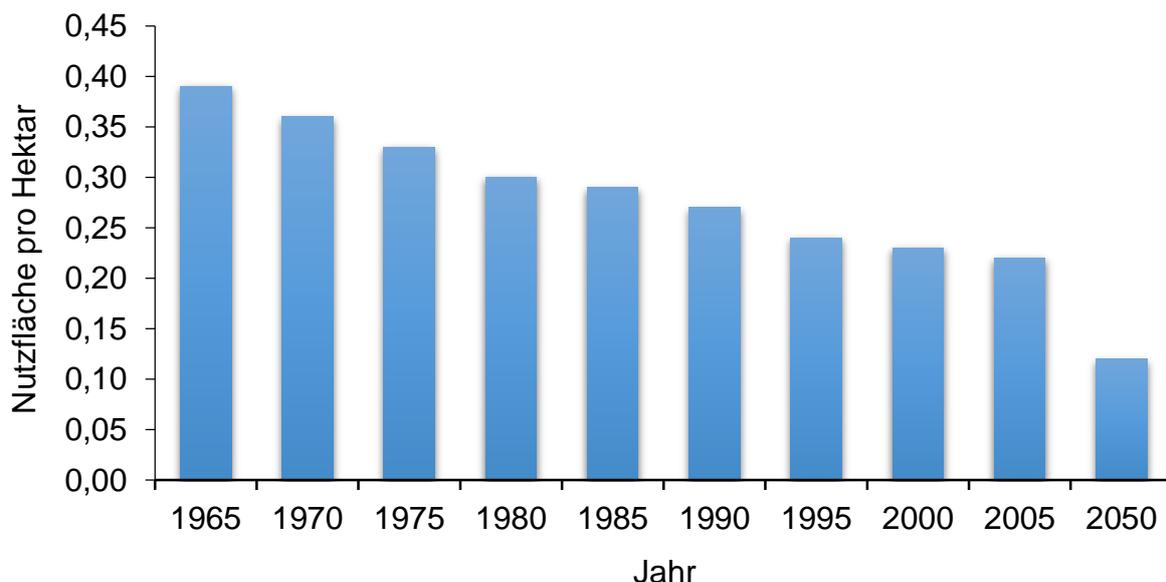


Abbildung 1: Entwicklung der Global verfügbaren landwirtschaftlichen Nutzfläche in Hektar der letzten 52 Jahre und vorraussichtliche Prognose in den nächsten 33 Jahren. Quelle: FAO, UN Population Division, 2008.

Der hohe Fleischkonsum in Deutschland und in den meisten anderen westlichen Ländern (Durchschnitt der Industrieländer ca. 88 kg pro Kopf pro Jahr) geht mit den damit verbundenen Zivilisationskrankheiten wie z.B. Herzkreislaufproblemen und anderen chronischen Erkrankungen (Friel *et al.*, 2009) einher. Den Kontrast dazu findet man größtenteils in Entwicklungsländern vor. In Südasien und Afrika werden

zum Beispiel im Schnitt weniger als 10 kg Fleisch pro Kopf und Jahr verbraucht. Die Folge des daraus resultierenden Ungleichgewichts zwischen Industrie- und Entwicklungsländern ist zunehmender Hunger in der Welt (FAO, Food and Agriculture Organization Vereinigten Staaten, 2015). Eine deutliche Einschränkung des Fleischkonsums der westlichen Länder wäre empfehlenswert. Nach Angaben der Welternährungsorganisation muss das Angebot an Lebensmitteln bis 2050 um 70% gesteigert werden. Hierbei spielt die Proteinversorgung eine entscheidende Rolle. Durch den Mangel an Proteinen, der weitestgehend in den Entwicklungsländern auftritt, aber teilweise auch in Industrieländern zu beobachten ist, kann es zu verschiedenen, teils schweren, Erkrankungen wie Wachstumsstörungen, Gewichtsabnahme und Haarausfall kommen. Eine dauerhafte Protein-Energie-Mangelernährung führt zu Kwashiorkor, Marasmus und dem marasmischen Kwashiorkor. Der Kwashiorkor zeichnet sich durch eine verminderte geistige und körperliche Leistungsfähigkeit aus. Zudem führt er zur Verschlechterung des Abwehrsystems und zur Bildung von Ödemen. Weitere Folgen können Blutarmut und Atembeschwerden sein. Typische Symptome für den Marasmus sind starker Gewichtsverlust, Muskelschwund sowie ein gesenkter Blutdruck und Herzschlag. Der marasmische Kwashiorkor vereinigt die Symptome beider Krankheitsbilder. Zusätzlich zur Problematik des voranschreitenden Mangels in der Proteinversorgung, stellen verstärkt auch religiöse und ethische Motive innerhalb der Bevölkerung die Produktion von Lebensmitteln vor neue Herausforderungen. Die Nachfrage nach Nahrungsmitteln, die beispielsweise halal, kosher oder vegan sind, steigt stetig an.

### 1.2 Auswirkungen auf den Markt

Eine Lösung für die in 1.1 beschriebenen Probleme könnte vegetarische oder vegane Ernährung in den Industrieländern sein. Die Ernährungssituation in den Entwicklungsländern würde dadurch deutlich verbessert werden. Statistiken zufolge sind immer mehr Menschen dazu bereit, ihre Ernährungsweise und den damit verbundenen Fleischkonsum komplett oder teilweise einzuschränken. Die dominierenden Motive, sich für eine vegetarische- oder vegane Ernährungsweise zu entscheiden (laut Statistiken für Deutschland), sind die eigene Gesundheit (43%), gefolgt von Tierschutz (31%) und dem Umweltbewusstsein (14%) ([www.Statista.de](http://www.Statista.de)). Generell ist das Interesse an alternativen Produkten, insbesondere an

Fleischersatzprodukten, in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen (Key *et al.*, 1996; 2007). Durch die wachsende Nachfrage wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an Fleischersatzprodukten auf Basis von pflanzlichen Proteinen, wie z.B. Soja-, Weizen- oder Lupinenproteinen etabliert. Diese Proteinquellen haben jedoch einen entscheidenden Nachteil: Sie können Allergien, Kreuzallergien und Unverträglichkeiten auslösen (Cordle, 2004).

Das steigende Ressourcenbewusstsein und wirtschaftliche Motive treiben die Suche nach alternativen Proteinen voran. Eine umweltfreundliche Alternative ohne bekannte Nachteile sind Pilze. Bereits Mitte der sechziger Jahre wurde von Experten eine drastische Zunahme der Weltbevölkerung vorhergesagt, die in einer globalen Proteinnot enden würde. Ein bis dahin unbekannter Filmemacher nahm sich dieser Problematik an und legte mit Dr. Arnold Spicer den Grundbaustein der Firma Marlow Food, die das bekannteste Fleischersatzprodukt auf Basis von Pilzproteinen, das sogenannte Quorn<sup>TM</sup>, entwickelt hat. Quorn<sup>TM</sup> gibt es seit Mitte der achtziger Jahre auf dem Markt. Die Grundlage für Quorn<sup>TM</sup> wird fermentativ aus dem Schimmelpilz *Fusarium venenatum* gewonnen und im Laufe des Prozesses mit Ei-Eiweiß und Milcheiweiß angereichert. Dabei entsteht das sogenannte Mycoprotein (Wiebe, 2002). Aufgrund des Zusatzes von tierischen Proteinen sind Quorn<sup>TM</sup>-Produkte lediglich für Vegetarier geeignet. Die Problematik der Unverträglichkeiten besteht auch hier weiterhin.

### 1.3 Bedeutung von Pilzen in der Lebensmittelindustrie

Pilze werden seit vielen Jahren auf Grund ihres Geschmackes, ihrer ökonomischen und ökologischen Vorteile und ihrer medizinischen Eigenschaften konsumiert und geschätzt (Sanchez, 2010). Pilze bestehen aus ca. 90% Wasser und 10% Trockenmasse. Aus ernährungsphysiologischer Sicht haben Pilze eine attraktive chemische Zusammensetzung. Sie sind reich an Protein und Kohlenhydraten, haben einen niedrigen Fettgehalt und sind eine gute Quelle für Mineralien. Die Aminosäurezusammensetzung ist ausgewogen und enthält alle essentiellen Aminosäuren (Maftoun *et al.*, 2015). Ihre Ernährungswerte sind mit denen von Obst, Gemüse, Eiern, Milch und Fleisch (Oei, 2003) vergleichbar. Der Energiewert von

frischen Pilzen liegt zwischen 250 und 350 cal kg<sup>-1</sup>, wodurch sich Pilze als ideale Grundlage für die Lebensmittelbiotechnologie eignen.

Während der biotechnologischen Herstellung von Lebensmitteln kommen seit Jahrhunderten Mikroorganismen zum Einsatz. Am weitesten verbreitet ist die alkoholische Gärung bei Bier und Wein. Die hier verwendeten Hefen werden zur Produktion von Ethanol eingesetzt. Das Getränk soll, bedingt durch den Alkoholgehalt, haltbar gemacht und gegen mikrobielles Wachstum geschützt werden. Des Weiteren dienen z.B. Schimmelpilze wie *Penicillium camembertii* oder *Penicillium gorgonzola* der Geschmacksgebung für einige Schimmelkäsesorten (Wainwright, 1995). In den ostasiatischen Ländern werden Pilze zur Fermentation verschiedener Lebensmittel (Sojasauce, Tempeh, Miso) eingesetzt. Bei der Herstellung von Tempeh werden Sojabohnen mit *Rhizopus* spp. Sporen beimpft und wenige Tage bei 30 °C inkubiert. Tempeh zählt unter Vegetariern als sehr bekömmliches Fleischersatzprodukt.

Weltweit am häufigsten angebaut werden die drei Speisepilze *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* und *Pleurotus ostreatus* (Reis *et al.*, 2012). Diese Speisepilze gehören zu den Basidiomyceten (Ständerpilzen), zu denen bis zu 30.000 verschiedene Arten zählen (Kirk and Ainsworth, 2008). Durch ihr einzigartiges Enzymsystem sind z.B. Weißfäulepilze in der Lage, komplexe Strukturen wie Lignin abzubauen und für ihren Stoffwechsel zu nutzen.

Industrienebenströme wie Obst- und Gemüseabfälle sind aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung anfällig für den Verderb. Diese Umstände führen zum einen zur Ausbreitung von Krankheiten und zum anderen zum Verlust potentieller Ressourcen. Diese Nebenströme können jedoch weiter verwertet werden. So ist aus früheren Publikationen (Onuoha *et al.*, 2009; Manu-Tawiah *et al.*, 1987; Bisaria *et al.*, 1986) bekannt, dass Pilze in der Lage sind, Industrie- (Agrar-)nebenströme zu verwerten und für ihren Stoffwechsel zu nutzen. Ein weiterer Vorteil bei der Nutzung von Pilzen ist das in den Zellwänden vorkommende Ergosterol. Trotz ausgewogener Ernährung entsteht möglicherweise ein Mangel an Vitamin D, der aufgrund von fehlenden tierischen Nahrungsmitteln auftreten kann. 1935 publizierten Schneunert *et al.* erstmals über Vitamin D-Gehalte von wild wachsenden Pilzen. Ergosterol kann durch

Bestrahlung mit UV-B Strahlen in Vitamin D<sub>2</sub> umgewandelt (Wittig *et al.*, 2013) werden.

### 1.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung proteinreicher, mineralstoffreicher und fettarmer Basidiomyceten-Mycelien, als Basis für die Herstellung von innovativen Lebensmitteln. Kultiviert wurde mittels Submers-Verfahren im Bioreaktor. Die zur Fermentation verwendeten Ressourcen stammten ausschließlich aus (agro-)industriellen Nebenströmen, wie zum Beispiel Karotten- und Zwiebeltrester, aber auch Isomaltulose- und Rübenmelasse. Das Produkt wurde komplett frei von tierischem Material produziert und hat großes Potenzial, eine gesunde Basis für vegetarische und vegane Lebensmittel zu werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
3-methyl-2-benzthiazolon Hydrazon Hydrochlorid	HPLC-Grade	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Acetonitril	HPLC-Grade	VWR, Darmstadt
Agar-Agar	f.d. Mikrobiologie	Merck Darmstadt
Ammoniumnitrat	>98,5%	Bernd Kraft, Duisburg
Anilin	Zur Analyse	Merck
Borsäure	>99,5%	Fluka AG, Steinheim
Chitin aus Krabbenschalen	100%	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cholecalciferol	100%	Sigma
D-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Merck
D-Fructose	99,5%	Merck
D-Saccharose	99,5%	Merck
D-Trehalose	100%	Spectrum Chemical, New jersey, USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	≥97%	Roth
Diethylether	min. 99,5 %, Ph.Eur.	Roth
Diphenylamin	Zur Synthese	Merck
EDTA	min. 99%	AppliChem
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	100% p.a.	Appllichem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	96%	J.T.Baker, München
Ethanol, unvergällt	96,4%	KWS
Ethanol	HPLC-Grade	Roth

## 2 Materialien und Methoden

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Ethanol, vergällt	96,4%, mit Petrolether vergällt	KWS
Kaliumhydroxid	85%	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	≥98%	Roth
Kaliumhexacyanoferrat-(II)-trihydrat	≥99%	Roth
Karottentrester	gebleicht	Döhler, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	p. a.	Fluka
Kjeldahl-Tabletten		Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	zur Analyse	AppliChem
L-Asparagin-Monohydrat	99%	Merck
Magnesiumsulfat-Hydrat	≥99%	Carl Roth
Malzextrakt		Fluka AG
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	zur Analyse	AppliChem
Methanol	HPLC-Grade	Baker
Mixed indicator acc. to SHER		Büchi Labortechnik GmbH, Krefeld
Multi 28 Elementelösung	1 mg L <sup>-1</sup>	Roth
N-Acetyl-D-Glucosamin	100%	Sigma-Aldrich
n-Pentan	99%	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Natriumacetat	100%	Roth
Natriumascorbat	100%	VWR
Natriumchlorid	99,5% p. a.	Roth
Natriumnitrit	100% p.a.	Merck
Natriumsulfamat	p.a.	VWR
Natriumsulfat, wasserfrei	min. 99 %	Roth
Natronlauge	25%, reinst	Merck
Isomaltulose-Melasse		Südzucker, Wabern
Pepton aus Sojabohnenmehl, enzymatisch verdaut		Fluka
Petrolether	35-65 °C	Chemsolute, Renningen
Phenol	100%	Merck, Darmstadt
Ribonuklease A		Amresco, Solon, USA

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Salzsäure	0,1 mol L <sup>-1</sup> , Maßlösung; 25%, reinst; 37% rauchend	Roth
Schwefelsäure	98%	Roth
Zink-(II)-sulfat-Heptahydrat	zur Analyse	AppliChem
Zinkacetat-Dihydrat	min. 99%, Ph.Eur.	Roth
Zwiebeltrester	frisch	Symrise, Holzminden

## 2.2 Verwendete Kits

### 2.2.1 RNeasy® Plant Mini Kit (50) von Qiagen

Tab. 2.2: Kit zur Isolierung von RNA

RLC-Puffer	Guanidin- Hydrochlorid
RPE-Puffer	
Sammelröhrchen	1,5 mL, 2 mL
QIAshredder Spin-Säule (lila)	
RNase-freies Wasser	
RNeasy Mini Spin-Säule (pink)	

### 2.2.2 QIAxcel RNA von Qiagen

Tab. 2.3: RNA Probenvorbereitungskit

---

QIAxcel RNA Quality Control Cartridge	
QX RNA Größenmarker	200-6000 nt
QX 12-Tube-Streifen	0,2 mL
QX Intensität-Kalibrierungs-Marker	
QX Mineralöl	
QX RNA Aligement Marker	
QX RNA Denaturierungs-Puffer	
QX RNA Verdünnungs-Puffer	
QX Separations-Puffer	
QX Wasch-Puffer	

---

### 2.2.3 UV Test zur Bestimmung von D-Glucose/ D-Fructose von Roche

Tab. 2.4: Enzymatische Bestimmung von D-Glucose/ D-Fructose

---

Lösung 1:	Triethanolaminpuffer, pH 7,6; NADP, 64 mg; ATP 160 mg; Magnesiumsulfat
Lösung 2	Hexokinase 200 U; Glucose-6-phosphat- Dehydrogenase, 100 U;
Lösung 3	Phosphoglucose-Isomerase, 490 U
Lösung 4	D-Glucose Testlösung

---

### 2.2.4 Assay Kit zur Bestimmung der Gesamtglucane von Megazyme

Tab. 2.5: Zusammensetzung des Assay Kits

---

<i>exo</i> -1,3- $\beta$ -Glucanase	20 U mL <sup>-1</sup>
$\beta$ -Glucosidase	4 U mL <sup>-1</sup>
GOPOD-Reagenz	Glucoseoxidase, Peroxidase, 4-Aminoantipyrin, <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure, Natriumazid
Amyloglucosidase	1,630 U mL <sup>-1</sup>
Invertase	500 U mL <sup>-1</sup>

---

## 2.3 Geräte

### 2.3.1 Verwendete Geräte

Tab. 2.6: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Aminosäure-Analysator	S 433	SYKAM Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck
Atomabsorptionsspektrometer	iCE 3000 Series	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Autoklav	Laboklav 160 MSL; Laboklav 25B	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
DC-Platten	Kieselgel 60 G auf Aluminiumfolie	Merck KGaA, Darmstadt
Dispensette	25 mL	Brand
Dispergiergerät	T 25 digital ULTRA- TURRAX®	IKA®
Eismaschine	AF 80	Scotsman® Ice Systems, Vernon Hills, USA
Erlenmeyerkolben (250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL, 5000 mL)	enghalsig	Kavalierglass, a.s., Prag, Tschechien
Feuchtegehaltbestimmer	MA 35	Sartorius AG, Göttingen
Gaschromatograph-FID	7890A GC System	Agilent Technologies, Ratingen
Gaschromatograph-MS	7890A GC System	Agilent Technologies
Gasbrenner	Gasprofi 1 micro	Wild-TEC, Göttinge
Hydrotherm	DANN6	C. Gerhardt GmbH & Co. KG. Königswinter
Dionex	ICS 3000	Thermo Fisher Scientific
Kjeldahl-Aufschlussapparatur	Digestion Unit K-435	Büchi Labortechnik GmbH, Krefeld
Kjeldahl-Kolben	Sample tube, 300 mL	Büchi Labortechnik

## 2 Materialien und Methoden

Gerät	Modell	Hersteller
Kolbenhubpipetten	Transferpette <sup>®</sup> S 2-20 µL 20-200 µL 100-1000 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Lyophilisator	ALPHA 1-2 LD Plus	Martin Christ Gefrier- trocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Magnetrührer	RH B2	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG,Staufen
Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma	Varian 720ES	Agilent Technologies
Messkolben	10-1000 mL	Duran Group GmbH, Wertheim
Messzylinder	50- 1000 mL	Duran Group GmbH
Muffelofen	L9/11/B 180	Nabertherm GmbH, Lilienthal
Orbitalschüttler	Gyro-Rocker SSL3	Stuart, Staffordshire, England
pH-Meter	S20 SevenEasy <sup>™</sup> pH	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
Präzisionswaage	BP 211 D	Sartorius
Photometer	NanoPhotometer Pearl	Implen GmbH, München
QIAxcel Advanced System	Automatisches DNA- und RNA- Analysegerät	Qiagen, Hilden
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-300	Büchi Labortechnik
Soxtherm-Anlage	SE-416	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Sterilbank	KS 18 1/PE AC	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Strohmühle	PX-MFC 90 D	Kinematica, Littau-Luzern
Thermomixer	MKR 13	HLC Bio Tech, Bovenden
Trockenschrank	DL 53	VWR, Radnor, USA
ULTRA-TURRAX <sup>®</sup>	IKA <sup>®</sup> T25 digital	IKA <sup>®</sup>
Ultraviolett PCR Werkbank	Peqlag	VWR Peqlab

Gerät	Modell	Hersteller
Vortex	Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS Co, Ltd., Tokio
UV/VIS-Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena AG, Jena
Umwälzkühler	Unichiller 009Tw-MPC plus	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
Wasserbad	WNB 29	Memmert, Schwabach
Wasserdampfdestillationsanlage	B-324	Büchi Labortechnik
Zentrifuge	Microfuge 22R Allegra X-15R Centrifuge 5430	Bechman Coulter, Krefeld Bechman Coulter, Eppendorf, Hamburg

### 2.3.2 Bioreaktoren

Tab. 2.7: Bioreaktor 7,5 L

Bioreaktor	Labfors 3 (Infors, Einsbach)
Nennvolumen Kulturgefäß	7,5 L
Druckluft	Hausleitung (2,1 bar), steril filtriert über PTFE Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
Abluft	PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
Kulturparameter	24 °C, 150 rpm(Scheibenrührer)
Belüftung	Luftrohr (AD 8 mm), 0,3 L min <sup>-1</sup>
pH-Elektrode	Schott Steamline SL 80-325 pH

Tab. 2.8: Verwendeter Bioreaktor 150 L

Bioreaktor	Biostat D 100 (B.Braun International, Melsungen)
Nennvolumen Kulturgefäß	150 L
Abluft	PTFE-Filterkerze (Sartorius, 0,2 µm)
Kulturparameter	24 °C, 160 rpm (Scheibenrührer)
Begasungsrate	3 L min <sup>-1</sup>
pH-Elektrode	Mettler Toledo

## 2.4 Verwendete Basidiomyceten

### 2.4.1 Screening

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen (Tab. 2.9) wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig und vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Niederlande) bezogen. Für das Screening wurden die in Tabelle 2.9 aufgeführten Basidiomyceten mit dem in Kapitel 2.5 beschriebenen Substraten submers kultiviert und anhand von Kultivierungsdauer und Proteingehalt selektiert.

Tab. 2.9: Für das Screening eingesetzte Basidiomyceten mit verwendeter Abkürzung und Herkunft.

Stamm	Abkürzung	Herkunft
<i>Agrocybe aegerita</i>	AAE	Fa. Sylvan
<i>Laetiporus sulphureus</i>	LSU	DSMZ
<i>Lentinula edodes</i>	LED	CBS
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	PSC	DSMZ
<i>Pleurotus sapidus</i>	PSA	DSMZ
<i>Stropharia rugosaannulata</i>	SRU	Vanessa Kleofas
<i>Wolfiporia cocos</i>	WCO	CBS

### 2.5 Substrate

Karottentrester (K) (Abbildung 2) wurde von der Firma Döhler als gebleichtes, getrocknetes und vermahlenes Substrat zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um einen Schalenabrieb der Karotten. Zwiebeltrester (ZT) wurde frisch von der Firma Symrise AG aus Holzminden bezogen und zur Weiterverwendung gefriergetrocknet und vermahlen. Rübenmelasse (RM) wurde von Equita, einem Online Shop für Pferdefutter, bezogen. Isomaltulose-Melasse (IM), welche während der Palatinit-Herstellung anfällt, wurde von der Firma Südzucker (Mannheim) zur Verfügung gestellt. Die Substrate Karottentrester und Zwiebeltrester wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert, Rüben- und Isomaltulose-Melasse bei 4 °C. Die getrockneten Substrate wurden mit den Medien autoklaviert, die flüssigen wurden separat autoklaviert (pH 6,0).



Abbildung 2: Gebleichter, gemahlener Karottentrester (A), getrockneter Zwiebeltrester (B), Rübenmelasse (C) und Palatinose-Melasse (D).

Die Substrate dienten als alleinige Kohlenstoffquelle. Die Einwaage der Substrate für das jeweilige Medium wurde auf  $15 \text{ g L}^{-1}$  Gesamtkohlenhydrate limitiert. Bestimmt wurde der Gehalt an Kohlenhydraten rechnerisch durch Differenzbildung.

Folgende Einwaagen wurden berechnet:

Karottentrester	$29,0 \text{ g L}^{-1}$
Isomaltulose-Melasse	$100 \text{ mL L}^{-1}$
Rübenmelasse	$100 \text{ mL L}^{-1}$
Zwiebeltrester	$31,5 \text{ g L}^{-1}$

## 2.6 Kultivierung von Basidiomyceten

Die Kultivierung der Basidiomyceten erfolgte in verschiedenen Nährmedien. Die aufgeführten Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert und der pH Wert mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt.

### 2.6.1 Nährmedien und Lösungen

Tab. 2.10: Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Substanz	Konzentration
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,080 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,090 g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,030 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,005 g L <sup>-1</sup>
Titriplex III (EDTA)	0,400 g L <sup>-1</sup>
Reinst. H <sub>2</sub> O	ad 1 L <sup>-1</sup>

Tab.2.11: Zusammensetzung des M1 Nährmediums

Substanz	Konzentration
Mono-Natrium-L-Aspartat-Monohydrat	6,2 g L <sup>-1</sup>
Ammoniumnitrat	2,4 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	1,0 mL L <sup>-1</sup>

Tab. 2.12 Zusammensetzung des M2 Nährmediums

Substanz	Konzentration
Hefeextrakt	3,0 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	1,0 mL L <sup>-1</sup>

Tab. 2.13: Zusammensetzung des Vorkulturmediums

Substanz	Konzentration
Malzextrakt	20,0 g L <sup>-1</sup>

Tab. 2.14: Zusammensetzung des Plattenmediums

Substanz	Konzentration
Malzextrakt	20,0 g L <sup>-1</sup>
Agar-Agar	15,0 g L <sup>-1</sup>

Tab. 2.15: Medien zur Medienoptimierung. Angaben in g L<sup>-1</sup>

	Hefeextrakt	Pepton (Soja)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	SE-Lsg.
M2	3,0			1,5	0,5	1,0
M2a	3,0		2,4	1,5	0,5	1,0
M2b	3,0			0,5	0,5	1,0
M3		3,0		1,5	0,5	1,0
M3a	3,0	3,0		1,5	0,5	1,0
M3b		3,0		0,5	0,5	1,0

### 2.6.2 Stammhaltung der Basidiomyceten

Die Stammhaltung erfolgte auf Malzextrakt-Agarplatten (MEA) (vgl. Tabelle 2.14). Hierzu wurde ein 1 cm<sup>2</sup> mit Mycel bewachsenes Agarstück der 80% bewachsenen Platte herausgestanzt und mittig auf eine neue Agar-Platte positioniert. Die Petrischalen wurden daraufhin mit Parafilm verschlossen und im Brutschrank bei 24 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Dies wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt.

### 2.6.3 Vorkultur

Die Vorkulturen (VK) wurden in autoklavierten Enghals-Erlenmeyerkolben, befüllt mit Malzextraktmedium (vgl. Tabelle 2.13), geführt. Für die Submerskultivierung wurde zu je 100 mL Vorkulturmedium ein 1 cm<sup>2</sup> großes Agarstück im Kolben inokuliert. Die Homogenisierung erfolgte für 30 s bei 10.000 U min<sup>-1</sup> mittels Ultraturrax-Stab. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss.

Tab. 2.16: Vorkulturdauer der für das Screening verwendeten Basidiomyceten.

Stamm	Vorkulturdauer [d]
AAE	11
LED	13
LSU	13
PSA	6
PSC	6
SRU	7
WCO	7

### 2.6.4 Hauptkulturen

Für die Kultivierung mit M1 Medium wurden die Substrate K und ZT zuerst in leere Erlenmeyerkolben eingewogen, mit Medium versehen, der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt und anschließend autoklaviert (121 °C, 20 min). Für die Kultivierung mit M2 Medium erfolgte die Zugabe des separat autoklavierten Substrates IM und RM nach Inokulation der Vorkultur. Für die Anzucht der Hauptkulturen wurde die Vorkultur (vgl. 2.5.2) mittels Ultraturrax-Homogenisator homogenisiert (30 s, 10.000 U min<sup>-1</sup>) und anschließend 10%ig (v/v) in die Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm.

### 2.6.5 Ernte des Mycels

Die Kultivierung der Hauptkultur wurde abgebrochen, sobald das Medium vollständig mit Mycel bewachsen war. Zur Abtrennung des Mediums vom Mycel wurde der Inhalt der Kolben in einen Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 3.283 g zentrifugiert. Das zurückgebliebene Mycel wurde anschließend mehrmals mit VE-Wasser gewaschen, bis der Überstand klar war. Das Ernten des Mycels aus dem Bioreaktor erfolgte über ein Passiertuch. Das geerntete Mycel wurde anschließend mit VE-Wasser gewaschen. Das Myzel wurde daraufhin mittels Gefriertrocknungsanlage auf eine Restfeuchte < 10% getrocknet.

### 2.6.6 Kultivierung im 7,5 L Bioreaktor

Der Fermenter wurde mit 4 L Medium und einer entsprechenden Menge Substrat befüllt, der pH- Wert mit 1 M Natronlauge auf 6,0 eingestellt und autoklaviert. Inokuliert wurde mit 400 mL homogenisierter Vorkultur (vgl. 2.5.2).

### 2.6.7 Kultivierung im 150 L-Bioreaktor

Befüllt wurde der Fermenter mit 80 L Medium und einer entsprechenden Menge an Substrat. Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge auf 6,0 eingestellt und das Medium anschließend sterilisiert. Zunächst wurden 800 mL Vor-Vorkultur hergestellt. Aus dieser Vor-Vorkultur wurden wiederum 8 L Vorkultur hergestellt, homogenisiert und inokuliert.

## 2.7 Nährwert-Analytik

### 2.7.1 Bestimmung des Feuchtegehalts

Die Feuchte der ausgewählten Substrate und des Pilzmycels wurde nach Herstelleranweisung mittels Feuchtebestimmer MA 35 (Sartorius) ermittelt.

### 2.7.2 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts nach Kjeldahl

Der Gesamtstickstoffgehalt wurde nach Kjeldahl (Kjeldahl 1883, modifiziert nach Matissek *et al.*, 2010) jeweils in Doppelbestimmung quantifiziert. Dazu wurden ca. 0,5 g der lyophilisierten Pilzmycelien bzw. 2 g der Substrate in stickstofffreie Pergamentschiffchen eingewogen und mit einer Siedeperle, einer halben Katalysatortablette und 15 mL konzentrierter Schwefelsäure in die Aufschlusskolben gegeben und bei 400 °C für mind. 3 h aufgeschlossen. Der Aufschluss war vollständig, nachdem die Lösung eine grünliche Farbe angenommen hatte. Nach Auskühlen der Aufschlusskolben wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt. Dazu wurde Natronlauge im Überschuss und einige Tropfen Sher-Indikator in den Aufschlusskolben gegeben. Der während der Wasserdampfdestillation gebildete Ammoniak wurde in eine borsäurehaltige, mit Sher-Indikator versetzte Lösung getrieben und anschließend mit 0,1 M Salzsäure-Maßlösung titriert.

Der Rohproteingehalt wurde nach Gleichung 1 berechnet.

$$P [\% \text{ TM}] = \frac{a * 1,4008 * F}{E * 10} * \frac{100}{100 - \% \text{ Feuchte}} \quad (1)$$

mit	P	Rohproteingehalt [% TM]
	a	Verbrauch an 0,1 M HCl-Maßlösung [mL]
	1,4008	1 mL 0,1 M HCl entspricht 1,4008 mg Stickstoff
	F	Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Rohproteingehalts (Faktor für PSA IM: 4,91; für PSC IM: 4,95, für LED K: 4,68)
	E	Probeneinwaage [g]
	10	Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe und mg Stickstoff in g
	%Feuchte	Restfeuchte [%]

### 2.7.3 Bestimmung des Aschegehalts

Zur Bestimmung des Aschegehalts wurden die Pilzmycelien bzw. Substrate in konstant gewogene Quarztiegel eingewogen und bei 550 °C im Muffelofen verascht. Der Aschegehalt wurde durch Differenzwägung der Quarztiegel ermittelt. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 2.

$$\text{Asche [\% TM]} = \frac{\Delta_{\text{Tiegel}} * 100}{E} * \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} * 100 \quad (2)$$

mit	$\Delta_{\text{Tiegel}}$	Differenz des Tiegels vor und nach Veraschung
	Asche	Aschegehalt [% TM]
	E	Probeneinwaage [g]
	%Feuchte	Restfeuchte [%]
	100	Umrechnung in g (100 g) <sup>-1</sup>

#### 2.7.3.1 Mineralstoffe

##### 2.7.3.1.1 Probenvorbereitung

Zur Quantifizierung der Mineralstoffe mittels optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES), wurden die Pilzmycelien mit Königswasser aufgeschlossen. Dazu wurden ca. 0.5 g des lyophilisierten und gemahlene Mycel, 0,5 g des Karottentresters sowie 2 mL der Isomaltulose-Melasse jeweils in einen Teflon-Becher eingewogen und mit 2 mL reinst. H<sub>2</sub>O, 6 mL Salzsäure (37%) und 2 mL Salpetersäure (65%) versetzt. Die Proben wurden geschwenkt und fest verschlossen. Für den Aufschluss wurde ein Mikrowellensystem genutzt. Das Temperaturprogramm ist in Abbildung 3 dargestellt. Zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen, durch die im zugesetzten Wasser enthaltenen Mineralien, wurde eine Referenzlösung (ohne Pilzmycel) mitgeführt.

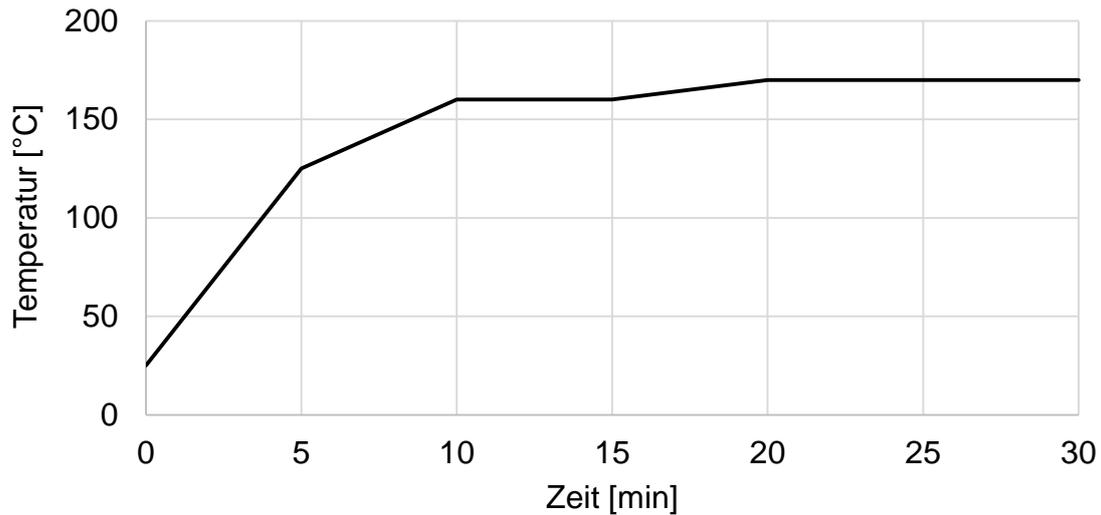


Abbildung 3: Temperaturprogramm des Mikrowellenaufschlusses

Anschließend wurden die Teflon-Becher im Eisbad abgekühlt und der Aufschluss quantitativ über einen Faltenfilter mit reinst. H<sub>2</sub>O in einen 50 mL Messkolben überführt und ad Marke aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (RT) in Polypropylen-Gefäßen.

### 2.7.3.1.2 Quantifizierung mittels ICP-OES

Die Quantifizierung der Mineralstoffe der aufgeschlossenen Proben (vgl. 2.7.3.1.1) wurde vom Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung der Justus-Liebig Universität Gießen durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte nach der DIN ISO 22036 bei folgenden Wellenlängen:

Tab.2.17: Verwendete Wellenlängen zur Quantifizierung der Elemente.

Element	Wellenlänge
Ca	220.861
Cr	205.560
Cu	327.395
Fe	240.489
K	766.491
Mg	182.731
Mn	257.610
Na	589.592
P	213.618
Zn	213.857

Als Standard diente eine Multi 28 Elemente Lösung ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), die wie in Kapitel 2.7.3.1.1 mit Königswasser versetzt wurde. Die Auswertung erfolgte über die ICP Expert Software.

### 2.7.3.2 Schwermetalle

#### 2.7.3.2.1 Probenvorbereitung

Als Schwermetalle wurden Cadmium und Blei zur Bestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) erfasst. Die Probenvorbereitung und der Mikrowellenaufschluss erfolgten analog zu Kapitel 2.7.3.1.1.

#### 2.7.3.2.2 Bestimmung von Blei mittels AAS

Die Erstellung der Kalibrierkurve für die AAS-Messung von Blei erfolgte vor der Messung der Proben. Verwendet wurde eine Blei-Stammlösung mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Kalibrierkurven wurden anhand von 5 Punkten ( $0, 5, 15, 30, 50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) erstellt (Abbildung 4).

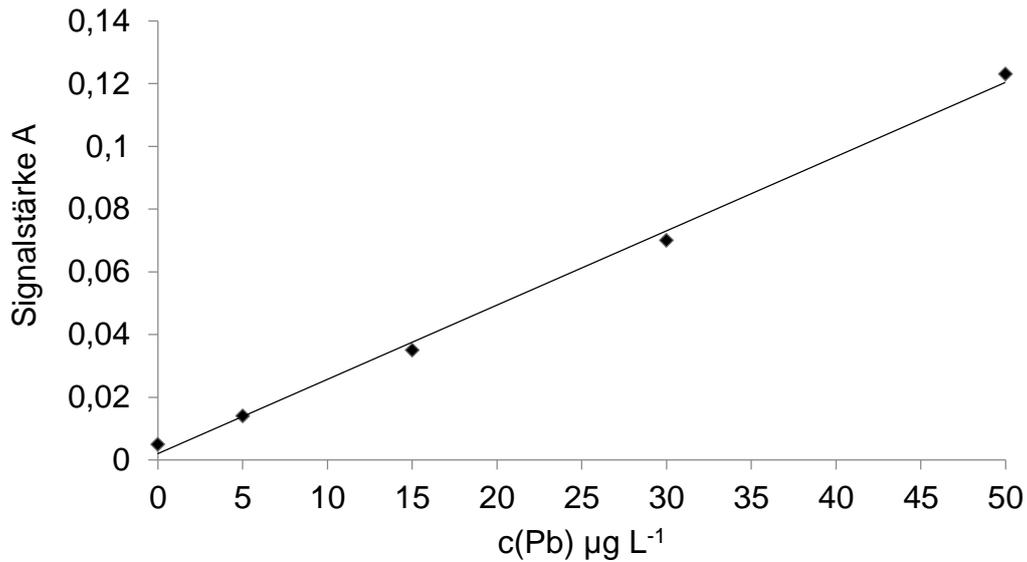


Abbildung 4: Auftragung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Blei.  $y = 0,0024x + 0,0021$ ,  $R^2 = 0,9966$ .

Die zur Messung verwendeten Probengefäße wurden vor der Messung mit der jeweiligen Probelösung gespült. Die gewählten Temperatureinstellungen und die Parameter können den Tabellen 2.18 und 2.19 entnommen werden.

Tab. 2.18: Temperatureinstellung der AAS zur Bestimmung von Blei.

Nr.	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anstieg [°C s <sup>-1</sup> ]	Gasfluss [mL min <sup>-1</sup> ]
1	120	40	10	0,2
2	650	20	150	0,2
3	1050	3	0	-
4	2100	3	0	0,2

Tab.2.19: Gewählte Parameter zur Messung von Blei.

Parameter	Wert
Inertgas	Argon
Untergrundkorrektur	Zeeman
Küvette	ELC
Injektionstemperatur	70 °C
Wellenlänge	228,8 nm
Bandbreite	0,5 nm
Lampenstrom	30%
Probenvolumen	15 µL
Modifiervolumen	10 µL

### 2.7.3.3.3 Bestimmung von Cadmium mittels AAS

Die Erstellung der Kalibrierkurve für die AAS Messung von Cadmium erfolgte vor der Messung der Proben. Verwendet wurde eine Cadmium-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup>. Die Kalibrierkurven wurden anhand von 5 Punkten (0, 1, 2, 3, 4 µg L<sup>-1</sup>) erstellt (Abbildung 5).

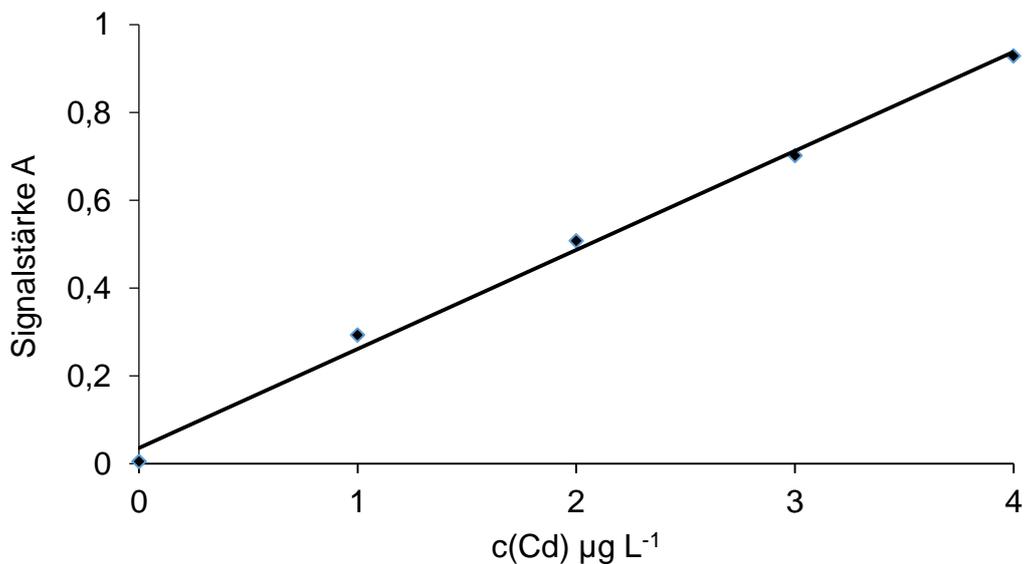


Abbildung 5: Auftragung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Cadmium.  $y = 0,2254x + 0,036$ ,  $R^2 = 0,9949$ .

Die Vorbereitung erfolgte analog zu Kapitel 2.7.3.1.1. Gewählte Temperatureinstellungen und Parameter können den Tabellen 2.20 und 2.21 entnommen werden.

Tab.2.20: Temperatureinstellungen der AAS zur Messung von Cadmium

Nr.	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anstieg [°C s <sup>-1</sup> ]	Gasfluss [mL min <sup>-1</sup> ]
1	115	40	10	0,2
2	1100	20	150	0,2
3	1800	3	0	-
4	2500	3	0	0,2

Tab. 2.21: Gewählte Parameter zur Messung von Cadmium

Parameter	Wert
Inertgas	Argon
Untergrundkorrektur	Zeeman
Küvette	ELC
Injektionstemperatur	70 °C
Wellenlänge	283,3 nm
Bandbreite	0,5 nm
Lampenstrom	90%
Probenvolumen	10 µL
Modifiervolumen	10 µL

### 2.7.3.3.4 Berechnung des Biokonzentrationsfaktors

Der Biokonzentrationsfaktor (BKF) gibt Aufschluss über den Akkumulationsgrad des Pilzes aus dem Substrat. Dabei wird das Verhältnis vom Mineralstoffgehalt im Pilz zum Mineralstoffgehalt im Substrat berechnet.

$$\text{BKF} = \frac{\text{Konzentration Mineralstoff [mg kg}^{-1}\text{]} * \text{Trockenmasse [kg]}}{\text{Konzentration Mineralstoff [mg kg}^{-1}\text{]} * \text{zugegebenem Substrat [kg]}} \quad (3)$$

### 2.7.4 Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts

Der Gesamtkohlenhydratgehalt wurde rechnerisch durch Differenzbildung bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 4.

$$\text{KH [\% TM]} = 100 - (\text{Rohprotein [\% TM]} - \text{Asche [\% TM]} - \text{Rohfett [\% TM]}) \quad (4)$$

mit KH Gesamtkohlenhydratgehalt [% TM]

#### 2.7.4.1 Bestimmung von Trehalose und Saccharose mittels Hochleistungs-Anionenaustausch-Flüssigkeits-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAE-PAD)

Die Bestimmung von Trehalose (Tre) und Saccharose (Sac) erfolgte mittels Hochleistungs-Anionen-Austausch-Flüssigkeits-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAE-PAD). Hierzu wurden etwa 0,5 g der lyophilisierten Mycelien, 0,5 g des gebleichten Karottentresters sowie 5 mL Isomaltulose-Melasse mit je 10 mL VE-Wasser vermischt. Hinzu kamen je 3 mL Carrez 1 und 2 Lösung. Anschließend wurden die Proben über einen Faltenfilter abfiltriert und vor der Analyse membranfiltriert. Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden folgende Standards in der Konzentration von 1-200 µM in reinst. Wasser eingesetzt: Sac und Tre. Die Proben wurden in den Konzentrationen 1:10, 1:100 und 1:1000 in reinst Wasser verdünnt. Abbildung 6 zeigt die jeweiligen Zucker Standards mit den dazugehörigen Retentionszeiten.

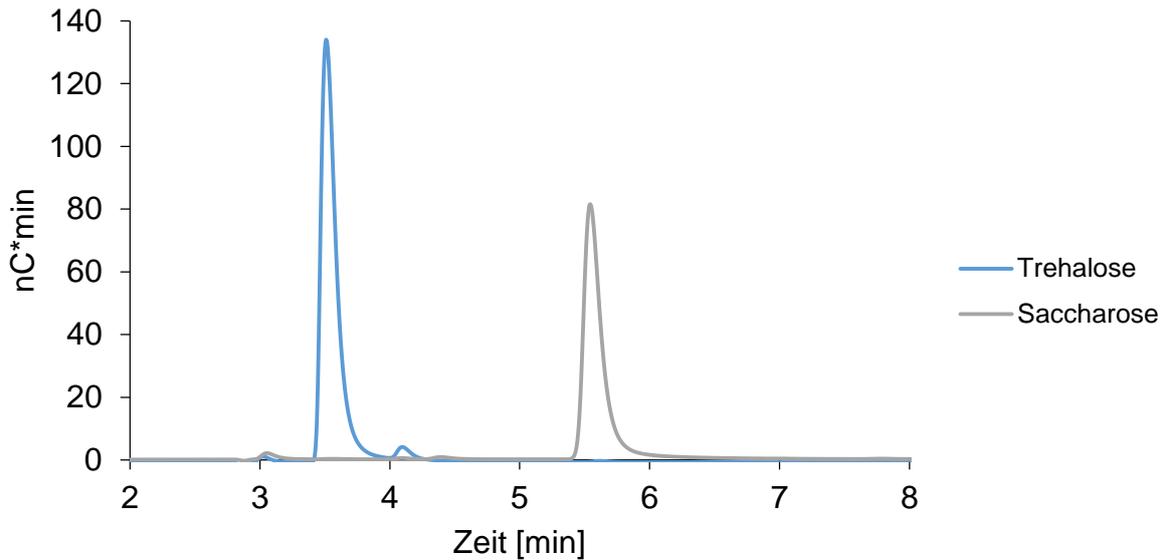


Abbildung 6: Auftrag der Zuckerstandards Trehalose und Saccharose [100 µM].

Die Standards und die Proben wurden mittels Autosampler in die Anionenaustauschersäule injiziert. Zur Datenaufnahme wurde das Programm Chromeleon V6.2 verwendet. Die gemessenen Proben wurden über die Peakflächen mit Hilfe der Standards berechnet.

Tab.2.22: Verwendete Parameter zur Messung von Trehalose und Saccharose.

Parameter	Einstellung
Gerät	ICS 3000 Dionex
Vorsäule	CarboPac® PA 200 3 x 30 mm
Trennsäule	CarboPac® PA 200 3 mm x 150 mm
Mobile Phase	Eluent A: 160 mM NaOH Eluent B: 1 M NaOH Eluent C: H <sub>2</sub> O Eluent D: 160 mM NaOH + 1M NaOAc
Flussrate	0,3 mL min <sup>-1</sup>
Gradient	0-3,5 min 100% A; 3,5-33,5 min 99,2% A → 0,8% D; 33,5-38,5 min 81,1% A → 18,9% D; 38,5-38,6 min 100% D 38,6-50 min 100% B 50 min 100% A

Parameter	Einstellung
Detektor	Gepulster amperometrischer Detektor
Injektionsvolumen	10 µL

### 2.7.4.2 Enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose

Zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose wurde das in Kapitel 2.2.3 beschriebene Kit nach Herstelleranweisung verwendet. Um die Probe von störenden Matrixbestandteilen zu befreien, wurde zunächst nach Carrez geklärt. Hierzu wurde ca. 1 g lyophilisiertes und gemahlenes Mycel in einen 100 mL Messkolben eingewogen, unter Schwenken mit 60 mL reinst. Wasser versetzt und 15 min bei 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurden je 5 mL Carrez-Lösung I und Carrez-Lösung II sowie 10 mL 0,1 M NaOH hinzugegeben. Die Kolben wurden geschwenkt und mit reinst. Wasser ad Marke aufgefüllt. Anschließend wurden die Lösungen filtriert und zur photometrischen Bestimmung eingesetzt. Das Pipettierschema ist Tabelle 2.23 zu entnehmen. Die Zusammensetzung der Lösungen wurde in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

Tab. 2.23: Verwendetes Pipettierschema

Lösung	Leerwert	Probe	Positivkontrolle
Lösung 1	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL
Probelösung	-	0,100 mL	-
Glucose-Testlösung	-	-	0,100 mL
Reinst. H <sub>2</sub> O	2,000 mL	1,900 mL	1,900 mL
mischen, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_1$ )			
Lösung 2	0,020 mL	0,020 mL	0,020 mL
mischen, nach ca. 15 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_2$ )			
Lösung 3	0,020 mL	0,020 mL	-
mischen, nach ca. 15 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_3$ )			

Zur Berechnung wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz (5) herangezogen.

$$c = \frac{V_T * M}{\varepsilon * d * v * 1000} * \Delta E \quad (5)$$

- mit
- c: Konzentration an Glucose bzw. Fructose [g L<sup>-1</sup>]
  - $\Delta E$ : für Glucose:  $(E_2 - E_1) - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$   
für Fructose:  $(E_3 - E_2) - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$
  - V<sub>T</sub>: Testvolumen [mL]
  - M: Molare Masse von Glucose bzw. Fructose = 180,16 g mol<sup>-1</sup>
  - $\varepsilon$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = 6,3 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>
  - d: Schichtdicke der Küvette = 1 cm
  - v: Probenvolumen = 0,1 mL

Zur Umrechnung auf g 100 g TM<sup>-1</sup> wurde Formel 6 verwendet:

$$G = \frac{c * V}{E} * \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} * 100 \quad (6)$$

- mit
- G: Gehalt an Glucose bzw. Fructose [g 100 g TM)<sup>-1</sup>]
  - V: Volumen, in dem die Probe gelöst wurde = 0,05 L
  - E: Probeneinwaage [g]
  - f: Feuchtegehalt [%]
  - $\frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}}$ : Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse
  - 100: Umrechnungsfaktor auf g (100 g)<sup>-1</sup>

### 2.7.4.3 Bestimmung des Glucangehalts

Der zu Analyse verwendete Assay (2.2.4) wurde nach Herstellerangaben verwendet und gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurde der Gehalt an Gesamtglucanen, im zweiten Teil der Gehalt an  $\alpha$ -Glucanen bestimmt.

2.7.4.3.1 Bestimmung der Gesamtglucane

90 mg des lyophilisierten und gemahlten Pilzmyzels wurden in ein Pyrexröhrchen eingewogen, mit 2,0 mL 4 °C-kalter Schwefelsäure (12 M) versetzt, verschlossen und mittels Vortexer vermischt. Inkubiert wurde für 2 h in einem Eiswasserbad und zwischendurch mehrmals gevortext. Nach Zugabe von 4 mL reinst. H<sub>2</sub>O wurde die Lösung 10 s gevortext, anschließend weitere 6 mL reinst. H<sub>2</sub>O hinzugegeben und erneut gevortext. Die folgende Inkubation erfolgte im Wasserbad für 2 h bei 100 °C. Nach Abkühlen der Pyrexröhrchen auf RT wurde die Probe quantitativ mit Natrium-Acetat-Puffer (200 mM, pH 5) in einen 100 mL-Messkolben überführt, die Lösung mit 6 mL Kaliumhydroxid-Lösung (10 M) versetzt und mit Natrium-Acetat-Puffer ad Marke aufgefüllt. 1 mL der Lösung wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und bei 9.200 g für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,1 mL entnommen und in ein 4 mL-Glasvial pipettiert, anschließend mit einer Mischung von *exo*-1,3- $\beta$ -Glucanase (20 U mL<sup>-1</sup>) und  $\beta$ -Glucosidase (4 U mL<sup>-1</sup>) in Natrium-Acetat-Puffer (200 mM, pH 5) versetzt. Der Ansatz wurde gevortext und für 60 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Schluss wurden 3,0 mL GOPOD-Reagenz (vgl. Tabelle 2.5) hinzugegeben und bei 40 °C für 20 min inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 510 nm.

$$\text{Gesamt-Glucan (\% w/w)} = \Delta E * \frac{F}{W} * \frac{100}{0,1} * \frac{1}{1000} * 100 * \frac{162}{180} = \Delta E * \frac{F}{W} * 90 \quad (7)$$

mit	$\Delta E$ :	Differenz zwischen Extinktion der Probenlösung und Extinktion der Reagenzblindlösung
	F:	Faktor zur Umrechnung in die Menge an D-Glucose in $\mu\text{g}$ , berechnet aus dem Quotienten von 100 und dem Mittelwert der Extinktionen von 100 $\mu\text{g}$ des D-Glucose-Standards
	100/0,1:	Korrekturfaktor, 0,1 mL von 100 mL wurden analysiert
	1/1000:	Umrechnung von $\mu\text{g}$ in mg
	100/1:	Umrechnung in 100 mg Probe
	162/180:	Faktor zur Umrechnung von freier D-Glucose zu Anhydroglucose,
	W:	Einwaage der Probe als Trockenmasse [mg]

### 2.7.4.3.2 Bestimmung des $\alpha$ -Glucangehalts

100 mg des lyophilisierten und gemahlene Pilzmyzels wurden in ein Pyrexröhrchen eingewogen, mit 2 mL einer Kaliumhydroxid-Lösung (2 M) versetzt und gevortext. Inkubiert wurde für 20 min in einem Eiswasserbad und zwischendurch mehrmals gevortext. Nach der Inkubation wurden 8 mL Natrium-Acetat-Puffer (1,2 M pH 3,8) hinzu pipettiert, vermischt, mit 0,2 mL einer 50% (v/v) Lösung Amyloglucosidase ( $1630 \text{ U mL}^{-1}$ ) und Invertase ( $500 \text{ U mL}^{-1}$ ) in Glycerol versetzt und 30 min bei  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Nach der Inkubation wurde bei  $1.500 \text{ g}$  abzentrifugiert,  $0,1 \text{ mL}$  des Überstandes in ein  $4 \text{ mL}$  Glasvial überführt und dieser Überstand mit  $0,1 \text{ mL}$  Natrium-Acetat-Puffer ( $200 \text{ mM}$ , pH 5) und  $3,0 \text{ mL}$  GOPOD-Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Als Reagenzblindlösung wurden  $0,2 \text{ mL}$  Natrium-Acetat-Puffer mit  $3,0 \text{ mL}$  GOPOD-Reagenz verwendet. Als Positivkontrolle wurde  $0,1 \text{ mL}$  Glucose-Standard ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) mit  $0,1 \text{ mL}$  Natrium-Acetat-Puffer und  $3,0 \text{ mL}$  GOPOD-Reagenz verwendet. Die Extinktionen wurden gegen die Reagenzblindlösung bei  $510 \text{ nm}$  gemessen.

### 2.7.4.4 Bestimmung des Chitingehalts

Zur Bestimmung des Chitingehalts in den Zellwänden der Basidiomyceten wurde das getrocknete, lyophilisierte und gemahlene Mycel mit  $2,5 \text{ mL}$   $6 \text{ N HCl}$  versetzt und bei  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $24 \text{ h}$  hydrolysiert. Zuvor wurde mittels einer Positivkontrolle (Chitin) die Wiederfindung bestimmt, um die optimale Hydrolysezeit zu finden. Hierzu wurde Chitin in Pyrexröhrchen eingewogen, mit  $2,5 \text{ mL}$   $6 \text{ N HCl}$  versetzt und  $22,5$ ;  $24$ ;  $26$  und  $28 \text{ h}$  hydrolysiert. Die restlichen Schritte (für Chitin und Mycelien) erfolgten analog nach folgendem Protokoll: Nach der Hydrolyse wurde der Inhalt der Pyrexröhrchen quantitativ mit reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  in ein Becherglas überführt und zunächst mit  $6 \text{ N NaOH}$ , dann mit  $1 \text{ N NaOH}$  auf pH 7 eingestellt. Die erhaltene Lösung wurde über Membranfilter filtriert und mit reinst.  $\text{H}_2\text{O}$  ad Marke aufgefüllt.  $X \text{ mL}$  der Lösung wurden mit  $X-1 \text{ mL}$   $0,5 \text{ M HCl}$  versetzt, gevortext und für  $2 \text{ h}$  bei  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden  $2 \text{ mL}$  Natriumnitrit hinzupipettiert und der Ansatz bei RT inkubiert. Nach  $15 \text{ min}$  wurde  $1 \text{ mL}$  Ammoniumsulfamat hinzugegeben und  $5 \text{ min}$  inkubiert. Für die Farbreaktion wurde  $1 \text{ mL}$  MBTH Lösung

zugemischt und bei 37 °C im Wasserbad 30 min inkubiert. Abschließend wurde 1 mL FeCl<sub>3</sub> Lösung hinzupipettiert und weitere 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen erfolgte die Messung bei 650 nm. Als Standard wurde N-Acetyl-D-Glucosamin verwendet (Abbildung 7).

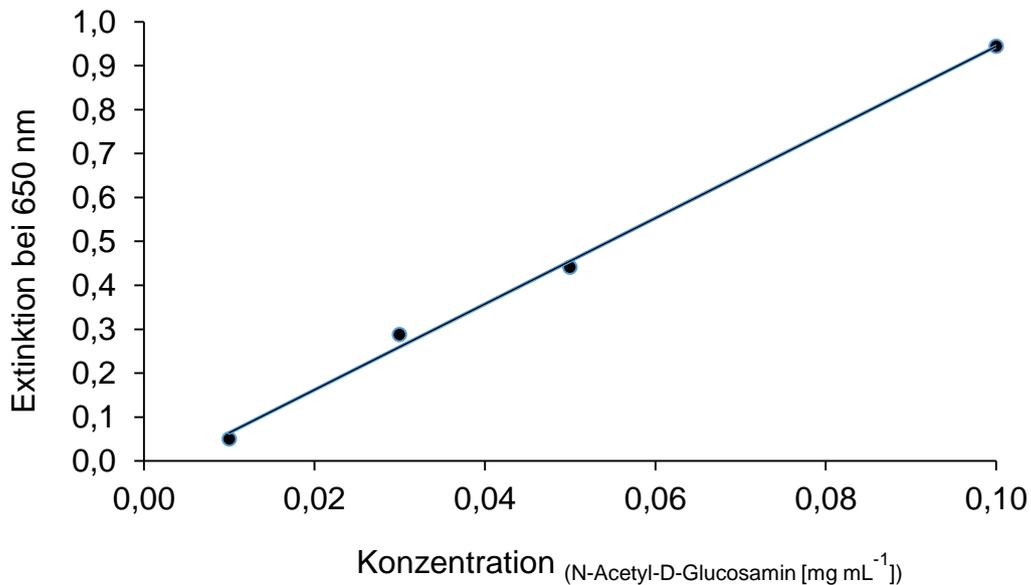


Abbildung 7: Kalibriergerade von N-Acetyl-D-Glucosamin zur Bestimmung von Chitin.  
 $y = 9,776x - 0,0336$ ,  $R^2 = 0,9972$ .

Zur Berechnung des Chitingehalts wurde Gleichung 8 verwendet.

$$\text{Chitin [g 100 g TM}^{-1}] = \frac{(c \cdot VF) \cdot 100}{E} * \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} \quad (8)$$

mit c: Konzentration N-Acetyl-D-Glucosamin [mg mL<sup>-1</sup>]

VF: Verdünnungsfaktor

100: Umrechnungsfaktor auf g (100 g)<sup>-1</sup>

E: Probeneinwaage [mg]

$\frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}}$ : Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse

### 2.7.5 Bestimmung des Rohfettgehalts

Der Rohfettgehalt wurde nach der Weibull-Stoldt-Methode analysiert. Dazu wurden ca. 4 g TM Probe und ca. 15 g des jeweiligen Substrates eingewogen. Der Aufschluss wurde durch Kochen mit 150 mL 4 M HCl für mind. 30 min durchgeführt. Anschließend wurden 100 mL heißes Wasser hinzugefügt, die Lösung filtriert und neutral gewaschen. Der Filter wurde bei 105 °C getrocknet und anschließend mit 155 mL Petrolether in einer Soxtherm-Apparatur extrahiert.

Nach Konstantwiegen der Kolben wurde der Gesamtfettgehalt nach Gleichung 9 ermittelt.

$$\text{Fett [g 100 g TM}^{-1}] = \frac{\Delta_{\text{Kolben}} * 100}{E} * \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} \quad (9)$$

mit	Fett	Fettgehalt [% TM]
	$\Delta_{\text{Kolben}}$	Differenz des Kolbengewichts vor und nach der Extraktion
	100:	Umrechnungsfaktor auf g (100 g) <sup>-1</sup>
	E	Probeneinwaage [g]
	$\frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}}$	: Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse

## 2.8 Chromatographische Methoden

### 2.8.1 Bestimmung der Gesamtaminosäurezusammensetzung

Das lyophilisierte und gemahlene Myzel wurde zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung einer sauren Hydrolyse unterzogen. Mit dieser Methode konnten 15 proteinogene Aminosäuren (AS) detektiert und quantifiziert werden, wobei Asn zu Asp und Gln zu Glu hydrolysiert wurden. Zur Quantifizierung von Met und Cys erfolgte eine Oxidation vor der sauren Hydrolyse. Der Gehalt an Trp wurde nach der basischen Hydrolyse bestimmt. Derivatisiert wurde mittels Nachsäulenderivatisierung mit 0,2 N Ninhydrinlösung (gelöst in Methanol, pH 10,85). Zum Schutz vor Verunreinigungen wurden alle verwendeten Glasgeräte im Pyrolyseofen bei 300 °C für 2 h ausgeglüht. Als externer Standard diente eine

Aminosäure-Kalibrier-Lösung (Gemisch aus Aminosäuren mit bekannten Konzentrationen für Hydrolysate) (Sykam) und L-Tryptophan ( $\geq 99,0\%$ , Roth). Für die Quantifizierung der Aminosäuren wurde eine Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Chromstar, Version 7.

### 2.8.1.1 Saure Hydrolyse

250 mg Mycel wurden in Pyrexröhrchen eingewogen und mit 6 mL 6 M HCl (0,1% Phenol) versetzt. Zur Vermeidung von Oxidationen wurde der Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Hydrolysiert wurde für 24 h bei 110 °C im Trockenschrank. Nach Abkühlen auf Eis wurde zentrifugiert (20 min, 4 °C, 3.283 g) und membranfiltriert (0,22  $\mu\text{m}$ ). Zur Abtrennung der Säure wurde ein Aliquot (200  $\mu\text{L}$ ) bei 130 °C bis zur Trockenen eingedampft und in 1 mL Probenverdünnungspuffer (pH 2,20) aufgenommen. Nach Verdünnen mit Probenverdünnungspuffer (1:5) wurde die Lösung zur Quantifizierung mittels Aminosäureanalysator eingesetzt.

Tab. 2.23: Eingestellte Parameter zur Messung nach der sauren Hydrolyse.

Parameter	Einstellung
Gerät	Aminosäureanalysator S433
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13 Na, Länge 175 mm
Säulentemperatur	0-5 min 49 °C; 5-10 min 49 °C $\rightarrow$ 56 °C; 10-26 min 56 °C; 26-31 min 56 °C $\rightarrow$ 74 °C; 31-55 min 74 °C; 55-60 min 74 °C $\rightarrow$ 50 °C
Mobile Phase	Natrium-Citrat Puffer, 0,12 N, pH 3,45 (A) Natrium-Citrat Puffer, 0,20 N, pH 10,85 (B)
Flussrate	0,25 mL min <sup>-1</sup>
Modus	Gradient
Gradient	0-5 min 100% A; 5-11 min 100% A $\rightarrow$ 95% A;

Parameter	Einstellung
	11-13 min 95% A → 80% A; 13-25 min 80% A → 70% A; 25-29 min 70% A → 30% A; 29-31 min 30% A → 20% A; 31-33 min 20% A → 10% A; 33-41 min 10% A → 0% A; 41-49 min 0% A; Regeneration mit 0,45 N NaOH
Detektor	UV/Vis-Detektor, 440 nm für Prolin und 570 nm für alle anderen Aminosäuren
Injektionsvolumen	50 µL

### 2.8.1.2 Bestimmung von Methionin und Cystein

Die Bestimmung von Methionin und Cystein erfolgte durch eine Oxidation mit Perameisensäure vor der Proteinhydrolyse. Dazu wurden 250 mg Myzel in Pyrexröhrchen eingewogen und mit 5 mL 5 M Oxidationslösung (30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 98%iger Ameisensäure und 0,1% Phenol) versetzt. Die Pyrexröhrchen wurden verschlossen und für 16 h bei 0 °C im Eisbad inkubiert. Durch Zugabe von 0,84 g Natriumdisulfit wurde die Oxidation abgebrochen und 5 mL 6 M HCl (0,1% Phenol) zugefügt. Anschließend wurde wie unter 2.8.1.1 beschrieben fortgefahren. Eingestellte Parameter können der Methode aus Tabelle 2.23 entnommen werden.

### 2.8.1.3 Bestimmung von Tryptophan

Zur Bestimmung von Tryptophan wurde basisch hydrolysiert. Dazu wurden 250 mg des Pilzmycels in Pyrexröhrchen eingewogen und mit 6 mL 5 M NaOH (0,1% Phenol) versetzt. Zur Vermeidung von Oxidationen wurde der Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Hydrolysiert wurde für 24 h bei 110 °C im Trockenschrank. Nach Abkühlen auf Eis wurde zentrifugiert (20 min, 4 °C, 3.283 g) und membranfiltriert (0,22 µm). Ein Aliquot (200 µL) wurde bei 130 °C bis zur Trockene eingedampft und in 1 mL Probenverdünnungspuffer (pH 2,20)

aufgenommen. Nach Verdünnen mit Probenverdünnungspuffer (1:5) wurde die Lösung zur Quantifizierung mittels Aminosäureanalysator eingesetzt.

Tab. 2.24: Eingestellte Parameter zur Messung nach der basischen Hydrolyse

Parameter	Einstellung
Gerät	Aminosäureanalysator S433
Trennsäule	Kationenaustauschersäule LCA K13 S/N Länge 175 mm, Filtersäule LCA K04 S/N
Säulentemperatur	74 °C
Mobile Phase	Natrium-Citrat Puffer, 0,12 N, pH 3,45 (A) Natrium-Citrat Puffer, 0,20 N, pH 10,85 (B)
Flussrate Puffer	0,25 mL min <sup>-1</sup>
Flussrate Ninhydrin	0,45 mL min <sup>-1</sup>
Modus	Gradient
Gradient	0-5 min 30% A; 5-7 min 30% A → 10% A; 7-15 min 10% A → 0% A; 15-20 min 0% A; Regeneration mit 0,45 N NaOH
Detektor	UV/Vis-Detektor, 570 nm
Injektionsvolumen	50 µL

### 2.8.1.4 Ein-Punkt-Kalibrierung

Für die Quantifizierung von Aminosäuren in Pilzmycelien wurde eine Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über die mitgelieferte Software anhand eines von der Firma Sykam gekauften Standards für Hydrolysat-Proben. Kalibriert wurde anhand der Zuordnung der Retentionszeiten der jeweiligen AS-Peaks. Abbildungen 8 und 9 zeigen die jeweilige Kalibrierung bei einer Wellenlänge von 570 nm und 440 nm. Die Ermittlung des Gesamtaminosäuregehalts wurde mit den ermittelten Aminosäurekonzentrationen aus Gleichung 10 in Excel vorgenommen.

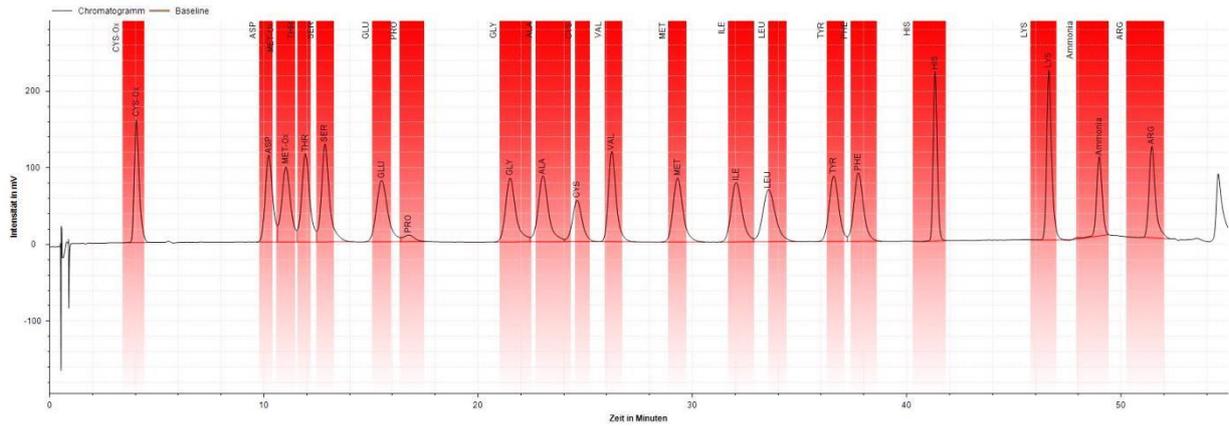


Abbildung 8: Ein-Punkt-Kalibrierung des Sykam Aminosäure-Standards für Hydrolysat-Proben bei einer Wellenlänge von 570 nm zur Bestimmung der Gesamtaminosäuren.

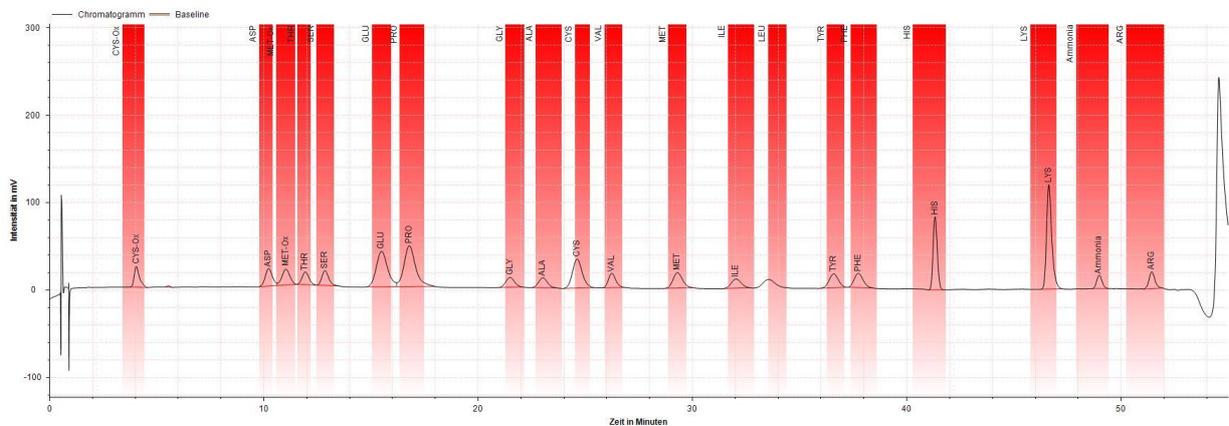


Abbildung 9: Ein-Punkt-Kalibrierung des Sykam Aminosäure-Standards für Hydrolysat-Proben bei einer Wellenlänge von 440 nm zur Bestimmung von Prolin.

Anhand der in Gleichung 10 dargestellten Formel wurde der Gehalt an Aminosäuren berechnet.

$$AS = \frac{c \cdot VF \cdot M \cdot V}{E \cdot 0,2 \text{ mL} \cdot 10^9} \cdot \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} \quad (10)$$

mit AS: Gesamtaminosäuregehalt der jeweiligen Aminosäure [g (100 g TM)<sup>-1</sup>]  
 c: Ermittelte Konzentration der Aminosäure [nmol mL<sup>-1</sup>]  
 VF: Verdünnungsfaktor  
 M: Molare Masse der Aminosäure [g mol<sup>-1</sup>]  
 E: Probeneinwaage [g]  
 V: Volumen der Ausgangslösung [mL]  
 10<sup>9</sup>: Umrechnungsfaktor von nmol in mol  
 $\frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}}$  : Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse

### 2.8.2 Bestimmung der Fettsäureverteilung

Zur Bestimmung der Fettsäuremethylesterverteilung wurde das aus Kapitel 2.7.5 gewonnene Fett verwendet. Nach Abdampfen des restlichen Petrolethers wurde das extrahierte Fett für 20 min bei 105 °C getrocknet. Etwa 80 mg des Fettes wurden in ein 15 mL-Derivatisierungsröhrchen mit teflonbeschichtetem Schraubverschluss überführt und mit 2 mL methanolischer Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Das Röhrchen wurde verschlossen für 10 min bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2,5 mL methanolische Bortrifluoridlösung (15%ig) zugesetzt und die Probe nochmals für 5 min bei 80 °C erhitzt. Im Anschluss wurden 2,5 mL Heptan zugesetzt und erneut für 1 min bei 80°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3 mL einer gesättigten wässrigen Natriumchloridlösung hinzugegeben. Um die Methylester in die Heptan-Phase zu überführen, wurden die Derivatisierungsröhrchen kräftig geschüttelt. Um das restliche Wasser zu entziehen, wurden 3 mL des klaren Überstandes in ein 4 mL Glasvial pipettiert und wasserfreies Natriumsulfat hinzugegeben. Die Lösung wurde 1:5 mit Heptan verdünnt und zur gaschromatographischen Bestimmung eingesetzt. Zur Quantifizierung wurde ein 37-Komponenten-Fettsäuremethylesterstandard als externer Standard verwendet. Die verwendeten Parameter können Tabelle 2.25 entnommen werden. Die Berechnung wurde anhand von Gleichung 11 durchgeführt.

$$FS_i = \frac{P_i}{\sum P_i} \cdot 100\% \quad (11)$$

- mit  $FS_i$ : Anteil der Fettsäure am Fettsäuregemisch [%]  
 $P_i$ : Fläche der zugehörigen Fettsäure [pA s]  
 $\sum P_i$ : Summe der Flächen der Fettsäuren [pA s]

Tab. 2.25: Parameter zur gaschromatographischen Auftrennung der Fettsäuremethylester.

Parameter	Einstellung
Gaschromatograph	Agilent Technologies 7890 A
Methode	MTS 3 GRAD_S2
Trennsäule	HP-Innowax 30 m x 0,32 mm ID 0,25 µm Filmdicke
Trägergas	Wasserstoff

Parameter	Einstellung
Fluss	2 mL min <sup>-1</sup>
Injektor	Autosampler mit Split/Splitlessinjektor
Injektortemperatur	250 °C
Septumpülung	3 mL min <sup>-1</sup>
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektortemperatur	250 °C
Temperaturprogramm	40 °C, 3 min 3 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C 240 °C, 12 min
Injektionsvolumen	1 µL
Split	Standard 1:5 ; Probe 1:15

Zur besseren Identifizierung der Peaks wurde unter Verwendung der oben beschriebenen Probe zusätzlich eine gaschromatographische Trennung (Agilent Technologies 7890 A) mit massenspektrometrischer Detektion (Agilent Technologies 5975C VL MSD) durchgeführt. Die Messung wurde anhand des Programms „MTS 03 liq“, der Trennsäule „VF-WAXms“ und einem Split von 1:20 durchgeführt.

### 2.8.3 Vitamin D<sub>2</sub>- Analytik

Durch Belichtung mittels UV-B Strahlen lässt sich das in der Zellmembran lokalisierte Ergosterol der Pilzmycelien in Vitamin D<sub>2</sub> umwandeln. Die lyophilisierten Mycelien wurden jeweils in Kristallierschalen mit einem Durchmesser von 7,3 cm und einer Probenhöhe von 0,5 cm belichtet. Die Belichtungszeit betrug 10 min mit einem Abstand des Mycels zu den UV-B Lampen von 10 cm. Quantifiziert und identifiziert wurden Ergosterol und Vitamin D<sub>2</sub> mittels HPLC-DAD.

### 2.8.3.1 Probenvorbereitung

Für die Verseifung wurde das lyophilisierte Pilzmyzel mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und in Braunglasrundkolben eingewogen (ca. 0,5 g). Anschließend wurden 50 mL Ethanol, 4 mL Natrium-Ascorbatlösung (17,5 g in 100 mL 1 M Natronlauge) und 10 mL KOH/H<sub>2</sub>O (50/50, w/w) zugesetzt. Als interner Standard wurde 0,5 mL Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>, 200 µg mL<sup>-1</sup>) verwendet. Anschließend wurde bei 80 °C unter Rückfluss verseift. Nach 1 h wurden 50 mL VE-Wasser hinzugefügt, auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln im Scheidetrichter mit 50 mL Diethylether, 50 mL n-Pentan/10 mL Ethanol, 50 mL n-Pentan und 20 mL n-Pentan. Die gewonnenen organischen Phasen wurden drei Mal mit 50 mL 3% KOH in 5%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde mit VE-Wasser neutral gewaschen und über Nacht bei 4 °C über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde die Lösung abfiltriert und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockene eingeeengt. Der trockene Rückstand wurde in 1,5 mL Methanol aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst und abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 14.000g). Zur Quantifizierung wurde die Lösung membranfiltriert (0,22 µm).

### 2.8.3.2 Kalibrierung

Sowohl Ergosterol als auch Vitamin D<sub>2</sub> wurden mittels HPLC-DAD identifiziert und quantifiziert. Dies erfolgte über die Peakflächenverhältnisse des Analyten zum internen Standard (Abbildung 10). Die Berechnungen fanden unter der Berücksichtigung der Kalibriergeraden und der Probenvorbereitung anhand von Gleichung 12 statt.

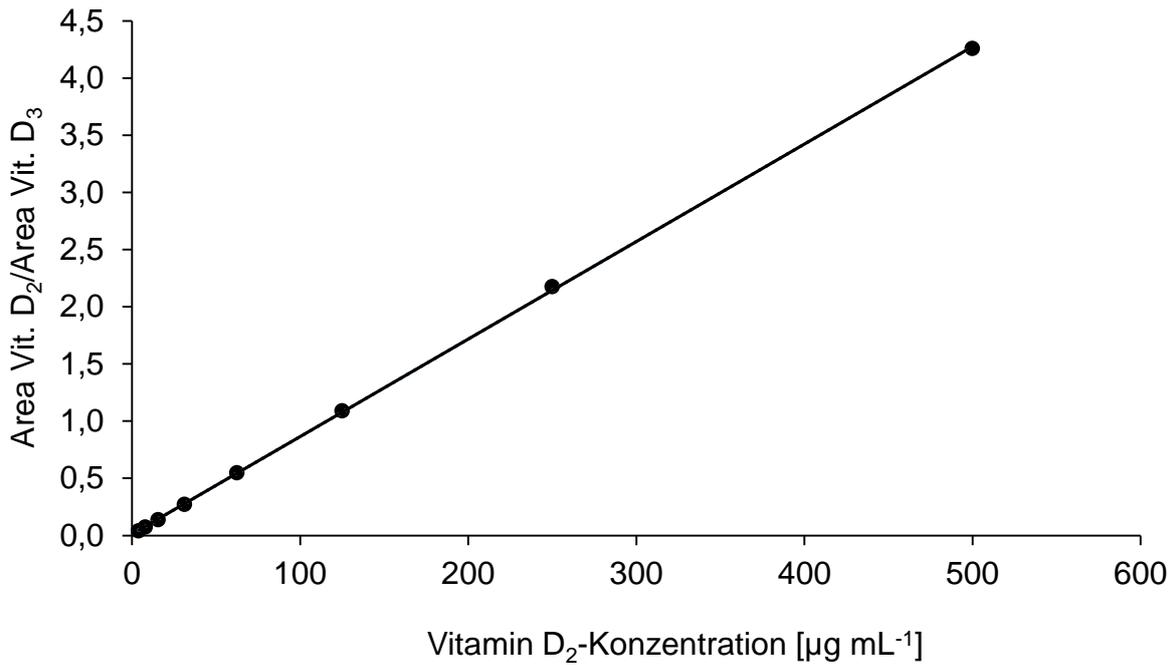


Abbildung 10: Kalibriergerade zur Bestimmung von Vitamin D<sub>2</sub> im Pilzmycel.  $y = 0,0085x + 0,0121$ ,  $R^2 = 0,9999$ .  $\lambda = 265$  nm.

$$\text{Vitamin D}_2 \text{ [}\mu\text{g (g TM)}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Vitamin D}_2 * V_{\text{MeOH}}}{E} * \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} \quad (12)$$

mit Vitamin D<sub>2</sub> Konzentration an Vitamin D<sub>2</sub> [µg mL<sup>-1</sup>]  
 V<sub>MeOH</sub> Volumen an Methanol, in dem der Rückstand aufgenommen wurde [mL]  
 E Probeneinwaage [g]  
 $\frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}}$  : Umrechnungsfaktor auf Trockenmasse

Tab. 2.26: Parameter zur Vitamin D Bestimmung mittels HPLC-DAD.

Parameter	Einstellung
HPLC-DAD	La Chrom System L-7100/L-7200/D-7000/L-7455 von Merck-Hitachi
Trennsäule	Chromolith Performance RP-18e 100-4,6 mm (mit Vorsäule) und EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, in Reihe geschaltet
Fluss	1 mL min <sup>-1</sup> (Gradient)
Injektor	Autosampler
Injektionsvolumen	10 µL

Parameter	Einstellung
Eluenten	Methanol, HPLC-Grade (A) Acetonitril HPLC-Grade (B) 0,05%ige Ameisensäure ©
Gradient	0-2 min 70% B, 30% C 2-10 min 100% B 10-20 min 100% B 20-30 min 5% A, 95% B 30-35 min 5% A, 95% B 35-40 min 100%B 40 min 70%B, 30% C
Software	System Manager HSM, Version 4.1

### 2.8.4 Ermittlung des Pilzgehalts im Lyophilisat

Das ausschließlich in den Pilzzellwänden vorkommende Ergosterol kann bei der Identifizierung von Pilzmycel und Substrat als Marker genutzt werden. Während der Kultivierung mit den industriellen Nebenströmen kommt es zu keinem vollständigen Abbau der Substrate, daher ist es nötig den Anteil an „reinem“ Mycel von dem Substrat zu unterscheiden. Dazu wurde LED nach Kapitel 2.6.3 kultiviert. Das Hauptkulturmedium bestand, wie schon in 2.6.3 beschrieben, aus dem alleinigen Mediumbestandteil Malzextrakt. Das lyophilisierte LED K Mycel wurde analog zu 2.8.3.1 aufgearbeitet.

#### 2.8.4.1 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurden die Peakflächenverhältnisse von Ergosterol zu 7-Dehydrocholesterol (IST) gegen die Biotrockenmasse des LED Mycels [g TM<sup>-1</sup>] aufgetragen. Gemessen wurde am Absorptionsmaximum von Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol bei 282 nm.

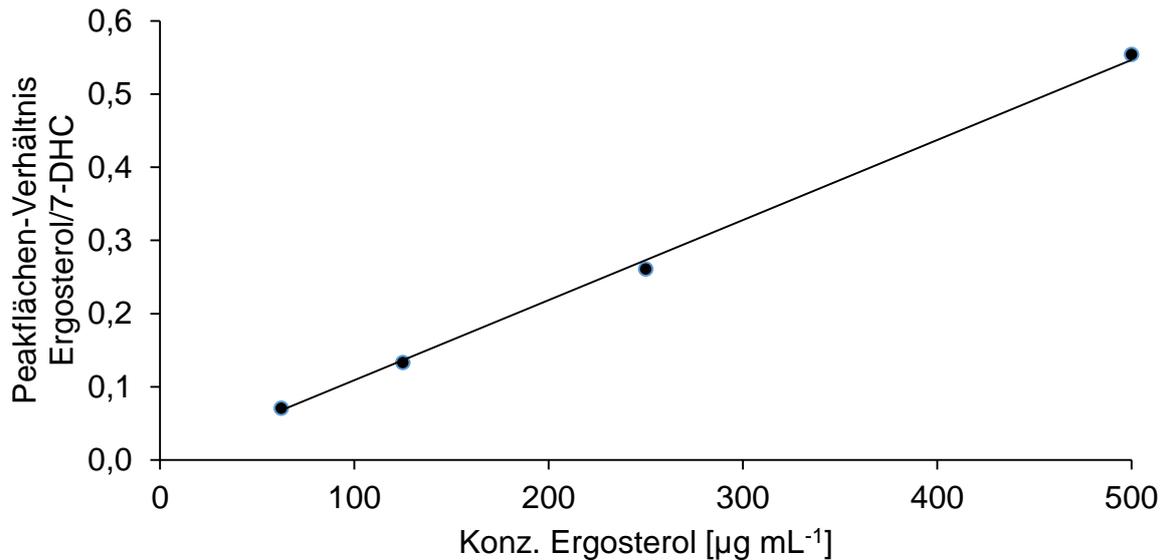


Abbildung 11: Kalibriergerade von Ergosterol mit 7-DHC [500 mg mL<sup>-1</sup>].  $y = 0,00109x$ .  $R^2 = 0,9983$ .  
 $\lambda = 282 \text{ nm}$ .

## 2.9 Berechnungen zur Proteinqualität

### 2.9.1 Chemical Score

Mitchell und Block publizierten 1946 eine Methode zur Bewertung von Nahrungsproteinen anhand eines Index, dem sogenannten Chemical Score (CS). Bei dieser Methode werden die essentiellen AS (EAS) der Proben mit den essentiellen Aminosäuren eines Referenzproteins verglichen. Dabei können Werte über 100 erreicht werden. Der CS gibt die limitierenden Aminosäuren wieder. Neben dem Vollei gibt es ein „ideales“ Referenzprotein, welches 1973 von der Weltgesundheitsorganisation (FAO/WHO) vorgeschlagen wurde und in dieser Berechnung als Referenzprotein verwendet wurde. Folgende Formel (13) wurde zur Berechnung des CS verwendet:

$$\text{CS} = \frac{\text{AS}_T}{\text{AS}_R} * 100 \quad (13)$$

mit CS: Chemical Score  
AS: essentielle Aminosäure  
T: Testprotein  
R: Referenzprotein

### 2.9.2 Essentieller Aminosäure-Index

In dem essentiellen Aminosäure-Index (EAA<sub>i</sub>) nach Oser (modifiziert nach Mitchell *et al.*, 1954a) werden alle essentiellen AS der Proben berücksichtigt. Cys und Met sowie Phe und Tyr werden hierbei als ein Wert angegeben. Liegen im Testprotein höhere Konzentrationen an EAS als im Referenzprotein vor, so wird der höchste annehmbare Wert, 100, angenommen. Aus dem berechneten EAA<sub>i</sub> lässt sich die Biologische Wertigkeit nach Oser berechnen. Berechnet wurde nach folgender Formel (14):

$$\text{EAA-Index} = \sqrt[n]{\left(\frac{AS1_T}{AS1_R} * 100\right) * \left(\frac{AS2_T}{AS2_R} * 100\right) \dots} \quad (14)$$

mit EAA-Index: essentieller Aminosäureindex  
AS1,2: essentielle Aminosäure  
T: Testprotein  
R: Referenzprotein  
n: Anzahl der berücksichtigten essentiellen AS

### 2.9.3 Biologische Wertigkeit

Definitionsgemäß entspricht die Biologische Wertigkeit (BW) derjenigen Menge an Nahrungsprotein, die 100 g Körpereweiß ersetzen kann. Die Methode nach Oser stellt eine Annäherung zur Berechnung der BW dar, entspricht jedoch nicht der tatsächlichen BW.

$$\text{BW} = 1,09 * \text{EAA}_i - 11,7 \quad (15)$$

mit BW: Biologische Wertigkeit  
EAA<sub>i</sub>: essentieller Aminosäureindex

### 2.9.4 Berechnung des *N:P conversion factors*

Der Stickstoffgehalt in Proteinen variiert aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Proteine zwischen 15% und 18%. Da dies jedoch abhängig vom Aminosäuregehalt ist, wurde unter Berücksichtigung der Aminosäureverteilung, des Rohproteins nach Kjeldahl ein neuer Umrechnungsfaktor, der sogenannte „*N:P conversion factor*“ berechnet. Die in (16) dargestellte Gleichung beschreibt die Umrechnung des Stickstoffgehalts in Proteingehalt.

$$N:P \text{ factor} = \frac{\text{Gesamtaminosäuregehalt [g 100 g TM}^{-1}\text{]}}{N_{\text{Kjeldahl}}[\text{g 100 g TM}^{-1}]} \quad (16)$$

mit *N:P factor*: Stickstoff-zu-Protein Umrechnungsfaktor  
 $N_{\text{Kjeldahl}}$ : Gesamtstickstoff aus Kjeldahl [g 100 g TM<sup>-1</sup>]

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1 Hitzebehandlung

Die Kultivierung erfolgte nach 2.6.4. Am Tag der Ernte wurde eine Hitzebehandlung durchgeführt. Hierzu wurde die HK in ein Fermentersystem (MR-R-T 250 mL, Schlee, Witten) überführt, um die optimalen Temperaturbedingungen (Außenmantel wurde mittels DC10-K10 von Thermo Scientific beheizt) zu erhalten. Tabelle 2.28 zeigt die verwendeten Temperatur- und Zeiteinheiten:

Tab.2.28: Verwendete Temperatur und Zeit zur Reduzierung von RNA.

Temperatur [°C]	Zeit [min]
60	30,40,50
65	30,40,50
70	30,40,50
72	30,40,50
74	30,40,50

### 2.10.2 Probenvorbereitung

Der Aufbau der Methode gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurde vor der Hitzebehandlung ein Aliquot zur Bestimmung des Rohproteins und ein Aliquot zur RNA-Quantifizierung entnommen. Im zweiten Teil erfolgte die Entnahme der zuvor beschriebenen Aliquote nach der Hitzebehandlung. Die Proben zur Rohproteinbestimmung wurden nach dem Ernten abzentrifugiert und das Mycel mit VE-Wasser gewaschen, eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die Proben zur RNA-Quantifizierung wurden nach der Ernte vom Medium getrennt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.10.3 Extraktion der RNA aus dem Pilzmycel

Zur Extraktion der RNA aus dem Pilzmycel wurde das in Kapitel 2.2.1 beschriebene Kit nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde das gefrorene Mycel mit flüssigem Stickstoff in RNase-freien Mörsern (3 h bei 300 °C ausgeglüht) aufgeschlossen, auf eine QIAshredder-Spin-Säule (lila) überführt und mit 450 µL RLC-Puffer (Guanidinhydrochlorid, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt. Der Ansatz wurde gevortext und 2 min bei 21,920 g zentrifugiert. 450 µL des Lysats wurden in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 225 µL Ethanol versetzt. Das homogenisierte Gemisch wurde anschließend auf eine RNeasy-Mini-Spin-Säule (pink) überführt und über mehrere Reinigungsschritte (700 µL RW1-Puffer und zweimal mit jeweils 500 µL RPE-Puffer) von Kontaminationen befreit. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert.

### 2.10.4 Quantifizierung der RNA mittels Kapillargelelektrophorese

Die Quantifizierung der RNA-Eluat erfolgte mittels Kapillargelelektrophorese (QIAxcel RNA). Zur Vorbereitung wurden zunächst 15 µL eines QX-RNA-Alignment-Markers in jeden der QX 0,2 mL 12-tube Streifen pipettiert und mit Mineralöl überschichtet. Die QIAxcel RNA Gel-Kartusche wurde auf RT gebracht und die

entsprechende Position eingesteckt. Der mitgelieferte Smartkey wurde in die dafür vorgesehene Fassung gesteckt. Für Konzentrationen zwischen 50 und 300 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  wurde jeweils 1  $\mu\text{L}$  bzw. 2  $\mu\text{L}$  bei Konz.  $<50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  der Probe in eine der zwölf 0,2 mL tubes pipettiert. Tube zwölf enthielt den QX-RNA-Size-Marker (200 - 6000 nt) (vgl. Abb.:12). Zu der Probe und zu dem Größenmarker wurde jeweils 1  $\mu\text{L}$  QX RNA Denaturierungs-Puffer hinzugefügt, 2 min bei 70 °C erhitzt, 1 min auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und auf 10  $\mu\text{L}$  mit QX RNA Verdünnungs-Puffer aufgefüllt. Ausgewertet wurde mit der vom Hersteller mitgelieferten QIAXcel ScreenGel Software.

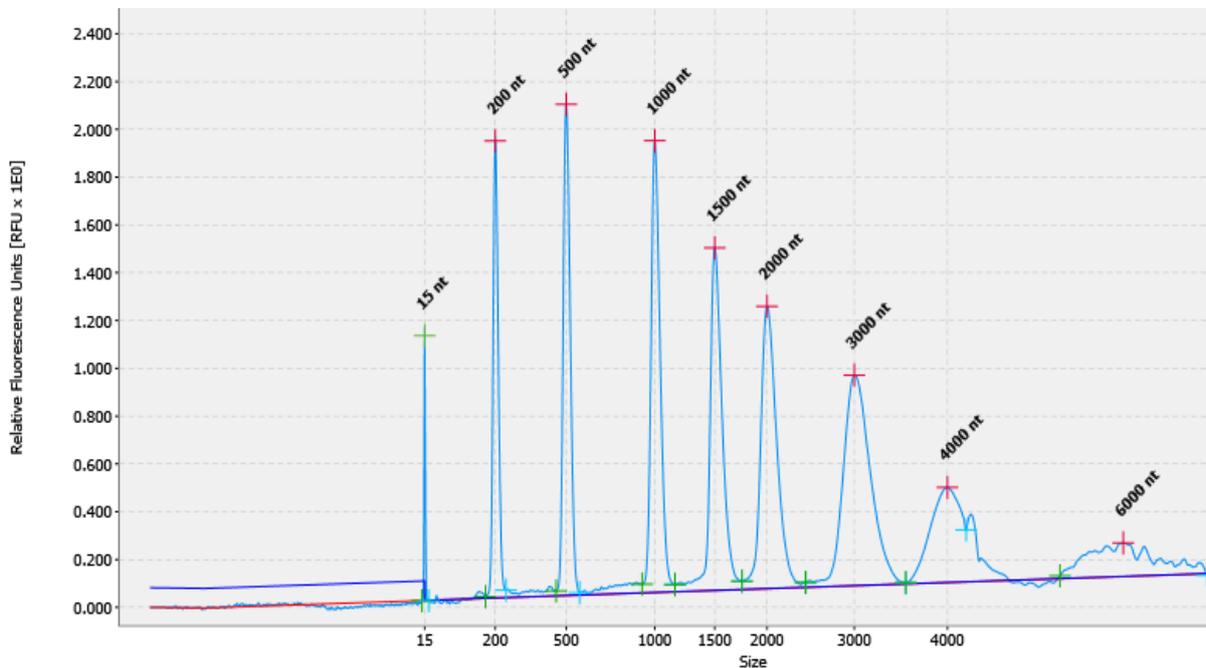


Abbildung 12: Elektropherogramm des Size-Markers 200 - 6000 nt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Screening verschiedener Pilz-Substrat-Kombinationen

Ziel des Screenings war die Auswahl von vielversprechenden Basidiomyceten-Substrat-Kombinationen. Als Auswahlkriterium wurden eine kurze Kultivierungsdauer [d] und ein hoher Proteingehalt [ $\text{g L}^{-1}$ ] herangezogen.

Für das Screening wurden insgesamt 7 Basidiomyceten (Tabelle 2.9) in einem mit verschiedenen Nebenströmen (Abbildung 2) supplementierten Medium (M1 und M2) submers kultiviert (Kapitel 2.6.4). Der Nebenstrom diente dabei als alleinige Kohlenstoffquelle. Die analysierten Basidiomyceten wiesen auf Rübenmelasse und auf Zwiebeltrester ein sehr langsames Wachstum auf, sodass diese beiden Substrate nicht mehr zur Kultivierung in Frage kamen. Als geeignet erwiesen sich LED auf Karottentrester (Kulturdauer: 6 Tage, ca.  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  Protein) im M1 Medium, sowie PSC (Kulturdauer: 3 Tage, ca.  $3,4 \text{ g L}^{-1}$  Protein) und PSA (Kulturdauer: 5 Tage, ca.  $2,9 \text{ g L}^{-1}$  Protein) jeweils auf Isomaltulose-Melasse im M2 Medium. Nach dem Screening erfolgte die Analytik dieser drei Pilz-Substrat-Kombinationen.

#### 3.1.1 Substratanalytik

Die Zusammensetzungen der verwendeten Substrate sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Bestimmung des Rohproteingehalts der Substrate erfolgte nach Kjeldahl (Kapitel 2.7.2), die Bestimmung des Aschegehalts wie in Kapitel 2.7.3, die Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts wie in Kapitel 2.7.4 sowie des Rohfettgehalts wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben.

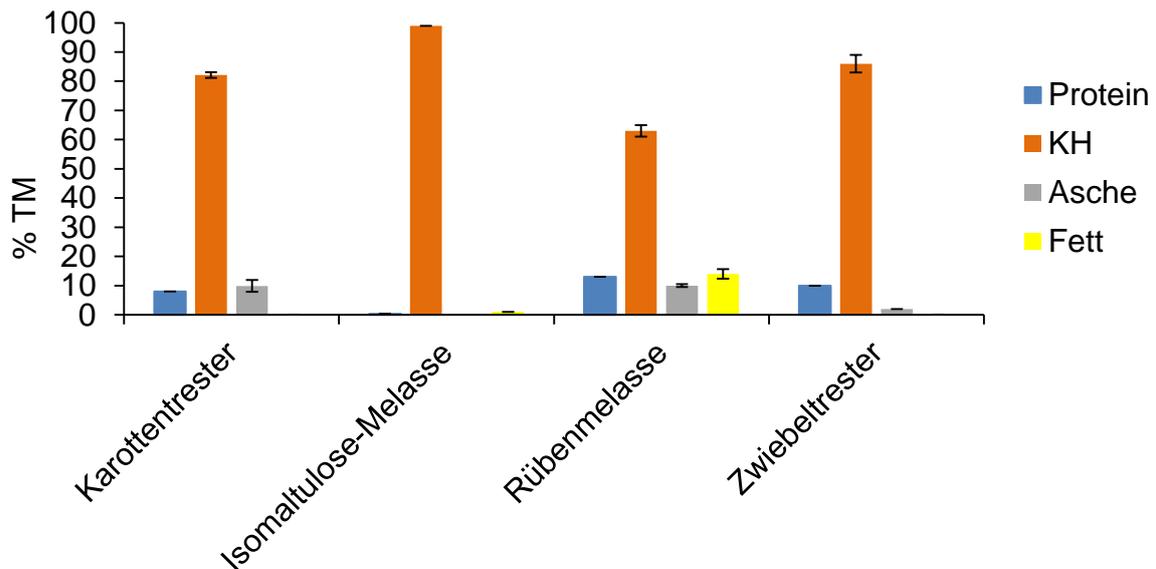


Abbildung 13: Gehalt an Rohprotein, Gesamtkohlenhydraten, Asche und Rohfett [ $\text{g (100 g TM)}^{-1}$ ] der Substrate Karottentrestler, Isomaltulose-Melasse, Rübenmelasse und Zwiebeltrestler.

### 3.1.2 Medienoptimierung

Die Ergebnisse der Medienoptimierung zur Kultivierung von PSA auf Isomaltulose-Melasse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. M2 Medium mit Hefeextrakt als alleinige Stickstoffquelle eignete sich unter Berücksichtigung der kurzen Kultivierungsdauer bei gleichzeitig hoher Proteinausbeute am besten. Mit Pepton als alleinige Stickstoffquelle konnten nur geringe Proteinausbeuten von  $<1 \text{ g (L TM)}^{-1}$  erreicht werden.

Tab.: 3.1 Ergebnisse der Medienoptimierung anhand von PSA auf Isomaltulose-Melasse.

Medium (2.15)	Kulturdauer [d]	TM [ $\text{g L}^{-1}$ ]	Protein [ $\text{g L}^{-1}$ ]
M2	5	$9,21 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,0$
M2a	5	$10,0 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,0$
M2b	3	$5,6 \pm 0,0$	$1,2 \pm 0,0$
M3	6	$4,4 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,2$
M3a	6	$4,3 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,0$
M3b	9	$1,3 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$

## 3.2 Nährwert-Analytik

Die Bestimmung der in den Mycelien enthaltenen Nährwerte erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 2.7 beschriebenen Analysemethoden.

### 3.2.1 Nährstoff-Zusammensetzung der Pilz-Substrat-Kombinationen

In Tabelle 3.2 ist die Zusammensetzung der ausgewählten Pilz-Substrat-Kombinationen dargestellt. Der höchste Rohproteingehalt wurde mit PSA IM erzielt. PSC IM wies den niedrigsten Rohfettgehalt auf, LED K den höchsten Aschegehalt. Die Rohproteingehalte wurden mit den in dieser Arbeit bestimmten Stickstoff zu Protein Faktoren berechnet.

Tab. 3.2: Nährstoff-Zusammensetzung von PSA IM, PSC IM und LED K.

Bestandteil [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	PSA IM	PSC IM	LED K
Rohproteingehalt	31,18 <sup>a</sup> ± 0,14	22,87 <sup>b</sup> ± 0,04	31,25 <sup>c</sup> ± 0,19
Gesamtkohlenhydrate	60,31± 0,34	72,01± 0,21	58,58± 0,24
Rohfettgehalt	3,15± 0,39	1,51± 0,08	4,37± 0,06
Asche	5,36± 0,22	3,61± 0,04	5,80± 0,15

<sup>a</sup> Nx4,91; <sup>b</sup>Nx4,95; <sup>c</sup>Nx4,73

Vergleicht man die Proteingehalte aus Tabelle 3.2 mit den berechneten Proteinmengen pro Liter Kulturmedium (Tabelle 3.3), so lässt sich die höchste Proteinausbeute pro Liter Kulturmedium bei PSC IM (3,37 g), die geringste bei LED K (2,19 g) ermitteln.

Tab. 3.3: Berechnete Proteinmenge pro Liter Kulturmedium von PSA IM, PSC IM und LED K.

Probe	Biotrockenmasse [g L <sup>-1</sup> ]	Protein [g L <sup>-1</sup> ]
PSA IM	9,21	2,87
PSC IM	14,75	3,37
LED K	7,01	2,19

### 3.2.2 Zusammensetzung der Kohlenhydrate und Ballaststoffe

#### 3.2.2.1 Chromatographische Bestimmung von Trehalose und Saccharose

Nach chromatographischer Auftrennung der Proben wurde Trehalose und Saccharose in allen drei Pilz-Substrat-Kombinationen detektiert und quantifiziert (Abbildungen 14 - 16). Für PSA IM wurde ein Tre-Gehalt von  $3,5 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  und ein Sac-Gehalt von  $9,5 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  ermittelt. In PSC IM wurden  $3,9 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  Tre und  $10,4 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  Sac bestimmt. In Led K wurde nur Tre mit einem Gehalt von  $2,3 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  bestimmt. Glc und Fru wurde nach Kapitel 3.2.2.2 enzymatisch bestimmt.

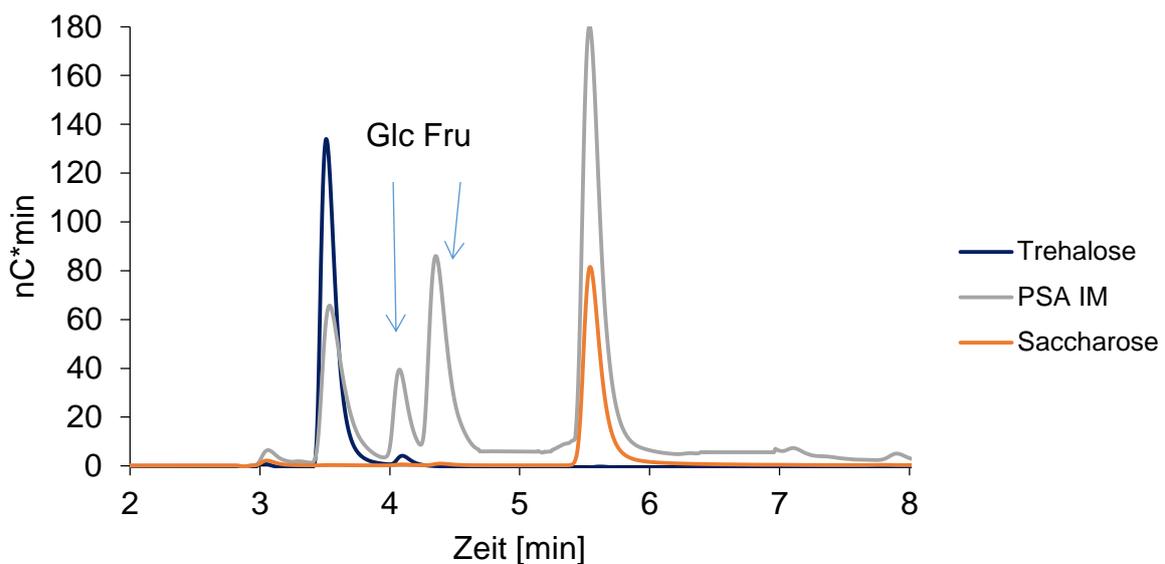


Abbildung 14: Chromatogramm von PSA IM in einer 1:100 Verdünnung und dem Trehalose und Saccharose Standard ( $100 \mu\text{M}$ ).

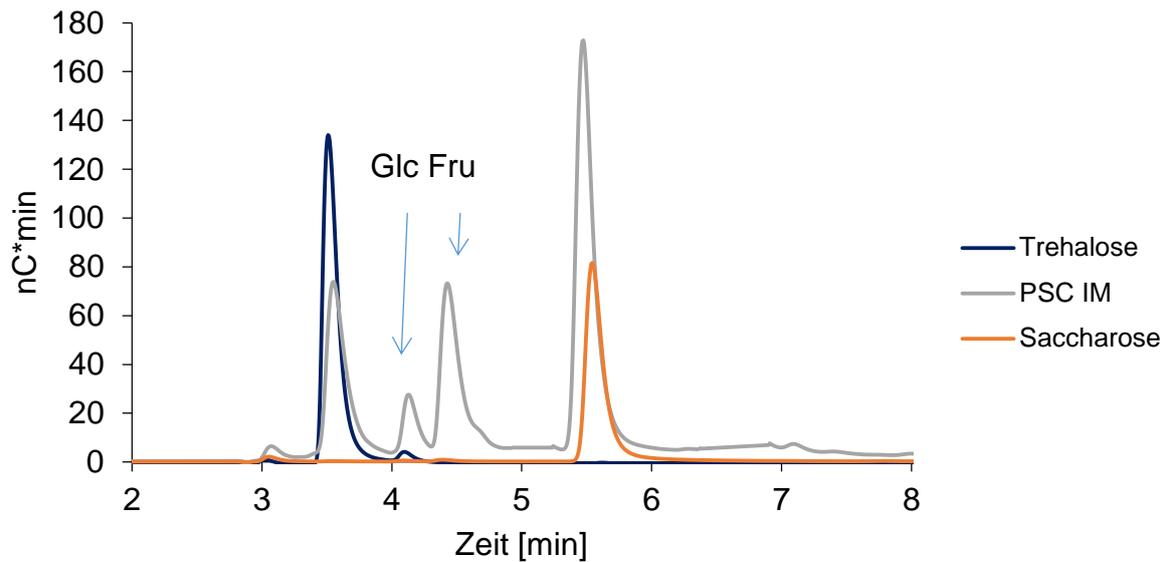


Abbildung 15: Chromatogramm von PSC IM in einer 1:100 Verdünnung und dem Trehalose und Saccharose Standard (100  $\mu$ M).

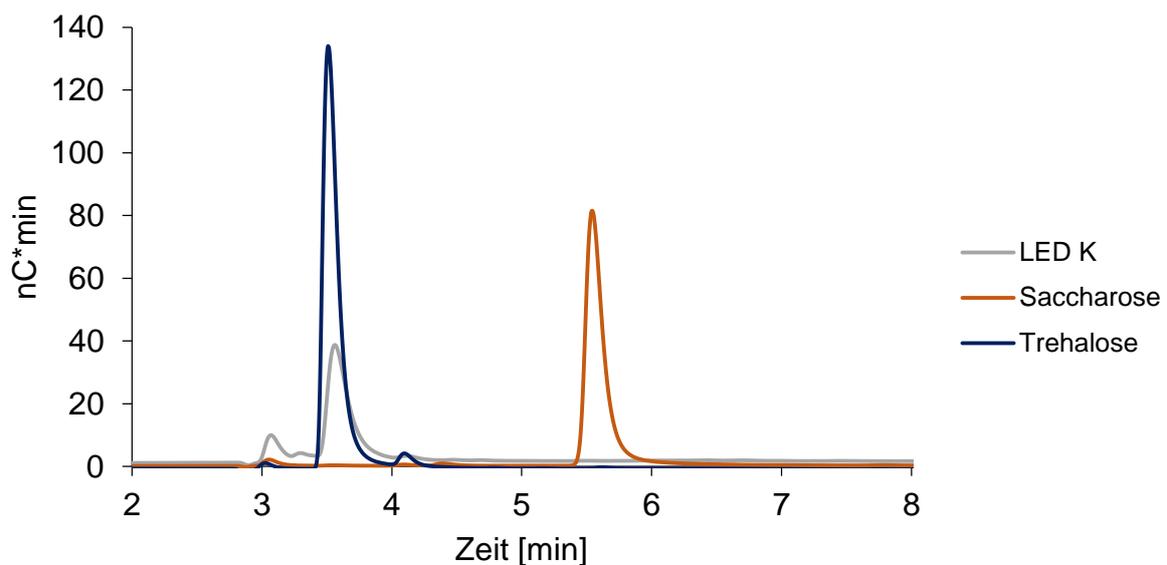


Abbildung 16: Chromatogramm von LED K in einer 1:100 Verdünnung und dem Trehalose und Saccharose Standard (100  $\mu$ M).

### 3.2.2.2 Enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose

Die Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose erfolgte wie in 2.7.4.2 beschrieben. In den Proben PSA IM, PSC IM sowie in den Substraten wurde mehr Fructose als Glucose, für LED K wurde mehr Glucose als Fructose bestimmt. Sowohl im Überstand von PSA IM und PSC IM, als auch im Überstand von LED K wurden weder Glc noch Fru detektiert (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Berechnete Konzentrationen von D-Glucose und D-Fructose in den Pilzmycelien und in den Substraten (n=3).

Probe	D-Glucose [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	D-Fructose [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
PSA IM	3,07± 0,04	6,07± 0,09
PSC IM	4,91± 0,01	9,42± 0,17
Isomaltulose-Melasse	12,40± 1,74	19,02± 2,13
LED K	0,25± 0,01	0,08± 0,01
Karottentrester	2,40± 0,11	7,00± 0,03

Tabelle 3.5 zeigt den berechneten Umsatz an D-Glucose und D-Fructose in den Pilzmycelien. PSA IM setzte 75% der im Substrat enthaltenen Glucose um, 68% der Fructose. PSC IM setzte 60% Glucose, 51% Fructose aus dem Substrat um. LED K setzte aus dem Karottentrester 90% Glucose und 99% Fructose um.

Tab.3.5: Berechneter Umsatz an D-Glucose und D-Fructose in den Pilzmycelien.

Probe	Umsatz D-Glucose aus dem Substrat [%]	Umsatz D-Fructose aus dem Substrat [%]
PSA IM	75	68
PSC IM	60	51
LED K	90	99

#### 3.2.2.3 Bestimmung des $\beta$ -Glucan-Gehalts

Die photometrische Bestimmung des  $\beta$ -Glucan-Gehalts erfolgte gemäß 2.7.4.3 durch Differenzbildung aus Gesamtglucanen und  $\alpha$ -Glucanen. Die Mycelien der drei Pilz-Substrat-Kombinationen zeigten einen  $\beta$ -Glucan-Gehalt von 12 - 19 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. PSA IM und PSC IM wiesen einen ähnlichen  $\alpha$ -Glucan-Gehalt auf, unterschieden sich jedoch im  $\beta$ -Glucan-Gehalt. Für LED K wurde ein geringerer  $\alpha$ -Glucan-Gehalt von 3,5 g (100 g TM)<sup>-1</sup> analysiert, der  $\beta$ -Glucan-Gehalt lag im Vergleich zu den *Pleurotus spp.* bei 12,5 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Insgesamt lag der prozentuale Anteil von  $\beta$ -Glucanen am gesamten Glucanen-Gehalt bei 70-78%. Der Anteil an  $\alpha$ -Glucanen bildeten den verbleibenden Anteil von 22 - 30% (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Bestimmung der Gesamtglucane und  $\alpha$ -Glucane in PSA IM, PSC IM und LED K (n=3) und Berechnung des  $\beta$ -Glucan-Gehalts .

Probe	$\alpha$ -Glucane	Gesamtglucane	$\beta$ -Glucane	% $\alpha$ - Glucane/Ge- samtglucane	% $\beta$ -Glucane/ Ge- samtglucane
PSA IM	6,08 $\pm$ 0,0*	24,77 $\pm$ 0,0*	18,69 $\pm$ 0,0*	25	75
PSC IM	6,07 $\pm$ 0,0*	20,26 $\pm$ 0,0*	14,19 $\pm$ 0,0*	30	70
LED K	3,50 $\pm$ 0,0*	16,00 $\pm$ 0,0*	12,50 $\pm$ 0,0*	22	78

\* angegeben in [g (100 g TM)<sup>-1</sup>]

### 3.2.2.4 Bestimmung des Chitin-Gehalts

Chitin wurde nach 2.7.4.4 bestimmt. Um die höchstmögliche Wiederfindung zu erzielen, wurde zunächst die Hydrolysezeit optimiert. Hierzu wurde Chitin in 3-fach Bestimmung eingewogen und für unterschiedliche Zeiten (22,5 - 28 h) hydrolysiert. Abbildung 17 zeigt die Wiederfindung im zeitlichen Verlauf. Die höchste Wiederfindung wurde nach 24stündiger Hydrolyse erzielt. Die Farbreaktion erfolgte abhängig von der N-Acetyl-D-Glucosamin-Konzentration (Abb.18). Abbildung 19 stellt die hydrolysierten Proben Chitin, PSA IM, PSC IM und LED K nach der Farbreaktion mit MBTH dar.

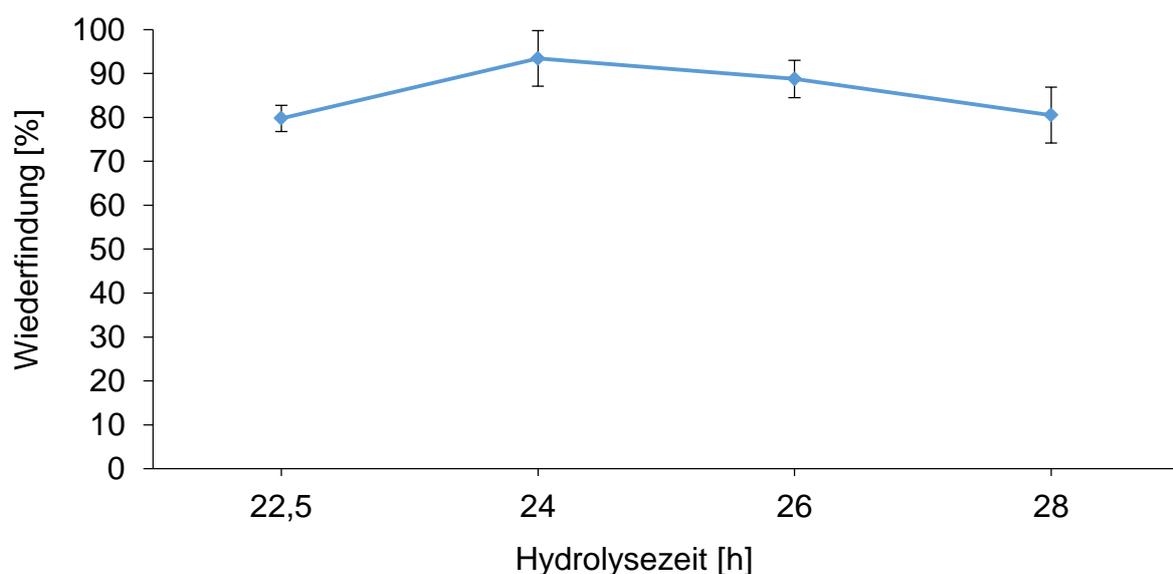


Abbildung 17: Bestimmung der optimalen Hydrolysezeit (22,5 - 28h) anhand der Wiederfindung Positivkontrolle Chitin.



Abbildung 18: N-Acetyl-D-Glucosamin Kalibrierreihe in den Konzentrationen: Wasserblindlösung,  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  gezeigt von links nach rechts.

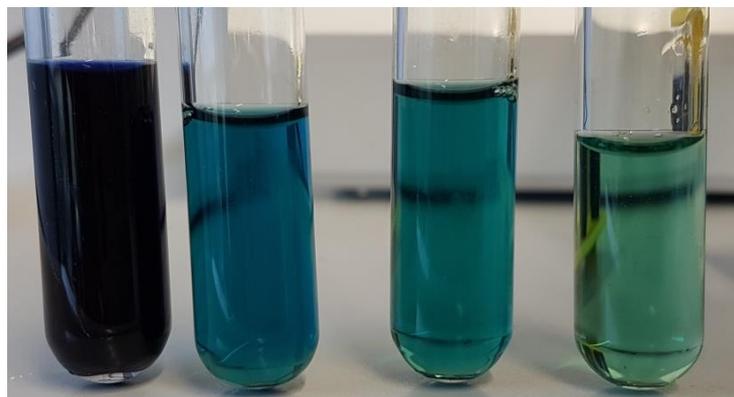


Abbildung 19: Farbreaktion der Proben von links nach rechts: Chitin, LED K, PSC IM und PSA IM.

Der berechnete Chitingehalt ( $n=3$ ) ist Tabelle 3.7 zu entnehmen. LED K enthielt die höchste Konzentration an Chitin ( $6,89 \pm 0,04 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ ), gefolgt von PSC IM. PSA IM enthielt  $2,61 \pm 0,05 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  Chitin.

Tab.3.7: Berechneter Chitingehalt, angegeben als g N-Acetyl-D-Glucosamin pro 100 g TM in PSA IM, PSC IM und LED K.

Probe	Chitin [ $\text{g (100 g TM)}^{-1}$ ]
PSA IM	$2,61 \pm 0,05$
PSC IM	$6,01 \pm 0,18$
LED K	$6,89 \pm 0,04$

### 3.2.3 Fettsäureverteilung der Pilz-Substrat-Kombinationen

Die Hydrolyse und die Extraktion des Fettes erfolgten gemäß 2.7.5. Anschließend wurde eine Derivatisierung des Fettes mittels  $\text{BF}_3$  (vgl. 2.8.2) durchgeführt und die gebildeten Fettsäuremethylester gaschromatographisch mittels GC-FID analysiert. Es wurden vier Hauptfettsäuren quantifiziert, welche in allen Pilz-Substrat-Kombinationen in ähnlichen Konzentrationen bestimmt wurden. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren betrug das Drei- bzw. Vierfache des Anteils an gesättigten Fettsäuren (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Prozentuale Zusammensetzung des Fettsäurespektrums in PSA IM, PSC IM und LED K.

Fettsäuremethylester	rel. Anteil [%] in PSA IM	rel. Anteil [%] in PSC IM	rel. Anteil [%] in LED K
Palmitinsäure	15	15	21
Stearinsäure	4	3	3
Ölsäure	16	8	6
Linolsäure	66	73	70
gesättigte Fettsäuren	19	18	24
ungesättigte Fettsäuren	81	82	76

### 3.2.4 Mineralstoffe und Schwermetalle

Die Bestimmung der Mineralstoffe erfolgte nach 2.7.3.1 mittels ICP-OES. Betrachtet man die Mengenelemente von PSA IM, PSC IM und LED K (Abb. 20), stellen sich Phosphor (P) und Kalium (K) bei PSA IM und PSC IM als Hauptmengenelemente dar.

Für LED K wurde Calcium (Ca) als Hauptmengenelement bestimmt, gefolgt von P und K. Die Ca-Konzentration bei PSA IM und PSC IM war sehr gering. Magnesium (Mg) und Natrium (Na) waren in allen Pilz-Substrat-Kombinationen nur in geringen Mengen vorhanden.

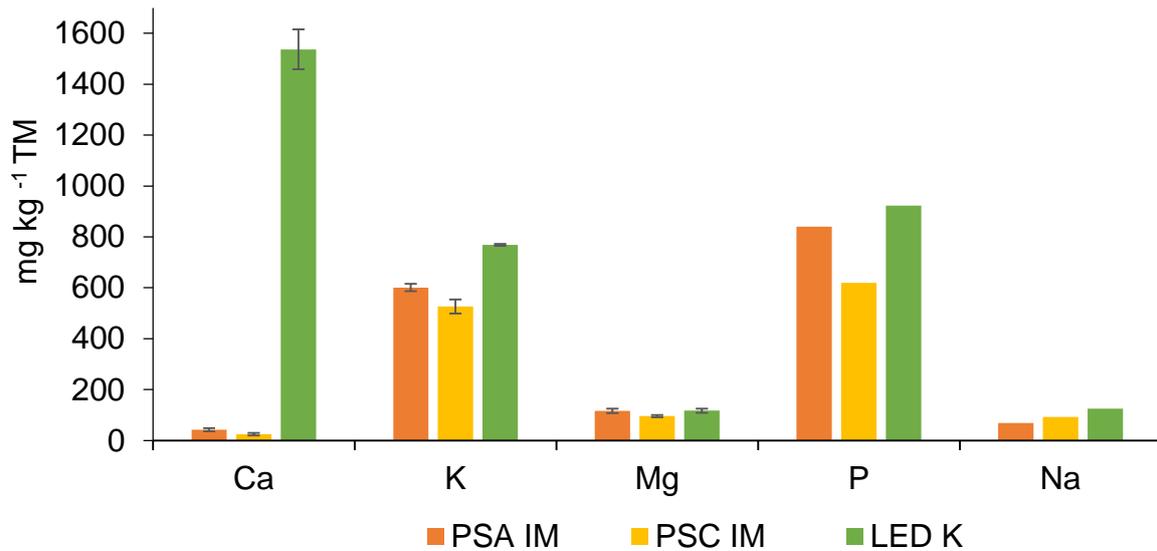


Abbildung 20: Mineralstoffzusammensetzung von PSA IM, PSC IM und LED K (n=3).

Abbildung 21 zeigt die Verteilung der essentiellen Spurenelemente in PSA IM, PSC IM und LED K. Auffällig ist die hohe Konzentration an Eisen (Fe) in LED K. PSA IM und PSC IM wiesen ähnliche Konzentrationen an Spurenelementen auf.

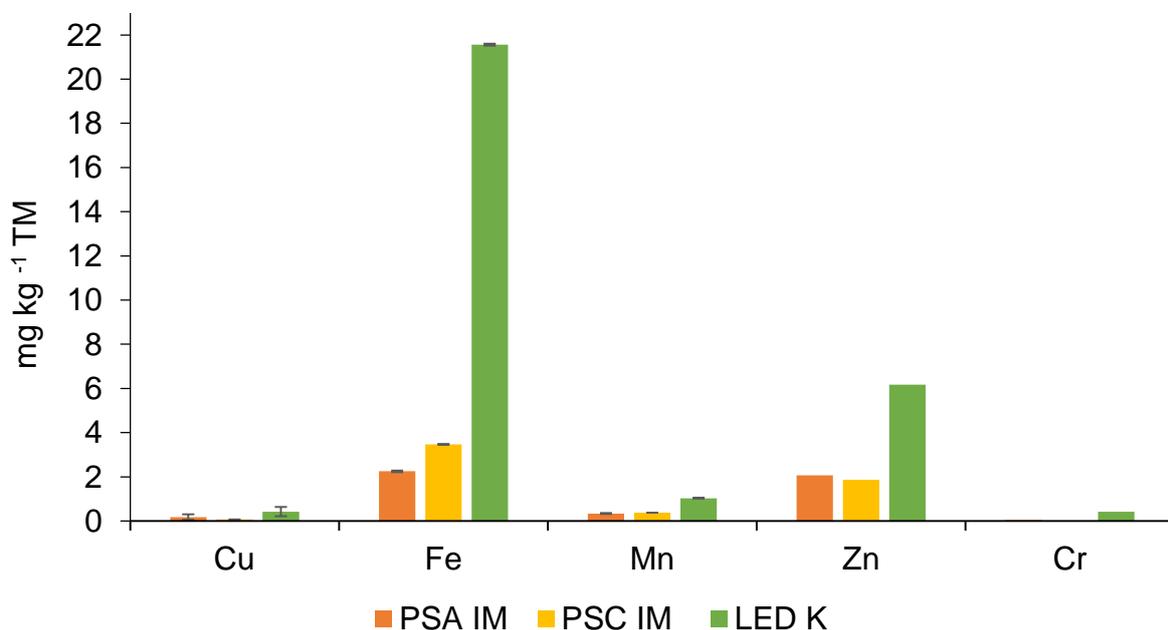


Abbildung 21: Spurenelemente der Pilz-Substrat-Kombinationen PSA IM, PSC IM und LED K (n=3).

Abbildung 22 zeigt die Mineralstoffzusammensetzung der verwendeten Substrate. Ca und K bildeten Hauptmengenelemente in Isomaltulose-Melasse und Karottentrester.

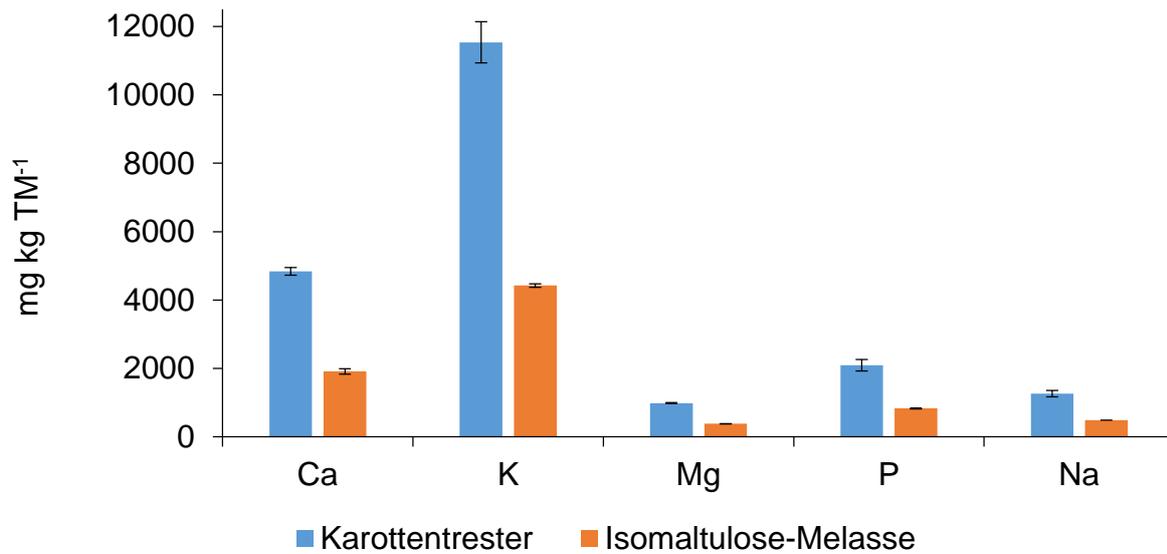


Abbildung 22: Mineralstoffzusammensetzung von Isomaltulose-Melasse (orange) und Karottentrester (blau) (n=2).

Abbildung 23 zeigt die Spurenelemente der beiden verwendeten Substrate. Fe bildete das Hauptspurenelement.

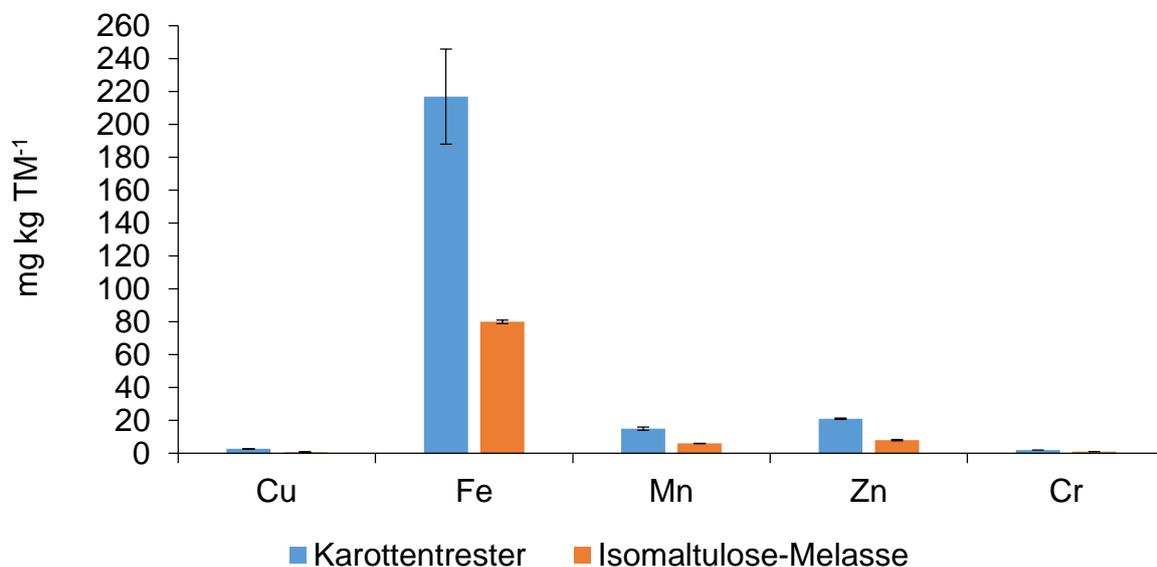


Abbildung 23: Spurenelemente in Isomaltulose-Melasse (orange) und Karottentrester (blau) (n=2).

Die ermittelten Blei-Gehalte der Proben (vgl. Tabelle 3.9) lagen unterhalb der Werte in der Referenzlösung, sodass ein Blei-Gehalt von  $0 \mu\text{g} (100 \text{ g TM})^{-1}$  in allen drei Pilz-Substrat-Kombinationen angenommen wurde.

Tab.: 3.9: Messung des Bleigehaltes in PSA IM, PSC IM und LED K (n=3).

Probe	Peakhöhe [A]	Peakfläche [A s]
Ref. PSA/PSC	0,002	0,000
PSA IM	0,0015± 0,00	0,001± 0,00
PSC IM	0,0015± 0,00	0,000± 0,00
Ref. LED	0,001	0,000
LED K	0,002± 0,00	0,001± 0,00

Die Messwerte des Cadmium-Gehalts der Proben lagen unterhalb der Messwerte der Referenzlösung, sodass für PSA IM und PSC IM ein Cadmium-Gehalt von  $0 \mu\text{g L}^{-1}$  angenommen wurde. Für LED K betrug der Gehalt an Cadmium (Cd)  $0,6 \pm 0,6 \mu\text{g (100 g TM)}^{-1}$ .

Tab. 3.10: Messung des Cadmiumgehaltes von PSA IM, PSC IM und LED K (n=3).

Probe	Peakhöhe [A]	Peakfläche [A s]
Ref. PSA/PSC	0,009	0,005
PSA IM	0,006± 0,00	0,006± 0,00
PSC IM	0,003± 0,00	0,001± 0,00
Ref. LED	0,001	0,000
LED K	0,055± 0,02	0,071± 0,02

#### 3.2.5 Aminosäureanalytik

Bei allen analysierten Pilzmycelien wurden 18 proteinogene Aminosäuren, darunter alle essentiellen AS, nachgewiesen. Bei PSA IM und PSC IM ist Glutaminsäure jeweils die dominierende Aminosäure (Abb. 24 und Abb. 25). Die Aminosäureverteilung von PSA IM und PSC IM erwies sich als sehr ähnlich (Abb.24 und Abb.25). Für PSA IM wurde ein Gesamtaminosäuregehalt von  $29,41 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  berechnet. Der Gesamtaminosäuregehalt für PSC IM betrug  $22,9 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ .

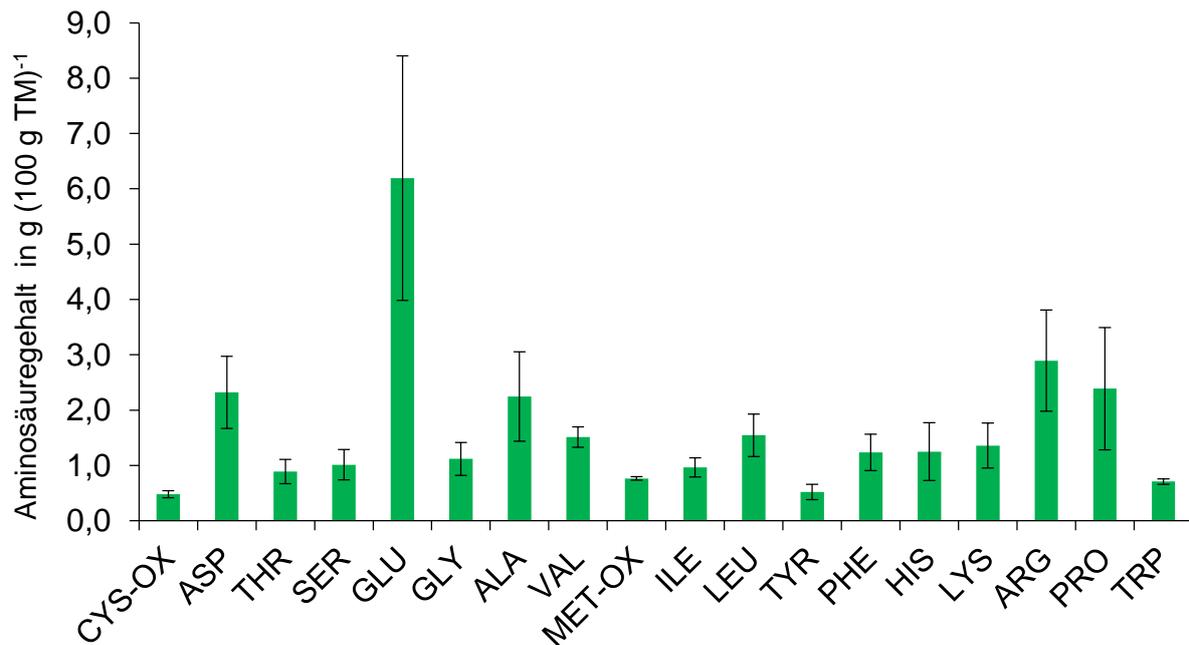


Abbildung 24: Gesamtaminosäuregehalt einer PSA Submerskultur supplementiert mit Isomaltulose-Melasse (5 d): 29,41 g (100 g)<sup>-1</sup> zum Vergleich mit dem Gesamtrohproteingehalt nach Kjeldahl (N\*4,91): 31,18 g (100 g)<sup>-1</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=6) mit den jeweiligen Standardabweichungen.

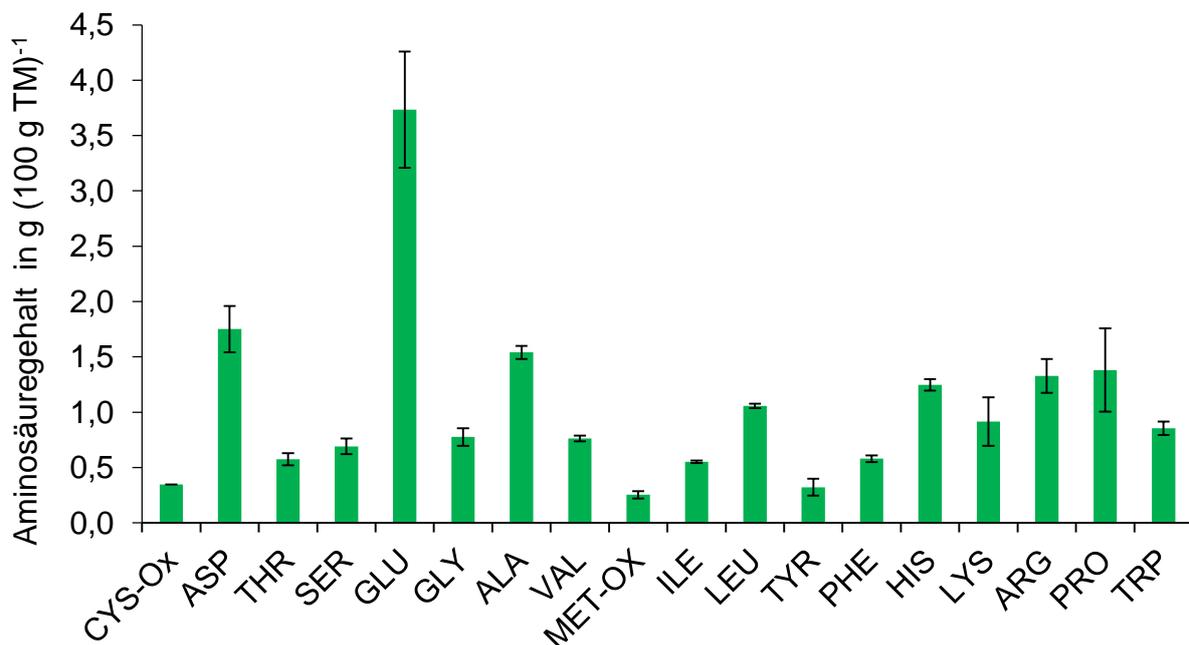


Abbildung 25: Gesamtaminosäuregehalt einer PSC Submerskultur supplementiert mit Isomaltulose-Melasse (3 d): 18,67 g (100 g TM)<sup>-1</sup> zum Vergleich mit dem Gesamtrohproteingehalt nach Kjeldahl (N\*4,96): 22,87 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) mit den jeweilige Standardabweichungen.

Die Aminosäurebestimmung von LED K wies eine hohe Konzentration an Asp, und Glu auf. Der Gesamtaminosäuregehalt von LED K betrug 27,03 g (100 g TM)<sup>-1</sup>.

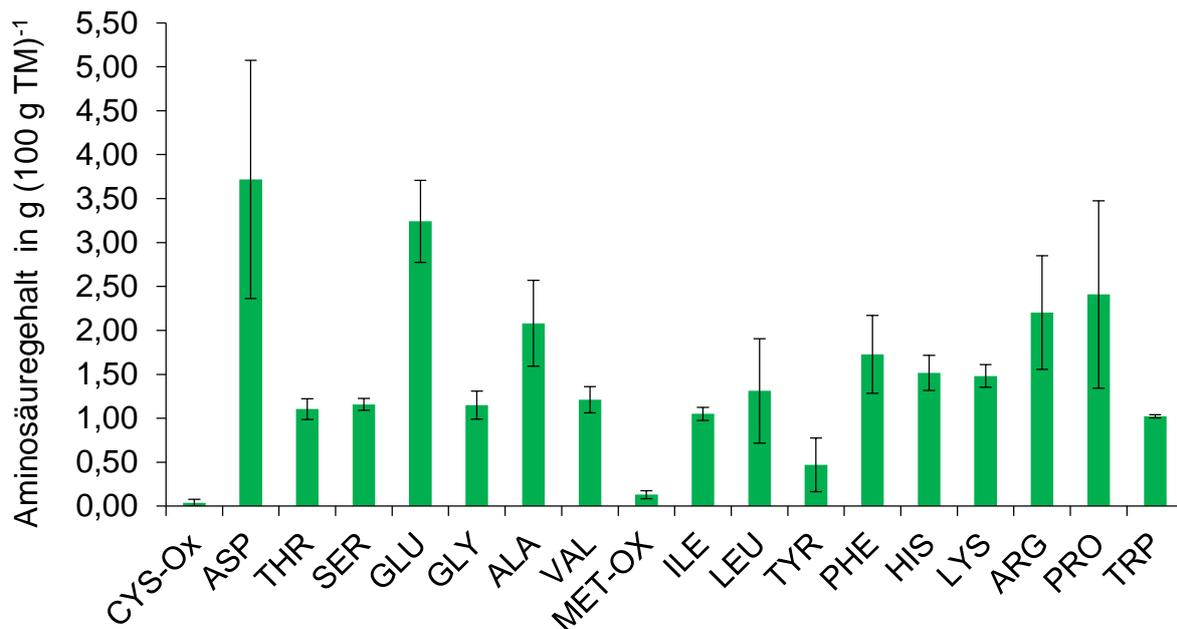


Abbildung 26: Gesamtaminosäuregehalt einer LED Submerskultur supplementiert mit Karottentrestler (6 d):  $27,03 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  zum Vergleich mit dem Gesamtrohproteinengehalt nach Kjeldahl ( $N \times 4,73$ ):  $31,25 \text{ (100 g TM)}^{-1}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n=3$ ) mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Insgesamt betrachtet (Abb.24 - 26; Tab.3.11) kommt Glu mit einem Anteil von >20% als dominierende AS in PSA IM und PSC IM vor. In LED K beträgt der Anteil an Glutamin 10,4%. Den geringsten Anteil am Gesamtaminosäuregehalt, mit 1,6% und 1,4%, erreichten die schwefelhaltigen AS Cys-Ox und Met-Ox bei PSA IM und PSC IM. Bei LED K wurden nur 0,2% für Cys-Ox und 0,4% für Met-Ox detektiert. Den dominierenden Anteil in LED K machte die AS Asp aus. Die Aminosäureverteilung von LED K unterscheidet sich nicht wesentlich von derjenigen von PSA und PSC (Abb.24 - 26, Tab. 3.11).

Tab.3.11: Vergleich der prozentualen Anteile der jeweiligen Aminosäure in Bezug auf die Gesamtaminosäurekonzentration berechnet über die Kalibrierung mit der Referenz-Aminosäure.

AS	Rel. Anteil % in PSA IM	Rel. Anteil% in PSC IM	Rel. Anteil% in LED K
Ala	7,4	8,3	6,7
Arg	9,8	7,1	7,1
Asp	7,9	9,4	12,0
Cys-Ox	1,6	1,9	0,2
Glu	21,1	20,0	10,4
Gly	3,8	4,2	3,7

AS	Rel. Anteil % in PSA IM	Rel. Anteil% in PSC IM	Rel. Anteil% in LED K
His	4,3	6,7	4,9
Ile	3,3	2,9	3,4
Leu	5,3	5,7	4,2
Lys	4,6	4,9	4,7
Met-Ox	2,6	1,4	0,4
Phe	4,2	3,1	5,5
Pro	8,1	7,4	7,7
Ser	3,5	3,7	3,7
Thr	3,0	3,1	3,5
Trp	2,4	4,6	3,3
Tyr	1,8	1,7	1,5
Val	5,2	4,1	3,9
Essentielle AS	34	33	31

### 3.2.6 Vitamin D<sub>2</sub>-Analytik

UV-Belichtung führte bei LED K zu einer Vitamin D<sub>2</sub>-Konzentration von 27,3 µg (g TM)<sup>-1</sup>, für PSC IM wurden 18,5 µg (g TM)<sup>-1</sup> und für PSA IM wurden 14,3 µg (g TM)<sup>-1</sup> Vitamin D<sub>2</sub> erreicht. In den unbelichteten Mycelien konnte kein Vitamin D<sub>2</sub> nachgewiesen werden.

Tab. 3.12: Vitamin D<sub>2</sub> Konzentration nach 10 minütiger Belichtung von PSA IM, PSC IM und LED K.

Pilz-Substrat	Vitamin D <sub>2</sub> Konzentration [µg g TM <sup>-1</sup> ]
PSA IM	14,3
PSC IM	18,5
LED K	27,3

### 3.2.6.1 Bestimmung des Mycelanteils im Lyophilisat

Der Anteil an LED im LED K Lyophilisat betrug am Tag der Ernte (Tag 6) 73% bei einer Auswaage von 5,86 g TM.

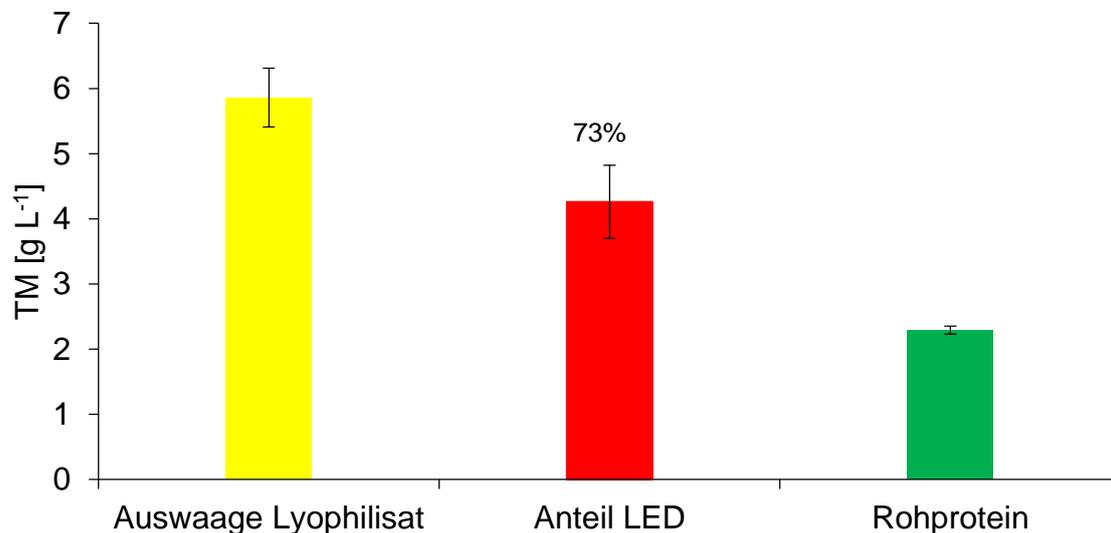


Abbildung 27: Bestimmung des LED-Anteils im Lyophilisat LED K über den Ergosterolgehalt (HPLC-DAD, 2.8.4), Proteingehalt über Kjeldahl (Nx4,73) (2.7.2).

## 3.3 Bestimmung der Proteinqualität

### 3.3.1 Berechnung des Chemical Scores

Aus den Tabellen 3.12 - 3.14 lässt sich der jeweilige berechnete Chemical Score (CS) (vgl. Kapitel 2.9.1, Gleichung 12) der Pilzmycelien ablesen. Die Berechnung des CS für PSA IM ergab vor allem eine Limitierung an LEU (CS 71) und THR (CS 71).

Die limitierende AS für PSC IM mit einem CS von 60 war ILE, gefolgt von THR mit einem CS von 63. Auch für LED K stellten sich schwefelhaltige AS Met und Cys als limitierende Aminosäuren dar (CS 18). Bei allen drei Pilzmycelien wurde der höchste CS für TRP errechnet.

Tab.3.12: Berechnung des Chemical Scores von PSA IM anhand des Referenzproteins.

AS	Referenzprotein <sup>1</sup>	AS <sup>2</sup>	AS <sup>3</sup>	CS
VAL	5,00	1,26	4,84	97
LEU	7,00	1,44	4,97	71
ILE	4,00	1,08	3,11	78
MET+CYS	3,50	0,20	4,01	115
THR	4,00	1,15	2,85	71
PHE+TYR	6,00	2,23	5,64	94
LYS	5,50	1,53	4,36	79
TRP	1,00	0,86	2,28	228

<sup>1</sup>1973 von FAO/WHO als Referenzprotein festgelegt.

<sup>2</sup>angegeben in g (100 g TM)<sup>-1</sup>.

<sup>3</sup>angegeben in g (100 g Protein)<sup>-1</sup>

Tab.3.13: Berechnung des Chemical Scores von PSC IM anhand des Referenzproteins.

AS	Referenzprotein <sup>1</sup>	AS <sup>2</sup>	AS <sup>3</sup>	CS
VAL	5,00	0,76	3,34	67
LEU	7,00	1,06	4,62	66
ILE	4,00	0,55	2,41	60
MET+CYS	3,50	0,60	2,63	75
THR	4,00	0,57	2,51	63
PHE+TYR	6,00	0,90	3,94	66
LYS	5,50	0,92	4,01	73
TRP	1,00	0,86	3,74	374

<sup>1</sup>1973 von FAO/WHO als Referenzprotein festgelegt.

<sup>2</sup>angegeben in g (100 g TM)<sup>-1</sup>.

<sup>3</sup>angegeben in g (100 g Protein)<sup>-1</sup>

Tab.3.14: Berechnung des Chemical Scores von LED K anhand des Referenzproteins.

AS	Referenzprotein <sup>1</sup>	AS <sup>2</sup>	AS <sup>3</sup>	CS
VAL	5,00	1,26	4,04	81
LEU	7,00	1,44	4,60	66
ILE	4,00	1,08	3,46	86
MET+CYS	3,50	0,20	0,64	18
THR	4,00	1,15	3,69	92
PHE+TYR	6,00	2,23	7,13	119
LYS	5,50	1,53	4,89	89
TRP	1,00	1,13	3,62	362

<sup>1</sup>1973 von FAO/WHO als Referenzprotein festgelegt.

<sup>2</sup>angegeben in g (100 g TM)<sup>-1</sup>.

<sup>3</sup>angegeben in g (100 g Protein)<sup>-1</sup>

### 3.3.2 Berechnung des Aminosäureindizes und der biologischen Wertigkeit

Zur Berechnung des essentiellen Aminosäureindizes und der biologischen Wertigkeit wurden die in Kapitel 2.9 dargestellten Gleichungen 13 und 14 verwendet. Für PSA IM ließ sich der höchste  $EAA_i$  (86) mit der höchsten biologischen Wertigkeit errechnen (82), gefolgt von LED K. Für PSC IM wurde ein  $EAA_i$  von 70 mit einer biologischen Wertigkeit von 65 berechnet (Tab. 3.15).

Tab. 3.15: Berechneter Essentieller Aminosäureindex und die Biologische Wertigkeit für PSA IM, PSC IM und LED K.

Probe	$EAA_i$	BW
PSA IM	86	82
PSC IM	70	65
LED K	71	66

### 3.3.3 Berechnung des *N:P-Conversion Factors*

In Tabelle 3.16 sind die Stickstoffgehalte, experimentell bestimmt aus Kjeldahl dargestellt.

Tab. 3.16: Berechnete Stickstoffgehalte aus den jeweiligen Methoden in den Pilz-Substrat-Kombinationen.

Probe	N <sub>Kjeldahl</sub> *
PSA IM	6,35
PSC IM	4,61
LED K	6,56

\* angegeben in g (100 g TM)<sup>-1</sup>.

Zur Berechnung neuer Stickstoff-zu-Protein Umrechnungsfaktoren wurde Formel 16 verwendet. Für LED K wurde der niedrigste Faktor von 4,73 berechnet (Tab. 3.17).

Tab. 3.17: Berechneter *N:P conversion factor* der jeweiligen Pilz-Substrat-Kombinationen im Vergleich zur Literaturangaben.

Probe	Neuer <i>N:P conversion factor</i>	<i>N:P conversion factor</i> Literatur <sup>a</sup>
PSA IM	4,91	4,97
PSC IM	4,96	4,97
LED K	4,73	4,50

<sup>a</sup> Mattila *et al.* (2002)

## 3.4 Maßstabsvergrößerung in den 7,5 L- und 150 L-Maßstab

Eine Maßstabsvergrößerung der Kulturen von PSA, PSC und LED mit Isomaltulose-Melasse und Karottentrester wurde in einem 7,5 L-Fermenter (4 L Medium) und in einem 150 L-Fermenter (80 L Medium) etabliert (vgl. Kapitel 2.6.6; 2.6.7, Abbildung 27 und 28).



Abbildung 28: 7,5 L Bioreaktor zur Submerskultivierung von Basidiomyceten-Mycel (PSA IM; Kulturtag 3).

Ein Vergleich der Rohproteinausbeute ( $\text{g L}^{-1}$ ) aus Tabelle 3.3 mit der Rohproteinausbeute der Maßstabvergrößerung mit einem Volumen von 4 L (Tabelle 3.18) zeigte eine geringere Rohproteinausbeute als die im Schüttelkolben bestimmte Rohproteinausbeute. Die höchste Proteinausbeute wurde bei PSA IM erzielt, gefolgt von PSC IM und LED K. Bei PSA und PSC wurde die Kultivierungsdauer im Vergleich zum Schüttelkolben um einen Tag verlängert. Dies wurde durch optischen Vergleich des Mediums bestimmt.

Tab.3.18: Berechnete Rohproteinmenge und Kulturdauer der Pilz-Substrat-Kombinationen PSA IM, PSC IM und LED K im 7,5 L-Fermenter.

Probe	Kulturdauer [d]	Rohprotein [ $\text{g L}^{-1}$ ]
PSA IM	6	1,46
PSC IM	4	1,42
LED K	6	1,31



Abbildung 29: 150 L-Bioreaktor zur Submerskultivierung von Basidiomyceten-Mycel.

Tab.3.19: Berechnete Rohproteinmenge und Kulturdauer der Pilz-Substrat-Kombinationen PSA IM, PSC IM und LED K im 150 L-Fermenter.

Probe	Kulturdauer [d]	Rohprotein [ $\text{g L}^{-1}$ ]
PSA IM	6	1,64
PSC IM	4	1,34
LED K	6	1,16

### 3.5 Abbau von RNA

#### 3.5.1 Auswirkungen auf den Proteingehalt

Abbildung 30 vergleicht den Rohproteingehalt in  $\text{g L}^{-1}$  von unbehandeltem (rot) und hitzebehandeltem (blau) PSA IM Pilzmycel.

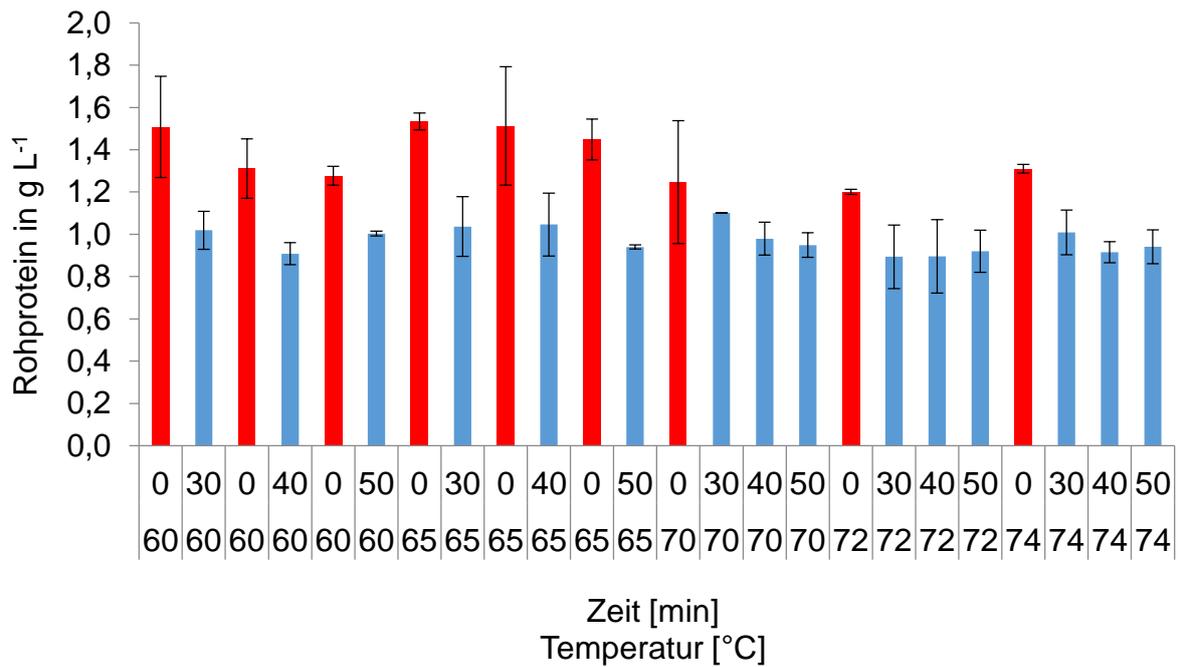


Abbildung 30: Vergleich des Rohproteins (g L<sup>-1</sup>) von unbehandelten (rot) zu hitzebehandelten (blau) Mycel von PSA IM in Abhängigkeit der Temperatur [°C] und Zeit [min].

Auf Grundlage der Ergebnisse der Optimierungsversuche von PSA IM wurde für PSC IM und LED K die optimale Temperatur/Zeit-Kombination gewählt (70 °C/30 min). Dazu wurden Zeit [min] und Temperatur [°C] gegen den Rohproteingehalt in g L<sup>-1</sup> aufgetragen (vgl. Abbildung 31).

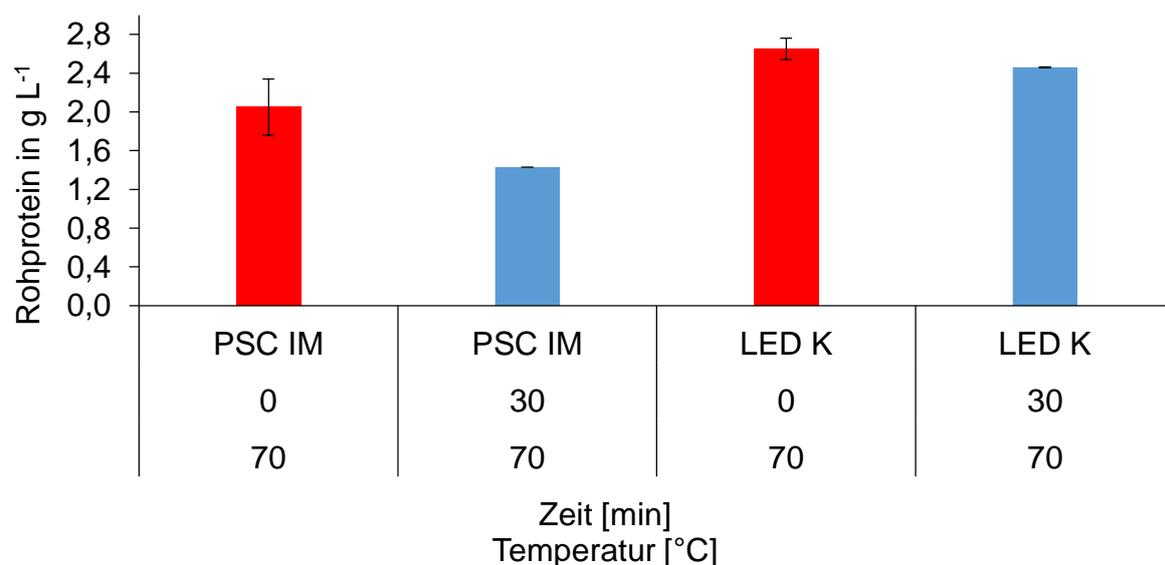


Abbildung 31: Vergleich des Rohproteins (g L<sup>-1</sup>) von unbehandelten (rot) zu hitzebehandelten (blau) Mycel von PSC IM und LED K.

### 3.5.3 QIAxcel RNA – Kapillargelelektrophorese

In Abbildung 32 ist die Gesamt-RNA-Konzentration in  $\text{mg (100 g TM)}^{-1}$  des jeweiligen unbehandelten und hitzebehandelten PSA IM-Mycels dargestellt. Die RNA-Konzentrationen des unbehandelten Mycel betragen  $1,31 - 34,6 \text{ mg (100 g TM)}^{-1}$ . Die RNA-Konzentrationen von behandelten betragen  $0,01 - 10,85 \text{ mg (100 g TM)}^{-1}$ .

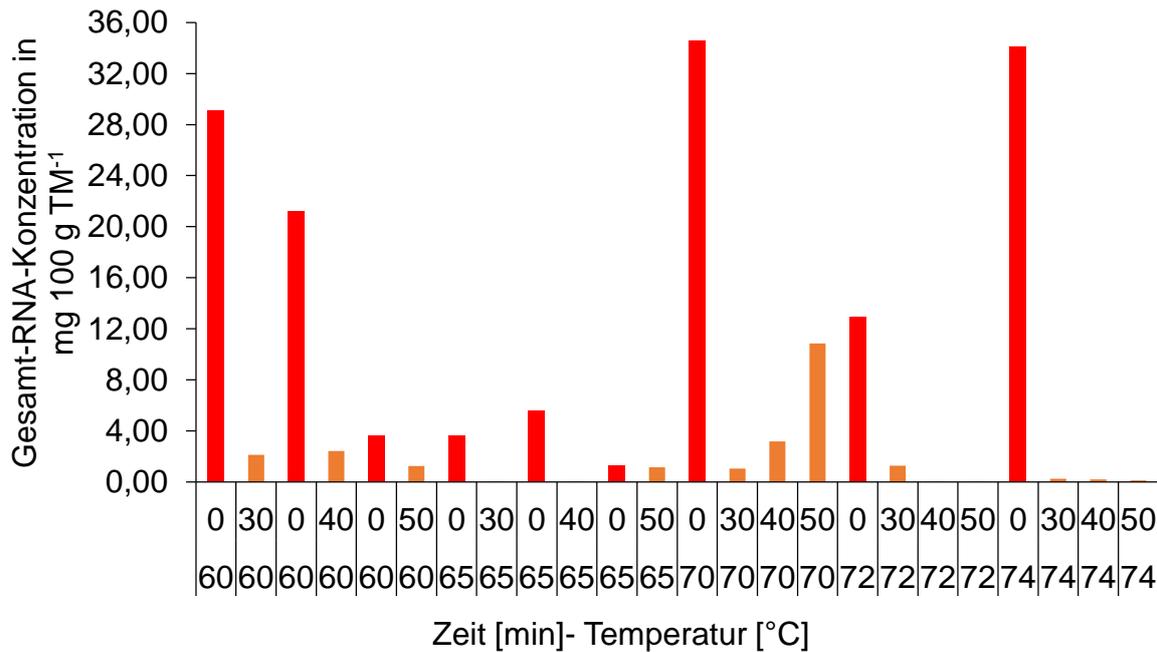


Abbildung 32: Vergleich der RNA-Konzentration ( $\text{mg (100 g TM)}^{-1}$ ) von unbehandeltem (rote Balken) und hitzebehandeltem (orangene Balken) PSA IM-Mycel.

Abbildung 33 zeigt die RNA-Konzentration des unbehandelten und hitzebehandelten PSC IM- und LED K-Mycels. Die Gesamt-RNA-Konzentration für unbehandeltes PSC IM Mycel betrug  $33,09 \text{ mg (100 g TM)}^{-1}$ . Die Gesamt-RNA-Konzentration für LED K betrug  $4,73 \text{ mg (100 g TM)}^{-1}$ .

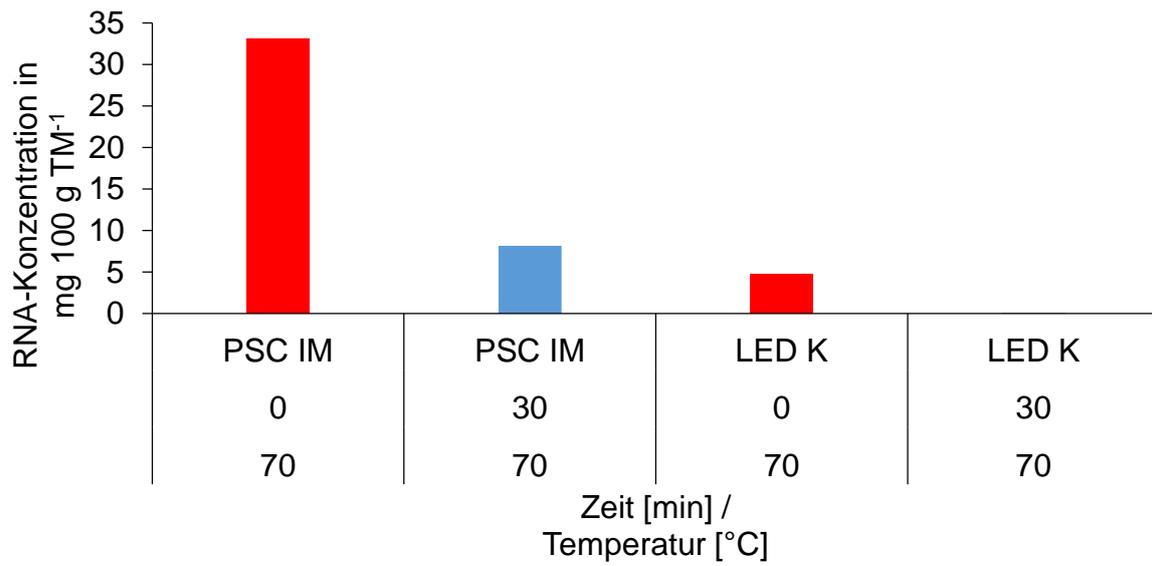


Abbildung 33: Vergleich der RNA-Konzentration ( $\text{mg (100 g TM)}^{-1}$ ) von unbehandeltem (rot) und behandeltem (blau) PSC IM- und LED K-Mycel.

### 4 Diskussion

In Europa wurde das Interesse an alternativen Proteinen zunehmend größer, nachdem in den 80er Jahren die „Bovine spongiforme Encephalopathie“, kurz BSE, bei Kühen ausbrach (Morrison *et al.*, 1999). Aus Angst, Muskelproteine infizierter Tiere zu verwenden, rückten alternative Proteinquellen immer mehr in den Fokus der Lebensmittelindustrie. Dies führt zu einer ansteigenden Akzeptanz für pflanzliche Proteine wie z.B. Sojaproteine (Singh *et al.*, 2008), Hülsenfruchtproteine, Getreideproteine und Mycoprotein, Pilze als mögliche Proteinquelle einzusetzen (Denny *et al.*, 2008). Der Name „Mycoprotein“ entspringt der in einem kontinuierlichen Fermentationsverfahren hergestellten Ribonucleinsäure (RNA)-reduzierten Biomasse aus Hyphen des Ascomyceten *Fusarium venenatum* (Rodger, 2001). Im Vergleich zu Fleischproteinen sind pflanzliche Proteine günstiger in der Herstellung, enthalten weniger Purine und kein Cholesterol (Kim *et al.*, 2011). Die Arbeitsgruppe um Yonghwi Kim aus Korea publizierte 2011 die biotechnologische Herstellung von *Agaricus bisporus*-Mycelien als möglichen Fleischersatz. Als Kohlenstoffquelle wurde ein Zuckerrohrextrakt verwendet. Bis zum heutigen Stand der Forschung sind keine daraus resultierenden bzw. weiteren Produkte auf Basis von Pilzen bekannt. Mit dem Ziel dieser Arbeit, ein Basidiomyceten-Protein für Nahrungsmittel biotechnologisch herzustellen, erschließen sich neue Möglichkeiten, um neue Proteinquellen auf Basis von Speisepilzen zu nutzen und als Proteinquelle in Lebensmitteln zu etablieren. Zu Beginn dieser Arbeit wurden Ansätze zur Isolierung des Proteins aus dem Mycel durchgeführt. Neben einer Ethanol-Fällung wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung zur Ermittlung der IEP der Proteine durchgeführt. Aufgrund der sehr geringen Proteinausbeuten pro Liter Kulturmedium kam nur der Einsatz des kompletten Pilzmycels zur Herstellung von Lebensmitteln in Frage.

#### 4.1 Screening geeigneter Pilz-Substrat-Kombinationen

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Auswahl geeigneter Basidiomycetenstämme, die die Grundvoraussetzung für die Entwicklung und Etablierung eines biotechnologischen Verfahrens zur industriellen Herstellung von Basidiomyceten-

Protein darstellen. Der verwendete Stamm sollte ein Speisepilz sein und auf seine Nährwerte hin analysiert werden. Mit Hilfe der Literatur und der institutseigenen Stammsammlung wurden sieben Basidiomyceten für das Screening ausgewählt (Tab. 2.9). Um die Kosten bei der Herstellung möglichst gering zu halten, wurde ein Screening geeigneter Rohstoffquellen aus Reststoffen der Industrie und Landwirtschaft als Substrate durchgeführt. Das zur Hauptkultivierung genutzte Substrat (Karottentrester, Isomaltulose-, Rüben-Melasse und Zwiebeltrester) stellte jeweils die einzige Kohlenstoffquelle dar. Durch die alleinige C-Quelle aus dem Substrat wurde der Pilz gezwungen, seinen Bedarf an Kohlenhydraten über die Verstoffwechslung des Substrates zu decken. Diesen Vorteil, Nebenströme zu metabolisieren und für sich zu nutzen, zeigten schon diverse Arbeitsgruppen. Reusser *et al.* (1958b) berichteten über einen Anstieg des Proteingehalts in *Morchella hybrida* um mehr als 200% unter Verwendung von Melasse und Sulfitablaugen als Substrat. Manu-Tawaih *et al.* (1987) verglichen den Proteingehalt von *Pleurotus ostreatus* in einem Glucose-haltigen Medium mit einem mit Torfextrakt supplementierten Medium. Bei letzterem wurde eine Steigerung der Proteinausbeute um 56% erreicht.

Als vielversprechend stellten sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus sajor-caju* auf Isomaltulose-Melasse und *Lentinula edodes* auf Karottentrester heraus. Um die Kosten bei der Herstellung des Mediums weiter zu reduzieren, wurde eine Optimierung des verwendeten M2 Mediums (vgl. Tabelle 2.12, interne Namensgebung) vorgenommen. Aus verschiedenen getesteten N-Quellen stellte sich Hefeextrakt als günstige Alternative, bei gleichbleibenden Proteinausbeuten und Kultivierungsdauer (Tabelle 3.1), zum teuren L-Asparingsäure-Monohydrat dar. Als Indikator für die Auswahl geeigneter Pilz-Substrat-Kombinationen dienten der Proteingehalt pro Liter Kulturmedium und eine möglichst kurze Kultivierungsdauer.

### 4.2 Nährwert-Analytik

Die Kultivierung von Basidiomyceten auf Nebenströmen der Industrie und Landwirtschaft ermöglicht die Gewinnung proteinreicher, kohlenhydrat- (u.a.  $\beta$ -Glucane, Chitin) und mineralstoffhaltiger Mycelien. Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Nährwerte näher betrachtet und diskutiert.

### 4.2.1 Rohprotein

Die in der Literatur angegebenen Proteingehalte für Fruchtkörper betragen 24 – 44% in *Agaricus bisporus*, 10 – 17% für *Lentinula edodes* und 21 – 30% für *Pleurotus* spp. (Weaver *et al.*, 1977; Breene *et al.*, 1990; Coskuner *et al.*, 2000). Für Mycelien wie z.B. *Agaricus bisporus* beträgt der Proteingehalt 33% und 26 – 40% für *Pleurotus ostreatus* (Manu-Tawiah *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2011). Für PSA IM wurde ein Proteingehalt von 31,18 g (100 g TM)<sup>-1</sup> bestimmt. Dies entspricht 2,9 g Protein pro Liter Kulturmedium. Für PSC IM wurde ein Proteingehalt von 22,87 g (100 g TM)<sup>-1</sup> mit der höchsten Proteinausbeute von 3,38 g Protein pro Liter Kulturmedium ermittelt. Mit einem Proteingehalt von 31,25 g (100 g TM)<sup>-1</sup> und einer Proteinausbeute von 2,19 g wurde für LED K die geringste Proteinausbeute ermittelt. Die Ergebnisse korrelieren gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten. Unterschiede im Proteingehalt werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, u.a durch die Art des Pilzes, durch das Wachstumsstadium, die Verfügbarkeit von Stickstoff im Medium und durch das zugesetzte Substrat (Longvah und Deosthale, 1998).

#### 4.2.1.1 Aminosäuren

Die in dieser Arbeit analysierten Mycelien von PSA IM, PSC IM und LED K zeigten die Präsenz von 18 proteinogenen Aminosäuren inklusive aller essentiellen Aminosäuren. Der Gesamtaminosäuregehalt, der sowohl die freien als auch die gebundenen Aminosäuren erfasst, betrug für PSA IM 29,41 g (100 g TM)<sup>-1</sup> und für PSC IM 22,90 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Literaturbefunden zufolge ist das Aminosäureprofil in allen *Pleurotus* spp. ähnlich (Maftoun *et al.*, 2015). Abbildungen 22 und 23 machen deutlich, dass Glu und Asp die dominierenden AS mit einem Gesamtanteil von ca. 29% sind. Bestätigt wird dies durch frühere Publikationen von Purkayastha & Nayak (1981) und Mdachi *et al.* (2004). Sie beschrieben jeweils die dominierenden AS Glu, Asp und Arg als spezifische AS in *Pleurotus* spp.. Eine Unterscheidung zwischen Gln und Glu sowie Asn und Aspe ist nicht möglich, da die Amidbindungen der Seitenketten von Gln und Asn während der sauren Probenvorbereitung hydrolysiert werden. Manzi *et al.* (1999) beschrieben die AS-Verteilung in Bezug auf die Gesamtaminosäuren von 12 verschiedenen *Pleurotus* spp. Der Vergleich zwischen

den in der Literatur angegebenen Werten mit denen von PSA IM und PSC IM zeigte Unterschiede in 7 AS. So lag der jeweilige prozentuale Anteil von Gly, Ile, Thr und Tyr unter den von Manzi *et al.* (1999) bestimmten Werten. Glu, Pro und Trp hingegen lagen über den Werten. Mögliche Ursachen für die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung sind zum einen genetische Variationen und der Kultivierungsprozess, zum anderen handelte es sich bei den von Manzi *et al.* (1999) beschriebenen *Pleurotus*-Spezies um Fruchtkörper und nicht um submers kultivierte Mycelien. Mendez *et al.* (2005) berichteten, dass die genetische Variation und der Kultivierungsprozess einen großen Einfluss auf die Nährwertzusammensetzung von *Pleurotus*-Arten haben. Dabei verglichen sie die Aminosäurezusammensetzung von *P. ostreatus* kultiviert auf *Pycnanthus ongoleubis* und anderen hölzernen Substraten und fanden signifikante Unterschiede in den Werten. Die schwefelhaltigen AS Cys und Met kamen nur in geringen Konzentrationen in PSA IM und PSC IM vor. Mit einem Anteil von 1,6% und 1,9% für Cys und 2,6% und 1,4% für Met kamen diese AS in den niedrigsten Konzentrationen vor. Cystin und Cys wurden in der oxidierten Probe als Cysteinsäure bestimmt und als Cystein mittels der molekularen Masse von  $120,15 \text{ g Mol}^{-1}$  berechnet. Met wurde in der oxidierten Probe als Methioninsulfon bestimmt und als Met berechnet.

Der Gesamtaminosäuregehalt von LED K betrug  $27,03 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  (vgl. Abbildung 24). Anders als bei PSA IM und PSC IM war die dominierenden AS Asp, gefolgt von Glu mit einem Gesamtanteil von ca. 22%. Manzi *et al.* (1999) und Bisen *et al.* (2010) beschrieben die Aminosäureverteilung von verschiedenen LED-Fruchtkörpern. Sie fanden heraus, dass Glu und Asp die dominierenden AS waren. Der prozentuale Anteil an Gly, Leu, Lys, Ser und Tyr lag unterhalb des Anteils der AS, die in dieser Arbeit bestimmten wurden. His und Phe dagegen lagen über den Werten. Die schwefelhaltigen AS kamen mit 0,15% für Cys und 0,42% für Met in der geringsten Menge im Mycel vor. Dies wurde durch Mattila *et al.* (2002) bestätigt. Sie untersuchten die Aminosäurezusammensetzung in LED-Fruchtkörpern und ermittelten den geringsten AS-Gehalt für die schwefelhaltigen AS und den höchsten für Glu.

### 4.2.1.2 Biologische Wertigkeit des Basidiomyceten-Proteins

Essentielle AS können vom Körper nicht selbst hergestellt werden und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Diese essentiellen AS werden für die Synthese von körpereigenen Proteinen in Muskeln, Organen, Knochen, Haut und für die Synthese von Enzymen, einiger Hormone und Antikörper benötigt. Durch den Mangel an einer oder mehrere essentiellen AS wird kein Protein synthetisiert (Grosvenor and Smolin, 2002). Speisepilze erwiesen sich als eine gute Quelle für essentielle AS wie Leu, Val, Thr, Lys, Met und Trp (Mdachi *et al.*, 2004).

Die Bewertung der Qualität des Proteins in den Pilzmycelien bezieht sich in dieser Arbeit auf alle essentiellen AS in Bezug auf einen Erwachsenen. His und Arg zählen zu den semi-essentiellen AS. Sie wurden in der Bewertung nicht berücksichtigt.

Bei der unter Kapitel 2.9.1 verwendeten Messmethode, dem *Chemical Score*, wurden die Proteine nach dem Gehalt an essentiellen AS bewertet. Er gibt Aufschluss darüber, welche essentiellen AS limitierend (CS <100) sind. Zum Vergleich wurde ein von der FAO/WHO vorgeschlagenes Referenzprotein verwendet. Das Referenzprotein gilt aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung für den Menschen als ideal. Für PSA IM wurden Leu und Thr mit einem CS von 71 als limitierende AS berechnet. Bei PSC IM stellten Ile (CS 60) und bei LED K Met und Cys mit einem CS von 18 die limitierenden AS dar. Die Qualität des Pilz-Proteins kann anhand seiner limitierenden AS mit anderen Speisepilzen verglichen werden. Crisan und Sands (1978) analysierten verschiedene Speisepilze und fanden Limitierungen in allen essentiellen AS. Breene *et al.* (1990) beschrieben Met, Cys, Val und Ile als limitierende AS in *Lentinula edodes*. Andere Proteinquellen, z.B. pflanzlicher Herkunft zeigen eine Limitierung von Lysin. Kuhmilch und Fleischproteine dagegen weisen oft ein Defizit an Methionin auf (Young *et al.*, 1994).

Eine weitere Methode, um die Qualität des Proteins zu beurteilen, ist die biologische Wertigkeit (BW) eines Proteins. Als Qualitätsmerkmal können zwei verschiedene Herangehensweisen herangezogen werden. Zum einen die biologische und zum anderen die chemische (rechnerische) Untersuchungsmethode. Biologische Methoden können nur anhand von zeitaufwändigen Fütterungsstudien durchgeführt werden, wodurch diese Methoden zahlreichen Unsicherheitsfaktoren unterworfen sind. Einfacher und mit deutlich weniger Aufwand lässt sich die Proteinqualität mittels chemischer Methoden berechnen. Die Verdaulichkeit der Proteine wird bei dieser Methode außer Acht gelassen. Für PSA IM wurde eine BW von 82, für PSC IM 65

und für LED K eine BW von 66 berechnet. Crisan and Sands (1978) untersuchten die Aminosäurezusammensetzung von verschiedenen Speisepilzen und berechneten biologische Wertigkeiten zwischen 32 und 89. Bisaria *et al.* (1987) kultivierten Fruchtkörper von *Pleurotus sajor-caju* auf verschiedenen Substraten und ermittelten biologische Wertigkeiten von 31 - 67. Millward (1999) berichtete, dass Pilze besonders für Vegetarier und Veganer von Vorteil seien, da sie alle essentiellen Aminosäuren enthalten.

Tabelle 4.1 zeigt verschiedene Proteinquellen mit den dazugehörigen BW im Vergleich zu den in dieser Arbeit berechneten BW. Die biologische Wertigkeit von PSA IM lässt sich im Bereich von Fleisch und Milch einordnen. Generell ist die Qualität der in dieser Arbeit bestimmten Pilzproteine höher als die der meisten Hülsenfrüchte und Gemüsesorten.

Tabelle 4.1: Biologische Wertigkeit einiger Nahrungsproteine.

Proteinquelle	BW
Hühner-Vollei	100*
Rindfleisch	80*
Kuhmilch	91*
Sojaprotein	74*
<i>Phaseolus vulgaris</i>	58*
Mycoprotein	84**
PSA IM	82
PSC IM	65
LED K	66

\*Hoffmann *et al.*, 2004

\*\* Mycoprotein GRAS Notification 2001

### 4.2.1.3 N:P Conversion factor

Die Berechnung des Proteingehalts hängt von dem Faktor ab, der bei der Umwandlung von Stickstoff zu Protein verwendet wird. Nitschke *et al.* (2011) berichteten, dass Pilze 10 - 20% Nicht-Protein-Stickstoff in Form von Chitin und andere Nicht-Protein-Verbindungen wie Amiden enthalten. In dieser Arbeit wurden die Faktoren 4,91 für PSA IM, 4,96 für PSC IM und 4,63 für LED K anhand von Formel 16 berechnet. Ein Vergleich der neu berechneten Faktoren mit den in der

Literatur angebenen Faktoren zeigte keinen signifikanten Unterschied. Mattila *et al.* (2002) berechneten einen Stickstoff-zu-Protein-Faktor von 4,97 für *Pleurotus ostreatus* Fruchtkörper und von 4,50 für Fruchtkörper von *Lentinula edodes*.

### 4.2.3 Kohlenhydrate

Der Gesamtkohlenhydratgehalt von Pilzen umfasst neben Mono- und Disacchariden verschiedene Polysaccharide wie z.B. Chitin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucane und Hemicellulosen. Der durch Differenzbildung berechnete Kohlenhydratgehalt für PSA IM betrug  $60,31 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ , für PSC IM  $72,01 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  und für LED K  $58,58 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Guo *et al.* (2007) ermittelten einen Kohlenhydratgehalt von  $57,1 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  für *Pleurotus sapidus*-Fruchtkörper. Chang *et al.* (1981), Chirihang *et al.* (2009) und Cuptapun *et al.* (2010) bestimmten den Kohlenhydratgehalt von *Pleurotus sajor-caju*-Fruchtkörpern zu  $50,7 - 65,2 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Longvah und Deosthale (1998) ermittelten für *Lentinula edodes*-Fruchtkörper einen Kohlenhydratgehalt von  $64,4 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Die Abweichungen zu den in der Literatur angegebenen Kohlenhydratgehalten von PSC IM und LED K können darauf zurückgeführt werden, dass es sich hierbei um Fruchtkörper und nicht um submers kultivierte Mycelien handelte.

#### 4.2.3.1 Mono- und Disaccharide

Kohlenhydrate kommen in Pilzen vorwiegend in Form von Polysacchariden vor (Blumenthal, 1976). Mono- und Disaccharide finden sich in der Regel nur in niedrigen Konzentrationen (Wim, Wannet, Hermans & Op den Camp, 2000). Die Zuckerzusammensetzung variiert innerhalb der Pilztaxa und durch Verwendung verschiedener Substrate. Glc, Fru und Tre wurde in allen Pilz-Substrat-Kombinationen ermittelt. Trehalose ist das meist verbreitete Disaccharid in Pilzen und dient als Energiespeicher (Inoue *et al.*, 1981; Thevelein *et al.*, 1982). Mittels HPAEC-PAD wurden der Tre- und Sac-Gehalt in PSA IM, PSC IM und LED K ermittelt. Dabei wurde der höchste Tre-Gehalt von  $3,9 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  in PSC IM bestimmt. Die niedrigste Tre-Konzentration von  $2,3 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  wies LED K auf. In einer umfangreichen Analyse ermittelten Maftoun *et al.* (2015) die

Zuckerzusammensetzung von *Pleurotus* spp. Fruchtkörpern. Unter anderem analysierten sie den Tre-Gehalt und fanden Konzentrationen zwischen 0,27 - 3,3 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Yoshida *et al.* (1987) untersuchten die Zuckerzusammensetzung in verschiedenen Wachstumsstadien von *Lentinula edodes*. Sie stellten fest, dass sich der Trehalosegehalt mit steigendem Alter des Mycels verändert. Nach 20 Tagen betrug der Trehalosegehalt 3,0 g (100 g TM)<sup>-1</sup>, nach 50 Tagen 7,2 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Neben Tre wurde Sac mittels HPAEC-PAD quantifiziert. Der höchste Sac-Gehalt wurde in PSC IM mit 10,4 g (100 g TM)<sup>-1</sup> ermittelt, gefolgt von PSA IM mit 9,5 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. In LED K wurde keine Sac nachgewiesen. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Zuckerzusammensetzung abhängig vom Substrat ist, da Sac in Fruchtkörpern nicht vorkommt. Der relativ hohe Gehalt an Sac in PSC und PSA kann durch das zugegebene Substrat Isomaltulose-Melasse erklärt werden. Im Substrat wurde ein Sac-Gehalt von 35,3 g (100 g TM)<sup>-1</sup> ermittelt. Im Karottentrester war keine Sac nachweisbar. PSA IM und PSC IM nutzten somit die aus dem Substrat bereitgestellte Sac als Energiespeicher.

Neben den Disacchariden wurden die Monosaccharide Glc und Fru enzymatisch bestimmt. Die Ergebnisse der Bestimmung von Glc und Fru beider Methoden (HPAEC und enzymatisch) wurden gegeneinander validiert und wiesen einen ähnlichen Gehalt auf. Als Ausgangsgehalt wurden in der Isomaltulose-Melasse 12,4 g (100 g TM)<sup>-1</sup> Glc und 19,02 g (100 g TM)<sup>-1</sup> Fru bestimmt. Das geerntete, gewaschene und getrocknete Mycel von PSA IM wies einen Glc-Gehalt von 3,07 g (100 g TM)<sup>-1</sup> und einen Fru-Gehalt von 6,07 g (100 g TM)<sup>-1</sup> auf. Im Überstand beider Mycelien wurde Glc noch Fru nachgewiesen. Berechnet von der Ausgangskonzentration an zugesetzter Glc und Fru erfolgte eine Umsetzung von 75% Glc und 68% Fru aus dem Substrat. Für PSC IM wurden 4,91 g (100 g TM)<sup>-1</sup> Glc und 9,42 g (100 g TM)<sup>-1</sup> Fru mit einer Umsetzung von 60% Glc und 51% Fru aus dem Substrat bestimmt. Der Unterschied zwischen beiden *Pleurotus*-Spezies ist möglicherweise auf die längere Kultivierungsdauer von PSA IM zurückzuführen. PSA IM wurde zwei Tage später geerntet und nutzte daher mehr Kohlenhydrate zur Bildung von Biomasse. Glc findet man als ubiquitären Bestandteil des Kohlenhydratstoffwechsels in Pilzen. Yang *et al.* (2001) untersuchten mehrere kommerzielle Pilze auf ihren Glc-Gehalt und ermittelten unter den verschiedenen Spezies Gehalte von 1,06 - 4,23 g (100 g TM)<sup>-1</sup> Glc. Guo *et al.* (2007) analysierten die Glc-Gehalte von verschiedenen *Pleurotus* spp. und fanden weit aus niedrigere

Konzentrationen von  $0,14 - 0,73 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Diese Unterschiede lassen sich auf unterschiedliche Stämme sowie unterschiedliche Medien bzw. Böden zurückführen. Fru kommt in Pilzen selten bzw nur in sehr geringen Konzentrationen vor (Reis *et al.*, 2012), daher wurde Fru offensichtlich aus dem Medium akkumuliert. Zur Kultivierung von LED K wurde Karottentrester als einzige C-Quelle verwendet. Die Ausgangskonzentrationen an zugesetzter Glc und Fru im Karottentrester entsprachen  $2,40 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  bzw.  $7,00 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Umgesetzt wurden, anders als bei PSA und PSC, 99% Fru und 90% Glc. Im Mycel wurde ein Glc-Gehalt von  $0,25 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  und ein Fru-Gehalt von lediglich  $0,08 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  ermittelt. Yoshida *et. al.* (1987) untersuchten die Zusammensetzung der Kohlenhydrate von *Lentinula edodes* in verschiedenen Altersstadien sowohl im Mycel als auch im Fruchtkörper. Sie fanden Glc-Gehalte von  $0,3 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  und Fru-Gehalte von  $0,1 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Dies entspricht in etwa den in dieser Arbeit bestimmten Gehalten an Glc und Fru. Im Gegensatz zur Isomaltulose-Melasse enthält Karottentrester deutlich weniger Glc und Fru. Hier wurde keine Akkumulierung von Fru festgestellt. Welche Hexosen bevorzugt verstoffwechselt werden, hängt von der individuellen Zusammensetzung des Enzymsystems der Pilze ab (Hammond, 1978).

### 4.2.3.2 Ballaststoffe

Der Ballaststoffgehalt von Speisepilzen variiert von Spezies zu Spezies.  $\beta$ -Glucane und Chitin bilden dabei die Hauptbestandteile der Zellwand von Pilzen. Beide Zellwandkomponenten gehören zu den nichtverdaulichen Kohlenhydraten. Sie sind gegen die menschlichen Enzyme resistent (Cheung, 2013).  $\beta$ -Glucane sind Polymere bestehend aus D-Glucose-Einheiten, die über  $\beta$ -glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Sie sind artspezifisch und unterscheiden sich durch die Variation der Seitenketten. Das  $\beta$ -Glucan Lentinan aus *Lentinula edodes* besteht beispielsweise aus fünf linear verknüpften  $\beta$ -1,3 glykosidisch verknüpften D-Glucose-Einheiten mit zwei  $\beta$ -1,6 glykosidisch verknüpften Glucopyranosid-Seitenketten.  $\beta$ -Glucane aus *Pleurotus* spp. bezeichnet man als Pleuran. Die pharmakologischen Eigenschaften der Pilze hängen sowohl von der Art der Verknüpfung der Polysaccharide als auch von der Menge der Polysaccharide ab.

Zur photometrischen Bestimmung des  $\beta$ -Glucan-Gehalts wurde der  $\beta$ -Glucan Assay von Megazyme verwendet (2.2.4). Aus der Differenz von Gesamtglucanen und

$\alpha$ -Glucanen wurde der  $\beta$ -Glucan-Gehalt berechnet. Dabei wurde für PSA IM ein  $\beta$ -Glucan-Gehalt von  $18,7 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  und für PSC IM ein Gehalt von  $14,2 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  berechnet. Sari *et al.* (2017) untersuchten 39 Speise- und wild wachsende Pilze und stellten erhebliche Unterschiede zwischen den Spezies fest. Unter den 39 verschiedenen Fruchtkörpern untersuchten sie auch *Lentinula edodes* und vier verschiedene *Pleurotus*-Spezies. Zur Quantifizierung nutzten sie ebenfalls den in dieser Arbeit verwendeten Assay von Megazyme. Für Fruchtkörper der *Pleurotus*-Spezies fanden sie  $\beta$ -Glucan-Gehalte zwischen  $15,3$  und  $24,2 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Der niedrigere Gehalt an  $\beta$ -Glucanen in PSC IM wird dadurch erklärt, dass es sich bei den von Sari *et al.* (2017) untersuchten Pilzen um Fruchtkörper und nicht um das Mycel handelte. Generell ist der  $\beta$ -Glucan-Gehalt in Mycelien niedriger als im Fruchtkörper. Dies bestätigte sich auch in einer von Bak *et al.* (2014) durchgeführten Studie, in welcher der Glucan-Gehalt von Fruchtkörpern und Mycel von *Lentinula edodes* verglichen wurde. Dabei wurden im Mycel  $\beta$ -Glucan-Gehalte von  $15,6 - 27,1 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  detektiert. In dieser Arbeit wurde für LED K ein Gehalt von  $12,5 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  berechnet. Bak *et al.* kultivierten LED auf einem Kartoffel-Dextrose-Medium. Da dieses Medium ausschließlich lösliche Bestandteile enthält, wurde das reine Mycel erfasst und analysiert. In dieser Arbeit wurde zur Kultivierung von LED K das unlösliche Substrat Karottentrester verwendet, wodurch bei der Ernte nicht zwischen Mycel und Substrat unterschieden werden konnte bzw. eine Trennung nicht möglich war. Aus Kapitel 3.2.6.1 geht hervor, dass sich im LED K-Lyophilisat noch 27% Karottentrester befand. Dies erklärt den niedrigeren  $\beta$ -Glucan-Gehalt. Im Rahmen mehrere Studien fanden Forscher neben einer immunstimulierenden Wirkung auch eine entzündungshemmende und antikanzerogene Wirkung der Glucane (Silveira *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2015). Dabei stellten sich die  $\beta$ -Glucane aus *Pleurotus ostreatus* und *Lentinula edodes* als am effektivsten heraus. *Pleurotus* spp. gelten aus medizinischer Sicht als besonders vielversprechend (Cohen *et al.*, 2004). Durch das Vorhandensein von Lovastatin zeigt der Pilz cholesterinsenkende Eigenschaften (Bobek *et al.*, 1999).

Ein weiterer wichtiger Zellwandbestandteil ist Chitin, welches aus N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten aufgebaut ist. Die Chitinmoleküle sind über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft und dienen der mechanischen Festigkeit der Zellwand. Die in der Literatur gebräuchlichste Methode zur Bestimmung von Chitin ist die MBTH Methode (vgl. Kapitel 2.7.4.4). Da Chitin in Wasser, organischen

Lösungen, verdünnten Laugen und Säuren unlöslich ist, muss es zur Quantifizierung zu N-Acetyl-D-Glucosamin hydrolysiert werden. Daher wurde eine vollständige Hydrolyse mittels 6 N HCl durchgeführt. In der Literatur werden allgemein Chitingehalte für Pilze von 0,5 - 8,0 g (100 g TM)<sup>-1</sup> angegeben (Nitschke *et al.*, 2011). Vetter *et al.* (2007) analysierten mit der gleichen Methode Fruchtkörper von *A. bisporus*, *P. ostreatus* und *L. edodes* und fanden Chitingehalte für *P. ostreatus* von 2,16 - 5,46 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Für PSA IM und PSC IM wurden in dieser Arbeit Chitingehalte von 2,61 g (100 g TM)<sup>-1</sup> bzw. 6,01 g (100 g TM)<sup>-1</sup> bestimmt. Der Unterschied zwischen den beiden Pleurotusarten lässt schlussfolgern, dass die Dauer der Kultivierung möglicherweise eine Rolle spielte. PSA IM wurde nach 5 Tagen und PSC IM nach 3 Tagen geerntet. In *L. edodes* Fruchtkörpern ermittelten Vetter *et al.* (2007) einen Chitingehalt von 5,36 - 8,07 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Dies korrelierte gut mit dem in dieser Arbeit bestimmten Chitingehalt von 6,9 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Nitschke *et al.* (2011) zeigte, dass der Chitingehalt unabhängig von der Art des Pilzes ist. Aus medizinischer Sicht ist Chitin sehr vielversprechend, da es Gallensäuren, neutrale Membranlipide und Cholesterin im Verdauungstrakt bindet und deren Absorption, bzw. Reabsorption verhindert (Bobek & Galbavy, 1999; Smiderle *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2014).

### 4.2.4 Rohfett

Das Rohfett in Pilzen umfasst die Vertreter aller Lipid-Klassen, einschließlich freier Fettsäuren, Mono-, Di- und Triglyceride, Phospholipide sowie Sterole (Smith *et al.*, 2002). Im Vergleich zum Protein- oder Kohlenhydratgehalt ist der Rohfettgehalt in Pilzen meist niedrig. Der Rohfettgehalt einiger Pilzarten beträgt zwischen 1,1 und 8,3 g 100 g TM<sup>-1</sup>. Der durchschnittliche Gehalt liegt bei 4,0 g (100 g TM)<sup>-1</sup> (Bano *et al.*, 1988; Crisan and Sands, 1978). Der geringste Rohfettgehalt wurde für PSC IM mit 1,51 g (100 g TM)<sup>-1</sup> quantifiziert. Huang *et al.* (1989) zeigten einen Rohfettgehalt von 1,6 g (100 g TM)<sup>-1</sup> in Fruchtkörpern von *P. sajor-caju*. Zudem fanden Mattila *et al.* (2002) und Crisan and Sands (1978) Rohfettgehalte von 3,7 - 4,9 g (100 g TM)<sup>-1</sup> in *L. edodes* und 1,6 - 4,4 g (100 g TM)<sup>-1</sup> in Fruchtkörpern von *P. ostreatus*.

### 4.2.4.1 Fettsäuremethylester

Das extrahierte Rohfett wurde zur weiteren Analyse nach Kapitel 2.8.2 aufgearbeitet und anschließend gaschromatographisch untersucht. Neben dem Fettgehalt spielt die Zusammensetzung des Fettes eine wichtige Rolle. Sie hat einen Einfluss auf die technologischen Eigenschaften wie z.B. den Schmelzpunkt und auf die physiologischen Eigenschaften wie z.B. die Verdaulichkeit.

Das Fettsäureprofil von allen untersuchten Pilz-Substrat-Kombinationen beschränkte sich im Wesentlichen auf vier Hauptfettsäuren Palmitinsäure (C 16:0), Stearinsäure (C 18:0), Ölsäure (C 18:1) und Linolsäure (C 18:2) (vgl. Tab. 3.8). Diese Fettsäuren werden auch als speisepilztypische Fettsäuren bezeichnet (Longvah & Deosthale, 1999; Senatore, 1990). Insgesamt dominierten die ungesättigten (76 - 81%) gegenüber den gesättigten (18 - 24%) Fettsäuren. Der hohe Gehalt an ungesättigten Fettsäuren war hauptsächlich auf Linolsäure zurückzuführen. So wurden in PSA IM 66%, in PSC IM 73% und in LED K 70% Linolsäure detektiert. Hadar und Cohen-Arazi (1986) kultivierten *P. ostreatus* auf Rübenmelasse und bestimmten ebenfalls Linolsäure als Hauptfettsäure. Stearinsäure kam in den meisten Speisepilzen in den geringsten Konzentrationen vor. In den Pilz-Substrat-Kombinationen wurden 3 - 4% Stearinsäure ermittelt. Dimou *et al.* (2002) untersuchten das Fettsäureprofil von 19 *Pleurotus* spp. und fanden ein ähnliches Fettsäureprofil. Koyama *et al.* (1984) analysierten die Fruchtkörper von *L. edodes* und bestimmten 73% Linolsäure und 15% Palmitinsäure. Die ungesättigte Linolsäure zählt zu den essentiellen Fettsäuren ( $\omega$ -6-Fettsäure), sie kann vom Körper nicht selbst produziert werden und muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Linolsäure wird im Körper zu Arachidonsäure (entzündungsfördernd) und zu Dihomogammalinolensäure (entzündungshemmend) synthetisiert. Sie bildet die Ausgangssubstanz für hormonartig wirksame Thromboxane, Leucotriene und Prostacyclin. Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist eine Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren besser als eine Aufnahme von den nicht so leicht verdaulichen gesättigten Fettsäuren (Baltes und Matissek, 2011). Durch den hohen Anteil an Linolsäure trägt das Pilzmycel zu einer gesunden und ausgewogenen Ernährung bei.

#### 4.2.5 Asche

Der Mineralstoffgehalt der Pilze hängt im Wesentlichen von der Spezies, dem Alter und dem verwendeten Substrat ab (Demirbas *et al.*, 2001). Der Aschegehalt von Pilzen beträgt in der Regel 1,0–10% der Trockenmasse (Kalac, 2009; Oyetayo *et al.*, 2013; Maftoun *et al.*, 2015). Für LED K wurde der höchste Aschegehalt von 5,80 g (100 g TM)<sup>-1</sup> und für PSC IM der geringste Aschegehalt mit 3,61 g (100 g TM)<sup>-1</sup> bestimmt. PSA IM wies einen Aschegehalt von 5,30 g (100 g TM)<sup>-1</sup> auf. Maftoun *et al.* (2015) ermittelten Aschegehalte von verschiedenen Fruchtkörpern der *Pleurotus* spp. Daraus ergaben sich Aschegehalte für PSC zwischen 3,09 und 7,95 g (100 g TM)<sup>-1</sup> und für PSA Fruchtkörper von 5,32 g (100 g TM)<sup>-1</sup>. Longvah und Deosthale (1998) ermittelten einen Aschegehalt von 6,0 g (100 g TM)<sup>-1</sup> für LED-Fruchtkörper. Die in dieser Arbeit ermittelten Aschegehalte stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

Der Mineralstoffgehalt lässt sich weiter in Mengenelemente, Spurenelemente und Ultraspurenelemente einteilen. Dabei sind Mengenelemente in Mengen von >50 mg/Tag essentiell (Matissek *et al.*, 2010). In Pilzen findet man Ca, K, Mg, Na und Pr. Die Spurenelemente in Pilzen umfassen Cu, Fe, Mn, Mo und Zn und sind für den Menschen in Mengen von <50 mg/Tag essentiell (Matissek *et al.*, 2010). Pilze benötigen diese Elemente für ihr Wachstum und ihren Metabolismus (Mattila *et al.* 2001; Baldrian, 2003). Zu den Ultraspurenelementen gehören u.a. Cadmium und Blei (Sun *et al.*, 2017). Diesen Ultraspurenelementen wird eine toxische und/oder krebserzeugende Wirkung zugesprochen (Maftoun *et al.*, 2015). Sowohl wild wachsende als auch kultivierte Pilze können innerhalb kürzester Zeit über das Mycel eine große Menge an Wasser und Mineralien aus dem Substrat absorbieren (Mazurkiewicz *et al.*, 2014). Das Ausmaß der Absorption lässt sich über den Biokonzentrationsfaktor (BKF) (vgl. 2.7.3.3.4) bestimmen. Er gibt das Verhältnis des Elementgehalts im Pilz zum Elementgehalt im Substrat wieder. Dabei gilt ein BKF >1 als akkumulierend und ein BKF <1 als nicht akkumulierend (García *et al.*, 2009; Kalac 2010; Kojta *et al.*, 2012; Falandysz *et al.*, 2015). Aufgrund der Variabilität der Mineralstoffgehalte in Abhängigkeit des verwendeten Substrates wurde kein direkter Vergleich mit der Literatur vorgenommen. Die Hauptmengenelemente bei PSA IM, PSC IM und LED K waren P (840,5; 619,9; 922,3 mg (kg TM)<sup>-1</sup>), K

(601,0; 526,6; 768,7 mg (kg TM)<sup>-1</sup>) und fast ausschließlich in LED K vorkommend, Ca (1536,78 mg (kg TM)<sup>-1</sup>). P kam in beiden Substraten in einer höheren Konzentration vor als im Mycel. Durch die Berechnung mit der in Kapitel 2.7.3.3.4 gezeigten Formel (3) wurde ein BKF >1 für P für PSA IM und PSC IM berechnet. Dies bedeutet, dass PSA IM und PSC IM bioakkumulierend für P waren. Somit wurde gezeigt, dass P effizient aus dem Substrat in das Mycel übertragen wurde. Für LED K betrug der BKF <1, somit wurde keine akkumulierende Wirkung festgestellt. George *et al.* (2014) kultivierten verschiedene Shiitake spp. auf einem Kartoffel-Dextrose-Agar mit einer Kultivierungsdauer von 25 Tagen und bestimmten den P-Gehalt in den Mycelien. Dabei wurden Gehalte von 3201 - 8184 mg (kg TM)<sup>-1</sup> erreicht. Kalac (2009) analysierte verschiedene wild wachsende Fruchtkörper und ermittelte einen P-Gehalt von 5000 - 10000 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Kikuchi *et al.* (1984) untersuchten 21 verschiedene Speisepilzfruchtkörper und fanden P-Konzentrationen von 946 – 3500 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Lavola *et al.* (2011) zeigten, dass sich die Konzentrationen des jeweiligen Elements bei Pilzen, die auf dem gleichen Substrat gewachsen waren, um ein 1000-faches unterscheiden können. P spielt als Bestandteil von Adenosintriphosphat eine wichtige Rolle im intermediären Stoffwechsel und ist in Membranlipiden vorhanden. Der Gehalt an K war im Vergleich zu Na in PSA IM, PSC IM und LED K sehr hoch, was aus ernährungsphysiologischer Sicht einen großen Vorteil darstellt, da K eine wichtige Rolle beim Ionengleichgewicht spielt und besonders für Menschen mit Bluthochdruck hilfreich sein kann (Vetter, 2003). Der berechnete BKF für K lag bei allen Pilz-Substrat-Kombinationen bei <1. Somit wurde keine bioakkumulierende Wirkung festgestellt. K lag in den Substraten in einer 10-fach höheren Konzentration als in den Pilz-Substrat-Kombinationen vor. Bakken *et al.* (1990) untersuchten die Fruchtkörper von 22 verschiedenen Spezies und fanden K-Konzentrationen zwischen 250 - 410 mg (kg TM)<sup>-1</sup>.

Ca ist als „second messenger“ an diversen rezeptorvermittelten zellulären Signalübertragungsreaktionen beteiligt (Gadd, 1995). Ca<sup>2+</sup>-Ionen dienen bei der Signalverarbeitung als Signalstoff, wobei Sekundärprozesse durch Calmodulin vermittelt werden. Neben einer geringen Konzentration an Ca in PSA IM und PSC IM (42,3 mg kg TM<sup>-1</sup>; 24,9 mg (kg TM)<sup>-1</sup>), wurde eine 36 - 62-fache höhere Konzentration an Ca in LED K nachgewiesen. Der Ca-Gehalt in Karottentrester betrug 4841 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Anhand des berechneten BKF von <1 wurde keine

akkumulierende Wirkung festgestellt. Manu-Tawiah *et al.* (1987) verglichen den Mineralstoffgehalt im *Pleurotus ostreatus* Mycel, kultiviert mit einem Torfextrakt, mit einem Mycel, welches in einem synthetischen Medium kultiviert wurde und den Fruchtkörpern. Dabei stellten sie fest, dass der Ca-Gehalt des Mycels, welches mit Torfextrakt kultiviert wurde, fast doppelt so hohe Werte annahm ( $215 \text{ mg (100 g TM)}^{-1}$  zu  $143 \text{ mg (100 g TM)}^{-1}$ ) im Vergleich zum Mycel aus dem synthetischen Medium. Aus Kapitel 3.2.6.1 geht hervor, dass 27% des Lyophilisats aus nicht umgesetzten Karottentrestern besteht. Im LED K-Mycel wurden ca. 30% des Ca-Gehalts wieder gefunden, welcher im Karottentrestern bestimmt wurde. Der hohe Ca-Gehalt ist somit auf Reste des Tresters zurückzuführen.

Mg kam in LED K und PSA IM in gleichen Konzentrationen vor ( $116 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ ). Die Konzentration an Mg in PSC IM betrug  $95 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ . Kikuchi *et al.* (1984) bestimmten in 9 Speisepilzen Mg-Gehalte von  $59 - 274 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ . George *et al.* (2014) fanden in verschiedenen Shiitake-Mycelien Mg-Konzentrationen zwischen  $295 - 1232 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ . Da der BKF  $<1$  war, wurde keine akkumulierende Wirkung festgestellt. Pilze gelten als Bioakkumulatoren von Schwermetallen. Das Ausmaß der Akkumulation von Mineralien ist in der Regel zum einen von der Spezies und von dem Metabolismus abhängig, zum anderen aber auch von der Zusammensetzung des Substrates, aus dem die Pilze ihre Nährstoffe beziehen (Yamaca *et al.*, 2007). Im Vergleich zu Pflanzen sind Pilze in der Lage, hohe Konzentrationen an Schwermetallen, insbesondere Cd, Hg, Cu und Pb anzureichern (Kalac und Svoboda, 2004). Aufgrund möglicher gesundheitlicher Risiken wurden im Rahmen dieser Arbeit die Cd- und Pb-Konzentrationen der Pilz-Substrat-Kombinationen und der Substrate mittels AAS analysiert. Weder im Pilzmycel noch in den Substraten wurde Cd oder Pb gefunden.

Metalle wie Fe, Cu, Zn, Cr, Zn, Se und Mn gelten in geringen Konzentrationen als essentielle Metalle, die in biologischen Prozessen, z.B. als Enzymaktivatoren, eine wichtige Rolle spielen (Tuzen *et al.* 2003; Das, 2005; Radulescu *et al.*, 2010). Höhere Konzentrationen dieser Metalle wirken jedoch toxisch (Turkecul *et al.*, 2004; Yamaca *et al.*, 2007). Die Berechnungen des BKF ergaben für die Metalle Cu, Zn, Cr, Zn und Se Werte  $<1$ , eine akkumulierende Wirkung der Metalle wurde nicht festgestellt. Fe lag sowohl in den Substraten (Karottentrestern  $217 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ , Isomaltulose  $80 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ ) als auch in den Pilzmycelien (PSA IM 2,3; PSC IM 3,5; LED K  $26,6 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ ) in den höchsten analysierten Konzentrationen vor. Tuzen *et al.* (2003)

untersuchten Fruchtkörper diverser wild wachsender Pilze auf ihren Fe-Gehalt. Daraus ergaben sich Fe-Gehalte von 14,6 - 83,5 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Die analysierten Fe-Konzentrationen von PSA IM und PSC IM lagen unterhalb dieser Konzentrationsangabe. Kikuchi *et al.* (1984) fanden in 9 von 21 analysierten Speisepilzen Fe. Die Konzentrationen der verschiedenen Spezies betragen 3,5 - 27 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Die Aufnahme von Fe hat viele Vorteile. Zum einen fungiert Fe als Bestandteil der roten Blutkörperchen und zum anderen ist es ein wichtiger Bestandteil verschiedener Stoffwechsellzyme.

Neben Cr (nur in LED K 0,4 mg (kg TM)<sup>-1</sup>) und Cu (0,1 - 0,4 mg (kg TM)<sup>-1</sup>) kam Mn in der geringsten Konzentration sowohl in den Mycelien als auch in den Substraten vor. Mit 1,0 mg (kg TM)<sup>-1</sup> wurde Mn in LED K in der höchsten Konzentration ermittelt. In PSC IM wurden 0,4 mg (kg TM)<sup>-1</sup> und in PSA IM 0,3 mg (kg TM)<sup>-1</sup> ermittelt. Im Karottentrester wurden 15 mg (kg TM)<sup>-1</sup>, in der Isomaltulose-Melasse 6 mg (kg TM)<sup>-1</sup> Mn ermittelt. Der BKF lag für alle Pilzmycelien bei <1, es wurde keine akkumulierende Wirkung festgestellt. Falandysz *et al.* (1992) und Jorhem & Sundström (1995) analysierten die Fruchtkörper von *Agaricus* spp. Sie bestimmten Mn-Konzentrationen von 5 – 60 mg kg TM<sup>-1</sup>. Varo *et al.* (1980) berichteten über Mn-Konzentrationen in *A. bisporus* von 0,8 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. In verschiedenen Shiitake-Mycelien wurden Mn-Konzentrationen von 2,2 - 48,5 mg (kg TM)<sup>-1</sup> bestimmt. Zum Vergleich wurde in Shiitake Fruchtkörpern ein Mn-Gehalt von 18,2 - 73,2 mg (kg TM)<sup>-1</sup> ermittelt. Mangan fungiert, zusammen mit Zink und Kupfer, als Bestandteil des antioxidativen Enzymsystems (Cofaktor) und ist für den Knochenbau und das Nervensystem essentiell.

LED K wies die höchste Zn-Konzentration von 6,2 mg (kg TM)<sup>-1</sup> auf, gefolgt von PSA IM (2,1 mg (kg TM)<sup>-1</sup>) und PSC IM mit 1,9 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. In der Literatur gelten wild wachsende Pilze als Zn-Akkumulatoren (Isiloglu *et al.*, 2000), dies konnte jedoch anhand des BKF nicht bestätigt werden, da der BKF bei allen Pilzmycelien <1 lag. Für Fruchtkörper eines wild wachsenden *Agaricus bisporus* wurde ein Zn-Gehalt von 8,6 mg (kg TM)<sup>-1</sup> ermittelt (Varo *et al.*, 1980). Für verschiedene Shiitake-Mycelien detektierten George *et al.* (2014) Zn-Konzentrationen von 19,0 - 49,7 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Für kultivierte Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* ermittelten Mattila *et al.* (2001) eine Zn-Konzentration von 11 mg kg TM<sup>-1</sup>, für kultivierte *Lentinula edodes*-Fruchtkörper 21 mg (kg TM)<sup>-1</sup>. Zink spielt in verschiedenen Stoffwechselreaktionen

eine Rolle und ist wichtig für eine gesunde Haut, die Proteinsynthese und ein intaktes Immunsystem.

Anhand der Literatur und der eigenen Ergebnisse wurden die Unterschiede der Mineralstoffkonzentrationen sowohl durch Verwendung verschiedener Substrate, als auch zwischen den jeweiligen Spezies deutlich. Die hier verwendeten Pilz-Substrat-Kombinationen können auf Grund ihres Gehalts an P, Mg, Fe und Zn gut mit verschiedenen Gemüsesorten wie z.B. Brokkoli, grünes Blattgemüse und Tomaten verglichen werden (Mleczek *et al.*, 2013).

### 4.3 Maßstabsvergrößerung

Um die Produktion von Basidiomycetenprotein wirtschaftlich etablieren zu können, erfolgte eine Maßstabsvergrößerung vom Schüttelkolben in verschiedene Bioreaktoren. Verschiedene Parameter müssen hier an den jeweiligen Mikroorganismus angepasst und optimiert werden, da der Wechsel sich unter Umständen auch negativ auf das Wachstum der Pilze auswirken kann. Die richtige Auswahl an Mischern spielt dabei eine wichtige Rolle, denn Scherkräfte können die verwendeten Mikroorganismen schädigen und ihr Wachstum verringern (Janshekar und Fiechter, 1988). Dies führt zu einer geringeren Proteinausbeute. Wie weit sich Mikroorganismen durch Scherkräfte beeinflussen lassen, ist stamm- und speziesabhängig (Nuske *et al.*, 2002). Die Temperatur spielt neben der Scherkraft ebenfalls eine entscheidende Rolle. Bei zu niedrigen Temperaturen können Nährstoffe nicht mehr absorbiert werden, die enzymatische Aktivität wird herabgesetzt und die Atmungsrate verlangsamt sich (Kim *et al.*, 2003). Dies führt zu einer Hemmung des Mycelwachstums. Zu hohe Temperaturen hingegen führen zur Denaturierung der Proteine. Eine unmittelbare Messung des Sauerstoffgehalts wurde nicht durchgeführt. Da Pilze obligate Aerobier sind, kann dieser Parameter entscheidend für das Wachstum sein.

Die Maßstabsvergrößerung wurde für alle drei Pilz-Substrat-Kombinationen durchgeführt. Die Parameter Medienzusammensetzung, Temperatur und pH-Wert wurden im Schüttelkolben optimiert. Im Bioreaktor folgte lediglich eine Anpassung der Rührgeschwindigkeit (von 150 rpm auf 160 rpm) und der Begasungsrate. Im

Bioreaktor wurde eine Verzögerung der Kultivierungsdauer von einem Tag beobachtet. Die Proteinausbeuten pro Liter Kulturmedium ließen sich zwar im Bioreaktor reproduzieren, allerdings lagen sie deutlich (40 - 58%) unter den Proteinausbeuten, die bei der Kultivierung im Schüttelkolben erzielt wurden. Dies wurde sowohl im 7,5 L Fermenter als auch im 150 L Fermenter beobachtet. Ein Hauptproblem lag im Schäumen und dem damit verbundenen Verlust des Mycels aus dem Kulturmedium, da sich das Mycel an der Deckenwandung, den Armaturen und der oberen Wandung des Reaktors festsetzte. Der Einsatz von lebensmitteltauglichen Antischaummitteln würde hier Abhilfe schaffen. Fukushima *et al.* (1993) zeigten in einem 200 L-Bioreaktor, dass das Wachstum von *Lentinus edodes* durch Anpassung der Rührgeschwindigkeit von 250 rpm auf 600 rpm weiter stimuliert werden konnte.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Anpassung der Parameter wie Rührgeschwindigkeit, Sauerstoffzufuhr und Inokulum im Rahmen einer Prozessoptimierung an den jeweiligen Pilz durchgeführt werden müsste.

### 4.4 Vitamin D<sub>2</sub> Analytik

Vitamin D spielt für die Gesundheit eine essentielle Rolle. Ein Mangel an Vitamin D wird mit Rachitis, Osteoporose, Diabetes, Autoimmunerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert. Vitamin D ist in zwei verschiedenen Formen verfügbar, als Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>) und als Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>). Beide Formen gelten in der Literatur als äquivalent. Nur wenige Nahrungsmittel enthalten Vitamin D in größeren Mengen. In den frühen 20er Jahren wurde eine bioaktive Form des Vitamin D<sub>2</sub>, die durch UV-Belichtung produziert wurde, entdeckt (Vieth *et al.* 2006). Lebensmittel, die Vitamin D enthalten, sind meist tierischer Herkunft, so leiden Veganer oftmals an einer Mangelversorgung mit Vitamin D (Simon *et al.*, 2013). Bedeutende Vitamin D-Lieferanten sind Pilze. Sowohl Fruchtkörper als auch das Mycel enthalten das Mycosterol Ergosterol (Provitamin Vitamin D<sub>2</sub>). Die Synthese von Vitamin D<sub>2</sub> in den Pilzen erfolgt über die photochemische Umwandlung (Ringöffnung) von Provitamin D zu Vitamin D über eine Reihe von photochemischen und thermischen Reaktionen (Roberts *et al.*, 2008). In vorangegangenen Arbeiten (Ahlborn *et al.*, in Vorbereitung) wurde anhand von frischem und lyophilisiertem, Mycel gezeigt, dass sich ab einer Belichtungszeit von 10 Minuten ein

Konzentrationsplateau an Vitamin D<sub>2</sub> einstellte. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit eine Belichtungszeit von 10 min gewählt.

Zum Vergleich wurde unbelichtetes lyophilisiertes Mycel aus der gleichen Kulturcharge als Negativ-Kontrolle verseift und auf den Vitamin D<sub>2</sub>-Gehalt hin analysiert. In keiner der Kontrollen wurde Vitamin D<sub>2</sub> bestimmt. Dies lag daran, dass die Mycelien unter Lichtausschluss kultiviert wurden. Für PSA IM wurden 14,3 µg (g TM)<sup>-1</sup>, für PSC IM 18,5 µg (g TM)<sup>-1</sup> und für LED K 27,3 µg (g TM)<sup>-1</sup> Vitamin D<sub>2</sub> ermittelt. Die Werte stimmen mit den in der Literatur ermittelten Werten überein. Huang *et al.* (2015) bestrahlten beispielsweise verschiedene Fruchtkörper und Mycelien, u.a diverse *Pleurotus* spp. und *L. edodes*, 2 h mittels UV-B Strahlen und verglichen deren Vitamin D<sub>2</sub>-Gehalte miteinander. Für Fruchtkörper von drei *Pleurotus* spp. detektierten sie nach 2-stündiger Belichtung Vitamin D<sub>2</sub>-Konzentrationen von 69 - 208,65 µg (g TM)<sup>-1</sup>, für *L.edodes* 15,06 µg (g TM)<sup>-1</sup>. Eine 2-stündige Belichtung eines frisch geernteten *Pleurotus* spp. Mycels erreichte Vitamin D<sub>2</sub>-Konzentrationen von 66 - 82 µg (g TM)<sup>-1</sup>. Jasinghe und Perera (2005) analysierten Fruchtkörper von *Pleurotus* spp. und *L. edodes* nach 2-stündiger Belichtung mittels UV-B und fanden 53,9 bzw. 79,5 µg (g TM)<sup>-1</sup> Vitamin D<sub>2</sub>. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass eine Belichtung des lyophilisierten Mycels von 10 min ausreichte, um den Tagesbedarf an Vitamin D<sub>2</sub> von 5 µg bei einem Verzehr von 1 g (TM) Mycel zu decken (Regulation (EU) No 1169/2011). Takamura *et al.* (1991) untersuchten die Fruchtkörper von *L. edodes* und detektierten Vitamin D<sub>2</sub>-Konzentrationen von 21,8 - 109,6 µg g TM<sup>-1</sup>. Verschiedene Autoren (Souci *et al.*, 1986 und Holland *et al.*, 1991) stellten fest, dass der Vitamin D<sub>2</sub>-Gehalt innerhalb der verschiedenen Arten variiert. Die großen Unterschiede in den Vitamin D<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden sowohl durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen und Belichtungsintensitäten, als auch durch die Größe der jeweils exponierten Oberflächen bedingt. Je größer die belichtete Oberfläche, desto mehr Ergosterol wurde in Vitamin D<sub>2</sub> umgewandelt. In dieser Arbeit wurde eine Kristallisierschale mit einem Durchmesser von 10,3 cm verwendet. Vorherige Arbeiten (Ahlborn *et al.*, in Vorbereitung) zeigten einen Zusammenhang zwischen der belichteten Fläche und der Vitamin D<sub>2</sub>-Konzentration.

Auch der Feuchtegehalt und die verwendete Temperatur während der Belichtung spielen eine Rolle bei der Umwandlung von Ergosterol zu Vitamin D<sub>2</sub> (Jasinghe und Perera, 2005). Dies wurde jedoch während dieser Arbeit nicht untersucht. In der

Literatur wurde gezeigt, dass durch Belichtung mit UV-B Strahlen der Gehalt an Vitamin D<sub>2</sub> sowohl in den Fruchtkörpern als auch im Mycel deutlich gesteigert wurde (Huang *et al.*, 2015). Für eine Nutzung des Pilzmycels als Proteinquelle wäre es wirtschaftlich günstiger, frisch geerntetes Mycel zu belichten und dieses mit unbelichtetem Mycel zu vermischen, um gegebenenfalls eine Überschreitung der empfohlenen Tagesmenge an Vitamin D<sub>2</sub> zu vermeiden. Die Anreicherung von Vitamin D<sub>2</sub> in Pilzen bietet zum einen den Vorteil Mangelerscheinungen entgegenzuwirken und zum anderen fördert es die Aufnahme an Calcium (Horst *et al.*, 2005).

### 4.4.1 Bestimmung des Mycelanteils im Lyophilisat

Der Ergosterolgehalt von *L. edodes* wurde ermittelt (vgl. 2.8.4), um zwischen Pilzbiomasse und Karottenrester differenzieren zu können. Am Tag der Ernte (Tag 6) wurden 73% Pilzbiomasse im Lyophilisat bestimmt. Die restlichen 27% bildeten den Karottentrest. Da Ergosterol in den Pilzen das Hauptsterol darstellt, wird es als Biomarker und Indikator für das Pilzwachstum eingesetzt (Zelles *et al.* 1987; Klamer und Bååth 2004; Kim *et al.* 2005; Porep *et al.* 2014). Es wurde gezeigt, dass sich diese Methode gut zur Differenzierung von Pilzbiomasse und unlöslichen Bestandteilen im Medium anwenden lässt. Neben Pilzen enthalten auch einige Protozoen und Algen Ergosterol (Raederstorff und Rohmer 1987; Peeler *et al.* 1989).

### 4.5 Abbau der RNA

Die Konzentration von Nucleinsäuren in Lebensmitteln ist von wachsendem Interesse. Unter ernährungsphysiologischen Aspekten ist ein Abbau von Nucleinsäuren, die die Verwendbarkeit mikrobieller/tierischer Quellen für die humane Ernährung einschränken, erforderlich, da ein übermäßiger Konsum nucleinsäurereicher Nahrung das Krankheitsbild Gicht fördert (Marquard, 2014). Eine purinreiche Ernährung, z.B. durch Fleisch, Fisch oder Hülsenfrüchte, trägt zu diesem Krankheitsbild bei. Unter den Gemüsesorten weisen besonders Spinat, Porree, Brokkoli und Blumenkohl einen hohen RNA-Gehalt auf. Diese Lebensmittel enthalten viele Zellkerne und somit mehr DNA/RNA, die während der Verdauung u.a. in Purine

zerlegt werden. Harnsäure ist das Abbauprodukt der Purine Adenin und Guanin und wird normalerweise von den Nieren aus dem Blut gefiltert und mit dem Harn ausgeschieden. Eine purinreiche Ernährungsweise führt zur Erhöhung der Harnsäurekonzentration im Blut, wodurch die Ausscheidung der Harnsäure gestört wird. Die erhöhte Harnsäurekonzentration bewirkt die Bildung von Harnsäurekristallen, welche sich in den Gelenken und Geweben absetzen. Bei Speisepilzen fällt das DNA-/RNA-Verhältnis zu Gunsten der RNA aus. Pilze enthalten aufgrund ihres schnellen Wachstums mehr RNA als DNA in ihren Zellen (Li GSF *et al.*, 1982). Unter den Speisepilzen wurden höhere RNA-Konzentrationen überwiegend in Austernpilzen, Steinpilzen und Champignons vorgefunden (Lassek *et al.*, 1990). Daher wurde in dieser Arbeit nur die RNA-Konzentration berücksichtigt und vermindert.

Herbel *et al.* (1987) untersuchten die RNA-Konzentration in eiweißreichen Lebensmitteln wie Fleisch und Fisch. Dabei verglichen sie die RNA-Gehalte von frischem und hitzebehandeltem Fleisch und Fisch. Sie stellten eine starke Veränderung des RNA-Gehalts (frisches Fleisch: 15 - 87%, zubereitetes Fleisch: 1,0 - 3,8% RNA) fest. Wiebe *et al.* (2001) zeigten anhand des Ascomyceten *Fusarium venenatum* den Abbau von RNA in einem Bioreaktor durch Einleiten von heißem Wasserdampf (>68 °C). Auf diese Weise wurde der RNA-Gehalt auf <2% gemindert. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde in dieser Arbeit ein Versuchsaufbau im Reaktor gewählt. Durch kontrollierte Rührgeschwindigkeiten und Temperaturbedingungen wurde die optimale Temperatur-Zeit-Einstellung anhand von PSA IM etabliert. In einem Patent von Ward (1998) wurde der Abbau der RNA bei Temperaturen zwischen 55 - 74 °C präferiert. Ziel dieses Versuches war die Nutzung der zelleigenen endogenen RNase zum Abbau der RNA. Ein Hitzeschock bewirkt eine Reihe komplexer Reaktionen, wie die Inaktivierung von Peptidasen und RNase-Inhibitoren, die Zerstörung von Ribosomen zur Freisetzung von RNA und den partiellen Abbau der RNA zu Monomeren durch die RNase. Die entstandenen Monomere diffundieren daraufhin aus den Zellen heraus und können anschließend ausgewaschen werden (Wiebe, 2002).

Da der Abbau von Nucleinsäuren speziesabhängig ist, wurden in Anlehnung an das Patent von Ward (1998) verschiedene Temperaturen und Erhitzungszeiten gewählt, um den maximalen Abbau der RNA bei möglichst konstant bleibendem Proteingehalt zu erzielen. Anhand von PSA IM wurde gezeigt, dass höhere Temperaturen (70 -

74 °C) am effektivsten waren (Abbildung 30). Dabei nahm der Proteingehalt mit zunehmender Hitzeeinwirkung stetig ab (12 - 25%). Temperaturen zwischen 60 - 65 °C führten zu Proteineinbußen von >30%, dies stimmt mit den von Ward *et al.* (1989) beschriebenen Ergebnissen überein. Darüber hinaus beschrieb Ward (1989) bei dieser Methode einen Biomasseverlust von 31 - 38%. Grund dafür sind Zellbestandteile mit niedrigem Molekulargewicht, wie z.B. Aminosäuren, die durch den Hitzeschock aus der Zelle heraus diffundiert sind.

Zeneca patentierten in Anlehnung an das Patent von Ward ein modifiziertes Verfahren, bei dem die Pilzbiomasse zügig auf >68 °C für 30 - 45 min erhitzt wurde. Durch dieses Verfahren wurde der Verlust an Biomasse auf 30 - 33% gesenkt und der Erhalt der Proteine gewährleistet (Ward, 1998). In der vorliegenden Arbeit ergab sich durch den Vergleich des Proteingehalts mit der Gesamt-RNA-Konzentration während der Hitzeeinwirkung eine optimale Temperatur-Zeit-Einstellung von 70 °C und 30 min für PSA IM. Mit dieser Temperatur-Zeit-Einstellung wurde gezeigt, dass ein Abbau der RNA-Konzentration von 34,6 mg (100 g TM)<sup>-1</sup> auf 1,1 mg (100 g TM)<sup>-1</sup> (97%) (vgl. Abbildung 32) erreicht wurde. Der Proteingehalt sank um 11,7%. Aufgrund der gleichbleibenden Matrix wurde dieses Temperatur-Zeit-Optimum auf PSC IM und LED K übertragen. Dabei zeigte sich für PSC IM ein Proteinverlust von 30%. Derart hohe Verluste wurden während der Optimierung von PSA IM nur bei niedrigen Temperaturen beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass PSC IM aufgrund des höheren Chitin-Gehalts eine stabilere Zellwand besitzt als PSA und dadurch entweder höhere Temperaturen oder eine längere Behandlungsdauer als 30 min benötigt. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde von 33,09 mg (100 g TM)<sup>-1</sup> auf 8,14 mg (100 g TM)<sup>-1</sup> (Abbildung 33) gesenkt, was einen Abbau von 75% entsprach. Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass eine Optimierung für PSC IM notwendig wäre, um den Proteinverlust so gering wie möglich zu halten und den Abbau der RNA auf >90% zu steigern. Die besten Ergebnisse wurden für LED K erreicht. Der Proteingehalt wurde bei dieser Temperatur-Zeit-Einstellung um 7% verringert, die Gesamt-RNA-Konzentration wurde um 99% von 4,73 mg (100 g TM)<sup>-1</sup> auf 0,06 mg (100 g TM)<sup>-1</sup> gesenkt. Insgesamt enthielt LED K die geringste Gesamt-RNA-Konzentration. Dies könnte mit der Wachstumsrate zusammenhängen. LED K benötigt in VK 13 Tage, in HK 6 Tage. Aus der Publikation von Li *et al.* (1982) geht hervor, dass die Menge an RNA proportional zur Wachstumsrate ist, sodass bei schnell wachsenden Organismen ein

höherer RNA-Gehalt erwartet wird. Insgesamt war der RNA-Gehalt in den gemessenen Pilz-Substrat-Kombinationen im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen RNA-Gehalten sehr niedrig. Chang *et al.* (1982) ermittelten RNA-Konzentrationen für diverse Fruchtkörper von 6,0 - 8,8% RNA in der Trockenmasse. Daraus ergibt sich ein 10-fach niedriger RNA-Gehalt in den Pilz-Substrat-Kombinationen im Vergleich zu den Werten von Chang. Kasuga *et al.* (1999) ermittelten einen RNA-Gehalt von 1,2% – 2,4% TM in den Fruchtkörpern getrockneter Shiitake-Pilze. Ein Grund für die Unterschiede zur Literaturangabe ist der in dieser Arbeit verwendete apparative Aufbau der Methode. Wiebe *et al.* (2001) leiteten heißen Wasserdampf in den Reaktor, wodurch die Biomasse schneller auf die Ziel-Temperatur erhitzt wurde. Dies war in dieser Arbeit nicht möglich. Die Erfassung der Zeit erfolgte erst nach Erreichen der Ziel-Temperatur. Die Zeit bis zum Erreichen der optimalen Temperatur wurde hierbei nicht berücksichtigt. Die Schwankungen der in Abbildung 29 gezeigten RNA-Konzentrationen von PSA IM zum Zeitpunkt 0 sind vermutlich auf die Aufarbeitung zur Elution der RNA zurückzuführen. Zur späteren Berechnung der RNA-Konzentration auf die Trockenmasse, wurde das gemörserte Mycel nach dem Überführen in das Reaktionsgefäß gewogen. Ein Auftauen der aufgeschlossenen Probe konnte nicht vermieden werden, wodurch aktive RNasen die RNA abgebaut haben und die Gesamt-RNA-Konzentration dementsprechend gesenkt wurde. Ein weiterer Grund stellt die Wahl der Methode zur Quantifizierung dar. Die in der Literatur angegebene RNA-Konzentration wurde nicht mittels der Kapillargelelektrophorese ermittelt. Chang *et al.* (1982) nutzen einen kolorimetrischen Assay, in dem sie die Pentosen spezifisch mit Orcinol färbten. Kasuga *et al.* (1999) nutzen die HPLC zur Quantifizierung. Dennoch wurde gezeigt, dass ein Abbau der RNA anhand der in dieser Arbeit etablierten Methode gelungen ist und die RNA-Konzentration um bis zu 99% gesenkt wurde.

### 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sieben Basidiomyceten mit vier verschiedenen industriellen Nebenströmen als alleiniger Kohlenstoffquelle submers kultiviert. Drei verschiedene Pilz-Substrat-Kombinationen (*Lentinula edodes* auf Karottentrester (6 Tage, 1,92 g Protein L<sup>-1</sup>), *Pleurotus sajor-caju* (4 Tage, 3,37 g Protein L<sup>-1</sup>) und *Pleurotus sapidus* (5 Tage, 2,87 g Protein L<sup>-1</sup>) auf Isomaltulose-Melasse) stellten sich in Anbetracht von Kultivierungsdauer und Proteingehalt als vielversprechend dar. Neben der Kultivierung im Schüttelkolben wurde eine Maßstabsvergrößerung auf 7,5 L bzw. 150 L-Fermenter erfolgreich umgesetzt. Das zur Submerskultivierung verwendete M2 Medium wurde in Bezug auf die Kosten so optimiert, dass auf eine günstige Stickstoffquelle wie Hefeextrakt anstelle des teureren Mono-Natrium-L-Aspartats zurückgegriffen werden konnte.

Das gefriergetrocknete Mycel wurde mit gängigen lebensmittelchemischen Methoden analysiert. Neben der Feuchte wurden der Asche-, Rohprotein-, Rohfett- und Kohlenhydratgehalt der verschiedenen Pilz-Substrat-Kombinationen bestimmt. Parallel wurden alle Substrate hinsichtlich der gleichen Parameter analysiert. Zur weiteren Nährwertbestimmung wurde die Kohlenhydratfraktion näher betrachtet und die einzelnen Zucker chromatographisch und enzymatisch bestimmt. Zudem wurde der Gehalt an Gesamtglucanen und Chitin ermittelt. Die Fettsäurezusammensetzung wurde mittels GC-FID und GC-MS ermittelt. Dabei konnten vier Fettsäuremethylester als Hauptfettsäuren quantifiziert (Linol-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure) werden. Der Mineralstoffgehalt wurde mittels optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma analysiert. Die Pilz-Substrat-Kombinationen stellten sich als gute Phosphor-, Kalium- und Calcium-Quellen heraus. Darüber hinaus wurden die Mycelien auf Vorhandensein von Schwermetallen wie Blei und Cadmium spektroskopisch analysiert. Es wurde keine Schwermetallbelastung ermittelt. Zur Beurteilung der Qualität des Proteins wurde der Aminosäuregehalt bestimmt und die biologischen Wertigkeiten sowie die limitierenden Aminosäuren berechnet. Ein neuer interner Proteinrechnungsfaktor wurde anhand des Stickstoff-Gehalts (Kjeldahl und Aminosäuren) berechnet.

Um Ergosterol zu Vitamin D<sub>2</sub> zu transformieren, wurden die Lyophilisate mit UV-B-Strahlung belichtet und mittels HPLC auf den Vitamin D<sub>2</sub>-Gehalt hin analysiert. Eine Belichtungszeit von wenigen Sekunden reichte aus, um hinreichende Mengen an

Vitamin D<sub>2</sub> zu bilden. Durch Hitzebehandlung des Mycels konnte der Nukleinsäuregehalt um bis zu 99% reduziert und damit gewährleistet werden, dass der Puringehalt im Pilzmycel gering ist.

### Abstract

In the present study a total of seven basidiomycetes were submerged cultivated with four different industrial side streams as the only carbon source. Three different fungus-substrate combinations (*Lentinula edodes* with carrot peels (6 d, 1.92 g Protein L<sup>-1</sup>), *Pleurotus sajor-caju* (3 d, 3.37 g Protein L<sup>-1</sup>) und *Pleurotus sapidus* with molasses (5 d, 2.87 g Protein L<sup>-1</sup>)) were very promising considering cultivation time and protein content. In addition to the cultivation in shake flasks, a scale up to 7.5 L and 150 L fermenters was successfully implemented. The M2 medium used for submerged cultivation was optimized in terms of costs so that a favorable source of nitrogen such as yeast extract could be used instead of the more expensive mono-sodium L-aspartate.

The freeze dried mycelium was analyzed by standard methods of food chemistry. In addition to the moisture, the ash, protein, fat and carbohydrate contents of the various fungus-substrate combinations were determined. In parallel, all substrates were analyzed in the same way. For further determination of the nutritional value, the carbohydrate fraction was examined in detail and the individual sugars were determined chromatographically and enzymatically. Furthermore, the content of total glucans and chitin were determined.

The fatty acid composition was determined by use of GC-FID and GC-MS, whereby four fatty acid methyl esters could be quantitated as main fatty acids. The mineral content was analyzed by means of optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma. The fungus-substrate combinations turned out to be rich sources of phosphorus, potassium and calcium. In addition, the absence of the heavy metals lead and cadmium was demonstrated by means of spectroscopy. To assess the quality of the protein, the amino acid content was determined and the biological values as well as the limiting amino acids were calculated. A new nitrogen to protein conversion factor was calculated on the basis of the nitrogen content (Kjeldahl, amino acids). To transform ergosterol into vitamin D<sub>2</sub>, the freeze dried mycelia were exposed to UV-B radiation and analyzed for vitamin D<sub>2</sub> content by HPLC. Just a few seconds of exposure time was sufficient to form sufficient amounts of vitamin D<sub>2</sub>. The problem of gout caused by purine-rich foods could be reduced by heating the mycelium. By this method, the nucleic acid content could be reduced by 99%.

---

## 6 Literatur

Ahangi Z, Shojaosadati S, Nikoopour H (2008) Study of Mycoprotein Production using *Fusarium oxysporum* PTCC 5115 and reducing of its RNA content. Pakistan Journal of Nutrition, 7 (2):240-243.

Bak W, Park J, Park Y, Ka H (2014) Determination of glucan in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. Mycobiology, 42:301–304.

Bakken L, Olsen R (1990) Accumulation of radiocaesium in fungi. Canadian Journal of Microbiology, 36:70–710.

Baldrian P (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme and Microbiology Technology, 32:78-91.

Bano Z, Bhagya S, Srinivasan K (1981) Essential amino acid composition and proximate analysis of Mushroom, *Pleurotus florida*. Mushrooms News Letter for the Tropics, 1:6-10.

Bano Z, Rajarathanam S (1982) *Pleurotus* mushrooms as a nutritious food. In: Tropical mushrooms—Biological Nature and cultivation methods, (Chang S, Quimio, T eds.). The Chinese University press, Hong Kong, 363-382.

Bano Z and Rajarathnam S (1988) *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. Critical Reviews of Food Science and Nutrition, 27:87-158.

Bisaria R, Madan M and Bisaria VR (1987) Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivated in different agrowastes. Biological Wastes, 19:239-255.

Bisen P, Baghel R, Sanodiya B, Thakur G, Prasad G (2010) *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. Medicinal chemistry, 17:2419-2430.

Blumenthal H (1976) Reserve carbohydrate in fungi. Smith J, Berry D (Eds.), *The Filamentous Fungi*, John Wiley, New York, 292-307

Bobek P, Galbavy S (1999) Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbit. *Nahrung*, 43 (5): 339–342.

Bobek P, Ginter E, & Ozdin L (1993) Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) accelerates the plasma clearance of low density and high density lipoproteins in rats. *Nutrition Research*, 13:885–890.

Bobek P, Ozdyn L, & Kuniak L (1995) The effect of oyster (*Pleurotus ostreatus*) its ethanolic extract and extraction residues on cholesterol levels in serum lipoproteins and liver of rat. *Nahrung*, 39:98–99.

Boye, J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B (2012) Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108:183-211.

Breene W (1990) Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53 (10):883-894.

Chang S, Lau O, Cho K (1981) The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. *European Journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(1):58-62.

Cheung P (2013) Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2:162–166.

Chirinang P, Intarapiche K (2009) Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia*, 35:326–31.

Cohen R, Persky L, and Hadar Y (2004) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 582-594.

Cordle C (2004) Soy protein allergy: incidence and relative severity. *Journal of Nutrition*, 134(5):1213-1219.

Coskuner Y, Özdemir Y (2000) Acid and EDTA blanching effects on the essential element content of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (14):2074-2076.

Crisan E, & Sands A (1978) The biology and cultivation of edible mushrooms. In: Chang S and Hayes W (Eds.) *Nutritional value*, 137-165.

Cuptapun Y, Hengsawadi D, Mesomya W, Yaieiam S (2010) Quality and quantity of protein in certain kinds of edible mushroom in Thailand. *Kasetsart Journal of Natural Science*, 44:664-70.

Das N (2005) Heavy metals biosorption by mushrooms. *Natural Product Radiance*, 4:454-459.

Denny A, Aisbitt B, Lunn J (2008) Mycoprotein and health. *Nutrition Bulletin*, 33:298-310.

Demirbas A (2001) Concentration of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. *Food Chemistry*, 75:453-457.

Dimou D, 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.

Falandysz J & Bona H (1992) Metals content in wild growing mushrooms (*Agaricus* spp.) in the city and region of Gdansk. *Bromatologia I Chemia Toksykologiczna*, 25: 251-256.

Falandysz J, Szymczyk K, Ichihashi H (2001) ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Additives and Contaminants*, 18 (6):503–513.

Falandysz J, Zhang J, Wang Y, Krasieńska G, Kojta A, Saba M, Shen T, Li T, Liu H (2015) Evaluation of the mercury contamination in mushrooms of genus *Leccinum* from two different regions of the world: accumulation, distribution and probable dietary intake. *Science of the Total Environment*, 537:470–478.

FAO/WHO Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1973) In: Energy and Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. WHO Technical Report Series No. 522,.

Food and Agriculture Organization of the United States (2015) The State of Food Insecurity in the World 2015. Available at: <http://www.fao.org/hunger/en/> (accessed 8. September 2016).

Friel S, Dangour A, Garnett T, Lock K, Chalabi Z, Roberts I, Butler A, Butler C, Waage J, McMichael A, Haines A (2009) Public health benefits of strategies to reduce greenhouse-gas emissions: food and agriculture. *The Lancet*, 374 (9706):2016-2025.

Fukushima Y, Okada K, Kawai G, Motai H (1993) Efficient production of mycelium of *Lentinus edodes* by a continuous culture and the effect of lignin on growth, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76:45-48.

Gang J, Liu H, Liu Y (2016) Optimization of Liquid Fermentation Conditions and Protein Nutrition Evaluation of Mycelium from the Caterpillar Medicinal Mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(8).

García M, Alonso J, Melgar M (2009) Lead in edible mushrooms. Levels and bioaccumulation factors. *Journal of Hazardous Materials*, 167:777–783.

George P, Ranatunga T, Reddy S and Sharma G (2014) A Comparative Analysis of Mineral Elements in the Mycelia and the Fruiting Bodies of Shiitake Mushrooms. *American Journal of Food Technology*, 9:360-369.

Ginterová, A (1973) Nitrogen fixation by higher fungi. *Biologia (Bratislava)* 28:199-202.

Hadar Y and Cohen-Arazi E (1986) Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 51(6):1352.

Herbel W und Montag A (1987) Nucleostoffe in proteinreichen Lebensmitteln. *Zeitung für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 185:119-122.

Holland B, Welch A, Unwin A, Buss I, Paul D, Southgate A (1991) McCane and Widdowson's the composition of foods; The Royal Society of chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Bungay Suffolk.

Horst R, Reinhard T, Reddy S (2005) Vitamin D metabolism. In: Feldman D, Pike J, Glorieux F eds. *Vitamin D*. London, UK:Elsevier Academic Press, 15-36.

Huang, B, Yung, K and Chang, S, (1989) Fatty acid composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms, *Mushroom Science*, 12.

Huang S, Linb C, Tsai S (2015) Vitamin D<sub>2</sub> content and antioxidant properties of fruit body and mycelia of edible mushrooms by UV-B irradiation. *Journal of Food Composition and Analysis* 42:38-45.

Inoue, H ,and Shimoda C (1981) Changes in Trehalose content and trehalase activity during spore germination in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Archives of Microbiology*, 129:19-22.

Isiloglu M, Yilmaz F, Merdivan M (2000) Concentrations of trace elements in wild edible mushrooms. *Food chemistry*, 73:169-175.

Janshekar H, Fiechter A (1988) Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors. *Journal of Biotechnology*,8:97–112

Jasinghe V, Perera C (2005) Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D<sub>2</sub> by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92:541–546.

Jorhem L & Sundström B (1995) levels of some trace elements in edible fungi. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Froschung*, 201:311-316.

Kalac P (2009) Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*, 113(1):9-16.

Kalac P (2010) Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000–2009. *Food Chemistry*, 122(1):2–15.

Kalac P, Svoboda L (2004) Contents of detrimental metals mercury, cadmium and lead in wild growing edible mushrooms: a review. *Energy Education Science and Technology*, 13(1):31–38.

Kim K, Choi B, Lee I, Lee H, Kwon S, Oh K, Yonghwi Kim (2001) Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 91(9):1561-1568.

Kim Y D, Kim B, Park H (2005) Ergosterol content of basidiomycetes culture in rice. *International Rice Research Notes*, 30:43-44.

Key T, Thorogood M, Appleby P & Burr M (1996) Dietary habits and mortality in 11 000 vegetarians and health conscious people: results of a 17 year follow up. *British medical Journal*, 313(7060):775–779.

Key T, Appleby P, and Rosell M (2007) Health effects of vegetarian and vegan diets,” The Proceedings of the Nutrition Society, 65(1):35–41.

Kikuchi M, Tamakawa K, Hiroshima K, Aihara Y, Mishima Y, Seki T, and Tsunoda A (1984) Survey on contents of metals in edible mushrooms. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 534-542.

Kirk P, Ainsworth G (2008) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 10. Auflage. CAB International, Wallingford.

Kjeldahl J (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 22:366–382.

Klamer M, Bååth E (2004) Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 $\omega$ 6,9. Soil Biology & Biochemistry, 36:57-65.

Kojta K, Jarzyńska G, Falandysz J (2012) Mineral composition and heavy metal accumulation capacity of Bay Bolete (*Xerocomus badius*) fruiting bodies collected near a former gold and copper mining area. Journal of Geochemical Exploration, 121:76–82.

Kosaric N, LeDuy A, Zajic J (1973) Submerge culture growth of edible mushroom on waste sulphite liquors. Canadian Journal of Chemistry and Engineering, 51:186-190.

Koyama N, Aoyagi Y, Sugahara T (1984) Fatty acid compositions and ergosterol contents of edible mushrooms. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 31(11):732–738.

Lassek E (1990) Nucleostoffe in kohlenhydratreichen Lebensmitteln. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung: 17–21.

Lavola A, Aphalo P, Lehto T (2011) Boron and other elements in sporophores of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. Mycorrhiza, 21:155–165.

Li G, Chang S (1982) The nucleic acid content of some edible mushrooms. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15:237-240.

Liu X, Huang K, Zhou J (2014) Composition and Antitumor Activity of the Mycelia and Fruiting Bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(2):74-79.

Longvah T& Deosthale Y (1998) Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India, *Food Chemistry*, 63(3):331-334.

Maftoun P, Johari H, Soltani M (2015) In: The Edible Mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and Nutritional Values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4:67-83.

Manu Tawiah W and Martin AM (1987) Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiology*, 4:303-310.

Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L (1999) Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65:477-482.

Marquardt N (2014) *Ernährungsphysiologie der Nahrungsmittel. Gesunde und toxische Nahrungsbestandteile im Fokus*. Berlin: Lehmanns Media: 302-304.

Matissek R, Baltes W (2016) *Lebensmittelchemie*. Springer-Spektrum. Verlag: Springer Berlin. 8.vollständig überarbeitete Auflage. ISBN 978-3-662-47111-1, ISBN 978-3-662-47112-8 (eBook).

Matissek R, Steiner G, Fischer M (2010a) Aminosäuren, Peptide, Proteine und Nucleinsäuren. In: Matissek R, Steiner G, Fischer, M (Hrsg.) *Lebensmittelanalytik*, Heidelberg: 85–126.

Matissek R, Steiner G, Fischer M (2010b) Kohlenhydrate. In: Matissek R, Steiner G, Fischer, M (Hrsg.) *Lebensmittelanalytik*, Heidelberg: 127–172.

Mazurkiewicz N, Podlasińska J (2014) Bioaccumulation of trace elements in wild-growing edible mushrooms from Lubuskie voivodeship, Poland. *Chemistry and Ecology*, 30(2):110–117.

Mattila P, Salo-Väänänen P, Könkö K, Aro H, Jalava T (2002) Basic composition and Amino Acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:6419-6422.

Mdachi, S, Nkunya M, Nyigo, V & Urasa I (2004) Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry*, 86:179–182.

Millward D (1999) The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. *Proceedings of the Nutritional Society*, 58: 249-260.

Mitchell HH, Block E (1946) Some Relationships between the Amino Acid Contents of Proteins and their Nutritive Value for the Rat. *The Journal of Biology and Chemistry*, 163:599-620.

Mleczek M, Magdziak Z, Golinski P, Siwulski M (2013) Concentrations of minerals in selected edible mushrooms species growing in Poland and their effect on human health. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12 (2):203-214.

Morrison N, Clark R, Chen Y, Talashek T, Sworn G (1999) Gelatin alternatives for the food industry. In: *Physical chemistry and industrial application of gellan gum*. Heidelberg: Springer-Verlag, 127-131.

Mycoprotein GRAS Notification (2001) Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration.

Nitschke J, Altenbach H, Malolepszy T, Mölleken H (2011) A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate Research*, 346:1307-1310.

Nuske J, Scheibner K, Dornberger U, Ullrich R, Hofrichter M (2002) Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme Microbiology and Technology*, 30:556–561.

Oei, P (2003) Manual on mushroom cultivation: techniques species and opportunities for commercial application in developing countries. TOOL publications, Amsterdam 274.

Onuoha C, Uchechi U, Onuoha B (2009) Cultivation of *Pleurotus pulmonaris* (mushroom) using some agrowastes materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4:109-112.

Oser BL (1959) An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of protein. *Protein and amino nutrition*. Academic Press, New York, 281-95.

Oyetayo V & Ariyo O (2013) Micro and macronutrient of *Pleurotus ostreatus* cultivated on different wood substrates. *Jordan Journal of biological Science*, 6 (3):223-226.

Peeler T, Stephenson M, Einspahr K, Thompson Jr. G (1989) Lipid characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity. *Plant Physiology*, 89:970-976.

Perera C, Jasinghe V, Ng F, Mujumdar A (2003) The effect of moisture content on the conversion of ergosterol to vitamin D in shiitake mushrooms. Regulation (EU) No 1169/2011 of the European parliament and of the council of 25 October 2011. *Official Journal of the European Union*, L 304/18.

Porep J, Walter R, Kortekamp A, Carle R (2014) Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food Control*, 37:77-84.

Purkayastha R & Nayak D (1981) Analysis of Protein patterns of an Edible mushroom by Gel-Electrophoresis and its amino acid composition. *Journal Food Science and Technology*, 18:89-91.

Radulescu C, Stihl C, Busuioc G, Gheboianu A and Popescu I (2010) Studies concerning heavy metals bioaccumulation of wild edible mushrooms from industrial area by using spectrometric techniques. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84:641-646.

Raederstorff D & Rohmer M (1987) Sterol biosynthesis via cycloartenol and other biochemical features related to photosynthetic phyla in the amoebae *Naegleria lovaniensis* and *Naegleria gruberi*. *European Journal of Biochemistry*, 164:427-434.

Regulation (EU) No 1169/2011 of the European parliament and of the council of 25 October 2011. *Official Journal of the European Union*, L 304/18.

Reis F, Barros L, Martins A, Ferreira I (2011) Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry and Toxicology*, 50(2):191-7.

Ren D, Jiao Y, Yang X, Yuan L, Guo L & Zhao (2015) Antioxidant and antitumor effects of polysaccharides from the fungus *Pleurotus abalonus*. *Chemico-Biological Interactions*, 237:166-174.

Reusser F, Spencer F, Sallans H (1958b) Protein and fat content of some mushrooms grown in submerge culture. *Applied Microbiology*, 6:1-4.

Roberts J, Teichert A, McHugh T (2008) Vitamin D<sub>2</sub> formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:4541-4544.

Rodger G (2001) Production and properties of Mycoprotein as a meat alternative. *Food Technology Chicago*, 55:36-41.

Royse D & Sanchez-Vazquez J (2003) Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. *Bioresource Technology*, 90(2):225-228.

Sari M, Prange A, Lelley I, Hambitzer R (2017) Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry* 1(216):45-51.

Sanchez C (2010) Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1321-1337.

Senatore F (1990) Fatty acid and free amino acid content of some mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51:91-96.

Shah H, Khalil, I, Jabeen S (1997) Nutritional composition and protein quality of *Pleurotus* mushroom. *Sarhad Journal of Agricultural*, 13:621-626.

Silveira M, Smiderle F, Moraes C, Borato D, Baggio C, Ruthes A (2014) Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate polymers*, 113:588-596.

Simon R, Borzelleca J, Deluca H, Weaver C (2013) Safety assessment of the post-harvest treatment of button mushrooms using ultraviolet light. *Food and Chemical Toxicology*, 56:278-289.

Singh P, Kumar R, Sabapathy S Bawa A (2008) Functional and Edible Uses of Soy Protein Products

Smiderle F, Olsen I, Carbonero E, Baggio C, Freitas C, Marcon R (2008) Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1-3),(1-6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*, 597:86-91.

Smith J, Rowan N, Sullivan R (2002) Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments USA University of Strathclyde.

Souci S, Fachman W, Kraut H. (1986) Food composition and Nutrition Tables; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH:Stuttgart.

Stoll-Kleemann S (2014) Meat Consumption in the 21<sup>st</sup> Century – An Issue for Research in Human Ecology. GAIA 23/4:366–368.

Sun L, Chang W, Bao C, Zhuang Y (2017) Metal Contents, Bioaccumulation, and Health Risk Assessment in Wild Edible Boletaceae Mushrooms. Journal of food science, 82(6):1500-1508.

Takamura K, Hoshino H Sugahara T Amano H (1991) Determination of vitamin D<sub>2</sub> in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, 545:201-204.

Thevelein J, den Hollander J & Shulman R (1982) Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores: correlation with Trehalose breakdown as studied by in vivo <sup>13</sup>CNMR. Proceedings of the National Academy of Science, 79:3503-3507

Turkekul I, Elmastas M, Tuzen M (2004) Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead and cadmium in mushrooms samples from Tokat. Food Chemistry, 84:389–392.

Tuzen M (2003) Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. Microchemical Journal, 74:289-297.

Varo P, Lahelma O, Nuurtamo M, Saari E, and Koivistoinen P (1980) Mineral element composition of finish foods, vii. potato, vegetables, fruits, berries, nuts and mushrooms. Acta Veterinaria Scandinavica, 22:89–113.

Vetter J (2003) Data on sodium content of common edible mushrooms. *Food chemistry*, 81:589-593.

Vetter J (2007) Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, 102:6–9

Vieth R and Houghton L (2006) The case against ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>) as a vitamin supplement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84:694-700.

Wainwright M (1995) *Biotechnologie mit Pilzen – Eine Einführung*. Springer, New York.

Ward P (1998) Production of food. US 08/696,821.

Weaver L, Kroger M, Kneebone L (1977) Comparative protein studies (Kjeldahl, dye binding, amino acid analysis) of nine strains of *Agaricus bisporus*. *Journal of Food Science*, 42(2):364-366.

Wiebe (2002) Myco-protein from *Fusarium venenatum*: A well-established product for human consumption. *Applied microbiology and biotechnology*, 421–427.

Wim J, Wannet J, Hermans C, Op den Camp H (2000) HPLC detection of soluble carbohydrate involved in mannitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:287-291

Wittig M, Krings U, Berger R (2013) Single-run analysis of vitamin D photoproducts in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) after UV-B treatment. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31:266-274.

Yamaça M, Yıldız D, Sarıkürkcü C, Çelikkollu M, Halil Solak M (2007) Heavy metals in some edible mushrooms from the Central Anatolia, Turkey. *Food Chemistry*, 103(2):263–267.

Yang J, Lin H, Mau J (2001) Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 72:465–471.

Yoshida H, Sugahar T, Hayashi J (1987) Changes in Carbohydrates and Organic Acids during Development of Mycelia and Fruit-bodies of Shiitake Mushroom [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 34(5):274–281.

Young V, Pellett P (1994) Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59:1203-1213.

## 7 Anhang

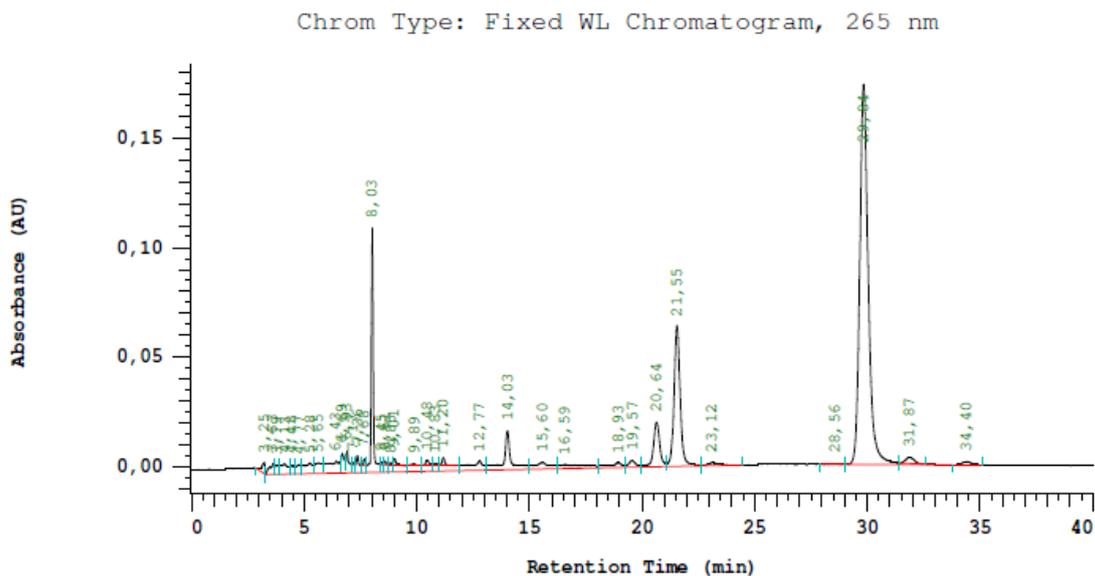


Abbildung 34: HPLC-DAD-Chromatogramm von PSA IM (5d) nach 10 minütiger Belichtung mittels UV B mit 100 µg Vitamin D<sub>3</sub> (IST). Vitamin D<sub>2</sub> 20,64 min, Vitamin D<sub>3</sub> 21,55 min. λ 265 nm.

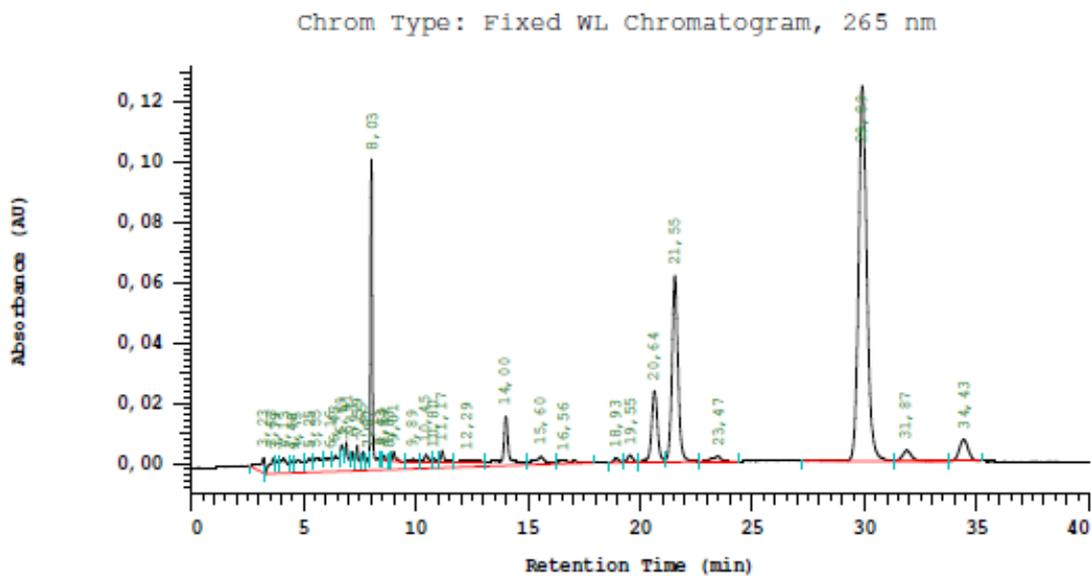


Abbildung 35: HPLC-DAD-Chromatogramm PSC IM (3d) nach 10 minütiger Belichtung mittels UV B mit 100 µg Vitamin D<sub>3</sub> (IST). Vitamin D<sub>2</sub> 20,64 min, Vitamin D<sub>3</sub> 21,55 min. λ 265 nm.

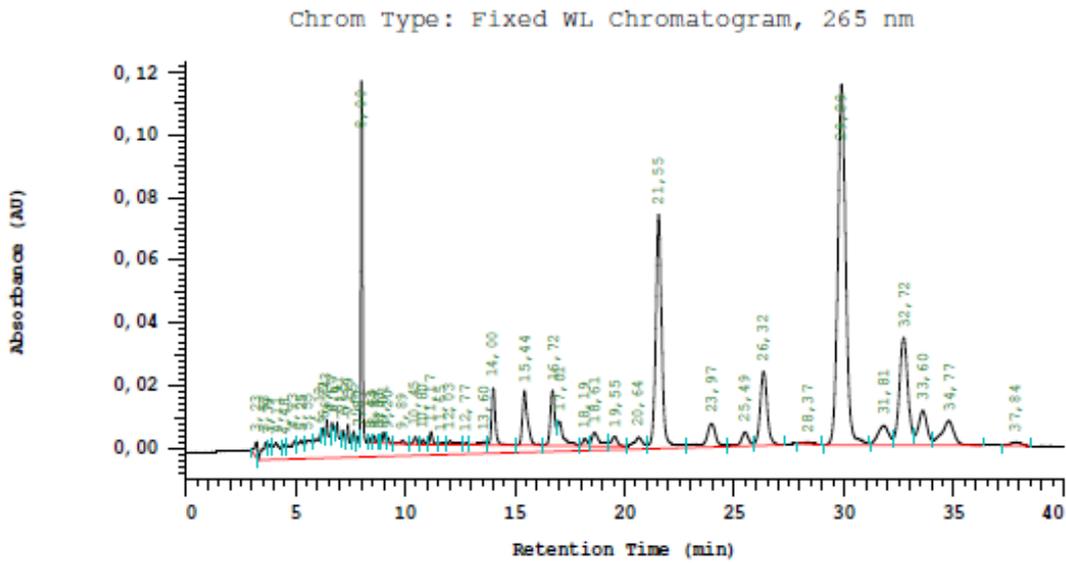


Abbildung 36: HPLC-DAD-Chromatogramm LED K (6d) nach 10 minütiger Belichtung mittels UV B mit  $100 \mu\text{g}$  Vitamin  $\text{D}_3$  (IST). Vitamin  $\text{D}_2$  20,64 min, Vitamin  $\text{D}_3$  21,55 min.  $\lambda$  265 nm.

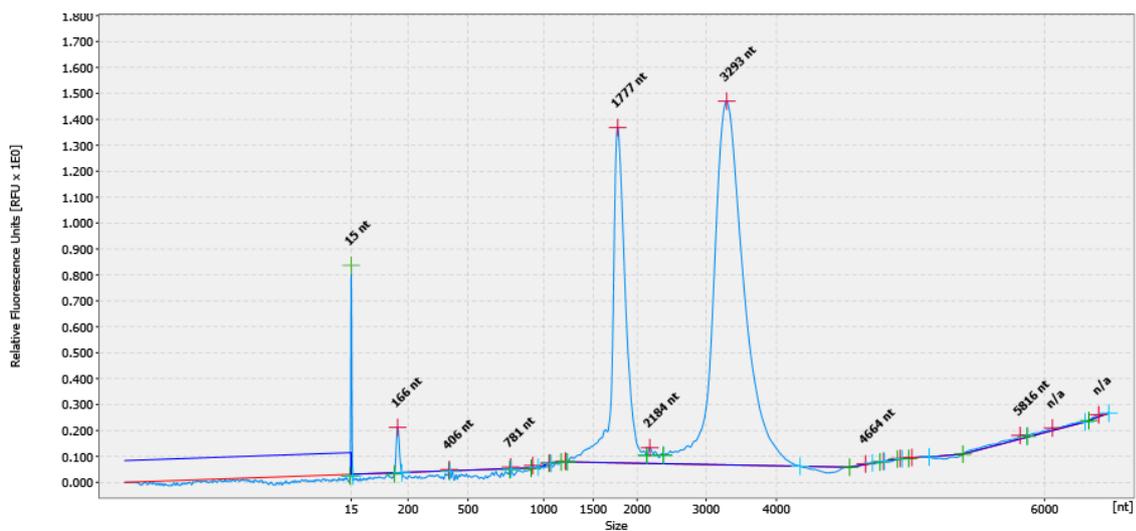


Abbildung 37: Elektropherogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der RNAdes unbehandelten PSA IM Mycels. 18s 1777 nt, 28s 3293 nt.

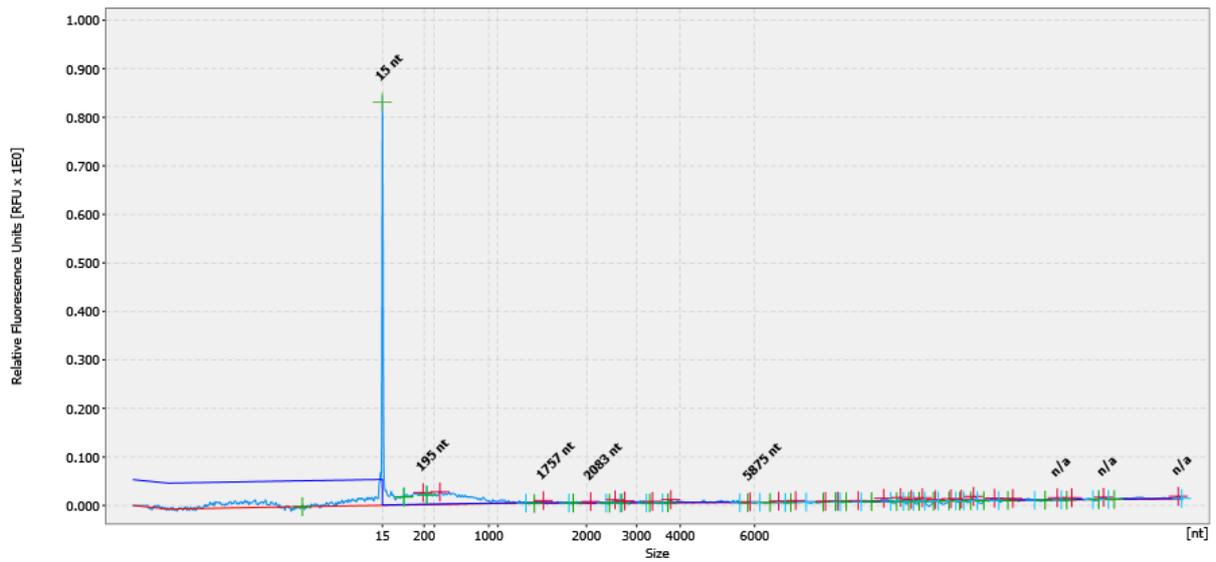


Abbildung 38: Elektropherogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA des behandelten PSA IM Mycels nach 30 min und 70 °C.

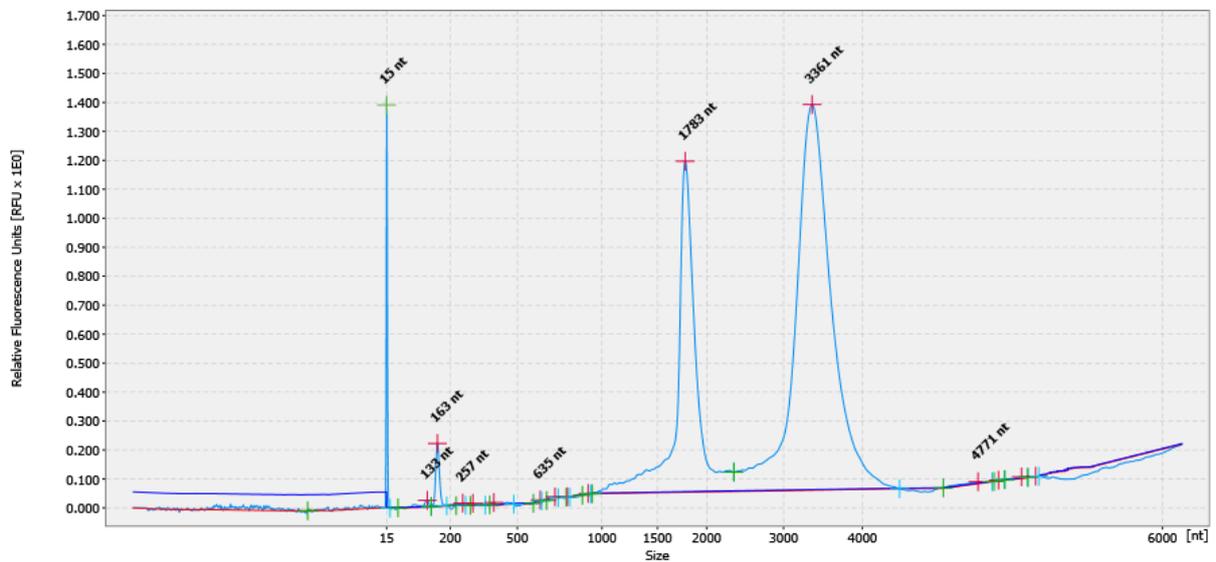


Abbildung 39: Elektropherogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA des unbehandelten PSC IM Mycels. 18s 1783 nt, 28s 3361 nt.

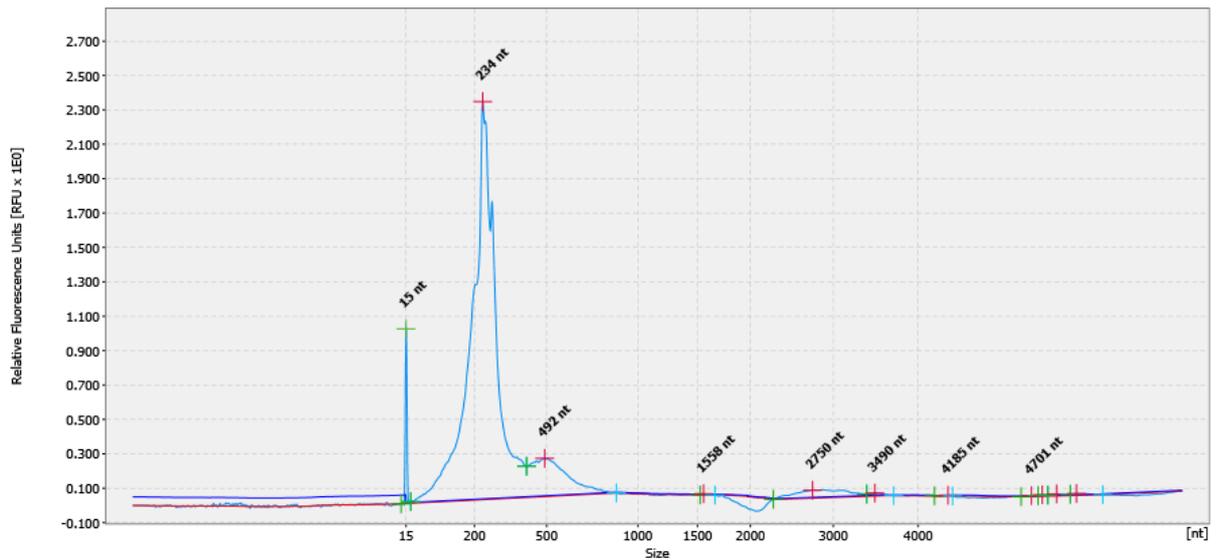


Abbildung 40: Elektropherogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA des behandelten PSC IM Mycels. nach 30 min und 70 °C.

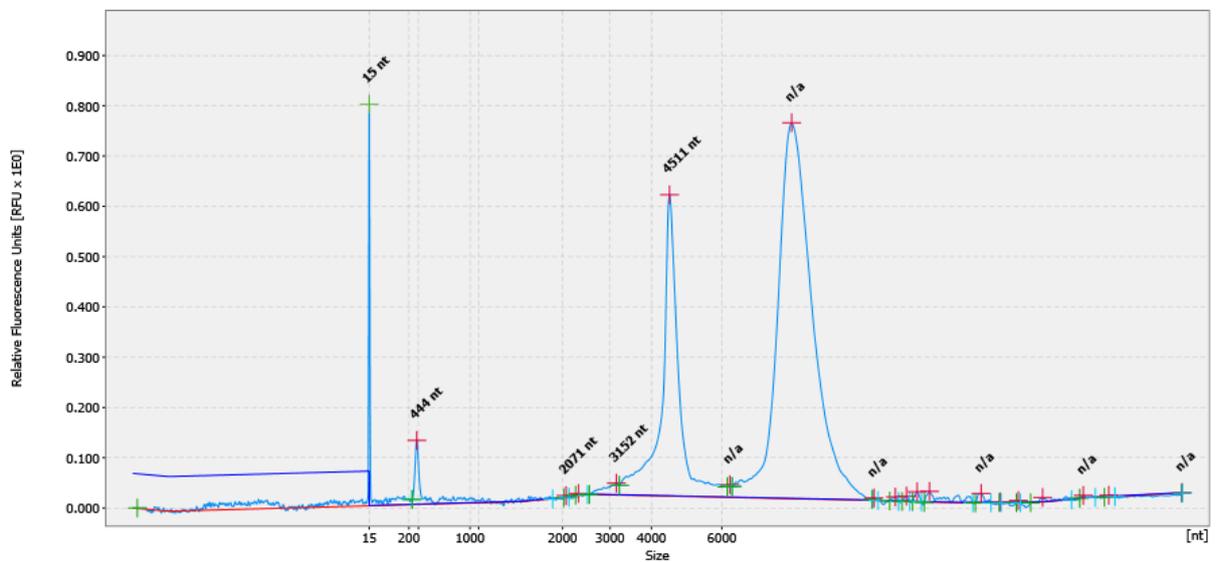


Abbildung 41: Elektropherogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA des unbehandelten LED K Mycels. 18s 4511 nt, 28s 7017 nt.

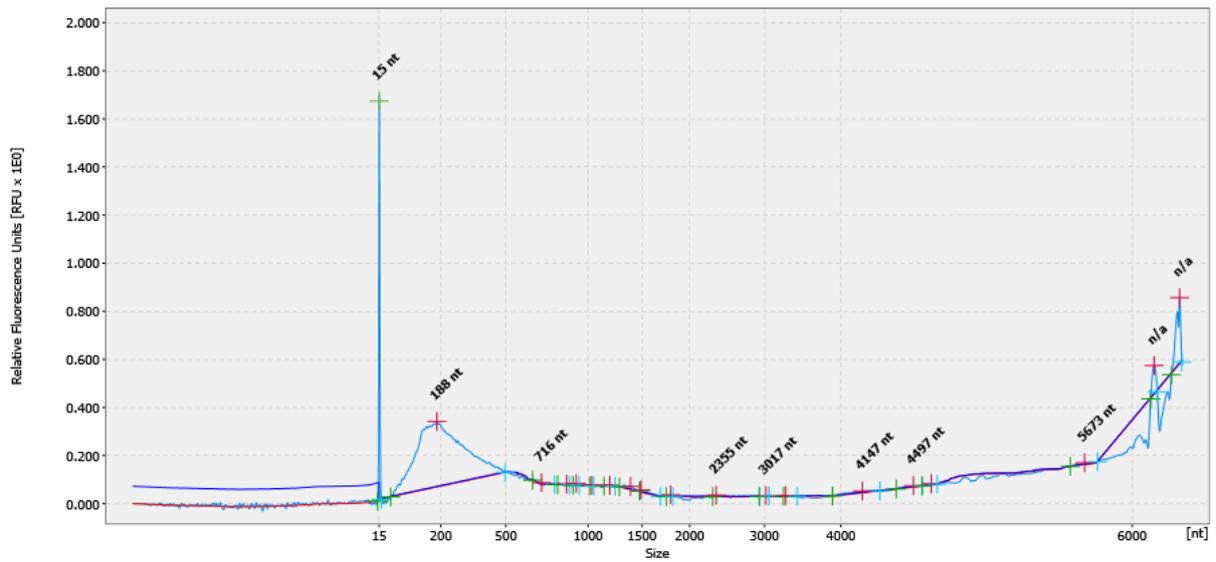


Abbildung 42: Elektropherogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA des behandelten LED K Mycels nach 30 min und 70 °C.