

Fermentation von Biertrebern mittels Basidiomyceten

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin

Victoria-Luisa Hrazdil

2026

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Ich bin sehr dankbar für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und sein Feedback. Außerdem danke ich PD Dr. habil. Oliver Roßbach für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Martin Rühl und Prof. Dr. Kai Thormann für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ein großer Dank geht an Dr. Marco Fraatz, der immer ein offenes Ohr für Ergebnisse und Probleme hatte. Danke für die konstruktiven Gespräche, Anregungen und kritischen Fragen. Außerdem danke ich Prof. Dr. Martin Rühl für die Anleitung und Tipps im Umgang mit Bioreaktoren.

Für die Bereitstellung der Substrate danke ich der Störtebeker Braumanufaktur. Ein zusätzlicher Dank geht an das Bundesministerium für Forschung, Technologie und Raumfahrt (BMFTR) für die finanzielle Förderung im Rahmen des RUBIN-Projektes „MaltFungiProtein“ (Förderkennzeichen 03RU1U081C).

Ich danke Paula Hallmann, Lara Rautschka, Josefine Bremer und Daniel Troß, die mit ihren Bachelor- und Masterarbeiten zu dieser Arbeit beigetragen haben. Es war eine Freude mit euch zu arbeiten und euch bei euren Abschlussarbeiten zu unterstützen.

Vielen Dank an dieser Stelle auch an meine ehemaligen Kollegen Manuela Dorin, Jonas Baake und Nico Baumann für die gute Zusammenarbeit im Labor und Büro, die kurzweiligen Mittagspausen und den guten Austausch. Durch euch war die Zeit und Arbeit viel schöner und ich werde mich gerne an die Zeit mit euch erinnern.

Danken möchte ich auch Bianka Daubertshäuser und Peter Seum für die schnelle Hilfe bei technischen Problemen und ihre Unterstützung.

„Last but not least“ danke ich meiner Familie und Freunden sowie meinem Partner von Herzen für ihr Verständnis und die Unterstützung während der Zeit dieser Arbeit. Ihr habt mich angefeuert und mir die nötige Motivation und das Durchhaltevermögen gegeben. Danke!

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Hrazdil V.-L., Hallmann P., Dresler J., Fraatz M. A., Zorn H.: Optimization of the fermentation of brewer's spent grains by *Pleurotus ostreatus* using response surface methodology. Angenommen bei Bioresources and Bioprocessing

Dorin M., Krüger B., Hrazdil V.-L., Zorn H.: A rapid and semi-automated method for the quantification of chitin in the basidiomycetes *Lentinus squarrosulus* and *Pleurotus ostreatus*. Angenommen bei Food Analytical Methods

Dorin M., Hrazdil V.-L., Zorn H.: Quantifizierung des Pilzgehaltes in Fermentationsansätzen. chrom+food forum 2024, 15-17

Tagungsbeiträge

Poster

Hrazdil V.-L., Fraatz M. A., Reineke-Lautenbacher J., Garbe L.-A., Zorn H.: MaltFungiProtein – Biokonversion von Biertreber zu Pilzprotein für die Herstellung proteinreicher Lebensmittel. 51. Deutsche Lebensmittelchemietage **2023**, Bonn

Dorin M., Hrazdil V.-L., Krüger B., Sudwischer P., Zorn H.: Analyse des Zellwand-Polysaccharides Chitin als Marker für den Pilzgehalt in Fermentationsansätzen – Eine Gegenüberstellung zweier Methoden. 52. Deutsche Lebensmittelchemietage **2024**, Freising

Zusammenfassung

Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung und dem damit einhergehenden, stetig steigenden Bedarf an Nahrung, ist eine nachhaltige Kreislaufwirtschaft anzustreben. Diese gewährleistet eine optimale Ressourcennutzung und reduziert Verschwendung. Daher sollten auch die Nebenprodukte aus der Lebensmittelherstellung für die menschliche Ernährung nutzbar gemacht werden. Biertreber ist mengenmäßig der wichtigste Nebenstrom der Bierbrauindustrie. Er verfügt über gute Nährwerte und *food-grade* Qualität. Derzeit ist er allerdings nur begrenzt in Lebensmitteln einsetzbar und wird hauptsächlich als Tierfutter verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte Biertreber durch die Fermentation mit Basidiomyceten aufgewertet und als Lebensmittelzutat im Hinblick auf den Einsatz als Fleischersatzprodukt für die Lebensmittelindustrie nutzbar gemacht werden.

Durch die Grundanalytik der Treber wurden die bereits in der Literatur beschriebenen Nährwerte bestätigt. Die Durchschnittswerte betragen für den Reinproteingehalt $15 \text{ g (100 g)}^{-1}$, für den Gesamtfettgehalt $12 \text{ g (100 g)}^{-1}$ und den Aschegehalt 3 g (100 g)^{-1} .

In einem Screening in Emerskultur wurden 144 Basidiomyceten auf Agar-Platten kultiviert, deren einzige Nährstoffquelle die Treber von Weizenbier, Pilsener und Schwarzbier waren. Aufgrund ihres schnellen Wachstums, dichtem Myzel oder würzigen Geruchs wurden 27 Basidiomyceten für ein Screening in Submerskultur ausgewählt. Aus dem Screening in Submerskultur wurde die Kombination von *Pleurotus ostreatus* und Schwarzbierdreber (SBT) ausgewählt, da die Fermentation einen hohen Rohproteingehalt von 6 g L^{-1} lieferte und es sich bei *P. ostreatus* um einen bekannten Speisepilz handelt.

Durch eine Supplementierung von 20 g L^{-1} Bierwürze zum SBT-Medium fand unter initial neutralem pH-Wert Pilzwachstum in der Vorkultur statt. Die Verwendung einer solchen Vorkultur stellt eine Alternative zur Vorkultur in Malzextraktmedium dar.

Die Fermentation von SBT mit *P. ostreatus* wurde im 1 L- und 5 L-Maßstab erfolgreich in den Bioreaktor übertragen und optimiert. Die Optimierung erfolgte mit statistischer Versuchsplanung (DOE) und zielte auf die Maximierung des Ergosterolgehaltes [mg g^{-1}] und [mg L^{-1}] ab. Gleichzeitig sollte das Inokulumvolumen minimiert werden, um Kosten einzusparen. Die Modelle wurden durch Bestätigungsläufe validiert und lieferten $1,23 \text{ mg g}^{-1}$ und $15,54 \text{ mg L}^{-1}$ Ergosterol unter optimierten Bedingungen mit 4,4% (v/v) Inokulum.

Um Kosten einzusparen und die Fermentation weiter zu optimieren, wurden semi-kontinuierliche Fermentationsstrategien angewendet. Hierbei wurde ein Teil der Fermentationsbrühe als Inokulum für folgende Kulturen verwendet oder der Kulturüberstand als Wasserersatz in frischen Medien verwendet. In jeweils vier aufeinanderfolgenden Generationen wurden keine negativen Auswirkungen auf das Pilzwachstum festgestellt. Außerdem wurde durch die Fütterung von Würze während der Kultivierung im Bioreaktor das

Pilzwachstum verbessert. Der Ergosterolgehalt betrug $3,39 \text{ mg g}^{-1}$ im Vergleich zu $1,96 \text{ mg g}^{-1}$ bei Fermentationen ohne Fütterung.

Durch die Fermentation wurde der Reinproteingehalt in der Biomasse im Vergleich zum Treber von $16 \text{ g (100 g)}^{-1}$ auf $20 \text{ g (100 g)}^{-1}$ gesteigert und der Gesamtfettgehalt von $10 \text{ g (100 g)}^{-1}$ auf 4 g (100 g)^{-1} gesenkt. Die biologische Wertigkeit wurde von 88 auf 94 verbessert, was annähernd der biologischen Wertigkeit von Myzel ohne Nebenstrom entsprach. Vor der Fermentation waren Tryptophan und Lysin limitierend, während nach der Fermentation Methionin, Cystein und Lysin limitierend waren. Für Lysin stiegen die *chemical scores* von 78,3 auf 92,4 an. Durch die Fermentation wurde der Anteil der ungesättigten Fettsäuren von 66% auf 70% erhöht. Die Hauptfettsäuren in der Biomasse waren Linol-, Palmitin- und Ölsäure.

Mittels Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) wurden die Aromastoffe aus SBT, Myzel von *P. ostreatus* und dem fermentierten Treber extrahiert. Mittels Gaschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie und Olfaktometrie (GC-MS/MS-O) wurden in allen Proben Hexanal, 1-Octen-3-on und (*E*)-2-Octenal nachgewiesen. Nach der Fermentation wurden Furfural, (*E*)-2-Nonenal, 2-Furanmethanol und 2-Phenylethanol nicht mehr nachgewiesen. Dafür wurden 3-Methylbutanal, 3-Octanon, 1-Octen-3-ol und Benzaldehyd nachgewiesen. 1-Octen-3-on war in allen Proben der Aromastoff mit dem höchsten Aromaverdünnungs-(FD-)Faktor. In beiden Myzelien wurde ein FD-Faktor von ≥ 256 bestimmt. Durch ein Panel wurde der Geruch der aufgetauten Biomasse aus SBT und *P. ostreatus* als würzig und leicht pilzartig und geröstet beschrieben. Aufgrund der Konsistenz wurde die aufgetaute Probe der nicht zuvor eingefrorenen vorgezogen.

Durch die Fermentation mit *P. ostreatus* wurde der Schwarzbierdreber innerhalb von vier Tagen im Hinblick auf den Reinproteingehalt, die biologische Wertigkeit und die Fettsäureverteilung aufgewertet. Der fermentierte Treber stellt ein Ausgangsprodukt für die Extraktion von Mykoprotein oder die Entwicklung eines Fleischersatzproduktes dar. Die Ergebnisse aus den semi-kontinuierlichen Kulturführungen über mehrere Generationen und den Fed-Batch Experimenten suggerieren weiteres Optimierungspotential der Fermentation. Aus dem Screening geht hervor, dass neben der Kombination von *P. ostreatus* und SBT weitere Pilz-Treber-Kombinationen zur Aufwertung von weiterem Bierdreber geeignet sind. Durch die Vergrößerung des Prozesses in einen Industrie-Maßstab und weitere Optimierung könnte sämtlicher in der Brauerei anfallender Bierdreber fermentiert und für die Lebensmittelindustrie zugänglich gemacht werden.

Abstract

Due to a constantly growing world population and the accompanying, constantly increasing demand for food, a sustainable circular economy should be established. This ensures an optimal use of resources and reduces waste. Therefore, the by-products from food production should be harnessed for human nutrition. Brewer's grains are the most important by-product of the beer brewing industry. It has good nutritional values and accrues in food-grade quality. Currently, its use in food is limited for sensory reasons and it is mainly used as animal feed. The aim of this project was to upgrade spent grains by fermentation with basidiomycetes to make them usable as a food ingredient for the food industry, e.g. as a meat substitute.

The basic analysis of the spent grains confirmed the nutritional values described in the literature. The average values were 15 g (100 g)⁻¹ for the true protein content, 12 g (100 g)⁻¹ for the total fat content and 3 g (100 g)⁻¹ for the ash content.

In a surface culture screening, 144 basidiomycetes were cultivated on agar plates using spent grains of wheat beer, pilsner and black beer as sole nutrient sources, respectively. Due to their rapid growth, dense mycelium or spicy odor, 27 basidiomycetes were selected for a second screening in submerged culture. From the screening in submerged culture, the combination of *Pleurotus ostreatus* and black beer spent grains (SBT) was selected, as the fermentation yielded a high crude protein content of 6 g L⁻¹ and *P. ostreatus* is a well-known edible fungus. By supplementing 20 g L⁻¹ beer wort to the SBT medium, fungal growth was observed in the preculture at an initially neutral pH value. The use of such a preculture represents an alternative to growing precultures in malt extract medium.

The fermentation of SBT with *P. ostreatus* was successfully transferred to bioreactors on 1 and 5 L scale and optimized. The optimization was carried out with design of experiments (DOE) and aimed at maximizing the ergosterol content [mg g⁻¹] and [mg L⁻¹]. Simultaneously the inoculum volume was reduced in order to save costs. The models were validated by confirmation runs and resulted in 1.23 mg g⁻¹ and 15.54 mg L⁻¹ ergosterol under optimized conditions with 4.4% inoculum.

Semi-continuous fermentation strategies were used to save costs and further optimize the fermentation. Therefore, a part of the fermentation broth was used as inoculum for subsequent cultures or the culture supernatant was used as a water substitute in fresh media. No negative effects on fungal growth were observed in each of four successive generations. In addition, feeding wort during the cultivation in the bioreactor improved fungal growth. The ergosterol content increased from 1.96 mg g⁻¹ in fermentations without feeding to 3.39 mg g⁻¹.

The fermentation with *P. ostreatus* increased the true protein content of the biomass from 16 g (100 g)⁻¹ to 20 g (100 g)⁻¹ compared to the spent grains and reduced the total fat content from 10 g (100 g)⁻¹ to 4 g (100 g)⁻¹. The biological value was improved from 88 to 94, which approximately corresponded to the biological value of the mycelium without side stream.

Tryptophan and lysine were limiting in the unfermented spent grains, while after fermentation, methionine, cysteine and lysine were limiting. For lysine, the chemical score increased from 78.3 to 92.4. The fermentation increased the proportion of unsaturated fatty acids from 66% to 70%. The main fatty acids in the biomass were linoleic, palmitic and oleic acid.

Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) was used to extract the aroma compounds from SBT, the mycelium of *P. ostreatus* and the fermented spent grains. By using gas chromatography with tandem mass spectrometry and olfactometry (GC-MS/MS-O), hexanal, 1-octen-3-one and (*E*)-2-octenal were detected in all samples. After fermentation, furfural, (*E*)-2-nonenal, 2-furanmethanol and 2-phenylethanol were no longer detected. Instead, 3-methylbutanal, 3-octanone, 1-octen-3-ol and benzaldehyde were detected. 1-Octen-3-one was the aroma compound with the highest flavor dilution (FD)-factor in all samples; an FD-factor of ≥ 256 was determined in both mycelia. A sensory panel described the odor of the thawed biomass from SBT and *P. ostreatus* as spicy and slightly mushroom-like and roasted. Due to the consistency, the thawed sample was preferred over the not previously frozen sample.

Fermentation with *P. ostreatus* was used to improve the true protein content, biological value and fatty acid distribution of the spent grains within four days. The fermented spent grains represent a starting product for the extraction of mycoprotein or the development of meat substitutes. The results from the semi-continuous fermentations over several generations and the fed-batch experiments suggest further potential for optimizing the fermentation. The screening revealed that, in addition to the combination of *P. ostreatus* and SBT, other mushroom-spent grain combinations might be suitable for upgrading other spent grains. By scaling up the process to an industrial scale and further optimization, all spent grains produced in the brewery could be fermented and made available for the food industry.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AA	<i>Aminosäure</i>
AAS	<i>Amino Acid Score</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AVA	Aromaverdünnungsanalyse
BW	Biologische Wertigkeit
CS	<i>Chemical Score</i>
DFFITS	<i>difference in fits</i>
DO	<i>dissolved oxygen</i> , gelöster Sauerstoff
DOE	<i>design of experiments</i>
EAAI	<i>Essential Amino Acid Index</i>
F	<i>flow</i> , Begasungsrate
FD	<i>flavor dilution</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Fettsäure
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatograph/Gaschromatographie
GRAS	<i>generally recognized as safe</i> , allgemein als sicher anerkannt
HS	<i>head space</i> , Kopfraum
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinon-Hydrazon-Hydrochlorid
ME(A)	Malzextrakt(agar)
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid</i>
N	<i>agitation</i> , Rührgeschwindigkeit
nz	nicht zerkleinert
O	Olfaktometrie
ODP	Olfaktometrie Detektor Port
POS	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PT	Pilsenertreber
RBF	<i>repeated-batch fermentation</i> , mehrfache Batch-Fermentation
RI	Retentionsindex
SBT	Schwarzbiertreber

Abkürzung	Bedeutung
SPME	<i>solid phase micro extraction</i> , Festphasenmikroextraktion
TAA	<i>total amino acids</i>
THF	Tetrahydrofuran
TM	Trockenmasse
VE	voll entsalzt
WT	Weizentreber
z	zerkleinert

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Publikationen und Tagungsbeiträge	II
Publikationen	II
Tagungsbeiträge	II
Zusammenfassung.....	III
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
1.1 Nebenströme und Kreislaufwirtschaft.....	1
1.2 Bierherstellung und Nebenströme der Brauindustrie.....	1
1.2.1 Bier	1
1.2.2 Biertreber	2
1.2.3 Altheife	3
1.2.4 Malzkeime	3
1.3 Pilzfermentation.....	3
1.3.1 Basidiomyceten	3
1.3.2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	4
1.3.3 Myzelproduktion	4
1.4 Fleischersatzprodukte und Mykoprotein.....	5
1.5 Zielsetzung	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 Substrate	8
2.1.2 Organismen	9
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	14
2.1.4 Chemikalien.....	18
2.2 Methoden.....	21

2.2.1	Pilzkultivierung.....	21
2.2.1.1	Stammhaltung.....	21
2.2.1.2	Screening in Emerskultur.....	21
2.2.1.3	Vorkultur.....	22
2.2.1.4	Screening in Submerskultur.....	22
2.2.1.5	Optimierung der Vorkultur.....	23
2.2.1.6	Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren	24
2.2.1.7	Vorarbeiten für die Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor.....	26
2.2.1.8	Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor mittels DOE	27
2.2.1.9	Dauer des Dispergierens	28
2.2.1.10	Kulturführung über mehrere Generationen.....	28
2.2.1.11	Fed-Batch	29
2.2.1.12	Wachstumsbeurteilung und Bestimmung des Pilzanteils	30
2.2.2	Analytik.....	31
2.2.2.1	Bestimmung der Feuchte mittels Feuchtebestimmer	31
2.2.2.2	Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl	31
2.2.2.3	Bestimmung des Gesamtfettgehaltes.....	32
2.2.2.4	Bestimmung des Aschegehaltes.....	33
2.2.2.5	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes	34
2.2.2.6	Aminosäureanalytik	34
2.2.2.7	Bestimmung der Fettsäureverteilung.....	38
2.2.2.8	Bestimmung des Ergosterolgehaltes	40
2.2.2.9	Bestimmung des Chitingehaltes	42
2.2.2.10	Sensorische Beurteilung der Biomasse.....	43
2.2.2.11	Aromanalytik mittels GC-MS/MS-O	43
3	Ergebnisse	46
3.1	Substratanalytik	46
3.2	Screening in Emerskultur	47
3.3	Screening in Submerskultur	49
3.4	Optimierung der Vorkultur.....	53

3.5	Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren und Optimierung der Batch-Fermentation	58
3.5.1	Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren	58
3.5.2	Vorarbeiten für die Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor.....	60
3.5.3	Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor mittels DOE.....	62
3.6	Ansätze zur Verbesserung der Kulturführung.....	70
3.6.1	Dauer des Dispergierens.....	70
3.6.2	Kulturführung über mehrere Generationen.....	72
3.6.3	Fed-Batch	74
3.7	Analytik der Biomasse.....	77
3.7.1	Chemische Analytik	77
3.7.2	Sensorische Analytik	80
3.8	Wachstumsbeurteilung und Bestimmung des Pilzanteils	84
4	Diskussion.....	90
4.1	Substratanalytik	90
4.1.1	Biertreber	90
4.1.2	Hefe	92
4.1.3	Würze	93
4.1.4	Malzkeime	96
4.2	Screening in Emerskultur	97
4.3	Screening in Submerskultur	99
4.4	Optimierung der Vorkultur.....	100
4.5	Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren und Optimierung der Batch-Fermentation	102
4.5.1	Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren	102
4.5.2	Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor mittels DOE.....	103
4.6	Ansätze zur Verbesserung der Kulturführung.....	106
4.6.1	Dauer des Dispergierens.....	106
4.6.2	Kulturführung über mehrere Generationen.....	107
4.6.3	Fed-Batch	108

4.7	Analytik der Biomasse	110
4.7.1	Chemische Analytik	110
4.7.2	Sensorische Analytik	114
4.8	Wachstumsbeurteilung und Bestimmung des Pilzanteils	116
4.9	Ausblick	119
5	Literaturverzeichnis	122
6	Anhang.....	135
6.1	Substratanalytik	135
6.2	Screening in Emerskultur	136
6.3	Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren und Optimierung der Batch-Fermentation	144
6.4	Analytik der Biomasse	146
6.4.1	Chemische Analytik	146
6.4.2	Sensorische Analytik	148
7	Selbstständigkeitserklärung	161

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Nebenströme und Kreislaufwirtschaft

In der Mitte der 2080er Jahre wird ein Maximum der Weltbevölkerung von 10,3 Milliarden Menschen erwartet. 2024 wurde die Weltbevölkerung mit 8,2 Milliarden Menschen angegeben (United Nations Department For Economic And Social Affairs 2024). Damit verbunden ist ein erhöhter Bedarf an Lebensmitteln. Um den weltweiten Bedarf in 2050 zu decken, müsste die Lebensmittelproduktion im Vergleich zum Jahr 2005 um 70% gesteigert werden (FAO 2009). Im Jahr 2023 litten 9% der Weltbevölkerung unter Hunger. Das entspricht weltweit jedem 11. Menschen. Etwa 29% der globalen Bevölkerung waren ernährungsunsicher. Eines der nachhaltigen Entwicklungsziele der UN ist das Besiegen des weltweiten Hungers bis 2030 (FAO et al. 2024).

Während der weltweiten Produktion gehen etwa 14% der Lebensmittel verloren. Hierbei nicht berücksichtigt sind Verluste im Einzelhandel und auf Verbraucherebene. Die Reduzierung von Lebensmittelverlusten und -verschwendung ist wichtig, um Ernährungsziele wie das Beenden von Hunger zu erreichen (FAO 2019).

Bei der Herstellung von Lebensmitteln fallen Nebenströme an. Dazu zählen beispielsweise Traubentrester aus der Weinproduktion, Apfeltrester sowie Zitruschalen aus der Saftproduktion, Kartoffelschalen, Olivenpresskuchen aus der Ölherstellung oder Getreidenebenprodukte (Schieber 2017). Diese Nebenströme enthalten wertvolle Inhaltsstoffe wie Protein, Rohfaser, Fett, Antioxidantien, Vitamine und Mineralstoffe. Aus den Nebenströmen der Lebensmittelproduktion werden in der Regel Non-Food Artikel. Dazu zählen die Verwendung als Tierfutter, Biomasse oder Abfall. Durch geeignete Verfahren können die Nebenströme jedoch aufgewertet und für die menschliche Ernährung nutzbar gemacht werden. Im Sinne einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft ist es erforderlich, die Nebenströme wieder in den Wertschöpfungskreislauf einzubringen (Aschemann-Witzel und Stangherlin 2021; Salvatore et al. 2024).

1.2 Bierherstellung und Nebenströme der Brauindustrie

1.2.1 Bier

In Deutschland wurden in 2024 82 Mio. hL Bier produziert. Je Einwohner gerechnet wurde ein Bierkonsum von ca. 82 L berechnet (Statistisches Bundesamt 2025). Insgesamt wurden im Jahr 2022 weltweit 185 Mio. Tonnen Bier produziert (FAOSTAT). Bier wird aus Wasser, Gerstenmalz, Hopfen und Hefe sowie gegebenenfalls Zusätzen hergestellt. Zu Beginn wird

das Braumalz gemahlen und eingemaischt. Hierbei wird durch Mischen und Erhitzen die Stärke hydrolysiert. Die Maische besteht aus dem extrahierten Getreiderückstand und der flüssigen Süßwürze (Olajire 2020). Beim Läutern wird die Würze vom Treber getrennt. Anschließend wird sie gekocht und Hopfen zugesetzt. Durch das Würzekochen koaguliert das Getreideeiweiß, die vorhandenen Enzyme werden inhibiert und Metallionen, Gerbstoffe und Fette bilden unlösliche Komplexe. Diese werden durch das Klären der Würze entfernt. Nachdem die Würze gekühlt und belüftet wurde, erfolgt die Zugabe von Hefe. Diese metabolisiert die enthaltenen Zucker und setzt Ethanol, CO₂ und Aromastoffe frei. Abschließend wird das Jungbier gelagert, erneut filtriert und abgefüllt (Olajire 2020).

Die Hauptnebenströme der Bierproduktion sind Biertreber, Altheife, Kieselgur-Schlamm und Abwasser (Fillaudeau et al. 2006; Olajire 2020).

1.2.2 Biertreber

Das Nebenprodukt, das mit 85% den größten Anteil der Nebenprodukte ausmacht, ist Biertreber. Bei der Herstellung von 100 L Bier fallen durchschnittlich 20 kg Biertreber an (Mussatto et al. 2006; Mathias et al. 2015; Ortiz et al. 2019). Bei der Bierproduktion fielen dementsprechend innerhalb des Jahres 2024 allein in Deutschland 1,64 Mio. Tonnen Biertreber an.

Biertreber enthält hauptsächlich Spelzen, das Perikarp und die Samenschale von Braugetreide. Überwiegend wird hierbei Gerste eingesetzt. Neben dem großen Faseranteil, der aus Lignozellulose besteht, ist Treber reich an Protein. Ein Großteil der in Getreide enthaltenen Stärke wird während des Brauprozesses abgebaut (Kissell und Prentice 1979; Mussatto et al. 2006; Mussatto 2014).

Derzeit wird der anfallende Biertreber überwiegend als Tierfutter genutzt. In Europa werden etwa 70% des Trebers für die Rindermast und Milchviehhaltung eingesetzt. Weitere 20% werden kompostiert und 10% für die Produktion von Biogas verwendet. Teilweise wird Treber sogar nach einer Trocknung verbrannt oder endet auf Deponien (Knirsch et al. 1999; Bianco et al. 2020). In wissenschaftlichen Arbeiten wurden bereits weitere verschiedene Einsatzmöglichkeiten evaluiert. Dazu zählen die Verwendung in Bioplastik, in der Biokraftstoff-Herstellung und Ethanol-Produktion, als Adsorbens und als Lebensmittel-Zusatz oder -Zutat. Der Einsatz in Lebensmitteln ist jedoch begrenzt, da der Treber-Zusatz zu sensorischen Veränderungen der Produkte führt (Mussatto 2014; Lisci et al. 2024; Belardi et al. 2025). Aufgrund seiner hohen Feuchte und Zusammensetzung ist Biertreber anfällig für mikrobiellen Verderb. Gleichzeitig eignet sich Treber durch diese Eigenschaft als Nährmedium für mikrobielle Fermentationen. Verschiedene Arbeiten zeigen bereits die erfolgreiche Kultivierung von Bakterien, Hefen und Pilzen unter der Verwendung von Biertreber (Robertson et al. 2010; Mussatto 2014; Mitri et al. 2022).

1.2.3 Altheefe

Bei Altheefe handelt es sich nach Biertreber um einen der Haupt-Nebenströme der Bierindustrie. Pro m³ Bier fallen durchschnittlich 2 kg Altheefe an (Ferreira et al. 2010). Bierhefe wird in der Regel vier- bis sechsmal wiederverwendet, bevor sie als Nebenstrom anfällt. Altheefe enthält neben Hefe Bierfeststoffe und Trub. Sie sollte daher nicht mit Reinzuchthefen verwechselt werden, die zum Bierbrauen eingesetzt werden (Huige 1994; Ferreira et al. 2010). Analog zum Biertreber wird Altheefe aktuell überwiegend als Tierfutter verwendet und teilweise verbrannt oder auf Deponien entsorgt (Ferreira et al. 2010; Karlović et al. 2020).

1.2.4 Malzkeime

Vor dem eigentlichen Brauprozess erfolgt das Mälzen der Gerste. Das Mälzen entspricht einer Keimung unter kontrollierten Bedingungen und dient der Enzymaktivierung. Dazu wird die Gerste eingeweicht, gekeimt und gedarrt. Durch diesen Vorgang werden hydrolytische Enzyme freigesetzt, die die Zellwände, Proteine und die Stärke teilweise verdauen. Dies macht das Korn brüchiger (Celus et al. 2006; Ferreira et al. 2010; Karlović et al. 2020).

Die Keimlinge und Wurzeln, welche zusammen 3-5% des Malzes ausmachen, bleiben nach dem Mälzen übrig. Sie werden vom Malz getrennt, da sie Feuchtigkeit absorbieren und dem Bier eine Bitternote und eine unerwünschte Färbung geben würden. Da sie nährstoffreich sind, werden sie als Tierfutter eingesetzt (Celus et al. 2006; Karlović et al. 2020).

1.3 Pilzfermentation

1.3.1 Basidiomyceten

Schätzungsweise gibt es weltweit über 5 Millionen verschiedene Pilzarten. Dazu zählen neben denen im Volksmund als „Pilze“ bezeichneten Arten unter anderem Hefen und Schimmelpilze. Die auch als Ständerpilze bekannte Abteilung Basidiomycota umfasst etwa 30.000 Arten, zu denen die meisten bekannten Speisepilze gehören. Ungefähr 25 der Arten werden als Lebensmittel akzeptiert (Fazenda et al. 2008; Blackwell 2011; Valverde et al. 2015). Weltweit am häufigsten konsumiert werden davon *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* ssp. und *Lentinula edodes* (Valverde et al. 2015; Roncero-Ramos und Delgado-Andrade 2017). Pilze sind ernährungsphysiologisch gut für den Menschen geeignet, da sie einen niedrigen Fett- und Energiegehalt aufweisen und reich an Protein und Rohfaser sind. Der Proteingehalt von Pilzen ist vergleichbar mit dem von Hülsenfrüchten. Im Pilzprotein sind dabei alle essentiellen Aminosäuren vertreten, was in einer hohen biologischen Wertigkeit (BW) resultiert. Diese ist

je nach Stamm höher als die BW von Sojaprotein (González et al. 2020; Berger et al. 2022; Lübeck und Lübeck 2022).

Für ihr Wachstum benötigen Pilze primär organischen Kohlenstoff und Stickstoff. Letzterer kann aus organischen oder anorganischen Quellen stammen. Aus diesem Grund eignen sich viele verschiedene Substrate zur Pilzkultivierung (Berger et al. 2022; Lübeck und Lübeck 2022). In der Literatur wurden neben synthetischen Medien bereits unterschiedliche Nebenströme wie verschiedene Trester, Kartoffelpülpe, Kakaobohnenschalen und viele weitere erfolgreich zur Pilzkultivierung eingesetzt (Ahlborn et al. 2019; Papadaki et al. 2019; Bickel Haase et al. 2024; Happel et al. 2025). Zur Verwertung dieser Substrate werden entsprechende Enzyme sekretiert, welche die Pflanzenzellwände zersetzen. Dabei wird zwischen Braun- und Weißfäulepilzen unterschieden. Weißfäulepilze sind in der Lage neben Zellulose und Hemizellulose auch Lignin abzubauen (Fazenda et al. 2008; González et al. 2020).

1.3.2 *Pleurotus ostreatus*

Zu den Weißfäulepilzen gehört die Gattung *Pleurotus* ssp., die etwa 40 Arten umfasst. Diese sind kommerziell erhältlich und essbar. Aufgrund von Inhaltsstoffen wie phenolischen Substanzen und β -Glucanen werden sie teilweise als Medizinalpilze genutzt (Valverde et al. 2015). Natürlicherweise leben Pleuroten auf lebenden oder toten Pflanzenteilen, die arm an Nährstoffen und Vitaminen sind. Sie wachsen jedoch auch schnell und gut in Flüssigkultur (Zadrazil 1978).

Die bekannteste Art ist *Pleurotus ostreatus*. Sie ist auch unter dem Namen Austernseitling bekannt. Die Fruchtkörper von Austernseitlingen werden seit den 1970er Jahren industriell produziert (Zadrazil 1978). Sie zeichnen sich durch einen hohen Proteingehalt aus, der sich kaum von dem des Myzels unterscheidet. Die biologische Wertigkeit des Proteins ist hoch und wird primär durch Methionin limitiert (Manu-Tawiah und Martin 1987).

P. ostreatus wurde bereits erfolgreich auf verschiedenen Nebenströmen wie Weintrub und Trester, verschiedenen Pflanzenfasern, Papier und Sägespänen kultiviert. Fruchtkörper wurden auch bereits auf biertreberhaltigen Medien kultiviert (Wang et al. 2001; Mandeel et al. 2005; Papadaki et al. 2019; Bakratsas et al. 2024).

1.3.3 Myzelproduktion

Eine Alternative zu der Produktion von Fruchtkörpern ist die Myzelkultivierung. Bei Myzel handelt es sich um den vegetativen Teil des Pilzes, der netzwerkartig wächst (Islam et al. 2017). Myzel kann in filamentöser Form in Festbettkultivierung oder in Flüssigkultur produziert werden. In Flüssigkultur sind die filamentösen Strukturen dicht verwoben und liegen in

kugelförmigen, sogenannten Pellets vor (Papagianni 2004; Scholtmeijer et al. 2023). Die Flüssigkultur wird auch als Submerskultur bezeichnet und stellt einen biotechnologischen Prozess dar, in dem ein Pilz in einem flüssigen Nährmedium wächst. Die Kultur wird während der Fermentation gerührt, um den Sauerstofftransport ins Medium zu gewährleisten (González et al. 2020).

Im Vergleich zur Fruchtkörperproduktion ist die Submersfermentation weniger aufwändig, kürzer und erfordert weniger Platz. Grundsätzlich lassen sich die Fermentationen in beliebigen Maßstäben durchführen. Sie sind nicht zeit- oder ortsgebunden und können dementsprechend dort durchgeführt werden, wo Substrat verfügbar ist. In Bioreaktoren können die bevorzugten Kultivierungsparameter eingestellt und die Fermentation mithilfe von Sensoren überwacht werden (Corrêa et al. 2016; Berger et al. 2022; Scholtmeijer et al. 2023). Pilze wachsen schneller als Pflanzen und insbesondere durch die Kultivierung in Bioreaktoren kann qualitativ hochwertiges Pilzprotein gewonnen werden. Der CO₂-Ausstoß ist dabei im Vergleich zur Produktion von Insekten oder Pflanzen geringer. Durch die Verwendung von Nebenströmen aus der Lebensmittelindustrie und die Wiederverwendung von Wasser aus dem Kultivierungsprozess kann eine nachhaltige Kreislaufwirtschaft angestrebt werden (Berger et al. 2022).

Fruchtkörper und Myzel weisen Unterschiede in Bezug auf die quantitative Zusammensetzung auf. Dies wird auf eine unterschiedliche Genexpression zurückgeführt (Berger et al. 2022; Chen et al. 2025). Fruchtkörper von Speisepilzen werden allgemein als sicher (*generally recognized as safe*, GRAS) anerkannt. Myzel hingegen wurde vor dem 15. Mai 1997 nicht in nennenswertem Umfang in der EU für den menschlichen Verzehr verwendet und fällt unter Artikel 3 Abs. 2 a) der VO (EU) 2015/2283 (Novel Food Verordnung). Gemäß Artikel 6 Abs. 2 dürfen „nur zugelassene und in der Unionsliste aufgeführte neuartige Lebensmittel [...] als solche in Verkehr gebracht oder in und auf Lebensmitteln verwendet werden“. Derzeit ist lediglich ein Myzelauszug von *Lentinula edodes* zugelassen (Beschluss der Kommission vom 2. Februar 2011).

1.4 Fleischersatzprodukte und Mykoprotein

Mit dem Anstieg der Weltbevölkerung wird mit einer erhöhten Nachfrage nach tierischen Produkten gerechnet (FAO 2009). Seit 1961 hat sich die Produktion von Wiederkäuerfleisch mehr als verdoppelt. Die Viehhaltung hat derzeit einen erheblichen Einfluss auf die Treibhausgasemissionen, Versauerung von Böden, Eutrophierung und den Süßwasserverbrauch. 80% der landwirtschaftlichen Nutzflächen weltweit entfallen auf die Viehzucht. Dazu zählen Weideflächen und Ackerflächen für die Futterproduktion (Poore und

Nemecek 2018; Humpenöder et al. 2022). Aufgrund dieser Lage besteht ein steigender Bedarf für Fleischalternativen.

Fleischersatzprodukte imitieren den Geschmack, das Aussehen und die Textur von tierischem Fleisch. Fleischersatz kann aus Pflanzen, Insekten, Algen oder Pilzen hergestellt werden. Auf dem Markt überwiegt aktuell der Anteil der pflanzenbasierten Produkte (Kim et al. 2011; Swing et al. 2021; Boukid und Gagaoua 2022).

Die bekanntesten Fleischalternativen auf Pilzbasis sind Tempeh und Quorn. Bei Tempeh handelt es sich um eine schnittfeste Masse, die traditionell aus mit *Rhizopus* ssp. fermentierten Bohnen besteht. Tempeh ist ein traditionelles Lebensmittel in Indonesien (Nout und Kiers 2005). Quorn ist die Markenbezeichnung für Myzel von *Fusarium* ssp.. Dieses wird in einer kontinuierlichen Flüssigfermentation hergestellt, bei der sich alle vier bis fünf Stunden die Zellmasse verdoppelt. Das Kulturmedium ist synthetisch und besteht aus Glucose, Ammonium, Mineralstoffen und Biotin (Sadler 1988). Quorn hat einen hohen Proteingehalt mit einer hohen biologischen Wertigkeit, die vergleichbar mit der von Hühnerfleisch ist. Dementsprechend wird Quorn häufig als Mykoprotein bezeichnet. Diese Bezeichnung meint Protein aus Pilzmyzel (Sadler 1988; Derbyshire et al. 2023; Todorov et al. 2024).

Im Vergleich zu tierischem Protein hat Mykoprotein einen kleineren ökologischen Fußabdruck. Durch die Verwendung von Nebenströmen bei der Medienherstellung kann dieser weiter verkleinert werden. Bei 20% Substitution von Wiederkäuerfleisch durch Mykoprotein könnten die CO₂-Emissionen durch Entwaldung bis 2050 halbiert und zudem der Methanausstoß verringert werden (Upcraft et al. 2021; Humpenöder et al. 2022; Todorov et al. 2024). Mykoprotein hat weniger Fett und durch Ballaststoffe wie β -Glucan einen höheren Kohlenhydratanteil als vergleichbare Soja-Produkte. Zusätzlich werden eine bessere Textur und besserer Geschmack von Mykoprotein im Vergleich zu pflanzenbasierten Produkten beschrieben (Kim et al. 2011). Der bessere Geschmack lässt sich auf Glutaminsäure und Asparaginsäure zurückführen. Diese sind die Hauptminosäuren im Pilzmyzel und sorgen für einen Umami-Geschmack (Todorov et al. 2024).

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Aufwertung des bislang kaum für die Lebensmittelherstellung genutzten Biertreibers durch die Fermentation mit Basidiomyceten. Dazu war eine geeignete Pilz-Substrat-Kombination für die Flüssigfermentation zu ermitteln. Um eine Auswahl der Organismen für ein Screening in Flüssigkultur zu erhalten, war zunächst ein Screening in Oberflächenkultur durchzuführen.

Die Fermentation der gewählten Pilz-Substrat-Kombination sollte im Hinblick auf einen industriellen Prozess optimiert und im Labormaßstab vergrößert werden. Dazu wurden

verschiedene Parameter während der Fermentation sowie die Kulturführung variiert. Die aus der Fermentation erhaltene Biomasse sollte chemisch und sensorisch charakterisiert werden. Dabei wurde der Fokus auf die Veränderungen der Nährwerte, sowie des Aminosäure- und Fettsäureprofils gelegt. Die sensorische Charakterisierung erfolgte, um Veränderungen des Aromas durch die Fermentation festzustellen. Da das Fermentationsprodukt als Fleischersatz eingesetzt werden soll, ist ein ansprechendes Aroma wichtig. Da das Pilzmyzel nach der Fermentation derzeit nicht von den Treber-Resten getrennt werden kann, war der Pilzanteil in der Biomasse zu bestimmen. Hierfür wurde standardmäßig der Biomarker Ergosterol verwendet. Ergänzend dazu wurden andere Methoden, wie die Chitinbestimmung, getestet. Im Anschluss an diese Arbeit wird ein industrieller Prozess auf der Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten Daten angestrebt. Dieser wertet den Biertreber durch Fermentation auf und führt das Produkt im Sinne einer Kreislaufwirtschaft wieder der Lebensmittelindustrie zu.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substrate

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Substraten handelte es sich um Nebenströme der Brauindustrie. Diese wurden von der Störtebeker Braumanufaktur GmbH (Stralsund, DE) zur Verfügung gestellt. Bei den verwendeten Biertrebern handelte es sich um Weizenbiertreber (WT), Pilsenerbier (PT) und Schwarzbierbier (SBT, Abbildung 2-1). Die Treber wurden nach der Probenahme gefroren und in Thermoboxen geliefert. Die Temperatur im Inneren der Boxen bei Probenerhalt lag zwischen -5 °C und 5 °C . Der Treber wurde bei -20 °C gelagert und etwa 24 h vor Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut. Sofern nicht anders beschrieben, wurde der Treber vor der Verwendung mit einem Thermomix für 30 s auf Stufe 8 zerkleinert.



Abbildung 2-1: In dieser Arbeit verwendete Biertreber (von links): Weizenbier (WT), Pilsenerbier (PT) und Schwarzbierbier (SBT)

Neben den Biertrebern wurden Vorderwürze, Altheife und Malzkeime verwendet (Abbildung 2-2). Vorderwürze und Altheife wurden analog zum Biertreber gefroren und bei -20 °C gelagert. Die Malzkeime waren trocken und wurden bei Raumtemperatur gelagert.

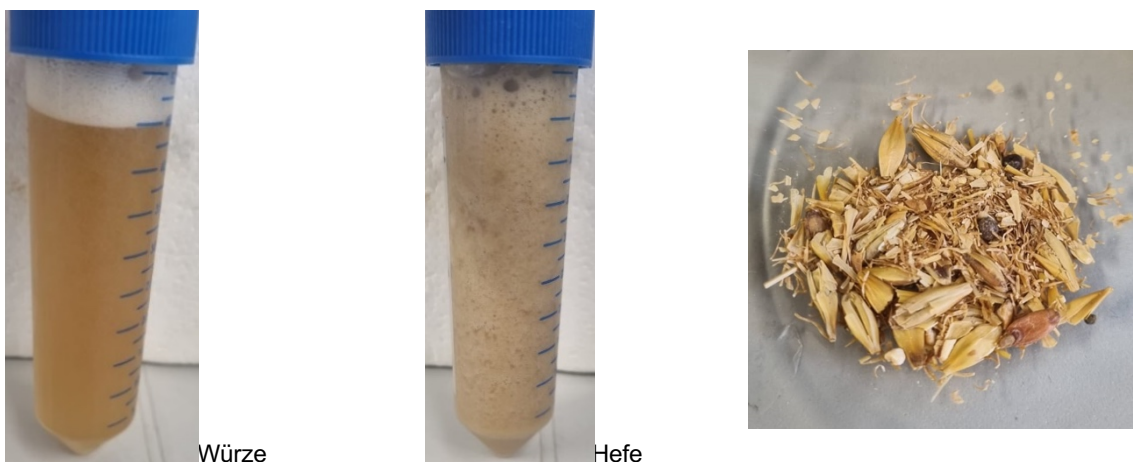


Abbildung 2-2: Frische Vorderwürze, Altheife und getrocknete Malzkeime

2.1.2 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind mit interner Stammnummer, bevorzugtem Medium und ihrer Herkunft in Tabelle 2-1 aufgeführt. Die Medienzusammensetzungen sind in Tabelle 2-2 dargestellt.

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Organismen mit interner Stammnummer, bevorzugtem Nährmedium und Bezugsstelle; CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Göttingen: Georg-August Universität Göttingen, FPr: Florian Prell, FAM: Falk Amelung, Alm: Adrian Imami, VSc: Viktor Schilberg, MRu: Martin Rühl, BDa: Bianka Daubertshäuser, HZI: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, IHI Zittau: Internationales Hochschulinstitut Zittau

Interne Stamm-Nr.	Name	Medium	Herkunft
3	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	MEA	CBS
4	<i>Mycetinis scorodonius</i>	MEA	CBS
5	<i>Pleurotus sapidus</i>	MEA	DSMZ
6	<i>Trametes suaveolens</i>	MEA	DSMZ
7	<i>Trametes versicolor</i>	MEA	unbekannt
9	<i>Wolfiporia cocos</i>	MEA	CBS
10	<i>Pleurotus floridanus</i>	MEA	Göttingen
13	<i>Pleurotus</i> sp.	MEA	DSMZ
16	<i>Lentinula edodes</i>	MEA	CBS
20	<i>Cyathus limbatus</i>	MEA	CBS
22	<i>Wolfiporia cocos</i>	MEA	Fa. NZYME
24	<i>Laetiporus sulphureus</i>	MEA	DSMZ
30	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MEA	DSMZ
31	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	MEA	DSMZ
34	<i>Ganoderma</i> sp.	MEA	DSMZ
35	<i>Coprinellus</i> sp.	MEA	DSMZ
37	<i>Lentinus squarrosulus</i>	MEA	DSMZ
38	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	MEA	DSMZ
39	<i>Lentinus crinitus</i>	MEA	DSMZ
41	<i>Coprinus comatus</i>	MEA	DSMZ
42	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	MEA	DSMZ
43	<i>Panellus serotinus</i>	MEA	DSMZ
46	<i>Trametes hirsuta</i>	MEA	DSMZ
47	<i>Ganoderma anullaris</i>	MEA	DSMZ

Interne Stamm-Nr.	Name	Medium	Herkunft
52	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	MEA	DSMZ
56	<i>Gymnopilus</i> sp.	MEA	DSMZ
57	<i>Pholiota aurivella</i>	MEA	DSMZ
59	<i>Pholiota</i> sp.	MEA	DSMZ
60	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	MEA	DSMZ
61	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	MEA	DSMZ
63	<i>Phellinus igniarius</i>	MEA	DSMZ
65	<i>Pholiota squarrosa</i>	MEA	DSMZ
67	<i>Fistulina hepatica</i>	MEA	DSMZ
79	<i>Laetiporus</i> sp.	MEA	DSMZ
80	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	MEA	DSMZ
86	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	MEA	DSMZ
87	<i>Armillaria</i> sp.	MEA	DSMZ
88	<i>Armillaria tabescens</i>	MEA	DSMZ
89	<i>Coprinus</i> sp.	MEA	DSMZ
92	<i>Lentinellus cochleatus</i> var. <i>inolens</i>	MEA	CBS
100	<i>Pleurotus eryngii</i>	MEA	DSMZ
103	<i>Hericium erinaceus</i>	MEA	InterMed Discovery GmbH, Dortmund (DE)
110	<i>Exidia glandulosa</i>	MEA	DSMZ
112	<i>Phlebia tremellosa</i>	MEA	DSMZ
113	<i>Pholiota nameko</i>	MEA	DSMZ
114	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	MEPA	DSMZ
121	<i>Abortiporus biennis</i>	MEA	CBS
123	<i>Postia</i> sp.	MEA	CBS
127	<i>Hericium cirrhatum</i>	MEA	CBS
128	<i>Hericium coralloides</i>	MEA	CBS
135	<i>Polyporus squamosus</i>	MEA	CBS
136	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MEA	CBS
139	<i>Pycnoporus coccineus</i>	MEA	CBS

Interne Stamm-Nr.	Name	Medium	Herkunft
141	<i>Parasola conopilea</i>	MEA	CBS
144	<i>Lentinellus cochleatus</i> var. <i>inolens</i>	MEA	CBS
159	<i>Agrocybe pediades</i>	MEA	CBS
160	<i>Flammulina velutipes</i>	MEA	DSMZ
161	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	MEA	DSMZ
162	<i>Clitocybe geotropa</i>	MEA	CBS
164	<i>Agaricus arvensis</i>	MEA	CBS
165	<i>Meripilus giganteus</i>	MEA	DSMZ
166	<i>Cyclocybe aegerita</i>	MEA	Sylvan Inc., Kittanning (US)
167	<i>Fomes fomentarius</i>	MEA	FAM
168	<i>Flammulina velutipes</i>	MEA	FAM
170	<i>Verticillium</i> sp.	MEA	DSMZ
176	<i>Ganoderma applanatum</i>	MEA	FAM
177	<i>Pleurotus</i> sp.	MEA	Göttingen
178	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	MEA	Göttingen
179	<i>Pleurotus ostreatus</i>	MEA	Göttingen
183	<i>Macrolepiota procera</i>	MEA	Göttingen
186	<i>Armillaria mellea</i>	MEA	DSMZ
187	<i>Pleurotus ostreatus</i>	MEA	Yoichi Honda
189	<i>Psathyrella candolleana</i>	MEPA	FAM
190	<i>Trametes hirsuta</i>	MEPA	FAM
192	<i>Fomitopsis pinicola</i>	MEPA	FAM
194	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	MEPA	FAM
196	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	MEA	DSMZ
197	<i>Mycena alnetorum</i>	MEPA	FAM
201	<i>Piptoporus betulinus</i>	MEPA	FAM
202	<i>Macrolepiota procera</i>	MEPA	FAM
205	<i>Clitopilus</i> sp.	MEPA	FAM
206	<i>Crepidotus</i> sp.	MEPA	FAM
207	<i>Clitocybe nebularis</i>	MEPA	FAM
208	<i>Meripilus giganteus</i>	MEPA	FAM

Interne Stamm-Nr.	Name	Medium	Herkunft
210	<i>Phellinus igniarius</i>	MEPA	FAM
211	<i>Trametes ochracea</i>	MEPA	FAM
212	<i>Coprinellus micaceus</i>	MEPA	FAM
214	<i>Hypholoma sublateritium</i>	MEPA	FAM
217	<i>Leucopaxillus tricolor</i>	MEPA	FAM
220	<i>Mycena pseudocorticola</i>	MEPA	FAM
222	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	MEPA	FAM
223	<i>Psathyrella piluliformis</i>	MEPA	FAM
226	<i>Parasola conopilus</i>	MEPA	FAM
227	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	MEPA	FAM
228	<i>Clitocybe</i> sp.	MEPA	FAM
229	<i>Armillaria gallica</i>	MEPA	FAM
230	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	MEPA	FAM
232	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	SNL	FPr
233	<i>Trametes ochracea</i>	MEPA	FPr
234	<i>Phlebia tremellosa</i>	MEPA	FPr
239	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	MEPA	FPr
245	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	MEA	FPr
248	<i>Pholiota lignicola</i>	MEPA	Alm
252	<i>Sparassis crispa</i>	MEA	FPr
254	<i>Hypholoma sublateritium</i>	MEA	FPr
256	<i>Trametes versicolor</i>	SNL	FPr
264	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	MEA	Mycelia, Deinze (BE)
270	<i>Cyclocybe aegerita</i>	MEA	IHI Zittau
274	<i>Ustilago maydis</i>	MEPA	MB215
275	<i>Coprinellus flocculosus</i>	MEPA	VSc
279	<i>Cyclocybe aegerita</i>	MEA	MRu
289	<i>Hymenopellis radicata</i>	MEPA	FPr
290	<i>Agaricus bernardii</i>	MEPA	FPr
295	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	MEPA	FPr
296	<i>Laetiporus sulphureus</i>	MEA	FPr

Interne Stamm-Nr.	Name	Medium	Herkunft
301	<i>Clitocybe gibba</i>	SNL	FPr
307	<i>Gymnopus peronatus</i>	SNL	FPr
309	<i>Mycetinis alliaceus</i>	SNL	FPr
310	<i>Psathyrella candolleana</i>	MEA	FPr
313	<i>Cyclocybe aegerita</i>	MEA	Senckenberg Gesellschaft, Frankfurt (DE)
316	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	MEPA	FPr
319	<i>Laetiporus sulphureus</i>	MEA	FPr
331	<i>Stereum hirsutum</i>	MEPA	BDa
332	<i>Coprinus comatus</i>	MEA	FPr
337	<i>Trametes cinnabarina</i>	MEPA	FPr
342	<i>Strobilurus esculentus</i>	MEPA	FPr
345	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	MEA	Mycelia, Deinze (BE)
348	<i>Auriscalpium vulgare</i>	MEPA	FPr
383	<i>Cyclocybe aegerita</i>	MEA	MRu
408	<i>Cyclocybe aegerita</i>	MEA	MRu
433	<i>Mycena galericulata</i>	MEA	CBS
435	<i>Inonotus obliquus</i>	MEA	CBS
436	<i>Pleurotus</i> sp.	MEPA	CBS
451	<i>Agaricus</i> sp.	MEPA	DSMZ
484	<i>Hericium coralloides</i>	YM 6.3	HZI Braunschweig (AG Stadler)
485	<i>Pleurotus dryinus</i>	MEPA	DSMZ
491	<i>Ganoderma lucidum</i>	MEPA	DSMZ
502	<i>Flammulina velutipes</i>	MEA	DSMZ
503	<i>Lactarius torminosus</i>	MEA	CBS
506	<i>Schizophyllum commune</i>	MEA	Han Wöstern, University Utrecht
515	<i>Hericium</i> sp.	MEA	Myco Genetics
517	<i>Clitocybe</i> sp.	MEPA	DSMZ
518	<i>Stropharia caerulea</i>	MEPA	DSMZ
520	<i>Grifola frondosa</i>	MEA	Mycelia, Deinze (BE)

Tabelle 2-2: Zusammensetzungen der verwendeten Medien

	MEA	MEPA	SNL	YM6.3
Malzextrakt	20 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹		10 g L ⁻¹
Agar-Agar	15 g L ⁻¹	15 g L ⁻¹	15 g L ⁻¹	15 g L ⁻¹
Sojapepton		3 g L ⁻¹		
Glucose Monohydrat			30 g L ⁻¹	4 g L ⁻¹
Asparagin Monohydrat			4,5 g L ⁻¹	
Kaliumdihydrogenphosphat			1,5 g L ⁻¹	
Magnesiumsulfat Monohydrat			0,5 g L ⁻¹	
Hefeextrakt			3 g L ⁻¹	4 g L ⁻¹
Spurenelement-Lösung			1 mL L ⁻¹	
pH-Wert	nativ	5,6	6,0	6,3

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Bezeichnung, Hersteller und Herstellerort

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Herstellerort
Alufolie	Stärke 30 µm	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Aminosäureanalysator	S433 Amino Acid	Sykam GmbH	Eresing, DE
Aufschlussbecher	HT Probenglas	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Autoklav	Laboklav 25B Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik	Haldensleben, DE
Braunglas Vial	Kurzgewindeflaschen ND9 Braunglas, 1,5 mL	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Brutschrank	INE 500	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, DE
Derivatisierungs- röhrchen	Kulturröhrchen 16 x 160 mm mit Gewinde und Kappe	Otto E. Kobe KG	Marburg, DE
Edelstahlsieb	Rundsieb, Edelstahl, Maschenweite 1,5 mm	Contacto Bander GmbH	Erkrath, DE
Einwegspritzen 1 mL bis 10 mL	Braun Inkjet	B. Braun SE	Melsungen, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Herstellerort
Einwegspritzen 50 mL mit Luer-Lock	Terumo Syringe	Terumo Corporation	Laguna, PH
Enghals Erlenmeyerkolben	100 – 2000 mL	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Exsikkator		Glaswek Wertheim	Wertheim, DE
Extraktionsbecher	250 mL	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Extraktionshülsen aus Cellulose		C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Faltenfilter	MN 615 1/4 D=185 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, DE
Feinwaage	BP 211 D	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG	Göttingen, DE
	SI-234A	Denver Instrument Company	Denver, US
Feuchtebestimmer	MA 35	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG	Göttingen, DE
Gefriertrockner	Alpha 1-2 LD Plus	Martin Christ Gefriertrocknungs- anlagen GmbH	Osterode am Harz, DE
Glaswolle	extra fein	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Grobwaage	Acculab ATL-2202	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG	Göttingen, DE
HS-Kappe	Feingewindeschraub- kappe ND18, magnetisch, 8 mm Mittelloch, Silikonseptum	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
HS-Vial	Feingewindeflasche, 20 mL, Klarglas	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Hydrotherm	Hydrotherm-H5- Apparatur	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Herstellerort
Impfnadel	Impfösenhalter PP, nach Kolle	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Kjeldahl Aufschlussblock	Turbotherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Kjeldahl-Kolben	Kjeldahl-Kolben K250, 250 mL	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Kjeldahl Säurewäscher	Vacusog	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Klarglas Vials	Kurzwendeflaschen ND9 Klarglas, 1,5 mL	Lab Logistics Group GmbH	Meckenheim, DE
Kolbenhubpipetten (0,5-5 mL, 1-10 mL)	Transferpette S	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, DE
Kolbenhubpipetten (2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	peqPETTE (Peqlab)	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Kolbenhubpipetten- spitzen	20 µL, 200 µL, 1000 µL	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AT
Korkbohrer	Korkbohrer 5,0 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Küvetten	10 x 4 x 45 mm	Sarstedt Ag & Co. KG	Nümbrecht, DE
Magnetrührer	Heiz- und Magnetrührer, analog, Keramikplatte	Otto E. Kobe KG	Marburg, DE
Magnetrührstäbchen	15-40 mm	Otto E. Kobe KG	Marburg, DE
Medizinbecher	30 mL, transparent	Otto E. Kobe KG	Marburg, DE
Membranfilter	Nylon Membran, Durchmesser 25 mm, Porengröße 0,45 µm	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Messkolben	Messkolben 10 – 2500 mL	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Mikroeinsatz 0,1 mL		Lab Logistics Group GmbH	Meckenheim, DE
Mörser und Pistill	aus Porzellan	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Muffelofen	Controller B 180	Nabertherm GmbH	Lilienthal, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Herstellerort
Orbitalschüttler	Orbitron	Infors HAT	Bottmingen, CH
Passiertuch	50 x 50 cm, feingewebt, Dichtegrad 100, Baumwolle		
Pasteurpipette		Otto E. Kobe KG	Marburg, DE
Pergamentschiffchen (stickstofffrei)		Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, DE
Peristaltikpumpe	Masterflex L/S Economy Drive	Cole Parmer	Vernon Hills, US
Petrischalen	PS, 94/16 mm, mit Nocken	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AT
pH-Meter	SevenEasy pH Meter S20	Mettler Toledo GmbH	Urdorf, CH
pH-Teststreifen	LLG-Universal Indikator Papier pH 1-14	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Photometer	UviLine SI 7000	SI Analytics	Mainz, De
PP Kurzgewindekappen	Septum: RedRubber/PTFE	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
PP Kurzgewindekappen	Septum: PTFE	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Pyrex-Röhrchen	Pyrex Kulturröhrchen mit rundem Boden aus Borosilikatglas mit Schraubverschluss, Kapazität 19 mL	Thermo Scientific Fisher	Waltham, US
Quarztiegel		Otto E. Kobe KG	Marburg, DE
Rundfilter	MN 612 Durchmesser 9 cm	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Schott-Flaschen	Gewindeflasche mit Ausgießring und Kappe, 50 – 1000 mL	DWK Life Sciences	Wertheim, DE
Siedesteinchen	Typ A	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Soxtherm	Soxtherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Sterilstopfen	Zellstoffstopfen	VWR International GmbH	Darmstadt, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Herstellerort
Sterilwerkbank	Thermo Scientific	Thermo Fisher	Waltham, US
	Herasafe KS18	Scientific	
Thermomix	TM6	Vorwerk SE & Co. KG	Wuppertal, DE
Trichter	Glastrichter Kalk-Soda-Glas, 40 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Trockenschrank	Dry-Line 53	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Ultra-Turrax	T25 digital Ultra-Turrax	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen im Breisgau, DE
Ultraschallbad		Omnilab	Bremen, DE
Vortex	VTX-3000L	LMS Consult GmbH & Co. KG	Brigachtal, DE
Wägebapier		C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Wasserbad	WNB 7-45	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, DE
Wasserdampfdestillations-Apparatur	Vapodest 450	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter, DE
Zentrifuge	Megafuge Centrifuge	16R Thermo Scientific	Fisher Waltham, US
Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AT

2.1.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind mit Reinheit und Herstellerangaben in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Verwendete Chemikalien mit Reinheit, Hersteller und Herstellerort

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	Herstellerort
Acetylchlorid	98%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Acetonitril	≥ 99,9%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
N-Acetyl-D-glucosamin	≥ 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Agar-Agar	n/a	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Aktivkohle	n/a	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	Herstellerort
Ameisensäure	≥ 99,0%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Amino Acid Standard Stock Solution Type H	n/a	Sykam GmbH	Eresing, DE
Ammoniumsulfamat	≥ 98%	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Asparagin Monohydrat	reinst	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Benzaldehyd	≥ 98%	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Borsäure	≥ 99,8%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
2-Butanon	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Chitin aus Krabbenschalen		Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Citronensäure Monohydrat	≥ 99,8%	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
7-Dehydrocholesterol	≥ 95%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Eisen(III)-chlorid	≥ 98,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Ergosterol	> 95,0%	TCI EUROPE N.V.	Zwijndrecht, BE
Ethanol	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
EDTA	≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Fettsäurestandard	n/a	CS-Chromatographie Service GmbH	Langerwehe, DE
flüssiger Stickstoff	n/a	Linde plc	Dublin, IE
2-Furanmethanol	99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Furfural		Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Glucose Monohydrat	n/a	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
HCl	37%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	n/a	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Helium	5.0	Nippon Gases	Düsseldorf, DE
n-Heptan	≥ 99%	Honeywell International, Inc.	Morris Plains, US
n-Hexan	≥ 97,0%	Honeywell International, Inc.	Morris Plains, US
Hexanal	96%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Isopropanol	≥ 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Kaliumcarbonat	99%	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 98%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	Herstellerort
Kjeldahl-Tabletten (quecksilber- und selenfrei)	97%	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Magnesiumsulfat Hydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Malzextrakt	n/a	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Methanol	≥ 99,9%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon-Hydrochlorid Monohydrat (MBTH)		Fluorochem Ltd	Hadfield, UK
MSTFA	99%	Fluorochem Ltd	Hadfield, UK
3-Octanon	98%	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
(E)-2-Octenal	≥ 94%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
1-Octen-3-ol	98%	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
1-Octen-3-on	96%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Na-Hydrolysat-Puffer A-1	n/a	Sykam GmbH	Eresing, DE
Na-Hydrolysat-Puffer B-1	n/a	Sykam GmbH	Eresing, DE
NaOH Plätzchen	≥ 98%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Natrium-L-(+)-Ascorbat	99%	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Natriumnitrit	n/a	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Natriumsulfat, wasserfrei	≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Natronlauge	≥ 32%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Ninhydrin mit 1 mL Reduziermittel	n/a	Sykam GmbH	Eresing, DE
Nonadecansäure	≥ 95%	Cayman Chemical Co.	Ann Arbor, US
(E)-2-Nonenal	96%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Octanal	99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Pepton aus Sojabohnen	n/a	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Petroleumether (Siedebereich 40 – 65 °C)	n/a	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Phenol	≥ 99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	Herstellerort
2-Phenylethanol	99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Phosphorsäure (85%)	85%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Salzsäure 0,1M	Maßlösung	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Salzsäure reinst	≥ 25,0%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Schwefelsäure	≥ 97%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
THF	≥ 99,9%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE
Thiodiglykol	≥ 95,0%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, DE
Trinatriumcitrat Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Wasserstoff	5.0	Nippon Gases	Düsseldorf, DE
Wasserstoffperoxid (30%)	≥ 30,0%	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, DE

2.2 Methoden

2.2.1 Pilzkultivierung

2.2.1.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung der verwendeten Basidiomyceten erfolgte in Emerskultur auf Malzextrakt-Agar-Platten (MEA). Das Medium bestand dabei aus 20 g L⁻¹ Malzextrakt und 15 g L⁻¹ Agar-Agar gelöst in voll entsalztem (VE-)Wasser. Das Nährmedium wurde zur Sterilisation bei 121 °C für 20 min autoklaviert und anschließend unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Bei Platten, die 70% bis 80% bewachsen waren, wurde mittels Korkbohrer ein Stück vom Rand des Myzelrasens (ca. 0,25 cm²) ausgestochen und auf eine neue MEA-Platte umgesetzt. Das Umsetzen der Pilze erfolgte in einer Sterilwerkbank. Die Inkubation erfolgte bei 24 °C und unter Lichtausschluss.

2.2.1.2 Screening in Emerskultur

Für das Emersscreening wurden Treber-Agar-Platten hergestellt. Dafür wurden 30 g L⁻¹ TM der drei in Abbildung 2-1 gezeigten Treber nach dem Mörsern mit flüssigem Stickstoff mit 15 g L⁻¹ Agar-Agar und entsprechend VE-Wasser versetzt und wie in 2.2.1.1 beschrieben sterilisiert und in Petrischalen gegossen. Die Treber-Agar-Platten wurden jeweils mit einem Stück Myzel der in Tabelle 2-1 aufgeführten Pilze inokuliert. Die Inokulation und Inkubation erfolgten analog zu 2.2.1.1. Die Kultivierung der Platten erfolgte für 14 Tage, wobei der Durchmesser des Myzelrasens an Tag 2, 5, 7, 9, 12 und 14 vermessen und dokumentiert

wurde. Zusätzlich wurden die Platten an Tag 7 und 14 geöffnet, der Geruchseindruck dokumentiert und die Platten fotografiert. Für das Screening in Submerskultur wurden die Organismen ausgesucht, die ein schnelles Wachstum von > 70% an Tag 7 oder ein sehr dichtes Wachstum aufwiesen. Zusätzlich wurden die Organismen bevorzugt, die ein intensiv würziges Aroma aufwiesen. Kandidaten, die Geruchseindrücke wie blumig, fruchtig, muffig oder stechend aufwiesen, wurden nicht für die Auswahl berücksichtigt.

MEA-Platten mit unterschiedlichen pH-Werten wurden hergestellt, indem nach dem Autoklavieren sterile Natronlauge bzw. Salzsäure zugegeben wurde. So wurde ein pH-Bereich von drei bis acht abgedeckt. Die Platten wurden jeweils mit einem Myzelstück von *Pleurotus ostreatus* analog zu 2.2.1.1 inokuliert. Nach sieben Tagen Inkubation bei 24 °C wurden die Durchmesser des Myzelrasens auf den Platten gemessen.

2.2.1.3 Vorkultur

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Vorkulturen in Enghals-Erlenmeyerkolben mit Malzextraktmedium (ME, 20 g L⁻¹) angesetzt. Die Füllmenge der Kolben betrug jeweils 40% (v/v). Das Medium und die Kolben inklusive Sterilstopfen wurden für 20 min bei 121 °C sterilisiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Pro 100 mL Medium wurden 0,5 cm² vom Rand des Myzelrasens einer etwa 75% bewachsenen Platte ausgestochen und in den Kolben überführt. Anschließend wurde das Myzelstück mittels Ultra-Turrax für 30 s bei 10.000 rpm dispergiert. Der Kolben wurde mit einem Sterilstopfen verschlossen und für 7 Tage bei 150 rpm und 24 °C auf einem Orbitalschüttler unter Lichtausschluss kultiviert. Das Ansetzen der Vorkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank.

2.2.1.4 Screening in Submerskultur

Um eine geeignete Treber-Konzentration für das Screening in Submerskultur festzulegen, wurden für die Pilze *Pleurotus eryngii*, *Hypsizyugus marmoreus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus* sp. und *Lentinula edodes* die Konzentrationen 17 g L⁻¹ TM, 30 g L⁻¹ TM und 43 g L⁻¹ TM getestet. Für die Vorbereitung der Medien wurden die entsprechenden Mengen zerkleinerten Trebers (WT, PT und SBT) in Enghals-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit VE-Wasser versetzt. Die Medien wurden in Kolben mit Sterilstopfen für 20 min bei 121 °C autoklaviert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Als Inokulum dienten jeweils die gemäß 2.2.1.3 angesetzten Vorkulturen der jeweiligen Organismen. Vor der Verwendung wurden diese für 30 s bei 10.000 rpm mittels Ultra-Turrax dispergiert. Anschließend wurde ein Teil der homogenisierten Vorkultur mit einer Kolbenhubpipette mit angeschnittener Pipettenspitze zu den vorbereiteten Treber-Medien gegeben. Die Menge an Inokulum betrug hierbei 10% (v/v) in Bezug auf das Treber-Medium. Die Kulturen wurden bei 24 °C unter Lichtausschluss für 7 Tage auf einem Orbitalschüttler mit 150 rpm inkubiert. Nach der Kultivierung wurden die

Kulturen jeweils in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abdekantiert und die festen Rückstände lyophilisiert. Die Bestimmung der Feucht- und Trockenmassen erfolgte gravimetrisch. Nach dem Trocknen wurden die Rückstände gemäß 2.2.2.2 auf ihren Rohproteingehalt analysiert. Um zu beurteilen, ob für das Screening in Submerskultur eine Zerkleinerung des Trebers notwendig war, wurden jeweils 17 g L⁻¹ TM zerkleinerter (z) und nicht-zerkleinerter (nz) Treber (WT, PT und SBT) verwendet. Die Vorbereitung der Medien, die Kultivierung und die Ernte der Kulturen erfolgten wie oben für die Festlegung der Treber-Konzentration beschrieben. Nach dem Trocknen wurden die Rückstände gemäß 2.2.2.8 hinsichtlich des Ergosterolgehaltes analysiert.

Für das Screening in Submerskultur wurden die in 3.2 als geeignet befundenen Kandidaten verwendet. Als Medium wurden jeweils 30 g L⁻¹ TM des zerkleinerten Trebers (WT, PT und SBT) verwendet und wie zuvor beschrieben angesetzt. Die Vorkulturen wurden gemäß 2.2.1.3 angesetzt und als Inokulum wurden 10% (v/v) in Bezug auf das Volumen des Mediums verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss auf einem Orbitalschüttler mit 150 rpm. Die Dauer der Kultivierung betrug 9 Tage, wobei der Geruchseindruck an Tag 2, 5, 7 und 9 bewertet wurde. Die Kulturen wurden wie zuvor beschrieben mittels Zentrifuge geerntet und getrocknet. Die Bestimmung der Feucht- und Trockenmassen erfolgte gravimetrisch. Nach dem Trocknen wurde der Rohproteingehalt der Biomassen gemäß 2.2.2.2 bestimmt. Die Screening-Kulturen wurden in Triplikaten angesetzt und die Kulturen für die Vorarbeiten in Duplikaten.

2.2.1.5 Optimierung der Vorkultur

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurden Vorkulturen von *P. ostreatus* gemäß 2.2.1.3 angesetzt. An Kulturtag 6 bis 10 wurden jeweils drei Kolben mittels Zentrifuge geerntet. Die Biomassen wurden gefriergetrocknet und die Trockenmassen gravimetrisch bestimmt. Zusätzlich wurden die pH-Werte der Kulturüberstände gemessen.

Um eine geeignete Zusammensetzung für Vorkulturen mit Treber-Medium zu finden, wurden zusätzlich zu 17 g L⁻¹ TM SBT Würze, Hefe und Malzkeime in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Malzkeime wurden direkt verwendet. Für die Würze wurde eine Stammlösung mit der Konzentration 20 g L⁻¹ und für die Hefe eine Stammlösung mit der Konzentration 10 g L⁻¹ angesetzt. Die Medien setzten sich jeweils aus SBT und den in Tabelle 2-5 aufgeführten Konzentrationen von Würze, Hefe oder Malzkeimen zusammen. Um eine Vergleichbarkeit der Kulturen innerhalb einer Versuchsreihe zu ermöglichen, wurde zum Inokulieren eine Suspension aus 2 cm² Myzelrasen von *P. ostreatus* und 40 mL sterilem VE-Wasser hergestellt. Davon wurde jeweils 1 mL als Inokulum verwendet.

Tabelle 2-5: Konzentrationen von Würze, Hefe und Malzkeimen, die dem SBT-Medium für die Optimierung der Vorkulturen zugesetzt wurden. Nur einer der Nebenströme wurde jeweils in den angegebenen Konzentrationen supplementiert. Die mit * markierten Medien wurden erneut mit eingestelltem pH-Wert betrachtet.

Würze-Konzentrationen [g L ⁻¹]	Hefe-Konzentrationen [g L ⁻¹]	Malzkeime-Konzentrationen [g L ⁻¹]
0,0	0,0	0,0
1,0	1,5*	0,5
2,5	3,0*	1,0
5,0*	5,0	1,5
10,0*	10,0	
20,0*		

Um das Wachstum von *P. ostreatus* in der Vorkultur weiter zu verbessern, wurde der pH-Wert vom SBT-Medium und ME-Medium vor dem Autoklavieren der Medien mit Natronlauge auf 8 eingestellt. Zum Vergleich wurden die Medien ohne eine Veränderung des pH-Wertes vorbereitet. Als Inokulum diente hierbei die oben beschriebene Myzel-Suspension.

Die in Tabelle 2-5 mit * markierten Medien wurden erneut angesetzt und vor dem Autoklavieren auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Als Inokulum wurde hier ebenfalls die oben beschriebene Myzel-Suspension verwendet. Vor dem Inokulieren wurde der pH-Wert der eingestellten Medien mittels pH-Papier überprüft. Alle Vorkulturen wurden bei 24 °C für sieben Tage bei 150 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die Ernte der Kulturen erfolgte mittels Zentrifuge. Anschließend wurden die Biomassen lyophilisiert und der Ergosterolgehalt analysiert. Die Bestimmung der Trockenmassen erfolgte gravimetrisch und die pH-Werte der Überstände wurden mittels pH-Meter bestimmt. Zur Überprüfung, ob sich die optimierte Vorkultur als Inokulum eignet, wurde SBT-Medium mit 17 g L⁻¹ TM in Kolben angesetzt, sterilisiert und mit 5% (v/v) der optimierten Vorkultur inokuliert. Alle Kultivierungen erfolgten in Triplikaten.

2.2.1.6 Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren

Die Übertragung der Fermentation in den Bioreaktor erfolgte zunächst im 1 L-Maßstab im Eppendorf Parallelfementer-System (Tabelle 2-6). Vor Beginn der Fermentation wurden für das Medium 17 g L⁻¹ TM SBT und 1 L Trinkwasser in den Reaktor gefüllt und die pH-Elektrode mittels Zweipunktkalibrierung auf den Bereich 4 bis 7 kalibriert.

Tabelle 2-6: Geräteparameter des Eppendorf Parallelfementer-Systems

SciVario® twin (Eppendorf SE, Jülich (DE))

Kulturgefäß	DS1500 (Arbeitsvolumen 0,4 – 1,5 L, Zellkultur)
pH-Elektrode	EasyFerm Plus (325 mm, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (CH))
DO-Sensor (optisch)	VisiFerm RS485 (325 mm, H2 Kappe, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (CH))
Begasung	Submers
Sparger	L-Sparger
Rührwerk	2 Schrägblattrührer, 1 Rushton-Typ-Rührer
Software	DASware® control (Version 6.5.0.0)

Nach dem Autoklavieren wurde der Reaktor konditioniert. Dafür und für die nachfolgende Fermentation wurde die Kaskade in Tabelle 2-7 verwendet. Nachdem die Sauerstoffsättigung, die mittels *dissolved oxygen* (DO) Sensor gemessen wurde, stabil war, wurde der DO-Sensor auf 100% kalibriert. Der Setpoint für den DO wurde auf 30% festgelegt. Als Inokulum wurden 50 mL einer sieben Tage alten Vorkultur von *P. ostreatus* in ME-Medium (siehe 2.2.1.3) verwendet. Abweichend von 2.2.1.3 wurden bei den Vorkulturen für den Bioreaktor die doppelte Myzelmenge zum Ansetzen verwendet. Die Temperatur während der Fermentation wurde auf 24 °C eingestellt.

Tabelle 2-7: Kaskade im Eppendorf Parallelfementer-System für die erste Kultivierung von *P. ostreatus* auf SBT-Medium im Bioreaktor

	Controllerleistung [%]	Setpoint
Rührgeschwindigkeit	0	150 rpm
	40	350 rpm
Sauerstoffkonzentration	60	21%
	100	21%
Begasungsrate	40	5,5 L h ⁻¹
	60	15 L h ⁻¹

Während der Fermentation wurden die Parameter gelöster Sauerstoff (*dissolved oxygen*, DO), Rührgeschwindigkeit (N), Temperatur (T), Begasungsrate (F) und der pH-Wert überwacht und mit Hilfe der Software aufgezeichnet. Nach der Fermentation wurde die Kultur durch ein Passiertuch und Sieb geerntet.

Für die Kultivierung von *P. ostreatus* im 5 L-Maßstab wurde ein Labfors 5 Tischbioreaktor (Tabelle 2-8) verwendet. Hier wurde ebenfalls die pH-Elektrode vor dem Autoklavieren mittels Zweipunktkalibrierung kalibriert.

Tabelle 2-8: Geräteparameter des Tischbioreaktors Labfors 5

Labfors 5 (Infors HT, Bottmingen (CH))

Kulturgefäß	7,5 L (Arbeitsvolumen 1 – 5 L)
pH-Elektrode	EasyFerm Plus (425 mm, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (CH))
DO-Sensor (optisch)	VisiFerm RS485 (425 mm, H2 Kappe, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (CH))
Begasung	Submers
Sparger	L-Sparger
Rührwerk	2 Schrägblattrührer, 1 Rushton-Typ-Rührer
Software	eve® (Version 2021 H2)

Nachdem 5 L SBT-Medium eingefüllt und im Reaktor autoklaviert wurden, wurden 250 mL einer sieben Tage alten Vorkultur geturrt und in eine an den Reaktor angeschlossene Vorlageflasche gefüllt. Der Reaktor wurde konditioniert und der DO-Sensor wie zuvor beschrieben kalibriert. Die Temperatur wurde auf 24 °C eingestellt. Nach dem Kalibrieren des DO-Sensors wurde das Inokulum mit Hilfe einer Peristaltikpumpe in den Reaktor gepumpt. Während der Fermentation wurden die oben genannten Parameter überwacht und mit Hilfe der eve® Software aufgezeichnet. Die Kaskade des Tischbioreaktors ist in Tabelle 2-9 gezeigt. Als Setpoint für den DO wurden 30% gewählt. Die Ernte erfolgte wie zuvor für die Parallelfementer beschrieben.

Tabelle 2-9: Kaskade im Tischbioreaktor Labfors 5 für die Kultivierung von *P. ostreatus* auf SBT-Medium im 5 L-Maßstab

	Maximum	Setpoint	Minimum
Rührgeschwindigkeit [rpm]	400	250	200
Begasungsrate [L min ⁻¹]	4,0	0,5	0,3

2.2.1.7 Vorarbeiten für die Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor

Für einen Vergleich der Fermentation von verschiedenen SBT-Konzentrationen mit *P. ostreatus* wurde das Parallelfementer-System verwendet. In die Reaktoren wurden 17 g L⁻¹ TM, 34 g L⁻¹ TM, 51 g L⁻¹ TM und 68 g L⁻¹ TM zerkleinerter SBT mit jeweils 1 L Trinkwasser gegeben. Die Vorbereitung der Reaktoren erfolgte analog zu 2.2.1.6. Die Kaskade war identisch zu der in Tabelle 2-7 mit Ausnahme der Rührgeschwindigkeit. Für die zwei niedrigen Konzentrationen war der Setpoint bei 0% Controllerleistung 200 rpm und für die beiden hohen Konzentrationen 250 rpm. Das Inokulumvolumen betrug 5% (v/v).

In einer weiteren Fermentation von SBT mit *P. ostreatus* im Parallelfementer-System wurden alle Reaktoren mit 17 g L^{-1} SBT-Medium mit Trinkwasser befüllt. Da die Füllstände bei den unterschiedlichen SBT-Konzentrationen unterschiedlich waren, wurde der Treber bei dieser und bei allen weiteren Fermentationen im Bioreaktor in einen Messzylinder eingewogen und mit Trinkwasser *ad* 1 L aufgefüllt. Die Vorbereitung der Reaktoren erfolgte analog zu 2.2.1.6. und die Kaskade entsprach der zuvor beschriebenen. Für jeweils zwei der Reaktoren wurde eine Temperatur von $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Zusätzlich wurden zwei Reaktoren bei einem nativen pH-Wert belassen und in zwei der Reaktoren wurde mit 1 M Natronlauge ein pH-Wert von 7 eingestellt. Insgesamt waren die Fermentationsbedingungen in allen vier Reaktoren unterschiedlich.

2.2.1.8 Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor mittels DOE

Für die Optimierung der Fermentation von Schwarzbierdreber mit *P. ostreatus* wurden die in Tabelle 2-10 aufgeführten Parameter in den dort angegebenen Bereichen adressiert. Für die Optimierung mittels *design of experiments* (DOE) wurde ein i-optimaler Versuchsplan mit Design Expert 13 (Version 23.1.3, Stat Ease Inc., Minneapolis (US)) erstellt (Tabelle 6-3).

Tabelle 2-10: Parameter und Bereich der Parameter, die mittels DOE optimiert wurden

Parameter	Bereich
Substratmenge	$17 \text{ g L}^{-1} \text{ TM} - 51 \text{ g L}^{-1} \text{ TM}$
Inokulumvolumen	1,0% - 7,0%
Initialer pH-Wert	5,0 – 11,0
Temperatur	$24,0 \text{ }^{\circ}\text{C} - 40,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Durchführung der Kultivierungen erfolgte im Eppendorf Parallelfementer-System. Die Vorbereitung der Reaktoren erfolgte wie zuvor in 2.2.1.6 beschrieben. Die Korrekturlösungen für den pH-Wert waren 1 M Natronlauge und 0,1 M Citronensäure. Beide Korrekturlösungen wurden vor der Verwendung autoklaviert. Für alle im Rahmen der Optimierung durchgeführten Reaktorläufe wurde die in Tabelle 2-11 angegebene Kaskade verwendet. Der Setpoint für die Konzentration des gelösten Sauerstoffs war 30%. Die Kultivierungen wurden in einer Einfachbestimmung durchgeführt. Für die Evaluierung der Läufe wurde der Ergosterolgehalt gemäß 2.2.2.8 bestimmt und in den Einheiten $[\text{mg g}^{-1}]$ und $[\text{mg L}^{-1}]$ verwendet.

Tabelle 2-11: Kaskade im Eppendorf Parallelfemter für die Optimierung der Kultivierung von *P. ostreatus* auf SBT-Medium im Bioreaktor

	Controllerleistung [%]	Setpoint
Rührgeschwindigkeit	0	200 rpm
	50	500 rpm
Sauerstoffkonzentration	0	21%
	100	21%
Begasungsrate	0	5,5 L h ⁻¹
	100	15 L h ⁻¹

Um das von Design-Expert berechnete Modell und die optimalen Kultivierungsbedingungen zu validieren, wurden die finalen Parameter aus Kapitel 3.5.3 parallel in vier Reaktoren verwendet.

2.2.1.9 Dauer des Dispergierens

Analog zu 2.2.1.3 wurden Vorkulturen von *P. ostreatus* angesetzt. Abweichend davon wurden die Myzelstücke unterschiedlich lange mittels Ultra-Turrax dispergiert. Die Dauer des Dispergierens betrug 0 s, 30 s, 60 s, 120 s und 300 s. Alle Ansätze wurden in Triplikaten erstellt. Die Kulturen wurden nach sieben Tagen Kultivierung geerntet, lyophilisiert und die Trockenmassen gravimetrisch bestimmt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Vorkulturen von *P. ostreatus* gemäß 2.2.1.3 angesetzt. Nach siebentägiger Kultivierung wurden die Kulturen für 0 s, 30 s, 60 s, 120 s oder 300 s dispergiert und als Inokulum für SBT-Hauptkulturen verwendet. Die Hauptkulturen wurden jeweils in Triplikaten angesetzt und 7 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mittels Zentrifuge geerntet, lyophilisiert und die Trockenmassen gravimetrisch bestimmt. In den Kulturüberständen wurden die pH-Werte bestimmt und die getrockneten Biomassen gemäß 2.2.2.8 auf ihren Ergosterolgehalt analysiert.

Da aus den nicht homogenisierten Vorkulturen die Entnahme eines repräsentativen Aliquots als Inokulum schwierig war, wurden die Dauer 0 s und 30 s wiederholt. Hierfür wurden die Hauptkulturen in größerem Maßstab kultiviert, sodass jeweils eine ganze Vorkultur als Inokulum diente. Die Hauptkulturen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert und analysiert. Aufgrund des größeren Maßstabs wurden die Kulturen jedoch nicht mittels Zentrifuge, sondern durch Vakuumfiltration geerntet.

2.2.1.10 Kulturführung über mehrere Generationen

In einer Versuchsreihe wurde aus Hauptkulturen von *P. ostreatus* in SBT-Medium über mehrere Generationen neue Hauptkulturen inokuliert. Statt eine Vorkultur gemäß 2.2.1.3 als

Inokulum für eine Hauptkultur zu verwenden, wurde eine Hauptkultur nach siebentägiger Kultivierung unter Standardbedingungen für 30 s mittels Ultra-Turrax dispergiert und 10% (v/v) in Bezug auf das neue Hauptkulturmedium als Inokulum für die neue Hauptkultur entnommen. So wurden insgesamt vier Generationen kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Kulturen jeweils mittels Zentrifuge geerntet, die Rückstände lyophilisiert und die pH-Werte der Überstände bestimmt. Die getrockneten Biomassen wurden gemäß 2.2.2.8 hinsichtlich ihres Ergosterolgehaltes analysiert. Jede Generation wurde in Triplikaten angesetzt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Kulturüberstände der Hauptkulturen als Medienbestandteil für weitere Hauptkulturen verwendet. Hierfür wurden Hauptkulturen von *P. ostreatus* in SBT-Medium unter sterilen Bedingungen geerntet. Für die Herstellung der SBT-Medien wurde der zerkleinerte SBT in Kolben mit Sterilstopfen autoklaviert und anschließend der zuvor erhaltene Kulturüberstand anstelle von Wasser unter sterilen Bedingungen zugegeben. Da während der Kultivierung und beim Ernten Verluste an Kulturflüssigkeit auftraten, wurden die Kulturüberstände mit sterilem Wasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Als Inokulum in dieser Versuchsreihe diente eine ME-Vorkultur (s. 2.2.1.3). Die Dauer der Kultivierung betrug jeweils 7 Tage. Die Ernte erfolgte mittels Zentrifuge. Die Biomassen wurden gefriergetrocknet und die Trockenmassen gravimetrisch bestimmt. Der Ergosterolgehalt der Biomassen wurde gemäß 2.2.2.8 bestimmt. Insgesamt wurden auf diese Weise vier Generationen nach einer standardmäßig angesetzten Generation erhalten. Die Kultivierungen erfolgten in Triplikaten.

2.2.1.11 Fed-Batch

Für die Fed-Batch Versuche wurden Feed-Lösungen aus Schwarzbiertreber und Altheife angesetzt und sterilisiert. Die Vorderwürze wurde unverdünnt nach der Sterilisation verwendet. Die Lösungen wurden dabei so hergestellt, dass sie eine hohe Konzentration aufwiesen und dennoch mit einer Pipette handhabbar waren. Die Konzentrationen der Lösungen sind in Tabelle 2-12 angegeben. Gefüttert wurden jeweils Hauptkulturen von *P. ostreatus* auf SBT-Medium ($17 \text{ g L}^{-1} \text{ TM}$).

Tabelle 2-12: Konzentrationen der verwendeten Feed-Lösungen in Bezug auf die Trockenmasse (TM)

Feed-Lösung	Trebersuspension	Althefesuspension	Vorderwürze
Konzentration [$\text{g L}^{-1} \text{ TM}$]	3	10	26

Im ersten Versuch wurden an Kulturtag fünf jeweils 1% (v/v) Feed in Bezug auf das Volumen der Hauptkultur steril zugegeben. Zusätzlich wurden Kontrollkulturen ohne Feed kultiviert. Alle Kulturen wurden in Dreifachbestimmungen angesetzt. Nach 7 Tagen wurden die Kulturen geerntet und die Biomassen lyophilisiert. Die Trockenmassen wurden gravimetrisch bestimmt

und der Ergosterolgehalt wurde gemäß 2.2.2.8 analysiert. Dieser Versuch wurde zusätzlich mit 5% (v/v) Feed durchgeführt. Hier wurde nur der Ergosterolgehalt analysiert.

Für die Evaluierung des Fütterungszeitpunkts wurden Kulturen an Tag 3, 4 und 5 mit 5% (v/v) Vorderwürze gefüttert. Zusätzlich wurden Kontrollkulturen ohne Feed geführt. Die Ernte und Analytik erfolgten wie zuvor beschrieben.

Ein Fütterungsversuch wurde im Bioreaktor durchgeführt. Dafür wurde der in Tabelle 2-3 beschriebene Tischbioraktor mit 4,5 L SBT-Medium (17 g L^{-1} TM) unter Standardbedingungen verwendet. An Tag 5 wurden 225 mL Vorderwürze steril zudosiert. Die Ernte erfolgte nach sieben Tagen mittels Passiertuch und Sieb. Nach dem Gefriertrocknen wurden die Trockenmasse gravimetrisch und der Ergosterolgehalt nach 2.2.2.8 bestimmt. Der Ansatz wurde zudem unter vergleichbaren Bedingungen ohne Feed als Referenz durchgeführt.

2.2.1.12 Wachstumsbeurteilung und Bestimmung des Pilzanteils

Für die Bestimmung des Pilzanteils wurde *P. ostreatus* auf SBT-Medium unter den in Tabelle 3-7 angegebenen, optimierten Bedingungen kultiviert. Als Referenzmyzel wurde *P. ostreatus* in ME-Medium (20 g L^{-1}) unter den optimierten Bedingungen kultiviert. Die Kultivierungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung im Parallelfementer-System (Tabelle 2-6). Während den Fermentationen wurde die CO_2 -Konzentration online mittels Abgasanalyse (DASGIP® GA4, Eppendorf SE, Jülich (DE)) in der Abluft gemessen. Die Myzelien auf SBT und ME wurden lyophilisiert und der Pilzanteil im fermentierten Schwarzbierdreber über den Ergosterol- und den Chitingehalt bestimmt.

Im Tischreaktor (Tabelle 2-8) wurde die Wachstumsbeurteilung online mithilfe eines Lebendzelllichtesensors (Incyte Arc, Hamilton Bonaduz, Bonaduz (CH)) gemessen. Um die Leitfähigkeit im Medium zu erhöhen und im Kalibrierbereich des Sensors zu liegen, wurde das Medium für Fermentationen mit Lebendzelllichtesensor mit $1,5 \text{ g L}^{-1}$ Kaliumdihydrogenphosphat und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat Hydrat versetzt. In einer Fermentation von 5 L SBT-Medium mit *P. ostreatus* unter Standardbedingungen wurde täglich mittels Tauchrohr und Peristaltikpumpe eine Probe von etwa 80 mL aus dem Reaktor gezogen. Die Proben wurden zentrifugiert, der Rückstand lyophilisiert und der Ergosterolgehalt analysiert. In einer Fermentation von 5 L ME-Medium unter Standardbedingungen wurden, wie zuvor beschrieben, Proben an Tag 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 und 13 gezogen. Das Myzel wurde lyophilisiert und die Trockenmassen gravimetrisch bestimmt. Zusätzlich wurde eine Fermentation von 4,5 L SBT-Medium unter den in Tabelle 3-7 angegebenen, optimierten Bedingungen durchgeführt.

2.2.2 Analytik

2.2.2.1 Bestimmung der Feuchte mittels Feuchtebestimmer

Die Bestimmung erfolgte mittels Feuchtebestimmer nach Herstelleranweisung bei 102 °C. Die Feuchte wurde in % angegeben.

2.2.2.2 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl

Die Bestimmung des Rohproteingehaltes erfolgte nach der Methode von Kjeldahl (Kjeldahl 1883). Hierbei wurden 200 mg der getrockneten Proben in ein Pergamentschiffchen eingewogen und in einen Kjeldahl-Kolben überführt. Nach oxidativ saurem Aufschluss (Tabelle 2-13) mit Schwefelsäure und einem Katalysatorgemisch wurden automatisch Wasser und Natronlauge zugegeben und der entstandene Ammoniak durch Wasserdampfdestillation (Tabelle 2-14) ausgetrieben. Der Ammoniak wurde in 2%iger Borsäure aufgefangen und die Lösung anschließend automatisch mit 0,1 M Salzsäure titriert.

Tabelle 2-13: Temperaturprogramm des Aufschlussblocks für die Rohproteinbestimmung

Heizintensität [%]	Zeit [min]
100	5
0	5
100	5
0	5
100	5
0	5
75	150

Tabelle 2-14: Parameter der Wasserdampfdestillations-Apparatur für die Rohproteinbestimmung

Parameter	Wert
Zugabe Wasser	90 mL
Zugabe Natronlauge	80 mL
Reaktionszeit	0 s
Destillationszeit	240 s
Dampfleistung	100%
Zugabe Borsäure	80 mL
Probenabsaugung	30 s

Die Berechnung der Rohproteingehalte erfolgte nach Gleichung (2-1) unter Verwendung des allgemeinen Umrechnungsfaktors für Lebensmittel von 6,25 gemäß Art. 2 Abs. 4 in Verbindung mit Anhang I Nr. 10. von VO (EU) Nr. 1169/2011.

$$P = \frac{1,4007 \cdot (V_{\text{Probe}} - V_{\text{Blind}}) \cdot \text{UF}}{E \cdot 1000} \cdot 100 \quad (2-1)$$

- Mit P Rohproteingehalt [g (100 g)⁻¹
 1,4007 1 mL HCl (0,1 M) entspricht 1,4007 mg Stickstoff
 V_{Probe} Verbrauchtes Volumen an 0,1 M HCl für die Probe [mL]
 V_{Blind} Verbrauchtes Volumen an 0,1 M HCl für den Blindwert [mL]
 UF Umrechnungsfaktor von Stickstoffgehalt in Proteingehalt, allgemein 6,25
 E Probeneinwaage [g]

2.2.2.3 Bestimmung des Gesamtfettgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes erfolgte nach Weibull-Stoldt. Hierfür wurden je nach zu erwartendem Fettgehalt der Probe etwa 2 g bis 8 g in ein Wägepapier eingewogen und dieses in den Aufschlussbecher überführt. Der Aufschluss mit 4 M Salzsäure, sowie die Filtration und das chloridfrei Waschen des Filters erfolgten automatisch mittels Hydrotherm (Tabelle 2-15). Nach dem Trocknen des Filters wurde das Fett in der Soxtherm-Apparatur automatisch mit Petrolether extrahiert (Tabelle 2-16). Der im Extraktionsbecher verbliebene Petrolether wurde unter Stickstoffstrom abgedampft und das extrahierte Fett im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet. Die Berechnung des Gesamtfettgehaltes erfolgte gravimetrisch nach Formel (2-2).

Tabelle 2-15: Parameter der Aufschlussapparatur für die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes

Phase	Parameter	Wert
Füllstände	Salzsäure	125 mL
	Wasser	125 mL
Heizphase	Aufheizphase	10 min
	Kochphase I	26 min
		50%
	Kochphase II	30 min
		70%
	Kühlphase	20 min
Filter – Befeuchtung	Anzahl Zyklen	3
	Volumen pro Zyklus	30 mL
Filtrationsphase	Wartezeit	5 s

Phase	Parameter	Wert
Filtrationsphase	Spülzyklen	18
	Leitungsrohr Öffnungszeit	200 ms
	Probenspülzeit	10 s
	Probenspülung	50 mL
	Kühlerspülung	40 mL
	Filterspülung	40 mL

Tabelle 2-16: Parameter der Soxtherm-Apparatur für die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes

Parameter	Wert
Petrolether 35/65	155 mL
T-Klasse	200 °C
Extraktionstemperatur	150 °C
Absenintervall	4 min
Absenkimpuls	2 s
Kochphase	30 min
Intervalle bei Abdestillieren AA	5
Extraktionszeit	90 min
Intervalle bei Abdestillieren AB	4
Abdestillieren AC	5 min

$$F = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100 \quad (2-2)$$

- Mit F Gesamtfettgehalt [g (100 g)⁻¹]
 m₁ Masse des leeren, getrockneten Extraktionsbechers mit Siedesteinen [g]
 m₂ Masse des Extraktionsbechers mit Siedesteinchen und Fett nach der Trocknung [g]
 E Probeneinwaage [g]

2.2.2.4 Bestimmung des Aschegehaltes

Der Aschegehalt wurde durch Differenzwägung eines leeren Tiegels und des Tiegels mit Probe nach vollständiger Veraschung bei 550 °C und mit Formel (2-3) bestimmt.

$$A = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100 \quad (2-3)$$

Mit	A	Rohaschegehalt [g (100 g) ⁻¹]
	m ₁	Masse des leeren Tiegels [g]
	m ₂	Masse des Tiegels mit Probe nach vollständiger Veraschung [g]
	E	Probeneinwaage [g]

2.2.2.5 Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes

Der Gesamtkohlenhydratgehalt der Proben wurde rechnerisch nach Formel (2-4) berechnet. Als Proteingehalt wurde jeweils der Reinproteingehalt, der nach Formel (2-1) und (2-7) berechnet wurde, verwendet.

$$KH = 100 - (P_{\text{rein}} + A + F) \quad (2-4)$$

Mit	KH	Gesamtkohlenhydratgehalt [g (100 g) ⁻¹]
	A	Rohaschegehalt [g (100 g) ⁻¹]
	P _{rein}	Reinproteingehalt [g (100 g) ⁻¹]
	F	Gesamtfettgehalt [g (100 g) ⁻¹]

2.2.2.6 Aminosäureanalytik

Für die Bestimmung der Aminosäuren wurden drei verschiedene Aufschlüsse durchgeführt, um alle proteinogenen Aminosäuren zu erfassen. Für den überwiegenden Teil aller proteinogenen Aminosäuren (*total amino acids*, TAA) wurden etwa 25 mg der gefriergetrockneten Probe in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL Hydrolysemix (6 M HCl mit 1 g L⁻¹ Phenol) bei 110 °C für 24 h hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat auf Eis mit 7,5 M Natronlauge neutralisiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natronlauge auf 2,2 eingestellt und das Hydrolysat in einem Messkolben mit Citratpuffer (Tabelle 2-17) auf 20 mL aufgefüllt. Nach Membranfiltration und ggf. Verdünnung mit Citratpuffer wurde die Lösung mittels Aminosäureanalysator analysiert.

Tabelle 2-17: Zusammensetzung des Citratpuffers (0,12 M) nach SYKAM für die Aminosäureanalytik

Chemikalie	Konzentration	pH-Wert
Trinatriumcitrat Dihydrat	11 g L ⁻¹	2,2
Citronensäure	6 g L ⁻¹	
Thiodiglycol	14 mL L ⁻¹	
HCl (32%)	12 mL L ⁻¹	
Phenol	2 g L ⁻¹	

Die Trennung der Aminosäuren erfolgte auf einer Kationenaustauschersäule. Für die Detektion wurden die Aminosäuren zunächst mit Ninhydrin mittels Nachsäulenderivatisierung zu einer farbigen Verbindung umgesetzt und anschließend mit UV/VIS-Detektor bei 570 nm bzw. 440 nm (Prolin) detektiert (Tabelle 2-18).

Tabelle 2-18: Parameter für die Analyse der Aminosäuren mit Ausnahme von Tryptophan

Parameter	Aminosäureanalysator S433 (SYKAM GmbH, Eresing)
Vorsäule	Ammoniakfiltersäule LCA K13/Na für Protein-Hydrolysat (4,6 x 100 mm)
Injektionsvolumen	50 µL
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13/Na für das erweiterte Hydrolysatprogramm (PEEK, 4,6 x 175 mm)
Eluenten	A: Na-Citratpuffer A1 (0,12 N, pH 3,45, SYKAM) B: Na-Citratpuffer B1 (0,20 N, pH 10,85, SYKAM) C: Regenerationslösung (0,2 g L ⁻¹ EDTA in 0,5 M Natronlauge) Flussrate: 0,45 mL min ⁻¹
Gradient und Ofentemperatur	
Aminomodul	Ninhydrin (0,1 M in Methanol) Flussrate: 0,25 mL min ⁻¹
Reaktortemperatur	130 °C

Für die Bestimmung von Cystein und Methionin wurden etwa 25 mg der gefriergetrockneten Probe in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und in einem Eisbad 0,5 mL frisch angesetzter Oxidationsmix hinzugefügt. Der Oxidationsmix bestand aus einer Mischung von Wasserstoffperoxid (30%) und phenolischer Ameisensäure (889 g Ameisensäure, 111 g Reinstwasser, 4,73 g Phenol) im Verhältnis 1:9. Nach Zugabe des Oxidationsmix wurden die Proben bei 0 °C inkubiert. Nach 16 h wurde die Oxidation durch die Zugabe von etwa 80 mg

Natriumdisulfit gestoppt. Die weitere Aufarbeitung und Messung erfolgten wie zuvor für die TAAAs beschrieben.

Für die Bestimmung von Tryptophan wurden etwa 25 mg der gefriergetrockneten Probe in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL phenolischer Natronlauge (5 M NaOH mit 1 g L⁻¹ Phenol) bei 110 °C für 24 h hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat auf Eis mit 0,5 M Phosphorsäure neutralisiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf 2,2 eingestellt und das Hydrolysat in einem Messkolben mit Citratpuffer (Tabelle 2-17) auf 20 mL aufgefüllt. Nach Membranfiltration wurde die Lösung mittels Aminosäureanalysator analysiert. Abweichend zu der in Tabelle 2-18 dargestellten Methode wurden ein anderer Gradient und ein abweichendes Temperaturprogramm verwendet (Abbildung 2-3).

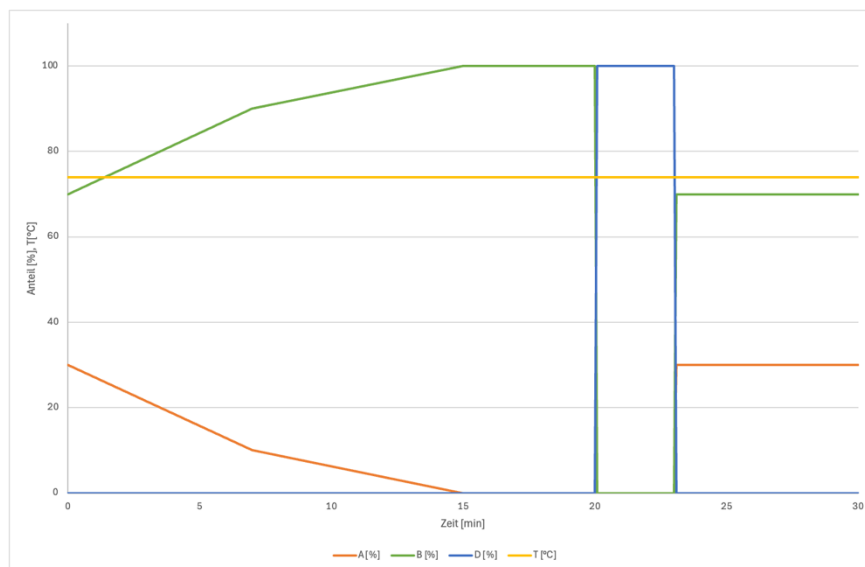


Abbildung 2-3: Eluentenzusammensetzung und Temperaturprofil für die Messung von Trp

Für die Quantifizierung des jeweiligen Aminosäure-Gehalts in der Probe wurde eine Kalibrierreihe aus einem Mischstandard und eine aus einer Trp-Referenzlösung angesetzt. Durch lineare Regression wurde die Konzentration der Aminosäuren bestimmt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung, der molaren Massen und der Einwaage wurde der jeweilige Aminosäuregehalt AA nach Gleichung (2-5) ermittelt.

$$AA = \frac{c \cdot VF \cdot V \cdot M}{E \cdot 10^9} \cdot 100 \quad (2-5)$$

Mit	AA	Aminosäuregehalt [g (100 g TM) ⁻¹]
	c	Durch lineare Regression ermittelte Konzentration der Aminosäure [nmol mL ⁻¹]
	VF	Verdünnungsfaktor
	V	Probenvolumen, hier 20 mL
	M	Molare Masse der Aminosäure [g mol ⁻¹]
	E	Probeneinwaage [g TM]

Der Aminosäuregehalt wurde unter der Annahme berechnet, dass die Aminosäuren frei vorlagen. In Proteinen sind Aminosäuren jedoch über Peptidbindungen miteinander verknüpft. Daher wurde in Gleichung (2-6) der jeweilige Aminosäuregehalt entsprechend korrigiert und ein Wassermolekül subtrahiert.

$$AA \text{ res} = \frac{c \cdot VF \cdot V \cdot (M - M_{H_2O})}{E \cdot 10^9} \cdot 100 \quad (2-6)$$

Mit	AA res	Aminosäuregehalt in Peptidbindung [g (100 g TM) ⁻¹]
	c	Durch lineare Regression ermittelte Konzentration der Aminosäure [nmol mL ⁻¹]
	VF	Verdünnungsfaktor
	V	Probenvolumen, hier 20 mL
	M	Molare Masse der Aminosäure [g mol ⁻¹]
	E	Probeneinwaage [g TM]
	M _{H₂O}	Molare Masse von Wasser [g mol ⁻¹] (18 g mol ⁻¹)

Für die Berechnung des Umrechnungsfaktors des Gesamtstickstoffgehalts in den entsprechenden Reinproteingehalt wurde die Summe der korrigierten Aminosäuregehalte gebildet und das Verhältnis zum experimentell bestimmten Rohproteingehalt nach Formel (2-7) berechnet.

$$UF_{\text{rein}} = \frac{\sum AA \text{ res}}{\frac{P}{UF}} \quad (2-7)$$

Mit	UF _{rein}	Umrechnungsfaktor für den Gesamtstickstoff- in den Reinproteingehalt
	AA res	Aminosäuregehalt in Peptidbindung [g (100 g) ⁻¹]
	P	Rohproteingehalt [g (100 g) ⁻¹]
	UF	Umrechnungsfaktor für den Rohproteingehalt (6,25)

Für die Beurteilung der Proteinqualität wurde zunächst der *amino acid score* (aas) gemäß Gleichung (2-8) berechnet. Dafür wurde der Aminosäuregehalt der essentiellen Aminosäuren im Probestprotein mit dem des WHO-Referenzproteins verglichen. Das Referenzprotein stellt dabei das Referenzprotein dar, das die Weltgesundheitsorganisation 1973 beschlossen hat (Food and Agriculture Organization und World Health Organization 1973). Aus dem aas wurde nach Gleichung (2-9) der *chemical score* (CS) berechnet. Dieser ist für die Berechnung des *essential amino acid index* (EAAI) nach Formel (2-10) relevant. Die biologische Wertigkeit wurde nach Formel (2-11) berechnet.

$$\text{aas} = \frac{\text{AA}_{\text{Probe}}}{\text{AA}_{\text{Referenz}}} \quad (2-8)$$

Mit	AAS	<i>amino acid score</i>
	AA_{Probe}	Anteil der Aminosäure im Probestprotein [%]
	$\text{AA}_{\text{Referenz}}$	Anteil der Aminosäure im Referenzprotein [%]

$$\text{CS} = \text{aas} \cdot 100 \quad (2-9)$$

Mit	CS	<i>chemical score</i>
	aas	<i>amino acid score</i>

$$\text{EAAI} = \sqrt[8]{\text{CS}_{\text{Ile}} \cdot \text{CS}_{\text{Leu}} \cdot \text{CS}_{\text{Lys}} \cdot \text{CS}_{\text{Met+Cys}} \cdot \text{CS}_{\text{Phe+Tyr}} \cdot \text{CS}_{\text{Thr}} \cdot \text{CS}_{\text{Trp}} \cdot \text{CS}_{\text{Val}}} \quad (2-10)$$

Mit	EAAI	<i>essential amino acid index</i>
	CS	<i>chemical score</i>

$$\text{BW} = (1,09 \cdot \text{EAAI}) - 11,7 \quad (2-11)$$

Mit	BW	biologische Wertigkeit
	EAAI	<i>essential amino acid index</i>

2.2.2.7 Bestimmung der Fettsäureverteilung

Die Bestimmung der Fettsäureverteilung erfolgte durch Derivatisierung zu Fettsäuremethylestern (FSME) nach Palmquist und Jenkins mit kleinen Modifikationen (Palmquist und Jenkins 2003). 0,5 g der gefriergetrockneten und gemörserten Probe wurde in ein Pyrex-Röhrchen eingewogen und mit 2 mL Nonadecansäure ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ in Heptan) sowie 3 mL 10% methanolischer Salzsäure versetzt. Nach gründlichem Durchmischen mittels Vortex wurde die Probe für 2 h bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 mL Hexan und 10 mL 6% Kaliumcarbonat-Lösung wurde erneut mittels Vortex gemischt. Die Probe wurde in ein

Headspace Vial überführt und bei 1500 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase in ein frisches Vial überführt, mit Natriumsulfat und Aktivkohle versetzt und erneut zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit wurde in ein Braunglas-Vial überführt und anschließend mittels Gaschromatograph (GC) mit gekoppeltem Massenspektrometer (MS) analysiert (Tabelle 2-19). Als Referenz wurde ein Standardgemisch ebenfalls mittels GC-MS analysiert. Die Proben wurden jeweils in einer Doppelbestimmung aufgearbeitet. Für die Berechnung der Fettsäureverteilung wurden die Fettsäuren berücksichtigt, die im Standard enthalten waren.

Tabelle 2-19: GC-Parameter für die Bestimmung der Fettsäureverteilung

7890B GC System (Agilent Technologies, Santa Clara (US))

MultiPurposeSampler MPS robotic (GERSTEL, Mühlheim an der Ruhr (DE)) SS Inlet	Spritzenvolumen	10 μL
	Injektionsvolumen	1 μL
	Injektionsgeschwindigkeit	50 $\mu\text{L s}^{-1}$
	Modus	Split
	Injektortemperatur	250 $^{\circ}\text{C}$
	<i>Septum purge flow</i>	3 mL min^{-1}
	<i>Gas saver</i>	20 mL min^{-1} nach 2 min
	Splitrate	100:1
	Splitfluss	120 mL min^{-1}
	Liner	Split/Splitless FocusLiner® (Trajan Scientific and Medical, Melbourne, AU)
Ofen	Temperaturprogramm	40 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)/ 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ / 240 $^{\circ}\text{C}$ (12 min)
Säule (VF-WAXms)	VF-WAXms	CP9205: NL10771228
	Dimension	30 m x 250 μm x 0,25 μm
	Trärgas	He (5.0)
	Flussrate	1,2 mL min^{-1} (konstant)
Detektor	MS	5977B MSD (Agilent Technologies)
	$T_{\text{Transferline}}$	250 $^{\circ}\text{C}$
	Ionenquelle	EI
	$T_{\text{Ionenquelle}}$	230 $^{\circ}\text{C}$
	Ionisierungsenergie	70 eV
	$T_{\text{Quadrupol}}$	150 $^{\circ}\text{C}$
	<i>Solvent delay</i>	4,4 min

7890B GC System (Agilent Technologies, Santa Clara (US))

Detektor	Modus	scan (m/z 33 – 440)
	Gain Factor	1
Software	Datenaufnahme	MassHunter GC/MS Acquisition
	Datenauswertung	Mass Hunter Qualitativ Analysis

2.2.2.8 Bestimmung des Ergosterolgehaltes

Die Bestimmung des Ergosterolgehaltes erfolgte nach der geringfügig modifizierten Methode von Bickel Haase et al. (Bickel Haase et al. 2024). Hierfür wurden ca. 200 mg der gefriergetrockneten und gemörsterten Probe in ein Pyrex-Röhrchen eingewogen und mit Natriumascorbat und 5 mL 5% methanolischer Natronlauge versetzt. Als interner Standard (IST) diente 7-Dehydrocholesterol in 2-Butanon (5 mg mL^{-1}). Die Probelösung wurde 1 h bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad verseift und anschließend in Dunkelheit auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Überstand wurde membranfiltriert, in ein Derivatisierungsröhrchen überführt und dreimal mit 5 mL Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in einem Messkolben mit Hexan auf 15 mL aufgefüllt und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. 6 mL des Extraktes wurden in ein Pyrex-Röhrchen überführt und das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom bis zur Trockenheit entfernt. Der Rückstand wurde in jeweils 0,5 mL Tetrahydrofuran (THF) und *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoacetamid (MSTFA) aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Die Silylierung erfolgte über Nacht nach dem Erhitzen für 2 min bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad. Am nächsten Tag wurde die Probelösung in ein Braunglas-Vial überführt und mittels GC analysiert. Als Detektor wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet. Die Methodenparameter sind in Tabelle 2-20 aufgeführt.

Für die Quantifizierung des Ergosterols in den Proben wurde eine externe Kalibriergerade aus Ergosterol (2 mg mL^{-1} in 2-Butanon) und IST in 2-Butanon angesetzt. Der Konzentrationsbereich des Ergosterols betrug $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ bis $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$. Jeweils 1 mL der Kalibrierlösungen wurde in ein Pyrex-Röhrchen überführt und das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernt. Danach wurden die Kalibrierstandards analog zu den Proben behandelt.

Tabelle 2-20: Geräteparameter des GC-FID zur Bestimmung von Ergosterol

7890A GC System (Agilent Technologies, Santa Clara (US))

7683B Series Injektor (Agilent Technologies)	Spritzenvolumen	10 μL
	Injektionsvolumen	1 μL
	Injektionsgeschwindigkeit	6000 $\mu\text{L min}^{-1}$
SS Inlet	Modus	Split

7890A GC System (Agilent Technologies, Santa Clara (US))

SS Inlet	Injektortemperatur	250 °C
	Septum purge flow	3 mL min ⁻¹
	Gas saver	25 mL min ⁻¹ nach 5 min
	Splitrate	5:1
	Splitfluss	10 mL min ⁻¹
	Liner	Split/Splitless FocusLiner® (Trajan Scientific and Medical, Melbourne, AU)
Ofen	Temperaturprogramm	100 °C (3 min)/ 30 °C min ⁻¹ / 280 °C (12 min)/ 30 °C min ⁻¹ /320 °C (5 min)
Säule	DB-5ms	US9228336H
	Dimensionen	30 m x 320 µm x 0,25 µm
	Trärgas	H ₂ (5.0)
	Fluss	2 mL min ⁻¹ (konstant)
Detektor FID	Temperatur	300 °C
	H ₂ -Strom	40 mL min ⁻¹
	Luftstrom	400 mL min ⁻¹
	Makeup Flow	25 mL min ⁻¹
Software	Datenaufnahme/Auswertung	GC ChemStation (Rev. B.04.01)

Unter Berücksichtigung der Peakflächen und Konzentrationen von Ergosterol und IST in den Kalibrierlösungen wurde eine Kalibriergerade erstellt. Mithilfe dieser und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Probeneinwaage wurde der Ergosterolgehalt der Proben gemäß Gleichung (2-12) berechnet.

$$G_{\text{Ergo}} = \frac{\left(\frac{A_{\text{Ergo}}}{A_{\text{IST}}} - b\right) \cdot m_{\text{IST}} \cdot 2,5}{m \cdot E} \quad (2-12)$$

- Mit G_{Ergo} Ergosterolgehalt [mg g⁻¹]
 A_{Ergo} Peakfläche von Ergosterol
 A_{IST} Peakfläche des IST
 b Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
 m_{IST} Masse des IST in der Probe [mg]
 m Steigung der Kalibriergeraden
 E Probeneinwaage [g]

2.2.2.9 Bestimmung des Chitingehaltes

Die Bestimmung des Chitingehaltes erfolgte nach der modifizierten Methode von Vetter und Siller sowie der Farbreaktion von Smith und Gilkerson (Smith und Gilkerson 1979; Vetter und Siller 1991; Ahlborn et al. 2019). Etwa 20 mg der gefriergetrockneten, gemörserten Probe wurden in ein Pyrex-Röhrchen eingewogen und mit 2,5 mL 6 M Salzsäure versetzt. Die Hydrolyse der Proben erfolgte bei 105 °C im Trockenschrank für 24 h. Der pH-Wert des Hydrolysats wurde mit Natronlauge auf 7 eingestellt und in einem Messkolben mit Reinstwasser auf 10 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Probelösung filtriert. In einem Pyrex-Röhrchen wurden 350 µL des Filtrates mit 150 µL Reinstwasser verdünnt und mit 500 µL 0,5 M Salzsäure versetzt. Die Lösung wurde für 2 h bei 110 °C im Trockenschrank inkubiert und nach dem Abkühlen mit 2 mL Natriumnitritlösung (2,5%) und 1 mL Ammoniumsulfamatlösung (12,5%) versetzt. Nach Zugabe von 1 mL 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon-Hydrochlorid-Lösung (MBTH) (0,25%) wurde die Probelösung für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Zugabe von 1 mL FeCl₃-Lösung (0,5%) und weiteren 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend die Extinktion bei 650 nm gemessen.

Für die Erstellung einer externen Kalibriergeraden wurden Lösungen des Chitin-Monomers *N*-Acetyl-D-Glucosamin in einem Konzentrationsbereich von 2,5 µg mL⁻¹ bis 150 µg mL⁻¹ verwendet. Als Blindwert wurden 500 µL Reinstwasser mit 500 µL 0,5 M Salzsäure verwendet. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden ca. 10 mg Chitin aus Krabbenschalen in ein Pyrex-Röhrchen eingewogen und, wie zuvor für die Proben beschrieben, hydrolysiert. 50 µL dieses Hydrolysats wurden mit 450 µL Reinstwasser und 500 µL Salzsäure versetzt. Die Farbreaktion erfolgte für die Kalibrierlösungen, Blindwerte und Wiederfindungen analog zu den Proben. Die Aufarbeitung der Proben, Blindwerte und Wiederfindungen erfolgte jeweils in einer Doppelbestimmung.

Die Berechnung des Chitingehaltes erfolgte mithilfe einer Kalibriergeraden und unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Probeneinwaage nach Formel (2-13). Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der Wiederfindung korrigiert.

$$C = \frac{E(650 \text{ nm}) - b \cdot 1000 \cdot 10}{m \cdot 150 \cdot E} \quad (2-13)$$

Mit	C	Chitingehalt [mg g ⁻¹]
	E(650 nm)	Extinktion der Probelösung bei 650 nm
	b	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
	m	Steigung der Kalibriergeraden
	E	Probeneinwaage [g]

2.2.2.10 Sensorische Beurteilung der Biomasse

Der wie in 2.2.1.12 beschrieben, fermentierte Schwarzbierdreber wurde in einer Verkostung sensorisch beurteilt. Zwei Proben wurden dabei ausgegeben. Bei einer Probe handelte es sich um Biomasse, die nach der Ernte über Nacht im Kühlschrank gelagert wurde und die andere Probe war die identische Biomasse, die nach der Ernte über Nacht tiefgefroren und vor der Verkostung wieder aufgetaut wurde. Die Proben wurden in transparenten Medizinbechern ausgegeben, die mit „A“ und „B“ beschriftet waren. Die Prüfung fand verdeckt statt und die Probanden sollten das Aussehen, die Konsistenz, Geruch, Geschmack und den Gesamteindruck beurteilen. Für Geruch und Geschmack waren Attribute vorgegeben und zusätzlich sollte die Intensität auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr intensiv) bewertet werden. Der Gesamteindruck sollte ebenfalls anhand einer Skala von 0 (schlecht) bis 5 (sehr gut) bewertet werden. Das Aussehen und die Konsistenz sollten frei beschrieben werden. Der Prüfbogen ist in Abbildung 6-4 dargestellt.

Das Panel bestand aus 22 Prüfpersonen, die sich in 9 männliche und 13 weibliche Probanden aufteilten. Das Alter der Prüfpersonen lag zwischen 22 und 57 Jahren und alle Probanden waren Nichtraucher.

2.2.2.11 Aromaanalytik mittels GC-MS/MS-O

Für die Analytik der geruchsaktiven Substanzen wurde ein Gaschromatograph (GC) mit gekoppeltem Tandemmassenspektrometer (MS/MS) und Olfaktometrie Detektor Port (ODP) verwendet. Für die Extraktion der flüchtigen Verbindungen aus der Probe wurde die Festphasenmikroextraktion (*solid phase micro extraction*, SPME) verwendet. Dabei wurde die SPME-Faser im Kopfraum (*head space*, HS) der Probe positioniert. Die Faser wurde nach der Extraktion im Inlet des GC thermodesorbiert und die Analyten anschließend auf einer polaren Säule (VF-WAXms) getrennt. Die Parameter der Extraktion und der GC-Messung sind in Tabelle 2-21 aufgeführt. Die Detektion der geruchsaktiven Substanzen erfolgte durch Abriechen des Trägerstroms am ODP. Parallel dazu wurden die Massenspektren der Substanzen erfasst. Als Probe diente jeweils (1,0 ± 0,1) g von feuchtem SBT, *P. ostreatus* kultiviert auf Malzextrakt (POS-ME) und Treber (POS-SBT). Diese wurden jeweils in 20 mL HS-Vials eingewogen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2-21: GC-Parameter für die Aromaanalytik

7890 A GC System, Agilent Technologies

SPME	Faser	Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS, Supelco, Bellefonte, US), 10 mm x 80 µm
	Eintauchtiefe in Vial	27 mm

7890 A GC System, Agilent Technologies

SPME	Temperatur	40 °C	
	Extraktionszeit	30 min	
	Inkubationszeit	5 min	
	Schüttelgeschwindigkeit	250 rpm	
SS Inlet	Desorptionstemperatur	250 °C	
	Desorptionszeit	1 min	
	Liner	Splitless inlet liner for SPME 0,75 mm ID (Sigma Aldrich, St. Louis, US)	
	Eintauchtiefe (Faser)	54 mm	
	Modus	Splitlos	
	<i>Septum purge flow</i>	3 mL min ⁻¹	
	<i>Gas saver</i>	25 mL min ⁻¹ nach 5 min	
	Ofen	Temperaturprogramm	40 °C (3 min)/ 3 °C min ⁻¹ / 150 °C (0 min)/ 20 °C min ⁻¹ /240 °C (3,833 min)
		Säule	VF-WAXms
Dimension	30 m x 250 µm x 0,25 µm		
Trägergas	Helium (5.0)		
Flussrate	1,56 mL min ⁻¹ (konstant)		
Splitterplatte	MS:ODP	1:1	
Detektor	MS/MS	Triple Quadrupol (7000 Agilent Technologies)	
	T _{Transferline}	250 °C	
	Ionenquelle	EI	
	T _{Ionenquelle}	230 °C	
	Ionisierungsenergie	70 eV	
	T _{Quadrupol}	150 °C	
	<i>Solvent delay</i>	0 min	
	Modus	<i>scan</i> (m/z 30 - 300)	
	<i>Gain Factor</i>	1	
	ODP	ODP 3, GERSTEL	
Autosampler	T _{Transferline}	250 °C	
	MultiPurposeSampler 2XL (MPS), GERSTEL		
Software	Datenaufnahme	MassHunter GC/MS Acquisition B 07.01.1805	
	Datenauswertung	MassHunter Qualitativ Analysis Version B.06.00	

Für die Identifizierung der geruchsaktiven Verbindungen wurden die aufgenommenen Massenspektren mit den Referenzspektren des *National Institute of Standards and Technology* (NIST) verglichen. Zusätzlich wurden die für die Substanzvorschläge wahrgenommenen Geruchseindrücke mit denen der Datenbank *The Good Scents Company* verglichen. Ferner wurden die Retentionsindizes (RI) der geruchsaktiven Analyten nach der Formel von van den Dool und Kratz berechnet (Formel (2-14), Van Den Dool und Kratz 1963).

$$RI = 100 \cdot i \cdot \left(\frac{t_{R,A} - t_{R,Std}}{t_{R,Std(n+1)} - t_{R,Std}} \right) + 100 \cdot n \quad (2-14)$$

Mit	RI	Retentionsindex
	i	Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkan
	$t_{R,A}$	Nettoretentionszeit des Analyten [min]
	$t_{R,Std}$	Nettoretentionszeit des Standards [min]
	n	Anzahl der C-Atome des Alkans, welches vor dem Analyten eluiert

Für die Identifizierung wurden jeweils 20 mg der Substanz eingewogen und mit Acetonitril auf 20 mL aufgefüllt. Anschließend wurde ein Mischstandard aus 50 µL der Aroma-Stocks *ad* 50 mL Wasser angesetzt. Der Mischstandard wurde erneut um den Faktor fünf mit Wasser verdünnt und 1 mL des verdünnten Mischstandards mit der in Tabelle 2-21 beschriebenen Methode extrahiert und analysiert. Die RIs der Analyten wurden mit Literaturwerten und den RIs der Aromastandards verglichen. Alle RIs wurden für eine polare und für eine unpolare Säule bestimmt. Die abweichenden GC-Parameter für die Messungen auf der unpolaren Säule sind in Tabelle 2-22 aufgeführt.

Tabelle 2-22: Abweichende GC-Parameter für die Messung auf der unpolaren Säule

GC	Parameter	7890 A GC System, Agilent Technologies
Ofen	Temperaturprogramm	40 °C (3 min)/ 3 °C min ⁻¹ / 150 °C (0 min)/ 20 °C min ⁻¹ /320 °C (3,833 min)
Säule	DB-5ms	122-5532: US1613414H, Agilent
	Dimension	30 m x 250 µm x 0,25 µm
	Trägergas	Helium (5.0)
	Flussrate	1,2 mL min ⁻¹ (konstant)

Zur Bestimmung der *flavour dilution* (FD-)Faktoren wurde eine Aromaverdünnungsanalyse (AVA) durchgeführt. Die Verdünnung der Probe erfolgte über die Veränderung der Splitverhältnisse im GC-Inlet nach Zhang (Zhang et al. 2014). Limitiert war das Verfahren durch die Pneumatiksteuerung auf einen FD-Faktor von 256.

3 Ergebnisse

3.1 Substratanalytik

Die Reinprotein-, Gesamtfett-, Rohasche- und Gesamtkohlenhydratgehalte für die in 2.1.1 aufgeführten Substrate sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

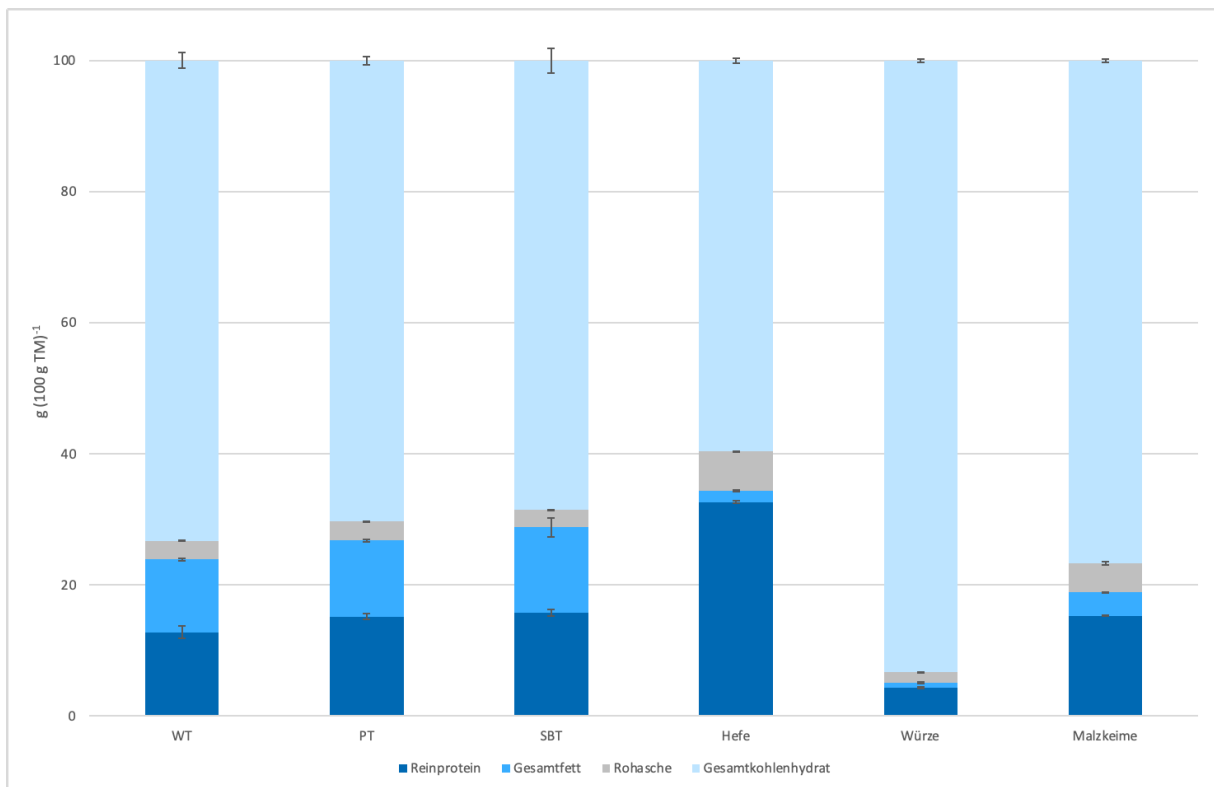


Abbildung 3-1: Reinprotein-, Gesamtfett-, Rohasche- und Gesamtkohlenhydratgehalte der Substrate Weizenbier treber (WT), Pilsener treber (PT), Schwarzbier treber (SBT), Hefe, Würze und Malzkeime bezogen auf die Trockenmasse (TM)

Anhand der Aminosäureverteilung aus Abbildung 3-2 wurden für die verwendeten Substrate der *essential amino acid index* (EAAI) und die daraus resultierende biologische Wertigkeit (BW) gemäß 2.2.2.6 berechnet. Diese sind zusammen mit den limitierenden Aminosäuren und dem jeweils zugehörigen *chemical score* (CS) in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

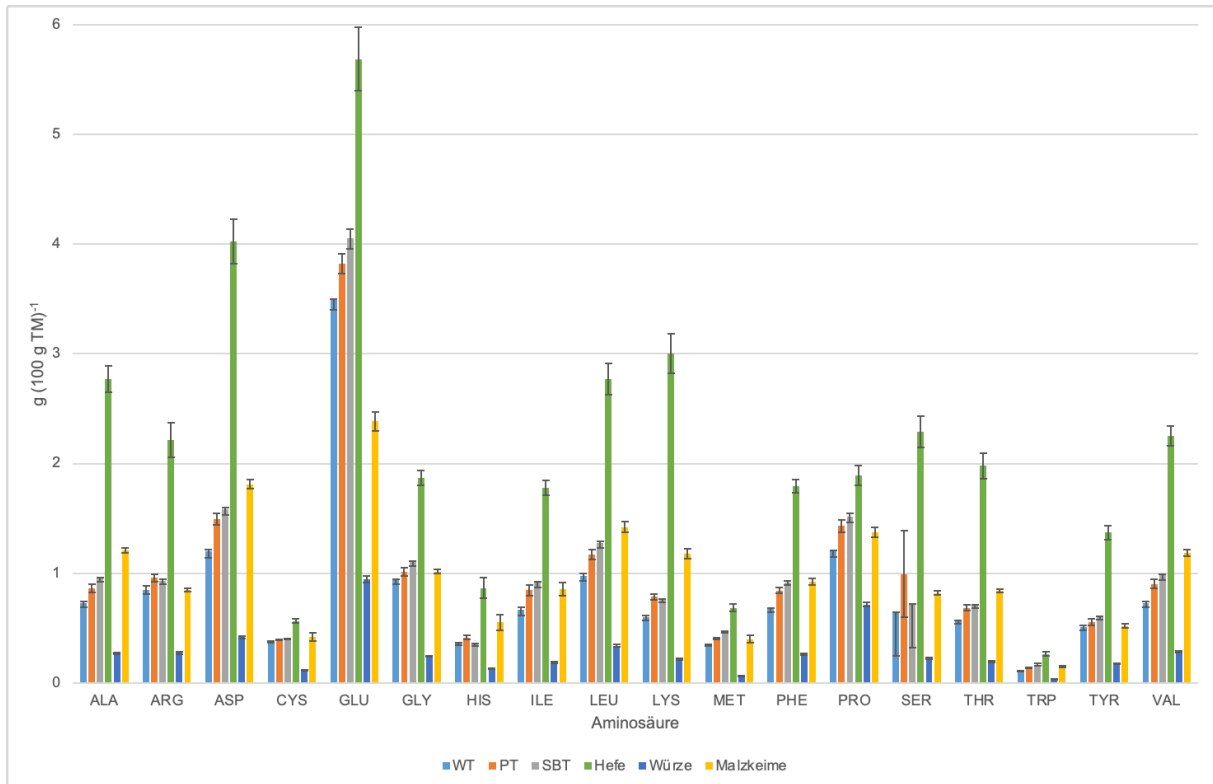


Abbildung 3-2: Aminosäureverteilung der Substrate Weizenbiertréber (WT), Pilsenertréber (PT), Schwarzbiertréber (SBT), Hefe, Würze und Malzkeime. Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

Tabelle 3-1: *Essential amino acid indices* (EAAI), biologische Wertigkeiten (BW) sowie erste und zweite limitierende Aminosäuren (AA) mit zugehörigen *chemical scores* (CS) der Substrate Weizenbiertréber (WT), Pilsenertréber (PT), Schwarzbiertréber (SBT), Hefe, Würze und Malzkeime

Substrat	EAAI	BW	1. limitierende AA (CS)	2. limitierende AA (CS)
WT	90 ± 1	87 ± 1	Trp (69,4)	Lys (73,1)
PT	94 ± 1	90 ± 1	Trp (80,6)	Lys (80,6)
SBT	94 ± 1	91 ± 1	Lys (75,2)	Trp (87,0)
Hefe	95 ± 2	91 ± 2	Trp (69,1)	Met/Cys (93,7)
Würze	89 ± 1	86 ± 2	Trp (65,1)	Lys (77,3)
Malzkeime	98 ± 1	95 ± 1	Trp (84,7)	-

3.2 Screening in Emerskultur

Von den gemäß 2.2.1.2 auf Platten gescreenten Basidiomyceten wurden die in Abbildung 3-3 gezeigten Organismen als geeignet für die Submerskultur bewertet. Sie wiesen entweder einen Bewuchs der Agar-Platte von mindestens 70% an Tag 7 der Kultivierung oder einen insgesamt sehr dichten Myzelrasen auf. *Laetiporus sulphureus* und *Fomitopsis pinicola* wurden in der Sensorik als würzig beschrieben. Eine Übersicht des Wachstums aller Pilze aus dem Emersscreening ist in Tabelle 6-2 im Anhang dargestellt.

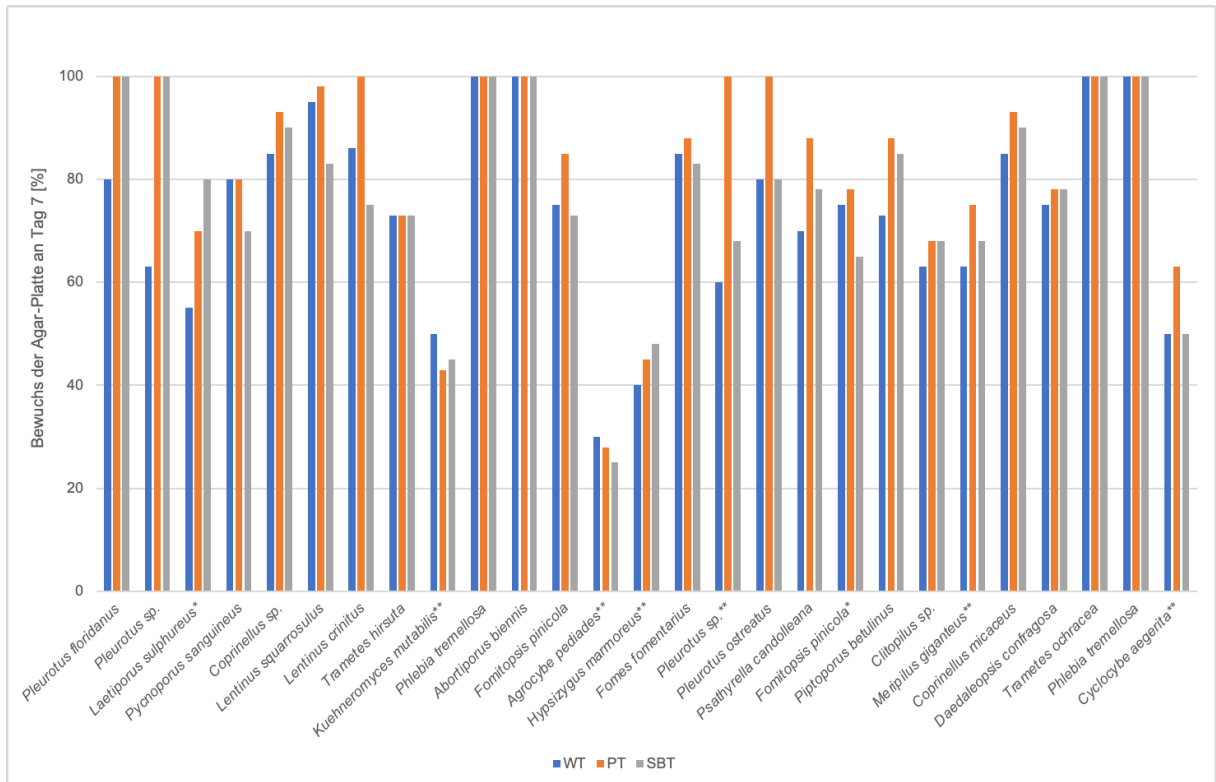


Abbildung 3-3: Bewuchs der Treber-Agar-Platten an Tag 7 der Kultivierung. WT: Weizenbieretreber, PT: Pilsenertreber, SBT: Schwarzbieretreber. * würziger Geruch, ** dichter Myzelrasen¹

Der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *Pleurotus ostreatus* wurde gemäß 2.2.1.2 getestet. Je höher der pH-Wert des Mediums war, desto stärker waren die Platten bewachsen (Abbildung 3-4).

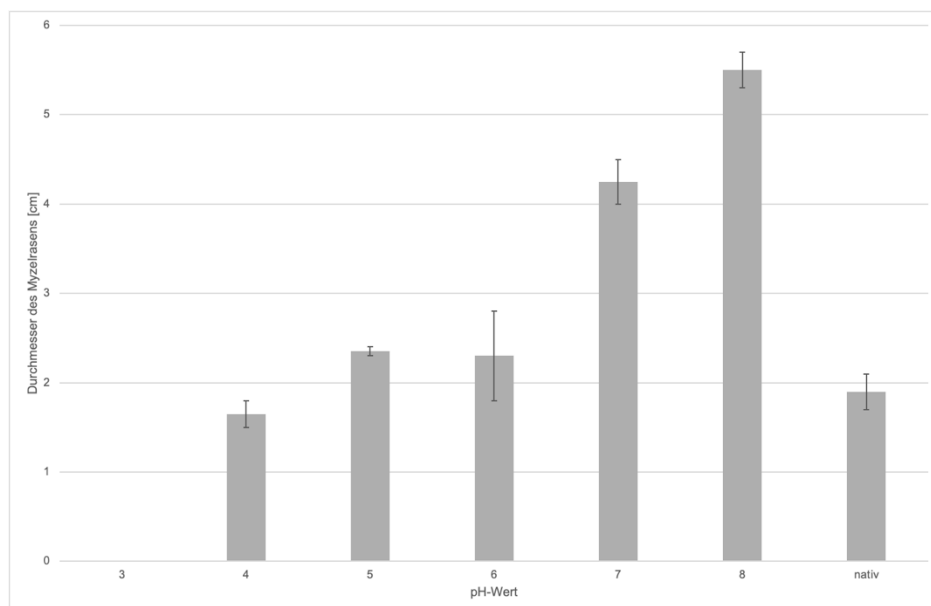


Abbildung 3-4: Durchmesser des Myzelrasens von *P. ostreatus* in Abhängigkeit des pH-Wertes auf MEA

¹ Die Daten sind in Zusammenarbeit mit Feipeng Zhang entstanden

3.3 Screening in Submerskultur

Anhand der Trockenmassen der Hauptkulturen, die nach 2.2.1.4 aus Medien unterschiedlicher Konzentrationen kultiviert wurden, zeigte sich, dass die Trockenmassen mit zunehmender Medienkonzentration anstiegen (Abbildung 3-5).

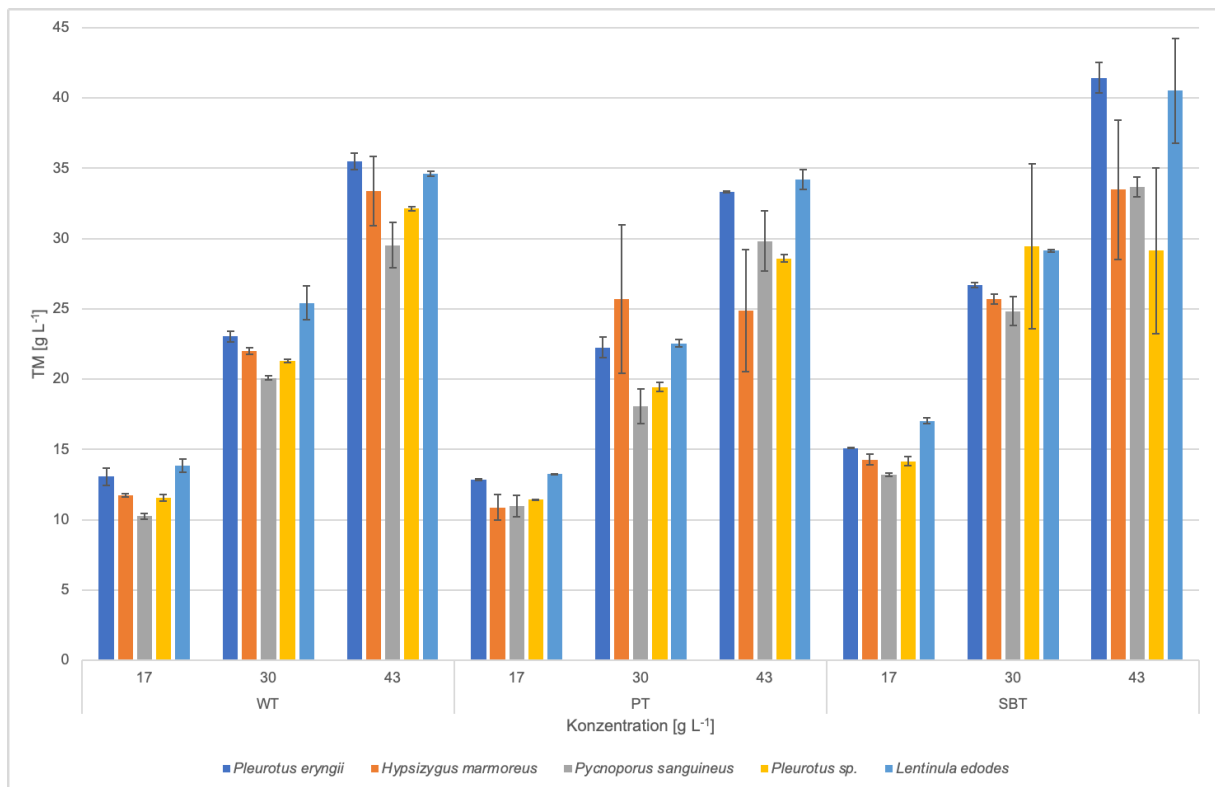


Abbildung 3-5: Trockenmassen (TM) der Hauptkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Weizenbiertreber- (WT), Pilsenerbier- (PT) und Schwarzbierbier- (SBT) Medium. Die Konzentration der Medien bezieht sich auf die Trockenmasse.

Bei Betrachtung der Rohproteingehalte dieser Kulturen zeigte sich kein allgemeiner Trend für eine bestimmte Konzentration (Abbildung 3-6). Für *Pycnoporus sanguineus* stieg der Rohproteingehalt mit zunehmender Konzentration bei WT und SBT an. Im PT-Medium hingegen sank der Rohproteingehalt mit zunehmender Konzentration. Für *Pleurotus eryngii* wurde für alle Treber-Medien ebenfalls ein leichter Anstieg des Rohproteingehaltes mit zunehmender Konzentration beobachtet. Bei den Kulturen von *Hypsizygos marmoreus*, *Pleurotus sp.* und *Lentinula edodes* konnten keine Zusammenhänge zwischen Medienkonzentration und Rohproteingehalt beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass die ideale Konzentration abhängig von den verwendeten Trebern und dem Organismus war und eine genauere Betrachtung der Medienkonzentration nach dem Screening erfolgen sollte.

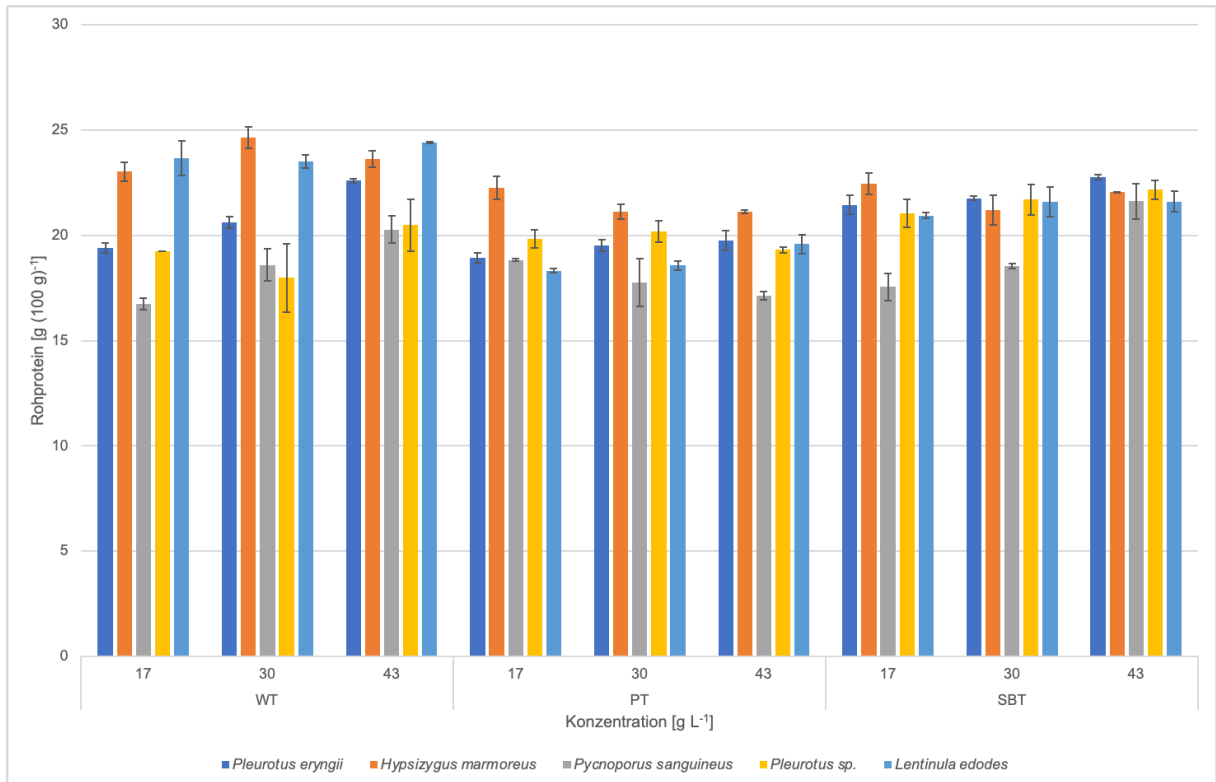


Abbildung 3-6: Rohproteingehalte der Hauptkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Weizenbiertreber- (WT), Pilsenertreber - (PT) und Schwarzbiertreber- (SBT) Medium. Die Konzentration der Medien bezieht sich auf die Trockenmasse. Zur Berechnung der Rohproteingehalte wurde der Faktor 6,25 für allgemeine Lebensmittel verwendet.

Bei den Trockenmassen der Kulturen, die auf zerkleinertem (z) und nicht zerkleinertem (nz) Treber kultiviert wurden, zeigte sich keine starke Bevorzugung des zerkleinerten Trebers (Abbildung 3-7). Für *Pycnoporus sanguineus* auf WT, sowie *Pleurotus eryngii* und *Lentinula edodes* auf SBT wurden höhere Trockenmassen auf dem nicht zerkleinerten Treber erzielt. Auch die Ergosterolgehalte dieser Kulturen zeigten nicht ausschließlich höhere Werte für die zerkleinerten Medien (Abbildung 3-8). Für *Pleurotus sp.* auf WT und PT und *Lentinula edodes* auf SBT wurden hier höhere Ergosterolgehalte für die nicht zerkleinerten Medien festgestellt. Insgesamt war eine Zerkleinerung des Trebers auch im Hinblick auf die Sensorik zu bevorzugen. Rein optisch fielen bei dem nicht zerkleinerten Treber die großen Getreidespelzen auf, die auch während der Fermentationsdauer von einer Woche nicht abgebaut werden konnten (siehe Abbildung 2-1).

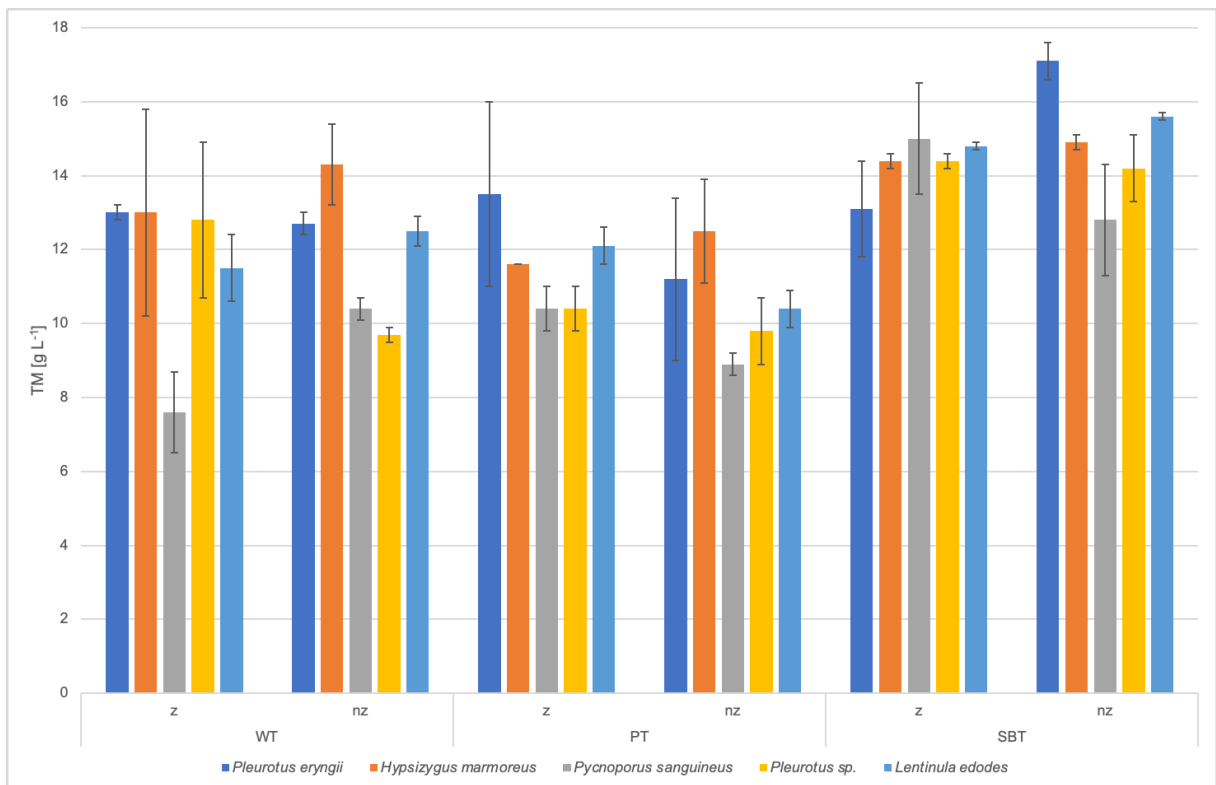


Abbildung 3-7: Trockenmassen (TM) der Hauptkulturen, die aus Medien mit zerkleinertem (z) und nicht zerkleinertem (nz) Weizenbiertréber (WT), Pilsenertréber (PT) und Schwarzbiertréber (SBT) angesetzt wurden

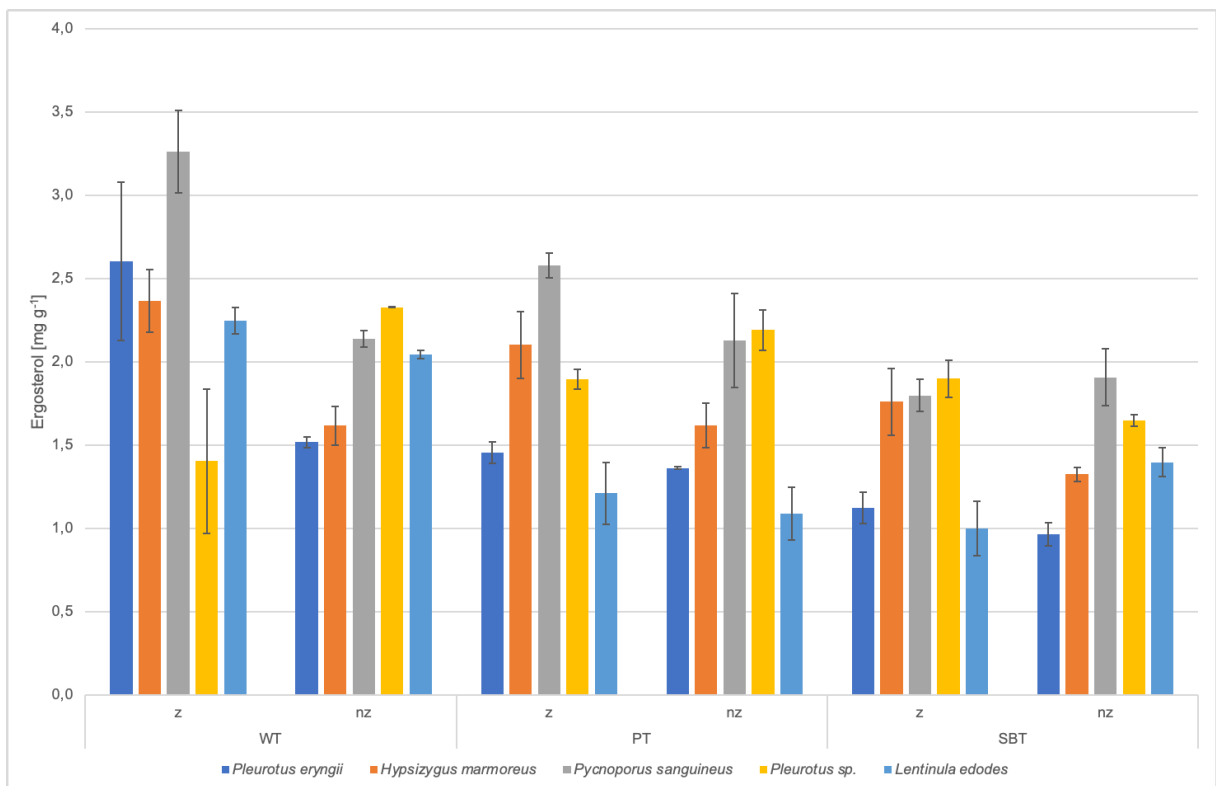


Abbildung 3-8: Ergosterolgehalte der Biomassen der Hauptkulturen, die aus Medien mit zerkleinertem (z) und unzerkleinertem (nz) Weizenbiertréber (WT), Pilsenertréber (PT) und Schwarzbiertréber (SBT) angesetzt wurden

Bei den Trockenmassen der Hauptkulturen aus dem Submersscreening, die nach 2.2.1.4 angesetzt wurden, wiesen die Kulturen mit SBT überwiegend die höchsten Trockenmassen auf (Abbildung 3-9).

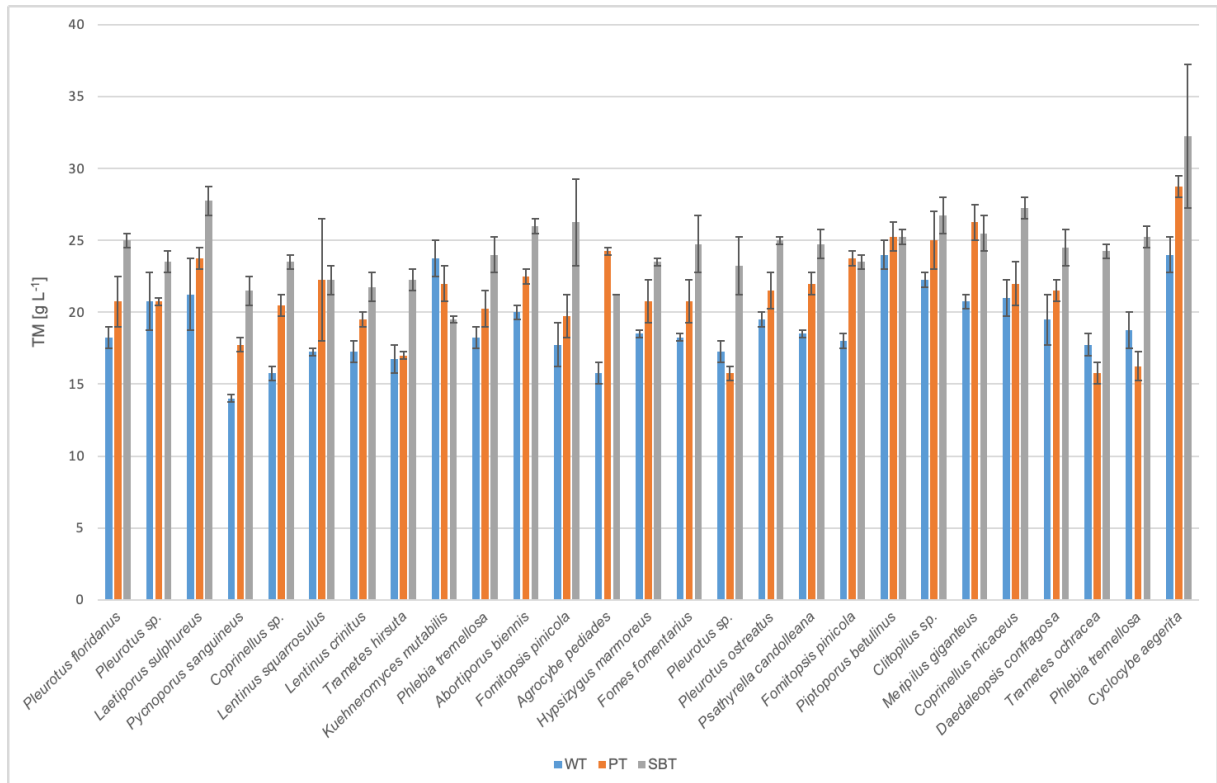


Abbildung 3-9: Trockenmassen (TM) der Hauptkulturen aus dem Submersscreening auf Weizenbiertréber (WT), Pilsenertréber (PT) und Schwarzbiertréber (SBT)²

Bei den Rohproteingehalten in Bezug auf das Kulturvolumen fielen besonders *Pleurotus ostreatus*, *Clitopilus* sp. und *Cyclocybe aegerita* auf SBT mit hohen Werten auf (Abbildung 3-10). Da es sich bei *P. ostreatus* um einen bekannten Speisepilz handelt, wurde der Fokus im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Kombination aus *P. ostreatus* und SBT gelegt. Der Schwarzbiertréber wurde bevorzugt, da die Kombination die höchsten Rohproteingehalte für *P. ostreatus* zeigte und die Fermentate einen würzigen Geruch aufwiesen. Dies wurde bei den Kulturen mit Weizenbiertréber und Pilsenertréber nicht wahrgenommen.

² Die Daten sind in Zusammenarbeit mit Feipeng Zhang entstanden

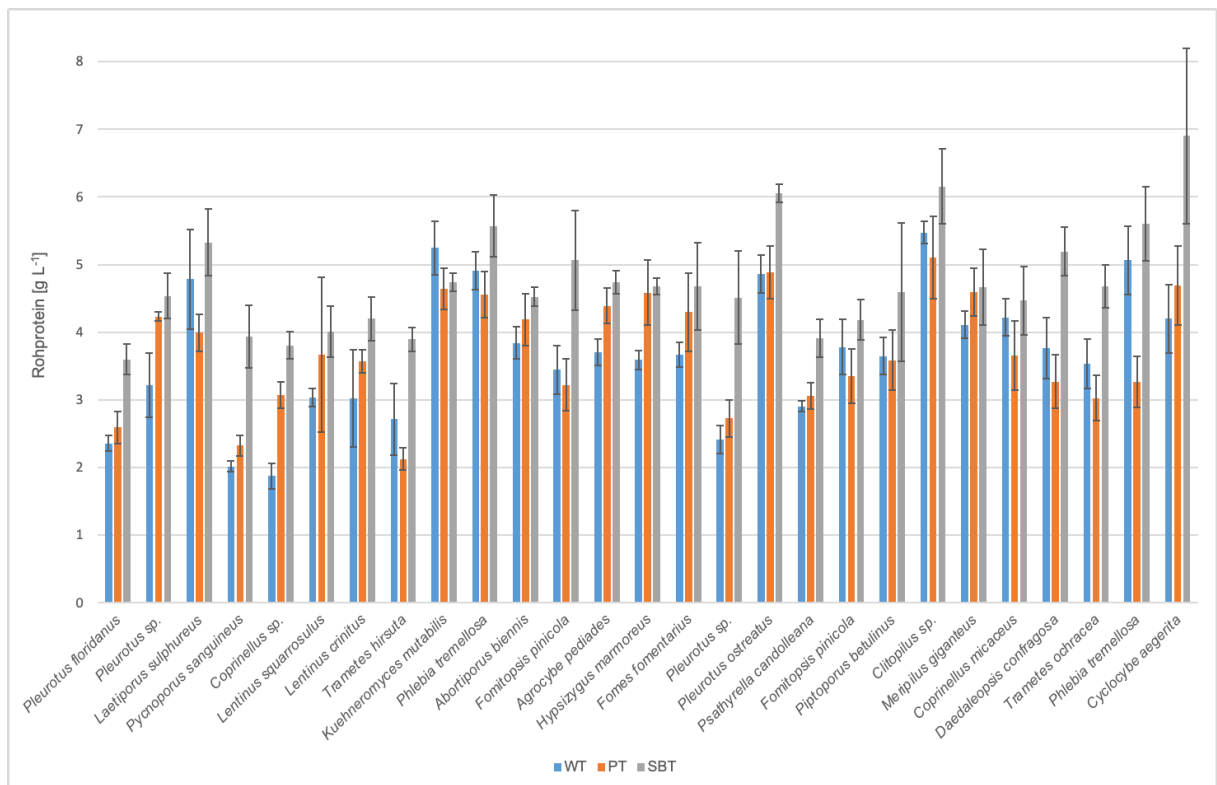


Abbildung 3-10: Rohproteingehalte der Hauptkulturen aus dem Submersscreening auf Weizenbier (WT), Pilsenerbier (PT) und Schwarzbier (SBT). Zur Berechnung wurde der Faktor 6,25 für Lebensmittel allgemein verwendet.³

3.4 Optimierung der Vorkultur

Gemäß 2.2.1.5 wurde der geeignete Zeitpunkt für die Verwendung der Vorkultur als Inokulum bestimmt. Anhand des starken Anstiegs der Trockenmasse und des pH-Wertes zwischen Kulturtag sieben und acht (Abbildung 3-11) wurde die Vorkultur im Folgenden an Tag sieben als Inokulum verwendet.

³ Die Daten sind in Zusammenarbeit mit Feipeng Zhang entstanden

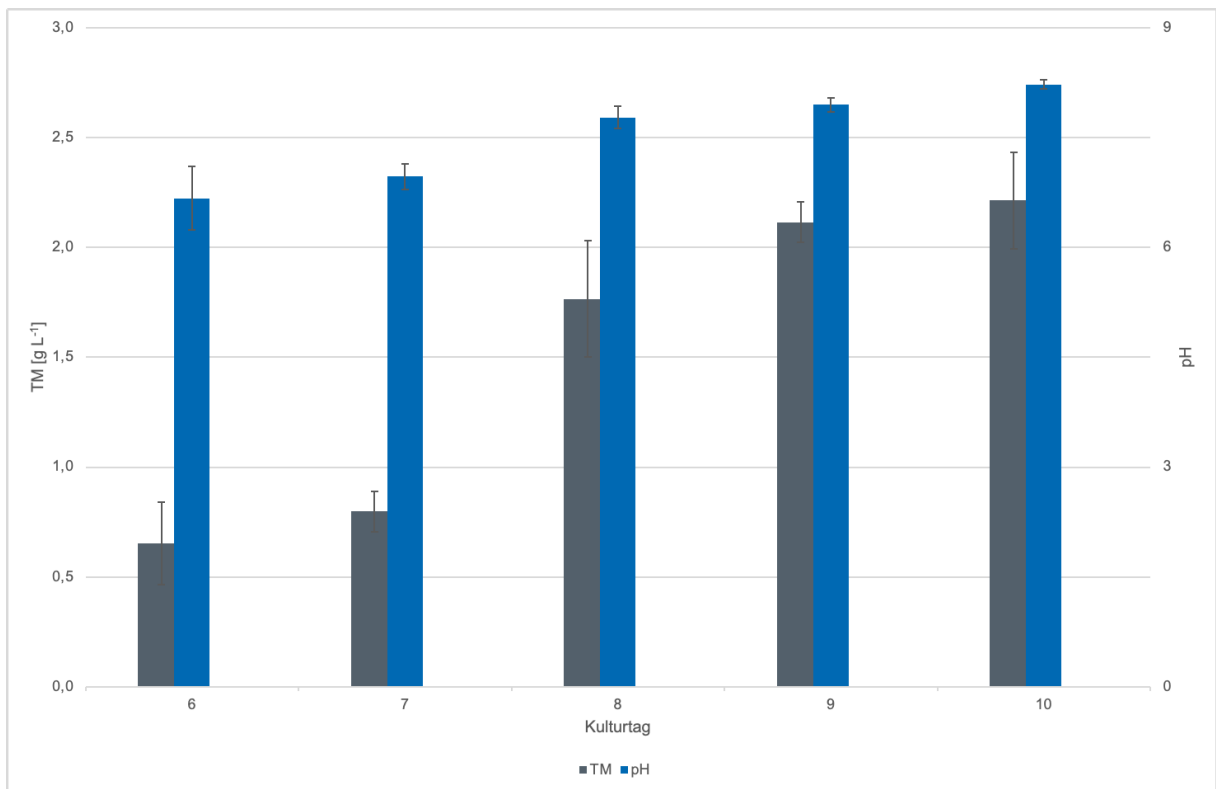


Abbildung 3-11: Trockenmassen (TM) und finale pH-Werte von Vorkulturen von *P. ostreatus* auf Malzextrakt an verschiedenen Kulturtagen

Bei den gemäß 2.2.1.5 mit Würze, Hefe und Malzkeimen supplementierten Vorkulturen mit initial nativem pH-Wert zeigten sich keine Unterschiede in den finalen pH-Werten der Überstände (Abbildung 3-12 bis Abbildung 3-14). Bei den Würze- und Hefemedien waren außerdem keine Unterschiede hinsichtlich der Trockenmassen zu erkennen, während die Trockenmassen bei der Supplementierung mit Malzkeimen mit zunehmender Konzentration anstiegen. Da es sich bei den Malzkeimen im Vergleich zur Würze und Hefe um ein nicht-lösliches Substrat handelte, war dies zu erwarten. Außerdem waren die Medien mit Malzkeimen viskoser als die Medien, die mit Würze und Hefe supplementiert wurden. Die Ergosterolgehalte in den Vorkulturen mit Würze zeigten keine Unterschiede. In den Vorkulturen mit Hefe stiegen die Ergosterolgehalte bei den höheren Konzentrationen an. Mit zunehmender Konzentration von Malzkeimen sanken die Ergosterolgehalte. Die steigenden Ergosterolgehalte bei hohen Hefekonzentrationen ließen sich darauf zurückführen, dass die Hefe selbst einen Ergosterolgehalt von $(0,86 \pm 0,01) \text{ mg g}^{-1}$ aufwies. Insgesamt lagen die Gehalte der Vorkulturen im Bereich des Schwarzbiertrebers, der einen Ergosterolgehalt von $(0,04 \pm 0,00) \text{ mg g}^{-1}$ aufwies. Die pH-Werte, Trockenmassen und Ergosterolgehalte unterstützten den optischen Eindruck, dass in diesen Kulturen kein Wachstum stattfand.

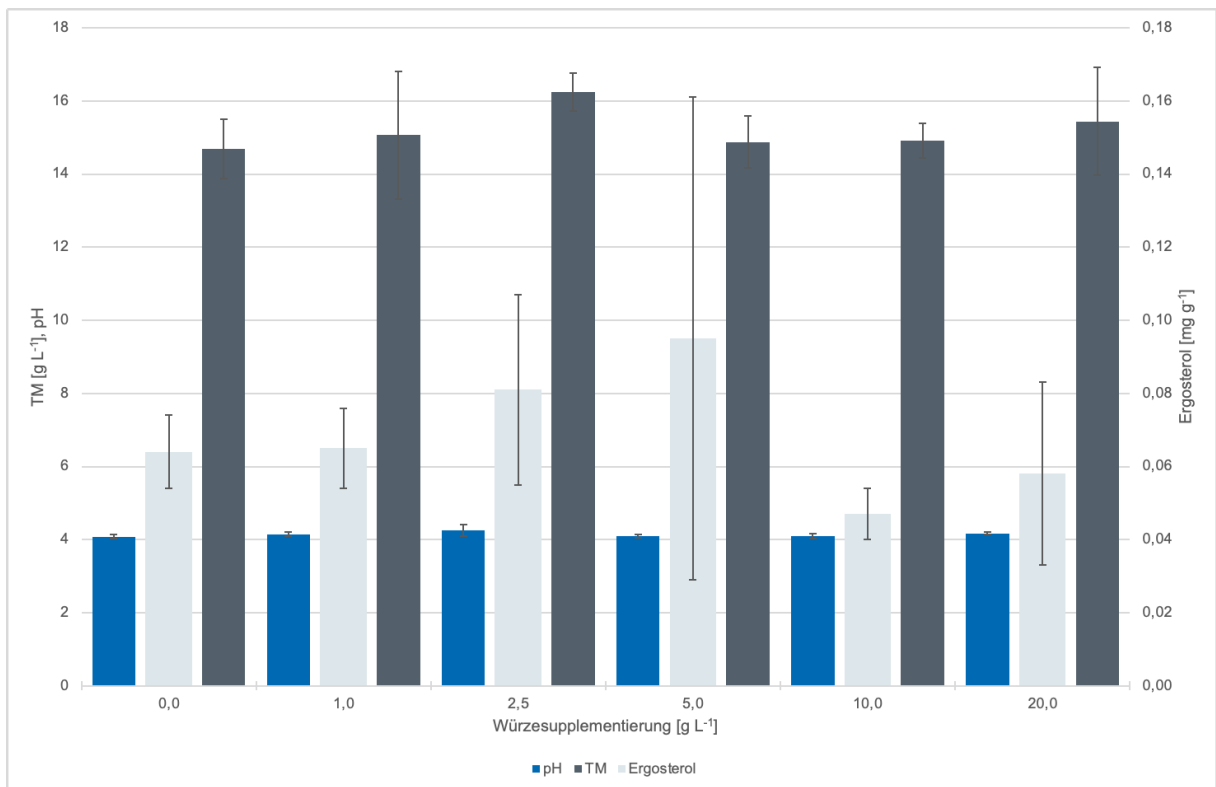


Abbildung 3-12: Einfluss der Supplementierung von Würze in verschiedenen Konzentrationen zum Schwarzbierrebermedium auf den pH-Wert, die Trockenmasse (TM) und den Ergosterolgehalt der Vorkultur

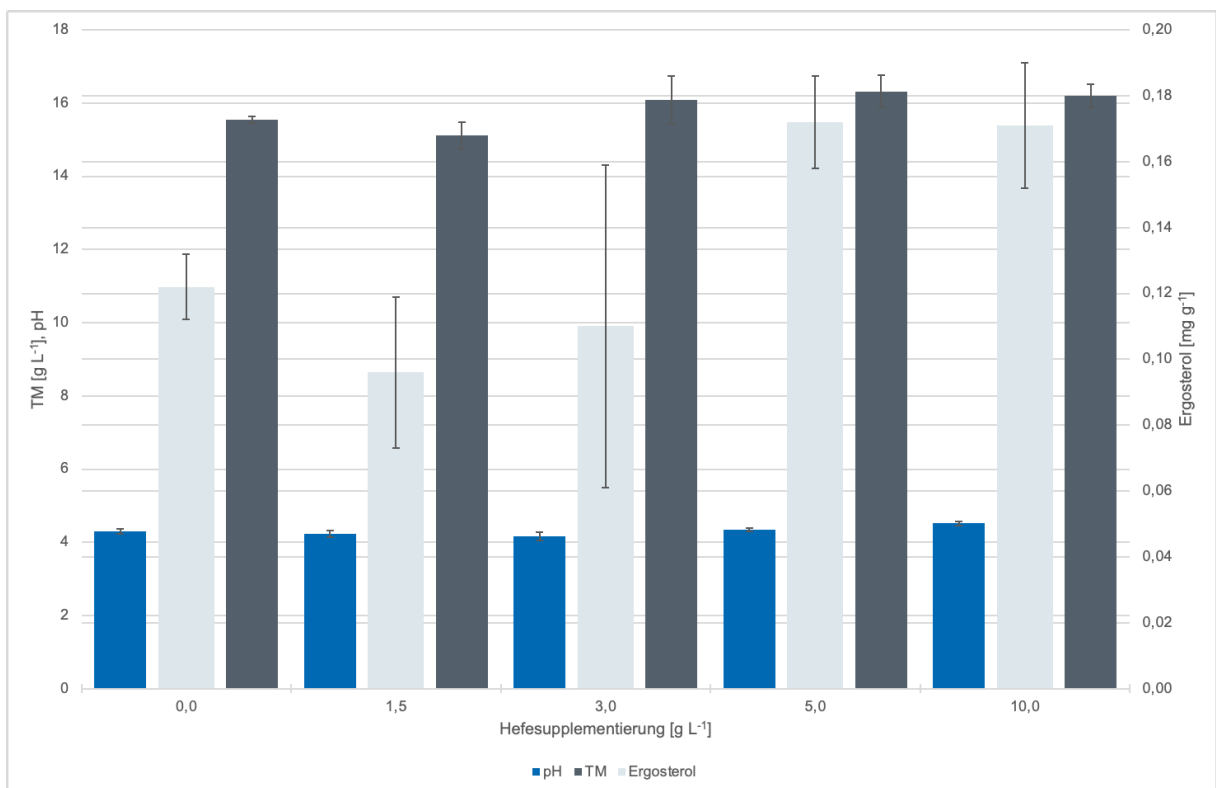


Abbildung 3-13: Einfluss der Supplementierung von Hefe in verschiedenen Konzentrationen zum Schwarzbierrebermedium auf den pH-Wert, die Trockenmasse (TM) und den Ergosterolgehalt der Vorkultur

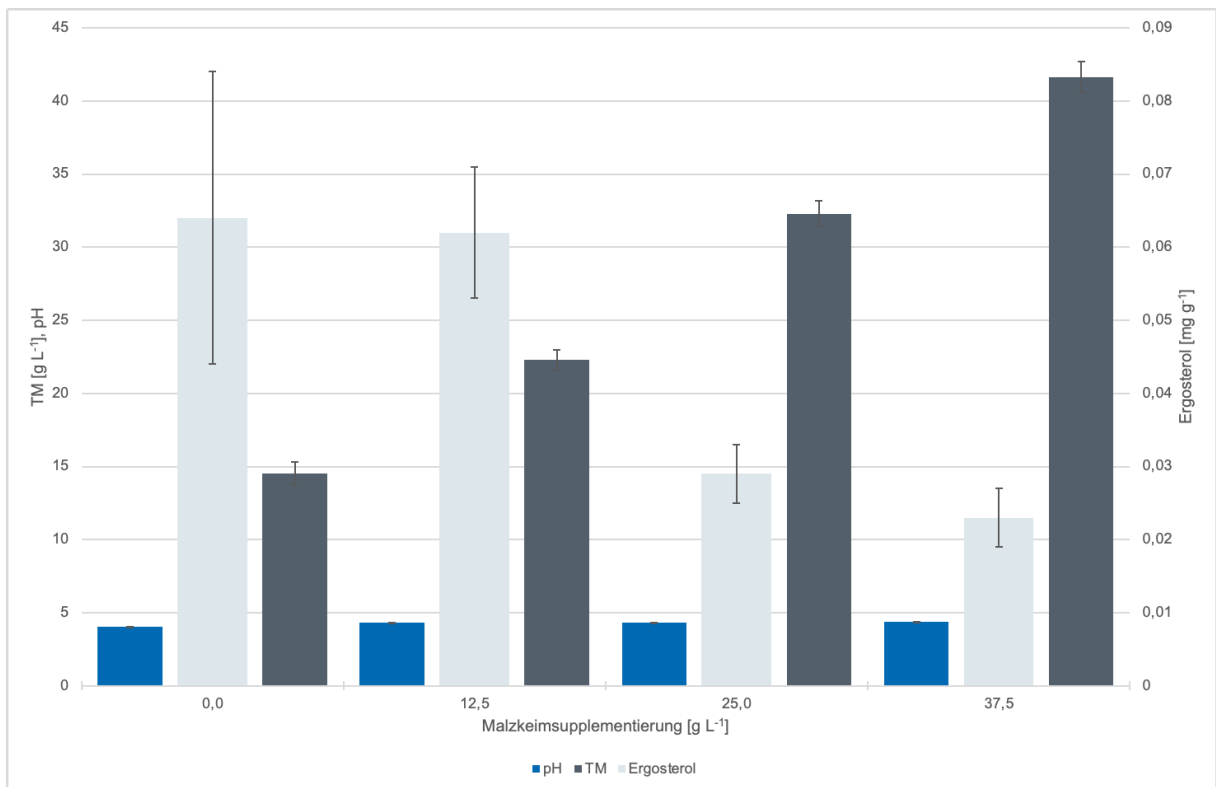


Abbildung 3-14: Einfluss der Supplementierung von Malzkeimen in verschiedenen Konzentrationen zum Schwarzbiermedium auf den pH-Wert, die Trockenmasse (TM) und den Ergosterolgehalt der Vorkultur

Eine Erhöhung des pH-Wertes vor dem Autoklavieren zeigte für SBT- und ME-Vorkulturen ein deutlich besseres Wachstum. Der optische Eindruck (Abbildung 3-15) wurde hierbei von den Trockenmassen, pH-Werten und Ergosterolgehalten unterstützt (Abbildung 3-16).

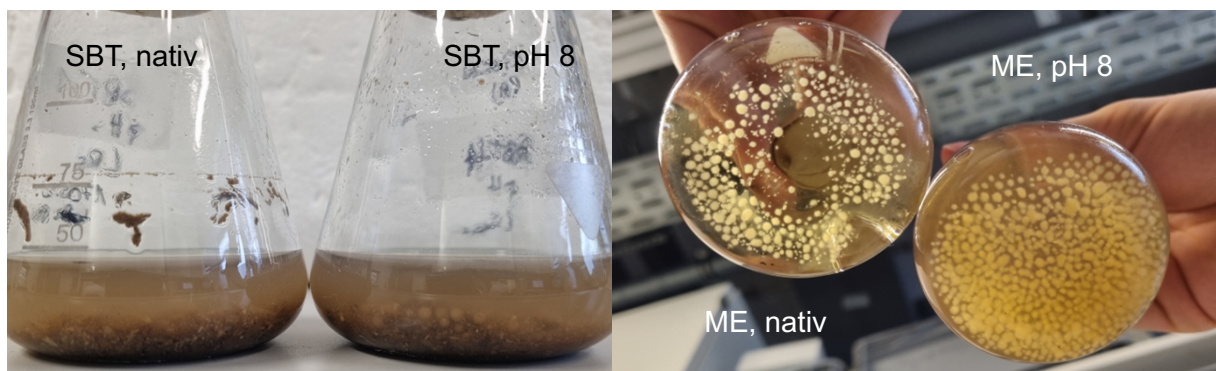


Abbildung 3-15: Vorkulturen von *P. ostreatus* in Schwarzbiermedium (SBT, links) und Malzextraktmedium (ME, rechts) mit initial nativen pH-Werten (jeweils linker Kolben) und vor dem Autoklavieren auf 8 eingestellten pH-Werten (jeweils rechter Kolben)

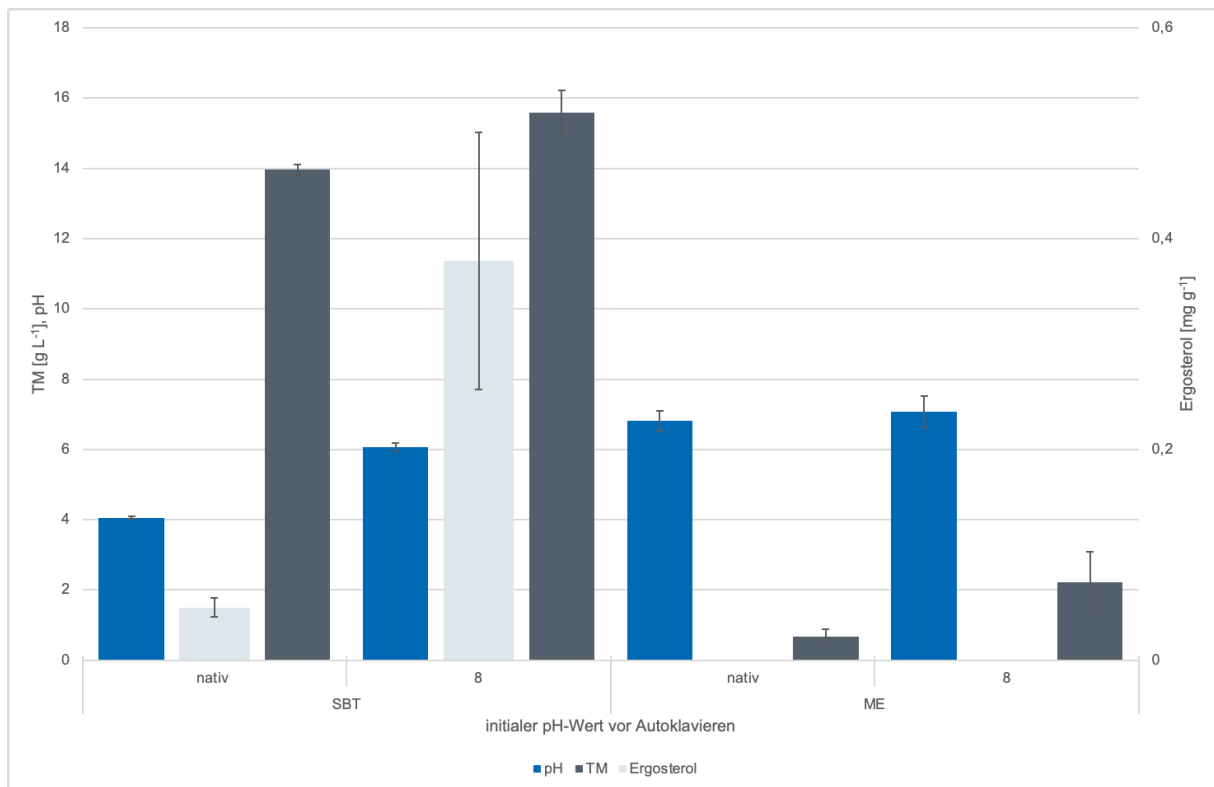


Abbildung 3-16: pH-Werte, Trockenmassen (TM) und Ergosterolgehalte von Vorkulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertreber (SBT) und Malzextrakt (ME) mit vor dem Autoklavieren auf 8 eingestellten und nativen pH-Werten.⁴

Eine erneute Supplementierung mit 10 g L⁻¹ und 20 g L⁻¹ Würze bei eingestellten pH-Werten zeigte im Vergleich zur Referenz ohne Supplementierung ein deutlich verbessertes Wachstum in Bezug auf Trockenmasse und Ergosterolgehalt (Abbildung 3-17).

Die nach 2.2.1.5 angesetzten Hauptkulturmedien wurden mit einer Vorkultur von *P. ostreatus* in SBT- und 20 g L⁻¹ Würze-Medium inokuliert. Anhand des pH-Wertes und Ergosterolgehaltes in Tabelle 3-2 war ein Wachstum des Pilzes zu verzeichnen.

Tabelle 3-2: Trockenmasse (TM), pH-Wert und Ergosterolgehalt der Hauptkulturen, die aus einer Vorkultur von *P. ostreatus* in Schwarzbiertreber- (17 g L⁻¹) und Würze- (20 g L⁻¹) Medium inokuliert wurde

TM [g L ⁻¹]	pH-Wert	Ergosterolgehalt [mg g ⁻¹]
13,42 ± 0,02	5,0 ± 0,5	1,90 ± 0,32

⁴ Da das Myzel ohne Treber sehr wenig Gewicht im Verhältnis zum Volumen aufwies, reichte die Menge an Myzel aus ME-Medium nicht für die Ergosterol-Bestimmung aus.

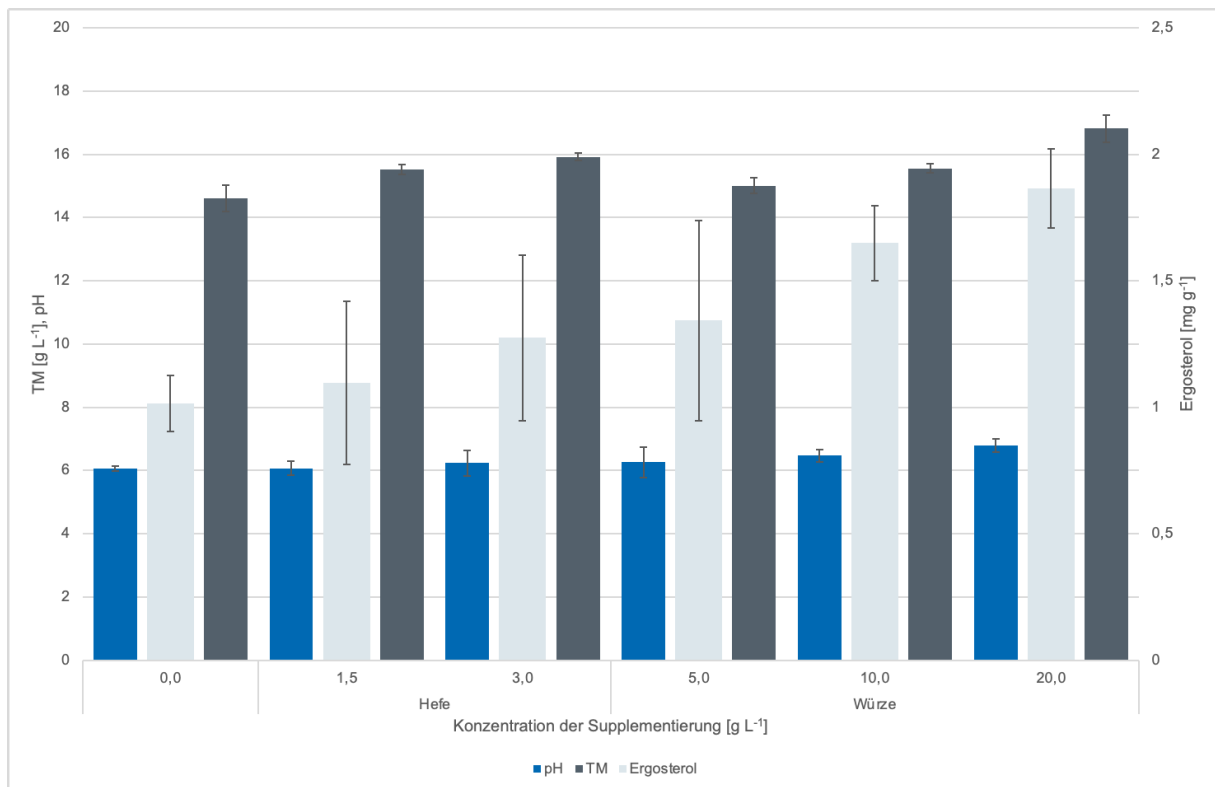


Abbildung 3-17: pH-Werte, Trockenmassen (TM) und Ergosterolgehalte von Vorkulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertreber mit Supplementierung von Hefe und Würze und vor dem Autoklavieren eingestellten pH-Werten

3.5 Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren und Optimierung der Batch-Fermentation

3.5.1 Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren

Die Fermentation von Schwarzbiertreber mit *Pleurotus ostreatus* wurde gemäß 2.2.1.6 in den Bioreaktor mit 1 L Medium übertragen. Während der Fermentation stieg der pH-Wert von 4,4 auf 8,0 an (Abbildung 3-18). Im Verlauf setzte sich Myzel mit Treber im oberen Bereich der Flüssigkeit und darüber fest (Abbildung 3-19). Deswegen wurde die Rührgeschwindigkeit von initial 150 rpm auf 200 rpm erhöht. In dieser Fermentation führte die Anpassung der Rührgeschwindigkeit zu keiner Veränderung. Um das Festsetzen von Biomasse zu verhindern, wurde die initiale Rührgeschwindigkeit für alle weiteren Fermentationen auf 200 rpm festgelegt.

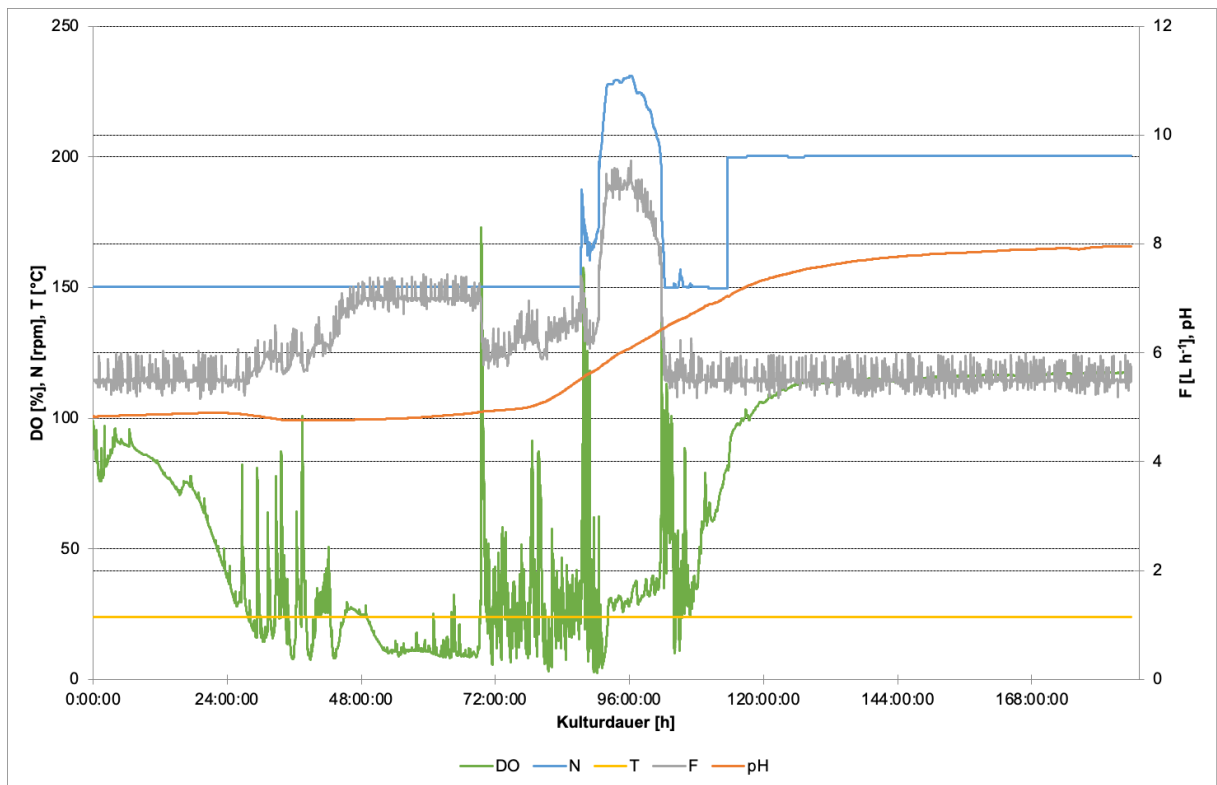


Abbildung 3-18: Fermentation von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus* im Bioreaktor mit 1 L SBT-Medium (17 g L^{-1}) und 5% Inokulum. DO: gelöster Sauerstoff, N: Rührgeschwindigkeit, T: Temperatur, F: Begasungsrate



Abbildung 3-19: Bioreaktor während der Fermentation aus Abbildung 3-18 (links) und nach der Fermentation (rechts).

Im Maßstab mit 5 L Medium war die Fermentation ebenfalls erfolgreich. Auch hier wurde während der Fermentation ein Anstieg des pH-Wertes beobachtet (Abbildung 3-20). Mit einer initialen Rührgeschwindigkeit von 200 rpm setzte sich kaum Biomasse an den Reaktoreinbauten fest (Abbildung 3-21).

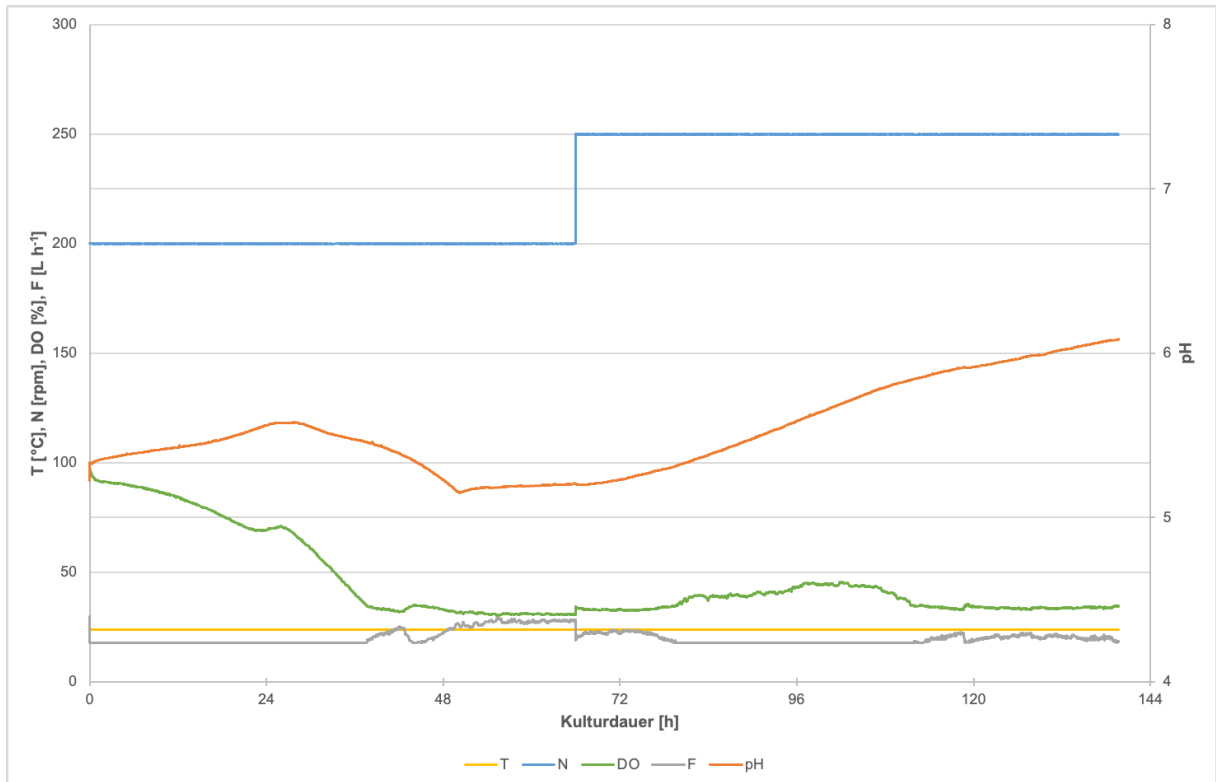


Abbildung 3-20: Fermentation von Schwarzbierdreber mit *P. ostreatus* im Bioreaktor mit 5 L SBT-Medium (17 g L^{-1}) und 5% Inokulum. DO: gelöster Sauerstoff, N: Rührgeschwindigkeit, T: Temperatur, F: Begasungsrate



Abbildung 3-21: Bioreaktor mit 5 L SBT-Medium nach der Fermentation mit *P. ostreatus*

3.5.2 Vorarbeiten für die Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor

Ein Vergleich der DO-Verläufe von Fermentationen mit unterschiedlichen SBT-Konzentrationen zeigte, dass das Wachstum des Pilzes bei höheren Konzentrationen langsamer erfolgte. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs fiel mit steigender SBT-

Konzentration weniger stark ab (Abbildung 3-22). Die Rührgeschwindigkeit für 51 g L⁻¹ und 68 g L⁻¹ wurde initial auf 250 rpm angepasst, um ein Absinken des Trebers zu verhindern. Aufgrund des sehr langsamen Wachstums und der Schwierigkeit eine stetige Durchmischung bei 68 g TM L⁻¹ zu gewährleisten, wurde für die Optimierung mittels DOE (siehe 2.2.1.8 und 3.5.3) der Bereich zwischen 17 g TM L⁻¹ und 51 g TM L⁻¹ betrachtet.

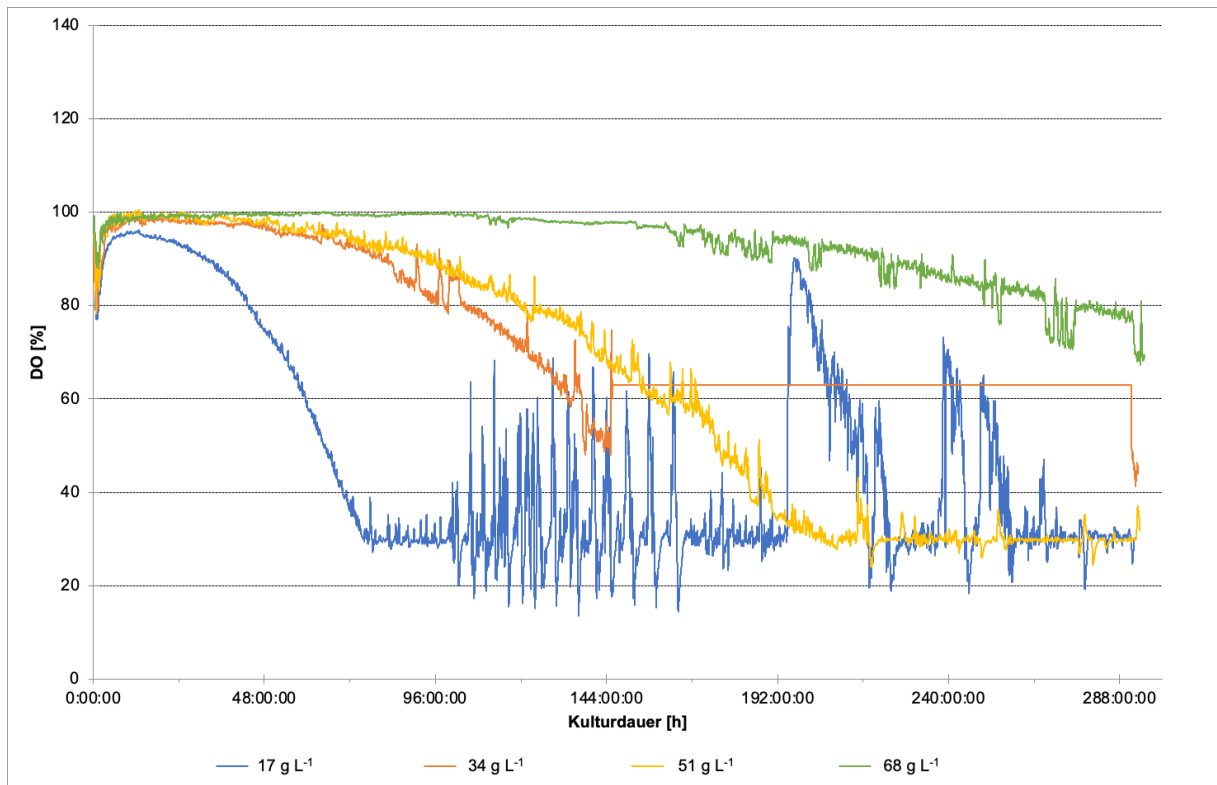


Abbildung 3-22: Vergleich der gelösten Sauerstoffkonzentrationen (DO) im Verlauf der Kultivierung von verschiedenen Konzentrationen des SBT-Mediums mit *P. ostreatus*. Die Konzentrationen beziehen sich auf die Trockenmasse.

Ein Vergleich von Kulturen, die bei 24 °C und 30 °C sowie nativen und auf 7 eingestellten initialen pH-Werten kultiviert wurden, zeigte, dass beide Parameter in Kombination einen unterschiedlich schnellen Abfall des DOs bewirkten (Abbildung 3-23). So fiel die Sauerstoffkonzentration bei pH 7 und 30 °C am stärksten und schnellsten ab, während sie bei 30 °C und nativem pH-Wert kaum sank.

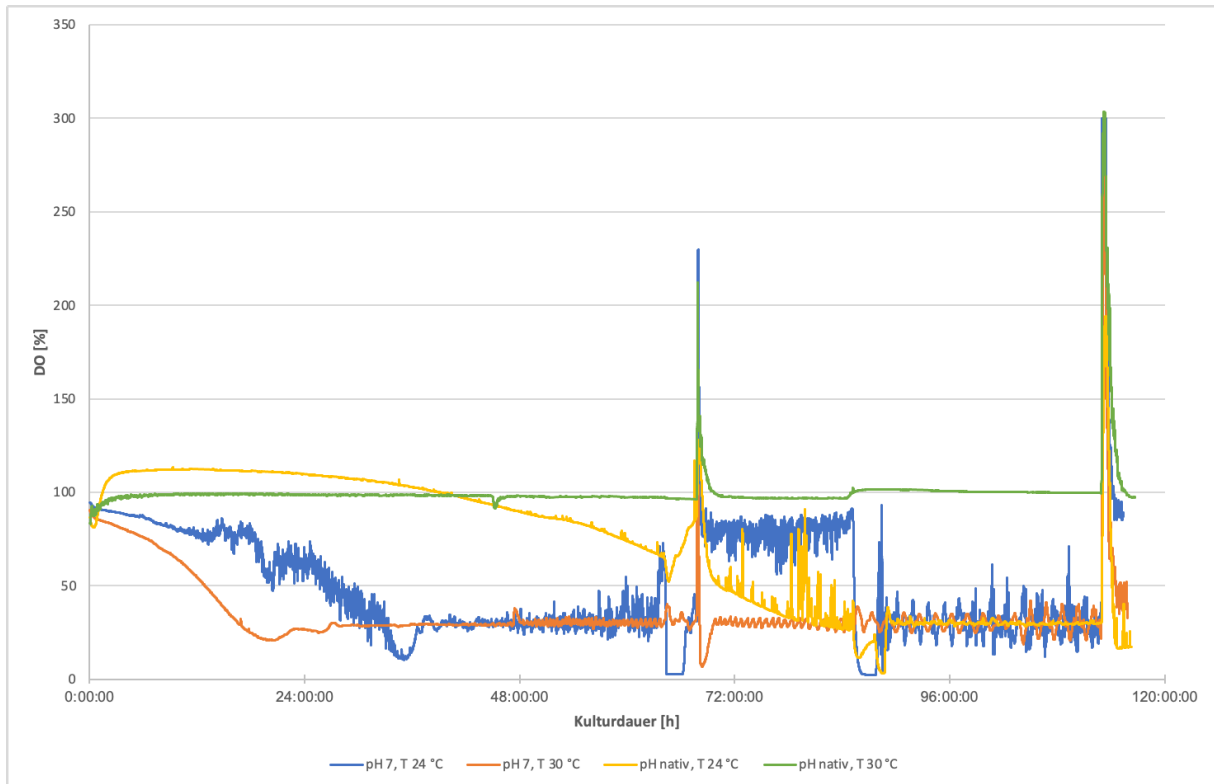


Abbildung 3-23: Vergleich der gelösten Sauerstoffkonzentrationen (DO) im Verlauf der Kultivierung von SBT-Medium mit *P. ostreatus* bei verschiedenen Temperaturen und initialen pH-Werten

3.5.3 Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor mittels DOE

Nach Durchführung der Fermentationen gemäß 2.2.1.8 und Analyse des Ergosterolgehaltes nach 2.2.2.8 wurden für beide Antwortgrößen Ergosterolgehalt [mg g^{-1}] und [mg L^{-1}] geeignete Modelle erstellt. Ergosterol [mg g^{-1}] spiegelte den Pilzanteil in der geernteten und getrockneten Biomasse wider, während Ergosterol [mg L^{-1}] den absoluten Pilzanteil je Kulturansatz wiedergab. Bei den Berechnungen wurde das Ergebnis von Run 21 nicht berücksichtigt, da der Fluss während der Kultivierung nicht reguliert werden konnte und eine ausreichende Belüftung nicht gewährleistet wurde. Für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}] stellte sich ein quadratisches Modell als am besten geeignet heraus. Unter Verwendung des Programms „Design Expert 13“ wurden die Faktoren, die nicht signifikant waren und einen p-Wert $> 0,05$ aufwiesen, eliminiert und somit aus der Berechnung ausgeschlossen. Die Eliminierung erfolgte dabei rückwärts, also beginnend bei den Termen, die die Wechselwirkungen der höchsten Stufe darstellen. Nach der Berechnung empfahl der Box-Cox-Plot eine Transformation durch die Quadratwurzel. Die Gleichung des Modells ist in Gleichung (3-1) dargestellt.

$$\sqrt{\text{Ergosterol} [\text{mg g}^{-1}]} = + 0,8951 - 0,3264 A + 0,2520 B - 0,0687 C - 0,5086 D \quad (3-1)$$

$$- 0,1695 AD + 0,1790 BD + 0,2542 CD - 0,5189 C^2 - 0,5261 D^2$$

Die Fit-Statistik für das Modell des Ergosterolgehalts [mg g^{-1}] ist in Tabelle 3-3 dargestellt. In der *analysis of variance* (ANOVA) in Tabelle 3-4 sind die Terme aufgeführt, die für die Berechnung des Modells verwendet wurden. Die nicht signifikanten Terme wurden aus hierarchischen Gründen verwendet. Das Modell war signifikant und wies einen nicht signifikanten *lack of fit* auf.

Tabelle 3-3: Fit-Statistik des Modells für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}], transformiert mit der Quadratwurzel

Bestimmtheitsmaß R^2	0,6302
Adjustiertes R_{adj}^2	0,5449
Vorhergesagtes R_{pred}^2	0,2458
Signal-Rausch-Verhältnis S/N	14,9810

Tabelle 3-4: ANOVA (*analysis of variance*) für das Modell für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}] (Quadratisches Modell mit Transformation durch die Quadratwurzel). Substratmenge: Treberkonzentration des Mediums [g L^{-1}], V Inokulum: Inokulumvolumen [%], pH initial: initialer pH-Wert, T: Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]

	F-Wert	p-Wert	
Modell	7,39	< 0,0001	signifikant
A-Substratmenge	14,62	0,0005	signifikant
B-V Inokulum	11,69	0,0015	signifikant
C-pH initial	0,3987	0,5315	nicht signifikant
D-T	21,55	< 0,0001	signifikant
AD	3,60	0,0651	nicht signifikant
BD	4,67	0,0369	signifikant
CD	5,54	0,0237	signifikant
C^2	27,09	< 0,0001	signifikant
D^2	26,56	< 0,0001	signifikant
Residual			
<i>lack of fit</i>	1,57	0,2303	nicht signifikant

Im DFFITS-Test lagen vier Datenpunkte außerhalb der Grenzen. Da diese Versuchsläufe jedoch nicht negativ in der Cook's Distanz auffielen, wurden sie zur Berechnung des Modells verwendet und nicht als Ausreißer betrachtet (Abbildung 3-24). Auch in der Auftragung der realen Messwerte gegen die vorhergesagten Werte zeigten sich keine Ausreißer (Abbildung 3-26 A).

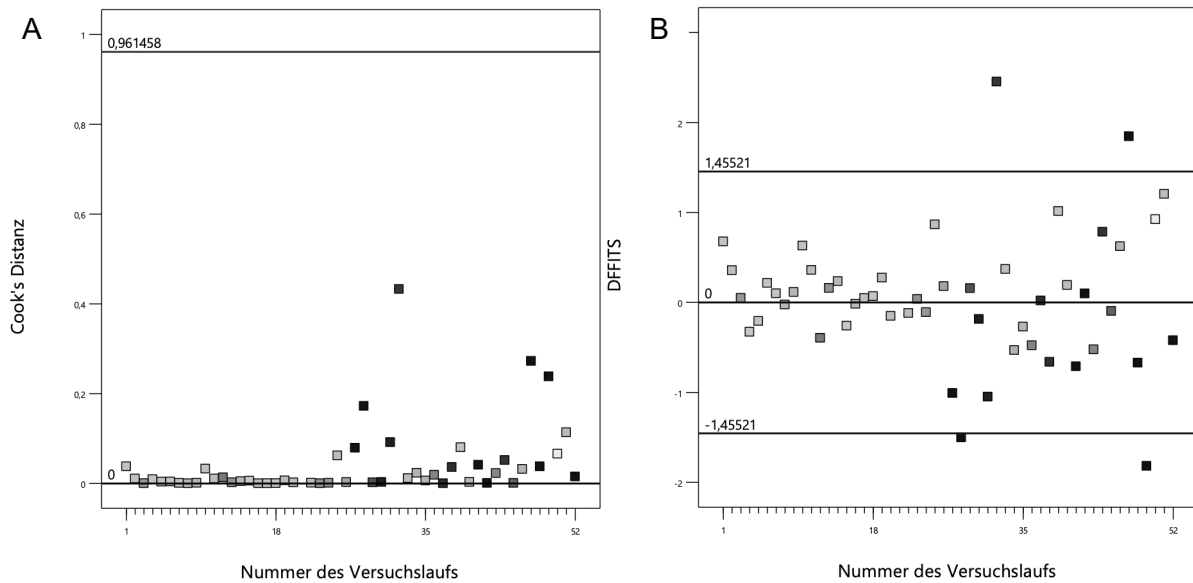


Abbildung 3-24: Cook's Distanz (A) und DFFITS (*difference of fits*, B) jeweils aufgetragen gegen die Nummer des Versuchslaufs für den Ergosterolgehalt [mg g⁻¹]

Für den Ergosterolgehalt [mg L⁻¹] wurde ein kubisches Modell verwendet. Dieses eignete sich laut „Design Expert 13“ am besten. Auch hier wurden die nicht signifikanten Terme mit einem p-Wert > 0,05 eliminiert, beginnend bei den Termen, die die Wechselwirkungen der höchsten Stufe beschreiben. Der Box-Cox-Plott empfahl hier eine Transformation durch die Quadratwurzel. Die Formel, die das Modell beschreibt, ist in Formel (3-2) gezeigt.

$$\begin{aligned}
 \sqrt{\text{Ergosterol [mg L}^{-1}\text{]}} = & + 4,48 + 0,8480 A + 0,5391 B - 0,0376 C - 4,19 D & (3-2) \\
 & + 0,5440 AB - 2,69 AC - 1,63 AD + 0,6718 BC + 0,0433 CD + 0,0511 A^2 - 0,6556 B^2 \\
 & - 0,7295 C^2 - 3,58 D^2 + 1,13 A^2B - 1,59 AB^2 - 2,35 AC^2 - 1,16 AD^2 + 2,85 C^2D \\
 & - 2,04 CD^2
 \end{aligned}$$

Die Fit-Statistik für das Modell des Ergosterolgehalts [mg L⁻¹] ist in Tabelle 3-5 dargestellt. In der *analysis of variance* (ANOVA) in Tabelle 3-6 sind die Terme aufgeführt, die für die Berechnung des Modells verwendet wurden. Die nicht signifikanten Terme wurden aus hierarchischen Gründen verwendet. Das Modell war signifikant und wies einen nicht signifikanten *lack of fit* auf.

Tabelle 3-5: Fit-Statistik des Modells für den Ergosterolgehalt [mg L⁻¹], transformiert mit der Quadratwurzel

Bestimmtheitsmaß R ²	0,8643
Adjustiertes R _{adj} ²	0,7754
Vorhergesagtes R _{pred} ²	0,4959
Signal-Rausch-Verhältnis S/N	14,5590

Tabelle 3-6: ANOVA (*analysis of variance*) für das Modell für den Ergosterolgehalt [mg L^{-1}] (Kubisches Modell, transformiert mit der Quadratwurzel). Substratmenge: Treberkonzentration des Mediums [g L^{-1}], V Inokulum: Inokulumvolumen [%], pH initial: initialer pH-Wert, T: Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]

	F-Wert	p-Wert	
Modell	9,72	< 0,0001	signifikant
A-Substratmenge	3,07	0,0905	nicht signifikant
B-V Inokulum	3,26	0,0815	nicht signifikant
C-pH initial	0,0021	0,9638	nicht signifikant
D-T	25,27	< 0,0001	signifikant
AB	4,62	0,0400	signifikant
AC	20,60	< 0,0001	signifikant
AD	5,00	0,0332	signifikant
BC	4,57	0,0411	signifikant
CD	0,0078	0,9300	nicht signifikant
A ²	0,0278	0,8688	nicht signifikant
B ²	5,76	0,0230	signifikant
C ²	0,6909	0,4126	nicht signifikant
D ²	23,10	< 0,0001	signifikant
A ² B	5,91	0,0215	signifikant
AB ²	11,74	0,0018	signifikant
AC ²	13,63	0,0009	signifikant
AD ²	5,13	0,0311	signifikant
C ² D	9,31	0,0048	signifikant
CD ²	5,54	0,0255	signifikant
Residual			
<i>lack of fit</i>	1,07	0,4769	nicht signifikant

Im DFFITS-Test für den Ergosterolgehalt [mg L^{-1}] lagen sechs Datenpunkte außerhalb der Grenze. Diese Punkte waren in der Cook's Distanz jedoch nicht auffällig (Abbildung 3-25). Anhand der Auftragung der vorhergesagten Werte gegen die tatsächlich gemessenen Werte in Abbildung 3-26 B waren keine Ausreißer erkennbar. Daher wurden für die Berechnung des Modells mit Ausnahme von Lauf 21 alle Datenpunkte berücksichtigt.

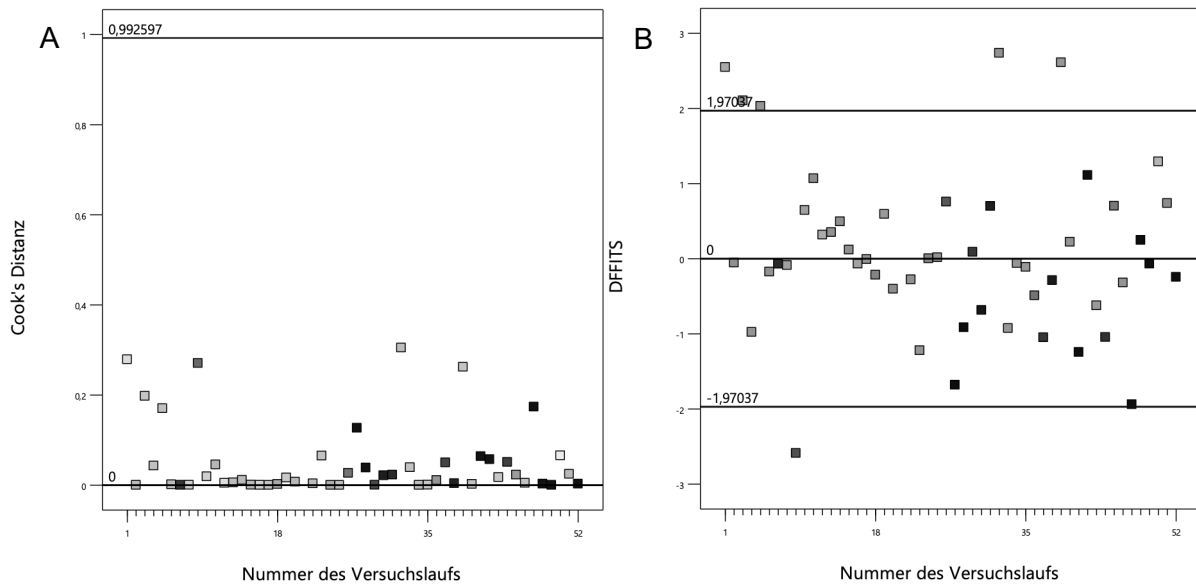


Abbildung 3-25: Cook's Distanz (A) und DFFITS (*difference of fits*, B) jeweils aufgetragen gegen die Nummer des Versuchslaufs für den Ergosterolgehalt [mg L⁻¹]

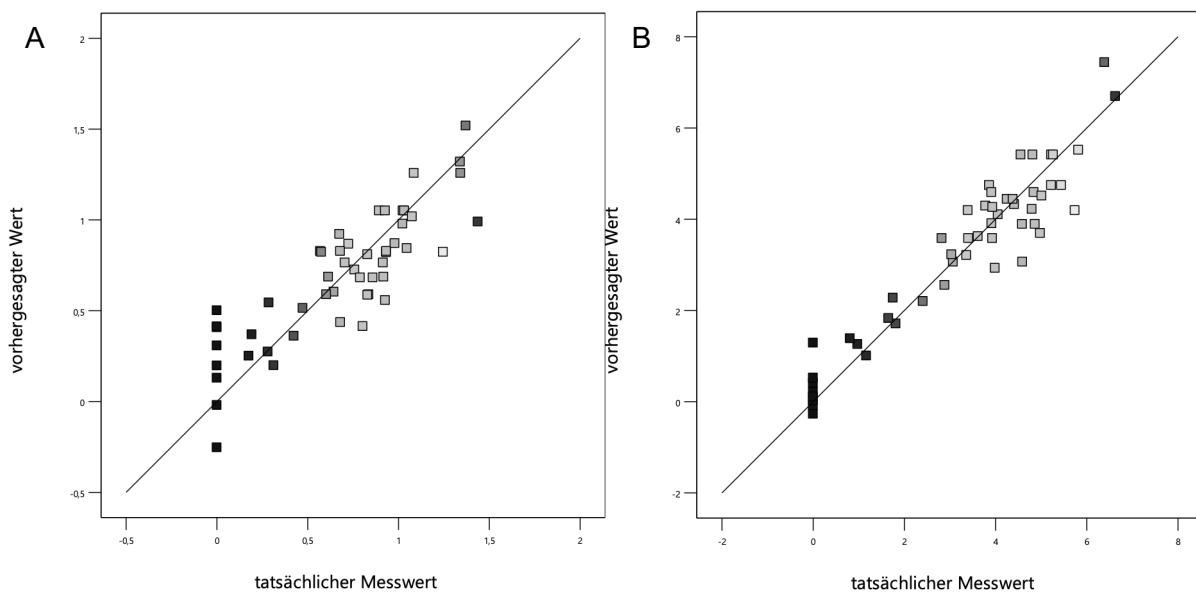


Abbildung 3-26: Auftragung der durch das Modell vorhergesagten Werte gegen die tatsächlichen Messwerte für den Ergosterolgehalt [mg g⁻¹] (A) und den Ergosterolgehalt [mg L⁻¹] (B)

Die 3D-Darstellungen des Modells für den Ergosterolgehalt [mg g⁻¹] zeigen, dass 30 °C die optimale Kultivierungstemperatur darstellt (Abbildung 3-27). In der Auftragung der Temperatur gegen den initialen pH-Wert ist ein Maximum des Ergosterolgehaltes bei 30 °C und einem pH-Wert von etwa 8 erkennbar. Jedoch erreicht das Maximum in der Darstellung nicht die maximal mögliche Ergosterolkonzentration, die durch eine stark rote Färbung gekennzeichnet wäre. Da für die Auswahl der finalen Parameter die Bedingung eines möglichst kleinen Inokulumvolumens war, wurde für die Grafiken jeweils das finale Inokulumvolumen von 4,4%

verwendet. In Abbildung 3-27 C ist zu erkennen, dass mit zunehmendem Inokulumvolumen höhere Ergosterolgehalte erzielt wurden.

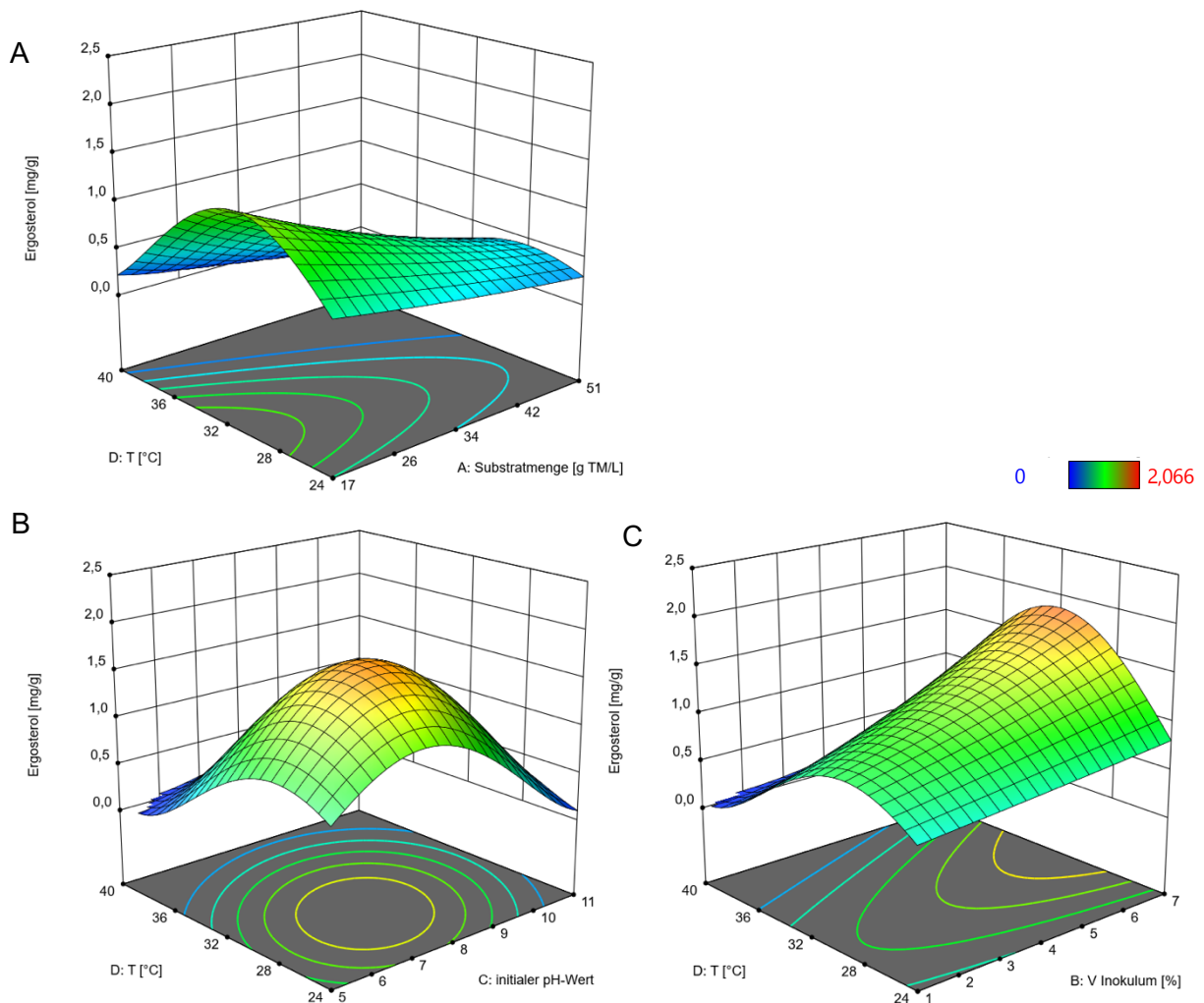


Abbildung 3-27: 3D-Darstellung des Modells für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}] (quadratisches Modell, transformiert mit der Quadratwurzel); A: Temperatur (T) gegen die Substratmenge bei einem initialen pH-Wert von 9,3 und einem Inokulumvolumen von 4,4% (v/v); B: Temperatur (T) gegen den initialen pH-Wert bei einer Substratmenge von 17 g TM L^{-1} und einem Inokulumvolumen von 4,4%; C: Temperatur (T) gegen das Inokulumvolumen (V Inokulum) bei einer Substratmenge von 17 g TM L^{-1} und einem initialen pH-Wert von 9,3

Auch die 3D-Darstellungen des Ergosterolgehaltes [mg L^{-1}] in Abbildung 3-28 zeigen einen Anstieg des Ergosterolgehaltes mit zunehmendem Inokulumvolumen. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes wurden höhere Ergosterolgehalte beobachtet (Abbildung 3-28 B, C, D). Allerdings wies das Modell am oberen Rand des Faktorraums eine hohe Standardabweichung auf. Für einen pH-Wert von 11 wurde kein Wachstum während der Durchführung festgestellt und der Versuchsplan wurde dementsprechend angepasst. Die zur Berechnung des Modells verwendeten Daten sind in Tabelle 6-3 dargestellt. Daher war das Modell in dem hohen pH-Wert-Bereich mit einem hohen Fehler behaftet. Für die Substratmenge war in Wechselwirkung mit dem Inokulumvolumen und der Temperatur eine Abnahme des Ergosterolgehaltes [mg L^{-1}] mit steigender Substratmenge erkennbar (Abbildung 3-28 A, E). In der Wechselwirkung mit

dem initialen pH-Wert stieg der Ergosterolgehalt mit zunehmender Substratmenge. Das Temperaturoptimum lag in einem ähnlichen Bereich wie bei dem Modell für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}].

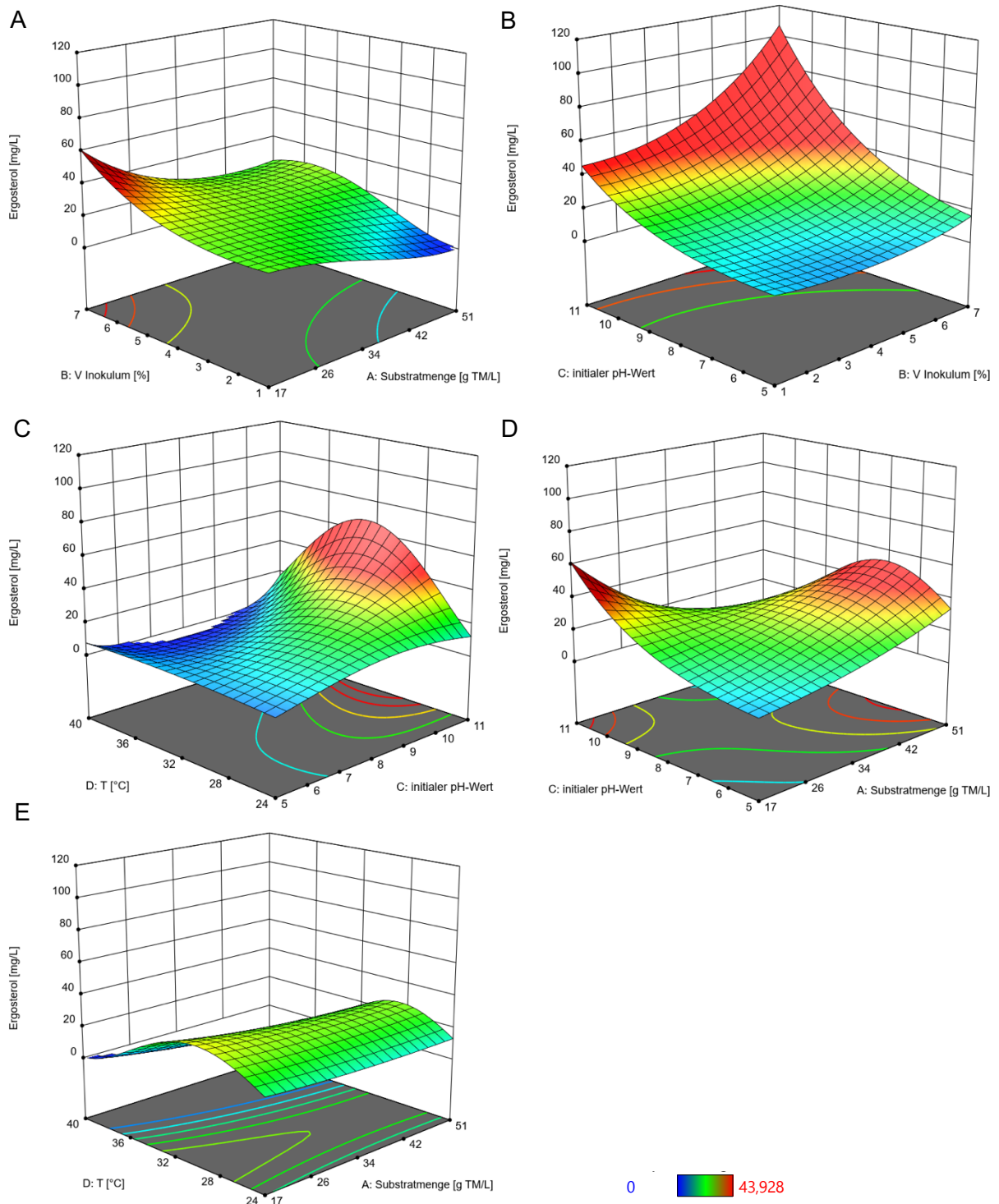


Abbildung 3-28: 3D-Darstellung des Modells für den Ergosterolgehalt [mg L^{-1}] (kubisches Modell, transformiert mit der Quadratwurzel); A: Inokulumvolumen (V Inokulum) gegen die Substratmenge bei einem initialen pH-Wert von 9,3 und einer Temperatur von 30 °C; B: Inokulumvolumen (V Inokulum) gegen den initialen pH-Wert bei einer Substratmenge von 17 g TM L⁻¹ und einer Temperatur von 30 °C; C: initialer pH-Wert gegen die Temperatur (T) bei einer Substratmenge von 17 g TM L⁻¹ und einem Inokulumvolumen von 4,4%; D: initialer pH-Wert gegen die Substratmenge bei einer Temperatur von 30 °C und einem Inokulumvolumen von 4,4%; E: Temperatur (T) gegen die Substratmenge bei einem initialen pH-Wert von 9,3 und einem Inokulumvolumen von 4,4%

Die optimalen Parameter für eine gleichzeitige Maximierung des Ergosterolgehalts [mg g^{-1}] und [mg L^{-1}] und Reduzierung des Inokulumvolumens sind in Tabelle 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-7: Finale Parameter für die Fermentation von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus*

Substratmenge [g TM L^{-1}]	Inokulumvolumen [%]	pH-Wert	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]
17	4,4	9,3	30

Ein Vergleich der durch „Design Expert 13“ vorhergesagten Werte und der experimentell bestimmten Werte für die Ergosterolgehalte [mg g^{-1}] und [mg L^{-1}] für die optimierte Fermentation von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus* ist in Tabelle 3-8 gezeigt. Durch die Bestätigungsläufe wurde das Modell bestätigt.

Tabelle 3-8: Durch „Design Expert 13“ vorhergesagte Werte und experimentell bestimmte Werte für Ergosterol [mg g^{-1}] und Ergosterol [mg L^{-1}] für die optimierte Fermentation von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus*

	Vorhersage	Experimenteller Wert
Ergosterol [mg g^{-1}]	$1,36 \pm 0,56$	$1,23 \pm 0,09$
Ergosterol [mg L^{-1}]	$32,65 \pm 9,17$	$15,54 \pm 0,49$

Nach der Fermentation waren deutlich Myzel-Pellets neben den Treber-Rückständen erkennbar, was für eine erfolgreiche Fermentation sprach (Abbildung 3-29).



Abbildung 3-29: Kulturgefäß nach der Fermentation von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus* bei den in Tabelle 3-7 angegebenen Bedingungen

3.6 Ansätze zur Verbesserung der Kulturführung

3.6.1 Dauer des Dispergierens

Anhand der Trockenmassen, die für die nach 2.2.1.9 behandelten Vorkulturen mit unterschiedlichen Turrax-Zeiten erhalten wurden, stellten sich 30 s für die Dauer des Dispergierens als geeignet heraus (Abbildung 3-30).

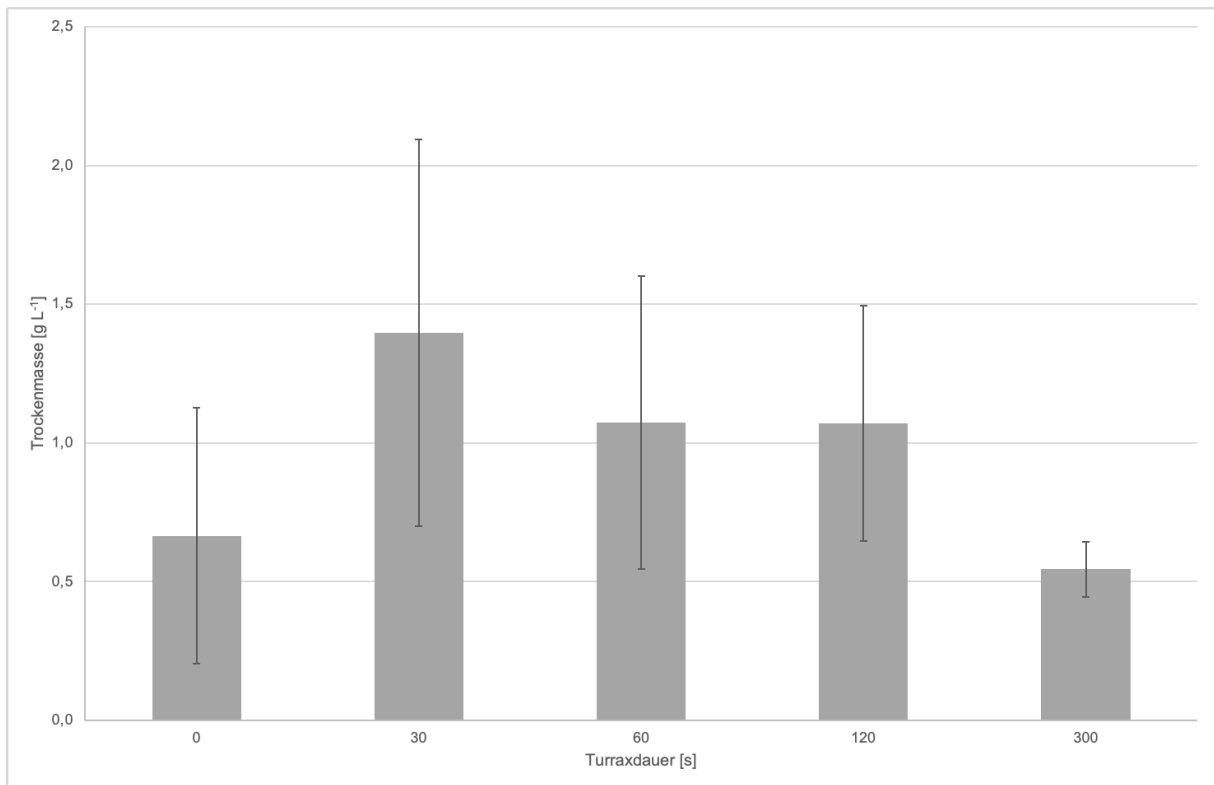


Abbildung 3-30: Einfluss der Dauer des Dispergierens eines Myzelstücks von *Pleurotus ostreatus* beim Ansetzen einer Vorkultur in ME auf die Trockenmasse nach sieben Tagen Kultivierung

Ein Vergleich der Trockenmassen, pH-Werte und Ergosterolgehalte der Hauptkulturen, die nach 2.2.1.9 aus unterschiedlich lange dispergierten Vorkulturen angesetzt wurden, ist in Abbildung 3-31 dargestellt. Für die Trockenmassen wurden bei zunehmender Dauer des Dispergierens etwas geringere Werte verzeichnet. Der Ergosterolgehalt stieg hingegen mit längerer Dauer an. Für die pH-Werte zeigte sich kein Trend, jedoch lagen alle Werte der Kulturen, die dispergiert wurden, deutlich über den nicht-dispergierten. Der pH-Wert der nicht-dispergierten Kulturen lag mit 5 deutlich näher am nativen pH-Wert des Mediums von 4,2. Aufgrund der pH-Werte und Ergosterolgehalte kann somit davon ausgegangen werden, dass ein besseres Pilzwachstum in den dispergierten Kulturen stattfand. Auch in den Kulturen mit einem längeren Dispersionsvorgang wurde noch Pilzwachstum verzeichnet.

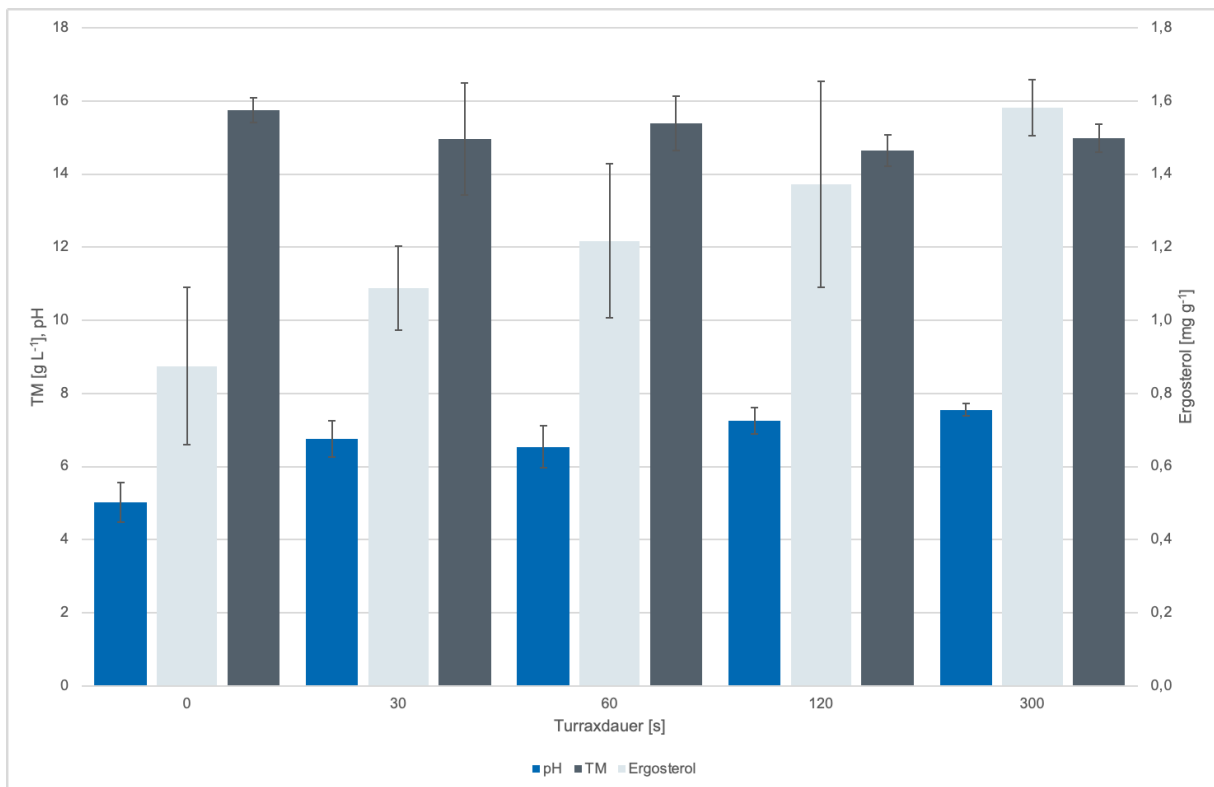


Abbildung 3-31: Einfluss der Dauer des Dispergierens einer sieben Tage kultivierten Vorkultur von *P. ostreatus* auf ME auf die Trockenmasse (TM), den pH-Wert und den Ergosterolgehalt der Hauptkultur mit Schwarzbiertreiber-Medium nach sieben Tagen Kultivierung

Um einen Einfluss der nicht-homogenen Vorkultur bei der Dispersionsdauer von 0 s und somit eines nicht repräsentativen Inokulums zu minimieren, wurden die Hauptkulturen im Maßstab verzehnfacht. Ein Vergleich der Trockenmassen und pH-Werte zeigte keinen Unterschied zwischen den dispergierten und nicht-dispergierten Kulturen (Abbildung 3-32). Der Ergosterolgehalt war bei den dispergierten Kulturen deutlich höher. Somit bestätigte sich, dass der Dispersionsvorgang relevant für das Pilzwachstum war.

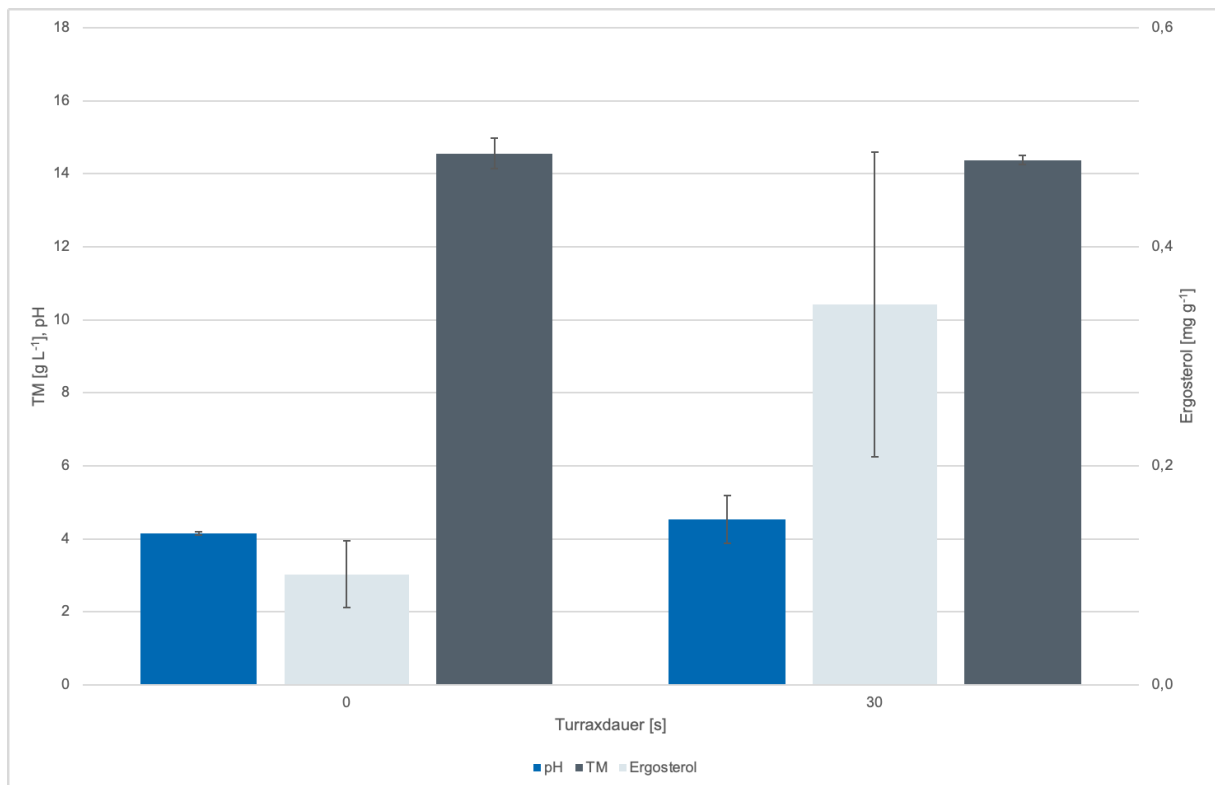


Abbildung 3-32: Einfluss der Dauer des Dispergierens einer sieben Tage kultivierten Vorkultur von *P. ostreatus* auf ME auf die Trockenmasse (TM), den pH-Wert und den Ergosterolgehalt der Hauptkultur mit Schwarzbiertreber-Medium nach sieben Tagen Kultivierung. Maßstabsvergrößerung der Hauptkultur von 40 mL auf 400 mL⁵

3.6.2 Kulturführung über mehrere Generationen

Die Trockenmassen, pH-Werte und Ergosterolgehalte der Kulturen, die über mehrere Generationen aus vorherigen Hauptkulturen nach 2.2.1.10 inokuliert wurden, sind in Abbildung 3-33 dargestellt. Im Verlauf der Generationen stieg der Ergosterolgehalt mit Ausnahme von Generation 3 deutlich an. Dies deutete auf ein verbessertes Pilzwachstum hin, je länger eine Hauptkultur als Inokulum verwendet wurde. Auch die pH-Werte von Generation 3 und 4 lagen zwischen 7 und 8, was auf ein gutes Wachstum hindeutete. Die Trockenmassen von Generation 3 und 4 waren etwas höher als die von Generation 1 und 2.

⁵ Die Ergosterolgehalte sind niedrig, da das Pilzwachstum schlechter als in dem kleineren Maßstab war.

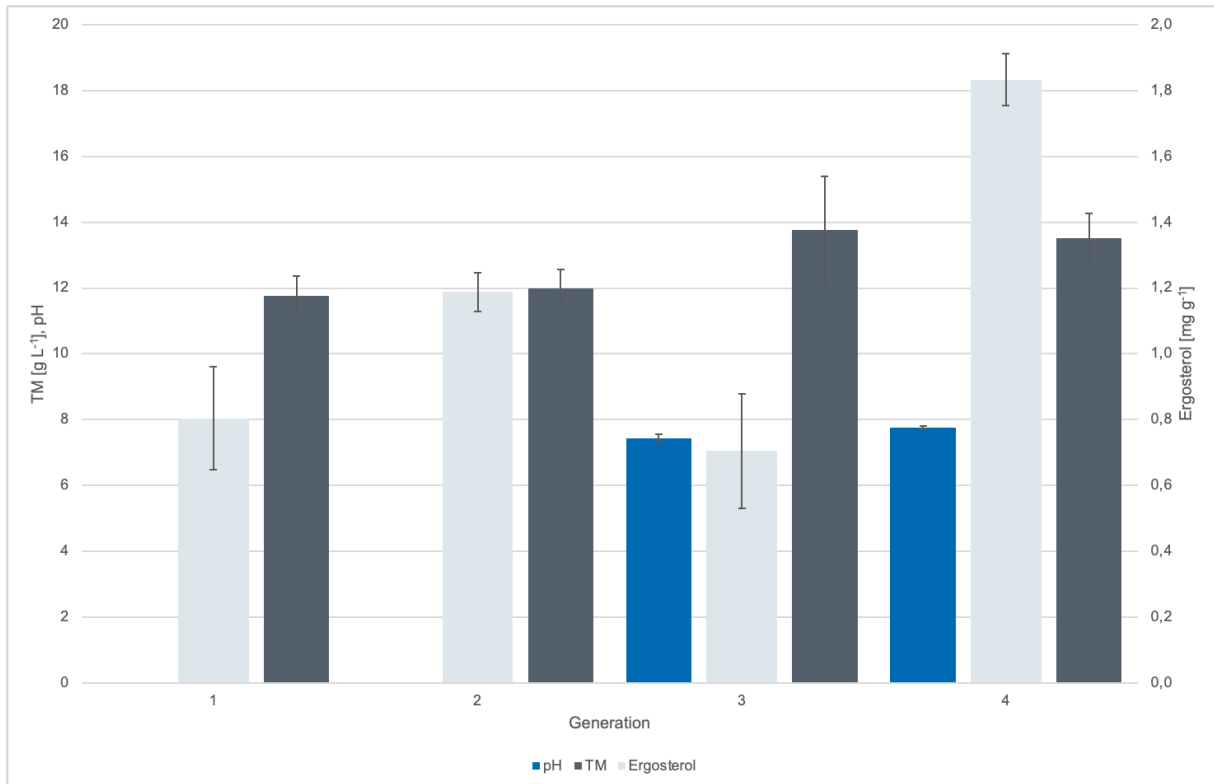


Abbildung 3-33: Trockenmassen (TM), pH-Werte und Ergosterolgehalte von Hauptkulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertreber, die über mehrere Generationen aus einer Hauptkultur inokuliert wurden. Zur Vergleichbarkeit wurden bei der TM von Generation 4 10% abgezogen, da dies als Inokulum bei den vorherigen Generationen verwendet wurde. Die pH-Werte von Generation 1 und 2 wurden nicht gemessen.

Für die Hauptkulturen, die gemäß 2.2.1.10 aus den Überständen vorheriger Hauptkulturen angesetzt wurden, sind die Trockenmassen und Ergosterolgehalte in Abbildung 3-34 aufgeführt. Im Vergleich zu Generation 0 zeigten die restlichen Generationen ähnliche Trockenmassen und etwas höhere Ergosterolgehalte. Der pH-Wert im Überstand von Generation 4 betrug $6,8 \pm 0,1$ und war vergleichbar mit Werten aus den vorherigen Experimenten. Somit lässt sich der Kulturüberstand über mindestens vier Generationen wiederverwenden, ohne einen negativen Einfluss auf das Pilzwachstum zu haben.

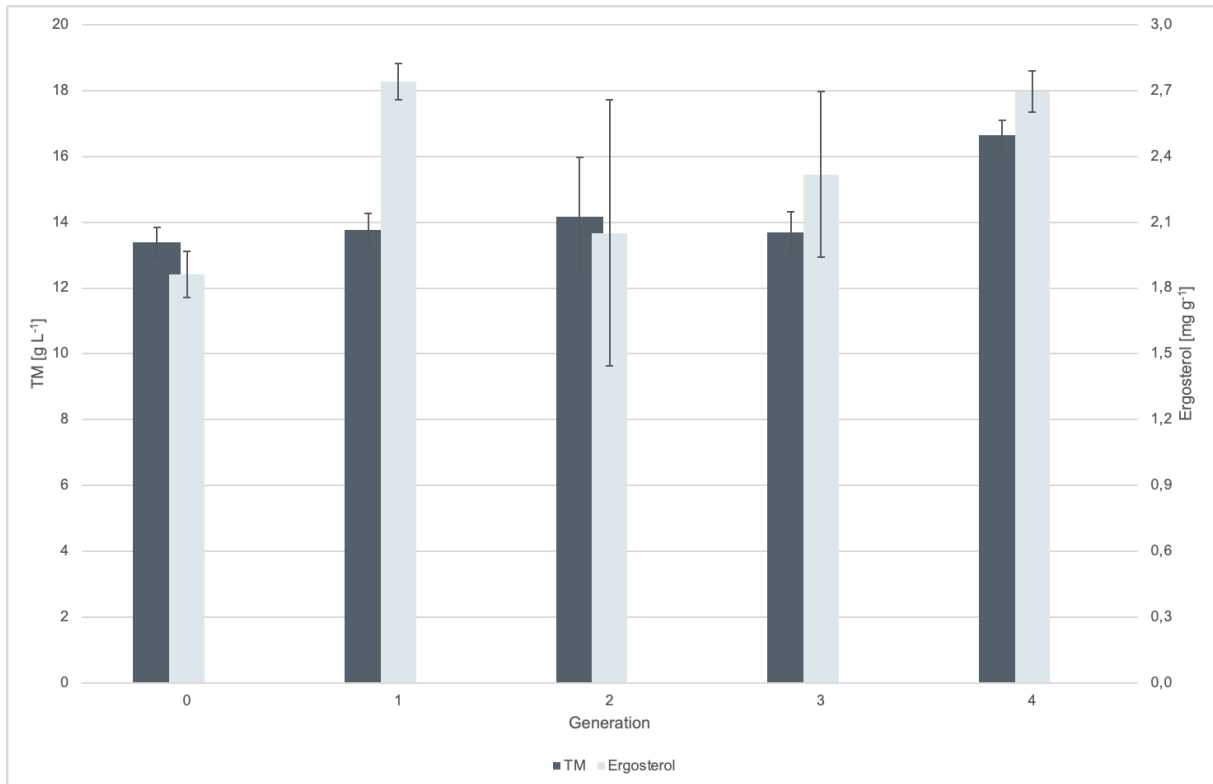


Abbildung 3-34: Trockenmassen (TM) und Ergosterolgehalte von Hauptkulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertreber, deren Medium über mehrere Generationen aus Kulturüberstand vorheriger Hauptkulturen angesetzt wurde. Generation 0 dient als Vergleich, da hier noch kein Kulturüberstand als Medienbestandteil verwendet wurde.⁶

3.6.3 Fed-Batch

Die nach 2.2.1.11 angesetzten und gefütterten Kulturen wiesen nach sieben Tagen Kulturdauer die in Abbildung 3-35 dargestellten Trockenmassen und Ergosterolgehalte auf. Im Vergleich wiesen die mit Würze gefütterten Kulturen die höchsten Trockenmassen auf. Die Ergosterolgehalte wiesen hohe Standardabweichungen auf, weshalb hier keine klare Tendenz erkennbar war. Bei einer Wiederholung des Fütterungsversuches mit mehr Supplement wurden für den Zusatz von Hefe die höchsten Werte verzeichnet (Abbildung 3-36), wobei dies auf den in 3.4 aufgeführten Ergosterolgehalt der Hefe zurückzuführen war. Da die Kulturen mit Hefefütterung muffig rochen, wurde die Hefe für weitere Fütterungsexperimente ausgeschlossen. Aufgrund der vergleichsweise hohen Trockenmasse (Abbildung 3-35) und leichteren Dosierbarkeit mittels Pipette und Peristaltikpumpe, wurde Würze als Supplement weiterverfolgt.

⁶ Die pH-Werte wurden hier nicht bestimmt, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren.

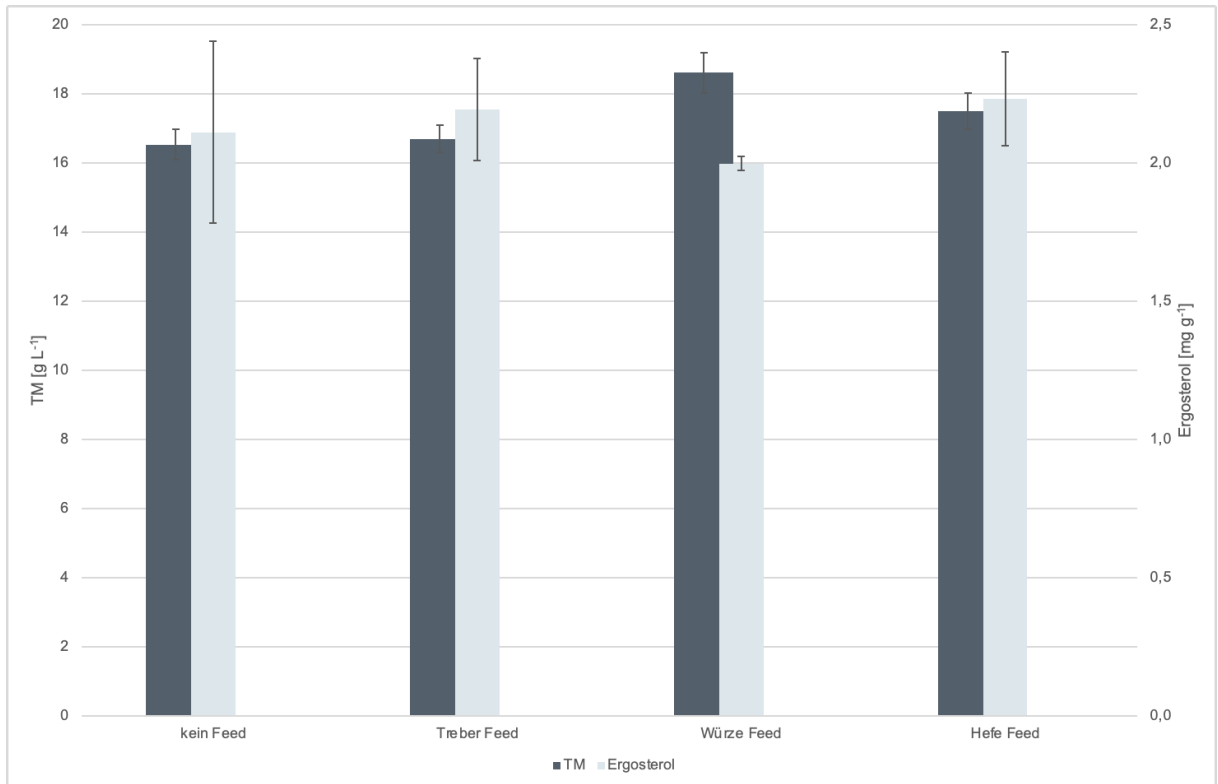


Abbildung 3-35: Trockenmassen (TM) und Ergosterolgehalte von Kulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertrebermedium, die an Kulturtag 5 mit 1% (v/v) Treber, Würze und Hefe gefüttert wurden

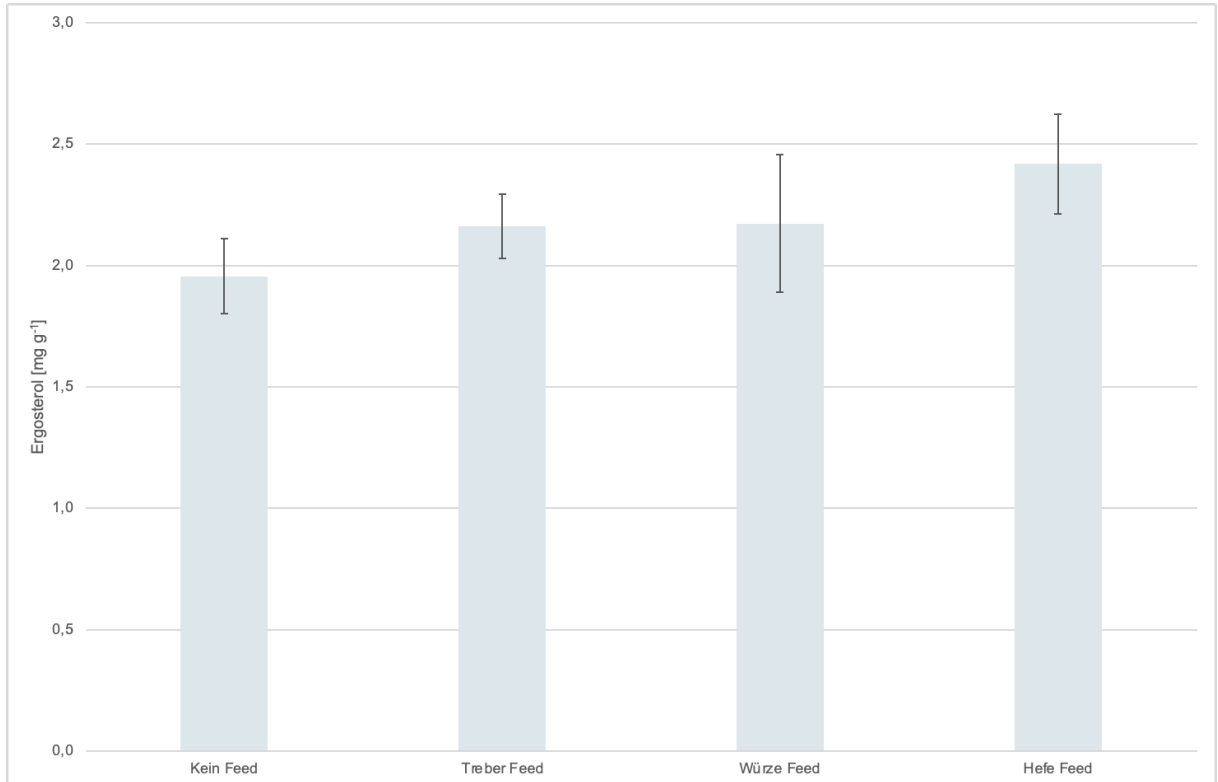


Abbildung 3-36: Ergosterolgehalte von Kulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertrebermedium, die an Kulturtag 5 mit 5% (v/v) Treber, Würze und Hefe gefüttert wurden

Ein Vergleich der Fütterung an verschiedenen Kulturtagen zeigte einen deutlich erhöhten Ergosterolgehalt an Tag 3 (Abbildung 3-37). Die Trockenmassen stiegen an, je später der Fütterungszeitpunkt war. Allerdings wiesen die Trockenmassen hohe Abweichungen auf.

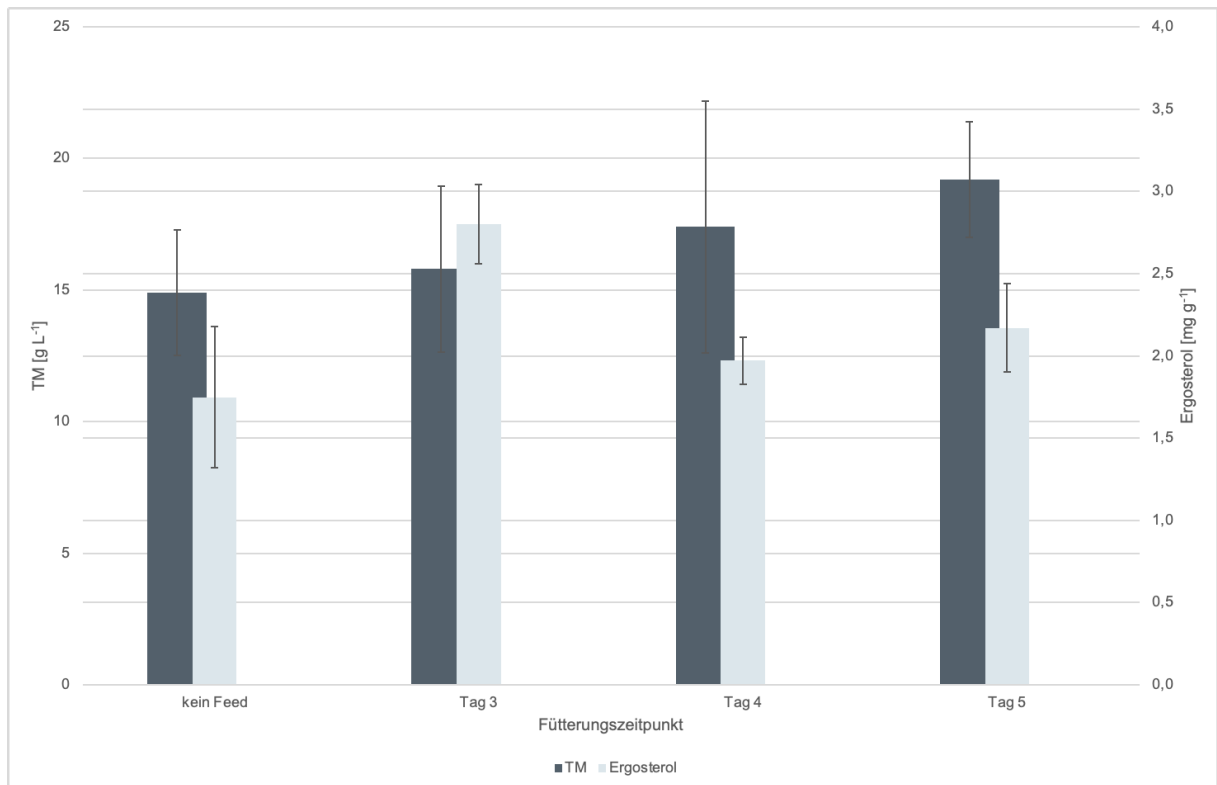


Abbildung 3-37: Trockenmassen (TM) und Ergosterolgehalte von Kulturen von *P. ostreatus* auf Schwarzbiertrebermedium, die an unterschiedlichen Tagen mit 5% (v/v) Würze gefüttert wurden

Bei der Kultivierung von *P. ostreatus* im Bioreaktor mit Schwarzbiertrebermedium und einer Würze-Fütterung an Tag fünf wurde eine etwas höhere Trockenmasse und ein deutlich höherer Ergosterolgehalt im Vergleich zu Fermentationen mit vergleichbaren Bedingungen ohne Feed erzielt werden (Tabelle 3-9). Im Kulturverlauf der Fermentation mit Feed wurde ein Absinken des gelösten Sauerstoffs und des pH-Wertes bei Zugabe des Feeds beobachtet (Abbildung 3-38).

Tabelle 3-9: Vergleich von Trockenmasse und Ergosterolgehalt von Fermentationen von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus* ohne Feed und mit 5% (v/v) Würze-Feed im 5 L-Maßstab

	Trockenmasse [g L ⁻¹]	Ergosterolgehalt [mg g ⁻¹]
Ohne Feed	17,0	1,96 ± 0,00
Mit Feed	17,7	3,39 ± 0,11

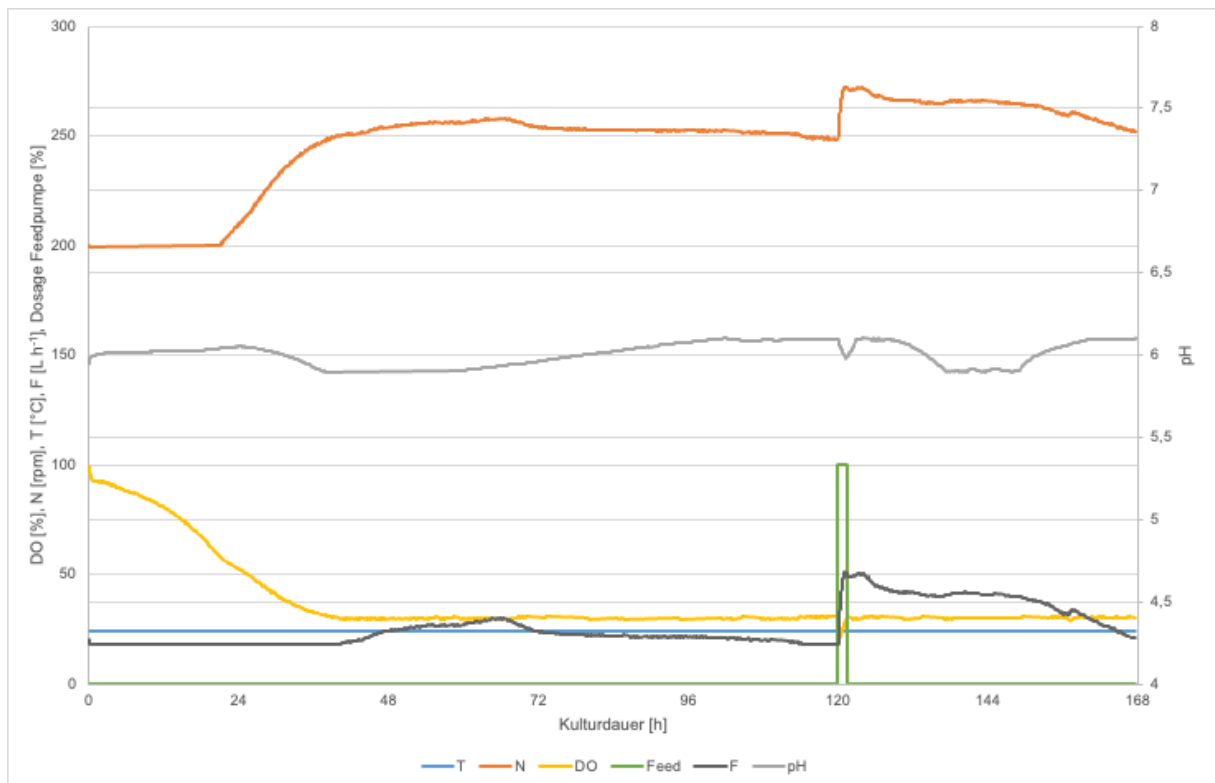


Abbildung 3-38: Kulturverlauf der Fermentation von Schwarzbiertrebermedium mit *P. ostreatus* mit Fütterung von 5% Würze (v/v) an Kulturtag fünf. T: Temperatur, N: Rührgeschwindigkeit, DO: gelöster Sauerstoff, F: Begasungsrate.

3.7 Analytik der Biomasse

3.7.1 Chemische Analytik

Ein Vergleich der Reinprotein-, Gesamtfett-, Rohasche- und Gesamtkohlenhydratgehalte von dem Myzel von *Pleurotus ostreatus* auf Malzextrakt (POS-ME) und Schwarzbiertreber (POS-SBT) und nicht fermentiertem Schwarzbiertreber ist in Abbildung 3-39 dargestellt. Die Reinproteingehalte unterschieden sich zwischen den Myzelien und der Treber-Referenz deutlich. Das Referenzmyzel auf Malzextrakt wies den höchsten und der nicht fermentierte Schwarzbiertreber den geringsten Reinproteingehalt auf. Somit konnte der Proteingehalt des Schwarzbiertrebers durch die Fermentation erhöht werden. Auch die Proteinqualität konnte erhöht werden. Die biologische Wertigkeit des fermentierten Schwarzbiertrebers erreichte nahezu die des Referenzmyzels und lag somit deutlich über der biologischen Wertigkeit des nicht fermentierten Schwarzbiertrebers (Tabelle 3-10). Nach der Fermentation war Tryptophan nicht mehr die limitierende Aminosäure. Die Aminosäureprofile sind in Abbildung 3-40 dargestellt.

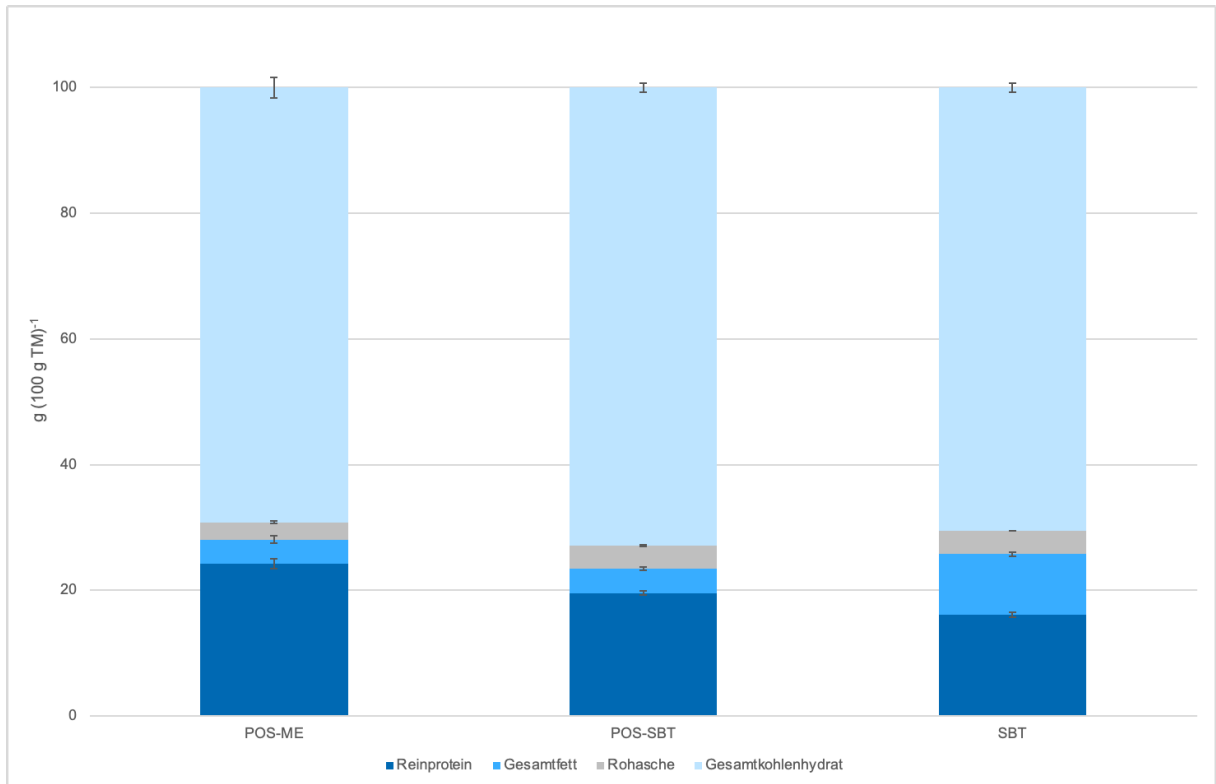


Abbildung 3-39: Reinprotein-, Gesamtfett-, Rohasche- und Gesamtkohlenhydratgehalt von den Myzelien von *P. ostreatus* auf Malzextrakt (POS-ME) und Schwarzbiertréber (POS-SBT) und Schwarzbiertréber ohne Fermentation (SBT) in Bezug auf die Trockenmasse (TM)

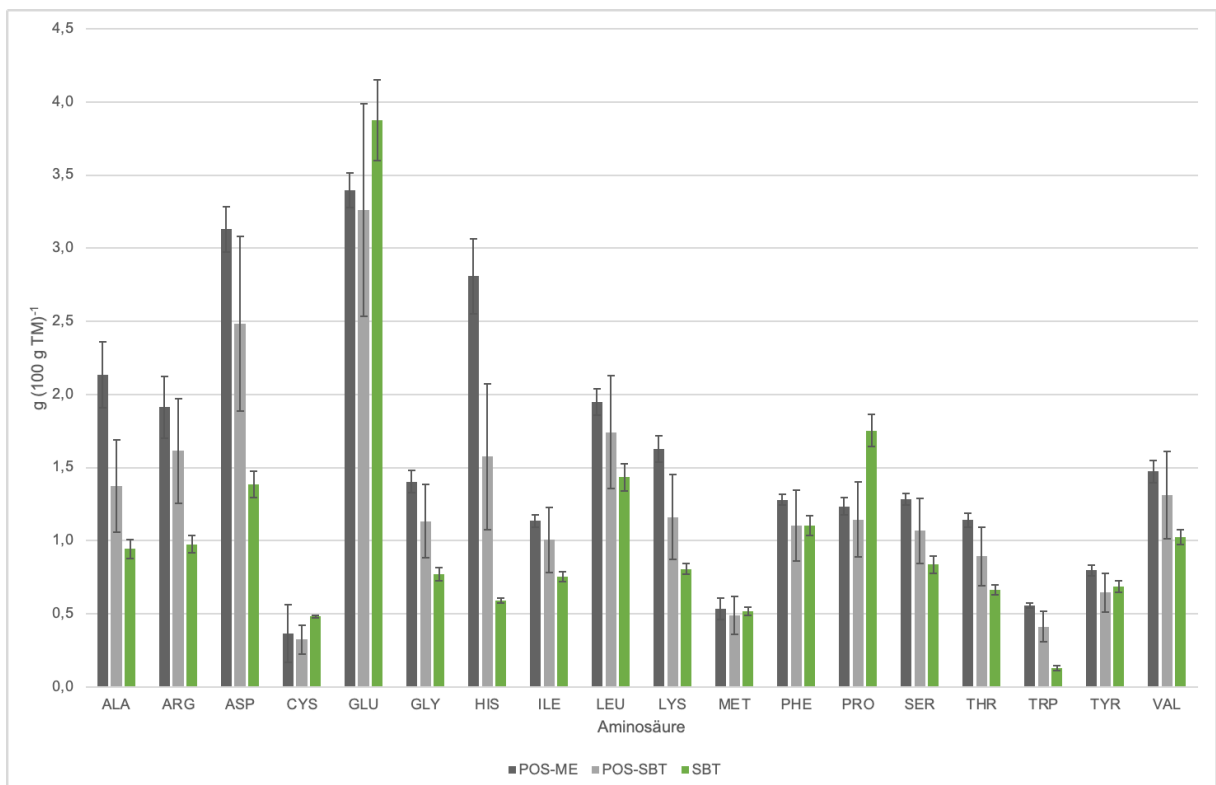


Abbildung 3-40: Aminosäureverteilung von den Myzelien von *P. ostreatus* auf Malzextrakt (POS-ME) und Schwarzbiertréber (POS-SBT) und Schwarzbiertréber ohne Fermentation (SBT). Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

Tabelle 3-10: *Essential amino acid indices* (EAAI), biologische Wertigkeiten (BW) sowie erste und zweite limitierende Aminosäuren (AA) mit zugehörigen *chemical scores* (CS) der Myzelien von *P. ostreatus* auf Malzextrakt (POS-ME) und Schwarzbiertreber (POS-SBT) und Schwarzbiertreber ohne Fermentation (SBT)

Probe	EAAI	BW	1. limitierende AA (CS)	2. limitierende AA (CS)
POS-ME	98 ± 3	95 ± 3	Met/Cys (85,3)	Leu (98,7)
POS-SBT	97 ± 2	94 ± 3	Met/Cys (85,5)	Lys (92,4)
SBT	91 ± 2	88 ± 2	Trp (69,5)	Lys (78,3)

Durch die Fermentation stieg der Anteil an ungesättigten Fettsäuren (FS) von 65,8% ± 0,1% im Schwarzbiertreber auf 69,5% ± 2,9% im fermentierten Schwarzbiertreber. Das reine Myzel wies mit 80,8% ± 1,9% den größten Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf. Im Fettsäureprofil lag der fermentierte Schwarzbiertreber zwischen dem nicht fermentierten Treber und dem reinen Myzel (Abbildung 3-41). Nur für Ölsäure war der relative Anteil im fermentierten Treber größer als im nicht fermentierten Treber und deutlich größer als im reinen Myzel. Neben den im Standard enthaltenen Fettsäuremethylestern waren in den Chromatogrammen weitere kleine Peaks zu erkennen (Abbildung 6-1 bis Abbildung 6-3). Bei diesen Peaks könnte es sich um weitere Fettsäuren handeln. Durch den Abgleich der Massenspektren wurden im Myzel von *P. ostreatus* auf ME voraussichtlich Pentadecansäure und Palmitoleinsäure detektiert.

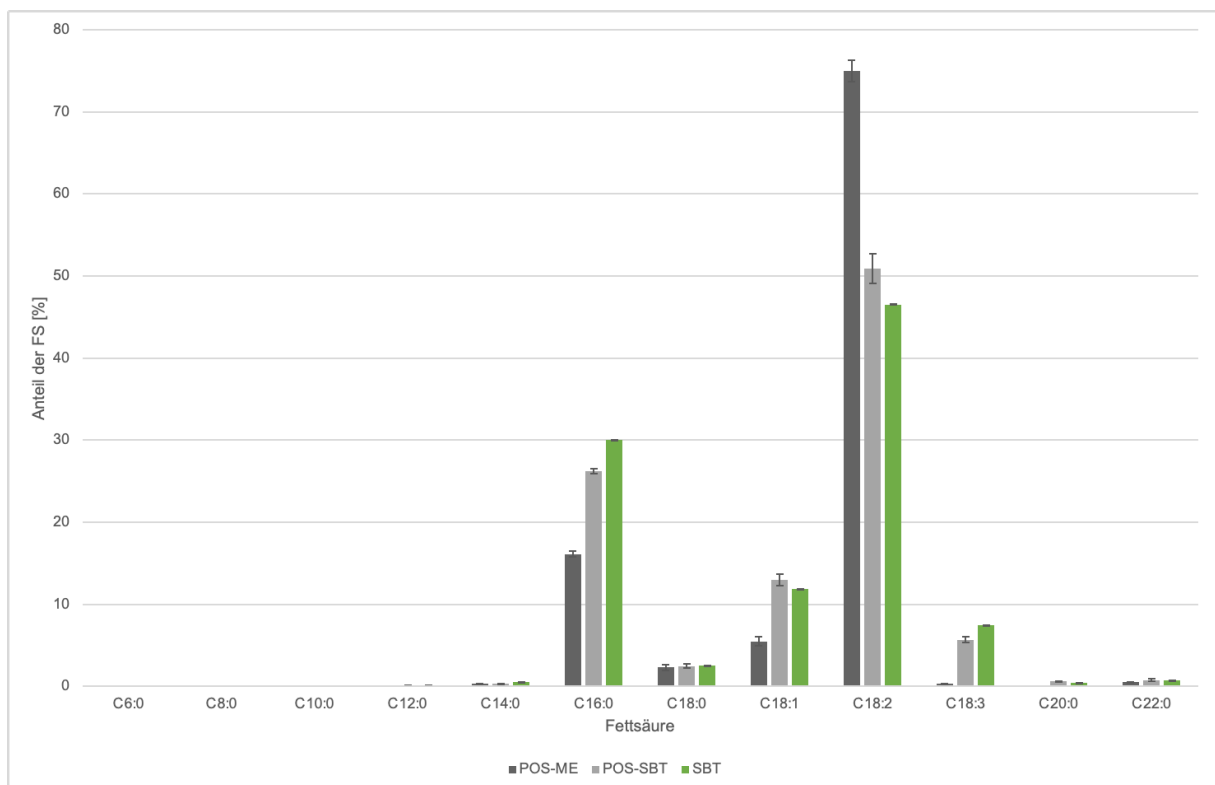


Abbildung 3-41: Fettsäureverteilung der Myzelien von *P. ostreatus* auf Malzextrakt (POS-ME) und Schwarzbiertreber (POS-SBT) und Schwarzbiertreber ohne Fermentation (SBT). FS: Fettsäure

3.7.2 Sensorische Analytik

Eine Verkostung von aufgetautem und nicht zuvor gefrorenem Myzel aus der Fermentation von Schwarzbierdreber mit *P. ostreatus* wurde gemäß 2.2.2.10 durchgeführt. Die Probanden beschrieben den Geruch und Geschmack der nicht zuvor gefrorenen Probe als weniger intensiv (Abbildung 3-42). Das Attribut „pilzartig“ traf für Geruch und Geschmack für beide Proben zu. Nach dem Auftauen wurden die Proben zusätzlich als würzig beschrieben. Die Konsistenz wurde insgesamt als inhomogen, holzig und stark faserig beschrieben, wobei die aufgetauten Proben als etwas besser kaubar bewertet wurden. Der Gesamteindruck der nicht gefrorenen Probe wurde durchschnittlich mit 1,7 bewertet und der der aufgetauten Probe mit 1,9. Aufgrund der Bevorzugung der aufgetauten Probe, wurden für die Aromaanalytik Aliquote von gefrorenem Myzel, die vor der Analyse aufgetaut wurden, verwendet.

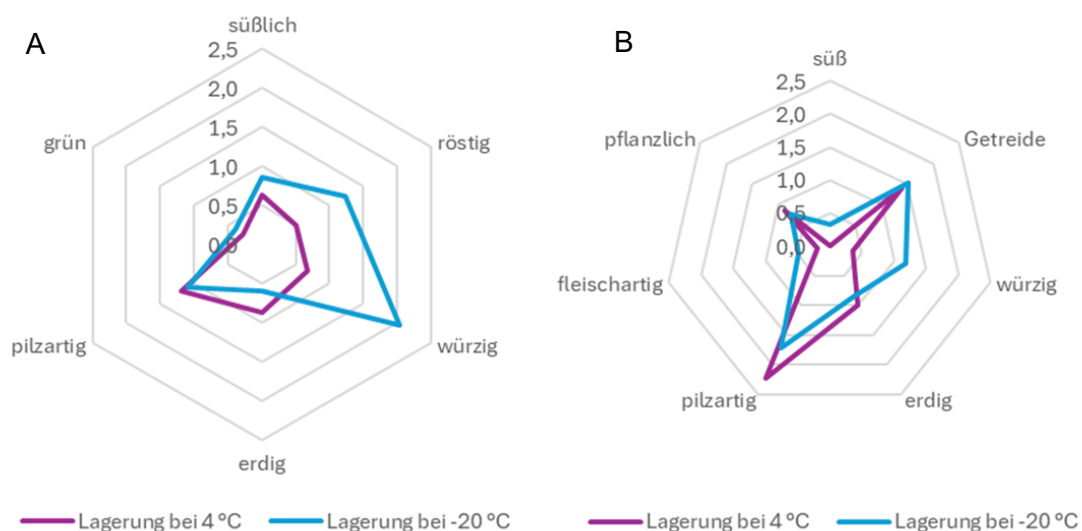


Abbildung 3-42: Bewertung des Geruchs (A) und Geschmacks (B) der Biomasse von mit *P. ostreatus* fermentiertem Schwarzbierdreber nach 24 h Lagerung bei 4 °C und -20 °C durch ein Panel von 22 Probanden

Die gemäß 2.2.2.11 aufgenommenen Chromatogramme der Myzelien von *P. ostreatus* auf Malzextrakt und Schwarzbierdreber sowie nicht fermentiertem Schwarzbierdreber sind in Abbildung 3-43 bis Abbildung 3-45 dargestellt.

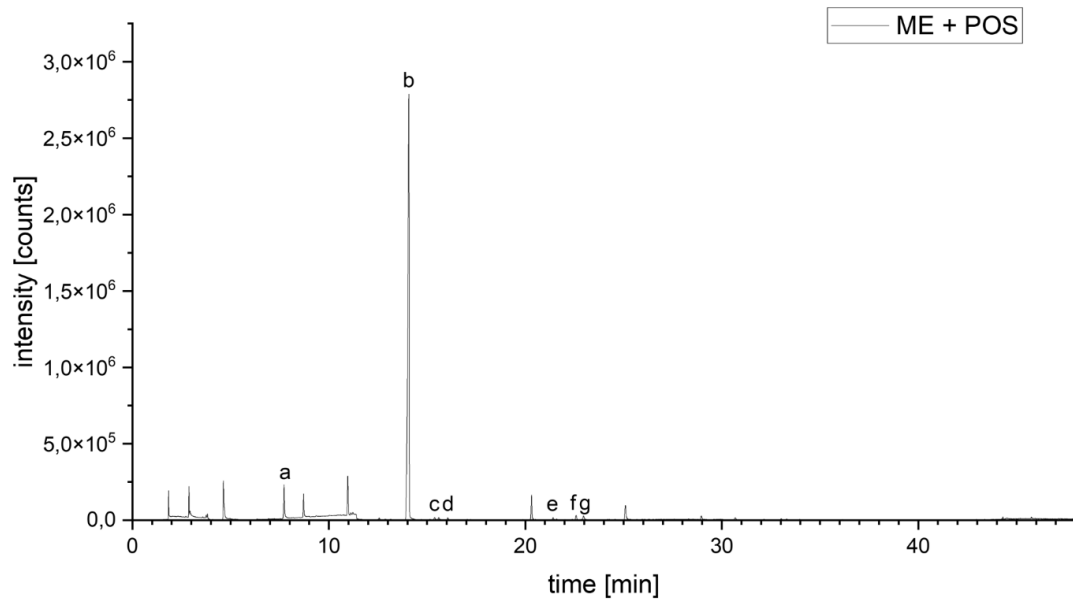


Abbildung 3-43: HS-SPME Chromatogramm von 1 g Myzel von *P. ostreatus* auf Malzextrakt. a: Hexanal, b: 3-Octanon, c: Octanal, d: 1-Octen-3-on, e: (*E*)-2-Octenal, f: 1-Octen-3-ol, g: Furfural

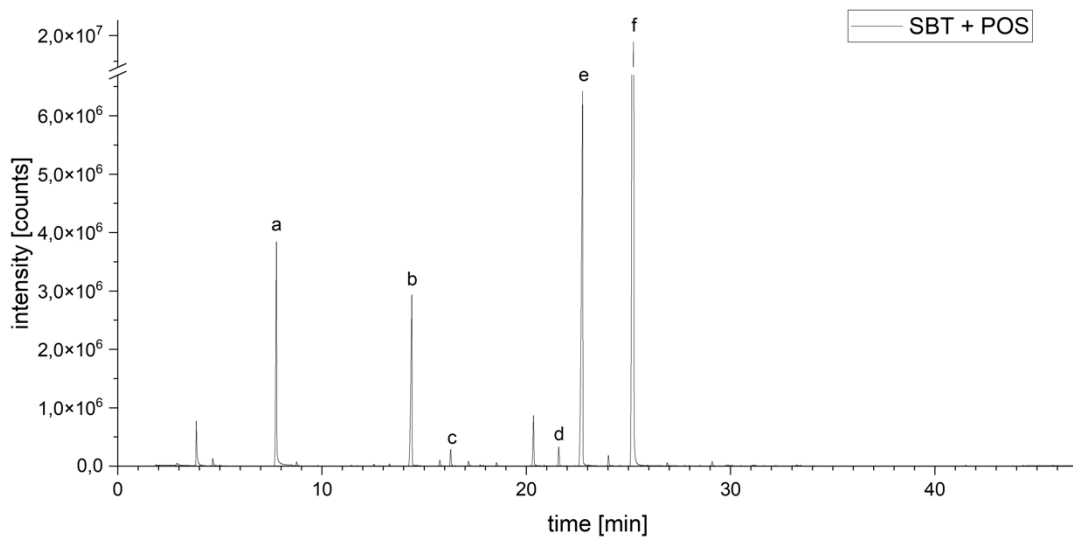


Abbildung 3-44: HS-SPME Chromatogramm von 1 g der Biomasse von mit *P. ostreatus* fermentiertem Schwarzbierdreber. a: Hexanal, b: 3-Octanon, c: 1-Octen-3-on, d: (*E*)-2-Octenal, e: 1-Octen-3-ol, f: Benzaldehyd

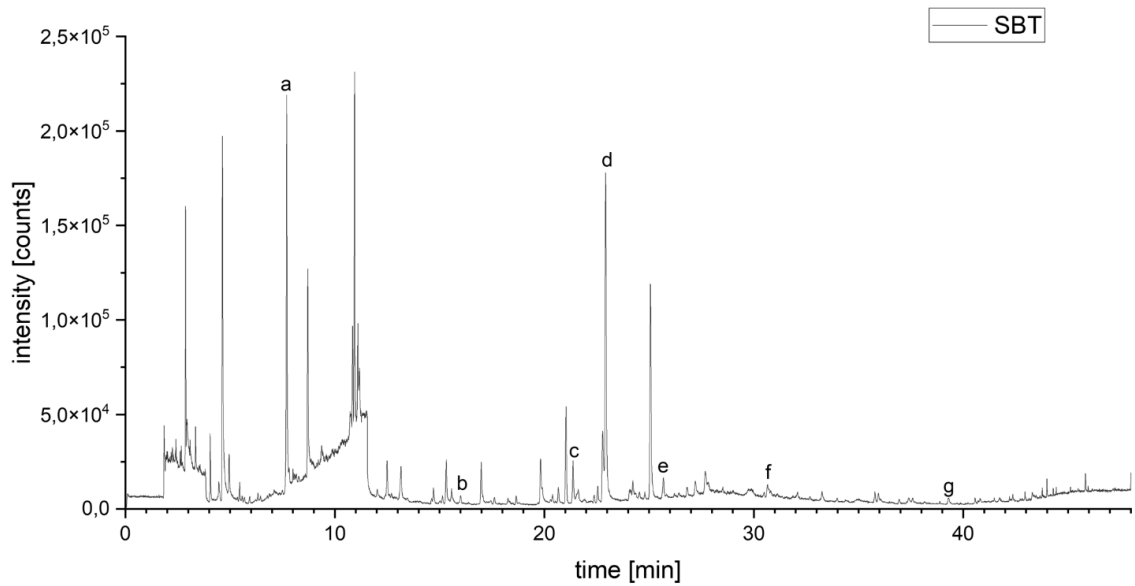


Abbildung 3-45: HS-SPME Chromatogramm von 1 g Schwarzbierdreber. a: Hexanal, b: 1-Octen-3-on, c: (*E*)-2-Octenal, d: Furfural, e: (*E*)-2-Nonenal, f: 2-Furanmethanol, g: 2-Phenylethanol

Ein Vergleich der FD-Chromatogramme von Schwarzbierdreber und den Myzelien von *P. ostreatus* auf Malzextrakt und Schwarzbierdreber ist in Abbildung 3-46 dargestellt. Für alle Proben wies 1-Octen-3-on den höchsten FD-Faktor auf. In beiden Myzelien wurde ein FD-Faktor von ≥ 256 bestimmt.

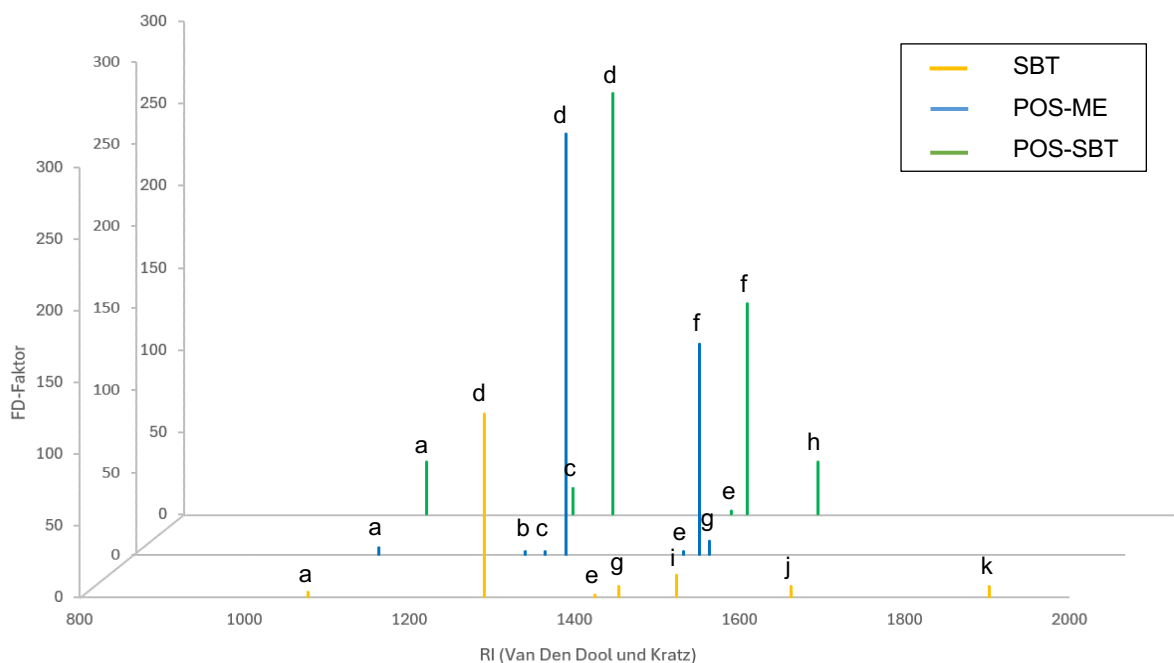


Abbildung 3-46: Vergleich der FD-Chromatogramme von Schwarzbierdreber (SBT), dem Myzel von *P. ostreatus* in Malzextraktmedium kultiviert (POS-ME) und dem mit *P. ostreatus* fermentiertem Schwarzbierdreber (POS-SBT). a: Hexanal, b: 3-Octanon, c: Octanal, d: 1-Octen-3-on, e: (*E*)-2-Octenal, f: 1-Octen-3-ol, g: Furfural, h: Benzaldehyd, i: (*E*)-2-Nonenal, j: 2-Furanmethanol, k: 2-Phenylethanol

Ein Vergleich der wahrgenommenen Geruchseindrücke mit den Geruchsattributen, die den Substanzvorschlägen in der Literatur zugeordnet werden, ist in Tabelle 3-11 gezeigt. Insgesamt deckten sich die wahrgenommenen Geruchseindrücke mit den für die Substanzvorschläge in der Literatur beschriebenen Geruchsattributen. Ein Vergleich der Retentionsindices (RIs), die auf einer polaren und unpolaren Säule bestimmt wurden, mit den RIs von Standardsubstanzen und Literaturwerten ist in Tabelle 3-12 abgebildet. Für eine Übereinstimmung wurde eine Abweichung von 20 toleriert, die für keinen der Aromastoffe überschritten wurde. Lediglich für 2-Phenylethanol wich der RI des Standards von der Probe um 22 ab. Die Massenspektren der Verbindungen, die auf polarer und unpolarer Säule aufgenommen wurden, stimmten mit Referenzspektren überein. Die Spektren sind im Anhang in Tabelle 6-4 bis Tabelle 6-15 aufgeführt. Aufgrund der Übereinstimmung hinsichtlich des Geruchs, Massenspektrums und RIs wurden die aufgeführten Aromastoffe als identifiziert angesehen.

Tabelle 3-11: Substanzen mit wahrgenommenen Geruchsattributen und Geruchsbeschreibungen aus der Literatur.
*The Good Scents Company – Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients Information

Substanz	Wahrgenommene Geruchsattribute	Geruchsattribute Literatur*
Hexanal	frisch, grün, grasig, zitrusartig	frisch, grün, fettig, aldehydisch, grasig, blättrig, fruchtig
3-Octanon	frisch, grün, zitrusartig	frisch, krautig, Lavendel, süßlich, Pilz
Octanal	pilzartig, süßlich, zitrusartig	wachsig, zitrusartig, grün, frisch, fettig, krautig
1-Octen-3-on	pilzartig, modrig	pilzartig, erdig, muffig, krautig
(E)-2-Octenal	frisch, grün, erdig, röstig	fettig, grün, frisch, Gurke, wachsig, Banane
1-Octen-3-ol	pilzartig, erdig, modrig	pilzartig, erdig, grün, ölig, rohes Huhn
Furfural	grün, pilzartig, holzartig	Mandel, süß, holzig, Brot
Benzaldehyd	Mandel, süßlich	Mandel, Kirsche, süßlich
(E)-2-Nonenal	pilzartig, Getreide, grün	fettig, grün, zitrusartig, gurkenartig, aldehydisch
2-Furanmethanol	erdig, muffig	alkoholisch, chemisch, muffig, süßlich, Karamell, Brot, Kaffee
2-Phenylethanol	süßlich, blumig	blumig, Rose, Rosenwasser

Tabelle 3-12: Vergleich der Retentionsindices (RIs) der Substanzen aus den Proben mit Standards und Literaturwerten, gemessen auf einer polaren Säule (VF-WAXms) und einer unpolaren Säule (DB-5ms); a: (Berlinet et al. 2005), b: (Cros et al. 2005), c: (Nielsen und Poll 2004), d: (Riu-Aumatell et al. 2005), e: (Shimoda et al. 1996), f: (Cho et al. 2007), g: (Maccioni et al. 2007), h: (Flamini et al. 2007), i: (Flamini et al. 2003), j: (Moio und Addeo 1998), k: (Flamini et al. 2002)

Substanz	VF-WAXms (polar)			DB-5ms (unpolar)		
	RI	RI	RI	RI	RI	RI
	Probe	Standard	Literatur	Probe	Standard	Literatur
Hexanal	1071	1082	1077 ^a	801	805	807 ^f
3-Octanon	1247	1249	1244 ^b	985	985	971 ^f
Octanal	1271	1284	1267 ^a	1003	1003	1003 ^g
1-Octen-3-on	1293	1302	1290 ^c	976	977	980 ^h
(E)-2-Octenal	1419	1421	1425 ^b	1057	1058	1064 ⁱ
1-Octen-3-ol	1443	1451	1443 ^b	981	980	981 ⁱ
Furfural	1451	1454	1454 ^d	829	834	831 ⁱ
Benzaldehyd	1508	1519	1524 ^b	959	960	963 ⁱ
(E)-2-Nonenal	1519	1527	1524 ^d	1159	1159	1164 ⁱ
2-Furanmethanol	1647	1647	1662 ^e	861	860	857 ^j
2-Phenylethanol	1888	1910	1902 ^d	1110	1109	1113 ^k

3.8 Wachstumsbeurteilung und Bestimmung des Pilzanteils

Von den Myzelien, die gemäß 2.2.1.12 kultiviert und verarbeitet wurden, wurden jeweils die Gehalte an Chitin und Ergosterol bestimmt. Auffällig war der hohe Chitingehalt für den nicht fermentierten Schwarzbierdreber (SBT), der in der gleichen Größenordnung lag wie der Chitingehalt für den fermentierten Schwarzbierdreber (POS-SBT). Für SBT war kaum Ergosterol nachweisbar (Abbildung 3-47). Die aus dem Ergosterol- und Chitingehalt bestimmten Pilzanteile waren nach Abzug der Dreber-Blindwerte vergleichbar (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Pilzanteil des mit *Pleurotus ostreatus* fermentierten Schwarzbierdrebers. Die Berechnung erfolgte aufgrund des Ergosterol- und des Chitingehaltes jeweils mit Berücksichtigung des Blindwertes des nicht fermentierten Schwarzbierdrebers.

	Pilzanteil [%]
Bestimmung durch Ergosterol	21,4 ± 7,5
Bestimmung durch Chitin	17,8 ± 11,3

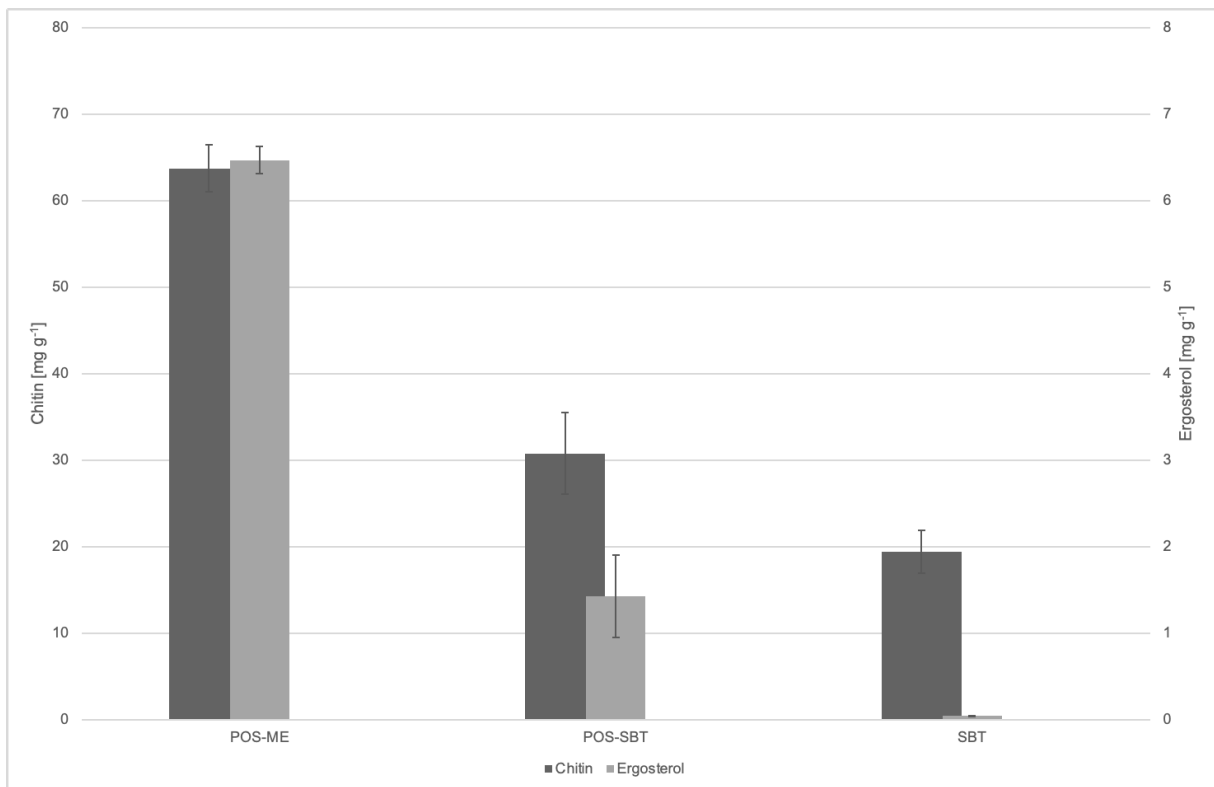


Abbildung 3-47: Chitin- und Ergosterolgehalte von Myzel von *P. ostratus* in Malzextraktmedium (POS-ME) und Schwarzbiertrebermedium (POS-SBT) und nicht fermentiertem Schwarzbiertreber (SBT)

Ein Vergleich der Kohlenstofftransferaten (Abbildung 3-48), die während den Fermentationen gemäß 2.2.1.12 aufgezeichnet wurden, zeigt, dass während der Fermentation des Schwarzbiertreibers (POS-SBT) deutlich mehr CO₂ ausgestoßen wurde als während der Fermentation des Malzextraktmediums (POS-ME). Daher war eine Quantifizierung des Pilzanteils im fermentierten Schwarzbiertreber über den CO₂-Gehalt in der Abluft nicht möglich.

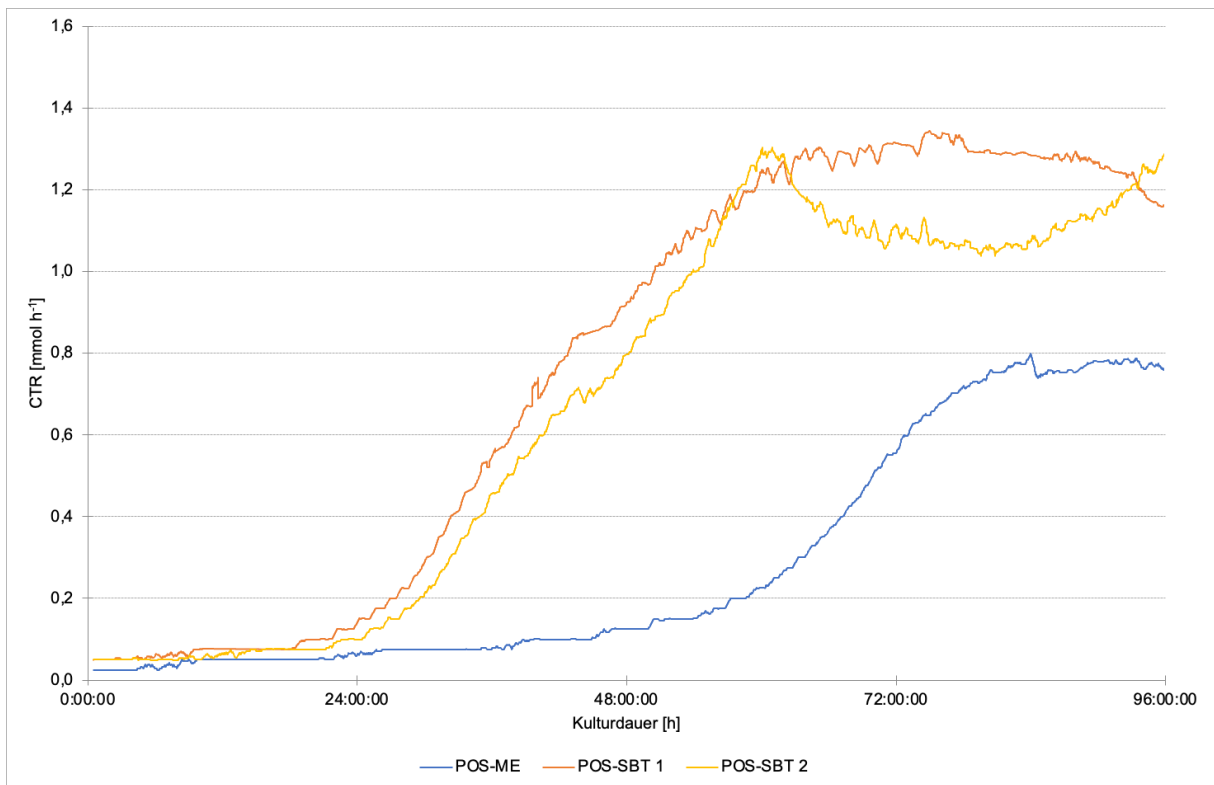


Abbildung 3-48: Kohlenstofftransferraten (CTR) der Fermentationen von Malzextraktmedium mit *Pleurotus ostreatus* (POS-ME) und Schwarzbierdrebermedium mit *P. ostreatus* (POS-SBT)

Für die online-Beurteilung des Pilzwachstums wurde ein Lebendzelldichtesensor (Incyte Arc, Hamilton) gemäß 2.2.1.12 verwendet. Ein Vergleich des Signals des Sensors und einer Wachstumskurve, die gemäß 2.2.1.12 aufgenommen wurde, zeigt einen ähnlichen Verlauf beider Kurven (Abbildung 3-49). Beim Vergleichen der Kurven mit dem im Medium gelösten Sauerstoff (DO) war erkennbar, dass das Pilzwachstum verzögert zur Abnahme des DO stattfand. Ein weiterer Vergleich des Signals des Lebendzelldichtesensors mit den Trockenmassen von *P. ostreatus* in Malzextraktmedium während der Fermentation zeigte ebenfalls eine Ähnlichkeit der Kurvenverläufe (Abbildung 3-50). Bei der Betrachtung der Kohlenstofftransferraten aus Fermentationen von Schwarzbierdreber mit *P. ostreatus* und dem Signal des Lebendzelldichtesensors während einer vergleichbaren Fermentation im 4,5 L-Maßstab, waren auch hier vergleichbare Kurvenverläufe erkennbar (Abbildung 3-51). Insgesamt beschrieb der Sensor neben der Abgasanalytik und der Analytik von Proben, die während den Fermentationen gezogen wurden, das Wachstum des Pilzes vergleichbar.

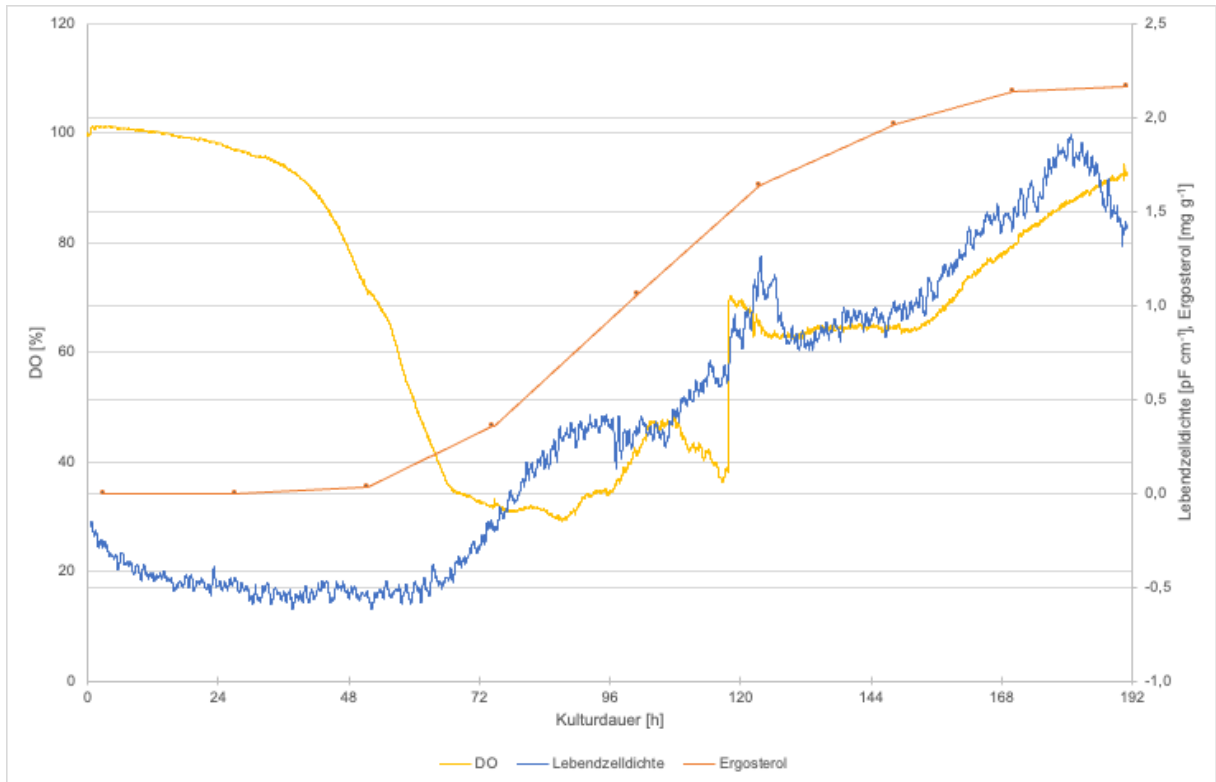


Abbildung 3-49: Kulturverlauf einer Fermentation von Schwarzbiertreber mit *P. ostreatus* unter Verwendung eines Lebendzellichtesensors (Incyte Arc, Hamilton) und täglicher Probenahme zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes. DO: gelöster Sauerstoff

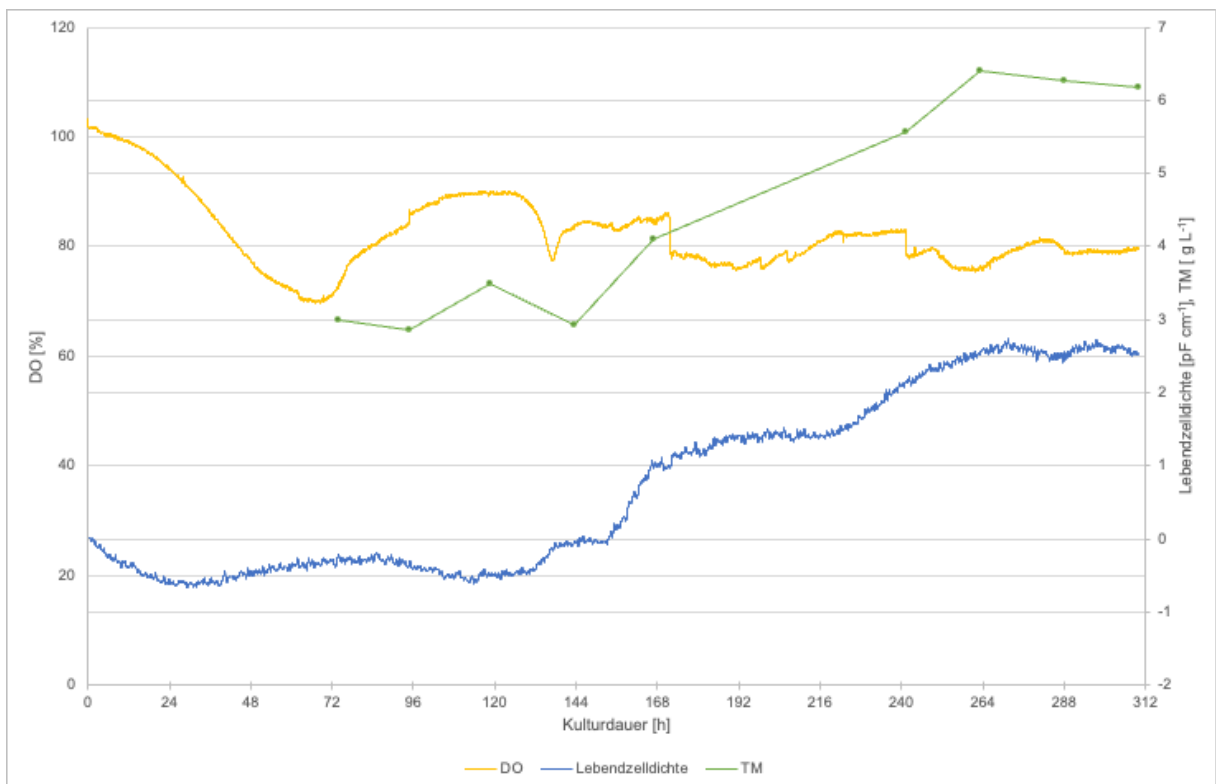


Abbildung 3-50: Kulturverlauf einer Fermentation von Malzextraktmedium mit *P. ostreatus* unter Verwendung eines Lebendzellichtesensors (Incyte Arc, Hamilton) und Probenahme zur Bestimmung der Trockenmasse (TM) an Kulturtag 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 und 13

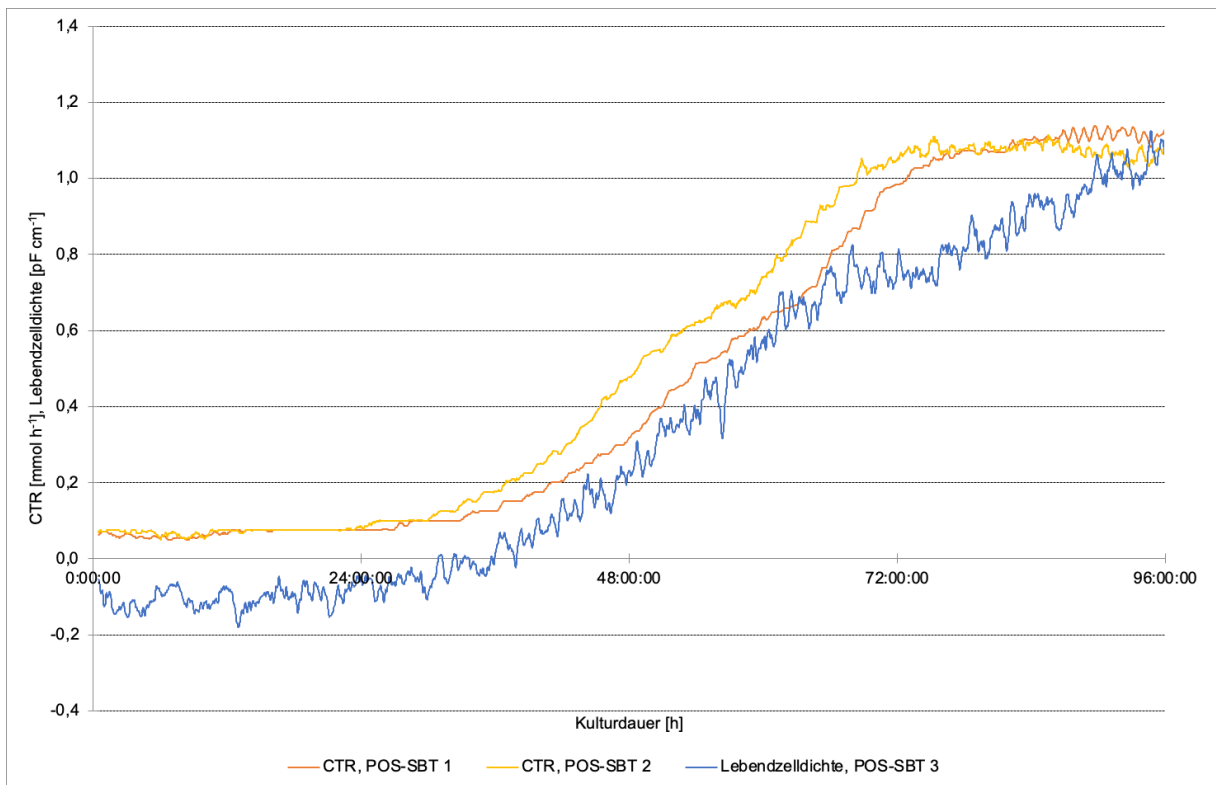


Abbildung 3-51: Vergleich des Signals des Lebendzellidichtesensors mit Kohlenstofftransferaten (CTR) aus verschiedenen Fermentationen von Schwarzbierdreber mit *P. ostreatus* (POS-SBT). Fermentation 1 und 2 wurden im 1 L-Maßstab und Fermentation 3 im 4,5 L-Maßstab kultiviert.

Für eine Quantifizierung des Pilzanteils wurde das Sensorsignal gegen die Trockenmassen aus der Fermentation von ME-Medium aus Abbildung 3-50 aufgetragen (Abbildung 3-52). Da ein linearer Zusammenhang erst ab etwa 144 h Fermentationsdauer festgestellt wurde, wurde für die Kalibriergerade nur der Zeitraum von 144 h bis zum Ende der Fermentation verwendet. Die Gleichung der Kalibriergeraden ist in Formel (3-3) dargestellt. Der lineare Regressionskoeffizient der Geraden betrug 0,9921.

$$TM = 1,2947 \cdot ZD + 2,9398 \quad (3-3)$$

Mit TM Trockenmasse des Pilzmyzels [g L^{-1}]
 ZD Lebendzellidichte [pF cm^{-1}]

Für die Daten der Fermentation aus Abbildung 3-49 wurde eine Trockenmasse des Pilzanteils von $4,7 \text{ g L}^{-1}$ berechnet. Unter Berücksichtigung der Gesamttrockenmasse von $145,2 \text{ g}$ und dem finalen Kulturvolumen von $4,7 \text{ L}$ entsprach dies einem Pilzanteil von 15%.

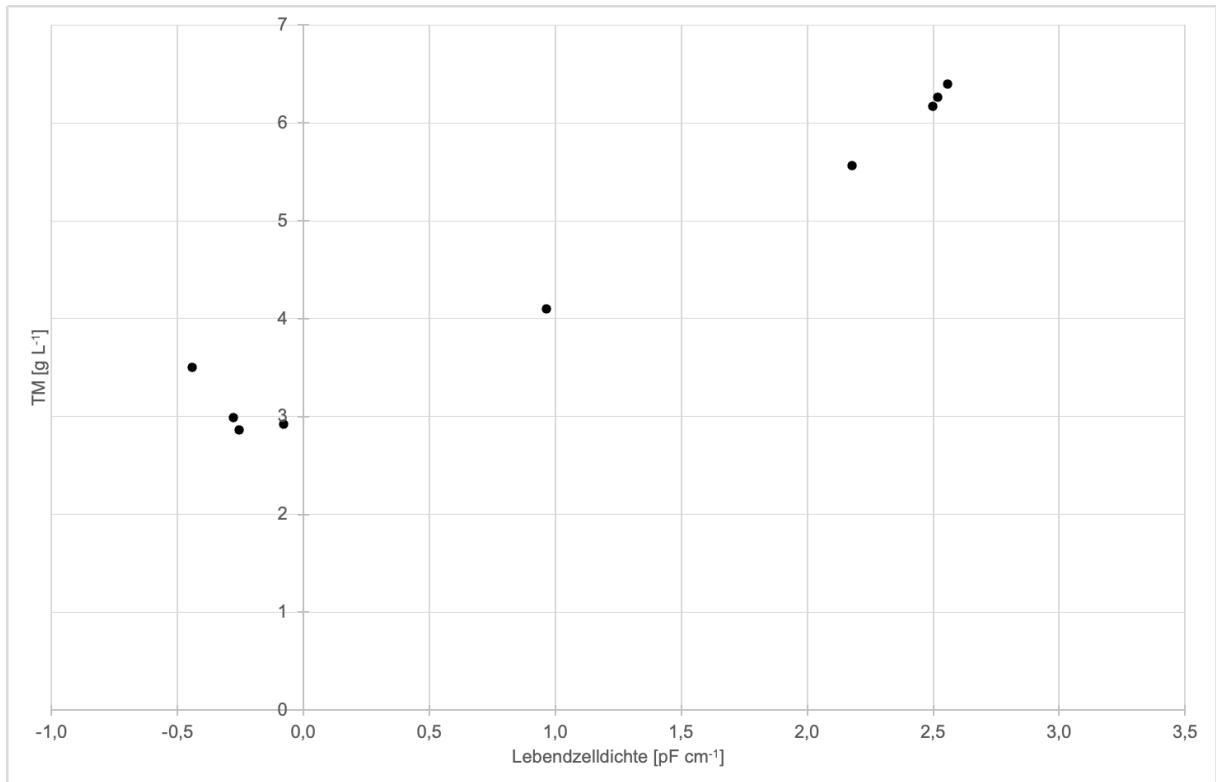


Abbildung 3-52: Auftragung des Signals des Lebendzellichtesensors gegen die Trockenmassen des Myzels aus der Fermentation von Malzextraktmedium mit *P. ostreatus* aus Abbildung 3-50

4 Diskussion

4.1 Substratanalytik

4.1.1 Biertreber

Der Vergleich verschiedener Literaturwerte für Protein-, Fett- und Aschegehalte von Biertreber zeigt große Spannweiten (Tabelle 4-1). Bei den Proteingehalten in Tabelle 4-1 handelt es sich überwiegend um Rohproteingehalte, die mit dem Kjeldahlfaktor 6,25 berechnet wurden. Santos et al. hingegen verwendeten einen Faktor für Getreide, der kleiner als 6,25 ist. Werden die in Kapitel 3.1 dargestellten Reinproteingehalte, die mit jeweils spezifischen Faktoren aus der Aminosäureanalytik berechnet wurden, in Rohprotein umgerechnet, betrug der Proteingehalt der in dieser Arbeit verwendeten Treber durchschnittlich $22 \text{ g (100 g)}^{-1}$. Dies entspricht den in Tabelle 4-1 angegebenen Literaturwerten für den Proteingehalt. Der Fettgehalt von Biertreber wurde im Vergleich zum Proteingehalt nicht in allen unten aufgeführten Publikationen bestimmt. Die relativen Schwankungen der Werte entsprechen jedoch denen der Proteingehalte. Für die in dieser Arbeit analysierten Treber wurde durchschnittlich ein Fettgehalt von $12 \text{ g (100 g)}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert liegt etwas über dem höchsten aufgeführten Literaturwert von Kanauchi et al. mit $10,6 \text{ g (100 g)}^{-1}$. Hierbei ist jedoch keine Angabe über die verwendete Methode zur Fettbestimmung zu finden. Der von Santos et al. bestimmte Fettgehalt wurde nur durch Extraktion erhalten. In dieser Arbeit wurde vor der Extraktion eine saure Hydrolyse durchgeführt. Diese führt zur Hydrolyse von gebundenen Fettbestandteilen wie Lipoproteinen oder Glykolipiden, die bei der anschließenden Extraktion miterfasst werden. Dementsprechend sind mit dieser Methode etwas höhere Fettgehalte erklärbar.

Gemäß Kapitel 3.1 wurde in den Trebern ein durchschnittlicher Aschegehalt von $2,8 \text{ g (100 g)}^{-1}$ analysiert. Dieser Wert passt zu den in Tabelle 4-1 aufgeführten Literaturwerten. Allerdings ist ein Großteil der Literaturwerte etwas höher als die in dieser Arbeit analysierten Aschegehalte von Biertreber. Grundsätzlich handelt es sich bei Biertreber um ein Produkt, das aus gekeimtem und gedarrtem Getreide und gegebenenfalls Zusätzen besteht. Dementsprechend sind Schwankungen der Zusammensetzung von Biertrebern zu erwarten. Je nach Biersorte variiert die Zusammensetzung des Malzes. Zusätzlich beeinflussen der Brauprozess und die dabei verwendeten Methoden die Zusammensetzung der Produkte einschließlich des Biertreibers (Santos et al. 2003; Robertson et al. 2010). Auch bei ausschließlicher Verwendung von Gerste beeinflussen Variationen der Sorte, des Erntezeitpunktes und der Anbauregion die Nährwerte (Santos et al. 2003).

Tabelle 4-1: Literaturwerte für Protein-, Fett- und Aschegehalte von Biertreber. Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse

	Protein [g (100 g) ⁻¹]	Fett [g (100 g) ⁻¹]	Asche [g (100 g) ⁻¹]
(Mussatto und Roberto 2005)	15,3	Nicht analysiert	4,6
(Kanauchi et al. 2001)	24,0	10,6	2,4
(Santos et al. 2003)	24,2	3,9	3,4
(Huige 1994)	28,0	7,2	4,0
(Prentice und Refsguard 1978)	31 – 36	6,7 – 9,6	4,3
(Robertson et al. 2010)	18,6 ± 4,5	Nicht analysiert	Nicht analysiert
(Resconi et al. 2024)	19,2	7,0	4,4

Die Aminosäureverteilung der in dieser Arbeit verwendeten Biertreber (siehe Abbildung 3-2) entsprach der in der Literatur beschriebenen Aminosäureverteilung von Biertreber (Abbildung 4-1). Die Aminosäure mit dem größten Anteil ist Glutamin bzw. Glutaminsäure. Diese werden analytisch zusammen erfasst.

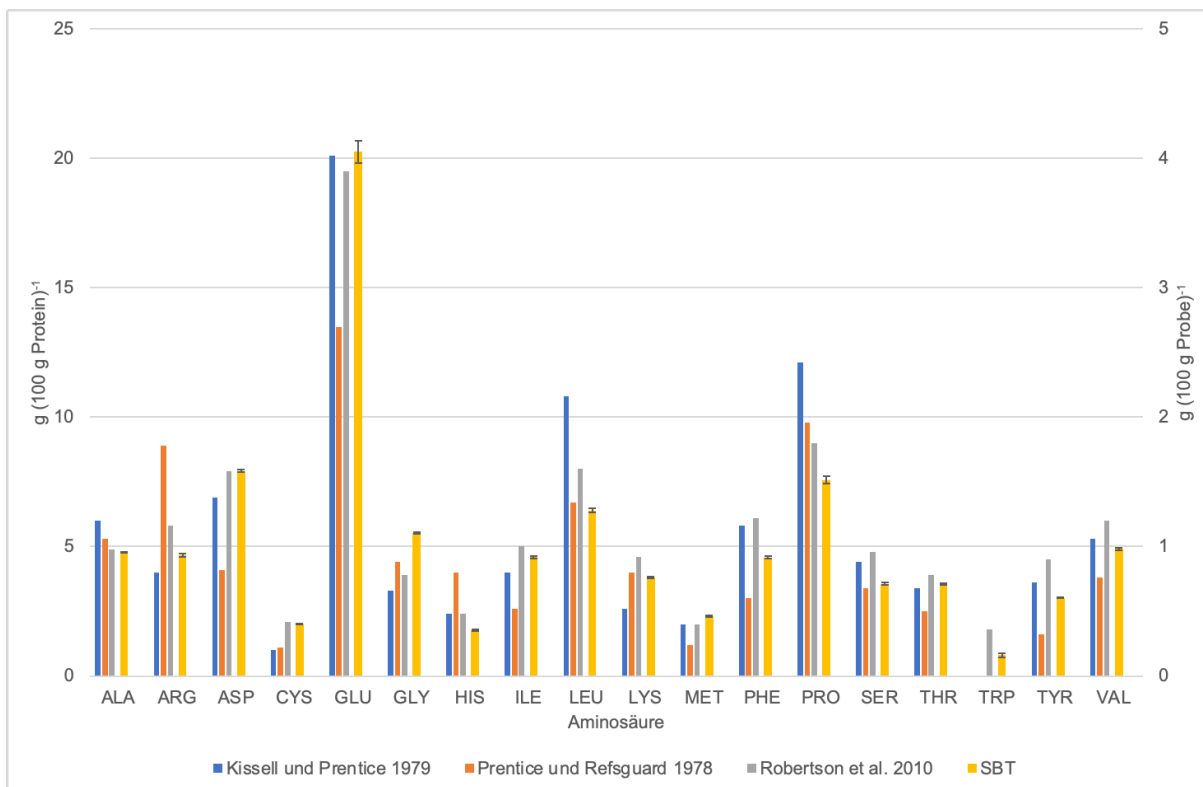


Abbildung 4-1: Aminosäureverteilung von Biertrebern gemäß Literatur (Prentice und Refsguard 1978; Kissell und Prentice 1979; Robertson et al. 2010) im Vergleich zur Aminosäureverteilung des verwendeten Schwarzbiertrreibers (SBT). Die Daten des SBT sind in g (100 g Probe)⁻¹ angegeben und die Literaturwerte in g (100 g Protein)⁻¹. Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

4.1.2 Hefe

Ein Vergleich von Literaturwerten für Protein-, Fett- und Aschegehalte von Altheefe ist in Tabelle 4-2 dargestellt. Der Aschegehalt der Hefe aus dieser Arbeit entsprach mit 6 g (100 g)^{-1} den Werten von Resconi et al. und Jäger et al.. Die Literaturwerte weisen für alle drei Parameter eine große Streuung auf. Gemäß Literatur führen die Wiederverwendung der Hefe, der Hefetyp und mögliche Vorbehandlungen im Brauprozess wie zum Beispiel ein Entbittern zu unterschiedlichen Zusammensetzungen der Altheefe (Schlabitz et al. 2024). Die Trocknung der Hefe verändert die Nährwerte leicht. Dies ist an den von Schlabitz et al. publizierten Werten erkennbar, die die Hefe vor den Analysen bei unterschiedlichen Temperaturen getrocknet hatten. In dieser Arbeit wurde die Altheefe vor den Analysen lyophyllisiert, was zu keiner starken thermischen Belastung der Probe führte.

Der Fettgehalt der in dieser Arbeit verwendeten Altheefe lag im Bereich der Literaturwerte und entsprach dem Wert von Jäger et al.. Auch der Proteingehalt der Altheefe entsprach den Literaturwerten, wobei der bestimmte Reinproteingehalt im unteren Bereich der Literaturwerte einzuordnen ist. Der Literaturwert von Jäger et al. entspricht jedoch dem Rohproteingehalt, da hier der Umrechnungsfaktor 6,25 verwendet wurde. Daher ist davon auszugehen, dass der Reinproteingehalt niedriger ist. Da Hefe mit 7% der Trockenmasse einen hohen Anteil an RNA besitzt, führt die Verwendung des Faktors 6,25 zur Überbestimmung des Proteingehaltes (Martini et al. 1979; Caballero-Córdoba und Sgarbieri 2000).

Tabelle 4-2: Literaturwerte für Protein-, Fett- und Aschegehalte von Altheefe. Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse. a: Hefe aus Pilsener Herstellung, sprühgetrocknet bei 45 °C, b: Hefe aus Weißbierherstellung, sprühgetrocknet bei 45 °C, c: Hefe aus Pilsener Herstellung, sprühgetrocknet bei 75 °C, d: Hefe aus Weißbierherstellung, sprühgetrocknet bei 75 °C

	Protein [g (100 g)^{-1}]	Fett [g (100 g)^{-1}]	Asche [g (100 g)^{-1}]
(Huige 1994)	48	1	7
(Resconi et al. 2024)	40,33	0,43	6,35
(Schlabitz et al. 2024)	^a 48,4 ± 0,78	^a 0,44 ± 0,19	^a 4,04 ± 0,19
	^b 31,08 ± 0,65	^b 0,24 ± 0,04	^b 5,61 ± 0,09
	^c 50,68 ± 0,11	^c 0,33 ± 0,09	^c 6,85 ± 0,07
	^d 35,76 ± 0,27	^d 0,14 ± 0,09	^d 5,89 ± 0,08
(Emerich Heringer et al. 2023)	53,94 ± 1,32	5,34 ± 0,08	4,70 ± 0,15
(Jaeger et al. 2024)	35,39 ± 1,50	1,36 ± 0,09	5,63 ± 0,32

Die Aminosäureverteilung der verwendeten Altheefe entspricht überwiegend der in der Literatur beschriebenen (Abbildung 4-2). Da bei den Aminosäureprofilen aus verschiedenen Publikationen unterschiedliche Hefe-Proben verwendet wurden, sind gewisse Unterschiede

erklärbar. In allen Arbeiten stellte Glutamin bzw. Glutaminsäure die dominante Aminosäure dar. Vieira et al. verwendeten einen Extrakt aus Altheife von *Saccharomyces pastorianus* und bestimmten die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin als limitierend (Vieira et al. 2016). Auch bei Zhu et al. waren diese beiden Aminosäuren limitierend (Zhu et al. 2022). In dieser Arbeit wurde Tryptophan als erste limitierende Aminosäure festgestellt. Cystein und Methionin waren auch limitierend, jedoch mit einem höheren CS als Tryptophan.

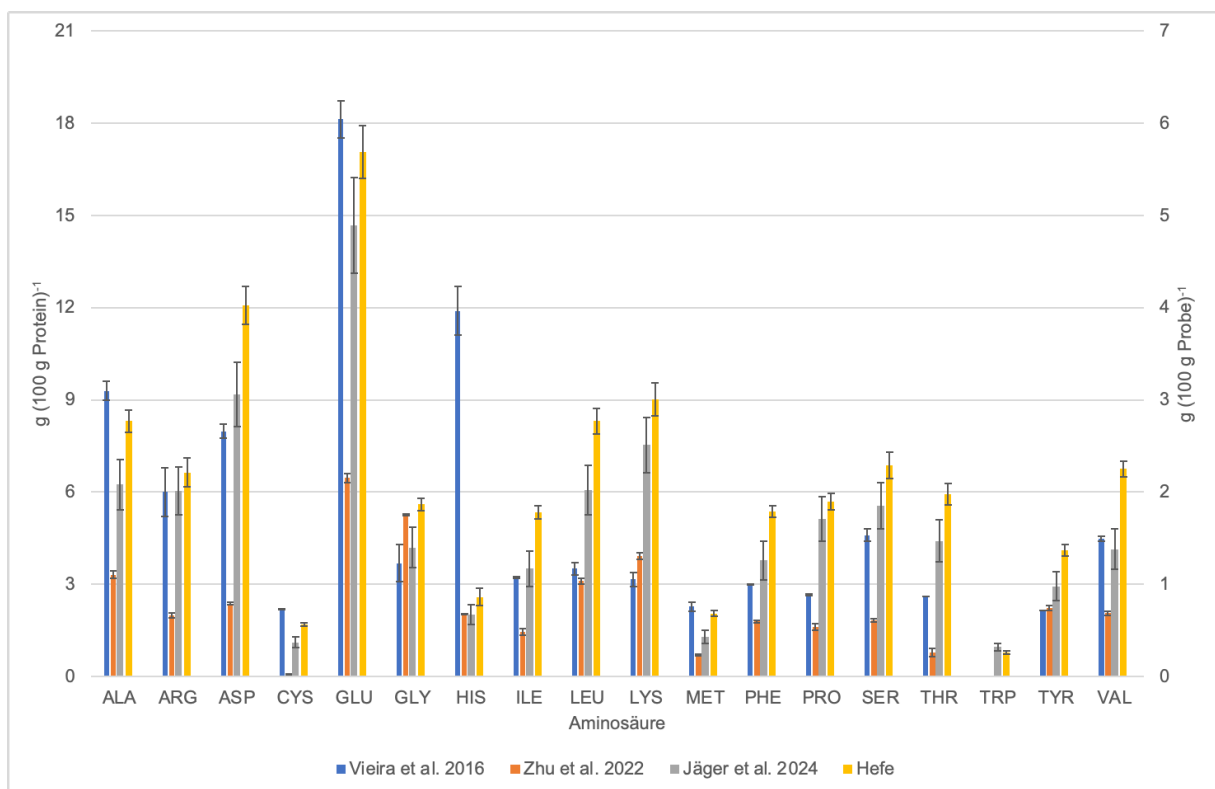


Abbildung 4-2: Aminosäureverteilung von Altheife gemäß Literatur (Vieira et al. 2016; Zhu et al. 2022; Jaeger et al. 2024) im Vergleich zur Aminosäureverteilung der verwendeten Hefe. Die Daten der Hefe und die Angaben von Jäger et al. sind in $\text{g (100 g Probe)}^{-1}$ angegeben und die von Vieira et al. und Zhu et al. in $\text{g (100 g Protein)}^{-1}$. Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

4.1.3 Würze

Für Würze gibt es deutlich weniger Vergleichswerte in Bezug auf die Nährwerte als für Treber und Altheife. In Bezug auf die Trockenmasse entsprechen etwa 90-92% Kohlenhydraten. Darunter sind hauptsächlich die Monosaccharide Glucose und Fructose, die Disaccharide Maltose und Saccharose sowie Maltotriose als Trisaccharid (MacWilliam 1968). In dieser Arbeit wurde aus den Protein-, Fett- und Aschegehalten ein Kohlenhydratanteil von $(93,3 \pm 0,3) \text{ g (100 g)}^{-1}$ ermittelt, was dem in der Literatur beschriebenen Gehalt entspricht. Der in dieser Arbeit bestimmte Aschegehalt von $(1,54 \pm 0,04) \text{ g (100 g)}^{-1}$ entsprach ebenfalls der Literatur. Hier wird ein Wert von 1,5% bis 2% Asche angegeben (MacWilliam 1968).

Allgemein wird beschrieben, dass 4% bis 5% der Trockenmasse von Würze auf stickstoffhaltige Substanzen zurückzuführen sind. Dabei reichen die Angaben für den Gesamtstickstoffgehalt bei MacWilliam von $63 \text{ mg (100 mL)}^{-1}$ bis $110 \text{ mg (100 mL)}^{-1}$. Hierbei wurde jedoch nicht beschrieben, mit welcher Methode die Gehalte ermittelt wurden (MacWilliam 1968). Lund et al. bestimmten einen Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl von 950 mg L^{-1} (Lund et al. 2014). Für die in dieser Arbeit verwendete Würze wurde ein Reinproteingehalt von $(4,35 \pm 0,09) \text{ g (100 g)}^{-1}$ bestimmt, was einem Gesamtstickstoffgehalt von $(0,89 \pm 0,02) \text{ g (100 g)}^{-1}$ bezogen auf die Trockenmasse entspricht. Unter der Berücksichtigung der Dichte der Würze von $1,114 \text{ g mL}^{-1}$ ergibt sich ein Gesamtstickstoffgehalt von $267 \text{ mg (100 mL)}^{-1}$, was deutlich über den zuvor beschriebenen Literaturwerten liegt. Lund et al. geben neben dem Gesamtstickstoffgehalt auch einen Proteingehalt an, der durch die Summe der einzelnen Aminosäuren berechnet wurde. Dieser betrug $3,748 \text{ g L}^{-1}$ (Lund et al. 2014). Weitere Proteingehalte wurden photometrisch für zwei verschiedene Würzen bestimmt. Diese Proteingehalte betragen $(9,16 \pm 0,35) \text{ g L}^{-1}$ und $(11,4 \pm 0,42) \text{ g L}^{-1}$ (Gorinstein et al. 1999). Unter erneuter Berücksichtigung der Dichte ließ sich für die hier verwendete Würze ein Reinproteingehalt von 13 g L^{-1} berechnen. Dieser Wert liegt leicht über den Literaturwerten, jedoch zeigt die Spannweite der Literaturwerte, dass der Proteingehalt schwanken kann. Für die der Berechnung des Reinproteingehaltes in dieser und der Arbeit von Lund et al. sind die Konzentrationen der Aminosäuren entscheidend. Diese hängen vom Stickstoff-Gehalt des verwendeten Malzes und der beim Mälzen und Maischen eingesetzten Technologie ab. Außerdem wird die Stickstoffkonzentration bereits durch die Malzzusammensetzung beeinflusst (MacWilliam 1968).

Für den Fettgehalt werden in der Literatur $84,0 \text{ mg L}^{-1}$ und $134,0 \text{ mg L}^{-1}$ für zwei Süßwürzen, also Würze vor dem Kochen mit Hopfen, aufgeführt (Bravi et al. 2009). Als Rohfettgehalt für Würze nach der Hopfen-Zugabe werden $(50 - 70) \text{ mg L}^{-1}$ genannt (MacWilliam 1968). In der in dieser Arbeit verwendeten Würze wurde ein Fettgehalt von 2 g L^{-1} analysiert. Dieser Wert übersteigt die Literaturwerte deutlich. Die von Bravi et al. aufgeführten Fettgehalte wurden jedoch nur mittels Soxleth-Extraktion erhalten, während in dieser Arbeit zuvor ein saurer Aufschluss erfolgte. Hierdurch werden an Matrixbestandteilen wie Proteinen haftende Lipide gelöst und miterfasst. Als genaue Methode zur Bestimmung des Lipid-Gehaltes wird die Extraktion nach mild saurer Hydrolyse von gefriergetrockneter Würze beschrieben (Anness und Reud 1985). Genau dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Wie bei den anderen Zwischenprodukten und Nebenströmen wird der Lipidgehalt durch die Technologie des Brauprozesses beeinflusst. Maische-Filter führen beispielsweise zu höheren Lipid-Gehalten in der Würze als andere Verfahren. Für einen Maische-Filter beträgt das Verhältnis des Fettgehaltes zwischen Treber und Würze 20:1, während für einen Läuterbottich das Verhältnis 79:1 beträgt (Anness und Reud 1985). Unter der Annahme des Fett-

Verhältnisses bei der Verwendung eines Maische-Filters passen die Fettgehalte von Würze und Biertreber in dieser Arbeit zusammen.

Die Aminosäureverteilung, die in dieser Arbeit bestimmt wurde, stimmt mit den Literaturwerten aus Abbildung 4-3 überein. In der verwendeten Würze waren Glutaminsäure und Prolin die dominanten Aminosäuren, wobei der Gehalt an Glutaminsäure höher war. In der Arbeit von Lund et al. war Glutaminsäure ebenfalls die Aminosäure mit dem höchsten Gehalt. Prolin wurde hier hingegen nicht nachgewiesen (Lund et al. 2014). Bei Otter, Taylor und MacWilliam war Prolin mit Abstand die Aminosäure mit dem größten Anteil im Protein, während der Glutaminsäuregehalt im Bereich der anderen Aminosäuren lag. Die große Standardabweichung von Prolin bei MacWilliam ist darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um einen Mittelwert aus verschiedenen Würzen handelt. Anhand der Fehlerbalken für alle Aminosäuren ist erkennbar, dass je nach Art der Würze Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren auftreten. MacWilliam gibt als einziger Tryptophangehalte an. Diese liegen jedoch deutlich über dem in dieser Arbeit bestimmten.

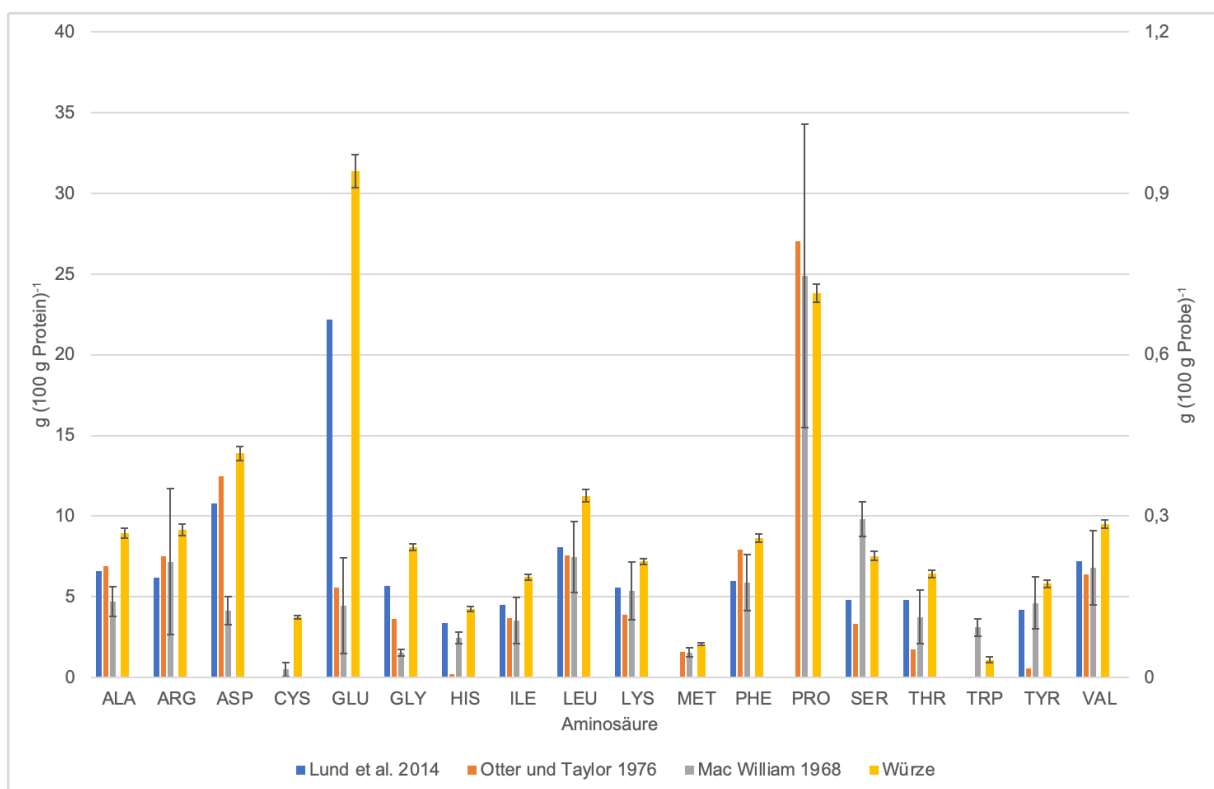


Abbildung 4-3: Aminosäureverteilung von Würze laut Literatur (MacWilliam 1968; Otter und Taylor 1976; Lund et al. 2014) im Vergleich zur Aminosäureverteilung der verwendeten Würze. Die Werte von MacWilliam sind Mittelwerte von neun verschiedenen Würzen und dementsprechend mit Standardabweichung angegeben. Die Daten der Würze sind in $\text{g (100 g Probe)}^{-1}$ und die Literaturwerte in $\text{g (100 g Protein)}^{-1}$ angegeben. Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

4.1.4 Malzkeime

Der Aschegehalt der in dieser Arbeit verwendeten Malzkeime betrug $4,4 \text{ g (100 g)}^{-1}$ und war damit vergleichbar mit Literaturdaten (Tabelle 4-3). Der Fettgehalt lag über den Literaturwerten, wobei, wie zuvor beschrieben, vor der Extraktion eine saure Hydrolyse durchgeführt wurde. Zusätzlich schwanken die Fettgehalte zwischen den unterschiedlichen Bestandteilen der Malzkeime. Salama et al. analysierten Malzkeime und deren Fraktionen. In Bezug auf den Fettgehalt wiesen die Keimlinge mit $5,59 \text{ g (100 g)}^{-1}$ deutlich höhere Werte auf als die Wurzeln und Spelzen. Mengenmäßig machten sie jedoch den kleinsten Anteil aus (Salama et al. 1997). Der in dieser Arbeit analysierte Fettgehalt für die Malzkeime liegt etwas darunter und ist somit als realistisch anzusehen.

Tabelle 4-3: Literaturwerte für Protein-, Fett- und Aschegehalte von Malzkeimen. Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse

	Protein [g (100 g)^{-1}]	Fett [g (100 g)^{-1}]	Asche [g (100 g)^{-1}]
(Huige 1994)	27,5	1,5	6,8
(Waters et al. 2013)	36,75	1,7	2,88
(Salama et al. 1997)	$21,84 \pm 0,14$	$2,55 \pm 0,09$	$0,73 \pm 0,05$

Der Reinproteingehalt der in dieser Arbeit verwendeten Malzkeime ist deutlich niedriger als die Literaturwerte in Tabelle 4-3. Unter der Verwendung des allgemeinen Umrechnungsfaktors für Lebensmittel von 6,25 wurde ein Rohproteingehalt von $19,4 \text{ g (100 g)}^{-1}$ berechnet. Dieser liegt etwas unter dem Wert von Salama et al. Im Vergleich der Fraktionen stellten sie fest, dass der Rohproteingehalt der Spelzen weniger als die Hälfte der Gehalte von Keimlingen und Wurzeln ausmachte (Salama et al. 1997). Die Anteile von Keimlingen, Wurzeln und Spelzen der verwendeten Malzkeime ist nicht bekannt.

Das analysierte Aminosäureprofil aus Abbildung 3-2 stimmt mit dem aus der Literatur überein (Abbildung 4-4). Die hohen Werte für Asparagin- und Glutaminsäure von Robbins und Pomeranz und für Histidin bei Waters et al. scheinen Ausreißer zu sein. In dieser Arbeit entsprachen die Werte den beiden jeweils niedrigeren Konzentrationen. In den analysierten Malzkeimen war Glutaminsäure die prominenteste Aminosäure. Für Tryptophan lag der analysierte Wert zwischen den Literaturwerten, wobei Robbins et al. kein Tryptophan analysierten. Salama et al. gaben als limitierende Aminosäuren Methionin und Cystein an, während in dieser Arbeit Tryptophan als limitierend bestimmt wurde. Im Vergleich geben Salama et al. einen höheren Tryptophan-Gehalt als der in dieser Arbeit bestimmte an (Salama et al. 1997). Unter der Verwendung der Berechnungen aus Kapitel 2.2.2.6 lässt sich für die Werte von Waters et al. eine biologische Wertigkeit von 32 und 76 für die Werte von Salama et al. berechnen. Waters et al. nennen zwar keine Werte für Lysin, aber sie schreiben, dass es

nicht limitierend ist. Die in dieser Arbeit bestimmte biologische Wertigkeit liegt mit 95 deutlich über den aus Literaturdaten bestimmten (Tabelle 3-1). Die biologischen Wertigkeiten für die Literaturwerte haben jedoch eine große Spannweite, in die der hier berechnete Wert fällt.

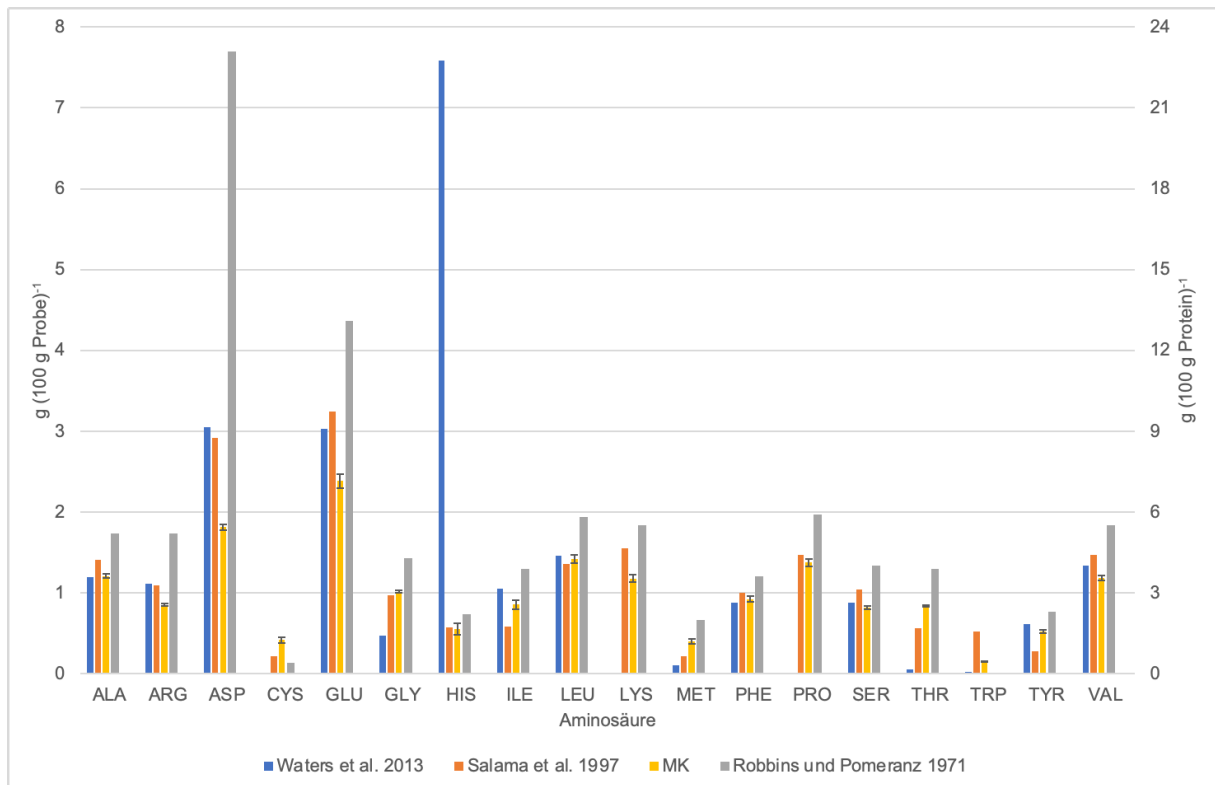


Abbildung 4-4: Aminosäureverteilung von Malzkeimen laut Literatur (Robbins und Pomeranz 1971; Salama et al. 1997; Waters et al. 2013) im Vergleich zur Aminosäureverteilung von den verwendeten Malzkeimen (MK). Die Daten der Malzkeime sowie von Waters et al. und Salama et al. sind in $\text{g (100 g Probe)}^{-1}$ angegeben. Bei den Daten von Robbins und Pomeranz handelt es sich um $\text{g (100 g Protein)}^{-1}$. Waters et al. machen keine Angaben zu Cys und Lys. Robbins und Pomeranz haben kein Trp analysiert. Salama et al. fassen Cys und Met zusammen. Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

4.2 Screening in Emerskultur

Neben den in dieser Arbeit analysierten und bereits diskutierten Inhaltsstoffen von Biertreber sind weitere Hauptbestandteile Zellulose, Hemizellulose und Lignin. Diese entsprechen über 50% der Trockenmasse (Kanauchi et al. 2001; Mussatto und Roberto 2005). Basidiomyceten sind dafür bekannt, Enzyme zu sekretieren, die diese Stoffe abbauen. Daraus beziehen die Pilze ihre Nährstoffe und können Biomasse aufbauen (Lübeck und Lübeck 2022; Scholtmeijer et al. 2023). In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Nebenströme aus der Lebensmittelindustrie als Nährmedium für die Kultivierung von Basidiomyceten evaluiert (Ahlborn et al. 2019). Biertreber wurde bereits ebenfalls als Medienbestandteil verwendet. In vielen Publikationen, die unter anderem von Xiros und Christakopoulos aufgelistet wurden, wurden bereits einige Bakterien, Ascomyceten und wenige Basidiomyceten zur

Enzymgewinnung auf Biertreber-Medien kultiviert (Xiros und Christakopoulos 2012). In einigen Arbeiten wurde Biertreber bereits als Medienbestandteil für die Kultivierung von Fruchtkörpern von *Pleurotus*-Spezies verwendet. In diesen Publikationen wurde jedoch nicht wie in dieser Arbeit ausschließlich Biertreber verwendet (Wang et al. 2001; Gregori et al. 2008; de Souza et al. 2022; do Nascimento Deschamps et al. 2024). Mit dem Myzel von *Trametes versicolor* wurden die Nährwerte und Eigenschaften von Biertreber verbessert, um diesen in der Lebensmittelproduktion zu verwenden (Zeko-Pivač et al. 2022). In einer weiteren Publikation wurden unter anderem *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Agrocybe aegerita*, *Lepista nuda* und *Lentinula edodes* in Bezug auf die Produktion von Xylanase und Xylooligosacchariden mit Biertreber untersucht. Die Kultivierungen erfolgten hier submers und als Festbettkultivierung. Im Vergleich zu dieser Arbeit enthielt das Medium bei beiden Kultivierungsmethoden neben Biertreber auch andere Stoffe, die das Wachstum der Pilze beeinflussen (da Silva Menezes et al. 2017). All diese Beispiele zeigen bereits, dass sich Biertreber für die Kultivierung von Basidiomyceten eignet. Die meisten der 144 im Emersscreening untersuchten Pilze zeigten Wachstum auf den drei Biertrebern. Unter den 27 Kandidaten, die für das Submersscreening geeignet erschienen, waren vier *Pleurotus*-Spezies, jeweils zwei *Trametes*- und *Lentinus*-Stämme sowie *Agrocybe aegerita*. Einige dieser Pilze wurden bereits unter anderem in der Arbeit von da Silva Menezes et al. erfolgreich mit Biertreberanteil im Medium kultiviert. Daher scheint es nicht verwunderlich, dass diese Kandidaten ein gutes Wachstum im Emersscreening aufwiesen.

Laetiporus sulphureus und *Fomitopsis pinicola* wurden primär wegen des würzigen Geruchs der Kulturen als Kandidaten für das Submersscreening ausgewählt. *L. sulphureus* ist in der Literatur bereits für seinen würzigen Geruch bekannt (Krings et al. 2011; Yalman et al. 2023). Da *L. sulphureus* nach dem Submersscreening jedoch nicht weiter kultiviert wurde, wurde dieser Aspekt nicht weiter untersucht. Bei der Fermentation von Weizenkleie mit *F. pinicola* wurde ein starker Anstieg der Konzentration von 4-Ethylguajacol über die Fermentationsdauer beobachtet (Tu et al. 2020). Dieser Aromastoff wird in der Literatur als rauchig und schinkenartig beschrieben (Franitza et al. 2016). Möglicherweise war der würzige Geruch, der auch in den Submerskulturen wahrgenommen wurde, unter anderem auf diesen Aromastoff zurückzuführen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde jedoch nicht mit *F. pinicola* gearbeitet und daher wurden keine Analysen zum Aroma durchgeführt.

Die Platten von *Kuehneromyces mutabilis*, *Agrocybe pediades* und *Hypsizygus marmoreus* waren nach sieben Tagen deutlich unter 70% bewachsen. Diese Organismen wurden aufgrund ihres dichten Wachstums jedoch auch als geeignet für die Submerskultur eingeschätzt. Der Fokus in dieser Arbeit lag auf der Produktion von proteinreichem Pilzmyzel in Submerskultur. Ein dichter Myzelrasen wurde daher neben einem schnellen Bewuchs der Treber-Agar-Platten als Indikator für gutes Wachstum angesehen.

4.3 Screening in Submerskultur

In den Vorarbeiten für das Submersscreening in Kapitel 3.3 konnte durch die Trockenmassen und Rohproteingehalte keine allgemeine, ideale Treber-Konzentration für die Pilzfermentation ermittelt werden. Zwar stiegen die Trockenmassen mit zunehmender Treber-Konzentration an, jedoch war in den Biomassen noch Treber enthalten. Es ist davon auszugehen, dass mit zunehmender, eingesetzter Treber-Menge auch die Konzentration an nicht-fermentiertem Treber-Rückstand in der Biomasse anstieg. Die Proteingehalte in den Biomassen wurden demnach durch nicht fermentierten Treber beeinflusst. Für die Berechnung wurde der Faktor 6,25 verwendet, der die realen Proteingehalte in den Biomassen nicht wiedergibt. Es ist bekannt, dass Pilze relevante Mengen an Nicht-Protein-Stickstoff enthalten. Dazu zählen Chitin, Nucleinsäuren und Harnstoff. Nicht alle höheren Pilze enthalten Harnstoff und die nachgewiesenen Konzentrationen variieren stark. Daher sollte der Faktor 4,38 für die Berechnung des Rohproteingehaltes in Pilzen verwendet werden (Kurkela 1980; Scholtmeijer et al. 2023). Da es sich bei den Biomassen um Mischungen aus Biertreber und Pilzmyzel verschiedener Pilze handelte, entspricht die Berechnung mit dem Faktor 4,38 jedoch ebenfalls nicht der Realität. Zudem unterscheiden sich die Mengen und Verhältnisse von Pilzinhaltstoffen wie Protein je nach Spezies und verwendetem Stamm, sowie Kultivierungsbedingungen und dem Alter bzw. Entwicklungsstadium. Dementsprechend ist für die Angabe der korrekten Proteingehalte jeweils eine Aminosäureanalyse erforderlich (Scholtmeijer et al. 2023). Diese ist jedoch zeitaufwändig und kostenintensiv. Da es sich hier lediglich um eine Vorarbeit für die Auswahl eines geeigneten Organismus handelte, wurde deshalb auf eine Aminosäureanalyse verzichtet. Ziel des Experimentes war zu ermitteln, ob es eine eindeutige Präferenz für eine Konzentration gab und daher war der Vergleich des Rohproteingehaltes mit identischem Faktor für alle Proben ausreichend. Da keine allgemeine Präferenz der Pilze für eine Treber-Konzentration festgestellt wurde, erschien die Wahl der mittleren Konzentration für das Screening sinnvoll. Die optimale Treber-Konzentration wurde nach dem Screening im Rahmen der Optimierung der Kulturbedingungen in Kapitel 3.5.3 ermittelt.

Die Zerkleinerung des Trebers vor der Fermentation wurde aus sensorischen Gründen als notwendig angesehen. Ein verbessertes Wachstum der verwendeten Testorganismen in zerkleinertem Treber-Medium war in Abbildung 3-8 teilweise zu erkennen. In der Literatur wird ebenfalls eine Vorbehandlung des Trebers empfohlen, da die Enzymaktivität für die Hydrolyse von Zellulose und Hemizellulose durch Lignin, welches wie eine Barriere wirkt, und die hohe Kristallinität der Zellulose limitiert wird (Beldman et al. 1987; Macheiner et al. 2003). Eine Zerkleinerung des Materials führt zu einer größeren Oberfläche und somit zu einer verbesserten Zugänglichkeit (Gharpuray et al. 1983).

Macheiner et al. analysierten den Zuckergehalt nach der Extraktion von unterschiedlich vorbehandeltem Biertreber. Hierbei wurde etwas mehr Gesamtzucker nach dem Mixen des getrockneten Trebers in einem Küchenmixer im Vergleich zum unbehandelten Treber festgestellt. Nach dem Erhitzen einer nicht zerkleinerten Treber-Suspension für 20 min bei 120 °C wurde ein höherer Gesamtzuckergehalt festgestellt. Der mit Abstand größte Gesamtzuckergehalt wurde nach Mikrowellenbestrahlung für 10 min bei 160 °C analysiert (Macheiner et al. 2003). Die Autoren fassten zusammen, dass physikalische Verfahren allein nur zu geringfügig höheren Zuckergehalten führten. Sie sehen eine Kombination von Extrusion und enzymatischer Vorbehandlung als vielversprechend an. In der vorliegenden Arbeit wurde der Treber ab den Fermentationen im Bioreaktor mittels Mixer zerkleinert und das Medium vor der Verwendung autoklaviert. Somit ist davon auszugehen, dass nach diesen Vorbehandlungen neben den verbesserten sensorischen Eigenschaften eine geringfügig verbesserte Verfügbarkeit der Saccharide gegeben war. Für eine Überprüfung dieser Vermutung würde eine Analyse des wässrigen Anteils des Mediums im Hinblick auf den Zuckergehalt Aufschluss geben.

Das Wachstum der Pilze wurde anhand des Ergosterolgehaltes verglichen. Da in der Biomasse nach der Fermentation noch Treber enthalten ist, ist eine Korrelation des Pilzanteils über die Trockenmasse nicht aussagekräftig. Da Ergosterol fast exklusiv in Pilzen vorkommt, wurde es als Biomarker für Pilzanteile bereits verbreitet verwendet (Manter et al. 2001; Steudler und Bley 2015a; Mansoldo et al. 2020).

4.4 Optimierung der Vorkultur

Die Vorkulturen in dieser Arbeit wurden primär in ME-Medium kultiviert. Das Wachstum von *Pleurotus ostreatus* war schnell in diesem Medium im Vergleich zum Biertreber und da es sich um ein lösliches Medium handelt, war eine gute Handhabbarkeit als Inokulum gegeben. Im Hinblick auf einen möglichen industriellen Prozess ist dieses Vorgehen jedoch teuer. Bei Malzextrakt handelt es sich nicht um einen Nebenstrom der Brauindustrie und dementsprechend müsste dieser zugekauft werden.

Neben einer Kostenersparnis könnte die Nutzung von Brauereinebenströmen als Vorkulturmedium bereits eine Adaption des Pilzes an das Hauptkulturmedium bewirken. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Produktion von extrazellulären Enzymen zum Abbau von Lignocellulose in Medien mit leicht zugänglichen Kohlenstoffquellen wie Glucose inhibiert ist. Im Gegensatz dazu wird die Enzymproduktion bei Anwesenheit von komplexen Kohlenhydraten und „Hunger“ des Organismus getriggert (Lübeck und Lübeck 2022).

Im Malzextrakt sind größere Mengen löslicher Zucker enthalten, während unlösliche Bestandteile wie Zellulose und Lignin nicht vorhanden sind. In Anwesenheit von Biertreber in

der Vorkultur könnte die Sekretion lignocellulolytischer Enzyme angeregt und ein besseres Wachstum in der Hauptkultur erzielt werden. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Kulturführung über mehrere Generationen aus Kapitel 3.6.2.

Neben der Medienzusammensetzung ist für die Enzymproduktion auch die Kultivierungsmethode entscheidend. In einem Vergleich einer „klassischen“ Submersfermentation mit einer Kombination aus Festbettkultivierung auf einem lignocellulosehaltigem Substrat und anschließender Flüssigkultivierung, wurde bei der Kombination beider Verfahren eine höhere Enzymproduktivität festgestellt (An et al. 2016). Hierbei wurde jedoch nicht untersucht, ob durch die Kombination der Kultivierungsmethoden auch eine höhere Ausbeute an Pilzmyzel auftrat. Eine Festbettkultivierung wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da das Ziel der Arbeit die Gewinnung von proteinreichem Myzel aus der Flüssigkultivierung war. Möglicherweise würde diese Methode in Kombination mit der submersen Kultivierung zu einem verbesserten Pilzwachstum beitragen. In zukünftigen Arbeiten könnte dieses Verfahren für die Fermentation von Treber mit *P. ostreatus* getestet werden. In Kapitel 4.2 wurde bereits diskutiert, dass Festbettkulturen von *P. ostreatus* auf Treber-Medium bereits in der Literatur beschrieben sind.

Die Supplementierung von Würze und Altheife in Kapitel 3.4 ohne Einstellung des pH-Wertes führte zu keiner Verbesserung des Myzelwachstums im Vergleich zu Treber-Kulturen ohne Supplement. Der niedrige pH-Wert erklärt das ausbleibende Pilzwachstum. Für *P. ostreatus* wird in der Literatur in der Regel ein initialer pH-Wert von 6 als ideal beschrieben (Bakratsas et al. 2024; Hamza et al. 2024; Guan et al. 2025). Bei einem initialen pH-Wert von 4 findet nur ein schlechtes Wachstum statt (Manu-Tawiah und Martin 1987; Furlan et al. 1997). Ein gutes Wachstum des in dieser Arbeit verwendeten *P. ostreatus* Stamms wurde im neutralen bis leicht basischem Milieu festgestellt (s. Abbildung 3-15). Daher wurden die Vorkulturen in Treber-Medium mit Würze und Altheife mit einem neutral eingestellten pH-Wert wiederholt. Der initiale pH-Wert der Hauptkulturen in SBT-Medium wurde optimiert (siehe Kapitel 3.5.3). Für weitere Untersuchungen zur Vorkultur mit Treber-Medium könnte der optimierte pH-Wert verwendet werden.

Da bei der Supplementierung mit Würze ohne pH-Wert-Einstellung keine Unterschiede zwischen den Kulturen festgestellt wurden, wurden die beiden höchsten Konzentrationen mit initial eingestelltem pH-Wert wiederholt. Für die Supplementierung mit Altheife wurden die niedrigsten Konzentrationen gewählt. Das Wachstum wurde anhand des Ergosterolgehalts der Kulturen beurteilt. Da Altheife selbst Ergosterol enthält, ist der Ergosterolgehalt nach der Fermentation teilweise auf den Ergosterolgehalt der Hefe zurückzuführen. Eine Differenzierung zwischen dem Gehalt der Hefe und dem neu gebildeten Ergosterol während der Fermentation war analytisch nicht möglich. Die niedrigsten Hefezusätze wurden

verwendet, um den Einfluss des Ergosterolgehaltes der Hefe auf den Ergosterolgehalt der Biomassen nach der Fermentation möglichst gering zu halten.

Die Supplementierung des Treber-Mediums mit Malzkeimen führte zu einer höheren Feststoffkonzentration im Medium und dieses wurde viskoser. Die erhöhte Viskosität des Mediums könnte aus technologischer Sicht für Herausforderungen bei der Förderung der Vorkulturen in einen Reaktor sorgen. Daher wurden keine weiteren Versuche mit Malzkeimen durchgeführt. Im Labormaßstab konnte lediglich ME-Medium für die Vorkulturen eingesetzt werden, da dieses löslich ist und die homogenisierten Vorkulturen somit in Spritzen und dünnen Schläuchen mit Pumpen handhabbar waren. Der Einsatz von Treber in Vorkulturen für die Bioreaktoren im Labormaßstab war in dieser Arbeit nicht machbar, da der Feststoffanteil des Trebers zu einer Verstopfung der Schläuche und Spritzen führte. Im industriellen Maßstab ist jedoch eine Förderung mittels Schnecken möglich.

Für eine mögliche, zukünftige Verwendung von Biertreber-Würze-Medium für die Vorkultur sollten die Konzentrationen beider Medienbestandteile sowie die Kulturdauer optimiert werden. Für die Temperatur und den pH-Wert könnten die bereits in Kapitel 3.5.3 optimierten Bedingungen für die Hauptkultur verwendet werden.

4.5 Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren und Optimierung der Batch-Fermentation

4.5.1 Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren

Das Rühren der Fermentationsbrühe sorgt für eine Durchmischung und Sauerstofftransport. Wenn die Fermentationsbrühe nicht ausreichend durchmischt wird, können sich stagnierende Zonen bilden (Gibbs et al. 2000). Höhere Rührgeschwindigkeiten führen neben einem höheren Massentransfer gleichzeitig zu einer erhöhten mechanischen Beanspruchung der Zellen. Daraus können Veränderungen im Wachstum und der Morphologie sowie das Zerstören von Zellstrukturen resultieren (Cui et al. 1998; Papagianni 2004). Bei der Übertragung der Fermentation vom Schüttelkolben in den Bioreaktor wurde zunächst die Rührgeschwindigkeit beibehalten. Dies resultierte in einem Verklumpen des Biertreibers mit dem Pilzmyzel an der Oberfläche der Kulturflüssigkeit (Abbildung 3-19). Durch das Rühren gelangten Teile des Myzels aus der Flüssigkeit und wuchsen an der Gefäßwand emers weiter. Dies ist bereits in der Literatur für Pilzmyzel beschrieben (Camici et al. 1952). Durch das langsame Rühren setzte sich vermehrt Substrat und Myzel in der strömungsarmen Region ab. Ein moderates Erhöhen der initialen Rührgeschwindigkeit behob das Problem und beeinflusste das Pilzwachstum nicht negativ. *Pleurotus ostreatus* wurde bereits in Bioreaktoren bei 200 rpm erfolgreich kultiviert (Zadrazil 1978; Bakratsas et al. 2024).

Neben dem Rühren ist der Luftfluss für die Sauerstoffübertragung relevant. Der in der Kaskade festgelegte Bereich für die Luftzufuhr reichte aus, um den festgelegten DO-Wert von mindestens 30% zu gewährleisten. Daher wurde die Luftzufuhr nicht verändert. Bei dem gewählten Sollwert für den DO handelte es sich um den im Institut standardmäßig verwendeten Wert. Für *P. ostreatus* wurde in mehreren Arbeiten ein besseres Wachstum bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen festgestellt. Hierbei wurden ein initialer DO von 10% und kontinuierliche Luftzufuhr von 1 *vvm* (*vessel volumes per minute*) verwendet (Zadrazil 1978; Marquez-rocha et al. 1999; Gern et al. 2008). In dieser Arbeit wurde eine initiale Luftzufuhr von 0,1 *vvm* bei einem DO von 30% verwendet. Eine Optimierung des Sollwerts für den DO könnte demnach zu einer Verbesserung des Pilzwachstums führen und wäre für eine weitere Maßstabsvergrößerung interessant. Eine zu geringe Sauerstoffzufuhr kann jedoch eine Sauerstofflimitierung darstellen und somit inhibierend auf das Wachstum wirken (Zadrazil 1978; Bodizs et al. 2007).

4.5.2 Optimierung der Batch-Fermentation im Bioreaktor mittels DOE

Die Regressionskoeffizienten, die die Vorhersagefähigkeit des Modells beurteilen, waren für beide Antwortgrößen relativ niedrig. Ein hoher Regressionskoeffizient allein erlaubt jedoch keine Aussage, ob das Modell für Vorhersagen geeignet ist oder nicht. Durch ein Hinzufügen zusätzlicher Variablen könnte der Regressionskoeffizient verbessert werden. Allerdings würde durch ein einfaches Verbinden aller Datenpunkte die Güte des Modells nicht verbessert. Das adjustierte R^2 berücksichtigt die Anzahl der Modell-Terme. Daher kann dieser Wert einen Hinweis auf *overfitting* geben (Anderson und Whitcomb 2017). Für beide Ergosterol-Antwortgrößen hatten die ausgewählten Modelle das höchste adjustierte R^2 und waren somit am besten geeignet. Die zwei quadratischen Terme C^2 und D^2 im Modell für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}] wiesen die größten F-Werte auf und waren sehr signifikant. Das spricht ebenfalls dafür, dass das gewählte, quadratische Modell gut geeignet war. Für einen guten Fit des Modells sollten die vorhergesagten mit den tatsächlichen Werten idealerweise übereinstimmen (Baş und Boyacı 2007). Wie in Abbildung 3-26 gezeigt, entsprachen die vorhergesagten Werte überwiegend den experimentell bestimmten. Größere Abweichungen zeigten sich bei den Läufen, in denen kein Ergosterol nachgewiesen wurde, aber ein Wert abweichend von null vorhergesagt wurde. Da sich sehr kleine Ergosterol-Peaks nicht mehr integrieren ließen, wurden diese als null angesehen. Anhand Tabelle 6-3 ist ersichtlich, dass es sich bei den Kulturbedingungen, bei denen kein Ergosterol quantifizierbar war, insbesondere um hohe Treberkonzentrationen, sehr niedriges Inokulumvolumen oder hohe Temperaturen handelte. In diesen Grenzbereichen des Faktorraums ist die Voraussagekraft der Modelle dementsprechend nicht gut. Eine Extrapolation über den Faktorraum hinaus wird nicht empfohlen, da nicht sicher ist, ob das Modell über die definierten Grenzen hinaus

zutreffend ist (Baş und Boyacı 2007). Ein Indiz über die Vorhersagefähigkeit des Modells gibt R_{pred}^2 . Dieses war für beide Modelle niedrig und wich deutlich von R_{adj}^2 ab. Idealerweise sollten Modelle die ermittelten Daten nicht nur gut abbilden, sondern auch zuverlässige Prognosen zulassen (Anderson und Whitcomb 2017). Durch die Bestätigungsläufe wurde jedoch gezeigt, dass die vorhergesagten Werte zu den ermittelten Werten passten. Obwohl R_{pred}^2 für das Ergosterol-Modell [mg g^{-1}] deutlich niedriger als für das Modell [mg L^{-1}] war, passte der ermittelte Wert sehr gut zum vorhergesagten.

Die Maximierung des Ergosterolgehaltes in Bezug auf die Trockenmasse und das Kulturvolumen sowie eine gleichzeitige Minimierung des Inokulumvolumens wurden durch die Optimierung erreicht. Ein direkter Vergleich der optimierten Ergosterolgehalte mit Werten vor der Optimierung ist nur bedingt möglich. Die Kulturdauer in Kapitel 3.5.3 war auf vier Tage begrenzt, während in anderen Fermentationen dieser Arbeit längere Kulturzeiträume verwendet wurden. Läufe, die annähernd unter den Standardbedingungen (17 g TM L^{-1} SBT, 5% Inokulum, 4,2 initialer pH-Wert, $24 \text{ }^\circ\text{C}$ Temperatur) im Rahmen des DOE durchgeführt wurden, sind Lauf 4, 13, 19 und 33. Beim Vergleich der Ergosterolgehalte in Tabelle 6-3 mit den Ergosterolgehalten, die unter optimierten Kulturbedingungen erhalten wurden, fällt auf, dass manche der Versuchsläufe höhere Ergebnisse erzielten als die Optimalbedingungen. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass die Versuche überwiegend in Einzelbestimmungen erfolgten. Bei Lauf 4 und Lauf 13 handelte es sich um die gleichen Bedingungen. Die Ergosterolgehalte schwankten jedoch. Diese Schwankungen werden in den Modellen berücksichtigt. Ein weiterer Grund für die Abweichung war die Reduzierung des Inokulumvolumens im Rahmen der Optimierung. Bei den optimierten Bedingungen wurde demnach das kleinstmögliche Inokulumvolumen verwendet, das hohe Ergosterolgehalte zulässt, um im Hinblick auf einen industriellen Prozess Kosten für das Inokulum einzusparen. Pilze der Gattung *Pleurotus* sind dafür bekannt, dass sie innerhalb eines großen Temperaturbereichs wachsen. Hierbei wird in der Literatur ein Bereich von $15 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $31 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgeführt (Rajaratnam et al. 1987), wobei für Submerskulturen von *P. ostreatus* überwiegend Temperaturen von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $28 \text{ }^\circ\text{C}$ genutzt wurden (Manu-Tawiah und Martin 1987; Papaspyridi et al. 2010; Hultberg und Bodin 2019; Papadaki et al. 2019; Bakratsas et al. 2023; Hamza et al. 2024; Guan et al. 2025). Darüber hinaus sind auch Kulturen in flüssigen und festen Medien bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ beschrieben (Furlan et al. 1997; Garduño et al. 2024). Grundsätzlich sind die optimale Temperatur und Medienzusammensetzung von *P. ostreatus* Stammspezifisch (Bugarski et al. 2002). Der Einfluss der Temperatur war in beiden Modellen signifikant und wies einen sehr kleinen p-Wert auf. Dementsprechend hatte die Temperatur einen großen Einfluss auf den Ergosterolgehalt.

Der initiale pH-Wert allein war in keinem der beiden Modelle signifikant. Allerdings war er in den höheren Termen und in Kombination mit anderen Variablen statistisch relevant. Das steht

im Widerspruch zu den Ergebnissen aus Abbildung 3-4, in der das Pilzwachstum mit zunehmendem pH-Wert anstieg. Somit hatte der pH-Wert hier einen direkten Einfluss auf das Pilzwachstum. Die Wechselwirkung von initialem pH-Wert und Temperatur, die in Abbildung 3-23 dargestellt ist, war im Modell für den Ergosterolgehalt [mg g^{-1}] signifikant. Der Term CD, der diese Wechselwirkung beschreibt, ist in beiden Modellen enthalten. In anderen Studien, die ebenfalls die Kultivierungsbedingungen von *P. ostreatus* optimierten, war der pH-Wert jeweils signifikant und es wurden optimale pH-Werte von 6,5 und 6 beschrieben (Hamza et al. 2024; Guan et al. 2025). In diesen Publikationen wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit mit vollständig flüssigen Medien gearbeitet und das Pilzwachstum direkt über die Trockenmasse abgebildet. Außerdem legten diese Arbeiten neben der Trockenmasse den Exopolysaccharidgehalt oder den Selengehalt als Antwortgrößen fest. Die Variablen waren dabei neben dem pH-Wert Temperatur und Rührgeschwindigkeit, beziehungsweise Konzentrationen von Medienbestandteilen (Hamza et al. 2024; Guan et al. 2025). Dementsprechend handelt es sich dabei um andere Modelle mit teils anderen und weniger Variablen und anderen Zielen. Somit ist eine Vergleichbarkeit dieser Arbeiten untereinander nicht möglich. Generell wird jedoch für viele Flüssigkulturen von *P. ostreatus* ein initialer, oftmals optimierter pH-Wert von 6 angegeben (Papaspayridi et al. 2010; Bakratsas et al. 2023; Hamza et al. 2024; Guan et al. 2025). In einer weiteren Veröffentlichung wird ein optimaler pH-Wert von 8 beschrieben (Jonathan et al. 2011).

Bei der Durchführung eines DOE ist es wichtig, die Versuche so durchzuführen, dass die Parameter, die nicht variiert werden sollen, möglichst konstant gehalten werden. Das begünstigt die Aussagekraft des Modells (Anderson und Whitcomb 2017; Politis et al. 2017). Im Verlauf der Arbeit wurde mit unterschiedlichen Treber-Chargen gearbeitet. Für die Durchführung der Experimente im Rahmen des DOE wurde darauf geachtet, dass ausschließlich eine Treber-Charge verwendet wurde. Zu Beginn der Experimente war diese frisch. Da die Experimente über mehrere Monate durchgeführt wurden, ist unklar, ob beziehungsweise welche Veränderungen am Treber auftraten. Überdies ist unklar, ob die hohen pH-Werte, die zu Beginn der Fermentation eingestellt wurden, Veränderungen am Treber hervorriefen.

Die Korrelation von Ergosterolgehalt und Biomasse variiert je nach Temperatur (Stuedler und Bley 2015b). Da die Temperatur im Rahmen der Optimierung variiert wurde, könnte dadurch der Ergosterolgehalt beeinflusst worden sein. Das könnte auch ein Grund für die hohe Signifikanz der Temperatur in beiden Modellen sein. Dies wurde während der Optimierung nicht berücksichtigt. Dieser Einfluss könnte dazu beigetragen haben, dass die adjustierten und vorhergesagten R^2 der Modelle weiter auseinander lagen. Der Ergosterolgehalt eignete sich im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit evaluierten Methoden zur Bestimmung des

Pilzanteils jedoch am besten. Eine genaue Diskussion der verschiedenen Methoden erfolgt in Kapitel 4.8.

4.6 Ansätze zur Verbesserung der Kulturführung

4.6.1 Dauer des Dispergierens

Das Dispergieren von Myzel führt zu einer Verteilung von Hyphen-Fragmenten, die jeweils zu Pellets wachsen. Zweck et al. beobachteten bei der Verwendung eines nicht dispergierten Myzel-Stücks von *Fomes annosus* ein sehr langsames und unregelmäßiges Wachstum. Ein Dispergieren mittels Ultraturrax für 30 s hingegen sorgte für eine sehr feine, gleichmäßige Verteilung von Hyphen und ein besseres Wachstum (Zweck et al. 1978). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen aus Abbildung 3-30, in der für ein Dispergieren von 30 bis 120 s höhere Trockenmassen im Vergleich zum nicht dispergierten Myzelstück erhalten wurden. Für *Pycnoporus cinnabarius* wurden Kombinationen aus verschiedenen Geschwindigkeiten und Zeiten beim Dispergieren getestet. Die Autoren folgerten anhand ihrer Ergebnisse, dass das Myzel bei hohen Scherkräften einheitlicher wird. Die idealen Parameter waren 25.000 rpm und 30 s (Jones et al. 1993). Auch für *Inonotus hispidus* wurde bereits beschrieben, dass das Dispergieren des Myzels zu höheren Trockenmassen und einheitlicherem Myzel führt. Hier wurde die höchste Biomasse bei 26.000 rpm und 3 min festgestellt. Bei einer längeren Zeit des Dispergierens wurde ein Rückgang der Biomasse verzeichnet (Shen et al. 2025). Der Rückgang der Biomasse nach einer gewissen Zeit des Dispergierens ist auf das Absterben von Zellen zurückzuführen. Für *Pleurotus ostreatus* wurde in dieser Arbeit kein starker Rückgang der Trockenmasse über den Zeitraum bis 5 min verzeichnet.

Das Dispergieren sorgt für eine Verteilung von Hyphen-Fragmenten, aus denen neue Pellets gebildet werden. Kleine, wenig kompakte Pellets werden für die Kultivierung von Pilzen bevorzugt, da hier ein besserer Stoffaustausch möglich ist. Ein limitierender Faktor für das Pilzwachstum ist die Sauerstoffkonzentration. Bei kleinen, durchlässigen Pellets kann Sauerstoff bis ins Innere des Pellets gelangen, während bei größeren und dicht gewachsenen Pellets kaum Sauerstoff ins Innere gelangt. In Folge dessen tritt im Inneren die Autolyse ein, die in einem Hohlraum des Pellets resultiert (Camici et al. 1952; Styogantseva et al. 1989; Papagianni 2004; Shen et al. 2025). Dies erklärt den Anstieg des Ergosterolgehalts in Abbildung 3-31 mit zunehmender Turraxdauer. Wie für *Pycnoporus cinnabarius* zuvor beschrieben, sorgen höhere Scherkräfte für einheitliche Myzel-Fragmente. Je länger die Turraxdauer für *P. ostreatus* war, desto einheitlicher und kleiner waren die Myzel-Fragmente. Dies resultierte in kleinen, einheitlichen Pellets, in denen ein schneller Stoffaustausch gewährleistet war. Dementsprechend waren die Pellets mit zunehmender Turraxdauer vitaler, was dem Anstieg des Ergosterolgehaltes entspricht. Eine mikroskopische Analyse der

Vorkulturen nach dem Dispergieren wurde nicht durchgeführt. Diese sollte zur Überprüfung der zuvor beschriebenen Annahme durchgeführt werden.

Im Hinblick auf einen industriellen Prozess stellte sich die Frage, ob ein Homogenisieren der Vorkultur notwendig ist und ob die standardmäßig verwendeten 30 s dabei einzuhalten sind. Das Dispergieren ist grundsätzlich notwendig und eine längere Turraxdauer bis zu 5 min förderte das Pilzwachstum. In einem industriellen Prozess und in einem größeren Maßstab sollte eine Optimierung der Parameter beim Dispergieren durchgeführt werden. Zusätzlich zu der in dieser Arbeit variierten Dauer scheint die Geschwindigkeit des Dispersionswerkzeugs ein relevanter Parameter zu sein. Dies geht aus der Publikation von Jones et al. hervor, die unterschiedliche Geschwindigkeiten für das Dispergieren getestet haben (Jones et al. 1993).

4.6.2 Kulturführung über mehrere Generationen

Der Prozess einer mehrfachen Batch-Fermentation (*repeated-batch fermentation*, RBF) wurde bereits für verschiedene Basidiomyceten wie *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* und *P. ostreatus* verwendet, um die Produktion von Enzymen oder Exopolysacchariden zu verbessern. Bei diesem Verfahren wird ein Teil oder das gesamte Medium durch frisches Medium ersetzt und das Myzel wird über mehrere Fermentationen weiterverwendet (Yup Jang et al. 2002; Krishna Prasad et al. 2006; Birhanli und Yesilada 2010; Wan Mohtar et al. 2016). In den Publikationen, deren Ziel die Laccase-Produktion war, wurden durch den RBF-Prozess höhere Mengen an Laccase gewonnen. Dies wurde auf einen Anstieg der Zellkonzentration im Laufe des Prozesses zurückgeführt (Yup Jang et al. 2002; Birhanli und Yesilada 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführten Kulturreihen über mehrere Generationen ähneln dem RBF-Prinzip. Im Vergleich zu diesen Veröffentlichungen wurde hier jedoch mit einem nicht vollständig löslichen Medium aus SBT gearbeitet. Die Trennung von Myzel und SBT-Resten aus dem Medium war nicht möglich. Ein Austausch des Mediums, wie er in der Literatur durchgeführt wurde, konnte dementsprechend nicht erfolgen. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit entsprechen dennoch denen aus der Literatur, da im Verlauf über mehrere Generationen ein Anstieg des Ergosterolgehalts festgestellt wurde. Daraus wurde eine Verbesserung des Pilzwachstums geschlossen. In der Literatur wurde ein Verkürzen der Fermentationsdauer festgestellt. Die Autoren führten dies auf eine verkürzte stationäre Phase zu Beginn der Fermentation zurück, da der Pilz bereits an das Medium und die Kulturbedingungen angepasst war (Chaves et al. 2014; Wan Mohtar et al. 2016). In allen RBF-Prozessen wurde zwischen vier und acht Zyklen ein Rückgang der Produktivität festgestellt. Teilweise wurde beobachtet, dass sich die Zellmorphologie änderte und größere Pellets oder bei fixiertem Myzel eine sehr dichte Struktur auftrat. Der Stoffaustausch war dadurch erschwert und führte zu dem Rückgang der Produktivität (Krishna Prasad et al. 2006; Chaves et al. 2014; Ji et al. 2014). In dieser Arbeit wurde das Myzel vor der Weiterverwendung dispergiert und ein Teil davon als

Inokulum für das frische Medium verwendet. Somit wurde dem Entstehen von sehr großen und dichten Pellets entgegengewirkt. Bei dieser Kulturreihe wurde in der vierten Generation kein Rückgang des Pilzwachstums festgestellt. Da das Kultivieren über mehrere Generationen bislang nur in Schüttelkolben mit definierter Kulturdauer durchgeführt wurde, liegen über die Fermentationsdauer und eine potentielle Reduzierung dieser keine Daten vor. Neben der Zeitersparnis wird nicht für jede neue Charge eine neue Vorkultur benötigt, was Kosten einspart.

Die Wiederverwendung des Kulturüberstands wurde ebenfalls getestet, um Kosten in einem industriellen Prozess möglichst zu minimieren. Für die Fermentationen werden große Mengen Trinkwasser benötigt, die durch ein Wiederverwenden des Kulturüberstandes als Teil des Mediums reduziert werden können. Das Ersetzen von flüssigem Medium bei einer mehrfachen Batch-Fermentation verringert die Konzentration von Inhibitoren oder toxischen Metaboliten, die sich negativ auf das Pilzwachstum auswirken (Chaves et al. 2014). Bei der Wiederverwendung des Kulturüberstands akkumulieren derartige Stoffe. Für die RBF von *Ganoderma lucidum* wurden Exopolysaccharide bereits als solche Metabolite beschrieben (Wan Mohtar et al. 2016). Außerdem sind verschiedene Pilze der Abteilung Basidiomycota in der Lage organische Säuren wie Oxalsäure zu produzieren. Eine Anreicherung dieser führt zu einem abgesenkten pH-Wert, der das Wachstum negativ beeinflussen kann (Liaud et al. 2014). In dieser Arbeit wurde jedoch kein Absinken des pH-Wertes festgestellt. Die pH-Werte der Kulturen über mehrere Generationen wiesen pH-Werte im neutralen Bereich auf. Wie bereits zuvor diskutiert, war das Wachstum von *P. ostreatus* bei pH-Werten im neutralen bis basischen Bereich besser als im sauren (vgl. 4.4 und 4.5).

In den Kulturüberstand werden Enzyme sekretiert. Bei Weißfäulepilzen wie *P. ostreatus* sind darunter Laccasen, Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen, die für den Ligninabbau verantwortlich sind (Hou et al. 2004; Arunkumar und Sheik Abdulla 2015). Da der Kulturüberstand steril geerntet und vor der weiteren Verwendung nicht autoklaviert wurde, ist davon auszugehen, dass auch eine Anreicherung von Enzymen stattfand. Diese begünstigen den Fermentationsprozess und erklären die höheren Ergosterolgehalte von Generation eins und vier im Vergleich zur Ursprungsgeneration. Für die Wiederverwendung des Kulturüberstands über mehrere Generationen wurden nach vier Generationen keine negativen Effekte auf das Pilzwachstum festgestellt.

4.6.3 Fed-Batch

Für die Verbesserung der Exopolysaccharid-Produktion und die Gewinnung ligninolytischer Enzyme mit Basidiomyceten sind in der Literatur bereits Fed-Batch Versuche beschrieben. In allen Publikationen führte die Fütterung von Glucose oder Sojaöl zu einer höheren Produktausbeute (De Baets et al. 2002; Hu et al. 2009; Zhu und Sun 2009; El-Enshasy et al.

2010). Hu et al. und Zhu und Sun stellten zusätzlich zur höheren Produktausbeute eine höhere Pilzbiomasse durch die Fütterung fest. Auch in dieser Arbeit wurde durch die Fütterung mit Bierwürze eine höhere Biotrockenmasse erzielt. Bei der Kultur von *Tremella fuciformis* wurden Unterschiede im Pilzwachstum zwischen Batch und Fed-Batch Fermentation erst ab der späten exponentiellen Phase sichtbar. Insgesamt wurden durch die Fütterung eine höhere Zelldichte und Zellvitalität erreicht. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in der Fed-Batch Fermentation war niedriger und stieg deutlich später als während der Batch-Fermentation an. Die Autoren korrelierten dies mit dem höheren Zellwachstum (Zhu und Sun 2009). In dieser Arbeit wurde die Fed-Batch Fermentation im Bioreaktor an Kulturtag sieben abgebrochen, um einen Vergleich der Ausbeute zwischen Batch und Fed-Batch Fermentation unter vergleichbaren Bedingungen zu ermöglichen. In den Batch-Fermentationen wurde nach Tag sechs ein kontinuierlicher Anstieg des DO festgestellt und deswegen die Fermentation an Kulturtag sieben beendet (vgl. Abbildung 3-49). Im Verlauf der Fed-Batch Fermentation war kein Anstieg des gelösten Sauerstoffs erkennbar (Abbildung 3-38). Dies entspricht der Beobachtung von Zhu und Sun. Eine längere Kulturdauer der Fed-Batch Fermentation und somit mehr Pilzbiomasse wäre somit voraussichtlich möglich.

Die Wahl von Bierwürze als Feed und die damit verbundene höhere Pilzausbeute passt zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.4. Für ein verbessertes Wachstum in der Vorkultur sorgte ebenfalls Bierwürze.

Der Zeitpunkt der Fütterung wurde lediglich im Schüttelkolben untersucht. Da das Wachstum im Schüttelkolben und Bioreaktor nicht direkt vergleichbar sind, wäre eine genauere Untersuchung des geeigneten Fütterungszeitpunkts sinnvoll (El-Enshasy et al. 2010). El-Enshasy et al. zogen für die Bestimmung des Fütterungszeitpunkts die Daten der Abluftanalytik zurate. Eine reduzierte Sauerstoffaufnahme und CO₂-Abgabe von *P. ostreatus* zeigten sich bei einer Nährstofflimitierung. Kurz bevor diese eintrat, erfolgte die Fütterung mit Glucose (El-Enshasy et al. 2010). Da auch in dieser Arbeit mit *P. ostreatus* gearbeitet wurde, wäre eine Bestimmung des geeigneten Fütterungszeitpunkts durch die Abluftanalytik auch denkbar.

Eine zu hohe Nährstoffkonzentration zu Beginn der Fermentation kann das Pilzwachstum inhibieren, da diese den Sauerstofftransport beeinflusst (Gibbs et al. 2000; El-Enshasy et al. 2010). Bei der Zugabe des Würze-Feed war im Kulturverlauf ein starkes Absinken des DO zu erkennen (Abbildung 3-38). Durch die automatische Erhöhung des Gasflusses und der Rührgeschwindigkeit wurde dies ausgeglichen. Eine direkte Zugabe von Würze in das SBT-Medium erfolgte bei der Optimierung der Vorkultur im Schüttelkolben (Kapitel 3.4). Allerdings handelte es sich hierbei um Vorkulturen, die durch ein Myzelstück aus der Emerskultur inokuliert wurden. Bei den Fed-Batch Kulturen hingegen handelte es sich um Hauptkulturen. Außerdem wurde für die Vorkulturen lediglich 20 g L⁻¹ Würze verwendet, während die

Würzekonzentration im Medium nach der Fütterung 50 g L^{-1} betrug. Ob eine direkte Verwendung der Würze im Medium zu einer Wachstumshemmung führt, ist derzeit unklar.

4.7 Analytik der Biomasse

4.7.1 Chemische Analytik

Der in dieser Arbeit analysierte Fettgehalt für das Myzel von *Pleurotus ostreatus* in ME-Medium (Abbildung 3-39) stimmt mit den Werten von Manu-Tawiah und Martin überein (Tabelle 4-4). Der ermittelte Aschegehalt war niedriger als die Literaturwerte. In den synthetischen Medien von Manu-Tawiah und Martin sowie Hadar und Cohen-Arazi, die für die Kultivierung von Myzel verwendet wurden, waren neben Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen zusätzlich Salze enthalten. Die Mineralstoffkonzentration im Medium scheint dementsprechend den Aschegehalt des Myzels zu beeinflussen. Dies wurde bereits für verschiedene Basidiomyceten beschrieben (Jennison et al. 1957). Da in dieser Arbeit lediglich ME und keine zusätzlichen Salze verwendet wurden, erklärt dies den niedrigeren Aschegehalt im Vergleich zu den Literaturwerten.

Tabelle 4-4: Literaturwerte für Protein-, Fett- und Aschegehalte von Myzel von *P. ostreatus*. Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse.

	Protein [g (100 g)^{-1}]	Fett [g (100 g)^{-1}]	Asche [g (100 g)^{-1}]
(Hadar und Cohen-Arazi 1986)	$24,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,1$
(Onuoha et al. 2021)	$21,2 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,0$	$3,3 \pm 0,0$
(Manu-Tawiah und Martin 1987) Torf-Extrakt	$40,1 \pm 1,8$	$3,7 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,6$
(Manu-Tawiah und Martin 1987) synthetisches Medium	$25,7 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,7$

Der ermittelte Proteingehalt für das Myzel von *P. ostreatus* in ME-Medium liegt im Bereich der Literaturwerte. Bei den Literaturwerten handelt es sich allerdings um Rohproteingehalte. Der von Hadar und Cohen-Arazi bestimmte Proteingehalt wurde mit der Coomassie-Methode bestimmt, während die anderen Werte über den Kjeldahl-Stickstoff mit dem Umrechnungsfaktor 6,25 erhalten wurden. Der Rohproteingehalt des in dieser Arbeit verwendeten Stamms von *P. ostreatus* in ME-Medium lag zwischen den beiden Werten von

Manu-Tawiah und Martin. Wie bereits für den Aschegehalt beschrieben, variiert auch der Proteingehalt je nach Medium und zusätzlich zwischen verschiedenen Stämmen.

Die Zusammensetzung von SBT wurde bereits in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Der Reinprotein- und Gesamtfettgehalt des fermentierten SBT lagen wie erwartet zwischen denen von Myzel von *P. ostreatus* und nicht fermentiertem SBT. Durch die Fermentation wurde ein Teil des SBT in Pilz-Biomasse umgewandelt. Dabei wurde Protein auf- und Fett abgebaut. Der Aschegehalt änderte sich durch die Fermentation nicht. In der Literatur wurden diese positiven Veränderungen in Bezug auf das Nährwertprofil von fermentiertem Treber mit Basidiomyceten bereits beschrieben. Zusätzlich ist in diesen Publikationen beschrieben, dass der Cellulosegehalt und in Abwesenheit von Monosacchariden der Gehalt an Hemicellulose und Lignin durch die Fermentation sank (Zeko-Pivač et al. 2022). Dafür wurde nach der Fermentation ein höherer β -Glucangehalt festgestellt (Eliopoulos et al. 2022). Im Vergleich zu dieser Arbeit wurden die Basidiomyceten in Festbettkultur geführt. Da in dieser Arbeit der Kohlenhydratanteil rechnerisch ermittelt wurde, kann keine Aussage über Veränderungen von Lignocellulose- oder β -Glucan-Gehalten gemacht werden.

Das in Abbildung 3-40 dargestellte Aminosäureprofil von *P. ostreatus* in ME-Medium passt überwiegend zu den in Abbildung 4-5 dargestellten Literaturwerten. Die Aminosäureverteilung in der Literatur unterscheidet sich teilweise stark. Bei Bakratsas et al. war Glycin die dominante Aminosäure; danach folgten Prolin und Leucin. In der Publikation von Hadar und Cohen-Arazi war hingegen Asparaginsäure die Aminosäure mit dem größten Anteil. In dieser Arbeit waren Glutaminsäure gefolgt von Asparaginsäure und Histidin die Aminosäuren mit dem größten Anteil. Der größere Asparaginsäure-Anteil passt zu den Ergebnissen von Hadar und Cohen-Arazi. Sowohl in dieser Arbeit als auch in der Publikation von Hadar und Cohen-Arazi wurden die Aminosäuren nach saurer Hydrolyse analysiert. Hierbei wurden jeweils Glutamin und Glutaminsäure zusammen als Glutaminsäure erfasst. Gleiches gilt für Asparagin und Asparaginsäure. Die Unterschiede in der Verteilung und den Mengen der Aminosäuren lassen sich auf unterschiedliche Stämme von *P. ostreatus* und unterschiedliche Wachstumsbedingungen zurückführen. In der Publikation von Manu-Tawiah und Martin wurde ein Stamm in zwei unterschiedlichen Medien kultiviert und der Gehalt der Aminosäuren unterschied sich. Das Aminosäureprofil wies geringe Abweichungen auf und als limitierende Aminosäure wurde Methionin angegeben (Manu-Tawiah und Martin 1987). Auch bei Bakratsas et al. lagen die schwefelhaltigen Aminosäuren und Lysin deutlich unter den Gehalten des Referenzproteins der FAO. Diese Ergebnisse entsprechen denen dieser Arbeit.

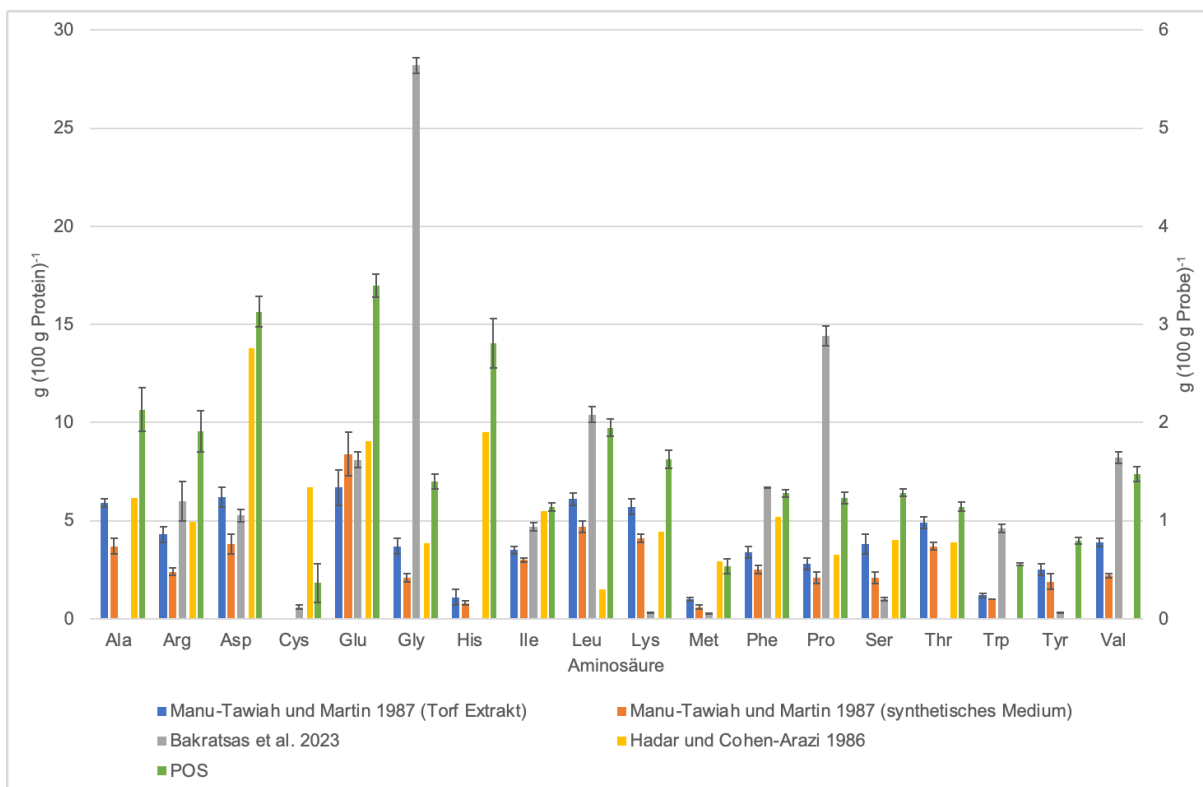


Abbildung 4-5: Aminosäureverteilung von Myzel von *P. ostreatus* laut Literatur (Hadar und Cohen-Arazi 1986; Manu-Tawiah und Martin 1987; Bakratsas et al. 2023) im Vergleich zur Aminosäureverteilung des Myzels des verwendeten *P. ostreatus* Stamms (POS). Die Werte von Hadar und Cohen-Arazi sowie POS sind in $\text{g (100 g Probe)}^{-1}$ angegeben und die anderen Literaturwerte in $\text{g(100 g Protein)}^{-1}$. Asparagin und Glutamin wurden während der Analyse zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert und jeweils zusammen unter ASP bzw. GLU erfasst.

Das Aminosäureprofil von Schwarzbiertreber wurde bereits in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Das Aminosäureprofil des Myzels von *P. ostreatus* mit SBT-Medium lag zwischen den Profilen des nicht-fermentierten Trebers und des Myzels in ME. Es ist davon auszugehen, dass während der Fermentation ein Teil des SBT in Pilzprotein umgebaut wurde. Die verbesserte biologische Wertigkeit und die Änderung der limitierenden Aminosäuren sprechen ebenfalls dafür. Möglicherweise könnte die biologische Wertigkeit durch den Zusatz eines Nebenstroms, der reich an schwefelhaltigen Aminosäuren ist, zum Medium weiter verbessert werden. Die in dieser Arbeit zusätzlich zum Treber analysierten Nebenströme eignen sich jedoch nicht. In der Hefe waren Methionin und Cystein limitierend und in der Würze war sehr wenig Protein enthalten. Die Malzkeime eigneten sich aufgrund ihrer trockenen, festen Beschaffenheit grundsätzlich nicht als Medien-Zusatz.

Die Fettsäureverteilung des Myzels von *P. ostreatus* in ME-Medium in Abbildung 3-41 entspricht der Fettsäureverteilung aus der Literatur (Abbildung 4-6). Die Literaturwerte beziehen sich alle auf unterschiedliche Stämme von *P. ostreatus*. Die Hauptfettsäure ist dabei Linolsäure. Lediglich für die Stämme „Michigan“ und „ATHUM 4438“ war die Hauptfettsäure Palmitinsäure (Bespalova et al. 2002; Papaspyridi et al. 2012). Diese war neben Ölsäure und Stearinsäure anteilig eine der Hauptfettsäuren in dem Myzel dieser Arbeit wie auch in der

Literatur. Neben den in dieser Arbeit für die anteilige Berechnung verwendeten Fettsäuren wurden in der Literatur weitere Fettsäuren im Myzel von *P. ostreatus* beschrieben. Darunter fallen ungeradzahlige Fettsäuren und langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Papaspayridi et al. 2013). Im Chromatogramm waren weitere Peaks erkennbar, die zu derartigen Fettsäuren gehören könnten (Abbildung 6-1). Durch den Abgleich der Massenspektren wurden unter anderem Pentadecansäure und Palmitoleinsäure in Betracht gezogen. Da die Fettsäureverteilung abhängig vom verwendeten Stamm, Medium und Kulturbedingungen variiert, sind die Unterschiede in der genauen Fettsäureverteilung in dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur zu erklären (Bespalova et al. 2002; Papaspayridi et al. 2013).

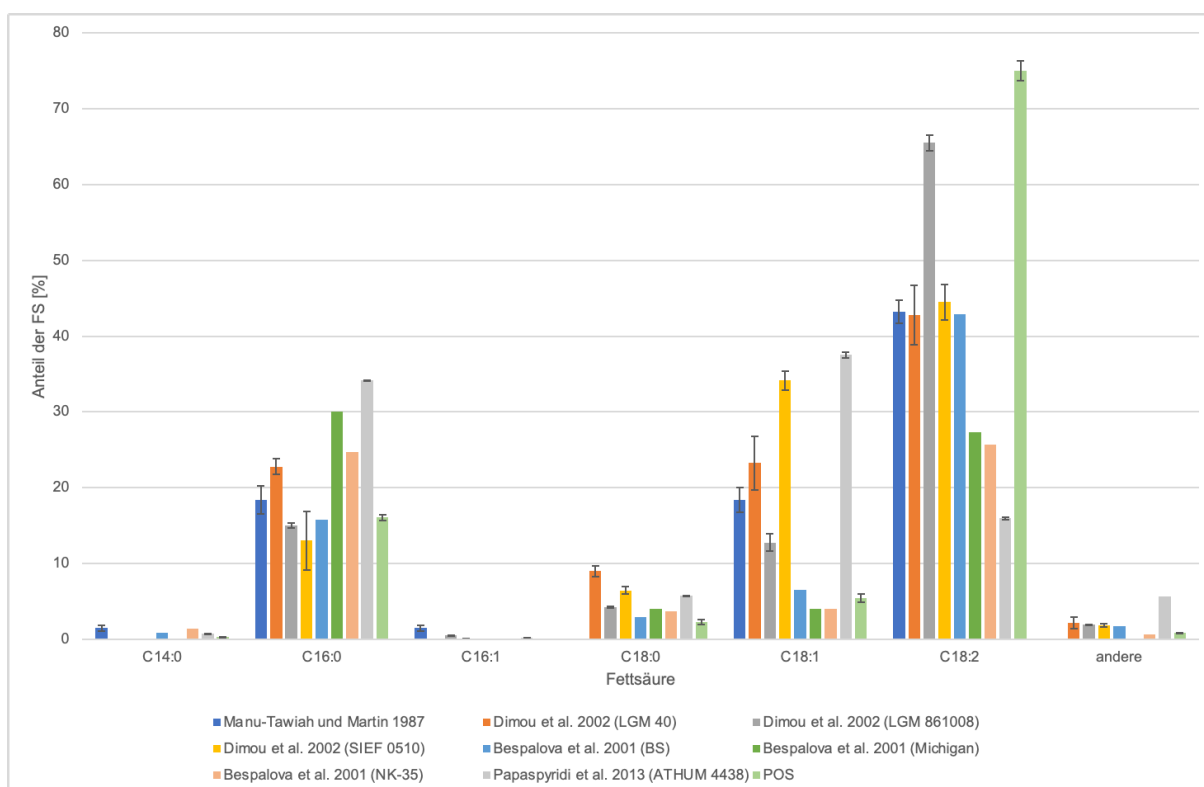


Abbildung 4-6: Fettsäureverteilung von Myzel von *P. ostreatus* laut Literatur (Manu-Tawiah und Martin 1987; Bespalova et al. 2002; Dimou et al. 2002; Papaspayridi et al. 2013). FS: Fettsäure

Die Fettsäureverteilung des SBT aus Abbildung 3-41 stimmte mit der Fettsäureverteilung aus der Literatur in Abbildung 4-7 überein. Farcas et al. führen neben den in Abbildung 4-7 dargestellten Fettsäuren noch einige weiter auf. Darunter auch Myristin-, Arachin- und Behensäure, die im SBT aus dieser Arbeit nachgewiesen wurden (Farcas et al. 2015). Bei dem fermentierten Schwarzbierdreber handelte es sich um eine Mischung aus Treber und Myzel. Die Anteile von Palmitin-, Linol- und Linolensäure von POS-SBT lagen erwartungsgemäß zwischen denen von POS-ME und SBT. Der Anteil von Ölsäure und Arachinsäure war im fermentierten Schwarzbierdreber größer als im Myzel von *P. ostreatus* und im nicht fermentierten Treber.

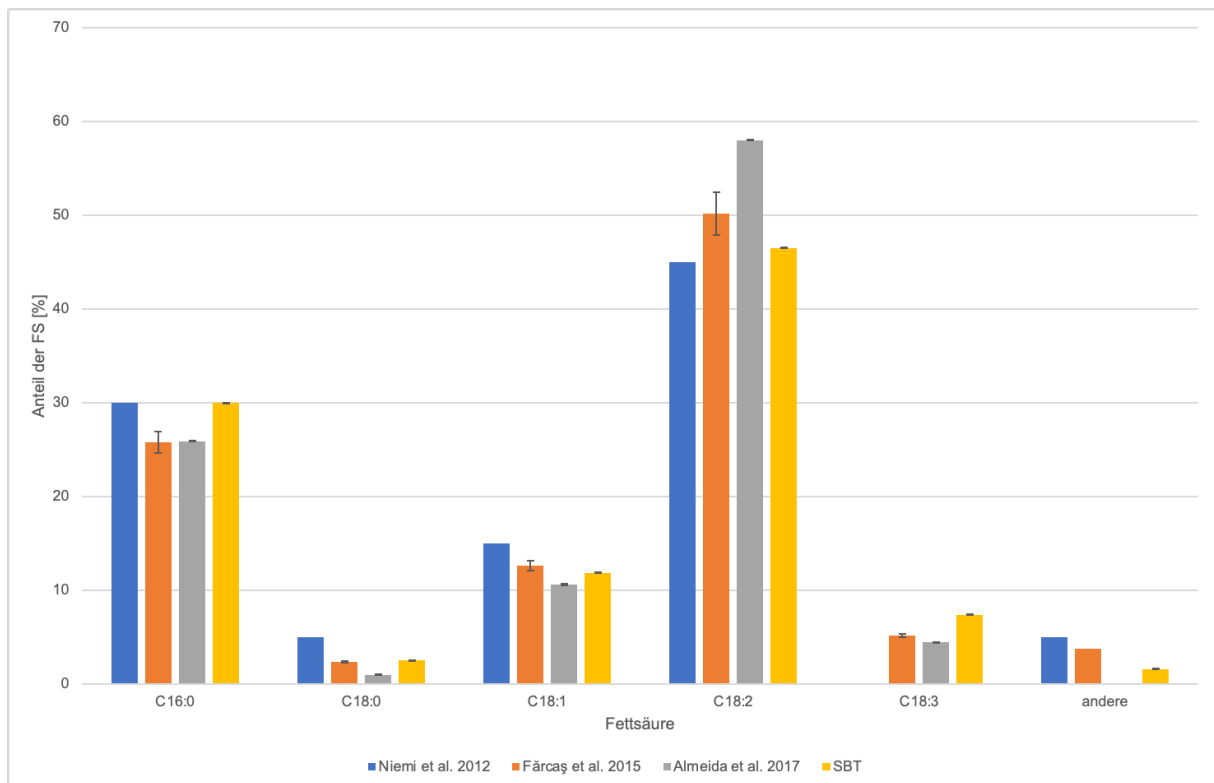


Abbildung 4-7: Fettsäureverteilung von Biertreber laut Literatur (Niemi et al. 2012; Farcas et al. 2015; Almeida et al. 2017). FS: Fettsäure

4.7.2 Sensorische Analytik

In der sensorischen Beurteilung in 3.7.2 wurde das gefrorene und aufgetaute Myzel von *P. ostreatus* in SBT-Medium als geruchlich intensiver wahrgenommen und vom Panel aufgrund eines besseren Mundgefühls bevorzugt. Der intensivere Geruchseindruck lässt sich dadurch erklären, dass durch das Einfrieren und Auftauen Zellen aufgeschlossen wurden und infolgedessen Enzyme freigesetzt wurden.

Kabbaj et al. analysierten das Aroma von *P. ostreatus* aus verschiedenen Kultivierungsmethoden. Wie auch in dieser Arbeit identifizierten sie in Submerskultur 3-Octanon und 1-Octen-3-ol. Zusätzlich wiesen sie 3-Methylbutanol, 2-Methylbutanol und 3-Octanol nach. Diese wurden in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Hexanal, 3-Octanon und Octanal, die in dieser Arbeit im submers kultiviertem Myzel identifiziert wurden, wurden lediglich in der Festbettkultur nachgewiesen (Kabbaj et al. 2002). In einer weiteren Arbeit wurden Fruchtkörper, die auf Medien mit unterschiedlichen Anteilen von Getreidetrester aus der Brennerei kultiviert wurden, analysiert. Hierbei war Hexanal der überwiegend vorkommende Aldehyd. 1-Octen-3-on, das in dieser Arbeit im Myzel identifiziert wurde, wurde nicht nachgewiesen (Zhou et al. 2023). Im Fruchtkörper von *P. ostreatus* wurden unter anderem 1-Octen-3-on und (*E*)-2-Octenal nachgewiesen (Nyegue et al. 2003). Beim Vergleich der Literaturwerte zeigt sich, dass Unterschiede im Aromaprofil durch die

Kultivierungsbedingungen aber auch durch unterschiedliche Stämme zu erklären sind. Ein weiterer Unterschied zwischen den verschiedenen Arbeiten waren die Extraktionsmethoden. Die Probenvorbereitung hat einen großen Einfluss auf die nachfolgenden Analysen. Kabbaj et al. nutzten unter anderem die Submerskultivierung mit anschließender dynamischer Kopfraumanalyse. Dies war zu den in dieser Arbeit verwendeten Methoden am ähnlichsten. Furfural wurde in reinen Pilz-Proben nicht detektiert. Lediglich in fermentiertem Quinoa und Linsenmehl wurde dieses nachgewiesen. Furfural trug jedoch bereits im unfermentierten Medium zum Aroma bei (Sánchez-García et al. 2024). Möglicherweise stammte das in dieser Arbeit detektierte Furfural aus dem autoklavierten ME-Medium. Dafür spricht auch, dass die zugehörige Peakfläche klein war (siehe Abbildung 3-43) und im Myzel, das in SBT-Medium kultiviert wurde, kein Furfural nachgewiesen wurde.

Benzaldehyd wurde in der Biomasse von *P. ostreatus* kultiviert in SBT-Medium nachgewiesen, jedoch nicht im SBT ohne Fermentation. Es ist davon auszugehen, dass Benzaldehyd durch die Fermentation gebildet wurde. In Fruchtkörpern und Myzel von *P. ostreatus* wurde Benzaldehyd bereits nachgewiesen (Beltran-Garcia et al. 1997; Kabbaj et al. 2002). Beltran-Garcia et al. extrahierten frische Fruchtkörper mit Lösungsmittel und gehen davon aus, dass Benzaldehyd während der Extraktion gebildet wurde. Kabbaj et al. hingegen nutzten die dynamische Kopfraumanalyse. Das Probengefäß mit dem frischen Myzel wurde für 20 min mit Helium begast, um die flüchtigen Substanzen auf einem Adsorbens zu fixieren. Dabei sind Veränderungen an der Probenmatrix unwahrscheinlich. Die Bildung von Benzaldehyd in anderen Basidiomyceten wurde bereits beschrieben. Als Präkursor gilt dabei L-Phenylalanin (Kawabe und Morita 1993; Lapadatescu et al. 1997). Der Phenylalanin Gehalt im SBT lag unter dem Gehalt des Myzels von *P. ostreatus* in ME-Medium. Freie Aminosäuren wurden in dieser Arbeit nicht analysiert. Alle weiteren Aromastoffe, die in der Biomasse von *P. ostreatus* und SBT identifiziert wurden, waren C8-Oxylipine, die bereits im Myzel in ME-Medium beschrieben wurden. Diese sind hauptsächlich für das pilzartige Aroma verantwortlich und werden aus Linol- und Linolensäure gebildet (Tressl et al. 1982; Kleofas et al. 2014; Karrer et al. 2021). Verwunderlich war daher, dass 1-Octen-3-on und (*E*)-2-Octenal auch im Schwarzbierdreber gefunden wurden. (*E*)-2-Octenal, (*E*)-2-Nonenal und Hexanal werden unter einigen anderen Aromastoffen im Bierdreber beschrieben (Farcas et al. 2015; Naibaho et al. 2023). Zusätzlich wurden 1-Octen-3-ol und Benzaldehyd als Aromastoffe in Bierdreber aufgeführt (Ktenioudaki et al. 2013; Naibaho et al. 2023). In dieser Arbeit wurden diese jedoch nur im fermentierten Schwarzbierdreber nachgewiesen. Farcas et al. detektierten (*E*)-2-Octenal, Furfural und (*E*)-2-Nonenal nur in Malz und nicht im Dreber. In einer anderen Publikation hingegen wurde Furfural in zu Mehl gemahlenem Bierdreber nachgewiesen (Ktenioudaki et al. 2013). 2-Furanmethanol, Hexanal und 1-Octen-3-on wurden unter anderen Aromastoffen in der

Flüssigkeit, die durch Auspressen von Biertreber gewonnen wurde, identifiziert (Shetty et al. 2023).

Da 1-Octen-3-on und (*E*)-2-Octenal typische Aromastoffe für Pilze sind, wurde zunächst vermutet, dass diese durch eine Kontamination des Trebers entstanden. Da (*E*)-2-Octenal in mehreren Publikationen im Biertreber nachgewiesen wurde, ist die Anwesenheit dieses Aromastoffs nicht zwingend auf eine Kontamination zurückzuführen. 1-Octen-3-on wurde lediglich von Shetty et al. in der Treberflüssigkeit beschrieben. Hierbei gibt es keine Angaben über eine mögliche Lagerzeit. Um sicher sagen zu können, ob 1-Octen-3-on und (*E*)-2-Octenal durch eine mögliche Kontamination des Trebers nachgewiesen wurden, müsste erneut eine Analyse von frischem Schwarzbierdreber durchgeführt werden.

2-Phenylethanol wurde in der Literatur bislang nicht als Aromastoff in Biertreber identifiziert. Da es sich bei Biertreber jedoch nicht um ein standardisiertes Produkt handelt, sind Variationen in der Zusammensetzung möglich. Dies wurde in Bezug auf die Majorbestandteile bereits in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Auch die bereits aufgeführten Publikationen in Bezug auf die volatilen Verbindungen in Biertreber weisen Unterschiede auf.

4.8 Wachstumsbeurteilung und Bestimmung des Pilzanteils

In der Literatur sind viele verschiedene Methoden für die Pilzquantifizierung beschrieben. Dazu zählen die Quantifizierung über eine Markersubstanz wie Ergosterol, Chitin oder Nucleinsäuren (Desgranges et al. 1991; Ooijkaas et al. 1998). Eine Alternative hierzu ist die biologische Aktivität. Dazu zählen Respiration, enzymatische Aktivitäten oder die Quantifizierung von ATP. Die Markersubstanzen Chitin und Ergosterol sind relativ spezifisch für Pilze und für den Aufbau von Biomasse notwendig (Seitz et al. 1979). Die Quantifizierung von ATP und CO₂ hingegen ist nicht exklusiv für Pilze und nicht ausschließlich mit dem Aufbau von Biomasse verbunden. Weiterhin können über die Nährstoff-Aufnahme Rückschlüsse auf das Pilzwachstum gezogen werden (Desgranges et al. 1991; Ooijkaas et al. 1998). Die Quantifizierung des Pilzanteils ist in den Fällen erforderlich, in denen Myzel nicht vom Substrat getrennt werden kann. In der Regel handelt es sich hierbei um Festbettfermentationen. In der in dieser Arbeit durchgeführten Submerskultivierung war eine Trennung des Trebers vom Myzel nach der Fermentation ebenfalls nicht möglich. Daher wurde der Pilzgehalt nach der optimierten Fermentation mittels Ergosterol- und Chitingehalt bestimmt. Ein idealer Marker sollte während des Wachstums des Pilzes möglichst konstant sein und unter variierenden Kulturbedingungen gleichbleiben. Durch Vergleiche von verschiedenen Quantifizierungsmethoden ist bekannt, dass eine geeignete Methode zur Biomassenbestimmung je nach Pilz und Applikation gewählt werden sollte und einer geeigneten Kalibrierung bedarf (Ooijkaas et al. 1998).

Ergosterol ist das Hauptsterol von *Pleurotus ostreatus*. Der genaue Gehalt sowie der Anteil an weiteren Sterolen wie Fungisterol variiert je nach Stamm (Koutrotsios et al. 2017; Boukid et al. 2022). Demnach war Ergosterol als Marker für den Pilzanteil in dieser Arbeit geeignet. In einigen Publikationen, die verschiedene Quantifizierungsmethoden verglichen, wurde Ergosterol im Vergleich zur Chitinbestimmung als geeignet beschrieben. Gründe hierfür waren die oftmals aufwändigere Methode für Chitin, eine höhere Sensitivität der Ergosterolmethode und Matrixeffekte bei der Chitinanalytik (Seitz et al. 1979; Matcham et al. 1985; Steudler und Bley 2015b).

Matrixeffekte bei der Chitinanalytik wurden auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Der hohe Blindwert in der Größenordnung der Chitingehalte der Myzelien war auffällig. Getreide enthält kein Chitin, daher ist fraglich, was den hohen Blindwert verursachte. Unklar ist auch, ob die Substanz, die den hohen Blindwert verursachte, während der Fermentation abgebaut wurde. Wie in dieser Arbeit wird der Chitingehalt in der Regel durch colorimetrische Assays bestimmt. Diese sind anfällig für Interferenzen. Insbesondere Hexosamine sind dafür bekannt die Chitinanalytik über Glucosamin zu stören (Seitz et al. 1979; Steudler und Bley 2015b). In Getreide sind die Hexosamingehalte jedoch gering (Matcham et al. 1985). Der Blindwert wurde für das Treber-Medium bestimmt. Da es sich bei Treber um Getreide handelt, wäre ein niedrigerer Blindwert zu erwarten. Allerdings ist das im Treber enthaltene Getreide bereits gekeimt, gedarrt und extrahiert. Außerdem handelte es sich bei dem verwendeten Treber um Schwarzbierdreber. Zusätzlich zum Mälzen fand dementsprechend ein Röstprozess statt. Die hierbei gebildeten Maillard-Produkte könnten ähnlich wie Hexosamine die Chitin-Bestimmung behindern und für den hohen Blindwert verantwortlich sein.

Ergosterol wurde bereits von verschiedenen Autoren als geeigneter Biomarker für die Pilzquantifizierung beschrieben (Seitz et al. 1979; Matcham et al. 1985; Newell 1994; Steudler und Bley 2015b; Mansoldo et al. 2020). Für den Ergosterolgehalt ist jedoch bekannt, dass er abhängig vom Medium, der Temperatur, der Sauerstoffverfügbarkeit und dem Alter des Myzels ist (Desgranges et al. 1991; Ooijkaas et al. 1998; Klamer und Bååth 2004; Steudler und Bley 2015b). Insbesondere die Variation des Ergosterolgehaltes in verschiedenen Medien ist für die Pilzquantifizierung problematisch. Da bei der in dieser Arbeit produzierten Biomasse in Treber-Medium keine Trennung zwischen festen Medienbestandteilen und Pilzmyzel möglich war, wurde als Referenzmyzel *P. ostreatus* in ME-Medium kultiviert. Der Ergosterolgehalt dieses Myzels diente als Bezugsgröße für die Berechnung des Pilzanteils. Aufgrund dessen, dass der Ergosterolgehalt in unterschiedlichen Medien variiert, ist jedoch davon auszugehen, dass der berechnete Pilzanteil fehlerbehaftet ist. Ooijkaas et al. evaluierten verschiedene Methoden zur Pilzquantifizierung und konnten keinen geeigneten Biomarker bei der Verwendung unterschiedlicher Medien finden (Ooijkaas et al. 1998).

Die Respiration von Pilzen wurde bereits zur Pilzquantifizierung verwendet. Der CO₂-Gehalt in der Abluft korrelierte für verschiedene Pilze wie *Trametes* spp. und *Morchella* spp. mit der trockenen Pilzbiomasse und wurde deswegen als geeignete Methode beschrieben (Anderson und Domsch 1978; Steudler und Bley 2015b). Wie der Ergosterolgehalt variiert die CO₂-Emission je nach Temperatur, Pilzspezies und Substrat. Insbesondere eine Temperaturerhöhung führt zu einem exponentiellen Anstieg der CO₂-Emission (Cohen et al. 2002; Kahl et al. 2015; Pavlík et al. 2020). Da die Fermentationen zur Pilzquantifizierung unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, hatte die Temperaturabhängigkeit keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Da für das Referenzmyzel jedoch ein komplett lösliches Medium im Vergleich zum SBT-Medium verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass der CO₂-Ausstoß davon beeinflusst wurde. Der CO₂-Ausstoß während der Fermentation des ME-Mediums war deutlich geringer als in der Fermentation des SBT-Mediums. Mit der Beurteilung des CO₂-Gehalts als Quantifizierungsmethode wäre der Pilzanteil nach der Fermentation im SBT-Medium deutlich über dem im ME-Medium. Dies steht im Widerspruch zum Pilzanteil, der über den Ergosterolgehalt bestimmt wurde. Gemäß Ooijkaas et al. lässt die respiratorische Aktivität nicht immer Rückschlüsse auf die Biomasse zu (Ooijkaas et al. 1998). Dies wurde durch diese Arbeit bestätigt.

Das Messprinzip des Lebendzell-dichte-Sensors beruht auf einer Kapazitätsmessung. In der Literatur ist die Anwendung dieser Art von Sensoren bereits für Zellkulturen und Mikroorganismen beschrieben. Dabei wurde die Korrelation des Signals mit der Biomasse festgestellt (Austin et al. 1994; Carvell und Dowd 2006; Horta et al. 2015). Die Kultivierung von Hefen mit Lebendzell-dichte-Sensoren ist in der Literatur bereits beschrieben. Hier wurde festgestellt, dass das Messprinzip gut für die Biomassenbestimmung geeignet ist (Harris et al. 1987; Austin et al. 1994; Horta et al. 2015). Für die Anwendung des Sensors in der Kultivierung von Basidiomyceten wurde allerdings keine Literatur gefunden. Im Gegensatz zur Analytik von Biomarkern wie Ergosterol oder Chitin ist eine online-Messung während der Fermentation möglich. Ein weiterer Vorteil ist, dass feste Medienbestandteile aufgrund ihrer nicht-intakten Zellmembran nicht polarisiert werden können und somit die Messung nicht beeinflussen. Tote Zellen werden aus dem gleichen Grund nicht erfasst (Harris et al. 1987; Carvell und Dowd 2006).

Der Vergleich des Signals des Lebendzell-dichte Sensors mit der CO₂-Emission während der Fermentation in Abbildung 3-51 zeigte sehr ähnliche Kurvenverläufe. Gleiches galt für den Vergleich mit dem Ergosterolgehalt in Abbildung 3-49. Diese Fermentationen wurden in SBT-Medium durchgeführt. Wie in der Literatur beschrieben, wurde auch in dieser Arbeit keine Störung durch die im Medium enthaltenen, festen Partikel festgestellt. Anhand der vergleichbaren Kurvenverläufe wurde geschlossen, dass eine Anwendung des

Lebendzell-dichte-Sensors für die Submerskultivierung von höheren Pilzen prinzipiell möglich ist.

Das Signal des Sensors und die Trockenmasse von *P. ostreatus* während der Fermentation von ME-Medium in Abbildung 3-50 zeigten ebenfalls einen ähnlichen Verlauf. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Trockenmasse und dem Sensor-Signal konnte jedoch erst ab etwa 144 h festgestellt werden. Zu Beginn der Fermentation zeichnete der Sensor negative Werte für die Lebendzell-dichte auf und das Signal schwankte. Erst ab 144 h stieg das Signal und die Werte waren positiv. Die negativen Werte des Sensors spiegelten sich nicht in den Trockenmassen wider. Ab 144 h zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen der Trockenmasse und dem Signal des Sensors. Warum das Signal zu Beginn der Fermentation negativ wurde, ist noch unklar. Da dieser negative Verlauf des Sensor-Signals am Anfang aller Fermentationen auftrat, sind weitere Untersuchungen hierzu notwendig. Möglicherweise war die Zellkonzentration zu Beginn der Fermentation zu gering und das Schwanken und die negativen Werte bedeuten, dass die untere Messgrenze des Sensors erreicht war. Um dies auszuschließen, könnten weitere Fermentationen mit einer größeren Menge an Inokulum durchgeführt werden. Durch eine größere Menge an Inokulum wären auch initial höhere Trockenmassen zu erwarten. Dies würde bereits eine frühere Probenahme zur Bestimmung der Trockenmasse ermöglichen. Zu Beginn der Fermentation in ME-Medium ist das Pilzmyzel visuell zu erkennen, jedoch reicht die Pilzkonzentration noch nicht für eine gravimetrische Bestimmung aus. Da es sich bei der Probenahme jeweils lediglich um eine Einfachbestimmung handelte, sind die Schwankungen im Kurvenverlauf der Trockenmasse zu erklären.

Der über die Lebendzell-dichte berechnete Pilzanteil von 15% ist vergleichbar mit den Pilzgehalten, die aufgrund des Ergosterol- und Chitingehaltes berechnet wurden. Der geringfügig niedrigere Pilzanteil lässt sich darauf zurückführen, dass die für die Berechnung zugrundeliegende Fermentation nicht unter optimierten Bedingungen durchgeführt wurde. Diese wurden bei den Fermentationen für die Berechnung des Pilzanteils mittels Ergosterol- und Chitingehalt angewendet.

Für Pilze ist bekannt, dass bei niedrigen Temperaturen kleinere Zellen gebildet werden. Bei hohen Temperaturen werden größere Zellen mit dickeren Zellwänden gebildet (Stuedler und Bley 2015b). Ob dies einen Einfluss auf das Signal des Sensors hat, ist unklar. Daher sollte die Kalibrierung abgesehen vom Medium unter vergleichbaren Bedingungen stattfinden.

4.9 Ausblick

Die Optimierung der Batch-Fermentation erfolgte bereits in Bioreaktoren, während die Verbesserung der Kulturführung lediglich in Schüttelkolben durchgeführt wurde. Da die

Ergebnisse aus den Fed-Batch Experimenten, der Verwendung von Hauptkulturen als Inokulum und die Verwendung von Kulturüberstand als Medienbestandteil vielversprechend erscheinen, sollten diese mit den optimierten Fermentationsparametern in Bioreaktoren wiederholt werden. Um einen wirtschaftlichen Prozess aus den Fermentationen zu generieren, sollte eine weitere Maßstabsvergrößerung über den Labormaßstab hinaus erfolgen. Für die Treber, die in dieser Arbeit nicht als Substrat weiterverwendet wurden, sollten ebenfalls geeignete Basidiomyceten für die Fermentation evaluiert werden. Auch Malzkeime bieten sich aufgrund ihrer Zusammensetzung als Fermentationsmedium für Basidiomyceten an. Im Sinne einer Kreislaufwirtschaft ist es sinnvoll, möglichst alle geeigneten Nebenströme der Brauindustrie für die Lebensmittelindustrie aufzuwerten und zur Verfügung zu stellen.

Im Anschluss an diese Arbeit bietet sich die Entwicklung eines Fleischersatzproduktes auf Basis des fermentierten Trebers an. Alternativ könnte eine Methode zur Extraktion der Proteine aus dem fermentierten Treber entwickelt werden. Aus den Getreideresten der Alkoholbrennerei beispielsweise wurde Protein bereits mit einer Mischung aus Alkali und Ethanol im Labormaßstab extrahiert (Cookman und Glatz 2009). Eine Extraktion hätte den Vorteil, dass die Spelzen keinen negativen Einfluss auf die Sensorik ausüben würden. Im Gegensatz zu einer direkten Verwendung des Trebers sind mit einer Extraktion weitere Kosten und Ressourcenbindung verbunden.

Pleurotus ostreatus ist dafür bekannt Sekundärmetabolite zu bilden, die sich positiv auf den menschlichen Organismus auswirken. Die Fruchtkörper sind reich an B-Vitaminen sowie Vitamin C und im Myzel wurde bereits Pantothenensäure nachgewiesen. Außerdem sind β -Glucane enthalten (Deepalakshmi und Mirunalini 2014; van Dam et al. 2024). Die in dieser Arbeit produzierte Biomasse sollte im Hinblick auf diese Stoffe analysiert werden. Zudem ist das im Myzel enthaltene Ergosterol ein Vorläufer von Vitamin D₂. Durch die Bestrahlung mit UV-B-Licht wurde im Labormaßstab bereits Ergosterol im Pilzmyzel in Vitamin D₂ umgewandelt (Ahlborn et al. 2019). Um den fermentierten Biertreber ernährungsphysiologisch weiter aufzuwerten, wäre eine Bestrahlung interessant. Bei einem erhöhten Gehalt an Vitaminen und β -Glucan besteht die Möglichkeit, Lebensmittel mit nährwert- oder gesundheitsbezogenen Aussagen gemäß Health claims Verordnung (VO (EG) Nr. 1924/2006) zu versehen. Dies wäre im Hinblick auf die Vermarktung eines Fleischersatzproduktes interessant.

In dieser Arbeit wurde bereits die biologische Wertigkeit des Proteins bestimmt. Hiermit kann jedoch keine abschließende Beurteilung der Proteinqualität erfolgen, da diese nicht die Verfügbarkeit des Proteins für den menschlichen Organismus berücksichtigt. Hierfür sollte die Verdaubarkeit des fermentierten Biertrebers untersucht werden. Für Mykoprotein wird durchschnittlich ein um die Verdaulichkeit korrigierter *amino acid score* von 0,91 angegeben, wobei eine Verdaubarkeit von 78% angenommen wird (Miller und Dwyer 2001). Da außer

Pilzprotein noch Treber nach der Fermentation erhalten war, ist die Verdaubarkeit des Produktes aus dieser Arbeit vermutlich geringer.

Zusätzlich zur Verdaubarkeit sollten toxikologische Untersuchungen des fermentierten Trebers durchgeführt werden. Da es sich bei *P. ostreatus* um einen bekannten Speisepilz handelt, ist davon auszugehen, dass auch das Myzel sicher konsumiert werden kann. Zwischen Myzel und Fruchtkörper von *P. ostreatus* gibt es zwar Unterschiede, jedoch wird auch in der Literatur von einer Unbedenklichkeit des Myzels berichtet (van Dam et al. 2024). Dennoch handelt es sich bei Myzel um ein Novel Food, das gemäß VO (EU) 2015/2283 zugelassen werden muss. Hierfür werden in der Regel toxikologische Studien benötigt, die die Sicherheit für den menschlichen Verzehr belegen. Für das Myzel von *P. ostreatus* wurde bereits 2024 durch die Firma MyForest Foods Co. ein Antrag zur Zulassung als Novel Food gestellt (Summary of applications and notifications - European Commission).

Da die Pilzquantifizierung durch den Ergosterol- und Chitinanteil fehlerbehaftet ist, sollte weiterhin an einer geeigneteren Methode hierfür geforscht werden. Insbesondere im Hinblick auf den Einsatz in der Lebensmittelindustrie ist eine Spezifikation des Endproduktes mit der Angabe des Pilzanteils relevant. Das Blindwert-Problem der Chitin-Analytik könnte durch eine alternative Methode behoben werden. Dennoch besteht die Herausforderung, eine geeignete Referenz für 100% Pilz zu produzieren. Wie bereits beschrieben, wirkt sich das Medium auf die Zusammensetzung des Myzels aus. Dementsprechend ist für die Referenzmyzelproduktion ein synthetisches Medium herzustellen, das dem Treber-Medium möglichst ähnlich ist.

5 Literaturverzeichnis

- Ahlborn J, Stephan A, Meckel T, Maheshwari G, Rühl M, Zorn H (2019): Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. *Int J Recycl Org Waste Agricult* 8, 447–455
- Almeida A da R, Geraldo MRF, Ribeiro LF, Silva MV, Maciel MV de OB, Haminiuk CWI (2017): Bioactive compounds from brewer's spent grain: phenolic compounds, fatty acids and in vitro antioxidant capacity. *Acta Sci Technol* 39, 269–277
- An Q, Wu X-J, Han M-L, Cui B-K, He S-H, Dai Y-C, Si J (2016): Sequential solid-state and submerged cultivation of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* on biomass and the activity of lignocellulolytic enzymes. *Bioresources* 11, 8791–8805
- Anderson JPE, Domsch KH (1978): A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol Biochem* 10, 215–221
- Anderson MJ, Whitcomb PJ: RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments. Second edition; Taylor & Francis, Boca Raton 2017
- Anness BJ, Reud RJR (1985): Lipids in wort. *J Inst Brew* 91, 313–317
- Arunkumar M, Sheik Abdulla SH (2015): Hyper-production of manganese peroxidase by mutant *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 and its applications in biodegradation of textile azo dyes. *Desalin Water Treat* 56, 509–520
- Aschemann-Witzel J, Stangherlin IDC (2021): Upcycled by-product use in agri-food systems from a consumer perspective: A review of what we know, and what is missing. *Technol Forecast Soc Change* 168, 120749
- Austin GD, Watson RWJ, D'Amore T (1994): Studies of on-line viable yeast biomass with a capacitance biomass monitor. *Biotechnol Bioeng* 43, 337–341
- Bakratsas G, Polydera A, Nilson O, Kossatz L, Xiros C, Katapodis P, Stamatis H (2023): Single-cell protein production by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Sustain Food Technol* 1, 377–389
- Bakratsas G, Antoniadis K, Athanasiou PE, Katapodis P, Stamatis H (2024): Laccase and biomass production via submerged cultivation of *Pleurotus ostreatus* using wine lees. *Biomass* 4, 1–22
- Baş D, Boyacı İH (2007): Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng* 78, 836–845
- Belardi I, De Francesco G, Alfeo V, Bravi E, Sileoni V, Marconi O, Marrocchi A (2025): Advances in the valorization of brewing by-products. *Food Chem* 465, 141882
- Beldman G, Hennekam J, Voragen AGJ (1987): Enzymatic hydrolysis of beer brewers' spent grain and the influence of pretreatments. *Biotechnol Bioeng* 668–671
- Beltran-Garcia MJ, Estarron-Espinosa M, Ogura T (1997): Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *J Agric Food Chem* 45, 4049–4052
- Berger RG, Bordewick S, Krahe N-K, Ersoy F (2022): Mycelium vs. fruiting bodies of edible fungi — a comparison of metabolites. *Microorganisms* 10, 1379

- Berlinet C, Ducruet V, Brillouet J-M, Reynes M, Brat P (2005): Evolution of aroma compounds from orange juice stored in polyethylene terephthalate (PET). *Food Addit Contam* 22, 185–195
- Bespalova LA, Makarov OE, Antonyuk LP, Ignatov VV (2002): Lipogenesis in the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* cultivated on different media. *Appl Biochem Microbiol* 38, 349–354
- Bianco A, Budroni M, Zara S, Mannazzu I, Fancello F, Zara G (2020): The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 8661–8678
- Bickel Haase T, Klis V, Hammer AK, Pinto Lopez C, Verheyen C, Naumann-Gola S, Zorn H (2024): Fermentation of cocoa pod husks with *Pleurotus salmoneo-stramineus* for food applications. *Food sci nutr* 12, 2551–2566
- Birhanli E, Yesilada O (2010): Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochem Eng J* 52, 33–37
- Blackwell M (2011): The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98, 426–438
- Bodizs L, Titica M, Faria N, Srinivasan B, Dochain D, Bonvin D (2007): Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation. *J Process Contr* 17, 595–606
- Boukid F, Gagaoua M: Chapter Seven - Meat alternatives: A proofed commodity? In: Wu J (Hrsg.): *Advances in Food and Nutrition Research (Emerging Sources and Applications of Alternative Proteins)*. Band 101; Academic Press 2022, 213–236
- Boukid F, Pera J, Parladé J, Castellari M (2022): Fungal bioconversion of brewery by-products: assessment of fatty acids and sterols profiles. *Qual Assur Saf Crops Foods* 14, 202–211
- Bravi E, Perretti G, Buzzini P, Della Sera R, Fantozzi P (2009): Technological steps and yeast biomass as factors affecting the lipid content of beer during the brewing process. *J Agric Food Chem* 57, 6279–6284
- Bugarski D, Gvozdenovic Dj, Cervenski J, Takac A (2002): Effect of major environmental conditions on the development of the mycelium and growth of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Acta Hort* 319–323
- Caballero-Córdoba GM, Sgarbieri VC (2000): Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. *J Sci Food Agric* 80, 341–351
- Camici L, Sermonti G, Chain EB (1952): Observations on *Penicillium chrysogenum* in submerged culture. 1. Mycelial growth and autolysis. *Bull World Health Organ* 6, 265–275
- Carvell JP, Dowd JE (2006): On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance. *Cytotechnology* 50, 35–48
- Celus I, Brijs K, Delcour JA (2006): The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *J Cereal Sci* 44, 203–211

- Chaves MB, Junior NL, Borges G, Wisbeck E, Gern R, Furlan S, Junior AF (2014): Production of bioactive substances in fed-batch and semi-continuous culture by *Pleurotus ostreatus*. *Chem Eng Trans* 38, 307–312
- Chen J, Yu M, Yang C, Huang Z, He L, Bian J, Sun S, Li J (2025): Study on the nutritional relationships in mycelia and fruiting bodies of *Hypsizygus marmoreus* under defined nutrient conditions. *Food Chem* 467, 142323
- Cho IH, Lee SM, Kim SY, Choi H-K, Kim K-O, Kim Y-S (2007): Differentiation of aroma characteristics of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) of different grades using gas chromatography–olfactometry and sensory analysis. *J Agric Food Chem* 55, 2323–2328
- Cohen R, Persky L, Hazan-Eitan Z, Yarden O, Hadar Y (2002): Mn²⁺ alters peroxidase profiles and lignin degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* under different nutritional and growth conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 102, 415–429
- Cookman DJ, Glatz CE (2009): Extraction of protein from distiller’s grain. *Bioresour Technol* 100, 2012–2017
- Corrêa RCG, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR (2016): Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends Food Sci Technol* 50, 103–117
- Cros S, Lignot B, Bourseau P, Jaouen P, Prost C (2005): Desalination of mussel cooking juices by electro dialysis: effect on the aroma profile. *J Food Eng* 69, 425–436
- Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KChAM (1998): Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 57, 409–419
- da Silva Menezes B, Rossi DM, Ayub MAZ (2017): Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World J Microbiol Biotechnol* 33, 58
- De Baets S, Du Laing S, François C, Vandamme EJ (2002): Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29, 181–184
- de Souza DF, da Silva M de CS, de Paula Alves M, Fuentes DP, Porto LEO, de Oliveira PV, Kasuya MCM, Eller MR (2022): By-products as substrates for production of selenium-enriched *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Waste Biomass Valor* 13, 989–1001
- Deepalakshmi K, Mirunalini S (2014): *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J Biochem Technol* 5, 718–726
- Derbyshire EJ, Theobald H, Wall BT, Stephens F (2023): Food for our future: the nutritional science behind the sustainable fungal protein – mycoprotein. A symposium review. *J Nutr Sci* 12, e44
- Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, Durand A (1991): Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 35, 200–205
- Dimou DM, Georgala A, Komaitis M, Aggelis G (2002): Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol Res* 106, 925–929

- do Nascimento Deschamps JL, Schulz JG, Riani JC, Bonatti-Chaves M, Bonatti M, Sieber S, Lana M, Wisbeck E (2024): Sustainable production of *Pleurotus sajor-caju* mushrooms and biocomposites using brewer's spent and agro-industrial residues. *Sci Rep* 14, 26281
- El-Enshasy H, Daba A, El-Demellawy M, Ibrahim A, El Sayed S, El-Badry I (2010): Bioprocess development for large scale production of anticancer exo-polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *J Appl Sci* 10, 2523–2529
- Eliopoulos C, Arapoglou D, Chorianopoulos N, Markou G, Haroutounian SA (2022): Conversion of brewers' spent grain into proteinaceous animal feed using solid state fermentation. *Environ Sci Pollut Res* 29, 29562–29569
- Emerich Heringer HC, Marchioro MLK, Meneguzzi D, Barbosa-Dekker AM, Dekker RFH, da Cunha MAA (2023): Valorization of spent brewers yeast in the integrated production of the fungal exopolysaccharide (1→6)- β -D-glucan (Iasiodiplodan) and single-cell protein. *Biocatal Agric Biotechnol* 54, 102971
- FAO (2009): Feeding the world in 2050.
- FAO: The State of Food and Agriculture 2019 (The State of Food and Agriculture (SOFA) 2019). FAO, Rome 2019
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO: The State of Food Security and Nutrition in the World 2024 (2024). FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO; Rome 2024
- Farcas AC, Socaci SA, Dulf FV, Tofană M, Mudura E, Diaconeasa Z (2015): Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *J Cereal Sci* 64, 34–42
- Fazenda ML, Seviour R, McNeil B, Harvey LM (2008): Submerged culture fermentation of "higher fungi": The macrofungi. *Adv Appl Microb* 63, 33–103
- Ferreira IMPLVO, Pinho O, Vieira E, Tavela JG (2010): Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci Technol* 21, 77–84
- Fillaudeau L, Blanpain-Avet P, Daufin G (2006): Water, wastewater and waste management in brewing industries. *J Clean Prod* 14, 463–471
- Flamini G, Cioni PL, Morelli I (2002): Analysis of the essential oil of the aerial parts of *Viola etrusca* from Monte Labbro (South Tuscany, Italy) and in vivo analysis of flower volatiles using SPME. *Flavour Fragr J* 17, 147–149
- Flamini G, Luigi Cioni P, Morelli I, Ceccarini L, Andolfi L, Macchia M (2003): Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy. *Flavour Fragr J* 18, 460–462
- Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Bader A (2007): Essential oils of the aerial parts of three *Salvia* species from Jordan: *Salvia lanigera*, *S. spinosa* and *S. syriaca*. *Food Chem* 100, 732–735
- Food and Agriculture Organization, World Health Organization (1973): Energy and protein requirements: report of a Joint FAO/WHO ad hoc expert committee [meeting held in Rome from 22 March to 2 April 1971]. Russian version of nos. 516-530 bound together (barcode no. 00073783)

- Franitza L, Granvogl M, Schieberle P (2016): Influence of the production process on the key aroma compounds of rum: From molasses to the spirit. *J Agric Food Chem* 64, 9041–9053
- Furlan SA, Virmond LJ, Miers DA, Bonatti M, Gern RMM, Jonas R (1997): Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World J Microbiol Biotechnol* 13, 689–692
- Garduño IR, Smith M, Baranova E, Kinsley C (2024): Hydrogen production in dark fermentation of a brewery sludge pre-treated with white-rot fungi in submerged culture. *Bioresour Technol Rep* 25, 101773
- Gern RMM, Wisbeck E, Rampinelli JR, Ninow JL, Furlan SA (2008): Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Biores Technol* 99, 76–82
- Gharpuray MM, Lee Y-H, Fan LT (1983): Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 25, 157–172
- Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F (2000): Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* 20, 17–48
- González A, Cruz M, Losoya C, Nobre C, Loredó A, Rodríguez R, Contreras J, Belmares R (2020): Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food Funct* 11, 7400–7414
- Gorinstein S, Zemser M, Vargas-Albores F, Ochoa J-L, Paredes-Lopez O, Scheler Ch, Salnikow J, Martin-Belloso O, Trakhtenberg S (1999): Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. *Food Chem* 67, 71–78
- Gregori A, Švagelj M, Pahor B, Berovič M, Pohleven F (2008): The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *N Biotechnol* 25, 157–161
- Guan A, Wang M, Gong Y, Huang T, Du Y, Zong S (2025): Optimization of selenium biofortification by liquid fermentation based on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its effect on nutritional value of *Pleurotus ostreatus*. *J Food Compos Anal* 137, 106850
- Hadar Y, Cohen-Arazi E (1986): Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl Environ Microbiol* 51, 1352–1354
- Hamza A, Khalad A, Kumar DS (2024): Enhanced production of mycelium biomass and exopolysaccharides of *Pleurotus ostreatus* by integrating response surface methodology and artificial neural network. *Bioresour Technol* 399, 130577
- Happel K, Zeller L, Hammer AK, Zorn H (2025): Umami enhancing properties of enzymatically hydrolyzed mycelium of *Flammulina velutipes* cultured on potato pulp. *Food Sci Nutr* 13, e70128
- Harris CM, Todd RW, Bungard SJ, Lovitt RW, Morris JG, Kell DB (1987): Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme Microb Technol* 9, 181–186
- Horta ACL, Silva AJD, Sargo CR, Cavalcanti-Montañó ID, Galeano-Suarez ID, Velez AM, Santos MP, Gonçalves VM, Giordano RC, Zangirolami TC (2015): On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: Assessing the methodology

- for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. *Braz J Chem Eng* 32, 821–829
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B (2004): Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem* 39, 1415–1419
- Hu C, Zou Y, Zhao W (2009): Effect of soybean oil on the production of mycelial biomass and pleuromutilin in the shake-flask culture of *Pleurotus mutilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 25, 1705–1711
- Huige NJ: Brewery by-products and effluents. In: *Handbook of Brewing*. CRC Press, New York 1994, 501–505
- Hultberg M, Bodin H (2019): Fungi-based treatment of real brewery waste streams and its effects on water quality. *Bioprocess Biosyst Eng* 42, 1317–1324
- Humpenöder F, Bodirsky BL, Weindl I, Lotze-Campen H, Linder T, Popp A (2022): Projected environmental benefits of replacing beef with microbial protein. *Nature* 605, 90–96
- Islam MR, Tudryn G, Bucinell R, Schadler L, Picu RC (2017): Morphology and mechanics of fungal mycelium. *Sci Rep* 7, 13070
- Jaeger A, Nyhan L, Sahin AW, Zannini E, Arendt EK (2024): Lactic acid fermentation as a valorising agent for brewer's spent yeast—improving the sensory quality and nutritional potential. *Fermentation* 10, 54
- Jennison MW, Richberg CG, Krikszens AE (1957): Physiology of wood-rotting basidiomycetes: II. Nutritive composition of mycelium grown in submerged culture. *Appl Microbiol* 5, 87–95
- Ji X-J, Zhang A-H, Nie Z-K, Wu W-J, Ren L-J, Huang H (2014): Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy. *Biores Technol* 170, 356–360
- Jonathan SG, Adebayo-Tayo BC, Egbomuche RC, Popoola OO (2011): Optimization of growth conditions for mycelial yield and exopolysaccharide production by *Pleurotus ostreatus* cultivated in Nigeria. *Afr J Microbiol Res* 5, 2130–2138
- Jones CL, Lonergan GT, Mainwaring DE (1993): Mycelial fragment size distribution: an analysis based on fractal geometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 242–249
- Kabbaj W, Breheret S, Guimberteau J, Talou T, Olivier JM, Bensoussan M, Sobal M, Roussos S (2002): Comparison of volatile compound production in fruit body and in mycelium of *Pleurotus ostreatus* identified by submerged and solid-state cultures. *Appl Biochem Biotechnol* 102–103, 463–469
- Kahl T, Baber K, Otto P, Wirth C, Bauhus J (2015): Drivers of CO₂ emission rates from dead wood logs of 13 tree species in the initial decomposition phase. *Forests* 6, 2484–2504
- Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y (2001): Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *J Am Soc Brew Chem* 59, 59–62
- Karlović A, Jurić A, Ćorić N, Habschied K, Krstanović V, Mastanjević K (2020): By-products in the malting and brewing industries—re-usage possibilities. *Fermentation* 6, 82

- Karrer D, Weigel V, Hoberg N, Atamasov A, Rühl M (2021): Biotransformation of [U-13C]linoleic acid suggests two independent ketonic- and aldehydic cycles within C8-oxylipin biosynthesis in *Cyclocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini. *Mycol Progress* 20, 929–940
- Kawabe Tatsuya, Morita Hideo (1993): Volatile components in culture fluid of *Polyporus tuberaster*. *J Agric Food Chem* 41, 637–640
- Kim K, Choi B, Lee I, Lee H, Kwon S, Oh K, Kim AY (2011): Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *J Sci Food Agric* 91, 1561–1568
- Kissell LT, Prentice N (1979): Protein and fiber enrichment of cookie flour with brewer's spent grain. *Cereal Chem* 56, 261–266
- Kjeldahl J (1883): Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius, Zeitschrift f anal Chemie* 22, 366–382
- Klamer M, Bååth E (2004): Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6,9. *Soil Biol Biochem* 36, 57–65
- Kleofas V, Sommer L, Fraatz MA, Zorn H, Rühl M (2014): Fruiting body production and aroma profile analysis of *Agrocybe aegerita* cultivated on different substrates. *Nat Resour* 5, 233–240
- Knirsch M, Penschke A, Meyer-Pittroff R (1999): Disposal situation for brewery waste in Germany. Results of a survey. *Brauwelt Int* 477
- Koutrotsios G, Kalogeropoulos N, Stathopoulos P, Kaliora AC, Zervakis GI (2017): Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World J Microbiol Biotechnol* 33, 98
- Krings U, Grimrath A, Schindler S, Berger RG (2011): Volatiles responsible for the seasoning-like flavour of cell cultures of *Laetiporus sulphureus*. *Flavour Fragr J* 26, 174–179
- Krishna Prasad K, Venkata Mohan S, Pati BR, Sarma PN (2006): Immobilization of *Pleurotus ostreatus* 1804 on PUF cubes: Influence of mycelial growth pattern on laccase yield. *Indian J Biotechnol* 5, 84–88
- Ktenioudaki A, Crofton E, Scannell AGM, Hannon JA, Kilcawley KN, Gallagher E (2013): Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain. *J Cereal Sci* 57, 384–390
- Kurkela R (1980): Non-protein nitrogen compounds in the higher fungi—A review. *Food Chem* 5, 109–130
- Lapadatescu C, Feron G, Vergoignan C, Djian A, Durand A, Bonnarme P (1997): Influence of cell immobilization on the production of benzaldehyde and benzyl alcohol by the white-rot fungi *Bjerkandera adusta*, *Ischnoderma benzoinum* and *Dichomitus squalens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 708–714
- Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Gimbert IH-, Levasseur A, Raouche S, Sigoillot J-C (2014): Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol* 1, 1

- Lisci S, Tronci S, Grosso M, Hajrizaj R, Sibono L, Karring H, Gerganov A, Maschietti M, Errico M (2024): Valorizing brewer's spent grain: A sequential pathway of supercritical extraction, hydrolysis, and fermentation. *Chem Eng Sci* 285, 119620
- Lübeck M, Lübeck PS (2022): Fungal cell factories for efficient and sustainable production of proteins and peptides. *Microorganisms* 10, 753
- Lund MN, Lametsch R, Sørensen MB (2014): Increased protein–thiol solubilization in sweet wort by addition of proteases during mashing. *J Inst Brew* 120, 467–473
- Maccioni S, Baldini R, Cioni PL, Tebano M, Flamini G (2007): In vivo volatiles emission and essential oils from different organs and pollen of *Cistus albidus* from Caprione (Eastern Liguria, Italy). *Flavour Fragr J* 22, 61–65
- Macheiner D, Adamitsch B f., Karner F, Hampel W a. (2003): Pretreatment and hydrolysis of brewer's spent grains. *Eng Life Sci* 3, 401–405
- MacWilliam IC (1968): Wort composition—a review. *J Inst Brew* 74, 38–54
- Mandeel QA, Al-Laith AA, Mohamed SA (2005): Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 601–607
- Mansoldo FRP, Firpo R, Cardoso V da S, Queiroz GN, Cedrola SML, Godoy MG de, Vermelho AB (2020): New method for rapid identification and quantification of fungal biomass using ergosterol autofluorescence. *Talanta* 219, 121238
- Manter, Kelsey, Stone (2001): Quantification of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in Douglas-fir needles by ergosterol analysis. *For Pathol* 31, 229–240
- Manu-Tawiah W, Martin AM (1987): Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiol* 4, 303–310
- Marquez-rocha FJ, Guillén GK, Sánchez JE, Vázquez-duhalt R (1999): Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnol Tech* 13, 29–32
- Martini AEV, Miller MW, Martini A (1979): Amino acid composition of whole cells of different yeasts. *J Agric Food Chem* 27, 982–984
- Matcham SE, Jordan BR, Wood DA (1985): Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 21, 108–112
- Mathias TR dos S, Alexandre VMF, Cammarota MC, de Mello PPM, Sérvulo EFC (2015): Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *J Inst Brew* 121, 400–404
- Miller SA, Dwyer JT (2001): Evaluating the safety and nutritional value of mycoprotein. *Food Technol* 55, 42–47
- Mitri S, Salameh S-J, Khelfa A, Leonard E, Maroun RG, Louka N, Koubaa M (2022): Valorization of brewers' spent grains: pretreatments and fermentation, a review. *Fermentation* 8, 50
- Moio L, Addeo F (1998): Grana Padano cheese aroma. *Res J Dairy Sci* 65, 317–333
- Mussatto SI (2014): Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J Sci Food Agric* 94, 1264–1275

- Mussatto SI, Roberto IC (2005): Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *J Sci Food Agric* 85, 2453–2460
- Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC (2006): Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci* 43, 1–14
- Naibaho J, Pudło A, Bobak Ł, Wojdyło A, López ÁA, Pangestika LMW, Andayani SN, Korzeniowska M, Yang B (2023): Conventional water bath heating on undried brewer's spent grain: Functionality, fatty acids, volatiles, polyphenolic and antioxidant properties. *Food Biosci* 53, 102523
- Newell SY (1994): Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Appl Environ Microbiol* 60, 3479–3482
- Nielsen GS, Poll L (2004): Determination of odor active aroma compounds in freshly cut leek (*Allium ampeloprasum* Var. Bulga) and in long-term stored frozen unblanched and blanched leek slices by gas chromatography olfactometry analysis. *J Agric Food Chem* 52, 1642–1646
- Niemi P, Tamminen T, Smeds A, Viljanen K, Ohra-aho T, Holopainen-Mantila U, Faulds CB, Poutanen K, Buchert J (2012): Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *J Agric Food Chem* 60, 9910–9917
- Nout MJR, Kiers JL (2005): Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *J Appl Microbiol* 98, 789–805
- Nyegue M, Zollo P-HA, Bessièrè J-M, Rapior S (2003): Volatile components of fresh *Pleurotus ostreatus* and *Termitomyces shimperi* from Cameroon. *J Essent Oil-Bear Plants* 6, 153–160
- Olajire AA (2020): The brewing industry and environmental challenges. *J Clean Prod* 256, 102817
- Onuoha SC, Okoroh PN, Tom-Quinn RA (2021): Proximate composition, essential heavy metal concentrations and nutrient density of the mycelium and fruiting bodies of organically cultivated *Pleurotus ostreatus*. *J Appl Life Sci Int* 44–52
- Ooijkaas LP, Tramper J, Buitelaar RM (1998): Biomass estimation of *Coniothyrium Minitans* in solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 22, 480–486
- Ortiz I, Torreiro Y, Molina G, Maroño M, Sánchez JM (2019): A feasible application of circular economy: spent grain energy recovery in the beer industry. *Waste Biomass Valor* 10, 3809–3819
- Otter GE, Taylor L (1976): The determination of amino acids in wort, beer and brewing materials using gas chromatography. *J Inst Brew* 82, 264–269
- Palmquist DL, Jenkins TC (2003): Challenges with fats and fatty acid methods. *J Anim Sci* 81, 3250–3254
- Papadaki A, Kachrimanidou V, Papanikolaou S, Philippoussis A, Diamantopoulou P (2019): Upgrading grape pomace through *Pleurotus* spp. cultivation for the production of enzymes and fruiting bodies. *Microorganisms* 7, 207
- Papagianni M (2004): Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechno Adv* 22, 189–259

- Papaspyridi L, Sinanoglou V, Strati I, Katapodis P, Christakopoulos P (2013): Fatty acid profile of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma australe* grown naturally and in a batch bioreactor. *Acta Aliment* 42, 328–337
- Papaspyridi L-M, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P (2010): Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochem Eng J* 50, 131–138
- Papaspyridi L-M, Aligiannis N, Topakas E, Christakopoulos P, Skaltsounis A-L, Fokialakis N (2012): Submerged fermentation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor as a promising alternative for the effective production of bioactive metabolites. *Molecules* 17, 2714–2724
- Pavlík M, Fleischer P, Fleischer P, Pavlík M, Šuleková M (2020): Evaluation of the carbon dioxide production by fungi under different growing conditions. *Curr Microbiol* 77, 2374–2384
- Politis SN, Colombo P, Colombo G, Rekkas DM (2017): Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm* 43, 889–901
- Poore J, Nemecek T (2018): Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science* 360, 987–992
- Prentice N, Refsguard JM (1978): Enzymic hydrolysis of brewers' spent grain. *J Am Soc Brew Chem* 36, 196–200
- Rajaratnam S, Bano Z, Miles PG (1987): *Pleurotus* mushrooms. Part I A. morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 26, 157–223
- Resconi A, Bellezza Oddon S, Ferrocino I, Loiotine Z, Caimi C, Gasco L, Biasato I (2024): Effects of brewery by-products on growth performance, bioconversion efficiency, nutritional profile, and microbiota and mycobiota of black soldier fly larvae. *Anim* 18, 101288
- Riu-Aumatell M, López-Tamames E, Buxaderas S (2005): Assessment of the volatile composition of juices of apricot, peach, and pear according to two pectolytic treatments. *J Agric Food Chem* 53, 7837–7843
- Robbins GS, Pomeranz Y (1971): Amino acid composition of malted cereals and malt sprouts. *J Am Soc Brew Chem* 29, 15–21
- Robertson JA, l'Anson KJA, Treimo J, Faulds CB, Brocklehurst TF, Eijsink VGH, Waldron KW (2010): Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Sci Technol* 43, 890–896
- Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C (2017): The beneficial role of edible mushrooms in human health. *Curr Opin Food Sci* 14, 122–128
- Sadler M (1988): QUORN. *Food sci nutr* 88, 9–11
- Salama A-RA, El-Sahn MA, Mesallam AS, Shehata AME-T (1997): The chemical composition, the nutritive value and the functional properties of malt sprout and its components (acrospires, rootlets and husks). *J Sci Food Agric* 75, 50–56

- Salvatore I, Leue-Rüegg R, Beretta C, Müller N (2024): Valorisation potential and challenges of food side product streams for food applications: A review using the example of Switzerland. *Future Foods* 9, 100325
- Sánchez-García J, Muñoz-Pina S, García-Hernández J, Heredia A, Andrés A (2024): Volatile profile of quinoa and lentil flour under fungal fermentation and drying. *Food Chem* 430, 137082
- Santos M, Jiménez JJ, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C, del Nozal MJ (2003): Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chem* 80, 17–21
- Schieber A (2017): Side streams of plant food processing as a source of valuable compounds: selected examples. *Annu Rev Food Sci Technol* 8, 97–112
- Schlabit C, Kuhn D, Grambusch IM, Pedralli L, Jacobs W, Neutzling Lehn D, Volken De Souza CF (2024): Reuse of residual brewer's yeast: valorization of industrial waste as a source of nutrients for dairy cattle. *Waste Biomass Valor* 15, 5487–5499
- Scholtmeijer K, van den Broek LAM, Fischer ARH, van Peer A (2023): Potential protein production from lignocellulosic materials using edible mushroom forming fungi. *J Agric Food Chem* 71, 4450–4457
- Seitz LM, Sauer DB, Burroughs R, Mohr HE, Hubbard JD (1979): Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathol* 69, 1202
- Shen K, Liu Y, Liu L, Khan AW, Normakhamatov N, Wang Z (2025): Characterization, optimization, and scaling-up of submerged *Inonotus hispidus* mycelial fermentation for enhanced biomass and polysaccharide production. *Appl Biochem Biotechnol* 197, 1534–1555
- Shetty R, Petersen FR, Podduturi R, Molina GES, Wätjen AP, Madsen SK, Zioga E, Øzmerih S, Hobley TJ, Heiner Bang-Berthelsen C (2023): Fermentation of brewer's spent grain liquids to increase shelf life and give an organic acid enhanced ingredient. *LWT Food Sci Technol* 182, 114911
- Shimoda M, Wu Y, Osajima Y (1996): Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *J Agric Food Chem* 44, 3913–3918
- Smith RL, Gilkerson E (1979): Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal Biochem* 98, 478–480
- Statistisches Bundesamt (2025): Absatz von Bier, betriebene Braustätten, Verbrauch von Bier: Deutschland, Jahre.
- Stuedler S, Bley T: Better one-eyed than blind—challenges and opportunities of biomass measurement during solid-state fermentation of basidiomycetes. In: *Filaments in Bioprocesses (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)*. Band 149; Springer, Cham 2015a, 223–252
- Stuedler S, Bley T (2015b): Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 1313–1323
- Styogantseva JM, Are RJ, Viestuks UE: Growth of pellets of a basidial fungus *Pleurotus ostreatus* under various cultivation conditions. Band 9; De Gruyter, Berlin, Boston 1989, 149–156

- Swing CJ, Thompson TW, Guimaraes O, Geornaras I, Engle TE, Belk KE, Gifford CL, Narayanan Nair M (2021): Nutritional composition of novel plant-based meat alternatives and traditional animal-based meats. *Food sci nutr* 7, 1–12
- Todorov SK, Tomasikova F, Hansen M, Shetty R, Jansen CL, Jacobsen C, Hobley TJ, Lametsch R, Bang-Berthelsen CH (2024): Using pre-fermented sugar beet pulp as a growth medium to produce *Pleurotus ostreatus* mycelium for meat alternatives. *Int J Food Microbiol* 425, 110872
- Tressl R, Bahri D, Engel KH (1982): Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *J Agric Food Chem* 30, 89–93
- Tu J, Zhao J, Liu G, Tang C, Han Y, Cao X, Jia J, Ji G, Xiao H (2020): Solid state fermentation by *Fomitopsis pinicola* improves physicochemical and functional properties of wheat bran and the bran-containing products. *Food Chem* 328, 127046
- United Nations Department For Economic And Social Affairs: WORLD POPULATION PROSPECTS 2024: summary of results. UNITED NATIONS, New York 2024
- Upcraft T, Tu W-C, Johnson R, Finnigan T, Hung NV, Hallett J, Guo M (2021): Protein from renewable resources: mycoprotein production from agricultural residues. *Green Chem* 23, 5150–5165
- Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O (2015): Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int J Microbiol* 2015, 376387
- van Dam L, Cruz-Morales P, Rodriguez Valerón N, Calheiros de Carvalho A, Prado Vásquez D, Lübke M, Kloster Pedersen L, Munk R, Sommer MOA, Jahn LJ (2024): GastronOmics: Edibility and safety of mycelium of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Curr Res Food Sci* 9, 100866
- Van Den Dool H, Kratz P (1963): A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J Chrom A* 11, 463–471
- Vetter J, Siller I (1991): Chitingehalt von höheren Pilzen. *Z Lebensm Unters Forch* 193, 36–38
- Vieira EF, Carvalho J, Pinto E, Cunha S, Almeida AA, Ferreira IMPLVO (2016): Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *J Food Compos Anal* 52, 44–51
- Wan Mohtar WAAQI, Ab. Latif N, Harvey LM, McNeil B (2016): Production of exopolysaccharide by *Ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol* 6, 91–101
- Wang D, Sakoda A, Suzuki M (2001): Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour Technol* 78, 293–300
- Waters DM, Kingston W, Jacob F, Titze J, Arendt EK, Zannini E (2013): Wheat bread biofortification with rootlets, a malting by-product. *J Sci Food Agric* 93, 2372–2383
- Xiros C, Christakopoulos P (2012): Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste Biomass Valor* 3, 213–232
- Yalman S, Trapp T, Vetter C, Popa F, Fraatz MA, Zorn H (2023): Formation of a meat-like flavor by submerged cultivated *Laetiporus montanus*. *J Agric Food Chem* 71, 8083–8092

- Yup Jang M, Ryul Ryu W, Hwan Cho M (2002): Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. *Enzyme Microb Technol* 30, 741–746
- Zadrazil F: Cultivation of *Pleurotus*. In: Chang ST, Hayes WA (Hrsg.): The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press 1978, 521–557
- Zeko-Pivač A, Bošnjaković A, Planinić M, Parlov Vuković J, Novak P, Jednačak T, Tišma M (2022): Improvement of the nutraceutical profile of brewer's spent grain after treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganisms* 10, 2295
- Zhang Y, Fraatz MA, Horlamus F, Quitmann H, Zorn H (2014): Identification of potent odorants in a novel nonalcoholic beverage produced by fermentation of wort with Shiitake (*Lentinula edodes*). *J Agric Food Chem* 62, 4195–4203
- Zhou T, Hu W, Yang Z, Li J, Zeng X (2023): Study on nutrients, non-volatile compounds, volatile compounds and antioxidant capacity of oyster mushroom cultivated with corn distillers' grains. *LWT Food Sci Technol* 183, 114967
- Zhu H, Sun SJ (2009): Effect of Constant Glucose feeding on the production of exopolysaccharides by *Tremella fuciformis* spores. *Appl Biochem Biotechnol* 152, 366–371
- Zhu L, Wang J, Feng Y, Yin H, Lai H, Xiao R, He S, Yang Z, He Y (2022): Process optimization, amino acid composition, and antioxidant activities of protein and polypeptide extracted from waste beer yeast. *Molecules* 27, 6825
- Zweck S, Hüttermann A, Chet I (1978): A convenient method for preparing inocula of homogenized mycelia. *Exp Mycol* 2, 377–378
- FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>; abgerufen am 27.05.2025
- Summary of applications and notifications - European Commission. https://food.ec.europa.eu/food-safety/novel-food/authorisations/summary-applications-and-notifications_en; abgerufen am 07.06.2025
- VERORDNUNG (EU) Nr. 1169/2011 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission; zuletzt geändert durch Delegierte Verordnung (EU) 2024/2512 der Kommission vom 17. April 2024
- VERORDNUNG (EU) 2015/2283 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 1852/2001 der Kommission; zuletzt geändert durch Verordnung (EU) 2019/1381 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Juni 2019
- BESCHLUSS DER KOMMISSION vom 2. Februar 2011 zur Genehmigung des Inverkehrbringens eines Mycelauszugs von *Lentinula edodes* (Shiitake-Pilz) als neuartige Lebensmittelzutat gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates

6 Anhang

6.1 Substratanalytik

Tabelle 6-1: Feuchte, Roh- und Reinprotein-, Gesamtfett-, Rohasche- und Gesamtkohlenhydratgehalte der Substrate Weizenbiertreber (WT), Pilsenerbier (PT), Schwarzbier (SBT), Hefe, Würze und Malzkeime (MK). Mit Ausnahme der Feuchte beziehen sich alle Werte auf die Trockenmasse (TM).

Substrat	WT	PT	SBT	Hefe	Würze	MK
Feuchte [%]	78,58 ± 2,76	78,18 ± 0,92	81,22 ± 0,26	89,07 ± 0,38	72,81 ± 0,29	7,34 ± 1,04
Rohprotein [g (100 g TM) ⁻¹]	24,32 ± 1,82	18,88 ± 0,51	23,48 ± 0,69	37,71 ± 0,20	5,54 ± 0,11	19,42 ± 0,02
Reinprotein [g (100 g TM) ⁻¹]	12,80 ± 0,96	15,19 ± 0,41	15,78 ± 0,46	32,64 ± 0,18	4,35 ± 0,09	15,32 ± 0,02
Gesamtfett [g (100 g TM) ⁻¹]	11,1 ± 0,2	11,6 ± 0,2	13,0 ± 1,4	1,71 ± 0,14	0,78 ± 0,12	3,61 ± 0,04
Rohasche [g (100 g TM) ⁻¹]	2,85 ± 0,02	2,97 ± 0,01	2,68 ± 0,03	6,02 ± 0,05	1,54 ± 0,04	4,4 ± 0,22
Gesamtkohlenhydrat [g (100 g TM) ⁻¹]	73,2 ± 1,2	70,2 ± 0,6	68,5 ± 1,9	59,6 ± 0,4	93,3 ± 0,3	76,7 ± 0,3

6.2 Screening in Emerskultur

Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsenertreber, SBT: Schwarzbiertreber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]					
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	WT	175	3	63	100	100	100	100
	PT	175	3	65	100	100	100	100
	SBT	175	0	65	100	100	100	100
<i>Mycetinis scorodoniis</i>	WT	175	5	28	40	53	83	93
	PT	175	5	28	38	58	83	93
	SBT	175	5	25	38	53	83	93
<i>Pleurotus sapidus</i>	WT	175	8	55	80	100	100	100
	PT	175	10	53	78	100	100	100
	SBT	175	10	50	78	100	100	100
<i>Trametes suaveolens</i>	WT	175	23	55	80	100	100	100
	PT	175	25	63	100	100	100	100
	SBT	175	23	58	83	100	100	100
<i>Trametes versicolor</i>	WT	175	23	85	100	100	100	100
	PT	175	25	73	100	100	100	100
	SBT	175	23	63	100	100	100	100
<i>Wolfiporia cocos</i>	WT	175	25	68	100	100	100	100
	PT	175	30	98	100	100	100	100
	SBT	175	30	85	100	100	100	100
<i>Pleurotus floridaus</i>	WT	175	13	55	80	93	100	100
	PT	175	15	63	100	100	100	100
	SBT	175	13	60	100	100	100	100
<i>Pleurotus sp.</i>	WT	175	15	48	63	83	100	100
	PT	175	15	65	100	100	100	100
	SBT	175	15	60	100	100	100	100
<i>Lentinula edodes</i>	WT	100	5	33	48	65	88	100
	PT	175	5	33	50	60	88	100
	SBT	250	5	33	45	55	83	100
<i>Cyathus limbatius</i>	WT	100	5	33	50	70	100	100
	PT	175	5	33	50	73	100	100
	SBT	250	5	33	50	70	100	100

Name Pilz	Treber	Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]					
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14
<i>Wolfiporia cocos</i>	WT	175	20	68	80	100	100	100
	PT	175	25	80	100	100	100	100
	SBT	175	20	68	100	100	100	100
<i>Laetiporus sulphureus</i>	WT	100	0	33	50	83	100	100
	PT	175	0	33	55	78	100	100
	SBT	250	0	25	48	68	100	100
<i>Fomitopsis pinicola</i>	WT	100	0	45	66	80	100	100
	PT	175	0	45	70	90	100	100
	SBT	250	0	48	81	88	100	100
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	WT	100	0	40	68	75	100	100
	PT	175	0	45	80	80	100	100
	SBT	250	0	48	83	88	100	100
<i>Ganoderma sp.</i>	WT	175	10	43	65	93	100	100
	PT	175	8	40	75	95	100	100
	SBT	175	8	38	60	83	100	100
<i>Coprinellus sp.</i>	WT	100	13	50	80	88	100	100
	PT	175	13	50	80	88	100	100
	SBT	250	15	50	80	88	100	100
<i>Lentinus squarrosulus</i>	WT	100	15	50	83	88	100	100
	PT	175	8	45	73	90	100	100
	SBT	250	8	45	70	95	100	100
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	WT	175	8	45	70	90	100	100
	PT	175	13	58	88	100	100	100
	SBT	175	13	55	88	100	100	100
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	WT	175	20	63	85	100	100	100
	PT	175	18	65	93	100	100	100
	SBT	175	20	65	90	100	100	100
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	WT	175	18	63	95	100	100	100
	PT	175	18	63	98	100	100	100
	SBT	175	15	55	83	100	100	100
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	WT	175	5	20	28	38	43	43
	PT	175	5	23	35	35	48	58
	SBT	175	5	23	35	43	48	63

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsener treber, SBT: Schwarzbiertreber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]									
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14				
<i>Gymnopilus</i> sp.	WT	100	5	25	45	40	50	70				
		175	5	20	45	38	50	65				
		250	3	20	30	38	45	60				
	PT	100	3	15	30	35	53	70				
		175	3	15	30	38	55	70				
		250	3	18	33	40	55	70				
<i>Pholiota aurivella</i>	WT	100	3	15	30	43	53	70				
		175	3	20	30	40	55	70				
		250	3	18	30	43	55	70				
	PT	175	8	13	15	18	50	60				
		175	5	10	15	30	80	88				
		175	8	10	13	25	58	60				
<i>Pholiota</i> sp.	WT	175	13	45	63	85	100	100				
		175	13	43	65	85	100	100				
		175	13	43	60	78	100	100				
	PT	175	10	38	50	63	80	90				
		175	10	35	43	63	80	90				
		175	10	38	45	63	80	90				
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	WT	100	0	8	18	25	35	38				
		175	0	10	18	25	35	43				
		250	0	10	23	28	40	55				
	PT	100	0	10	23	25	38	53				
		175	0	10	23	33	45	58				
		250	0	10	23	28	43	55				
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	WT	100	0	13	23	30	35	55				
		175	0	10	20	28	35	53				
		250	0	13	23	30	43	58				
	PT	175	3	35	48	65	100	100				
		175	5	40	55	70	100	100				
		175	3	38	50	65	100	100				
<i>Phellinus igniarius</i>	WT	175	3	18	33	43	58	68				
		175	3	20	38	43	63	73				
		175	3	18	35	43	58	68				
	PT	175	0	8	15	20	33	38				
		175	0	8	14	23	33	38				
		175	0	8	14	23	33	38				
<i>Fistulina hepatica</i>	WT	175	0	5	13	18	29	38				
		175	0	5	13	18	29	38				
		175	0	5	13	18	29	38				
	PT	175	0	5	13	18	29	38				
		175	0	5	13	18	29	38				
		175	0	5	13	18	29	38				

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]									
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14				
<i>Lentinus crinitus</i>	WT	100	20	58	65	100	100	100				
		175	20	58	86	100	100	100				
		250	15	55	100	100	100	100				
	PT	100	10	55	100	100	100	100				
		175	13	53	100	100	100	100				
		250	13	50	80	100	100	100				
<i>Coprinus cornatus</i>	WT	100	13	50	80	100	100	100				
		175	13	50	75	100	100	100				
		250	13	50	75	100	100	100				
	PT	100	3	25	40	60	88	95				
		175	3	33	55	75	100	100				
		250	3	33	55	75	100	100				
<i>Hyphizygus marmoreus</i>	WT	100	3	35	58	78	100	100				
		175	3	30	55	73	100	100				
		250	4	33	58	75	100	100				
	PT	100	4	30	53	73	100	100				
		175	4	35	58	73	100	100				
		250	3	33	55	73	100	100				
<i>Hyphizygus marmoreus</i>	WT	100	5	25	40	55	83	90				
		175	5	15	38	50	75	83				
		250	5	20	40	53	78	85				
	PT	100	5	28	43	60	90	100				
		175	5	25	40	60	88	100				
		250	5	25	45	60	88	100				
<i>Panellus serotinus</i>	WT	100	5	28	43	60	85	100				
		175	5	28	45	60	88	100				
		250	5	28	43	60	88	100				
	PT	175	0	13	53	78	55	100				
		175	0	10	60	88	100	100				
		175	0	10	55	78	78	100				
<i>Trametes hirsuta</i>	WT	175	23	60	73	100	100	100				
		175	23	58	73	100	100	100				
		175	20	50	73	100	100	100				
	PT	175	0	3	3	5	8	13				
		175	0	5	8	10	13	18				
		175	0	3	3	5	10	13				

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsenertreber, SBT: Schwarzbierdreber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]						
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14	
	WT	100	0	8	28	33	65	100	
	SBT	175	0	5	28	20	60	100	
	SBT	250	0	8	25	40	63	100	
<i>Exidia glandulosa</i>	WT	175	8	23	38	48	85	88	
	PT	175	8	25	40	48	85	100	
	SBT	175	8	25	38	48	85	100	
<i>Phlebia tremelosa</i>	WT	175	5	73	100	100	100	100	
	PT	175	5	80	100	100	100	100	
	SBT	175	5	83	100	100	100	100	
	WT	100	0	39	45	63	80	100	
	WT	175	0	33	40	61	75	100	
	WT	250	0	36	48	63	85	100	
<i>Pholiota nameko</i>	WT	100	3	25	50	73	100	100	
	PT	175	3	30	50	75	100	100	
	SBT	250	3	38	55	83	100	100	
	WT	100	3	25	45	55	80	100	
	SBT	175	3	25	45	60	83	100	
	SBT	250	3	30	46	70	85	100	
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	WT	175	5	43	55	78	83	88	
	PT	175	10	45	70	88	100	100	
	SBT	175	10	45	58	78	100	100	
<i>Abortiporus biennis</i>	WT	175	28	73	100	100	100	100	
	PT	175	28	75	100	100	100	100	
	SBT	175	25	70	100	100	100	100	
<i>Postia</i> sp.	WT	175	0	3	3	5	18	30	
	PT	175	0	5	8	18	33	45	
	SBT	175	0	3	3	5	15	25	
<i>Hericium cirrhatum</i>	WT	175	0	5	5	25	23	25	
	PT	175	0	5	8	18	30	38	
	SBT	175	0	5	5	13	23	28	
<i>Hericium coraloides</i>	WT	175	0	5	15	25	38	55	
	PT	175	0	11	30	43	83	88	
	SBT	175	0	15	28	38	65	78	
<i>Polyporus squamosus</i>	WT	100	0	5	10	13	28	33	
	WT	175	0	5	15	18	30	30	
	WT	250	0	5	15	8	15	35	

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]						
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14	
<i>Laetiporus</i> sp.	WT	175	3	8	10	28	20	28	
	PT	175	3	15	13	28	23	33	
	SBT	175	3	13	18	23	25	48	
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	WT	175	5	23	40	55	83	85	
	PT	175	5	25	45	55	88	93	
	SBT	175	5	25	43	53	78	83	
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	WT	175	0	3	3	5	16	18	
	PT	175	0	3	5	8	18	23	
	SBT	175	0	3	5	5	15	20	
<i>Armillaria</i> sp.	WT	175	0	3	5	18	25	28	
	PT	175	0	3	8	15	25	30	
	SBT	175	0	3	10	18	25	26	
<i>Armillaria tabescens</i>	WT	175	0	3	8	10	18	23	
	PT	175	0	5	8	13	20	23	
	SBT	175	0	5	10	18	23	20	
<i>Coprinus</i> sp.	WT	175	3	8	15	28	35	43	
	PT	175	3	13	15	28	25	33	
	SBT	175	3	10	13	23	28	35	
<i>Lentinellus cochleatus</i> var. <i>inolens</i>	WT	175	0	3	5	5	10	10	
	PT	175	0	3	3	3	13	13	
	SBT	175	0	3	3	3	13	13	
<i>Pleurotus eryngii</i>	WT	100	5	20	48	55	100	100	
	PT	175	8	23	43	55	100	100	
	SBT	250	5	28	45	58	100	100	
<i>Pleurotus eryngii</i>	WT	100	5	33	45	56	100	100	
	PT	175	5	35	48	76	100	100	
	SBT	250	5	35	55	68	100	100	
<i>Hericium erinaceus</i>	WT	100	5	20	40	59	100	100	
	PT	175	8	23	35	63	100	100	
	SBT	250	8	25	35	59	100	100	
<i>Hericium erinaceus</i>	WT	100	0	15	30	38	75	100	
	PT	175	0	10	28	48	73	100	
	SBT	250	0	13	30	48	75	100	
<i>Hericium erinaceus</i>	WT	100	0	8	20	25	80	100	
	PT	175	0	10	30	38	85	100	
	SBT	250	0	10	33	48	85	100	

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsener treber, SBT: Schwarzbier treber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Medium		Bewuchs der Platte [%]									
	Treber	Konzentration [g/L]	Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14				
<i>Agaricus arvensis</i>	SBT	175	0	3	5	8	8	13				
	WT	175	0	5	13	18	28	33				
	PT	175	0	5	13	20	28	38				
<i>Meripilus giganteus</i>	SBT	175	0	5	13	18	28	28				
	WT	175	3	38	55	83	100	100				
	PT	175	5	40	68	100	100	100				
<i>Cyclocybe aegerita</i>	SBT	175	3	33	65	88	100	100				
	WT	175	10	25	48	73	100	100				
	PT	175	10	38	60	85	100	100				
<i>Fomes fomentarius</i>	SBT	175	13	35	53	73	100	100				
	WT	175	10	48	85	100	100	100				
	PT	175	13	50	88	100	100	100				
<i>Flammulina velutipes</i>	SBT	175	10	50	83	100	100	100				
	WT	175	10	30	35	48	75	93				
	PT	175	10	30	43	60	90	100				
<i>Verticillium sp.</i>	SBT	175	10	33	40	60	88	100				
	WT	175	3	10	20	23	33	38				
	PT	175	5	13	18	28	30	40				
<i>Ganoderma applanatum</i>	SBT	175	3	10	18	25	30	35				
	WT	175	8	23	35	45	63	68				
	PT	175	8	23	35	50	70	78				
<i>Pleurotus sp.</i>	SBT	175	8	28	35	45	63	85				
	WT	100	8	45	58	68	100	100				
	PT	175	8	45	60	85	100	100				
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	SBT	250	15	53	63	85	100	100				
	WT	100	13	55	100	100	100	100				
	PT	175	13	60	100	100	100	100				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SBT	250	18	60	100	100	100	100				
	WT	100	18	58	63	100	100	100				
	PT	175	15	55	68	100	100	100				

Name Pilz	Medium		Bewuchs der Platte [%]									
	Treber	Konzentration [g/L]	Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14				
<i>Fomitopsis pinicola</i>	SBT	100	0	3	15	15	30	38				
	WT	175	0	3	13	10	20	38				
	PT	250	0	3	10	20	20	38				
<i>Pycnoporus coccineus</i>	SBT	100	0	3	8	8	20	28				
	WT	175	0	5	10	18	30	38				
	PT	250	0	3	10	15	25	33				
<i>Parasola conoplea</i>	SBT	175	13	48	75	95	100	100				
	WT	175	15	55	85	100	100	100				
	PT	175	13	45	73	95	100	100				
<i>Lentinellus cochleatus var. inolens</i>	SBT	175	10	40	68	80	88	93				
	WT	175	13	43	68	83	90	93				
	PT	175	15	43	68	80	90	90				
<i>Agrocybe pedicelata</i>	SBT	175	5	20	23	38	40	45				
	WT	175	8	20	25	38	50	63				
	PT	175	8	23	25	38	48	53				
<i>Flammulina velutipes</i>	SBT	175	3	3	3	3	5	5				
	WT	175	3	3	3	5	5	5				
	PT	175	3	3	3	5	5	8				
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	SBT	175	8	18	30	43	63	70				
	WT	175	8	13	28	30	40	48				
	PT	175	8	13	25	30	43	53				
<i>Clitocybe geotropa</i>	SBT	175	5	38	50	78	100	100				
	WT	100	8	33	50	70	100	100				
	PT	175	8	33	50	70	100	100				
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	SBT	100	8	30	45	58	68	68				
	WT	175	8	28	40	55	60	65				
	PT	250	8	28	43	55	65	68				
<i>Clitocybe geotropa</i>	SBT	100	8	30	45	63	88	100				
	WT	175	8	30	45	60	88	100				
	PT	250	10	30	48	63	88	100				
<i>Clitocybe geotropa</i>	SBT	100	8	30	48	58	83	88				
	WT	175	8	30	48	60	85	90				
	PT	250	8	30	45	58	83	88				
<i>Clitocybe geotropa</i>	SBT	175	0	3	5	5	8	13				
	WT	175	0	3	5	8	8	13				
	PT	175	0	3	5	8	8	13				

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsener treber, SBT: Schwarzbier treber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]						
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14	
<i>Piptoporus betulinus</i>	WT	175	13	48	73	95	100	100	
	PT	175	13	55	88	100	100	100	
	SBT	175	15	53	85	100	100	100	
<i>Macrolepiota procera</i>	WT	175	8	11	15	23	28	30	
	PT	175	5	10	15	23	28	30	
	SBT	175	3	10	15	20	28	30	
<i>Clitopilus sp.</i>	WT	175	18	50	63	93	100	100	
	PT	175	18	55	68	100	100	100	
	SBT	175	18	50	68	95	100	100	
<i>Crepidotus sp.</i>	WT	175	8	18	25	38	65	70	
	PT	175	8	23	35	53	78	83	
	SBT	175	8	20	33	48	63	68	
<i>Clitocybe nebularis</i>	WT	175	3	10	13	20	28	35	
	PT	175	3	10	13	20	30	35	
	SBT	175	3	10	13	18	25	28	
<i>Meripilus giganteus</i>	WT	175	5	33	63	85	100	100	
	PT	175	8	38	75	100	100	100	
	SBT	175	8	38	68	100	100	100	
<i>Phellinus igniarius</i>	WT	175	3	13	25	40	55	68	
	PT	175	3	15	33	43	60	73	
	SBT	175	3	15	30	40	60	78	
<i>Trametes ochracea</i>	WT	100	20	60	66	100	100	100	
	PT	175	20	63	91	100	100	100	
	SBT	250	23	65	68	100	100	100	
<i>Coprinellus micaceus</i>	WT	100	23	65	100	100	100	100	
	PT	175	23	65	100	100	100	100	
	SBT	250	23	63	100	100	100	100	
<i>Coprinellus micaceus</i>	WT	100	20	65	100	100	100	100	
	PT	175	20	58	100	100	100	100	
	SBT	250	20	58	100	100	100	100	
<i>Coprinellus micaceus</i>	WT	100	10	55	85	88	100	100	
	PT	175	13	55	85	100	100	100	
	SBT	250	13	55	85	100	100	100	
<i>Coprinellus micaceus</i>	WT	100	18	60	93	100	100	100	
	PT	175	18	60	93	100	100	100	
	SBT	175	18	60	93	100	100	100	

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]						
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14	
	WT	250	8	48	80	100	100	100	
	PT	100	13	50	83	100	100	100	
	SBT	175	15	60	100	100	100	100	
<i>Macrolepiota procera</i>	WT	250	15	63	100	100	100	100	
	PT	100	13	43	63	100	100	100	
	SBT	175	13	43	80	100	100	100	
<i>Armillaria mellea</i>	WT	250	13	53	83	100	100	100	
	PT	175	5	13	15	25	35	45	
	SBT	175	5	15	20	30	48	45	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WT	175	5	10	18	33	45	48	
	PT	175	0	0	8	13	20	20	
	SBT	175	0	3	8	13	20	20	
<i>Psathyrella candolleana</i>	WT	175	0	3	8	13	20	20	
	PT	175	0	3	8	13	20	20	
	SBT	175	0	3	8	13	20	25	
<i>Trametes hirsuta</i>	WT	175	10	55	85	100	100	100	
	PT	175	15	65	100	100	100	100	
	SBT	175	13	63	80	100	100	100	
<i>Fomitopsis pinicola</i>	WT	175	20	53	70	80	100	100	
	PT	175	23	60	88	100	100	100	
	SBT	175	23	53	78	100	100	100	
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	WT	175	20	63	85	100	100	100	
	PT	175	20	63	88	100	100	100	
	SBT	175	18	58	88	100	100	100	
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	WT	175	8	48	75	100	100	100	
	PT	175	8	53	78	100	100	100	
	SBT	175	8	38	65	100	100	100	
<i>Mycena alnetorum</i>	WT	175	5	20	38	53	70	80	
	PT	175	5	23	40	53	68	78	
	SBT	175	5	25	40	53	70	78	
<i>Mycena alnetorum</i>	WT	175	10	33	48	63	83	93	
	PT	175	10	35	45	68	90	93	
	SBT	175	10	30	45	65	88	93	
<i>Mycena alnetorum</i>	WT	175	3	10	28	33	48	55	
	PT	175	3	10	13	28	48	55	
	SBT	175	3	13	28	35	48	55	

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsenerbier, SBT: Schwarzbierbier. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]					
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	WT	100	0	50	65	75	80	100
		175	0	50	65	75	75	100
		250	0	45	65	80	85	100
	PT	100	0	43	65	85	100	100
		175	0	46	70	83	100	100
		250	0	43	65	80	100	100
<i>Trametes ochracea</i>	SBT	100	0	43	65	75	80	100
		175	0	43	63	83	75	100
		250	0	40	63	78	85	100
	WT	100	5	75	100	100	100	100
		175	5	70	100	100	100	100
		250	5	65	100	100	100	100
<i>Phlebia tremellosa</i>	PT	100	10	55	100	100	100	100
		175	13	50	100	100	100	100
		250	8	50	100	100	100	100
	SBT	100	10	53	100	100	100	100
		175	10	45	100	100	100	100
		250	10	50	100	100	100	100
<i>Gloeophyllum septarium</i>	WT	175	10	73	100	100	100	100
		175	13	78	100	100	100	100
		175	15	83	100	100	100	100
	PT	175	13	35	50	70	83	85
		175	15	38	55	73	90	100
		175	13	33	50	73	90	100
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	WT	175	3	33	80	100	100	100
		175	3	38	80	100	100	100
		175	3	38	85	100	100	100
	PT	175	8	33	35	60	78	90
		175	10	33	43	63	85	95
		175	10	33	38	60	78	93
<i>Sparassis crispa</i>	WT	175	0	3	5	13	25	25
		175	0	3	5	15	28	28
		175	0	3	5	18	28	30
	PT	175	5	25	38	48	65	75
		175	5	35	45	61	75	88
		175	5	35	45	61	75	88

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]					
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14
<i>Hypoholoma sublateritium</i>	SBT	250	15	60	93	100	100	100
		100	20	60	90	100	100	100
		175	18	60	90	100	100	100
	WT	250	20	60	88	100	100	100
		175	5	20	40	58	83	95
		175	5	23	35	58	80	93
<i>Leucopaxillus tricolor</i>	SBT	175	5	20	33	43	65	78
		175	3	10	13	18	25	28
		175	3	13	13	18	25	28
	PT	175	3	13	15	20	28	33
		175	5	18	25	45	43	55
		175	5	18	25	40	48	60
<i>Mycena pseudocorticola</i>	SBT	175	5	18	25	35	43	55
		175	5	13	23	25	40	40
		175	5	13	25	35	43	63
	PT	175	10	13	23	28	38	40
		175	5	30	43	58	63	83
		175	5	28	43	58	73	95
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	SBT	175	5	28	40	60	68	95
		175	10	28	30	48	60	63
		175	5	25	35	48	63	70
	PT	175	3	25	35	45	60	65
		175	8	33	58	78	100	100
		175	5	33	53	73	100	100
<i>Psathyrella piluliformis</i>	SBT	175	8	30	43	70	100	100
		175	3	13	25	28	38	45
		175	3	13	25	30	40	50
	WT	175	3	13	25	28	38	48
		175	0	0	3	10	15	20
		175	0	0	5	18	23	33
<i>Psathyrella conopilus</i>	SBT	175	0	0	5	15	18	28
		175	8	50	75	100	100	100
		175	8	43	78	100	100	100
	PT	175	8	43	78	100	100	100
		175	8	43	78	100	100	100
		175	8	43	78	100	100	100

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsener treber, SBT: Schwarzbier treber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]									
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14				
<i>Laetiporus sulphureus</i>	WT	175	3	25	38	60	100	100	100	100	100	
	PT	175	5	50	75	100	100	100	100	100		
	SBT	175	3	35	50	88	100	100	100	100		
<i>Clitocybe gibba</i>	WT	175	3	5	5	8	10	15				
	PT	175	3	5	8	8	13	15				
	SBT	175	3	3	5	8	10	15				
<i>Gymnopus peronatus</i>	WT	175	5	20	30	43	63	73				
	PT	175	5	18	28	43	60	70				
	SBT	175	5	18	30	43	58	68				
	WT	100	0	5	13	25	33	43				
	PT	175	0	8	20	30	43	55				
	SBT	250	0	8	13	23	40	45				
<i>Mycetinis alliaceus</i>	WT	100	0	5	15	23	38	50				
	PT	175	0	10	18	23	40	50				
	SBT	250	0	8	18	23	43	58				
<i>Psathyrella candolleana</i>	WT	175	23	53	85	100	100	100				
	PT	175	25	70	98	100	100	100				
	SBT	175	23	60	90	100	100	100				
<i>Cyclocybe aegerita</i>	WT	100	10	20	40	54	70	85				
	PT	175	8	20	35	53	73	83				
	SBT	250	10	23	38	50	70	83				
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	WT	100	10	28	45	55	75	95				
	PT	175	10	30	43	58	75	98				
	SBT	250	13	30	40	55	75	90				
<i>Laetiporus sulphureus</i>	WT	175	0	0	0	0	0	0				
	PT	175	0	0	0	0	0	0				
	SBT	175	0	3	5	8	8	15				

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]									
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14				
<i>Trametes versicolor</i>	SBT	175	5	33	45	58	80	90				
	WT	175	0	3	5	5	5	8				
	PT	175	0	3	5	5	5	8				
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	SBT	175	3	3	3	3	3	5				
	WT	175	10	35	48	60	78	83				
	PT	175	8	35	43	58	75	85				
<i>Cyclocybe aegerita</i>	SBT	175	8	35	45	60	78	90				
	WT	100	8	15	30	38	58	68				
	PT	175	8	21	33	43	58	70				
<i>Ustilago maydis</i>	SBT	250	8	19	25	33	58	65				
	WT	100	8	20	35	38	53	68				
	PT	175	8	20	38	50	48	63				
<i>Coprinellus flocculosus</i>	SBT	250	8	20	35	53	55	68				
	WT	100	6	15	38	45	55	60				
	PT	175	6	18	35	45	65	65				
<i>Cyclocybe aegerita</i>	SBT	250	6	20	33	50	58	68				
	WT	175	10	25	28	30	40	48				
	PT	175	13	20	25	33	40	45				
<i>Hymenopellis radicata</i>	SBT	175	15	23	28	35	45	50				
	WT	175	20	55	55	85	100	100				
	PT	175	23	68	100	100	100	100				
<i>Agaricus bernardii</i>	SBT	175	23	68	100	100	100	100				
	WT	175	8	23	50	65	93	100				
	PT	175	13	38	63	85	100	100				
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	SBT	175	10	33	50	75	100	100				
	WT	175	5	25	40	65	100	100				
	PT	175	5	23	35	63	100	100				
<i>Agaricus bernardii</i>	SBT	175	5	23	38	65	100	100				
	WT	175	0	3	3	5	13	20				
	PT	175	0	3	5	5	13	18				
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	SBT	175	0	3	5	8	13	20				
	WT	175	23	68	83	100	100	100				
	PT	175	25	73	100	100	100	100				
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	SBT	175	25	73	100	100	100	100				

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbiertreber, PT: Pilsenerbier, SBT: Schwarzbierbier. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]						
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14	
<i>Cyclocybe aegerita</i>	PT	175	15	38	53	73	93	100	
	SBT	175	15	35	50	68	85	100	
	WT	175	5	15	20	43	50	65	
<i>Mycena galericulata</i>	PT	175	5	15	20	43	55	70	
	SBT	175	5	15	25	40	53	65	
	WT	175	3	13	20	20	28	35	
<i>Inonotus obliquus</i>	PT	175	5	15	28	30	38	43	
	SBT	175	5	15	25	30	38	40	
	WT	175	23	58	85	100	100	100	
<i>Pleurotus sp.</i>	PT	175	23	68	100	100	100	100	
	SBT	175	23	63	100	100	100	100	
	WT	175	0	8	20	23	43	50	
<i>Agaricus sp.</i>	PT	175	0	13	20	33	40	48	
	SBT	175	0	13	20	30	40	45	
	WT	175	3	15	28	38	58	65	
<i>Hericium coraloides</i>	PT	175	3	15	33	48	80	100	
	SBT	175	3	25	30	53	80	80	
	WT	175	0	3	5	13	13	23	
<i>Pleurotus dryinus</i>	PT	175	0	5	10	18	25	28	
	SBT	175	0	3	8	15	18	25	
	WT	175	13	45	75	100	100	100	
<i>Ganoderma lucidum</i>	PT	175	13	53	88	100	100	100	
	SBT	175	13	50	80	100	100	100	
	WT	175	5	30	55	83	100	100	
<i>Flammulina velutipes</i>	PT	175	5	33	55	85	100	100	
	SBT	175	5	30	50	78	100	100	
	WT	175	0	5	5	5	10	13	
<i>Lactarius torminosus</i>	PT	175	0	5	5	5	8	10	
	SBT	175	0	8	8	5	8	10	
	WT	175	18	63	88	100	100	100	
<i>Schizophyllum commune</i>	PT	175	20	58	83	100	100	100	
	SBT	175	20	60	90	100	100	100	
	WT	100	3	20	25	38	60	60	
<i>Hericium sp.</i>	WT	175	1	15	23	33	38	50	

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]						
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14	
		250	0	23	41	60	100	100	
		100	0	33	44	55	100	100	
	PT	175	0	30	50	74	100	100	
		250	0	30	56	75	100	100	
		100	0	38	50	75	100	100	
	SBT	175	0	28	38	80	100	100	
<i>Stereum hirsutum</i>		250	0	35	56	100	100	100	
	WT	175	15	50	70	100	100	100	
	PT	175	15	58	100	100	100	100	
<i>Coprinus comatus</i>	SBT	175	18	53	83	100	100	100	
	WT	175	3	3	8	18	20	25	
	PT	175	3	3	10	23	33	45	
<i>Trametes cinnabarina</i>	SBT	175	3	3	13	23	30	38	
	WT	175	10	33	43	63	93	100	
	PT	175	10	33	50	70	100	100	
		175	10	30	50	65	100	100	
	WT	100	0	8	26	36	53	65	
		175	0	13	23	35	50	65	
<i>Strobilurus esculentus</i>		250	0	11	23	33	45	65	
	PT	100	0	10	23	33	50	63	
		175	0	13	23	33	50	65	
		250	0	13	30	38	53	65	
	SBT	100	0	18	28	35	55	65	
		175	0	18	33	38	58	70	
<i>Stropharia rugosaannulata</i>	WT	250	0	18	30	43	60	73	
		175	10	33	45	63	78	85	
	PT	175	10	30	48	63	80	88	
<i>Auriscalpium vulgare</i>	SBT	175	10	30	45	58	73	78	
	WT	175	0	3	3	5	8	10	
	PT	175	0	3	5	5	8	10	
<i>Cyclocybe aegerita</i>	SBT	175	0	3	3	5	5	8	
	WT	175	5	5	13	18	23	25	
	PT	175	3	10	18	25	33	38	
	SBT	175	3	13	20	25	35	35	
	WT	175	13	30	48	63	80	100	

Fortsetzung von Tabelle 6-2: Bewuchs der Platten aus dem Emersscreening in Kapitel 3.2. WT: Weizenbierreber, PT: Pilsenerreber, SBT: Schwarzbierreber. Die Treber-Konzentrationen bezieht sich auf die Feuchtmasse.

Name Pilz	Treber	Medium Konzentration [g/L]	Bewuchs der Platte [%]										
			Tag 2	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14					
		250	3	18	25	30	40	53					
	PT	100	1	10	25	20	45	45					
		175	3	15	25	13	45	53					
		250	3	20	25	20	43	50					
	SBT	100	3	15	23	28	35	48					
		175	3	15	23	25	33	48					
		250	5	15	25	23	33	43					
	WT	175	5	13	15	18	28	30					
	PT	175	5	10	15	20	25	30					
		175	5	10	13	18	25	30					
	WT	175	3	5	8	8	15	18					
	PT	175	3	5	8	10	15	18					
		175	3	5	8	8	13	15					
	SBT	175	3	5	8	8	13	15					
	WT	175	3	10	30	50	55	58					
		175	3	20	40	53	55	58					
	PT	175	3	15	35	50	55	58					
	SBT	175	3	15	35	50	55	58					
		175	20	65	100	100	100	100					
	WT	175	23	73	100	100	100	100					
	PT	175	23	68	100	100	100	100					
		175	30	100	100	100	100	100					
	WT	175	30	100	100	100	100	100					
	PT	175	30	100	100	100	100	100					
		175	30	100	100	100	100	100					
	WT	175	10	45	63	85	100	100					
	PT	175	13	48	65	90	100	100					
		175	13	45	68	90	100	100					
	WT	175	8	33	45	65	88	100					
	PT	175	5	28	43	63	88	100					
		175	5	33	43	65	88	100					
	WT	175	8	35	55	80	100	100					
	PT	175	8	38	63	80	100	100					
		175	8	38	63	80	100	100					
	SBT	175	8	38	68	83	100	100					
	WT	175	8	38	68	83	100	100					

6.3 Übertragung der Fermentation in Bioreaktoren und Optimierung der Batch-Fermentation

Tabelle 6-3: Versuchsplan und Ergebnisse des DOE zur Optimierung der Batch-Fermentation von Schwarzbierreber mit *Pleurotus ostreatus*

Block	Run	Substratmenge [g TM L ⁻¹]	V Inokulum [%]	pH initial	T [°C]	Ergosterol [mg g ⁻¹]	Ergosterol [mg L ⁻¹]
1	1	51	7,0	4,5	30,0	0,689	29,627
1	2	34	1,0	5,2	30,0	0,738	19,188
1	3	17	1,0	7,0	27,2	1,795	25,130
1	4	17	7,0	5,2	25,1	1,178	15,309
1	5	41	1,0	7,0	20,0	0,497	15,904
1	6	34	1,0	5,2	30,0	0,623	18,067
1	7	44	5,5	6,1	30,0	1,156	43,928
1	8	34	4,0	5,6	25,0	1,049	27,274
1	9	51	7,0	7,0	22,9	1,047	40,833
1	10	51	4,0	5,2	20,0	0,699	27,261
1	11	34	4,0	4,2	25,0	0,843	21,075

Block	Run	Substratmenge [g TM L ⁻¹]	V Inokulum [%]	pH initial	T [°C]	Ergosterol [mg g ⁻¹]	Ergosterol [mg L ⁻¹]
1	12	27	7,0	7,0	30,0	1,880	33,840
1	13	17	7,0	5,3	25,1	1,801	23,413
1	14	33	7,0	6,0	21,0	0,959	23,016
1	15	48	1,0	6,0	25,2	0,526	19,462
1	16	34	4,0	5,6	25,0	1,066	27,716
1	17	25	2,5	6,1	20,0	0,688	13,072
1	18	21	1,0	4,2	26,2	0,576	9,216
1	19	17	4,0	4,2	30,0	0,870	11,310
1	20	34	4,0	5,6	25,0	0,798	20,748
1	21	51	2,5	7,0	30,0	0,000	0,000
1	22	34	4,0	5,6	25,0	0,859	23,193
1	23	51	4,0	5,2	20,0	0,364	14,924
1	24	34	4,0	4,2	25,0	0,377	9,425
1	25	17	5,5	7,0	20,0	1,095	15,33
1	26	17	1,0	4,5	20,0	0,414	5,796
1	27	51	1,0	4,2	25,0	0,000	0,000
1	28	34	7,0	4,2	20,0	0,000	0,000
2	29	25	2,5	6,3	35,0	0,180	3,289
2	30	28	1,0	9,0	35,0	0,031	0,657
2	31	51	7,0	9,0	35,0	0,037	1,365
2	32	17	5,5	9,0	35,0	2,066	23,676
2	33	17	5,5	9,0	24,0	0,838	14,288
2	34	34	7,0	6,0	26,8	0,456	16,430
2	35	26	2,5	6,0	26,8	0,462	11,601
2	36	26	2,5	6,0	26,8	0,324	7,968
2	37	51	2,5	9,0	31,3	0,079	3,069
2	38	17	2,5	6,3	35,0	0,082	0,949
2	39	51	4,0	9,0	24,0	0,646	24,806
2	40	26	2,5	6,0	26,8	0,870	15,451
3	41	40	4,0	10,0	24,0	0,000	0,000
3	42	28	2,5	11,0	24,0	0,000	0,000
3	43	34	4,0	8,0	32,0	0,331	11,529
3	44	28	7,0	5,0	37,0	0,098	2,733
3	45	40	1,0	9,0	30,0	0,224	8,323
3	46	40	4,0	5,0	30,0	0,463	15,478

Block	Run	Substratmenge [g TM L ⁻¹]	V Inokulum [%]	pH initial	T [°C]	Ergosterol [mg g ⁻¹]	Ergosterol [mg L ⁻¹]
3	47	17	1,0	10,0	40,0	0,000	0,000
3	48	40	7,0	10,5	24,0	0,000	0,000
3	49	17	4,0	7,0	38,0	0,000	0,000
3	50	34	4,0	8,0	32,0	1,553	32,939
3	51	40	4,0	5,0	24,0	0,860	21,027
3	52	34	4,0	10,0	37,0	0,000	0,000

6.4 Analytik der Biomasse

6.4.1 Chemische Analytik

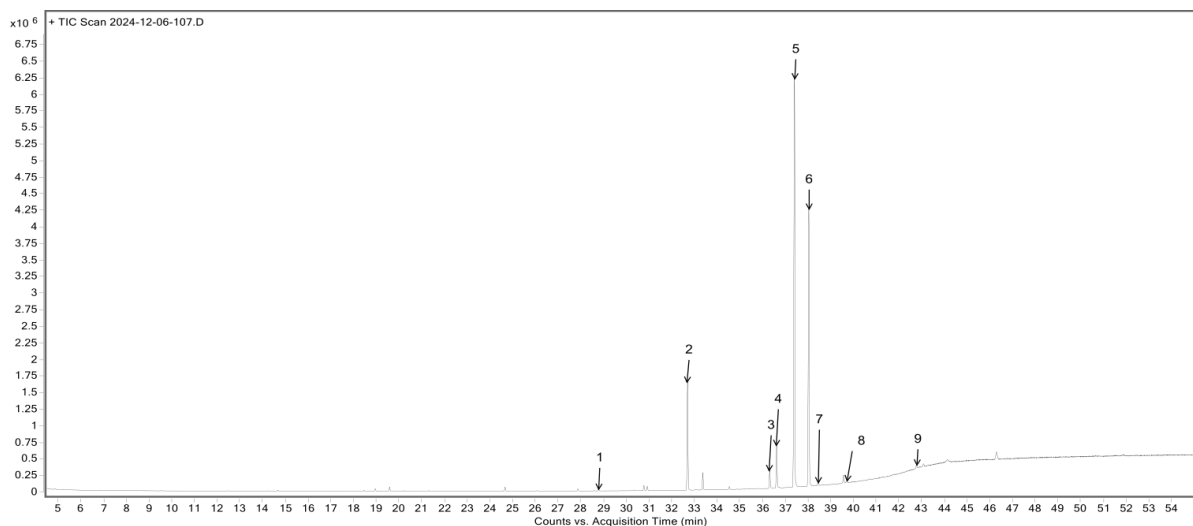


Abbildung 6-1: Chromatogramm der Fettsäuremethylester von *Pleurotus ostreatus* in ME-Medium kultiviert. 1: Myristinsäure, 2: Palmitinsäure, 3: Stearinsäure, 4: Ölsäure, 5: Linolsäure, 6: Nonadecansäure (IST), 7: Linolensäure, 8: Arachinsäure, 9: Behensäure

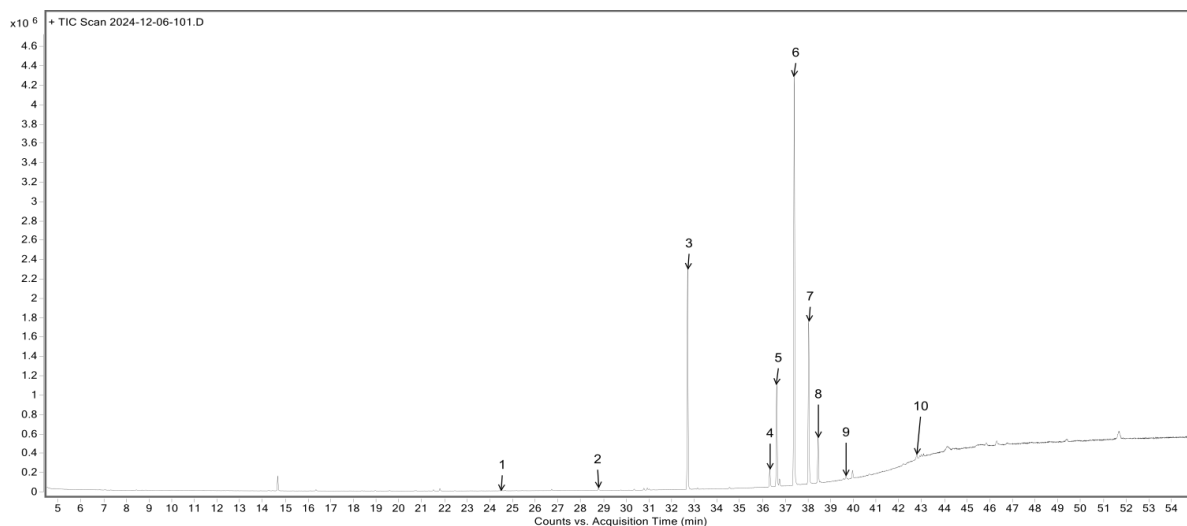


Abbildung 6-2: Chromatogramm der Fettsäuremethylester von *Pleurotus ostreatus* in SBT-Medium kultiviert. 1: Laurinsäure, 2: Myristinsäure, 3: Palmitinsäure, 4: Stearinsäure, 5: Ölsäure, 6: Linolsäure, 7: Nonadecansäure (IST), 8: Linolensäure, 9: Arachinsäure, 10: Behensäure

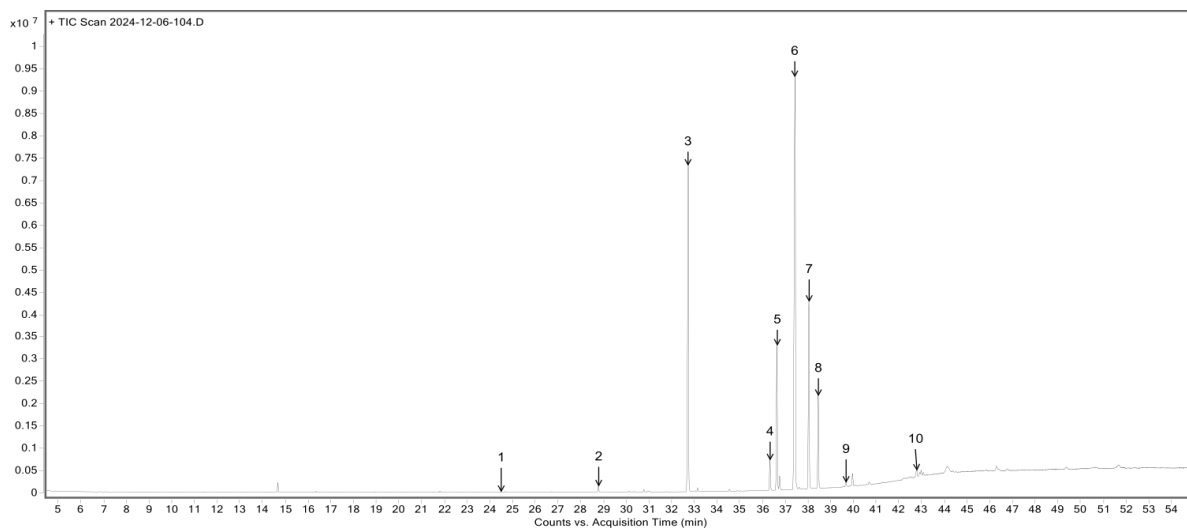


Abbildung 6-3: Chromatogramm der Fettsäuremethylester von SBT. 1: Laurinsäure, 2: Myristinsäure, 3: Palmitinsäure, 4: Stearinsäure, 5: Ölsäure, 6: Linolsäure, 7: Nonadecansäure (IST), 8: Linolensäure, 9: Arachinsäure, 10: Behensäure

6.4.2 Sensorische Analytik

Name		Geschlecht		Raucher?		Datum		Alter	
------	--	------------	--	----------	--	-------	--	-------	--

Myzel 1 a

Aussehen:

Geruch (Intensität von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr intensiv))

	süßlich	röstig	würzig	erdig	pilzartig	grün	Sonstiges

Geschmack (Intensität von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr intensiv))

	süß	Getreide	würzig	erdig	pilzartig	fleischartig	pflanzlich	Sonstiges

Konsistenz:

Gesamteindruck (0 (schlecht) bis 5 (sehr gut))

Myzel 1 b

Aussehen:

Geruch (Intensität von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr intensiv))

	süßlich	röstig	würzig	erdig	pilzartig	grün	Sonstiges

Geschmack (Intensität von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr intensiv))

	süß	Getreide	würzig	erdig	pilzartig	fleischartig	pflanzlich	Sonstiges

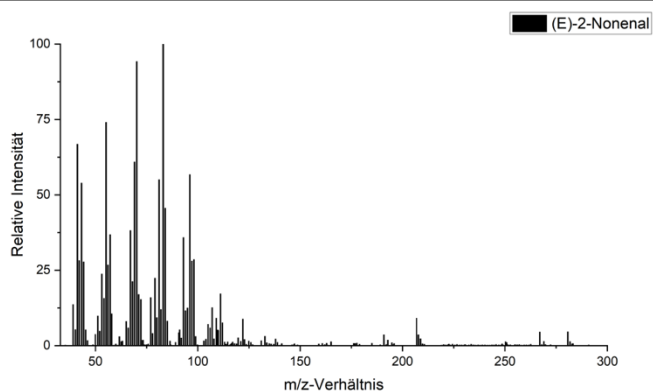
Konsistenz:

Gesamteindruck (0 (schlecht) bis 5 (sehr gut))

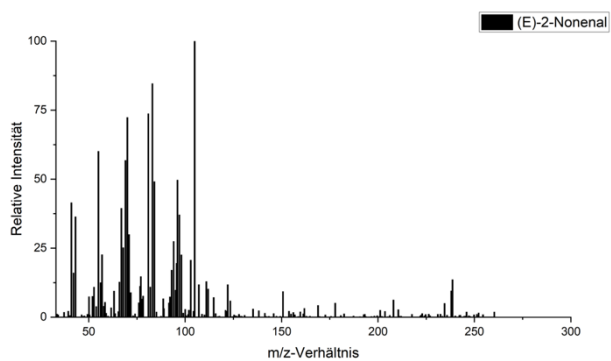
Abbildung 6-4: Bogen für die sensorische Bewertung von fermentiertem Schwarzbiertreber mit *Pleurotus ostreatus* nach Kapitel 2.2.2.10

Tabelle 6-4: Massenspektren von (*E*)-2-Nonenal

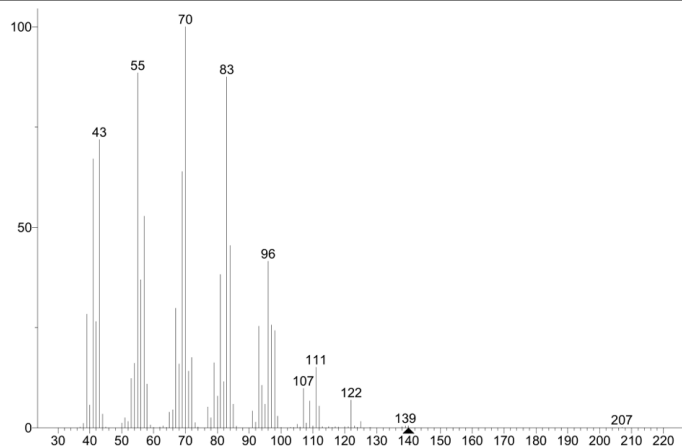
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

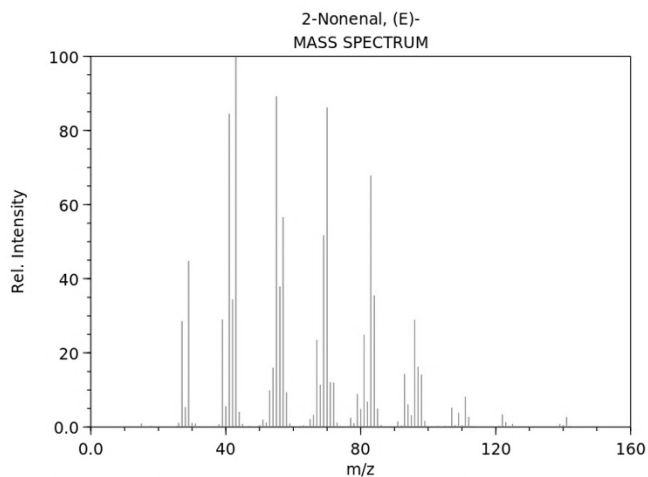
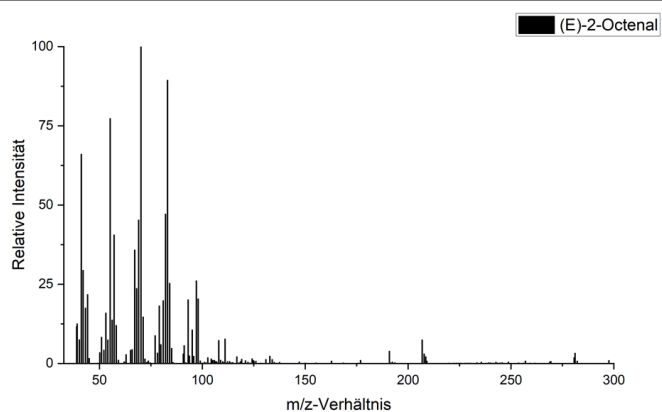
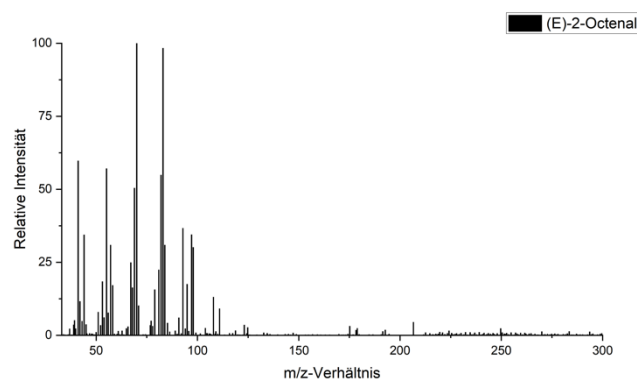
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

Tabelle 6-5: Massenspektren von (*E*)-2-Octenal

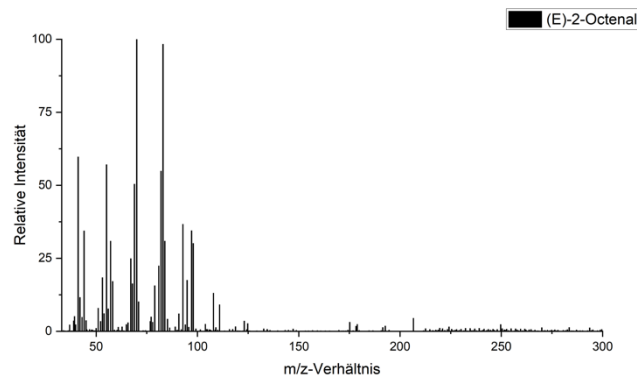
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

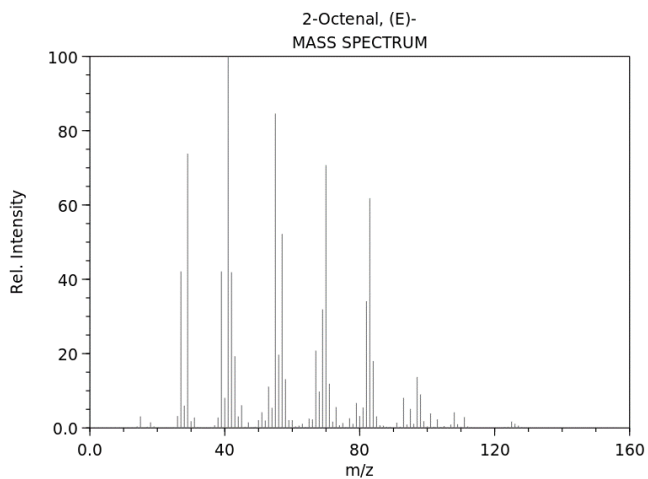
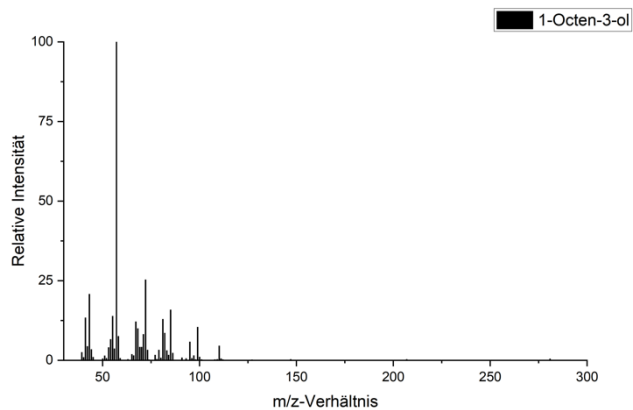
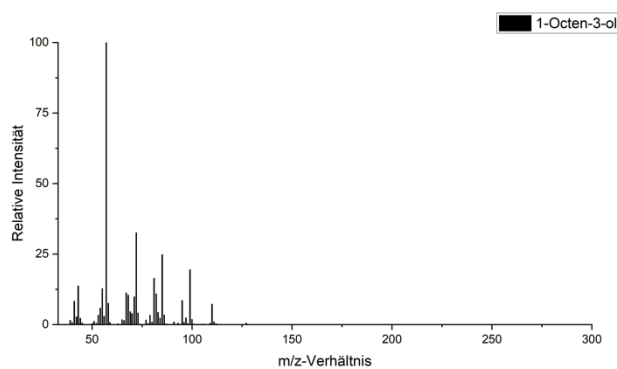


Tabelle 6-6: Massenspektren von 1-Octen-3-ol

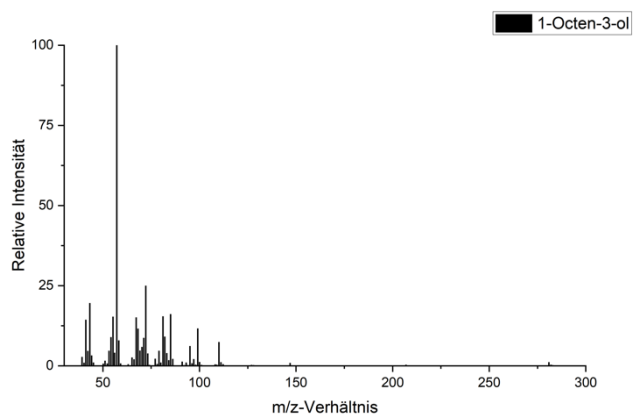
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

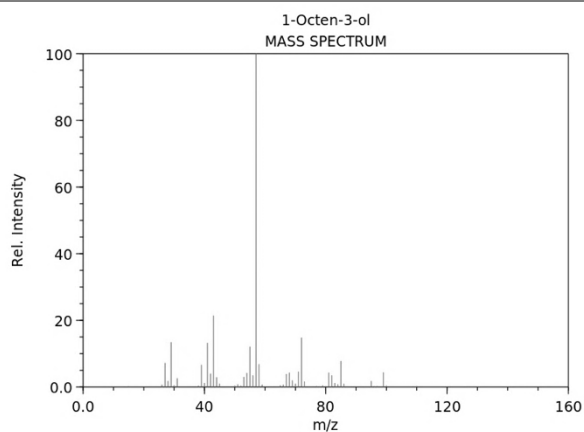
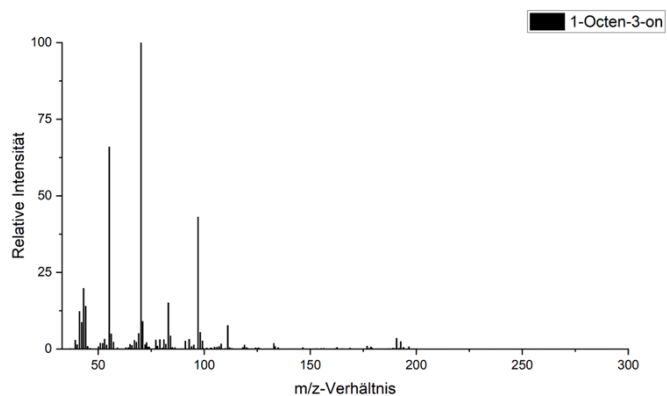
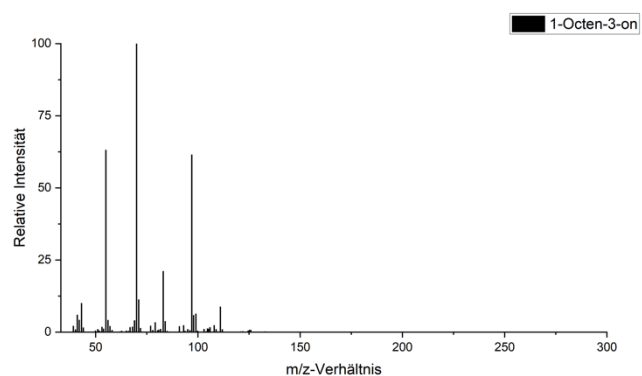
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)

Tabelle 6-7: Massenspektren von 1-Octen-3-on

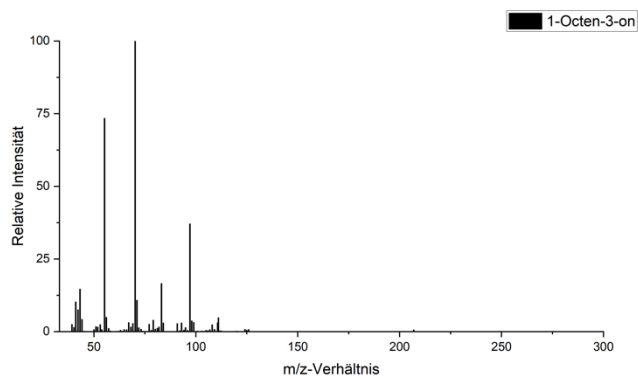
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

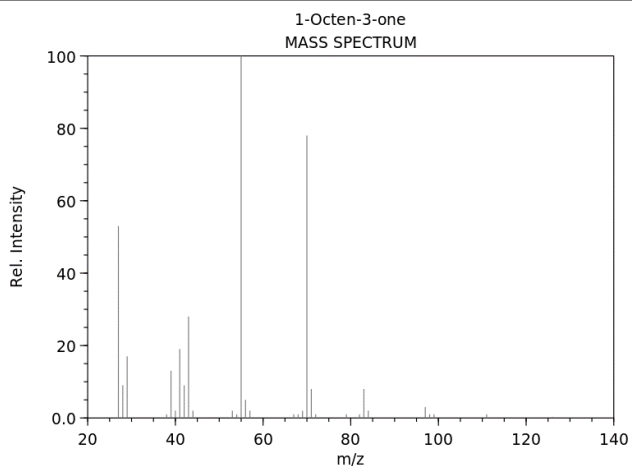
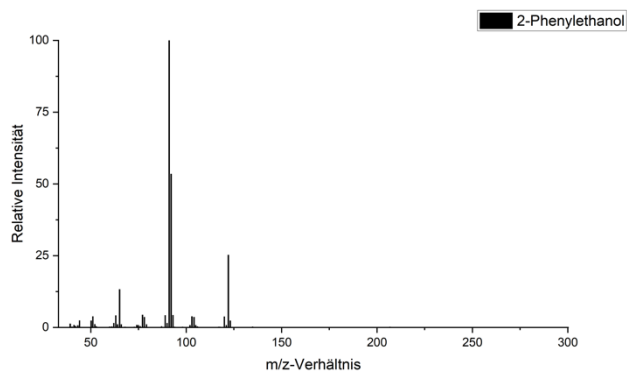
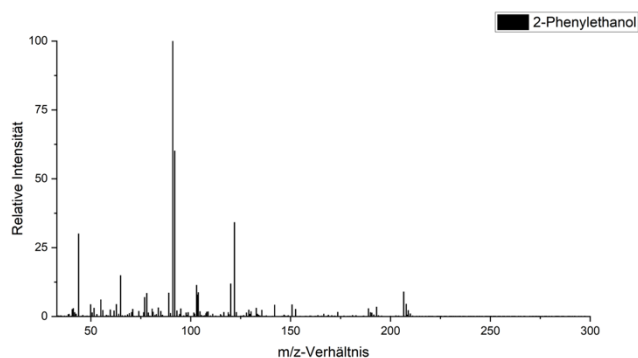


Tabelle 6-8: Massenspektren von 2-Phenylethanol

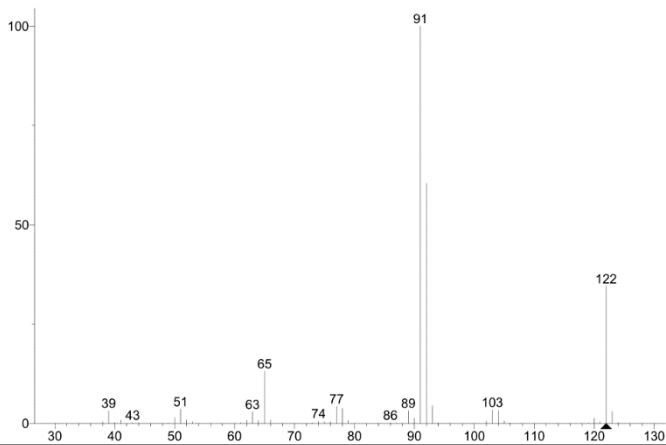
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

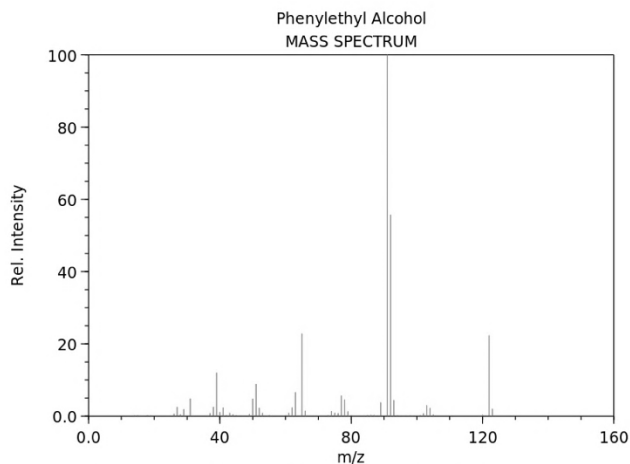
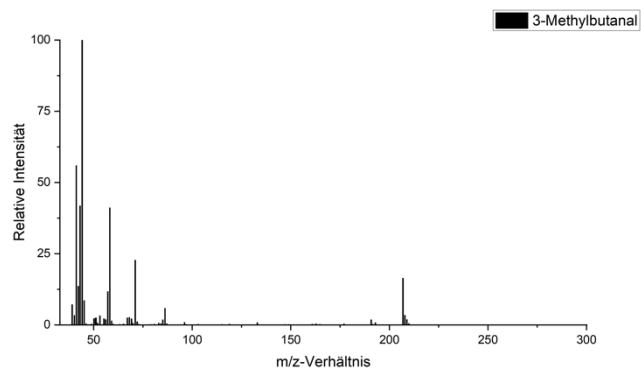
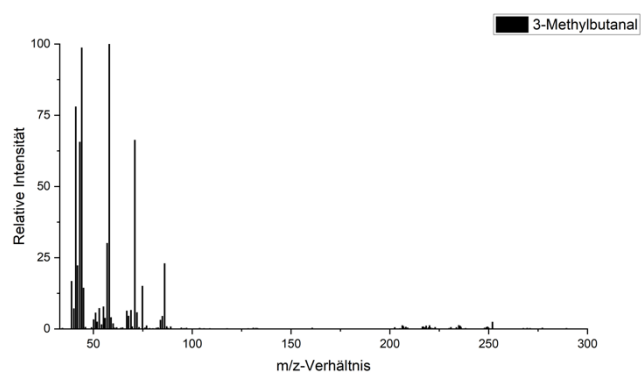


Tabelle 6-9: Massenspektren von 3-Methylbutanal

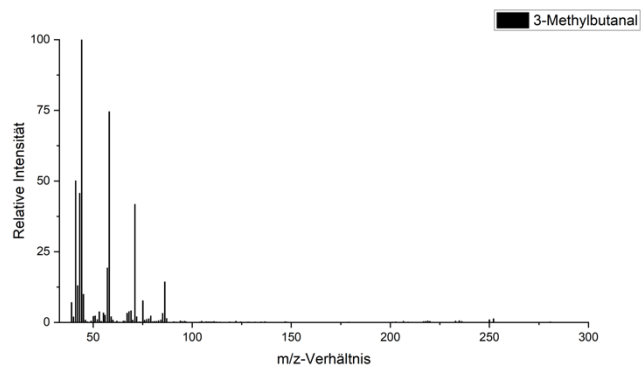
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

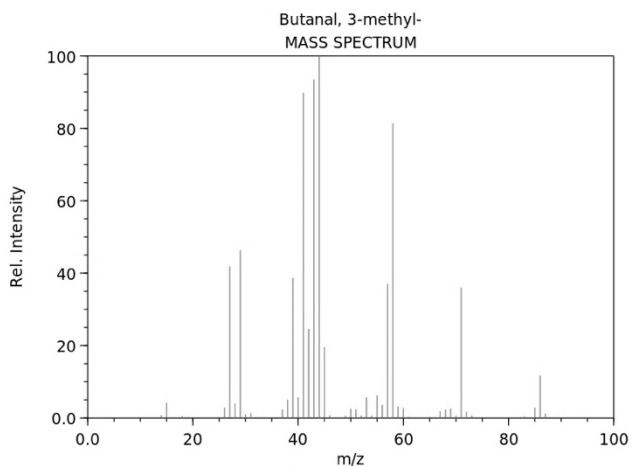
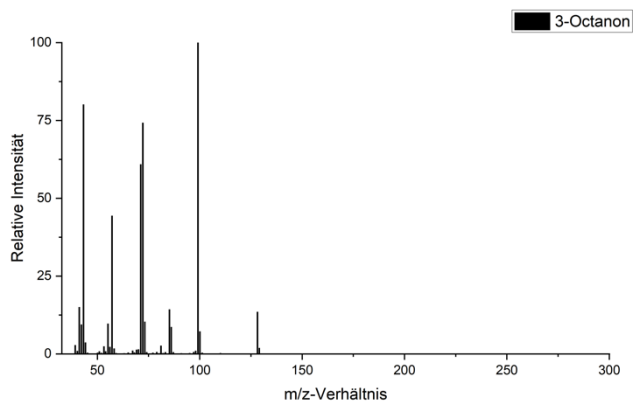
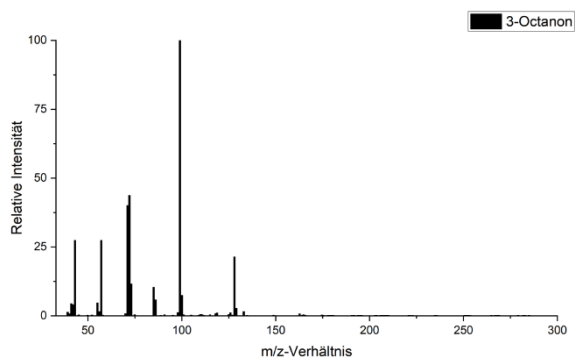
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)

Tabelle 6-10: Massenspektren von 3-Octanon

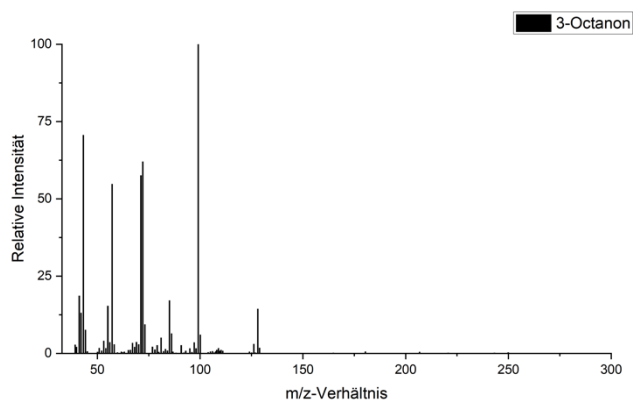
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

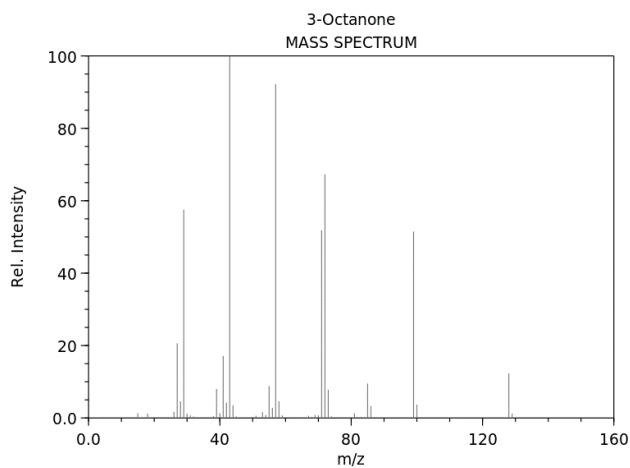
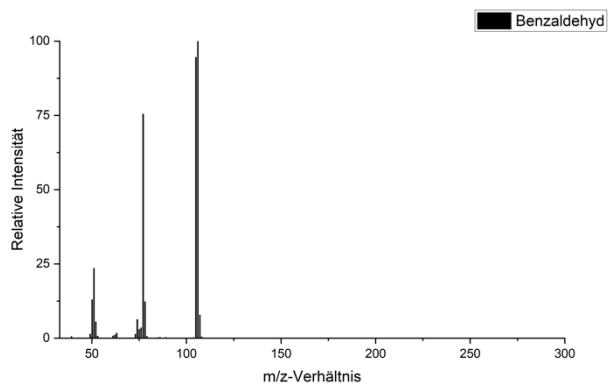
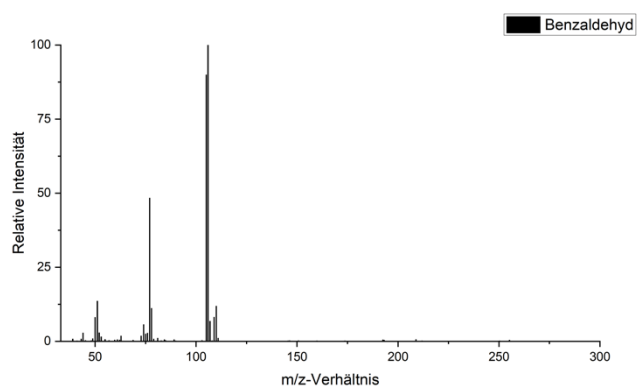
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)

Tabelle 6-11: Massenspektren von Benzaldehyd

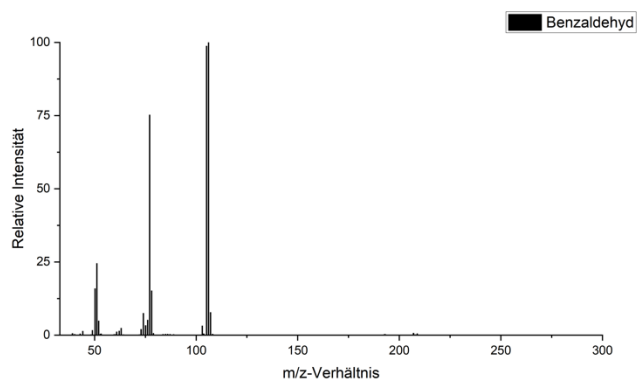
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

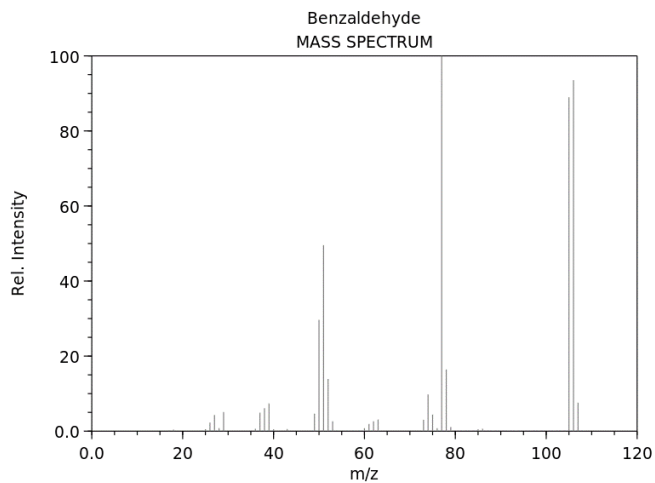
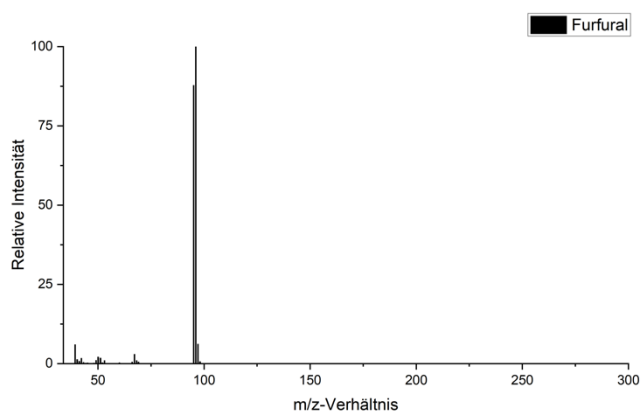
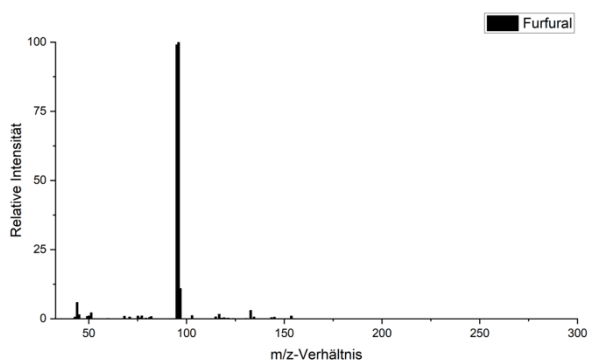
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

Tabelle 6-12: Massenspektren von Furfural

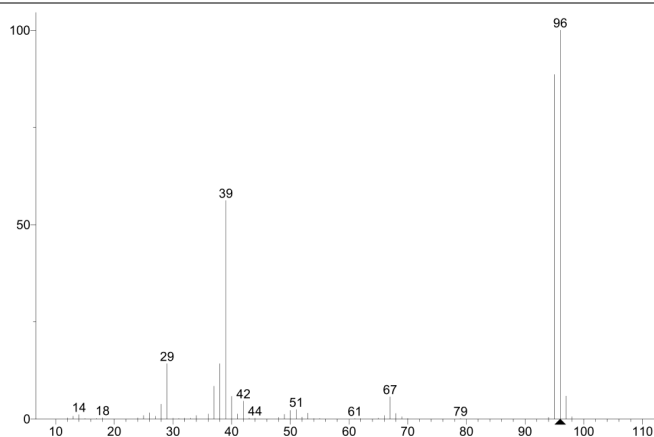
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

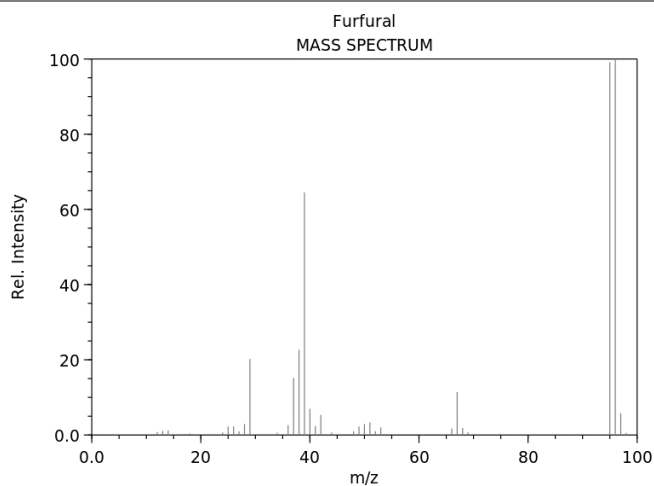
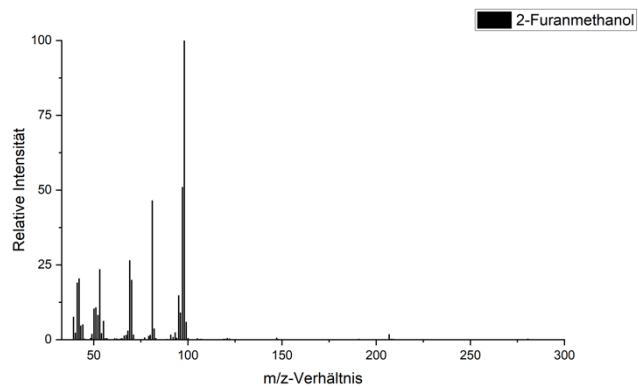
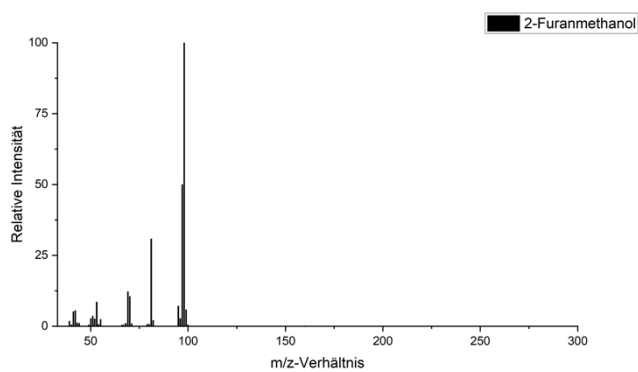


Tabelle 6-13: Massenspektren von 2-Furanmethanol

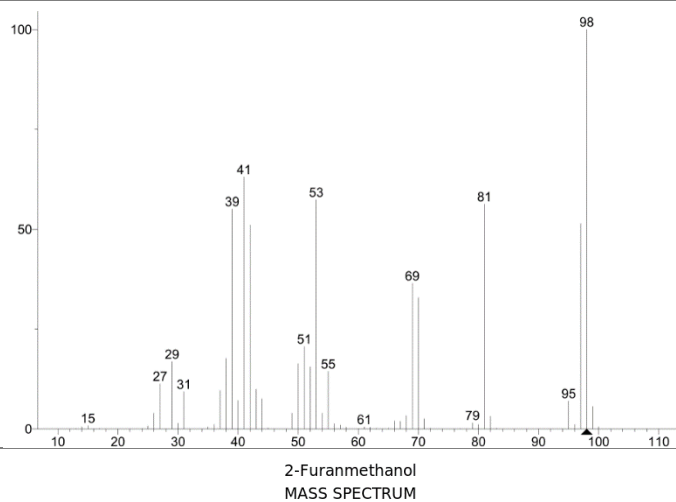
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

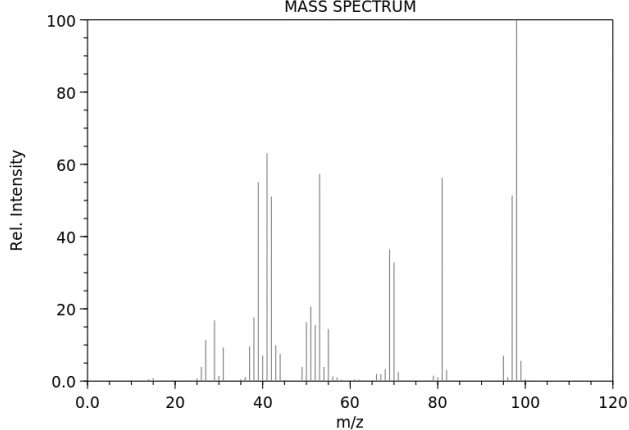
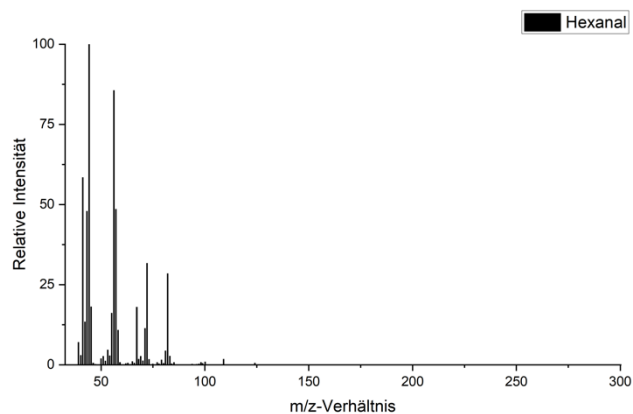
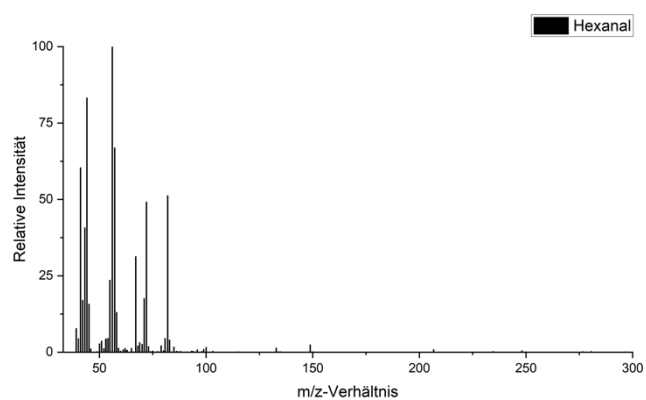


Tabelle 6-14: Massenspektren von Hexanal

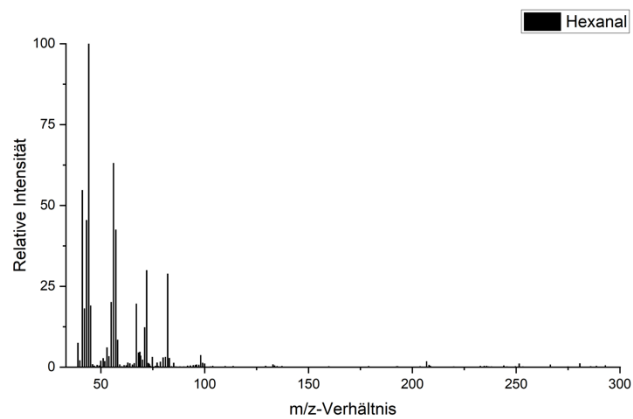
Probe (VF-WAXms)



Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

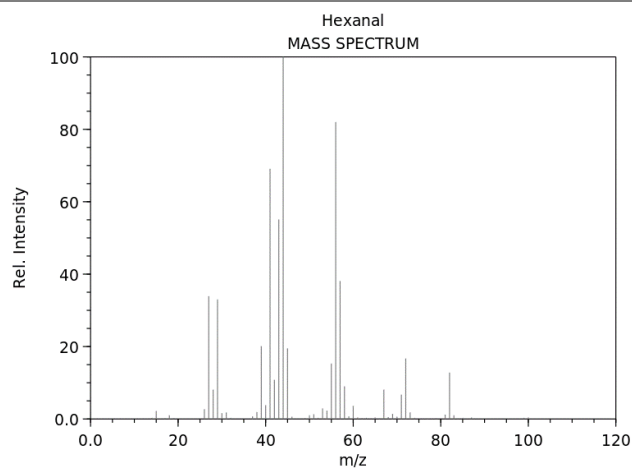
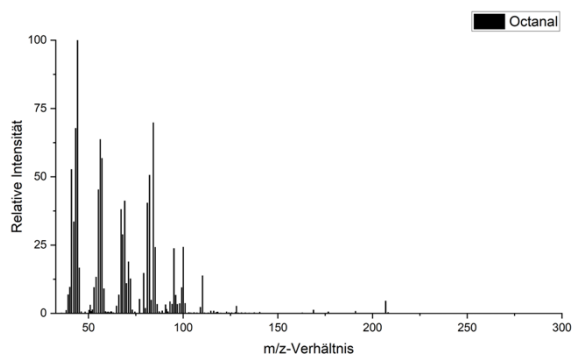
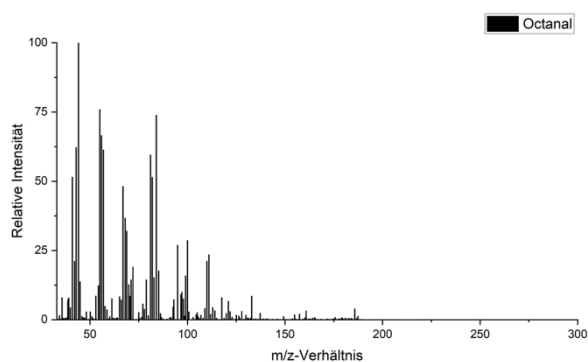
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)

Tabelle 6-15: Massenspektren von Octanal

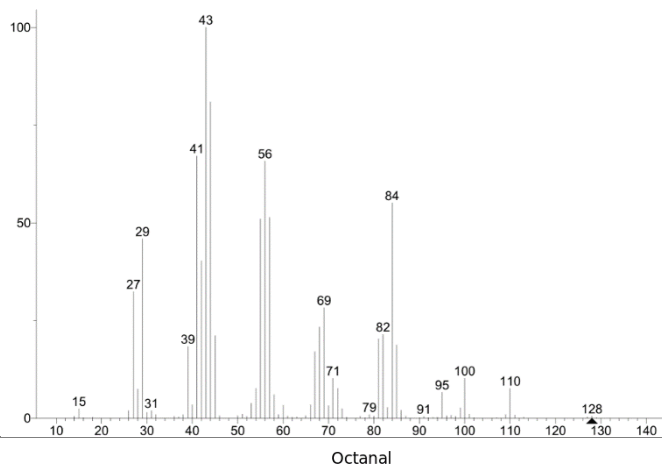
Probe (VF-WAXms)



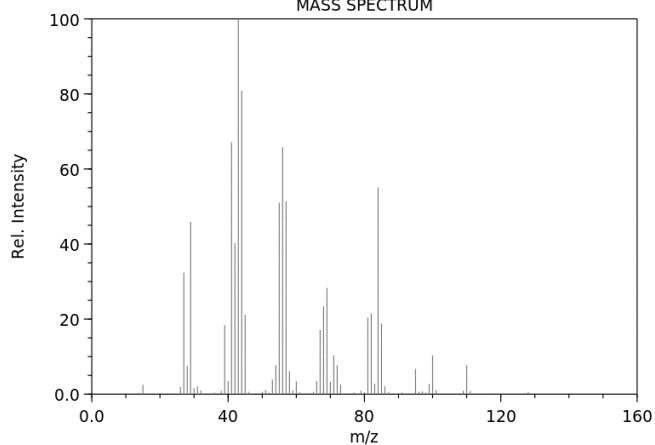
Probe (DB-5ms)



Standard (VF-WAXms)



Spektrum der NIST-Datenbank (2014)

NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

7 Selbstständigkeitserklärung

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

Angaben zu auf künstlicher Intelligenz (KI) basierender Hilfen wie ChatGPT oder SchulKI von OpenAI oder Gemini von Google zur Erstellung meiner Dissertation (Zutreffendes angekreuzt):

- Ich habe bei der Erstellung dieses Textes kein KI-Tool verwendet.
- Ich habe ein KI-Tool in den folgenden Bereichen eingesetzt (Mehrfachnennungen möglich):
 - Ideen finden, meine Kreativität anregen
 - Verstehen von Konzepten, Recherche von Fakten und Definitionen
 - Optimierung eines von mir verfassten Textes
 - Erstellen ganzer Textpassagen nach meinen Vorgaben

Folgende KI-Tools habe ich verwendet, damit aufgeführte Teile meines Textes von dem Tool wie folgt profitiert haben:

Datum: _____ Unterschrift: _____