

Fermentation von Seitenströmen der Zuckerindustrie 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

Manuela Dorin, geb. Bedenbender

(staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin)

aus Dillenburg

2026

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Lars M. Blank

Institut für Angewandte Mikrobiologie
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

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: _____

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Holger Zorn, für die Möglichkeit der Promotion, die Bereitstellung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken. Vielen Dank für das stets offene Ohr, das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, viel Neues zu lernen.

Mein Dank gilt auch dem Land Nordrhein-Westfalen und dem Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat, die durch die finanzielle Förderung der Projekte „Rübenschnitzelburger“ (UW-01-061) und „HyMycoMeat“ (281A817D21) die Bearbeitung ermöglicht haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den an den Projekten beteiligten Kooperationspartnern Metten Fleischwaren GmbH & Co. KG, Quh-Lab Lebensmittelsicherheit, RWTH Aachen und der Nordzucker AG für die konstruktiven Gespräche und die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt hier der Quh-Lab Lebensmittelsicherheit für die Möglichkeit, einen Teil der Arbeiten dort durchzuführen sowie Herrn Prof. Dr. Lars M. Blank von der RWTH Aachen für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für den Beitritt in die Prüfungskommission danke ich Herrn Prof. Dr. Gunter Eckert sowie Herrn Prof. Dr. Kai Thormann.

Bei der Nordzucker AG, der Südzucker AG sowie der Consun Beet Company möchte ich mich für die Bereitstellung der Fermentationssubstrate bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Fraunhofer IME in Gießen für die Möglichkeit der Nutzung der Gefriertrocknungsanlage und des Aminosäure-Analysators.

Bei der Firma C. Gerhardt GmbH & Co. KG, insbesondere bei Herrn Björn Krüger, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Chitin-Analytik und die in diesem Zuge erfolgte Bereitstellung der Faserextraktionseinheit „Fibretherm“ bedanken.

Des Weiteren danke ich all meinen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und die konstruktiven Gespräche. Ein besonderer Dank gilt hier Peter und Bianca für ihre Hilfe und Unterstützung bei technischen Problemen aller Art, sowie Sebastian für die Einweisung in die molekularbiologischen Arbeitsweisen und die abendlichen Schreibrunden.

Auch möchte ich mich bei den Studierenden, insbesondere bei Isabella, Elisa und Lara bedanken, die durch ihre Abschlussarbeiten einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch meinen ehemaligen Kommilitonen, die maßgeblich zu meiner Freude an der Lebensmittelchemie beigetragen haben und deren Freundschaft mir bis heute ein großer Zugewinn ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinem Mann Tim, für die unermüdliche Unterstützung, die Zusprache von Mut sowie das Verständnis für lange Labortage und meine manchmal mangelnde Zeit bedanken!

VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

Dorin, M., Hrazdil, V.-L., Zorn, H. (2024) Alternativer Analyseansatz mittels Faserextraktionseinheit für das Polysaccharid Chitin zur Quantifizierung des Pilzgehaltes in Fermentationsansätzen. *chrom+food FORUM* **9**, 15-17.

Dorin, M., Krüger, B., Hrazdil, V.-L., Zorn, H. (2026) A rapid and semi-automated method for the quantitation of chitin in in the basidiomycetes *Lentinus squarrosulus* and *Pleurotus ostreatus*, *Food Anal. Methods* **19**, 88. <https://doi.org/10.1007/s12161-026-02998-w>

Dorin, M., Boesel, S., Zorn, H. (2026) Quantification of *Lentinus squarrosulus* in fermentation processes using qPCR, submitted.

Tagungsbeiträge

Poster

Bedenbender, M., Zorn, H., Frettlöh, M.: Fermentation von Seitenströmen der Zuckerindustrie durch Basidiomyceten. 51. Deutsche Lebensmittelchemietage, 2023, Bonn.

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

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund einer wachsenden Weltbevölkerung wird eine nachhaltige und effiziente Nutzung der zur Lebensmittelproduktion angebauten Pflanzen immer bedeutsamer. Noch immer werden große Teile der bei der Lebensmittelverarbeitung anfallenden Nebenströme verworfen oder zur Tierfutterherstellung eingesetzt. So auch bei der Raffinade-Produktion, bei welcher große Mengen extrahierter Rübenschnitzel anfallen. Rübenschnitzel enthalten nur noch geringe Mengen Saccharose und sind aufgrund des hohen Anteils unverdaulicher Zellwandpolymere für den menschlichen Verzehr nicht geeignet. Basidiomyceten verfügen über eine breite Enzymvielfalt, die es ihnen ermöglicht, komplexe Strukturen, wie Zellwandkohlenhydrate und Lignin abzubauen und zu metabolisieren. Die erzeugten Verbindungen sind im Unterschied zum Ausgangsmaterial wieder für den Menschen verwertbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Nebenströme der Zuckerindustrie betrachtet und geeignete Spezies der Abteilung der Basidiomycota identifiziert, welche diese effizient abbauen können. Dazu wurde zunächst ein Screening in Oberflächenkultur mit > 50 Spezies und ein darauf aufbauendes Screening in Flüssigkultur durchgeführt.

Für getrocknete Rübenschnitzel in Kombination mit Melasse waren vor allem die beiden Spezies *L. squarrosulus* und *D. tabescens* geeignet. Hier wurden Rohproteingehalte von $19,1 \pm 0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*L. squarrosulus*) und $16,1 \pm 0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*D. tabescens*) erzielt. Durch eine Supplementation mit Althefer aus dem Bierbrauprozess wurden diese weiter auf $26,9 \pm 0,6 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*L. squarrosulus*) und $18,0 \pm 0,9 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*D. tabescens*) gesteigert. Nach Optimierung der Kultivierung im Schüttelkolben wurde der Fermentationsprozess mit *L. squarrosulus* in den Bioreaktor übertragen. Hier wurde die Kultivierung bis zu einem Maßstab von 20-Litern Kulturvolumen skaliert.

Auch wurde gezeigt, dass hochtemperaturgetrocknete Rübenschnitzel ohne Verluste von Pilz- oder Proteingehalt durch frische oder dampfgetrocknete Rübenschnitzel ersetzt werden können.

Das erzeugte Mycel von *L. squarrosulus* wies eine für die Humanernährung vorteilhafte Zusammensetzung auf. So wurden bei Kultivierung auf getrockneten Rübenschnitzeln eine biologische Wertigkeit von 92 ± 1 und ein Anteil von ungesättigten Fettsäuren von 81% an den Gesamtfettsäuren ermittelt. Aus dem erzeugten Mycel wurden hybride Prototypen nach Art einer Bratwurst mit einem Mycelgehalt von 20% hergestellt. Die Hybrid-Produkte überzeugten bei den Attributen Geruch und Geschmack. Ein deutlicher Verbesserungsbedarf war bei Mundgefühl und Textur zu beobachten.

Für eine höhere Flexibilität und breitere Anwendung wurden zudem die beiden bereits von Mikroorganismen fermentierten Nebenströme silierte Rübenschnitzel und Vinasse als Substrate betrachtet. Hier zeigte *L. squarrosulus* auf silierten Rübenschnitzeln, Vinasse und der Kombination beider Nebenströme das beste Wachstum. Es wurden Rohproteingehalte von

18,4 g·(100 g TM)⁻¹ (silierte Rübenschnitzel) bis 32,5 g·(100 g TM)⁻¹ (Vinasse) erzielt. Die höchsten biologischen Wertigkeiten wurden durch Fermentation der silierten Rübenschnitzel mit 91,5 bestimmt.

Weiter wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden der Pilzquantifizierung evaluiert. Dazu wurde zum einen eine bereits etablierte photometrische Methode der Chitin-Bestimmung einer halbautomatisierten Methode gegenübergestellt. Die auf einer alkalischen Proteinhydrolyse und einer anschließenden Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl basierende Methode lieferte dabei für Mycel und Fruchtkörper vergleichbare Ergebnisse zur photometrischen Methode. Zum anderen wurde für *L. squarrosulus* eine qPCR-Methode etabliert, welche es ermöglicht, Pilzgehalte von 10-80% mittels Realtime-PCR zu detektieren. Mit beiden Methoden wurden im mittleren Bereich einer Wachstumskurve von *L. squarrosulus* vergleichbare Pilzgehalte zur Ergosterol-Methode ermittelt.

ABSTRACT

Due to a growing world population, the sustainable and efficient use of crops grown for food production is becoming increasingly important. Large portions of the by-products generated during food processing are still discarded or used for animal feed production. This is also the case for refined sugar production, which generates large quantities of extracted beet pulp. Beet pulp contains only small amounts of sucrose and is no longer suitable for human consumption due to its high content of indigestible cell wall polymers. Basidiomycetes have a wide variety of enzymes that enables them to break down and metabolize complex structures, such as cell wall carbohydrates and lignin. The thus produced fermentates are usable by humans.

In this work, various side streams from the sugar industry were examined and suitable species from the division Basidiomycota were identified that can break them down efficiently. First, screening in surface cultures with > 50 species was carried out, followed by a screening using submerged cultures.

The species *L. squarrosulus* and *D. tabescens* were particularly suitable for dried beet pulp in combination with molasses. Crude protein contents of $19.1 \pm 0.1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g DM})^{-1}$ (*L. squarrosulus*) and $16.1 \pm 0.1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g DM})^{-1}$ (*D. tabescens*) were achieved. Supplementation with spent yeast from the beer brewing process further increased the crude protein content to $26.9 \pm 0.6 \text{ g} \cdot (100 \text{ g DM})^{-1}$ (*L. squarrosulus*) and $18.0 \pm 0.9 \text{ g} \cdot (100 \text{ g DM})^{-1}$ (*D. tabescens*). After optimizing the cultivation in shake flasks, the fermentation process with *L. squarrosulus* was transferred to the bioreactor. Here, cultivation was scaled up to a culture volume of 20 liters.

It was demonstrated that high-temperature-dried beet pulp can be replaced by fresh or steam-dried beet pulp without any loss of fungal or protein content.

The mycelium produced by *L. squarrosulus* had a composition that was beneficial for human nutrition. When cultivated on dried beet pulp, a biological value of 92 ± 1 was determined, with unsaturated fatty acids accounting for 81% of the total fatty acid content. Hybrid prototypes in the style of bratwurst with a mycelium content of 20% were produced from the fermentate. The hybrid products produced were convincing in terms of smell and taste. However, there was a need for improvement in terms of mouthfeel and texture.

For greater flexibility and broader application, two further by-products already fermented by microorganisms, ensiled beet pulp and vinasse, were also tested as substrates. Here, *L. squarrosulus* showed the best growth on ensiled beet pulp, vinasse, and the combination of both by-products. Crude protein contents ranging from $18.4 \text{ g} \cdot (100 \text{ g DM})^{-1}$ (ensiled beet pulp) to $32.5 \text{ g} \cdot (100 \text{ g DM})^{-1}$ (vinasse) were obtained. The highest biological value of 91.5 was analyzed after fermentation of ensiled beet pulp.

Furthermore, various methods for quantification of the share of mycelium in the fermentate were evaluated. On the one hand, an established photometric method for chitin determination

was compared with a semi-automated method. The method, which is based on alkaline protein hydrolysis and subsequent nitrogen determination according to Kjeldahl, was able to deliver results for mycelium and fruiting bodies that were well comparable to those of the photometric method. On the other hand, a qPCR method was established for *L. squarrosulus*, which enables the detection of fungal contents of 10-80% using real-time PCR. Both methods resulted in comparable fungal contents to the ergosterol method in the middle range of a growth curve of *L. squarrosulus*.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Volltext
ABU	<i>Armillaria bulbosa</i>
ADF	Saure-Detergenzien-Fasern
ALA	Alanin
ARG	Arginin
AS	Aminosäure
ASP	Asparaginsäure
bp	Basenpaare
BW	Biologische Wertigkeit
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
CS	Chemical Score
C _T -Wert	Cycle treshold
CYS	Cystein
DMAB	4-(N,N-Dimethylamino)benzaldehyd
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTA	<i>Desarmillaria tabescens</i>
DM	Dry mass
MEA	Malzextrakt-Agar
MEPA	Malzextrakt-Pepton-Agar
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäuren
EAAI	Essential Amino Acid Index
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FID	Flammenionisationsdetektor
FK	Fruchtkörper
GC	Gaschromatographie

Abkürzung	Volltext
GLU	Glutaminsäure
GLY	Glycin
HAU	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>
HIS	Histidin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HTT	Hochtemperaturtrocknung
ID	Innendurchmesser
IV	Inokulationsvolumen
IMD	InterMed Discovery GmbH, Dortmund
IST	Interner Standard
ILE	Isoleucin
KV	Kulturvolumen
LEU	Leucin
LOQ	Limit of quantification
LSQ	<i>Lentinus squarrosulus</i>
LYS	Lysin
ME	Malzextrakt
MEA	Malzextrakt-Agar
MEPA	Malzextrakt-Pepton-Agar
MS	Massenspektroskopie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
MET	Methionin
MEX	<i>Macrolepiota excoriata</i>
MnP	Mangan-Peroxidase
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
NDF	Neutral-Detergenzien-Fasern
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff
OS	Originalsubstanz

Abkürzung	Volltext
ox	oxidiert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHE	Phenylalanin
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RS	Rübenschnitzel
RSM	Rübenschnitzel-Melasse-Medium
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck, hier: gelöster Sauerstoff im Medium
SER	Serin
TAA	Total Amino Acids
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofuran
THR	Threonin
TM	Trockenmasse
TYR	Tyrosin
UNU	United Nations University
VAL	Valin
WHO	Weltgesundheitsorganisation

INHALTSVERZEICHNIS

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	I
DANKSAGUNG	II
VERÖFFENTLICHUNGEN	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
INHALTSVERZEICHNIS	XI
1 THEORETISCHER HINTERGRUND	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Fermentation mit Basidiomyceten	4
1.3 Nebenströme der Zuckerindustrie	7
1.4 Pilzquantifizierung	9
ZIELSETZUNG	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Verwendete Chemikalien	14
2.2 Verwendete Geräte	16
2.3 Verwendetes Verbrauchsmaterial	18
2.4 Pilz-Kultivierung	19
2.4.1 Stammhaltung	19
2.4.2 Vorkultur	19
2.4.3 Hauptkultur	20
2.4.4 Bioreaktor-Kultivierung	20

2.5	Substrate Rübenschnitzel und Melasse	22
2.5.1	Screening	22
2.5.2	Optimierung der Kultivierung	24
2.5.3	Produktentwicklung und sensorische Evaluation	27
2.6	Substrate Vinasse und silierte Rübenschnitzel	27
2.6.1	Screening	27
2.6.2	Optimierung der Kultivierung	29
2.7	Pilzquantifizierung	29
2.7.1	Ergosterol-Analytik	29
2.7.2	Chitin-Analytik	31
2.7.3	Vergleich zweier Methoden zur Chitin-Analytik zur Pilzquantifizierung	35
2.7.4	Etablierung einer qPCR-Methode	35
2.8	Analyse der chemischen Zusammensetzung	40
2.8.1	Bestimmung der Trockenmasse	40
2.8.2	Protein-Analytik	40
2.8.3	Aminosäure-Analytik	42
2.8.4	Zucker-Analytik (enzymatisch)	48
2.8.5	Gesamtfett-Analytik nach Weibull-Stoldt	49
2.8.6	Fettsäure-Analytik	51
2.8.7	Gesamtkohlenhydrat-Analytik	52
2.8.8	Asche	53
2.8.9	Säureunlösliche Asche	54
2.8.10	Harnstoff-Analyse	54
3	ERGEBNISSE	56
3.1	Substrate Rübenschnitzel und Melasse	56
3.1.1	Chemische Zusammensetzung	56
3.1.2	Screening in Oberflächenkultur	58
3.1.3	Screening in Flüssigkultur	62
3.1.4	Optimierung der Kultivierung	64
3.1.5	Alternative Substrate	87
3.1.6	Chemische Zusammensetzung des produzierten Mycels von <i>L. squarrosulus</i>	92
3.1.7	Produktentwicklung und sensorische Evaluierung	95

3.2	Substrate Silierte Rübenschnitzel und Vinasse	101
3.2.1	Chemische Zusammensetzung der Substrate und Medienzusammensetzung	101
3.2.2	Screening in Oberflächenkultur	103
3.2.3	Screening in Flüssigkultur	105
3.2.4	Optimierung der Kultivierung	112
3.3	Pilzquantifizierung	120
3.3.1	Etablierung einer qPCR-Methode	120
3.3.2	Vergleich zweier Methoden zur Chitin-Analytik	131
4	DISKUSSION	139
4.1	Substrate Rübenschnitzel und Melasse	139
4.1.1	Chemische Zusammensetzung	139
4.1.2	Screening in Oberflächenkultur	142
4.1.3	Screening in Flüssigkultur	145
4.1.4	Optimierung der Kultivierung	147
4.1.5	Alternative Substrate	161
4.1.6	Chemische Zusammensetzung des produzierten Mycels	163
4.1.7	Produktentwicklung und sensorische Evaluierung	166
4.2	Substrate silierte Rübenschnitzel und Vinasse	169
4.2.1	Chemische Zusammensetzung	169
4.2.2	Screening in Oberflächenkultur	171
4.2.3	Screening in Flüssigkultur	172
4.2.4	Optimierung der Kultivierung	174
4.3	Pilzquantifizierung	177
4.3.1	Etablieren einer qPCR-Methode	177
4.3.2	Vergleich zweier Methoden zur Chitin-Analytik	180
	AUSBLICK	183
	FAZIT	185
	LITERATURVERZEICHNIS	186
	ANHANG	209

1 THEORETISCHER HINTERGRUND

1.1 Hintergrund

Seit dem Jahr 1990 ist ein stetiger Rückgang des Fleischkonsums in Deutschland zu beobachten (Robert Koch-Institut, 2016). Wurden in Deutschland im Jahr 2018 noch 61,1 kg Fleisch pro Kopf verzehrt, so waren es im Jahr 2024 nur noch 58,2 kg (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2025). Die spiegelt sich auch in rückläufigen Zahlen der Tierhaltung in der Europäischen Union (EU) wider. So sank beispielsweise die Schweinepopulation in der EU von 148 Mio. Tieren im Jahr 2018 auf 132 Mio. Tiere im Jahr 2024 (Eurostat, 2025b). Im gleichen Zeitraum sank auch die Rinderpopulation von 78 Mio. Tieren auf 72 Mio. Tiere (Eurostat, 2025a). Die Gründe für den verminderten Fleischkonsum sind vielschichtig und reichen von ethisch-moralischen über religiöse, ökologische und gesundheitliche Gründe (Robert Koch-Institut, 2016). Im Jahr 2024 ernährten sich bereits 41% der deutschen Bevölkerung flexitarisch, was eine bewusste Verringerung des Fleischkonsums bedeutet. Ganz auf Fleisch und Fisch verzichteten 8% der deutschen Bevölkerung und 2% lebten vegan und verzichteten somit vollständig auf tierische Produkte (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2024). Immer mehr Menschen in Deutschland und Europa greifen daher zu Fleischersatzprodukten, um eine ausreichende Proteinzufuhr bei veganer und vegetarischer Ernährung zu erzielen (Thavamani *et al.*, 2020; Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2024). Die Vielfalt der Fleischersatzprodukte ist in den letzten Jahren mit der Nachfrage stark gestiegen und weist bereits jetzt ein breites Spektrum auf. Die Alternativen lassen sich in pflanzenbasiert, insektenbasiert, pilzbasiert, algenbasiert sowie „cultured meat“ einteilen (Thavamani *et al.*, 2020).

Aktuell sind auf dem Markt hauptsächlich pflanzenbasierte Alternativen erhältlich, welche vor allem aus Getreide, Leguminosen und Ölsaaten hergestellt werden (Thavamani *et al.*, 2020). Für die Herstellung von getreidebasierten Fleischersatzprodukten werden im Wesentlichen die Proteinfractionen von Weizen, Mais und Reis verwendet (Ahmad *et al.*, 2022). Insbesondere das Weizenprotein Gluten kann durch Wasserstoffbrücken-Bindungen, Disulfidbrücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen faserige Strukturen ausbilden, die für eine fleischähnliche Konsistenz sorgen können (Chiang *et al.*, 2021). Diese Eigenschaft ist in der asiatischen Küche bereits seit Jahrhunderten bekannt. Das dort traditionelle Lebensmittel Seitan wird durch das Auswaschen der Stärkefraktion aus Weizenteig erhalten und erlangt durch Erhitzen eine fleischartige Konsistenz (Chiang *et al.*, 2021; Malav *et al.*, 2015). Außerhalb von Asien wird Seitan in eingelegter und marinierter Form, sowie teilweise in Kombination mit Tofu seit Mitte/Ende des 19. Jahrhunderts vermarktet (Bentley, 2024). Weizengluten wird darüber hinaus auch in extrudierter und texturierter Form als Fleischersatz angeboten, wobei die

biologische Wertigkeit durch einen niedrigen Gehalt der essenziellen Aminosäure Lysin nur bei etwa 60 liegt (Malav *et al.*, 2015; Shewry, 2009; Anwar und El-Chaghaby, 2019).

Für die Herstellung von Fleischersatzprodukten aus Leguminosen wird überwiegend Soja verwendet, wobei auch Linsen, Kichererbsen, Erbsen, Bohnen und die Lupine zunehmend an Bedeutung gewinnen (Ahmad *et al.*, 2022). Leguminosen weisen einen hohen Proteingehalt von 20% (Kichererbse) bis 40% (Sojabohne, Lupine) und eine biologische Wertigkeit von 39 (Lupine) bis 62-72 (Kichererbse, Sojabohne) auf (Khan *et al.*, 1979; Semba *et al.*, 2021; Schoeneberger *et al.*, 1982; Nosenko, 2017). Durch den hohen Lysin-Gehalt sind Leguminosen(-proteine) eine gute Ergänzung zu getreidebasierten Proteinen und aufgrund der gute Wasserbindekapazität des Proteins sowie der emulgierenden Eigenschaften ein guter Ausgangsstoff für Fleischersatzprodukte (Erbersdobler *et al.*, 2017).

In Deutschland kennen bereits 96 % der Bevölkerung sojabasierte Fleischersatzprodukte wie Tofu oder Tempeh und über 50% haben diese bereits einmal gekauft und verzehrt (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2024). Tofu wird durch das Fällen der Proteinfraktion aus Sojamilch hergestellt (Wang, 1984). Durch Pressen des Protein-Präzipitats werden je nach Vermarktungsregion unterschiedliche Wassergehalte von 50-60% (China), 75-80% (Europa, USA) und 87-90% (Japan) eingestellt, die in weichen bis zähen Texturen resultieren (Wang, 1984). Tempeh wird durch Fermentation der Sojabohnen mit dem Schimmelpilz der Gattung *Rhizopus* hergestellt (Wang, 1984).

Trotz Vielfalt und Bekanntheit der Produkte spielen Sojaerzeugnisse in der Ernährung der Deutschen dennoch bisher mit 2-3 g/Tag nur eine untergeordnete Rolle (Max Rubner-Institut, 2008).

Bislang im Handel kaum erhältlich sind insektenbasierte Fleischalternativen. Insekten müssen in der EU nach der Verordnung (EU) 2015/2283, der Novel Food-Verordnung, für den menschlichen Verzehr zugelassen werden. Seit 2023 sind in der EU vier Insektenspezies zugelassen, welche den getrockneten gelben Mehlwurm (*Tenebrio molitor*), die Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*), den Buffalowurm (*Alphitobius diaperinus*) und die Hausgrille (*Acheta domesticus*) umfassen (Europäische Kommission, 2023b). Insekten sind mit 50-80% Protein und 10-30% Fett in der Trockenmasse besonders reich an Fett und Protein, wobei die Proteinqualität mit der der Sojabohne vergleichbar ist (Caparros Megido *et al.*, 2016; Bednářová *et al.*, 2014; Aguilar-Miranda *et al.*, 2002; Finke *et al.*, 1989). Insekten liefern überdies Vitamine und Ballaststoffe sowie die Spurenelemente Zink und Eisen (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). Während in Afrika aufgrund der vorteilhaften Nährstoffzusammensetzung bereits 5-10% des Proteinbedarfs durch Insekten gedeckt werden, ist die Verbraucherakzeptanz in Europa noch stark eingeschränkt (Caparros Megido *et al.*, 2016; Ayieko und Oriaro, 2008). Auch eine Bewertung der Nachhaltigkeit der Insektenzucht und -verarbeitung ist derweil noch nicht abschließend erfolgt (Kirner und Manns, 2024).

Hinzu kommt, dass Insekten das Protein Tropomyosin, welches auch in Krebs- und Weichtieren vorkommt, enthalten und so Allergien hervorrufen können. Entsprechende Produkte, die Insekten enthalten, müssen daher mit einem Allergenhinweis gekennzeichnet werden (Europäische Kommission, 2023b; Gisy, 2023)

Ebenso wie insektenbasierte Proteine und Fleischersatzprodukte spielen auch algenbasierte Produkte und „cultured meat“ in Deutschland zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Rolle (Mattick *et al.*, 2015; Kirner und Manns, 2024). Bei Mikroalgen ist vor allem die kostenintensive Aufarbeitung sowie die geringe Verbraucherakzeptanz gegenüber Färbung und fischigem Geruch ursächlich (Kurek *et al.*, 2022). Für „cultured meat“ werden Stammzellen, sogenannte Satellitenzellen, aus Tieren entnommen und *in vitro* vermehrt (Post, 2012, 2014). Die Kultivierung und Differenzierung der Zellen erfordern aktuell noch größtenteils fötales Kälberserum, welches neben Wachstumsfaktoren 200-400 Proteine sowie Zucker und Fettsäuren enthält. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung ist die industrielle Herstellung nur begrenzt möglich und mit hohen Kosten und Energieaufwand verbunden (Post *et al.*, 2020). Aufgrund der Tatsache, dass auch hier ein Töten von Tieren erforderlich ist und das Kultivierungsverfahren für Verbraucher unbekannt und schwer verständlich ist, ist die Verbraucherakzeptanz limitiert (Mattick *et al.*, 2015). Hinzu kommt auch hier der noch nicht abschließend bestimmte Nachhaltigkeitsaspekt durch die energieintensive Kultivierung (Post *et al.*, 2020).

Im Gegensatz dazu sind mycoproteinbasierte Produkte bereits seit einigen Jahren in deutschen Supermärkten und Discountern zu finden, wobei für das Mycel von Pilzen wie auch bei Insekten eine Zulassung als neuartiges Lebensmittel beantragt werden muss. Bis zum Inkrafttreten der Verordnung (EU) 2015/2283 zum 01.01.2018 war dies durch Verordnung (EG) Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten festgelegt (Europäisches Parlament und der Rat, 2015).

Bei den aktuell im Supermarkt erhältlichen Produkten handelt es sich um Produkte mit dem Mycel des Pilzes *Fusarium venenatum*. Das Mycel des Pilzes *Fusarium venenatum* wurde bereits vor Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten durch das vereinigte Königreich im Jahr 1984 für die Lebensmittelproduktion zugelassen (Finnigan *et al.*, 2017; Europäisches Parlament und der Rat, 1997). In der EU wird das Mycoprotein seit 1991 unter dem Namen Quorn® verkauft, in den USA seit dem Jahr 2002 (Finnigan *et al.*, 2017). Das Mycoprotein besteht zu 75% aus Wasser. In der Trockenmasse sind 45 g Protein, 13 g Fett, 25 g Ballaststoffe und 10 g Kohlenhydrate enthalten (Finnigan *et al.*, 2017). Verzehrstudien geben erste Hinweise darauf, dass durch den Verzehr des Mycoproteins positive gesundheitliche Effekte auftreten können. So wurde nach Verzehr beispielsweise eine Reduktion des Cholesteringehaltes im Blut der Probanden festgestellt, die zu Studienbeginn hohe Cholesterin-Werte aufwiesen (Ruxton und McMillan, 2010). Auch der Nachhaltigkeitsaspekt ist für Mycoprotein positiv zu beurteilen, da

dieses im Vergleich zu tierischem Protein einen vier- bis zehnfach geringeren CO₂-Ausstoß erzeugt (Thavamani *et al.*, 2020; Ramirez *et al.*, 2006).

Neben dem Mycel von *Fusarium venenatum* ist auch das Mycel des Pilzes *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* für die Lebensmittelproduktion zugelassen. Als Bestandteil von Tempeh wurde es bereits vor dem in Art. 3 Abs. 2 der VO (EU) 2015/2283 festgelegten Stichtag des 15. Mai 1997 in nennenswertem Umfang verzehrt und fällt daher nicht unter die Einstufung als Novel Food (Swedish Food Agency, 2022).

Seit Januar 2023 ist auch das mit Mycelien des Pilzes *Lentinula edodes* fermentierte Erbsen- und Reisprotein für die Lebensmittelproduktion zugelassen, wobei das entstehende Endprodukt < 0,1% w/w Mycel enthält (Turck *et al.*, 2022). In Fleischersatzprodukten dürfen hier bis zu 40 g des getrockneten Produktes pro 100 g verwendet werden (Europäische Kommission, 2023a).

Für Mycelien einiger Basidiomyceten, wie beispielsweise *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii*, erfolgte durch die EU-Kommission bereits eine Einstufung als Novel Food nach VO (EU) 2015/2283, jedoch liegt hier zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Zulassung vor (Europäische Kommission, 2017a).

1.2 Fermentation mit Basidiomyceten

Das Reich der Pilze umfasst mehr als 100.000 verschiedene Spezies, wobei die *Ascomycota* (Schlauchpilze) mit etwa 60.000 Spezies und die *Basidiomycota* (Ständerpilze) mit ca. 30.000 Spezies die größten Abteilungen im Reich der Pilze darstellen (Brahmachari *et al.*, 2017). Während aktuell zur Herstellung von Fleischersatzprodukten nahezu ausschließlich das Mycel des Pilzes *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, welcher keiner Abteilung zugeordnet ist, sowie das Mycel des Ascomyceten *Fusarium venenatum* verwendet wird, werden seit einigen Jahren vermehrt Ansätze zur Fermentation von Rest- und Nebenströmen der Lebensmittelindustrie mit Basidiomyceten verfolgt (Ahlborn *et al.*, 2019; Bickel Haase *et al.*, 2024; Schoch *et al.*, 2020; Berger und Ersoy, 2022).

Basidiomyceten können aufgrund ihrer vielfältigen Enzymausstattung zahlreiche pflanzliche Polymere abbauen, die für den Menschen nicht oder nur zu geringen Mengen zugänglich sind, und die Bestandteile wieder zu für den Menschen verwertbaren Substanzen metabolisieren (Brahmachari *et al.*, 2017; Ahlborn *et al.*, 2019). Dazu zählen vor allem Lignocellulosen, welche den Hauptbestandteil pflanzlicher Biomasse bilden (Sánchez, 2009). Lignocellulosen liegen in der pflanzlichen Zellwand in Form von Makrofibrillen vor. Diese Makrofibrillen bestehen aus Cellulose-Mikrofibrillen, die von Hemicellulose umschlossen sind. Lignin befindet sich in den Zwischenräumen und umgibt Cellulose und Hemicellulose (Cürten und Spieß, 2018). Die Kompartimente sind über kovalente Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft, was einen Abbau durch Mikroorganismen erschwert (Latif *et al.*, 2018; Rytioja *et al.*, 2014). Cellulose ist ein lineares Polymer, welches aus β -1,4-glykosidisch

verknüpften D-Glucose-Einheiten besteht. Die Untereinheit der Cellulose ist das Disaccharid Cellobiose, das aus zwei um 180° versetzten D-Glucose-Einheiten besteht (Andlar *et al.*, 2018; Sánchez, 2009). Hemicellulosen sind Polysaccharide und aus verschiedenen Monomeren aufgebaut, wobei die Hauptbestandteile die Monosaccharide D-Xylose, D-Mannose, D-Galactose, D-Glucose und D-Arabinose sowie die Uronsäuren D-Galacturon- und D-Glucuronsäure sind. Die Monomere liegen β -1,4-glykosidisch oder β -1,3-glykosidisch verknüpft vor und bilden so ein stark verzweigtes Molekül (Sánchez, 2009; Payne *et al.*, 2015). Je nach Pflanze dominieren Hexosen mit größtenteils vorliegenden β -1,4-verknüpften Mannose-Einheiten (Mannanen) oder Pentosen mit β -1,4-verknüpften Xylose-Einheiten (Xylanen) das Hemicellulose-Grundgerüst (Pauly *et al.*, 2013).

Lignin ist ein komplexes Polymer, welches nicht aus Monosacchariden, sondern aus Phenylpropan-Derivaten besteht. Die Hauptbestandteile sind hier *p*-Coumarylalkohol, Coniferylalkohol sowie Sinapylalkohol (Andlar *et al.*, 2018; Brahmachari *et al.*, 2017; Cürten und Spieß, 2018). Vor allem Lignin ist aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften sowie der irregulären Strukturen nur schwer abbaubar (Brahmachari *et al.*, 2017). Einige Basidiomyceten verfügen jedoch über eine Enzymausstattung, die einen Abbau des Lignins ermöglicht.

Bei Basidiomyceten kann zwischen Weiß- und Braunfäule-Pilze unterschieden werden. Während Braunfäule-Pilze, welchen nur < 10% der Basidiomyceten zuzuordnen sind, nur Cellulose und Hemicellulose vollständig abbauen können, bauen Weißfäulepilze alle drei Hauptbestandteile der Lignocellulose ab (Andlar *et al.*, 2018; Brahmachari *et al.*, 2017). Braunfäule-Pilze, zu denen beispielsweise *Gloephyllum trabeum* und *Fomes fomentarius* gehören, verfügen nicht über die zum vollständigen Abbau des Lignins benötigten Laccasen und Peroxidasen (Lyr, 1957). Sie können Lignin mithilfe der Fenton-Reaktion jedoch oxidativ modifizieren und depolymerisieren (Andlar *et al.*, 2018; Kerem und Hammel, 1999). Zu den Weißfäule-Pilze zählt der Großteil der Basidiomyceten. Beispiele für Weißfäule-Pilze sind *Polyporaceae*, wie *Trametes versicolor* und *Lentinus squarrosulus*, *Marasmiaceae*, wie *Lentinula edodes*, *Pleurotaceae*, wie *Pleurotus ostreatus*, und > 10.000 weitere Spezies (Andlar *et al.*, 2018; Brahmachari *et al.*, 2017). Meist werden Lignin und die enthaltenen Polysaccharide durch Weißfäule-Pilze simultan abgebaut (Brahmachari *et al.*, 2017). Hierzu sekretieren diese Pilze zwei Klassen extrazellulärer Enzyme, hydrolytische Enzyme zum Abbau der Polysaccharide und oxidative Enzyme zum Abbau des Lignins (Sánchez, 2009).

Für den Abbau der Cellulose werden hauptsächlich drei Gruppen hydrolytischer Enzyme benötigt. Dies sind zum einen die Endocellulasen (Endoglucanasen), welche innerhalb der Glucose-Ketten in den amorphen Bereichen der Cellulose spalten. Zum anderen werden Exocellulasen, auch als Cellobiohydrolasen bezeichnet, benötigt, welche die Glucose-Ketten jeweils von den Enden hydrolysieren (Harris *et al.*, 2010; Sergentani *et al.*, 2016). Durch das Zusammenspiel beider Cellulasen entstehen Oligosaccharide und Cellobiose, welche die genannten Enzyme inhibieren. Mithilfe von β -Glucosidasen werden diese weiter zu

verwertbarer Glucose umgesetzt (Cürten und Spieß, 2018; Sergeantani *et al.*, 2016; Payne *et al.*, 2015). Einige Pilze verfügen zusätzlich über Polysaccharid-Monooxygenasen (PMO), welche die kristalline Cellulose direkt oxidativ spalten (Neufeld und Pietruszka, 2012; Cürten und Spieß, 2018).

Für den Abbau der Hemicellulose werden ebenfalls mehrere Enzyme der Klasse der Hydrolasen benötigt. Zu diesen zählen die Endo-1,4- β -Xylanase und β -1,4-Xylosidase bei vorliegendem Xylan-Grundgerüst und die Endo-1,4- β -Mannanase und β -1,4-Mannosidase bei vorliegendem Mannan-Grundgerüst. Während Endo-Xylanasen und die Endo-Mannanasen in der Kette des Polysaccharids spalten und somit Oligosaccharide erzeugen, spalten Xylosidasen und Mannosidasen vom terminalen Ende der Oligosaccharide die Monosaccharide D-Xylose und D-Mannose ab (Rytioja *et al.*, 2014; Polizeli *et al.*, 2005). Weiter werden zum Abbau ergänzende Glucosidasen, wie α -L-Rhamnosidasen und die β -Galactosidasen benötigt, welche jeweils am Terminus hydrolysieren. Neben den Glucosidasen werden zum vollständigen Abbau auch Feruloyl-Esterasen benötigt, welche Ferulasäure von Arabinose-Resten der Seitenketten abspalten (Cürten und Spieß, 2018).

Der Abbau von Lignin wird vor allem durch Phenol-Oxidasen sowie Häm-Peroxidasen katalysiert und durch weitere Oxidasen unterstützt (Dashtban *et al.*, 2010). Bei Phenol-Oxidasen, welche auch als Laccasen bezeichnet werden, handelt es sich um glykosylierte Oxidoreduktasen mit Kupfer-Ionen im aktiven Zentrum. Sie katalysieren mithilfe eines radikalischen Reaktionsmechanismus' die Oxidation von aromatischen und nicht-aromatischen Verbindungen. Hierzu werden molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert und Ligninsubstrate durch freie Radikale oxidiert (Dashtban *et al.*, 2010; Hammel, 1997). Häm-Peroxidasen verfügen über eine Häm-Gruppe im aktiven Zentrum und benötigen Wasserstoffperoxid als Co-Substrat für die Lignin-Oxidation. Das Wasserstoffperoxid wird hier von unterstützenden Oxidasen, wie Arylalkohol-Dehydrogenasen und Glyoxal-Oxidasen, produziert (Dashtban *et al.*, 2010; Guillén *et al.*, 1992). Häm-Peroxidasen können in Lignin-Peroxidasen, Mangan-Peroxidasen und versatile Peroxidasen unterteilt werden. Während Lignin-Peroxidasen die nicht-phenolischen Bestandteile des Lignins oxidieren können, werden die phenolischen Komponenten durch Mangan-Peroxidasen oxidiert. Versatile Peroxidasen haben ein breiteres Substratspektrum und können sowohl die phenolischen als auch die nicht-phenolischen Komponenten oxidieren (Dashtban *et al.*, 2010).

Nicht alle Weißfäule-Pilze verfügen über das gesamte Spektrum der lignolytischen Enzyme. So verfügen die meisten Weißfäule-Pilze über Laccasen (Hammel, 1997). Eine Ausnahme ist *Phanerochaete chrysosporium*, welcher nicht über Laccasen, jedoch über Mangan- und Lignin-Peroxidasen verfügt (Dhiman *et al.*, 2024). *Pleurotaceae*, wie *P. ostreatus* und *P. pulmonarius* exprimieren Mangan-Peroxidasen, versatile Peroxidasen sowie Laccasen, jedoch keine Lignin-Peroxidasen (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002; Hammel, 1997; Dhiman *et al.*, 2024). Die Enzym-Expression der Pilze ist jedoch auch von der

Nährstoffzusammensetzung des Substrates abhängig und kann stark variieren (Andlar *et al.*, 2018). So wurden bspw. für *Trametes versicolor* bei Kultivierung auf Kompost aus Weizenstroh nur Laccasen nachgewiesen, während bei Kultivierung auf Zuckerrohr-Bagasse neben Laccasen auch Mangan-Peroxidasen und weitere Oxidasen sowie Cellobiase nachgewiesen wurden (Sánchez, 2009).

Aufgrund der beschriebenen Enzymausstattung und Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Substrate eignen sich Basidiomyceten besonders gut für den fermentativen Abbau pflanzlichen Materials, welches als Rest- und Nebenstrom bei der Lebensmittelherstellung anfällt. Durch die Fermentation werden polymere Zellwandkomponenten wieder in Monomere zersetzt, metabolisiert und wieder für den menschlichen Verzehr verfügbar gemacht (Meyer *et al.*, 2020).

1.3 Nebenströme der Zuckerindustrie

Weltweit wird Zucker zu 21% aus Zuckerrüben und zu 79% aus Zuckerrohr gewonnen (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2024). Während in der EU ausschließlich Zuckerrüben angebaut werden, wird Zuckerrohr vor allem in Brasilien, Indien, China und Thailand angebaut (Melati *et al.*, 2017; Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2024). Die EU erzeugte in der Kampagne 2023/2024 mit 15,6 Mio. t rund 50% der weltweiten Rübenzuckermenge. Neben Frankreich und Polen ist Deutschland in der EU einer der größten Zucker-Produzenten (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Referat „Statistik, Planungsgrundlagen, Wissensmanagement“, 2025).

Im Jahr 2023 betrug die Anbaufläche für Zuckerrüben in Deutschland 396.000 ha, wobei der Ertrag bei 797,3 dt/ha lag. Insgesamt wurden im Jahr 2023 in Deutschland 31.558.000 t Zuckerrüben geerntet. Zuckerrüben aus Deutschland enthielten im Jahr 2019 im Durchschnitt 17,44% Zucker. Aufgrund verschiedener Witterungseinflüsse unterliegt der Zuckergehalt jedoch jährlichen Schwankungen, sodass im Jahr 2018 im Durchschnitt 19,31% Zucker und im Jahr 2024 16,33% Zucker in deutschen Rüben enthalten waren (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2020; Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V., 2025).

Zur Extraktion des enthaltenen Zuckers werden die Zuckerrüben zunächst gewaschen und anschließend mithilfe von rotierenden Messern zerkleinert, sodass Schnitzel von 3-4 cm Länge und 2-3 mm Dicke resultieren. Die Extraktion der Schnitzel erfolgt im Gegenstromverfahren bei 70-75 °C, wobei als Endprodukt entzuckerte Schnitzel sowie das Zwischenprodukt Rohsaft entstehen (Bayrak *et al.*, 2003). Die entzuckerten Schnitzel werden abgepresst, sodass der verbleibende Wassergehalt in Pressschnitzeln noch etwa 85% beträgt (Woodman und Calton, 1928; DLG e.V., 1997). Der Rohsaft wird weiterverarbeitet und einer Saftreinigung mittels Kalk/Kohlensäureverfahren unterzogen. Hier werden Teile der Nichtzuckerstoffe entfernt. Der entstandene Dünnsaft wird in mehreren Schritten eingedickt, sodass Dicksaft entsteht. Der Dicksaft wird anschließend mit Impfkristallen versetzt und bis zur Kristallisation erhitzt. Durch

Abkühlen wird das Kristallwachstum vorangetrieben und in einem letzten Schritt die Zuckerkristalle durch Zentrifugation vom Sirup abgetrennt. Aus dem im finalen Zentrifugationsschritt abgetrennten Sirup, der Melasse, kann kein weiterer Zucker mehr gewonnen werden (Verein der Zuckerindustrie, 2003; Klein *et al.*, 2023). Während des gesamten Verarbeitungsprozesses der Zuckerrübe fallen verschiedene Restströme sowie Abfälle an.

Für Zuckerrüben liegt der Abfallkoeffizient bei der Primärproduktion bei 2,0-8,0% (Schnepel und Hoffmann, 2016), sodass in Deutschland im Durchschnitt 140.000 t während Nachernteprozessen, Lagerung und Transport im Jahr 2015/2016 anfielen. Bei der Zuckerherstellung fielen im Jahr 2015 zusätzlich 103.700 t organischer Abfall an (Schmidt *et al.*, 2019).

Die mengenmäßig bedeutendsten Restströme bei der Zuckerherstellung sind Rübenschnitzel und Melasse (Klein *et al.*, 2023). Die anfallende Menge des Nebenstroms Rübenschnitzel korreliert direkt mit der produzierten Zuckermenge und betrug im Jahr 2018/2019 1.636.000 t Trockenmasse und im Jahr 2023/2024 1.719.000 t. Die produzierte Menge des Nebenstroms Melasse hängt von vielen Faktoren, wie beispielsweise der Dicksaftabgabe an die Bioethanolindustrie, ab. Im Jahr 2018/2019 fielen 868.000 t und im Jahr 2022/2023 815.000 t Melasse an (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2020, 2024). Während Rübenschnitzel direkt als Biogas-Substrat oder in silierter, pelletierter und getrockneter Form als Direkt- und Mischfuttermittel für Rinder und Schweine dienen, wird Melasse neben Tierfutter auch als Fermentationssubstrat, bspw. für die Produktion von Hefe, Ethanol, Enzymen und Arzneimitteln eingesetzt (Klein *et al.*, 2023). Diese unterschiedliche Verwertung ist auf die ungleiche Zusammensetzung der beiden Restströme zurückzuführen.

Im Prozess anfallende Pressschnitzel werden zu einem großen Teil getrocknet und weisen als Trockenschnitzel nur noch einen geringen Wasseranteil von etwa 10% auf (DLG e.V., 1997; Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing, 2023). Den größten Anteil der Trockenmasse bilden die Fasern der Zuckerrübe, welche sich in Neutral-Detergenzien-Fasern (NDF) und Saure-Detergenzien-Fasern (ADF) unterteilen lassen. Trockenschnitzel weisen einen NDF-Wert von 35-40% und einen ADF-Wert von ca. 20% der Trockenmasse auf (Fadel *et al.*, 2000; Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing, 2023).

In der Trockenmasse sind überdies 8-10% Rohprotein und 6-9% Restzucker enthalten. Der Rohaschegehalt beträgt 3-6%, wobei vor allem die Mineralstoffe Kalium und Calcium enthalten sind (Fadel *et al.*, 2000). Der Rohfettgehalt beträgt < 1% der Trockenmasse (DLG e.V., 1997). Melasse weist eine Trockenmasse von ca. 80 % auf (Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing, 2023; DLG e.V., 1997). Diese umfasst zu 50-70% Zucker, und zu 10-16% Rohprotein. Daneben sind 6-18% Asche enthalten (Palmonari *et al.*, 2020). Der enthaltene Zucker ist fast ausschließlich auf vorkommende Saccharose und nur zu 1-2 % auf Glucose und Raffinose zurückzuführen. Bei der enthaltenen Asche sind die Mineralstoffe

Phosphor, Kalium, Natrium und Calcium als Hauptbestandteile zu nennen (Palmonari *et al.*, 2020; Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing, 2023).

Aufgrund des hohen Restzuckergehaltes der Melasse wird diese häufig den Rübenschnitzeln vor der Trocknung und Pelletierung zugesetzt, um eine bessere Haltbarkeit sowie einen süßen Geschmack des Futtermittels zu erzielen (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e. V., 2021). Im Jahr 2019/2020 wurden insgesamt 2.880.000 t Futtermittel aus Zuckerrüben erzeugt. Davon waren 1.597.000 t Rübenpressschnitzel, 1.178.000 t Rübenmelasseschnitzel und 105.000 t Trockenschnitzel (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e. V., 2021). Die erzeugte Melasse wurde im Jahr 2019/2020 zu etwa 45% für die Tierfutterherstellung verwendet, zu 15% für die Hefeproduktion und zu 40% für Brennereien, die Bioethanol-Erzeugung sowie die Herstellung von Ethylalkohol (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e. V., 2021).

1.4 Pilzquantifizierung

Bei der Fermentation nicht-löslicher Nebenströme durch Basidiomyceten nach einer üblichen Fermentationsdauer von 6-10 Tagen verbleiben meist noch Anteile der eingesetzten Substrate im Fermentat. Da diese von dem gebildeten Mycel nicht oder nur mit hohem Aufwand separiert werden können, ist zur Abschätzung des Pilzwachstums und somit der Qualität der Biomasse eine Quantifizierung des Pilzgehaltes im Fermentat essenziell. Zur Quantifizierung werden hier Biomarker herangezogen, welche zwar in Pilzen, jedoch nicht in dem eingesetzten pflanzlichen Material vorkommen. Beispiele sind das in Pilzen vorkommende Ergothionein sowie Chitin und Ergosterol (Ekblad *et al.*, 1998).

Ergothionein ist eine antioxidativ-wirkende, schwefelhaltige Aminosäure, die erstmals im Pilz *Claviceps purpurea* nachgewiesen wurde (Tanret, 1909). Sie wird nur von Pilzen, einigen Cyanobakterien sowie Mykobakterien synthetisiert (Goncharenko *et al.*, 2015; Kalaras *et al.*, 2017). Die Biosynthese in Pilzen erfolgt aus den drei Aminosäuren Histidin, Cystein und Methionin, wobei Histidin das Grundgerüst des Ergothioneins bildet. Die Aminosäure Cystein bringt die Thiolgruppe ein, Methionin dient als Methylgruppen-Donator (Melville *et al.*, 1957). Das Molekül kann von Pflanzen, Tieren und Menschen nicht gebildet werden, ist jedoch dennoch in menschlichen und tierischen Organen, wie Leber und Niere, sowie in pflanzlichem Material mittels Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) nachweisbar (Ey *et al.*, 2007; Dubost *et al.*, 2006). Dies ist darauf zurückzuführen, dass mikrobiell im Boden gebildetes Ergothionein durch das Wurzelsystem der Pflanzen aufgenommen wird und so durch den Verzehr auch in den tierischen und menschlichen Organismus gelangt (Melville *et al.*, 1957). In Leber und Niere von Schwein und Huhn wurden 7-11 mg·kg⁻¹ nachgewiesen, in pflanzlichem Material wie Kidney-Bohnen und Haferkleie 4-6 mg·kg⁻¹. Bei Pilzen variiert der Ergothionein-Gehalt stark je nach Gattung, Wachstumsphase und Nährmedium. Die höchsten Gehalte wurden für *Pleurotus ostreatus* und *Boletus edulis* mit 100-500 mg·kg⁻¹ nachgewiesen.

In einigen Pilzen war Ergothionein nicht nachweisbar (Ey *et al.*, 2007). Ergothionein ist daher nur eingeschränkt für die Quantifizierung des Pilzgehaltes nutzbar.

Ergosterol ist ein Zellmembransterol, welches sehr spezifisch für Pilze ist und nur in geringen Mengen in Algen und Protozoen nachgewiesen wurde (Peeler *et al.*, 1989; Raederstorff und Rohmer, 1987; Mercer, 1984). In der Abteilung Basidiomycota, mit Ausnahme der Klasse der Pucciniomyceten, ist Ergosterol mit 70-85% das am häufigsten vorkommende Sterol (Weete, 1989). Weitere vorkommende Sterole sind beispielsweise 5-Dehydroergosterol und 22-Dehydroergosterol sowie Zwischenprodukte des Ergosterol-Synthesewegs (Weete, 1989; Mercer, 1984). Die Synthese des Ergosterols erfolgt zunächst analog zu der Synthese von Sitosterol in Pflanzen und Cholesterin in Tieren. Aus Acetyl-CoA wird über 4 Reaktionsschritte Squalen hergestellt, welches durch die Squalen-Monooxygenase zu Squalen-2,3-epoxid oxidiert wird. Durch Cyclisierung wird bei Tieren und Pilzen das tetracyclische Triterpen Lanosterol erhalten. Durch aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen wird bei Pilzen als Endprodukt das Zellmembransterol Ergosterol erhalten (Mercer, 1984; Dupont *et al.*, 2012). Ergosterol wird aufgrund seiner Spezifität häufig zur Quantifizierung von Pilzen in Umweltproben, wie beispielsweise Waldböden, aber auch in Futter- und Lebensmitteln verwendet (Mille-Lindblom *et al.*, 2004). Aufgrund eines vermuteten raschen Abbaus nach dem Tod einer Hyphe wird Ergosterol oft als Marker zur Quantifizierung lebender Pilzbiomasse beschrieben. Mille-Lindblom *et al.* (2004) wiesen jedoch nach, dass der Abbau langsamer als vermutet stattfindet, wenn die Lagerung unter Lichtausschluss erfolgt. Nach einer 2-monatigen Lagerung von Erdproben, welche mit Ergosterol dotiert wurden, wurde ein Abbau von 34% unter Zugabe von Bakterien und von 23% ohne diese beobachtet. Deutlich schneller erfolgte der Abbau von Ergosterol unter Einfluss von Sonnenstrahlung, wo nach 24-stündiger Exposition bereits Ergosterol-Verluste von 43% zu beobachten waren (Mille-Lindblom *et al.*, 2004). Dies ist auf die photochemische Umwandlung von Ergosterol über Provitamin D₂ zu Ergocalciferol zurückzuführen (Havinga, 1973). Proben für die Ergosterol-Analyse sollten daher möglichst kurz, kühl und unter Lichtausschluss gelagert werden, um Verfälschungen zu vermeiden. Für die Analyse von Ergosterol wird zunächst das Probenmaterial mithilfe von methanolischer Kali- oder Natronlauge bei 70-80 °C aufgeschlossen und anschließend mit einem unpolaren organischen Lösungsmittel, wie Hexan oder Cyclohexan, extrahiert. Das Lösemittel wird abgedampft und der Rückstand in einem polaren Lösemittel, wie Methanol oder Tetrahydrofuran wieder aufgenommen. Die Analyse kann dann mittels HPLC oder nach entsprechender Derivatisierung mittels Gaschromatographie (GC) erfolgen (Mille-Lindblom und Tranvik, 2003; Bickel Haase *et al.*, 2024).

Deutlich stabiler gegenüber äußeren Einflüssen als Ergosterol ist das in der Zellwand vorkommende Polysaccharid Chitin. Das Polysaccharid kommt neben Pilzen auch in den Panzern von Krustentieren und Insekten vor, in höheren Tieren und Pflanzen wurde es bisher nicht nachgewiesen (Islam *et al.*, 2017). Chitin sorgt in der pilzlichen Zellwand und auch in den

Panzern von Insekten für die nötige Stabilität, was auf die Struktur des Chitins zurückzuführen ist (Bowman und Free, 2006). Chitin besteht aus β -(1,4)-verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Monomeren, welche teilweise in deacetylierter Form vorliegen können. Chitin-Ketten, bestehend aus jeweils über 1000 Monomeren, können sich über Wasserstoffbrücken-Bindungen in paralleler oder antiparalleler Struktur zusammenlagern, sodass sich Mikrofibrillen, bestehend aus 20-400 Ketten, bilden (Ruiz-Herrera und Ruiz-Medrano, 2004). Die Chitin-Mikrofibrillen sind in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert und werden in der Zellwand durch β -Glucane, Proteine sowie Oligosaccharide umgeben. Die Biosynthese des Chitins erfolgt in allen Organismen identisch. Die Bildung des Monomers N-Acetyl-D-Glucosamin erfolgt durch den Hexosamin Pathway. Aus der Glykolyse werden Glucose- und Fructose-Phosphat gewonnen, die zunächst zu Glucosamin-Phosphat umgesetzt werden. Es folgt eine enzymatische Acetylierung mit Acetyl-CoA und eine anschließende enzymatische Übertragung der Phosphatgruppe von C6 auf Position C1. Nach Aktivierung mit UDP wird die Bildung des Disaccharids durch das Enzym Chitin-Synthase katalysiert und es folgt die Polymerisation (Kayser und Aversch, 2024; Bowman und Free, 2006). Der Chitin-Anteil in der pilzlichen Zellwand beträgt für filamentöse Pilze 10-20% der Trockenmasse, für Hefezellen nur 1-2% (Bowman und Free, 2006). Der Chitingehalt in Pilzen kann jedoch je nach Spezies und betrachtetem Teil des Pilzes stark variieren und liegt im Mycel zwischen 0,8% (*Pleurotus ostreatus*) und 9,6% (*Agaricus bisporus*) der Trockenmasse (Nitschke *et al.*, 2011).

Für die Quantifizierung des Chitins sind in der Literatur mehrere chromatographische und photometrische Verfahren beschrieben. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften und der stofflichen Beschaffenheit wird häufig auf die Flüssigkeitschromatographie zurückgegriffen (Ghosh und Dhepe, 2021). Hier erfolgt die Quantifizierung des Monomers N-Acetyl-D-Glucosamin nach enzymatischem Abbau mit Chitinasen (Nitschke *et al.*, 2011). Ein Beispiel für ein photometrisches Verfahren ist die Methode nach Smith und Gilkerson (1979). Diese beruht darauf, dass 2,5-Anhydrohexosen mit 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon-Hydrochlorid (MBTH) einen blauen Farbstoff bilden, welcher bei 650 nm photometrisch erfasst werden kann. Im ersten Schritt wird die Probe im salzsauren Milieu unter Hitze hydrolysiert und die entstehenden N-Acetyl-D-Glucosamin-Monomere deacetyliert. Unter Zugabe von Natriumnitrit im sauren Milieu findet die Desaminierung der Monomere zu 2,5-Anhydrohexosen statt (Tsuji *et al.*, 1969a, 1969b). Diese reagieren mit MBTH und Eisen(III)-Ionen zu dem bei 650 nm photometrisch quantifizierbaren Farbstoff weiter (Smith und Gilkerson, 1979). Vor kurzem wurde für die Quantifizierung von Chitin in Insekten von Sudwischer *et al.* (2025) Sudwischer *et al.* eine Methode beschrieben, welche auf der Analyse des Stickstoffgehaltes nach alkalischer Hydrolyse der Probe beruht. Die Probe wird hier zunächst unter Hitze alkalisch hydrolysiert und die Hydrolyse-Produkte ausgewaschen. Der Rückstand wird dann nach Kjeldahl auf den Stickstoff-Gehalt untersucht und so auf den Chitin-Gehalt der Probe geschlossen (Sudwischer *et al.*, 2025). Die Methoden der Chitin-Analytik sind sehr vielfältig,

können jedoch aufgrund von Matrixeffekten nicht immer zuverlässig angewandt werden (Tsuji *et al.*, 1969a; Nitschke *et al.*, 2011).

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Pilzgehaltes ist die Quantifizierung über die in der Probe enthaltene Pilz-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, der Denaturierung, der Primerhybridisierung sowie der Elongation (Erlich, 1989). Bei der Denaturierung werden die komplementären DNA-Stränge durch Hitze getrennt, sodass zwei DNA-Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt, der Primerhybridisierung, binden die Primer an das 3'-Ende der Template-DNA. Im letzten Schritt, der Elongation, wird mithilfe der DNA-Polymerase beginnend mit den Primern wieder ein komplementärer DNA-Strang aus Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) aufgebaut (Erlich, 1989; Volkenandt *et al.*, 1990). Durch aufeinanderfolgende Zyklen wird die vorliegende Template-DNA hier exponentiell vervielfältigt. Der Nachweis der DNA kann dann qualitativ mittels Agarose-Gel und interkalierendem Farbstoff erfolgen oder quantitativ mittels quantitativer Realtime-PCR (qPCR). Für die qPCR können farbstoffbasierte sowie sondenbasierte Ansätze gewählt werden (Kubista *et al.*, 2006; Ponchel *et al.*, 2003). Ein Beispiel für einen sondenbasierten Ansatz ist der „TaqMan“-Ansatz. Hier werden unmarkierte Primer, sowie Fluoreszenz-markierte Sonden eingesetzt. Nach Öffnen des Doppelstrangs bindet die Fluoreszenz-markierte Sonde an einer spezifischen Stelle der Template-DNA. Bei der Elongation des DNA-Strangs wird der Fluoreszenz-Farbstoff durch die Polymerase von der Sonde getrennt und löst ein Fluoreszenz-Signal aus (Ponchel *et al.*, 2003). Ein Beispiel für eine farbstoffbasierte qPCR ist die Verwendung des asymmetrischen Cyanin-Farbstoffs SYBR® Green (Kubista *et al.*, 2006). SYBR® Green zeigt in Lösung nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz. Durch Binden des Farbstoffs an doppelsträngige DNA nimmt die Fluoreszenz stark zu, sodass die Fluoreszenz mit der erzeugten Menge doppelsträngiger DNA ansteigt. Die Reaktion verläuft jedoch nicht direkt proportional, da die Fluoreszenz vom Verhältnis Farbstoff zu Base abhängt, welches im Verlaufe der Reaktion abnimmt (Kubista *et al.*, 2006; Zipper *et al.*, 2004).

Die qPCR wurde bereits erfolgreich für die Quantifizierung des Pilzgehaltes verwendet. So wiesen bspw. Jomura *et al.* (2020) den Gehalt des Pilzes *Lentinula edodes* in Sägemehl mithilfe des SYBR® Green Farbstoffs und Spezies-spezifischen Primern nach.

ZIELSETZUNG

Ziel der Arbeit war es, in der Zuckerindustrie anfallende Nebenströme mithilfe eines Fermentationsprozesses mit Basidiomyceten einer höheren Wertschöpfung zuzuführen und wieder für die Lebensmittelherstellung nutzbar zu machen.

Bei der Herstellung von Raffinade fallen vor allem extrahierte Rübenschnitzel sowie Melasse als Nebenströme an. Insbesondere die Rübenschnitzel verfügen nur noch über einen geringen Handelswert und werden als Tierfutter oder als Rohstoff zur Energie- und Bio-Brennstoff-Gewinnung verwendet. Basidiomyceten können aufgrund ihrer Enzymausstattung komplexe Zellwand-Polymere, wie sie in Rübenschnitzeln vorkommen, abbauen und so die Ballaststoffe wieder in für den Menschen verfügbare Verbindungen umwandeln.

Für die Prozessentwicklung sollten zunächst ein bis zwei geeignete Spezies aus der institutseigenen Stammsammlung identifiziert werden, welche sich aufgrund ihrer Wachstums- und Aromaeigenschaften besonders gut für die Fermentation der Rübenschnitzel eignen. Dazu lag der Fokus auf einem hohen Protein- und Ergosterolgehalt. Die Auswahl sollte in einem umfangreichen Screening in Oberflächenkultur mit > 50 Spezies und einem darauf aufbauenden Screening in Flüssigkultur getroffen werden und der Prozess hinsichtlich Medienzusammensetzung und Kultivierungsparametern, wie pH-Wert und Temperatur, optimiert und in den Bioreaktor übertragen werden. Das produzierte Mycel sollte bezüglich der chemischen Zusammensetzung analysiert und für die Produktion erster Prototypen in Form von hybriden Fleischerzeugnissen verwendet werden.

Neben Rübenschnitzeln und Melasse sollten für eine bessere Übertragbarkeit und Flexibilität des Prozesses nach gleichem Prinzip auch weitere Nebenströme getestet und die Kultivierung bezüglich Protein- und Ergosterolgehalt optimiert werden.

Da der Biomarker Ergosterol zur Quantifizierung der Pilzbiomasse vor allem durch eine begrenzte Stabilität Nachteile aufweist, sollten im Zuge dieser Arbeit weitere Möglichkeiten zur Quantifizierung betrachtet und etabliert werden. Hier wurden der Chitin- und DNA-Gehalt betrachtet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Im Rahmen der Arbeit verwendete Chemikalien

Substanz	Reinheit [%]	CAS-Nummer	Hersteller
2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diolhydrochlorid (Tris-HCl)	≥ 99	1185-53-1	Carl Roth GmbH + Co. KG
2-Butanon	≥ 99,5	78-93-3	Carl Roth GmbH + Co. KG
2,2'-Thiodiethanol	≥ 99	111-48-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
3-Methyl-2-benzthiazolinon-hydrazonhydrochlorid		4338-98-1	Merck KGaA
4-(Dimethylamino)benzaldehyd		100-10-7	Thermo Fischer
7-Dehydrocholesterol	≥ 95	434-16-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Acetylchlorid p.a.	≥ 98,0	75-36-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Agarose für Elektrophorese		9012-36-6	Carl Roth GmbH + Co. KG
Aktivkohle zum Entfärben		7440-44-0	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ameisensäure	99 %	64-18-6	SERVA Electrophoresis GmbH
Aminosäure-Standard für erweitertes Hydrolysat-Programm			Sykam Chromatography
Ammoniumsulfamat, ACS-Reagenz	≥ 98,0	7773-06-0	FisherScientific
Borsäure	99,8	10043-35-3	Th. Geyer GmbH & Co.KG
Chitin aus Krabbenschale		1398-61-4	Carl Roth GmbH + Co. KG
Citronensäure	≥ 99,5	77-92-9	Carl Roth GmbH + Co. KG
D(-)-Fructose	> 99,5	57-48-7	Carl Roth GmbH + Co. KG
D(+)-Glucose		50-99-7	Carl Roth GmbH + Co. KG
D(+)-Saccharose	≥ 99,5	57-50-1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 99,0	151-21-3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Eisen(III)-chlorid (wasserfrei)		7705-08-0	Merck KGaA
Ergosterol		57-87-4	CAYMAN CHEMICAL
Essigsäure (Eisessig)	≥ 99,5	64-19-7	Th. Geyer GmbH
Ethanol	≥ 99,9 (HPLC)	64-17-5	CHEMSOLUTE®
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	≥ 99,0	6381-92-6	Carl Roth GmbH + Co. KG

Substanz	Reinheit [%]	CAS-Nummer	Hersteller
Fettsäuremethylester-Standard (37-Komponenten FAME-Mix)	≥ 98,7		Merck KGaA
Harnstoff	≥ 99,5	57-13-6	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hefeextrakt (pulv., für die Bakteriologie)		8013-01-2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumcarbonat, wasserfrei	≥ 99,0	584-08-7	Fluka
Kaliumhexacyanoferrat(II)		14459-95-1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	≥ 99,0	14459-95-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kjeldahl Tabletten CT		7758-99-8	VWR International
LB-Agar (Lennox) für die Molekularbiologie		7177-48-2	Carl Roth GmbH + Co. KG
L-Tryptophan	≥ 98,0 (HPLC)	73-22-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Malzextrakt		8002-48-0	Carl Roth GmbH + Co. KG
Malzextrakt		8002-48-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Malzextrakt		8002-48-0	Th. Geyer GmbH
Methanol	≥ 99,9 (HPLC)	67-56-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
N-Acetyl-D-Glucosamin		7512-17-6	FisherScientific
Natrium Citrat Puffer A-1			Sykam Chromatography
Natrium Citrat Puffer B-1			Sykam Chromatography
Natriumchlorid	≥ 99,5	7647-14-5	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natrium L(+)-Ascorbat		134-03-2	PanReac AppliChem
Natriumdisulfit	reinst	7681-57-4	Bernd Kraft
Natriumhydroxid	≥ 98,0	1310-73-2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumnitrit p.a.		7632-00-0	VWR Chemicals
Natronlauge	32	7664-93-9	CHEMSOLUTE®
n-Hexan		110-54-3	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
Ninhydrin Reagent + Reducing Agent for Ninhydrine Reagent (2 Komponenten)		485-47-2	Sykam Chromatography
N-Methyl- N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid		24589-78-4	fluorochem
Nonadecansäure	≥ 99,9	646-30-0	CAYMAN CHEMICAL
Orcinol		504-15-4	VWR Chemicals
Ortho-Phosphorsäure	85	7664-38-2	Fluka Analytical
Phenol		108-95-2	Merck KGaA
p-Nitrophenol		100-02-7	Fisher scientific
Power SYBR-Green ®		-	Thermo Fischer
Salzsäure	37	7647-01-0	Carl Roth GmbH + Co. KG

Substanz	Reinheit [%]	CAS-Nummer	Hersteller
Salzsäure-Maßlösung	0,1 M		Carl Roth GmbH + Co. KG
Schwefelsäure	98	7664-93-9	CHEMSOLUTE®
Seesand		14808-60-7	Merck KGaA
Stearinsäure	≥ 98,0	57-11-4	Carl Roth GmbH + Co. KG
Struktol® SB 420		-	Schill & Seilacher
TBE-Puffer (TRIS, Borsäure, Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat)		-	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tetrahydrofuran	≥ 99,7 (HPLC)	109-99-9	VWR Chemicals
TLC Silica gel 60 F ₂₅₄		7631-86-9	Merck KGaA
Trinatriumcitrat-Dihydrat		6132-04-3	FisherScientific
TriTrack DNA-Ladefarbstoff		-	Thermo Fischer
Wasserstoff 5.0		1333-74-0	Nippon Gases
Wasserstoffperoxid	30	7722-84-1	CHEMSOLUTE®
Zinkacetat Dihydrat	≥ 99,0	5970-45-6	Carl Roth GmbH + Co. KG

2.2 Verwendete Geräte

Tabelle 2: Im Rahmen der Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Aminosäureanalysator	S 7130, S 5200, S 2100, S 4300	SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruch, Deutschland
Aufschlusseinheit Kjeldahl	TURBOTHERM	C. Gerhardt GmbH & Co. KG
Autoklav	Laboklav ECO 80-B – Basisgerät	SHP Steriltechnik AG
Autoklav	Laboklav 25B – Basisgerät	SHP Steriltechnik AG
Bioreaktor	RALF MO 5 Liter	Bioengineering AG
Bioreaktor	NLF MO 30 Liter	Bioengineering AG
Brutschrank	Memmert	Memmert GmbH +Co. KG Deutschland
Bunsenbrenner	Gas profi 1 SCS micro	WLD-TEC GmbH
Chitin-Aufschluss	Fibretherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Dispergierwerkzeug	IKA®T25 digital ULTRA-TURRAX	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland
Feinwaage	BP 211 D	Sartorius
Feinwaage	SI-234 A	Denver Instrument
Fest-Flüssigextraktion	Soxtherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Feuchtebestimmer	MA 35 M	Sartorius AG Germany

Gerät	Modell	Hersteller
Flockeneisbereiter	EF 103 easy-fit	Scotsman Ice, Italy
Gaschromatograph	7890A GC System	Agilent, Santa Clara USA
Gaschromatograph mit Massenspektrometer	5977B MSD , 7890B GC-System	Agilent
Gaswäscher	VACUSOG	C. Gerhardt GmbH & Co. KG
Gefrierschrank (-18°C)		Liebherr-Hausgeräte GmbH, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LSCbasic	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Delta 2-24 LSCplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland
Gel-Doc	G:Box Documentation Imaging System & Transilluminator	Syngene™
Gelelektrophorese-Kammer mit Netzteil	Consort Netzteil EV3020	Carl Roth GmbH + Co. KG und Consort
Grobwaage	ME3002	Mettler Toledo
Inkubator	Bio ES-80 Shaker-Incubator	Grant Instruments
Inkubator	Orbital Shaker Incubator ES-80	Grant Instruments
Inkubationsschüttler	Innova® 42/42R Shaker	Eppendorf SE
Kühler	Unichiller	Peter Huber Kältemaschinenbau SE
Kühlschrank	Liebherr MED Line	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Deutschland
Muffelofen		Nabertherm GmbH
Mühle	Polymix PX-MFC 90 D	Kinematica
PCR Cycler	MJ Research PTC-200	PerkinElmer
pH-Meter	Five Go pH Meter	Mettler-Toledo GmbH, Deutschland
pH-Meter	Seven Easy	Mettler Toledo
Photometer	UViLine 9100 und 9400	Schott Instruments
Pipetten	peqette	peqlab
qPCR Cycler	CFX Opus 96	Bio-Rad
Reinstwasser-Anlage		Merck
Saftpresse	BP 12	DEMA Vertriebs GmbH, Deutschland
Schüttler	Ecotron INFORS HT-Schüttler	INFORS AG, CH-4103 Bottmingen
Schüttler	Orbitron, Infors HAT	INFORS AG, CH-4103 Bottmingen
Sterilbank	S2020 1.8; 1/PE AC	Thermo SCIENTIFIC
Sterilbank	KS 18 1/PE AC	Thermo SCIENTIFIC
Thermomix		Vorwerk Deutschland Stiftung & Co. KG, Deutschland
Thermomix-Heizblock	F2.0	Eppendorf
Thermoschüttler	MKR 23	HLC

Gerät	Modell	Hersteller
Titratoren	TitrationLine 5000®	SI Analytics®, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG
Ultraschallbad		Omnilab
Vakuumpumpe	RZ 6	VACUUBRANDTM
Vollautomatische Säurehydrolyse	Hydrotherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Vortex-Genie® 2 Mischer		Scientific Industries SI™
Vortex Schüttler	Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS Consult GmbH & Co.KG
Wärmeschrank	Heraeus T 6	Kendro Langensfeld
Wasserbad	WB 20 mT	P-D Industriegesellschaft mbH Prüfgerätekwerk Dresden
Wasserdampfdestillation	Vapodest 450	C. Gerhardt GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Zentrifuge	3-16 KL	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Zentrifuge	Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH

2.3 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Im Rahmen der Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Ausführung	Hersteller
1,5-mL-Kurzgewindeflasche ND 9	Braunglas	Labsolute®, Th. Geyer
1,5-mL-Kurzgewindeflaschen ND 9	Klarglas	LLG Labware
2,0-mL-Reaktionsgefäße	unsteril, DNase- und RNase-frei	Labsolute®, Th. Geyer
2,0-mL-SafeSeal Reaktionsgefäße		Sarstedt AG & Co. KG
15-mL-Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes	Greiner Bio-One
20-mL-Feingewindeflaschen ND 18	Klarglas	Labsolute®, Th. Geyer
50-mL-Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes	Greiner Bio-One
DNeasy® Plant Pro Kit		Qiagen
Faltenfilter Hydrotherm	Durchmesser 240 mm	C. Gerhardt
Feingewindeschraubkappe ND 18	Septum Silikon / PTFE	Labsolute®, Th. Geyer
Filter Fibretherm	FibreBag S	C. Gerhardt
Filterpapier	MN 612, 90 mm Durchmesser	Machery-Nagel GmbH + Co. KG
Folien PCR Platten	selbstklebend, -40 bis 110 °C	Brand GmbH & Co. KG
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini Kit		Machery-Nagel
Parafilm	M	Ancor Flexibles North America

Bezeichnung	Ausführung	Hersteller
Pasteurpipetten	Kalk-Soda-Glas (ISO 7712)	Labsolute ® , Th. Geyer
PCR-Platten, 96 well	weiß, halb. Rahmen, Low Profile	Brand GmbH & Co. KG
Petrischalen	94x16 mm, steril	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	10 mL	Brand GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 0,1-10 µL		Brand GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Sapphire	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 20-200 µL		Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen 2-20 µL		Sarstedt AG & Co. KG
PP Kurzgewindekappe	blau, Rubber/FEP	LLG Labware
PP Kurzgewindekappe	blau, PTFE virginal	LLG Labware
Saccharose/D-Glucose/D-Fructose UV-Test Kit	22 enzymatische Bestimmungen	R-Biopharm AG, Boehringer Mannheim
Spritzen	Inkjet, 2 mL und 5 mL	B. Braun Melsungen AG
Spritzenfilter	25 mm, nicht steril, 0.45 Nylon	Labsolute ® , Th. Geyer
Wägeschiffchen Kjeldahl	MN 808 Format: 58x10	Machery-Nagel GmbH + Co. KG

2.4 Pilz-Kultivierung

2.4.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte je nach Stamm auf Malzextrakt-Agar oder Malzextrakt-Pepton-Agar. Die Zusammensetzungen der Nährböden sind nachfolgend in Tabelle 4 dargestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien zur Stammhaltung

	Malzextrakt-Agar (MEA) $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$	Malzextrakt-Pepton-Agar (MEPA) $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$
Malzextrakt	20	30
Sojapepton	-	3
Agar	15	15

2.4.2 Vorkultur

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte in Malzextrakt-Medium. Dazu wurden sterile 250-mL-Schüttelkolben mit 100 mL Malzextrakt-Medium ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) verwendet.

Ein 1 cm^2 großes bewachsenes Agarstück wurde mit einer sterilen Impföse ausgeschnitten und in den Schüttelkolben überführt. Das Agarstück wurde in Malzextrakt-Medium mittels Ultra-Turrax-Stab für 30 s bei 10.000 rpm homogenisiert.

Die Inkubation erfolgte bei 150 rpm und 24 °C unter Lichtausschluss für 6-7 Tage.

2.4.3 Hauptkultur

Die Hauptkulturen wurden in 1 L- oder 250 mL-Enghals-Erlenmeyer-Kolben angesetzt.

Dazu wurde das Substrat/Nährmedium zunächst in den Schüttelkolben eingewogen und mittels Messzylinder mit der entsprechenden Menge Wasser versetzt.

Nach dem Autoklavieren wurden die Schüttelkolben mit Vorkulturen inokuliert. Die Vorkulturen wurden dafür mittels Ultra-Turrax für 30 s bei 10.000 rpm homogenisiert und anschließend die erforderliche Menge mittels Kolbenhub-Pipette entnommen und in den Hauptkultur-Ansatz überführt. Die Inkubation erfolgte bei 150 rpm unter Lichtausschluss bei 24 °C. Die Ernte der Kulturen erfolgte durch Zentrifugieren bei 3500 x g für 10 min.

2.4.4 Bioreaktor-Kultivierung

2.4.4.1 5-Liter Bioreaktor

Für die Kultivierung im Bioreaktor wurde das Modell „RALF MO basic“ der Firma Bioengineering mit einem Gesamtvolumen von 5 Litern verwendet. Die technischen Angaben und Kultivierungsparameter sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Technische Angaben und Parameter zur Kultivierung im 5-Liter-Bioreaktor

Hard- und Software	
Bioreaktor	RALF MO basic 5 Liter
Software	BioSCADA (Bioengineering)
Rührwerk	Welle mit zwei Rushton Impellern
Sparger	Ring-Sparger/ poröser Sparger der Firma BioThrust
Parameter	Wert
Begasung	Umgebungsluft Begasungsrate: 0,5-1 vvm
Gesamtvolumen	5 Liter
Kulturvolumen	3 Liter
Inokulationsvolumen	10-40% des Kulturvolumens
pH-Wert	6,0 (± 0,5), automatische Regulation mittels 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl
Rührerdrehzahl	variabel, zwischen 150-800 rpm
Temperaturregulation	mittels Heizmanschette und Kühlfinger
Sensoren	O ₂ -Sensor (Mettler Toledo), pH-Sonde (Mettler Toledo), Temperatur-Sonde, Antischaum-Sonde

Der Bioreaktor wurde mit Medium gefüllt bei 121 °C für 20 min autoklaviert und anschließend mit einer in Malzextrakt angesetzten Vorkultur inokuliert. Die Vorkultur wurde dazu nach Abschnitt 2.4.2 hergestellt und 30 s bei 10.000 rpm mittels Turrax-Stab homogenisiert. Die Zugabe der Vorkultur erfolgte steril.

Um der Schaumbildung während des Prozesses entgegenzuwirken, wurde Antischaum-Mittel eingesetzt, welches mittels Schlauchpumpe teilweise automatisch und teilweise manuell zugegeben wurde. Als Antischaummittel wurde Struktol® SB 420 verwendet, welches unter E 471 als Lebensmittelzusatzstoff gelistet ist und aus einer Kombination pflanzlicher Mono- und Diglyceride besteht. Die Ernte der Biomasse erfolgte nach 6 bis 7-tägiger Kultivierung über ein Passiertuch.

2.4.4.2 30-Liter-Bioreaktor

Für die Kultivierung im größeren Maßstab wurde das Modell „NLF MO“ der Firma Bioengineering mit einem Gesamtvolumen von 30 Litern verwendet. Die technischen Angaben sowie Kultivierungsparameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Technische Angaben und Parameter zur Kultivierung im 30-Liter-Bioreaktor

Hard- und Software	
Bioreaktor	NLF MO 30 Liter
Software	BioSCADA (Bioengineering)
Rührwerk	Welle mit zwei Rushton Impellern
Sparger	Ring-Sparger
Parameter	Wert
Begasung	Umgebungsluft Begasungsrate: 0,5-1 vvm
Gesamtvolumen	30 Liter
Kulturvolumen	20 Liter
Inokulationsvolumen	10% des Kulturvolumens
pH-Wert	6,0 (\pm 0,5), automatische Regulation mittels 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl
Rührerdrehzahl	variabel, zwischen 100-400 rpm
Temperaturregulation	mittels Kühlwasser/Wasserdampf über Reaktor- Doppelmantel
Sensoren	O ₂ -Sensor (Mettler Toledo), pH-Sonde (Mettler Toledo), Temperatur-Sonde, Antischaum-Sonde

Die Sterilisation des Bioreaktors erfolgte nach der Medienzugabe mittels Wasserdampf über den Doppelmantel des Bioreaktors. Die Temperatur wurde nach dem Aufheizen bei 121 °C für 20 min gehalten und der Reaktor anschließend mit Kühlwasser gekühlt.

Für die Inokulation wurden fünf Vorkulturen mit je 400 mL Volumen verwendet. Die Kulturen wurden nach 2.4.2 hergestellt und vor der Inokulation bei 10.000 rpm für 30 s mittels Turrax-Stab homogenisiert. Die Zugabe der Vorkulturen erfolgte steril mittels Schlauchpumpe. Als Antischaum-Mittel wurde Struktol® SB 420 verwendet. Hier wurden bereits vor der Sterilisation 10 mL zugegeben, um ein Übersäumen während des Sterilisationsprozesses zu vermeiden. Die Ernte der Biomasse erfolgte nach 6-7-tägiger Kultivierung mithilfe einer Saftpresse und einem feinporigem Presstuch.

2.5 Substrate Rübenschnitzel und Melasse

2.5.1 Screening

2.5.1.1 Auswahl der Pilze

Für das Screening in Oberflächenkultur auf den Substraten Rübenschnitzel und Melasse wurden 57 Pilze aus der Stammsammlung ausgewählt, wovon 56 Pilze der Abteilung der Basidiomycota zuzuordnen sind. Die ausgewählten Spezies sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Für das Screening in Oberflächenkultur auf den Substraten Rübenschnitzel und Melasse ausgewählte Pilzspezies

Nummer Stammsammlung	Abkürzung	Lateinischer Name	Bezugsquelle
3	IBE	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	CBS
4	MSC	<i>Mycetinis scorodonius</i>	CBS
5	PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ
7	TVE	<i>Trametes versicolor</i>	DSMZ
9	WCO-C	<i>Wolfiporia cocos</i>	CBS
10	PFL	<i>Pleurotus floridanus</i>	Universität Göttingen
13	POS	<i>Pleurotus ostreatus</i>	DSMZ
16	LED	<i>Lentinula edodes</i>	CBS
22	WCO-N	<i>Wolfiporia cocos</i>	NZYME
24	LSU	<i>Laetiporus sulphureus</i>	DSMZ
31	PYS	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	DSMZ
35	CXA	<i>Coprinellus xanthothrix</i>	DSMZ
37	LSQ	<i>Lentinus squarrosulus</i>	DSMZ
38	PEO	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	DSMZ
39	LSQU	<i>Lentinus crinitus</i>	DSMZ
41	CER	<i>Coprinus comatus</i>	DSMZ
42	HEL	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	DSMZ
43	PSER	<i>Panellus serotinus</i>	DSMZ
52	HAU	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	DSMZ
56	GEA	<i>Gymnopilus earlei</i>	DSMZ
60	KUM	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	DSMZ
67	FHE	<i>Fistulina hepatica</i>	DSMZ
86	SVA	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	DSMZ
87	ABU	<i>Armillaria bulbosa</i>	DSMZ
88	DTA	<i>Desarmillaria tabescens</i>	DSMZ
100	PER	<i>Pleurotus eryngii</i>	DSMZ
103	HER	<i>Hericium erinaceus</i>	IMD
113	PNA	<i>Pholiota nameko</i>	DSMZ
114	PCI	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	DSMZ
115	PFLA	<i>Pleurotus flabellatus</i>	DSMZ
135	POSQ	<i>Polyporus squamosus</i>	CBS
160	FVE-D	<i>Flammulina velutipes</i>	DSMZ

Nummer Stammsammlung	Abkürzung	Lateinischer Name	Bezugsquelle
161	HTE	<i>Hypsizyugus marmoreus</i>	DSMZ
164	AARV	<i>Agaricus arvensis</i>	CBS
165	MGI	<i>Meripilus giganteus</i>	DSMZ
166	AAE	<i>Agrocybe aegerita</i>	Fa. Sylvan
167	FFO	<i>Fomes fomentarius</i>	FAM
177	PSS	<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	Universität Göttingen
183	LPR	<i>Macrolepiota procera</i>	Universität Göttingen
201	PBE	<i>Piptoporus betulinus</i>	FAM
202	MPR	<i>Macrolepiota procera</i>	FAM
211	TOCH-F	<i>Trametes ochracea</i>	FAM
222	LPY	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	FAM
233	TVE-FP	<i>Trametes ochracea</i>	Bergwerkswald, Gießen
240	MAL-FP	<i>Mortierella alpina*</i>	Europastraße, Gießen
252	SCR-FP	<i>Sparassis crispa</i>	Reiskirchen
264	M 5012	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	unbekannt
289	HRA-FP	<i>Hymenopellis radicata</i>	Bergwerkswald, Gießen
301	IGI-FP	<i>Clitocybe gibba</i>	unbekannt
342	SES-FP	<i>Strobilurus esculentus</i>	unbekannt
345	SRU	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	unbekannt
436	PPU	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	CBS
445	MEX	<i>Macrolepiota excoriata</i>	CBS
451	ABI	<i>Agaricus bitorquis</i>	DSMZ
485	PDR	<i>Pleurotus dryinus</i>	DSMZ
491	GLU	<i>Ganoderma lucidum</i>	DSMZ
498	LPER	<i>Laetiporus persicinus</i>	CBS

*kein Basidiomycet

2.5.1.2 Medienzusammensetzung

Für das Screening in Oberflächenkultur wurden die Rübenschnitzel zunächst mittels Schwingmühle auf eine Partikelgröße < 1 mm zerkleinert und anschließend für die Herstellung des Nähragars verwendet. Die verwendeten Medienzusammensetzungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Medienzusammensetzungen für das Screening in Oberflächenkultur auf den Substraten Rübenschnitzel und Melasse

	Melasse $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$	Rübenschnitzel $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$	Agar $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$
Medium 1	7,5	15	20
Medium 2	-	20	20

Das Medium wurde autoklaviert und auf etwa 45-50 °C abgekühlt, bevor die Petrischalen gegossen wurden, um eine homogene Verteilung der Rübenschnitzel im Nährboden zu gewährleisten. Pro Petrischale wurden etwa 25-30 mL Medium verwendet.

Die Agar-Platten wurden mit einem bewachsenen Mycel-Stück (\varnothing 0,5 cm) inokuliert und bei 24 °C unter Lichtausschluss inkubiert.

Das Wachstum wurde über 7-10 Tage alle 2-3 Tage anhand des Mycel-Durchmessers gemessen und der Geruch der Kultur beurteilt. Spezies, die bis zu Tag 10 wenig bis kaum Wachstum zeigten, wurden bis Tag 14 kultiviert, um einen sensorischen Eindruck erlangen zu können.

Für das anschließende Screening in Flüssigkultur wurde die Medienzusammensetzung aus Tabelle 8 verwendet und auf die Zugabe des Agars verzichtet. Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben.

2.5.2 Optimierung der Kultivierung

2.5.2.1 Optimierung der Medien-Zusammensetzung

Für die Optimierung der Medienzusammensetzung wurden die Gehalte an Rübenschnitzeln und Melasse im Kulturmedium variiert. Die getesteten Zusammensetzungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Vor der Kultivierung wurden alle Medien auf pH 6 eingestellt.

Tabelle 9: Medienzusammensetzungen für die Optimierung der Kultivierung in den Substraten Rübenschnitzel und Melasse

	Melasse $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$	Rübenschnitzel $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$
Medium 1	15,0	10,0
Medium 2	11,0	12,5
Medium 3	7,5	15,0
Medium 4	0,0	20,0

Die Kultivierung erfolgte wie in 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben in 250-mL-Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 100 mL für 10 Tage. Das Mycel wurde anschließend nach 2.8.1.1 lyophilisiert und nach 2.8.2 auf den Proteingehalt analysiert.

2.5.2.2 Optimierung des Mahlgrades der Rübenschnitzel

Für die Optimierung des Mahlgrades wurden Rübenschnitzel-Pellets zunächst mittels Thermomix® auf Stufe 10 zerkleinert, bis keine größeren Stücke mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die gemahlene Rübenschnitzel mittels Siebsystem in verschiedene Mahlgrade aufgeteilt. Hier wurden die Mahlgrade 0,5 mm, 1 mm und 2 mm ausgewählt.

Für die Kultivierung wurde wie unter 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben vorgegangen. Die Kultivierung erfolgte im 100 mL-Maßstab mit 15 g Rübenschnitzeln und 7,5 g Melasse pro Liter für 6 Tage.

Das mittels Zentrifugation geerntete Mycel wurde anschließend nach 2.8.1.1 lyophilisiert und nach 2.7.1 auf den Ergosterolgehalt analysiert.

2.5.2.3 Optimierung der Kultivierungsparameter pH-Wert und Temperatur

Zur Optimierung der Kultivierungsparameter pH-Wert und Temperatur wurden zunächst Vorkulturen nach 2.4.2 hergestellt.

Die Vorkulturen wurden zum Inokulieren der Hauptkulturen verwendet. Die Kultivierung erfolgte im 100 mL-Maßstab mit 15 g Rübenschnitzeln und 7,5 g Melasse pro Liter für 8 Tage.

Für die Optimierung des pH-Wertes wurden die Hauptkultur-Ansätze vor dem Autoklavieren auf die pH-Werte 5, 6, 7 und 8 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 24 °C und 150 rpm.

Für die Optimierung der Kultivierungstemperatur wurden die Hauptkulturen bei 18 °C, 24 °C und 30 °C und 150 rpm kultiviert. Der pH-Wert wurde hier nicht eingestellt.

Das mittels Zentrifugation geerntete Mycel wurde anschließend nach 2.8.1.1 lyophilisiert, nach 2.8.2 auf den Proteingehalt und nach 2.7.1 auf den Ergosterolgehalt analysiert.

2.5.2.4 Supplementierung mit Hefe und Hefeextrakt

Der Proteingehalt sowie die Feuchte von Bierhefe und Hefeextrakt wurden nach 2.8.1.1 und 2.8.2 bestimmt.

Für die Kultivierung wurde eine Vorkultur nach 2.4.2 hergestellt. Nach 6-tägiger Kultivierung wurden daraus nach 2.4.3 die Hauptkulturen im 100 mL-Maßstab inokuliert. Die Hauptkulturen enthielten neben 15 g Rübenschnitzeln und 7,5 g Melasse pro Liter die in Tabelle 10 dargestellten Substrate. Außerdem wurden ein Medien-Blindwert sowie ein Kultur-Blindwert gemessen. Für den Medien-Blindwert wurden die Hauptkulturkolben vorbereitet, autoklaviert und inkubiert, jedoch nicht mit Pilz inokuliert. Für den Kultur-Blindwert wurden weder Hefe noch Hefeextrakt zugesetzt.

Tabelle 10: Eingesetzte Mengen an Hefeextrakt und Bierhefe für die Supplementierung der Kulturen

	Hefeextrakt $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$	Bierhefe $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$
Medium 1	5,0	-
Medium 2	-	10,0

Die Bierhefe wurde von der Erzquell Brauerei in Siegen zur Verfügung gestellt und direkt aus dem Braukessel entnommen. Die Bierhefe wurde vor der Verwendung bei 3500 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Hefe für die Supplementierung verwendet.

Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm für 8 Tage. Das mittels Zentrifugation geerntete Mycel wurde anschließend nach 2.8.1.1 lyophilisiert, nach 2.8.2 auf den Proteingehalt und nach 2.7.1 auf den Ergosterolgehalt analysiert.

2.5.2.5 Optimierung des Inokulationsvolumens und der Medienkonzentration

Für die Optimierung des Inokulationsvolumen sowie der Medienkonzentration wurden zunächst Vorkulturen nach 2.4.2 hergestellt. Die Vorkulturen wurden zur Inokulation der Hauptkulturen nach 2.4.3 verwendet. Für die Anpassung des Inokulationsvolumen wurden 5%, 10% und 20% des Kulturvolumens verwendet. Für die Optimierung der Medienkonzentration wurde das Verhältnis von Rübenschnitzeln zu Melasse beibehalten und die Mengen jeweils verdoppelt, verdreifacht und vervierfacht. Entsprechend der Medienkonzentration wurde auch das Inokulationsvolumen erhöht. Zum Vergleich wurde auch jeweils das Inokulationsvolumen von 10 mL pro 100 mL Kulturvolumen mitgeführt. Die Medienzusammensetzung sowie die angepassten Inokulationsvolumina sind in Tabelle 11 beschrieben.

Tabelle 11: Medienzusammensetzungen und Inokulationsvolumina der Ansätze zur Anpassung des Inokulationsvolumens und zur Optimierung der Medienkonzentration

Ansatz	Rübenschnitzel [g/L]	Melasse [g/L]	Wasser [mL pro Ansatz]	Inokulationsvolumen [mL]
1	15,0	7,5	105	5
2	15,0	7,5	90	20
3	15,0	7,5	100	10
4	30,0	15,0	90	20
5	45,0	22,5	80	30
6	60,0	30,0	70	40

Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm für 7 Tage. Das mittels Zentrifugation geerntete Mycel wurde anschließend nach 2.8.1.1 lyophilisiert und nach 2.7.1 auf den Ergosterolgehalt analysiert.

2.5.2.6 Analyse des Wachstums

2.5.2.6.1 Wachstum der Vorkultur in Malzextrakt

Zur Aufnahme einer Wachstumskurve wurden Vorkultur-Kolben mit je 100 mL 2%-igem Malzextrakt-Medium vorbereitet. Jeder Ansatz wurde mit einem 0,5 cm² großen, bewachsenen Agar-Stück inokuliert. Das Agarstück wurde mittels Ultra-Turrax-Stab für 30 s bei 10.000 rpm im Malzextrakt-Medium homogenisiert. Die Inkubation erfolgte bei 150 rpm und 24 °C unter Lichtausschluss für 13 (*L. squarrosulus*) bzw. 12 Tage (*D. tabescens*). Jeden Tag, außer für *D. tabescens* an Tag 8 und 9, wurden mittels Zentrifugation zwei Ansätze geerntet und

die Trockenmasse mittels Gefriertrocknung bestimmt. Für *L. squarrosulus* wurde zusätzlich, außer an Tag 8 und 9, der Ergosterolgehalt nach 2.7.1 bestimmt.

2.5.2.6.2 Wachstum der Hauptkultur in Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Zur Aufnahme einer Wachstumskurve wurden je 100 mL Rübenschnitzel-Melasse-Medium (1,5 g Rübenschnitzel und 0,75 g Melasse pro 100 mL) in 250-mL-Erlenmeyerkolben gegeben. Jeder Ansatz wurde mit 10 mL einer nach 2.4.2 vorbereiteten Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte für 10 (*D. tabescens*) bzw. 9 Tage (*L. squarrosulus*) bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Jeden Tag, außer für *D. tabescens* an Tag 2 und 9, wurden durch Zentrifugation zwei Ansätze geerntet. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung analysiert, der Proteingehalt nach 2.8.2 und der Ergosterolgehalt nach 2.7.1 bestimmt.

Für die Wachstumskurve von *L. squarrosulus* wurde zusätzlich der Chitin-Gehalt nach 2.7.2.1 und für die Kulturstage 1, 3, 5, 7 und 9 der DNA-Gehalt mittels qPCR nach 2.7.4.5 ermittelt. Mit Bezug auf die jeweiligen Gehalte in 100%-Mycel wurden daraus die Pilzgehalte zu den jeweiligen Wachstumstagen berechnet.

2.5.3 Produktentwicklung und sensorische Evaluation

Die Produktentwicklung erfolgte durch die Firma Metten Fleischwaren GmbH & Co. KG in Finnentrop. Unter Verwendung von Mycel des Pilzes *Lentinus squarrosulus* und Fleisch wurde eine hybride Bratwurst entwickelt.

Das Hybrid-Produkt wurde von einem Sensorik-Panel (41 Teilnehmende) mit einem konventionellen Produkt („Bratwurst klassisch“) verglichen.

Die sensorische Untersuchung erfolgte als Dreiecksprüfung mit zwei identischen und einer abweichenden Probe. Die Proben wurden hierzu mit dreistelligen Zufallsziffern codiert und gleichmäßig ausgegeben, sodass die Hälfte der Probanden das Hybrid-Produkt doppelt erhielt und die andere Hälfte das konventionelle Produkt.

Für die Auswertung wurden alle Bögen verwendet, bei denen die Zuordnung der Proben (identische Proben – abweichende Probe) korrekt erfolgt ist. Der verwendete Beurteilungsbogen der beschreibenden Prüfung ist dem Anhang (Abbildung XVI) zu entnehmen.

2.6 Substrate Vinasse und silierte Rübenschnitzel

2.6.1 Screening

2.6.1.1 Verwendete Pilze

Für diesen Teil der Arbeit wurden silierte Rübenschnitzel und Vinasse zur Verfügung gestellt. Auch hier wurde für jedes Substrat sowie die Kombination beider Substrate eine geeignete Spezies mithilfe eines Screenings ausgewählt. Aufgrund der Ähnlichkeit der Substrate mit den

zuvor verwendeten getrockneten Rübenschnitzeln und Melasse, wurden für das Screening acht Stämme aus Tabelle 7 ausgewählt.

Die für das Screening in Oberflächenkultur gewählten Pilze sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Basidiomycota für das Screening in Oberflächenkultur auf den Substraten silierte Rübenschnitzel und Vinasse

Nummer Stammsammlung	Abkürzung	lateinischer Name	Bezugsquelle
5	PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ
37	LSQ	<i>Lentinus squarrosulus</i>	DSMZ
52	HAU	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	DSMZ
87	ABU	<i>Armillaria bulbosa</i>	DSMZ
88	DTA	<i>Desarmillaria tabescens</i>	DSMZ
135	POSQ	<i>Polyporus sugamosus</i>	CBS
160	FVE-D	<i>Flammulina velutipes</i>	DSMZ
222	LPY	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	FAM

2.6.1.2 Medienzusammensetzung

Die silierten Rübenschnitzel wurden vor der Verwendung mittels Thermomix® (Stufe 10, 30 s) zerkleinert und anschließend für die Herstellung der Nährmedien verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -18°C.

Für das Screening wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Medienzusammensetzungen gewählt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren gemessen und im Fall von Medium 2 auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt.

Tabelle 13: Medienzusammensetzungen für das Screening in Oberflächenkultur auf den Substraten silierte Rübenschnitzel und Vinasse

	Vinasse $\left[\frac{g}{L}\right]$	Silierte Rübenschnitzel $\left[\frac{g}{L}\right]$	Agar $\left[\frac{g}{L}\right]$	pH-Wert
Medium 1	125	-	15	5,0
Medium 2	-	50	20	5,0 (eingestellt)
Medium 3	40	35	15	4,7
Medium 4	500	-	15	5,0

Für das anschließende Screening in Flüssigkultur wurde die Medienzusammensetzung aus Tabelle 13 verwendet und auf die Zugabe des Agars verzichtet. Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben.

2.6.2 Optimierung der Kultivierung

2.6.2.1 Optimierung der Kultivierungsparameter pH-Wert und Temperatur

Bei Medium 2 wurden die pH-Werte 4, 5, 6 und 7 eingestellt. Um auftretende pH-Abweichungen während des Autoklavierens zu vermeiden, wurden zunächst Blindversuche durchgeführt und der pH-Wert vor und nach dem Autoklavieren gemessen. Für die gewünschten pH-Werte wurde daher vor dem Autoklavieren auf pH 6 (pH 5), pH 7 (pH 6) und pH 11 (pH 7) eingestellt. Zusätzlich wurde mit Kaliumdihydrogenphosphat ($1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) gepuffert. Für Medium 1 wurden nur die pH-Werte 5 und 7 betrachtet. Für pH 7 wurde vor dem Autoklavieren ein pH-Wert von 8 eingestellt.

Die so hergestellten Ansätze wurden mit einer nach 2.4.2 hergestellten Vorkultur inokuliert und für 7 Tage inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm.

Für Medium 3 wurden keine pH-Optimierung durchgeführt, da die pH-Schwankungen nach dem Autoklavieren sehr unterschiedlich waren.

Zur Optimierung der Kultivierungstemperatur wurden die Hauptkulturen in Medium 1, 2 und 3 bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$, $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm kultiviert. Der pH-Wert wurde hier nicht eingestellt.

Die besten Ergebnisse beider Parameter wurden anschließend kombiniert und eine Kultivierung unter optimalen pH- und Temperatur-Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei entsprechenden pH- und Temperaturbedingungen für 7 Tage und 150 rpm.

Das mittels Zentrifugation geerntete Mycel aller Ansätze wurde nach 2.8.1.1 lyophilisiert, nach 2.8.2 auf den Proteingehalt und nach 2.7.1 auf den Ergosterolgehalt analysiert.

2.7 Pilzquantifizierung

2.7.1 Ergosterol-Analytik

Die Ergosterol-Bestimmung erfolgte nach Bickel Haase *et al.* (2024). Diese Methode beruht auf einer flüssig-flüssig-Extraktion mit anschließender Derivatisierung. Die Messung erfolgte mittels GC-FID.

Für die Analyse wurden etwa 200 mg der gemörserten Probe in Pyrex-Röhrchen eingewogen und mit 50 mg Natriumascorbat, 250 μL des internen Standards (7-Dehydrocholesterol in 2-Butanon, $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) und 5 mL methanolischer Natronlauge versetzt. Die Proben wurden gevortext und anschließend für 60 min bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Alle 20 min wurden die Proben gevortext und nach der Inkubation unter Lichtausschluss abgekühlt.

Der Überstand wurde membranfiltriert und in ein Derivatisierungs-Röhrchen überführt. Anschließend wurde dreimal mit je 5 mL Hexan extrahiert. Die Hexanphasen wurden in einem 15 mL Messkolben vereinigt und dieser bis zur Marke mit Hexan aufgefüllt. Mittels Natriumsulfat wurde die organische Phase getrocknet und 6 mL in ein Pyrex-Röhrchen überführt. Das Hexan wurde im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand in 0,5 mL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) und 0,5 mL Tetrahydrofuran (THF)

aufgenommen. Zum Lösen des Rückstands wurden die Proben einige Minuten ins Ultraschallbad gestellt und für die anschließende Silylierung für 2 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden über Nacht im Dunklen inkubiert.

Die Proben wurde in Braunglas-Vials überführt und mittels Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) vermessen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Parameter des GC-FID zur Messung von Ergosterol

Verwendete Soft- und Hardware	
Software	ChemStation Chromatographie-Datensystem (Agilent)
Autosampler/Injektor	Agilent 7683, Automatischer Flüssigprobengeber 10 µL Spritze
Gaschromatograph	7890A GC System (Agilent)
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Säule	DB-5 Säule, 30 m x 0,320 mm ID 0,25 µm
Messparameter	
Trärgas	Wasserstoff 5.0 Flow: 40 mL·min ⁻¹
Laufzeit	27,3 min
Injektionsvolumen	1 µL
Front Inlet	Split-/Splitless-Injektor, Split 1:5 T = 250 °C p = 41,4 kPa Flow 65 mL·min ⁻¹
Säule	p = 41,4 kPa Flow 2 mL·min ⁻¹
Temperaturprofil Säule	Initialtemperatur: 100 °C für 3 min Heizrate I : 30 °C·min ⁻¹ bis 280 °C / 280 °C für 12 min Heizrate II : 30 °C·min ⁻¹ bis 320 °C / 320 °C für 5 min
Detektor	T = 280°C Flow 400 mL·min ⁻¹

Zur Quantifizierung des Ergosterol-Gehaltes wurde eine externe Kalibrierung verwendet.

Diese wurde in 10 mL Messkolben angesetzt. Zunächst wurde jeweils 1 mL des internen Standards (7-Dehydrocholesterol in 2-Butanon, c = 5 mg·mL⁻¹) in jeden Messkolben vorgelegt. Die hinzugegebenen Mengen Ergosterol (Ergosterol in 2-Butanon, c = 2 mg·mL⁻¹) sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Mengen der Ergosterol-Stammlösung für die Kalibrierung

Kalibrierung	K0	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9
Ergosterol-Stammlösung [mL]	0,25	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50

Die Messkolben wurden mit 2-Butanon bis zur Marke aufgefüllt und 1 mL der Lösung in ein Pyrex-Röhrchen übertragen. Das 2-Butanon wurde im Stickstoffstrom abgedampft und der Rückstand in 0,5 mL MSTFA und 0,5 mL THF wieder aufgenommen. Der Rückstand wurde durch Vortexen in Lösung gebracht. Wie bei den Proben erfolgte die Silylierung zunächst für 2 min bei 70 °C und anschließend im Dunklen über Nacht.

Die Berechnung der Ergosterolgehalte erfolgte über die aus der Kalibrierung resultierende Kalibriergerade nach Formel (1) und (2). Eine Kalibriergerade ist beispielhaft im Anhang (Abbildung I) aufgeführt.

$$c_{\text{Ergosterol}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{\left(\frac{A_{\text{Ergosterol}}}{A_{\text{IST}}} \right) - b}{m} \quad (1)$$

Mit:

$A_{\text{Ergosterol}}$ = Peakfläche Ergosterol

A_{IST} = Peakfläche interner Standard

b = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

m = Steigung der Kalibriergerade

$$\text{Ergosterol} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right] = \frac{\left(\frac{c_{\text{Ergosterol}}}{6} * 15 \right)}{m_{\text{Probe}}} * 100 \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \quad (2)$$

Mit:

$c_{\text{Ergosterol}}$ = Konzentration von Ergosterol in der Messlösung in $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$

15 = Umrechnungsfaktor auf Gesamtvolumen der Probe

6 = Umrechnungsfaktor Messlösung

m_{Probe} = Einwaage der Probe in [mg]

2.7.2 Chitin-Analytik

2.7.2.1 Photometrisch Bestimmung

Für die photometrische Analyse des Chitin-Gehaltes wurde eine modifizierte Methode nach Smith und Gilkerson (Smith und Gilkerson, 1979; Vetter und Siller, 1991) verwendet. Die Methode beruht auf der Farbreaktion von 3-Methyl-2-benzthiazolinon-hydrazonhydrochlorid (MBTH) mit N-Acetyl-D-Glucosamin im saurem Milieu.

Für die Analyse wurden 20 mg fein gemahlene Pilzmycel in Pyrexröhrchen eingewogen und 2,5 mL 6 M Salzsäure zugegeben. Die Pyrex-Röhrchen wurden dicht verschlossen und die Proben für 24 h bei 105 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 2 mL 6 M NaOH versetzt und der pH-Wert mit 0,1 M und 1 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Probe wurde in einen

10 mL-Messkolben überführt, mit Wasser aufgefüllt und anschließend durch einen Faltenfilter in ein Headspace-Vial filtriert.

Von dem Filtrat wurden 150 µL entnommen, mit 350 µL Reinstwasser und 500 µL 0,5 M Salzsäure versetzt und für 2 h bei 110 °C erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurden 2 mL NaNO₂ (2,5 %-ig) zugegeben, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nacheinander wurden je 1 mL 12,5%-ige Ammoniumsulfatlösung (5 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur), 1 mL 0,25%-ige MBTH-Lösung (30 min Reaktionszeit bei 37 °C) und 1 mL 0,5%-ige Eisen(III)chlorid-Lösung (5 min Reaktionszeit bei 37 °C) zugegeben.

Die Extinktion der Proben wurde bei 650 nm gemessen.

Für die Blindwerte wurde statt des Filtrates Reinstwasser verwendet und weiter wie mit den Proben verfahren.

Die Kalibrierung wurde mit dem Chitin-Monomer N-Acetyl-D-Glucosamin hergestellt, sodass bei der Probenvorbereitung der Hydrolyse-Schritt entfällt. Dazu wurden 10 mg in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Für die Kalibrierung wurde das in Tabelle 16 aufgeführte Volumen der Stammlösung entnommen und mit der entsprechenden Menge Reinstwasser versetzt. Anschließend wurden jeweils 500 µL 0,5 M Salzsäure zugegeben.

Tabelle 16: Verwendete Konzentrationen von N-Acetyl-D-Glucosamin zur Quantifizierung von Chitin

Kalibrierung	K1	K2	K3	K4	K5
N-Acetyl-D-Glucosamin [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	150	50	25	15	5

Die Berechnung des Chitin-Gehaltes erfolgte über die in Tabelle 16 aufgeführte Kalibrierung und die daraus resultierende Kalibriergerade. Eine Kalibriergerade ist beispielhaft im Anhang (Abbildung II) aufgeführt. Die Berechnung erfolgte nach Formel (3) und (4) aus der Geradengleichung.

$$c_{\text{Chitin}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}) - b}{m} \quad (3)$$

Mit:

E_{Probe} = Extinktion Probe

$E_{\text{Blindwert}}$ = Extinktion Blindwert

b = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

m = Steigung der Kalibriergerade

$$\text{Chitin} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right] = \frac{c_{\text{Chitin}} * F * 10 * 100}{m_{\text{Probe}}} \quad (4)$$

Mit:

c_{Chitin} = Konzentration von Chitin in der Messlösung in $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$

F = Verdünnungsfaktor (F = 6,7 bei 150 μL Probevolumen)

10 = Umrechnungsfaktor auf Gesamtvolumen der Probe

100 = Umrechnungsfaktor $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$

m_{Probe} = Einwaage der Probe in [mg]

2.7.2.2 Teil-automatisierter Aufschluss mittels Fibretherm

Für die teilautomatisierte Methode zur Chitin-Bestimmung wurden die folgenden Geräte verwendet:

- FIBRE THERM (C. Gerhardt)
- TURBOTHERM (C. Gerhardt)
- VACUSOG (C. Gerhardt)
- VAPODEST 450 (C. Gerhardt)

Die Proben wurden vor der Analyse lyophilisiert und mittels Schneidmühle auf 0,5 mm zerkleinert.

Für den automatisierten Aufschluss wurden 0,5-1,5 g der zerkleinerten und homogenisierten Proben in einen FibreBag (Filterbeutel aus Textil, stickstoff-frei, C. Gerhardt) eingewogen und in das Fibretherm-Gerät eingesetzt. In diesem Schritt wurden die Peptidbindungen der Proteine durch alkalische Hydrolyse mit 0,25 M NaOH unter Sieden hydrolysiert und die Aminosäuren anschließend mithilfe der Spüleinrichtung aus der Probe herausgewaschen (Sudwischer *et al.*, 2025).

Der im Filter verbliebene Rückstand wurde nach dem Aufschluss bei 103 °C über Nacht getrocknet und der Stickstoff-Gehalt wie unter Abschnitt 2.8.2 beschrieben, analysiert.

Die Berechnung des Chitin-Gehaltes erfolgte über Formel (5).

$$\text{Chitingehalt [\%]} = \frac{(V_1 - V_0) [\text{mL}] * 0,1 \text{ M} * 203,19 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{m_{\text{Probe}} [\text{g}] * 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}}} * 100 \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} = \frac{(V_1 - V_0) * 0,1 * 20,319}{m_{\text{Probe}} [\text{g}]} \quad (5)$$

Mit:

V_1 = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$) im Hauptversuch in [mL]

V_0 = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$) im Blindversuch in [mL]

0,1 = Konzentration der Maßlösung $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$

203,19 = Molare Masse der N-Acetyl-D-glucosamin-Wiederholungseinheit $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$

m = Probeneinwaage in [g]

Die Wiederfindung des Chitins wurde mittels Krabbenschalen-Chitin als Standard ermittelt, welcher bei jedem Aufschluss im Duplikat mitgeführt wurde. Für den Blindversuch wurde ein leerer FibreBag für die Analyse des Stickstoff-Gehaltes eingesetzt.

Die Geräteparameter des Fibretherms wurden aus der Applikation der Herstellerfirma übernommen und sind in Tabelle 17 aufgeführt (Sudwischer *et al.*, 2023). Die Geräteparameter für Turbotherm, Vacusog, und Vapodest entsprechen denjenigen aus Abschnitt 2.8.2.

Tabelle 17: Verwendete Geräteeinstellungen für den Aufschluss mittels Fibretherm (Sudwischer *et al.*, 2023)

Aufschluss			
Schritt	Parameter	Einstellung	Einheit
1.	<A> Detergens	NaOH	
2.	<A> Dosierung	1.3	Liter
3.	<A> Heizleistung	35-38	%
4.	<A> Zirkulation Dauer	10	s
5.	<A> Zirkulation Pause	20	s
6.	<A> Siedezeit	1 h 00 min	h / min
7.	<A> Absaugen	2 bis 3 min	min / s
8.	<A> Auswaschen	1	Zyklen
9.	 Detergens	H ₂ O	
10.	 Dosierung	1.3	Liter
11.	 Heizleistung	55	%
12.	 Zirkulation Dauer	10	s
13.	 Zirkulation Pause	15	s
14.	 Siedezeit	0 h 05 min	h / min
15.	 Absaugen	2 bis 3 min	min / s
16.	 Auswaschen	0	Zyklen
17.	<C> Detergens	H ₂ O	
18.	<C> Dosierung	1.3	Liter
19.	<C> Heizleistung	55	%
20.	<C> Zirkulation Dauer	10	s
21.	<C> Zirkulation Pause	15	s
22.	<C> Siedezeit	0 h 05 min	h / min
23.	<C> Absaugen	2 bis 3 min	min / s
24.	<C> Auswaschen	0	Zyklen

Auswaschen			
Schritt	Parameter	Einstellung	Einheit
1.	Zugabe Wasser	1.3	Liter
2.	Zirkulation Dauer	9	Sekunden
3.	Zirkulation Pause	4	Sekunden
4.	Absaugen	2 bis 3 min	min / s
5.	Auswaschen Dauer	2 min	min / s
Aufheizen			
Schritt	Parameter	Einstellung	Einheit
1.	Zirkulation Dauer	10	Sekunden
2.	Zirkulation Pause	30	Sekunden
3.	Heizverzögerung nach Start	30	Sekunden
4.	NaOH heizen bis	80 bis 85	°C
5.	NDF / KOH heizen bis	80 bis 85	°C
6.	H ₂ O heizen bis	80 bis 85	°C
7.	NaOH kühlen bis	85	°C
8.	NDF / KOH kühlen bis	85	°C
9.	H ₂ O kühlen bis	85	°C

2.7.3 Vergleich zweier Methoden zur Chitin-Analytik zur Pilzquantifizierung

Die photometrische Methode nach 2.7.2.1 wurde mit der halb-automatisierten Fibretherm-Methode nach 2.7.2.2 verglichen. Dazu wurden Mischungen aus Süßkartoffelpulver sowie lyophilisierten Fruchtkörpern von *P. ostreatus* bzw. lyophilisiertem Mycel von *L. squarrosulus* hergestellt und mit beiden Methoden vermessen. Die Fruchtkörper bzw. das Mycel wurden mittels Schneidmühle auf < 1 mm zerkleinert und anschließend mit dem Süßkartoffel-Pulver bis zur benötigten Konzentration vermischt. Die eingestellten Pilzgehalte betragen jeweils 0%, 20%, 40%, 60%, 80% und 100%.

Die Berechnung der zu erwartenden Chitin-Gehalte bzw. der Pilz-Konzentration erfolgte über den analytisch ermittelten Wert für 100% Mycel bzw. Fruchtkörper.

2.7.4 Etablierung einer qPCR-Methode

Zur Etablierung einer qPCR-Methode wurde zunächst die DNA extrahiert, geeignete Primer ausgewählt und abschließend die qPCR-Methode optimiert.

Die verwendeten Methoden sind nachfolgend beschrieben.

Die zur Überprüfung der DNA-Isolation mittels Qiagen-Kit verwendeten Proben sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Einwaagen für die DNA-Isolierung mittels Qiagen-Kit

Ansatz	Rübenschnitzel-Pulver [mg]	lyophilisiertes Mycel von <i>L. squarrosulus</i> [mg]	lyophilisiertes Mycel von <i>D. tabescens</i> [mg]
1	0	10	0
2	0	5	0
3	5	5	0
4	0	0	10
5	0	0	5
6	5	0	5

Die zur Optimierung der qPCR verwendete Kalibrierreihe ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Einwaagen für die DNA-Isolierung einer Pilz-Konzentrationsreihe mittels Qiagen-Kit

Ansatz	Rübenschnitzel-Pulver [mg]	lyophilisiertes Mycel von <i>L. squarrosulus</i> [mg]	Pilzanteil [%]
1	20	0	0
2	18	2	10
3	16	4	20
4	14	6	30
5	12	8	40
6	10	10	50
7	8	12	60
8	6	14	70
9	4	16	80
10	2	18	90
11	0	20	100

2.7.4.1 DNA-Extraktion

2.7.4.1.1 Hausmethode des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Für die Extraktion der DNA wurde zunächst die Hausmethode des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Universität Gießen verwendet. Die verwendeten Chemikalien und Konzentrationen des Lyse-Puffers sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Konzentrationen der Chemikalien in der Stammlösung und im Lysepuffer für die DNA-Extraktion

Chemikalie	Konzentration im Lysepuffer	Konzentration der Stammlösung
Tris HCl pH 8,0	400 mM	1 M
EDTA pH 8,0	60 mM	200 mM
NaCl	150 mM	1 M
Natriumlaurylsulfat (SDS)	1%	10%
steriles H ₂ O	-	-

Etwa 50 mg lyophilisiertes Mycel wurden in ein 1,5-mL-Eppendorf-Tube eingewogen und mit 1000 µL Lysepuffer versetzt. Anschließend wurde gevortext und weitere 20 min bei 400 rpm unter Schütteln aufgeschlossen. Nach Zugabe von 300 µL Kaliumacetat-Lösung (3 M, pH 4,8)

wurde erneut gevortext und für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2,0-mL-Eppendorf-Tube überführt und mit 1000 µL eiskaltem Isopropanol versetzt. Danach wurde durch Invertieren gemischt und anschließend für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 1000 µL Ethanol hinzu pipettiert und für 1 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Für das Resuspendieren wurden 20 µL Reinstwasser verwendet.

2.7.4.1.2 DNA-Extraktion mittels DNeasy® Plant Pro Kit

Für die DNA-Extraktion des lyophilisierten Mycels wurde neben der Hausmethode das DNeasy® Plant Pro Kit des Herstellers Qiagen verwendet. Die Proben werden hier zunächst mechanisch aufgeschlossen und die freigesetzte DNA anschließend mittels Festphasen-Extraktion gereinigt.

Dazu wurden 10-20 mg des lyophilisierten und gemörserten Mycels in Probenröhrchen mit Metallkugel eingewogen und 500 µL Lysepuffer zugegeben. Die Proben wurden für 10 min bei 65 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend 20 min bei maximaler Geschwindigkeit mittels Vortex aufgeschlossen.

Die übrigen Schritte der Aufarbeitung folgten den Schritten des verwendeten Kits (Qiagen, 2019).

2.7.4.2 PCR

Für die PCR wurde ein Kapa2G-Kit mit Taq-Polymerase verwendet. Für einen 20 µL Ansatz wurde das Pipettierschema aus Tabelle 21 verwendet. Für andere Volumina wurde die Menge entsprechend erhöht bzw. verringert.

Tabelle 21: Verwendete Komponenten und Volumina für die PCR

Komponente	verwendetes Volumen [µL]
KAPA2G Puffer A (5x)	8,00
KAPA dNTP Mix (10 mM)	0,40
KAPA2G Polymerase (5 U·µL ⁻¹)	0,08
Primer rev/ for (10 µM)	je 1,00
ddH ₂ O	9,32
DNA	0,20

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer für PCR und qPCR sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Bezeichnung und Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer-Paare

Name Primer Paar	Name Primer	Sequenz
„ITS“	ITS 4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
	ITS 5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3'
„Gly Hyd“	Gly Hyd F	5'-CCA TGA TGG GTG GAC GTT-3'
	Gly Hyd R	5' CAG CTC GAC GTG CAC TGT-3'
„Amy Hyd“	Amy Hyd R	5'- GCG TCT CCA CAG ATT GAG CA-3'
	Amy Hyd F	5'- CTC TGG TCG TGG AAG AGG ATC T-3'
„Met Amino Pep“	Met Amino Pep F	5'-CGA GAA AGG CCG TGA GCT T-3'
	Met Amino Pep R	5'-CGA TGC CAT GTC CAG TGAA-3'
„ITS kurz“	ITS kurz F	5'-GATG AAT GTT GTC TCC GCA GA-3'
	ITS kurz R	5'-ACG GGA CTT GCT TAG GCT TG-3'

Die PCR wurde mittels PCR-Cycler durchgeführt. Das verwendete Programm ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Verwendetes Temperaturprogramm des PCR-Cyclers

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Funktion
95	180	Denaturierung
95	15	Denaturierung
61	15	Annealing
72	60	Elongation
72	60	Elongation
12	-----	kühlen

} 32 Zyklen

2.7.4.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 0,8%-ige Agarose-Gele verwendet. Dazu wurden 0,56 g Agarose mit 70 mL 0,5 %-igem TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Bei etwa 50 °C wurden 3 µL Rotistain® zugegeben und das Gel in die Vorlage mit entsprechender Anzahl Kämme gegossen.

Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer gelegt und mit isolierter DNA bzw. PCR-Produkt beladen. Um die Proben unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden diese vor dem Beladen mit TriTrack® versetzt. Pro 5 µL Probenvolumen wurde 1 µL des Farbstoffs verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 30-90 min je nach Laufstrecke und Probe (PCR-Produkt, DNA) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels UV-Licht in einem Gel-Dokumentationssystem.

2.7.4.4 Aufreinigung der DNA aus Agarose-Gel

Zum Sequenzieren wurde die DNA vor dem Versenden gereinigt. Dazu wurde die DNA-Bande aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Mini Kit“ der Firma Machery-Nagel gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Vorgaben des Kits.

Dazu wurden die ausgeschnittenen Banden in 2-mL-Eppendorf-Tubes gegeben und 200 μL Puffer pro 100 mg Gel zugegeben. Anschließend wurde das Gel bei 50 °C im Thermoblock geschmolzen. Die Flüssigkeit wurde auf die NucleoSpin-Säule aufgetragen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Elution der DNA erfolgte mit 20 μL Puffer und Zentrifugation bei 11.000 x g für 1 min.

2.7.4.5 qPCR

Die Messung erfolgte mittels qPCR-Cycler (CFX Opus 96). Die qPCR wurde in 96-well-plates (weiß, low profile, BRAND GmbH) mit einem Endvolumen von 20 μL pro Well durchgeführt. Pro Well wurden 1 μL bzw. 5 μL der isolierten DNA und 19 μL bzw. 15 μL MasterMix verwendet. Für die Echtzeit-Detektion wurde ein fertiger MasterMix mit Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green) verwendet und mit den entsprechenden Primern und Wasser versetzt.

Die Konzentrationen der PCR-Komponenten sowie das Temperaturprofil der qPCR wurden im Rahmen der Arbeit optimiert und waren somit variabel. Für die Optimierung wurden die vom Hersteller des verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffs „Power SYBR® Green“ vorgeschlagenen Werte herangezogen (Tabelle 24 und Tabelle 25). In Tabelle 26 und Tabelle 27 sind die optimierten Bedingungen dargestellt.

Die Auswertung erfolgte über die erhaltenen C_T -Werte und eine entsprechende Kalibrierreihe mit bekannten Pilzgehalten.

Tabelle 24: Vom Hersteller vorgeschlagene Konzentrationen der einzelnen MasterMix-Komponenten (Applied Biosystems, 2005)

MasterMix-Komponente	Menge/ Konzentration
Power SYBR® Green	10 μL auf 20 μL Probenvolumen
Reverse Primer	50-900 nM
Forward Primer	50-900 nM
Template DNA	1-100 ng

Tabelle 25: Vom Hersteller vorgeschlagenes Temperaturprofil für die qPCR (Applied Biosystems, 2005)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Enzymaktivierung	95	600
Denaturierung	95	15
Annealing/Elongation	60	60

} 40 Zyklen

Tabelle 26: Optimierte Mengen/Konzentrationen des qPCR-MasterMix'

MasterMix-Komponente	Menge/ Konzentration
Primer rev/ for (10 μM)	je 0,1 μL
Fluorophor (Power SYBR® Green)	10 μL
MilliQ-Wasser	8,8 μL (bei 1 μL Probe) // 4,8 μL (bei 5 μL Probe)

Tabelle 27: Optimiertes Temperaturprofil für die qPCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	95	600
Denaturierung	95	15
Annealing/Elongation	57	60
Elongation	65	5
Schmelzkurve	0,5 °C / Cycle bis 95 °C	

2.8 Analyse der chemischen Zusammensetzung

2.8.1 Bestimmung der Trockenmasse

2.8.1.1 Gefriertrocknung

Die Trockenmasse der Mycelien wurde gravimetrisch bestimmt. Dazu wurde das Mycel vor und nach der Gefriertrocknung ausgewogen.

2.8.1.2 Infrarot-Feuchtwaaage

Zur Bestimmung des Wassergehaltes nahezu trockener Substanzen wurde eine Infrarot-Feuchtwaaage nach Herstellerangaben verwendet.

2.8.1.3 Seesand-Methode

Zur Bestimmung der Trockenmasse der stark zuckerhaltigen Nebenströme wurde die Seesand-Methode nach Matissek *et al.* (2010) verwendet. Hierzu wurde eine Wägeschale mit 10 g Seesand versetzt und bei 103 °C getrocknet und konstant gewogen. Anschließend wurden 2-3 g Probe hinzugegeben und mit dem Seesand verrieben. Die Probe wurde bis zur Massenkonstanz bei 103 °C getrocknet und der Trockenmasse-Gehalt gravimetrisch bestimmt.

2.8.2 Protein-Analytik

Für die Protein-Analytik wurde die Methode nach Kjeldahl (1883) gewählt, die von Matissek *et al.* (2018) nach dem aktuellen Stand der Technik modifiziert wurde.

Für die Analyse von Mycel und Substraten wurden jeweils 150-250 mg der lyophilisierten, homogenisierten Probe in ein Kjeldahl-Aufschluss-Gefäß eingewogen und 2 Katalysator-Tabletten (Titandioxid, Kupfersulfat, Natriumsulfat, Kaliumsulfat) sowie 25 mL konzentrierte Schwefelsäure zugegeben. Der Aufschluss erfolgte mittels automatisiertem Infrarot Aufschlussblock mit Gaswäscher (Turbotherm und Vacusog, C. Gerhardt) nach dem in Tabelle 28 dargestellten Temperaturprogramm. Bei unvollständigem Aufschluss nach Ende des Temperaturprogramms wurde um 30 min bei 75 % verlängert.

Tabelle 28: Temperaturprofil der Turbotherm Aufschlussapparatur zur Bestimmung des Proteingehaltes nach Kjeldahl

Schritt	Dauer [min]	Leistung Aufschlussapparatur [%]
1	5	100
2	5	0
3	5	100
4	5	0
5	5	100
6	5	0
7	150	75

Nach dem Aufschluss wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte eine Wasserdampfdestillation mit automatisierter Destilliereinheit (Vapodest 450, C. Gerhardt) mit den in Tabelle 29 aufgeführten Parametern.

Tabelle 29: Parameter der Wasserdampfdestillations-Apparatur zur Proteinbestimmung

Parameter	Wert
Zugabe H ₂ O	90 mL
Zugabe NaOH	80 mL
Reaktionszeit	0 s
Destillationszeit	240 s
Dampfleistung	100 %
Zugabe H ₃ BO ₃	80 mL
Probenabsaugung	30 s

Die Proben wurden im Anschluss an die Wasserdampf-Destillation automatisiert mit 0,1 M Salzsäure zurück zum Ausgangs-pH-Wert titriert.

Die Berechnung des Proteingehaltes aus dem Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung erfolgte nach Formel (6).

$$\text{Proteingehalt (P)}[\%] = \frac{(a-b) [\text{mL}] * 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 14,007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * F}{E [\text{g}] * 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}}} * 100 \frac{\text{g}}{100 \text{g}} = \frac{(a-b) * 0,1 * 1,4007 * F}{E} \quad (6)$$

Mit:

a = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$) im Hauptversuch in [mL]

b = Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$) im Blindversuch in [mL]

0,1 = Konzentration der Maßlösung $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$

14,007 = Molare Masse von Stickstoff $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$

F = Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Proteingehaltes

E = Probeneinwaage in g

Der Umrechnungsfaktor ergibt sich aus dem durchschnittlichen Stickstoffgehalt des Proteins. Für Lebensmittel wird allgemein ein Faktor von 6,25 verwendet, da durchschnittliche Proteine 16% Stickstoff enthalten. Dieser Wert kann jedoch von Protein zu Protein stark variieren (Jones, 1931).

Für die Berechnung des Rohproteingehaltes der untersuchten Mycelien wurden daher teilweise spezifische Kjeldahl-Faktoren verwendet, die mithilfe der Aminosäureverteilung errechnet wurden. Die Berechnung erfolgte nach Formel (7), (8) und (9).

$$\text{Anteil Stickstoff an molarer Masse der Aminosäure } M_{N[\%]} [\%] = \frac{A_N * 14,007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 100}{M_{AS} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \quad (7)$$

Mit:

A_N = Anzahl an Stickstoff-Atomen in der Aminosäure

M_{AS} = Molare Masse der Aminosäure $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$

$$\text{Kjeldahlfaktor Rohprotein } K_{f \text{ Rohprotein}} = \frac{\sum \frac{M_{N[\%]} * c_{AS}}{100}}{\sum m_{AS \text{ residual}}} \quad (8)$$

Mit:

$M_{N[\%]}$ = Anteil Stickstoff an molarer Masse der Aminosäure

c_{AS} = Konzentration der Aminosäure in der Probe $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}} \right]$

$m_{AS \text{ residual}} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$ = Masse des Aminosäurerestes im Peptid

$$\text{Kjeldahlfaktor Reinprotein } K_{f \text{ Reinprotein}} = \frac{\sum m_{AS \text{ residual}}}{m_{N \text{ (Kjeldahl)}}} \quad (9)$$

Mit:

$m_{AS \text{ residual}} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$ = Masse des Aminosäurerestes im Peptid

$m_{N \text{ (Kjeldahl)}} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$ = Masse des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl

2.8.3 Aminosäure-Analytik

Die Aminosäure-Analytik erfolgte nach dem von Ahlborn *et al.* (2019) beschriebenen Verfahren.

Die Aufarbeitung erfolgte in drei separaten Ansätzen, da die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin sowie die Aminosäure Tryptophan bei der sauren Hydrolyse nicht stabil sind. Die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin wurden

daher erst nach vorangegangenem Oxidationsschritt sauer hydrolysiert. Für Tryptophan wurde eine basische Hydrolyse verwendet.

Die Einwaagen wurden entsprechend des Proteingehaltes angepasst (Tabelle 30).

Tabelle 30: Einwaagen für die Aminosäure-Analytik in Abhängigkeit des Proteingehaltes in der Trockenmasse

Proteingehalt pro 100 g Trockenmasse [g]	Einwaage pro Ansatz [mg]
15-20	40-50
20-30	30-40
30-40	20-30
> 40	20

Gesamtaminosäuren (Total amino acids TAA)

Die Proben wurden in 50 mL Falcon Tubes eingewogen und 2,5 mL Hydrolyse-Mix (6 M Salzsäure mit 1 g Phenol ·L⁻¹) hinzugegeben. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 24 h bei 110 °C inkubiert, wobei die erste Stunde mit angedrehten Deckeln inkubiert wurde. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben im Eisbad abgekühlt.

Nach Zugabe von 1,5 mL einer 7,5 M Natronlauge wurde der pH-Wert auf 2,2 eingestellt. Die Proben wurden quantitativ in einen 20-mL-Messkolben überführt und bis zur Marke mit Citrat-Puffer (c = 0,12 M, pH = 2,2; 11 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 6 g Citronensäure, 14 mL Thiodiglycol, 12 mL HCl 32%, 2 g Phenol ad 1 L) aufgefüllt. Ein Aliquot wurde membranfiltriert und in ein HPLC-Vial überführt.

Cystein und Methionin

Die Proben wurden in 50 mL Falcon Tubes eingewogen und auf Eis mit je 0,5 mL Oxidationslösung (3 % Wasserstoffperoxid in phenolischer Ameisensäure [76%-ig mit 0,05 mol Phenol]) versetzt. Es folgte eine Inkubation im Kühlschrank bei 0-4 °C für 16 h und ein anschließendes Stoppen der Reaktion mit 0,084 g Natriumdisulfit.

Das weitere Vorgehen entsprach dem der Analyse der Gesamtaminosäuren (TAA). Die Messmethode war ebenfalls identisch.

Tryptophan

Die Proben wurden in ein 50 mL Falcon Tubes eingewogen und mit 2,5 mL phenolischer Natronlauge (5 M Natronlauge mit 1 g Phenol ·L⁻¹) versetzt. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 24 h bei 110 °C inkubiert, wobei die erste Stunde mit angedrehten Deckeln inkubiert wurde. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben im Eisbad abgekühlt.

Nach Zugabe von 1 mL 0,5 M Phosphorsäure auf Eis wurde der pH-Wert auf 2,2 eingestellt. Die Proben wurden quantitativ in einen 20-mL-Messkolben überführt und bis zur Marke mit Citrat-Puffer aufgefüllt. Ein Aliquot wurde membranfiltriert und in ein HPLC-Vial überführt.

Die Messung der Proben erfolgte mittels HPLC-DAD mit Nachsäulenderivatisierung (Tabelle 31).

Tabelle 31: Verwendete Geräte und Geräteeinstellungen für die Aminosäure-Analytik

Parameter	Angaben
Software	Chromestar Version 7
Eluenten-System	S 7130 Amino Acid Reagent Organizer
Reaktionsmodul	S 4300 Amino Acid Reaction Module (Thermostat, Pumpe, Detektor)
Gradientenpumpen	S 2100 Solvent Delivery System
Injektor	S 5200 Sample Injektor
HPLC-Säule	SYKAM Cation Separation Column, Model: LCA K13/Na 4,6x175 mm Ammoniakfiltersäule LCA K04/Na
Detektor	UV/VIS Dioden-Array-Detektor; Detektionswellenlänge 570 nm, außer für Prolin (440 nm)
Derivatisierung	Ninhydrin (0,1 M in Methanol) Nachsäulenderivatisierung 130°C Reaktortemperatur Isokratisch mit Flussrate: 0,25 mL·min ⁻¹
Laufzeit	Gesamtaminosäuren/ Cystein und Methionin: 67 min Tryptophan: 30 min
Eluenten	Natriumcitrat-Puffer A-1: 0,12 N, pH 3,45 Natriumcitrat-Puffer B-1: 0,20 N, pH 10,85 Regenerationslösung 20 g·L ⁻¹ NaOH, 0,2 g·L ⁻¹ EDTA Gradient mit Flussrate: 0,45 mL·min ⁻¹ (siehe Tabelle 32 und Tabelle 33)
Waschlösung	25% Ethanol, 25% Isopropanol, 50% Reinstwasser
Injektionsvolumen	100 µL

Die Gradienten-Zusammensetzung, sowie die Säulentemperatur unterschieden sich je nach verwendeter Messmethode und sind nachfolgend für die beiden verwendeten Methoden dargestellt.

Methionin, Cystein und Gesamtaminosäuren

Methionin, Cystein und die TAA wurden mit der gleichen Methode gemessen. Das Gradienten- und Temperaturprofil ist in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: Gradientenprofil, Wert der Reagenzienpumpe und Temperaturprofil des Säulenofens während der Messung der Gesamtaminosäuren sowie Methionin und Cystein

Zeitpunkt [min]	Puffer A [%] (0,12 N, pH 3,45)	Puffer B [%] (0,02 N, pH 10,85)	Regenerationslösung [%]	Säulenofen [°C]	Reagenzienpumpe
0,0	100	0	0	49	Ninhydrin
5,0	100	0	0	49	Ninhydrin
11,0	95	5	0	56	Ninhydrin
13,0	80	20	0	56	Ninhydrin
25,0	70	30	0	56	Ninhydrin
29,0	30	70	0	56	Ninhydrin
31,0	20	80	0	74	Ninhydrin
33,0	10	90	0	74	Ninhydrin
41,0	0	100	0	74	Ninhydrin
48,0	0	100	0	74	Waschlösung
49,0	0	0	100	74	Waschlösung
52,0	100	0	0	74	Waschlösung
55,0	100	0	0	74	Waschlösung
60,0	100	0	0	50	Waschlösung
67,0	100	0	0	50	Waschlösung

Tryptophan

Für die Messung von Tryptophan wurde der in Tabelle 33 dargestellte Eluentengradient verwendet. Die Temperatur des Säulenofens wurde während der gesamten Messung auf 74 °C gehalten.

Tabelle 33: Gradientenprofil und Wert der Reagenzienpumpe während der Messung von Tryptophan

Zeitpunkt [min]	Puffer A [%] (0,12 N, pH 3,45)	Puffer B [%] (0,02 N, pH 10,85)	Regenerationslösung [%]	Reagenzienpumpe
0,0	30	70	0	Ninhydrin
5,0	30	70	0	Ninhydrin
7,0	10	90	0	Ninhydrin
15,0	0	100	0	Ninhydrin
20,1	0	0	100	Ninhydrin
21,0	0	0	100	Waschlösung
23,1	30	70	0	Waschlösung
32,0	30	70	0	Waschlösung

Quantifizierung und Berechnung

Die Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte mithilfe einer externen Kalibrierung. Dafür wurde der erweiterte Hydrolysestandard (Standard H-Ox-Ext.) der Firma Sykam verwendet. In diesem sind alle Aminosäuren des erweiterten Hydrolysat-Programms in einer Konzentration

von $1 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ enthalten, außer Cystin, welches eine Konzentration von $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ aufweist. Kalibriert wurde über fünf Punkte im Bereich von $5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ bis $200 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Für Tryptophan wurde eine einzelne Kalibrierung hergestellt. Dazu wurden $10,2 \text{ mg}$ L-Tryptophan auf 50 mL eingewogen, um eine Konzentration von $1 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ zu erhalten. Kalibriert wurde über fünf Punkte im Bereich von $5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ bis $200 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$. Beispielhafte Chromatogramme der Kalibrierung für TAA und Tryptophan sind im Anhang dargestellt (Abbildung V, Abbildung VI).

Die Berechnung der Konzentration der Aminosäuren in der Messlösung erfolgte aus den entsprechenden Kalibriergeraden und wurde automatisiert durch die Auswertesoftware ChromStar 7 durchgeführt.

Die Berechnung der Konzentration in der Probe erfolgte anschließend nach Formel (10).

$$\text{Aminosäuregehalt} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}} \right] = \frac{c_{\text{AS}} * M_{\text{AS}} * V * 100}{m * 10^9} \quad (10)$$

Mit:

c_{AS} = Konzentration der Aminosäure in der Messlösung $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right]$

M_{AS} = molare Masse der Aminosäure $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$

V = Gesamtvolumen des Hydrolysates (20 mL) $[\text{mL}]$

100 = Umrechnungsfaktor $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$

m = Einwaage der Probe $[\text{g}]$

10^9 = Umrechnungsfaktor (nmol zu mol)

Aus den Ergebnissen der Aminosäure-Analytik wurden der Chemical Score (CS) sowie die Biologische Wertigkeit (BW) berechnet.

Chemical Score (CS)

Bei der Berechnung des Chemical Scores wurden die acht essenziellen Aminosäuren Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin, Methionin und Threonin berücksichtigt. Zusätzlich wurden auch die semi-essenziellen Aminosäuren Tyrosin (Bildung aus Phenylalanin) und Cystein (Bildung aus Methionin) betrachtet. Die Aminosäuren Methionin und Cystein wurden dabei genau wie Phenylalanin und Tyrosin in der Summe berücksichtigt (Bell *et al.*, 1991; Bender, 1960).

Zur Berechnung wurden die Gehalte der Aminosäuren in der Probe einem Referenzprotein gegenübergestellt. Das Referenzprotein wurde durch die *Food and Agriculture Organization of the united nations* (FAO), *world health organization* (WHO) und die *united nations university* (UNU) festgelegt, um den idealen Aminosäurebedarf eines Menschen laut aktuellem Wissensstand zu definieren (A. Harper, 1981).

Das von FAO, WHO und UNU definierte Referenzprotein ist in Tabelle 34 dargestellt und wurde für die Berechnungen in dieser Arbeit verwendet. Die Berechnung erfolgte nach Formel (11).

Tabelle 34: Aminosäuremuster des Referenzproteins von WHO, FAO und UNU (A. Harper, 1981)

Aminosäure	$\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g Protein}} \right]$
Isoleucin	4,0
Leucin	7,0
Lysin	5,5
Methionin + Cystein	3,5
Phenylalanin + Tyrosin	6,0
Threonin	4,0
Tryptophan	1,0
Valin	5,0

$$\text{Chemical Score } \mathbf{CS} = \frac{AS_P}{AS_R} \cdot 100 \quad (11)$$

Mit:

AS_P = Aminosäure in der Probe [%]

AS_R = Aminosäure im Referenzprotein [%]

100 = Umrechnungsfaktor

Biologische Wertigkeit (BW)

Die Biologische Wertigkeit ist ein Maß, um abzuschätzen, welcher Anteil des aufgenommenen Proteins in körpereigenes Protein umgewandelt werden kann. Für die Berechnung wurde die Formel nach Oser (1959) verwendet und auf das Referenzprotein der FAO, WHO und UNU bezogen. Es wurde zunächst der Essential Amino Acid Index (EAA) aus den Chemical Scores der essenziellen Aminosäuren berechnet. Die Berechnung erfolgte nach Formel (12).

$$EAA = \sqrt[8]{CS_{Ile} * CS_{Leu} * CS_{Lys} * CS_{Met+Cys} * CS_{Phe+Tyr} * CS_{Thr} * CS_{Trp} * CS_{Val}} \quad (12)$$

Mit:

CS_x = Chemical Score der jeweiligen Aminosäure

Zur Berechnung der Biologischen Wertigkeit wurde dann Formel (13) verwendet (Oser, 1959).

$$\text{Biologische Wertigkeit } \mathbf{BW} = (1,09 \cdot EAA) - 11,7 \quad (13)$$

Mit:

EAA = Essential Amino Acid Index

2.8.4 Zucker-Analytik (enzymatisch)

Zur Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose wurde das enzymatische Analyse-Kit (Best. Nr. 10 716 260 035) der Firma R-Biopharm verwendet. Für die Analyse wurden 2-3 g der Probe in einen 100 mL-Messkolben eingewogen und mit 60 mL VE-Wasser versetzt. Im Falle von Melasse und Vinasse wurde anschließend für 15 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, für die Analyse der Rübenschnitzel wurde 15 min bei 80 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden jeweils 4 mL Carrez I und Carrez II zugegeben, auf 100 mL mit VE-Wasser aufgefüllt und die Proben über einem Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde für die Analyse verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte nach der Anleitung des Kits. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 340 nm.

Für Vinasse und Pressschnitzelsilage wurden jeweils 1 mL unverdünnte Probelösung eingesetzt. Für Rübenschnitzel wurden 100 µL unverdünnte Probelösung verwendet. Für Melasse wurden 100 µL eingesetzt und zusätzlich 1:10 verdünnt.

Neben den Probelösungen wurde auch ein Leerwert sowie eine Testkontrolle mit D-Glucose mitgeführt.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mithilfe der Extinktionsdifferenzen zu verschiedenen Messzeitpunkten nach dem Gesetz von Lambert-Beer. Zur Berechnung wurde Formel (14) verwendet.

$$\text{Konzentration } c \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad (14)$$

Mit:

V = Testvolumen [mL]

v = Probevolumen [mL]

M = Molmasse der zu bestimmenden Substanz $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH (= 6,3 $\frac{\text{L}}{\text{mmol} \cdot \text{cm}}$ bei 340 nm)

ΔE = Differenz der gemessenen Extinktionen

2.8.5 Gesamtfett-Analytik nach Weibull-Stoldt

Bei der Methode nach Weibull-Stoldt wurde die Probe im ersten Schritt (Hydrotherm) mit Salzsäure aufgeschlossen und das Fett mittels Filtration abgetrennt. Im zweiten Schritt (Soxtherm) wurde das enthaltene Fett mit Petrolether extrahiert und anschließend der Fettgehalt gravimetrisch bestimmt (Stoldt, 1951). Sowohl Aufschluss als auch Extraktion erfolgten automatisiert mithilfe der Analysegeräte Hydrotherm und Soxtherm der Firma C. Gerhardt.

2.8.5.1 Aufschluss (Hydrotherm)

Je nach erwartetem Fettgehalt wurden 2-10 g zerkleinerte/homogenisierte Probe eingewogen und in die Hydrotherm-Becher gegeben. Die Becher wurden in die Hydrotherm-Apparatur eingesetzt und die Faltenfilter in die entsprechenden Trichter unterhalb der Becher eingespannt. Die Proben wurden mit dem Futtermittel-Programm aufgeschlossen (Tabelle 35).

Tabelle 35: Verwendete Parameter für den Säureaufschluss mittels Hydrotherm-Apparatur

Parameter/Phase	Wert	Einheit
Füllstände		
Salzsäure (4 M)	100	mL
Wasser	100	mL
Heizphase		
Aufheizphase	12	min
Kochphase I	20	min
Kochphase I	50	%
Kochphase II	30	min
Kochphase II	70	%
Kühlphase	15	min
Filter-Befeuchtung		
Anzahl Zyklen	3	
Volumen pro Zyklus	30	mL

Parameter/Phase	Wert	Einheit
Filtrationsphase		
Wartezeit	5	s
Spülzyklen	16	
Leitungsrohr Öffnungszeit	200	s
Probenspülzeit	10	s
Probenspülung	40	mL
Kühlerspülung	30	mL
Filterspülung	40	mL

Nach dem Ende des Programms wurden die Filter entnommen und in Bechergläsern bei 105 °C für 2 bis 3 h getrocknet.

2.8.5.2 Extraktion (Soxtherm)

Die getrockneten Filter wurden in Cellulose-Extraktionshülsen gegeben und diese mit fettfreier Watte verschlossen. Die Hülsen wurden mit Extraktionsgittern in Soxtherm-Extraktionsbecher eingespannt. Die Extraktionsbecher wurden zuvor mit Siedesteinchen versetzt und konstant gewogen.

Pro Extraktionsbecher wurden 160 mL niedrigsiedender Petrolether (Siedebereich 40-60 °C) zugegeben und die Becher anschließend in die Soxtherm-Apparatur eingesetzt.

Für die Extraktion wurde das in Tabelle 36 dargestellte Programm verwendet.

Tabelle 36: Verwendete Parameter für die Fettextraktion mittels Soxtherm-Apparatur

Parameter	Wert	Einheit
Petrolether 35/65	160	mL
T-Klasse	200	°C
Extraktionstemperatur	150	°C
Absenintervall	4	min
Absenkimpuls	2	s
Kochphase	30	min
Abdestillieren AA	5	Intervalle
Extraktionszeit	90	Min
Abdestillieren AB	8	Intervalle
Abdestillieren AC	5	min
Programmdauer gesamt	177	min

Nach der Extraktion wurde verbliebener Petrolether unter Stickstoffstrom abgedampft und die Extraktionsbecher mit Fettrückstand und Siedesteinchen bei 105 °C getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Der Trockenvorgang wurde wiederholt, bis ein Massenanstieg zu beobachten war. Der Fettgehalt wurde dann nach Formel (15) berechnet.

$$\text{Fettgehalt } F = \frac{m_2 - m_1}{E} * 100 \quad (15)$$

Mit:

F = Fettgehalt [g (100 g)⁻¹]

m₁ = Masse des getrockneten Extraktionsbechers vor der Extraktion [g]

m₂ = Masse des getrockneten Extraktionsbechers nach der Extraktion [g]

E = Probeneinwaage [g]

2.8.6 Fettsäure-Analytik

Die Analyse der Fettsäuren erfolgte nach der Methode von Sukhija und Palmquist (1988), modifiziert nach Palmquist und Jenkins (2003). Die Fettsäuren werden hier im sauren Milieu mithilfe von Methanol in Fettsäure-Methylester umgewandelt.

500-600 mg des gefriergetrockneten Mycels bzw. des trockenen Substrates wurden in Pyrex-Röhrchen eingewogen und mit 2,00 mL internem Standard (Nonadecylsäure mit 2,0 mg/mL in Hexan) und 3 mL 10%-iger methanolischer Salzsäure versetzt. Nach Inkubation für 2 h bei 90 °C wurden 1 mL Hexan und 10 mL 6%-ige Kaliumcarbonat-Lösung hinzugegeben. Für die Extraktion der Fettsäuren wurde mittels Vortex durchmischt und anschließend eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min erzielt. Die Hexan-Phase wurde in ein Headspace-Vial überführt und 1 g Natriumsulfat zum Trocknen hinzugegeben. Zum Entfärben wurde die Probe mit 1 g Aktivkohle versetzt. Zur Abtrennung wurde erneut zentrifugiert und die Probenlösung zur Messung mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Quadrupol-Massenspektrometer (GC-MS/MS) eingesetzt (Tabelle 37).

Tabelle 37: Parameter für die GC-MS/MS-Analyse zur Messung der Fettsäure-Methylester

Verwendete Soft- und Hardware	
Software	Mass-Hunter
Autosampler/Injektor	10 µL Spritze 65 mm
Gaschromatograph	GC-System 7890B Agilent Technologies
Detektor	Massenselektiver Detektor (MSD) Agilent 5977B
Säule	VF-WAXms 0-250 °C, 30 m x 250 µm x 0.25 µm
Messparameter	
Trägergas	Helium
Laufzeit	55 min
Injektionsvolumen	1 µL
Back Inlet	T = 250 °C p = 61,69 kPa Flow 124,2 mL·min ⁻¹
Split	1:100 Flow 120 mL·min ⁻¹

Messparameter	
Temperaturprofil	Initialtemperatur: 40 °C für 3 min Heizrate: 5 °C·min ⁻¹ bis 240 °C / 240 °C für 12 min
Transfer Line	250 °C
Säule	p = 61,69 kPa Flow 1,2 mL·min ⁻¹
Parameter Massenspektrometer	
Aufnahmemodus	Scan (m/z 33-400)
Solvent Delay	4,4 min
MS-Source	230 °C
MS-Quadrupol	150 °C
Ionisierung	70 eV

Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte über die Retentionszeiten mithilfe eines 37-Komponenten-Fettsäure-Standards (Merck KGaA).

Des Weiteren wurden die Fragmentspektren der Analyten mit denen der NIST-Datenbank verglichen und ebenfalls für die Identifizierung herangezogen. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen der Fettsäuren.

2.8.7 Gesamtkohlenhydrat-Analytik

Die Gesamtkohlenhydrate wurden photometrisch mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay (Chaplin und Kennedy, 1994) bestimmt. Bei dieser Methode werden die Kohlenhydrate zunächst im sauren Milieu hydrolysiert und anschließend mit Orcinol zu einer farbigen Verbindung umgesetzt, die photometrisch bei einer Extinktion von 420 nm vermessen wird.

Für die Analyse wurden 10 mg homogenisierte und zerkleinerte Probe in ein 2-mL-Safelock-Tube eingewogen und mit 2 mL 2 M Salzsäure für 2 h bei 100 °C und 700 rpm inkubiert. Die Proben wurden membranfiltriert und in ein Safelock-Tube überführt. Je nach Matrix wurden die Proben 1:50 bis 1:200 mit Reinstwasser verdünnt. 200 µL der verdünnten Probe wurden mit 800 µL eiskaltem Orcinol-Schwefelsäure-Reagenz (2 g Orcinol pro L Schwefelsäure) versetzt und anschließend 15 min bei 80 °C erhitzt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und die Extinktion bei 420 nm gemessen.

Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung verwendet. Dazu wurde eine Glucose-Stammlösung (1 mg·mL⁻¹) angesetzt und entsprechend verdünnt (Tabelle 38).

Tabelle 38: Konzentrationen zur Quantifizierung des Gesamtkohlenhydrat-Gehaltes

Kalibrierung	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Glucose [µg·mL ⁻¹]	200,00	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25

Die Standards wurden wie die Proben behandelt, wobei der Hydrolyse-Schritt entfiel und direkt 200 µL Standard mit 800 µL Orcinol-Reagenz versetzt wurden. Für die Blindwerte wurden 200 µL Reinstwasser eingesetzt.

Die Berechnung der Kohlenhydrat-Gehalte erfolgte über die Kalibrierung aus Tabelle 38 und der daraus resultierenden Kalibriergerade. Eine beispielhafte Kalibriergerade ist im Anhang gezeigt (Abbildung III). Aus der Geradengleichung wurden die Kohlenhydrat-Gehalte nach Formel (16) und (17) berechnet:

$$c_{\text{Kohlenhydrate}} = \frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}) - b}{m} \quad (16)$$

Mit:

E_{Probe} = Extinktion Probe

$E_{\text{Blindwert}}$ = Extinktion Blindwert

B = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

m = Steigung der Kalibriergerade

$$\text{Kohlenhydrate} \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right] = \frac{c_{\text{Kohlenhydrate}} * F * 2}{m_{\text{Probe}} * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}}} * 100 \frac{\text{g}}{100 \text{ g}} = \frac{c_{\text{Kohlenhydrate}} * F * 2}{m_{\text{Probe}} * 10} \quad (17)$$

Mit:

$c_{\text{Kohlenhydrate}}$ = Konzentration Kohlenhydrate in der Messlösung in $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right]$

F = Verdünnungsfaktor ($F = 50$ bei 1:50 verdünnt)

2 = Umrechnungsfaktor auf Gesamtvolumen der Probe (2 mL)

10 = Umrechnungsfaktor

m_{Probe} = Einwaage der Probe in [mg]

2.8.8 Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte gravimetrisch.

1-5 g Probe wurden in zuvor ausgeglühte und konstant gewogene Quarztiegel eingewogen. Die Proben wurden über einem Bunsenbrenner vorverascht, bis kein Rauch mehr aufstieg. Anschließend wurden die Proben im Muffelofen bei 550 °C für 3 h verascht und im Exsikkator abgekühlt. Die Proben wurden ausgewogen und erneut für 1-2 h in den Muffelofen gestellt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben ausgewogen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Masse konstant blieb. Die Berechnung erfolgte nach Formel (18).

$$\text{Asche [\%]} = \frac{(m_2 - m_1)[\text{g}]}{E [\text{g}]} * 100 \frac{\text{g}}{100 \text{g}} \quad (18)$$

Mit:

m_2 = Masse des Tiegels und der Probe nach der Veraschung [g]

m_1 = Masse des leeren Tiegels [g]

E = Einwaage der Probe [g]

2.8.9 Säureunlösliche Asche

Zur Bestimmung der säureunlöslichen Asche wurde die Asche aus 2.8.8 im Quarztiegel mit 20 mL einer 10%igen Salzsäure versetzt. Die Probe wurde mit einem Uhrglas abgedeckt und 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die Probe durch einen aschefreien Rundfilter filtriert und der Rückstand neutral gewaschen.

Der Filter wurde in einem tarierten und ausgeglühten Quarztiegel bei 103 °C getrocknet, der trockene Filter vorverascht und anschließend bei 550 °C im Muffelofen für 30 min geglüht. Nach dem Abkühlen wurde der Gehalt der säureunlöslichen Asche gravimetrisch nach Formel (19) bestimmt.

$$\text{säureunlösliche Asche [\%]} = \frac{(m_2 - m_1)[\text{g}]}{E [\text{g}]} * 100 \frac{\text{g}}{100 \text{g}} \quad (19)$$

Mit:

m_2 = Masse des Tiegels mit säureunlöslichem Rückstand [g]

m_1 = Masse des leeren Tiegels [g]

E = Einwaage der Probe [g]

2.8.10 Harnstoff-Analyse

Zur Analyse des Harnstoff-Gehaltes wurde auf die Methode zur Bestimmung von Harnstoff in Futtermitteln aus Anhang III Teil D der VO (EG) 152/2009 zurückgegriffen (Europäische Kommission, 2009). Das Prinzip der Methode beruht auf der Reaktion von Harnstoff mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd (4-DMAB), wobei ein gelber Farbstoff gebildet wird. Dieser wird photometrisch bei 420 nm vermessen.

Für die Analyse wurden 2 g des gemörserten und getrockneten Mycels in einen 500-mL-Messkolben eingewogen, mit 1 g Aktivkohle versetzt und mit 400 mL VE-Wasser aufgefüllt. Zur Proteinfällung wurden je 5 mL Carrez I und Carrez II zugegeben und anschließend für 30 min die Probe unter Schütteln suspendiert. Anschließend wurde mit VE-Wasser auf 500 mL aufgefüllt und die Lösung filtriert.

Von dem Filtrat wurden 5 mL entnommen und in ein Pyrex-Röhrchen gegeben. Nach Zugabe von 5 mL 4-DMAB-Lösung wurde 15 min bei 20 °C temperiert und anschließend bei 420 nm gemessen.

Für die Kalibrierung wurde eine externe Kalibrierreihe verwendet. Dazu wurde eine 0,1%-ige Harnstofflösung auf Konzentrationen zwischen 0,001% und 0,01% verdünnt und je 5 mL in ein Pyrex-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde wie mit den Proben verfahren. Für den Blindwert wurde Reinstwasser statt Probe oder Standard verwendet.

Die Berechnung des Harnstoff-Gehaltes der Probe erfolgte durch die Kalibriergerade nach Formel (20) und (21). Eine Kalibriergerade ist beispielhaft im Anhang (Abbildung IV) dargestellt.

$$\text{Harnstoffgehalt } H \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{((E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}) - b)}{m} \quad (20)$$

Mit:

E_{Probe} = Extinktion der Probe bei 420 nm

$E_{\text{Blindwert}}$ = Extinktion des Blindwertes bei 420 nm

b = Achsenabschnitt der Kalibriergerade

m = Steigung der Kalibriergerade

$$\text{Harnstoffgehalt } H [\%] = \frac{H \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] * V [\text{mL}]}{\text{EW} [\text{g}] * 10} \quad (21)$$

Mit:

V = Gesamtvolumen = 500 mL

EW = Einwaage der Probe [g]

3 ERGEBNISSE

3.1 Substrate Rübenschnitzel und Melasse

3.1.1 Chemische Zusammensetzung

Um geeignete Kultivierungsmedien aus den Substraten Rübenschnitzel-Pellets und Melasse zusammenzustellen, wurde die chemische Zusammensetzung der Rübenschnitzel-Pellets und von Melasse analysiert (Abbildung 1). Analysiert wurden der Fett-, Protein-, Asche-, Wasser- und Kohlenhydrat-Gehalt, mit den unter 2.8.1, 2.8.2, 2.8.5, 2.8.7 und 2.8.8 aufgeführten Methoden.

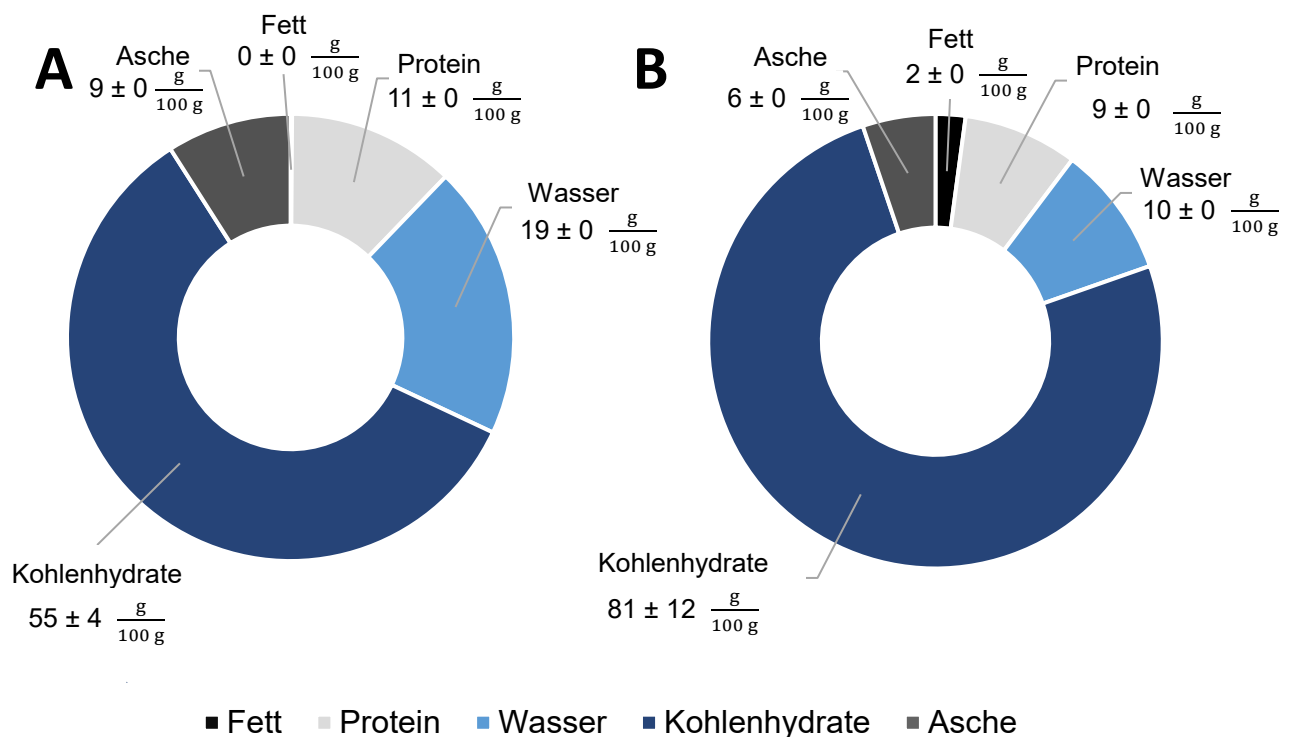


Abbildung 1: Mittelwerte der chemische Zusammensetzung der Substrate **A:** Melasse und **B:** Rübenschnitzel-Pellets
Die Analyse erfolgte nach den unter 2.8.1, 2.8.2, 2.8.5, 2.8.7 und 2.8.8 aufgeführten Methoden.

Für die Medienzusammenstellung wurde vor allem der Kohlenhydratgehalt betrachtet, wobei der in vorherigen Arbeiten etablierte Kohlenhydrat-Gehalt von ca. 15 g·L⁻¹ als Orientierung herangezogen wurde. Aus den analysierten Gehalten (Abbildung 1) ergaben sich die beiden nachfolgenden Medienzusammensetzungen für das Screening in Oberflächen- und Flüssigkultur:

Medium 1: 20 g Rübenschnitzel-Pellets pro Liter Medium

Medium 2: 15 g Rübenschnitzel-Pellets + 7,5 g Melasse pro Liter Medium

Zusätzlich zum Gesamtkohlenhydratgehalt wurden die Monosaccharide D-Glucose, D-Fructose sowie Saccharose in den Substraten nach 2.8.4 enzymatisch analysiert (Tabelle 39).

Tabelle 39: Nach Abschnitt 2.8.4 enzymatisch ermittelte Gehalte an D-Glucose, D-Fructose und Saccharose in den Substraten pelletierte Rübenschnitzel und Melasse, n=2

	Melasse	Rübenschnitzel-Pellets
Glucose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	0,00 ± 0,00	0,54 ± 0,02
Fructose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	0,01 ± 0,00	0,78 ± 0,02
Saccharose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	49,5 ± 0,1	10,5 ± 0,1

Zur Beurteilung der Proteinqualität der Substrate wurde auch das Aminosäure-Profil nach 2.8.3 analysiert (Abbildung 2).

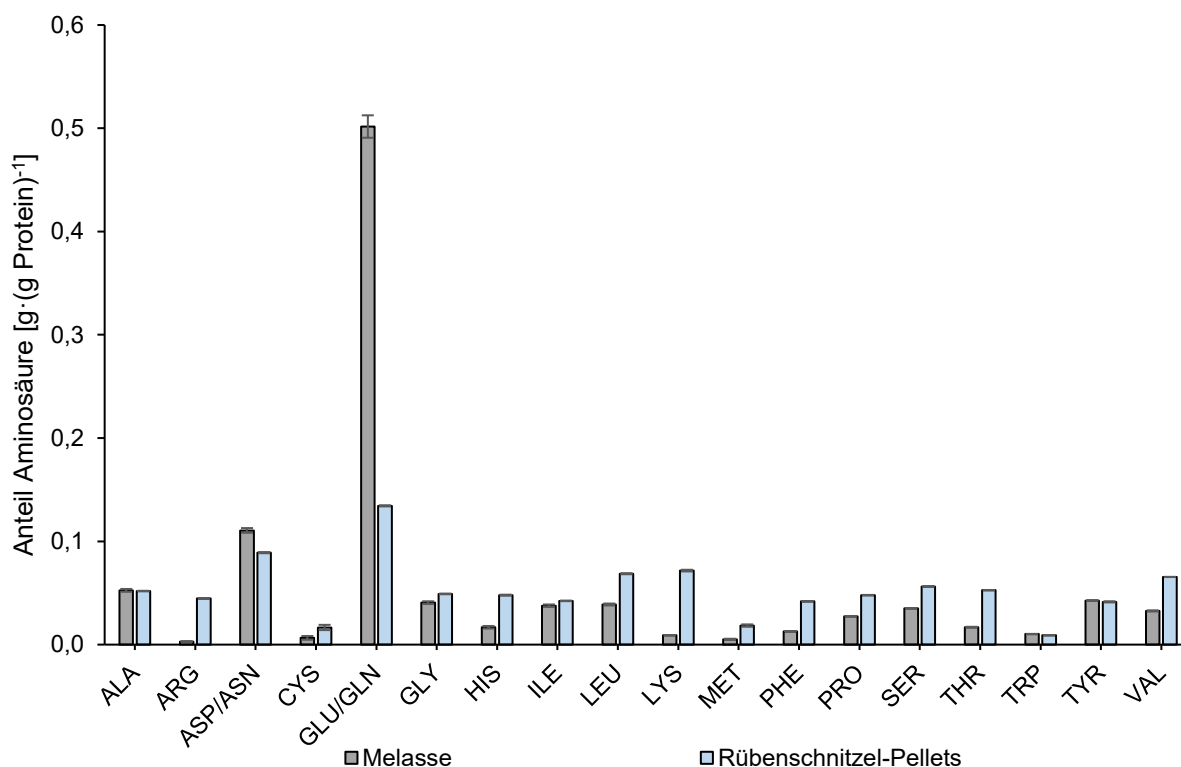


Abbildung 2: Aminosäure-Profil von Rübenschnitzel-Pellets sowie Melasse

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in drei getrennten Ansätzen nach 2.8.3, die Messung erfolgte mittels HPLC-DAD mit Nachsäulenderivatisierung, n=2.

Die limitierenden Aminosäuren für Melasse waren Lysin mit einem Chemical Score von 16 ± 1 und Methionin/Cystein mit einem Chemical Score von 33 ± 3 . Als biologische Wertigkeit ergab sich nach Formel (13) 47 ± 1 . Für das Substrat Rübenschnitzel betrug die biologische Wertigkeit 96 ± 1 . Die limitierenden Aminosäuren waren Tryptophan mit 95 ± 1 und Methionin/Cystein mit 97 ± 8 .

3.1.2 Screening in Oberflächenkultur

Die Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur sind in Tabelle 40 für das Medium Rübenschnitzel und in Tabelle 41 für das Medium Rübenschnitzel und Melasse dargestellt.

Tabelle 40: Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur auf Medium 1: Rübenschnitzel-Pellets (20 g·L⁻¹)

Dargestellt ist der Durchmesser des Mycels an den angegebenen Wachstumstagen in [cm] sowie der Geruchseindruck an Tag 7.

Verwendeter Pilz	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Geruchseindruck
<i>Ischnoderma benzonium</i>	0,8	3,0	6,0	9,0	citrus, grün
<i>Mycetinis scorodonius</i>	0,6	1,0	2,3	4,0	Honig, Zwiebel
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,4	3,4	7,5	9,0	süß, Vanille, Anis
<i>Trametes versicolor</i>	2,0	4,0	7,8	9,0	blumig, citrus
<i>Wolfiporia cocos</i>	2,1	3,3	7,0	9,0	Pilz, muffig, blumig
<i>Pleurotus floridanus</i>	1,5	3,3	7,6	9,0	süß, Vanille, Anis
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,2	3,2	8,0	9,0	krautig, Vanille, Pilz
<i>Lentinula edodes</i>	1,1	2,4	5,0	7,5	blumig, citrus
<i>Wolfiporia cocos</i>	2,1	4,0	7,4	9,0	blumig, muffig
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1,8	3,5	7,5	9,0	blumig, süß, suppig
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	1,2	3,0	6,0	7,4	Lösemittel, süß
<i>Coprinellus xanthothrix</i>	1,4	3,3	6,2	9,0	süß, erdig, Pilz
<i>Lentinus squarrosulus</i>	1,8	3,9	7,1	9,0	Pilz
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1,1	3,5	4,5	9,0	süß, Vanille, Anis
<i>Lentinus crinitus</i>	1,9	3,9	8,0	9,0	krautig, Lösemittel
<i>Coprinus comatus</i>	0,9	2,2	4,0	6,0	Pilz
<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	0,9	1,5	2,7	4,3	neutral
<i>Panellus serotinus</i>	1,2	3,5	6,8	9,0	blumig, Pilz
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0,6	0,6	0,7	1,0	sahnig, Pilz
<i>Gymnopilus earlei</i>	0,5	0,9	1,6	3,0	süß, krautig
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	1,2	2,3	3,6	4,9	blumig, Pilz
<i>Fistulina hepatica</i>	0,5	0,5	1,0	2,0	neutral
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,5	0,7	-*	-*	Plastik
<i>Armillaria bulbosa</i>	0,5	0,5	0,7	1,6	holzig, neutral
<i>Desarmillaria tabescens</i>	0,5	0,5	1,2	1,7	würzig, neutral
<i>Pleurotus eryngii</i>	0,9	2,0	4,0	7,0	Pilz, süß, Vanille
<i>Hericium erinaceus</i>	0,5	0,5	1,2	3,5	neutral
<i>Pholiota nameko</i>	0,9	2,0	4,5	6,0	krautig, frisch
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	1,1	2,5	5,5	9,0	erdig, Vanille, süß
<i>Pleurotus flabellatus</i>	1,3	2,7	5,5	9,0	erdig, krautig
<i>Polyporus squamosus</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	-**
<i>Flammulina velutipes</i>	1,5	3,5	5,7	9,0	blumig, erdig
<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	0,8	1,1	3,0	4,5	Pilz, Vanille
<i>Agaricus arvensis</i>	0,5	0,9	1,5	1,9	Pilz, blumig
<i>Meripilus giganteus</i>	1,0	2,3	5,0	7,4	süß, würzig
<i>Agrocybe aegerita</i>	1,5	2,5	5,0	7,3	süß, blumig
<i>Fomes fomentarius</i>	1,2	2,2	5,0	7,6	stechend, Pilz
<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	1,5	3,8	7,7	9,0	süß, Vanille, Anis
<i>Macrolepiota procera</i>	0,5	1,1	1,7	2,2	Pilz, blumig
<i>Piptoporus betulinus</i>	1,1	1,6	2,9	4,7	blumig, fruchtig
<i>Macrolepiota procera</i>	0,7	1,0	1,2	2,0	muffig
<i>Trametes ochracea</i>	1,8	3,9	7,4	9,0	Muffig, blumig
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	1,0	1,1	1,7	2,2	Marzipan, Pilz
<i>Trametes ochracea</i>	1,3	2,9	6,5	9,0	blumig

Verwendeter Pilz	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Geruchseindruck
<i>Mortierella alpina</i>	1,9	3,7	4,2	-*	Lauch, unangenehm
<i>Sparassis crispa</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	-**
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	0,8	2,0	3,5	5,2	blumig
<i>Hymenopellis radicata</i>	0,7	2,0	4,0	6,6	säuerlich, Pilz
<i>Clitocybe gibba</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	-**
<i>Strobilurus esculentus</i>	0,8	1,2	2,5	3,5	blumig, Gebäck
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	1,1	2,5	4,0	6,0	citrus, krautig
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1,9	3,8	8,0	9,0	blumig, Anis, muffig
<i>Macrolepiota excoriata</i>	0,5	0,7	1,2	1,7	Brot
<i>Agaricus bitorquis</i>	0,5	0,5	0,5	1,2	erdig, citrus
<i>Pleurotus dryinus</i>	0,5	0,5	0,5	1,0	neutral
<i>Ganoderma lucidum</i>	1,3	2,7	5,8	9,0	krautig, Pilz
<i>Laetiporus persicinus</i>	1,4	2,8	5,5	9,0	blumig

-*: keine Messung aufgrund des unangenehmen Geruchs

-**: kein Geruchseindruck feststellbar, starker Medium-Geruch

Viele Pilze hatten die verwendeten Agar-Platten mit einem Durchmesser von 9 cm bereits an Tag 10 vollständig bewachsen (Tabelle 40). Die Pilze *Polyporus squamosus*, *Sparassis crispa* sowie *Clitocybe gibba* zeigten nach 10 Tagen kein Wachstum.

Während die Seitlinge häufig einen süßlichen Geruch nach Vanille und Anis zeigten, waren bei einigen Pilzen auch suppig (*Laetiporus sulphureus*) und würzige (*Armillaria tabescens*, *Meripilus giganteus*) Geruchseindrücke wahrnehmbar. Manche Pilze zeigten einen überwiegend muffigen (*Macrolepiota procera*) oder unangenehmen Geruch (*Mortierella alpina*, *Pycnoporus sanguineus*, *Lycoperdon pyriforme*), sodass diese für das weitere Screening nicht mehr relevant waren.

Tabelle 41: Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur auf Medium 2: Rübenschnitzel-Pellets (15 g·L⁻¹) und Melasse (7,5 g·L⁻¹)

Dargestellt ist der Durchmesser des Mycel an den angegebenen Wachstumstagen in [cm] sowie der Geruchseindruck an Tag 7.

Verwendeter Pilz	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Geruchseindruck
<i>Ischnoderma benzonium</i>	0,8	2,4	5,6	7,3	citrus, grün
<i>Mycetinis scorodonius</i>	0,5	0,7	1,3	2,3	brotig
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,4	3,5	7,8	9,0	Anis, Vanille
<i>Trametes versicolor</i>	1,9	4,0	7,7	9,0	muffig, fruchtig
<i>Wolfiporia cocos</i>	2,1	3,7	5,2	5,5	muffig, blumig
<i>Pleurotus floridanus</i>	1,4	3,6	8,0	9,0	muffig
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,4	3,9	8,0	9,0	süß, blumig, Pilz
<i>Lentinula edodes</i>	1,1	2,5	4,6	7,5	unangenehm süß
<i>Wolfiporia cocos</i>	2,3	3,0	3,5	5,0	blumig
<i>Laetiporus sulphureus</i>	0,7	2,0	6,0	7,0	erdig
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	1,2	3,2	6,1	7,5	blumig, stechend
<i>Coprinellus xanthothrix</i>	1,7	3,6	7,2	9,0	erdig, säuerlich
<i>Lentinus squarrosulus</i>	2,0	4,3	7,8	9,0	Pilz, leicht bitter
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1,2	3,0	5,2	9,0	Vanille, muffig
<i>Lentinus crinitus</i>	2,0	4,4	8,5	9,0	muffig, Lösemittel
<i>Coprinus comatus</i>	1,3	3,1	5,9	9,0	frisch, erdig

Verwendeter Pilz	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Geruchseindruck
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	1,0	1,5	3,2	5,0	würzig
<i>Panellus serotinus</i>	1,1	3,4	6,4	8,0	Vanille
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0,5	0,5	0,8	1,0	rauchig, fettig
<i>Gymnopilus earlei</i>	0,5	0,8	1,7	2,7	erdig, süß
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	1,1	2,3	4,4	5,7	blumig, krautig
<i>Fistulina hepatica</i>	0,5	0,5	0,6	1,0	-**
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,5	0,7	-*	-*	Plastik
<i>Armillaria bulbosa</i>	0,5	0,5	0,5	1,7	holzige, neutral
<i>Desarmillaria tabescens</i>	0,5	0,5	1,2	1,7	brotig, würzig
<i>Pleurotus eryngii</i>	1,0	2,0	4,5	7,6	muffig
<i>Hericium erinaceus</i>	0,5	0,5	1,0	3,0	neutral
<i>Pholiota nameko</i>	0,9	2,4	5,0	7,2	krautig, erdig
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	1,3	3,0	6,0	9,0	Pilz, citrus
<i>Pleurotus flabellatus</i>	1,0	2,7	5,8	9,0	Pilz, muffig
<i>Polyporus squamosus</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	brotig
<i>Flammulina velutipes</i>	1,5	3,0	5,5	9,0	blumig, Pilz
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	0,8	1,2	2,5	3,8	fettig, unangenehm
<i>Agaricus arvensis</i>	0,5	0,6	1,0	1,8	Pilz, neutral
<i>Meripilus giganteus</i>	1,1	2,6	5,5	8,0	würzig, rauchig
<i>Agrocybe aegerita</i>	1,4	2,6	5,0	7,9	blumig
<i>Fomes fomentarius</i>	1,2	2,5	5,0	8,0	blumig, erdig
<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	1,5	4,0	7,8	9,0	Pilz, erdig
<i>Macrolepiota procera</i>	0,5	1,0	1,8	2,6	brotig, würzig
<i>Piptoporus betulinus</i>	1,1	0,9	3,7	6,1	fruchtig, blumig
<i>Macrolepiota procera</i>	0,6	1,0	1,9	2,2	brotig
<i>Trametes ochracea</i>	1,4	3,7	9,0	9,0	Pilz, muffig, krautig
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,9	1,0	1,4	2,2	citrus, Pilz
<i>Trametes ochracea</i>	1,2	3,3	6,8	9,0	blumig
<i>Mortierella alpina</i>	2,2	4,5	5,9	-*	gammlig, erdig
<i>Sparassis crispa</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	-**
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	1,0	1,0	2,5	5,0	blumig, frisch
<i>Hymenopellis radicata</i>	1,1	2,5	4,9	7,0	erdig, Kartoffel
<i>Clitocybe gibba</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	brotig
<i>Strobilurus esculentus</i>	0,8	1,0	1,9	3,0	erdig, Kartoffel
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	1,1	2,3	4,1	5,9	citrus, frisch
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1,7	4,2	9,0	9,0	süß, blumig
<i>Macrolepiota excoriata</i>	0,5	1,1	1,5	1,7	brotig
<i>Agaricus bitorquis</i>	0,5	0,5	0,5	0,6	-**
<i>Pleurotus dryinus</i>	0,5	0,5	0,5	0,7	-**
<i>Ganoderma lucidum</i>	1,4	3,0	6,3	9,0	krautig, Pilz
<i>Laetiporus persicinus</i>	1,2	2,0	5,3	7,5	Gras, muffig

-*: keine Messung erfolgt aufgrund des unangenehmen Geruchs

-**: kein Geruchseindruck feststellbar, starker Medium-Geruch

Von den 57 gescreenten Pilzen zeigten 26 Pilze ein schnelleres Wachstum als auf reinem Rübenschnitzel-Medium, bei 17 Pilzen war kein Unterschied zu erkennen und bei 14 Pilzen wurde ein langsames Wachstum festgestellt. Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Wachstumsverläufe von vier Pilzen in Oberflächenkultur auf beiden Medien.

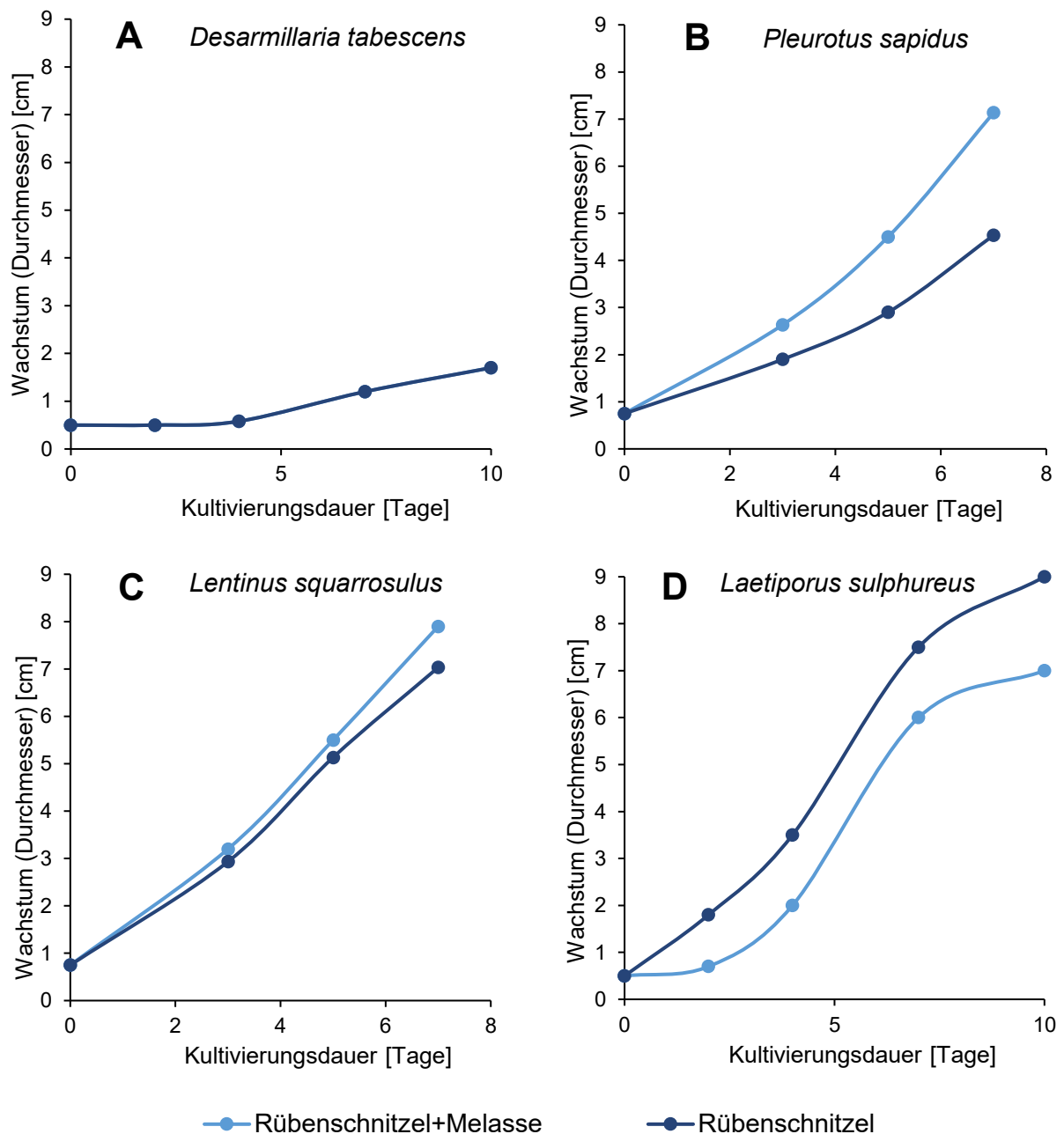


Abbildung 3: Wachstum von **A:** *Desarmillaria tabescens*, **B:** *Pleurotus sapidus*, **C:** *Lentinus squarrosulus*, **D:** *Laetiporus sulphureus* auf Rübenschnitzel-Melasse-Agar (15 g Rübenschnitzel/L und 7,5 g Melasse/L) und Rübenschnitzel-Agar (20 g Rübenschnitzel/L) über einen Zeitraum von 10 (A, D) bzw. 8 Tagen (B, C). Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss. Die Inokulation erfolgte mit einem 0,5 cm² großen bewachsenen Agar-Stück.

Abbildung 3 zeigt, dass sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch das bevorzugte Medium zwischen den betrachteten Pilzen variierte. *Desarmillaria tabescens* zeigte auf beiden Medien ein geringes Wachstum, wies jedoch auf Rübenschnitzel-Agar einen würzig-brotigen Geruch auf.

Für das folgende Screening in Flüssigkultur wurde daher nicht nur das Wachstum, sondern auch der sensorische Eindruck betrachtet, um geeignete Pilze auszuwählen.

So wurden beispielsweise die Pilze *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Armillaria bulbosa*, *Desarmillaria tabescens* und *Polyporus squamosus*, welche auf beiden Medien nur geringes Wachstum zeigten, aufgrund ihrer ansprechenden Sensorik für das Screening in Flüssigkultur ausgewählt. Insgesamt wurden auf Basis der Daten aus Tabelle 40 und Tabelle 41 zwanzig Kandidaten ausgewählt.

3.1.3 Screening in Flüssigkultur

Die Kultivierung in Flüssigkultur erfolgte in dem Medium, auf welchem die entsprechende Spezies in Oberflächenkultur das schnellere Wachstum zeigte. So wurden elf Spezies in Rübenschnitzel-Melasse-Medium und neun Spezies in Rübenschnitzel-Medium kultiviert.

Die Ergebnisse des Screenings in Flüssigkultur sind in Tabelle 42 dargestellt. Neben dem verwendeten Medium und dem Auswahlgrund für das Screening sind hier auch die Trockenmasse nach 10-tägiger Kultivierung sowie die Geruchseindrücke dargestellt.

Tabelle 42: Ergebnisse des Screenings in Flüssigkultur der 20 ausgewählten Basidiomyceten auf Rübenschnitzel- und Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Die Kultivierung erfolgte im 100 mL Maßstab bei 24 °C und 150 rpm für 10 Tage. Die Bestimmung der Trockenmassen erfolgte durch Trocknen des Mycels bei 103 °C im Trockenschrank, RS = Rübenschnitzel-Medium, RSM = Rübenschnitzel-Melasse-Medium, W = Wachstum, S = Sensorik

Pilz	Medium	Auswahlgrund W/S	Trockenmasse [$\frac{g}{100\text{ mL}}$]	Geruchseindruck
<i>Mycetinis scorodonius</i>	RS	S	2,7 ± 0,7	stechend, Plastik, muffig
<u>Pleurotus sapidus</u> <u>(PSA)</u>	RSM	W	0,9 ± 0,2	blumig, Vanille, leicht würzig
<i>Trametes versicolor</i>	RSM	W	0,6 ± 0,2	Farbe, Lack, leicht fruchtig
<i>Pleurotus ostreatus</i>	RSM	W	0,6 ± 0,1	malzig , leicht süßlich
<i>Lentinula edodes</i>	RS	W	0,7 ± 0,0	muffig, Harn, leicht blumig
<i>Laetiporus sulphureus</i>	RSM	W	1,1 ± 0,1	stechend, sauer
<i>Coprinellus xanthothrix</i>	RSM	W	0,6 ± 0,2	neutral , leicht sauer
<u>Lentinus squarrosulus</u> <u>(LSQ)</u>	RSM	W	0,8 ± 0,2	neutral , leicht süßlich
<u>Hygrophoropsis aurantiaca</u> <u>(HAU)</u>	RS	S	1,1 ± 0,0	leicht fettig, Brot
<u>Armillaria bulbosa</u> <u>(ABU)</u>	RS	S	1,1 ± 0,1	leicht würzig

Pilz	Medium	Auswahl- grund W/S	Trockenmasse [$\frac{g}{100 mL}$]	Geruchseindruck
<u>Desarmillaria tabescens (DTA)</u>	RS	S	1,3 ± 0,2	würzig, Maggi, fettig
<i>Polyporus squamosus</i>	RS	S	1,1 ± 0,0	neutral, leicht pilzig/fettig
<i>Flammulina velutipes</i>	RSM	W	0,8 ± 0,1	Karotte
<i>Meripilus giganteus</i>	RSM	W, S	1,0 ± 0,1	brötlich
<i>Agrocybe aegerita</i>	RSM	W, S	0,8 ± 0,3	fruchtig, leicht säuerlich
<i>Pleurotus salmoneo- stramineus</i>	RSM	W	0,5 ± 0,2	süßlich, nussig, blumig
<i>Macrolepiota procera</i>	RS	S	1,1 ± 0,4	sauer
<i>Trametes ochracea</i>	RSM	W	0,5 ± 0,2	Farbe, Lack
<u>Macrolepiota excoriata (MEX)</u>	RS	S	1,1 ± 0,0	leicht fettig/würzig
<i>Laetiporus persicinus</i>	RS	W	1,0 ± 0,0	Sellerie, Petersilie, stechend/grün

Auf Basis der Ergebnisse aus Tabelle 42 wurden sechs Kandidaten zur Kultivierung in einem größeren Ansatz und für weitere Analysen ausgewählt. Die Analysen umfassten neben der Trockenmasse auch den Rohproteingehalt.

Die ausgewählten Pilze sind in Tabelle 42 unterstrichen hervorgehoben. Die Kultivierung erfolgte jeweils auf den bereits zuvor verwendeten Medien für 11 Tage (Abbildung 4). Die Berechnung des Rohproteingehaltes erfolgte mit dem allgemeinen Faktor von 6,25.

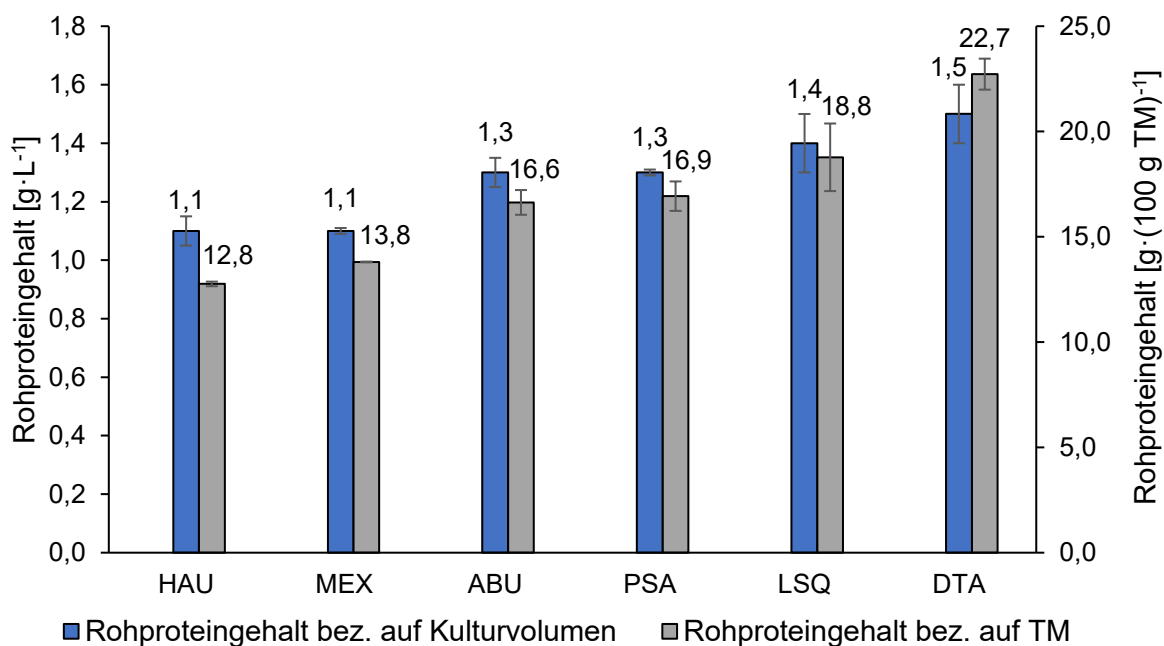


Abbildung 4: Rohproteingehalte der ausgewählten Basidiomyceten bezogen auf das Kulturvolumen und auf die Trockenmasse

Die Kultivierung erfolgte für HAU, MEX, ABU und DTA auf Rübenschnitzel-Medium und für PSA und LSQ auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 9 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung bestimmt und der Rohproteingehalt nach 2.8.2 analysiert. Zur Berechnung wurde der Faktor 6,25 verwendet, n=2.

Für die finale Auswahl von zwei Pilzen wurde neben dem Wachstum auch der sensorische Eindruck der Kulturen betrachtet. Während die Kultur von *Hygrophoropsis aurantiaca* (HAU) einen rauchig/ fettigen Geruch aufwies, rochen die Kulturen von *Macrolepiota excoriata* (MEX) und *Desarmillaria tabescens* (DTA) ab Kulturtag 7 würzig. Bei *Lentinus squarrosulus* (LSQ) war je nach Kulturzeitpunkt nur ein schwach süßlicher oder erdiger Geruch wahrnehmbar. Die Kultur von *Pleurotus sapidus* (PSA) wies einen leicht süßlichen und blumigen Geruch auf, die Kultur von *Armillaria bulbosa* (ABU) roch unangenehm krautig und muffig.

Unter Berücksichtigung des Wachstums auf Basis von Rohproteingehalt und Trockenmasse sowie des sensorischen Eindrucks wurden für die weiteren Versuche die beiden Pilze *Lentinus squarrosulus* und *Desarmillaria tabescens* ausgewählt.

3.1.4 Optimierung der Kultivierung

3.1.4.1 Anpassung der Medienzusammensetzung

Nach der Auswahl geeigneter Pilze wurde das Kultivierungsmedium optimiert. Dazu wurden verschiedene Verhältnisse von Rübenschnitzel-Pellets und Melasse verwendet, wobei stets ein Kohlenhydrat-Gehalt von 15 g·L⁻¹ als Orientierung herangezogen wurde. Der Melasse-Gehalt betrug zwischen 0 und 15 g·L⁻¹, der Rübenschnitzel-Gehalt zwischen 10 und 20 g·L⁻¹ (Tabelle 9). Die Ergebnisse in Form von Trockenmassen und Rohproteingehalten sind in Tabelle 43 aufgeführt.

Für die Optimierung sowie alle folgenden Teile wurden zur Berechnung der Rohproteingehalte die spezifischen Kjeldahlfaktoren verwendet, welche mittels Aminosäureverteilung (2.8.3) nach Formel (8) bestimmt wurden.

Tabelle 43: Rohproteingehalte und Trockenmassen von *L. squarrosulus* und *D. tabescens* nach 10-tägiger Submerskultivierung in Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss bei 150 rpm. Die Trockenmasse wurde durch Gefriertrocknung bestimmt. Der Rohproteingehalt wurde nach 2.8.2 mit den Faktoren 5,90 (LSQ) bzw. 5,96 (DTA) bestimmt; n=2

Pilz	Rüben- schnitzel [g] [L]	Melasse [g] [L]	Trockenmasse [g] [L]	Rohproteingehalt [$\frac{g}{100 g TM}$]	Rohproteingehalt [$\frac{g}{L}$]
<i>L. squarrosulus</i>	10,0	15,0	8,0 ± 1,2	18,0 ± 0,9	1,4 ± 0,1
	12,5	11,0	9,3 ± 0,1	16,4 ± 0,6	1,5 ± 0,0
	15,0	7,5	9,9 ± 0,4	15,8 ± 0,0	1,5 ± 0,1
	20,0	0,0	10,2 ± 0,4	13,5 ± 1,3	1,4 ± 0,2
<i>D. tabescens</i>	10,0	15,0	9,8 ± 1,0	15,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
	12,5	11,0	10,4 ± 0,6	15,2 ± 0,3	1,6 ± 0,1
	15,0	7,5	12,0 ± 1,0	14,4 ± 0,6	1,7 ± 0,1
	20,0	0,0	12,2 ± 0,3	12,8 ± 0,4	1,5 ± 0,0

Für die Auswahl des Mediums wurde auch die Sensorik der verschiedenen Kulturen betrachtet. Die Kulturen von *D. tabescens* wiesen für beide Medien einen leicht würzigen Geruch auf. Bei den Kulturen von *L. squarrosulus* war ein Unterschied zwischen den beiden Medien wahrnehmbar. Während die Medien mit geringen Rübenschnitzel-Konzentrationen einen leicht stechenden und erdigen Geruch aufwiesen, wurden die Geruchseindrücke mit steigendem Rübenschnitzel-Gehalt angenehmer. Bei einer Konzentration von 15 g Rübenschnitzeln pro Liter war kein stechender Geruch mehr wahrnehmbar, bei 20 g Rübenschnitzeln pro Liter schlug der Geruch in leicht süßliche Aromen um.

In Bezug auf die Sensorik sowie die Daten aus Tabelle 43 wurde für die weiteren Versuche Medium 3, welches aus 15 g Rübenschnitzel und 7,5 g Melasse pro Liter bestand, ausgewählt.

3.1.4.2 Optimierung des Mahlgrades der Rübenschnitzel

Für die Optimierung des Mahlgrades der Rübenschnitzel wurde nach 2.5.2.2 vorgegangen und Mahlgrade von 0,5 bis 2 mm verwendet. Die Rübenschnitzel mit verschiedenen Mahlgraden sind in Abbildung 5 dargestellt.



Abbildung 5: Verwendete Mahlgrade der Rübenschnitzel für die Optimierung der Kultivierung
Die Rübenschnitzel wurden mittels Schneidmühle zerkleinert und die verschiedenen Mahlgrade durch Sieben getrennt. Die Mahlgrade betragen 0,5 mm, 1 mm und 2 mm.

Nach der Ernte der Kulturen wurde das lyophilisierte Mycel jeweils im Duplikat nach 2.7.1 auf den Ergosterolgehalt analysiert (Abbildung 6).

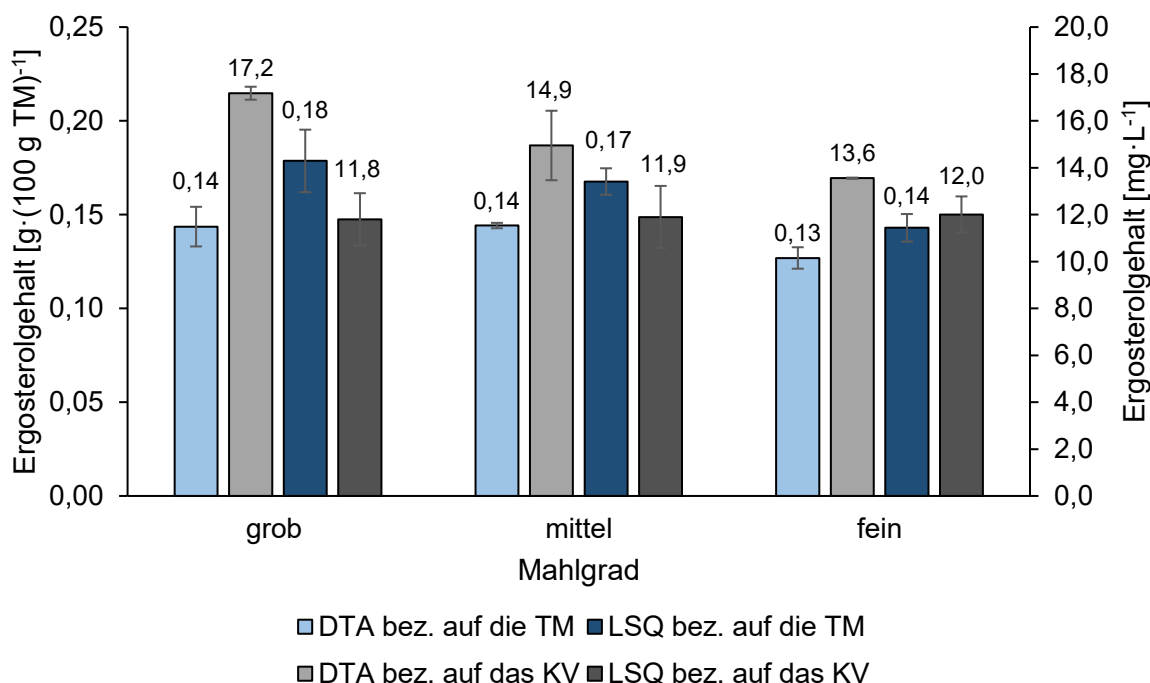


Abbildung 6: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf das Kulturvolumen und auf die Trockenmasse bei verschiedenen Mahlgraden der Rübenschnitzel
Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) , n=2. TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

Ergänzend wurden für die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse jeweils Signifikanztests durchgeführt (one-way-ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Hier wurden für keinen der beiden Pilze, weder bezogen auf die Trockenmasse, noch auf das Kulturvolumen, signifikante Unterschiede festgestellt.

3.1.4.3 Optimierung der Kultivierungsparameter pH-Wert und Temperatur

Die Optimierung der Kultivierungsparameter erfolgte nach 2.5.2.3 jeweils im Duplikat.

Temperaturoptimierung

Die Ergebnisse der Temperaturoptimierung sind nachfolgend für *L. squarrosulus* und *D. tabescens* in Form der erhaltenen Rohproteingehalte (Abbildung 7) und Ergosterolgehalte (Abbildung 8) dargestellt.

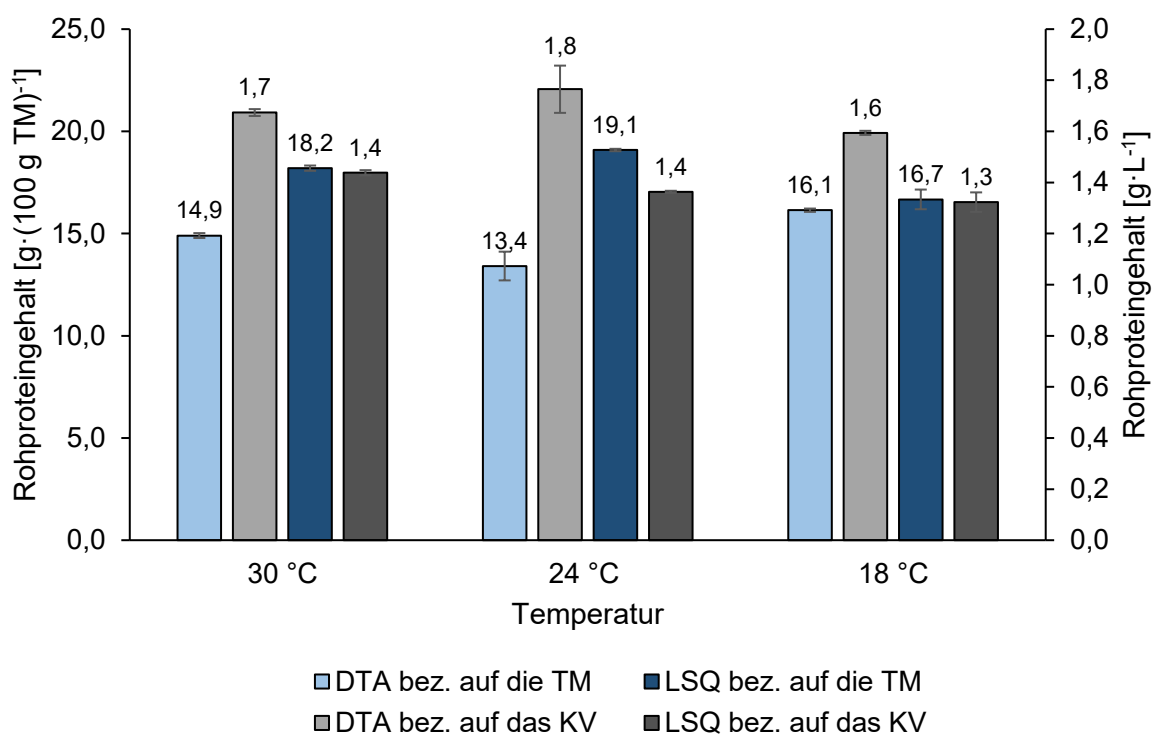


Abbildung 7: Rohproteingehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf das Kulturvolumen und auf die Trockenmasse bei verschiedenen Temperaturen

Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 7 Tage bei den angegebenen Temperaturen und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefrierdrying (2.8.1.1) bestimmt und der Rohproteingehalt nach 2.8.2 analysiert. Zur Berechnung wurde der Faktor 5,96 (DTA) bzw. 5,90 (LSQ) verwendet, n=2. TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

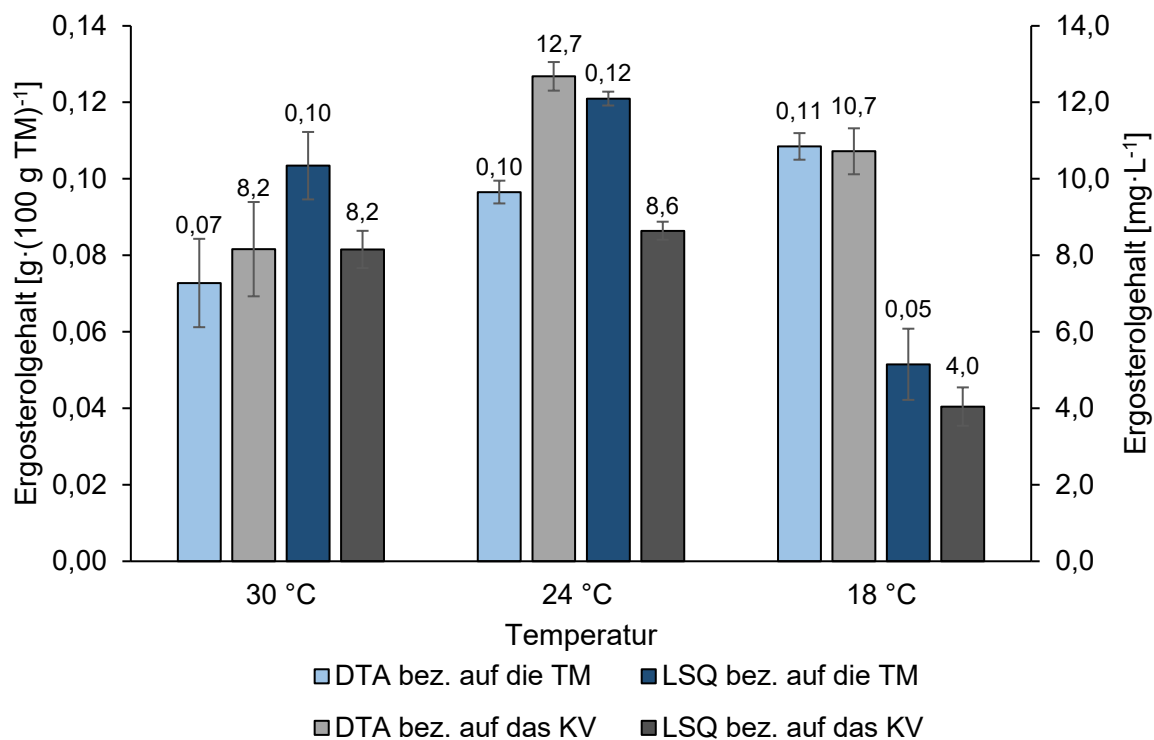


Abbildung 8: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf das Kulturvolumen und auf die Trockenmasse bei verschiedenen Temperaturen
 Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 7 Tage bei den angegebenen Temperaturen und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt, n=2. TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

pH-Wert Optimierung

Die Optimierung des pH-Wertes erfolgte parallel zur Temperaturoptimierung und wurde daher bei 24 °C für beide Pilze durchgeführt. Die Ergebnisse für Rohprotein- und Ergosterolgehalte sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt.

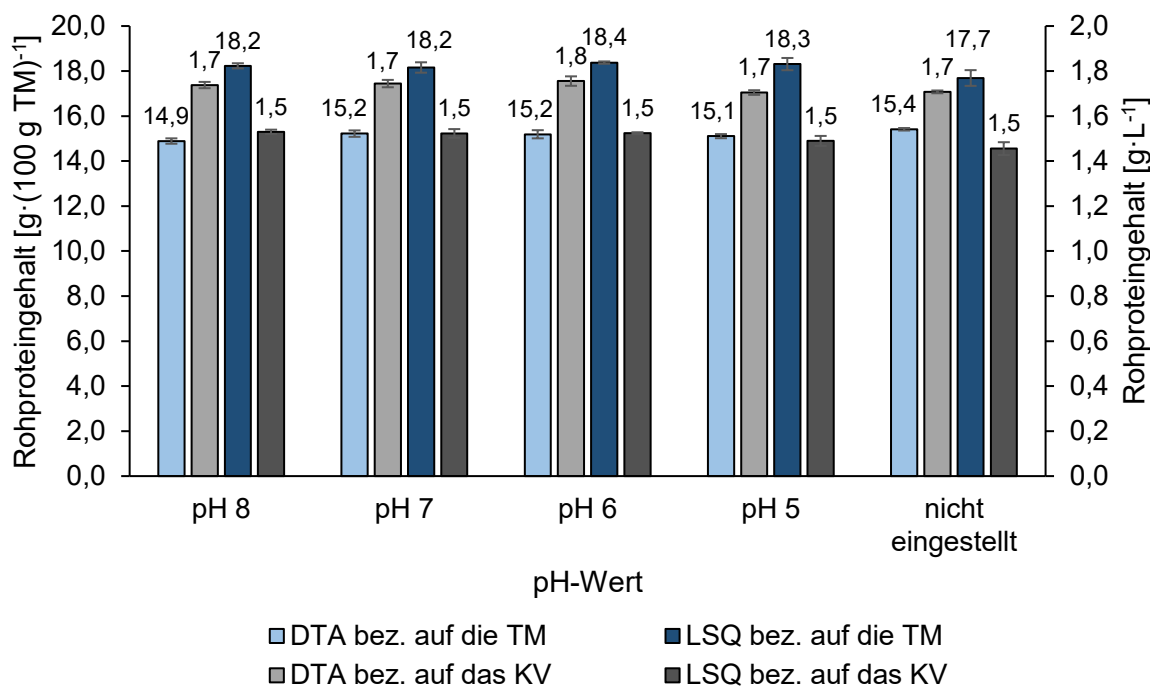


Abbildung 9: Rohproteingehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf das Kulturvolumen und auf die Trockenmasse bei verschiedenen pH-Werten

Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 7 Tage bei 24 °C und den angegebenen pH-Werten bei 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Rohproteingehalt nach (2.8.2) analysiert. Zur Berechnung wurde der Faktor 5,96 (DTA) bzw. 5,90 (LSQ) verwendet, n=2. TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

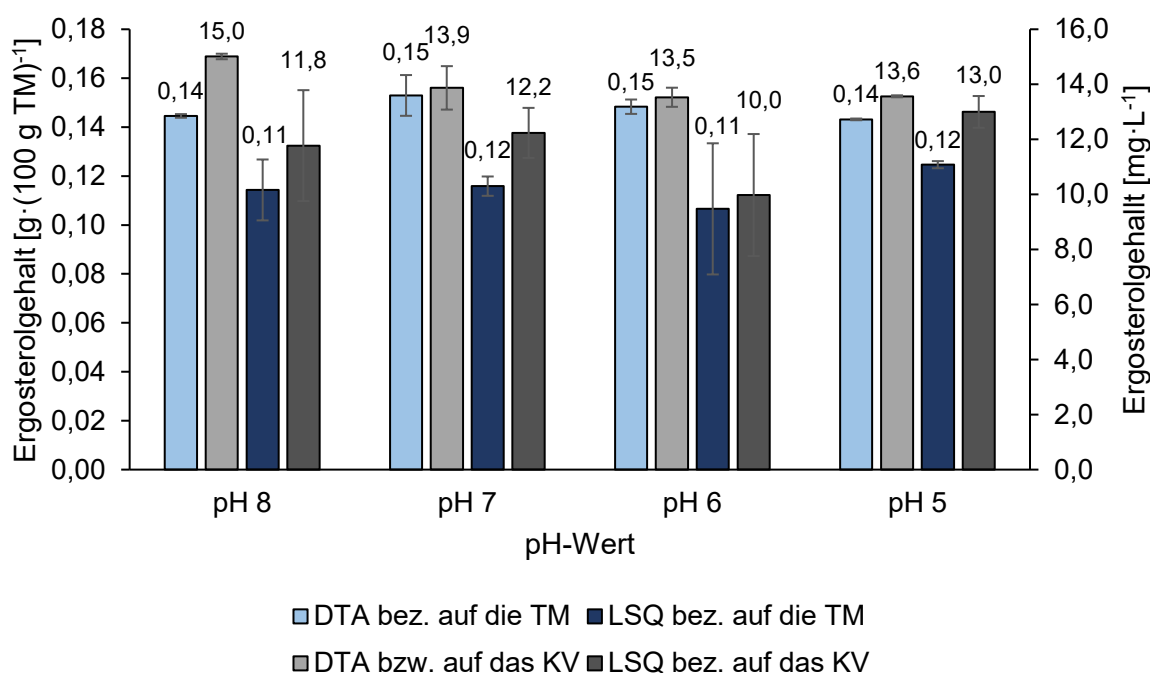


Abbildung 10: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf das Kulturvolumen und auf die Trockenmasse bei verschiedenen pH-Werten

Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 7 Tage bei 24 °C und den angegebenen pH-Werten bei 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt, n=2. TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

3.1.4.4 Supplementierung mit Bierhefe und Hefeextrakt

Die Supplementierung der Medien mit Bierhefe und Hefeextrakt wurde nach 2.5.2.4 durchgeführt. Zunächst wurden die eingesetzten Supplemente Bierhefe und Hefeextrakt bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung analysiert (Tabelle 44).

Tabelle 44: Kohlenhydratgehalte, Rohproteingehalte und Trockenmassen von Bierhefe und Hefeextrakt
Der Rohproteingehalt wurde nach 2.8.2 mit dem Faktor 6,25 bestimmt (n=2), der Kohlenhydrat-Gehalt mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay (2.8.7) und die Trockenmasse wurde mittels Feuchtebestimmer (2.8.1.2) analysiert.

	Kohlenhydratgehalt [$\frac{g}{100 g}$]	Rohproteingehalt [$\frac{g}{100 g}$]	Trockenmasse [%]
Bierhefe	12,3 ± 1,9	13,4 ± 0,1	26,4
Hefeextrakt	15,1 ± 2,8	68,6 ± 0,1	96,0

Für die Supplementierung wurden 1,0 g Bierhefe pro 100 mL bzw. 0,5 g Hefeextrakt pro 100 mL Kulturvolumen eingesetzt. Dies entsprach einer zugesetzte Menge Protein von 1,3 g·L⁻¹ (Bierhefe) und 3,4 g·L⁻¹ (Hefeextrakt).

Die Ergebnisse nach Kultivierung sind in Form von Rohproteingehalten in Abbildung 11 gezeigt.

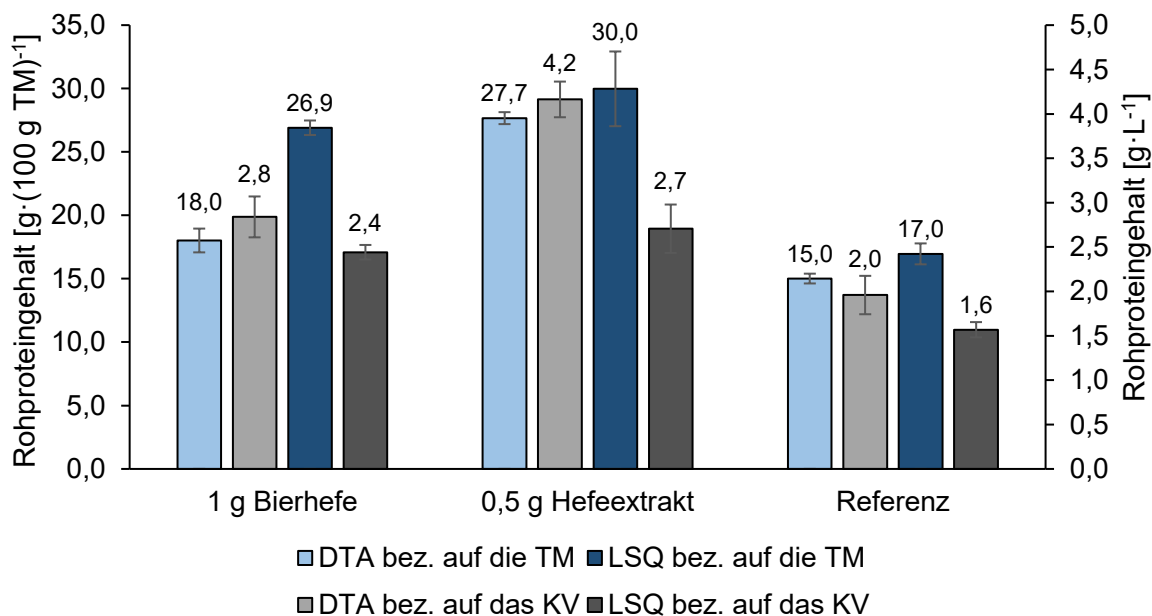


Abbildung 11: Rohproteingehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf das Kulturvolumen und die Trockenmasse mit und ohne Hefe-Supplementierung
Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 8 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Rohproteingehalt nach 2.8.2 analysiert. Zur Berechnung wurde der Faktor 5,96 (DTA) bzw. 5,90 (LSQ) verwendet. n=2, TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

Mithilfe der Supplementierung von Bierhefe und Hefeextrakt wurde der Rohproteingehalt der Kulturen beider Pilze im Vergleich zur Referenzkultur signifikant gesteigert (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$).

Für eine Aussage über das Wachstum der Pilze nach Supplementierung wurde auch der Ergosterolgehalt (Abbildung 12 und Abbildung 13) bestimmt. Hierzu wurde berücksichtigt, dass auch in Bierhefe Ergosterol enthalten ist. Da in Hefeextrakt kein Ergosterol nachgewiesen wurde, wurde keine Korrektur vorgenommen.

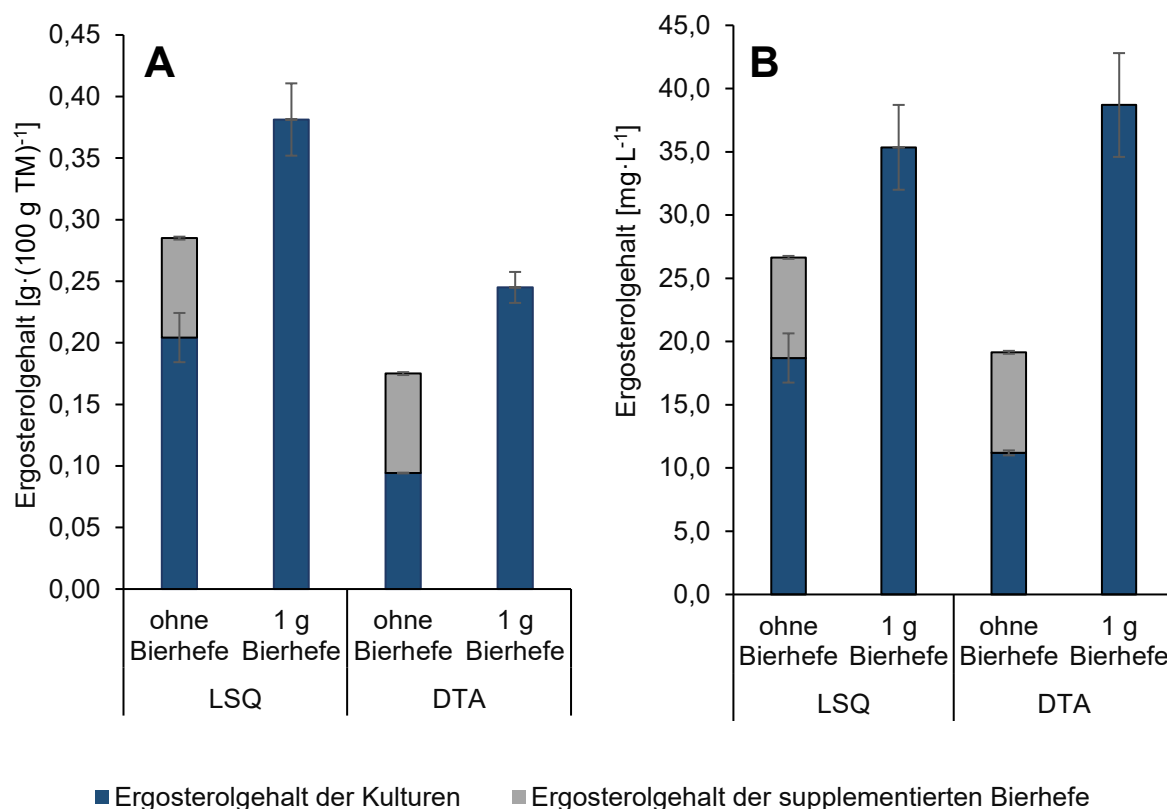


Abbildung 12: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf die Trockenmasse (A) und das Kulturvolumen (B) mit und ohne Bierhefe-Supplementierung. Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 8 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycel erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt. n=2 (DTA), n=4 (LSQ)

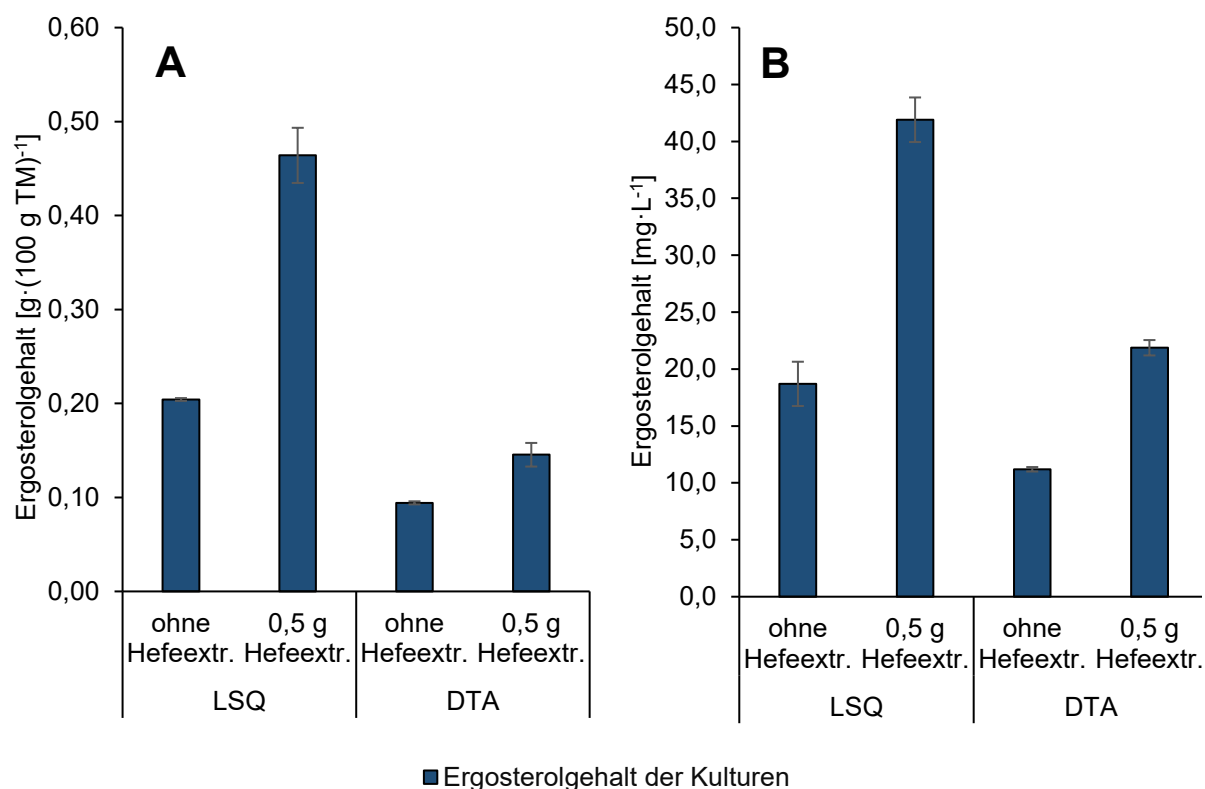


Abbildung 13: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf die Trockenmasse (A) und das Kulturvolumen (B) mit und ohne Hefeextrakt-Supplementierung. Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 8 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt. n=2 (DTA), n=4 (LSQ)

3.1.4.5 Optimierung des Inokulationsvolumens und der Substratkonzentration

Die Durchführung erfolgte nach Abschnitt 2.5.2.5. Zunächst wurde der Einfluss des zur Inokulation verwendeten Vorkultur-Volumens auf den Pilzgehalt der Hauptkultur untersucht. Dazu wurden jeweils 5%, 10% und 20% des Kulturvolumens zur Inokulation verwendet und der Ergosterolgehalt bestimmt (Abbildung 14).

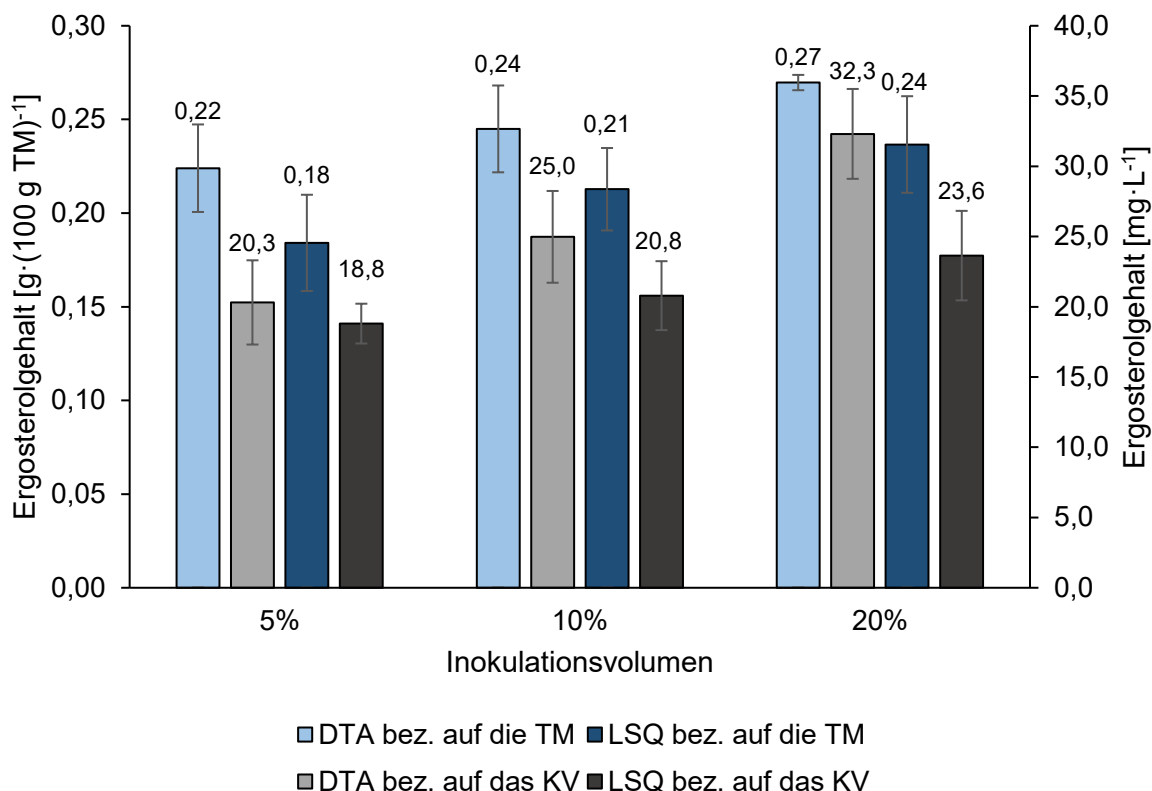


Abbildung 14: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf die Trockenmasse und das Kulturvolumen bei unterschiedlichen Inokulationsvolumina. Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt, n=4. TM=Trockenmasse, KV= Kulturvolumen

Für *L. squarrosulus* und *D. tabescens* wurden jeweils signifikante Unterschiede zwischen 5% und 20% Inokulationsvolumen festgestellt. Zu 10% ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$).

In einem weiteren Ansatz wurde die Substratkonzentration (SK) verdoppelt und verdreifacht. Gleichzeitig wurde auch das Inokulationsvolumen (IV) angepasst und der Einfluss auf den Ergosterolgehalt untersucht (Abbildung 15 und Abbildung 16).

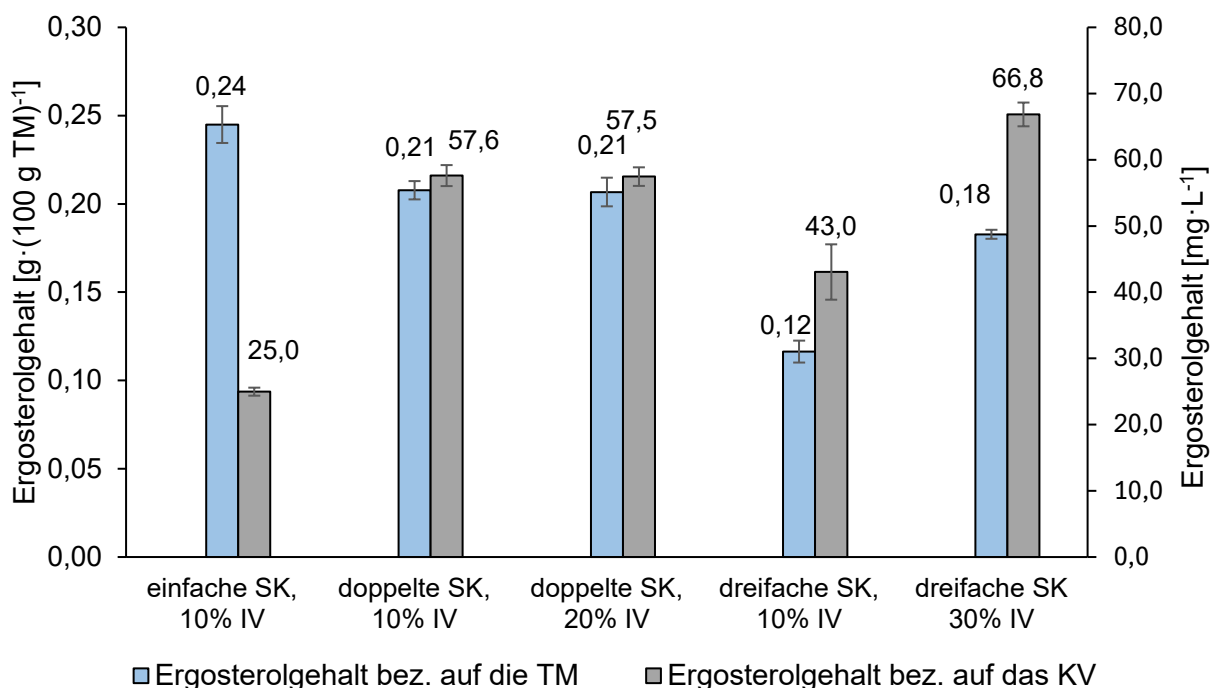


Abbildung 15: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) bezogen auf die Trockenmasse und das Kulturvolumen bei unterschiedlichen Inokualtionsvolumina und Substratkonzentrationen

Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher, doppelter und dreifacher Substratkonzentration für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt. n=2 bzw. 4 (einfache SK, 10% IV), SK=Substratkonzentration, IV = Inokulationsvolumen

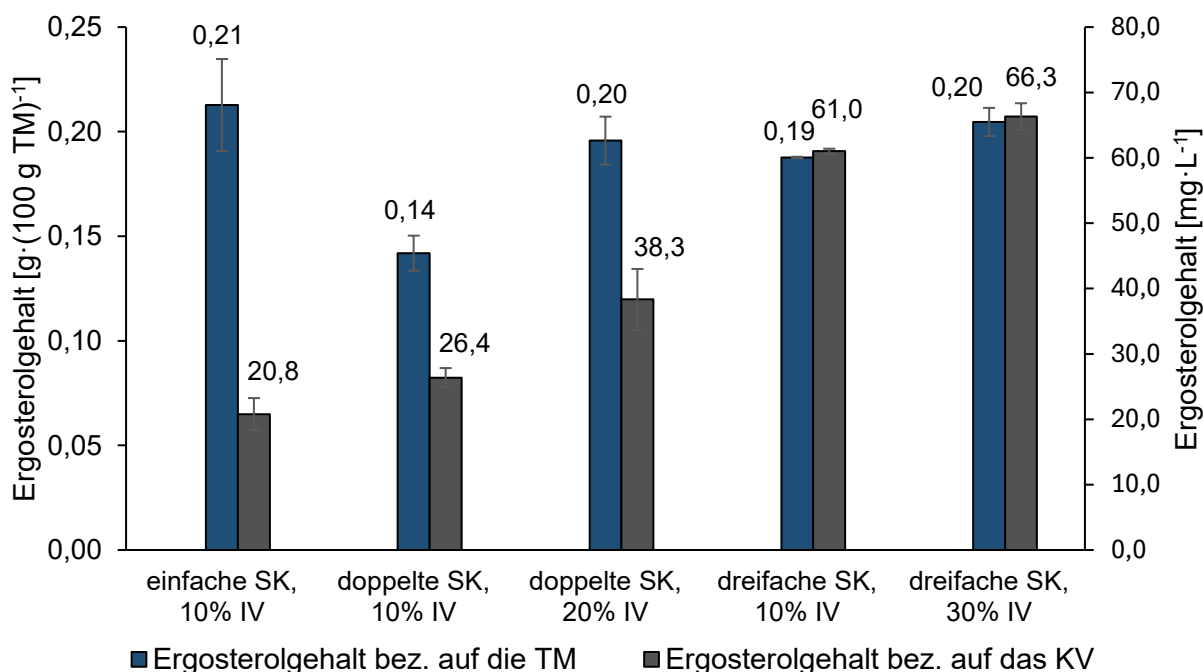


Abbildung 16: Ergosterolgehalte von *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf die Trockenmasse und das Kulturvolumen bei unterschiedlichen Inokualtionsvolumina und Substratkonzentrationen

Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher, doppelter und dreifacher Substratkonzentration für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt. n=2 bzw. 4 (einfache SK, 10% IV), SK=Substratkonzentration, IV = Inokulationsvolumen

In einem weiteren Ansatz wurde die Substratkonzentration vervierfacht und ein angepasstes Inokulationsvolumen von 10%, 20% und 40% des Kulturvolumens gewählt. Die erhaltenen Daten sind, verglichen mit den Daten der Standardbedingungen, in Abbildung 17 dargestellt.

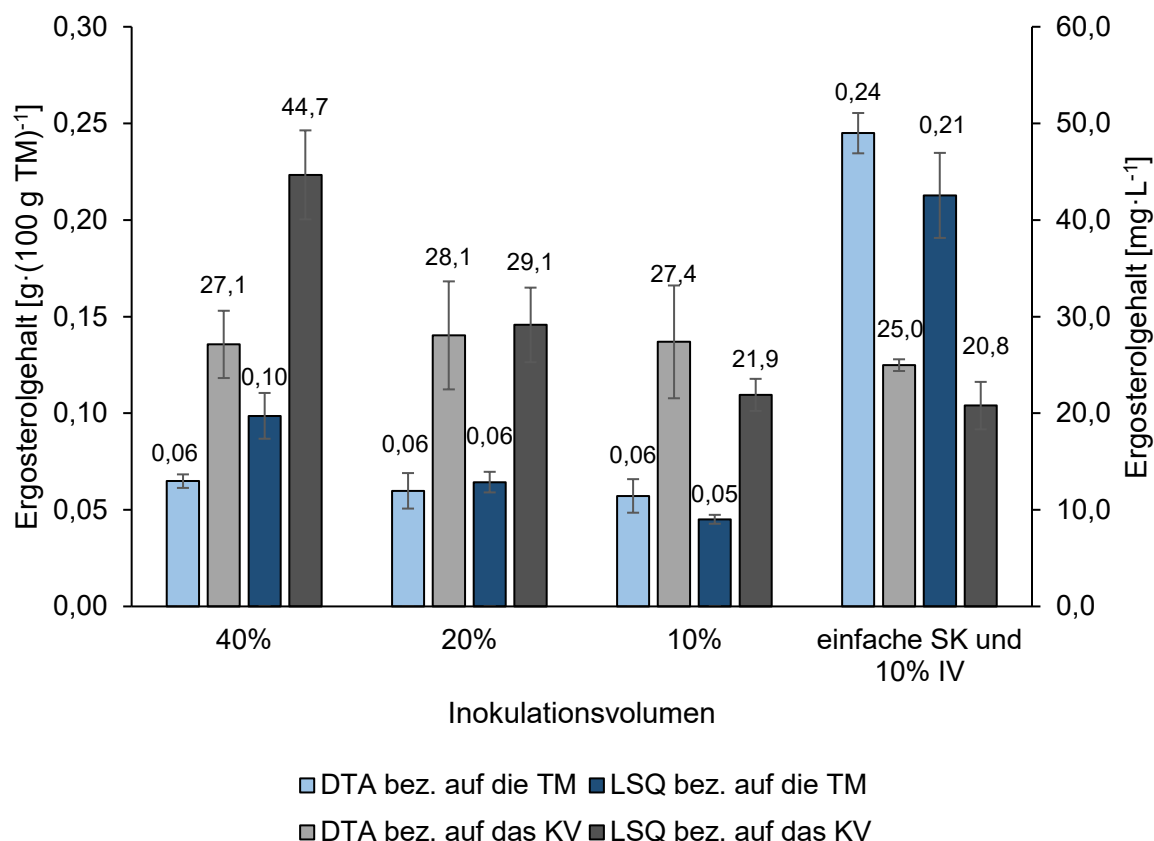


Abbildung 17: Ergosterolgehalte von *D. tabescens* (DTA) und *L. squarrosulus* (LSQ) bezogen auf die Trockenmasse und das Kulturvolumen bei unterschiedlichen Inokulationsvolumina
 Die Kultivierung erfolgte auf Rübenschrot-Melasse-Medium mit vierfacher Substratkonzentration für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Das Abtrennen des Mycels erfolgte mittels Zentrifuge. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1) bestimmt und der Ergosterolgehalt nach Derivatisierung mit MSTFA mittels GC-FID (2.7.1) bestimmt, n=4.
 SK=Substratkonzentration, IV = Inokulationsvolumen

3.1.4.6 Wachstum in Malzextraktmedium

Zur Bestimmung des Inokulationszeitpunktes der Hauptkulturen und der geplanten Bioreaktoren wurde das Wachstum der Vorkulturen beider Pilze in Malzextraktmedium nach 2.5.2.6.1 analysiert (Abbildung 18 und Abbildung 19).

Das Wachstum wurde über die Trockenmasse bestimmt. Für *L. squarrosulus* wurde zusätzlich der Ergosterolgehalt gemessen.

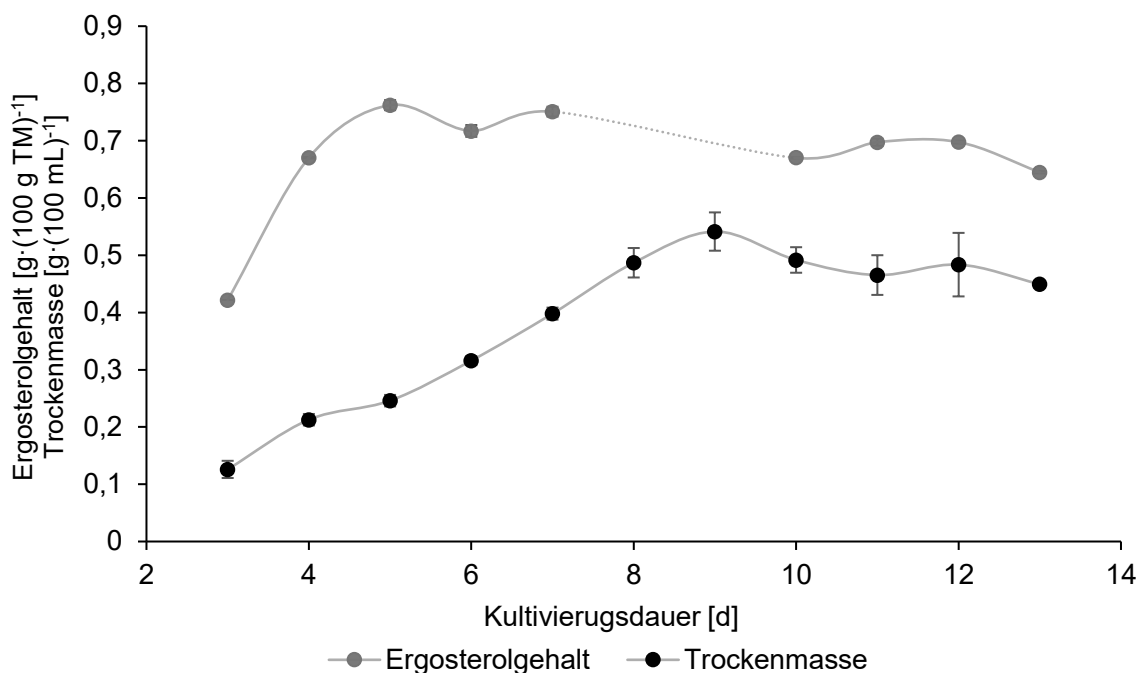


Abbildung 18: Wachstum der Vorkultur von *L. squarrosulus* in Malzextraktmedium
 Jeweils 100 mL Malzextrakt (2%-ig) wurden mit ca. 0,5 cm² Pilzmycel inokuliert und bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss für 13 Tage kultiviert. Die Ernte erfolgte mittels Zentrifuge, die Analyse der Trockenmasse erfolgte mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1), die Ergosterolanalyse erfolgte mittels GC-FID (2.7.1), n=2.

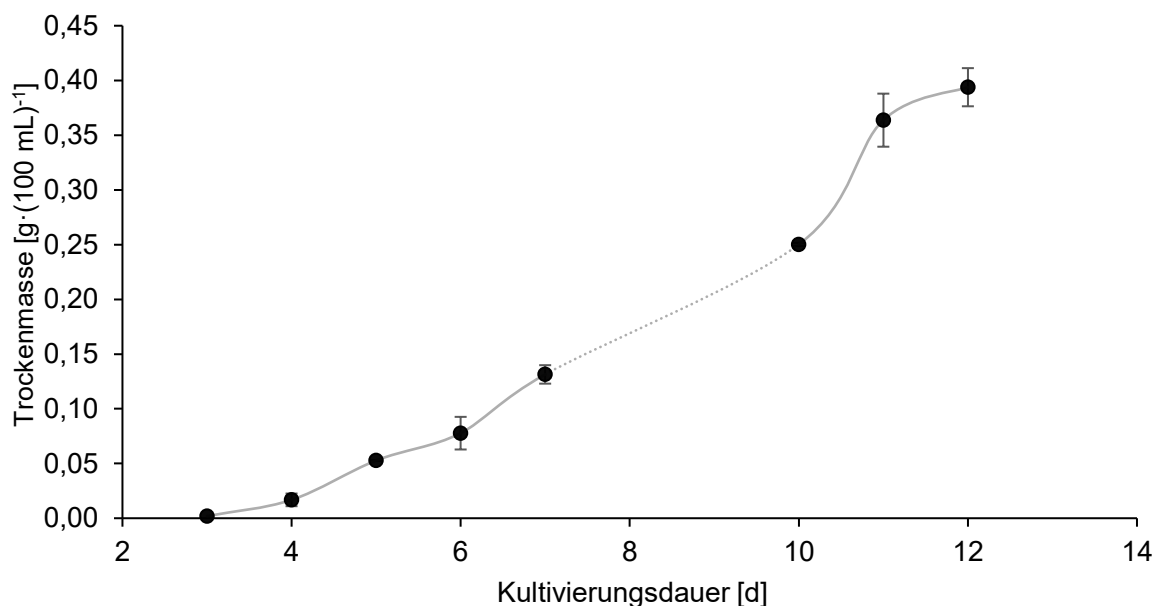


Abbildung 19: Wachstum der Vorkultur von *D. tabescens* in Malzextrakt
 Jeweils 100 mL Malzextrakt (2%-ig) wurden mit ca. 0,5 cm² Pilzmycel inokuliert und bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss für 10 Tage kultiviert. Die Ernte erfolgte mittels Zentrifuge, die Analyse der Trockenmasse erfolgte mittels Gefriertrocknung (2.8.1.1), n=2.

3.1.4.7 Wachstum in Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Für beide Pilze wurde nach 2.5.2.6 das Wachstum in Rübenschnitzel-Melasse-Medium über 9 bzw. 10 Tage betrachtet.

Die Wachstumsverläufe wurden als Anhaltspunkt zur Bestimmung des idealen Erntezeitpunktes im Bioreaktor aufgenommen. Da die Kultivierung im Bioreaktor einen Zeitraum von 10 Tagen nicht überschreiten sollte, wurden das Wachstum über 9 Tage (*L. squarrosulus*, Abbildung 20) und 10 Tage (*D. tabescens*, Abbildung 22) aufgenommen. Die mittels Gefrier Trocknung bestimmten Trockenmassen sind im Anhang (Tabelle I) dargestellt.

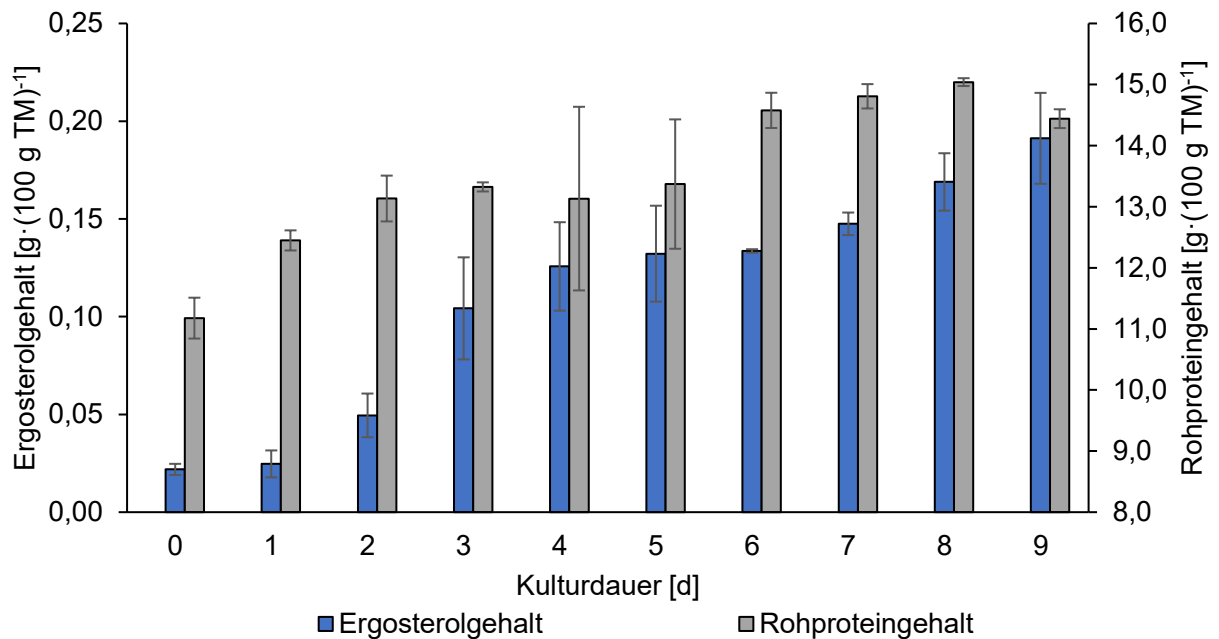


Abbildung 20: Wachstum von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Jeweils 100 mL Rübenschnitzel-Melasse-Medium (1,5 g Rübenschnitzel und 0,75 g Melasse) wurden mit einer für 6 Tage kultivierten Vorkultur inokuliert und bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss für 9 Tage kultiviert. Das Mycel wurde mittels Zentrifuge geerntet und gefriergetrocknet. Die Analyse des Rohproteingehaltes erfolgte nach 2.8.2. Die Ergosterolbestimmung erfolgte nach Derivatisierung mittels GC-FID (2.7.1), n=4.

Für *L. squarrosulus* wurde neben dem Ergosterolgehalt auch der Chitin-, sowie der DNA-Gehalt nach 2.7.2.1 und 2.7.4.5 bestimmt. Für den Parameter Chitin wurden alle aufgenommenen Wachstumstage gemessen. Die vollständigen Daten sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung VII). Die qPCR-Messung erfolgte ausschließlich für die Wachstumstage 1, 3, 5, 7 und 9.

Auf Basis der bekannten Ergosterol-, Chitin- und DNA-Gehalte des reinen Mycels wurden die entsprechenden Pilzgehalte an den Wachstumstagen errechnet. Die erhaltenen Ergebnisse aller drei Methoden sind in Abbildung 21 dargestellt.

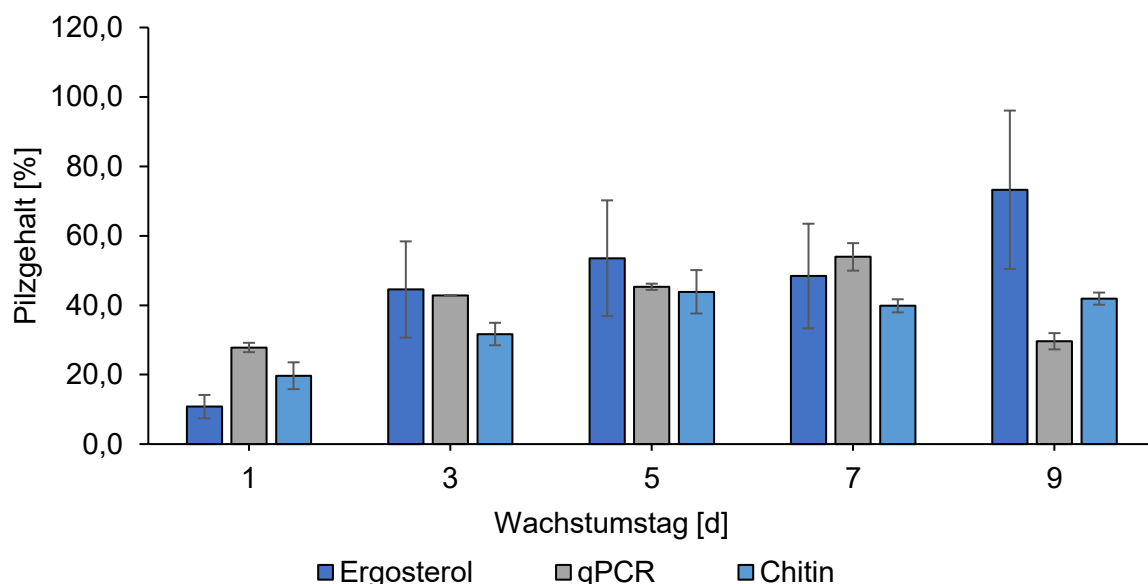


Abbildung 21: Wachstum von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium
 Jeweils 100 mL Rübenschnitzel-Melasse-Medium (1,5 g Rübenschnitzel und 0,75 g Melasse) wurden mit einer für 6 Tage kultivierten Vorkultur inokuliert und bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss für 9 Tage kultiviert. Das Mycel wurde mittels Zentrifuge geerntet und gefriergetrocknet. Die Ergosterolbestimmung erfolgte nach Derivatisierung mittels GC-FID (2.7.1), der Chitin-Gehalt wurde photometrisch bestimmt (2.7.2.1). Die qPCR wurde nach dem unter 2.7.4.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt, n=2.

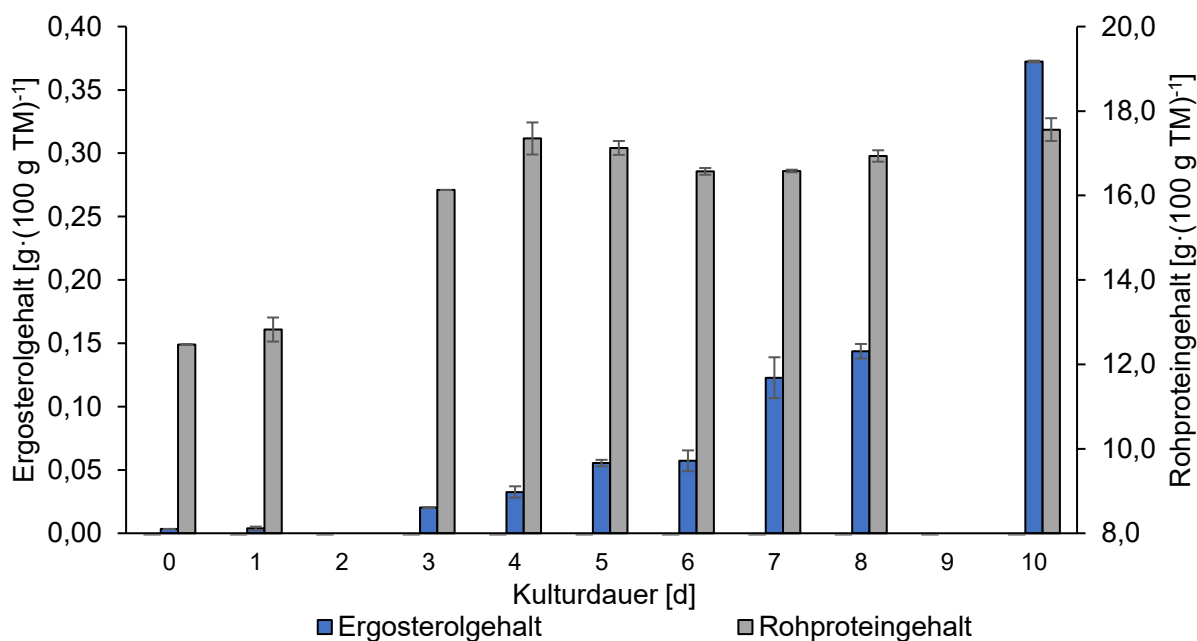


Abbildung 22: Wachstum von *D. tabescens* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium
 Jeweils 100 mL Rübenschnitzel-Melasse-Medium (1,5 g Rübenschnitzel und 0,75 g Melasse) wurden mit einer für 7 Tage kultivierten Vorkultur inokuliert und bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss für 10 Tage kultiviert. Das Mycel wurde mittels Zentrifuge geerntet und gefriergetrocknet. Die Analyse des Proteingehaltes erfolgte nach 2.8.2. Die Ergosterolbestimmung erfolgte nach Derivatisierung mittels GC-FID (2.7.1), n=2.

Aufgrund des schnelleren Wachstums wurde im Folgenden mit dem Pilz *L. squarrosulus* weitergearbeitet.

3.1.4.8 Upscaling

5-Liter-Bioreaktor

Im nächsten Schritt wurde die Kultivierung von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium in den Bioreaktor übertragen. Dazu wurde ein 5-Liter-Bioreaktor der Firma Bioengineering mit 3-Litern Kulturvolumen verwendet. Die Kultivierung erfolgte nach 2.4.4.1. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss von homogenisierten und nicht homogenisierten Vorkulturen untersucht. Dazu wurden die Vorkulturen einmal für 30 s bei 10.000 rpm mittels Ultra-Turrax zerkleinert und einmal ohne Zerkleinerung für die Inokulation verwendet. Die erhaltenen Kulturverläufe bzgl. pH-Wert sowie pO_2 sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt. Bei der Verwendung homogenisierter Vorkulturen wurde die Rührerdrehzahl nach 39 h, 42 h und 46 h für einige Sekunden von 230 rpm auf 500 rpm erhöht, um ein starkes Zuwachsen der pH-Elektrode sowie des pO_2 -Sensors zu vermeiden.

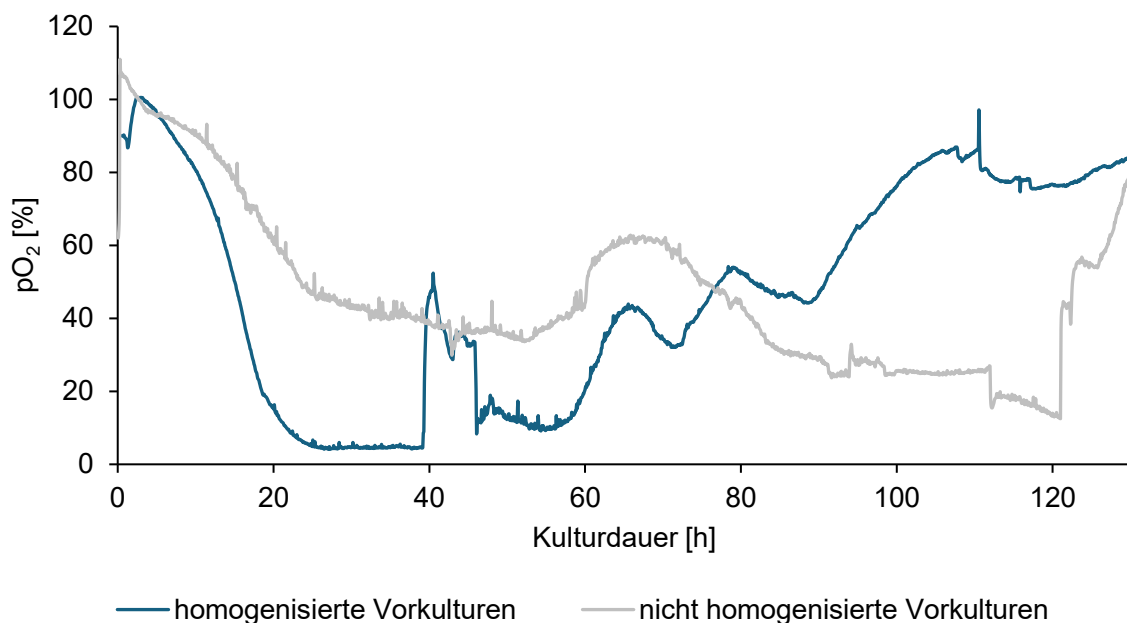


Abbildung 23: Aufzeichnung des Partialdrucks des gelösten Sauerstoffs (pO_2) in [% der Sättigung] während des Kulturverlaufs im Bioreaktor nach Inokulation mit homogenisierten bzw. nicht homogenisierten Vorkulturen

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit je 300 mL einer 6-tägigen Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kulturen wurden einmal mittels Ultra-Turrax für 30 s bei 10.000.rpm homogenisiert und einmal nicht homogenisiert eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 bei einer Rührerdrehzahl von 230 rpm für 6 Tage. Die Messung des pO_2 -Gehaltes erfolgte on-line mittels Clark-Elektrode.

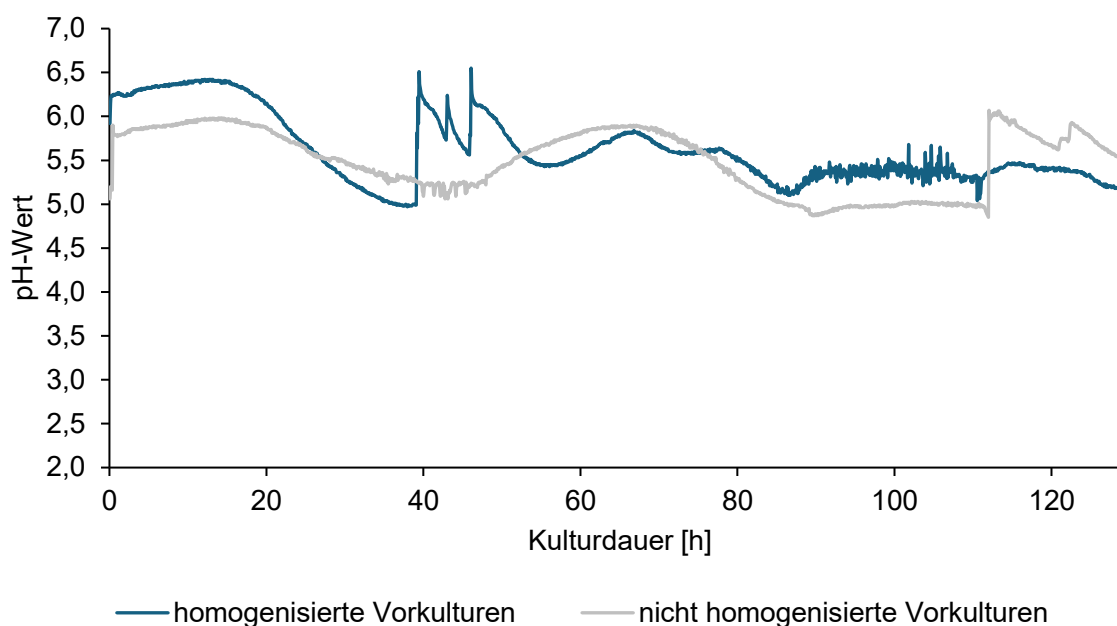


Abbildung 24: pH-Wert während des Kulturverlaufs im Bioreaktor nach Inokulation mit homogenisierten bzw. nicht homogenisierten Vorkulturen

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit je 300 mL einer 6-tägigen Vorkultur von *L.squarrosulus* inokuliert. Die Kulturen wurden einmal mittels Ultra-Turrax für 30 s bei 10.000.rpm homogenisiert und einmal nicht homogenisiert eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 bei einer Rührerdrehzahl von 230 rpm für 6 Tage. Die pH-Steuerung erfolgte mittels 0,05 M NaOH und löste bei pH < 5 aus. Die Messung des pH-Wertes erfolgte on-line mittels pH-Elektrode.

Von beiden Kultivierungen wurde zur Bewertung des Wachstums der Chitin-Gehalt nach 2.7.2.1 bestimmt (Tabelle 45). Die Analyse mit homogenisierten Vorkulturen basierte auf zwei Kultivierungen. Analytisch wurden keine signifikanten Unterschiede im Chitin-Gehalt beobachtet (t-Test, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$).

Tabelle 45: Ergebnisse der Chitin-Analytik der Kultivierungen mit homogenisierten und nicht homogenisierten Vorkulturen

Die Analysen der Bioreaktorläufe erfolgten aus dem lyophilisierten Mycel nach 2.7.2.1.

	Chitingehalt $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}} \right]$
Homogenisierte Vorkulturen	2,6 ± 0,2
Nicht-homogenisierte Vorkulturen	2,3 ± 0,1

In einem nächsten Schritt wurde der Edelstahl-Ring-Sparger der Firma Bioengineering gegen einen porösen Sparger der Firma BioThrust ersetzt (Abbildung 25).

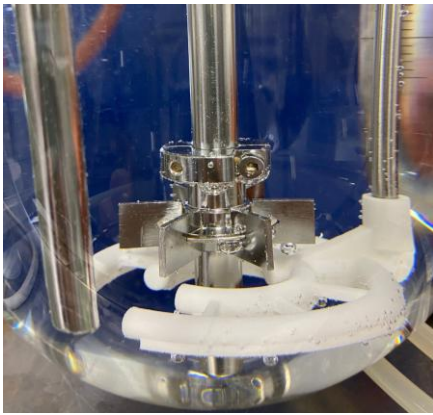


Abbildung 25: Im Bioreaktor verbauter poröser Sparger der Firma BioThrust

Die Kulturverläufe sind in Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellt.

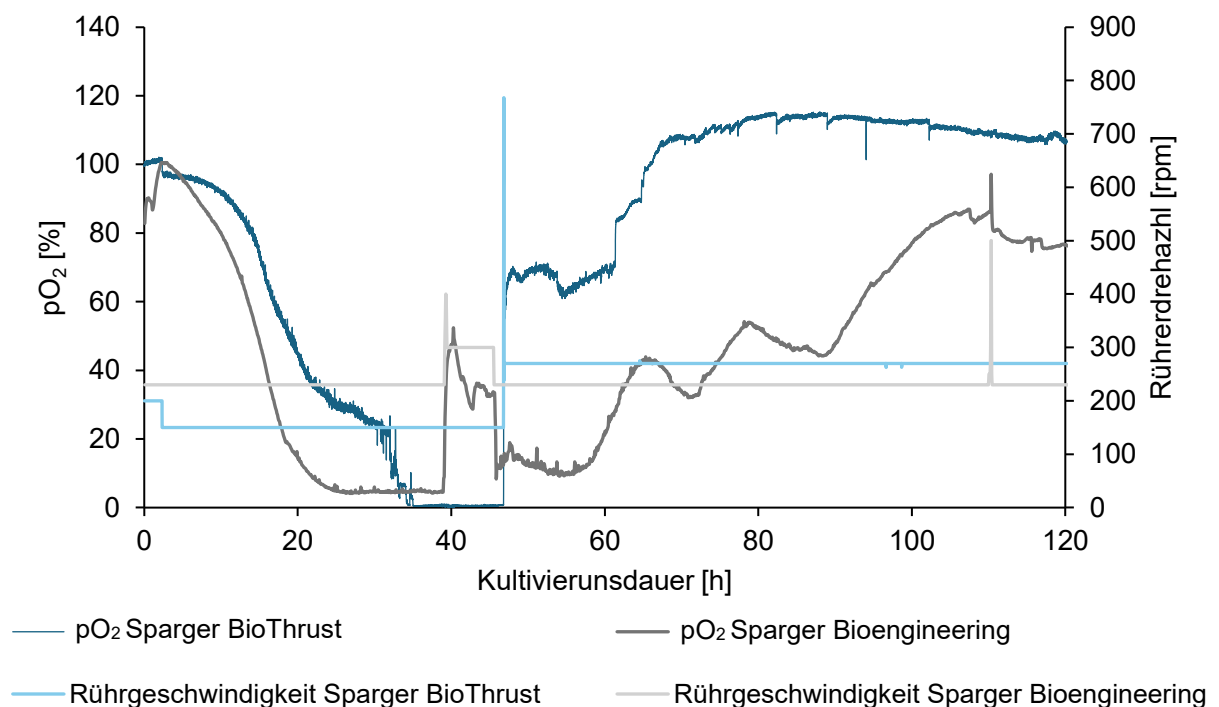


Abbildung 26: Aufzeichnung des Partialdrucks des gelösten Sauerstoffs (pO₂) in [% der Sättigung] sowie Rührerdrehzahl während des Kulturverlaufs im Bioreaktor mit Sparger der Firma Bioengineering und Sparger der Firma BioThrust

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit je 300 mL einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Für eine Kultivierung wurde der Edelstahl-Ringsparger der Firma Bioengineering verwendet, für die andere Kultivierung der poröse Sparger der Firma BioThrust. Die Messung des pO₂-Gehaltes erfolgte on-line mittels Clark-Elektrode. Als Rührwerk dienten zwei Rushton-Impeller.

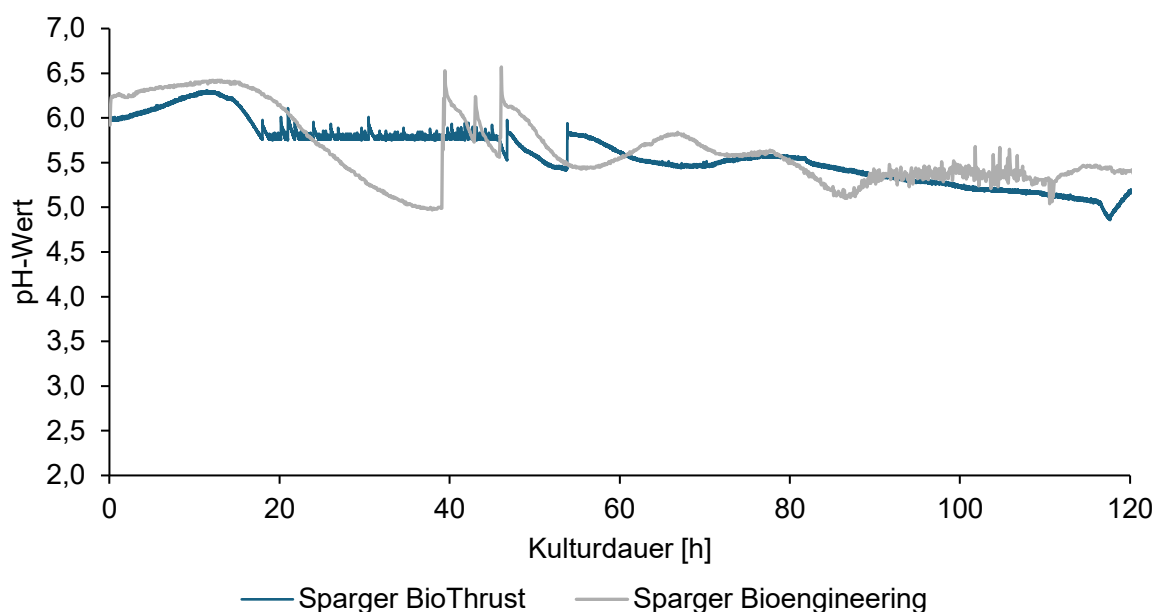


Abbildung 27: pH-Wert während des Kulturverlaufs im Bioreaktor mit Sparger der Firma Bioengineering und Sparger der Firma BioThrust

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit je 300 mL einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Für eine Kultivierung wurde der Edelstahl-Ringsparger der Firma Bioengineering verwendet, für die andere Kultivierung der poröse Sparger der Firma BioThrust. Als Rührwerk dienten zwei Rushton-Impeller. Die pH-Steuerung erfolgte mittels 0,05 M NaOH und löste bei pH < 5,5 aus. Die Messung des pH-Wertes erfolgte on-line mittels pH-Elektrode.

Von den Kultivierungen wurden die Chitin-Gehalte nach 2.7.2.1 bestimmt (Tabelle 46). Die Ergebnisse basieren jeweils auf zwei Kultivierungen.

Tabelle 46: Chitin-Gehalte der Biomasse nach Verwendung der Sparger von Bioengineering und BioThrust

Die Analysen der Bioreaktorläufe erfolgten aus dem lyophilisierten Mycel nach 2.7.2.1.

	Chitingehalt $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}}\right]$
Bioengineering Edelstahl-Sparger	2,4 ± 0,2
BioThrust poröser Sparger	3,2 ± 0,4

Für die weiteren Kultivierungen wurde aufgrund der verbesserten Sauerstoff-Sättigung der poröse Sparger der Firma BioThrust weiterverwendet.

Bei zwei Bioreaktor-Läufen mit homogenisierter Vorkultur und BioThrust-Sparger wurde der Wachstumsverlauf aufgenommen (Abbildung 28). Hierzu wurden von Tag 3 bis 8 jeweils 25 mL steril aus dem Bioreaktor entnommen und der Chitin-Gehalt der Biomasse nach 2.7.2.1 bestimmt.

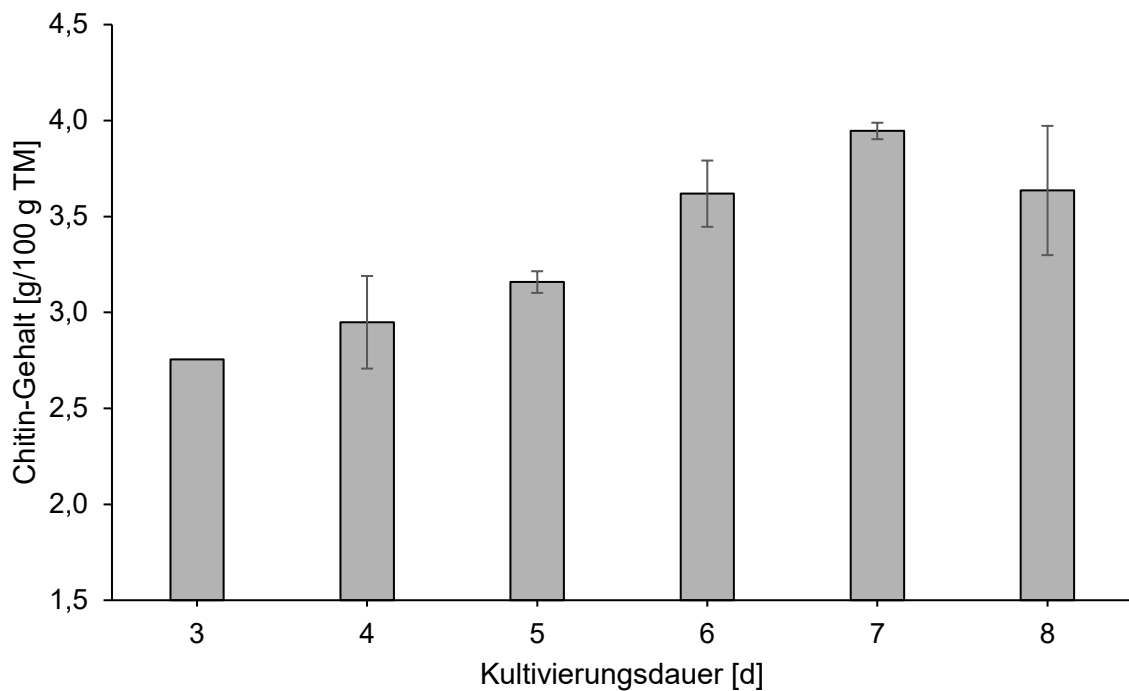


Abbildung 28: Wachstum des Pilzes *L. squarrosulus* im 5-Liter Bioreaktor mit einfacher Substratkonzentration und BioThrust-Sparger

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium (15 g Rübenschnitzel/L, 7,5 g Melasse/L) mit je 300 mL einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 8 Tage. Für die Kultivierung wurde der poröse Sparger der Firma BioThrust verwendet. Jeden Tag wurden 25 mL aus dem Reaktor entnommen und zentrifugiert. Das erhaltene Mycel wurde lyophilisiert und der Chitin-Gehalt nach 2.7.2.1 analysiert. n=4 (Tag 4,5,6,7), n=2 (Tag 3,8)

Im nächsten Schritt wurden die Substratkonzentration und gleichzeitig das Inokulationsvolumen erhöht. Es wurde die einfache Menge mit 10% Inokulationsvolumen, die doppelte Menge mit 20% Inokulationsvolumen, die dreifache Menge mit 30% Inokulationsvolumen und die vierfache Menge mit 40% Inokulationsvolumen getestet. Die Kulturverläufe der Ansätze sind nachfolgend in Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind die Parameter Rührerdrehzahl und Output der Laugepumpe im Anhang dargestellt (Abbildung VIII und Abbildung IX).

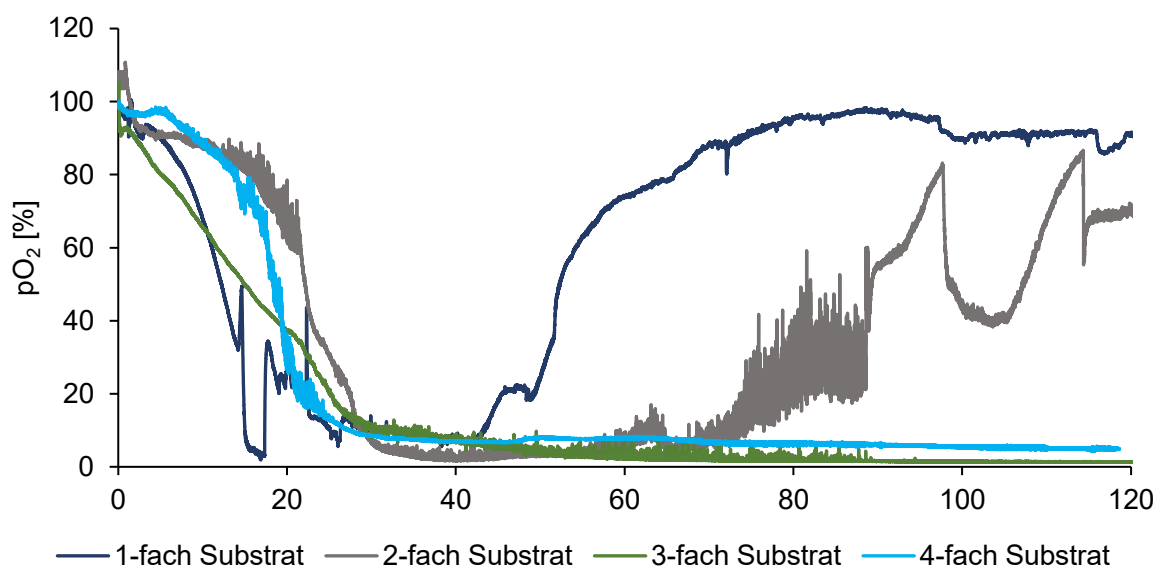


Abbildung 29: Aufzeichnung des Partialdrucks des gelösten Sauerstoffs (pO_2) in [% der Sättigung] während des Kulturverlaufs im Bioreaktor mit doppelter, dreifacher und vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Inokulationsvolumen

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher, doppelter, dreifacher bzw. vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Volumen (300 mL -1200 mL) einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Für die Kultivierung wurde der poröse Sparger der Firma BioThrust verwendet. Die Messung des pO_2 -Gehaltes erfolgte on-line mittels Clark-Elektrode. Als Rührwerk dienten zwei Rushton-Impeller.

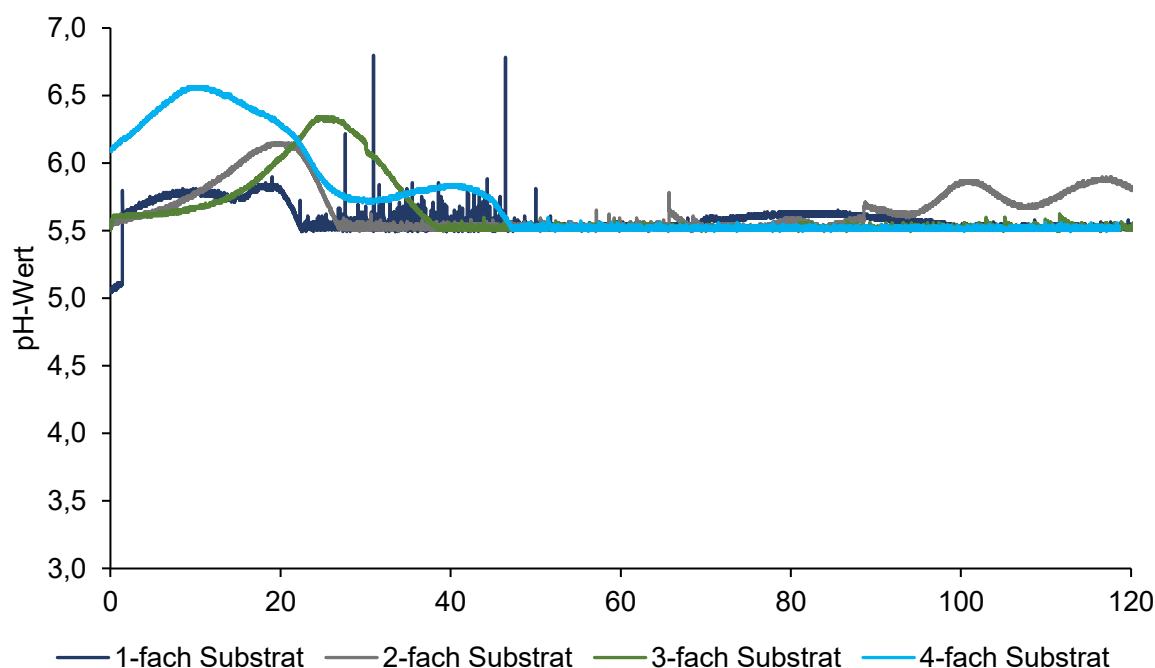


Abbildung 30: Aufzeichnung des pH-Wertes während des Kulturverlaufs im Bioreaktor mit doppelter, dreifacher und vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Inokulationsvolumen

Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher, doppelter, dreifacher bzw. vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Volumen (300 mL -1200 mL) einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Für die Kultivierung wurde der poröse Sparger der Firma BioThrust verwendet. Als Rührwerk dienten zwei Rushton-Impeller. Die pH-Steuerung erfolgte mittels 0,05 M NaOH und löste bei $pH < 5,5$ aus. Die Messung des pH-Wertes erfolgte on-line mittels pH-Elektrode.

Tabelle 47 enthält die Chitin-Gehalte der Ansätze mit erhöhtem Substratgehalt und angepasstem Inokulationsvolumen.

Tabelle 47: Chitin-Gehalte der Bioreaktorläufe mit doppelter, dreifacher und vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Inokulationsvolumen

Die Analysen der Bioreaktorläufe erfolgten aus dem lyophilisierten Mycel nach 2.7.2.1, n=4 (2-fache Substratkonzentration); n=3 (3-fache Substratkonzentration), n=2 (1-fache, 4-fache Substratkonzentration)

	Chitingehalt $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}}\right]$
Einfache Substratkonzentration	3,2 ± 0,4
Doppelte Substratkonzentration	3,0 ± 0,4
Dreifache Substratkonzentration	2,8 ± 0,2
Vierfache Substratkonzentration	2,7 ± 0,1

Kultivierung im 30-Liter-Bioreaktor

Nach der Etablierung der Kultivierung im 5-Liter-Bioreaktor wurde der Prozess in den 20-Liter-Maßstab übertragen. Dafür wurde ein 30-Liter-Bioreaktor der Firma Bioengineering verwendet. Die Kultivierungsparameter sind unter 2.4.4.2 aufgeführt.

Zunächst wurde der Wachstumsverlauf in Rübenschnitzel-Melasse-Medium aufgenommen. Der Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 31 und Abbildung 32 dargestellt. Zur Bewertung des Wachstums wurde der Ergosterol-Gehalt nach 2.7.1 bestimmt (Abbildung 33). Aufgrund der geringen Probenmenge wurde jeweils nur eine Einfachbestimmung durchgeführt. Für den Erntetag (Tag 6) wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

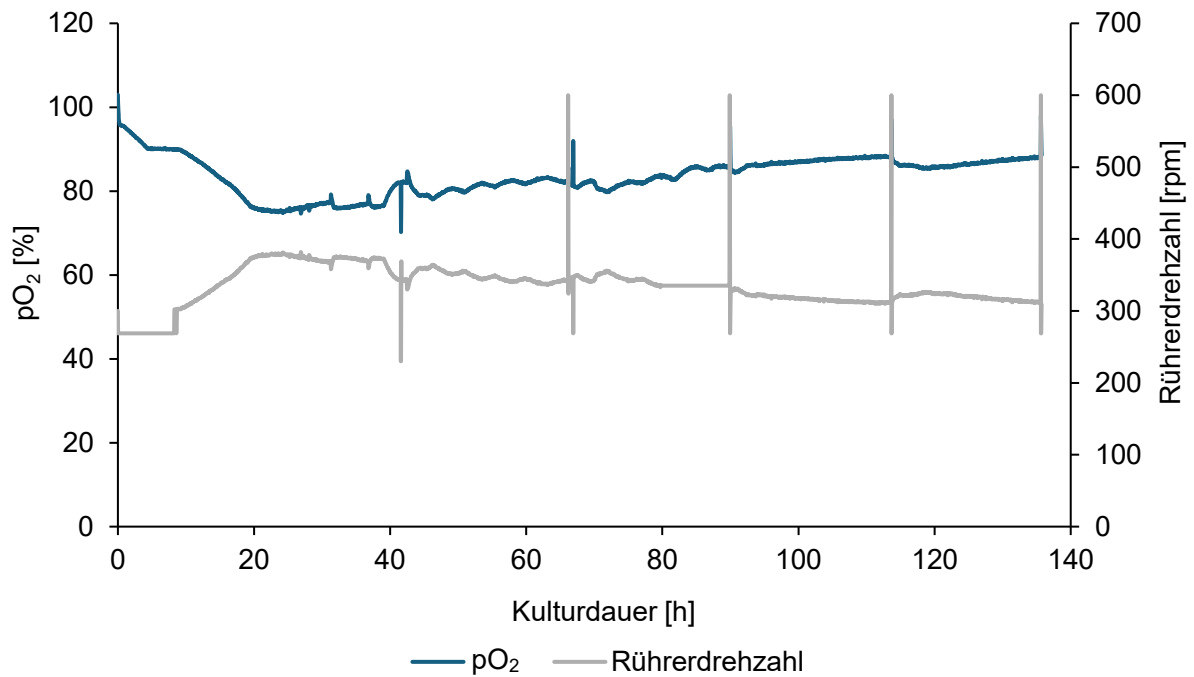


Abbildung 31: Aufzeichnung des gelösten Sauerstoffs (pO_2) sowie der Rührerdrehzahl während des Kulturverlaufs im 30-Liter-Bioreaktor mit einfacher Substratkonzentration und 10% Inokulationsvolumen. Im 30-Liter-Bioreaktor wurden zwanzig Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher Substratkonzentration mit zwei Litern einer 6-tägigen Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Ab Tag 3 wurde täglich eine Probe steril über das Ablass-Ventil entnommen und die Rührerdrehzahl dazu kurzzeitig auf 600 rpm erhöht. Die Messung des pO_2 -Gehaltes erfolgte on-line mittels Clark-Elektrode. Als Rührwerk dienten zwei Rushton-Impeller. Der pO_2 -Gehalt wurde auf 80% eingestellt und mit der Rührerdrehzahl gekoppelt.

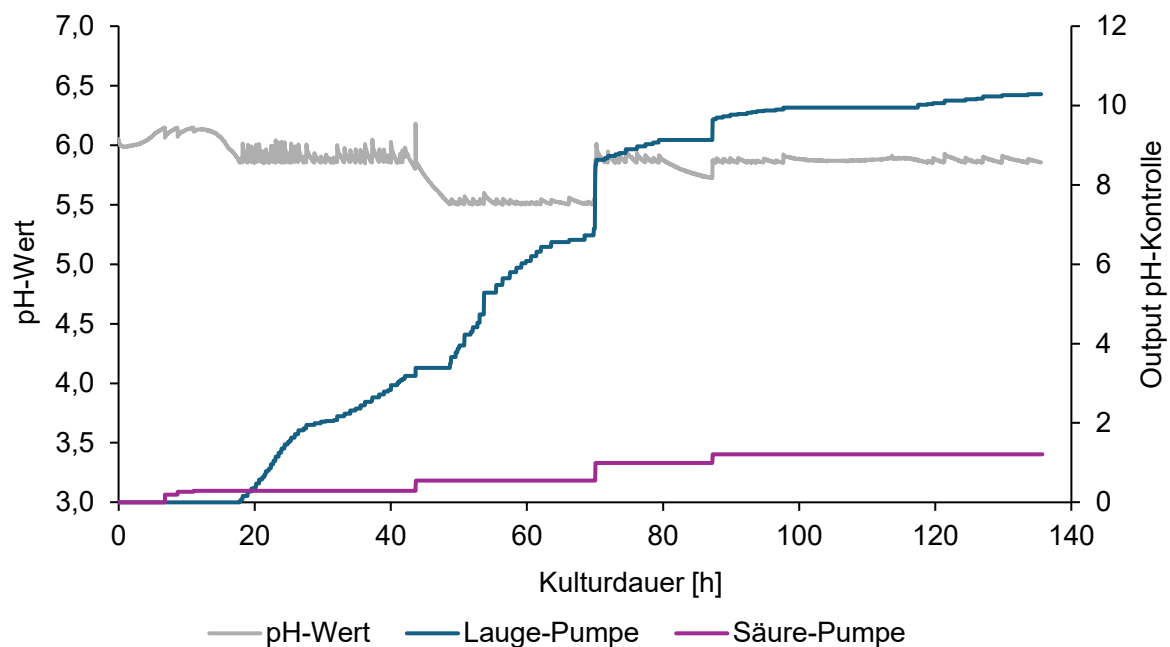


Abbildung 32: Aufzeichnung des pH-Wertes sowie des Verbrauchs an Säure und Lauge während des Kulturverlaufs im 30-Liter-Bioreaktor mit einfacher Substratkonzentration und 10% Inokulationsvolumen. Im 30-Liter-Bioreaktor wurden zwanzig Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher Substratkonzentration mit zwei Litern einer 6-tägigen Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Ab Tag 3 wurde täglich eine Probe steril über das Ablass-Ventil entnommen und die Rührerdrehzahl dazu kurzzeitig auf 600 rpm erhöht. Die Messung des pH-Wertes erfolgte on-line mittels pH-Elektrode. Die Kaskade wurde so eingestellt, dass die pH-Korrektur bei $pH < 5,5$ und $pH > 6,5$ ausgelöst wurde. Zur pH-Korrektur wurden 0,1 M NaOH und 0,05 M H_2SO_4 verwendet.

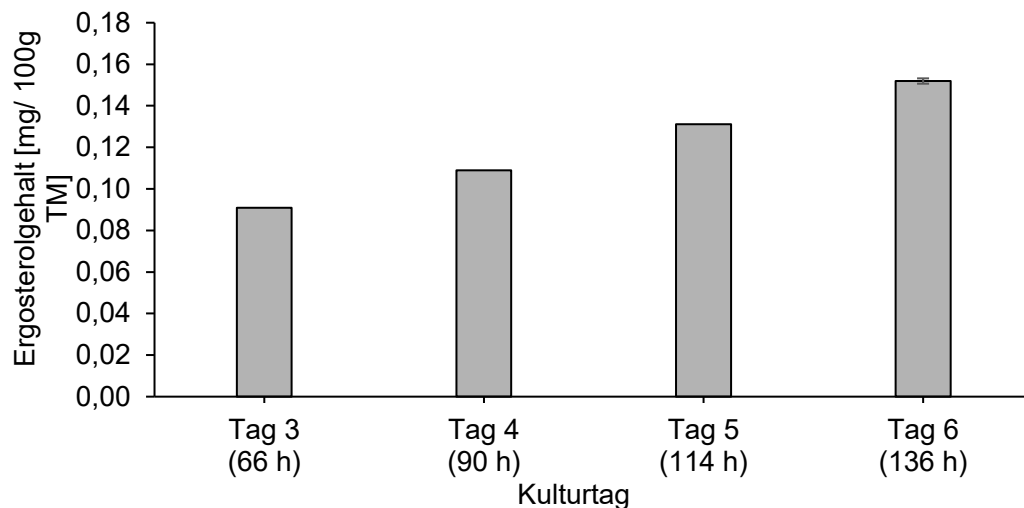


Abbildung 33: Wachstumsverlauf von *L. squarrosulus* im 30-Liter-Bioreaktor mit einfacher Substratkonzentration und 10% Inokulationsvolumen

Im 30-Liter-Bioreaktor wurden zwanzig Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher Substratkonzentration mit zwei Litern einer 6-tägigen Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Ab Tag 3 wurde täglich eine Probe steril über das Ablass-Ventil entnommen und die Rührerdrehzahl dazu kurzzeitig auf 600 rpm erhöht. Die ersten Milliliter der Probe wurden verworfen und das Mycel durch Zentrifugieren vom Überstand getrennt. Das erhaltene Mycel wurde lyophilisiert und der Ergosterol-Gehalt nach 2.7.1 analysiert. n=1, n=2 (Tag 6)

Ein Foto des im 30-Liter-Bioreaktor produzierten Mycels ist in Abbildung 34 dargestellt.



Abbildung 34: Fotos des Mycels von *L. squarrosulus* nach 6-tägiger Kultivierung im 30-Liter Bioreaktor
 Im 30-Liter-Bioreaktor wurden zwanzig Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher Substratkonzentration mit zwei Litern einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Die Ernte des Mycels erfolgte mittels 1 mm Sieb und Passiertuch.

3.1.5 Alternative Substrate

3.1.5.1 Chemische Zusammensetzung der Substrate

Für eine erhöhte Flexibilität des Prozesses wurden weitere Substrate der Firma Nordzucker auf ihre Eignung für den Fermentationsprozess untersucht. Dazu wurden die Substrate frische und dampfgetrocknete Rübenschnitzel(-Pellets) nach 2.8.1, 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8 auf ihre chemische Zusammensetzung analysiert (Abbildung 35).

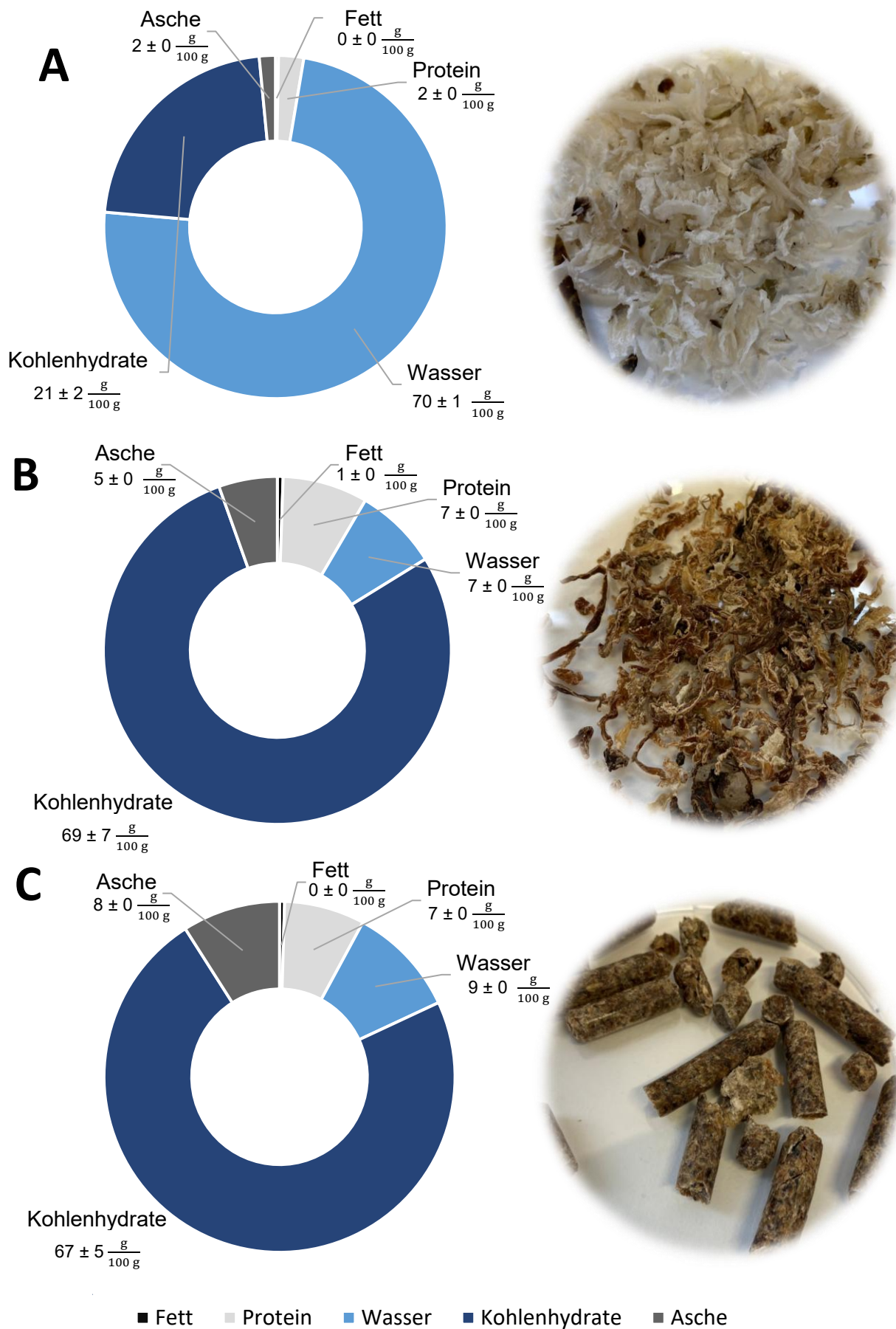


Abbildung 35: Mittelwerte der chemischen Zusammensetzung und Fotos der Substrate mit A: frische Rübenschnitzel, B: dampfgetrocknete Rübenschnitzel, C: dampfgetrockneten Rübenschnitzel-Pellets. Die Analyse erfolgte nach 2.8.1, 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8.

Auf Basis der chemischen Zusammensetzung wurden die Medienzusammensetzungen für weiterführende Versuche berechnet. Da das Ziel darin bestand, die für die vorherigen Versuche verwendeten hochtemperaturgetrockneten Rübenschnitzel-Pellets je nach Werk und Jahreszeit durch dampfgetrocknete Rübenschnitzel(-Pellets) bzw. frische Schnitzel zu ersetzen, sollte hier eine vergleichbare chemische Zusammensetzung in den Medien enthalten sein. Es ergaben sich daraus die folgenden Zusammensetzungen der Nährmedien:

Dampfgetrocknete Rübenschnitzel: 1,5 g Rübenschnitzel + 0,75 g Melasse pro 100 mL

Dampfgetrocknete Rübenschnitzel-Pellets: 1,5 g Rübenschnitzel + 0,75 g Melasse pro 100 mL

Frische Rübenschnitzel: 4,5 g Rübenschnitzel + 0,75 g Melasse pro 100 mL

Für einen besseren Vergleich der verschiedenen Rübenschnitzel wurde für die dampfgetrockneten Schnitzel und Pellets zusätzlich der Zuckergehalt enzymatisch nach 2.8.4 analysiert (Tabelle 48). Der Melassierungsgrad betrug nach den Angaben von Nordzucker etwa 2%.

Tabelle 48: Mittels enzymatischem Assay nach 2.8.4 analysierte Zuckergehalte in dampfgetrockneten Rübenschnitzeln und Pellets, n=2

	Dampfgetrocknete Rübenschnitzel (lose)	Dampfgetrocknete Rübenschnitzel (Pellets)
Glucose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$	1,36 ± 0,02	1,36 ± 0,03
Fructose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$	1,55 ± 0,00	1,52 ± 0,03
Saccharose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$	3,22 ± 0,09	3,18 ± 0,04

3.1.5.2 Kultivierung

L. squarrosulus wurde vergleichend in dem Nährmedium mit hochtemperaturgetrockneten Rübenschnitzel-Pellets und den Nährmedien mit dampfgetrockneten bzw. frischen Rübenschnitzeln kultiviert. Nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen wurden die Kulturen geerntet und die Parameter Trockenmasse, Proteingehalt und Ergosterolgehalt nach 2.8.1, 2.8.2 und 2.7.1 bestimmt (Abbildung 38 und Abbildung 39). Abbildung 36 zeigt Fotos der Kulturen vor der Ernte.

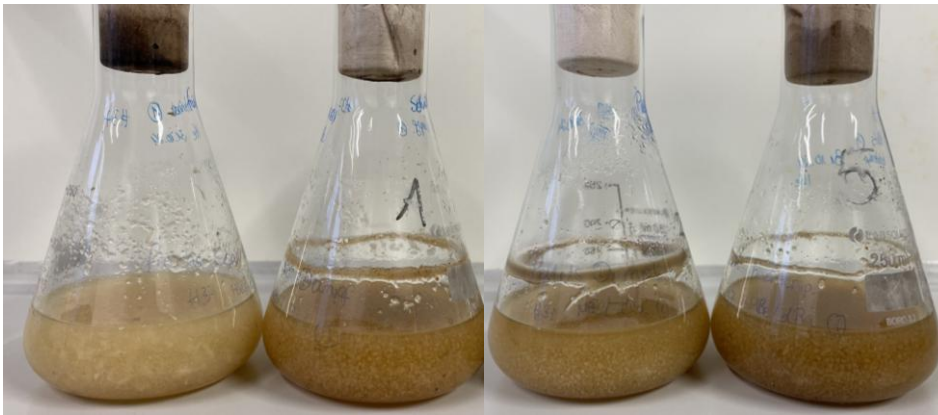


Abbildung 36: Kulturen von *L. squarrosulus* nach 7-tägiger Kultivierung auf verschiedenen Formen von Rübenschnitzeln

Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Die verwendeten Substrate waren von links nach rechts: frische Rübenschnitzel, dampfgetrocknete Rübenschnitzel, dampfgetrocknete Rübenschnitzel-Pellets, hochtemperaturgetrocknete Rübenschnitzel-Pellets

Bei allen Substraten lag ein deutlich erkennbares Mycelwachstum vor. Die Kulturen unterschieden sich jedoch in der Färbung, wobei die Kultur mit dem Substrat „frische Rübenschnitzel“ die hellste Färbung aufwies. Eine dunkle Färbung zeigten die Kulturen mit hochtemperaturgetrockneten Rübenschnitzel-Pellets.

Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten zeigten sich auch in der Färbung des lyophilisierten Mycels (Abbildung 37).



Abbildung 37: Lyophilisiertes Mycel von *L. squarrosulus* nach 7-tägiger Kultivierung auf verschiedenen Formen von Rübenschnitzeln

Links: frische Rübenschnitzel, Mitte: dampfgetrocknete Rübenschnitzel-Pellets, rechts: hochtemperatur-getrocknete Rübenschnitzel-Pellets

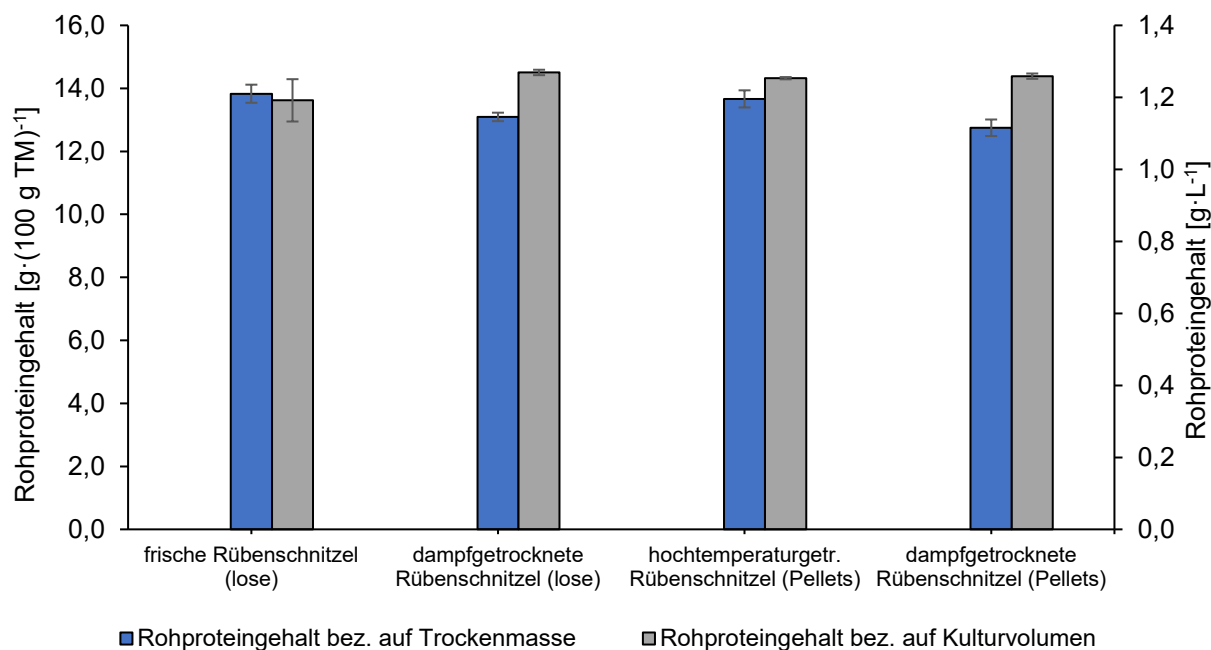


Abbildung 38: Rohproteingehalte des Mycels von *L. squarrosulus* nach 7-tägiger Kulturdauer auf verschiedenen Formen von Rübenschnitzeln

Die Kulturen wurden für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert und die Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels nach 2.8.2 ermittelt, n=2

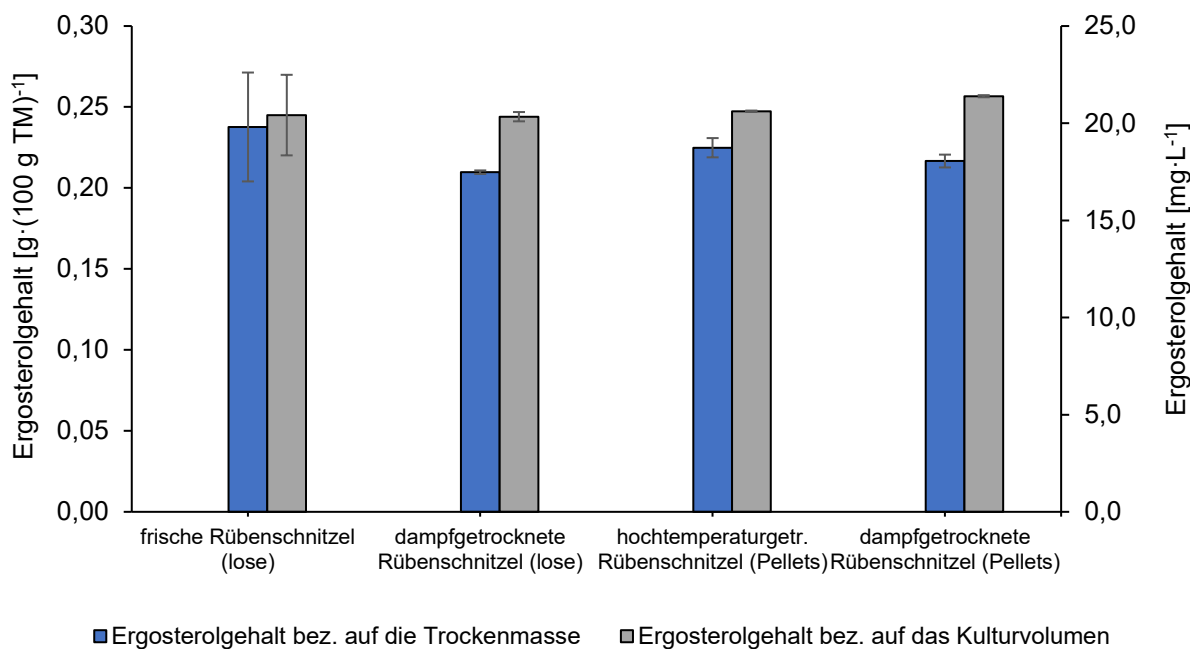


Abbildung 39: Ergosterolgehalte des Mycels von *L. squarrosulus* nach 7-tägiger Wachstumsdauer auf verschiedenen Formen von Rübenschnitzeln

Die Kulturen wurden für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert und die Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels nach Derivatisierung mittels GC-FID (2.7.1) analysiert, n=2.

3.1.6 Chemische Zusammensetzung des produzierten Mycels von *L. squarrosulus*

Im Bioreaktor auf Rübenschnitzel-Melasse-Medium und auf Malzextrakt kultiviertes Mycel wurden bezüglich der chemischen Zusammensetzung nach 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8 untersucht. Zusätzlich erfolgte auch die Analyse des Aminosäure- und Fettsäure-Spektrums nach 2.8.3 und 2.8.6. Sowohl bei der Aminosäure-, als auch bei der Fettsäureverteilung wurde das verwendete Substrat „Rübenschnitzel“ gegenübergestellt.

3.1.6.1 Chemische Zusammensetzung

Für die Analysen wurden Biomassen aus dem 5-Liter-Bioreaktor verwendet. Der Pilzgehalt in der Trockenmasse betrug, ermittelt über Ergosterol (45 ± 5)%.

Da die Trockenmasse des Mycels jeweils < 10 % betrug, ist in Abbildung 40 die chemische Zusammensetzung des Mycels, bezogen auf die Trockenmasse dargestellt. Die entsprechenden Werte, bezogen auf das feuchte Mycel, sind in Tabelle 49 aufgeführt.

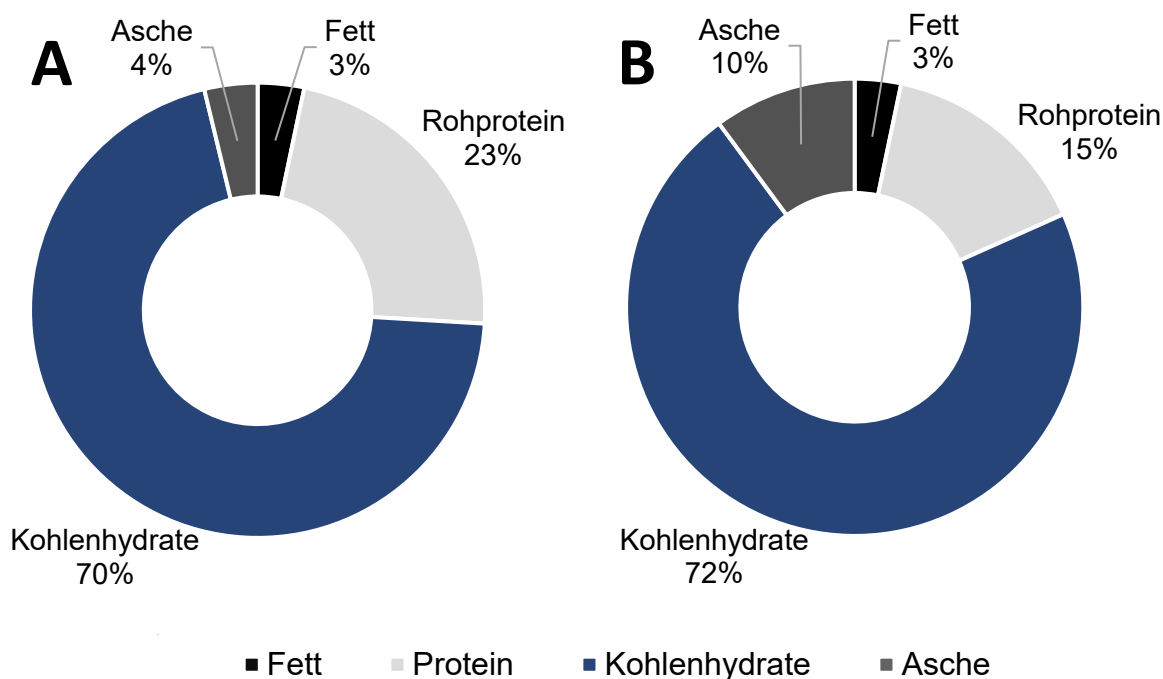


Abbildung 40: Prozentuale chemische Zusammensetzung des lyophilisierten Mycels von *L. squarrosulus* bezogen auf die Trockenmasse

A: *L. squarrosulus* submers kultiviert in Malzextrakt-Medium, **B:** *L. squarrosulus* submers kultiviert in Rübenschnitzel-Melasse-Medium; Analytik nach 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8; Rohprotein, Asche- und Kohlenhydratgehalt mit $n=2$, Fettgehalt mit $n=1$

Tabelle 49: Chemische Zusammensetzung des Mycels von *L. squarrosulus* kultiviert in Malzextrakt-Medium und Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Die Analysen erfolgten nach 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8; Protein- und Kohlenhydratgehalt mit n=2, Wasser-, Fett- und Aschegehalt mit n=1.

Analyt	Ergebnis bei Kultivierung in Malzextrakt-Medium $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Ergebnis bei Kultivierung in Rübenschnitzel -Medium $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$
Fett	0,2	0,2
Rohprotein	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,0
Reinprotein	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0
Wasser	92,5	93,6
Kohlenhydrate	4,8 ± 0,9	4,2 ± 0,3
Asche	0,3	0,6

3.1.6.2 Fettsäurezusammensetzung

Zur Bestimmung der Fettsäureverteilung wurde lyophilisiertes Mycel von *L. squarrosulus*, kultiviert in Malzextrakt-Medium sowie in Rübenschnitzel-Melasse-Medium, analysiert (Abbildung 41). Die Aufarbeitung folgte nach Abschnitt 2.8.6. Zum Vergleich wurde auch das Fettsäure-Profil des verwendeten Substrates Rübenschnitzel analysiert.

Die entsprechenden Chromatogramme sind dem Anhang (Abbildung X, Abbildung XII, Abbildung XIII, Abbildung XIV) zu entnehmen.

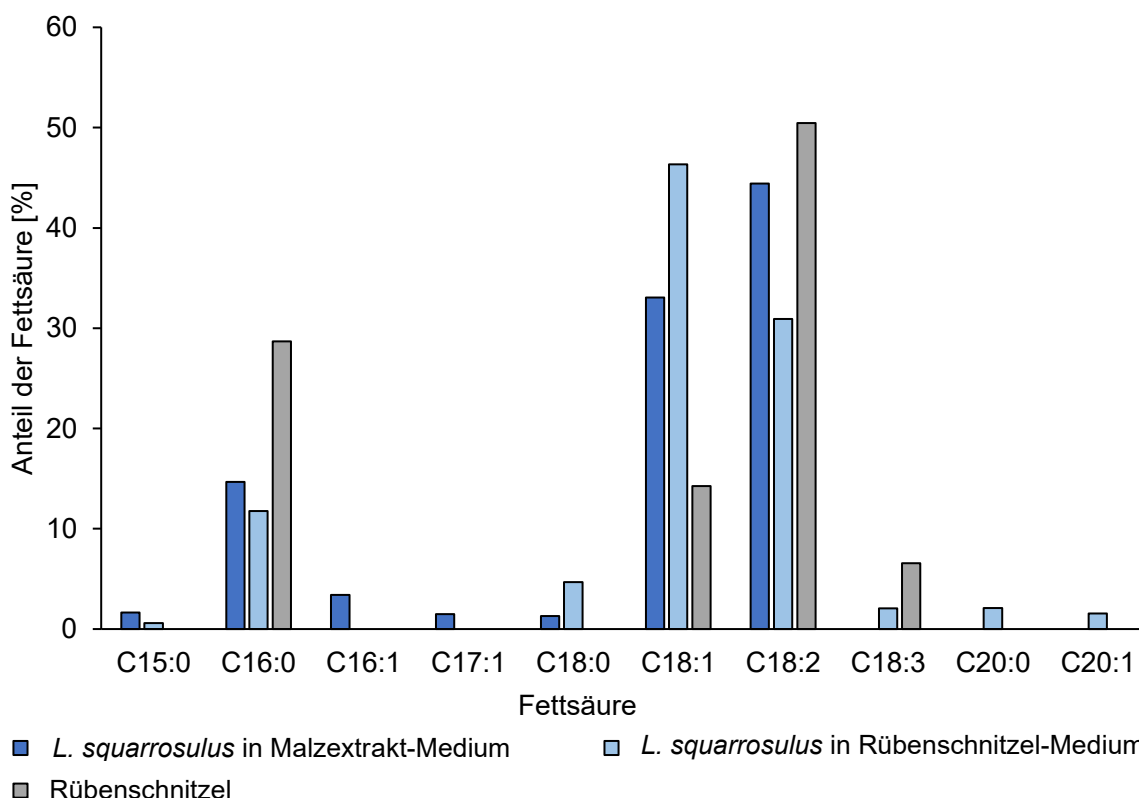


Abbildung 41: Fettsäure-Verteilung von Rübenschnitzeln sowie lyophilisiertem Mycel von *L. squarrosulus* kultiviert in Malzextrakt- und Rübenschnitzel-Melasse-Medium.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach 2.8.6, die Messung erfolgte mittels GC-MS/MS nach 2.8.6, n=1

Bei Ölsäure (C18:1) waren beide Isomere im Chromatogramm nachweisbar, sodass der Wert von 46 % der Summe des *Z*- und *E*- Isomers entspricht.

Bei dem in Malzextrakt kultivierten Mycel wurden neben den geradzahigen Fettsäuren auch die beiden Fettsäuren Pentadecansäure (C15:0) sowie Delta-9-*cis*-Heptadecansäure (C17:1) nachgewiesen.

3.1.6.3 Aminosäure-Profil

Zur Beurteilung der Qualität der im Mycel enthaltenen Proteine wurde das Aminosäure-Profil (Abbildung 42) bestimmt. Die Analyse erfolgte nach Abschnitt 2.8.3 für lyophilisiertes Mycel des Pilzes *L. squarrosulus*, kultiviert in Rübenschnitzel-Medium bzw. Malzextrakt-Medium sowie für das Substrat Rübenschnitzel.

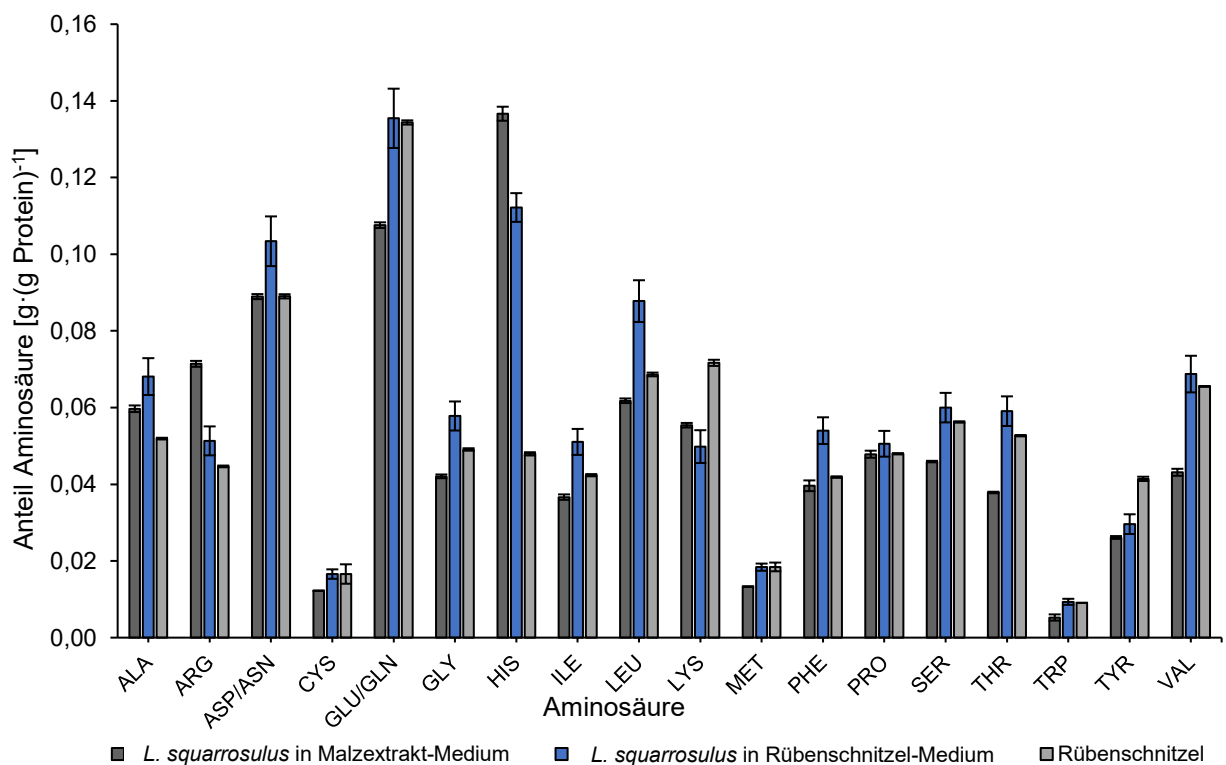


Abbildung 42: Aminosäure-Profil von Rübenschnitzeln sowie lyophilisiertem Mycel von *L. squarrosulus* kultiviert auf Malzextrakt- und Rübenschnitzel-Melasse-Medium
Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in drei getrennten Ansätzen nach 2.8.3, die Messung erfolgte mittels HPLC-DAD mit Nachsäulenderivatisierung, n=2.

Die nach Formel (12) und (13) berechneten Biologischen Wertigkeiten sowie die limitierenden Aminosäuren sind in Tabelle 50 aufgeführt. Dargestellt sind auch die nach Formel (8) und (9) berechneten Kjeldahl-Faktoren.

Tabelle 50: Biologische Wertigkeiten, limitierende Aminosäuren und berechnete Kjeldahl-Faktoren für Rübenschnitzel sowie für *L. squarrosulus*, kultiviert in Rübenschnitzel-Melasse-Medium und in Malzextrakt

Die Analysen erfolgten nach 2.8.3 mit n= 4 (LSQ in Rübenschnitzel-Melasse-Medium) bzw. n=2 (LSQ im Malzextrakt, Rübenschnitzel)

	Biologische Wertigkeit	1. limitierende Aminosäure	2. limitierende Aminosäure	Kjeldahl-Faktor (Rohprotein)	Kjeldahl-Faktor (Reinprotein)
<i>L. squarrosulus</i> in Rübenschnitzel-Melasse-Medium	92 ± 1	Lysin (85 ± 1)	Tryptophan (88 ± 3)	5,90 ± 0,01	5,47 ± 0,10
<i>L. squarrosulus</i> in Malzextrakt	85 ± 1	Tryptophan (57 ± 6)	Methionin und Cystein (78 ± 1)	5,41 ± 0,01	4,77 ± 0,02
Rübenschnitzel	96 ± 1	Tryptophan (95 ± 1)	Methionin und Cystein (97 ± 8)	6,20 ± 0,00	5,04 ± 0,01

Mithilfe der in Tabelle 50 aufgeführten Kjeldahl-Faktoren wurde der Rohproteingehalt aller in dieser Arbeit analysierten Proben von *L. squarrosulus* berechnet. Die Aminosäure-Analytik sowie die Berechnung der Kjeldahl-Faktoren wurde auch für *D. tabescens* zur Berechnung der Rohproteingehalte durchgeführt. Die Ergebnisse sowie die berechneten Kjeldahl-Faktoren und biologischen Wertigkeiten sind dem Anhang (Tabelle II und Abbildung XV) zu entnehmen.

3.1.7 Produktentwicklung und sensorische Evaluierung

Durch die Firma Metten wurde ein erster Prototyp der Produktkategorie „Bratwurst“ hergestellt. Dabei wurde sowohl Mycel des Pilzes *L. squarrosulus* als auch Fleisch verwendet, sodass es sich um ein Hybrid-Produkt handelte.

3.1.7.1 Chemische Zusammensetzung

Die Rezepturen sowie die analysierten chemischen Zusammensetzungen beider Produkte sind nachfolgend in Tabelle 51 und Abbildung 43 dargestellt. Die Ergebnisse der chemischen Zusammensetzung wurden auf die Trockenmasse bezogen. Der Wassergehalt des Hybrid-Produktes lag bei (60 ± 1) g·(100 g)⁻¹, der Wassergehalt des konventionellen Produktes Bratwurst „klassisch“ bei (57 ± 1) g·(100 g)⁻¹.

Tabelle 51: Rezepturen des Hybrid-Produktes sowie des konventionellen Produktes Bratwurst „klassisch“

Produkt	Zutaten
Hybrid-Produkt	34% Schweinefleisch, 21% Mycel von <i>L. squarrosulus</i> auf Rübenschntzel-Melasse-Medium, 21% Eis, 19% Sonnenblumenöl, 5% Gewürze und Zusatzstoffe (u.a. Methylcellulose)
Konventionelles Produkt Bratwurst „klassisch“	80% Schweinefleisch, Speck, Trinkwasser, jodiertes Speisesalz (Speisesalz, Kaliumjodat), Dextrose, Gewürze, Stabilisatoren: Diphosphate, Gewürzextrakte, Schweinedarm

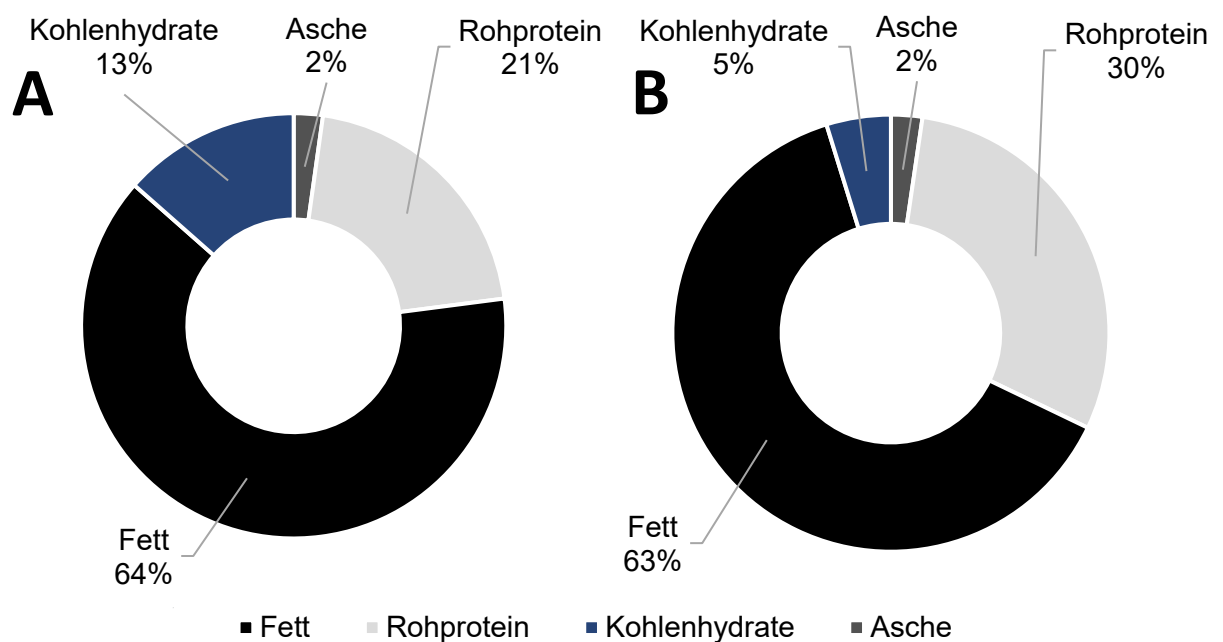


Abbildung 43: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Hybrid-Produktes sowie des konventionellen Produktes Bratwurst „klassisch“ bezogen auf die Trockenmasse

A: Hybrid-Produkt mit 21% Mycel **B:** konventionelles Produkt Bratwurst „klassisch“. Die Analytik erfolgte nach 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8. Zur Berechnung des Rohproteingehaltes wurde der Kjeldahlfaktor 6,25 verwendet. n=2

Die Komponenten Rohprotein und Fett wurden hier noch einmal näher betrachtet und das Aminosäureprofil (Abbildung 44) sowie die Fettsäureverteilung (Abbildung 45) nach 2.8.3 und 2.8.6 analysiert.

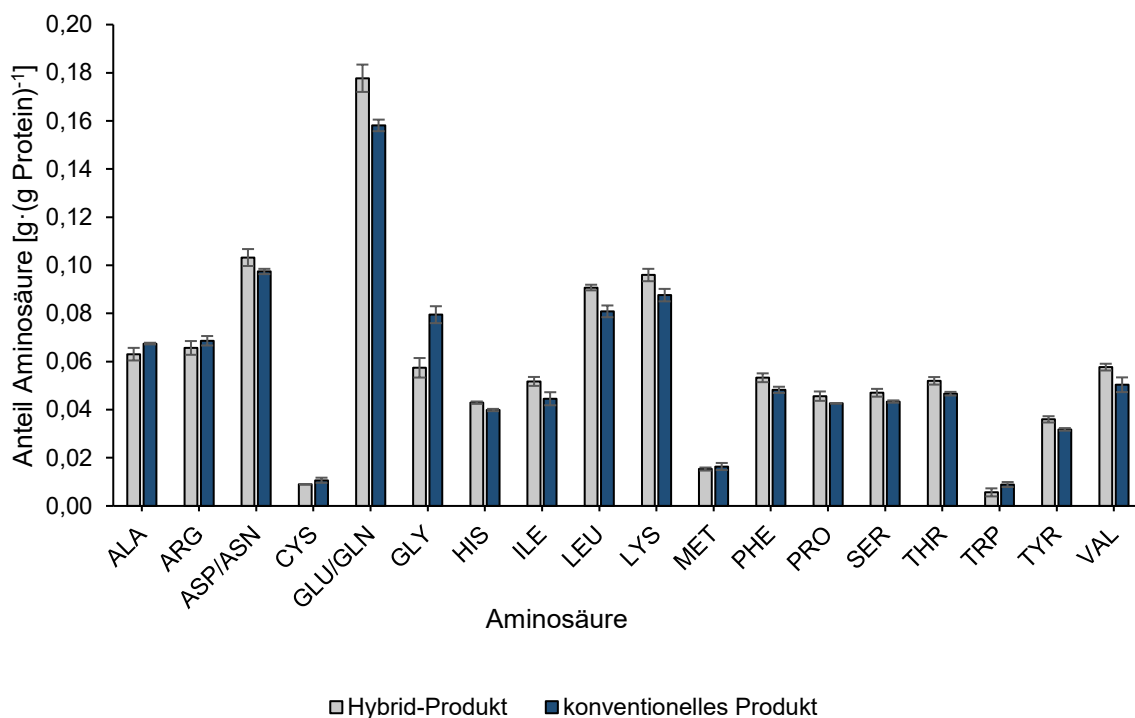


Abbildung 44: Aminosäure-Profil des Hybrid-Produktes sowie des konventionellen Produktes Bratwurst „klassisch“

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in drei getrennten Ansätzen nach 2.8.3, die Messung erfolgte mittels HPLC-DAD mit Nachsäulenderivatisierung, n=2.

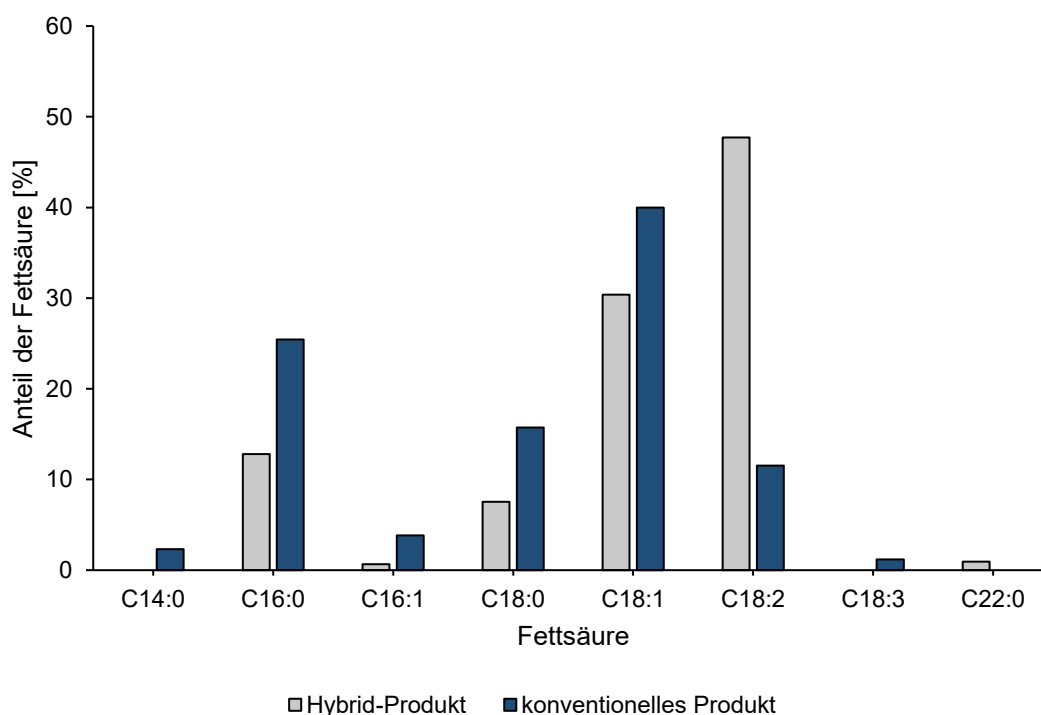


Abbildung 45: Fettsäure-Verteilung des Hybrid-Produktes sowie des konventionellen Produktes

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach 2.8.6, die Messung erfolgte mittels GC-MS/MS nach 2.8.6., n=1

3.1.7.2 Sensorische Evaluierung

Zur sensorischen Evaluierung wurden das Hybrid-Produkt sowie das konventionelle Produkt der Firma Metten, die Bratwurst „klassisch“, gebraten und nach dem Prinzip der Dreiecksprüfung (2.5.3) verkostet. Abbildung 46 zeigt das hergestellte Hybrid-Produkt neben der konventionellen Bratwurst „klassisch“ der Firma Metten im ungebratenen und gebratenen Zustand.



Abbildung 46: Fotos der ungebratenen und gebratenen Produkte
Jeweils oben: Hybrid-Produkt und unten: konventionelles Produkt Bratwurst „klassisch“

An dem sensorischen Panel nahmen 41 Personen teil, wovon 40 Prüfbögen auswertbar waren. Die Altersverteilung der Teilnehmenden ist in Abbildung 47 gezeigt.

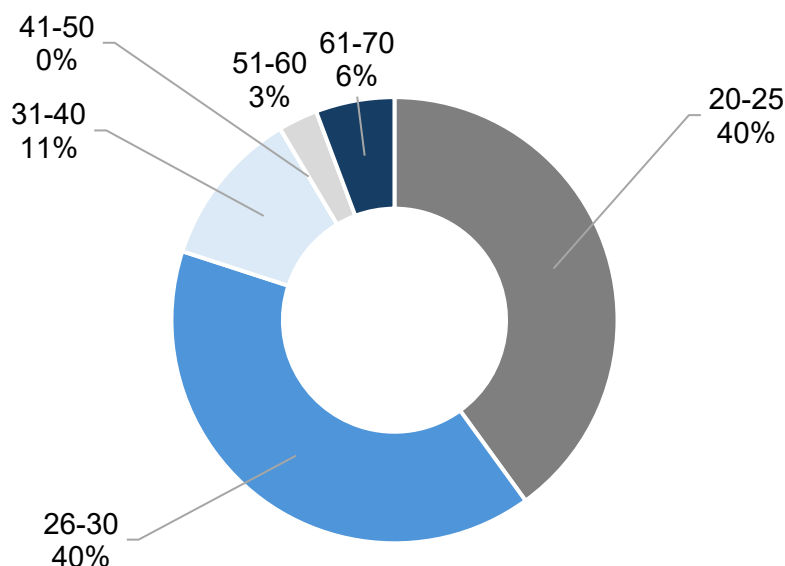


Abbildung 47: Altersverteilung der Teilnehmer des Sensorik-Panels

Die Ergebnisse der Bewertung von Geruch, Geschmack und Mundgefühl/Textur sind in Form von Netzdiagrammen in Abbildung 48, Abbildung 49 und Abbildung 50 dargestellt.

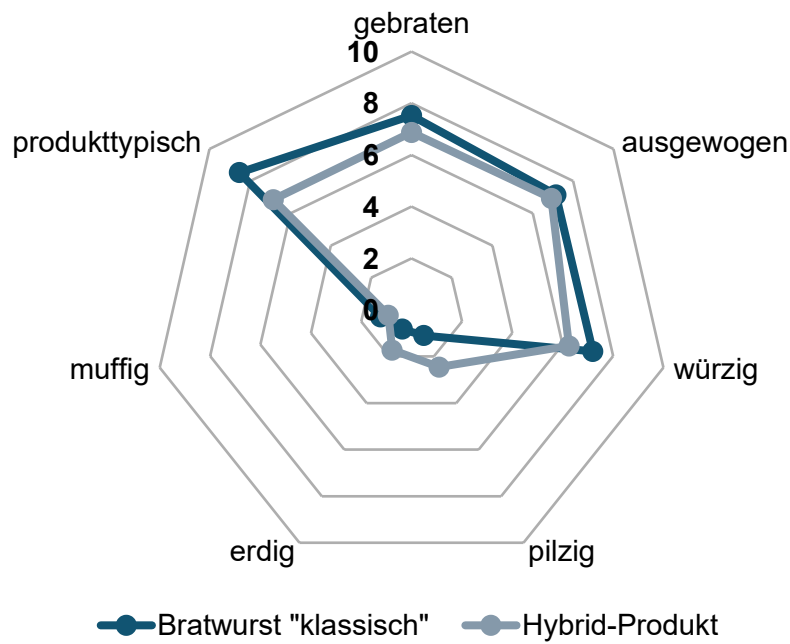


Abbildung 48: Netzdiagramm zum Geruchseindruck des konventionellen Produktes und des Hybridproduktes
 Dargestellt sind die Mittelwerte der Geruchseindrücke von 40 Teilnehmenden des Sensorik-Panels

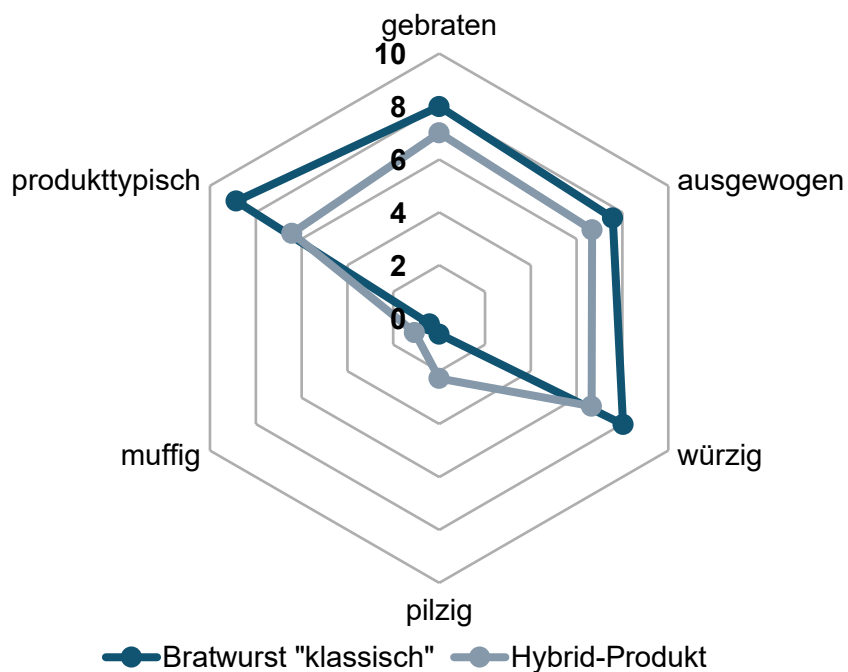


Abbildung 49: Netzdiagramm zum Geschmackseindruck des konventionellen Produktes und des Hybridproduktes
 Dargestellt sind die Mittelwerte der Geschmackseindrücke von 40 Teilnehmenden des Sensorik-Panels

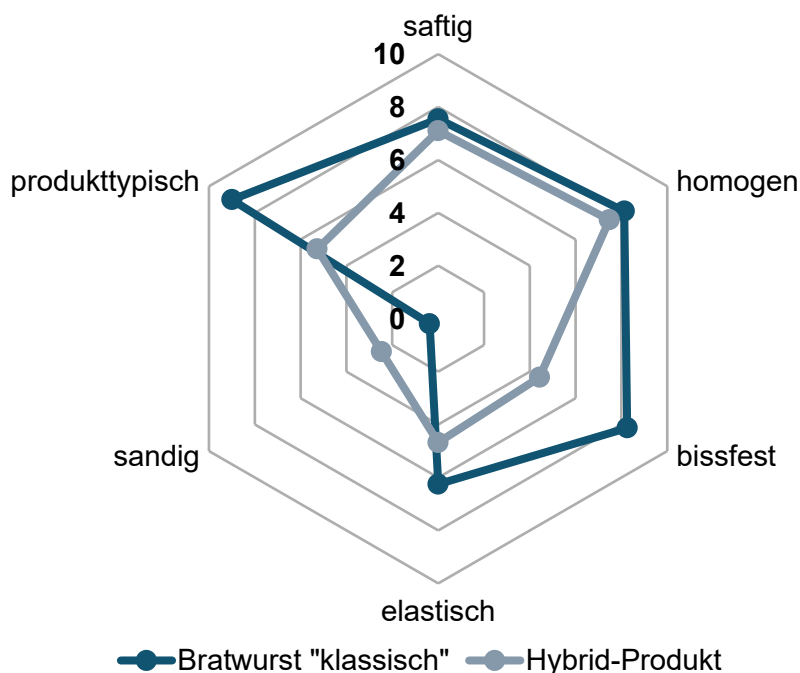


Abbildung 50: Netzdiagramm zum Mundgefühl und der Textur des konventionellen Produktes und des Hybridproduktes
 Dargestellt sind die Mittelwerte der Eindrücke zu Mundgefühl und Textur von 40 Teilnehmenden des Sensorik-Panels

Die Gesamteindrücke beider Produkte sind in Tabelle 52 dargestellt.

Tabelle 52: Gesamteindruck der Panel-Teilnehmer des konventionellen Produktes Bratwurst „klassisch“ und des Hybrid-Produkts in Bezug auf Geruch, Geschmack und Mundgefühl/Textur

	Bratwurst „klassisch“	Hybrid-Produkt
Geruch	8,1 ± 1,2	7,4 ± 1,6
Geschmack	8,4 ± 1,1	7,2 ± 1,5
Mundgefühl/ Textur	8,5 ± 1,1	6,2 ± 1,6

Bei dem Hybrid-Produkt wurde von einigen Probanden ein sandiges Mundgefühl wahrgenommen. Um die Ursache des sandigen Mundgefühls zu klären, wurde von dem Substrat frische Rübenschnitzel sowie dem Hybrid-Produkt der Gehalt an säureunlöslicher Asche nach 2.8.9 bestimmt (Tabelle 53).

Tabelle 53: Gehalt an säureunlöslicher Asche im Substrat sowie im Hybrid-Produkt

	säureunlösliche Asche $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}} \right]$
frische Rübenschnitzel	1,8 ± 0,1
Hybrid-Produkt	0,6 ± 0,1

3.2 Substrate Silierte Rübenschnitzel und Vinasse

3.2.1 Chemische Zusammensetzung der Substrate und Medienzusammensetzung

Die beiden bereits durch Mikroorganismen fermentierten Nebenströme Vinasse und silierte Rübenschnitzel wurden ebenfalls auf die Eignung als Fermentationssubstrat für Basidiomyceten getestet. Dazu wurden die chemische Zusammensetzung sowie das Aminosäureprofil beider Substrate analysiert (Abbildung 51, Abbildung 52, Tabelle 54 und Tabelle 55).

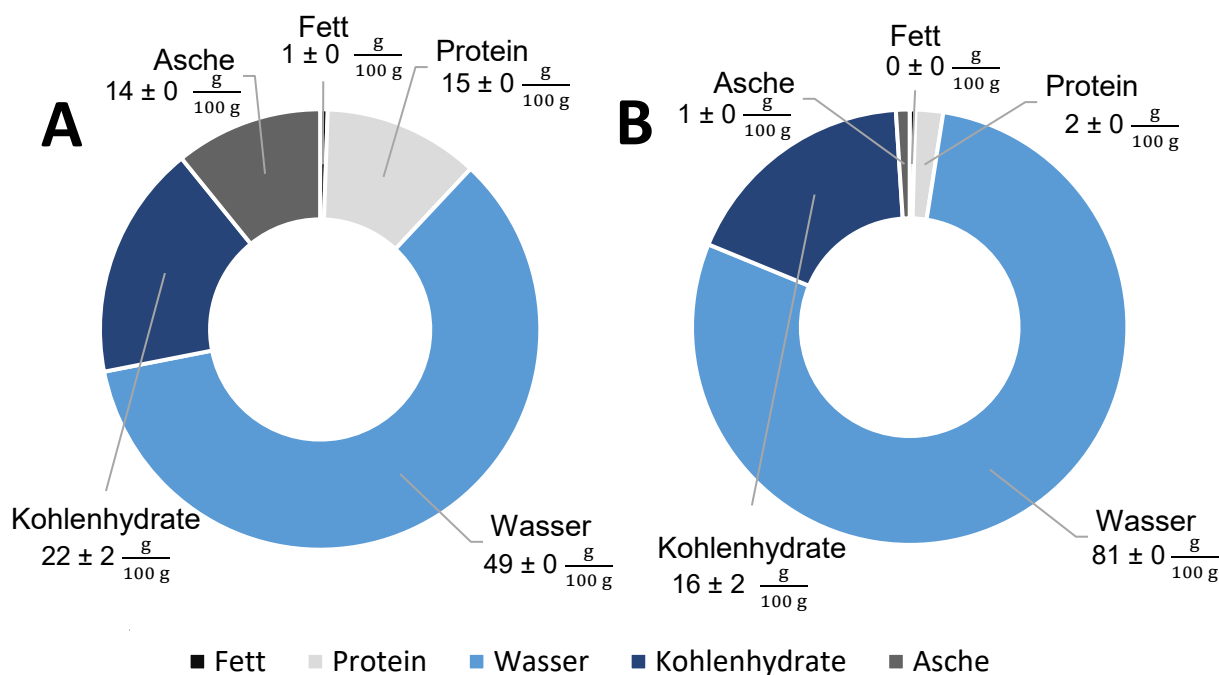


Abbildung 51: Chemische Zusammensetzung der Substrate mit **A:** Vinasse, **B:** silierte Rübenschnitzel. Die Analytik wurde nach den Methoden 2.8.1, 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8 durchgeführt.

Beide Substrate enthielten einen großen Anteil Wasser und nur geringe Anteile an Protein, Fett und Asche. Zur besseren Übersicht zeigt Tabelle 54 die chemische Zusammensetzung bezogen auf die Trockenmasse.

Tabelle 54: Chemische Zusammensetzung [%] der Substrate silierte Rübenschnitzel und Vinasse bezogen auf die Trockenmasse

Die Analytik wurde nach den Methoden 2.8.1, 2.8.2, 2.8.4, 2.8.7 und 2.8.8 durchgeführt.

	Vinasse [%]	Silierte Rübenschnitzel [%]
Asche	27,1 ± 0,4	4,8 ± 0,3
Protein	28,5 ± 0,2	9,6 ± 0,5
Kohlenhydrate	43,0 ± 4,0	84,0 ± 9,0
Fett	1,4 ± 0,2	2,0 ± 0,1

Zusätzlich wurde der Gehalt der freien Monosaccharide D-Glucose und D-Fructose sowie des Disaccharids Saccharose nach 2.8.4 analysiert (Tabelle 55).

Tabelle 55: Nach Abschnitt 2.8.4 enzymatisch ermittelte Gehalte an D-Glucose, D-Fructose und Saccharose in den Substraten silierte Pressschnitzel und Vinasse, n=2

	Vinasse	Pressschnitzel-Silage
Glucose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Fructose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$	0,50 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Saccharose $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$	0,43 ± 0,03	0,11 ± 0,01

Zur Beurteilung der Proteinqualität der Substrate wurde das Aminosäureprofil nach Absatz 2.8.3 analysiert (Abbildung 52).

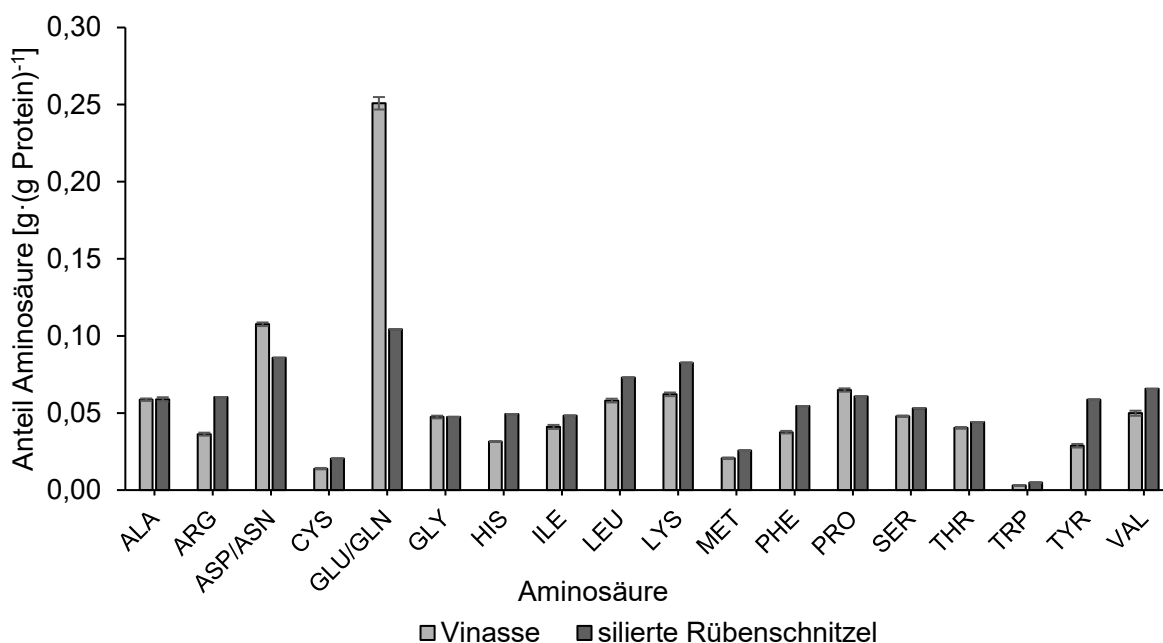


Abbildung 52: Aminosäureprofile der beiden Rohstoffe Vinasse und silierte Rübenschnitzel. Die Aminosäureanalytik wurde nach Absatz 2.8.3 durchgeführt, n=2.

Tryptophan war hier mit einem Chemical Score von 29 ± 1 die erste limitierende Aminosäure für das Substrat Vinasse. Die zweite limitierende Aminosäure war Leucin mit 83 ± 1 . Nach Formel (12) und (13) wurde eine biologische Wertigkeit von 79 ± 1 berechnet. Bei silierten Rübenschnitzeln war ebenfalls Tryptophan die limitierende Aminosäure mit einem Chemical Score von 48 ± 1 . Die biologische Wertigkeit betrug 88 ± 1 .

Auf Basis der Daten aus Abbildung 51 wurde die Medienzusammensetzungen für das nachfolgende Screening berechnet. Da die silierten Rübenschnitzel dazu führten, dass der Agar für das Screening in Oberflächenkultur nicht fest wurde, wurde die Menge an silierten Rübenschnitzeln im Einzelmedium sowie im kombinierten Medium verringert, sodass die Kohlenhydrat-Konzentration hier nur $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (silierte Rübenschnitzel Einzelmedium) bzw. $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Kombimedien) betrug. Außerdem wurde der pH-Wert des Mediums, welches nur silierte Rübenschnitzel enthielt, auf pH 5,0 eingestellt.

Es ergaben sich für das Screening die folgenden drei Medien-Konzentrationen:

Medium 1: 125 g Vinasse pro Liter Medium

Medium 2: 50 g silierte Rübenschnitzel pro Liter Medium

Medium 3: 40 g Vinasse und 35 g silierte Rübenschnitzel pro Liter Medium

Aufgrund von Literaturdaten, wonach *P. sapidus* sehr gutes Wachstum auf Vinasse-Medium mit einer Konzentration von 500 g·L⁻¹ (**Medium 4**) zeite, wurde dieses Medium ebenfalls in das Screening mit aufgenommen. Da hier jedoch keiner der für das Screening verwendeten Pilze Wachstum zeigte, wurde dieses Medium im weiteren Verlauf nicht weiter betrachtet.

3.2.2 Screening in Oberflächenkultur

Die Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur nach 2.6.1 sind in den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 56 bis Tabelle 58) nach den Medien sortiert dargestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden lediglich die Tage 3, 5, 7 und 10 dargestellt und das Wachstum farblich bewertet.

Tabelle 56: Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur auf Medium 1: 125 g Vinasse/L
Dargestellt ist der Durchmesser des Mycels an den angegebenen Wachstumstagen in [cm].

Verwendeter Pilz	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,1	1,8	2,6	4,0
<i>Lentinus squarrosulus</i>	1,2	2,4	3,3	4,0
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Armillaria bulbosa</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Desarmillaria tabescens</i>	0,5	0,7	0,7	0,9
<i>Polyporus squamosus</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Flammulina velutipes</i>	0,5	0,9	1,5	1,2
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabelle 57: Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur auf Medium 2: 50 g silierte Rübenschnitzel/L

Dargestellt ist der Durchmesser des Mycels an den angegebenen Wachstumstagen in [cm].

Verwendeter Pilz	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,5	3,1	4,8	8,2
<i>Lentinus squarrosulus</i>	3,1	5,9	8,0	9,0
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Armillaria bulbosa</i>	0,5	0,9	1,3	1,8
<i>Desarmillaria tabescens</i>	0,7	1,2	1,4	1,7
<i>Polyporus squamosus</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Flammulina velutipes</i>	0,8	2,4	3,3	4,8
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabelle 58: Ergebnisse des Screenings in Oberflächenkultur auf Medium 3: 40 g Vinasse und 35 g silierte Rübenschnitzel/L.

Dargestellt ist der Durchmesser des Mycels an den angegebenen Wachstumstagen in [cm].

Verwendeter Pilz	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,8	2,6	4,0	5,7
<i>Lentinus squarrosulus</i>	2,0	5,0	8,0	9,0
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Armillaria bulbosa</i>	0,5	0,6	1,3	1,4
<i>Desarmillaria tabescens</i>	0,5	0,7	1,0	1,4
<i>Polyporus squamosus</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Flammulina velutipes</i>	0,6	1,1	2,3	4,5
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,5	0,5	0,5	0,5

Die Basidiomyceten *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Polyporus squamosus* und *Lycoperdon pyriforme* zeigten auf keinem der hier verwendeten Medien Wachstum. Die drei genannten Pilze wurden daher für weiterführende Ansätze nicht berücksichtigt

Um aus den übrigen Spezies geeignete Kandidaten für das Screening in Flüssigkultur auszuwählen, wurde neben dem Wachstum auch der olfaktorische Eindruck der Kulturen betrachtet. Dieser ist nachfolgend, unterteilt nach den drei Medien, aufgeführt.

Medium 1: Vinasse (125 g·L⁻¹)

L. squarrosulus zeigte bis Tag 7 einen würzig/suppigen Geruch, welcher mit einem leicht pilzigen und fruchtigen Geruch einher ging. Über den 7. Kulturtag hinaus überwogen pilzige und leicht säuerliche Aromen. *P. sapidus* zeigte ebenfalls bis Tag 7 einen würzig-suppigen und leicht pilzig/erdigen Geruch, welcher dann zunehmend in süßliche/fruchtige Geruchsrichtungen überging.

F. velutipes zeigte bis Tag 6 ein würziges Aroma, welches an Tag 7 in einen säuerlichen und grünen Geruch umschlug. *D. tabescens* zeigte während der gesamten Kultivierung einen würzigen Geruch, der an geröstetes Brot erinnerte.

Medium 2: Silierte Rübenschnitzel (50 g·L⁻¹)

P. sapidus wies ein schwach würziges Aroma an Tag 7 auf, welches allerdings von pilzig/erdigen sowie leicht säuerlichen Aromen begleitet wurde. Ab Tag 8 war eine starke Abnahme des sauren Geruchs wahrzunehmen und es blieb ein vermehrt pilzig/erdiger Geruch. *L. squarrosulus* roch an Tag 7 schwach würzig, jedoch eher pilzig/erdig und auch fruchtig/süßlich. Ab Tag 8 war vermehrt ein „chemischer“ Geruch wahrnehmbar.

F. velutipes wurde bis Tag 7 als stark säuerlich wahrgenommen. Dieser Geruch nahm in den folgenden Tagen ab und ging in einen pilzig/erdigen und leicht strohigen Geruch über.

Bei *A. bulbosa* und *D. tabescens* dominierte zu Beginn ebenfalls ein säuerlicher Geruch, der während der Kultivierung in einen würzig/suppigen (Tag 5) und heuartig/grünen

Geruchseindruck übergang. Die Kulturen von *D. tabescens* wurden an Tag 7 und 8 als stärker würzig riechend wahrgenommen als die Kulturen von *A. bulbosa*.

Medium 3: Kombiniertes Medium mit Vinasse (40 g·L⁻¹) und silierten Rübenschitzeln (35 g·L⁻¹)

P. sapidus wies an Tag 6 und 7 überwiegend einen suppigen/würzigen Geruchseindruck auf, der im weiteren Kulturverlauf vermehrt ins pilzig/erdige und leicht heuartige Aromen übergang. *L. squarrosulus* wies an Tag 6 und 7 einen stark grünen Geruch auf. Erst an Tag 8 wurde ein würziger Geruchseindruck mit zusätzlichen leicht süßlichen und pilzartigen Aromen wahrgenommen.

F. velutipes roch an Tag 7 und 8 würzig und suppig, aber auch säuerlich und grasartig/grün. *A. bulbosa* und *D. tabescens* zeigten zu Beginn einen säuerlichen und würzigen Geruch. Ab Tag 6 verminderte sich der säuerliche Geruchseindruck und ein würziges, brotartiges Aroma überwog.

3.2.3 Screening in Flüssigkultur

Auf Basis der Daten aus Tabelle 56 bis Tabelle 58 und der beschriebenen Geruchseindrücke wurden *Pleurotus sapidus*, *Lentinus squarrosulus*, *Desarmillaria tabescens* und *Flammulina velutipes* für das Screening in Flüssigkultur ausgewählt.

Für das Screening in Flüssigkultur wurden die Kulturen nach 2.6.1.2 vorbereitet, nach 7 Tagen geerntet, lyophilisiert und die Trockenmasse, der Rohprotein- sowie Ergosterolgehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind nachfolgend, sortiert nach den verwendeten Medien dargestellt. Entsprechende Fotos der Kulturen sind Abbildung 53, Abbildung 56 und Abbildung 59 zu entnehmen.

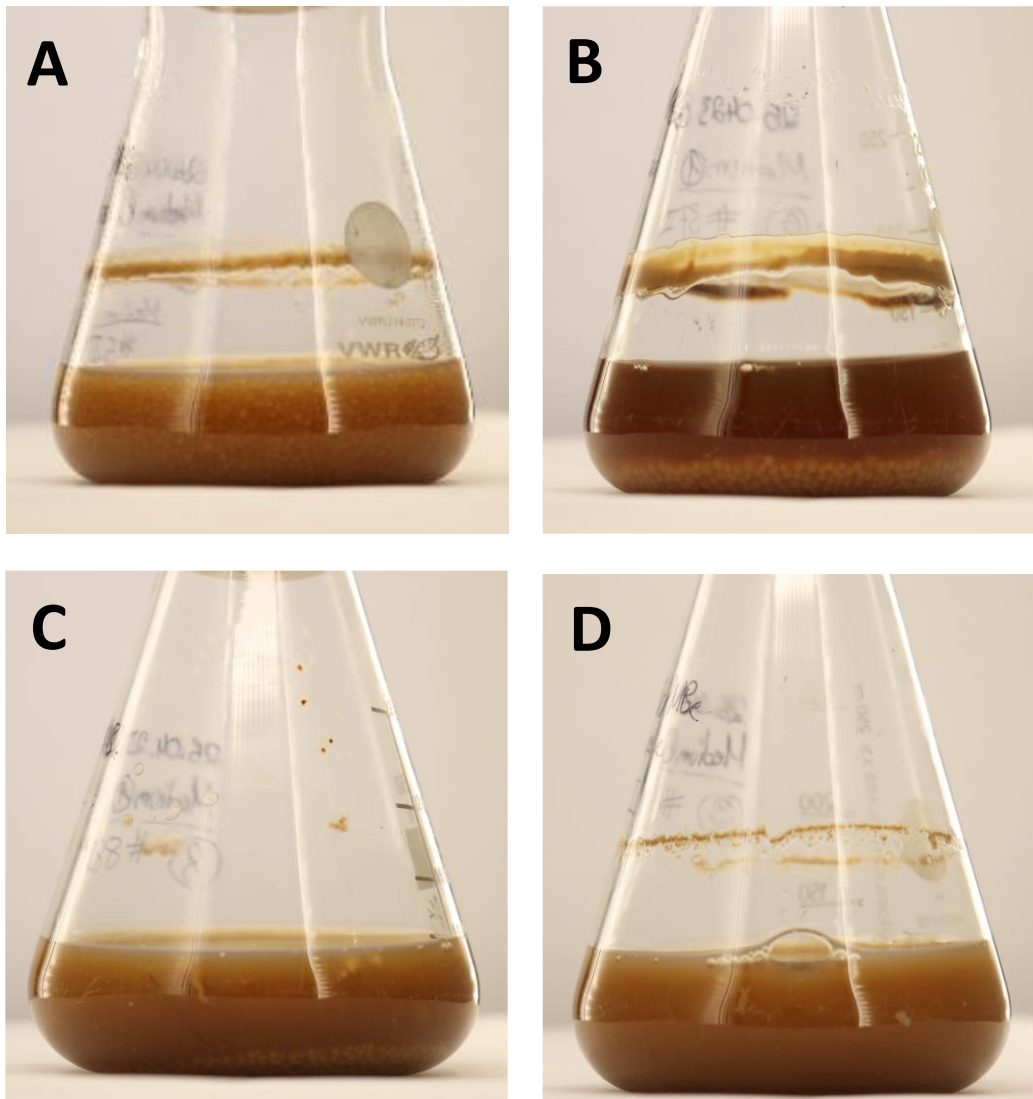
3.2.3.1 **Medium 1:** Vinasse 125 g·L⁻¹

Abbildung 53: Fotos der Kulturen von **A:** *P. sapidus*, **B:** *L. squarrosulus*, **C:** *D. tabescens* und **D:** *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse mit einer Konzentration von 125 g·L⁻¹ verwendet.

Alle vier Pilze zeigten Wachstum in Medium 1. Optisch zeigten *P. sapidus* und *L. squarrosulus* die stärkste Biomasse-Bildung. Die Ergebnisse der Rohprotein- und Ergosterol-Bestimmung des lyophilisierten Mycels sind in Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellt.

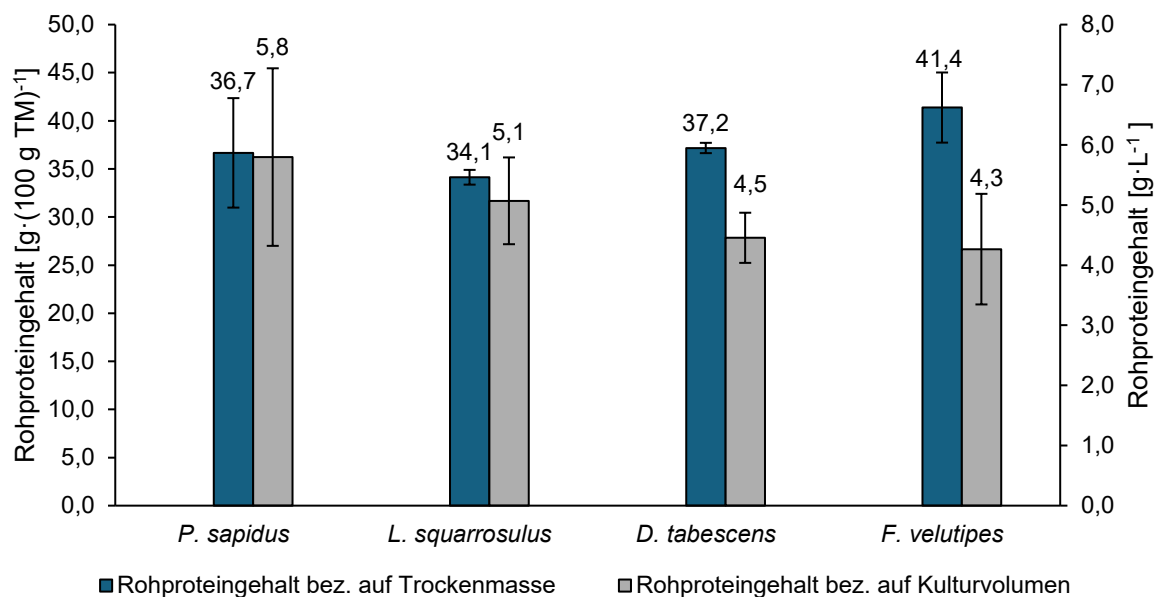


Abbildung 54: Rohproteingehalte der lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse mit einer Konzentration von 125 g·L⁻¹ verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt und betragen pH 5,2 ± 0,2. Zur Bestimmung des Rohproteingehaltes wurde die Methoden nach Kjeldahl (2.8.2) mit dem allgemeinen Rohprotein-Faktor von 6,25 verwendet, n=4.

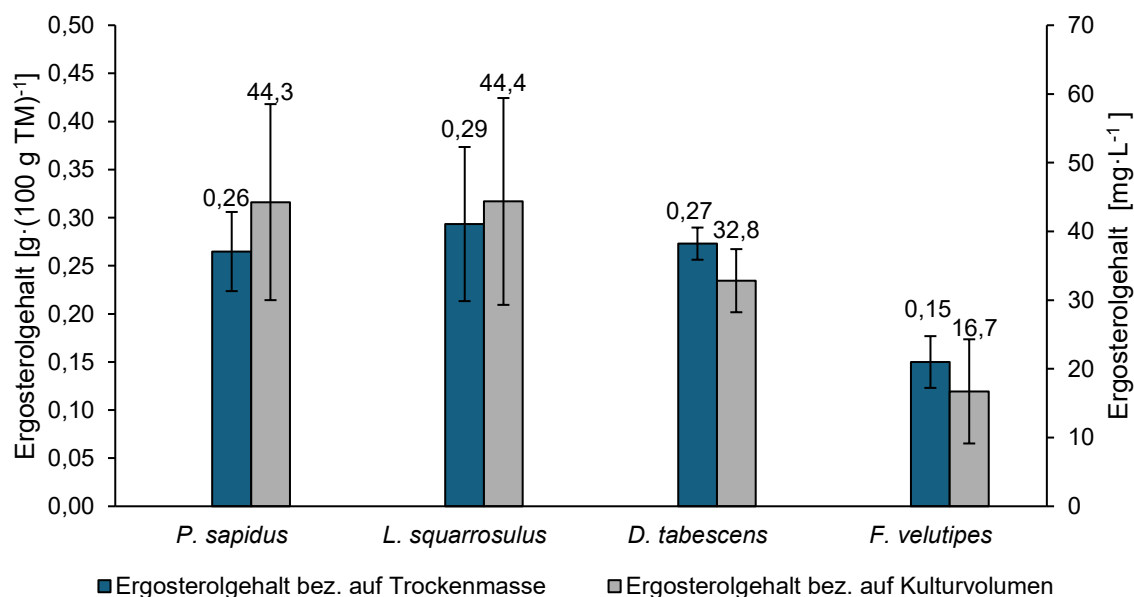


Abbildung 55: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse mit einer Konzentration von 125 g·L⁻¹ verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt und betragen pH 5,2 ± 0,2. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4.

Die Kulturen von *P. sapidus* wiesen die höchste Trockenmasse mit 17 g·L⁻¹ auf. Die Trockenmasse der Kulturen von *L. squarrosulus* betrug 15 g·L⁻¹, die von *D. tabescens* 12 g·L⁻¹ und für *F. velutipes* ergaben sich 11 g·L⁻¹.

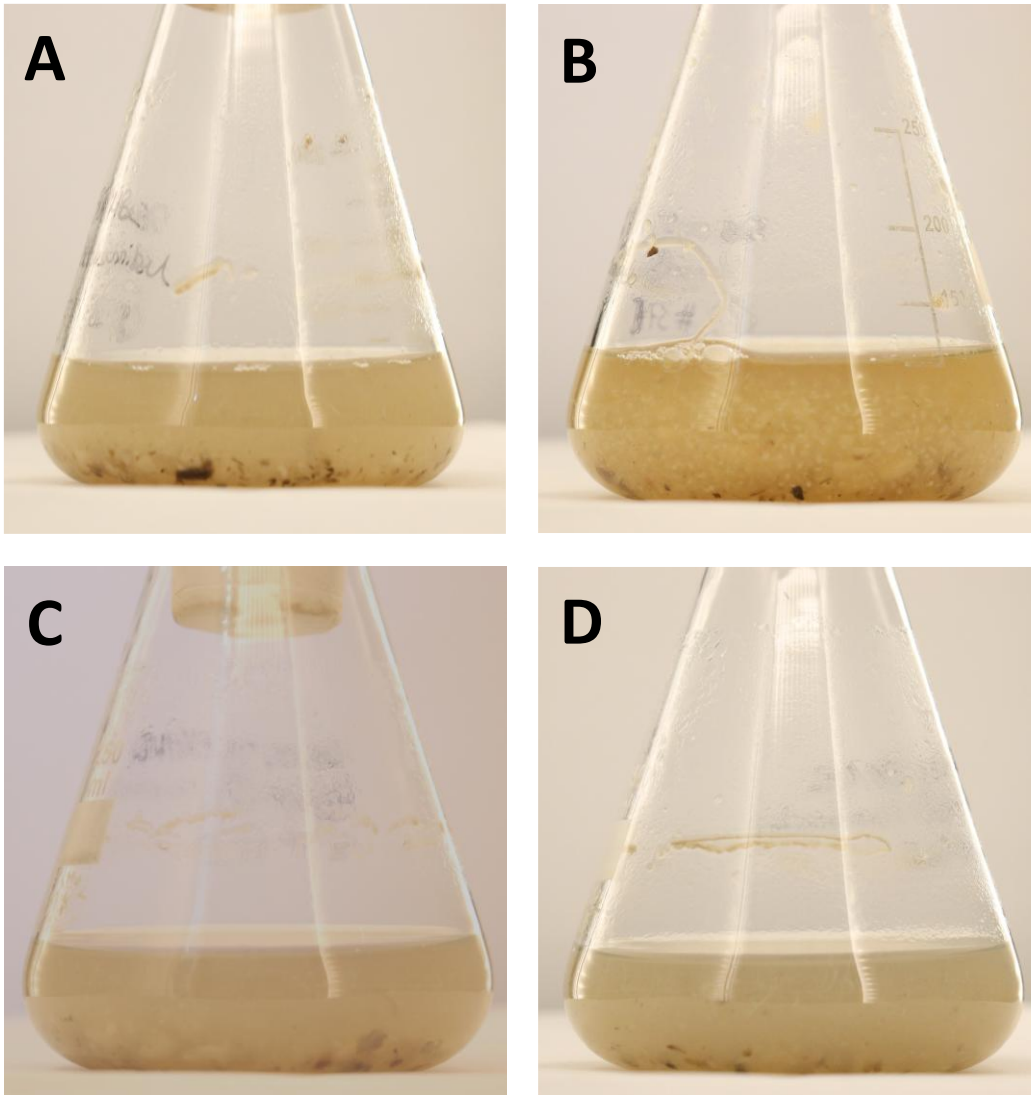
3.2.3.2 **Medium 2: Silierte Rübenschnitzel** $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 

Abbildung 56: Fotos der Kulturen von **A:** *P. sapidus*, **B:** *L. squarrosulus*, **C:** *D. tabescens* und **D:** *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurden silierte Rübenschnitzel mit einer Konzentration von $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ verwendet.

Bei allen vier Basidiomyceten waren noch Reste der silierten Rübenschnitzel zu erkennen (Abbildung 56). *L. squarrosulus* wies optisch das schnellste Wachstum auf, bei den übrigen Kulturen war kaum gebildetes Mycel zu erkennen. Die Rohprotein- und Ergosterolgehalte sind Abbildung 57 und Abbildung 58 zu entnehmen.

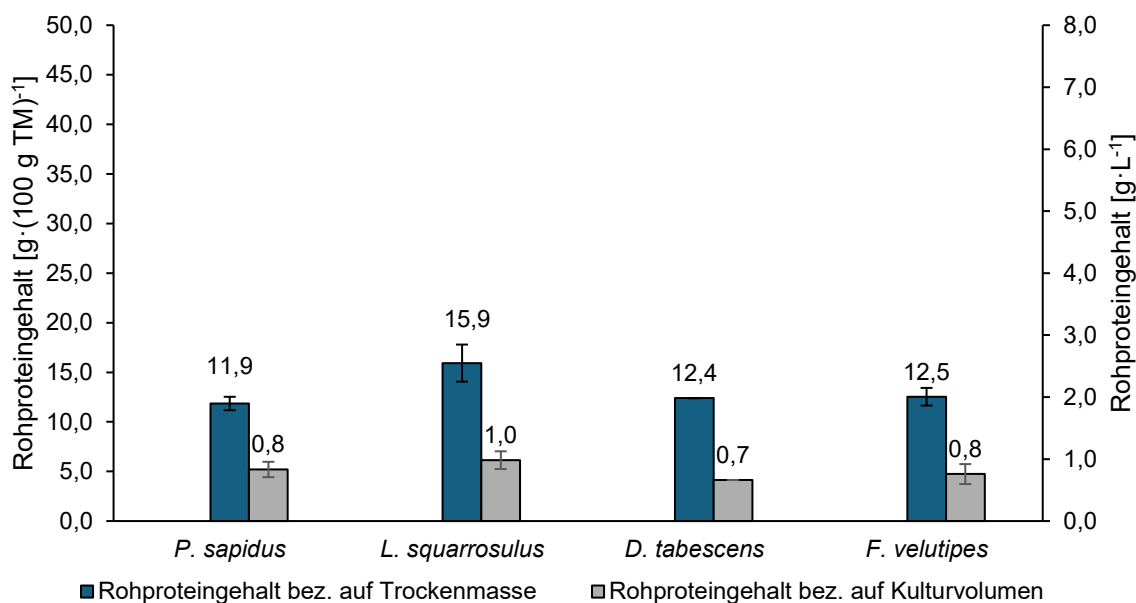


Abbildung 57: Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurden silierte Rübenschnitzel mit einer Konzentration von 50 g·L⁻¹ verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt und betragen pH 3,7 ± 0,2. Zur Bestimmung des Rohproteingehaltes wurde die Methoden nach Kjeldahl (2.8.2) mit dem allgemeinen Rohprotein-Faktor von 6,25 verwendet; n=4.

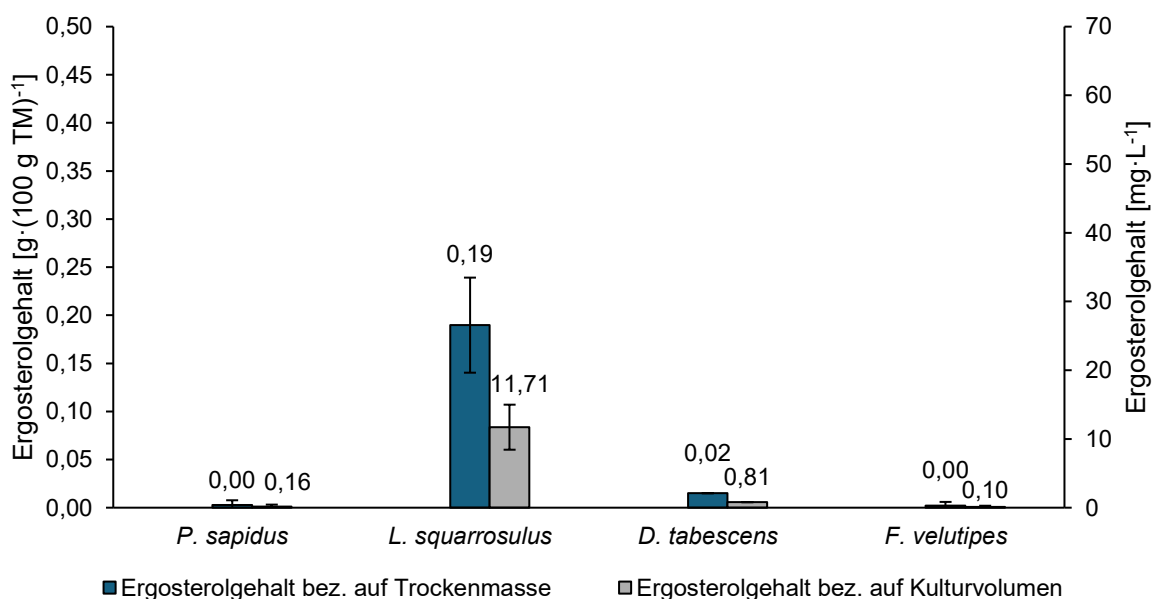


Abbildung 58: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurden silierte Rübenschnitzel mit einer Konzentration von 50 g·L⁻¹ verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt und betragen pH 3,7 ± 0,2. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4.

Die Ergebnisse spiegeln die optische Beobachtung wider. *L. squarrosulus* wies sowohl bezogen auf die Trockenmasse als auf das Kulturvolumen den höchsten Rohprotein- und Ergosterolgehalt auf. Bei *P. sapidus* und *V. velutipes* war Ergosterol nur jeweils in einem von vier Ansätzen nachweisbar.

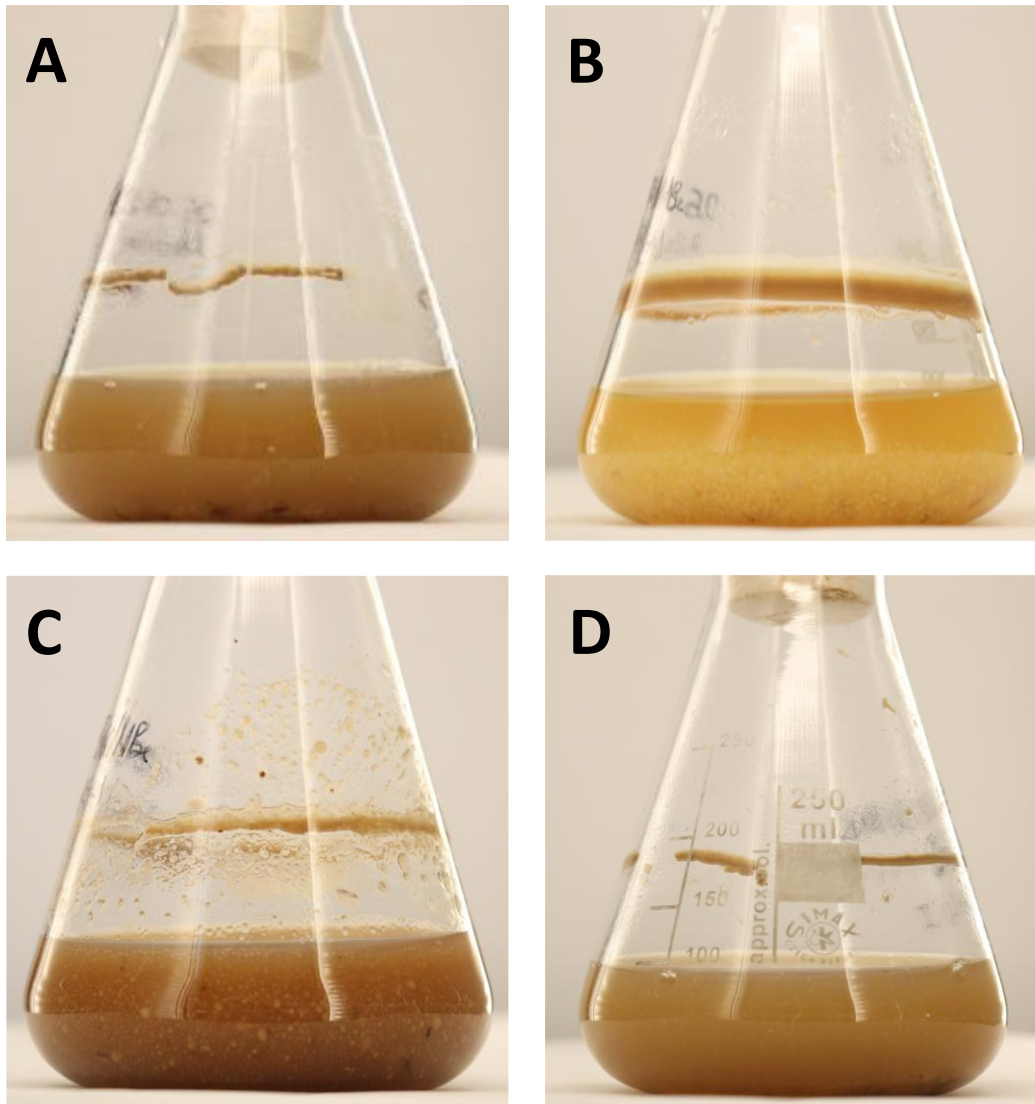
3.2.3.3 **Medium 3:** Vinasse $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und silierte Rübenschnitzel $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 

Abbildung 59: Fotos der Kulturen von **A:** *P. sapidus*, **B:** *L. squarrosulus*, **C:** *D. tabescens* und **D:** *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) und silierte Rübenschnitzel ($35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in Kombination verwendet.

Im kombinierten Medium, welches beide Nebenströme enthielt, wurden nach der 7-tägigen Kultivierung deutliche Farbunterschiede festgestellt. Während die Kultur von *L. squarrosulus* fast vollständig klar wurde und eine gelbe Färbung aufwies, war die von *P. sapidus* und *D. tabescens* sehr dunkel gefärbt und wies noch sichtbare Partikel der eingesetzten Rübenschnitzel auf. Die Ergebnisse der Rohprotein- und Ergosterolbestimmung sind in Abbildung 60 und Abbildung 61 dargestellt.

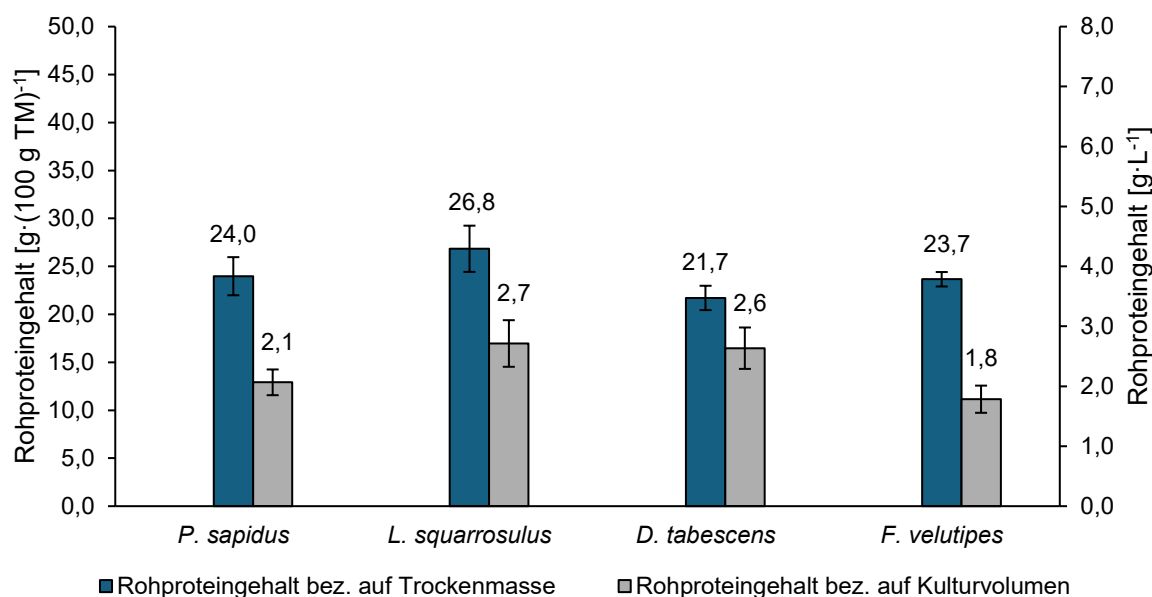


Abbildung 60: Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse (40 g·L⁻¹) und silierte Rübenschnitzel (35 g·L⁻¹) in Kombination verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt und betragen pH 4,8 ± 0,2. Zur Bestimmung des Rohproteingehaltes wurde die Methoden nach Kjeldahl (2.8.2) mit dem allgemeinen Rohprotein-Faktor von 6,25 verwendet, n=4

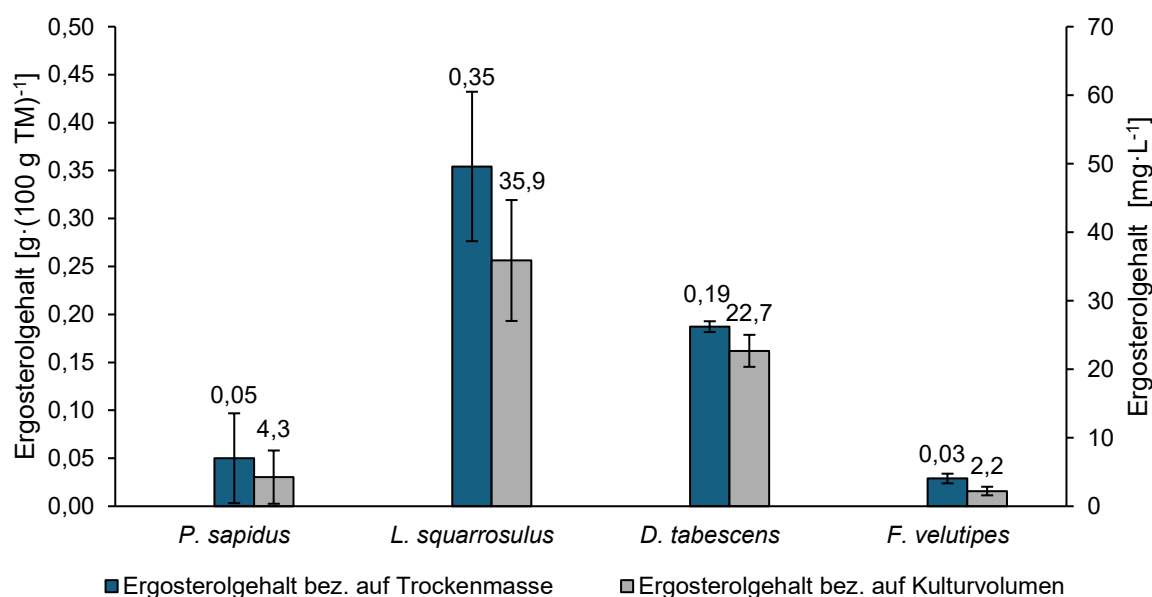


Abbildung 61: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse (40 g·L⁻¹) und silierte Rübenschnitzel (35 g·L⁻¹) in Kombination verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt und betragen pH 4,8 ± 0,2. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4.

In den Kulturen von *P. sapidus* und *F. velutipes* wurden nur geringe Mengen an Ergosterol nachgewiesen.

Zur weiteren Beurteilung und Auswahl der geeigneten Spezies wurde auch der Geruchseindruck der Kulturen nach 7-tägiger Kultivierung herangezogen (Tabelle 59).

Tabelle 59: Geruchseindrücke der Kulturen nach 7-tägiger Submerskultivierung bei 24 °C und 150 rpm. Mit Medium 1: Vinasse 125 g·L⁻¹, Medium 2: silierte Rübenschnitzel 50 g·L⁻¹, Medium 3: Vinasse 40 g·L⁻¹ und silierte Rübenschnitzel 35 g·L⁻¹

	Medium 1	Medium 2	Medium 3
<i>P. sapidus</i>	malzig, nach Bier	säuerlich	malzig, süßlich
<i>L. squarrosulus</i>	malzig, nach Bier	teigig, nach Pilz	nach Pilz und Getreide
<i>D. tabescens</i>	malzig, würzig	säuerlich	malzig, suppig, würzig
<i>F. velutipes</i>	malzig, suppig	säuerlich	säuerlich

Basierend auf den Aroma- und Wachstumseigenschaften war es schwierig, bereits geeignete Spezies auszuwählen. Vor allem bei Medium 2, welches mit $3,7 \pm 0,2$ einen sehr sauren pH-Wert aufwies, wurde unter den gewählten Bedingungen nur bei *L. squarrosulus* Wachstum festgestellt. Es wurden daher im Folgenden zunächst die Einflüsse unterschiedlicher pH-Werte und Temperaturen auf das Wachstum betrachtet und anschließend optimale Pilz-Substrat-Kombinationen sowie Wachstumsbedingungen gewählt.

3.2.4 Optimierung der Kultivierung

3.2.4.1 Einfluss des pH-Wertes

Medium 2 wies mit $3,7 \pm 0,2$ den niedrigsten pH-Wert auf. Der pH-Wert wurde daher mithilfe von Natronlauge zunächst angehoben und weitere Kultivierungen durchgeführt. Da der pH-Wert nach dem Autoklavieren stets wieder abgesunken war, wurde nach 2.6.2.1 vorgegangen und mit Kaliumdihydrogenphosphat gepuffert sowie ein höherer Start-pH-Wert eingestellt. Das Wachstum wurde anhand des Ergosterolgehaltes bewertet (Abbildung 62). Zusätzlich wurde der Rohproteingehalt bestimmt. Dieser ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung XVII).

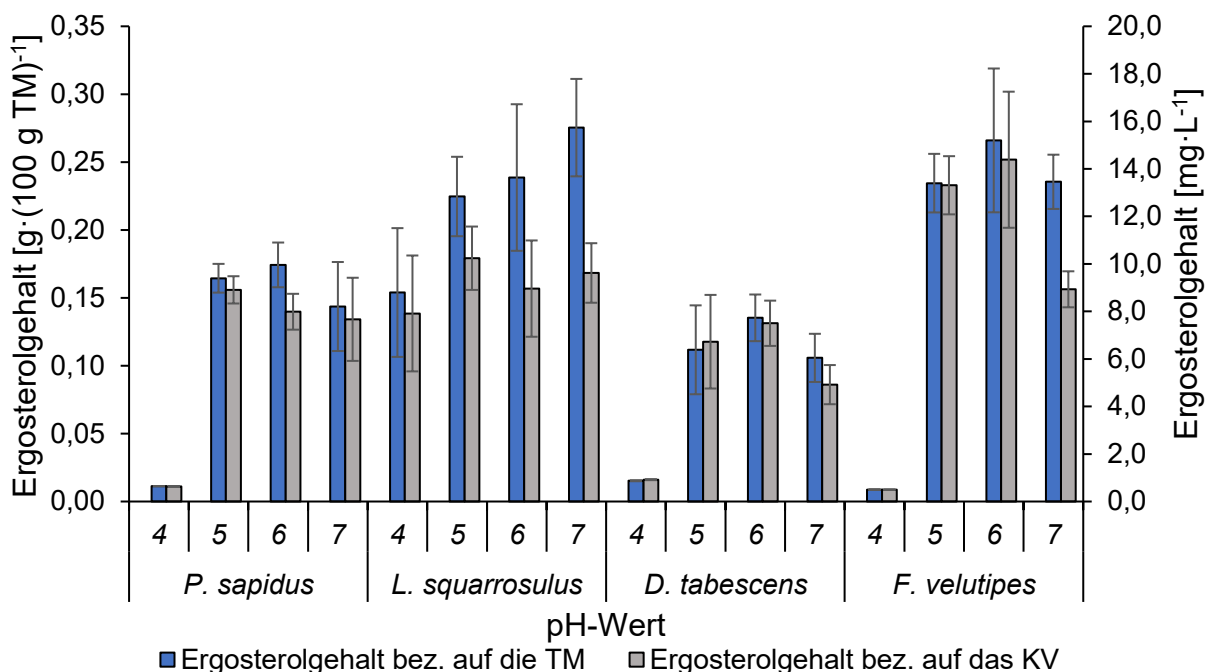


Abbildung 62: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurden silierte Rübenschnitzel (50 g·L⁻¹) verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden auf 5, 6 und 7 eingestellt, sowie auch der nicht-eingestellte pH-Wert von 3,7 ± 0,2 verwendet. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=2 (pH 6 und 7), n=4 (pH 4 und 5)

Auch für Medium 1, welches nur Vinasse enthielt, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf den Ergosterolgehalt und somit das Pilzwachstum untersucht (Abbildung 63).

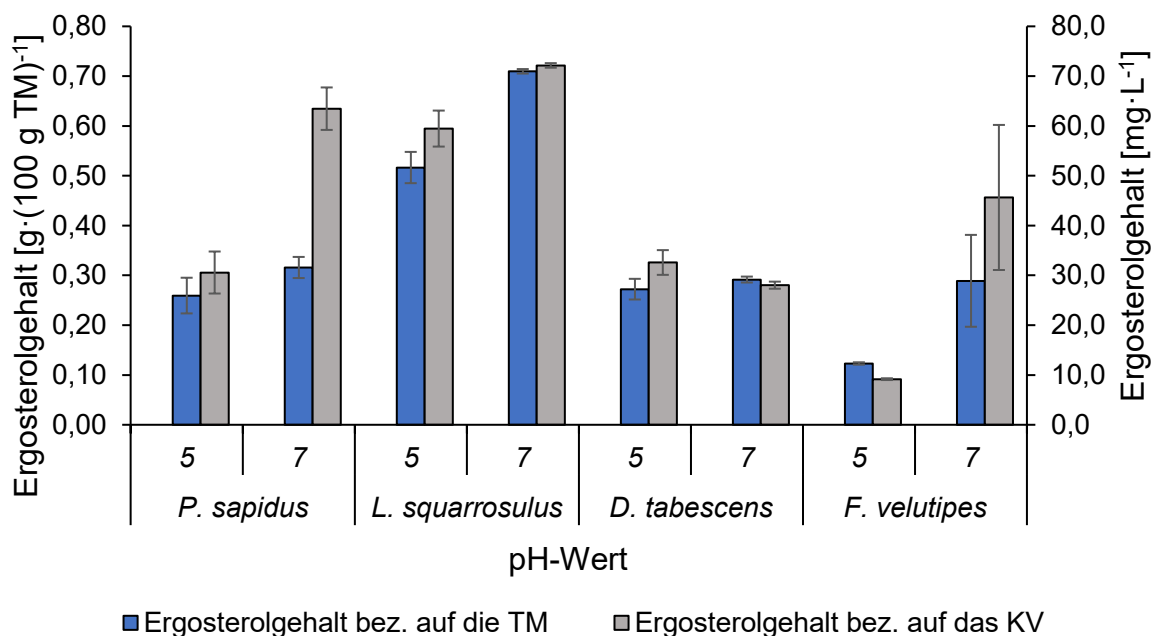


Abbildung 63: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse (125 g·L⁻¹) verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden auf 7 eingestellt, sowie auch der nicht-eingestellte pH-Wert von 5,2 ± 0,2 verwendet. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4 (pH 5), n=2 (pH 5)

3.2.4.2 Einfluss der Temperatur

Neben dem Einfluss des pH-Wertes wurde auch der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der Kulturen untersucht. Dazu wurden die Temperaturen 18 °C, 24 °C und 30 °C verwendet. Die Durchführung erfolgte nach 2.6.2.1. Die Ergebnisse der Ergosterolanalytik sind für das Substrat Vinasse in Abbildung 64 dargestellt, für die silierten Rübenschnitzel in Abbildung 65 und für das kombinierte Medium in Abbildung 66. Die ermittelten Rohproteingehalte können dem Anhang (Abbildung XVIII, Abbildung XIX und Abbildung XX) entnommen werden.

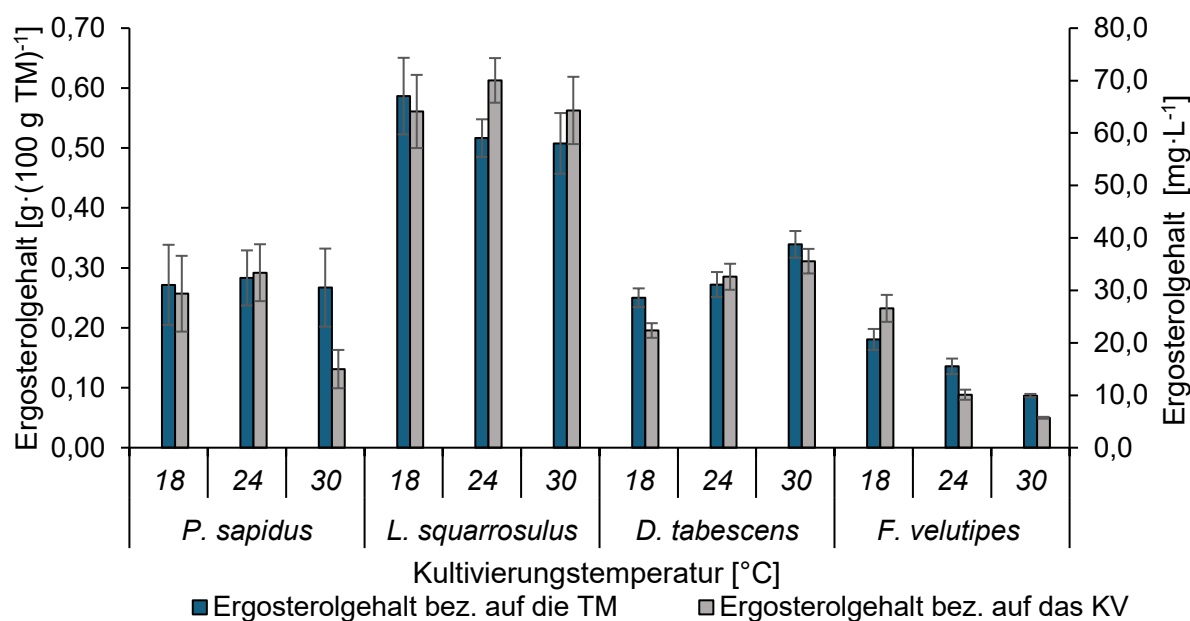


Abbildung 64: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen (18 °C, 24 °C, 30 °C) und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurde Vinasse (125 g · L⁻¹) verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4 (24 °C), n=2 (18 °C, 30 °C)

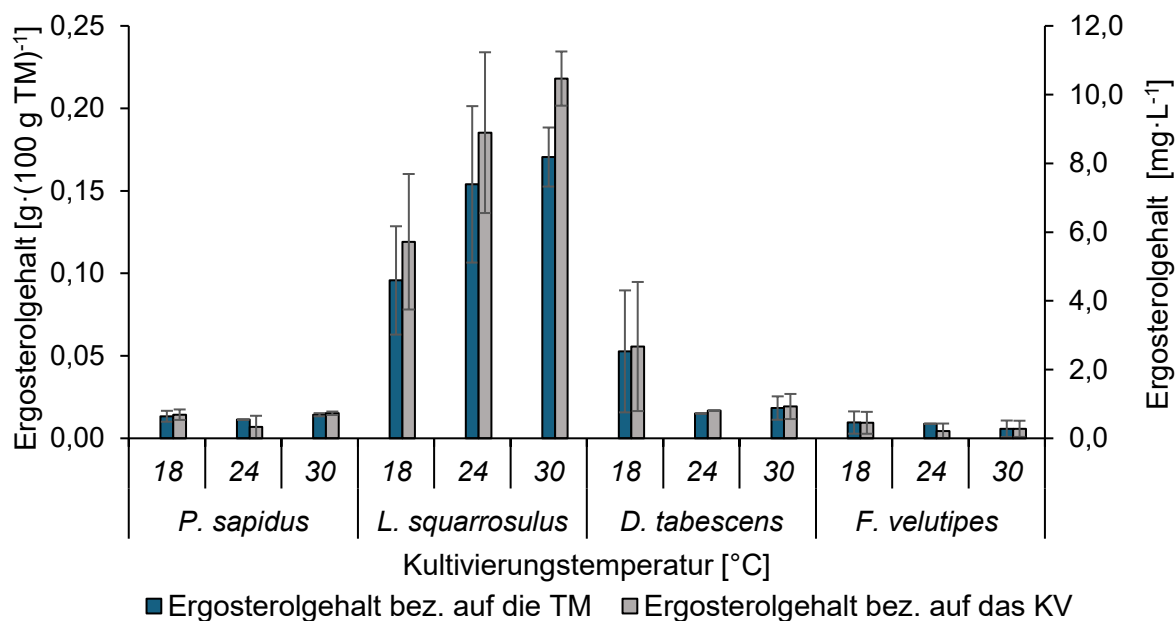


Abbildung 65: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen (18 °C, 24 °C, 30 °C) und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurden silierte Rübenschnitzel (50 g·L⁻¹) verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4 (24 °C), n=2 (18 °C, 30 °C)

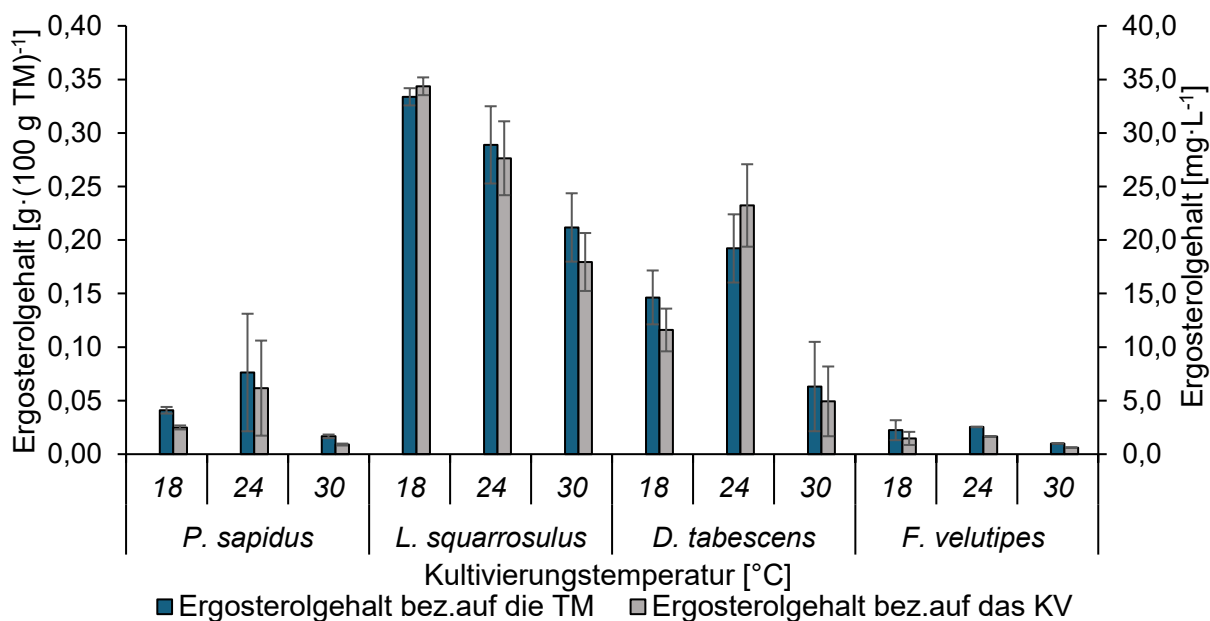


Abbildung 66: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen (18 °C, 24 °C, 30 °C) und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kulturmedium wurden silierte Rübenschnitzel (35 g·L⁻¹) in Kombination mit Vinasse (40 g·L⁻¹) verwendet. Die pH-Werte der Kulturen wurden nicht eingestellt. Zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes wurde nach der Extraktion silyliert und anschließend mittels GC-FID gemessen (2.7.1), n=4 (24 °C), n=2 (18 °C, 30 °C)

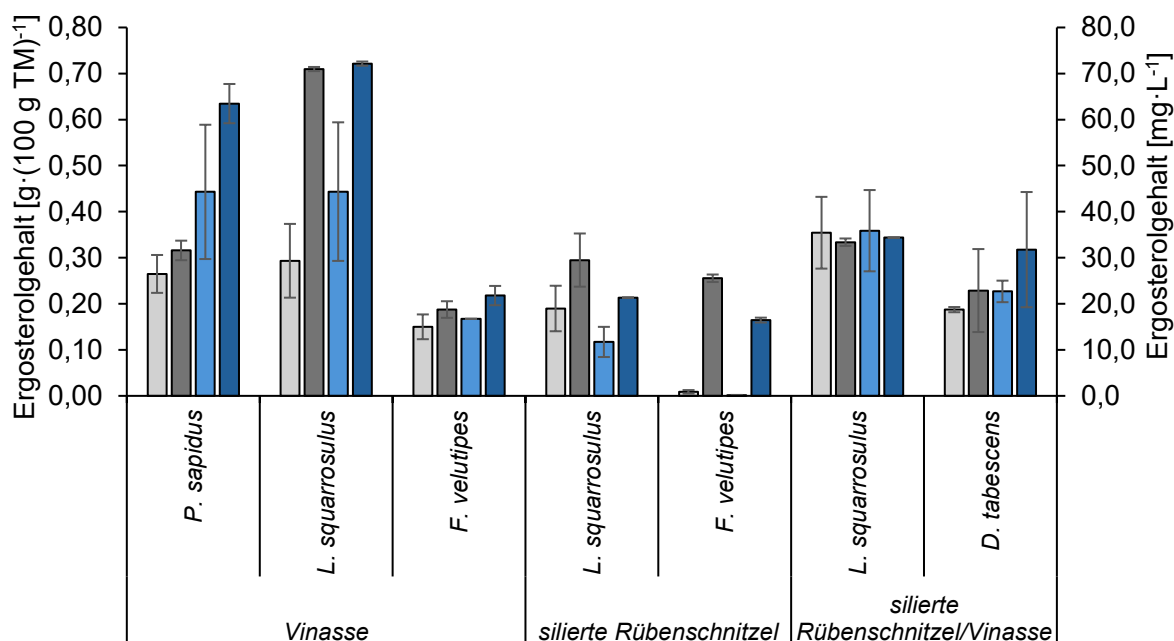
Aus Abbildung 64, Abbildung 65 und Abbildung 66 wurden in Kombination mit den Ergebnissen der pH-Wert-Versuche (Abbildung 62 und Abbildung 63) die optimalen Kultivierungsbedingungen abgeleitet. Diese sind in Tabelle 60 für die ausgewählten Pilze den Ausgangsbedingungen gegenübergestellt.

Tabelle 60: Gegenüberstellung der Ausgangsbedingungen und der optimalen Bedingungen in Bezug auf die getesteten pH-Werte und Temperaturen
Für die drei verwendeten Medien wurden jeweils die besten Pilze sowie die optimalen Kultivierungsbedingungen auf Basis der Vorversuche ausgewählt.

Medium	Pilz	Ausgangsbedingung		Optimale Bedingungen	
		pH-Wert	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Vinasse	<i>P. sapidus</i>	5	24	7	24
	<i>L. squarrosulus</i>	5	24	7	24
	<i>F. velutipes</i>	5	24	7	18
Silierte Rübenschnitzel	<i>L. squarrosulus</i>	4	24	7	24
	<i>F. velutipes</i>	4	24	6	24
Kombination Vinasse/silierte Rübenschnitzel	<i>D. tabescens</i>	5	24	5	24
	<i>L. squarrosulus</i>	5	24	5	18

Die ausgewählten Pilz-Substrat-Kombinationen wurden anschließend unter den optimierten Bedingungen aus Tabelle 60 kultiviert. Die hier erhaltenen Ergosterolgehalte sind in Abbildung 67 den Ausgangsbedingungen gegenübergestellt.

Zusätzlich wurden auch die Aminosäureprofile analysiert (Abbildung 68 bis Abbildung 70), sowie die biologischen Wertigkeiten nach Formel (13), der essenzielle Aminosäure-Index nach Formel (12) und die Kjeldahl-Faktoren nach Formel (8) und (9) berechnet (Tabelle 61).



Verwendeter Pilz und Medium

- Ausgangsbedingungen bez. auf die TM ■ optimierte Bedingungen bez. auf die TM
- Ausgangsbedingungen bez. auf das KV ■ optimierte Bedingungen bez. auf das KV

Abbildung 67: Ergosterolgehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung unter Ausgangsbedingungen und optimierten Bedingungen (Tabelle 60). Als Kultivierungsmedium wurden Vinasse (125 g·L⁻¹), silierte Rübenschnitzel (50 g·L⁻¹) sowie das kombinierte Medium mit silierten Rübenschnitzel (35 g·L⁻¹) und Vinasse (40 g·L⁻¹) verwendet. Die Bestimmung des Ergosterolgehaltes erfolgte nach 2.7.1, n=4 (Ausgangsbedingungen), n=2 (optimierte Bedingungen)

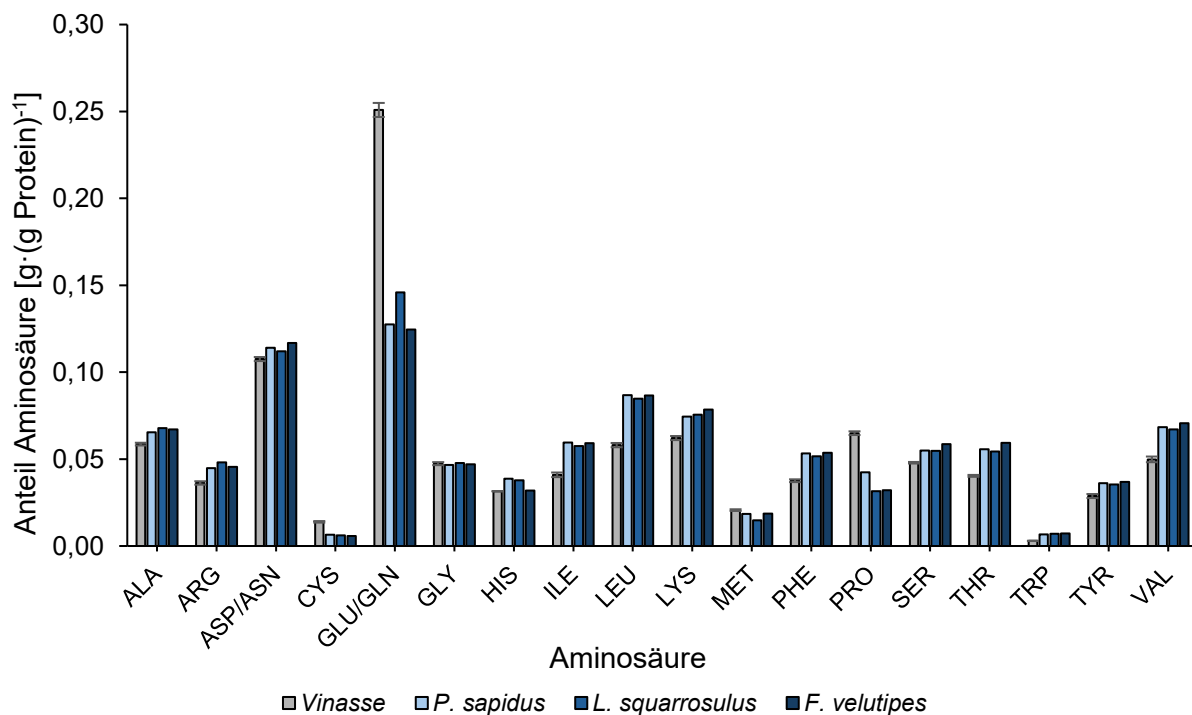


Abbildung 68: Aminosäureprofile des Substrats Vinasse sowie der mit Vinasse kultivierten Mycelien von *P. sapidus*, *L. squarrosulus* und *F. velutipes*. Die Kultivierung erfolgte unter den Bedingungen aus Tabelle 60 für 7 Tage. Das Mycel wurde lyophilisiert und die Aminosäureanalytik nach Absatz 2.8.3 durchgeführt, n=2 (Vinasse), n=1 (Pilze)

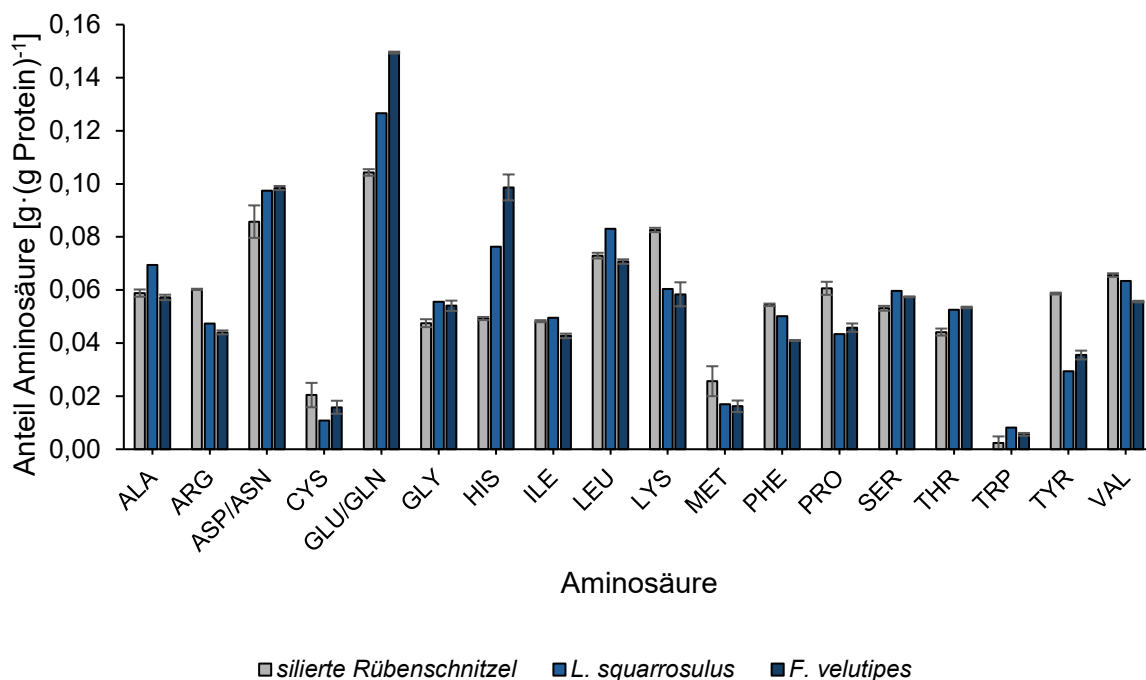


Abbildung 69: Aminosäureprofile des Substrates silierte Rübenschnitzel sowie der auf silierten Rübenschnitzeln kultivierten Mycelien von *L. squarrosulus* und *F. velutipes*. Die Kultivierung erfolgte unter den Bedingungen aus Tabelle 60 für 7 Tage. Das Mycel wurde lyophilisiert und die Aminosäureanalytik nach Absatz 2.8.3 durchgeführt, n=2 (Vinasse), n=1 (Pilze)

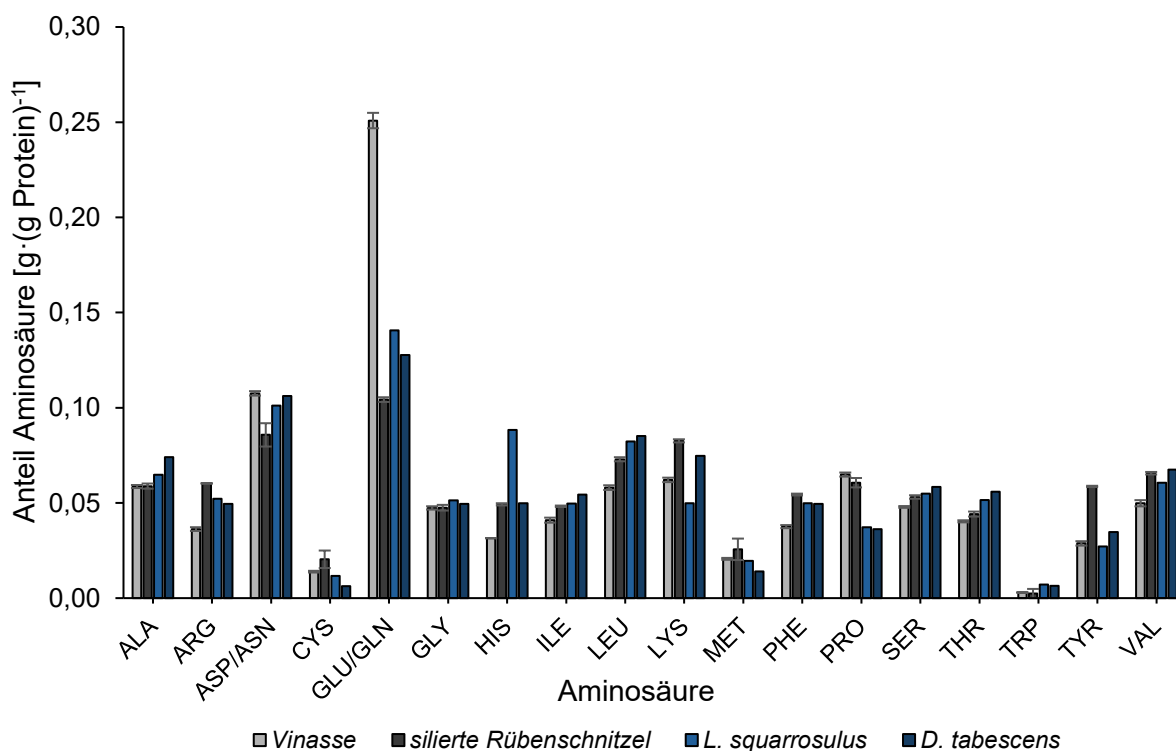


Abbildung 70: Aminosäureprofile der Substrate Vinasse und silierte Rübenschnitzel sowie der darauf kultivierten Mycelien von *L. squarrosulus* und *A. tabescens*. Die Kultivierung erfolgte unter den Bedingungen aus Tabelle 60 für 7 Tage. Das Mycel wurde lyophilisiert und die Aminosäureanalytik nach Absatz 2.8.3 durchgeführt, n=2 (Vinasse), n=1 (Pilze)

Tabelle 61: Ergebnisse der Protein- und Aminosäureanalytik für die ausgewählten Pilz-Substrat-Kombinationen auf den Substraten Vinasse und silierten Rübenschnitzeln
 Dargestellt sind die berechneten Kjeldahlfaktoren für Roh- und Reinprotein, die entsprechenden Proteingehalte, sowie die Biologische Wertigkeit (BW), der essenzielle Aminosäure-Index (EAAI) und die limitierenden Aminosäuren (AS)

Pilz	Vinasse			Silierte Rübenschnitzel		Kombination Vinasse/silierte Rübenschnitzel	
	<i>P. sapidus</i>	<i>L. squarrosulus</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. squarrosulus</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>D. tabescens</i>	<i>L. squarrosulus</i>
Kjeldahlfaktor Rohprotein	6,02	6,29	6,34	6,01	5,91	6,14	6,28
Kjeldahlfaktor Reinprotein	3,19	5,74	5,73	5,57	4,68	5,55	5,59
BW	84,7	86,2	88,2	91,5	88,0	84,8	81,5
EAAI	88,5	89,9	91,7	94,6	91,5	88,6	85,5
Limitierende AS 1	Trp	Cys+Met	Cys+Met	Cys+Met	Trp	Cys+Met	Trp
Limitierende AS 2	Cys+Met	Trp	Trp	Trp	Cys+Met	Trp	Cys+Met
Limitierende AS 3	-	-	-	-	-	-	Lys
Rohproteingehalt $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}} \right]$	34,8	32,5	40,6	18,4	11,9	27,8	21,8
Reinproteingehalt $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g TM}} \right]$	18,4	29,7	36,7	17,1	9,4	25,1	19,4

Die Aminosäuren Tryptophan sowie Methionin und Cystein waren bei allen Pilz-Substrat-Kombinationen limitierend. Die höchste Biologische Wertigkeit wurde für das Mycel von *L. squarrosulus*, kultiviert auf silierten Rübenschnitzeln, erzielt.

3.3 Pilzquantifizierung

3.3.1 Etablierung einer qPCR-Methode

3.3.1.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Für die Quantifizierung des Pilzgehaltes über den DNA-Gehalt musste die enthaltene DNA möglichst vollständig isoliert werden. Dafür wurde die DNA aus lyophilisierten Mycel von *L. squarrosulus*, kultiviert in Malzextrakt und Rübenschnitzel-Melasse-Medium, nach der unter 2.7.4.1.1 beschriebenen Methode extrahiert. Die DNA wurde 1:100 verdünnt und 10 µL mit 2 µL TriTrack® auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 71).

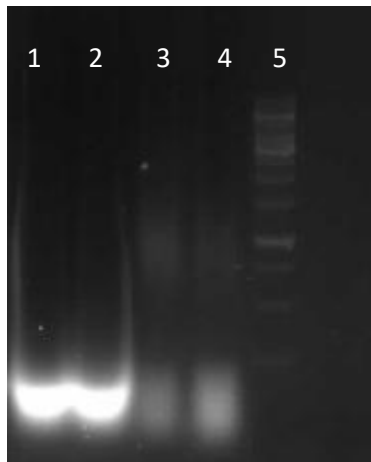


Abbildung 71: DNA des Pilzes *L. squarrosulus* isoliert aus lyophilisierten Mycel, extrahiert nach 2.7.4.1.1 (Schnellmethode, JLU-Hausmethode) nach Gelelektrophorese (0,8% Agarose, 100 V, 30 min) Aufgetragen sind **1+2:** DNA *L. squarrosulus* in Malzextrakt kultiviert, **3+4:** DNA *L. squarrosulus* in RS-Medium kultiviert, **5:** DNA-Ladder (1kb, 5 µL)

Bei beiden eingesetzten Proben war die DNA-Isolierung nicht erfolgreich (Spur 1-4).

Es wurde daher für die folgenden Versuche auf das Kit der Firma Qiagen für die DNA-Isolierung in Pflanzen zurückgegriffen (Abbildung 72). Die Durchführung erfolgte nach 2.7.4.1.2. Die für den Aufschluss verwendeten Proben sind in Abschnitt 2.7.4 aufgeführt (Tabelle 18).

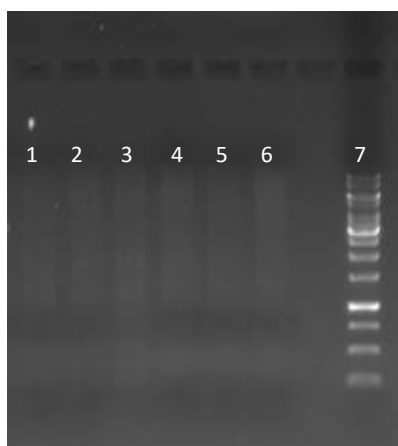


Abbildung 72: DNA der Pilze *L. squarrosulus* und *D. tabescens* isoliert aus lyophilisierten Mycel, extrahiert mittels Qiagen Plant Pro-Kit, nach Gelelektrophorese (0,8% Agarose, 100 V, 30 min) Aufgetragen sind jeweils die DNA-Isolate aus **1:** 10 mg Mycel von *L. squarrosulus* (Ansatz 1), **2:** 5 mg Mycel von *L. squarrosulus* (Ansatz 2), **3:** 5 mg Mycel von *L. squarrosulus* + 5 mg Rübenschnitzel-Pulver (Ansatz 3), **4:** 10 mg Mycel von *D. tabescens* (Ansatz 4), **5:** 5 mg Mycel von *D. tabescens* (Ansatz 5), **6:** 5 mg Mycel von *D. tabescens* + 5 mg Rübenschnitzel-Pulver, **7:** DNA-Ladder (1kb, 5 µL)

Mithilfe des Kits wurde die DNA beider Pilze erfolgreich isoliert, sodass dieses bei allen weiteren Ansätzen für die DNA-Isolierung verwendet wurde. Um größere Mengen DNA zu isolieren und Wägefehler zu verkleinern, wurde die Einwaage für die weiteren Versuche auf 20 mg erhöht und die Aufschlusszeit auf 20 min angepasst.

3.3.1.2 Auswahl der geeigneten Primer

Die für die Messung mittels qPCR benötigten Primer sollten spezifisch an der DNA des Pilzes binden, jedoch keine Bindung mit der DNA der Rübenschnitzel eingehen. Da zum Zeitpunkt der Durchführung für *L. squarrosulus* noch kein vollständiges Genom beschrieben war, wurde für das Primer-Design auf das Genom der verwandten Spezies *Lentinus tigrinus* zurückgegriffen und mit dem Genom der Rübenschnitzel abgeglichen. Die Primer sind Tabelle 22 in Abschnitt 2.7.4.2 zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Primer wurde jeweils eine PCR nach Abschnitt 2.7.4.2 durchgeführt. Eingesetzt wurde isolierte DNA von Rübenschnitzeln sowie isolierte DNA aus dem lyophilisiertem Mycel von *L. squarrosulus* (Abbildung 73).

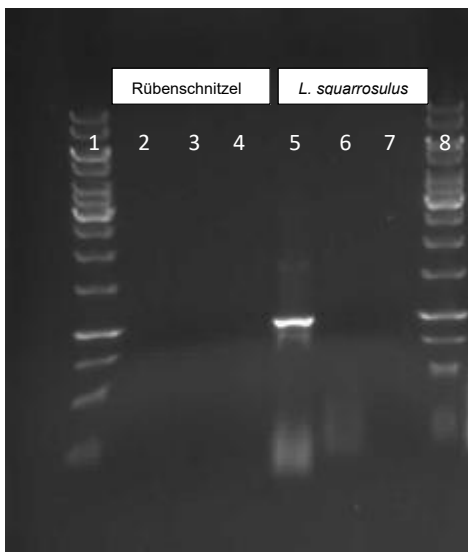


Abbildung 73: Agarosegel-Bild der PCR-Produkte der in Tabelle 22 aufgeführten Primer mit isolierter DNA aus Rübenschnitzeln und Mycel von *L. squarrosulus* (0,8% Agarose, 100 V, 60 min)

Aufgetragen sind 1: DNA-Ladder (1kb, 5 µL), 2: Rübenschnitzel DNA mit Primern „GlyHyd“, 3: Rübenschnitzel DNA mit Primern „AmyHyd“, 4: Rübenschnitzel DNA mit Primern „MetAminoPep“, 5: *L. squarrosulus* DNA mit Primern „GlyHyd“, 6: *L. squarrosulus* DNA mit Primern „AmyHyd“, 7: *L. squarrosulus* DNA mit Primern „MetAminoPep“, 8: DNA-Ladder (1kb, 5 µL)

Für Rübenschnitzel-DNA wurde kein PCR-Produkt erhalten. Für die DNA von *L. squarrosulus* wurde nur mit dem Primer-Paar „GlyHyd“ ein PCR-Produkt erhalten, welches jedoch aufgrund der Größe von ~1000 bp nicht für die qPCR geeignet war.

Im Folgenden wurden daher die Primer „ITS4/5“ verwendet. Das entsprechende PCR-Produkt der DNA von *L. squarrosulus* ist in Abbildung 74 dargestellt.

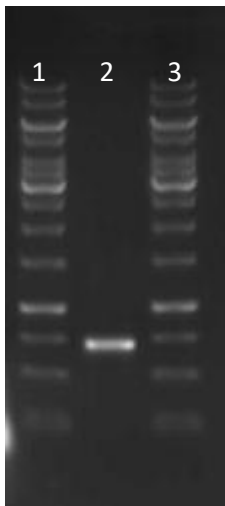


Abbildung 74: Agarosegel-Bild des PCR-Produktes der „ITS4/5“ Primer mit isolierter DNA aus Mycel von *L. squarrosulus* (0,8% Agarose, 100 V, 60 min) Aufgetragen sind **1:** DNA-Ladder (1kb, 5 μ L), **2:** *L. squarrosulus* DNA mit Primern „ITS4/5“, **3:** DNA-Ladder (1kb, 5 μ L)

Mit den Primern „ITS 4/5“ wurde ein PCR-Prdukt mit der DNA von *L. squarrosulus* gebildet. Das PCR-Produkt war aufgrund der Größe von ca. 700 bp nicht geeignet für die qPCR.

Im nächsten Schritt wurde aus einer Flüssigkultur Mycel entnommen, die DNA nach 2.7.4.1.2 isoliert, nach 2.7.4.4 aufgereinigt und zur Sequenzierung gesendet. Der sequenzierte Abschnitte wurden zum Primer-Design verwendet und ist im Anhang dargestellt.

Die erstellten Primer „ITS kurz F/R“ sind Tabelle 22 unter 2.7.4.2 zu entnehmen. Das Ergebnis der PCR nach Abschnitt 2.7.4.2 ist in Abbildung 75 dargestellt.

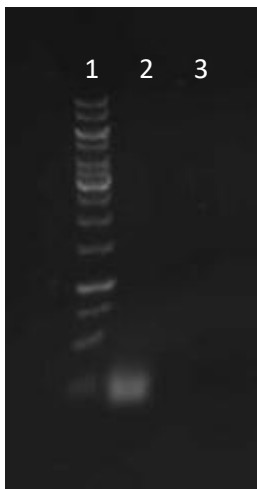


Abbildung 75: Agarosegel-Bild des PCR-Produktes der „ITS kurz F/R“ Primer mit isolierter DNA aus Mycel von *L. squarrosulus* (0,8% Agarose, 100 V, 60 min) Aufgetragen sind **1:** DNA-Ladder (1kb, 5 μ L), **2:** *L. squarrosulus* DNA mit Primern „ITS kurz F/R“, **3:** Rübenschitzel DNA mit Primern „ITS kurz F/R“

Mit den Primern „ITS kurz F/R“ wurde ein PCR-Produkt mit der DNA von *L. squarrosulus*, nicht jedoch mit der DNA von Rübenschitzeln erzeugt. Das PCR-Produkt wies eine Größe von ca. 200 bp auf, sodass diese Primer für die weiteren Optimierungen verwendet wurden.

3.3.1.3 Optimierung der qPCR-Methode

Zur Optimierung der qPCR-Methode wurden die Parameter DNA-, Primer- und Fluoreszenz-Farbstoff-Konzentration, sowie Annealing- und Elongationstemperatur variiert. Für die Optimierung wurden die vom Hersteller des verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffs „Power SYBR® Green“ vorgeschlagenen Werte herangezogen (Tabelle 24 und Tabelle 25).

Um bei der Optimierung ein möglichst breites Spektrum an Pilzgehalten abzudecken, wurde die Kalibrierreihe aus 2.7.1 verwendet und nach 2.7.4.1.2 aufgearbeitet. Zusätzlich wurden auch Realproben mit in die Optimierung einbezogen.

Optimierung der Verdünnungsstufe

Die Optimierung der Verdünnungsstufe der Template-DNA wurde zu Beginn mit den Primern „ITS 4/5“ durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die neuen Primer „ITS kurz F/R“ noch nicht vorlagen. Zunächst wurde eine geeignete Verdünnungsstufe ermittelt. Die erhaltenen Kurven mit Verdünnungen von 1:100- 1:10.000 sind in Abbildung 76 für die Pilzgehalte 40% und 80% dargestellt.

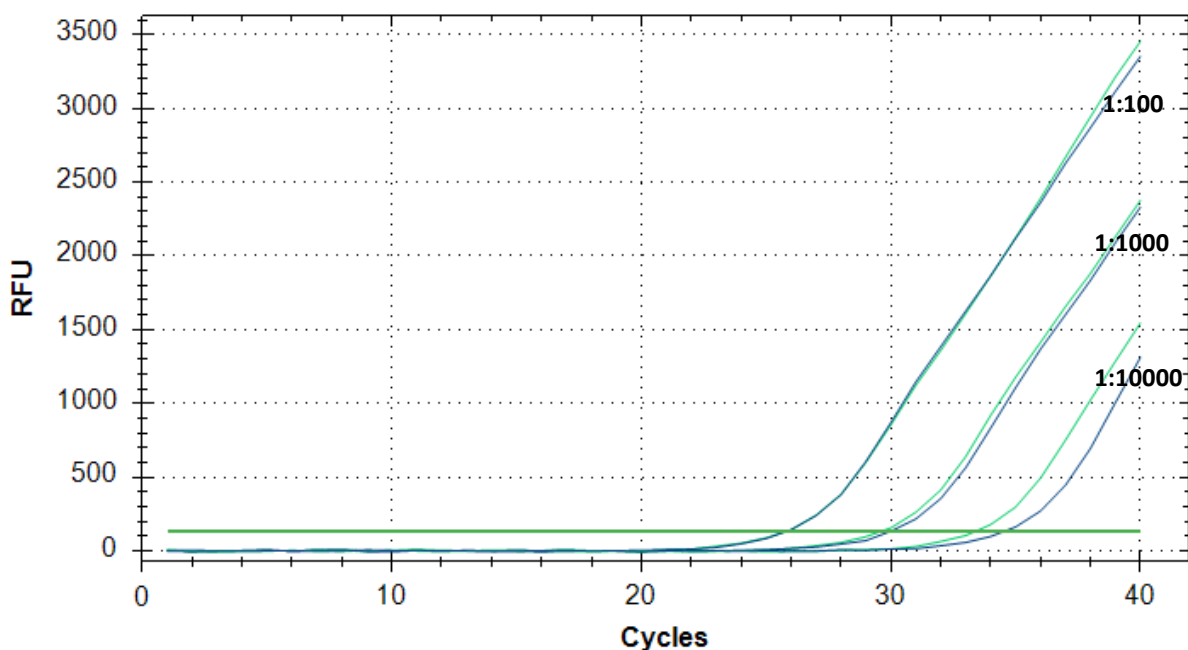


Abbildung 76: Amplifikationskurven der qPCR der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit unterschiedlichen Verdünnungen der Template-DNA
Dargestellt sind: dunkelblau: 40% Pilz, türkis: 80% Pilz; Verwendetes Fluorophor: Power SYBR® Green mit 10 µL je Ansatz, 5 µL Probenvolumen je Ansatz, 1 µL je Primer „ITS 4/5“ und Probe, Elongations- und Annealing-Temperatur: 60 °C

Da die Abstände der beiden Kurven mit steigender Verdünnung zunahm, wurde im Folgenden die Verdünnung weiter auf 1:100.000 sowie 1:200.000 erhöht. Die erhaltenen C_T -Werte unter Verwendung der „ITS kurz F/R“ Primer sind in Tabelle 62 dargestellt. Die erhaltenen Kurven sind dem Anhang (Abbildung XXI und Abbildung XXII) zu entnehmen.

Tabelle 62: C_t-Werte der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit variiertem Konzentration
 Eingesetzt wurde pro Ansatz je 1 µL der 1:100.000 bzw. 1:200.000 verdünnten Probe sowie die Primer „ITS kurz F/R“ in einer Konzentration von je 1 µL je Probe. Die eingesetzte Menge Power SYBR® Green betrug 10 µL je Ansatz, die Annealing- und Elongationstemperatur betrug 61,1°C.

	1:100.000 Verdünnung	1:200.000 Verdünnung
10% Pilz	31,45	32,61
20% Pilz	30,50	31,54
30% Pilz	30,04	31,17
40% Pilz	29,59	30,78
50% Pilz	29,37	30,52
60% Pilz	29,06	30,14
70% Pilz	28,61	29,88
80% Pilz	28,47	29,37
90% Pilz	28,45	29,72
100% Pilz	31,45	30,01

Mit einer Verdünnung von 1:100.000 war eine Trennung bis 80% Pilzgehalt möglich. Bei einer Verdünnung von 1:200.000 war eine Erhöhung der C_t-Werte bei gleichbleibenden Abständen der C_t-Werte zu beobachten.

Für die weitere Optimierung wurde eine Verdünnung von 1:100.000 gewählt.

Optimierung der Primer-Konzentration

In einem weiteren Schritt wurde die Primer-Konzentration variiert. Die Primer wurden hierzu in Konzentrationen von 250 nM (0,5 µL), 500 nM (1 µL) und 750 nM (1,5 µL) eingesetzt. Vermessen wurden die Wachstumstage 1 und 3 einer Kultur von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium. Die C_t-Werte sind in Tabelle 63 zusammengefasst. Abbildung 77 zeigt die entsprechenden Amplifikationskurven, wobei hier zur besseren Übersicht nur die Ergebnisse für 0,5 µL und 1,5 µL je Primer dargestellt sind.

Tabelle 63: C_t-Werte der Wachstumstage 1 und 3 einer Kultur von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit variiertem Menge je Primer
 Eingesetzt wurde pro Ansatz je 1 µL der 1:100.000 verdünnten Probe sowie die Primer „ITS kurz F/R“. Die eingesetzte Menge Power SYBR® Green betrug 10 µL je Ansatz.

Probe	Menge je Primer und Probe	Ct-Wert	
Wachstumstag 1	1,5 µL	29,31	} Differenz: 1,09
Wachstumstag 3	1,5 µL	28,22	
Wachstumstag 1	1,0 µL	32,10	} Differenz: 1,09
Wachstumstag 3	1,0 µL	31,01	
Wachstumstag 1	0,5 µL	31,31	} Differenz: 1,18
Wachstumstag 3	0,5 µL	30,13	

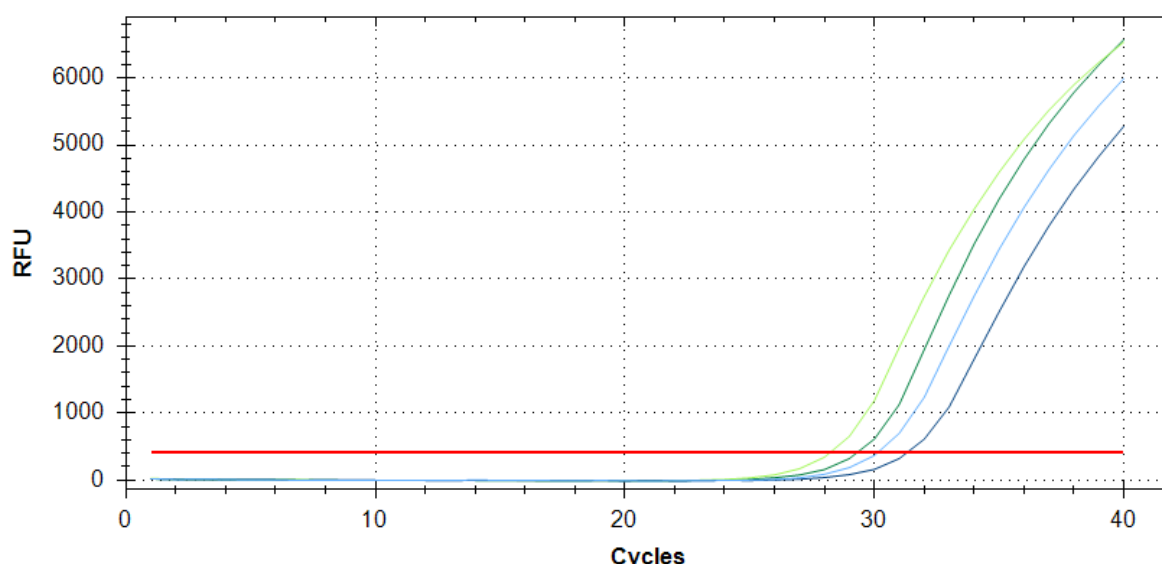


Abbildung 77: Amplifikationskurven der qPCR der Wachstumstage 1 und 3 der Kultur von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit variiert Menge je Primer
 Dargestellt sind: **dunkelgrün:** Wachstumstag 1 mit 1,5 µL Primer, **hellgrün:** Wachstumstag 3 mit 1,5 µL Primer, **dunkelblau:** Wachstumstag 1 mit 0,5 µL Primer, **hellblau:** Wachstumstag 3 mit 0,5 µL Primer;
 Verwendetes Fluorophor: Power SYBR® Green mit 10 µL je Ansatz, Proben 1:100.000 verdünnt, 1 µL Probenvolumen je Ansatz

Aus Tabelle 63 und Abbildung 77 geht hervor, dass eine Reduktion der Primer-Konzentration einen minimal vergrößerten Abstand beider Kurven bewirkte.

Im Folgenden wurde der Ansatz weiterverfolgt und die Primer-Konzentration auf das untere Minimum der Hersteller-Empfehlungen reduziert. Für die anschließenden Versuche wurden 0,1 µL je Primer (50 nM pro Ansatz) bzw. 0,2 µL je Primer (100 nM pro Ansatz) eingesetzt. Die Optimierung erfolgte in einem Zuge mit der Temperatur-Optimierung.

Optimierung der Temperatur

Für die Temperaturoptimierungen wurde ein Bereich von 57,0 °C - 63,6 °C betrachtet. Die Messung erfolgte mit der in Tabelle 19 dargestellten Konzentrationsreihe in einem Bereich von 50-90 % Pilz. Die erhaltenen C_t-Werte und gewählten Temperaturen sind in Tabelle 64 dargestellt. Die Amplifikationskurven bei 57 °C sind beispielhaft in Abbildung 78 dargestellt.

Tabelle 64: C_t-Werte der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit variiert Annealing/Elongations-Temperatur

Eingesetzt wurden pro Ansatz je 1 µL der 1:100.000 verdünnten Probe sowie die Primer „ITS kurz F/R“ in einer Konzentration von je 0,2 µL je Probe und 10 µL Power SYBR® Green.

Pilzgehalt	Temperatur				
	63,6 °C	61,5 °C	59,8 °C	58,4 °C	57,0 °C
50% Pilz	N/A	33,62	31,16	30,78	30,74
60% Pilz	N/A	32,18	30,72	30,11	29,91
70% Pilz	38,70	32,82	29,34*	29,66	29,61
80% Pilz	38,62	32,43	30,21	29,41	29,31
90% Pilz	N/A	32,02	30,46	29,57	29,29

*bei 70 % Pilzgehalt und einer Temperatur von 59,8 °C lag ein Pipettierfehler vor, sodass diese hier nicht weiter berücksichtigt wird

Wie Tabelle 64 zeigt, wurden bei 63,6 °C nur 70% und 80% Pilzgehalt nachgewiesen. Die übrigen Proben erreichten nach 40 Zyklen nicht die Detektionsschwelle. Mit abnehmender Temperatur waren niedrigere C_t-Werte zu beobachten, sodass alle Konzentrationen von 50% bis 90% detektiert wurden.

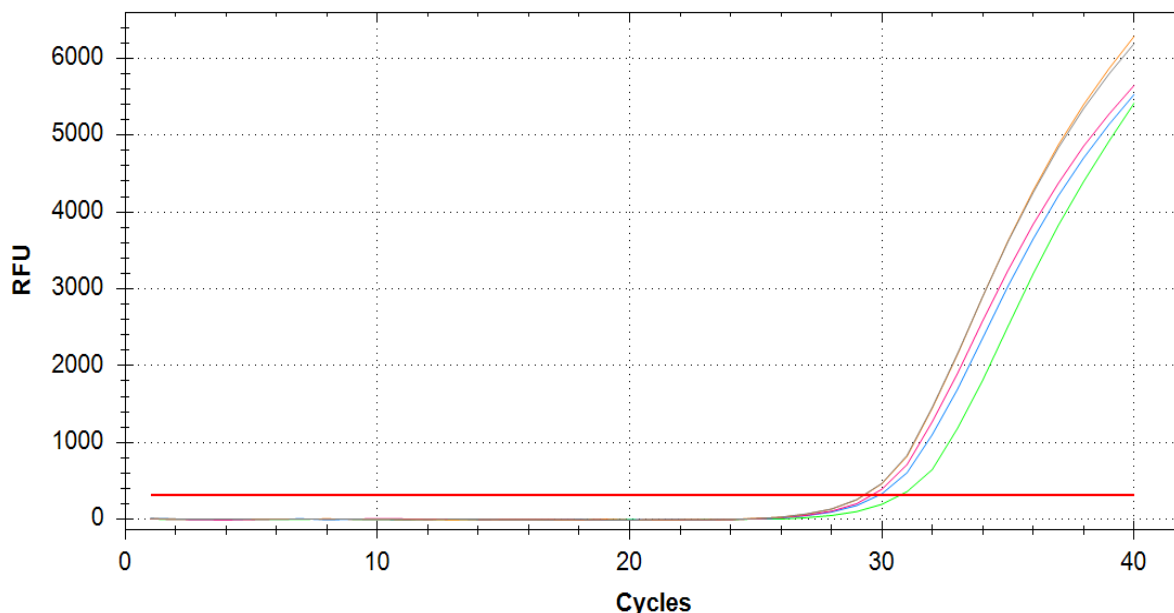


Abbildung 78: Amplifikationskurven der qPCR der Konzentrationsreihe aus Tabelle 19 mit 50%-90% Pilzgehalt

Dargestellt sind: grün Kalibrierung 50 % Pilz, blau Kalibrierung 60 % Pilz, pink Kalibrierung 70 % Pilz, grau 80 % Pilz, orange 90 % Pilz

Eingesetzt wurde je 1 µL der 1:100.000 verdünnten Proben, 0,2 µL je Primer je Probe und 10 µL SYBR® Green bei einer Annealing/Elongations-Temperatur: 57 °C

Für die beiden Temperaturen 57 °C und 58,4 °C wurden weitere Messungen im Zuge der Optimierung von Temperatur und Primer-Konzentration durchgeführt. Tabelle 65 zeigt die C_t-Werte für beide Temperaturen und Primer-Konzentrationen für die Konzentrationsreihe von 50% - 90% Pilz. Im Anhang (Abbildung XXIV, Abbildung XXV) sind die entsprechenden Amplifikationskurven dargestellt.

Tabelle 65: C_t-Werte der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit variierter Annealing/Elongations-Temperatur sowie variierter Primer-Konzentration

Eingesetzt wurde pro Ansatz je 1 µL der 1:100.000 verdünnten Probe sowie die Primer „ITS kurz F/R“ in einer Konzentration von je 0,1 µL bzw. 0,2 µL je Probe. Die eingesetzte Menge Power SYBR® Green betrug 10 µL je Ansatz.

	0,1 µL je Primer		0,2 µL je Primer	
	58,4 °C	57,0 °C	58,4 °C	57,0 °C
50 % Pilz	33,26	33,50	29,55	29,59
60 % Pilz	32,65	32,53	29,43	29,06
70 % Pilz	32,50	32,11	29,05	28,67
80 % Pilz	32,35	32,09	28,60	28,58
90 % Pilz	32,02	32,01	29,03	28,44

Durch die variierten Primer-Gehalte wurden die Amplifikationskurven allgemein verschoben. Eine höhere Primer-Konzentration resultierte in einer schnelleren Detektion, sodass bei einer Primer-Konzentration von 100 nM pro Ansatz (0,2 µL je Primer) die C_T-Werte 29,6 bis 28,4 betragen. Bei 50 nM pro Ansatz (0,1 µL je Primer) lagen die C_T-Werte zwischen 33,5 bis 32,0.

Im Folgenden wurde mit 0,1 µL je Primer und 57 °C weitergearbeitet.

Optimierung der eingesetzten Menge des Fluorophor-Mix' Power SYBR® Green

Da der eingesetzte Fluorophor-Mix Power SYBR® Green einen bedeutenden Anteil an den Kosten der qPCR hat, wurde versucht, diesen Gehalt pro Ansatz zu reduzieren, ohne die Sensitivität der Methode zu reduzieren. Gleichzeitig wurde angestrebt, die Sensitivität durch größere Mengen des Fluorophor-Mix' zu erhöhen. Dazu wurde die Konzentrationsreihe aus Tabelle 19 im Bereich von 50-100% Pilzgehalt mit SYBR®- Green-Mengen von 6-14 µL pro Ansatz vermessen (Tabelle 66).

Tabelle 66: C_T-Werte der Konzentrationsreihe (Tabelle 19) von 50-100% Pilzgehalt mit variiertes Menge Power SYBR® Green je Probe

Eingesetzt wurde pro Ansatz je 1 µL der 1:100.000 verdünnten Probe sowie die Primer „ITS kurz F/R“ in Konzentrationen von je 0,1 µL. Die Annealing-Temperatur betrug 57 °C.

	6 µL SYBR®- Green	8 µL SYBR®- Green	10 µL SYBR®- Green	12 µL SYBR®- Green	14 µL SYBR®- Green
50 % Pilz	-	34,61	33,92	32,65	34,20
60 % Pilz	-	33,91	33,10	32,11	33,41
70 % Pilz	-	33,34	33,09	31,59	33,04
80 % Pilz	-	33,06	32,44	31,47	32,73
90 % Pilz	-	33,08	32,47	31,62	33,36
100 % Pilz	-	33,22	32,42	31,74	33,45

Bei einer Verringerung der SYBR® Green-Konzentration auf 6 µL pro Ansatz wurde bei keiner Konzentration eine Amplifikation über dem Schwellenwert erreicht. Ab 8 µL SYBR® Green war eine Amplifikation für alle Pilzgehalte von 50-100% detektierbar. Ein grafischer Vergleich der Kurven bei 50% Pilzgehalt und SYBR® Green Gehalten von 6 µL - 14 µL ist im Anhang (Abbildung XXIII) dargestellt. Da durch höhere SYBR® Green Gehalte keine verbesserte Trennung erzielt wurde, wurden diese in weiteren Versuchen nicht weiter berücksichtigt. Abbildung 79 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven mit einer SYBR® Green Menge von 8 µL und Pilzgehalten von 50% - 100%.

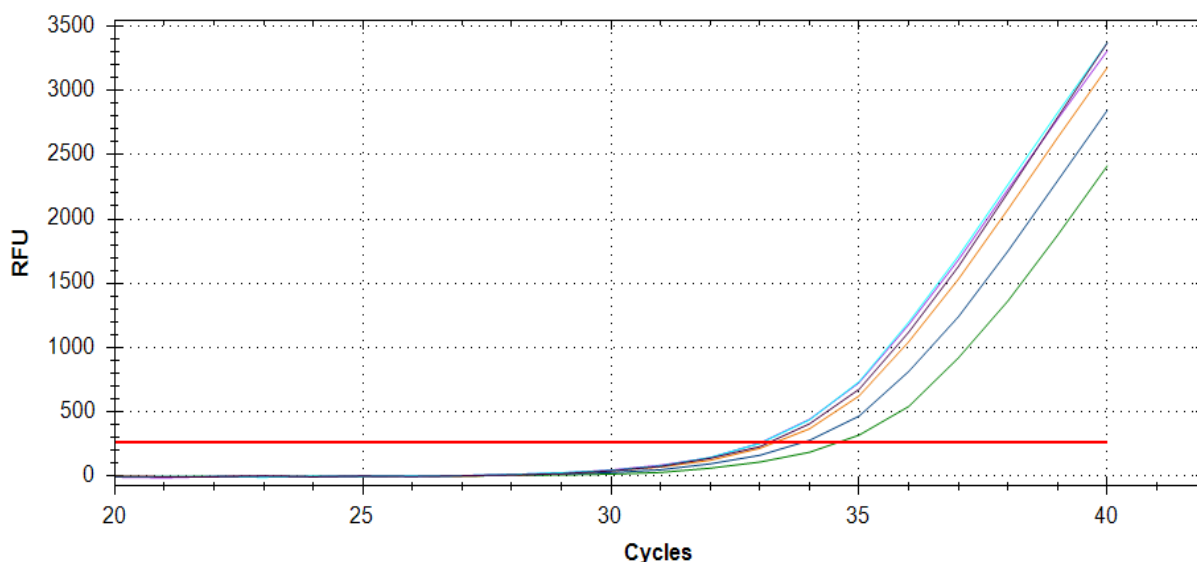


Abbildung 79: Amplifikationskurven der qPCR der Konzentrationsreihe aus Tabelle 19 mit 50%-100% Pilzgehalt und variierter Menge Power SYBR® Green MasterMix
 Dargestellt sind: grün: 50% Pilz, blau: 60% Pilz, orange: 70% Pilz, pink: 80% Pilz, türkis: 90% Pilz, schwarz: 100% Pilz, 57 °C Annealing/ Elongation, Verwendetes Fluorophor: Power SYBR® Green mit 8 µL je Ansatz, Proben 1:100.000 verdünnt, 1 µL Probenvolumen je Ansatz

Da bei 8 µL SYBR® Green je Probe im Vergleich zu 10 µL die C_T-Werte deutlich nach hinten verschoben wurden, wurde im nächsten Schritt geprüft, wie gut geringe Pilzgehalte von 10% bis 40% noch erfasst werden (Tabelle 67).

Tabelle 67: C_T-Werte der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit variierter Menge Power SYBR® Green

Eingesetzt wurde pro Ansatz je 1 µL der 1:100.000 verdünnten Probe sowie die Primer „ITS kurz F/R“ in einer Konzentration von je 0,1 µL je Probe. Die eingesetzte Menge Power SYBR® Green betrug 8 µL bzw. 10 µL je Ansatz, die Annealing- und Elongationstemperatur betrug 57 °C.

	C_T-Wert 8 µL SYBR®-Green	C_T-Wert 10 µL SYBR®-Green
10% Pilz	39,70	37,57
20% Pilz	38,76	36,77
30% Pilz	37,69	35,66
40% Pilz	37,63	34,93

Für geringe Pilzgehalte (10%, 20%) erfolgte die Detektion nur noch knapp vor der Detektionsgrenze von 40 Zyklen. Um diese Bereiche zuverlässig mitzuerfassen, wurde für die weiteren Versuche weiterhin ein Volumen von 10 µL SYBR® Green verwendet.

Messungen unter den optimierten Bedingungen

Zur Bestätigung der optimierten Bedingungen wurden mehrere Messungen der Konzentrationsreihe aus Tabelle 19 sowie verschiedener Wachstumsstadien von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium durchgeführt. Die Amplifikationskurven einer Messung der Konzentrationsreihe sind beispielhaft für einen Pilzgehalt von 0-80% in Abbildung 80 dargestellt. Da 90% und 100% die übrigen Kurven überlagerten, wurde aufgrund der

Übersichtlichkeit auf die Darstellung verzichtet. Die vollständigen Werte können dem Anhang (Tabelle III) entnommen werden. Eine gemittelte Darstellung zweiter Messungen zeigt Abbildung 81.

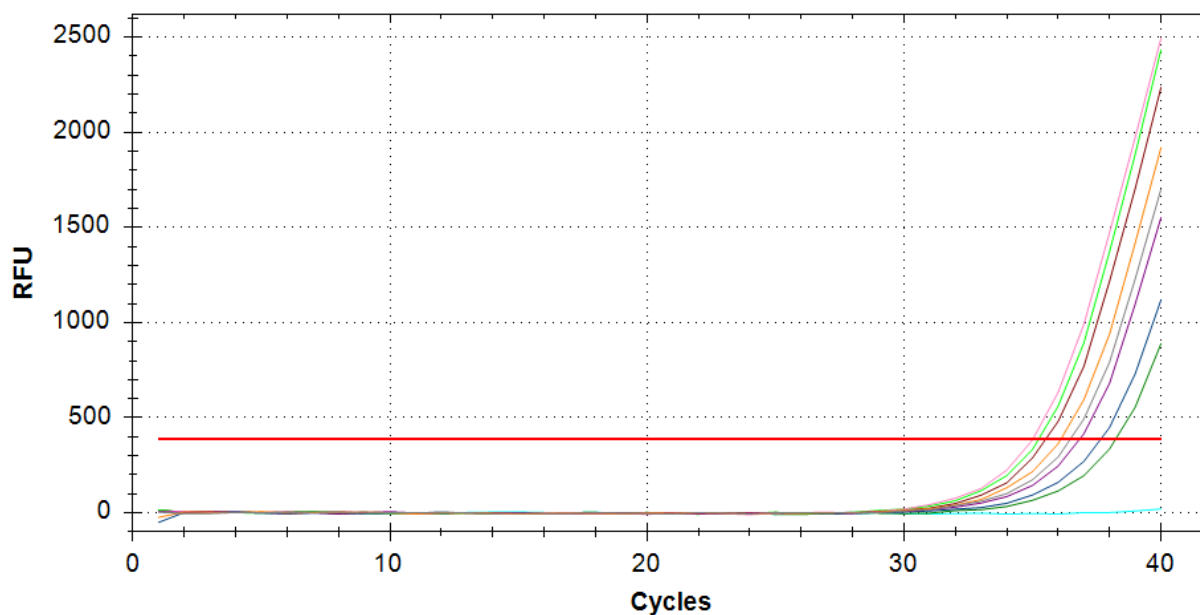


Abbildung 80: Amplifikationskurven der qPCR der Konzentrationsreihe aus Tabelle 19 mit 0%-80% Pilzgehalt mit optimierten Bedingungen
Dargestellt sind: **türkis:** 0% Pilz, **dunkelgrün:** 10% Pilz, **dunkelblau:** 20% Pilz, **lila:** 30% Pilz, **grau:** 40% Pilz, **orange:** 50% Pilz, **braun:** 60% Pilz, **hellgrün:** 70% Pilz, **rosa:** 80% Pilz, μL DNA-Template, 1:100.000 verdünnt, 0,1 μL je Primer „ITS kurz R/F“, 57 °C Annealing/ Elongationstemperatur, 10 μL SYBR® Green MasterMix

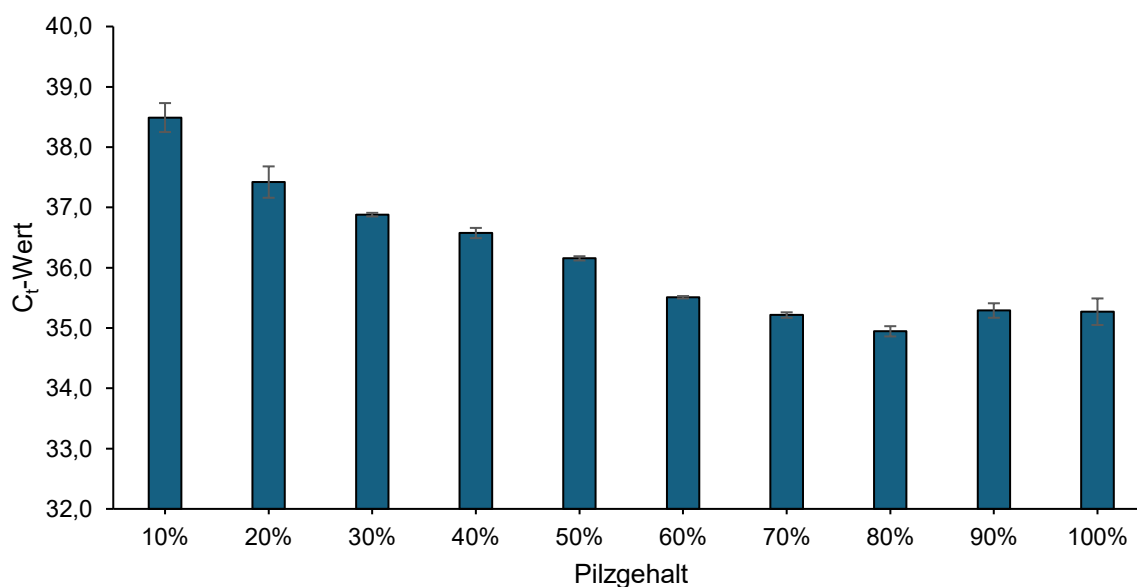


Abbildung 81: Mittelwerte der C_T-Werte mit halber Spannweite der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus*

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Messungen der Konzentrationsreihe aus Tabelle 19. Die Messbedingungen der qPCR waren wie folgt: 1 μL DNA-Template, 1:100.000 verdünnt, 0,1 μL je Primer „ITS kurz R/F“, 57 °C Annealing/ Elongationstemperatur, 10 μL SYBR® Green MasterMix

Die C_t -Werte wurden im Folgenden gegen die Pilzkonzentrationen in einer logarithmischen Skala aufgetragen, sodass eine Kalibriergerade (Abbildung 82) zur Quantifizierung des Pilzgehaltes in Realproben erhalten wurde.

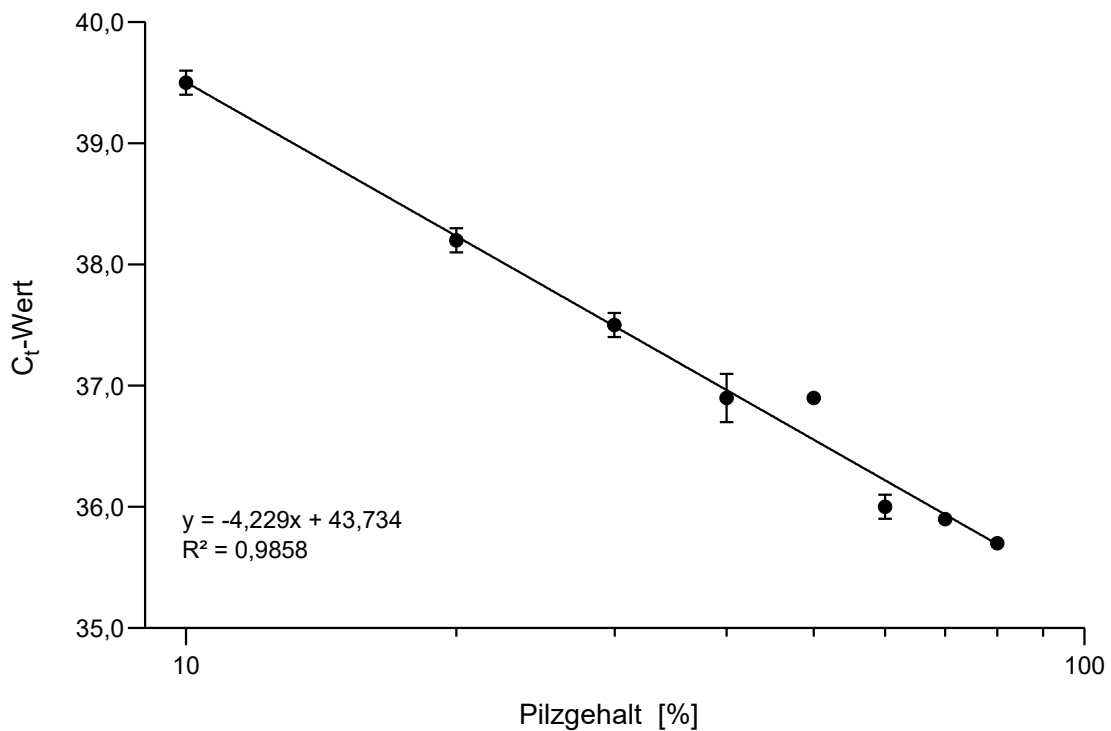


Abbildung 82: C_t -Werte aufgetragen gegen den Pilzgehalt

Dargestellt sind die Pilzgehalte von 10-80 %, welche mit den folgenden qPCR-Bedingungen gemessen worden sind: 1 μ L DNA-Template, 1:100.000 verdünnt, 0,1 μ L je Primer „ITS kurz R/F“, 57 °C Annealing/ Elongationstemperatur, 10 μ L SYBR® Green MasterMix

Anwendung auf Realproben

Zum Abschluss der Methodenentwicklung wurde die Wachstumstage 1, 3, 5 und 7 von *L. squarrosulus*, kultiviert in Rübenschnitzel-Melasse-Medium, mit den optimierten Bedingungen der qPCR gemessen. Die erhaltenen C_t -Gehalte wurden mithilfe der Kalibriergerade in Pilzgehalte umgerechnet und diese den Pilzgehalten, welche über den Chitin- und Ergosterol-Gehalt bestimmten wurden, gegenübergestellt (Abbildung 83).

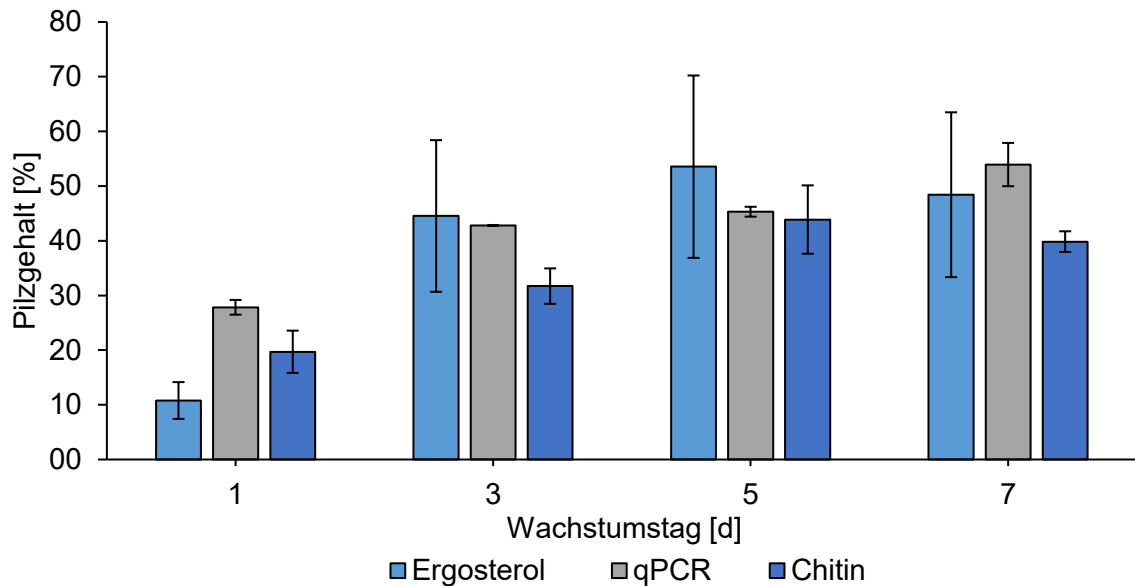


Abbildung 83: Pilzgehalte der Wachstumskurve von *L. squarrosulus* berechnet aus den analysierten Werten der Parameter Ergosterol, Chitin und q-PCR

Die Parameter wurden nach den Abschnitten 2.7.1, 2.7.2.1 und 2.7.4.4 analysiert. Für die Berechnung der Pilzgehalte aus den Analysedaten von Ergosterol und Chitin wurde der jeweilige Gehalt in purem Pilzmycel von *L. squarrosulus* zugrunde gelegt. Für die qPCR erfolgte die Berechnung mithilfe der Kalibriergerade aus Abbildung 82.

3.3.2 Vergleich zweier Methoden zur Chitin-Analytik

Eine weitere Methode der Pilzquantifizierung im Fermentat ist die Messung des Chitin-Gehaltes. Im Rahmen der Arbeit wurde die photometrische Methode nach Absatz 2.7.2.1 mit einer möglichen Alternativmethode nach 2.7.2.2, welche auf einem automatisierten alkalischen Aufschluss basiert, verglichen. Für die Methode nach 2.7.2.2 wurde das Gerät „Fibretherm“ der Firma Gerhardt verwendet.

Zunächst wurde überprüft, ob durch den alkalischen Aufschluss eine vollständige Hydrolyse der Proteine erfolgte. Dazu wurden die Proben nach 2.7.2.2 aufgeschlossen, getrocknet und das Aminosäureprofil (TAA) nach 2.8.3 bestimmt. Der Gesamtstickstoffgehalt wurde nach 2.8.2 ermittelt (Tabelle 68).

Tabelle 68: Stickstoff- und Aminosäuregehalte im Rückstand nach Aufschluss mittels Fibretherm
 Der Gesamtstickstoff wurde nach 2.8.2 ermittelt, das Aminosäureprofil nach 2.8.3 gemessen.
 n=3 (Gesamtstickstoff), n=2 (Aminosäuregehalt) OS = Originalsubstanz

	100% Nebenstrom	Mischung mit 20% Fruchtkörper	Mischung mit 40% Mycel	100% Mycel
Stickstoffgehalt nach dem Aufschluss [mg·(g OS) ⁻¹]	0,34 ± 0,18 *	0,60 ± 0,04	1,51 ± 0,03	3,24 ± 0,01
Stickstoffgehalt der nach dem Aufschluss verbliebenen Aminosäuren [mg·(g OS) ⁻¹]	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,21 ± 0,01
Anteil an Aminosäure-Stickstoff am Gesamtstickstoff [%]	5,9	6,6	4,0	6,5

*sehr nah an der Nachweisgrenze und somit mit erhöhter Messunsicherheit von ± 50%

Im Rückstand verbliebene Aminosäuren machten noch einen Anteil von 4-6 % am Gesamtstickstoff aus. Den größten Anteil machte dabei bei allen Proben, welche Mycel oder Fruchtkörper enthielten, Histidin aus. Ein Chromatogramm ist beispielhaft im Anhang (Abbildung XXVI) dargestellt.

Vergleich beider Verfahren für die Matrix Fruchtkörper

Mischungen von Fruchtkörpern des Pilzes *P. ostreatus* und dem Nebenstrom Süßkartoffel-Pulver wurden nach 2.7.3 hergestellt und mit der photometrischen sowie der Fibretherm-Methode vermessen (Abbildung 84, Abbildung 85 und Abbildung 86).

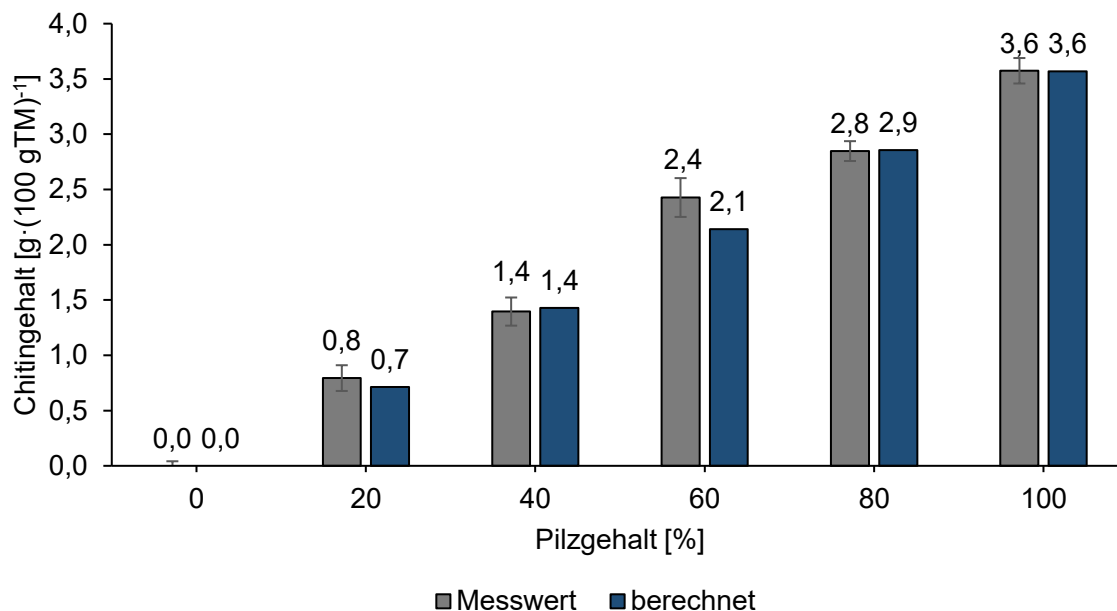


Abbildung 84: Berechnete und mit der photometrischen Methode gemessene Chitin-Gehalte der Proben mit bekannter Zusammensetzung (*P. ostreatus* in Kombination mit Süßkartoffelpulver)
 Lyophilisierte und gemahlene Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* wurden mit definierten Mengen Süßkartoffelpulver gemischt und mit der photometrischen Methode nach Smith und Gilkerson gemessen. Die gemessenen Werte wurden mit den berechneten Werten verglichen, die auf dem Wert von 100% Pilzen basieren. n =3

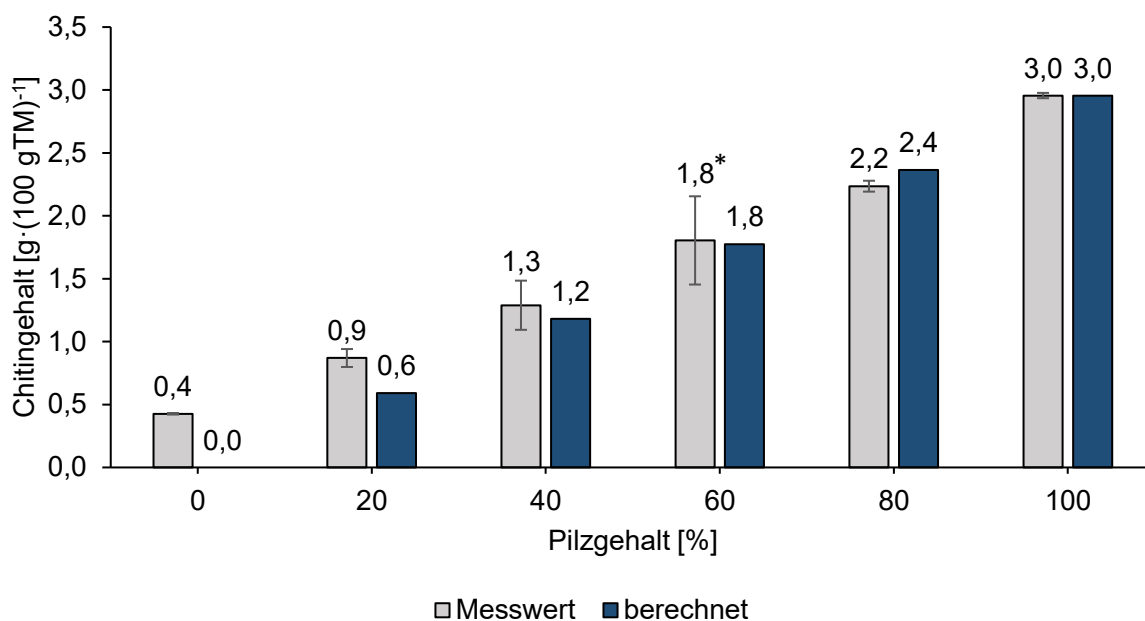


Abbildung 85: Berechnete und mittels Fibretherm-Methode gemessene Chitin-Gehalte der Proben mit bekannter Zusammensetzung (*P. ostreatus* in Kombination mit Süßkartoffelpulver)
 Lyophilisierte und gemahlene Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* wurden mit definierten Mengen Süßkartoffelpulver gemischt und mit der Fibretherm-Methode gemessen. Die gemessenen Werte wurden mit den berechneten Werten verglichen, die auf dem Wert von 100% Pilzen basieren. n =3
 *zwei verschiedene Proben wurden für die Messung des 60%-Wertes verwendet

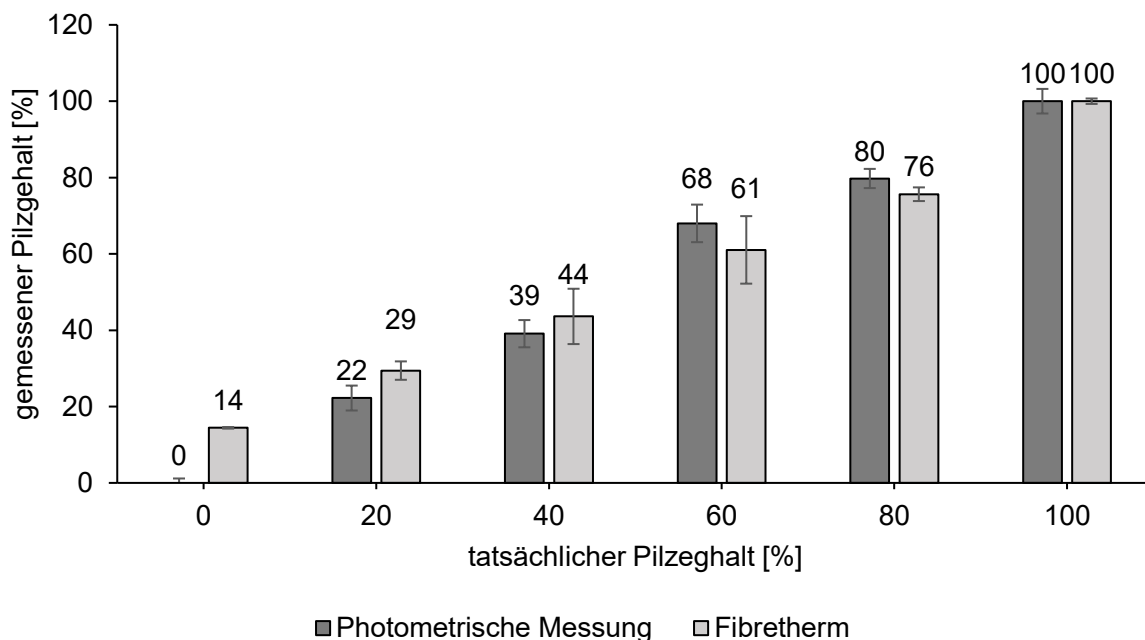


Abbildung 86: Pilzgehalte berechnet aus den gemessenen Werten der Proben mit bekannter Zusammensetzung (*P. ostreatus* in Kombination mit Süßkartoffelpulver)
 Lyophilisierte und gemahlene Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* wurden mit definierten Mengen Süßkartoffelpulver gemischt und mit der Fibretherm-Methode sowie der photometrischen Methode nach Smith und Gilkerson gemessen. Die Werte wurden aus den gemessenen Werten für 100% Pilz berechnet. n =3

Mit beiden Methoden wurden experimentell sehr ähnliche Chitin-Gehalte bestimmt, wie sie aus dem 100%-Wert errechnet wurden. Für die Fibretherm-Methode ergaben sich größere Abweichungen zu den eingestellten Pilzgehalten für die Messungen im Bereich 0-20% Pilzgehalt.

Neben der photometrischen Messung und der Fibretherm-Methode wurde auch der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl für die einzelnen Mischungen bestimmt und mit der Summe aus Chitin-Stickstoff und mittels Aminosäureanalysator ermitteltem Protein-Stickstoff verglichen (Abbildung 87).

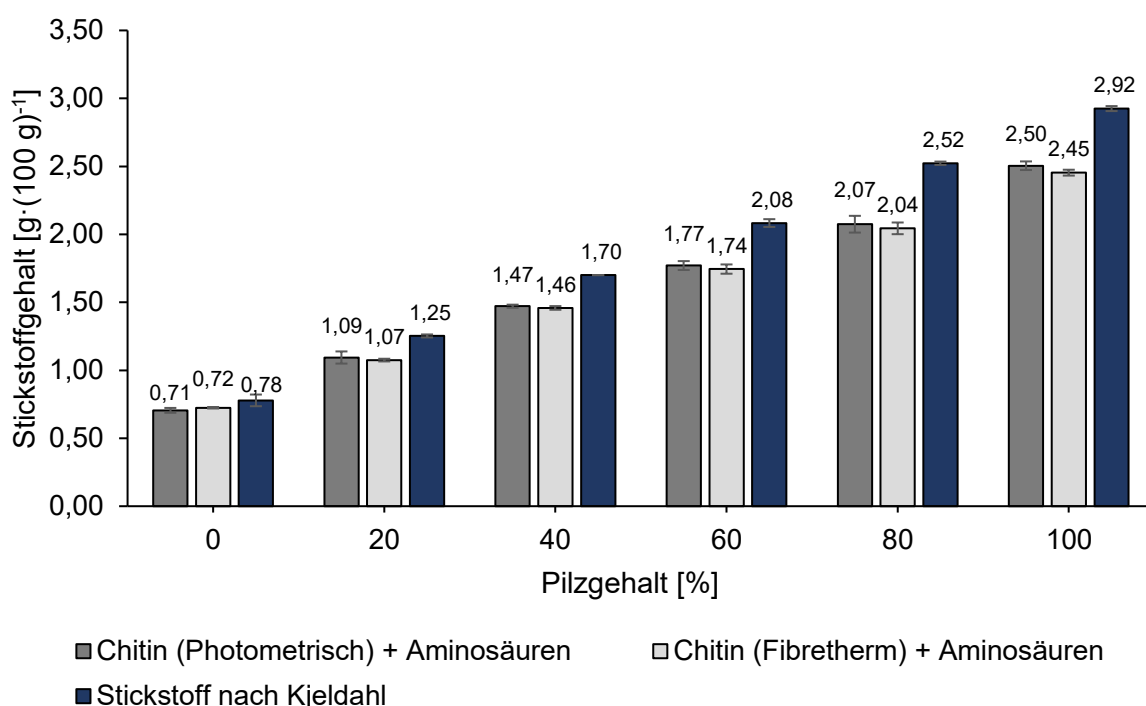


Abbildung 87: Vergleich des mittels Kjeldahl-Methodik analysierten Gesamtstickstoffs mit der Summe der Stickstoff-Gehalte aus der Chitin-Analytik und der Aminosäure-Analytik Mischungen von Fruchtkörpern von *P. ostreatus* mit Süßkartoffel-Pulver mit bekannter Zusammensetzung wurden mit der photometrischen und der Fibretherm-Methode auf ihren Chitin-Gehalt analysiert. Zusätzlich wurde der Gesamtstickstoffgehalt der Probe nach Kjeldahl analysiert und der Aminosäure-Stickstoff mittels Aminosäure-Analysator gemessen, n=2.

Je nach Pilzgehalt traten noch Differenzen von 0,07 g·(100 g)⁻¹ bis 0,48 g·(100 g)⁻¹ im Stickstoffgehalt auf. Es wurde daher nach 2.8.10 auf den Harnstoffgehalt der Proben geprüft. Die Ergebnisse der Harnstoff-Messung wurden, als Summe mit dem jeweiligen Chitin-Stickstoff, dem Nicht-Protein-Stickstoff (Differenz aus Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und Aminosäure-Stickstoff) gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind Abbildung 88 und Abbildung 89 zu entnehmen.

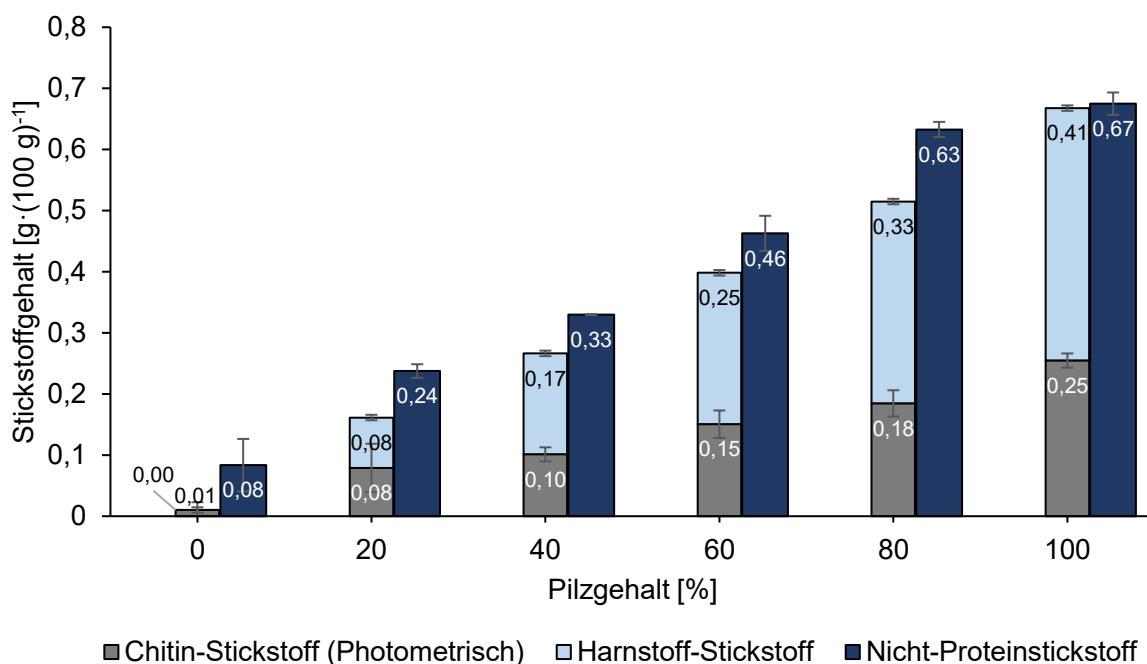


Abbildung 88: Gegenüberstellung des Nicht-Proteinstickstoffs und der Summe aus Chitin-Stickstoff (Photometrisch) und Harnstoff-Stickstoff
 Der Nicht-Proteinstickstoff wurde aus der Differenz des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl und des Aminosäure-Stickstoffs berechnet. Der Chitin-sowie Harnstoff-Gehalt wurden photometrisch analysiert und der Stickstoffgehalt aus den Ergebnissen berechnet.

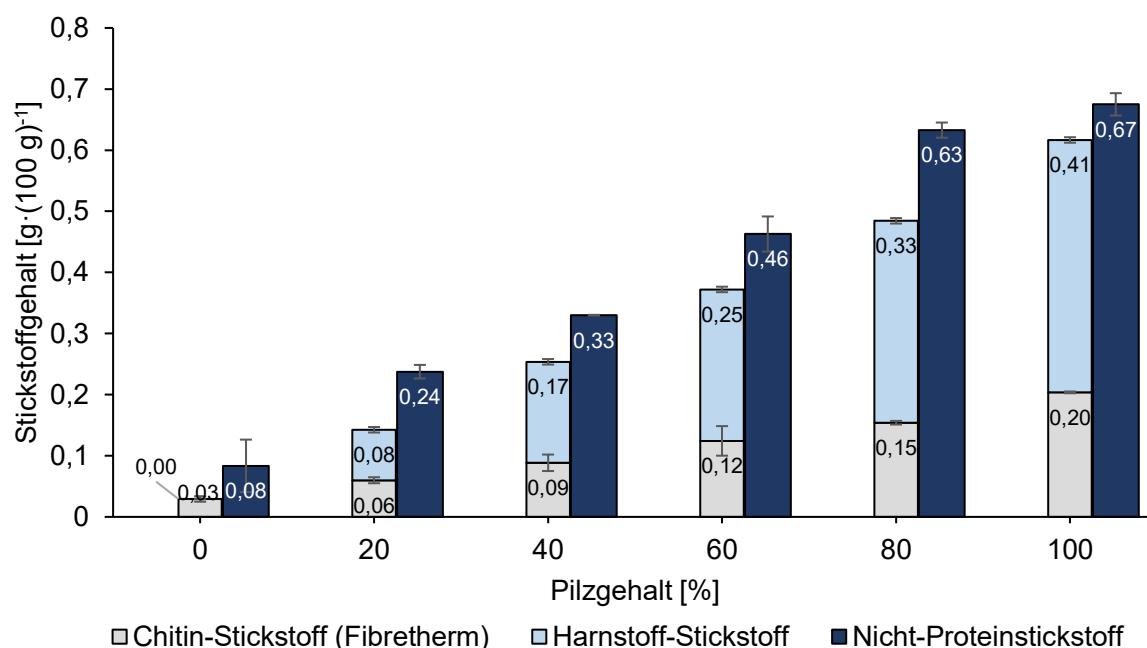


Abbildung 89: Gegenüberstellung des Nicht-Proteinstickstoffs und der Summe aus Chitin-Stickstoff (Fibretherm) und Harnstoff-Stickstoff
 Der Nicht-Proteinstickstoff wurde aus der Differenz des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl und des Aminosäure-Stickstoffs berechnet. Der Chitin-Gehalt wurde mittels Fibretherm analysiert und der Harnstoff-Gehalt photometrisch bestimmt. Die Stickstoffgehalte wurden aus den Ergebnissen berechnet.

Der Harnstoff-Gehalt machte in den Proben einen großen Anteil des Nicht-Protein-Stickstoffs aus. Je nach Pilzgehalt und Messmethode waren noch Differenzen zwischen den Stickstoffgehalten von 0,01 bis 0,15 g·(100 g)⁻¹ vorhanden.

Vergleich beider Verfahren für die Matrix Mycel

Wie für die Fruchtkörper wurden auch die Matrix Mycel Mischungen nach 2.7.3 angesetzt und mit der photometrischen Methode sowie der Fibretherm-Methode gemessen. Die erhaltenen Messwerte sind den aus dem Chitin-Gehalt für 100% Mycel theoretisch errechneten Werten in Abbildung 90 und Abbildung 91 gegenübergestellt.

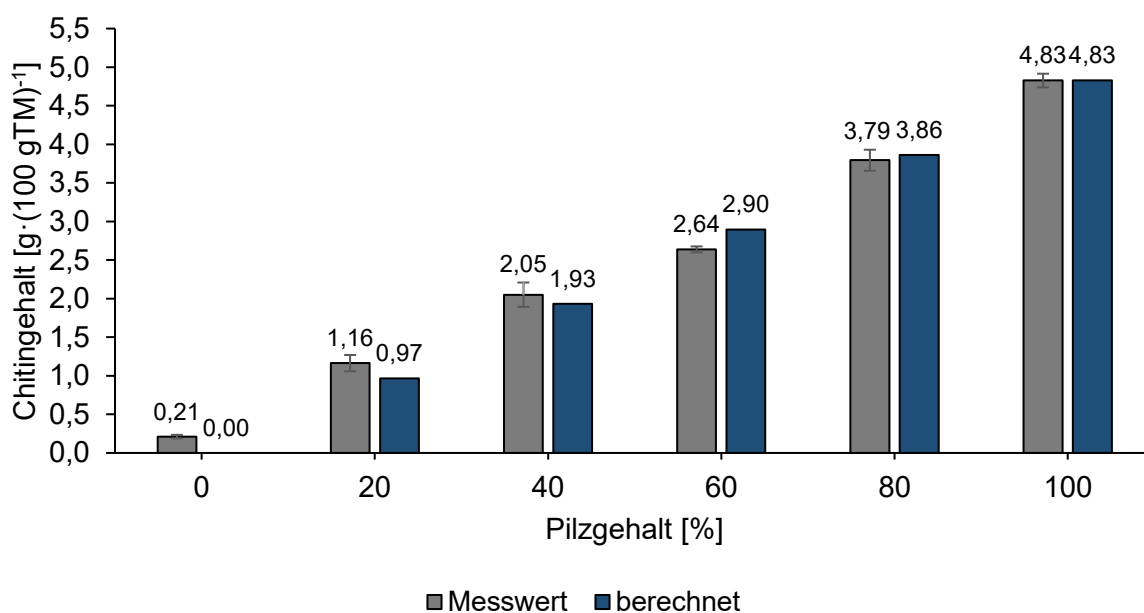


Abbildung 90: Berechnete und mit der photometrischen Methode gemessene Chitin-Gehalte der Proben mit bekannter Zusammensetzung (*L. squarrosulus* in Kombination mit Süßkartoffelpulver) Lyophilisiertes und gemahlene Mycel von *L. squarrosulus* wurde mit definierten Mengen Süßkartoffelpulver gemischt und mit der photometrischen Methode nach Smith und Gilkerson gemessen. Die gemessenen Werte wurden mit den berechneten Werten verglichen, die auf dem Wert von 100% Pilzen basieren, n =3.

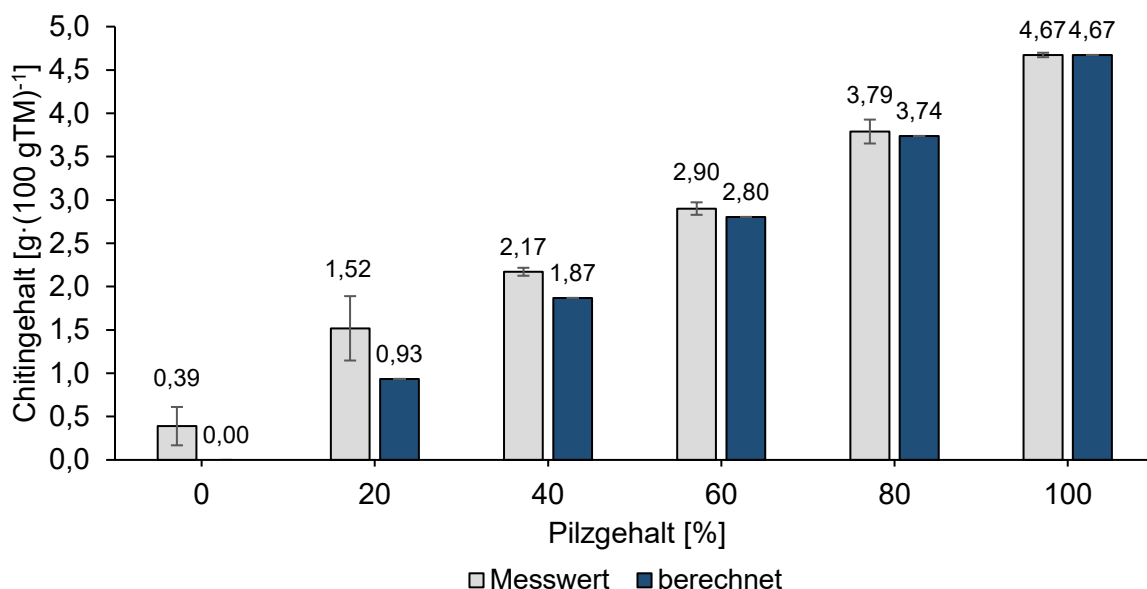


Abbildung 91: Berechnete und mittels Fibretherm-Methode gemessene Chitin-Gehalte der Proben mit bekannter Zusammensetzung (*L. squarrosulus* in Kombination mit Süßkartoffelpulver)
 Lyophilisiertes und gemahlenes Mycel von *L. squarrosulus* wurde mit definierten Mengen Süßkartoffelpulver gemischt und mit der Fibretherm-Methode gemessen. Die gemessenen Werte wurden mit den berechneten Werten verglichen, die auf dem Wert von 100% Pilzen basieren, n =3.

Die aus den jeweiligen Chitin-Gehalten für 100% Mycel berechneten Pilzgehalte sind für beide Methoden in Abbildung 92 dargestellt.

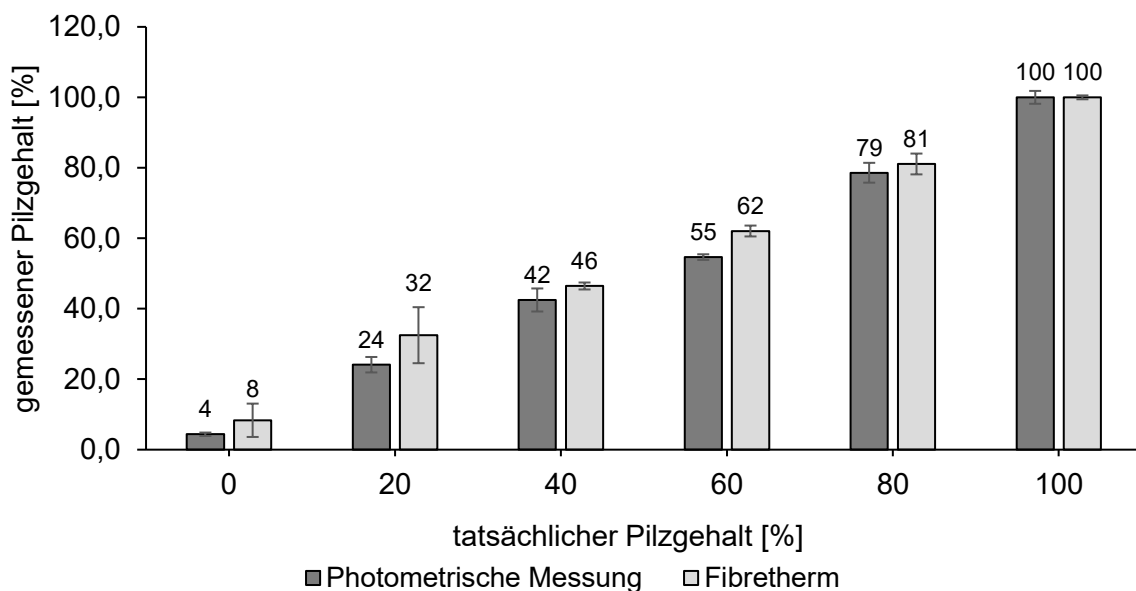


Abbildung 92: Pilzgehalte berechnet aus den gemessenen Werten der Proben mit bekannter Zusammensetzung (*L. squarrosulus* in Kombination mit Süßkartoffelpulver)
 Lyophilisiertes und gemahlenes Mycel von *L. squarrosulus* wurde mit definierten Mengen Süßkartoffelpulver gemischt und mit der Fibretherm-Methode sowie der photometrischen Methode nach Smith und Gilkerson gemessen. Die Werte wurden aus den gemessenen Werten für 100% Pilz berechnet, n =3.

Die gemessenen Werte für beide Messmethoden wichen nur geringfügig von dem tatsächlich eingestellten Wert ab. Größere Fehler waren für die Fibretherm-Methode bei Mycelgehalten von 0% und 20% zu beobachten.

Vergleicher beide Verfahren für Bioreaktor-Proben

Zusätzlich zu den definierten Mischungen wurden auch zwei in Teil 3.1.4.8 erhaltene Bioreaktor-Proben mit den Methoden aus 2.7.2.1 und aus 2.7.2.2 auf ihren Pilzgehalt analysiert (Abbildung 93). Die Berechnung erfolgte mithilfe der ermittelten Chitingehalte aus Abbildung 90.

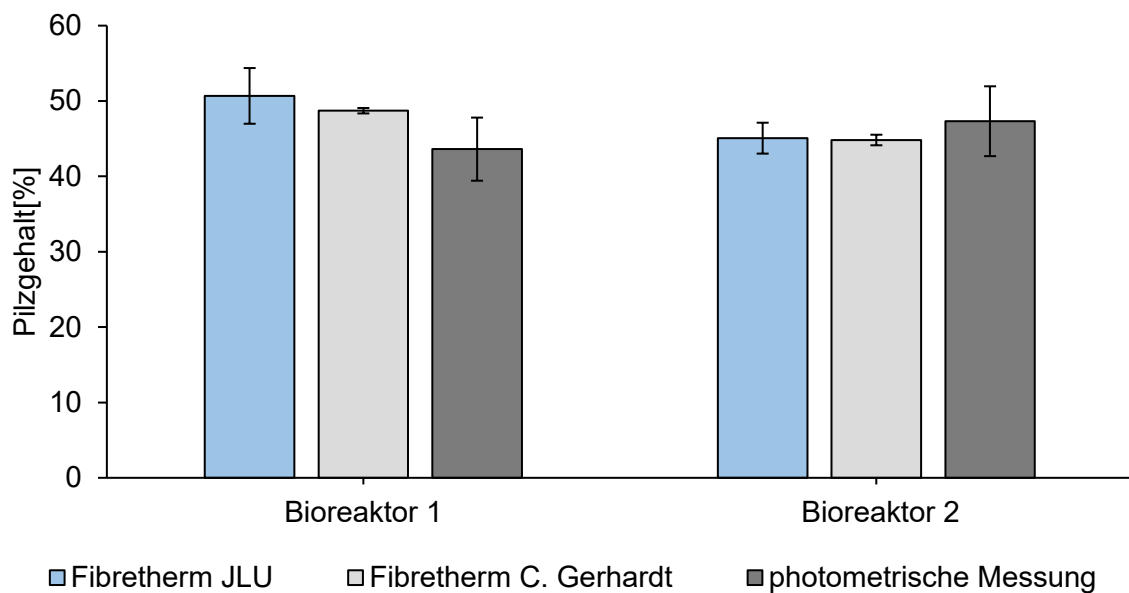


Abbildung 93: Pilzgehalte zweier Bioreaktorproben berechnet aus dem Chitin-Gehalt für 100% Mycel. Die Kultivierung von *L. squarrosulus* erfolgte im 5-Liter-Bioreaktor mit Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 6 Tage. Die Messung des lyophilisierten und gemahlene Mycels erfolgte mittels photometrischer Methode sowie Fibretherm-Methode an zwei verschiedenen Standorten. Die Werte wurden aus den gemessenen Werten für 100% Piltz berechnet, n =3.

Ein Signifikanztest ergab für keine der Messungen einen signifikanten Unterschied (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$)

4 DISKUSSION

4.1 Substrate Rübenschnitzel und Melasse

4.1.1 Chemische Zusammensetzung

Für die Zusammenstellung des Kulturmediums wurde die chemische Zusammensetzung der Substrate Rübenschnitzel-Pellets und Melasse analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 69 Literaturwerten gegenübergestellt.

Tabelle 69: Vergleichende Darstellung der analytisch ermittelten chemischen Zusammensetzung von pelletierten Rübenschnitzeln und Melasse mit Literaturwerten (Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing, 2023; Nordzucker AG; Wróblewska *et al.*, 2021; Habeeb *et al.*, 2017; Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003; Fadel *et al.*, 2000)

	Melasse		Rübenschnitzel-Melasse-Pellets	
	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$
Fett	0,1 ± 0,0	0,0-0,2	2,3 ± 0,4	0,7-0,9
Protein	11,4 ± 0,4	9,0-12,6	8,8 ± 0,3	8,2-12,6
Wasser	18,6 ± 0,0	20,0-25,0	10,1 ± 0,0	7,6-10,0
Kohlenhydrate	55 ± 4	50,9-59,7	81 ± 12	69,5-84,5
Asche	8,5 ± 0,1	7,4-10,6	5,6 ± 0,2	3,3-8,1

Tabelle 69 ist zu entnehmen, dass die analytisch ermittelten Werte beider Substrate mit den Literaturwerten vergleichbar waren. Bei dem Substrat Melasse gab es leichte Abweichungen beim Wassergehalt, bei den Rübenschnitzel-Pellets beim Fettgehalt.

Bei dem Substrat Melasse wurde ein geringerer Wassergehalt analysiert, was zum einen darauf zurückzuführen ist, dass der Wassergehalt mittels Differenzwägung nach Gefriertrocknung analysiert wurde und nach der Gefriertrocknung stets ein geringer Restfeuchtegehalt von 1-10% in der Probe verbleibt (Nowak und Jakubczyk, 2020; Bhatta *et al.*, 2020). Zum anderen wurde im Rahmen der Arbeit Melasse der Vorjahres-Kampagne erhalten, sodass auch aufgrund der Lagerdauer ein verringerter Wassergehalt möglich ist.

Für das Substrat Rübenschnitzel-Pellets wurde ein Fettgehalt analysiert, welcher leicht über den Literaturwerten liegt. In der Literatur sind geringe Fettgehalte von 0,7-0,8% beschrieben, analytisch wurden 2,3% ± 0,4% ermittelt. In Spezifikationen von Futtermittelherstellern sind jedoch auch Gehalte von 1-2% beschrieben (Furst McNess Company, 2021).

Die Abweichungen zu den Literaturwerten können unter anderem auf den Melassierungsgrad zurückgeführt werden (Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003). So sind in der Literatur Werte für unmelassierte Trockenschnitzel

von bis zu 2% Fett beschrieben, während mit einem höheren Melassierungsgrad der Fettgehalt der Rübenschnitzel-Melasse-Pellets sinkt (Dinand *et al.*, 1999). Desweiteren haben auch das Zuckergewinnungsverfahren, der Trocknungsprozess, der Reifegrad der Rübe sowie die geografische Herkunft einen bedeutenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Endproduktes (Marzo-Gago *et al.*, 2023; Südzucker AG, 2011; Fadel *et al.*, 2000). Auch kann das Endprodukt noch bis zu 0,5% Schaumverhüter enthalten, welche während der Zuckergewinnung als Verarbeitungshilfsstoff zugesetzt und nicht vollständig im Prozess entfernt werden (Pfeifer & Langen GmbH & Co. KG, 2021). Bei diesen kann es sich bspw. um Ester von Speisefettsäuren handeln, die bei der Fettbestimmung miterfasst werden (Schill+Seilacher "Struktol" GmbH, 2023).

Den größten Einfluss hat der Melassierungsgrad der Schnitzel/Pellets jedoch auf den Zuckergehalt. In Tabelle 70 sind die analytisch ermittelten Gehalte von Saccharose, Glucose und Fructose entsprechenden Literaturwerten gegenübergestellt. Weitere Mono- und Oligosaccharide wurden nicht betrachtet, da Raffinose, Trehalose, Stachyose und Kestose in der Literatur nicht nachgewiesen wurden (Wróblewska *et al.*, 2021; Baryga *et al.*, 2023).

Tabelle 70: Vergleichende Darstellung der enzymatisch ermittelten Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose von pelletierten Rübenschnitzeln und Melasse mit Literaturwerten (Baryga *et al.*, 2023; Palmonari *et al.*, 2020; Wróblewska *et al.*, 2021)

	Melasse		Rübenschnitzel-Melasse-Pellets		
	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert unmelassierte Schnitzel $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert melassierte Schnitzel $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$
Glucose	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,50	0,54 ± 0,02	0,84 ± 0,07	Σ0,8
Fructose	0,01 ± 0,00	0,30 ± 0,30	0,78 ± 0,02	1,12 ± 0,02	
Saccharose	49,5 ± 0,1	47,3 ± 3,0	10,5 ± 0,1	0,10 ± 0,00	19,9

Der Saccharose-Gehalt von Rübenschnitzel-Pellets ist stark von dem verwendeten Extraktionsverfahren sowie der Menge zugesetzter Melasse abhängig. Je nach Werk und Hersteller werden in Deutschland verschiedene Gehalte von 9-19% Gesamtzucker in den Verkehr gebracht (Nordzucker AG, 2006b; Pfeifer & Langen GmbH & Co. KG, 2021; Südzucker AG, 2014). Bei den von uns erhaltenen Pellets handelt es sich um schwach melassierte Pellets mit einem Gesamtzuckergehalt von ca. 12%. Dies passt mit den analytisch ermittelten Werten überein. Die ermittelten Werte für Glucose und Fructose sind niedriger als die Literaturwerte für unmelassierte Schnitzel, jedoch höher als die für stark melassierte Schnitzel (Baryga *et al.*, 2023; Wróblewska *et al.*, 2021). Dies ist auf den geringen Glucose- und Fructose-Gehalt der zugesetzten Melasse sowie natürliche jährliche Schwankungen zurückzuführen (Palmonari *et al.*, 2020; Marzo-Gago *et al.*, 2023).

Für die Bewertung der Proteinqualität der Substrate wurde das Aminosäure-Profil nach 2.8.3 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 94 Literaturwerten gegenübergestellt.

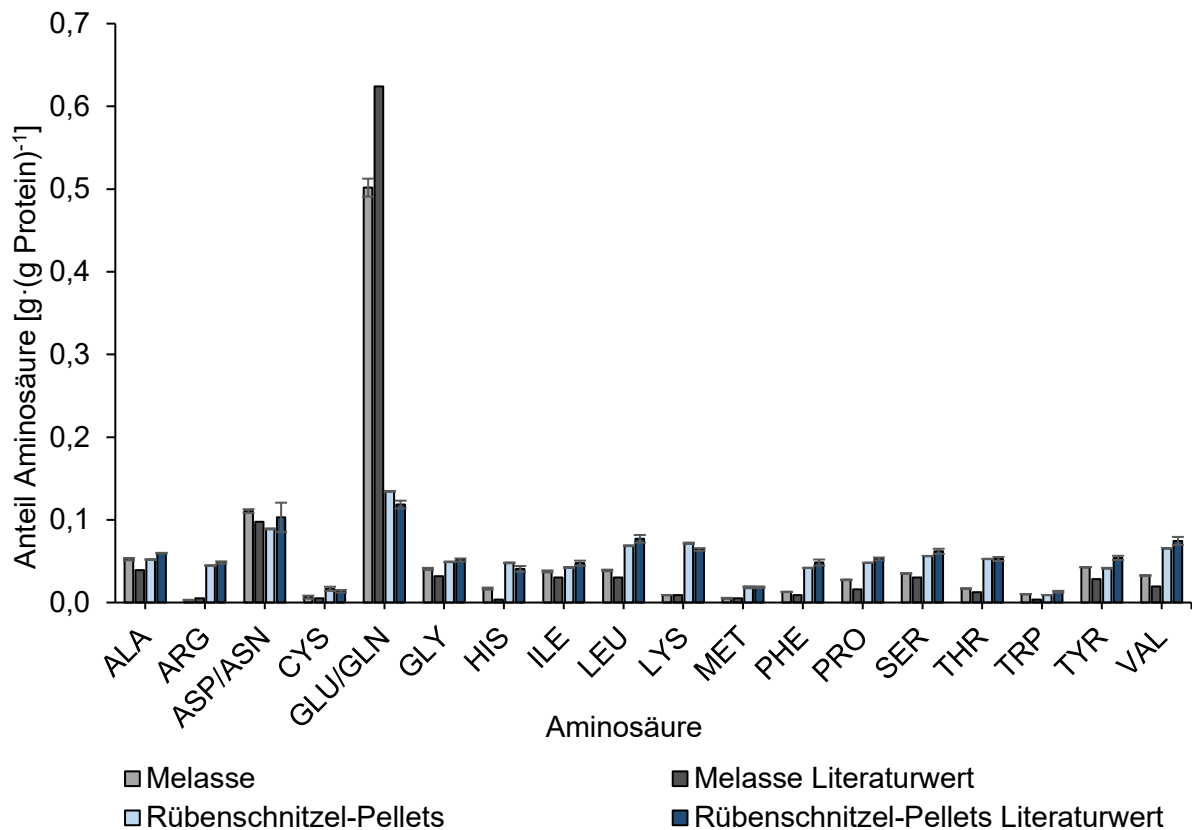


Abbildung 94: Gegenüberstellung des analysierten Aminosäure-Profiles von Rübenschnitzel-Pellets sowie Melasse mit Literaturwerten (Zang *et al.*, 2021; Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003)

Wie Abbildung 94 zu entnehmen ist, stimmen die nach 2.8.3 analysierten Werte für Rübenschnitzel-Pellets gut mit den Literaturwerten überein. Asparagin/Asparaginsäure und Glutamin/Glutaminsäure sind auch in der Literatur als dominierenden Aminosäuren angegeben, während Methionin/Cystein und Tryptophan limitierend sind.

Für das Substrat Melasse sind in der Literatur höhere Gehalte für die dominierende Aminosäure Glutaminsäure beschrieben als hier analytisch bestimmt wurde (Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003). Das Aminosäureprofil ist sonst jedoch gut vergleichbar. Limitierende Aminosäure in der Literatur ist neben Cystein/Methionin und Lysin auch die Aminosäure Tryptophan. Unterschiede in der Menge der Aminosäuren können auf natürliche Schwankungen, begründet in unterschiedlichen Sorten, geografischer Herkunft und den Witterungsbedingungen des Anbaujahrs zurückzuführen sein (Marzo-Gago *et al.*, 2023; Südzucker AG, 2011; Fadel *et al.*, 2000).

4.1.2 Screening in Oberflächenkultur

Für das Screening in Oberflächenkultur wurden 57 Pilze aus der institutseigenen Stammsammlung verwendet. Außer dem Pilz *Mortierella alpina*, welcher der Abteilung der Zygomycota angehört, wurden für das Screening ausschließlich Pilze aus der Abteilung der Basidiomycota verwendet (Tabelle 40 und Tabelle 41). Wie Tabelle 40 zu entnehmen ist, war das Wachstum der verschiedenen Pilze auf Agar-Medium, welches lediglich Rübenschnitzel enthielt, sehr variabel. Extrahierte und getrocknete Zuckerrübenschnitzel weisen (Tabelle 70) je nach Melassierungsgrad nur noch geringe Mengen der frei vorliegenden Zucker Glucose, Fructose und Saccharose auf (Baryga *et al.*, 2023; Wróblewska *et al.*, 2021). Hauptsächlich bestehen Rübenschnitzel aus den Zellwand-Polymeren Pektin, Cellulose, Hemicellulose und Lignin, wobei Lignin nur 1-4%, Pektin 20-30%, Cellulose 20-40% und Hemicellulose 25-35% der Biomasse ausmachen (Pawłowska *et al.*, 2023; Sidi-Yacoub *et al.*, 2019). Pektin liegt vor allem in Form von Homogalacturonan und Rhamnogalacturonan I vor. Das Polysaccharid Cellulose liegt eingebettet in Lignin vor, sodass ein enzymatischer Abbau erschwert wird (Watkinson und Eastwood, 2012).

Für einen möglichst vollständigen Abbau des Zellwand-Materials werden daher Enzyme für den Abbau von Pektin, Lignin, Cellulose und Hemicellulose benötigt. Da das Enzymspektrum in der Abteilung der Basidiomycota stark variiert, wurden während des Screenings deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Pilzen festgestellt (Goodell *et al.*, 2008). Bei Basidiomyceten wird allgemein zwischen Weiß- und Braunfäule-Pilzen unterschieden, wobei der Hauptunterschied darin besteht, dass Weißfäule-Pilze im Gegensatz zu Braunfäule-Pilzen größtenteils über Lignin abbauende Enzyme verfügen (Goodell *et al.*, 2008; Watkinson und Eastwood, 2012).

Im Screening zeigten vor allem Seitlinge (bspw. *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus ostreatus*) Trameten (*Trametes versicolor*, *Trametes ochracea*), Sägeblättlinge (*Lentinus squarrosulus*, *Lentinus crinitus*), Schwefelporlinge (*Laetiporus sulphureus*, *Laetiporus persicinus*) sowie die Pilze *Flammulina velutipes*, *Ischnoderma benzoniunum*, *Wolfiporia cocos*, *Ganoderma lucidum* und *Coprinellus xanthothrix* schnelles Wachstum. Kein Wachstum nach 10-tägiger Kultivierung zeigten die drei Pilze *Polyporus squamosus*, *Sparassis crispa* sowie *Clitocybe gibba*.

Bei den Pilzen, die schnelles Wachstum zeigten, handelt es sich größtenteils um Weißfäule-Pilze, also Pilze welche über ein enzymatisches System zum Abbau von Lignin verfügen (Watkinson und Eastwood, 2012; Goodell *et al.*, 2008; Hatakka, 1983). Vor allem Pilze der Gattung *Pleurotus* zeigten hier sehr schnelles Wachstum und hatten nach 7-tägiger Kultivierung größtenteils über 75% des Nähragars bewachsen. In der Literatur sind Seitlinge allgemein als gute Destruenten pflanzlichen Materials beschrieben und verfügen über ein breites Enzymspektrum zum Abbau von Cellulose, Hemicellulose sowie Lignin (Elisashvili *et al.*, 2006; Adebayo und Martínez-Carrera, 2015; Hadar *et al.*, 1992; Elisashvili *et al.*, 2008; Bari *et al.*, 2015). Dies ist auch für die Spezies *Pleurotus dryinus* beschrieben, welche bei dem hier

durchgeführten Screening in Oberflächenkultur erst nach 10-tägiger Kultivierungsdauer Wachstum zeigte (Elisashvili *et al.*, 2006).

Neben Seitlingen zeigten auch Trameten, Sägeblättlinge und Schwefelporlinge ein schnelles Wachstum. Sowohl bei den betrachteten Trameten als auch bei den Sägeblättlingen handelt es sich um Weißfäule-Pilze (Isikhuemhen *et al.*, 2012; Collins und Dobson, 1997). Trameten, wie die Spezies *Trametes versicolor*, können lignocellulosehaltiges pflanzliches Material, wie Traubenkerne- und stiele, Holzschnitzel und Weizenstroh, sehr gut abbauen (Lorenzo *et al.*, 2002; Schlosser *et al.*, 1997). Sie verfügen dazu sowohl über Cellulose- und Hemicellulose abbauende Enzyme als auch über Lignin abbauende Enzyme wie Laccasen, Mangan- und Lignin-Peroxidasen, deren Expression durch die Kultivierung auf pflanzlichem Material induziert wird (Lorenzo *et al.*, 2002; Bari *et al.*, 2015). Auch Sägeblättlinge, wie die Spezies *Lentinus squarrosulus*, verfügen über ein breites Spektrum lignocellulolytischer Enzyme (Isikhuemhen *et al.*, 2012; Ravichandran *et al.*, 2022). Neben Cellulasen, Xylanasen, Polygalacturonasen und β -Glucosidasen wurden auch Lignin abbauende Enzyme wie Laccasen, versatile Peroxidasen und Mangan-Peroxidasen im Kulturüberstand von *L. squarrosulus* nachgewiesen (Ravichandran *et al.*, 2022; Isikhuemhen *et al.*, 2012).

Schwefelporlinge gehören zur Familie der *Polyporaceae* und werden im Gegensatz zu den zuvor genannten Gattungen der Gruppe der Braunfäule-Pilze zugeordnet (Figueiredo *et al.*, 2021; Paez *et al.*, 2023; Lindner und Banik, 2008). Die beiden hier betrachteten Schwefelporlinge *Laetiporus sulphureus* und *Laetiporus persicinus* hatten nach 10-tägiger Kultivierung den gesamten Nährboden bewachsen. In der Literatur ist für *Laetiporus sulphureus* ein breites Spektrum oxidativer und hydrolytischer Enzyme für den Abbau von pflanzlichen Polysacchariden wie Cellulose und Hemicellulose beschrieben. Das exprimierte Spektrum übersteigt hier das vieler weiterer Braunfäule-Pilze (Figueiredo *et al.*, 2021). Bei Kultivierung auf Pektin wurde zudem ein schnelleres Wachstum beobachtet, als bei Kultivierung auf Mono-, Di- und Polysacchariden, was auf einen schnellen Abbau von Pektin in pflanzlichem Material mithilfe von Pektinasen schließen lässt (Figueiredo *et al.*, 2021). Durch die vorhandenen Enzyme wurden daher die im Screening verwendeten Rübenschnitzel sehr gut abgebaut.

Neben den zuvor genannten Pilzen hatten auch die Spezies *Flammulina velutipes*, *Ischnoderma benzonium*, *Wolfiporia cocos*, *Ganoderma lucidum* sowie *Coprinellus xanthothrix* nach 10-tägiger Kultivierung die Nähragar-Platte vollständig bewachsen. Bei *Flammulina velutipes*, *Ischnoderma benzonium*, *Ganoderma lucidum* sowie *Coprinellus xanthothrix* handelt es sich um Weißfäule-Pilze, die lignocellulosehaltiges Material, und somit auch die Rübenschnitzel, gut abbauen können (Kim *et al.*, 2014a; Hatakka, 1983; Dritsa *et al.*, 2007; D'Souza *et al.*, 1999). Bei *Wolfiporia cocos* handelt es sich um einen Braunfäule-Pilz mit enger Verwandtschaft zu der Gattung *Laetiporus* (Machuca *et al.*, 2001; Lindner und Banik, 2008). Eine Transkriptom- und Sekretom-Analyse ergab einen hohen Anteil Hemicellulasen und die

Möglichkeit durch radikalische Reaktionen eine Depolymerisation von Cellulose und Modifikation von Lignin zu erzielen (Gaskell *et al.*, 2016). Dies erklärt das schnelle Wachstum des Pilzes auf lignocellulosehaltigem Material wie Rübenschnitzeln.

Kein Wachstum bis Kulturtag 10 zeigten die Spezies *Polyporus squamosus*, *Sparassis crispa* sowie *Clitocybe gibba*. *Sparassis* Spezies zählen zu den Braunfäule-Pilzen und sind hauptsächlich auf Koniferen in nördlichen Ländern zu finden (Sou *et al.*, 2017). Für *Sparassis latifolia* wurde beobachtet, dass die Enzymaktivität stark vom Kultivierungsmedium abhängig ist und meist erst nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen ein Anstieg der Enzymaktivität zu beobachten war. Dies könnte das hier ausgebliebene Wachstum erklären (Sou *et al.*, 2017). Für *Clitocybe gibba* ist eine gute Lignin-Abbaurate, jedoch nur eine eingeschränkte Fähigkeit zum Abbau von Polysacchariden beschrieben (Osono, 2010). Da Lignin nur 1-4% der Rübenschnitzel-Biomasse ausmacht und der Großteil verbleibende Zellwand-Polysaccharide sind, passen die Beobachtungen des Screenings zu den Literaturdaten (Sidi-Yacoub *et al.*, 2019; Pawłowska *et al.*, 2023).

Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus Tabelle 40 und Tabelle 41 fällt auf, dass das Muster sehr ähnlich ist und Pilze, die bereits auf reinem Rübenschnitzel-Agar gutes Wachstum zeigten, auch mit Melasse-Zugabe ein gutes Wachstum zeigten. Unterschiede zeigten sich jedoch teilweise im sensorischen Eindruck sowie der Wachstumsgeschwindigkeit. So zeigten 26 Spezies ein schnelleres Wachstum auf dem Nähragar mit Melasse-Zusatz als bei dem reinen Rübenschnitzel-Medium. Bei 17 Spezies war kein Unterschied erkennbar und 14 Spezies zeigten bei reinem Rübenschnitzel-Medium ein schnelleres Wachstum als mit Melasse-Zusatz. Schneller wuchsen bei Melasse-Zusatz vor allem die Seitlinge, aber auch die Sägeblattlinge. Ein schnelleres Mycelwachstum durch Melasse-Supplementation des Mediums in Oberflächenkultur ist auch in der Literatur für die Seitlinge *Pleurotus ostreatus* sowie *Pleurotus cystidis* beschrieben (Hoa und Wang, 2015). Ein vergleichbares Wachstum zeigten beispielsweise *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes* und *Flammulina velutipes*.

Ein verlangsamtes Wachstum wurde bei den Schwefelporlingen *Laetiporus sulphureus* und *Laetiporus persicinus* beobachtet. In der Literatur ist für *Laetiporus sulphureus* beschrieben, dass dieser auf Mono-, Di- und Polysacchariden wächst, jedoch ein schnelleres Wachstum auf Pektin, Galacturonsäure, Xylan oder Galctomannan zeigt (Figueiredo *et al.*, 2021). In Flüssigkultur wurde in einem mit Glucose versetzten Medium eine deutlich verlängerte lag-Phase und damit einhergehend ein langsames Wachstum festgestellt (Figueiredo *et al.*, 2021). Dies stimmt mit den Beobachtungen des Screenings überein.

Neben den Wachstumseigenschaften wurde auch der sensorische Eindruck der Kulturen für die Auswahl geeigneter Spezies herangezogen. Einige Pilze der Gattung *Pleurotus*, wie *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus pulmonarius*, wiesen hier einen süßlichen, blumigen Geruch nach Vanille und Anis auf. In der Literatur ist für die Gattung

Pleurotus das Vorkommen von *p*-Anisaldehyd, Anissäure, Benzaldehyd und *p*-Hydroxybenzylalkohol sowie *o*-Hydroxybenzylalkohol beschrieben (Gutiérrez *et al.*, 1994; Bürger *et al.*, 2022). Die Aromakomponenten werden teilweise aus den Abbauprodukten des Lignins gebildet oder durch die Pilze vollständig synthetisiert (Gutiérrez *et al.*, 1994). Da für diese Verbindungen ein süßlicher Geruch nach Anis und Vanille bzw. Bittermandel beschrieben ist, stützen die Literaturangaben die Beobachtungen des Screenings (Bürger *et al.*, 2022). Für die Spezies aus der Gattung der Trameten wurden teilweise muffige, größtenteils jedoch blumige, süßliche Aromen wahrgenommen. Diese Geruchseindrücke sind für *Trametes versicolor* auch in der Literatur beschrieben (Zhang *et al.*, 2015). Für die Spezies *Laetiporus sulphureus* wurden auf Rübenschnitzel-Medium neben süßlichen auch suppigere Aromen festgestellt. In der Literatur ist für *Laetiporus sulphureus*, kultiviert auf Zwiebeln, der Aromastoff Benzothiazol beschrieben, welcher einen Geruch nach Brühe/Suppe aufweist (Stöppelmann *et al.*, 2024). Des Weiteren ist für viele Basidiomyceten, darunter auch *Laetiporus sulphureus*, das Vorkommen von Benzaldehyd beschrieben, welches einen süßlichen Geruch nach Bittermandel aufweist (Rapior *et al.*, 2000). Würzige Aromen wurden bspw. bei *Desarmillaria tabescens* und *Meripilus giganteus* festgestellt. In der Literatur sind für *D. tabescens* in Oberflächenkultur süße (bspw. Benzaldehyd und Benzonnitril), jedoch auch butterige (2,3-Butandion), malzige (3-Methylbutanal) und pilzige/fleischige Aromen (1-Octen-3-ol) beschrieben (Song *et al.*, 2015).

Für Pilze mit langsamen Wachstum wurden meist muffige und erdige Gerüche wahrgenommen, welche auf den Geruch des Nähragars zurückzuführen sind.

4.1.3 Screening in Flüssigkultur

Für das Screening in Flüssigkultur wurden auf Basis der Daten aus dem Screening in Oberflächenkultur unter Berücksichtigung von Geruchseindruck und Wachstumseigenschaften 20 Kandidaten ausgewählt (Tabelle 42). Hier wurde auch berücksichtigt, dass für einige Basidiomycota, wie *D. tabescens*, allgemein ein langsames Wachstum auf Agar-Medien beschrieben ist (Rhoads, 1945).

Wie aus Tabelle 42 hervorgeht, wurden Trockenmassen von $0,5 \pm 0,2 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ (*Pleurotus salmoneo-stramineus*, *Trametes ochracea*) bis $2,7 \pm 0,7 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ (*Mycetinis scorodoni*) erzielt. Die Trockenmasse kann als erste Abschätzung für das Pilzwachstum herangezogen werden, ist jedoch aufgrund des unvollständigen Abbaus der eingesetzten Rübenschnitzeln stark fehlerbehaftet. Unvollständig abgebaute Rübenschnitzel ließen sich weder durch Zentrifugation noch Filtration vom Mycel trennen und wurden daher bei der Bestimmung der Trockenmasse miterfasst. Für die Auswahl geeigneter Spezies wurde daher auch der sensorische Eindruck der Flüssigkultur berücksichtigt.

Die Geruchseindrücke variierten von Pilz zu Pilz stark. Für *Macrolepiota procera*, *Trametes ochracea*, *Lentinula edodes*, *Laetiporus sulphureus*, *Trametes versicolor* und *Mycetinis scorodonius* wurden unangenehme Geruchseindrücke wie nach Plastik, Lack oder auch muffig oder stechend bestimmt. Angenehme und für die Verwendung als Fleischersatz passende Geruchseindrücke wiesen die Mycelien der Spezies *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Armillaria bulbosa*, *Desarmillaria tabescens* und *Macrolepiota excoriata* mit Attributen wie fettig, würzig und nach Brot oder Maggi auf. Diese vier Spezies wurden daher für weitere Analysen ausgewählt. Die Trockenmassen betragen für alle vier Spezies zwischen 1,1 und 1,3 g·(100 mL)⁻¹ was ebenfalls für eine Verwertung des eingesetzten Substrates spricht, da die eingesetzte Menge Rübenschnitzel 2,0 g·(100 mL)⁻¹ betrug. Auch optisch wurde ein Abbau der Rübenschnitzel beobachtet.

Für *Desarmillaria tabescens* wurde bereits im Screening in Oberflächenkultur ein würziger Geruch wahrgenommen, welcher nach Song *et al.* (2015) bspw. auf das Vorhandensein der Aromastoffe 3-Methylbutanal sowie 1-Octen-3-ol zurückgeführt werden kann. Für *Armillaria bulbosa* wurde in Flüssigkultur in Hefeextrakt-Glucose-Medium kein Geruch festgestellt (Gallois *et al.*, 1990). Da Aromastoffe zum Teil aus Abbauprodukten von lignocellulosehaltigem Material gebildet werden, können die Geruchseindrücke in Hefeextrakt-Glucose-Medium stark von dem Aromaprofil in Rübenschnitzelmedium abweichen (Gallois *et al.*, 1990). Für *Hygrophoropsis aurantiaca* und *Macrolepiota excoriata* sind in der Literatur ebenfalls noch keine Geruchseindrücke für Flüssigkulturen mit lignocellulosehaltigem Material beschreiben. *Lentinus squarrosulus* und *Pleurotus sapidus*, welche bereits im Screening in Oberflächenkultur sehr schnelles Wachstum zeigten, zeigten auch im Screening in Flüssigkultur mit $0,8 \pm 0,2$ g·(100 mL)⁻¹ bzw. $0,9 \pm 0,2$ g·(100 mL)⁻¹ schnelles Wachstum. Die sensorischen Eindrücke waren neutral bis leicht süßlich (*Lentinus squarrosulus*) sowie blumig, nach Vanille und leicht würzig (*Pleurotus sapidus*), weshalb beide Pilze für weitere Analysen ausgewählt wurden.

Für die Gattung *Pleurotus* ist in der Literatur allgemein ein schnelles Wachstums in Flüssigkultur auf lignocellulosehaltigen Substraten beschrieben (Elisashvili *et al.*, 2008). Für *Pleurotus ostreatus* ist dies auch bereits bei Kultivierung in Rübenschnitzel-Medium beschrieben. Das Aromastoff-Profil zum Ende der Fermentation war hier geprägt von 1-Octen-3-ol, Hexanal, Pentanal sowie Octanal. Der Geruch wurde als pilzig, fettig, grün, jedoch auch blumig und süß beschrieben (Todorov *et al.*, 2024). Von *P. sapidus* ist ein Aromastoffprofil bei Kultivierung in Isomaltulose-Melasse in der Literatur beschrieben. Hier dominierten vor allem *p*-Anisaldehyd, 1-Octen-3-on, (*E*)-2-Octenal, (*E,E*)-2,4-Decadienal und cyclische Monoterpene das Aromastoffprofil. Die Kulturen wurden als süßlich, sowie nach Apfel, Pilz und Anis riechend beschrieben (Trapp *et al.*, 2018).

Dies passt zu den Ergebnissen in Tabelle 42. Für die Spezies *Lentinus squarrosulus* ist in der Literatur noch keine Kultivierung auf Rübenschnitzeln beschrieben. Wie bereits zuvor

beschrieben, verfügt die Spezies jedoch über eine große Anzahl Enzyme zum Abbau lignocellulosehaltigen Materials, was zu den Beobachtungen des Screenings in Flüssigkultur passt (Malhotra und Suman, 2021; Isikhuemhen *et al.*, 2012).

Im Rahmen des Screenings in Flüssigkultur wurden sechs Spezies für weiterführende Analysen ausgewählt. Da das Fermentationsprodukt für die Herstellung von Fleischersatzprodukten verwendet werden soll, war vor allem der Proteingehalt von hoher Relevanz und wurde für die sechs ausgewählten Spezies analysiert (Abbildung 4). Der niedrigste Rohproteingehalt wurde für *Hygrophoropsis aurantiaca* mit $12,8 \pm 0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ erzielt. *Desarmillaria tabescens* wies den höchsten Rohproteingehalt mit $22,7 \pm 0,7 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ auf. Für *D. tabescens* ist von Lupala *et al.* (2025) bei Kultivierung in Kartoffel-Dextrose-Bouillon ein Proteingehalt von $26,9 \pm 3,0 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ beschrieben. Dies passt zu dem hier erhaltenen Wert.

Der zweithöchste Rohproteingehalt wurde mit $18,8 \pm 1,6 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ für *Lentinus squarrosulus* erhalten. In der Literatur sind für das Mycel der verwandten Spezies *Lentinus crinitus* Rohproteingehalte von $10,5\text{-}27,0 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ beschrieben. Die Kultivierung erfolgte hier auf agroindustriellen Nebenströmen und der Rohproteingehalt war stark von dem verwendeten Substrat abhängig (Ishaq *et al.*, 2022; Dávila G *et al.*, 2020; Fabros *et al.*, 2022). Der hier ermittelte Rohproteingehalt liegt mittig in den Literaturwerten. *Pleurotus sapidus* zeigte den dritthöchsten Rohproteingehalt mit $16,9 \pm 0,7 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$. In der Literatur sind für das Mycel von *P. sapidus* Rohproteingehalte von 27,6% bei Kultivierung auf Isomaltulose-Melasse und von 25,4% bei Kultivierung auf Apfeltrester beschrieben (Ahlborn *et al.*, 2019; Stephan *et al.*, 2020). Die hier bestimmten Rohproteingehalte liegen deutlich unter den dort angegebenen Werten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Rübenschnitzel nicht vollständig abgebaut wurden und somit ein Teil der Rübenschnitzel bei der Rohproteinanalyse miterfasst wurde. Da Rübenschnitzel mit 8-12% Rohprotein einen vergleichsweise niedrigen Proteingehalt aufweisen, wird hierdurch der analysierte Rohproteingehalt des Fermentats verringert (Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003; Fadel *et al.*, 2000).

Aufgrund des Aromaprofils sowie der Proteingehalte wurden für weitere Optimierungen die beiden Spezies *Desarmillaria tabescens* und *Lentinus squarrosulus* ausgewählt.

4.1.4 Optimierung der Kultivierung

4.1.4.1 Anpassung der Medienzusammensetzung

Im ersten Schritt der Optimierung wurde das Kulturmedium angepasst. Dieses sollte entweder ausschließlich Rübenschnitzel oder eine Mischung aus Rübenschnitzeln und Melasse enthalten. Die Medien wurden dabei auf Basis des Kohlenhydrat-Gehaltes berechnet, wobei als Orientierung der von Ahlborn *et al.* (2019) genannte Wert von $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ herangezogen

wurde. Der Rübenschnitzel-Gehalt wurde zwischen 10 und 20 g·L⁻¹ gewählt und der Melasse-Gehalt entsprechend angepasst. Nach 10-tägiger Kultivierung wurden der Rohproteingehalt und die Trockenmasse des Mycels bestimmt. Da durch eine Verstoffwechslung der Kohlenhydrate der Kohlenstoff-Gehalt in der Trockenmasse abnimmt, steigt der Stickstoff-Gehalt im Verhältnis an. Der Stickstoffgehalt bzw. Proteingehalt der Kulturen kann so für eine erste Einschätzung des Wachstums herangezogen werden.

Die Ergebnisse in Tabelle 43 zeigen, dass die Trockenmasse für *L. squarrosulus* mit höherem Rübenschnitzel-Gehalt anstieg. Der Rohproteingehalt, bezogen auf die Trockenmasse, sank hingegen mit steigender Rübenschnitzel-Konzentration. Signifikante Unterschiede (one-way ANOVA, $p < 0,05$) wurden nur zwischen Medium 1 (10 g Rübenschnitzel·L⁻¹ und 15 g Melasse·L⁻¹) sowie Medium 4 (20 g Rübenschnitzel·L⁻¹) festgestellt. Der sinkende Rohproteingehalt kann auf einen verminderten Abbau der Rübenschnitzel zurückgeführt werden. Versuche, in denen *L. squarrosulus* auf Stroh kultiviert wurde, zeigten, dass eine Zugabe von Zuckerrohr-Bagasse in einem verbesserten Wachstum des Pilzes resultierte. Die zugegebene Menge hatte hier keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum (Wardaya *et al.*, 2023). Dies passt zu den hier erhaltenen Ergebnissen. In der Literatur ist beschrieben, dass Zucker und Zuckeralkohole die bevorzugte Kohlenstoff-Quelle der Gattung *Lentinus* darstellt (Saravanan *et al.*, 2024; Dulay *et al.*, 2021), was das verbesserte Wachstum bei Melasse-Zugabe erklären kann.

Bei Berechnung des Rohproteingehaltes bezogen auf das Kulturvolumen wurden nur minimale Unterschiede zwischen den verschiedenen Medienzusammensetzungen festgestellt, was aus der steigenden Trockenmasse bei sinkendem Rohproteingehalt resultiert. Unterschiede wurden jedoch im sensorischen Eindruck der Kulturen festgestellt. Mit steigendem Rübenschnitzel-Gehalt wurden zunehmend angenehmere und süßliche Gerüche festgestellt, während Kulturen mit niedrigerem Rübenschnitzel-Gehalt eher stechende und erdige Aromen aufwiesen. Dies kann auf die vom Substrat abhängige Bildung von Aromastoffen zurückgeführt werden (Bosse *et al.*, 2013).

Für *L. squarrosulus* wurde das Medium mit 15,0 g Rübenschnitzeln und 7,5 g Melasse ausgewählt, da bei der Kultivierung kein unangenehmer Geruch und ein schnelles Wachstum erkennbar waren.

Für *Desarmillaria tabescens* wurden ähnliche Ergebnisse wie bei *L. squarrosulus* erhalten (Tabelle 43). Auch hier wurde mit steigender Rübenschnitzel-Konzentration ein Anstieg der Trockenmasse und ein Sinken des Rohproteingehaltes in der Trockenmasse beobachtet. Ein Signifikanztest (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$) ergab, dass auch hier durch Melasse-Zugabe ein signifikant höherer Rohproteingehalt erzielt wurde. In der Literatur ist beschrieben, dass eine erhöhte Zuckerkonzentration einen positiven Einfluss auf das Wachstum von *Armillaria mellea* aufwies und, dass der Abbau von Lignin und phenolischen Komponenten besser möglich ist, wenn eine zusätzliche Kohlenstoffquelle verfügbar ist (Kirk und Farrell,

1987; Entry *et al.*, 1993). Auch wenn *Desarmillaria tabescens* inzwischen zur Gattung *Desarmillaria* gezählt wird, weist die Spezies eine nahe Verwandtschaft und ähnliche Eigenschaften wie die Gattung *Armillaria* auf (Schoch *et al.*, 2020; Koch *et al.*, 2017). Für *Armillaria ostoyae* ist beschrieben, dass der Cellulose-Abbau nicht von der Kohlenhydrat-Quelle abhängt und mit steigender Konzentration frei vorliegender Kohlenhydrate ein verminderter Cellulose-Abbau erfolgt. Gegensätzlich sieht dies beim Abbau von Lignin aus, hier rief eine steigende Konzentration frei vorliegender Zucker, vor allem von Glucose, einen erhöhten Lignin-Abbau hervor (Entry *et al.*, 1993).

Die Beobachtungen der Literatur stützen daher die Hypothese, dass eine Zugabe von Melasse in einem verbesserten Wachstum von *D. tabescens* resultiert. Ein hoher Gehalt freier Zucker führt jedoch zu einem bevorzugten Abbau der frei vorliegenden Mono- und Disaccharide, was zu einem verminderten Abbau der Cellulose und somit auch der Rübenschnitzel führt (Schwarze *et al.*, 2024). Die Melasse-Konzentration darf daher nicht zu hoch gewählt werden. Da für das Medium mit 15,0 g Rübenschnitzeln und 7,5 g Melasse die höchsten Rohproteingehalte pro Liter erzielt wurden, wurde dieses Medium für weitere Versuche verwendet.

4.1.4.2 Optimierung des Mahlgrades der Rübenschnitzel

Die Rübenschnitzel wurden in pelletierter Form mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm und einer Länge von 2-3 cm zur Verfügung gestellt und zeigten nach Wasserzugabe ein starkes Quellverhalten. Für eine bessere Dosierung und Handhabung wurden die Rübenschnitzel vor der Verwendung gemahlen und der optimale Mahlgrad durch Kultivierung ermittelt. Aus den in Abbildung 6 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass der Mahlgrad keinen signifikanten Einfluss auf den Ergosterolgehalt des Fermentats hatte.

In der Literatur ist für *Armillaria mellea* bei Kultivierung auf Sägespänen und Sägemehl beschrieben, dass bei Partikelgrößen unter 0,71 mm ein langsames Wachstum auftrat. Bei Partikelgrößen von 0,71-2,36 mm waren keine Unterschiede im Wachstum mehr erkennbar (Hong *et al.*, 1990). Ähnliches ist auch für *Lentinula edodes* beschrieben. Hier wurde bei Kultivierung auf Holzchnitzeln ein langsames Wachstum bei einer Partikelgröße von < 85 µm beobachtet und für Partikelgrößen von 0,85-1,7 mm das schnellste Wachstum. Von 1,7-4,0 mm war ein gleichbleibendes Wachstum zu beobachten (Royse und Sanchez-Vazquez, 2001). Dies kann möglicherweise auf eine schlechtere Belüftung bei sehr kleinen Partikelgrößen zurückgeführt werden (Royse und Sanchez-Vazquez, 2001).

Bei dem Vergleich der Literaturdaten mit den hier ermittelten Messdaten ist zu berücksichtigen, dass die Kultivierungen bei Hong *et al.* (1990) und Royse und Sanchez-Vazquez (2001) in Oberflächenkultur erfolgten und somit nur bedingt mit der hier durchgeführten submersen Kultivierung zu vergleichen sind.

4.1.4.3 Optimierung der Kultivierungsparameter pH-Wert und Temperatur

Im Zuge der Optimierung wurden der pH-Wert sowie die Temperatur der Kultivierung betrachtet. Dazu wurde bei drei Temperaturen (18 °C, 24 °C und 30 °C) und vier pH-Werten (pH 5, 6, 7 und 8) kultiviert. Nach 7-tägiger Kultivierung wurden die Trockenmasse, der Rohproteingehalt sowie der Ergosterolgehalt analysiert.

Temperatur

Aus Abbildung 7 und Abbildung 8 geht hervor, dass für *L. squarrosulus* die höchsten Rohprotein- und Ergosterolgehalte bei einer Kultivierungstemperatur von 24 °C und 30 °C erhalten wurden. Ein Signifikanztest (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$) ergab, dass bei den beiden Temperaturen jeweils signifikant höhere Rohprotein- und Ergosterolgehalte erhalten wurden, als bei Kultivierung bei 18 °C. In der Literatur ist beschrieben, dass die Gattung *Lentinus* vor allem in tropischen Gebieten vorkommt und somit wärmere Temperaturen bevorzugt (Fabros *et al.*, 2022; Dulay *et al.*, 2021). Saravanan *et al.* (2024) beschrieben 25-30°C als die optimale Kultivierungstemperatur von *L. squarrosulus*. Bei 20 °C war nur noch ein moderates Wachstum, bei 35 °C – 40 °C nur noch ein sehr langsames Wachstum feststellbar.

Für *D. tabescens* ergibt sich aus Abbildung 7 und Abbildung 8, dass die Temperatur im Vergleich zu *L. squarrosulus* einen geringeren Einfluss auf das Wachstum hatte. Für die Rohproteingehalte (bezogen auf die Trockenmasse) wurde nur zwischen 24 °C und 18 °C ein signifikanter Unterschied festgestellt (one-way ANOVA, $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$). Beim Ergosterolgehalt wurden, bezogen auf die Trockenmasse, bei 18 °C signifikant höhere Ergebnisse erzielt, als bei 30 °C. Bezogen auf das Kulturvolumen wurden die signifikanten Unterschiede zwischen 24 °C und 30 °C beobachtet. Dies zeigt, dass 30 °C für *D. tabescens* am wenigsten geeignet war. Zwischen 18 °C und 24 °C zeigten sich nur im Rohproteingehalt Unterschiede, nicht aber im Ergosterolgehalt. Da der Ergosterolgehalt als Biomarker für den Pilzgehalt aussagekräftiger ist, wurden 18 °C und 24 °C als geeignete Kultivierungstemperaturen abgeleitet (Mille-Lindblom *et al.*, 2004). Rhoads (1945) beschrieb, dass *D. tabescens* bei Temperaturen von 12,3-35,8 °C Wachstum zeigte. Bei einer Temperatur von 40 °C war kein Wachstum mehr messbar. Sehr schnell war das Wachstum bei 21,7 °C, das Optimum wurde bei 24,7 °C beobachtet. Bei *Armillaria mellea* wurde optimales Wachstum bei Temperaturen von 20-25 °C in Oberflächenkultur festgestellt (Hong *et al.*, 1990). Dies passt zu den hier gemachten Beobachtungen.

Aufgrund der besseren Umsetzbarkeit wurde für beide Spezies für folgende Versuche eine Kultivierungstemperatur von 24 °C verwendet.

pH-Wert

Aus Abbildung 9 geht hervor, dass die getesteten pH-Werte zwischen 5 und 8 keinen Einfluss auf den Rohproteingehalt der Kulturen von *L. squarrosulus* und *D. tabescens* hatten. Diese Beobachtung wurden durch einen Signifikanztest (one-way ANOVA , $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$) bestätigt. Signifikante Unterschiede wurden zwischen keinem der hier betrachteten pH-Werte festgestellt. Gleiches ergab sich auch für den Ergosterolgehalt (Abbildung 10). Das Wachstum beider Spezies war somit im Bereich zwischen pH 5 und pH 8 vergleichbar.

Von Fabros *et al.* (2022) ist beschrieben, dass *Lentinus*-Spezies in einem weiten pH-Bereich von 4-8 ein schnelles Wachstum zeigten. Einige Spezies bevorzugten jedoch ein leicht saures Milieu von 5-6, wohingegen der optimale pH-Wert von *L. squarrosulus* zwischen pH 6 und 7 beschrieben ist (Fabros *et al.*, 2022; Saravanan *et al.*, 2024). Dulay *et al.* (2021) ermittelten einen pH-Wert von 6 als optimal für *L. squarrosulus*, wobei sich im Bereich zwischen pH 5 und 7 kein statistischer Unterschied ergab. Bei pH 4 wurde ein verlangsamtes Wachstum beobachtet. Das Wachstum bei pH 8 war vergleichbar mit dem Wachstum bei pH 7 (Dulay *et al.*, 2021). Die in der Literatur beschriebenen pH-Bereiche sind mit den hier erhaltenen Ergebnissen vergleichbar.

Für *D. tabescens* wurde von Rhoads (1945) ein pH-Bereich von 3,9-8,7 getestet. Für alle der getesteten pH-Bereiche wurde ein schnelles Wachstum erzielt. Dies stützt die hier erzielten Beobachtungen, dass der pH-Wert zwischen 5 und 8 keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *D. tabescens* zeigte.

Für beide Pilze wurde daher für weitere Versuche das Rübenschnitzel-Medium ohne vorherige pH-Einstellung verwendet. Der pH-Wert lag nach dem Autoklavieren bei 5,8.

4.1.4.4 Supplementierung mit Bierhefe und Hefeextrakt

Für die supplementierten Stickstoff-Quellen Hefeextrakt- und Bierhefe wurden zunächst die Parameter Proteingehalt, Kohlenhydratgehalt und Trockenmasse analysiert (Tabelle 44).

Für Bierhefe wurde ein Kohlenhydratgehalt von $12,3 \pm 1,9 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ und ein Proteingehalt von $13,4 \pm 0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ ermittelt. Der Trockenmassegehalt nach Zentrifugation und Abdekantieren des Überstands betrug 26,4%. Umgerechnet auf die Trockenmasse ergaben sich ein Proteingehalt von $46,6 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ und ein Kohlenhydratgehalt von $50,7 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$. Von Mathias *et al.* (2015) ist für Bierhefe eine Trockenmasse von 13,1%, ein Proteingehalt von $48,8 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ und ein Kohlenhydratgehalt von $50,5 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ beschrieben. Die Literaturwerte für Protein- und Kohlenhydratgehalt passen gut zu den hier analysierten Gehalten. Der Wert für die Trockenmasse ist höher im Vergleich zu Literaturdaten. Dies ist auf die vorangegangene Zentrifugation zurückzuführen.

Für Hefeextrakt ist von Gänzle (2004) ein Trockensubstanzgehalt von 95-97% und ein Rohproteingehalt von 70% beschrieben. Kohlenhydrate sind nicht direkt angegeben, können jedoch mittels Differenzrechnung aus den Parametern Trockenmasse, Proteingehalt und

Aschegehalt berechnet werden. Es ergibt sich in der Literatur daraus ein Kohlenhydratgehalt von 15%. Die Literaturwerte stimmen gut mit den hier erhaltenen Ergebnissen überein.

Die Hefesupplementation wurde nach 2.5.2.4 durchgeführt. Die supplementierten Mengen betragen dabei 0,5 g Hefeextrakt und 1,0 g Bierhefe, was $0,13 \text{ g Protein} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ im Falle der Bierhefe und $0,34 \text{ g Protein} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ im Falle des Hefeextraktes entsprach. Die in Abbildung 11 dargestellten Rohproteingehalte zeigen, dass durch die Supplementation für beide Pilze eine Steigerung der Rohproteingehalte erzielt wurde. Der analysierte Rohproteingehalt war geringer als die Summe aus zugesetztem Protein und der Kultur ohne Hefe-Zusatz, was dafürspricht, dass ein Teil der zugesetzten Proteine im Überstand verblieb und nicht zum Biomasseaufbau verstoffwechselt wurde.

Zusätzlich zum Rohproteingehalt wurden auch die Ergosterolgehalte analysiert. Da Ergosterol das am häufigsten in Hefe vorkommende Sterol ist, wurde auch der Ergosterolgehalt der Kulturmedien vor Inokulation analysiert und bei der Auswertung berücksichtigt (Nes *et al.*, 1978). Dazu wurden Kultur- und Medien-Referenz summiert und mit dem Ergosterolgehalt der supplementierten Kultur verglichen. Durch die Supplementation von Bierhefe wurde für beide Spezies, bezogen auf Trockenmasse und Kulturvolumen, der Ergosterolgehalt signifikant erhöht (Abbildung 12, t-Test, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$).

Ähnliches ergab sich auch für die Supplementation von Hefeextrakt (Abbildung 13). Durch die Zugabe von $0,5 \text{ g Hefeextrakt} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ wurde ebenfalls bei beiden Spezies eine signifikante Steigerung des Ergosterolgehaltes erzielt (t-Test, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Durch die Hefesupplementation wurde so nicht nur eine Steigerung der Rohproteingehalte im Fermentat, sondern auch ein verstärktes Pilzwachstum erreicht. Dies kann mehrere Gründe haben.

Zum einen wurde durch die Zugabe von Hefe das im Medium vorliegende C:N-Verhältnis verändert. Im ursprünglichen Medium mit Rübenschnitzeln und Melasse wurde ein C:N-Verhältnis von 22:1 berechnet. Nach Supplementation der Bierhefe von 16:1 und nach Supplementation des Hefeextraktes von 10:1. Für die Gattungen *Lentinus* und *Armillaria/Desarmillaria* ist beschrieben, dass das vorliegende C:N-Verhältnis einen Einfluss auf das Wachstum hat (Dulay *et al.*, 2020; Rykowski, 1976; Schwarze *et al.*, 2024). Dieses ist je nach Spezies jedoch sehr variabel und daher nur bedingt vergleichbar (Rykowski, 1976; Dulay *et al.*, 2020). Für *Lentinus strigosus* wurde beispielsweise optimales Mycelwachstum bei einem C:N-Verhältnis von 10:1 festgestellt, für *L. crinitus* bei einem C:N-Verhältnis von 36,6:1 (Dulay *et al.*, 2020; Colla *et al.*, 2023). Asonibare *et al.* (2023) testeten das Wachstum von *L. squarrosulus* auf verschiedenen Hölzern und stellten ein schnelles Wachstum bei einem C:N-Verhältnis von 11:1 fest. Die betrachteten Hölzer wiesen jedoch alle ein ähnliches C:N-Verhältnis auf, sodass hier kein Vergleich zu anderen Verhältnissen stattfand. Für *Armillaria mellea* und *D. tabescens* ist beschrieben, dass das optimale C:N-Verhältnis je nach Isolat und Medium stark schwanken kann. So kann ein erhöhtes C:N-Verhältnis beispielsweise den

Abbau von Hemicellulose und ein geringeres C:N-Verhältnis den Abbau des Lignins fördern (Rykowski, 1976; Schwarze *et al.*, 2024).

Neben dem C:N-Verhältnis spielt zum anderen auch der Gesamtstickstoff-Gehalt im Medium eine Rolle (Anike *et al.*, 2015; Colla *et al.*, 2023; Dulay *et al.*, 2020). Dulay *et al.* (2020) erzielten durch Zugabe einer Stickstoffquelle allgemein ein schnelleres Wachstum bei der Gattung *Lentinus*. Als besonders geeignet erwiesen sich organische Stickstoff-Quellen wie Pepton und Hefeextrakt (Dulay *et al.*, 2020; Saravanan *et al.*, 2024; Anike *et al.*, 2015). Anike *et al.* (2015) beobachteten bei einer Supplementation von 2 g Hefeextrakt·L⁻¹ (0,02% Stickstoff) bis zu einer Konzentration von 30 g Hefeextrakt·L⁻¹ (0,32% Stickstoff) einen stetigen Anstieg der Mycelbiomasse für *L. squarrosulus*, wobei zwischen 20 g·L⁻¹ und 30 g·L⁻¹ keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt wurden. Auch von Roy Das *et al.* (2015) wurde eine deutliche Steigerung der Mycelbiomasse von *L. squarrosulus* nach Supplementation von Hefeextrakt beobachtet.

Für *D. tabescens* wurde ein verbessertes Wachstum bei Supplementation organischer Stickstoffquellen, wie Arginin und Alanin, beobachtet (Entry *et al.*, 1993). Sowohl Bierhefe, als auch Hefeextrakt enthalten beide Aminosäuren in Mengen von insgesamt 5,3% (Bierhefe) bzw. 6,9% (Hefeextrakt) der Trockenmasse (Gänzle, 2004; Zhu *et al.*, 2022).

Ein weiterer Grund für verbessertes Wachstum können die in Hefeextrakt und Bierhefe enthaltenen Mineralien und Vitamine sein, welche zu physiologischen Funktionen in Pilzen beitragen (Fasidi und Olorunmaiye, 1994; Dulay *et al.*, 2021). Dulay *et al.* (2021) beschrieben u.a., dass Vitamin B₆ zu einem guten Wachstum verschiedener *Lentinus* Spezies beitrug. Vitamin B₆ ist neben Vitamin B₁, B₂, Niacin, Biotin, Folsäure und Pantothenäure auch in Hefeextrakt enthalten (Gänzle, 2004; Dulay *et al.*, 2021).

4.1.4.5 Optimierung des Inokulationsvolumens und Erhöhen der Substratkonzentration

Für eine Erhöhung der Ausbeute bei gleichbleibendem Volumen wurden die Substratkonzentration und das Inokulationsvolumen im Medium erhöht.

Durch eine Erhöhung des Inokulationsvolumens wurde ein leichter Anstieg im Ergosterolgehalt für beide Spezies beobachtet (Abbildung 14). Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen 5% und 20% Inokulationsvolumen (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Zwischen 5% und 10% sowie zwischen 10% und 20% wurden keine signifikanten Unterschiede erzielt. Für folgende Versuche wurde daher ein Inokulationsvolumen von 10% beibehalten. In der Literatur wird häufig ein Inokulationsvolumen von 10% des Hauptkulturvolumens verwendet (Pokhrel und Ohga, 2007; Kim *et al.*, 2010; Lung und Hsieh, 2011). Für *Ganoderma lucidum*, welcher wie *Lentinus squarrosulus* zur Ordnung der *Polyporales* zählt, wurden in Flüssigkultur Inokualtionsvolumina von 1-12 % und von 14-20% getestet (Yang und Liao, 1998; Berovic *et al.*, 2003). Für 1-12% wurde mit steigendem

Inokulationsvolumen ein Anstieg des Mycelgehaltes beobachtet (Yang und Liao, 1998). Zwischen 14% und 20% erwies sich 17% als optimales Volumen (Berovic *et al.*, 2003). Bei 14% Inokulum war hier ein langsames Wachstum und eine geringe Biomasse-Bildung zu verzeichnen, bei 20% kam es ebenfalls zu einer geringeren Biomassebildung, welche möglicherweise auf eine Konkurrenz um die verfügbaren Substrate zurückzuführen war (Berovic *et al.*, 2003). Die Beobachtungen der Literatur, wo bis zu einer Erhöhung des Inokulationsvolumens auf 17% eine Steigerung der Biomasse erzielt wurde, passen zu den hier erhaltenen Ergebnissen. Weder für *L. squarrosulus* noch für *D. tabescens* wurden jedoch die für *G. lucidum* beobachteten Unterschiede zwischen 5% und 10% Inokulationsvolumen festgestellt. Dies kann auf die hier verwendeten Substrate und die Unterschiede der verwendeten Pilzspezies zurückgeführt werden.

Weiterhin wurde mit dem Inokulationsvolumen auch die Substratkonzentration auf die doppelte, dreifache und vierfache Menge erhöht. Es ergaben sich somit Rübenschnitzel-Gehalte von 15-60 g·L⁻¹ sowie Melasse-Gehalte von 7,5-30 g·L⁻¹, was Gesamtkohlenhydratgehalten im Medium von ca. 15-60 g·L⁻¹ entsprach.

Für *D. tabescens* wurden ab einer dreifachen Medienkonzentration verringerte Ergosterolgehalte, bezogen auf das Kulturvolumen erzielt (Abbildung 15). Durch eine gleichzeitige Erhöhung des Inokulationsvolumens wurde der Ergosterolgehalt erhöht.

Für *L. squarrosulus* stieg der Ergosterolgehalt bezogen auf das Kulturvolumen mit steigender Substratkonzentration und Inokulationsvolumina an (Abbildung 16). Beim Ergosterolgehalt bezogen auf die Trockenmasse wurden, außer für die doppelte Substratmenge und einfaches Inokulationsvolumen, gleichbleibende Gehalte beobachtet. Ein signifikanter Einfluss des Inokulationsvolumens wurde nur bei einer Substratkonzentration von 30 g Rübenschnitzel/L und 15 g Melasse/L beobachtet (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$).

Bei vierfacher Medienkonzentration (Abbildung 17) wurden für beide Spezies unabhängig vom Inokulationsvolumen signifikant geringere Ergosterolgehalte in der Trockenmasse festgestellt als bei den Ausgangsbedingungen (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Bezogen auf das Kulturvolumen wurde dies nicht beobachtet. Erhöhungen des Ergosterolgehaltes bezogen auf das Kulturvolumen, nicht jedoch in Bezug auf die Trockenmasse, können damit begründet werden, dass für die Berechnung des Ergosterolgehaltes pro Liter auch die vorliegende Trockenmasse berücksichtigt wurde. Diese stieg mit steigender Substratkonzentration an, was darauf schließen lässt, dass mehr der eingesetzten Rübenschnitzel zum Ende der Kultivierung im Fermentat verblieben. Für *L. squarrosulus* ist so eine weitere Erhöhung auf die dreifache Substratkonzentration möglich. Für *D. tabescens* sollte die Substratkonzentration nur verdoppelt, nicht aber verdreifacht werden, um ein Mycel ohne erhöhte Rübenschnitzelgehalte zu erhalten. Ähnliches wurde bei der Fermentation von verschiedenen Mengen Weizenstroh mit *Irpex lacteus* in der Literatur beobachtet. Auch hier wurde mit steigender Menge ein geringerer Abbaugrad erzielt (Mitreveli *et al.*, 2021). Dies wurde von Mitreveli *et al.* (2021)

auf eine zu geringe Enzymaktivität und Kultivierungsdauer für den vollständigen Abbau zurückgeführt. Zum anderen ist auch eine Hemmung der für den Abbau der Rübenschnitzel benötigten hydrolytischen Enzyme, wie bspw. Pektinasen, durch eine zu hohe Kohlenhydratkonzentration im Medium beschrieben (Vinięgra-González *et al.*, 2003; Metreveli *et al.*, 2021; Fadel *et al.*, 2000; Leijdekkers *et al.*, 2013).

Ein weiterer Grund für das verlangsamte Wachstum bei steigender Substratkonzentration kann die verminderte Durchmischung und Belüftung mit zunehmender Rübenschnitzelkonzentration sein. Getrocknete und gepresste Rübenschnitzel verfügen über ein sehr starkes Quellvermögen und binden damit große Mengen Wasser. Die Viskosität in den Schüttelkolben stieg mit steigender Rübenschnitzel-Konzentration stark an, was zu einem verminderten Sauerstoffeintrag führte. In der Literatur ist beschrieben, dass die Begasungsraten und somit der Sauerstoffeintrag einen großen Einfluss auf das Wachstum des Pilzmycel haben (Lung und Hsieh, 2011; Yang und Liao, 1998). Der Sauerstoffbedarf ist jedoch stark vom Pilz abhängig (Dulay *et al.*, 2021).

4.1.4.6 Wachstum der Vorkultur

Wie Abbildung 18 zeigt, war ab Tag 3 für *L. squarrosulus* ein linearer Anstieg der Trockenmasse zu beobachten. Nach Tag 9 flachte die Kurve ab und die Trockenmasse blieb konstant. Da die Vorkulturen in der linearen/exponentiellen Phase zur Inokulation der Hauptkulturen verwendet werden sollten, wurde hier eine Wachstumsdauer von 6-7 Tagen für die Vorkultur festgelegt (Vrabl *et al.*, 2019).

Für *Lentinula edodes* wurde in Malzextrakt-Medium von Feng *et al.* (2010) beobachtet, dass die lag-Phase bis Tag 3 andauerte und die stationäre Phase nach 10-tägiger Kultivierung eintrat. Dies passt gut zu dem hier beobachteten Verlauf.

Song *et al.* (1987) testeten das Wachstum von *L. edodes* in drei verschiedenen Nährmedien. Auch hier dauerte die lag-Phase bis etwa Tag 3 an und ging dann in lineares Mycel-Wachstum über. Im Bioreaktor wurde hier eine lineare Phase von 10 Tagen beobachtet.

Bezüglich des Ergosterolgehaltes in der Trockenmasse ist Abbildung 18 zu entnehmen, dass dieser zu Beginn der Wachstumsphase von Tag 3 auf Tag 4 stark anstieg und dann konstant blieb. Niemenmaa *et al.* (2008) beschrieben ebenfalls, dass sich der Ergosterolgehalt in der Trockenmasse im Kulturverlauf von Basidiomyceten der Familien *Polyporaceae* und *Corticaceae* verändert. Hier wurden die Pilze in einem vollständig löslichem Medium kultiviert und die Ergosterolgehalte über 5 Wochen im Abstand von 7 Tagen analysiert.

Bei *Gloeophyllum trabeum* wurde nach 7 Tagen ein Ergosterolgehalt von $0,24 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ ermittelt, nach 14 Tagen betrug der Ergosterolgehalt nur noch $0,15 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$. Der höchste Ergosterolgehalt wurde nach 35-tägiger Kultivierung mit $0,39 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ analysiert. Für *Ceriporiopsis subvermispora* wurde der höchste Ergosterolgehalt mit $0,17 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ bereits nach 7-tägiger Kultivierung erzielt. Nach 14 Tagen waren nur noch

0,01 g·(100g TM)⁻¹ nachweisbar, nach 35-tägiger Kultivierung wurde ein Ergosterolgehalt von 0,07 g·(100g TM)⁻¹ ermittelt (Niemenmaa *et al.*, 2008). Die Ergosterolgehalte in der Trockenmasse sind somit stark von der jeweiligen Spezies sowie der Wachstumsphase abhängig. Bei den meisten der von Niemenmaa *et al.* untersuchten Basidiomyceten sank der Ergosterolgehalt von Tag 7 auf Tag 14 ab. Dies wurde in Abbildung 18 auch für *L. squarrosulus* beobachtet, wo nach 7-tägiger Kultivierung ein Ergosterolgehalt von 0,75 g·(100g TM)⁻¹ und nach 14-tägiger Kultivierung von 0,65 g·(100g TM)⁻¹ erzielt wurde. Die erhaltenen Ergosterolgehalte passen zu den von Silva *et al.* (2010) analysierten Ergosterolgehalten von *Lentinus crinitus*. Hier wurde nach 7-tägiger Kultivierung ein Ergosterolgehalt von 0,6 g·(100g TM)⁻¹ erzielt. Von Kulturtag 7-20 blieben die Ergosterolgehalte in dieser Studie weitgehend konstant.

Für *D. tabescens* (Abbildung 19) wurde eine längere lag-Phase als für *L. squarrosulus* beobachtet. Der Beginn des linearen Anstiegs war hier ab Tag 4-5 zu beobachten und dauerte etwa bis Tag 11 an. Für *Armillaria mellea* ist von Sośnicka *et al.* (2022) ebenfalls eine längere lag-Phase beschrieben. Bei Kultivierung auf vollständig löslichem Standardmedium, welches 2,9 g Kohlenstoff und 0,26 g Stickstoff pro 100 mL enthielt, wurde der Beginn der linearen Phase an Tag 6 beobachtet. Die lineare Phase dauerte etwa 8 Tage an und ging anschließend in die stationäre Phase über. Die verlängerte lineare Phase, die von Sośnicka *et al.* beobachtet wurde, ist auf die erhöhte Nährstoffkonzentration im Vergleich zum hier verwendeten Malzextrakt mit einer Konzentration von 2 g pro 100 mL zurückzuführen.

4.1.4.7 Wachstum in Rübenschnitzel-Melasse-Medium

Für *L. squarrosulus* und *D. tabescens* wurden die Wachstumsverläufe in Rübenschnitzel-Melasse-Medium betrachtet, um den optimalen Erntezeitpunkt zu erfassen.

Aus Abbildung 20 geht hervor, dass die lag-Phase von *L. squarrosulus* etwa bis Tag 2 andauerte und der mittels Ergosterol bestimmte Pilzgehalt zunächst stark und an Tag 6 nur noch leicht anstieg. Ab Tag 7 war dann wieder ein schnelleres Wachstum zu beobachten.

Ein Vergleich mit Literaturwerten ist hier nur bedingt möglich, da die Enzymproduktion und -sekretion und somit auch der Abbau der Rübenschnitzel stark von den dem verwendeten Nährmedium sowie den Kultivierungsbedingungen abhängen (Cai *et al.*, 2017; Serbent *et al.*, 2023; Ravichandran *et al.*, 2022; Araújo Conceição *et al.*, 2017). So beschrieben Serbent *et al.* (2023) bspw. für die Laccase-Aktivität von *Lentinus crinitus* eine starke Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration. Ravichandran *et al.* (2022) beobachtete für *L. squarrosulus* eine induzierte Sekretion von lignocellulolytischen Enzymen bei Zugabe phenolischer Substanzen und lignocellulosehaltiger Substrate. Auch ist hier eine induzierte Produktion der Enzyme bei Nährstoffmangel beschrieben. Araújo Conceição *et al.* (2017) beobachteten für *Lentinus crinitus* bei Kultivierung auf Maniok und Gerste einen Anstieg des Lignin abbauenden Enzyms Mangan-Peroxidase (MnP) bis Tag 28, wobei der größte Anstieg zwischen Tag 4 und 14 zu

beobachten war. Bis Tag 4 war hier keine Aktivität von MnP messbar. In Bezug auf den Wachstumsverlauf in Abbildung 20 ist es somit möglich, dass zunächst bevorzugt die frei vorliegenden Kohlenhydrate der Melasse abgebaut wurden (Dulay *et al.*, 2021). Mit sinkender Zuckerkonzentration im Medium kann die Produktion lignolytischer Enzyme hochreguliert worden und es somit zu einem verstärkten Abbau der Rübenschnitzel gekommen sein (Ravichandran *et al.*, 2022). Für *Lentinula edodes* wurde bei Kultivierung auf Sägespänen, Kokosnuss-Faser, Maiskleie und Kaffee-Schalen festgestellt, dass hier der Beginn der linearen Wachstumsphase je nach Medienzusammensetzung meist um Kulturtag 4 zu beobachten war (Sánchez und Montoya, 2020). Die lineare Phase dauerte häufig bis etwa Tag 20 an, teilweise jedoch auch nur bis Tag 10. Wie in Abbildung 20 waren auch hier Plateaus zu beobachten, denen ein weiterer Anstieg der Pilzbiomasse folgte. Dies war vor allem bei dem Medium mit einem hohen Anteil an Kaffeeschalen und somit Lignin der Fall (van Nguyen *et al.*, 2023; Sánchez und Montoya, 2020).

Neben dem Rohprotein- und Ergosterolgehalt wurde für die Proben der verschiedenen Kulturtage von *L. squarrosulus* der Pilzgehalt über den Chitin- und DNA-Gehalt analysiert. Abbildung 21 zeigt, dass sich die Maxima der Parameter zwischen Tag 5 (Chitin) und Tag 9 (Ergosterol) ergaben und somit die Ernte der Kulturen in diesem Zeitraum erfolgen sollten. Größere Abweichungen zwischen den Methoden ergeben sich vor allem an Tag 1 und 9. Signifikante Unterschiede (one-way ANOVA, $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$) ergaben sich nur an Tag 1 der Kultivierung. Vor allem im mittleren Teil der Kultivierung, zwischen Tag 3 und 7 wurden durch alle drei Methoden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Auffällig sind die größeren Fehler, die bei der Berechnung des Pilzgehaltes über Ergosterol zu beobachten waren. Diese sind darin begründet, dass die Berechnung auf dem, bei Kultivierung in Malzextrakt erhaltenen Ergosterol-Gehalt, beruhte, welcher mit großen Abweichungen behaftet war. Die signifikanten Unterschiede an Tag 1 ergaben sich nur zwischen dem DNA- und dem Ergosterolgehalt. Wie Abbildung 18 zeigt, und es auch van Etten und Gottlieb (1965) für *Penicillium altroveanum* beobachtet haben, variierte der Ergosterolgehalt je nach Wachstumsphase. So war der Ergosterolgehalt in der Trockenmasse zunächst niedrig, stieg dann an und sank vor Beginn der stationären Phase wieder ab. Da die Kernteilung und somit die DNA-Replikation vor dem Hyphenwachstum stattfindet, ist der DNA-Gehalt hingegen schon vor Beginn des Hyphenwachstums erhöht, was die Unterschiede in den Methoden erklären kann (Dörfelt *et al.*, 2022).

Abbildung 22 zeigt, dass, wie bereits bei der Vorkultur beobachtet wurde, die lag-Phase bei *D. tabescens* deutlich länger andauerte als bei *L. squarrosulus*. Erst ab Tag 3 wurde ein ansteigender Ergosterolgehalt analysiert. Dieser stieg geringfügig bis Tag 6 und von Tag 6 auf Tag 7 sehr stark an. Zwischen Tag 7 und 8 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Zwischen Tag 8 und 10 wurde mehr als eine Verdopplung des Ergosterolgehaltes beobachtet. Bezogen auf den Rohproteingehalt wurde hier ein Anstieg von Tag 1 bis 4 beobachtet. Anschließend blieb der Rohproteingehalt weitgehend konstant.

4.1.4.8 Upscaling

Das Upscaling wurde im Maßstab von 3 und 20 L Kulturvolumen durchgeführt.

5-Liter-Bioreaktor

Die Kultivierung im 5-L-Bioreaktor mit 3 L Kulturvolumen erfolgte mit einer Begasungsrate von 1 vvm und Rührgeschwindigkeiten von 150-300 rpm. Diese Parameter wurden der Literatur entnommen, wo Rührgeschwindigkeiten zwischen 150 und 250 rpm für diese Reaktorgrößenordnung die besten Ergebnisse lieferten (Agudelo-Escobar *et al.*, 2017; Berovic *et al.*, 2003; Elisashvili, 2012; Kim *et al.*, 2010).

Zunächst wurde betrachtet, welchen Einfluss ein Homogenisieren der Vorkulturen auf das Pilzwachstum sowie den Kulturverlauf hat. Dies ist vor allem für spätere großtechnische Anwendungen von Bedeutung, da ein Homogenisieren im größeren Maßstab nur noch bedingt möglich ist.

Auffällig ist in Abbildung 23, dass der Gehalt an gelöstem Sauerstoff bei den homogenisierten Vorkulturen schneller und stärker absank als bei den nicht homogenisierten Vorkulturen. Bei den homogenisierten Vorkulturen war nach 2,5-tägiger Kultivierung wieder ein Anstieg des pO_2 -Gehaltes zu beobachten, bei den nicht-homogenisierten Vorkulturen war dies erst zum Ende der Kultivierung der Fall. Da der Sauerstoffverbrauch mit dem Pilzwachstum korreliert (Dulay *et al.*, 2021; Rau *et al.*, 1992), ist davon auszugehen, dass bei den homogenisierten Vorkulturen zu Beginn der Kultivierung ein schnelleres Wachstum stattgefunden hat, welches jedoch auch schneller wieder stagnierte.

Beim pH-Wert wurde ebenfalls zu Kultivierungsbeginn ein schnellerer und stärkerer Abfall bei den homogenisierten Vorkulturen beobachtet. Ein sinkender pH-Wert während der Kultivierung ist vor allem auf den Glucose-Metabolismus zurückzuführen, wobei Glucose zu organischen Säuren umgesetzt wird (Fang und Zhong, 2002). Das Absinken des pH-Wertes wurde für verschiedene *Lentinus* Spezies beobachtet und deutet nach Dulay *et al.* (2021) auf den Beginn der linearen Wachstumsphase hin. Bei der Verwendung von homogenisierten Vorkulturen kann so von einem beschleunigten Wachstum zu Beginn der Kultivierung ausgegangen werden. Nach 6-tägiger Kultivierung wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$) im Chitingehalt festgestellt (Tabelle 45). Ähnliches wurde auch von Okumura *et al.* (2024) beobachtet, wo durch ein Homogenisieren der Vorkulturen von *Sparassis crispa* zwar eine erhöhte Zelltrockenmasse sowie β -Glucanbildung bei geschüttelten Kulturen zu beobachten war, bei gerührten Kulturen jedoch nur ein sehr geringer Unterschied feststellbar war.

Weiter wurde betrachtet, ob durch den Austausch des Edelstahl-Ringspargers durch einen porösen Sparger (Abbildung 25) eine verbesserte Sauerstoffversorgung möglich war. Dies war von Relevanz, da der Gehalt des gelösten Sauerstoffs im Kulturverlauf meist stark abnahm und in der Literatur ein vermindertes Zellwachstum bei Sauerstoffmangel beschrieben ist (Elisashvili, 2012; Rau *et al.*, 1992). Für *Ganoderma lucidum* wurde bspw. ab einem pO_2 -

Gehalt von < 10% ein verringertes Wachstum beobachtet (Berovic *et al.*, 2003). Auch durch Erhöhen der Rührerdrehzahl kann eine verbesserte Sauerstoffversorgung gewährleistet werden, jedoch müssen hier auch der entstehende Scherstress und die damit einhergehenden meist negativen Auswirkungen auf das Mycelwachstum sowie vermehrte Schaumbildung beachtet werden (Elisashvili, 2012; Dulay *et al.*, 2021; Rau *et al.*, 1992; Thavamani *et al.*, 2020; Tepwong *et al.*, 2012).

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich wird, wurde durch den Umbau des Spargers ein verlangsamter Abfall der pO₂-Sättigung erzielt. Nach 1,5-tägiger Kultivierung lag die Sauerstoffsättigung dennoch bei nahezu 0%, was jedoch zum Teil auch auf eine zugewachsene Clark-Elektrode zurückzuführen sein kann. Im pH-Wert-Verlauf (Abbildung 27) zeigte sich, dass der pH-Wert bei dem Lauf mit porösem Sparger früher absank, was auf einen früheren verstärkten Kohlenhydrat-Metabolismus hinweist (Fang und Zhong, 2002; Cerrone *et al.*, 2024). Auch Dulay *et al.* (2021) wiesen nach, dass ein erhöhter Sauerstoffeintrag einen positiven Effekt auf das Wachstum von *L. squarrosulus* aufwies. Wie stark der pH-Abfall im Vergleich zum Edelstahl-Sparger war, war durch die automatisierte pH-Wert-Steuerung durch Lauge-Zugabe nicht eindeutig feststellbar. Wie aus Tabelle 46 hervorgeht, wurde der Chitingehalt durch den Umbau des Spargers erhöht, jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Der Sparger wurde dennoch für die weiteren Versuche beibehalten, da dieser im Gegensatz zum Edelstahl-Sparger nicht durch Partikel-Einlagerungen verstopfte.

Zur Bestimmung des idealen Erntezeitpunktes im Bioreaktor wurde, wie bereits unter 3.1.4.7 im Schüttelkolben durchgeführt, ein Wachstumsverlauf aufgenommen. Hier war ein Anstieg des Chitin-Gehaltes bis Tag 7 erkennbar (Abbildung 28). Im Vergleich wurde im Schüttelkolben ein Anstieg des Ergosterolgehaltes bis Tag 9 detektiert (Abbildung 20), wobei ein Anstieg des Chitin-Gehaltes nur bis Tag 5 nachweisbar war (Abbildung 21). Die unterschiedlichen Wachstumsverhalten in Schüttelkolben und Bioreaktor sind u.a. durch die Variation von Scherstress, Durchmischung und Sauerstoffversorgung zu erklären (Elisashvili, 2012; Dulay *et al.*, 2021). Für *Pycnoporus sanguineus* ist von Saat *et al.* (2014) beschrieben, dass der Pilz in Schikanekolben und gerührten Bioreaktoren ein besseres Wachstum zeigte als in Schüttelkolben. Dies war hier vor allem auf einen verbesserten Sauerstofftransfer zurückzuführen. Für *L. squarrosulus* wurde beobachtet, dass das Wachstum im Schüttelkolben und im Airlift-Bioreaktor stark von der Schüttelgeschwindigkeit der Schüttelkolben sowie der Belüftungsrate des Airlift-Reaktors abhing. Hier erwies sich eine Belüftung von 2,5 vvm als ideal, während 1,0 vvm und 5,0 vvm das Wachstum negativ beeinflussten. Dies spricht für einen erhöhten Sauerstoffbedarf des Pilzes sowie auch eine Sensitivität gegenüber Scherkräften (Asuraphong *et al.*, 2025). Da hier ein Rührkessel-Bioreaktor mit Rushton-Impeller statt eines Airlift-Reaktors verwendet wurde, sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. Das verlangsamte Wachstum im Vergleich zum

Schüttelkolben ist somit vermutlich auf die starken Scherkräfte des Rushton-Impellers zurückzuführen (Rau *et al.*, 1992; Elisashvili, 2012). Eine verringerte Rührerdrehzahl resultierte in einem starken Bodensatz und einer unzureichender Durchmischung, weshalb diese nicht weiter reduziert werden konnte.

Aus Abbildung 28 wurde eine ideale Kultivierungsdauer von 7 Tagen abgeleitet. Aufgrund geringer Unterschiede des Chitingehaltes zu Tag 6 und im Hinblick auf großtechnische Prozesse wurde eine Kultivierung pro Woche angestrebt. Es wurde daher mit einer Kultivierungsdauer von 6 Tagen weitergearbeitet.

Weiterhin wurde der Einfluss eines erhöhten Inokulationsvolumens sowie einer erhöhten Medienkonzentration auf den Chitingehalt sowie den Kulturverlauf untersucht.

Bei der Erhöhung der Substratkonzentration mit gleichzeitiger Erhöhung des Inokulationsvolumens wurden keine signifikanten Unterschiede im Chitingehalt festgestellt (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$; $p < 0,05$). Unterschiede zeigten sich jedoch im Kulturverlauf. Bei einfacher Substratkonzentration war das schnellste Absinken der Sauerstoffsättigung zu beobachten (Abbildung 29). Gleichzeitig wurde für eine einfache Substratkonzentration bereits nach 2-tägiger Kultivierung wieder ein Anstieg der Sauerstoffsättigung und somit ein Hinweis auf verlangsames Wachstum detektiert (Cerrone *et al.*, 2024). Dieser Anstieg war bei doppelter Substratkonzentration nach drei Kultivierungstagen und bei dreifacher und vierfacher Konzentration bis zum Kultivierungsende nicht zu beobachten. Ursache kann hier nicht nur eine verlängerte Wachstumsphase durch eine erhöhte Nährstoffkonzentration, sondern auch ein Blockieren der Clark-Elektrode durch eine unzureichende Durchmischung sowie ein verminderter Sauerstofftransfer durch erhöhte Viskosität sein (Elisashvili, 2012). Auch beim pH-Wert wurde bei einfacher und doppelter Substratmenge zum Ende der Kultivierung ein Anstieg beobachtet, welcher bei dreifacher- und vierfacher Menge ausblieb. Dies spricht ebenfalls für einen verminderten Kohlenhydrat-Metabolismus zum Ende der Kultivierungsdauer bei einfacher und doppelter Substratkonzentration (Dulay *et al.*, 2021). Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Chitingehalt. Die Ergebnisse passen zu den im Schüttelkolben unter 3.1.4.5 erhaltenen Ergebnissen.

30-Liter-Bioreaktor

Für das Upscaling wurde eine initiale Begasungsrate von 1 vvm eingestellt. Für eine verbesserte Sauerstoffsättigung wurde die Rührerdrehzahl an den pO_2 -Wert gekoppelt, sodass die Rührerdrehzahl erhöht wurde, wenn der pO_2 -Wert 80% unterschritt. Unter diesen Bedingungen wurde ein Wachstumsverlauf bis Kulturtag 6 aufgenommen. Abbildung 33 zeigt, dass bis zur Ernte des Bioreaktors an Tag 6 ein stetiger Anstieg im Ergosterolgehalt und somit im Pilzgehalt zu erkennen war. Die Parameter pO_2 sowie pH-Wert deuteten im Kulturverlauf (Abbildung 31 und Abbildung 32) darauf hin, dass die lineare Wachstumsphase etwa über 2,5 Kulturtage stattfand und sich das Wachstum anschließend verlangsamte. Dies ist vor allem

am sinkenden pH-Wert bzw. am korrelierenden Laugeverbrauch zu erkennen, da ein sinkender pH-Wert auf einen verstärkten Kohlenhydratmetabolismus zurückzuführen ist (Fang und Zhong, 2002; Cerrone *et al.*, 2024). Dieser Verlauf ist mit dem Verlauf in Abbildung 27 zu vergleichen, was auf ein ähnliches Wachstum in beiden Reaktorgrößen hindeutet.

Das in Abbildung 34 dargestellte Mycel wies eine kleine, homogene Pelletgröße auf. Eine homogene Pelletgröße ist auch für die Kultivierung von *L. squarrosulus* im Airlift-Reaktor beschrieben (Asuraphong *et al.*, 2025). Die Pelletgröße wird vor allem durch mechanischen Stress, jedoch auch durch den pH-Wert, die Temperatur und die Kultivierungsdauer beeinflusst (Jonczyk *et al.*, 2013; Rühl *et al.*, 2018; Serrano-Carreón *et al.*, 2015). So ist in der Literatur beschrieben, dass ein erhöhter Scherstress in einer verringerten Pelletgröße sowie einer höheren Pelletdichte resultiert (Kelly *et al.*, 2006; Serrano-Carreón *et al.*, 2015). Da die hier verwendeten Rushton-Impeller einen höheren Scherstress hervorrufen als andere Rührwerke, wie bspw. Helix-Impeller, kann die kleine Pelletgröße erklärt werden (Serrano-Carreón *et al.*, 2015; Rau *et al.*, 1992).

4.1.5 Alternative Substrate

4.1.5.1 Chemische Zusammensetzung der Substrate

Für mehr Flexibilität bei der Kultivierung wurden weitere Substrate von der Nordzucker AG zur Verfügung gestellt. Diese umfassten neben frischen Pressschnitzeln zusätzlich dampfgetrocknete lose Rübenschnitzel sowie dampfgetrocknete Pellets. Die Ergebnisse der chemischen Analyse sind in Tabelle 71 Literaturwerten gegenübergestellt. Zur verbesserten Vergleichbarkeit wurden Fett-, Rohprotein-, Kohlenhydrat- und Asche-Gehalt jeweils auf die Trockenmasse bezogen.

Tabelle 71: Vergleichende Darstellung der chemischen Zusammensetzung von frischen Pressschnitzeln sowie dampfgetrockneten Rübenschnitzel(pellets) mit Literaturwerten und Herstellerspezifikationen (Potthast *et al.*, 2011; Verein der Zuckerindustrie, 2012; Brøkner *et al.*, 2012). Die Gehalte wurden auf die jeweiligen Trockenmassen bezogen.

	frische Rübenschnitzel		Dampfgetrocknete Rübenschnitzel (lose)		Dampfgetrocknete Rübenschnitzel (Pellets)	
	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$
Fett	0,9 ± 0,1	0,2-1,2	0,5 ± 0,0	0,2-1,2	0,5 ± 0,0	0,4-1,1
Protein	7,7 ± 0,3	7,7-9,1	7,5 ± 0,1	7,9-9,9	7,5 ± 0,1	8,2-12,6
Wasser	70,0 ± 1,0	69,0-78,0	6,8 ± 0,1	7,0-10,2	9,4 ± 0,1	7,6-10,0
Kohlenhydrate	69,0 ± 6,0	65,0-69,2	74,0 ± 8,0	63,3-76,9	72,0 ± 6,0	62,8-75,3
Asche	4,9 ± 0,2	4,9-7,3	5,3 ± 0,1	5,4-8,6	8,9 ± 0,0	3,3-8,6

Wie Tabelle 71 zeigt, passen die analysierten Werte gut zu den Literaturwerten. Der Proteingehalt wich für die dampfgetrockneten Schnitzel und Pellets leicht nach unten ab, was jedoch auf jährliche Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung der Pflanzen zurückzuführen ist (Südzucker AG, 2011; Marzo-Gago *et al.*, 2023).

Der analysierten Gehalte von Glucose, Fructose und Saccharose sowie der daraus abgeleitete Gesamtzuckergehalt von 6,1% in der Originalsubstanz (Tabelle 48) passt zu dem der Nordzucker AG angegebenen Melassierungsgrad von 2%. Die Nordzucker AG gibt für Tierfutter ohne Melassezusatz Zuckergehalte von etwa 5,4% in der Originalsubstanz an, bei einem Melassierungsgrad von 10% sind 10,5% Zucker angegeben (Nordic Sugar A/S, 2020a, 2020b).

4.1.5.2 Kultivierung

Wie Abbildung 38 und Abbildung 39 zu entnehmen ist, wurden für *L. squarrosulus* keine signifikanten Unterschiede im Rohprotein- und Ergosterolgehalt zwischen den einzelnen Substraten festgestellt. Dies lässt darauf schließen, dass *L. squarrosulus*, unabhängig von der Verarbeitung einen schnellen Abbau der Rübenschnitzel erzielte.

Bei dampfgetrockneten Schnitzeln erfolgt das Trocknen in Verdampfungstrocknern, in denen die Rübenschnitzel durch überhitzten, ungesättigten Dampf getrocknet werden. Durch den Ausschluss von Sauerstoff und niedrigere Temperaturen werden durch diese Trocknung Nährstoffe geschont, ein Verbrennen verhindert und der Energieverbrauch im Vergleich zu der Hochtemperatur-Trocknung (HTT) gesenkt (Nordzucker AG).

Durch die Hochtemperatur-Trocknung entstehen deutlich mehr Maillard-Produkte, welche auch für die dunklere Färbung des Mycels, welches auf HTT-Pellets kultiviert wurde, in Abbildung 37 verantwortlich sein können (Dunmire *et al.*, 2024). Durch die Maillard-Reaktion, welche bevorzugt bei hohen Temperaturen, und somit beim Trocknen und Pelletieren auftritt, kann auch die Verfügbarkeit von Aminosäuren und Zuckern verringert werden (Dunmire *et al.*, 2024). Da für Basidiomyceten, wie bspw. *Bjerkandera adusta*, jedoch der Abbau gewisser Maillard-Produkte, wie bspw. Melanoidine nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass diese ebenfalls während des Fermentationsprozesses abgebaut und die Bestandteile metabolisiert werden (Berger und Ersoy, 2022). Der Abbau der Melanoidine scheint nach 7 Tagen jedoch noch nicht vollständig, da das Mycel noch eine charakteristische Färbung aufwies.

Aufgrund der Beobachtungen ist festzustellen, dass sich die verschiedenen Verarbeitungsformen der Rübenschnitzel ohne Verluste im Rohprotein- oder Ergosterolgehalt austauschen lassen. Bei der Verarbeitung muss jedoch der Farbunterschied berücksichtigt werden.

4.1.6 Chemische Zusammensetzung des produzierten Mycels

Da das produzierte Mycel für die Herstellung von Fleischersatzprodukten verwendet werden sollte, war die chemische Zusammensetzung von Bedeutung. Wie Abbildung 40 und Tabelle 49 zeigen, dominierten im lyophilisierten Mycel die Kohlenhydrate. Die Kohlenhydrate machten in der Trockenmasse des Mycels, welches in Rübenschnitzel-Melasse-Medium kultiviert wurde, 72% aus, die Proteine 15%, die Asche 10% und das Fett 3%. In der Literatur ist aktuell noch keine chemische Zusammensetzung für das Mycel von *L. squarrosulus* beschrieben. Da die chemische Zusammensetzung von Mycel und Fruchtkörpern meist vergleichbar ist (Cheung, 1996; Ulzijiargal und Mau, 2011; Berger *et al.*, 2022), wurde zur Orientierung vergleichend die chemische Zusammensetzung der Fruchtkörper herangezogen. Für die Fruchtkörper von *L. squarrosulus* sind in der Literatur Kohlenhydratgehalte von 69-80% in der Trockenmasse beschrieben (Obodai *et al.*, 2014; Ugbogu *et al.*, 2020). Der Proteingehalt ist mit 12,5-19,5% angegeben, der Fettgehalt mit 1,4-6,5% und der Aschegehalt mit 3,3-6,1% (Asonibare *et al.*, 2023; Obodai *et al.*, 2014; Ugbogu *et al.*, 2020). Die chemische Zusammensetzung des Mycels stimmt gut mit den Literaturdaten überein. Abweichungen gibt es lediglich im Aschegehalt, welcher mit 10% über den Literaturwerten lag. Hier ist jedoch zu beachten, dass Rübenschnitzel und Melasse hohe Aschegehalte aufweisen und es so auch zu einem erhöhten Aschegehalt im Mycel kommen kann (Woodman und Calton, 1928; Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003). Hinzu kommt ein unvollständiger Abbau der Rübenschnitzel, sodass es zu Verfälschungen der chemischen Zusammensetzung durch verbleibende Rübenschnitzel-Partikel kommen kann.

Für das in Malzextrakt kultivierte Mycel wurden im Vergleich zu dem in Rübenschnitzel-Melasse-Medium kultivierten Mycel ähnliche Ergebnisse erzielt. Unterschiede wurden im Aschegehalt festgestellt, welcher mit 3,9% deutlich unter dem Wert bei Kultivierung in Rübenschnitzel-Melasse-Medium lag. Höher hingegen war der Rohproteingehalt, welcher mit 22,8% über dem Gehalt bei Kultivierung in Rübenschnitzel-Melasse-Medium lag. Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung sind vor allem auf die variierende Zusammensetzung des Kultivierungsmediums zurückzuführen (Chen *et al.*, 2025). So wurde auch für Fruchtkörper von *Lentinus citrinus* beobachtet, dass die chemische Zusammensetzung bei Kultivierung auf unterschiedlichen Substraten variierten (Machado *et al.*, 2016). Dies ist vor allem darin begründet, dass die Enzymexpression je nach Umgebungsmedium angepasst werden kann und so die chemische Zusammensetzung der Pilze beeinflusst wird (Lau und Abdullah, 2017; Reis *et al.*, 2012; Berger *et al.*, 2022). Die chemische Zusammensetzung bei Kultivierung auf Malzextrakt passt gut zu den oben beschriebenen Literaturwerten. Der Rohproteingehalt ist geringfügig erhöht, was jedoch auch auf Unterschiede in der Zusammensetzung von Mycel und Fruchtkörpern zurückgeführt werden kann.

Neben der chemischen Zusammensetzung wurde auch die Fettsäure- und Aminosäurezusammensetzung der Mycelien untersucht. Zum Vergleich wurde auch das Fettsäure-Profil der Rübenschnitzel gemessen. Hier wurde vor allem Linolsäure (50%), Palmitinsäure (29%), Ölsäure (14%) und Linolensäure (6%) nachgewiesen. Dies passt zu den Literaturwerten von Arce *et al.* (2019) mit 52% Linolsäure, 29% Palmitinsäure, 11% Ölsäure und 6% Linolensäure.

Bei den Mycelien wurden vor allem C18-Fettsäuren nachgewiesen, wobei Ölsäure und Linolsäure die höchsten Gehalte im Mycel aufwiesen. Unterschiede ergaben sich hier zwischen den Kultivierungsmedien. Während bei Kultivierung in Malzextrakt Linolsäure mit 44,4% die häufigste Fettsäure war, war in Rübenschnitzel-Medium Ölsäure mit 46,3% am häufigsten vertreten. Palmitinsäure war in beiden Mycelien mit > 10% die dritthäufigste Fettsäure. Je nach Kultivierungsmedium wurden weitere Fettsäuren nachgewiesen. Bei Kultivierung in Malzextrakt wurden zusätzlich C15:0, C16:1, C17:1 und C18:0 nachgewiesen, bei Kultivierung in Rübenschnitzel-Medium wurden neben C15:0, C18:0 auch C18:3, C20:0 und C20:1 nachgewiesen. In Summe ergab sich bei Kultivierung in Rübenschnitzel-Medium ein Anteil ungesättigter Fettsäuren von 81% und von 82% in Malzextrakt-Medium. Der Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) lag bei 33% (Rübenschnitzel-Medium) bzw. 44% (Malzextrakt-Medium). In der Literatur sind für die Fruchtkörper von *L. squarrosulus* sehr variable Werte beschrieben. Obodai *et al.* (2014) wiesen 72-75% ungesättigte Fettsäuren im Gesamtfett nach. Dabei entfiel der größte Anteil mit 62-63% auf Linolsäure. Ölsäure wurde mit knapp 10% nachgewiesen, Palmitinsäure mit 18-20% und Stearinsäure mit 3-4%. Auch die nur in geringen Mengen vorkommenden Fettsäuren C15:0, C16:1, C18:0, C18:3, C20:0 und C20:1 wurden in den Fruchtkörpern von *L. squarrosulus* nachgewiesen.

Ugbogu *et al.* (2020) wiesen Palmitinsäure mit 8%, Stearinsäure mit 11% und Ölsäure mit 12% nach. Die übrigen Fettsäuren wurden hier nicht betrachtet. Zwischen beiden Literaturangaben liegt eine Varianz, die wieder auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen und ein variables Nährstoffangebot der Kultivierungsmedien zurückzuführen ist (Machado *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2012; Berger und Ersoy, 2022; Berger *et al.*, 2022). Gleiches lässt sich auch in Abbildung 41 beobachten, wo ebenfalls Unterschiede bei Kultivierung in Malzextrakt- und Rübenschnitzel-Medium zu beobachten waren. Unterschiede der Messwerte zu den Literaturwerten lassen sich auch durch bereits bei *Pleurotus ostreatus* und *Ganoderma australe* festgestellte Unterschiede im Fettsäurespektrum von Fruchtkörper und Mycelien erklären (Papaspayridi *et al.*, 2013).

Neben dem Fettsäurespektrum wurde auch das Aminosäureprofil des Mycels, kultiviert in Rübenschnitzel- und Malzextrakt-Medium analysiert (Abbildung 42). Das analysierte Aminosäureprofil ist vor allem zur Berechnung der biologischen Wertigkeit sowie für die exaktere Berechnung von Roh- und Reinproteingehalten von Bedeutung und wurde in Abbildung 95 mit Literaturdaten verglichen. Da für das Mycel keine Literaturdaten vorhanden

waren, wurde vergleichend das Aminosäureprofil von Fruchtkörpern des Pilzes *L. squarrosulus* gegenübergestellt. Die Literaturwerte entstammen dabei Ugboogu *et al.* (2020).

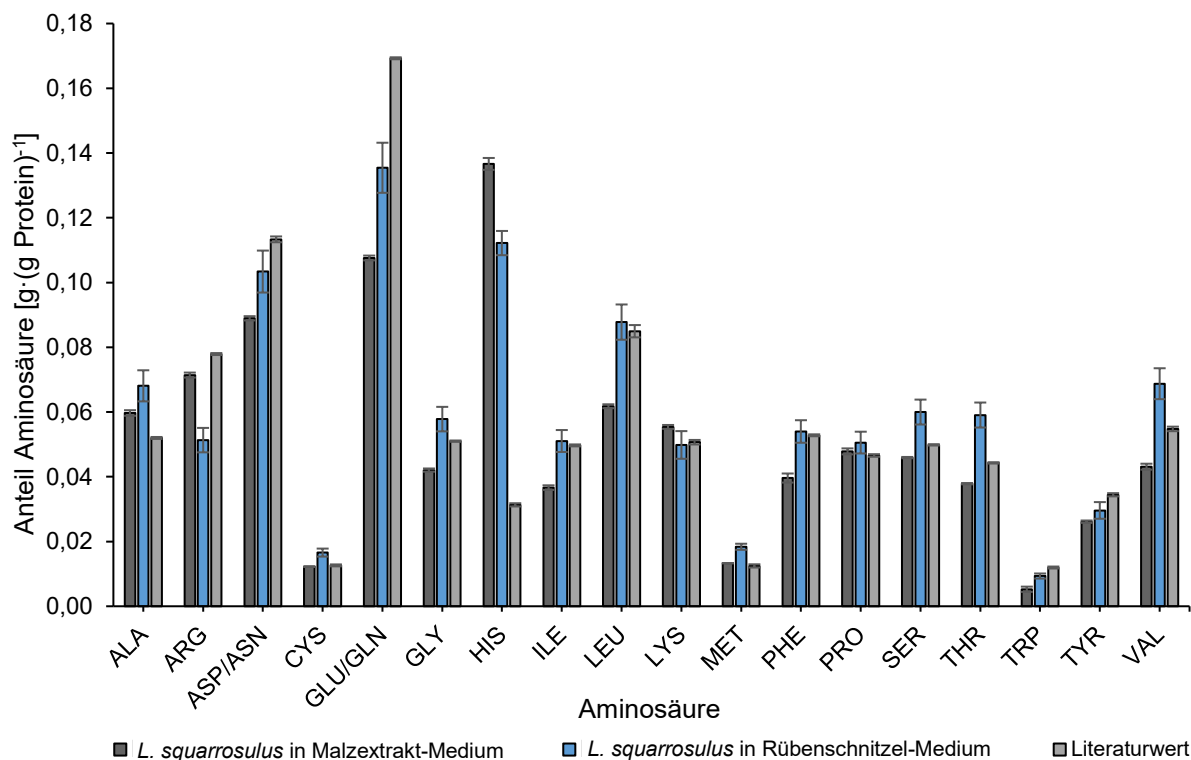


Abbildung 95: Aminosäure-Profil von Rübenschnitzeln sowie lyophilisiertem Mycel von *L. squarrosulus* auf Malzextrakt- und Rübenschnitzel-Melasse-Medium
Die Literaturwerte beziehen sich auf Fruchtkörper von *L. squarrosulus* und entstammen Ugboogu *et al.* (2020)

Aus Abbildung 95 geht hervor, dass die analysierten Daten gut mit den Literaturdaten übereinstimmen. Größere Abweichungen ergaben sich bei Glutamin(-säure) sowie Histidin. Im Mycel, kultiviert in Rübenschnitzel- und Malzextrakt-Medium, wurden deutlich höhere Werte für Histidin analysiert, als diese in der Literatur für die Fruchtkörper von *L. squarrosulus* beschrieben sind. Entgegengesetzt verhält sich dies bei Glutamin(-säure), wo im Mycel ein niedrigerer Gehalt als im Fruchtkörper nachgewiesen wurde. Diese Unterschiede sind in der Literatur auch für die Pilze *Pleurotus eryngii* sowie *Lentinula edodes* beschrieben. So wurde im Mycel von *Lentinula edodes* ein Histidin-Gehalt von 2,45 mg·g⁻¹ und im Fruchtkörper ein Gehalt von 1,62 mg·g⁻¹ nachgewiesen. Glutamin(-säure) wurde im Mycel mit einem Gehalt von 5,09 mg·g⁻¹ und in Fruchtkörpern mit einem Gehalt von 7,96 mg·g⁻¹ bestimmt (Wang *et al.*, 2016). Diese Beobachtungen passen zu den hier erhaltenen Ergebnissen.

Abbildung 42 zeigt auch Unterschiede zwischen den beiden Kultivierungsmedien. Dies ist auf die Medienzusammensetzung zurückzuführen und wurde in der Literatur u.a. auch für *Lentinula edodes*, kultiviert auf Malzkeimen und Gemüseabfällen beobachtet (El-Zalaki, 1979). Aus den Literaturwerten von Ugboogu *et al.* (2020) wurden Methionin und Cystein mit einem Chemical Score von 72 und Lysin mit einem Chemical Score von 92 als limitierende Aminosäuren identifiziert. Die Biologische Wertigkeit der Fruchtkörper wurde mit 92 berechnet.

Dies passt zu den in Tabelle 50 dargestellten Ergebnissen, wobei im Mycel zusätzlich Tryptophan als limitierende Aminosäure ermittelt wurde. Tryptophan wurde auch im Mycel von *Flammulina velutipes* und *Stropharia rugosoannulata* als limitierende Aminosäure identifiziert, wobei in den jeweiligen Fruchtkörper Lysin oder Methionin und Cystein limitierend waren (Zwinkels *et al.*, 2025). Dies lässt darauf schließen, dass Tryptophan möglicherweise in Mycel allgemein in geringeren Anteilen vorhanden ist, was die Differenzen zwischen den Ergebnissen in Tabelle 50 und den Literaturwerten erklären könnte.

4.1.7 Produktentwicklung und sensorische Evaluierung

4.1.7.1 Chemische Zusammensetzung

Abbildung 43 zeigt, dass, bezogen auf die Trockenmasse, bei beiden Produkten Fett mit 63% und 64% die Hauptkomponente war. Dies ist bei dem Hybrid-Produkt vor allem auf den hohen Gehalt an Sonnenblumenöl sowie zu geringen Anteilen auf das verwendete Schweinefleisch zurückzuführen. Bei der Bratwurst „klassisch“ wurde neben Schweinefleisch auch Speck als Zutat verwendet. Schweinemuskelfleisch enthält durchschnittlich 7,6% Fett in der TM, Schweinerückenspeck durchschnittlich 95 % (Souci *et al.*, 2016). Der erhaltene Wert von 63% passt zu Literaturdaten für Schweinsbratwurst mit durchschnittlichen 60% Fett in der TM (Souci *et al.*, 2016). Die verschiedenen Zutaten wirkten sich auch auf das Fettsäureprofil aus (Abbildung 45). Dieses ist nachfolgend Literaturdaten für Schweinespeck, Schweinemuskelfleisch und Sonnenblumenöl gegenübergestellt (Abbildung 96).

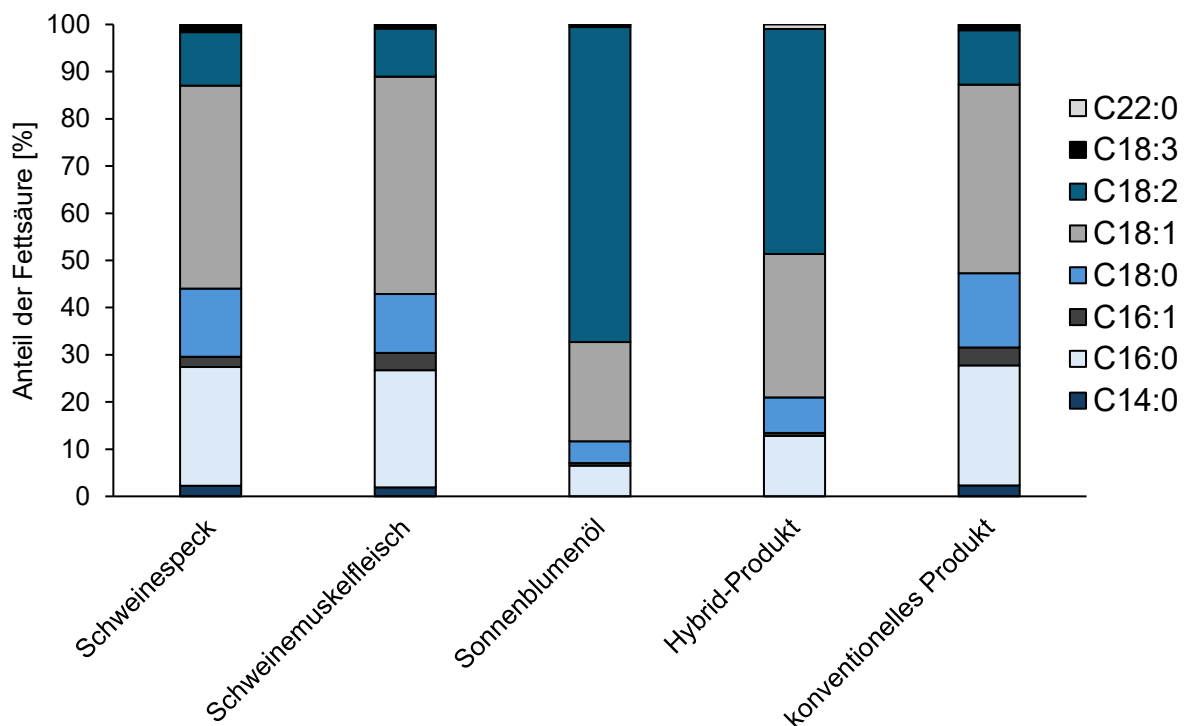


Abbildung 96: Fettsäure-Verteilung des Hybrid-Produktes sowie des konventionellen Produktes mit Gegenüberstellung von Literaturwerten von Schweinespeck, Schweinemuskelfleisch und Sonnenblumenöl (Akkaya, 2018; Souci *et al.*, 2016; Rinaldo und Mouro, 2001)

Das konventionelle Produkt Bratwurst „klassisch“ enthielt vor allem Ölsäure, Palmitinsäure sowie Stearinsäure und Linolsäure und stimmt mit den Literaturdaten für Schweinemuskelfleisch und Schweinespeck überein. Das Hybrid-Produkt wies im Vergleich zum konventionellen Produkt deutlich höhere Anteile Linolsäure auf. Die Anteile an Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure waren hingegen geringer. Insgesamt wies das Hybridprodukt mit 79% im Vergleich zu 57% in der Bratwurst „klassisch“ einen deutlich höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren auf, was aufgrund von möglichen positiven Effekten auf die Herz Kreislauf Gesundheit von ernährungsphysiologischer Relevanz ist (FAO, 2010).

Der Proteingehalt der Bratwurst „klassisch“ lag mit 30% über dem Wert des Hybrid-Produktes mit 21% (Abbildung 43). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das verwendete Schweinefleisch einen höheren Proteingehalt als das eingesetzte Mycel aufweist und bei der Bratwurst „klassisch“ ein höherer Anteil Schweinefleisch enthalten war. Das erhaltene Ergebnis für die Bratwurst „klassisch“ ist vergleichbar mit Literaturangaben, wo ein durchschnittlicher Rohproteingehalt von 35% in der TM angegeben ist (Souci *et al.*, 2016). Auch das analysierte Aminosäureprofil der Bratwurst „klassisch“ (Abbildung 44) ist mit Literaturwerten für Schweinemuskelfleisch vergleichbar (Abbildung 97).

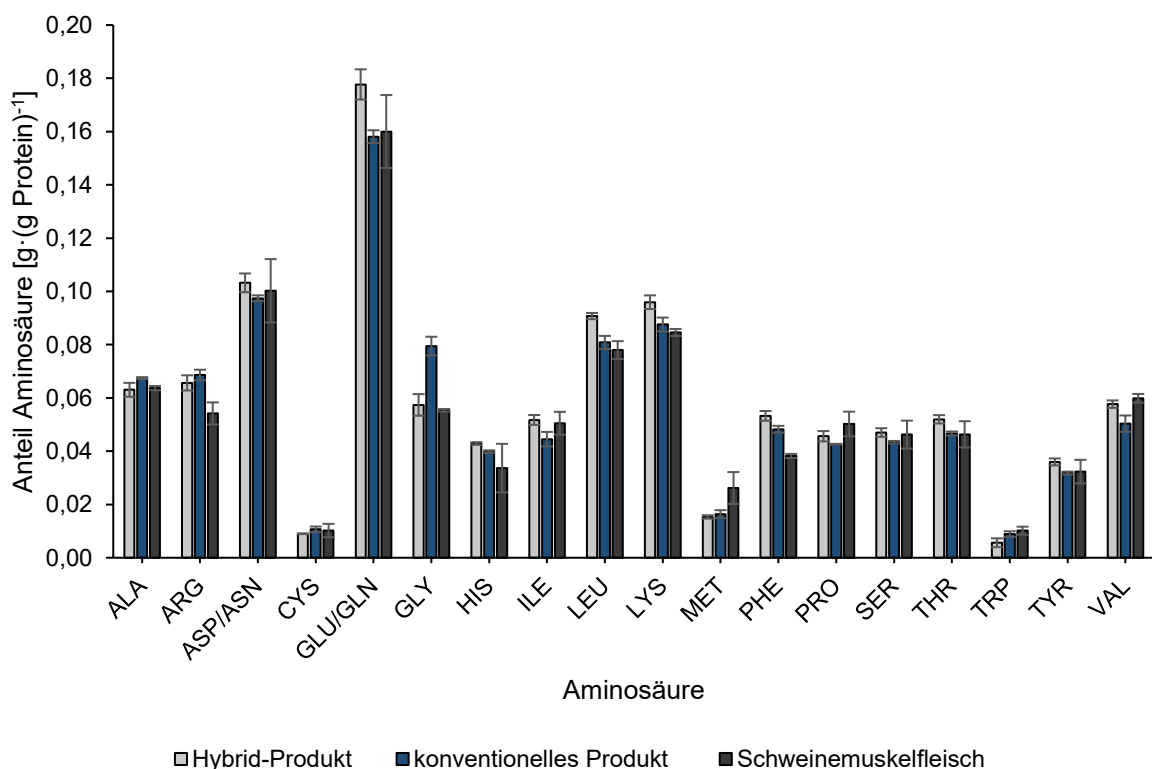


Abbildung 97: Aminosäureprofil des Hybrid-Produktes sowie des konventionellen Produktes mit Gegenüberstellung von Literaturwerten von Schweinemuskelfleisch (Souci *et al.*, 2016)

Geringfügige Abweichungen zu den Literaturdaten sind darauf zurückzuführen, dass für die Herstellung der Bratwurst nicht ausschließlich Schweinemuskelfleisch, sondern auch Fleisch

mit Speck- und Sehnenanteilen verwendet wurde. Je nach Ausgangsprodukt kann hier das Aminosäureprofil variieren. So ist in kollagenreichem Bindegewebe deutlich mehr Glycin enthalten, als in Schweinemuskelfleisch (Hui, 2012; Souci *et al.*, 2016). Dies zeigt sich auch in den analysierten Werten, wo für die konventionelle Bratwurst der höchste Glycin-Gehalt ermittelt wurde.

Im Vergleich zum Hybrid-Produkt wurden in dem konventionellen Vergleichsprodukt geringere Anteile der essenziellen Aminosäuren Lysin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Threonin und Valin nachgewiesen. Höhere Gehalte wurden bei den essenziellen schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin sowie bei Tryptophan analysiert. Da diese bei beiden Produkten die limitierenden Aminosäuren darstellen, wurde für die klassische Bratwurst mit 91 ± 2 gegenüber dem Hybrid-Produkt mit 83 ± 2 eine höhere biologische Wertigkeit erzielt, obwohl der relative Anteil aller essenziellen Aminosäuren im Hybrid-Produkt höher war.

4.1.7.2 Sensorische Evaluierung

Wie in Abbildung 48 und Abbildung 49 dargestellt, wies das hergestellte Hybrid-Produkt in Bezug auf Geruch und Geschmack sehr ähnliche Eigenschaften zu dem konventionellen Produkt, der Bratwurst „klassisch“, auf. Abweichungen ergaben sich bei Mundgefühl und Textur, wo das Hybrid-Produkt in der Gesamtbewertung (Tabelle 52) deutlich schlechter abschnitt als das konventionelle Produkt. Hier wurde das Produkt vor allem als zu weich wahrgenommen und einige Probanden nahmen außerdem ein sandiges Gefühl wahr. Eine fehlende Bissfestigkeit ist auch bei vielen veganen und vegetarischen Produkten beschrieben, welche häufig als zu weich oder schwammig beschrieben wurden. Dies ist vor allem auf die fehlende Textur und die veränderten technofunktionellen Eigenschaften der pflanzlichen Proteine im Vergleich zu der faserigen Proteinstruktur des Fleisches zurückzuführen (Gibis, 2023). Das sandige Gefühl stammt von den eingesetzten frischen Zuckerrübenschnitzeln, wie die Analyse der säureunlöslichen Asche zeigt (Tabelle 53). Die Zuckerrüben werden vor dem Zerkleinern einer Rübenwäsche unterzogen, wo anhaftende Erde und Steinchen entfernt werden (Nordzucker AG, 2022). Wurden diese dort nicht vollständig entfernt, so sind diese auch in dem hier verwendeten Substrat, den frischen, extrahierten Zuckerrüben, noch enthalten und gelangen so in das Endprodukt. Eine gründlichere Reinigung der Zuckerrüben oder ein Waschschrift der Schnitzel könnte hier das sandige Gefühl verhindern und zu einer Verbesserung des Mundgefühls beitragen.

4.2 Substrate silierte Rübenschitzel und Vinasse

4.2.1 Chemische Zusammensetzung

Für die Zusammenstellung des Mediums mit den Substraten silierte Rübenschitzel (Pressschitzel-Silage) und Vinasse wurde die chemische Zusammensetzung beider Substrate analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse für die chemische Zusammensetzung sowie das Aminosäureprofil sind nachfolgend Literaturwerten und Herstellerspezifikationen gegenübergestellt (Tabelle 72, Abbildung 98). Aufgrund des hohen Wassergehaltes beider Substrate wurden die analysierten Gehalte sowie die Literaturwerte jeweils auf die Trockenmasse bezogen.

Tabelle 72: Vergleichende Darstellung der analytisch ermittelten chemischen Zusammensetzung von silierten Rübenschitzeln und Vinasse mit Literaturwerten und Herstellerspezifikationen. (Stemme *et al.*, 2005; Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing, 2023; Potthast *et al.*, 2011; Ülger *et al.*, 2018; Weber, 2006; Nordzucker AG, 2006a; Deutsche Melasse Handelsgesellschaft mbH Agrar, 2014; Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, 2008) Die Gehalte wurden auf die jeweiligen Trockenmassen bezogen.

	Vinasse		Silierte Rübenschitzel	
	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Analytisch ermittelter Wert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$	Literaturwert $\left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}}\right]$
Fett	1,4 ± 0,2	0,4-1,1	2,0 ± 0,1	0,4-1,8
Protein	28,5 ± 0,2	27,4-32,9	9,6 ± 0,5	9,4-11,1
Wasser	48,8 ± 0,1	31,8-45,0	80,5 ± 0,1	72,0-82,0
Kohlenhydrate	43,0 ± 4,0	40,2	84,0 ± 9,0	59,9-80,7
Zucker (Sac, Fru, Glc)	1,8 ± 0,1 (Sac, Fru)	1,4-3,0	0,5 ± 0,1	0,0-3,1
Asche	27,1 ± 0,4	24,1-28,6	4,8 ± 0,3	5,3-8,1

Die in Tabelle 72 dargestellten Analyseergebnisse stimmen größtenteils mit Literaturwerten und Herstellerspezifikationen überein.

Silierte Rübenschitzel werden durch Fermentation von melassierten oder nicht melassierten Pressschitzeln mit thermophilen Milchsäurebakterien hergestellt. Durch die Milchsäurebakterien werden die enthaltenen Zucker zu Milchsäure metabolisiert, sodass sich durch die Silierung der Zuckergehalt, der Trockensubstanzgehalt sowie der pH-Wert verändert (Verein der Zuckerindustrie, 2012; Weber, 2006). Da die chemische Zusammensetzung mit der von den bereits unter 4.1.1, 4.1.5.1 diskutierten Substraten frischen und getrockneten Rübenschitzel(-Pellets) vergleichbar ist (Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, 2008), wird diese hier nicht erneut aufgegriffen.

Bei dem Substrat Vinasse liegen Abweichungen zu den Literaturwerten und Spezifikationen im Wassergehalt vor. Vinasse wird durch Fermentation von Zuckerrübenmelasse, Rohsaft oder Dicksaft gewonnen. Die Fermentation kann dabei auf die Produktion von Hefe, Ethanol oder Zitronensäure abzielen, was die Zusammensetzungen der zurückbleibenden Vinasse beeinflusst (Kling und Wöhlbier, 1983; Harms, 2003). Die hier analysierte Vinasse entstammte der Ethanol-Produktion. Nach Destillation des Alkohols bleibt Vinasse mit einem Trockenmasse-Gehalt von ca. 3,5% zurück. Durch Eindampfen werden höhere Trockenmassen erzielt, die sich je nach Qualität unterscheiden (Nordzucker AG, 2008).

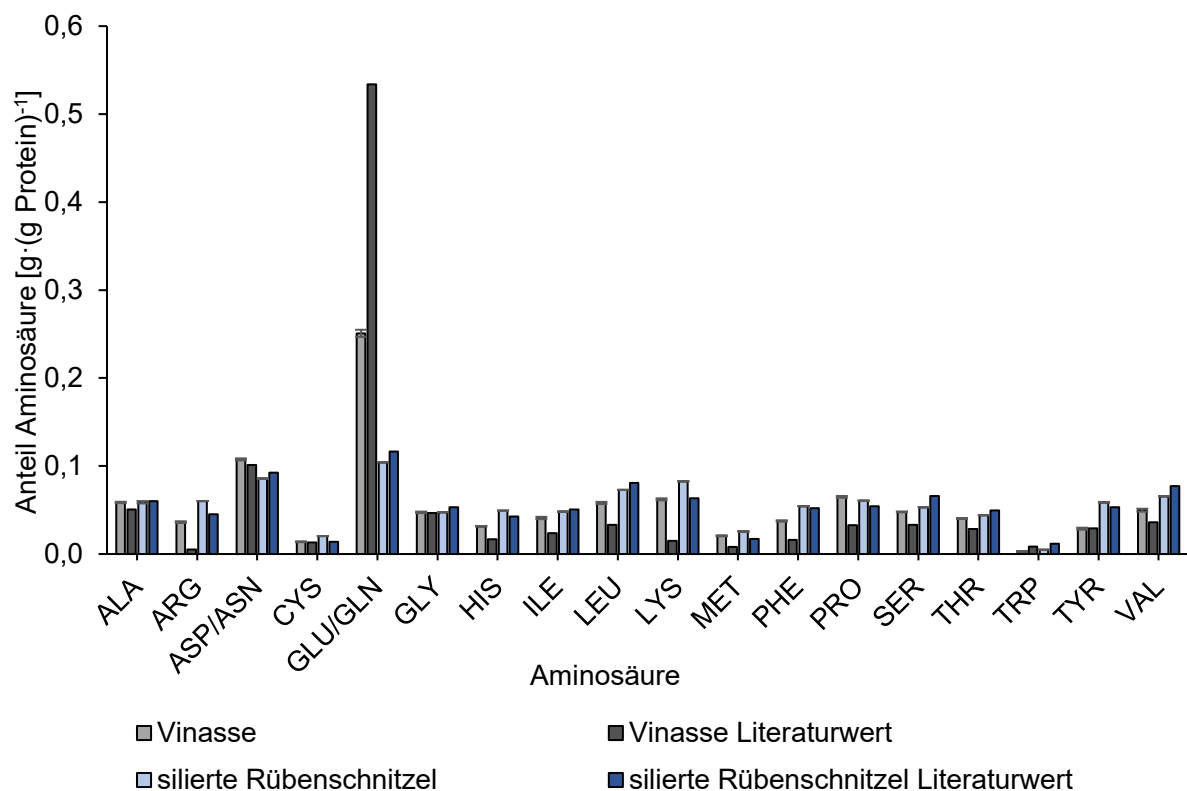


Abbildung 98: Aminosäureprofile der Rohstoffe Vinasse und silierte Rübenschnitzel

Die Aminosäureanalytik wurde nach Absatz 2.8.3 im Duplikat durchgeführt und Literaturwerten gegenübergestellt (Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003; Harms, 2003; Deutsche Melasse Handelsgesellschaft mbH, 2015; Heuzé *et al.*, 2019).

Die für das Substrat Pressschnitzelsilage analysierten Werte stimmen mit den Literaturwerten überein. Dominierend sind hier Asparagin- und Glutamin(säure), während Tryptophan, Methionin und Cystein die limitierenden Aminosäuren darstellen.

Für das Substrat Vinasse standen bezüglich des Aminosäureprofils nur Literaturwerte aus der Hefeproduktion zur Verfügung, was die hier beobachteten größere Abweichungen erklärt. Zum einen wird für die Hefe-Produktion und Ethanol-Herstellung mit unterschiedlichen Hefe-Stämmen gearbeitet (Schmid, 1952; Benjaphokee *et al.*, 2012; Meisel *et al.*, 2015) und zum anderen wird bei der Hefekultivierung für die Ethanol-Herstellung unter anaeroben

Bedingungen kultiviert, während für die Hefe-Produktion unter aeroben Bedingungen kultiviert wird (Schmid, 1952; Rodrigues *et al.*, 2006). Da der Sauerstoffgehalt einen wichtigen Einfluss auf die ablaufenden Stoffwechsel-Prozesse in der Hefezelle hat, verschieben sich unter anaeroben Bedingungen auch die Stoffwechsel-Metabolite. So liefert der Citratzyklus bei aerober Kultivierung wichtige Vorstufen für die Bildung von Aminosäuren, beispielsweise von α -Ketoglutarat, welches durch Transaminierung in Glutaminsäure umgewandelt wird (Rodrigues *et al.*, 2006). Dies kann den deutlich höheren Gehalt der Glutaminsäure in Literaturwerten im Vergleich zu den Werten in der analysierten Vinasse erklären.

4.2.2 Screening in Oberflächenkultur

Das Substrat Vinasse weist einen hohen Protein-, Kohlenhydrat- und Aschegehalt auf (Kling und Wöhlbier, 1983). Im Gegensatz zu den ebenfalls im Screening verwendeten silierten Rübenschnitzeln enthält Vinasse keine unlöslichen Zellwandkohlenhydrate, sondern große Teile lösliche Saccharide, wie Arabinose und Cellobiose (Harirchi *et al.*, 2020). Als weitere Kohlenstoffquelle sind organische Säuren, wie Essig- und Milchsäure enthalten, welche einen leicht sauren pH-Wert von 5 bewirken (Harirchi *et al.*, 2020; España-Gamboa *et al.*, 2011). Für den Abbau der Vinasse werden daher vor allem Proteasen, Oxidoreduktasen, wie bspw. die Cellobiose-Dehydrogenase, Hydrolasen sowie Decarboxylasen und eine gewisse Säure-Toleranz benötigt (Hofrichter *et al.*, 2009; Ander, 1994; España-Gamboa *et al.*, 2011). Wie Tabelle 56 zeigt, zeigten vor allem *Pleurotus sapidus* sowie *Lentinus squarrosulus* schnelles Wachstum auf Vinasse-Agar mit $125 \text{ g Vinasse} \cdot (\text{L})^{-1}$. *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Armillaria bulbosa*, *Polyporus squamosus* und *Lycoperdon pyriforme* zeigten kein Wachstum. In der Literatur ist bereits für verschiedene Spezies der Gattung *Pleurotus* ein schnelles Wachstum in Vinasse beschrieben (Aguiar *et al.*, 2023; Sartori *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2010). Die besten Ergebnisse wurden bei Aguiar *et al.* (2023) mit unverdünnter Vinasse erhalten. Bei einer Vinasse-Konzentration von $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde bei dem unter 3.2.2 durchgeführten Screening jedoch kein Wachstum beobachtet. Dies kann damit begründet werden, dass die Vinasse in der Literatur mit einer Spurenelement-Lösung versetzt wurde und mit einem deutlich höheren Pilzgehalt inokuliert wurde. Für *L. squarrosulus* liegt noch keine Literatur zum Vinasse-Abbau vor, jedoch wurde für die verwandte Spezies *Lentinus sajor-caju* ebenfalls eine sehr gute Umsetzung von Vinasse beobachtet (Corner, 1981; Sartori *et al.*, 2015; Vilar *et al.*, 2018).

Das ausbleibende Wachstum von *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Armillaria bulbosa*, *Polyporus squamosus* und *Lycoperdon pyriforme* kann möglicherweise auf in der Vinasse vorkommende Reaktionsprodukte, wie beispielweise Melanoidine, welche Mineralstoffe und Spurenelemente chelatisieren können, oder den sauren pH-Wert zurückzuführen sein. Für *Polyporus squamosus* wurde von Fidanova und Pénev (1988) ein schnelles Wachstum in Vinasse festgestellt. Jedoch wurde das Medium hier mit Stickstoff und Phosphat supplementiert sowie

der pH-Wert erhöht, was die Unterschiede zu den hier gemachten Beobachtungen erklären kann.

Silierte Rübenschnitzel weisen eine sehr ähnliche chemische Zusammensetzung wie getrockneten/pelletierten Rübenschnitzeln auf, wobei vorliegende Mono- und Disaccharide bakteriell zu organischen Säuren umgesetzt worden sind (Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, 2008; Wageningen Livestock Research und Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, 2003; Weber, 2006). Neben den Voraussetzungen, die bereits unter 4.1.2 beschrieben sind, muss der Pilz somit eine Toleranz gegenüber organischen Säuren und aziden pH-Werten aufweisen, um Wachstum zu zeigen.

Die hier erhaltenen Ergebnisse für das Wachstum passen zu den zuvor erhaltenen Daten aus 3.1.2 und werden hier nicht erneut aufgegriffen.

Im Gegensatz dazu wichen die erhaltenen Geruchseindrücke von den Geruchseindrücken des Screenings mit pelletierten Rübenschnitzeln in 3.1.2 ab. Für Vinasse wurden häufig würzige Geruchseindrücke wahrgenommen. Für silierte Rübenschnitzel dominierten zu Beginn der Kultivierung säuerliche und erdige Geruchseindrücke, die auf den starken Eigengeruch des Mediums zurückzuführen waren. Im Kulturverlauf waren bei *L. squarrosulus* auch süßliche, bei *A. bulbosa* und *D. tabescens* auch würzig/suppige und grüne Geruchseindrücke wahrnehmbar. Im kombinierten Medium wurden, wie im Vinasse-Medium vermehrt würzige Geruchseindrücke wahrgenommen.

Die Aromastoffbildung wird maßgeblich von den enthaltenen Nährstoffen, der Enzymexpression, sowie dem pH-Wert beeinflusst (Soccol *et al.*, 2007). Diese unterscheiden sich vor allem bei Vinasse deutlich von den getrockneten Rübenschnitzeln. Auch bei den silierten Rübenschnitzeln liegen durch Abbauprodukte, vor allem in Form von phenolischen Komponenten, organischen Säuren und Alkoholen, andere Aromastoff-Präkursoren vor, welche in einem veränderten Aromastoffprofil resultieren können (Berger und Zorn, 2004; Weber, 2006).

Aufgrund der Beobachtungen bezüglich Wachstum und Geruchseindruck wurden *L. squarrosulus*, *P. sapidus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* für das Screening in Flüssigkultur ausgewählt.

4.2.3 Screening in Flüssigkultur

Im Screening in Flüssigkultur wurde der Rohprotein- sowie der Ergosterolgehalt betrachtet.

4.2.3.1 **Medium 1:** Vinasse 125 g·L⁻¹

Bei 7-tägiger Kultivierung waren optisch Unterschiede im Wachstum sowie in der Färbung des Mediums zu beobachten (Abbildung 53). Vor allem *P. sapidus* zeigte schnelles Wachstum und der Kulturüberstand war deutlich heller als zu Beginn der Kultivierung. Eine effektive

Entfärbung der Vinasse ist in der Literatur bereits für *Pleurotus ostreatus* sowie andere Basidiomyceten beschrieben und beruht vor allem auf dem Abbau der enthaltenen Melanoidine (España-Gamboa *et al.*, 2011).

Wie Abbildung 54 zeigt, wiesen alle vier Spezies einen hohen Rohproteingehalt von $34,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*L. squarrosulus*) bis $41,4 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*F. velutipes*) auf. Die Rohproteingehalte lagen damit über den Literaturwerten von $19,0 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*Pleurotus spp.*) bis $32,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ (*F. velutipes*) (Sharma *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2014b; Kozhemyakina *et al.*, 2010; Sartori *et al.*, 2015). Ein Grund für die Abweichungen im Rohproteingehalt können in der Berechnung aus dem analysierten Gesamtstickstoff liegen. In der Literatur ist häufig kein Kjeldahl-Faktor angegeben, sodass es hier zu deutlichen Abweichungen im Rohproteingehalt kommen kann. Zum anderen wird der Rohproteingehalt maßgeblich von den Kultivierungssubstraten beeinflusst. Da das hier verwendete Vinasse-Medium im Vergleich zu in der Literatur verwendeten Vinassen einen hohen Proteingehalt von $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ aufwies, kann der hohe Rohproteingehalt auch darauf zurückgeführt werden (Sharma *et al.*, 2020; España-Gamboa *et al.*, 2011).

Bezogen auf den Ergosterolgehalt (Abbildung 55) wurden für *F. velutipes* die geringsten Werte analysiert. Zwischen *P. sapidus*, *L. squarrosulus* und *D. tabescens* wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Zur Beurteilung des Wachstums kann im Falle des Vinasse-Mediums, welches nur geringe Anteile an Feststoffpartikeln enthielt, auch die Trockenmasse herangezogen werden. Diese war für *P. sapidus* mit $17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ am höchsten. Sartori *et al.* (2015) wiesen für *Pleurotus spp.*, kultiviert auf Vinasse aus der Fermentation von Weintrester, mit $13\text{-}16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ähnliche Biomassen nach.

4.2.3.2 **Medium 2: Silierte Rübenschnitzel** $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Bei der Kultivierung in Medium 2, welches ausschließlich silierte Rübenschnitzel enthielt, wurde optisch kaum Wachstum beobachtet (Abbildung 56). Dies zeigte sich auch im Rohprotein- und Ergosterolgehalt (Abbildung 57 und Abbildung 58). Die Rohproteingehalte lagen mit 12% der Trockenmasse nur knapp über dem Proteingehalt der eingesetzten Rübenschnitzel, was für einen geringen Abbau des Substrates spricht. Ein höherer Rohproteingehalt wurde nur für *L. squarrosulus* mit $15,9 \text{ g} \cdot (100 \text{ g TM})^{-1}$ nachgewiesen. Auch für den Parameter Ergosterol wurden nur für *L. squarrosulus* zuverlässig quantifizierbare Ergebnisse erhalten. Dies kann damit zusammenhängen, dass durch den Autoklaviervorgang der pH-Wert des Flüssigmediums auf < 4 absank und dieser damit außerhalb des optimalen pH-Bereichs der hier verwendeten Spezies lag (Hasan Sardar *et al.*, 2015; Kozhemyakina *et al.*, 2010). Für *L. squarrosulus* und *D. tabescens* wurde bereits in 3.1.4.3 eine breite pH-Toleranz von 5-8 beobachtet, weshalb beide Spezies womöglich auch im sauren Milieu von < 4 noch Wachstum zeigten.

4.2.3.2 **Medium 3:** Vinasse 40 g·L⁻¹ und silierte Rübenschnitzel 35 g·L⁻¹

Bei dem kombinierten Medium wurde hier das stärkste Wachstum bei *L. squarrosulus* beobachtet (Abbildung 59). Das Medium wurde stark entfärbt und es war eine schnelle Mycelbildung zu beobachten. Die Beobachtungen bestätigten sich auch im Rohprotein- und Ergosterolgehalt (Abbildung 60 und Abbildung 61). Hier zeigte *L. squarrosulus* mit 26,8 g·(100 g TM)⁻¹ den höchsten Rohproteingehalt. Die Rohproteingehalte der drei übrigen Spezies lagen zwischen 21,7 g·(100 g TM)⁻¹ (*D. tabescens*) und 23,7 g·(100 g TM)⁻¹ (*F. velutipes*). Auch beim Ergosterolgehalt wurden für *L. squarrosulus* die höchsten Gehalte erzielt. Die Ergosterolgehalte von *F. velutipes* und *P. sapidus* lagen teilweise nur knapp über der Quantifizierungsgrenze (LOQ).

Die Ergebnisse spiegeln somit eine Kombination der Ergebnisse aus Medium 1 und 2 wider. Das langsamere Wachstum von *F. velutipes* und *P. sapidus* ist, wie bei Medium 2, auf den verringerten pH-Wert des Mediums zurückzuführen.

Die erhaltenen Geruchseindrücke (Tabelle 59) schwankten stark zwischen den verschiedenen Medien. Bei Medium 2 waren außer bei *L. squarrosulus* nur säuerliche Geruchseindrücke wahrnehmbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die übrigen drei Spezies kein oder nur ein stark verlangsamtes Wachstum zeigten und der Geruchseindruck so dem des Mediums entsprach.

4.2.4 Optimierung der Kultivierung

pH-Wert

Für die Optimierung des pH-Wertes wurden nur die beiden Einzelmedien betrachtet, welche lediglich Vinasse oder silierte Rübenschnitzel als Nährstoffquelle enthielten.

In dem Medium mit silierten Rübenschnitzeln wurden die höchsten Ergosterolgehalte, bezogen auf die Trockenmasse, für *L. squarrosulus* und *F. velutipes* für einen pH-Bereich von 5-7 erhalten. Auch für *D. tabescens* und *P. sapidus* zeigten sich 5-7 als geeignet. Die Ergebnisse für *D. tabescens* und *L. squarrosulus* stimmten mit den bereits in 3.1.4.3 erhaltenen Ergebnissen überein und werden hier nicht erneut aufgegriffen.

Für *P. sapidus* ist in der Literatur ein optimaler pH-Wert von 6 beschrieben, wobei bei allen pH-Werten zwischen 5 und 8 auf Kartoffeldextrose-Agar ein schnelles Wachstum beobachtet wurde (Hasan Sardar *et al.*, 2015). Dies passt zu den hier erhaltenen Ergebnissen. *F. velutipes* zeigte in der Literatur zwischen 5,0 und 6,5 das schnellste Wachstum (Kozhemyakina *et al.*, 2010), was die Ergebnisse in Abbildung 62 stützt.

Für die Optimierung in Vinasse-Medium (Abbildung 63) zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier wurden für *D. tabescens* und *L. squarrosulus* bei pH 5 und 7 ähnlich Ergebnisse erhalten. Abweichungen zu den vorherigen Beobachtungen wurden bei *P. sapidus* und *F. velutipes* festgestellt. Hier wurden durch die hohen Trockenmassen bei pH 7 zwischen pH 5 und 7,

bezogen auf das Kulturvolumen, signifikante Unterschiede im Ergosterolgehalt beobachtet (t-Test, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Da es sich bei Vinasse um ein Medium mit geringem Feststoffanteil handelt, kann hier die Trockenmasse ebenfalls als Wachstumsindikator herangezogen werden. Es ist somit davon auszugehen, dass *F. velutipes* und *P. sapidus* bei pH 7 in Vinasse-Medium ein schnelleres Wachstum zeigten, als bei pH 5. Dies weicht geringfügig von den zuvor gemachten Beobachtungen für Vinasse-Medium ab und ist auf die unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzung der Medien zurückzuführen (Meenakshi und Giridhar, 2011; Qinnghé *et al.*, 2004). So sind in Vinasse bspw. hohe Mengen Glycerol enthalten, welche mithilfe der Glycerol-Kinase metabolisiert werden können. Das pH-Optimum dieses Enzyms, isoliert aus *Saccharomyces cerevisiae*, liegt im alkalischen Bereich zwischen 9 und 10 (Harirchi *et al.*, 2020; Aragon *et al.*, 2008).

Temperatur

Für die Optimierung der Kultivierungstemperatur wurden alle drei Medien betrachtet.

Für das Vinasse-Medium (Abbildung 64) zeigte *L. squarrosulus* über den gesamten Temperaturbereich von 18 bis 30 °C den höchsten Ergosterolgehalt aller getesteten Spezies. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Temperaturen waren nicht zu beobachten (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Bei *D. tabescens* wurde bei einer Temperatur von 18 °C das langsamste Wachstum beobachtet. Entgegengesetzt war dies bei *F. velutipes*, wo das signifikant schnellste Wachstum bei 18 °C beobachtet wurde. Bei *P. sapidus* war der Ergosterolgehalt bezogen auf die Trockenmasse über den betrachteten Temperaturbereich gleichbleibend. Eine deutlich geringe Trockenmasse bei 30 °C resultierte hier jedoch in einem signifikant geringeren Ergosterolgehalt pro Liter. Für *F. velutipes* ist in der Literatur eine optimale Wachstumstemperatur von 23-25°C angegeben, für *P. sapidus* bei 25 °C (Hasan Sardar *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Während die Daten für *P. sapidus* zu den Beobachtungen passten, wichen für *F. velutipes* die erhaltenen Daten von den Literaturwerten ab. Liu *et al.* (2017) beobachteten, dass *F. velutipes* bei Temperaturen von unter 15 °C über 3 Tage oder länger Stoffwechselprozesse anpasst. Hier wurde bspw. ein Hochregulieren der katalytischen Enzyme und ein Runterregulieren des Pentosephosphatweges beobachtet. Dies kann, neben den Substratzusammensetzungen, die Abweichungen zu den Literaturdaten erklären.

Da die Versuche zu pH-Wert und Temperatur parallel liefen, wurden die Versuche zur Temperaturoptimierung für die silierten Rübenschnitzel (Abbildung 65) sowie das kombinierte Medium (Abbildung 66) noch bei dem nicht eingestellten pH-Wert durchgeführt. Das Wachstum war daher bei *P. sapidus* und *F. velutipes* sehr langsam. Die für *D. tabescens* und *L. squarrosulus* erhaltenen Ergebnisse für das Substrat silierte Rübenschnitzel passen zu den Daten aus 3.1.4.3, was sich mit der Ähnlichkeit der Substrate erklären lässt.

Aufgrund der Beobachtungen erwiesen sich für das Vinasse- sowie das silierte Rübenschnitzel-Medium höhere pH-Werte zwischen 6 und 7 als optimal. Die optimale Temperatur lag bei 18 °C (*F. velutipes*, Medium 1 und *L. squarrosulus*, Medium 3) und 24 °C (Tabelle 60). Durch die Kultivierung bei optimierten Bedingungen (Abbildung 67) wurden die Ergosterolgehalte der verschiedenen Pilz-Substratkombinationen verbessert, wobei *L. squarrosulus* für alle Substrate den höchsten Ergosterolgehalt zeigte.

Aminosäureprofile

Zur Einordnung der Proteinqualität wurde zusätzlich die Aminosäurespektren und biologischen Wertigkeiten ermittelt. Die biologischen Wertigkeiten lagen zwischen 81,5 (*L. squarrosulus* in Vinasse/ silierte Rübenschnitzel-Medium) und 91,5 (*L. squarrosulus* in silierte Rübenschnitzel-Medium). Die Werte liegen im Bereich von tierischen Proteinen wie Rindfleisch, Schweinefleisch und Milch und passen zu dem in Abschnitt 3.1.6.3 ermittelten Wert von 92 ± 1 bei Kultivierung in Rübenschnitzel-Melasse-Medium (Henderickx, 1963; Elmadfa und Leitzmann, 2019).

Vinasse enthielt vor der Fermentation vor allem Glutamin(-säure). Durch die Fermentation sank der Gehalt an Glutamin(-säure), während vor allem der Gehalt der essenziellen Aminosäuren Lysin, Leucin, Isoleucin, Valin und Threonin anstieg. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Pilzen waren gering.

Das Medium mit silierten Rübenschnitzeln wies deutlich weniger Glutamin(-säure) auf als die Vinasse. Glutamin(-säure) war dennoch die dominierende Aminosäure, gefolgt von Lysin und Leucin. Durch die Fermentation stieg vor allem der Gehalt von Glutamin(-säure), Histidin und Threonin an. Den größten Gehalt im Mycel wiesen die Aminosäuren Glutamin(-säure), Asparagin(-säure) sowie Leucin und Histidin auf.

Für das kombinierte Medium zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 68 und Abbildung 69. Durch die Fermentation wurde der Gehalt an Cystein, Methionin und Glutaminsäure verringert, während die Gehalte von Alanin, Histidin und den essenziellen Aminosäuren Leucin und Threonin zunahmen. Den größten Anteil im Mycel machten die Aminosäuren Glutamin(-säure), Asparagin(-säure), Histidin, Leucin und Lysin aus.

Die Zusammensetzungen, die für die jeweiligen Mycelien ermittelt wurden, passen zu vorliegenden Literaturdaten. Die Daten für *L. squarrosulus* passen zu den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.6.3. Für alle Spezies ist Glutamin(-säure) als dominierende Aminosäuren beschrieben (Kim *et al.*, 2014b; Happel *et al.*, 2025; Erbiai *et al.*, 2021; Kaur und Atri, 2019; Ugbogu *et al.*, 2020; Ahlborn *et al.*, 2019). In Mycel von *F. velutipes* wurden zudem die Aminosäuren Histidin, Asparagin(-säure) und Leucin in hohen Gehalten nachgewiesen (Happel *et al.*, 2025). Dies wurde auch in Abbildung 69 beobachtet. Im Mycel von *P. sapidus* wurden Histidin, Arginin, Asparagin(-säure) und Leucin in größeren Mengen nachgewiesen. Methionin, Cystein und Tryptophan waren nur in geringen Mengen enthalten (Ahlborn *et al.*,

2019). Fruchtkörper von *Armillaria mellea* wiesen neben Glutaminsäure hohe Gehalte an Threonin, Serin und Isoleucin auf, wobei hier nur 12 Aminosäuren untersucht wurden und keine Werte für bspw. Lysin und Leucin vorliegen (Erbai *et al.*, 2021). Dies passt ebenfalls zu den Ergebnissen aus Abbildung 70.

Insgesamt wurde durch die Fermentation der Nebenströme eine Steigerung der essenziellen Aminosäuren wie Leucin, Lysin, Isoleucin und Threonin sowie der semi-essenziellen Aminosäure Histidin erzielt. Limitierende Aminosäuren waren vor allem Cystein, Methionin und Tryptophan.

4.3 Pilzquantifizierung

4.3.1 Etablieren einer qPCR-Methode

4.3.1.1 Optimieren der DNA-Extraktion

Wie Abbildung 71 zeigt, wurden bei der DNA-Isolierung nach 2.7.4.1.1 größtenteils kleine DNA-Fragmente von <250 bp statt langkettiger DNA erhalten, weshalb diese Methode für die Verwendung in der qPCR nicht geeignet ist. Da hier neben dem Mörsern des lyophilisierten Mycels kein weiterer mechanischer Aufschluss-Schritt erfolgte, ist es möglich, dass die Zellen nicht vollständig aufgeschlossen und die DNA so nicht freigesetzt wurde. In der Literatur werden häufig zusätzliche Zerkleinerungs- und Heizschritte für einen vollständigen Aufschluss verwendet (Conlon *et al.*, 2022). Bei der DNA-Isolierung nach 2.7.4.1.2 wurde, wie Abbildung 72 zeigt, ein typisches Bild für langkettige DNA erzielt (Basselet *et al.*, 2008; Conlon *et al.*, 2022). Hier wurde mittels Vortex-Schüttler und Metallkugel stark mechanisch aufgeschlossen, was die erhöhte DNA-Ausbeute erklären kann. Auch Fredlund *et al.* (2008) erzielten mithilfe des DNeasy® Plant Mini Kits der Firma Qiagen im Vergleich mit drei weiteren Methoden die beste Ausbeute. Bei der dort ebenfalls verwendeten CTAB-Isolierung wurde nur ein Zehntel des DNA-Gehaltes, welcher mittels Qiagen-Kit erzielt wurde, nachgewiesen .

4.3.1.2 Auswahl der geeigneten Primer

Wie Abbildung 73 zeigt, wurde nicht mit allen Primern ein PCR-Produkt erhalten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass zum Primer-Design das Genom des Pilzes *Lentinus tigrinus* verwendet wurde, da zum Zeitpunkt der Durchführung noch kein vollständiges Genom des Pilzes *Lentinus squarrosulus* vorlag. Beide Spezies sind zwar verwandt, können sich jedoch im Genom so unterscheiden, sodass nicht alle Primer binden.

Die PCR-Produkte, welche mittels der Primer „GlyHyd“ und „ITS 4/5“ erzielt wurden, waren für die qPCR aufgrund ihrer Länge von > 500 bp nicht geeignet. Wernicke *et al.* (2012) beschrieben für die qPCR eine Amplikon-Länge von 70 bis 200 bp als ideal. Wang und Seed (2007) beschreiben 100-250 bp als typische Größe und 250 bp als maximale Größe für die qPCR. In der Literatur wurde für verschiedene Spezies der Familie der *Polyporaceae* ein Fragment mit einer Länge von ca. 150 bp verwendet (Simeng *et al.*, 2015). Zur Quantifizierung

von *Lentinula edodes* wurde ein Amplikon mit 237 bp verwendet (Jomura *et al.*, 2020). Die hier verwendeten Primer „ITS kurz F/R“ erzeugten ein Fragment von ca. 190 bp, was mittig zwischen den Literaturdaten lag.

4.3.1.3 Optimieren der qPCR-Methode

Für die Optimierung der PCR-Methode wurden die Parameter Verdünnung der Template-DNA, Primer-Konzentration, MasterMix-Konzentration sowie Annealing- und Elongations-temperatur betrachtet.

Optimierung der Verdünnung

Wie Abbildung 76 zeigt, wurde bei einer Verdünnung der Template-DNA von 1:100 keine Trennung zwischen den Pilzgehalten von 40% und 80% erzielt. Durch höhere Verdünnungen von 1:1000 und 1:10.000 war mit steigender Verdünnung eine bessere Trennung möglich. Dies ist auf den logarithmischen Zusammenhang zwischen C_T -Wert und DNA-Konzentration zurückzuführen (Adams, 2007). Je weniger Template-DNA vorliegt, desto mehr Amplifikations-Zyklen werden benötigt, um den Threshold zu überschreiten (C_T -Wert). Zwischen den Verdünnungen 1:100.000 und 1:200.000 wurde keine verbesserte Trennung mehr beobachtet (Tabelle 62). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass hier nur noch ein geringer Verdünnungsfaktor von 2 vorlag und der Gehalt der Template-DNA gering war. In der Literatur sind verschiedene DNA-Konzentrationen und Verdünnungen als optimal beschrieben. Da die geeignete Verdünnung der Template-DNA von einer Vielzahl von Faktoren, wie bspw. möglichen enthaltenen PCR-Inhibitoren und dem Reinheitsgrad der DNA abhängt, ist ein aussagekräftiger Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich (Heid *et al.*, 1996).

Optimierung der Temperatur

Die geeignete Annealing-Temperatur kann über die Schmelztemperatur der Primer abgeschätzt werden (Wang und Seed, 2007; Sugimoto *et al.*, 1996). Die Schmelztemperatur der Primer wurde grob über die Wallace-Regel berechnet, wobei für die hier verwendeten Primer „ITS kurz F/R“ jeweils Schmelztemperaturen von 62 °C erhalten wurden (Wang und Seed, 2007). Für die Annealing-Temperatur eignet sich meist die Schmelztemperatur abzüglich 5 °C, sodass hier ca. 57 °C als optimale Temperatur berechnet wurde (Sugimoto *et al.*, 1996). Dies passt zu den in Tabelle 64 dargestellten Ergebnissen. Hier wurden die besten Trennungen für 57,0 °C und 58,7 °C ermittelt.

Bei einer Temperatur von 63,6 °C wurden nur noch 70% und 80% Pilz detektiert. Dies lässt sich zum einen damit erklären, dass die Temperatur über der berechneten Schmelztemperatur der Primer lag und die Primer somit nicht mehr oder nur noch in geringem Maß an der DNA gebunden haben. Zum anderen nimmt die Fluoreszenz des SYBR®-Green-Farbstoffs mit

steigender Temperatur aufgrund einer höheren thermischen Energie und begünstigten intramolekularen Rotationen in den Bindungen des Farbstoffs ab (Kubista *et al.*, 2006).

Optimierung der Primer-Konzentration

Wie Tabelle 63 und Tabelle 65 zeigt, wurden durch die variierten Primer-Gehalte die Kurven allgemein verschoben. Durch eine verringerte Primer-Konzentration wurden steigende C_T -Werte erhalten. Dies ist auch in der Literatur beschrieben, wo abhängig vom vorliegenden Genom für 500 nM je Primer oder 300 nM je Primer die niedrigsten C_T -Werte erzielt wurden. Die höchsten C_T -Werte wurden für beide betrachteten Genome für 50 nM beobachtet. Dies passt zu den hier erzielten Ergebnissen, wo ebenfalls mit einem Volumen von 0,1 μ L je Primer (50 nM) die höchsten C_T -Werte erzielt wurden (Ponchel, 2007).

Optimierung der eingesetzten Menge des Fluorophor-Mix' Power SYBR® Green

Im Verlauf der Optimierung wurde auch der Einfluss der SYBR® Green Konzentration auf die Sensitivität der qPCR untersucht. Wie Tabelle 66 zeigt, wurde bei einer Konzentration von 6 μ L SYBR® Green pro 20 μ L Reaktionsvolumen keine Detektion mehr beobachtet, sodass hier der Gehalt des MasterMix' zu gering war. Auch eine zu hohe Konzentration von 14 μ L pro 20 μ L Reaktionsvolumen ließ die C_T -Werte nach hinten rücken. Als optimal erwiesen sich die vom Hersteller vorgegebenen 10 μ L pro 20 μ L Reaktionsvolumen. Gründe für die Beobachtungen können in der Zusammensetzung des MasterMix' liegen. Dieser enthält neben dem SYBR® Green-Farbstoff auch die Taq-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und Puffer-Komponenten, darunter Magnesiumchlorid (Thermo Fisher Scientific Inc, 2014). Mg^{2+} wird als Co-Faktor für die Polymerase benötigt, weshalb die Mg^{2+} -Konzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Polymerase und so der PCR hat (Lu *et al.*, 2011). Eine zu geringe Konzentration, wie möglicherweise bei 6 μ L MasterMix pro 20 μ L, kann die Polymerase-Aktivität stark einschränken. Auch eine zu hohe Konzentration kann in einer Einschränkung der Polymerase-Aktivität und Spezifitätsverlust resultieren (Kuffel *et al.*, 2021). Des Weiteren kann SYBR®-Green doppelsträngige DNA (dsDNA) stabilisieren und so die Schmelztemperatur erhöhen, sodass auch die Farbstoff-Konzentration den Verlauf der PCR beeinflussen kann (Monis *et al.*, 2005).

Messungen mit den optimierten Bedingungen

Wie Abbildung 80 zu entnehmen ist, wurden unter optimierten Bedingungen die Pilzgehalt von 0-80% reproduzierbar nachgewiesen. Bei einem Gehalt von 90% und 100% war wieder ein Anstieg der C_T -Werte zu beobachten, was möglicherweise auf PCR-inhibierende Substanzen im Pilzmycel zurückzuführen ist. Da meist Pilzkonzentrationen von 40-60% erwartet werden, wurde diese Einschränkung jedoch hingenommen und keine weiteren Optimierungen unternommen.

Wie Abbildung 82 zeigt, weist die Kalibriergerade eine Korrelation von $R^2 = 0,9858$ auf. Die Kalibrierung erfüllt damit die Anforderungen des Europäischen Netzwerkes für GVO-Labore, nachdem die Kalibrierung für die qPCR $\geq 0,98$ betragen sollte. Die Kalibrierung kann so zur Quantifizierung des Pilzgehaltes verwendet werden. Bei Realproben in Form von verschiedenen Kulturtagen von *L. squarrosulus* wurde hier, wie Abbildung 83 zeigt, ab Tag 3 eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Quantifizierungen über die Marker Chitin und Ergosterol erzielt (vgl. dazu auch Abschnitt 3.1.4.7 und 4.1.4.7).

4.3.2 Vergleich zweier Methoden zur Chitin-Analytik

Für die Quantifizierung des Pilzgehaltes stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei neben der unter 3.3.1 etablierten qPCR auch die Biomarker Ergosterol und Chitin Verwendung finden. Unter 3.3.2 wurde die aktuell verwendete photometrische Methode einer neuen, halbautomatisierten Methode gegenübergestellt. Dazu wurden jeweils Proben mit unterschiedlichen Gehalten von Fruchtkörpern, Mycel und dem Nebenstrom Süßkartoffel-Pulver hergestellt, aufgearbeitet und vermessen.

Da die halbautomatisierte Methode ursprünglich für die Analyse des Chitin-Gehaltes in Insekten etabliert wurde, wurden zunächst die Bedingungen des alkalischen Aufschlusses für die Hydrolyse von Pilzmycel und Fruchtkörpern überprüft (Sudwischer *et al.*, 2025). Wie Tabelle 68 zeigt, wurde durch den alkalischen Aufschluss ein Großteil der enthaltenen Proteine hydrolysiert und ausgewaschen. Beim reinen Nebenstrom verblieben hier nach dem Aufschluss noch $0,34 \pm 0,18 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1}$. Dies passt gut zu den von Sudwischer *et al.* (2025) erhaltenen Daten, wo nach 60–90-minütigem Aufschluss noch $0,44\text{--}0,53 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1}$ in reinem Sojamehl nachweisbar waren. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den verbliebenen Substanzen größtenteils um Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen (NPN) handelt, da der Gehalt an Amino-Stickstoff im Rückstand je nach Matrix nur noch $4,0\text{--}6,6\%$ betrug. Die verwendete Süßkartoffel verfügt über höhere Gehalt an NPN, wobei ein Großteil Aminosäuren ausmachen, jedoch auch wasserunlösliche Verbindungen, wie einige Amide, enthalten sind (Kays und Kays, 1998; Ekanayake und Collins, 2004). Der Aufschluss wurde daher unverändert verwendet.

Matrix Fruchtkörper

Wie aus Abbildung 84 und Abbildung 85 hervorgeht, wurden mit beiden Methoden vergleichbare Chitin-Gehalt erzielt und die Messwerte korrelierten gut mit den theoretisch berechneten Chitin-Gehalten der Mischungen.

Mit der photometrischen Methode wurden für die Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* mit $3,6\%$ in der TM höhere Gehalte als mit der Fibretherm-Methode mit $3,0\%$ in der TM erzielt. In der Literatur sind für Fruchtkörper von *P. ostreatus* Chitin-Gehalte von $2,9\text{--}3,3\%$ der TM für den Hut und $2,1\text{--}2,4\%$ der TM für den Stiel angegeben (Vetter und Siller, 1991; Vetter, 2007).

In Bezug auf den hier untersuchten gesamten Fruchtkörper ergibt sich ein Mittelwert von 2,7% der TM. Tshinyangu und Hennebert (1996) untersuchten die Chitingehalte verschiedener Stämme von *P. ostreatus* mittels der photometrischen Methode nach Smith und Gilkerson und ermittelten Gehalte von 3,6% für den gesamten Fruchtkörper. Die hier mit beiden Methoden analysierten Ergebnisse passen gut zu den in der Literatur beschriebenen Gehalten. Abweichungen zwischen der photometrischen Methode und der Fibretherm-Methode können möglicherweise auf das Messprinzip der photometrischen Methode zurückgeführt werden. Die Farbreaktion der photometrischen Methode beruht auf der Reaktion von 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon (MBTH) mit 2,5-Anhydrohexosen (Tsuji *et al.*, 1969b). Tsuji *et al.* (1969a) stellten jedoch auch bei der Reaktion von MBTH mit Aminosäuren, wie L-Tryptophan, L-Threonin und L-Methionin, die Bildung eines Farbkomplexes fest. Matrixeffekte und unerwünschte Nebenreaktionen können so zu einer möglichen Überbestimmung des Chitin-Gehaltes bei der photometrischen Methode geführt haben.

Abbildung 86 zeigt, dass die aus den Chitin-Gehalten berechneten Pilzgehalte gut mit den eingestellten Pilzgehalten übereinstimmen. Für die Fibretherm-Methode wurde eine Überbestimmung bei niedrigen Pilzgehalten von 0-20% Pilz festgestellt. Dies kann aus Ungenauigkeiten bei der Stickstoffbestimmung resultieren. Hier wird im letzten Schritt gebildetes Ammoniumtriborat mit Säure titriert. Da das verbrauchte Säurevolumen bei den geringen Stickstoffgehalten nur knapp über dem Blindwert lag, sind diese Werte stärker fehlerbehaftet. Zudem kann, wie in Tabelle 68 gezeigt, nicht ausgeschlossen werden, dass weitere stickstoffhaltige Verbindungen beim Aufschluss nicht vollständig entfernt und miterfasst wurden.

Zur Überprüfung der Chitin-Gehalte beider Methoden wurde zusätzlich noch der Gehalt an Aminosäurestickstoff in den Mischproben ermittelt, mit dem jeweiligen Chitin-Stickstoff addiert und dem mittels Kjeldahl analysiertem Gesamtstickstoffgehalt gegenübergestellt. Abbildung 87 zeigt, dass mit steigendem Pilzgehalt die Differenzen zwischen Gesamtstickstoff und Amino-/Chitin-Stickstoff anstiegen, was auf größere Gehalte an Nicht-Protein-Stickstoff in den Fruchtkörpern hindeutet. Eine direkte Überprüfung der beiden Chitin-Methoden war somit hier nicht möglich. Da die Methode nach Kjeldahl keine anorganischen Stickstoff-Verbindungen erfasst, wurden die Fruchtkörper auf die organische Verbindung Harnstoff untersucht. In der Literatur ist beschrieben, dass Fruchtkörper Harnstoff bilden und zum Teil akkumulieren können (Kurkela, 1980; Wagemaker *et al.*, 2005). Auch für die Gattung *Pleurotus* wurde eine Harnstoff-Akkumulation nachgewiesen, was bedeutet dass der Harnstoff-Gehalt >0,33% in der TM betrug (Kurkela, 1980). Der Harnstoffgehalt in jungen Fruchtkörpern von *Agaricus bisporus* wurde mit 2,6% der TM des Fruchtkörpers bestimmt (Kurkela, 1980). Für *P. ostreatus* wurde hier ein Gehalt von 1,7% ermittelt, was in der gleichen Größenordnung liegt. Nach Addition des Harnstoff-Stickstoffs zu dem Chitin-Stickstoff wurde, wie Abbildung 88 und Abbildung 89 zeigen, ein Großteil des Nicht-Protein-Stickstoffs erfasst.

Matrix Mycel

Auch für das Mycel von *L. squarrosulus* wurden die Chitin-Gehalte mittels photometrischer und halbautomatisierter Methode ermittelt. Wie Abbildung 90 zeigt, passten die photometrisch ermittelten Gehalte gut zu den theoretisch berechneten Gehalten. Auch die mittels Fibretherm analysierten Gehalte (Abbildung 91) stimmten ab einem Pilzgehalt > 20% gut mit den berechneten Werten überein. Darunter trat, wie bereits bei den Fruchtkörpern, eine Überbestimmung des Chitin-Gehaltes auf. Dies geht auch aus Abbildung 92 hervor.

Anders als bei den Fruchtkörper-Mischungen stimmten bei der Analyse des Mycels die Chitin-Gehalte beider Methoden für das reine Mycel mit $4,83 \pm 0,09\%$ (photometrisch) und $4,67 \pm 0,03\%$ (Fibretherm) in der TM sehr gut überein. In der Literatur ist noch kein Chitin-Gehalt des submers kultivierten Mycels von *L. squarrosulus* beschrieben. Für *Lentinus sajor-caju* ist ein Chitin-Gehalt von 5,5% für das submers kultivierte Mycel beschrieben (Cheung, 1996). Dieser Wert liegt leicht über dem hier analysierten Wert. Unter Berücksichtigung der anderen Spezies, sowie der Tatsache, dass der Chitingehalt unter anderem auch vom Wachstumsstadium abhängt, passen die hier ermittelten Werte gut zu den Literaturdaten (Di Lena *et al.*, 1994).

Zu den Mischungen mit bekannten Gehalten wurden auch Realproben mit einem unbekanntem Pilzanteil gemessen. Hier handelte es sich um im Bioreaktor kultiviertes Mycel von *L. squarrosulus* in Rübenschnitzel-Melasse-Medium. Wie Abbildung 93 zeigt, wurden hier mit der Fibretherm-Methode an beiden Standorten sowie mit der photometrischen Methode übereinstimmende Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede erzielt (one-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $p < 0,05$). Dies bestätigt die vorherigen Beobachtungen und, dass die Fibretherm-Methode für die Analyse des Pilzgehaltes in Bioreaktor-Proben geeignet ist.

AUSBLICK

Mit Blick auf eine wachsende Weltbevölkerung wird die Ernährung der Menschen zu einer immer größeren Herausforderung. Ein Vermeiden von Abfall sowie eine möglichst effiziente und vollständige Verwertung der zur Lebensmittelproduktion angebauten Pflanzen können die Ernährungssituation verbessern. Im Laufe dieser Arbeit wurden Fermentationsprozesse entwickelt, welche es ermöglichen, einen großen Teil der in der Zuckerindustrie anfallenden Nebenströme als Substrate einzusetzen und so einer höheren Wertschöpfung zuzuführen. Hier können zukünftige weitere Substrate der Zuckerindustrie sowie Substratkombinationen, bspw. Melasse in Kombination mit silierten Rübenschnitzeln, getestet und optimiert werden. Zudem können die Bioreaktor-Kultivierungen bezüglich Rührerdrehzahl und -geometrie sowie Begasungsrate weiter optimiert werden, um den Prozess möglichst reproduzierbar, effizient und energiesparend zu gestalten. Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung und den Bau von Pilotanlagen ist auch ein weiteres Upscaling bis im Maßstab von 1.000-10.000 Litern erforderlich. Hier müssen dann, bezogen auf die technischen Voraussetzungen der Reaktoren, weitere Optimierungen betrieben werden. Diese betreffen beispielsweise die Geometrie der Reaktoren, die Begasungsart und -rate sowie Rührergeometrie und -geschwindigkeit.

Auch sollte für die industrielle Anwendung eine schnelle und zuverlässige Methode zur Quantifizierung des Pilzgehaltes und somit zur Beurteilung des Fermentationsbatches vorliegen. Hierzu können die in dieser Arbeit betrachteten bzw. entwickelten Verfahren verwendet werden. Für eine zuverlässigere und breitere Anwendung sollten mit der qPCR-Methode weitere Realproben in verschiedenen Wachstumsstadien gemessen und mit den Ergebnissen aus Chitin- und Ergosterolbestimmung verglichen werden. Zudem können für die halbautomatisierte Chitin-Bestimmung weitere Pilze und Pilz-Substratkonzentrationen gemessen und validiert werden, um eine breite Anwendung über dieses Projekt hinaus zu ermöglichen.

Da das im Bioreaktor kultivierte Mycel der Spezies *Lentinus squarrosulus* unter die Novel Food Verordnung (VO (EU) 2015/2283) fällt, muss vor der Vermarktung des Produktes zunächst eine Zulassung als Novel Food erfolgen. Für die Zulassung muss ein Antrag bei der Europäischen Kommission gestellt werden, welcher neben administrativen auch wissenschaftliche Daten enthalten muss (Europäische Kommission, 2017b). Diese sollen die Sicherheit des Lebensmittels nachweisen und umfassen neben Informationen zur chemischen Zusammensetzung und einem Nachweis der Erzeugung reproduzierbarer Chargen unter anderem auch Ergebnisse von toxikologischen Studien (Turck *et al.*, 2024). Da bislang nicht ausreichend Daten zur Toxikologie des Mycels vorliegen, müssen diese Tests noch beauftragt und durchgeführt werden. Auch muss die Reproduzierbarkeit der Fermentation im großen Maßstab nach erfolgreicher Etablierung sichergestellt und nachgewiesen werden.

Bei der sensorischen Evaluation des ersten Prototyps wurde deutlich, dass vor allem bei Mundgefühl und Textur noch Verbesserungsbedarf besteht. Hier müssen somit weitere Chargen mit veränderten Texturen hergestellt werden. Zudem wäre es für die Produktentwicklung relevant, die Öl- und Wasserbindekapazitäten des Mycels zu bestimmen und gegebenenfalls durch Verarbeitungsschritte, wie Zerkleinerung, zu optimieren. Bisher wurde zudem nur ein hybrides Produkt hergestellt, welches neben Mycel auch Fleisch enthielt. Hier wäre das Ziel, vollständig auf die Zutat Fleisch verzichten zu können, was ebenfalls weitere Entwicklungsarbeit im lebensmitteltechnologischen Bereich erfordert. Ebenfalls ist für die spätere Vermarktung und industrielle Verarbeitung die Haltbarkeit des Produktes von Relevanz. Hier sollten Lagerungsversuche des Mycels und des Endproduktes durchgeführt werden, um geeignete Lagerungsbedingungen und Haltbarkeitsdaten festlegen zu können.

FAZIT

Im Rahmen der Arbeit wurden geeignete Spezies identifiziert, welche verschiedene Nebenströme der Zuckerindustrie, wie Rübenschnitzel, schnell metabolisierten und dabei keine negativen Geruchseindrücke aufwiesen. Vor allem *Lentinus squarrosulus*, welcher auch auf weiteren Nebenströmen der Zuckerindustrie ein schnelles Wachstum zeigte, erwies sich als besonders geeignet.

Ein erstes Upscaling im Bioreaktor bis zu einem Maßstab von 20 Litern Kulturvolumen zeigte bereits die Skalierbarkeit des Prozesses und war der erste Schritt zu einer Vergrößerung im (vor-)industriellen Maßstab. Das Mycel stellt zudem durch eine hohe biologische Wertigkeit und einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren einen ernährungsphysiologisch wertvollen Rohstoff für die weitere Verarbeitung zu Fleischersatzprodukten dar.

Ein erster Prototyp mit einem Mycel-Anteil von 20% überzeugte bereits bei Geruch und Geschmack und wurde von Probanden nur geringfügig schlechter bewertet als das sich im Handel befindliche Vergleichsprodukt ohne Mycel. Ein größeres Verbesserungspotenzial wurde lediglich bei Mundgefühl und Textur beobachtet.

Zudem wurde in dieser Arbeit eine alternative und im Vergleich zur aktuellen photometrischen Methode deutlich schnellere Möglichkeit der Chitin-Bestimmung betrachtet und die Funktionalität für Mycel von *Lentinus squarrosulus* sowie Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* gezeigt. Eine entwickelte qPCR-Methode wies Pilzgehalte bis 80% zuverlässig nach und wurde erfolgreich auf erste Realproben angewendet.

LITERATURVERZEICHNIS

- A. Harper (1981). Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements: Amino acid scoring patterns. Rom.
- Adams, P. S. (2007) Data analysis and reporting. I *Real-time PCR* (pp. 65–88): Taylor & Francis.
- Adebayo, E. A; Martínez-Carrera, D. (2015) Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *Afr. J. Biotechnol.* **14**, 52–67.
- Agudelo-Escobar, L. M; Gutiérrez-López, Y; Urrego-Restrepo, S. (2017) Effects of aeration, agitation and pH on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide from the filamentous fungus *Ganoderma lucidum*. *DYNA* **84**, 72–79.
- Aguiar, M. M., *et al.* (2023) Vinasse bio-valorization for enhancement of *Pleurotus* biomass productivity: chemical characterization and carbohydrate analysis. *Biomass Conv. Bioref.* **13**, 10031–10040.
- Aguiar-Miranda, E. D; López, M. G; Escamilla-Santana, C; La Barba de Rosa, A. P. (2002) Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor* larvae. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 192–195.
- 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.
- Ahmad, M; Qureshi, S; Akbar, M. H; Siddiqui, S. A; Gani, A; Mushtaq, M; Hassan, I; Dhull, S. B. (2022) Plant-based meat alternatives: Compositional analysis, current development and challenges. *Applied Food Research* **2**, 100154.
- Akkaya, M. R. (2018) Prediction of fatty acid composition of sunflower seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of food science and technology* **55**, 2318–2325.
- Ander, P. (1994) The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CbO as related to lignin and cellulose degradation - a review. *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 297–311.
- Andlar, M; Rezić, T; Marđetko, N; Kracher, D; Ludwig, R; Šantek, B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in life sciences* **18**, 768–778.
- Anike, F. N; Isikhuemhen, O. S; Blum, D; Neda, H. (2015) Nutrient Requirements and Fermentation Conditions for Mycelia and Crude Exo-Polysaccharides Production by *Lentinus squarrosulus*. *ABB* **06**, 526–536.
- Anwar, D; El-Chaghaby, G. (2019) Nutritional quality, amino acid profiles, protein digestibility corrected amino acid scores and antioxidant properties of fried tofu and seitan, 176–190.
- Applied Biosystems (2005). *Power SYBR® Green PCR Master Mix: Performing Real-Time PCR Assays: Quick Reference Card*. USA.

- Aragon, C. C; Ferreira-Dias, S; Lucca Gattás, E. A. de; Freitas Sanches Peres, M. de (2008) Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **52-53**, 113–120.
- Araújo Conceição, T. de; Koblitz, M. G. B; Kamida, H. M; Góes-Neto, A. (2017) Study of the Production of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. Lignolytic Enzymes Grown on Agro-Industrial Waste. *ABB* **08**, 259–272.
- Arce, O. N; Alagón Huallpa, G; Ródenas, L; Martínez-Paredes, E; Moya, V; Pascual, J; Cervera, C. (2019) Effect of the harvest season on the chemical characteristics of the sugar beet pulp (*Beta vulgaris*) granulated. Technical note **53**, 51–57.
- Asonibare, A. O; Olasupo, O. O; Osunlaja, O. A; Oladipo, A. D; Olaoti-Laaro, S. O; Abdazeez, A. O. (2023) Effects of mineral composition of different wood wastes in Ibadan on proximate composition of *Lentinus Squarrosulus* (Mont.). *jasem* **27**, 1413–1416.
- Asuraphong, N; Leepasert, T; Taengphan, W; Teerapatsakul, C. (2025) Efficiency of Mycelial Biomass and Bioactive Compound Production by *Lentinus squarrosulus* Mycelia Grown in an Airlift Bioreactor as a New Source of Cosmeceutical Biological Substances. *Trends Sci* **22**, 9717.
- Ayieko, M. A; Oriaro, V. (2008) Consumption, indigeneous knowledge and cultural values of the lakefly species within the Lake Victoria region. *African Journal of Environmental Science and Technology* **2**, 282–286.
- Bari, E; Nazarnezhad, N; Kazemi, S. M; Tajick Ghanbary, M. A; Mohebbi, B; Schmidt, O; Clausen, C. A. (2015) Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. *International Biodeterioration & Biodegradation* **104**, 231–237.
- Baryga, A; Ziobro, R; Gumul, D; Rosicka-Kaczmarek, J; Miśkiewicz, K. (2023) Physicochemical Properties and Evaluation of Antioxidant Potential of Sugar Beet Pulp—Preliminary Analysis for Further Use (Future Prospects). *Agriculture* **13**, 1039.
- Basselet, P; Wegrzyn, G; Enfors, S.-O; Gabig-Ciminska, M. (2008) Sample processing for DNA chip array-based analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Microbial cell factories* **7**, 29.
- Bayrak, M; Midilli, A; Nurveren, K. (2003) Energy and exergy analyses of sugar production stages. *Int. J. Energy Res.* **27**, 989–1001.
- Bednářová, M; Borkovcová, M; Komprda, T. (2014) Purine derivate content and amino acid profile in larval stages of three edible insects. *Journal of the science of food and agriculture* **94**, 71–76.
- Bell, S. J; Bistran, B. R; Ainsley, B. M; Manji, N; Lewis, E. J; Joyce, C; Blackburn, G. L. (1991) A chemical score to evaluate the protein quality of commercial parenteral and enteral formulas: Emphasis on formulas for patients with liver failure. *Journal of the American Dietetic Association* **91**, 586–589.

- Bender, A. E. (1960) Correlation of amino acid composition with nutritive value of proteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **5**, 1–5.
- Benjaphokee, S., *et al.* (2012) Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New biotechnology* **29**, 379–386.
- Bentley, A. (2024) Food that Acts Like Other Food. 67-79 Pages / The International Journal of Sociology of Agriculture and Food, Vol. 30 No. 2 (2024).
- Berger, R. G; Bordewick, S; Krahe, N.-K; Ersoy, F. (2022) Mycelium vs. Fruiting Bodies of Edible Fungi-A Comparison of Metabolites. *Microorganisms* **10**.
- Berger, R. G; Ersoy, F. (2022) Improved Foods Using Enzymes from Basidiomycetes. *Processes* **10**.
- Berger, R. G; Zorn, H. (2004) Flavors and Fragrances. In J. S. Tkacz, & L. Lange (Eds.), *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine* (pp. 341–358). Boston, MA: Springer US.
- Berovic, M; Habijanac, J; Zore, I; Wraber, B; Hodzar, D; Boh, B; Pohleven, F. (2003) Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of biotechnology* **103**, 77–86.
- Bhatta, S; Stevanovic, T; Ratti, C. (2020) Freeze-drying of maple syrup: Efficient protocol formulation and evaluation of powder physicochemical properties. *Drying Technology* **38**, 1138–1150.
- Bickel Haase, T; Klis, V; Hammer, A. K; Pinto Lopez, C; Verheyen, C; Naumann-Gola, S; Zorn, H. (2024) Fermentation of cocoa pod husks with *Pleurotus salmoneo-stramineus* for food applications. *Food science & nutrition* **12**, 2551–2566.
- Bosse, A. K; Fraatz, M. A; Zorn, H. (2013) Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food chemistry* **141**, 2952–2959.
- Bowman, S. M; Free, S. J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**, 799–808.
- Brahmachari, G., Demain, A. L., & Adrio, J. L. (Eds.) (2017). *Biotechnology of microbial enzymes: Chapter 5 - Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology: Production, biocatalysis and industrial applications*. Amsterdam, Boston, Heidelberg: Academic Press an imprint of Elsevier.
- Brøkner, C; Bach Knudsen, K. E; Karaman, I; Eybye, K. L; Tauson, A. H. (2012) Chemical and physicochemical characterisation of various horse feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* **177**, 86–97.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2020). *Bericht zur Markt- und Versorgungslage Zucker 2020*. Bonn.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2024). *Bericht zur Markt- und Versorgungslage Zucker 2024*. Bonn.

- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2025). *Bericht zur Markt- und Versorgungslage mit Fleisch 2025*. Bonn.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2024). *Deutschland, wie es isst: Der BMEL-Ernährungsreport 2024*. Berlin.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Referat „Statistik, Planungsgrundlagen, Wissensmanagement“ (2025). *Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland 2024*.
- Bürger, F; Koch, M; Fraatz, M. A; Omarini, A. B; Berger, R. G; Zorn, H. (2022) Production of an Anise- and Woodruff-like aroma by monokaryotic Strains of *Pleurotus sapidus* grown on citrus side streams. *Molecules (Basel, Switzerland)* **27**.
- Cai, Y; Gong, Y; Liu, W; Hu, Y; Chen, L; Yan, L; Zhou, Y; Bian, Y. (2017) Comparative secretomic analysis of lignocellulose degradation by *Lentinula edodes* grown on microcrystalline cellulose, lignosulfonate and glucose. *Journal of proteomics* **163**, 92–101.
- Caparros Megido, R; Gierts, C; Blecker, C; Brostaux, Y; Haubruge, É; Alabi, T; Francis, F. (2016) Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food Quality and Preference* **52**, 237–243.
- Cerrone, F; Lochlainn, C. Ó; Callaghan, T; McDonald, P; O'Connor, K. E. (2024) Airlift bioreactor-based strategies for prolonged semi-continuous cultivation of edible Agaricomycetes. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **108**, 377.
- Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. (Eds.) (1994). *Carbohydrate analysis: A practical approach*. (2. ed.). The practical approach series, 143. Oxford: IRL Press at Oxford Univ. Press.
- 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 chemistry* **467**, 142323.
- Cheung, P. C.-K. (1996) Dietary Fiber Content and Composition of Some Cultivated Edible Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 468–471.
- Chiang, J. H; Tay, W; Ong, D. S. M; Liebl, D; Ng, C. P; Henry, C. J. (2021) Physicochemical, textural and structural characteristics of wheat gluten-soy protein composited meat analogues prepared with the mechanical elongation method. *Food Structure* **28**, 100183.
- Colla, I. M., et al. (2023) Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitus*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **20**, 3941–3952.
- Collins, P. J; Dobson, A. (1997) Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and environmental microbiology* **63**, 3444–3450.
- (2023a) commission implementing regulation (EU) 2023/6 of 3 January 2023 authorising the placing on the market of pea and rice protein fermented by *Lentinula edodes* (Shiitake mushroom) mycelia as a novel food and amending Implementing Regulation (EU) 2017/2470. In *Official Journal of the European Union*.

- Conlon, B. H; Schmidt, S; Poulsen, M; Shik, J. Z. (2022) Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi. *STAR protocols* **3**, 101126.
- Corner, E. J. H. (1981). *The agaric genera Lentinus, Panus, and Pleurotus: With particular reference to Malaysian species*. Nova Hedwigia Beiheft, 69. Vaduz: Cramer.
- Cürten, C; Spieß, A. C. (2018) Enzyme zum Abbau von Biomasse. In K.-E. Jaeger, A. Liese, & C. Syldatk (Eds.), *Einführung in die Enzymtechnologie* (pp. 265–282). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dashtban, M; Schraft, H; Syed, T. A; Qin, W. (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology* **1**, 36–50.
- Dávila G, L. R; Murillo A, W; Zambrano F, C. J; Suárez M, H; Méndez A, J. J. (2020) Evaluation of nutritional values of wild mushrooms and spent substrate of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. *Heliyon* **6**, e03502.
- Deutsche Melasse Handelsgesellschaft mbH (2015). Vinasse (Product code DMH-ES2SG). Hamburg.
- Deutsche Melasse Handelsgesellschaft mbH Agrar (2014). Vinasse (Product code LQS D2N). Hamburg.
- Dhiman, S; Kaur, P; Narang, J; Mukherjee, G; Thakur, B; Kaur, S; Tripathi, M. (2024) Fungal bioprocessing for circular bioeconomy: Exploring lignocellulosic waste valorization. *Mycology* **15**, 538–563.
- Di Lena, G; D'Annibale, A; Sermanni, G. G. (1994) Influence of the age and growth conditions on the mycelial chitin content of *Lentinus edodes*. *J. Basic Microbiol.* **34**, 11–16.
- Dinand, E; Chanzy, H; Vignon, R. M. (1999) Suspensions of cellulose microfibrils from sugar beet pulp. *Food Hydrocolloids* **13**, 275–283.
- DLG e.V. (Ed.) (1997). *DLG-Futterwerttabellen - Wiederkäuer*. (7., erw. und überarb. Aufl.). Frankfurt am Main: DLG-Verl.
- Dörfelt, H; Ruske, E; Kästner, A. (2022) Pilzstrukturen und ihre Funktion. In H. Dörfelt, E. Ruske, & A. Kästner (Eds.), *Die Welt der Pilze* (pp. 15–47). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dritsa, V; Rigas, F; Natsis, K; Marchant, R. (2007) Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. *Bioresource technology* **98**, 1741–1747.
- D'Souza, T. M; Merritt, C. S; Reddy, C. A. (1999) Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental microbiology* **65**, 5307–5313.
- Dubost, N. J; Beelman, R. B; Peterson, D; Royse, D. J. (2006) Identification and Quantification of Ergothioneine in Cultivated Mushrooms by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy. *Int J Med Mushr* **8**, 215–222.

- Dulay, R. M. R; Cabrera, E. C; Kalaw, S. P; Reyes, R. G. (2021) Optimization of submerged culture conditions for mycelial biomass production of fourteen *Lentinus* isolates from Luzon Island, Philippines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **38**, 102226.
- Dulay, R. M. R; Cabrera, E. C; Kalaw, S. P; Reyes, R. G; Hou, C. T. (2020) Nutritional requirements for mycelial growth of three *Lentinus* species from the Philippines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **23**, 101506.
- Dunmire, K. M., *et al.* (2024) Effect of the pelleting process on diet formulations with varying levels of crystalline amino acids and reducing sugars on digestibility in growing pigs. *Journal of animal science* **102**.
- Dupont, S; Lemetais, G; Ferreira, T; Cayot, P; Gervais, P; Beney, L. (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution; international journal of organic evolution* **66**, 2961–2968.
- Ekanayake, I. J; Collins, W. (2004) Effect of irrigation on sweet potato root carbohydrates and nitrogenous compounds. *Journal of Food Agriculture and Environment* **2**, 243–248.
- Ekblad, A. L; Wallander, H; Näsholm, T. (1998) Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist* **138**, 143–149.
- Elisashvili, V. (2012) Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *Int J Med Mushr* **14**, 211–239.
- Elisashvili, V; Penninckx, M; Kachlishvili, E; Asatiani, M; Kvesitadze, G. (2006) Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 998–1004.
- Elisashvili, V; Penninckx, M; Kachlishvili, E; Tsiklauri, N; Metreveli, E; Kharziani, T; Kvesitadze, G. (2008) *Lentinus edodes* and *Pleurotus species* lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource technology* **99**, 457–462.
- Elmadfa, I., & Leitzmann, C. (2019). *Ernährung des Menschen*. (6., überarbeitete und aktualisierte Auflage). utb Ernährungswissenschaften, Ökotrophologie, Diätetik/Diätologie, 8036. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- El-Zalaki, M. (1979) Properties of *Lentinus edodes* amylases and amino acid content of the mycelium. *Food chemistry* **4**, 293–302.
- Entry, J. A; Donnelly, P; Cromack, K. (1993) Effect of nitrogen and carbon sources on lignin and cellulose degradation by *Armillaria ostoyae*. *European Journal of Forest Pathology* **23**, 129–137.
- Erbersdobler, H. F; Barth, C. A; Jahreis, G. (2017) Legumes in human nutrition: Nutrient content and protein quality of pulses. *Ernährungs Umschau* **64**, 134–139.
- Erbiai, E. H; Da Silva, L. P; Saidi, R; Lamrani, Z; Da Esteves Silva, J. C. G; Maouni, A. (2021) Chemical Composition, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Two Wild Edible

- Mushrooms *Armillaria mellea* and *Macrolepiota procera* from Two Countries (Morocco and Portugal). *Biomolecules* **11**.
- Erlich, H. A. (1989) Polymerase chain reaction. *Journal of clinical immunology* **9**, 437–447.
- España-Gamboa, E; Mijangos-Cortes, J; Barahona-Perez, L; Dominguez-Maldonado, J; Hernández-Zarate, G; Alzate-Gaviria, L. (2011) Vinasses: characterization and treatments. *Waste management & research the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA* **29**, 1235–1250.
- Europäische Kommission (2009). *Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln: VO (EG) Nr. 152/2009*.
- Europäische Kommission (2017a). *Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 der Kommission vom 20. Dezember 2017 zur Erstellung der Unionsliste der neuartigen Lebensmittel gemäß der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel*.
- Europäische Kommission (2017b). *Durchführungsverordnung (EU) 2017/2469 der Kommission vom 20. Dezember 2017 zur Festlegung administrativer und wissenschaftlicher Anforderungen an die Anträge gemäß Artikel 10 der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel*.
- Europäische Kommission (2023b). *Insekten in Lebensmitteln: die Fakten*.
- Europäisches Parlament und der Rat (1997). *Verordnung (EG) Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten*.
- Europäisches Parlament und der Rat (2015). *Verordnung (EU) 2015/2283 des europäischen Parlaments und des Rates vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 1852/2001 der Kommission, 2015*.
- Eurostat (2025a). *Bovine population - annual data*: Eurostat.
- Eurostat (2025b). *Pig population - annual data*: Eurostat.
- Ey, J; Schömig, E; Taubert, D. (2007) Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6466–6474.
- Fabros, J. A; Dulay, R. M; A. M. De Leon; Kalaw, S. P; Reyes, R. G. (2022) Distribution, cultivation, nutritional composition, and bioactivities of *Lentinus* (*Polyporaceae*, Basidiomycetes): A review. *CREAM* **12**, 170–219.
- Fadel, J; DePeters, E; Arosemena, A. (2000) Composition and digestibility of beet pulp with and without molasses and dried using three methods. *Animal Feed Science and Technology* **85**, 121–129.

- Fang, Q.-H; Zhong, J.-J. (2002) Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* **37**, 769–774.
- FAO (2010). *Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an Expert Consultation ; 10 - 14 November 2008, Geneva*. FAO food and nutrition paper, 91. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fasidi, I. O; Olorunmaiye, K. S. (1994) Studies on the requirements for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian mushroom. *Food chemistry* **50**, 397–401.
- Feng, Y.-L; Li, W.-Q; Wu, X.-Q; Cheng, J.-W; Ma, S.-Y. (2010) Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* **49**, 104–112.
- Ferreira, L. F; Aguiar, M; Pompeu, G; Messias, T. G; Monteiro, R. R. (2010) Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 1613–1621.
- Fidanova, M; Pénev, P. (1988) Possibilities of biosynthesis of substantial proteins of fungal mycelium by using fermentation residues (vinasse). In (pp. 557–567). Budapest: Akadémiai Kiadó.
- Figueiredo, F. L. de, *et al.* (2021) Multi-omics analysis provides insights into lignocellulosic biomass degradation by *Laetiporus sulphureus* ATCC 52600. *Biotechnology for biofuels* **14**, 96.
- Finke, M. D; DeFoliart, G. R; Benevenga, N. J. (1989) Use of a four-parameter logistic model to evaluate the quality of the protein from three insect species when fed to rats. *The Journal of nutrition* **119**, 864–871.
- Finnigan, T; Needham, L; Abbott, C. (2017) Mycoprotein: A healthy new protein with a low environmental impact. In *Sustainable Protein Sources* (pp. 305–325): Elsevier.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013). *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. FAO forestry paper, 171. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fredlund, E; Gidlund, A; Olsen, M; Börjesson, T; Spliid, N. H. H; Simonsson, M. (2008) Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of microbiological methods* **73**, 33–40.
- Furst McNess Company (2021). *Commodity nutrient profile - beet pulp pellets*. Freeport, USA.
- Gallois, A; Gross, B; Langlois, D; Spinnler, H.-E; Brunerie, P. (1990) Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic Basidiomycetes. *Mycological Research* **94**, 494–504.
- Gänzle, M. (2004). *Hefeextrakte*: Thieme Gruppe.

- Gaskell, J; Blanchette, R. A; Stewart, P. E; BonDurant, S. S; Adams, M; Sabat, G; Kersten, P; Cullen, D. (2016) Transcriptome and Secretome Analyses of the Wood Decay Fungus *Wolfiporia cocos* Support Alternative Mechanisms of Lignocellulose Conversion. *Applied and environmental microbiology* **82**, 3979–3987.
- Ghosh, N; Dhepe, P. L. (2021) HPLC method development for chitin and chitosan valorisation chemistry. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2**, 100139.
- Gibis, M. (2023) Plant Based Food: Alternativprodukte auf dem DLG-Prüfstand. *DLG-Lebensmittel*.
- Gisy, J. (2023) Insektenprodukte: Kreuzreaktionen bei Krebs- und Weichtierallergien. *hautnah dermatologie* **39**, 12–13.
- Goncharenko, K. V; Vit, A; Blankenfeldt, W; Seebeck, F. P. (2015) Structure of the sulfoxide synthase EgtB from the ergothioneine biosynthetic pathway. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **54**, 2821–2824.
- Goodell, B; Qian, Y; Jellison, J. (2008) Fungal Decay of Wood: Soft Rot—Brown Rot—White Rot. In T. P. Schultz, H. Militz, M. H. Freeman, B. Goodell, & D. D. Nicholas (Eds.), *Development of Commercial Wood Preservatives* (pp. 9–31). Washington, DC: American Chemical Society.
- Guillén, F; Martínez, A. T; Martínez, M. J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European journal of biochemistry* **209**, 603–611.
- Gutiérrez, A; Caramelo, L; Prieto, A; Martínez, M. J; Martínez, A. T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and environmental microbiology* **60**, 1783–1788.
- Habeeb, A. A; Gad, A. E; El-Tarabany, A. A; Mustafa, M. M; Atta, M. (2017) Using of sugar beet pulp by-product in farm animals feeding. *Int. J. Sci. Res. Sci. Technol* **3**, 107–120.
- Hadar, Y; Kerem, Z; Gorodecki, B; Ardon, O. (1992) Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom, *Pleurotus*. *Biodegradation* **3**, 189–205.
- Hammel, K. E. (1997) Fungal degradation of lignin. In *Driven by nature: plant litter quality and decomposition* (pp. 33–45).
- Happel, K; Zeller, L; Hammer, A. K; Zorn, H. (2025) Umami enhancing properties of enzymatically hydrolyzed mycelium of *Flammulina velutipes* cultured on potato pulp. *Food science & nutrition* **13**, e70128.
- Harirchi, S; Etemadifar, Z; Yazdian, F; Taherzadeh, M. J. (2020) Efficacy of polyextremophilic *Aeribacillus pallidus* on bioprocessing of beet vinasse derived from ethanol industries. *Bioresource technology* **313**, 123662.
- Harms, A. E. (2003). *Untersuchungen zum Futterwert von expandierten Trockenschnitzeln sowie von Vinasse beim Rind*. Dissertation. Hannover.

- Harris, P. V., *et al.* (2010) Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* **49**, 3305–3316.
- Hasan Sardar, H. S; Ali, M. A; Ayyub, C. M; Rashid Ahmad, R. A. (2015) Effects of different culture media, temperature and pH levels on the growth of wild and exotic *Pleurotus species*. *2305-0284* **27**, 139–145.
- Hatakka, A. I. (1983) Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 350–357.
- Havinga, E. (1973) Vitamin D, example and challenge. *Experientia* **29**, 1181–1193.
- Heid, C. A; Stevens, J; Livak, K. J; Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome research* **6**, 986–994.
- Henderickx, H. (1963) Biological value and chemical score. *Z Ernährungswiss* **3**, 158–163.
- Heuzé, V., Thiollet, H., Tran, G., Sauvant, D., Bastianelli, D., & Lebas, F. (2019). *Sugar beet pulp, pressed or wet: Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO*.
- Hoa, H. T; Wang, C.-L. (2015) The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* **43**, 14–23.
- Hofrichter, M; Liers, C; Kinne, M; Ullrich, R. (2009) Abbau und Transformation von Lignin und Huminstoffen durch Pilze (Degradation and transformation lignin and humic substances by fungi). In (pp. 81–96).
- Hong, J.-S; Kim, M.-K; So, G.-H; Kim, Y.-H. (1990) Studies on the mycelial cultivation and the rhizomorph production of *Armillaria mellea*. *The Korean Journal of Mycology* **18**, 149–157.
- Hui, Y. H. (2012). *Handbook of Meat and Meat Processing*: CRC Press.
- Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft Poing (2023). *Gruber Tabelle zur Fütterung der Milchkühe, Zuchtrinder, Schafe, Ziegen*. (48. veränderte Auflage).
- Ishaq, M; Galappaththi, M. C. A; Khan, M. B; Ullah, S; Fiaz, M; Khalid, A. N. (2022) *Lentinus squarrosulus* an edible macro-fungus reported from Pakistan. *S* **7**, 1–3.
- Isikhuemhen, O. S; Mikiashvili, N. A; Adenipekun, C. O; Ohimain, E. I; Shahbazi, G. (2012) The tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont.: lignocellulolytic enzymes activities and sugar release from cornstalks under solid state fermentation. *World journal of microbiology & biotechnology* **28**, 1961–1966.
- Islam, S; Bhuiyan, M. A. R; Islam, M. N. (2017) Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J Polym Environ* **25**, 854–866.
- Jomura, M; Kuwayama, T; Soma, Y; Yamaguchi, M; Komatsu, M; Maruyama, Y. (2020) Mycelial biomass estimation and metabolic quotient of *Lentinula edodes* using species-specific qPCR. *PloS one* **15**, e0232049.

- Jonczyk, P; Takenberg, M; Hartwig, S; Beutel, S; Berger, R. G; Scheper, T. (2013) Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems. *Journal of biotechnology* **167**, 370–376.
- Jones, D. B. (1931) Factors for Converting Percentages of Nitrogen in Foods and Feeds into Percentages of Protein. *US Department of Agriculture* **183**.
- Kalaras, M. D; Richie, J. P; Calcagnotto, A; Beelman, R. B. (2017) Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food chemistry* **233**, 429–433.
- Kaur, B; Atri, N. S. (2019) Evaluation of amino acid and fatty acid profile of *Pleurotus sapidus*-an edible mushroom from India. *MR* **28**.
- Kays, S. J; Kays, S. E. (1998) Sweetpotato chemistry in relation to health. *Proceedings of the Sweet Potato Production System Towards the 21st Century*, 231–272.
- Kayser, O; Aversch, N. J. H. (2024) Sekundärstoffwechsel und wichtige biotechnische Wege. In O. Kayser, & N. J. H. Aversch (Eds.), *Technische Biochemie* (pp. 113–133). Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Kelly, S; Grimm, L. H; Bendig, C; Hempel, D. C; Krull, R. (2006) Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochemistry* **41**, 2113–2117.
- Kerem, Z; Hammel, K. E. (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS letters* **446**, 49–54.
- Khan, M. A; Jacobsen, I; Eggum, B. O. (1979) Nutritive value of some improved varieties of legumes. *Journal of the science of food and agriculture* **30**, 395–400.
- Kim, H.-I; Kwon, O.-C; Kong, W.-S; Lee, C.-S; Park, Y.-J. (2014a) Genome-wide identification and characterization of novel laccase genes in the white-rot fungus *Flammulina velutipes*. *Mycobiology* **42**, 322–330.
- Kim, S. S; Lee, J. S; Cho, J. Y; Kim, Y. E; Hong, E. K. (2010) Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* liquid culture. *Journal of bioscience and bioengineering* **109**, 351–355.
- Kim, Y.-D; Kwak, S.-H; Kim, K.-J; Seo, K.-S; Park, T.-Y; Yu, K.-Y; Jin, S.-W. (2014b) The analysis of useful components in *Flammulina velutipes* fruit body, *Flammulina velutipes* mycelium and *Cordyceps militaris* mycelium. *Journal of Mushroom* **12**, 193–200.
- Kirk, T. K; Farrell, R. L. (1987) Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin 1, 2. *Ann. Rev. Microbiol* **41**, 465–505.
- Kirner, T; Manns, B. (2024) Nachhaltige Ernährung der Zukunft – Beitrag alternativer Proteinquellen. In S. Beier, P. Hense, C. Klümper, S. Lechtenböhmer, & C. Reicher (Eds.), *Die UN-Nachhaltigkeitsziele als interdisziplinäre Herausforderung* (pp. 139–155). Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Kjeldahl, J. (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius, Zeitschrift f. anal. Chemie* **22**, 366–382.

- Klein, O; Nier, S; Tamásy, C. (2023) Nebenströme der Agrar- und Ernährungswirtschaft – vom Abfallprodukt zur wertvollen Ressource!? *Standort* **47**, 12–18.
- Kling, M; Wöhlbier, W. (1983) Futtermittel pflanzlicher Herkunft 311 Tabellen. *Handelsfuttermittel / begr. von Max Kling. Neu hrsg. von Werner Wöhlbier ... 2 A.*
- Koch, R. A; Wilson, A. W; Séné, O; Henkel, T. W; Aime, M. C. (2017) Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, Guyanagaster. *BMC evolutionary biology* **17**, 33.
- Kozhemyakina, N. V; Ananyeva, E. P; Gurina, S. V; Galynkin, V. A. (2010) Conditions of cultivation, composition, and biological activity of mycelium of *Flammulina velutipes* (Fr.) P. Karst. *Appl Biochem Microbiol* **46**, 536–539.
- Kubista, M., *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **27**, 95–125.
- Kuffel, A; Gray, A; Daeid, N. N. (2021) Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency. *International journal of legal medicine* **135**, 63–72.
- Kurek, M. A; Onopiuk, A; Pogorzelska-Nowicka, E; Szpicer, A; Zalewska, M; Półtorak, A. (2022) Novel Protein Sources for Applications in Meat-Alternative Products-Insight and Challenges. *Foods (Basel, Switzerland)* **11**.
- Kurkela, R. (1980) Non-protein nitrogen compounds in the higher fungi—A review. *Food chemistry* **5**, 109–130.
- Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (2008). *Konservierung von Pressschnitzeln – Beeinflussung der Silagequalität*. Dummerstorf.
- Latif, A; Harun, S; Sajab, M. S; Markom, M; Jahim, J. (2018) Ammonia-based pretreatment for ligno-cellulosic biomass conversion – an overview. *Journal of Engineering Science and Technology* **13**, 1595–1620.
- Lau, B. F; Abdullah, N. (2017) Bioprospecting of *Lentinus squarrosulus* Mont., an underutilized wild edible mushroom, as a potential source of functional ingredients: A review. *Trends in Food Science & Technology* **61**, 116–131.
- Leijdekkers, A. G. M; Bink, J. P. M; Geutjes, S; Schols, H. A; Gruppen, H. (2013) Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose; a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. *Bioresource technology* **128**, 518–525.
- Lindner, D. L; Banik, M. T. (2008) Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America. *Mycologia* **100**, 417–430.
- Liu, J.-Y; Men, J.-L; Chang, M.-C; Feng, C.-P; Yuan, L.-G. (2017) iTRAQ-based quantitative proteome revealed metabolic changes of *Flammulina velutipes* mycelia in response to cold stress. *Journal of proteomics* **156**, 75–84.

- Lorenzo, M; Moldes, D; Rodríguez Couto, S; Sanromán, A. (2002) Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource technology* **82**, 109–113.
- Lu, M; Chen, X; Lin, L; Luo, Y; Zhang, Y; Liu, Z; Li, L; Tang, H. (2011) Effects Analysis of Mg²⁺, dNTPs and Taq DNA Polymerase on SSR-PCR System of Pear. *Journal of Life Sciences* **5**.
- Lung, M. Y; Hsieh, C. W. (2011) Antioxidant property and production of exopolysaccharide from *Armillaria mellea* in submerged cultures: Effect of culture aeration rate. *Engineering in life sciences* **11**, 482–490.
- Lupala, A. S; Lee, Y. J; Yoo, S; Choi, J; Lim, J. M; Lee, S. B; Jung, Y. H; Lim, Y. W. (2025) Integrated Assessment of Growth and Protein Content in Basidiomycetous Fungi for Mycoprotein Production. *Journal of microbiology and biotechnology* **35**, e2510014.
- Lyr, H. (1957) Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion. *Planta* **50**, 359–370.
- Machado, A. R. G; Teixeira, M. F. S; Souza Kirsch, L. de; Da Campelo, M. C. L; Aguiar Oliveira, I. M. de (2016) Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi journal of biological sciences* **23**, 621–627.
- Machuca, A; Napoleão, D; Milagres, A. (2001) Detection of metal-chelating compounds from wood-rotting fungi *Trametes versicolor* and *Wolfiporia cocos*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 687–690.
- Malav, O. P; Talukder, S; Gokulakrishnan, P; Chand, S. (2015) Meat analog: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* **55**, 1241–1245.
- Malhotra, M; Suman, S. K. (2021) Laccase-mediated delignification and detoxification of lignocellulosic biomass: removing obstacles in energy generation. *Environmental science and pollution research international* **28**, 58929–58944.
- Marzo-Gago, C; Díaz, A. B; Blandino, A. (2023) Sugar Beet Pulp as Raw Material for the Production of Bioplastics. *Fermentation* **9**, 655.
- Mathias, T. R. d. S; Alexandre, V. M. F; Cammarota, M. C; Mello, P. P. M. de; Sérvulo, E. F. C. (2015) Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *J. Inst. Brew.* **121**, 400–404.
- Matissek, R., Fischer, M., & Steiner, G. (2018). *Lebensmittelanalytik: Kapitel 16: Aminosäuren, Peptide, Proteine, Nucleinsäuren*. S. 351-358. (6. Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Matissek, R., Steiner, G., & Fischer, M. (2010). *Lebensmittelanalytik: Kapitel 1: Allgemeine Bestimmungen in Lebensmitteln*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Mattick, C. S; Landis, A. E; Allenby, B. R; Genovese, N. J. (2015) Anticipatory Life Cycle Analysis of In Vitro Biomass Cultivation for Cultured Meat Production in the United States. *Environmental science & technology* **49**, 11941–11949.

- Max Rubner-Institut (2008). *Nationale Verzehrsstudie II: Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen*. Ergebnisbericht Teil 2.
- Meenakshi, G; Giridhar, S. (2011) Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 1131–1136.
- Meisel, K., Braune, M., Gröngröft, A., Majer, S., Müller-Langer, F., Naumann, K., & Oehmichen, K. (2015). *Technische und methodische Grundlagen der THG-Bilanzierung von Bioethanol: Handreichung*. Leipzig, Dresden: DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH; Sächsische Landesbibliothek – Staats- und Universitätsbibliothek Dresden.
- Melati, R. B; Schmatz, A. A; Pagnocca, F. C; Contiero, J; Brienzo, M. (2017) Sugarcane bagasse: Production, composition, properties, and feedstock potential. *Sugarcane: Production Systems, Uses and Economic Importance*, 1–38.
- Melville, D. B; Eich, S; Ludwig, M. L. (1957) The biosynthesis of ergothioneine. *Journal of Biological Chemistry* **224**, 871–877.
- Mercer, E. I. (1984) The biosynthesis of ergosterol. *Pesticide Science* **15**, 133–155.
- Metreveli, E; Khardziani, T; Elisashvili, V. (2021) The Carbon Source Controls the Secretion and Yield of Polysaccharide-Hydrolyzing Enzymes of Basidiomycetes. *Biomolecules* **11**.
- Meyer, V., et al. (2020) Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal biology and biotechnology* **7**, 5.
- Mille-Lindblom, C; Tranvik, L. J. (2003) Antagonism between bacteria and fungi on decomposing aquatic plant litter. *Microbial ecology* **45**, 173–182.
- Mille-Lindblom, C; Wachenfeldt, E. von; Tranvik, L. J. (2004) Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of microbiological methods* **59**, 253–262.
- Monis, P. T; Giglio, S; Saint, C. P. (2005) Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical biochemistry* **340**, 24–34.
- Nes, W. R; Sekula, B. C; Nes, W. D; Adler, J. H. (1978) The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 6218–6225.
- Neufeld, K; Pietruszka, J. (2012) Understanding Nature—Towards the Enzymatic Degradation of Cellulose with Monooxygenases. *ChemCatChem* **4**, 1239–1240.
- Niemenmaa, O; Galkin, S; Hatakka, A. (2008) Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* **62**, 125–134.
- Nitschke, J; Altenbach, H.-J; Malolepszy, T; Mölleken, H. (2011) A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate research* **346**, 1307–1310.
- Nordic Sugar A/S (2020a). *Betfor(R)*. Malmö.

- Nordic Sugar A/S (2020b). *Pulpetter(R)*.
- Nordzucker AG. *Zuckerrübertrockenschnitzel*. Braunschweig.
- Nordzucker AG (2006a). *Datenblatt für Einzelfuttermittel der Positivliste - Zuckerrübenvinasse aus der Ethanolherstellung*. Braunschweig.
- Nordzucker AG (2006b). *Datenblatt für Einzelfuttermittel der Positivliste: Anlage 2 zu Zuckerrübertrockenschnitzel / Zuckerrübenmelasseschnitzel*.
- Nordzucker AG (2008). *Datenblatt für Einzelfuttermittel der Positivliste- Zuckerrübenvinasse aus der Ethanolherstellung für Futterzwecke*. Braunschweig.
- Nordzucker AG (2022). *Von der Rübe zum Zucker: Zuckerherstellung - Schritt für Schritt*. Braunschweig.
- Nosenko, T. (2017) Comparison of biological value and technological properties of oil seed proteins. *Ukr. food j.* **6**.
- Nowak, D; Jakubczyk, E. (2020) The Freeze-Drying of Foods-The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods (Basel, Switzerland)* **9**.
- Obodai, M., et al. (2014) Evaluation of the chemical and antioxidant properties of wild and cultivated mushrooms of Ghana. *Molecules (Basel, Switzerland)* **19**, 19532–19548.
- Okumura, R; Nakamura, Y; Asada, C. (2024) Efficiency of β -glucan production by *Sparassis crispa* depends on mycelium shape. *Biomass Conv. Bioref.* **14**, 1939–1947.
- Oser, B. L. (1959) An integrated Essential Amino Acid Index for predicting the Biological Value of proteins. In *Protein and Amino Acid Nutrition* (pp. 281–295): Elsevier.
- Osono, T. (2010) Decomposition of grass leaves by ligninolytic litter-decomposing fungi. *Grassland Science* **56**, 31–36.
- Paez, C. A; Kraistudomsook, N; Smith, J. A; Loyd, A. L; Lindner, D. L; Smith, M. E. (2023) Revising the taxonomic placement of *Laetiporus persicinus* within the *Laetiporaceae*. *Mycologia* **115**, 107–121.
- Palmonari, A., et al. (2020) Short communication: Characterization of molasses chemical composition. *Journal of dairy science* **103**, 6244–6249.
- Palmquist, D. L; Jenkins, T. C. (2003) Challenges with fats and fatty acid methods. *Journal of animal science* **81**, 3250–3254.
- 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 Alimentaria* **42**, 328–337.
- Pauly, M; Gille, S; Liu, L; Mansoori, N; Souza, A. de; Schultink, A; Xiong, G. (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* **238**, 627–642.
- Pawłowska, M; Zdeb, M; Nieścioruk, M. (2023) Efficiency of Chemical Pretreatment of Sugar Beet Pulp Biomass Intended to Energy Production via Biological Processes. *Energies* **16**, 574.

- Payne, C. M; Knott, B. C; Mayes, H. B; Hansson, H; Himmel, M. E; Sandgren, M; Ståhlberg, J; Beckham, G. T. (2015) Fungal cellulases. *Chemical reviews* **115**, 1308–1448.
- Peeler, T. C; Stephenson, M. B; Einspahr, K. J; Thompson, G. A. (1989) Lipid Characterization of an Enriched Plasma Membrane Fraction of *Dunaliella salina* Grown in Media of Varying Salinity. *Plant physiology* **89**, 970–976.
- Pfeifer & Langen GmbH & Co. KG (2021). *Datenblatt für Einzelfuttermittel der QS-Liste-BETA Pur Pellets 8 mm schwach melassiert*. (2nd ed.). Köln.
- Pokhrel, C; Ohga, S. (2007) Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food chemistry* **105**, 641–646.
- Polizeli, M. L. T. M; Rizzatti, A. C. S; Monti, R; Terenzi, H. F; Jorge, J. A; Amorim, D. S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology* **67**, 577–591.
- Ponchel, F., *et al.* (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC biotechnology* **3**, 18.
- Ponchel, F. (2007) Real-time PCR using SYBR-Green. In *Real-time PCR* (pp. 167–182): Taylor & Francis.
- Post, M. J. (2012) Cultured meat from stem cells: challenges and prospects. *Meat science* **92**, 297–301.
- Post, M. J. (2014) Cultured beef: medical technology to produce food. *Journal of the science of food and agriculture* **94**, 1039–1041.
- Post, M. J., *et al.* (2020) Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nat Food* **1**, 403–415.
- Potthast, C; Brinker, S; Maier, K. (2011) Futtermittel aus der Zuckerrübenverarbeitung—neue Daten zu Inhaltsstoffen aus einer bundesweiten Erhebung. *Sugar industry* **136**, 639–669.
- Qiagen (2019). *DNeasy® Plant Pro Kit Handbook: For the isolation of genomic DNA from plant cells, tissues, and seed samples; removes polyphenolics and polysaccharides*.
- Qinnghe, C; Xiaoyu, Y; Tianguai, N; Cheng, J; Qiugang, M. (2004) The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry* **39**, 1561–1566.
- Raederstorff, D; Rohmer, M. (1987) Sterol biosynthesis via cycloartenol and other biochemical features related to photosynthetic phyla in the amoeba *Naegleria lovaniensis* and *Naegleria gruberi*. *European journal of biochemistry* **164**, 427–434.
- Ramirez, C; Patel, M; Blok, K. (2006) How much energy to process one pound of meat? A comparison of energy use and specific energy consumption in the meat industry of four European countries. *Energy* **31**, 2047–2063.
- Rapior, S; Konska, G; Guillot, J; Andary, C; Bessiere, J. (2000) Volatile composition of *Laetiporus sulphureus*. *Cryptogamie Mycologie* **21**, 67–72.

- Rau, U; Gura, E; Olszewski, E; Wagner, F. (1992) Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *Journal of Industrial Microbiology* **9**, 19–25.
- Ravichandran, A., Kolte, A., Dhali, A., Gopinath, S., & Srid, M. (2022). *Transcriptomic Analysis of the White-rot Basidiomycete Lentinus Squarrosulus to Provide Insights Into Its Lignocellulose Biodegradation Ability*.
- Reis, F. S; Barros, L; Martins, A; Ferreira, I. C. F. R. (2012) Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **50**, 191–197.
- Rhoads, A. S. (1945) A Comparative Study of Two Closely Related Root-Rot Fungi, *Clitocybe tabescens* and *Armillaria mellea*. *Mycologia* **37**, 741.
- Rinaldo, D; Mourot, J. (2001) Effects of tropical climate and season on growth, chemical composition of muscle and adipose tissue and meat quality in pigs. *Anim. Res.* **50**, 507–521.
- Robert Koch-Institut (2016). *Verbreitung der vegetarischen Ernährungsweise in Deutschland: RKI-Bib1* (Robert Koch-Institut).
- Rodrigues, F; Ludovico, P; Leão, C. (2006) Sugar Metabolism in yeasts: an Overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In G. Péter, & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 101–121). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- Roy Das, A; Borthakur, M; Saha, A. K; Joshi, S. R; Das, P. (2015) Growth of mycelial biomass and fruit body cultivation of *Lentinus squarrosulus* collected from home garden of Tripura in Northeast India. *J App Biol Biotech.*
- Royse, D. J; Sanchez-Vazquez, J. E. (2001) Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. *Bioresource technology* **76**, 229–233.
- Rühl, M; Lange, K; Kües, U. (2018) Laccase production and pellet morphology of *Coprinopsis cinerea* transformants in liquid shake flask cultures. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 7849–7863.
- Ruiz-Herrera, J; Ruiz-Medrano, R. (2004) Chitin biosynthesis in fungi. *Handbook of fungal biotechnology*, 315–330.
- Ruxton, C. H; McMillan, B. (2010) The impact of mycoprotein on blood cholesterol levels: a pilot study. *British Food Journal* **112**, 1092–1101.
- Rykowski, K. (1976) Investigation of nitrogen nutrition in different strains of *Armillaria*[*Armillariella*] *mellea* [and *Clitocybe tabescens*]. II. Influence of different concentrations of carbon and nitrogen. *European Journal of Forest Pathology* **6**, 264–274.
- Rytioja, J; Hildén, K; Yuzon, J; Hatakka, A; Vries, R. P. de; Mäkelä, M. R. (2014) Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and molecular biology reviews MMBR* **78**, 614–649.

- Saat, M. N; Annuar, M. S. M; Alias, Z; Chuan, L. T; Chisti, Y. (2014) Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioprocess and biosystems engineering* **37**, 765–775.
- Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances* **27**, 185–194.
- Sánchez, Ó. J; Montoya, S. (2020) Assessment of Polysaccharide and Biomass Production from Three White-Rot Fungi by Solid-State Fermentation Using Wood and Agro-Industrial Residues: A Kinetic Approach. *Forests* **11**, 1055.
- Saravanan, K. G., Thiribhuvanamala, G., T. P., Angappan, K., Revathy, N., & Rangasamy, A. (2024). *Exploring the morphological, molecular profiling and cultural optimization of *Lentinus squarrosulus* Mont.*
- Sartori, S. B; Ferreira, L. F. R; Messias, T. G; Souza, G; Pompeu, G. B; Monteiro, R. T. R. (2015) *Pleurotus* biomass production on vinasse and its potential use for aquaculture feed. *Mycology* **6**, 28–34.
- Schill+Seilacher "Struktol" GmbH (2023). *Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31: Struktol SB 2031*. (11th ed.). Hamburg.
- Schlosser, D; Grey, R; Fritsche, W. (1997) Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor* Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 412–418.
- Schmid, W. (1952) Zellvermehrung und Zellatmung bei Hefe. *Zeitschrift für Naturforschung B* **7**, 217–219.
- Schmidt, T. G., Schneider, F., Leverenz, D., & Hafner, G. (2019). *Lebensmittelabfälle in Deutschland - Baseline 2015*. Thünen-Report, 71. Braunschweig: Johann-Heinrich-von-Thünen-Institut.
- Schnepel, K; Hoffmann, C. M. (2016) Genotypic differences in storage losses of sugar beet – causes and indirect criteria for selection. *Plant Breeding* **135**, 130–137.
- Schoch, C. L., *et al.* (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database the journal of biological databases and curation* **2020**.
- Schoeneberger, H; Gross, R; Cremer, H. D; Elmadfa, I. (1982) Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. *The Journal of nutrition* **112**, 70–76.
- Schwarze, F. W. M. R., *et al.* (2024) Taming the production of bioluminescent wood using the white rot fungus *Desarmillaria Tabescens*. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* **11**, e2403215.
- Semba, R. D; Ramsing, R; Rahman, N; Kraemer, K; Bloem, M. W. (2021) Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security* **28**, 100520.

- Serbent, M. P; Gonçalves Timm, T; Vieira Helm, C; Benathar Ballod Tavares, L. (2023) Growth, laccase activity and role in 2,4-D degradation of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. in a liquid medium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **50**, 102682.
- Sergentani, A. G; Gonou-Zagou, Z; Kapsanaki-Gotsi, E; Hatzinikolaou, D. G. (2016) Lignocellulose degradation potential of Basidiomycota from Thrace (NE Greece). *International Biodeterioration & Biodegradation* **114**, 268–277.
- Serrano-Carreón, L; Galindo, E; Rocha-Valadéz, J. A; Holguín-Salas, A; Corkidi, G. (2015) Hydrodynamics, Fungal Physiology, and Morphology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **149**, 55–90.
- Sharma, V. P; Upadhyay, R. C; Banyal, S; Barh, A; Kamal, S. (2020) Studies on cultivation, nutrition and extracellular ligninolytic enzymes of *Flammulina velutipes* strains collected from Indian Himalayas. *MR* **29**, 37.
- Shewry, P. R. (2009) Wheat. *Journal of experimental botany* **60**, 1537–1553.
- Sidi-Yacoub, B; Oudghiri, F; Belkadi, M; Rodríguez-Barroso, R. (2019) Characterization of lignocellulosic components in exhausted sugar beet pulp waste by TG/FTIR analysis. *J Therm Anal Calorim* **138**, 1801–1809.
- Silva, R. R; Corso, C. R; Matheus, D. R. (2010) Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 841–846.
- Simeng, Z; Sacha, G; Isabelle, H.-G; Marie-Noëlle, R. (2015) A PCR-based method to quantify fungal growth during pretreatment of lignocellulosic biomass. *Journal of microbiological methods* **115**, 67–70.
- Smith, R. L; Gilkerson, E. (1979) Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Analytical biochemistry* **98**, 478–480.
- Socol, C. R; Medeiros, A. B. P; Vandenberghe, L. P. S. (2007) Flavor Compounds Produced by Fungi, Yeasts. *Handbook of Food Products Manufacturing, Volume 1: Principles, Bakery, Beverages, Cereals, Cheese, Confectionary, Fats, Fruits, and Functional Foods* **1**, 179.
- Song, C. H; Cho, K. Y; Nair, N. G. (1987) A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* **79**, 866–876.
- Song, K. J; Beckman, T; Scherm, H; Kemenova, O. G; McMurray, G. (2015) Detection of *Armillaria* Root Rot Disease by analysis of volatile organic compounds. In *2015 ASABE International Meeting: American Society of Agricultural and Biological Engineers*.
- Sośnicka, A; Kózka, B; Makarova, K; Giebułtowicz, J; Klimaszewska, M; Turło, J. (2022) Optimization of White-Rot Fungi mycelial culture components for bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants. *Water* **14**, 1374.

- Sou, H.-D; Ryoo, R; Ka, K.-H; Park, H. (2017) The mycelial growth and ligninolytic enzyme activity of cauliflower mushroom (*Sparassis latifolia*). *Forest Science and Technology* **13**, 158–163.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2016). *Food composition and nutrition tables*: 8th revised and completed edition. Stuttgart: MedPharm Scientific Publishers.
- Stemme, K; Gerdes, B; Harms, A; Kamphues, J. (2005) Beet-vinasse (condensed molasses solubles) as an ingredient in diets for cattle and pigs - nutritive value and limitations. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **89**, 179–183.
- Stephan, A; Ahlborn, J; Gao, L; Schrenk, D; Zajul, M; Zorn, H. (2020) Mycelia of *P. sapidus* and *L. edodes* as functional raw materials in a minced meat doner kebab system - toxicological evaluation and comparison to commercial proteins. *Journal of Nature Science & Sustainable Technology* **14**, 107–133.
- Stoldt, W. (1951) Fat determination in milk, milk products, butter, cheese and ice cream. *Milchwissenschaft*, 152–155.
- Stöppelmann, F; Chan, L. F; Hildebrand, G; Hermann-Ene, V; Vetter, W; Rigling, M; Zhang, Y. (2024) Molecular decoding a meat-like aroma generated from *Laetiporus sulphureus*-mediated fermentation of onion (*Allium cepa* L.). *Food research international (Ottawa, Ont.)* **192**, 114757.
- Sudwischer, P., Krüger, B., Sitzmann, W., & Hellwig, M. (2023). *Applikation Kjeldahl- A.1.5.13 Chitin in Insekten*. C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter.
- Sudwischer, P; Krüger, B; Sitzmann, W; Hellwig, M. (2025) Chitin Analysis in insect-based feed ingredients and mixed feed: Development of a cost-effective and practical method. *Journal of animal physiology and animal nutrition*.
- Südzucker AG (2011). *Datenblatt für Einzelfuttermittel der Positivliste-Rübenmelasseschnitzel*. Mannheim/Ochsenfurt.
- Südzucker AG (2014). *Datenblatt 1 Rübenmelasseschnitzel, Einzelfuttermittel*. Mannheim/Ochsenfurt.
- Sugimoto, N; Nakano, S; Yoneyama, M; Honda, K. (1996) Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic acids research* **24**, 4501–4505.
- Sukhija, P. S; Palmquist, D. L. (1988) Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 1202–1206.
- Swedish Food Agency (2022). *Consultation request for the determination of novel food status: Mycelium of Rhizopus oligosporus*.
- Tanret, C. (1909) A new base taken from rye ergot, ergothioneine. *Ann Chim Phys* **18**, 114–124.
- Tepwong, P; Giri, A; Ohshima, T. (2012) Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes*. *Mycoscience* **53**, 102–112.

- Thavamani, A; Sferra, T. J; Sankararaman, S. (2020) Meet the Meat Alternatives: The Value of Alternative Protein Sources. *Current nutrition reports* **9**, 346–355.
- Thermo Fisher Scientific Inc (2014). *Power SYBR® Green PCR Master Mix*.
- Todorov, S. K., *et al.* (2024) Using pre-fermented sugar beet pulp as a growth medium to produce *Pleurotus ostreatus* mycelium for meat alternatives. *International journal of food microbiology* **425**, 110872.
- Trapp, T; Zajul, M; Ahlborn, J; Stephan, A; Zorn, H; Fraatz, M. A. (2018) Submerged cultivation of *Pleurotus sapidus* with molasses: Aroma Dilution Analyses by means of solid phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 2393–2402.
- Tshinyangu, K. K; Hennebert, G. L. (1996) Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus var. columbinus*. *Food chemistry* **57**, 223–227.
- Tsuji, A; Kinoshita, T; Hoshino, M. (1969a) Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **17**, 1505–1510.
- Tsuji, A; Kinoshita, T; Hoshino, M. (1969b) Microdetermination of hexosamines. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **17**, 217–218.
- Turck, D., *et al.* (2022) Safety of pea and rice protein fermented by Shiitake (*Lentinula edodes*) mycelia as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA journal. European Food Safety Authority* **20**, e07205.
- Turck, D., *et al.* (2024) Guidance on the scientific requirements for an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA journal. European Food Safety Authority* **22**, e8961.
- Ugbogu, E. A; Emmanuel, O; Salem, A. Z. M; Elghandour, M. M. M. Y. (2020) Nutritional composition of *Termitomyces robustus* (*Agaricomycetes*) and *Lentinus squarrosulus* (Mont.) singer in South East Nigeria. *Agroforest Syst* **94**, 1291–1300.
- Ülger, I; Kaliber, M; Ayaşan, T; Küçük, O. (2018) Chemical composition, organic matter digestibility and energy content of apple pomace silage and its combination with corn plant, sugar beet pulp and pumpkin pulp. *SA J. An. Sci.* **48**, 497.
- Ulzijiargal, E; Mau, J.-L. (2011) Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. *Int J Med Mushr* **13**, 343–349.
- van Etten, J. L; Gottlieb, D. (1965) Biochemical changes during the growth of fungi. ii. Ergosterol and fatty acids in *penicillium atrovenetum*. *Journal of bacteriology* **89**, 409–414.
- van Nguyen, D; Duong, C. T. T; Vu, C. N. M; Nguyen, H. M; Pham, T. T; Tran-Thuy, T.-M; Nguyen, L. Q. (2023) Data on chemical composition of coffee husks and lignin microparticles as their extracted product. *Data in brief* **51**, 109781.
- Velázquez-Cedeño, M. A; Mata, G; Savoie, J.-M. (2002) Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: Changes in the production

- of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**, 201–207.
- Verein der Zuckerindustrie (2003). *Konzept zur Qualität und Produktsicherheit für Futtermittel aus der Zuckerrübenverarbeitung: Leitlinien der deutschen Zuckerindustrie*. (2. Auflage). Bonn.
- Verein der Zuckerindustrie (2012). *PressSchnitzel- Wissenswertes zu Silierung und Verfütterung*. Bonn.
- Vetter, J. (2007) Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food chemistry* **102**, 6–9.
- Vetter, J; Siller, I. (1991) Chitingehalt von höheren Pilzen. *Z Lebensm Unters Forch* **193**, 36–38.
- Vilar, D. S., *et al.* (2018) Vinasse degradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological – Electrochemical oxidation treatment. *Separation and Purification Technology* **192**, 287–296.
- Viniegra-González, G; Favela-Torres, E; Aguilar, C. N; Romero-Gomez, S. d. J; Díaz-Godínez, G; Augur, C. (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* **13**, 157–167.
- Volkenandt, M; Löhr, M; Dicker, A. P. (1990) Genamplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* **115**, 670–676.
- Vrabl, P; Schinagl, C. W; Artmann, D. J; Heiss, B; Burgstaller, W. (2019) Fungal Growth in Batch Culture - What We Could Benefit If We Start Looking Closer. *Frontiers in microbiology* **10**, 2391.
- Wagemaker, M. J. M; Welboren, W; van der Drift, C; Jetten, M. S. M; van Griensven, L. J. L. D; Op den Camp, H. J. M. (2005) The ornithine cycle enzyme arginase from *Agaricus bisporus* and its role in urea accumulation in fruit bodies. *Biochimica et biophysica acta* **1681**, 107–115.
- Wageningen Livestock Research, & Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food (2003). *CVB Feed Table 2023: Chemical composition and nutritional values of feedstuffs*.
- Wang, H. L. (1984) Tofu and tempeh as potential protein sources in the western diet. *J Americ Oil Chem Soc* **61**, 528–534.
- Wang, W.-K; Zhu, Y; Tang, Y; Lu, N; Song, J.-L; Yuan, W.-D; Jia, Y. (2016) Non-Volatile Taste Components of Different Cultivated Mushrooms at Mycelia, Primordium, and Fruit Body Cultivation Stages. *International Journal of Food Properties* **19**, 1938–1948.
- Wang, X; Seed, B. (2007) High-throughput primer and probe design. In *Real-time PCR* (pp. 121–134): Taylor & Francis.
- Wardaya, Y. S; Mumpuni, A; Ekowati, N. (2023) Utilization of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus squarrosulus* in the manufacture of mycelium-based biocomposite using sugarcane bagasse and cornstalk media. *BioEksakta: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed* **5**, 94–103.

- Watkinson, S. C; Eastwood, D. C. (2012) *Serpula lacrymans*, Wood and Buildings. *Advances in applied microbiology* **78**, 121–149.
- Weber, U. (2006). *Untersuchungen zur Silierung von Zuckerrübenpressschnitzeln in Folienschläuchen*. Zugl.: Berlin, Humboldt-Univ., Diss., 2005. Berlin: Logos-Verl.
- Weete, J. D. (1989) Structure and Function of Sterols in Fungi. In *Advances in Lipid Research* (pp. 115–167).
- Wernicke, C; Franke, P; Radke, L; Berge, S; Frohme, M. (2012) Qualitätsmanagement in der RT-qPCR. *Biospektrum* **18**, 42–45.
- Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e. V. (2021). *Jahresbericht 2020/2021*. Berlin.
- Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V. (2025). *Bilanz Rübenkampagne 2024/25: Viele Rüben mit wenig Zucker*. Berlin.
- Woodman, H. E; Calton, W. E. (1928) The composition and nutritive value of sugar beet pulp. *J. Agric. Sci.* **18**, 544–568.
- Wróblewska, P; Hikawczuk, T; Wiliczkiwicz, A. (2021) Dried sugar beet pulp as a source of soluble dietary fibre in equine nutrition: A review. *Animal Nutrition and Feed Technology* **21**, 405–420.
- Yang, F.-C; Liao, C.-B. (1998) Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Engineering* **19**, 233–236.
- Zang, Y; Silva, L. H. P; Geng, Y. C; Ghelichkhan, M; Whitehouse, N. L; Miura, M; Brito, A. F. (2021) Dietary starch level and rumen-protected methionine, lysine, and histidine: Effects on milk yield, nitrogen, and energy utilization in dairy cows fed diets low in metabolizable protein. *Journal of dairy science* **104**, 9784–9800.
- Zhang, Y; Fraatz, M. A; Müller, J; Schmitz, H.-J; Birk, F; Schrenk, D; Zorn, H. (2015) Aroma characterization and safety assessment of a beverage fermented by *Trametes versicolor*. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 6915–6921.
- Zhu, L., *et al.* (2022) Process optimization, amino acid composition, and antioxidant activities of protein and polypeptide extracted from waste beer yeast. *Molecules (Basel, Switzerland)* **27**.
- Zipper, H; Brunner, H; Bernhagen, J; Vitzthum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research* **32**, e103.
- Zwinkels, J., van de Koolwijk, P., van der Wielen, N., van Mastrijt, O., & Smid, E. J. (2025). *Mycelium of mushroom-producing fungi as high-quality protein source*.

ANHANG

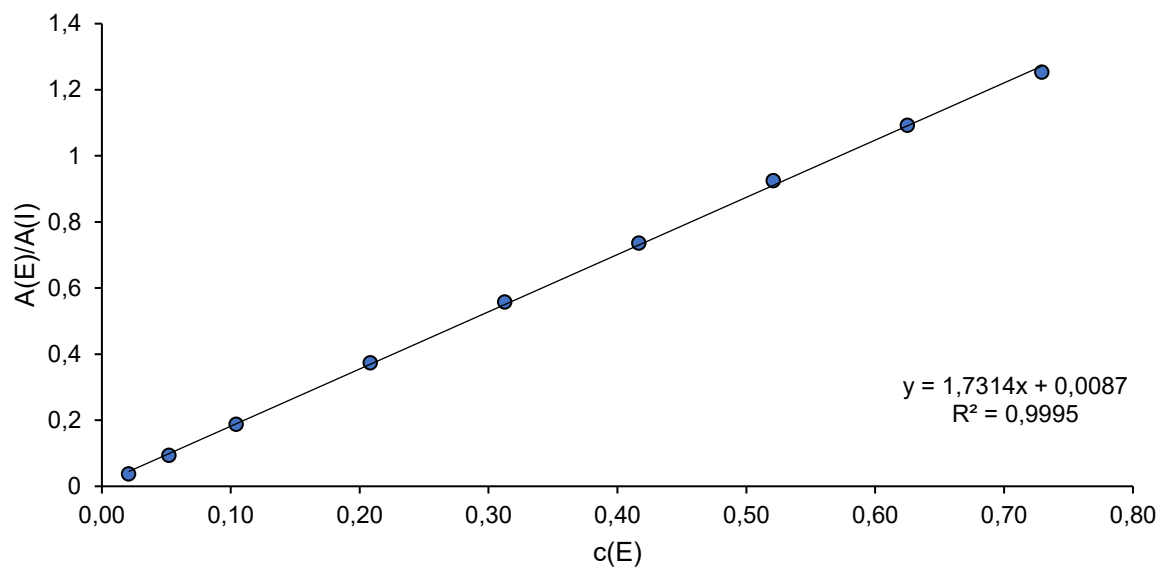
Ergänzendes Material zur kulturbegleitenden Analytik

Abbildung I: Kalibriergerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß für die Bestimmung von Ergosterol nach 2.7.1.

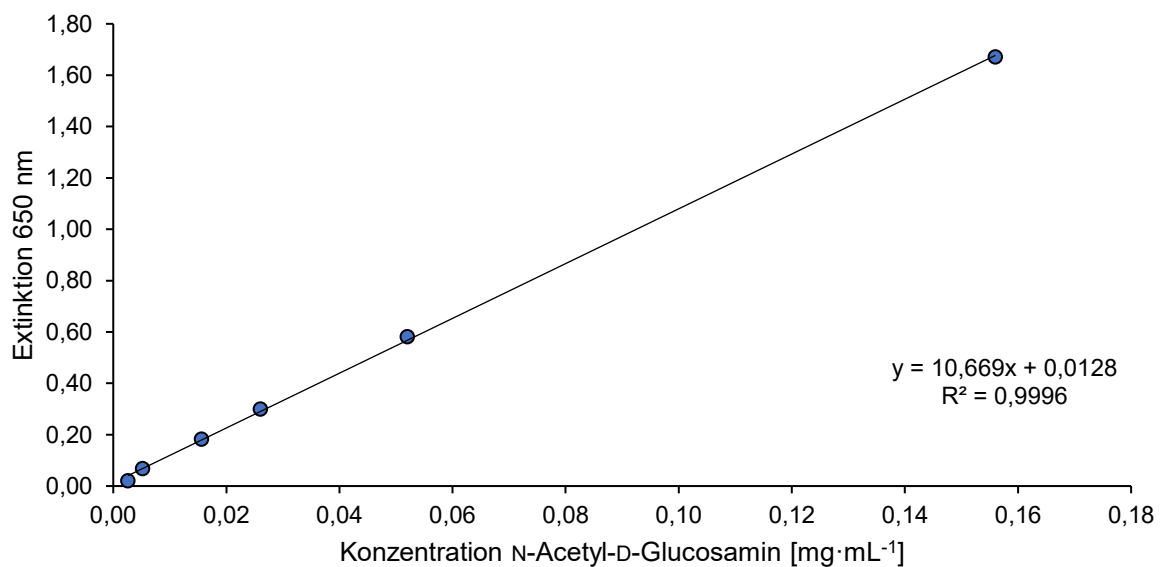


Abbildung II: Kalibriergerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß für die Bestimmung von Chitin nach 2.7.2.1.

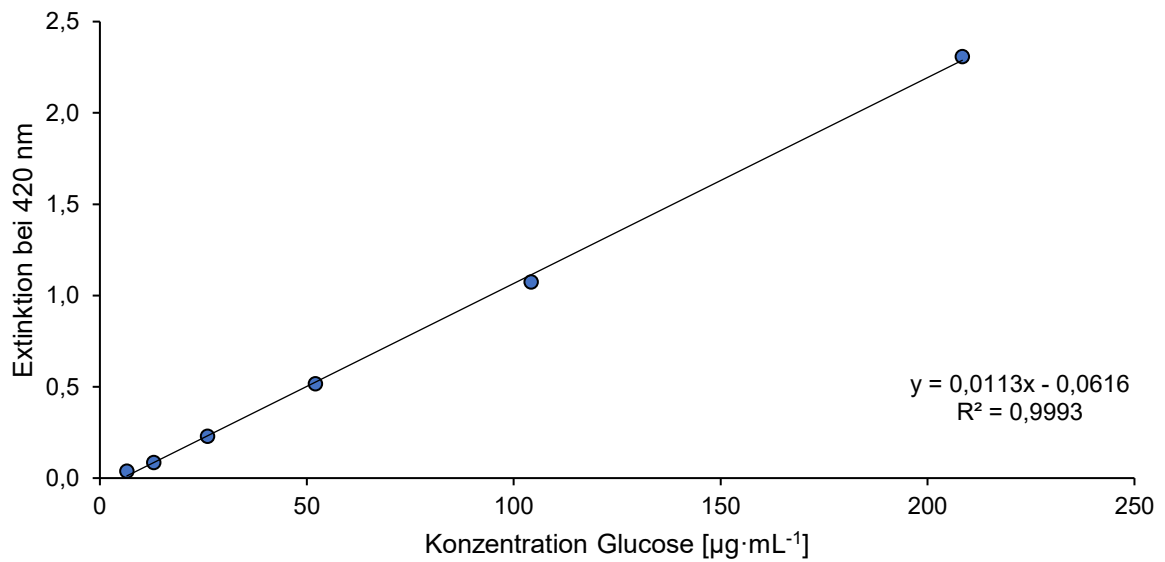


Abbildung III: Kalibriergerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß für die Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate nach 2.8.7.

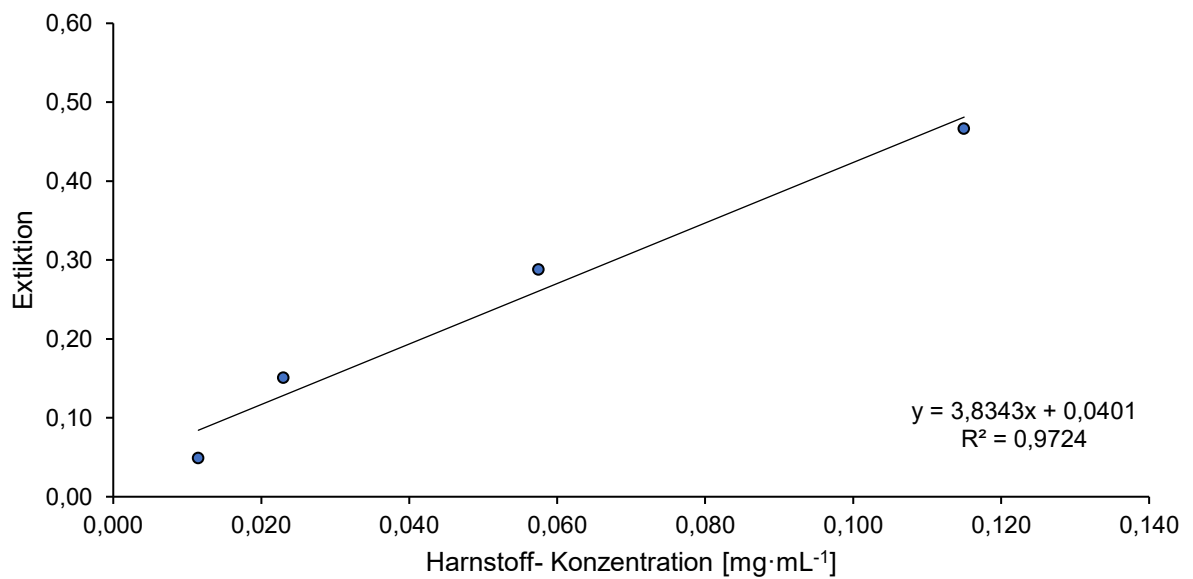


Abbildung IV: Kalibriergerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß für die Bestimmung von Harnstoff in Fruchtkörpern nach 2.8.10.

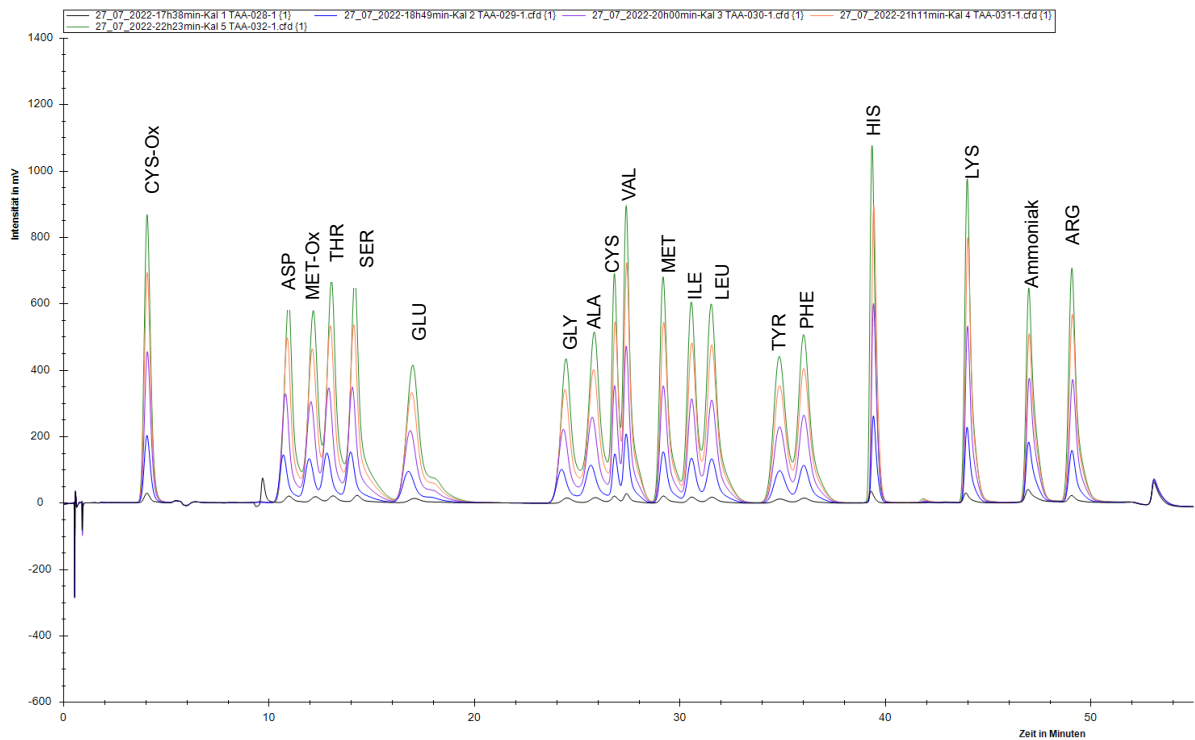


Abbildung V: Externe Kalibrierung zur Quantifizierung der Aminosäuren mittels Aminosäure-Analysator. Dargestellt ist die Kalibrierung für die Gesamtaminosäuren (H-Ox-Mischung, Sykam), gemessen nach 2.8.3

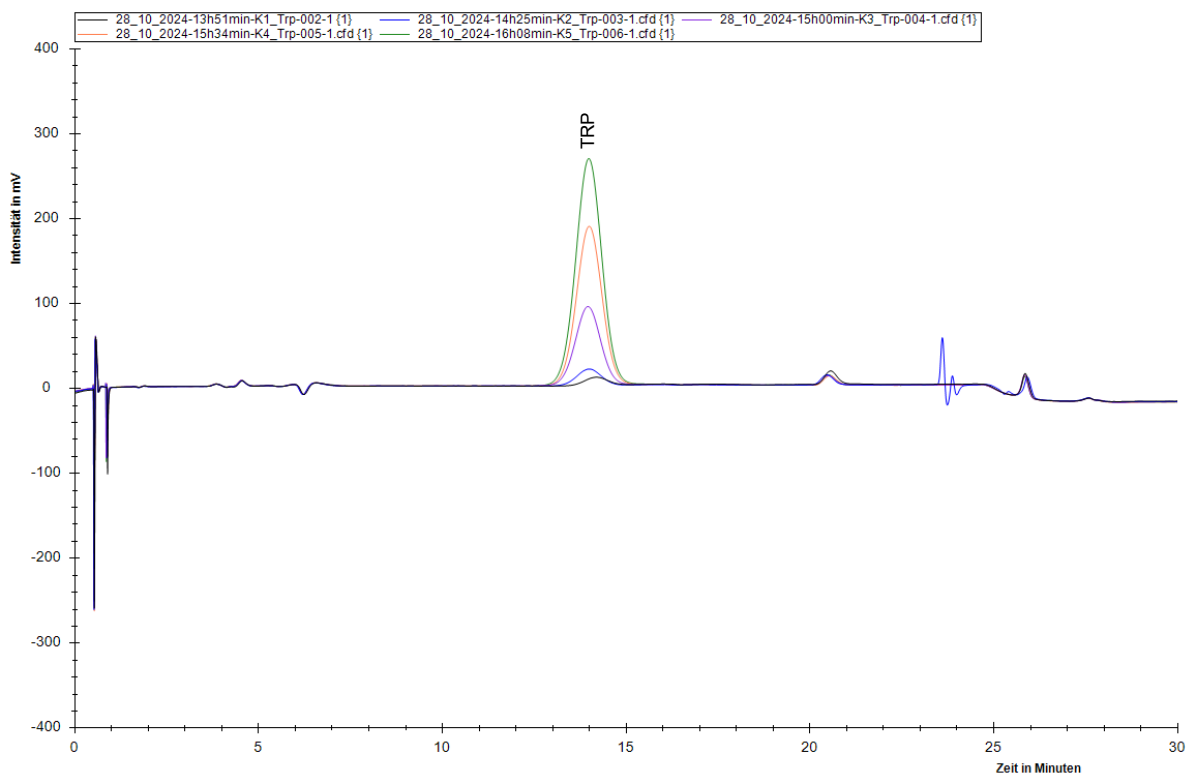


Abbildung VI: Externe Kalibrierung zur Quantifizierung der Aminosäuren mittels Aminosäure-Analysator. Dargestellt ist die Kalibrierung für Tryptophan, gemessen nach 2.8.3

Ergänzendes Material zu 3.1.4.7

Tabelle I: Trockenmassen der Mycelien der Wachstumskurven von *D. tabescens* und *L. squarrosulus*. Die Kultivierung erfolgte für 10 bzw. 9 Tage in Rübenschnitzel-Melasse-Medium in 100 mL Kulturvolumen und 250-mL-Schüttelkolben bei 24 °C und 150 rpm im Dunklen. Die Trockenmasse wurde nach 2.8.1.1 ermittelt, n = 2

Kultivierungstag	<i>L. squarrosulus</i>	<i>D. tabescens</i>
	Trockenmasse $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$	Trockenmasse $\left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]$
0	9,2 ± 0,9	7,1 ± 0,0
1	9,8 ± 0,6	5,7 ± 1,0
2	10,0 ± 0,2	-
3	9,6 ± 0,4	7,0 ± 0,0
4	10,4 ± 0,4	8,2 ± 0,3
5	10,7 ± 0,9	8,9 ± 0,7
6	9,2 ± 0,0	9,2 ± 0,0
7	9,4 ± 0,5	9,9 ± 0,8
8	9,2 ± 0,2	8,4 ± 0,2
9	9,0 ± 0,9	-
10	-	8,8 ± 0,9

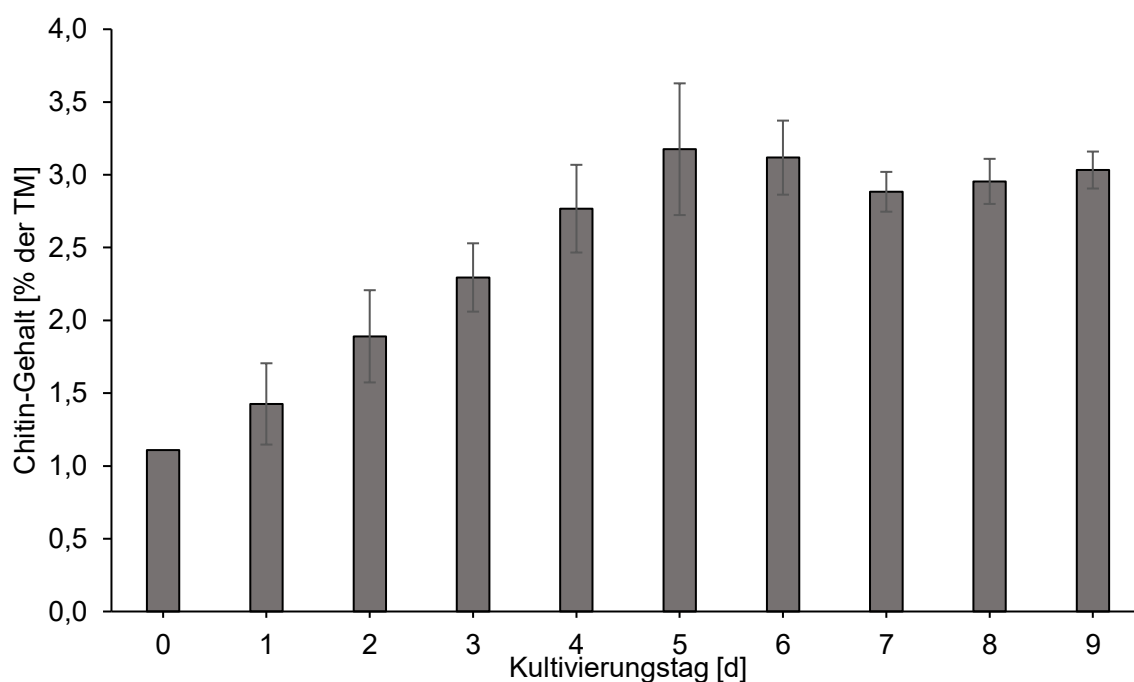


Abbildung VII: Chitin-Gehalte der Wachstumskurve von *L. squarrosulus*

Die Kultivierung erfolgte in Rübenschnitzel-Melasse-Medium für 9 Tage. Der Chitin-Gehalt wurde photometrisch nach 2.7.2.1 aus dem lyophilisierten Mycel bestimmt, n=2

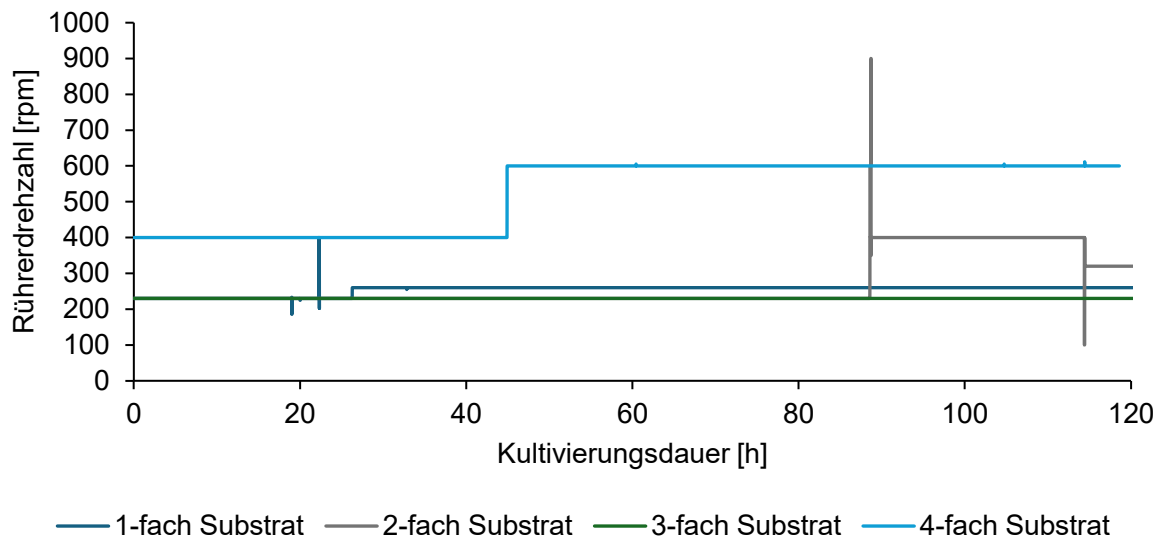
Ergänzendes Material zu 3.1.4.8

Abbildung VIII: Aufzeichnung der Rührerdrehzahl während des Kulturverlaufs im Bioreaktor mit doppelter, dreifacher und vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Inokulationsvolumen. Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher, doppelter, dreifacher bzw. vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Volumen (300 mL -1200 mL) einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Für die Kultivierung wurde der poröse Sparger der Firma BioThrust verwendet.

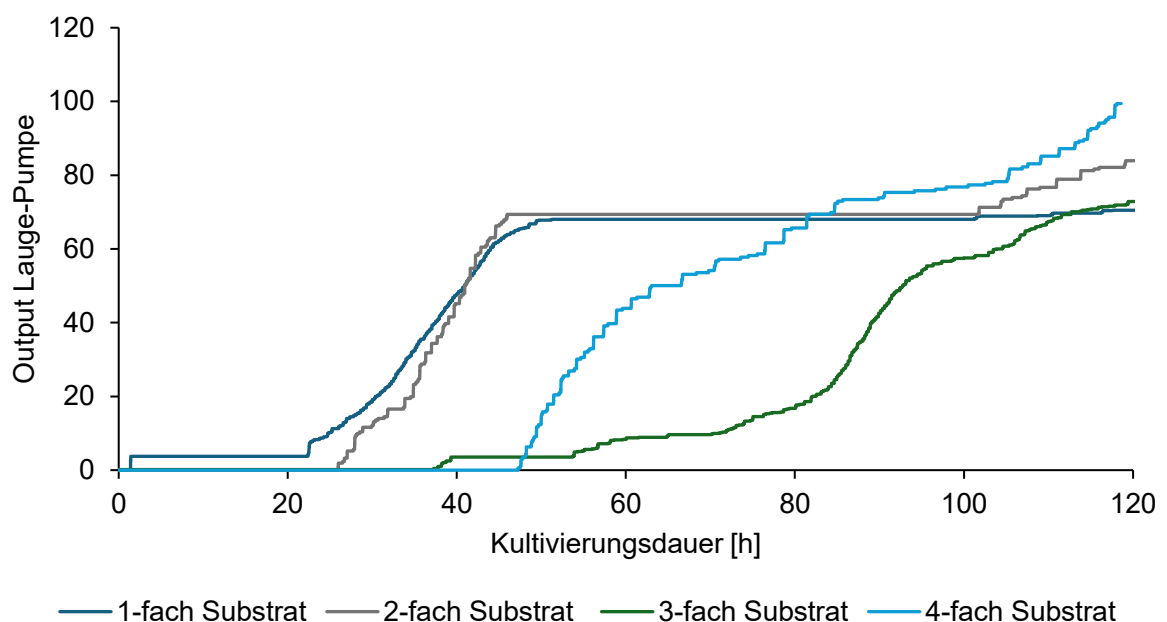


Abbildung IX: Aufzeichnung Outputs der Lauge-Pumpe während des Kulturverlaufs im Bioreaktor mit doppelter, dreifacher und vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Inokulationsvolumen. Im 5-Liter-Bioreaktor wurden drei Liter Rübenschnitzel-Melasse-Medium mit einfacher, doppelter, dreifacher bzw. vierfacher Substratkonzentration mit angepasstem Volumen (300 mL -1200 mL) einer 6-tägigen, homogenisierten Vorkultur von *L. squarrosulus* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und pH 6 für 6 Tage. Für die Kultivierung wurde der poröse Sparger der Firma BioThrust verwendet. Als Rührwerk dienen zwei Rushton-Impeller. Die pH-Steuerung erfolgte mittels 0,05 M NaOH und löste bei pH < 5,5 aus. Die Messung des pH-Wertes erfolgte on-line mittels pH-Elektrode.

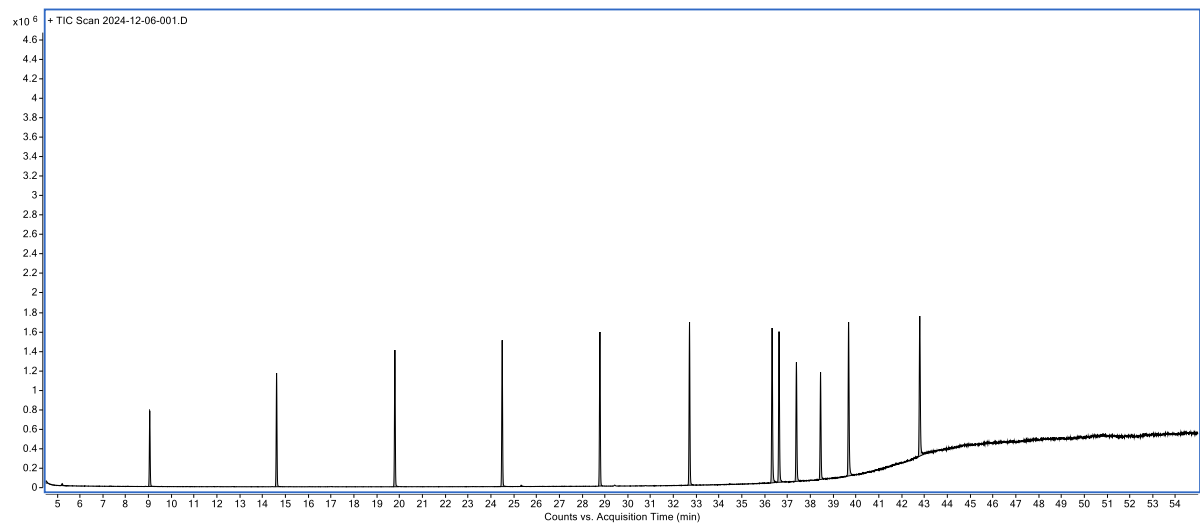
Ergänzendes Material zu 3.1.6.2

Abbildung X: Fettsäureverteilung des verwendeten 12-Komponenten-FSME-Standards nach Messung mittels GC-MS/MS nach 2.8.6

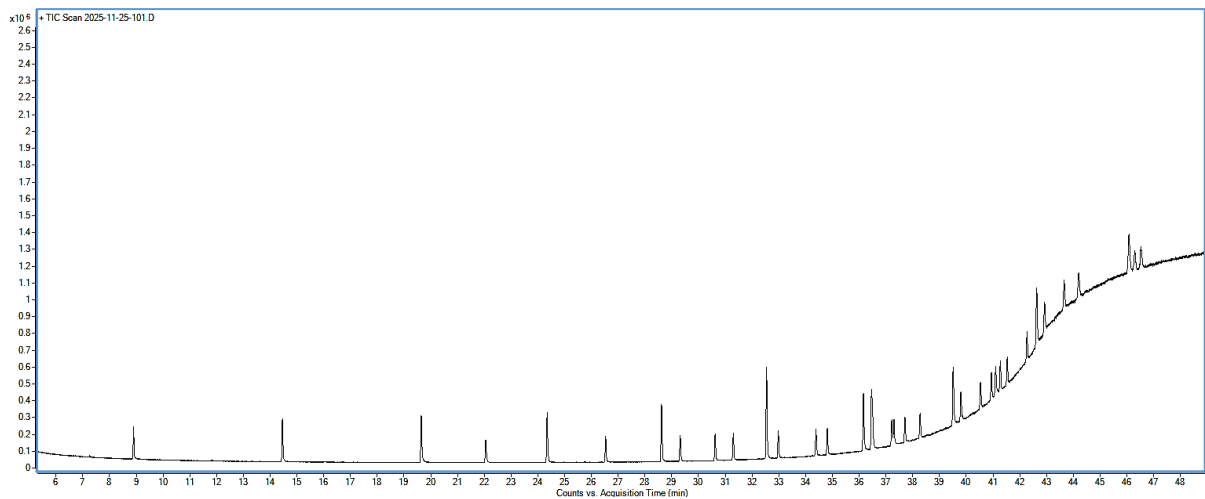


Abbildung XI: Fettsäureverteilung des verwendeten 37-Komponenten-FSME-Standards nach Messung mittels GC-MS/MS nach 2.8.6

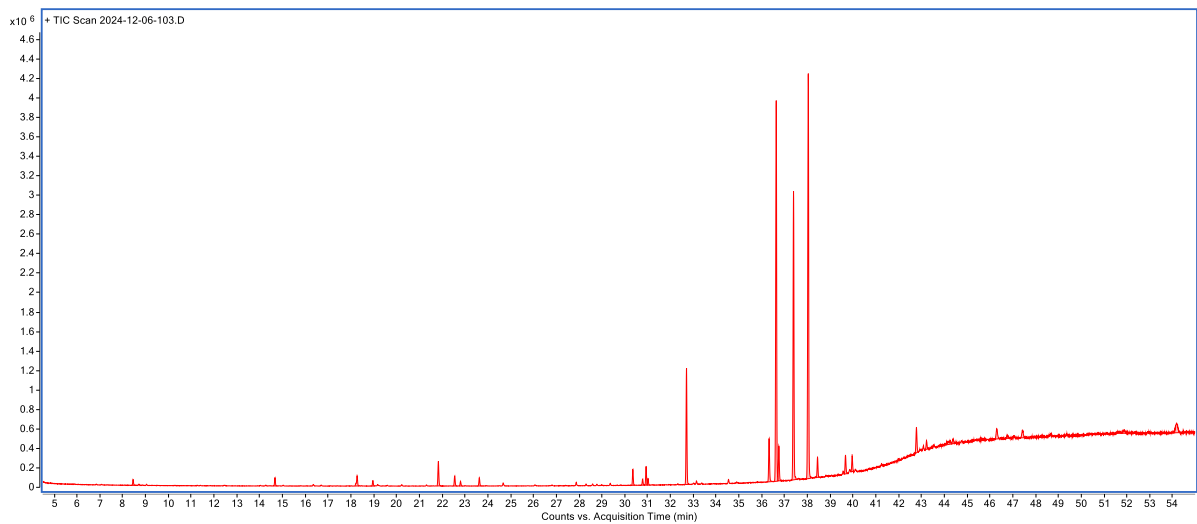


Abbildung XII: Fettsäuremuster der Messung von *L. squarrosulus* kultiviert in Rübenschnitzel-Melasse-Medium, Messung mittels GC-MS/MS nach 2.8.6

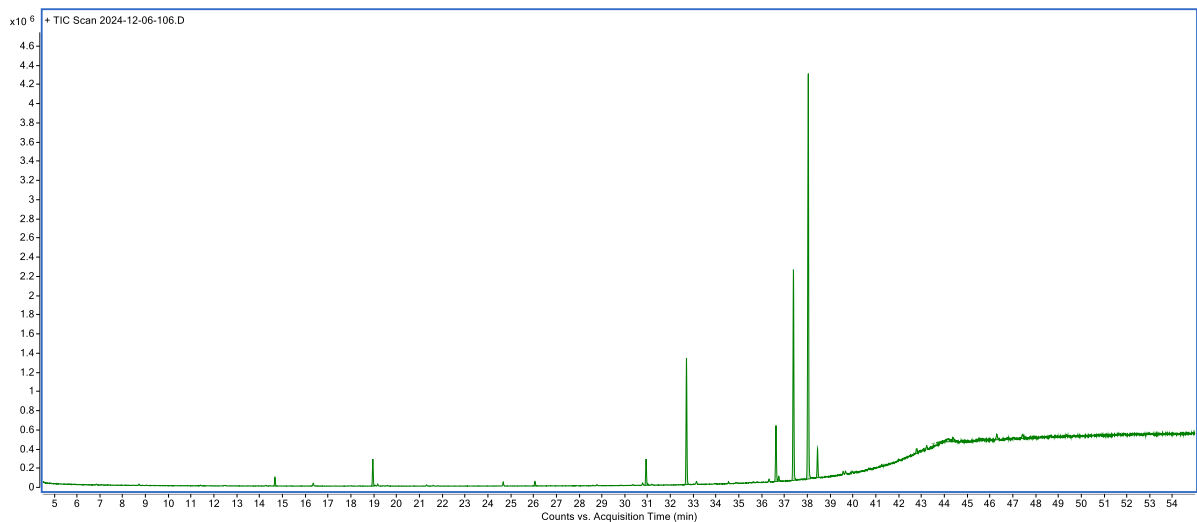


Abbildung XIII: Fettsäuremuster der Messung von Rübenschnitzeln, Messung mittels GC-MS/MS nach 2.8.6

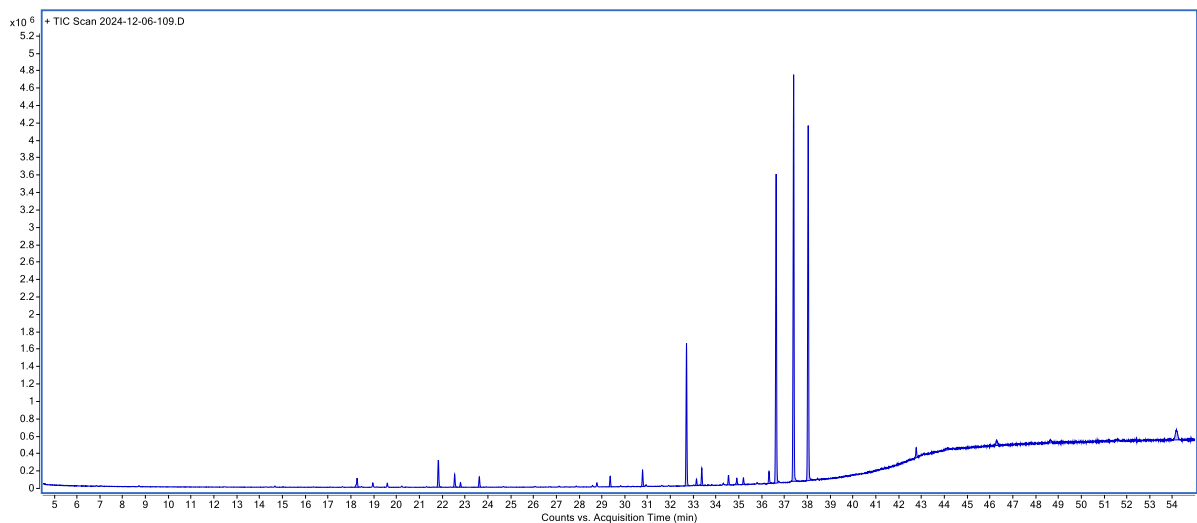


Abbildung XIV: Fettsäuremuster der Messung von *L. squarrosulus* kultiviert in Malzextrakt-Medium, Messung mittels GC-MS/MS nach 2.8.6

Ergänzendes Material zu 3.1.6

Tabelle II: Biologische Wertigkeiten, limitierende Aminosäuren und berechnete Kjeldahl-Faktoren für Rübenschnitzel sowie für *D. tabescens* kultiviert in Rübenschnitzel-Melasse-Medium und in Malzextrakt. Die Analysen erfolgten nach 2.8.3 mit n= 4 bzw. n=2 (Malzextrakt)

	Biologische Wertigkeit	1. limitierende Aminosäure	2. limitierende Aminosäure	Kjeldahl-Faktor (Rohprotein)	Kjeldahl-Faktor (Reinprotein)
<i>D. tabescens</i> in Rübenschnitzel-Melasse-Medium	89 ± 1	Tryptophan (57 ± 3)	Methionin und Cystein (91 ± 6)	5,96 ± 0,02	5,20 ± 0,13
<i>D. tabescens</i> in Malzextrakt	78 ± 1	Tryptophan (46 ± 2)	Methionin und Cystein (64 ± 1)	5,63 ± 0,01	4,73 ± 0,07

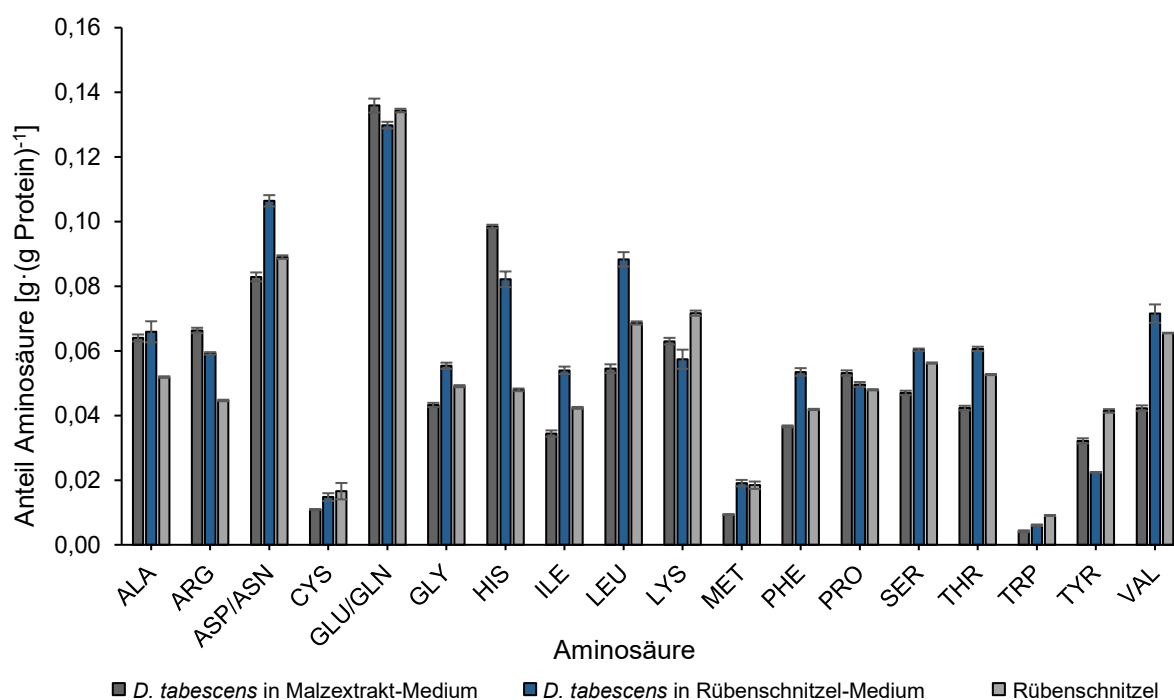


Abbildung XV: Aminosäure-Profil von Rübenschnitzeln sowie lyophilisiertem Mycel von *D. tabescens* auf Malzextrakt- und Rübenschnitzel-Melasse-Medium. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in drei getrennten Ansätzen nach 2.8.3, die Messung erfolgte mittels HPLC-DAD mit Nachsäulenderivatisierung, n=2.

Ergänzendes Material zu 3.1.7

Bratwurst mit Pilzmyzel von *L. squarrosulus*

Datum: _____ Alter: _____

Geschlecht	Raucher	Sensorisch geschult
<input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/> m <input type="checkbox"/> d	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

Sie erhalten drei Proben, von denen zwei identisch sind. Die Bewertung erfolgt auf Grundlage olfaktorischer und gustatorischer Eigenschaften sowie des Mundgefühls bzw. der Textur. Bitte identifizieren Sie die abweichende Probe und bewerten Sie alle Proben hinsichtlich der angegebenen sensorischen Attribute auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 10 (sehr intensiv). Tragen Sie außerdem eine Bewertung des Gesamteindrucks ein.

Identische Probennummern: _____

Abweichende Probennummer: _____

Geruch

Identische Proben											
Beschreibung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anmerkung
gebraten											
ausgewogen											
würzig											
pilzig											
erdig											
muffig											
produkttypisch											
Gesamteindruck											
Abweichende Probe											
Beschreibung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anmerkung
gebraten											
ausgewogen											
würzig											
pilzig											
erdig											
muffig											
produkttypisch											
Gesamteindruck											

Geschmack

Identische Proben											
Beschreibung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anmerkung
gebraten											
ausgewogen											
würzig											
pilzig											
muffig											
produkttypisch											
Gesamteindruck											
Abweichende Probe											
Beschreibung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anmerkung
gebraten											
ausgewogen											
würzig											
pilzig											
muffig											
produkttypisch											
Gesamteindruck											

Mundgefühl / Textur

Identische Proben											
Beschreibung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anmerkung
saftig											
homogen											
bissfest											
elastisch											
sandig											
produkttypisch											
Gesamteindruck											
Abweichende Probe											
Beschreibung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anmerkung
saftig											
homogen											
bissfest											
elastisch											
sandig											
produkttypisch											
Gesamteindruck											

Abbildung XVI: Verwendeter Sensorik-Bogen zur Beurteilung der Hybridbratwurst nach 2.5.3

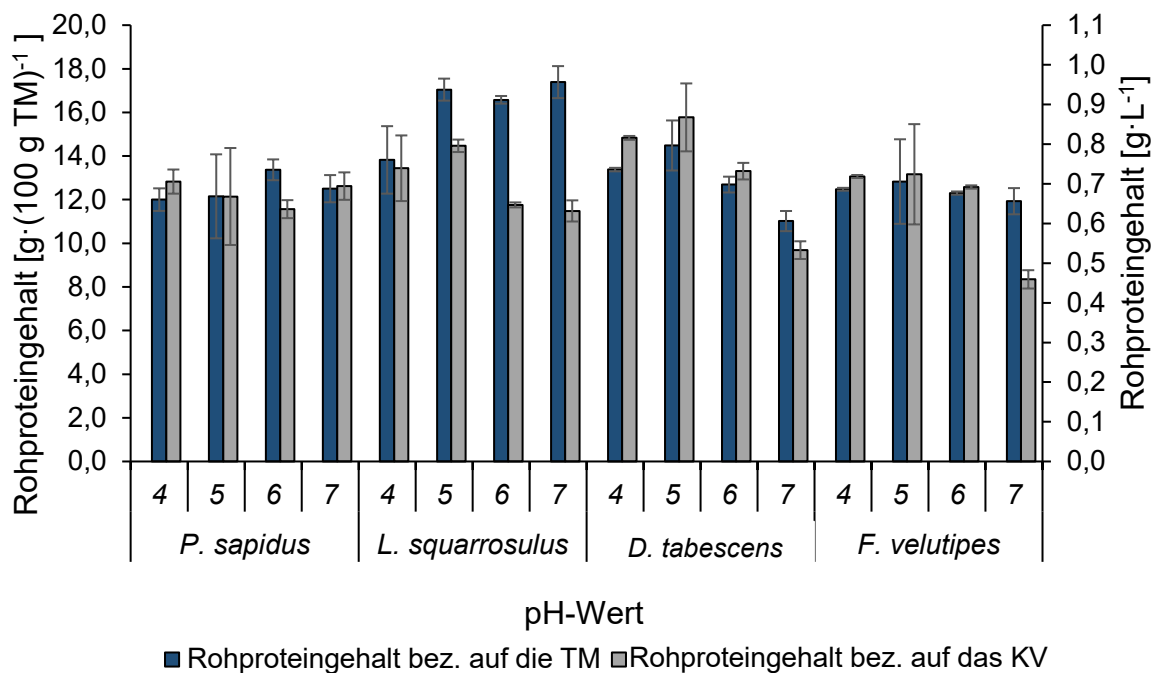
Ergänzendes Material zu 3.2.4

Abbildung XVII: Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen pH-Werten (4, 5, 6, 7) und 150 rpm, 24 °C unter Lichtausschluss. Als Kultivierungsmedium wurden silierte Rübenschnitzel (50 g·L⁻¹) verwendet. Zur Bestimmung des Rohproteingehaltes wurde die Methode nach Kjeldahl verwendet, n=2

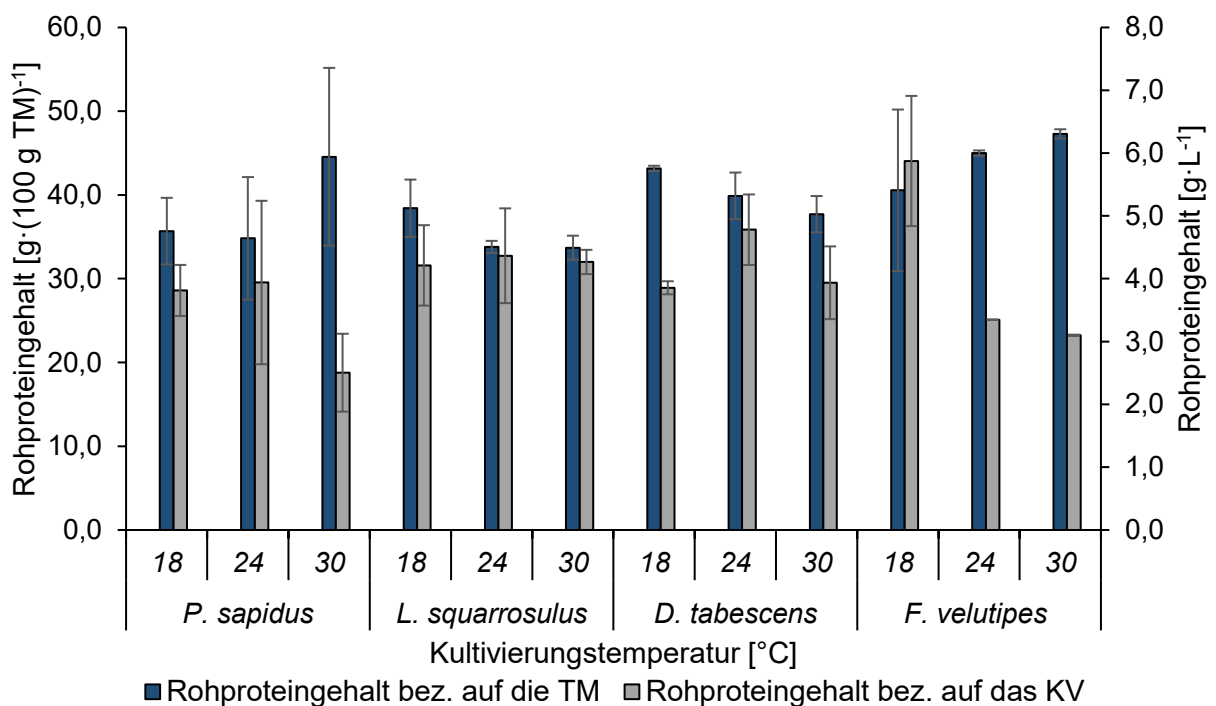


Abbildung XVIII: Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen (18 °C, 24 °C, 30 °C) und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kultivierungsmedium wurde Vinasse (125 g·L⁻¹) verwendet. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Kjeldahl verwendet, n=2

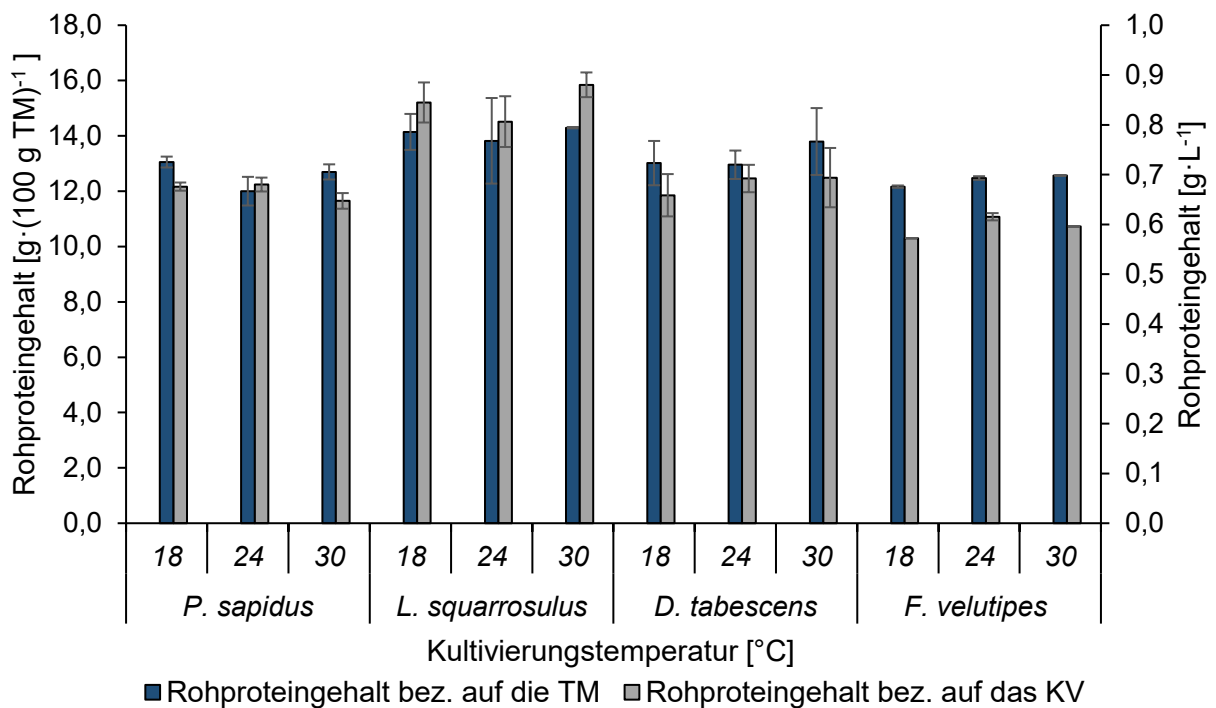


Abbildung XIX: Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen (18 °C, 24 °C, 30 °C) und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kultivierungsmedium wurden silierte Rübenschnitzel (50 g · L⁻¹) verwendet. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Kjeldahl verwendet, n=2

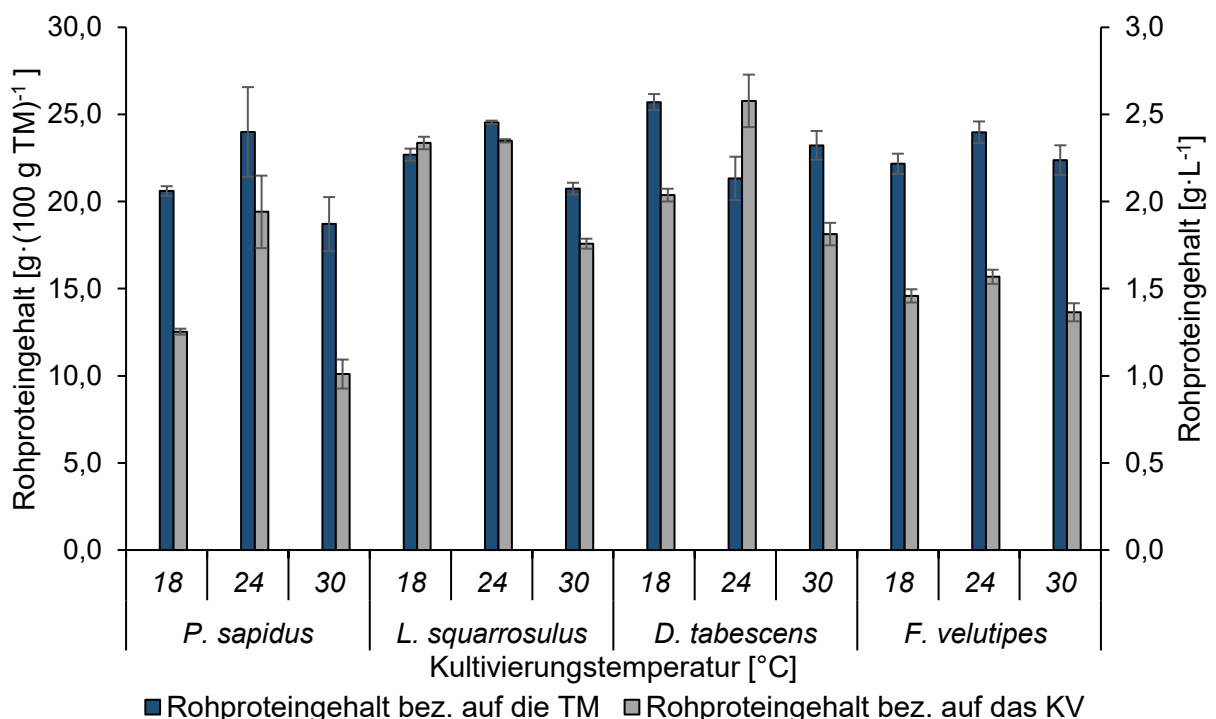


Abbildung XX: Rohproteingehalte des lyophilisierten Mycels von *P. sapidus*, *L. squarrosulus*, *D. tabescens* und *F. velutipes* nach 7-tägiger Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen (18 °C, 24 °C, 30 °C) und 150 rpm unter Lichtausschluss. Als Kultivierungsmedium wurden silierte Rübenschnitzel (35 g · L⁻¹) in Kombination mit Vinasse (40 g · L⁻¹) verwendet. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Kjeldahl verwendet, n=2

Ergänzendes Material zu 3.3.1

Sequenz der ITS-Region von *L. squarrosulus*

Zur Sequenzierung wurden die ITS-Primer verwendet. Die grau hervorgehoben Abschnitte wurden zur Primer-Generation für die qPCR verwendet

ITS Primer F:

```
TTTGAGGTCAGAGTTCGATGAATGTTGTCTCCGCAGAGACGATTAGAAGCTTGGCCC
GTATAAACGCTTCAACGGTCGCGGCGTAGACATTATCACACCGTGAGCCAGATCCGCAA
GGAACCAAAGCTAATGCATTTGAGAGGAGCCGACTAGACGAAAGCTAGCCGACAAGCCT
CCAAGTCCAAGCCTAAGCAAGTCCCGTTAAGAACCCGTTAGGTTGAGAATTTTCATGACAC
TCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATG
ATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGA
GAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAGAGATGCGTTACATCGCAAATACACATT
CTGATACTTATAAGAGTTTGTGGTAAACGTAGGCCAGTCACAACACTACAGCGAAAAAGCC
CGCGAAGGCGACTCCCCCSCT
```

ITS Primer R:

```
CGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGT
GGGTTTCAGGAACCTTCSAAAGCGGGGGA
```

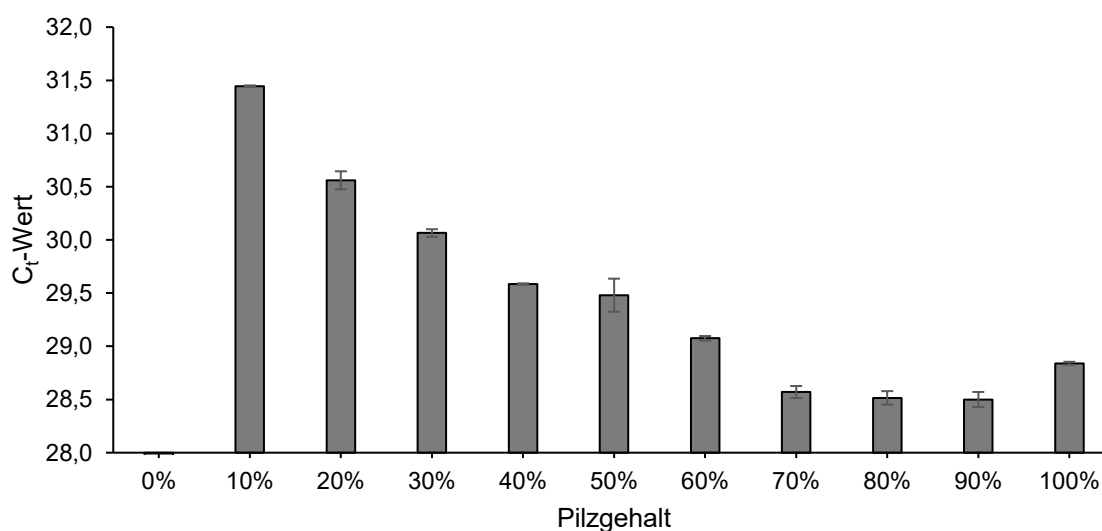


Abbildung XXI: C_t-Werte der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* bei einer Verdünnung der Template-DNA von 1:100.000

Dargestellt sind die C_t-Werte der Messung der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit den folgenden qPCR-Bedingungen: Elongations-/Annealing-Temperatur: 61,1 °C, 10 µL SYBR je Probe, 1 µL Probe 1:100.000 verdünnt, 1 µL je Primer ITS 4/5

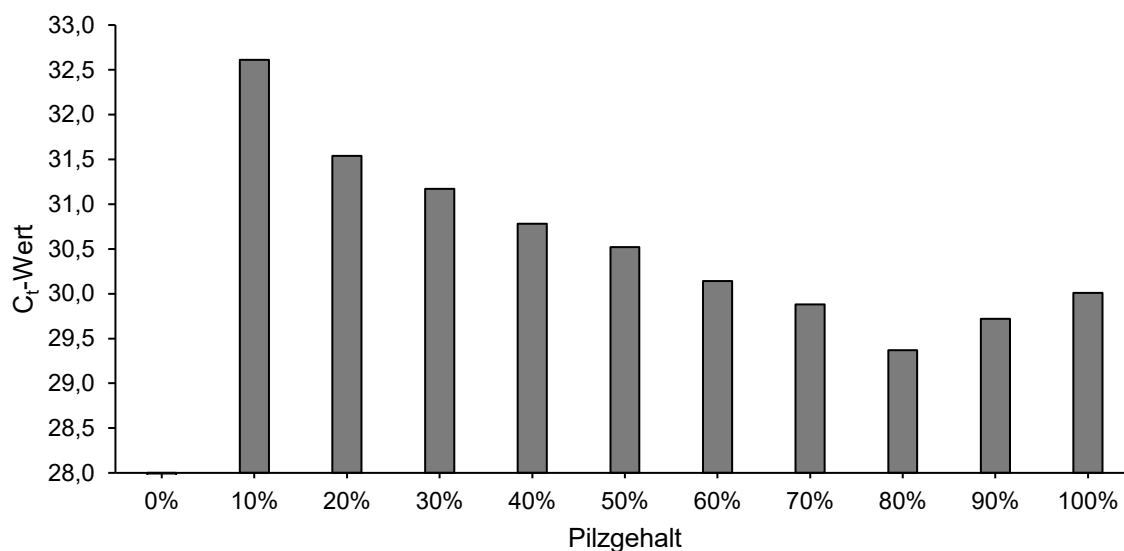


Abbildung XXII: Ct-Werte der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* bei einer Verdünnung der Template-DNA von 1:200.000

Dargestellt sind die Ct-Werte der Messung der Konzentrationsreihe von *L. squarrosulus* mit den folgenden qPCR-Bedingungen: Elongations-/Annealing-Temperatur: 61,1 °C, 10 µL SYBR je Probe, 1 µL Probe 1:200.000 verdünnt, 1 µL je Primer ITS 4/5

Tabelle III: Ergebnisse der qPCR-Messungen mit den Endbedingungen 1 µL DNA-Template, 1:100.000 verdünnt, 0,1 µL je Primer „ITS kurz R/F“, 57 °C Annealing/ Elongationstemperatur, 10 µL SYBR® Green MasterMix

Pilzgehalt	Messtag 1		Messtag 2		Messtag 3	
	Messung 1	Messung 2	Messung 1	Messung 2	Messung 1	Messung 2
0%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
10%	38,87	38,72	39,62	39,41	38,25	38,73
20%	37,61	38,06	38,24	38,11	37,68	37,16
30%	37,23	36,71	37,41	37,53	36,85	36,91
40%	36,63	36,8	37,12	36,75	36,49	36,66
50%	36,2	36,07	36,87	36,9	36,12	36,19
60%	35,6	35,68	36,14	35,84	35,53	35,49
70%	35,61	35,66	35,92	35,88	35,26	35,17
80%	35,08	35,21	35,73	35,65	35,03	34,86
90%	35,49	35,33	35,98	35,97	35,41	35,17
100%	35,48	34,89	36,19	35,63	35,49	35,05

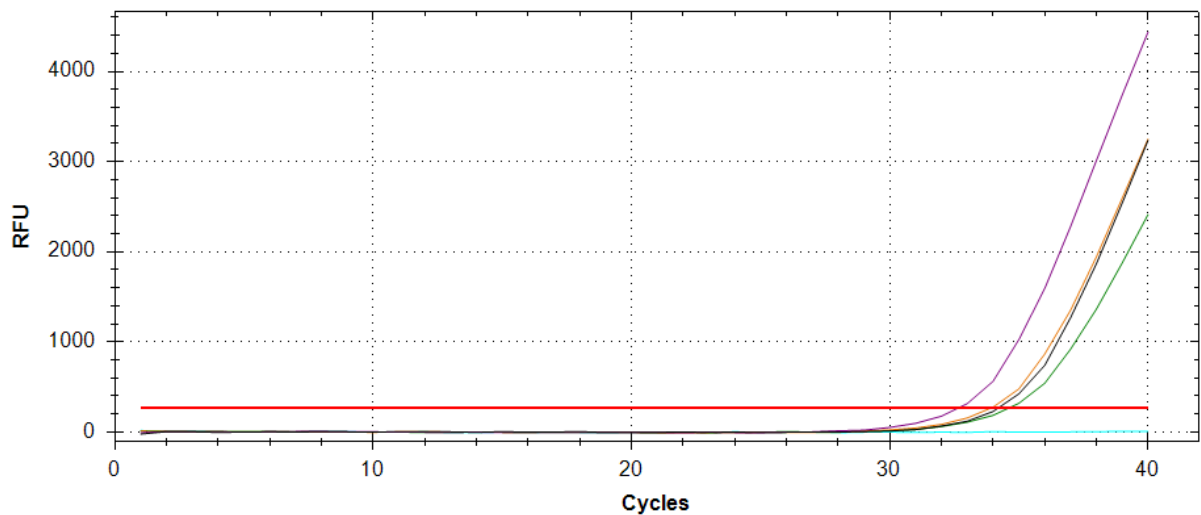


Abbildung XXIII: Einfluss verschiedener SYBR-Green-Mengen auf den Kurvenverlauf in der qPCR. Dargestellt sind jeweils die Probe 50 % Pilz mit türkis: 6 µL SYBR-Green, grün: 8 µL SYBR-Green, orange: 10 µL SYBR-Green, lila: 12 µL SYBR-Green, schwarz: 14 µL SYBR-Green; 1 mL Probe, 0,1 µL Primer, 57 °C

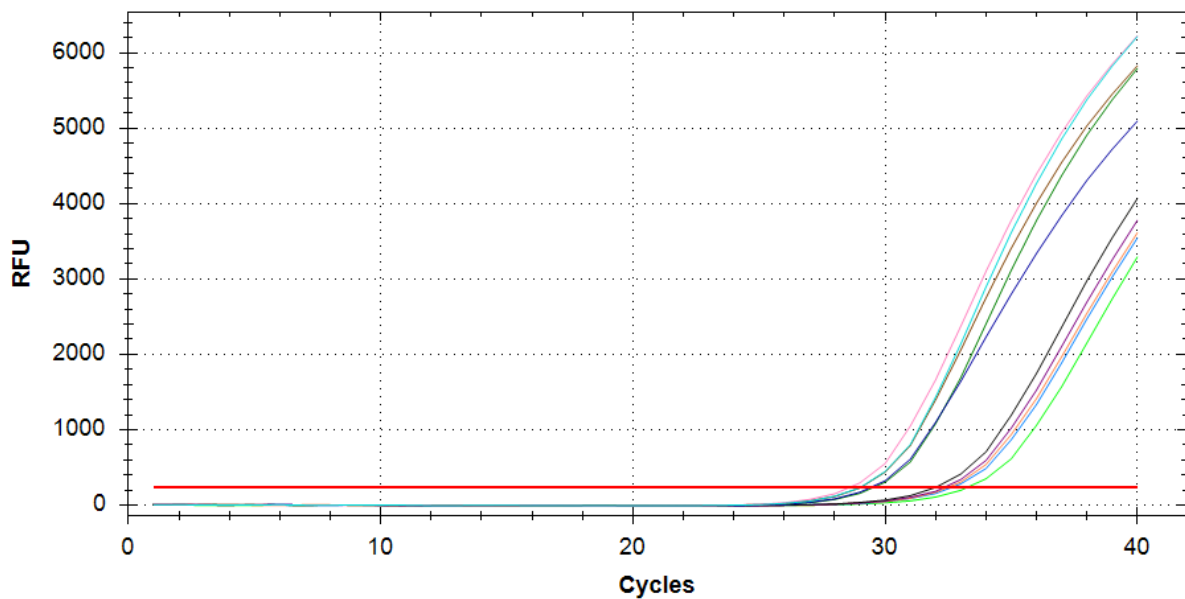


Abbildung XXIV: Einfluss verschiedener Primer-Konzentrationen auf den Kurvenverlauf in der qPCR. Dargestellt sind mit je 0,1 µL je Primer hellgrün: 50% Pilz, hellblau: 60% Pilz, orange: 70% Pilz, lila: 80% Pilz, schwarz: 90% Pilz // mit je 0,2 µL je Primer: dunkelgrün: 50% Pilz, dunkelblau: 60% Pilz, braun: 70% Pilz, türkis: 80% Pilz, rosa: 90% Pilz, Temperatur: 58,4 °C, 10 µL SYBR je Probe, 1 µL Probe 1:100.000 verdünnt

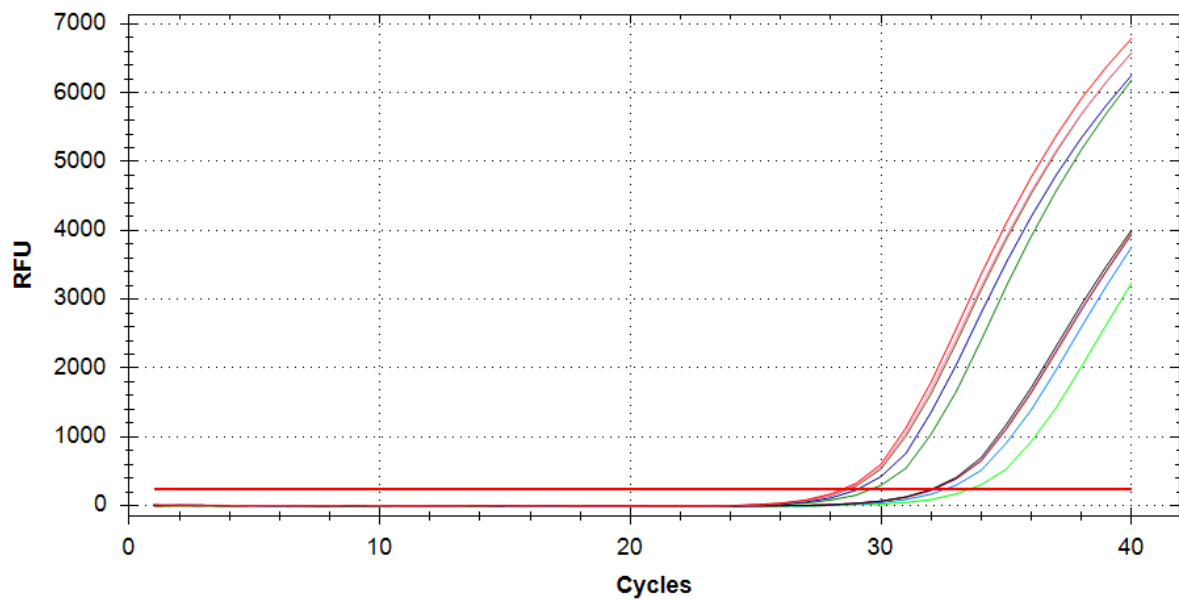


Abbildung XXV: Einfluss verschiedener Primer-Konzentrationen auf den Kurvenverlauf in der qPCR. Dargestellt sind mit je 0,1 µL je Primer: hellgrün: 50% Pilz, hellblau: 60% Pilz, orange: 70% Pilz, lila: 80% Pilz, schwarz: 90% Pilz // mit je 0,2 µL je Primer: dunkelgrün: 50% Pilz, dunkelblau: 60% Pilz, braun: 70% Pilz, rosa: 80% Pilz, rot: 90% Pilz, Temperatur: 57,0 °C, 10 µL SYBR je Probe, 1 µL Probe 1:100.000 verdünnt

Ergänzendes Material zu 3.3.2

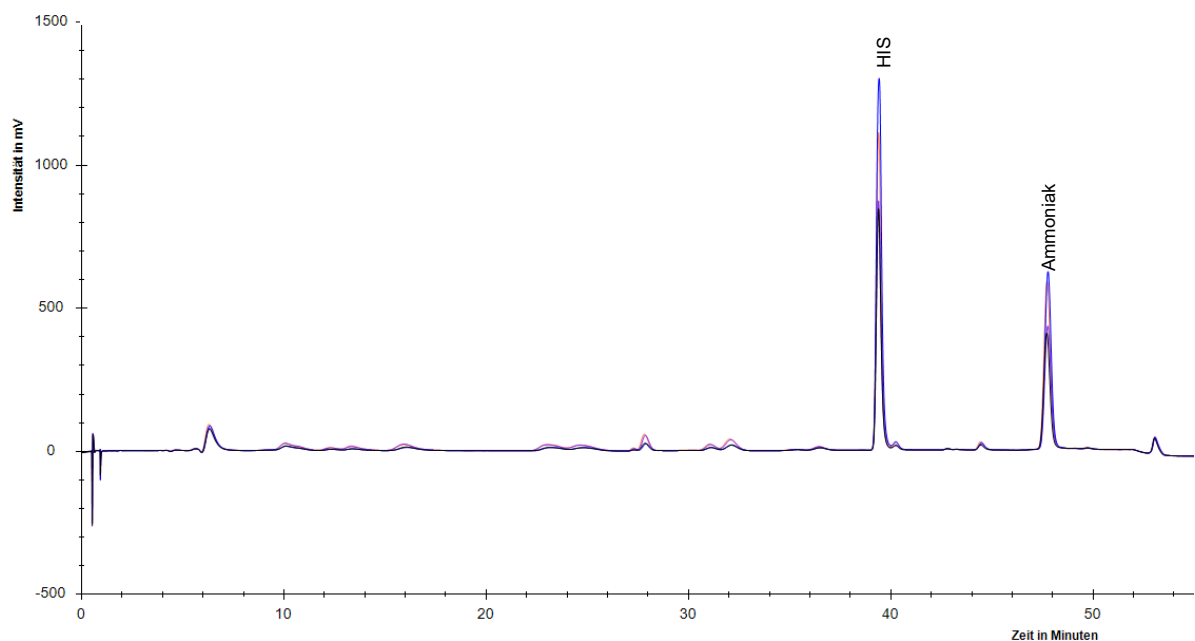


Abbildung XXVI: Chromatogramm der Aminosäure-Messung der mittels Fibretherm aufgeschlossenen Proben
Zu sehen sind Peaks für Histidin und Ammoniak