

**Biotechnologische Produktion einer Vitamin D
reichen, alternativen Proteinquelle durch
Basidiomyceten auf industriellen
Nebenströmen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jenny Ahlborn, geb. Günther (M. Sc.)

aus Gießen

2019

Dekan: Prof. Dr. J. Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn,
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
 2. Gutachter: Prof. Dr. R. Göttlich
Institut für Organische Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen
-

Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während dieser Zeit herzlich bedanken. Danke für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut und die selbstständige Arbeitseinteilung, die es mir ermöglicht hat, Familie und Beruf gut zu vereinen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei der Justus-Liebig-Universität bedanken, die es sich zum Ziel gesetzt hat familienfreundlich zu sein. Vielen Dank auch für die Bewilligung eines sechsmonatigen Promotionsabschlusstipendiums im Rahmen des Gleichstellungskonzeptes. Der Technischen Hochschule Mittelhessen sei ebenfalls für die Bewilligung eines viermonatigen Stipendiums gedankt.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Martin Rühl, der insbesondere in Sachen Vitamin D und Ergosterol stets ein offenes Ohr hatte und mit hilfreichen Ratschlägen zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Richard Göttlich möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich danken. Bereits zu meiner Schulzeit bekräftigte er mich durch die Durchführung der „Schnupperuni Chemie“ Lebensmittelchemie an der Justus-Liebig-Universität zu studieren – eine sehr gute Entscheidung!

Auch möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Gunter Eckert und Dr. Martin Rühl für den Beitritt in die Prüfungskommission bedanken.

Für die Unterstützung einiger Analysen geht mein Dank auch an Prof. Dr. Sven Schubert (Institut für Pflanzenernährung) für die Bereitstellung der Mikrowelle zum Mineralstoffaufschluss, sowie Prof. Dr. Rolf-Alexander Düring (Institut für Bodenkunde) für die Messungen mittels ICP-OES.

Bei allen Firmen, die Substrate zur Verfügung gestellt haben, möchte ich mich ebenfalls bedanken, sowie bei Druid Austernpilze, für die Bereitstellung der Arimed B 12 100 W UV-Lampen.

Für die tolle Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Kollegen herzlich bedanken. Allen, die mir bei der Durchführung von GC-Messungen geholfen haben, sei

ebenfalls an dieser Stelle gedankt. Nur durch das Vereinen von unterschiedlichen Fachrichtungen kann ein vielfältiges Team entstehen, das durch unterschiedliche Lösungsansätze zu guten wissenschaftlichen Erkenntnissen gelangt. Mein besonderer Dank geht an Frau Garima Maheshwari. Mit ihr habe ich nicht nur unzählige Experimente zusammen durchgeführt und jeden Tag meine Englischkenntnisse verbessert, sondern darüber hinaus auch kulinarische Köstlichkeiten ausgetauscht.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken! Lieber Nils, herzlichen Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, Deine Liebe und Unterstützung! Lieber Johannes, Du hast mir gezeigt, dass es im Leben wichtigere Dinge gibt, als sein Leben nur auf Arbeit auszurichten. Andererseits hast Du mir auch gezeigt, dass die Mischung aus Familie und Beruf perfekt ist. Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Unterstützung, das Betreuen von Johannes und das Einspringen in Notfällen herzlich bedanken!

Veröffentlichungen

Publikationen

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*; eingereicht

Ahlborn J, Calzolari N, Spielmeyer A, Avci SS, Zimmer M, Rühl M (2018) Enrichment of vitamin D₂ in mycelium from submerged cultures of the agaric mushroom *Pleurotus sapidus*. *J Food Sci Technol*. Doi: 10.1007/s13197-018-3290-z

Ahlborn J, Stephan A, Zajul M, Trapp T, Köhler P, Zorn H (2018) Herstellung einer alternativen Proteinquelle auf Basis von Basidiomyceten und technofunktionelle Applikation in glutenfreiem Brot. *Lebensmittelchemie* 72:5

Stephan A, Ahlborn J, Zajul M, Zorn H (2018) Edible mushroom mycelia of *Pleurotus sapidus* as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory tests in comparison to commercial proteins and meat sausages. *Eur Food Res Technol* 244:913–924. Doi: 10.1007/s00217-017-3012-1

Stephan A, Ahlborn J, Zajul M, Mayer F, Koehler P, Zorn H (2018) Techno-functional effects of mycelia of *Pleurotus sapidus* and *Lentinula edodes* in a gluten-free bread system. *Cereal Technology* 03/2018:154-165

Trapp T, Zajul M, Ahlborn J, Stephan A, Zorn H, Fraatz MA (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. Doi: 10.1021/acs.jafc.6b05292

Tagungsbeiträge*Vorträge*

Ahlborn J, Stephan A, Zajul M, Trapp T, Köhler P, Zorn H (2017) Herstellung einer alternativen Proteinquelle auf Basis von Basidiomyceten und technofunktionelle Applikation in glutenfreiem Brot. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Würzburg, Deutschland

Poster

Stephan A, Ahlborn J, Zajul M, Zorn H (2017) Mycelia of *Pleurotus sapidus* and *Lentinula edodes* as functional raw materials in comparison to commercial proteins in a minced meat doner kebab system. 63. International Congress of Meat Science and Technology, Cork, Irland

Stephan A, Zajul M, Ahlborn J, Trapp T, Frettlöh M, Zorn H (2016) Herstellung einer alternativen Proteinquelle durch Submerskultivierung von Basidiomyceten auf industriellen Nebenströmen als Nahrungsmittelrohstoff mit technofunktionellen Applikationen in veganen Modellsystemen wie Brotbelag und veganen Sticks. 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Freising-Weihenstephan, Deutschland

Trapp T, Zajul M, Ahlborn J, Stephan A, Frettlöh M, Fraatz M A, Zorn H (2016) Entwicklung einer alternativen Proteinquelle durch Submerskultivierung von Basidiomyceten auf industriellen Nebenströmen: Aromaprofilanalyse und Untersuchung der Aromastoff-Genese. 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Freising-Weihenstephan, Deutschland

Trapp T, Stephan A, Ahlborn J, Zajul M, Frettlöh M, Zorn H, Fraatz MA (2016) Development of a Meat-substitute based on Biotransformation of Industrial Side-streams by Basidiomycetes: Investigation of Aroma Profiles. 11. Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology, Eisenach, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Danksagung	II
Veröffentlichungen	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis.....	XII
Tabellenverzeichnis.....	XVII
Zusammenfassung.....	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Hintergrund	5
1.2 Alternative Proteinquellen	8
1.2.1 Algen	8
1.2.2 Insekten	9
1.2.3 Pflanzliche Proteine	11
1.2.4 Pilze	12
1.3 Industrielle Nebenströme	13
1.4 Vitamin D in Pilzen	13
1.5 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien	16
2.2 Verwendete Kits	18
2.3 Geräte	19
2.4 Basidiomyceten.....	20

2.5	Substrate.....	20
2.6	Kultivierung der Pilze.....	22
2.6.1	Stammhaltung.....	22
2.6.2	Vorkultur	22
2.6.3	Hauptkultur	23
2.6.4	Gewinnung des Pilzmyzels.....	25
2.6.5	Medienoptimierung	25
2.7	Analysenmethoden.....	26
2.7.1	Bestimmung der Restfeuchte.....	26
2.7.2	Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes	26
2.7.3	Bestimmung des Chitingehaltes	27
2.7.4	Pektin.....	29
2.7.5	Enzymatische Bestimmung frei vorliegender D-Glucose und D-Fructose	34
2.7.6	Enzymatische Bestimmung von Saccharose.....	35
2.7.7	Bestimmung des Aminosäureprofils	35
2.7.8	Berechnung der Kjeldahlfaktoren.....	41
2.7.9	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl.....	42
2.7.10	Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl	43
2.7.11	Berechnung der Proteinqualität	43
2.7.12	Bestimmung freier Aminosäuren	45
2.7.13	Bestimmung des Gesamtfettgehaltes.....	46
2.7.14	Bestimmung des Fettsäureprofils mittels GC-FID	47
2.7.15	Bestimmung der Rohasche	49
2.7.16	Bestimmung des Mineralstoffgehaltes.....	49
2.7.17	Bestimmung der Schwermetalle Blei, Cadmium und Quecksilber.....	50
2.7.18	Biomassenquantifizierung über Ergosterol.....	53
2.7.19	Anreicherung von Vitamin D ₂ im Pilzmyzel.....	58

3	Ergebnisse	64
3.1	Screening verschiedener Pilz-Substrat-Kombinationen	64
3.1.1	Substratzusammensetzung	66
3.1.2	Zusammensetzung der Pilzmyzelien	66
3.2	Upscaling im 150 L Bioreaktor	68
3.3	Medienoptimierung.....	68
3.4	Bestimmung des Chitingehaltes von PSA ATD und ATD.....	70
3.5	Quantifizierung und Charakterisierung des Pektins in PSA ATD und ATD ..	70
3.6	Enzymatische Bestimmung frei vorliegender D-Glucose, D-Fructose und Saccharose in PSA ATD und ATD.....	71
3.7	Aminosäureprofile von PSA ATD und ATD	71
3.7.1	Berechnung der Kjeldahlfaktoren für PSA ATD und ATD	74
3.7.2	Proteinqualität von PSA ATD und ATD.....	75
3.8	Aspartatkonzentration im Kulturüberstand von PSA ATD	77
3.9	Fettsäureprofil von PSA ATD und ATD	78
3.10	Bestimmung des Mineralstoffgehaltes	79
3.11	Bestimmung von Blei, Cadmium und Quecksilber	80
3.12	Biomassenquantifizierung von PSA ATD.....	80
3.12.1	Ermittlung des Bezugswertes	80
3.12.2	Wachstumskurve von PSA auf ATD.....	81
3.12.3	Optimierung des Pilzanteils	82
3.12.4	Quantifizierung des Pilzanteils nach Verringerung des Aspartatgehaltes im Medium.....	84
3.12.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Ergosterol	85
3.13	Anreicherung von Vitamin D ₂ in Pilzmyzel	85
3.13.1	Vitamin D ₂ Gehalte in PSA ATD in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer	85
3.13.2	Einfluss der Oberflächengröße auf die Bildung von Vitamin D ₂	86
3.13.3	Auswirkung des lebenden Myzels auf den Vitamin D Gehalt	86

3.13.4	Lagerstabilität von Vitamin D ₂ in Pilzmyzel.....	87
3.13.5	Belichtung einer Ergosterolstandardlösung	88
3.13.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Vitamin D ₂	90
4	Diskussion.....	91
4.1	Screening, Optimierung der Medien, Upscaling	92
4.2	Zusammensetzung von PSA ATD und ATD.....	93
4.2.1	Aminosäuren.....	94
4.2.2	Freie Aminosäuren	98
4.2.3	C:N-Verhältnisse und deren Einfluss auf Biomasse und Proteingehalt.....	100
4.2.4	Fett und Fettsäureprofil.....	101
4.2.5	Mineralstoffe	102
4.2.6	Schwermetalle	104
4.2.7	Chitin	105
4.2.8	Pektin.....	105
4.2.9	Biomassenquantifizierung und Upscaling.....	107
4.2.10	Anreicherung von Vitamin D ₂ in Pilzmyzel.....	111
5	Fazit	114
6	Literatur.....	115
7	Anhang.....	124
7.1	Chromatogramme zum Aminosäureprofil von PSA ATD.....	124
7.2	Chromatogramme zum Aminosäureprofil von ATD.....	125
7.3	Chromatogramme zum Aminosäureprofil des Referenzproteins.....	127
7.4	Chromatogramme zur Quantifizierung freier Aminosäuren	128
7.5	Chromatogramme zur Bestimmung des Fettsäureprofils mittels GC-FID... ..	131
7.6	Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung mittels Ergosterol.....	133
7.7	Chromatogramme zur Anreicherung von Vitamin D ₂	137

Abkürzungsverzeichnis

7-DHC	7-Dehydrocholesterol
AAE	<i>Agrocybe aegerita</i>
AA _{res}	Proteingebundene Aminosäure (Englisch: amino acid residue)
AAS	Amino Acid Score bzw. Atomabsorptionsspektroskopie
ÄG	Äquivalentgewicht
Apfel	frischer Apfeltrester der Firma Fischer
Aronia	Aroniatrester
ASA	Aminosäureanalysator
AS	Aminosäure
ATD	Apfeltrester der Firma Döhler
AUA	Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt
BG	Bestimmungsgrenze
BS	Blattspinat
BW	Biologische Wertigkeit
CS	Chemical Score
DAD	Diodenarraydetektor
DE	Veresterungsgrad
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAAI	Essentieller Aminosäure Index
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Erdbeschleunigung
GA	Granatapfeltrester
GC	Gaschromatographie
HK	Hauptkultur
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP-OES	Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma
KG	Körpergewicht
LED	<i>Lentinula edodes</i>
LSU	<i>Laetiporus sulphureus</i>

MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon Hydrochlorid Monohydrat
MeO	Methoxy-Gehalt
N	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
n	Anzahl der Messungen
nn	nicht nachweisbar
N _{net}	netto Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
NWG	Nachweisgrenze
PDCAAS	Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
PSA ATD	<i>Pleurotus sapidus</i> kultiviert auf Apfeltrester der Firma Döhler
PSC	<i>Pleurotus sajor-caju</i>
PSS	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
Reg Sol	Regenerierlösung
RM	Rübenmelasse der Firma Südzucker
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SE	Spurenelementlösung
SRU	<i>Stropharia rugosoannulata</i>
TDF	<i>Total dietary fiber</i>
TM	Trockenmasse
UV	Ultraviolettstrahlung
VE	vollentmineralisiert
VK	Vorkultur
vvm	Volumen Luft pro Volumen Fermenter und Minute
w	Massenanteil
WCO	<i>Wolfiporia cocos</i>
WHO	World Health Organization
WI	Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

Proteinogene Aminosäuren wurden nach dem Dreibuchstabencode abgekürzt. Mineralstoffe und weitere Elemente wurden als Elementsymbol nach dem Periodensystem abgekürzt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen von Ergosterol und Vitamin D ₂	14
Abbildung 2: Apfeltrester von Döhler (A), Aroniatrester (B), Granatapfeltrester (C), frischer Apfeltrester von Fischer (D), lyophilisierter und gemahlener Blattspinat (E), Rübenmelasse (F).....	21
Abbildung 3: Kalibriergerade zur Quantifizierung des Gesamtkohlenhydratgehaltes mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay; $y = 0,0062 x + 0,0836$, $R^2 = 0,9940$	27
Abbildung 4: Farbreaktion von 2,5-Anhydrohexosen mit 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon Hydrochlorid Monohydrat (MBTH). Farbkomplex kann bei 650 nm photometrisch quantifiziert werden; nach Tsuji, Kinoshita und Hoshino 1969.....	29
Abbildung 5: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Pektin mittels Pektat-Lyase bei 235 nm; $y = 0,0028x - 0,0029$, $R^2 = 0,9999$	33
Abbildung 6: Standard-Chromatogramm zur Quantifizierung von Aminosäuren bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (440 nm für Prolin, 570 nm für alle weiteren Aminosäuren). $c = 100 \text{ nmol mL}^{-1}$ je Aminosäure, Cystin 50 nmol mL^{-1}	38
Abbildung 7: Standard-Chromatogramm von Tryptophan, $c = 50 \text{ nmol mL}^{-1}$ bei 570 nm.	38
Abbildung 8: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Blei	51
Abbildung 9: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Cadmium	52
Abbildung 10: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Quecksilber.....	53
Abbildung 11: Struktur von Ergosterol (A) und 7-Dehydrocholesterol (B).	54
Abbildung 12: Absorptionsspektrum von Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol in Ethanol: Maxima bei 202, 263, 273, 282 und 294 nm.	55
Abbildung 13: Kalibriergerade Ergosterol. $2,9 - 750 \mu\text{g mL}^{-1}$	57
Abbildung 14: Emissionsspektrum der UV-B Lampen Arimed B 12 9 W (kompakt). Emissionsbereich ca. 275 bis 360 nm mit Emissionsmaximum zwischen ca. 295 und 320 nm. Im Abstand von 10 cm zur Lampe gemessen.	59
Abbildung 15: Struktur von Vitamin D ₂ (A) und Vitamin D ₃ (B).	60
Abbildung 16: Absorptionsspektrum von Vitamin D ₂ und D ₃ in Methanol: 215 und 265 nm.	60
Abbildung 17: Kalibriergerade Vitamin D ₂ . $3,9 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$	61

Abbildung 18: Lyophilisat von <i>Pleurotus sapidus</i> auf Apfeltrester (ATD) für 4 Tage im Schüttelkolben kultiviert.....	65
Abbildung 19: Zusammensetzung der Substrate.....	66
Abbildung 20: Zusammensetzung des Lyophilisats PSA ATD aus dem Schüttelkolben.....	67
Abbildung 21: Zusammensetzung des Lyophilisats PSA ATD aus dem 150 L Bioreaktor.....	68
Abbildung 22: Aminosäureprofil von <i>P. sapidus</i> auf Apfeltrester (Schüttelkolben); n=3.....	72
Abbildung 23: Aminosäureprofil von <i>P. sapidus</i> auf Apfeltrester (Fermenter); n=3... ..	72
Abbildung 24: Aminosäureprofil von Apfeltrester ATD; n=3.....	73
Abbildung 25: Fettsäureprofil von Apfeltrester ATD mittels GC-FID analysiert.....	78
Abbildung 26: Fettsäureprofil von PSA ATD (Schüttelkolben) mittels GC-FID analysiert.....	79
Abbildung 27: Zusammensetzung der Mineralstoffe (Mengenelemente) von ATD und PSA ATD (Fermenter).....	79
Abbildung 28: Zusammensetzung der Mineralstoffe (essentielle Spurenelemente) von ATD und PSA ATD (Fermenter).....	80
Abbildung 29: Wachstumskurve von <i>Pleurotus sapidus</i> (PSA) auf 24,6 g L ⁻¹ Apfeltrester (ATD) über einen Zeitraum von 6 Tagen; bestimmt über den Ergosterolgehalt mittels HPLC-DAD. Kjeldahlfaktoren N _{net} : 4,15 für ATD und 4,11 für Lyophilisat, nach 2.7.8 ermittelt; n = 3.....	82
Abbildung 30: Pilzanteil von <i>Pleurotus sapidus</i> (PSA) auf Apfeltrester (ATD) verschiedener Konzentrationen nach 4 Kultivierungstagen; bestimmt über Ergosterolgehalt mittels HPLC-DAD. Kjeldahlfaktoren N _{net} : 4,11, nach 2.7.8 ermittelt; n = 3.....	83
Abbildung 31: Anteil Pilz-Biomasse (PSA) und Proteingehalt in Medium M1 mit Apfeltrester verschiedener Konzentrationen unter Einsatz von 3,12 g L ⁻¹ Aspartat. Kjeldahlfaktoren N _{net} : 4,11, nach 2.7.8 ermittelt; n=3.....	84
Abbildung 32: Anreicherung von Vitamin D ₂ in <i>Pleurotus sapidus</i> auf Apfeltrester ATD in Abhängigkeit von der Belichtungszeit der lyophilisierten Biomasse.....	85
Abbildung 33: Einfluss verschieden großer Oberflächen auf den Vitamin D ₂ Gehalt einer flüssigen PSA Kultur auf Malzextraktmedium; Belichtungszeit: 10 min.....	86

Abbildung 34: Vergleich der Vitamin D ₂ Gehalte von aktiven und inaktivierten Kulturen von PSA, die auf Malzextraktmedium gewachsen und als flüssige Kultur belichtet wurden.	87
Abbildung 35: Einfluss der Lagerungsdauer bei zwei verschiedenen Temperaturen auf den Vitamin D ₂ Gehalt von belichteten Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i> auf Apfeltrester.	88
Abbildung 36: Abnahme der Ergosterolkonzentration in einer belichteten Standardlösung über einen Zeitraum von 30 min.	89
Abbildung 37: Zunahme der Vitamin D ₂ Konzentration in einer belichteten Ergosterolstandardlösung über einen Zeitraum von 30 min.	89
Abbildung 38: Chromatogramm zur Quantifizierung der Gesamtaminosäuren (570 nm) in PSA ATD (Schüttelkolben). Prolin wurde bei 440 nm quantifiziert.	124
Abbildung 39: Chromatogramm zur Quantifizierung von Cystein und Methionin nach Oxidation in PSA ATD (Schüttelkolben) bei 570 nm.	124
Abbildung 40: Chromatogramm zur Quantifizierung des Tryptophans in PSA ATD (Schüttelkolben) bei 570 nm.	125
Abbildung 41: Chromatogramm zur Quantifizierung der Gesamtaminosäuren (570 nm) in ATD. Prolin wurde bei 440 nm quantifiziert.	125
Abbildung 42: Chromatogramm zur Quantifizierung von Cystein und Methionin nach Oxidation in ATD bei 570 nm.	126
Abbildung 43: Chromatogramm zur Quantifizierung von Tryptophan in ATD bei 570 nm.	126
Abbildung 44: Chromatogramm zur Quantifizierung der Gesamtaminosäuren (570 nm) des Referenzproteins Alpha-Lactalbumin. Prolin wurde bei 440 nm quantifiziert.	127
Abbildung 45: Chromatogramm zur Quantifizierung von Cystein und Methionin nach Oxidation des Referenzproteins Alpha-Lactalbumin bei 570 nm.	127
Abbildung 46: Chromatogramm zur Quantifizierung von Tryptophan im Referenzprotein Alpha-Lactalbumin bei 570 nm.	128
Abbildung 47: Chromatogramm einer 1:4 Verdünnung zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit 24,6 g L ⁻¹ ATD und 6,24 g L ⁻¹ Aspartat im Medium.	128
Abbildung 48: Chromatogramm einer 1:4 Verdünnung zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit 12,3 g L ⁻¹ ATD und 6,24 g L ⁻¹ Aspartat im Medium.	129

Abbildung 49: Chromatogramm einer 1:4 Verdünnung zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit 6,15 g L ⁻¹ ATD und 6,24 g L ⁻¹ Aspartat im Medium.....	129
Abbildung 50: Chromatogramm zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit 24,6 g L ⁻¹ ATD und 3,12 g L ⁻¹ Aspartat im Medium.	130
Abbildung 51: Chromatogramm zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit 12,3 g L ⁻¹ ATD und 3,12 g L ⁻¹ Aspartat im Medium.	130
Abbildung 52: Chromatogramm zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit 6,15 g L ⁻¹ ATD und 3,12 g L ⁻¹ Aspartat im Medium.	131
Abbildung 53: Alkanreihe (C10 bis C30).	131
Abbildung 54: Fettsäuremethylester-Standard.	132
Abbildung 55: Fettsäureprofil von ATD.....	132
Abbildung 56: Fettsäureprofil von PSA ATD.....	133
Abbildung 57: Ausschnitt übereinandergelegter Chromatogramme zur Kalibrierung des Ergosterols für die Biomassenquantifizierung. Mischstandard aus Ergosterol (2,9 – 750 µg mL ⁻¹) und 7-Dehydrocholesterol (500 µg mL ⁻¹). Retentionszeiten: 30,0 min Ergosterol, 31,5 min 7-DHC bei 282 nm.....	133
Abbildung 58: Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung über Ergosterol (Ermittlung des Bezugswertes, 3.12.1. A: PSA MEM, B: PSA M1, C: PSA ATD ausgekocht. Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm. .	134
Abbildung 59: Chromatogramme zur Wachstumskurve von PSA ATD (3.12.2). A: Blindwert Medium, B: Tag 0, C: Tag 1, D: Tag 2, E: Tag 3, F: Tag 4, G: Tag 5, H: Tag 6. Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.	135
Abbildung 60: Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung von PSA ATD mit verschiedenen Apfeltresterkonzentrationen im Medium. A: 6,15 g L ⁻¹ , B: 12,3 g L ⁻¹ , C: 24,6 g L ⁻¹ . Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.	136
Abbildung 61: Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung von PSA ATD mit 50% weniger Aspartat im Medium und verschiedenen Apfeltresterkonzentrationen. A: 6,15 g L ⁻¹ , B: 12,3 g L ⁻¹ , C: 24,6 g L ⁻¹ . Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.	136
Abbildung 62: Ausschnitt übereinandergelegter Chromatogramme zur Kalibrierung des Vitamin D ₂ . Mischstandard aus Vitamin D ₂ (3,9 – 250 µg mL ⁻¹) und Vitamin D ₃ (100 µg mL ⁻¹). Retentionszeiten: 20,6 min Vitamin D ₂ , 21,5 min Vitamin D ₃ bei 265 nm.	137

Abbildung 63: Chromatogramme belichteter PSA ATD Proben mit unterschiedlichen Belichtungszeiten: A: 0 min, B: 1 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 20 min, F: 45 min. Retentionszeiten: 20,6 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃ bei 265 nm. 138

Abbildung 64: Ausschnitte von Chromatogrammen einer belichteten Ergosterolstandardlösung. A: 0 min, B: 1,5 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 30 min Belichtung. Retentionszeiten: 20,7 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃, 30,0 min Ergosterol, 31,5 min 7-DHC bei 265 nm..... 139

Abbildung 65: Ausschnitte von Chromatogrammen einer belichteten Ergosterolstandardlösung. A: 0 min, B: 1,5 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 30 min Belichtung. Retentionszeiten: 20,7 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃, 30,0 min Ergosterol, 31,5 min 7-DHC bei 282 nm..... 140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.....	16
Tabelle 2: Verwendete Kits.....	18
Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte.	19
Tabelle 4: Für das Screening verwendete Basidiomyceten.....	20
Tabelle 5: Verwendete Substrate und deren Abkürzung.	21
Tabelle 6: Auf verschiedenen Substraten kultivierte Pilze.	22
Tabelle 7: Zusammensetzung Medium M1.....	23
Tabelle 8: Zusammensetzung der steril-filtrierte Spurenelementlösung.....	23
Tabelle 9: Zur Medienoptimierung verwendete Variationen von Medium M1.....	25
Tabelle 10: Pipettierschema zur enzymatischen Pektin-Quantifizierung.	33
Tabelle 11: Geräteparameter zu Bestimmung des Aminosäureprofils.	36
Tabelle 12: Einstellungen zur Bestimmung von Tryptophan mittels Kurzmethode	37
Tabelle 13: Zusammensetzung des Citratpuffers zur Aminosäurebestimmung.....	40
Tabelle 14: Zusammensetzung des von der FAO/WHO 1973 festgelegten Referenzproteins.	44
Tabelle 15: Parameter der halbautomatischen Soxtherm-Apparatur SE-416.....	47
Tabelle 16: Parameter des Gaschromatographen zur Bestimmung des Fettsäureprofils.....	48
Tabelle 17: Zur Quantifizierung der Mineralstoffe verwendete Emissionswellenlängen.....	49
Tabelle 18: AAS-Temperaturprogramm zur Bestimmung von Blei.....	51
Tabelle 19: AAS-Temperaturprogramm zur Bestimmung von Cadmium.....	52
Tabelle 20: HPLC-DAD Parameter zur Bestimmung von Ergosterol.....	56
Tabelle 21: Screening verschiedener Pilze auf Reststoffströmen.	65
Tabelle 22: Ergebnisse der Medienoptimierung bei PSA Apfel; n=2.	69
Tabelle 23: Ergebnisse der Medienoptimierung bei PSA ATD. SE: Spurenelementlösung; n=2.	69
Tabelle 24: Ergebnisse der Medienoptimierung bei PSA mit ATD in VE-Wasser für drei verschiedene Kultivierungsdauern; n=2.	70
Tabelle 25: Charakterisierung des Pektins aus ATD.....	70

Tabelle 26: Pektingehalte von PSA ATD und ATD über photometrischen Assay bestimmt; n=2.....	71
Tabelle 27: Gehalte an frei vorliegender D-Glucose, D-Fructose und Saccharose; n=2.....	71
Tabelle 28: Daten zur Berechnung der Kjeldahlfaktoren. AS: Summe aller Aminosäuren, AA _{res} : Summe der proteingebundenen Aminosäuren nach Abzug der Molekülmasse von Wasser.....	74
Tabelle 29: Daten zur Proteinqualität von <i>Pleurotus sapidus</i> auf ATD (150 L Bioreaktor). AS: Aminosäure, AAS: Amino Acid Score, CS: Chemical Score, EAAI: Essentieller Aminosäure Index; n= 3.....	75
Tabelle 30: Daten zur Proteinqualität von <i>Pleurotus sapidus</i> auf ATD (Schüttelkolben). AS: Aminosäure, AAS: Amino Acid Score, CS: Chemical Score, EAAI: Essentieller Aminosäure Index; n= 3.....	76
Tabelle 31: Daten zur Proteinqualität von Apfeltrester. AS: Aminosäure, AAS: Amino Acid Score, CS: Chemical Score, EAAI: Essentieller Aminosäure Index; n= 3.	77
Tabelle 32: Nach Kultivierung von PSA auf ATD verschiedener Konzentrationen im Kulturüberstand nachgewiesene Aspartatkonzentrationen. SD: Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.....	78
Tabelle 33: Ergosterolgehalte von <i>P. sapidus</i> zu verschiedenen Wachstumsstadien; BW: Blindwert mit Medium und Apfeltrester; SD: Standardabweichung; n=3.....	82
Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergosterolgehalte bei verringerter Apfeltresterkonzentration und Fed-Batch-Verfahren. SD: Standardabweichung; n=3.	84
Tabelle 35: Vergleich der Zusammensetzung von Myzel und Fruchtkörper (FK) aus der Literatur.....	93
Tabelle 36: Vergleich der Apfeltrester-Zusammensetzung mit Literaturwerten.	94
Tabelle 37: Wiederfindungsraten (WF) der Aminosäuren (AS) im Referenzprotein Alpha-Lactalbumin; SD: Standardabweichung.	97
Tabelle 38: C:N-Verhältnisse der verwendeten Medien.	100

Zusammenfassung

Im Zuge der stetig wachsenden Weltbevölkerung muss nach alternativen Nahrungsquellen geforscht werden, um den Kalorien- und Proteinbedarf der Bevölkerung decken zu können. Innovative Lebensmittel sollten nicht nur ressourcenschonend produziert werden, sondern auch der Nachfrage der Bevölkerung nach gesunden und nachhaltigen Lebensmitteln gerecht werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, anfallende Nebenströme der Lebensmittelindustrie zu verwenden und als Kohlenstoffquelle für das Wachstum von Basidiomyceten (Speisepilze) zu verwenden. Das durch Submerskultivierung erzeugte Myzel sollte proteinreich und schnell zu produzieren sein, um es als alternative Proteinquelle für die Herstellung von veganen oder vegetarischen und innovativen Lebensmittel in der menschlichen Ernährung verwenden zu können.

Zu Beginn wurden verschiedene Pilz-Substrat-Kombinationen auf die erzeugte Biomasse und den Proteingehalt hin untersucht. Als Substrate wurden verschiedene Trester (Apfel, Granatapfel und Aronia), Blattspinat und Rübenmelasse untersucht, sowie acht verschiedene Basidiomyceten. *Pleurotus sapidus*, der für vier Tage auf Apfeltrester kultiviert wurde, lieferte mit etwa 14 g L^{-1} die höchste Biotrockenmasse; der Reinproteingehalt betrug 21%. Das Produkt wurde lyophilisiert und für alle weiteren Analysen eingesetzt. Im Verlaufe der Arbeit wurde dieses Lyophilisat auf seine Zusammensetzung hin untersucht: 4% Fett (davon 45% Linolsäure als Hauptfettsäure), 2% Asche und 74% Kohlenhydrate. Die Analyse des Chitingehaltes ergab 6,3%. Das Aminosäureprofil wurde eingehend untersucht und nicht nur der durchschnittliche Proteinstickstoffgehalt (17,9%) analysiert, sondern auch der Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor N_{net} (4,11) ermittelt, der bei der Berechnung des Reinproteingehaltes Verwendung findet. Mit einem Wert von 86 wies das Lyophilisat eine sehr gute biologische Wertigkeit auf, mit Cystein und Methionin als limitierende Aminosäuren. Wiederfindungsraten der Aminosäuren wurden über die Analyse eines Referenzproteins mit bekannter Zusammensetzung ermittelt. Der Einfluss des C:N-Verhältnisses auf die Proteinbildung wurde ebenfalls diskutiert. Demnach kann ein hoher Stickstoffanteil unter Umständen zu höheren Proteinausbeuten führen.

Eine Maßstabsvergrößerung im 150 L Bioreaktor konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die hohe Biomasse konnte aufrechterhalten werden, wohingegen das Myzel 20% weniger Protein enthielt.

Um den reinen Pilzanteil am Lyophilisat zu quantifizieren, wurde eine Biomassenquantifizierungsmethode über die Bestimmung des Ergosterolgehaltes mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) etabliert. So konnte festgestellt werden, dass das analysierte Lyophilisat lediglich etwa 50% Myzel enthielt. Zahlreiche Versuche wurden durchgeführt, um diesen Anteil zu steigern. Ein Fed-Batch-Verfahren lieferte letztendlich 89% Pilzanteil mit $5,4 \text{ g L}^{-1}$ Trockenmasse nach sechstägiger Kultivierung mit $6,15 \text{ g L}^{-1}$ Apfeltrester und erneuter Substratzugabe nach vier Tagen. Reines Pilzmyzel, das als Bezugswert zur Berechnung des Pilzanteils herangezogen wurde und auf Malzextraktmedium kultiviert wurde, wies einen Ergosterolgehalt von $(7.147,5 \pm 353,7) \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ auf.

Ergosterol diene nicht nur als Biomarker, sondern auch als Präkursor für die Anreicherung mit Vitamin D₂, die durch UV-B Belichtung erzielt wurde. Die Gehalte an Ergosterol und Vitamin D₂ wurden mittels HPLC analysiert. Verschiedene Studien zeigten, dass es nach 10- bis 20-minütiger Belichtung zu einer Stagnation bei der Anreicherung kam. Im belichteten Lyophilisat von *P. sapidus* auf Apfeltrester konnten so bis zu $115 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ Vitamin D₂ erzielt werden. Neben verschiedenen Belichtungszeiten wurden auch Messreihen mit aktivem und hitzeinaktiviertem Myzel in vollständiger Submerskultur durchgeführt. Weiterhin wurden der Einfluss der Oberfläche und die Lagerstabilität von belichtetem Lyophilisat untersucht.

Abstract

As the world's population continues to rise, alternative nutritional food sources need to be developed to meet the increasing global protein demand. Innovative food should not only be produced in a time and resource efficient way, but should also meet the society's demand of being healthy and sustainable. The aim of this work was thus to produce protein rich basidiomycetes (edible mushrooms) via submerged cultivation, while making use of by-products of the food industry as sole carbon source. The product (fungal mycelium) obtained from the submerged cultivation could then qualify as an alternative source of protein for the production of vegan/vegetarian foods to be used for human nutrition.

Various fungus-substrate combinations were screened for biomass production and protein content. As substrates, different pomaces (apple, pomegranate and aronia), leaf spinach and beet molasses were investigated. Eight different basidiomycetes, including *Pleurotus sapidus*, were tested. *P. sapidus* grown on apple pomace provided the best results. The product obtained from the submerged fermentation from these cultures was lyophilised and used for further experiments. After four days of submerged cultivation, 14 g L⁻¹ dry biomass with a pure protein content of 21% was obtained. The lyophilisate was analysed for its chemical composition: 4% fat with 45% linoleic acid as the main fatty acid, 2% ash and 74% carbohydrates including 6.3% chitin. The amino acid profile was examined in detail. The average nitrogen content of the protein (17.9%) was analyzed. A nitrogen-to-protein conversion factor, N_{net} (4.11), was calculated to determine pure protein contents. With a value of 86, the lyophilisate showed a high biological value, with cysteine and methionine as limiting amino acids. Recovery rates of the amino acids were determined by analysis of a reference protein of known composition. The influence of the C:N ratio on the protein content was also evaluated, and a high nitrogen content may lead to higher protein yields.

Upscaling to a 150 L bioreactor was successfully performed. High biomass production could be achieved, whereas the mycelium contained 20% less protein.

In order to quantify the fungal content of the lyophilisate, a high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established to determine the ergosterol

content of the biomass. The lyophilisate obtained from a 4 day submerged cultivation of *Pleurotus sapidus* grown on apple pomace contained only about 50% fungal mycelium. Numerous attempts were made to increase this proportion. Finally, a fed-batch process yielded 89% fungal content with 5.4 g L⁻¹ dry matter after six days of cultivation. The initial concentration of apple pomace in the culture medium was 6.15 g L⁻¹. After four days another 6.15 g L⁻¹ were added. Pure mushroom mycelium cultured in malt extract medium was used as a reference for calculating the fungal content. The reference mycelium had an ergosterol content of (7147.5 ± 353.7) µg (g dry matter)⁻¹.

Ergosterol did not only serve as a biomarker, but also as a precursor for vitamin D₂. Vitamin D production was achieved by exposure of the mycelia to UV-B light. Various experiments showed stagnation after 10 to 20 minutes of exposure. In the exposed lyophilisate of *P. sapidus* cultivated on apple pomace, up to 115 µg (g dry matter)⁻¹ vitamin D₂ were formed. In addition to different exposure times, a series of measurements with heat-inactivated submerged cultures, the influence of surface area and storage stability of the UV-B exposed lyophilisate, on vitamin D₂ accumulation were investigated.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Im Jahr 2015 lebten laut einer Schätzung der Vereinten Nationen rund 7,4 Milliarden Menschen auf der Erde (United Nations 2017). Weiterhin geht diese Schätzung davon aus, dass im Jahr 2100 bis zu 16,5 Milliarden Menschen die Erde bevölkern werden. Als Grund hierfür nennen die Vereinten Nationen einerseits die große Diskrepanz zwischen Geburten- und Sterberate (141 Millionen Geburten vs. 57 Millionen Todesfälle im Jahr 2015) und andererseits die steigende Lebenserwartung. So lag im Jahr 2014 die durchschnittliche Lebenserwartung bei 71,19 Jahren, in 2099 könnte sie bei 82,75 Jahren liegen. 1950 betrug die Lebenserwartung gerade einmal 45,78 Jahre (United Nations 2017).

Mit einer wachsenden Weltbevölkerung geht auch ein steigender Bedarf an Lebensmitteln einher. Die Nahrungsmittelproduktion führt ihrerseits wieder zu einem hohen Verbrauch an natürlichen Ressourcen wie Land und Wasser. Die Erdoberfläche besteht zu 29% aus Landfläche, dies entspricht 149 Millionen km². Nur 104 Millionen km² sind bewohnbar, wovon 51 Millionen km² auf landwirtschaftliche Nutzflächen entfallen. Diese wiederum werden zu 77% (40 Millionen km²) für Nutztiere und nur zu 23% (11 Millionen km²) für Nutzpflanzen verwendet (Our World in Data (OWID) 2018, WWF 2016).

Der Kalorienbedarf eines Menschen wird weltweit nur zu 17% über Fleisch und Milchprodukte gedeckt, 83% über pflanzliche Lebensmittel. Fleisch und Milch liefern lediglich 33% des täglichen Proteinbedarfs, demzufolge werden im Durchschnitt weltweit 67% des Proteinbedarfs über pflanzliche Nahrungsmittel gedeckt (OWID 2018, WWF 2016). Da nur 23% der Nutzflächen für die Produktion pflanzlicher Nahrungsmittel eingesetzt werden, steht dies im Missverhältnis zur eigentlich benötigten, höheren Produktion von pflanzlichen Nahrungsmitteln. In den westlichen Ländern liegt das Verhältnis zur Deckung des Proteinbedarfs eher auf Seiten der tierischen Lebensmittel. In Deutschland standen 2013 pro Tag und Kopf 102 g Protein zur Verfügung, wovon 61% tierischen Ursprungs und lediglich 39% pflanzlichen Ursprungs waren (OWID 2018, FAO 2017). Die

Proteinversorgung mit 102 g/Tag/Kopf in Deutschland spiegelt den europäischen Durchschnitt exakt wider. Der Weltdurchschnitt lag im Jahr 2013 bei ca. 81 g/Tag. Afrika besaß die schlechteste Versorgung mit 69 g/Tag/Kopf, gefolgt von Asien mit 78 g/Tag/Kopf (OWID 2018). Die durchschnittliche Proteinversorgung in den Jahren 1961 bis 2013 stieg von 61 auf 81 g Protein pro Tag und Kopf an (OWID 2018). Diese Werte zeigen jedoch nicht die wahren Verzehrsmengen auf, sondern lediglich das, was theoretisch zur Verfügung stehen würde. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt eine tägliche Proteinzufuhr von 0,8 g/kg Körpergewicht (KG) für Erwachsene im Alter von 19-65 Jahren. Für einen 70 kg schweren Erwachsenen würde dies eine Proteinzufuhr von 56 g/Tag bedeuten. Bei über 65-jährigen liegt ein Schätzwert von 1 g/kg KG/Tag vor. Auch Kinder und Jugendliche benötigen laut DGE 0,8 – 1 g/kg KG/Tag, Säuglinge sogar zwischen 1,3 – 2,5 g/kg KG/Tag. Demzufolge liegt eigentlich kein Proteinmangel in der Welt vor, sondern es herrscht ein Verteilungs-, Nutzungs- und Wegwerfproblem, da theoretisch 81 g Protein pro Kopf und Tag zur Verfügung stehen, aber nur 56 g pro Tag benötigt werden. Typische Proteinmangel-Syndrome sind Wachstumsstörungen, Haarausfall, ein geschwächtes Immunsystem und Muskelabbau (Marasmus), sowie Kwashiorkor. Kwashiorkor ist eine Proteinmangelkrankheit, die vorwiegend bei Kleinkindern auftritt, die von der Muttermilch entwöhnt wurden (Williams, Oxon und Lond 1935).

Einen wichtigen Faktor in der Ernährung stellt nicht nur die Protein- sondern auch die Kalorienzufuhr dar. Auch bei Betrachtung der Kalorienverteilung ist weltweit eigentlich kein Mangel zu erwarten; dennoch leiden viele Millionen Menschen Hunger. Sogar in Afrika stehen theoretisch über 2.600 kcal/Tag/Kopf zur Verfügung, benötigt werden laut DGE für 25-51 Jahre alte Männer 2.300 kcal bzw. 1.800 kcal bei Frauen. Die Spannweite der theoretisch zur Verfügung stehenden Kalorien in den Entwicklungsländern und den westlichen Ländern verringert sich zusehends. Auch hier wird das Verteilungsproblem deutlich.

Die weltweite Fleischproduktion spiegelt sich auch in der Verwestlichung der Länder wider. Im Jahre 1961 betrug die Fleischproduktion weltweit 71 Millionen Tonnen. Seither steigt der Fleischkonsum stetig an, sodass die Fleischproduktion im Jahre 2014 bereits 318 Millionen Tonnen betrug (OWID 2018, FAO 2017). In Deutschland war der pro Kopf Fleischverbrauch mit etwa 60 kg pro Jahr in den

letzten Jahren recht konstant, 2017 waren darunter 36 kg Schweinefleisch, 12 kg Geflügel und 10 kg Rind/Kalb (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung 2018).

Die hohe Nachfrage nach tierischem Eiweiß führt nicht nur zu einem enormen Land- und Wasserverbrauch, sondern auch zu hohen Treibhausgasemissionen wie CO₂ und Methan. Der hohe Fleischbedarf kann aufgrund der knappen Ressourcen bei der rasant ansteigenden Weltbevölkerung nicht mehr gedeckt werden. Eine nachhaltige und sichere Versorgung mit hochwertigen Proteinen ist daher enorm wichtig. Da der Mensch schon immer Fleisch verzehrt hat und dies wahrscheinlich nicht vollständig aufgeben wird, sind schmackhafte, gesunde und nachhaltig erzeugte alternative Proteinquellen von großer Bedeutung. Aufgrund der steigenden Weltbevölkerung werden alternative Proteinquellen den Fleischkonsum wahrscheinlich nicht deutlich senken können, aber sie können die Nahrungsgrundlage für die zusätzliche Anzahl an Menschen bilden, sodass sie eine zur Fleischproduktion zusätzliche Proteinquelle bilden.

Neben den offensichtlichen Gründen des Landmangels zur Deckung der benötigten Nahrungsmittelmengen und der Klimaerwärmung durch Treibhausgase, gibt es noch eine Vielzahl andere Gründe, warum alternative Proteinquellen von großer Bedeutung sind. Neben religiösen Gründen, die den Verzehr von bestimmten Fleischsorten untersagen (koscher, halal), spielen auch ethische Aspekte eine Rolle. Durch die hohe Fleischnachfrage werden Tiere in Massentierhaltung gehalten, sodass das Tierwohl darunter leidet. Die vegetarische Verbrauchergruppe will zwar auf fleischfreie Waren zurückgreifen, aber nicht unbedingt auf den Fleischgeschmack verzichten. Da auch Milchkühe und Hennen in Massen gehalten werden, verzehren Veganer auch keinerlei tierische Produkte wie Milch und Ei. Der zurzeit im Trend liegende Flexitarier verkörpert wahrscheinlich das Optimum einer gesunden und nachhaltigen Ernährungsweise. Flexitarier verzehren nur wenig, dafür aber ausgewähltes Fleisch und ernähren sich überwiegend von pflanzlichen, aber auch von tierischen Produkten. Ein weiterer Grund für die Reduzierung des Fleischkonsums ist die eigene Gesundheit. Ein zu hoher Fleischkonsum, insbesondere von verarbeitetem Fleisch, kann zu Herzkrankheiten, Schlaganfällen oder Diabetes führen (Micha, Wallace und Mozaffarian 2010). Als (fleischfreie) Alternativen werden nicht nur

Pflanzenproteine, sondern auch Algen, Insekten und Pilze in Betracht gezogen und teilweise bereits auf dem Markt gehandelt. Im Folgenden werden die möglichen Alternativen näher erläutert.

1.2 Alternative Proteinquellen

1.2.1 Algen

Bei Algen, die als alternative Proteinquelle diskutiert werden, handelt es sich in den meisten Fällen nicht um Makroalgen, die mit bloßem Auge sichtbar und aus den Weltmeeren bekannt sind, sondern um Mikroalgen: mikroskopisch kleine, einzellige Lebewesen, die Photosynthese betreiben können. Bereits seit den frühen 50iger Jahren wird an der Massenproduktion von Mikroalgen geforscht. Auf dem heutigen Markt lassen sich sowohl Produkte finden, die aus ganzen, getrockneten Algen bestehen, sowie extrahierte Produkte wie β -Carotin, Omega-3-Fettsäuren und Astaxanthin (Enzig *et al.* 2014). Dabei werden sie als „Superfood“ und Nahrungsergänzungsmittel geführt. 30% der weltweiten Algenproduktion werden als sojafreies Tierfutter, vor allem für Geflügel- und Fischzucht, verwendet (Becker 2007). Obwohl einige Mikroalgen-Spezies (z. B. *Chlorella* sp. oder *Spirulina* sp.) eine hervorragende Nährstoffzusammensetzung haben (bis zu 50-60% Protein mit allen essentiellen Aminosäuren, bis zu 20% Fett, viele Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente), verhindert die cellulosehaltige Zellwand den Verdau der Algen beim Menschen (Becker 2007). Eine Nachbehandlung ist daher von Nöten, um die Zellwand aufzuschließen und so den Verdau der Inhaltsstoffe zu erleichtern. Weitere Nachteile der Verwendung von Algen als alternative Proteinquelle sind sowohl der Geschmack und die Farbe als auch der Geruch. Nur geringe Algenmengen können in Lebensmitteln eingesetzt werden, ohne dass der leicht fischige Geruch/Geschmack und die Farbe die Sensorik beeinflussen (Becker 2007). Verwendung finden vor allem *Chlorella* sp. und *Spirulina* sp. mit Produktionsvolumina von 5.000 bzw. 2.000 Tonnen Trockenmasse (TM) pro Jahr (Enzig *et al.* 2014). Die Produktionskosten für Mikroalgen fallen je nach Art der Anlage unterschiedlich aus. Die drei häufigsten Anlagen sind teichähnliche Anlagen, flache Bioreaktoren und horizontale oder vertikale Röhrensysteme. Letztere sind die produktivsten Anlagen mit Produktionskosten von 4,15 Euro/kg TM (Norsker *et al.* 2011).

In Deutschland, in der Nähe von Bremen, liegt die erste europäische Bio-Algenfarm (Evergreen-Food), die ihre Produkte unter dem Namen „Lüttge“ vertreibt. Neben Gourmet-Produkten wie Algen-Öl und Algenperlen in zwei verschiedenen Geschmacksrichtungen, sind auch Algenpulver und Algenkapseln erhältlich. Laut eigenen Angaben erfolgt die Kultivierung einer Vorkultur von *Chlorella vulgaris* zuerst im Labormaßstab. Diese wird dann zur Produktion einer Starterkultur in einem vertikalen Schlauchsystem verwendet, mit Hilfe derer dann die Massenproduktion in einem 30.000 L Becken beginnt, das kontinuierlich geerntet wird.

1.2.2 Insekten

Obwohl Insekten schon seit Generationen vor allem in Asien, Afrika und Südamerika verzehrt werden, herrscht in den westlichen Ländern eine starke Abneigung gegenüber Insekten als Nahrungsmittel. Hierzulande werden Insekten wie Heuschrecken, Motten oder Fliegen eher als Schädlinge betrachtet und die Hemmschwelle sie zu verzehren ist groß. Weltweit sind jedoch 2.111 als essbar registrierte Insektenarten bekannt (Jongema 2017). Heuschrecken und Larven von Schmetterlingen und Käfern zählen zu den am häufigsten verzehrten Insektenarten (Mitsuhashi 2010). Insekten können, je nach Art, Entwicklungsstadium und Nahrungsgrundlage, sehr kalorienreich, sowie protein-, fett-, vitamin- und mineralstoffreich sein. Rumpold und Schlüter (2013) listeten eine Vielzahl an Insekten nach Artzugehörigkeit auf und fassten z. B. die durchschnittlichen Proteingehalte in der Trockenmasse zusammen: Käfer 41%, Fliegen 50%, Grillen 61%, Motten 45%, Termiten 35%, Ameisen 46%, Wanzen 48%, Raupen 41%. Mit 20-30% in Trockenmasse ist auch der Lipidgehalt recht hoch.

Ein hoher Proteingehalt alleine reicht jedoch zur Bewertung der alternativen Proteinquelle nicht aus. Einerseits sollte das Aminosäurespektrum eine für den Menschen gute Verteilung aufweisen, viele essentielle Aminosäuren enthalten und beim Vergleich mit einem von der FAO festgelegten Referenzprotein keine gravierenden Unterschiede aufweisen. Andererseits werden Tierstudien benötigt, bei denen die Stickstoffbilanz und die Stickstoffretention ermittelt werden. Denn

ein hoher Fasergehalt, wie es z. B. bei Insekten der Fall ist, verringert die Verdaubarkeit des Proteins und damit die biologische Wertigkeit.

Belluco *et al.* (2013) stellt in einem Review weitere mögliche Nachteile dar: die Übertragung von Krankheitserregern und Mykotoxinen. Vor allem der Rohverzehr von Insekten birgt ein erhöhtes Risiko für mikrobiologische Kontaminationen wie z. B. *Enterobacteriaceae*. Empfohlen wird daher kurzes Kochen und anschließendes Rösten vor dem Verzehr und eine Lagerung bei Kühlschranktemperaturen, um das Risiko einer Kontamination zu verringern. Neben mikrobiellen Kontaminationen können auch essbare Insekten als Überträger von Parasiten wie Toxoplasma-Erreger und Sarkosporidien fungieren. Auch bei der Verarbeitung und dem Transport von Insekten ist, wie bei vielen Lebensmitteln, Vorsicht geboten, da z. B. falsches Lagern zur Bildung von Mykotoxinen führen kann. Neben diesen Risiken wird noch auf einen weiteren wichtigen Faktor hingewiesen: Allergien. In China kommt es nach dem Verzehr von Seidenraupen häufiger zu allergischen Reaktionen (Belluco *et al.* 2013). Das allergische Potential ist in der westlichen Welt noch nicht vollständig absehbar, da es mit einer vermehrten Insektenaufnahme auch zu einer Sensibilisierung gegenüber Insekten kommen kann. Ebenso können Kreuzreaktionen mit anderen Arthropoden wie Krebstieren auftreten. Eine eindeutige Kennzeichnung von Insekten in Lebensmitteln ist daher von großer Bedeutung.

Neben den beschriebenen Risiken besitzen Insekten jedoch auch viele Vorteile, weswegen sie auch als alternative Nahrungsmittelquelle in Betracht kommen. Die Produktion von Insekten benötigt keinerlei landwirtschaftliche Nutzflächen und Insektenfarmen können platzsparend in die Höhe gebaut werden. Dies führt wiederum zur Massentierhaltung, welche Konsumenten, die aus ethischen Gründen auf alternative Nahrungsmittel zurückgreifen möchten, ablehnen. Für die Produktion von 1 kg Protein aus *Tenebrio molitor* (Mehlwurm) werden jedoch nur 10% der Fläche zur Produktion von 1 kg Protein aus Rindfleisch benötigt (Oonincx und de Boer 2012). Darüber hinaus sind 80% des Insekts essbar, wohingegen bei einem Rind nur 40%, bei Schwein und Huhn nur 55% essbar sind (van Huis 2013). Die Umsetzungsrate des Futters in Lebendmasse ist bei Insekten mit 2,1 kg Futter pro 1 kg Lebendgewicht (van Huis 2013) deutlich günstiger als bei Rind, Schwein und Huhn (25 kg, 9,1 kg bzw. 4,5 kg). Da Insekten omnivor sind,

sind sie sehr anspruchslos, was die Nahrungsquelle betrifft. Theoretisch könnten sie sich auch von Abfällen ernähren. Dies birgt allerdings wieder Risiken wie Infektionsgefahr und Anreicherung von Rückständen und Schadstoffen in der Nahrungskette in sich. Außerdem ist die Kundenakzeptanz von solchen Produkten in westlichen Ländern gering.

Die Abneigung, Insekten zu verzehren, würde sich laut Tao und Li (2018) reduzieren, sobald Insekten nicht mehr als solche zu erkennen sind. Daher werden zurzeit z. B. Insektenmehle vertrieben, aber auch Extrudate aus einer Reismehl-Insektenmehl-Mischung. Im Internet können auch ganze Insekten erstanden werden, die zurzeit allerdings noch sehr teuer sind. Heuschrecken, Mehlwürmer und Co der Firma SnackInsekt kosteten bei Amazon im Oktober 2019 zwischen 179 und 863 Euro pro Kilogramm. Auch Insektenmehl ist erhältlich und kostet 99,50 Euro/kg (gemahlene Buffalowürmer von Snack Insects im Oktober 2019 bei Amazon). Dass ein Umdenken in den Essgewohnheiten stattfinden muss, bewegte auch das Großunternehmen Ikea dazu an Alternativen auf Insektenbasis zu forschen. Im März 2018 wurde in der Presse bekannt, dass Ikea Insekten-Köttbullar und Frikadellen aus Mehlwürmern getestet hatte (Berliner Morgenpost 2018).

1.2.3 Pflanzliche Proteine

Pflanzliche Nahrung bzw. pflanzliche Proteine decken den Großteil des Energiebedarfs, denn Fleisch liefert lediglich 15% der benötigten Energie (Herrero *et al.* 2016). Als alternative Proteinquellen werden vor allem Leguminosen wie Lupinen, Ackerbohnen, Linsen und Kichererbsen, aber auch Sonnenblumen und Entengrütze (kleine Wasserlinse) diskutiert. Allen Alternativen ist gemein, dass sie einen zu anderen pflanzlichen Lebensmitteln vergleichsweise hohen Proteingehalt besitzen. Linsen und Erbsen verschiedener Art besitzen umgerechnet etwa 30% Protein in der Trockenmasse (Iqbal *et al.* 2006). Auch Lupinen besitzen mit 29-46% Protein einen hohen Proteingehalt (Hove 1974; Sujak, Kotlarz und Strobel 2006). Der Landverbrauch bei pflanzlichen Proteinquellen ist 50-fach niedriger als bei der Rindfleischproduktion; Treibhausgase werden sogar 100-fach weniger ausgestoßen (Herrero *et al.* 2016). Ob pflanzliche, alternative Proteinquellen eine sinnvolle Lösung zur

Nahrungsmittelversorgungsproblematik der Zukunft darstellen, bleibt zu klären. In Zeiten des Klimawandels müssten ständig neue Anbaugelände erschlossen werden und neue Sorten, die bei den gegebenen Bedingungen wachsen und gedeihen können, gezüchtet werden. Um eine Auslaugung der Ackerböden zu verhindern und um künftige Ernteerträge zu sichern, müssen den Böden auch wieder Nährstoffe zugeführt werden, die ihnen durch intensiven Pflanzenanbau entzogen wurden.

1.2.4 Pilze

Ein großer Vorteil bei der Verwendung von Pilzen als alternative Proteinquelle gegenüber Insekten oder Algen ist die große Akzeptanz in der Bevölkerung. Pilze, d.h. die oberirdisch wachsenden Fruchtkörper, werden schon seit Jahrhunderten zur Ernährung, aber auch in der Medizin eingesetzt. Zahlreiche fermentierte Lebensmittel wie Tempeh, Sojasauce und Miso sind auf der ganzen Welt verbreitet und akzeptiert. Neuesten Schätzungen zufolge gibt es zwischen 2,2 und 3,8 Millionen verschiedene Spezies (Hawksworth und Lücking 2017). Viele Pilze sind nicht nur wohlschmeckend, sondern auch fett- und kalorienarm und gleichzeitig reich an Ballaststoffen wie β -Glucanen und Chitin. In der eukaryotischen Domäne der Pilze gibt es ca. 30.000 verschiedene Basidiomyceten, zu denen die meisten Speisepilze zählen. Bereits auf dem Markt erhältliche Produkte wie Quorn™ (Marlow Foods) enthalten den Schimmelpilz *Fusarium venenatum*, der jedoch zu den Ascomyceten zählt, die für Toxine wie Patulin, Aflatoxine oder Fumonisine bekannt sind. Quorn™ weist zwar einen sehr hohen Proteingehalt auf (48% der Trockenmasse, Rodger 2001), als Bindemittel wird allerdings Hühnereieweiß eingesetzt, sodass diese Produkte nicht für Veganer und bestimmte Allergiker geeignet sind.

Ebenso wie bei Algen kann auch bei Pilzen die gesamte Biomasse als Proteinquelle eingesetzt werden. Das Myzel der Pilze, also der in der Natur unterirdisch wachsende Teil des Pilzes, ist weitaus größer als die sichtbaren Fruchtkörper. Im Labor wächst es in Submerskultur schneller als die Fruchtkörper. Die Zusammensetzung von Myzel und Fruchtkörper sind in Bezug auf Protein-, Fett- und Aschegehalt weitgehend ähnlich (Martin und Bailey 1985).

1.3 Industrielle Nebenströme

Die Lebensmittelindustrie produziert nicht nur die gewünschten Lebensmittel, sondern es entstehen auch Nebenprodukte, die keine weitere Verwendung finden und als Abfall entsorgt werden müssen. Diese Nebenströme sind jedoch eine gute Kohlenstoffquelle für Pilze, die auch in der Lage sind schwer abbaubare Stoffe wie Lignin oder Cellulose abzubauen und in hochwertige Pilzbiomasse umzuwandeln. Große Lebensmittelbetriebe produzieren kontinuierlich, sodass das ganze Jahr über erhebliche Mengen an Reststoffströmen anfallen.

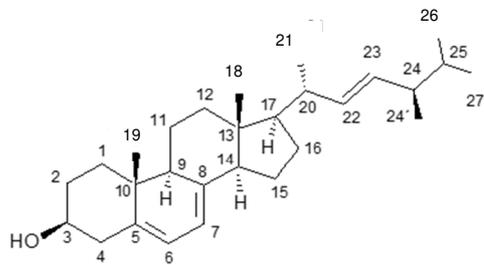
Eine gute Kohlenstoffquelle sind Trester verschiedener Art. Eine der beliebtesten Obstsorten ist der Apfel. Alleine in Deutschland wurden im Jahr 2017 etwa 600.000 Tonnen Äpfel produziert (Statistisches Bundesamt 2018), weltweit waren es im Jahr 2016 sogar ca. 89 Millionen Tonnen (FAO 2018). Pro Jahr fallen in Deutschland 200.000 bis 250.000 Tonnen frischer Apfeltrester als Nebenprodukt der Apfelsaftherstellung an (Kammerer *et al.* 2014). Neben Trestern entstehen in der Lebensmittelindustrie auch Melassen als Nebenprodukte der Zuckerherstellung, die sehr kohlenhydratreich sind. In Deutschland wurden im Wirtschaftsjahr 2016/2017 etwa 650.000 Tonnen Melasse erzeugt, von denen lediglich ca. 396.000 Tonnen Verwendung als Tierfutter oder Substrat für Hefefabriken fanden (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V. 2018).

1.4 Vitamin D in Pilzen

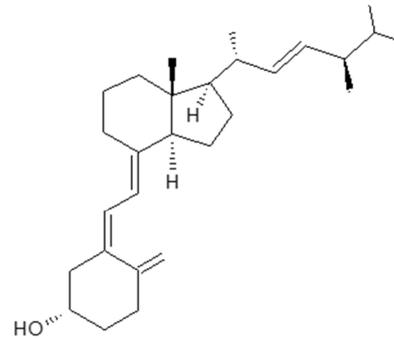
Vitamin D₃ ist nur in wenigen Lebensmitteln enthalten, vorwiegend in tierischen Lebensmitteln wie Eigelb und Fisch. Vitamin D₃ kann auch bei Sonneneinstrahlung direkt in der Haut des Menschen gebildet werden. Bei einer veganen oder vegetarischen Ernährung kann es daher vor allem in den Wintermonaten zu einem Vitamin D Mangel kommen.

Pilze enthalten in der Zellmembran Ergosterol (Abbildung 1), ein Präkursor von Vitamin D₂, der durch UV-B Belichtung (280-315 nm) in Vitamin D₂ umgewandelt werden kann (Mattila *et al.* 1994; Roberts, Teichert und McHugh 2008; Wittig *et al.* 2013). Vitamin D₂ und D₃ unterscheiden sich lediglich in der Seitenkette durch eine zusätzliche Doppelbindung und eine Methylgruppe an C₂₄ bei Vitamin D₂. Sowohl

Vitamin D₂ als auch D₃ werden im Körper metabolisiert: In der Leber entsteht 25-Hydroxyvitamin D, das in den Nieren zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxyvitamin D umgewandelt wird (Wacker und Holick 2013).



Ergosterol (Pro-Vitamin D₂)



Vitamin D₂ (Ergocalciferol)

Abbildung 1: Strukturen von Ergosterol und Vitamin D₂.

1.5 Zielsetzung

Die Erzeugung einer hochwertigen und proteinreichen Nahrungsquelle durch Kultivierung von Speisepilzen (Basidiomyceten) auf industriellen Reststoffströmen der Nahrungsmittelindustrie war der Grundgedanke, der dieser Arbeit zugrunde lag. Das erzeugte Pilzmyzel soll als alternative Proteinquelle Grundlage für die Herstellung von veganen/vegetarischen, neuartigen und innovativen Lebensmittel dienen.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf einem Screening ausgewählter Basidiomyceten mit verschiedenen Reststoffströmen der Lebensmittelindustrie wie Trester (Apfel, Granatapfel, Aronia), Blattspinat oder Rübenmelasse in Submerskultivierung. Eine geeignete Pilz-Substrat-Kombination, die bei möglichst geringer Kultivierungsdauer viel proteinreiche Biomasse lieferte, wurde für alle weiteren Analysen ausgewählt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die ausgewählte Pilz-Substrat-Kombination auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden: Rohfett und Fettsäureprofil, Rohprotein und Aminosäureprofil, Rohasche und Schwermetalle, sowie Kohlenhydrate inklusive Chitin. Weiterhin wurde das in Pilzen enthaltene Ergosterol dazu verwendet, den Pilzanteil in der Pilz-Substrat-Kombination zu quantifizieren.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Anreicherung des Pilzmyzels mit Vitamin D₂, das durch UV-Belichtung aus dem Präkursor Ergosterol gebildet wird und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie analysiert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	for HPLC, Gradient Grade	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
<i>N</i> -Acetyl-D-Glucosamin	≥ 95%	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Agar-Agar	Kobe I	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ameisensäure	99-100% z. A.	Chemsolute, Renningen, DE
Ammoniumdihydrogenphosphat	≥ 99%	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumnitrat	≥ 98,5%	Bernd Kraft GmbH, Duisburg, DE
Ammoniumsulfamat	-	Acros Organics, Geel, BE
Blei-Standardlösung	für die AAS, 1 g L ⁻¹ in 2- 5% Salpetersäure	Acros, New Jersey, USA
Borsäure	> 99,5%	Fluka Analytical, Seelze, DE
Cadmium-Standardlösung	für die AAS, 1 g L ⁻¹ in 2- 5% Salpetersäure	Acros
Calciumchlorid-Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth
Chitin	aus Krabbenschalen	Carl Roth
Cholecalciferol (D ₃)	neat	Sigma-Aldrich
Cirtonensäure, wasserfrei	≥ 99,5%	Carl Roth
7-Dehydrocholesterol	≥ 95,0 %	Sigma-Aldrich
Diethylether	≥ 99,5%, zur Synthese, stab.	Carl Roth
EDTA	> 99%, p.a.	AppliChem, Darmstadt, DE
Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	p.a.	AppliChem
Ergocalciferol (D ₂)	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich
Ergosterol	≥ 95,0%	Sigma-Aldrich
Essigsäure	100%, p.a.	Carl Roth
Ethanol	≥ 99,8%, p.a.	Carl Roth
FAME-Testlösung	-	Chromatographie Service, Langerwehe, DE
Isocatan	Für GC ECD und FID	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%	Carl Roth

Tabelle 1 (Fortsetzung): Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	> 99%, krist.	Carl Roth
Kaliumhydroxid	≥ 85%	Chemsolute
Kjeldahl-Tabletten	Hg- und Se-frei	Carl Roth
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat	p.a.	AppliChem
Magnesiumsulfat-Hydrat	≥ 99%	Carl Roth
Malzextrakt	für die Mikrobiologie	Sigma-Aldrich
Mangan(II)-Sulfat-Monohydrat	≥ 99%	Carl Roth
MBTH	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Methanol	for HPLC, HPLC grade	J.T. Baker, München, DE
3-Methyl-2-benzothiazolinon Hydrazon Hydrochlorid Monohydrat	≥ 99,0%	Fluka Analytical
Mixed indicator acc. to Sher	-	Büchi Labortechnik, Flawil, CH
Mono-Natrium-L-Aspartat- Monohydrat	99%	Alfa Aesar
Natriumacetat, wasserfrei	> 99,0%	Bernd Kraft
Natriumchlorid	> 99,8%	Carl Roth
Natriumdisulfit	≥ 97%	Acros Organics
Natriumhydroxid	≥ 99%, p.a. in Plätzchen	Carl Roth
Natriumhydroxid	50 - 52% in Wasser (w/w)	Sigma-Aldrich
Natrium-L-Ascorbat	≥ 99,0%	AppliChem GmbH,
Natrium-L-Aspartat-Monohydrat	99%	Afla Aesar
Natriumnitrit	p.a.	Merck
Natriumsulfat, wasserfrei	99,9%	Carl Roth
Orcinol	97%	Sigma-Aldrich
Pd-Matrix-Modifier	10 g L ⁻¹	Merck
n-Pentan	≥ 99,0%, z. A.	Chemsolute
Petrolether	tiefsiedend, 35-65 °C	Chemsolute
Phenol	p.a.	Merck
Phosphorsäure	85%, reinst	Carl Roth
2-Propanol	≥ 99,8%	Carl Roth
Quecksilber-Standardlösung	1000ppm in Salpetersäure	Fisher Chemicals, Schwerte, DE

Tabelle 1 (Fortsetzung): Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Salzsäure	36,5 – 38%	Carl Roth
Salzsäure	25%, reinst	Chemsolute
Salzsäure, 0,1 M	Maßlösung	Carl Roth
Schwefelsäure	95 – 98%	Carl Roth
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	≥ 99,0%	Merck
Thiodiglycol (2,2'-Thiodiethanol)	≥ 95,0%	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth
Tris Hydrochlorid	≥ 99%	Carl Roth
L-Tryptophan	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Zink(II)-Sulfat-Heptahydrat	p.a.	AppliChem
Zinkacetat-Dihydrat	≥ 99%	Carl Roth

2.2 Verwendete Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Kits.

Kit	Verwendung	Hersteller
Enzytec D-Glucose/ Saccharose	UV-Test zur Quantifizierung von Saccharose	R-Biopharm AG, Darmstadt, DE
D-Glucose/D-Fructose	UV-Test zur Quantifizierung frei vorliegender D-Glucose und D-Fructose	R-Biopharm AG
Pectin Identification	Pektat-Lyase zur Quantifizierung von Pektin	Megazyme, Wicklow, Irland

2.3 Geräte

Geräte, die nicht in Tabelle 3 aufgeführt sind, werden in den entsprechenden Abschnitten genauer angegeben.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	SI-234A	Denver Instrument, Göttingen, DE
Autoklav (klein)	Laboklav Typ 25B	SHP Steriltechnik, Magdeburg, DE
Autoklav (groß)	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik
Brutschrank	Heratherm IMC 18 Compact	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD Plus	Martin Christ, Osterode am Harz, DE
Eismaschine	EF 103	Scotsman, Pogliano, I
Feuchtebestimmer	MA 35	Sartorius AG, Göttingen, DE
Inkubationsschüttler	MKR 13	HLC BioTech, Bovenden, DE
Inkubationsschüttler	Ecotron	Infors HAT, Einsbach, DE
Kolbenhubpipetten (2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Transferpette S	Brand, Wertheim, DE
Magnetheizrührer	C-MAG HS 4	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Meter	FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
Photometer	UviLine 9100 UviLine 9400	Schott Instruments, Schwerzenbach, CH
Reinluftwerkbank	Hera Safe KS18	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Reinstwassersystem	Sartorius arium 611VF	Sartorius
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-300	Büchi Labortechnik, Essen, DE
Soxleth-Apparatur	Soxtherm	Gerhardt, Königswinter, DE
Trockenschrank	Heratherm™	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE
Ultraschallbad	Omnilab	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co.KG, Bremen, DE
Ultra-Turrax	IKA T25 digital, 1000/min	IKA, Staufen, DE
Umwälzkühler	Minichiller	Huber, Offenburg, DE
Vortexer	VTX-3000L	LMS, Tokyo, JP

Tabelle 3 (Fortsetzung): Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Waage	AX6202	Mettler-Toledo
Vakuumpumpe	CVC 3000	Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim, DE
Wasserbad	SA20	Prüfgerätewerk Dresden, Dresden, DE
Zentrifuge	Allgegra X-I5R	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Zentrifuge	Microfuge 22 R	Beckman Coulter

2.4 Basidiomyceten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt acht verschiedene Basidiomyceten (Tabelle 4) verwendet.

Tabelle 4: Für das Screening verwendete Basidiomyceten. DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE; WI: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, NL. Abk.: Abkürzung.

Stamm	Trivialname	Abk.	Herkunft	Stamm-Nr.
<i>Agrocybe aegerita</i>	Südlicher Ackerling	AAE	Sylvan, Horst, NL	4022
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Gemeiner Schwefelporling	LSU	DSMZ	1014
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	LED	WI	389.89
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	Rosen-Seitling	PSS	institutseigene Stammsammlung	-
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Lungen-Seitling	PSC	institutseigene Stammsammlung	-
<i>Pleurotus sapidus</i>	-	PSA	DSMZ	8266
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Riesen-Träuschling	SRU	Mycelia, Nevele, BE	M 5012
<i>Wolfiporia cocos</i>	Kiefernschwamm	WCO	WI	279.55

2.5 Substrate

Gemahlener Apfeltrester aus der Saftproduktion sowie Aronia- und Granatapfeltrester wurden von der Firma Döhler, Darmstadt, zur Verfügung gestellt. Frischer Apfeltrester wurde von der Obstkellerei Fischer in Schweinsberg

bezogen und frischer Blattspinat von der Firma Elbtal Tiefkühlkost in Lommatzsch. Südzucker, Mannheim, stellte Rübenmelasse aus der Zuckerherstellung zur Verfügung.

Bei allen Substraten (Abbildung 2) handelte es sich um Reststoffströme, die in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Frische Substrate wurden bei -20 °C gelagert, mit Ausnahme von Rübenmelasse (4 °C), trockene bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. In Tabelle 5 sind die verwendeten Abkürzungen der Substrate aufgeführt. Alle Substrate, mit Ausnahme von Blattspinat, wurden unbehandelt eingesetzt. Blattspinat wurde gefriergetrocknet und mittels Strohmühle gemahlen (Siebgröße: 2 mm).

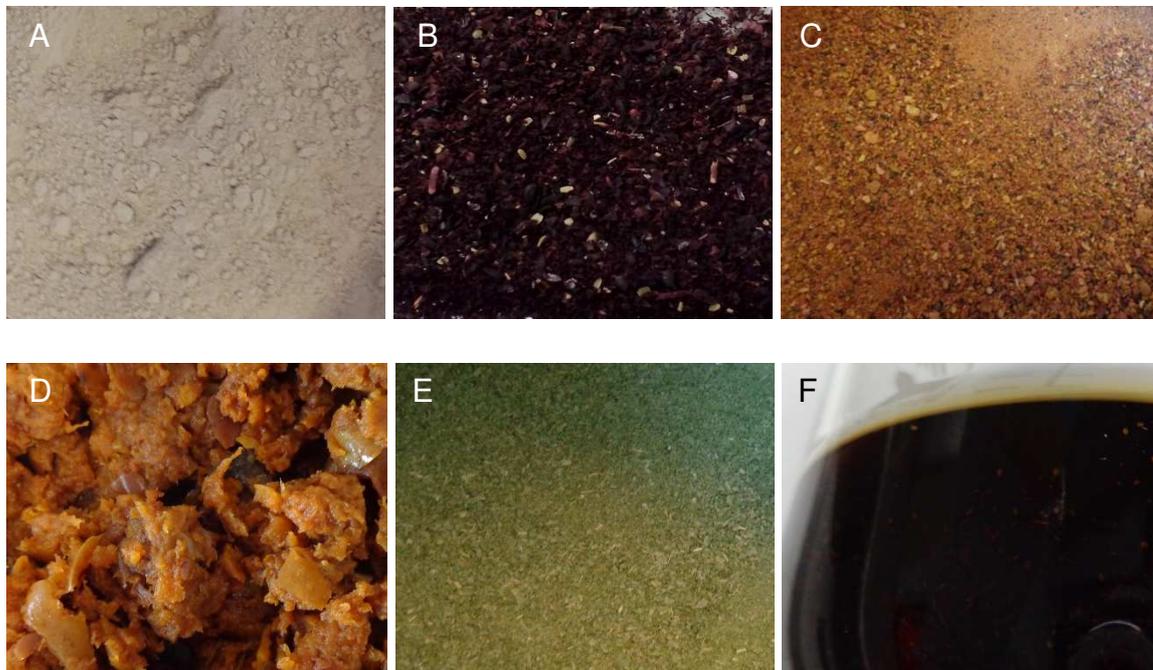


Abbildung 2: Apfeltrester von Döhler (A), Aroniatrester (B), Granatapfeltrester (C), frischer Apfeltrester von Fischer (D), lyophilisierter und gemahlener Blattspinat (E), Rübenmelasse (F).

Tabelle 5: Verwendete Substrate und deren Abkürzung.

Substrat	Abkürzung
Apfeltrester (Döhler)	ATD
Apfeltrester (Fischer)	Apfel
Aroniatrester	Aronia
Blattspinat	BS
Granatapfeltrester	GA
Rübenmelasse	RM

Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von Reststoffströmen und Basidiomyceten und die untersuchten Kombinationen (X) sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Auf verschiedenen Substraten kultivierte Pilze. X: untersuchte Kombination. AAE: *Agrocybe aegerita*, LED: *Lentinula edodes*, LSU: *Laetiporus sulphureus*, PSA: *Pleurotus sapidus*, PSC: *Pleurotus sajor-caju*, PSS: *Pleurotus salmoneostramineus*, SRU: *Stropharia rugosoannulata*, WCO: *Wolfiporia cocos*.

Substrat \ Pilz	AAE	LED	LSU	PSA	PSC	PSS	SRU	WCO
Apfeltrester (Döhler)	X	X	X	X	X	X	X	X
Apfeltrester (Fischer)	X	X	X	X			X	X
Aroniatrester	X	X	X	X			X	X
Blattspinat	X	X	X	X			X	X
Granatapfeltrester	X	X		X			X	X
Rübenmelasse	X	X		X			X	X

2.6 Kultivierung der Pilze

Die Kultivierung und alle nötigen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte stets bei 24 °C unter Lichtausschluss. Benötigte Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min sterilisiert.

2.6.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden alle Basidiomyceten als Oberflächenkultur auf Malzextrakt-Agar-Platten (20 g L⁻¹ Malzextrakt, 15 g L⁻¹ Agar-Agar) bei 24 °C kultiviert. Sobald die Platten zu 80% bewachsen waren, wurde 1 cm² des mit Myzel bewachsenen Agars entnommen und auf eine neue Agarplatte aufgebracht.

2.6.2 Vorkultur

Die Vorkultur erfolgte in Enghals-Erlenmeyerkolben in Submerskultur. Dazu wurde der Kolben zu 40% mit Malzextraktlösung (20 g L⁻¹) befüllt und pro 100 mL mit 1 cm² einer bewachsenen Agarplatte (2.6.1) inokuliert. Das Agarstück wurde mittels Ultra-Turrax für 30 s bei 10.000 rpm in der Lösung homogenisiert. Die

anschließende Kultivierung erfolgte bei 150 rpm (Inkubationsschüttler Ecotron, Schütteldurchmesser 2,5 cm) für einige Tage. Die Dauer der Kultivierung richtete sich nach dem Wachstum der verschiedenen Pilze. Am Ende der Kultivierung der Vorkultur wurde diese homogenisiert (Ultra-Turrax, 30 s, 10.000 rpm) und für die Hauptkultur eingesetzt.

2.6.3 Hauptkultur

Für die Kultivierung in Hauptkultur wurde Medium M1 mit folgender Zusammensetzung (Tabelle 7 und Tabelle 8) verwendet. Die Einwaage an Reststoffstrom, der als alleinige Kohlenstoffquelle diente, wurde so eingestellt, dass der Kohlenhydratgehalt 15 g pro Liter Medium betrug. Die zugrunde gelegten Daten sind in 3.1.1 dargestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung Medium M1.

Komponente	Konzentration
Mono-Natrium-L-Aspartat-Monohydrat	6,24 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	2,40 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,50 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 8)	1,00 mL L ⁻¹

Tabelle 8: Zusammensetzung der steril-filtrierte Spurenelementlösung.

Komponente	Konzentration [mg L ⁻¹]
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	80
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	90
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	30
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	5
EDTA	400

2.6.3.1 Hauptkulturen im Schüttelkolben

Das Screening zur Untersuchung von geeigneten Pilz-Substrat-Kombinationen erfolgte in Enghals-Erlenmeyerkolben. Dazu wurde eine entsprechende Menge

Reststoffstrom direkt in die Kolben eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen Medium M1 (Tabelle 7, 2.6.3) aufgefüllt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 mittels 1 M NaOH wurde der Kolben mit einem Zellstoffstopfen verschlossen und autoklaviert. Das abgekühlte Medium wurde mit homogenisierter Vorkultur (2.6.2) inokuliert (10% des Volumens an Medium M1) und für einige Tage bei 150 rpm kultiviert. Die Kulturführung wurde beendet, sobald die Flüssigkeit durch das gewachsene Pilzmyzel hoch viskos war. Die Abtrennung des Myzels erfolgte nach 2.6.4.

Zur Optimierung des Pilzanteils an der Biomasse wurde ein Fed-Batch-Verfahren verwendet. Dazu wurden, wie oben beschrieben, Erlenmeyerkolben mit lediglich 6,15 g Apfeltrester (ATD) anstatt 24,6 g pro Liter Medium angesetzt und *Pleurotus sapidus* für vier Tage kultiviert. An Tag 4 wurden weitere 6,15 g ATD hinzugegeben und für zwei weitere Tage kultiviert. Die Abtrennung des Myzels (2.6.4) erfolgte an Tag 6.

2.6.3.2 7,5 L Bioreaktor

Ein 7,5 L Bioreaktor (Labfors 3, Infors, Einsbach, Deutschland) wurde mit 5 L Medium M1 und einer entsprechenden Menge Reststoffstrom befüllt, der pH-Wert mittels 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt und autoklaviert. Die Inokulation erfolgte mit 500 mL homogenisierter Vorkultur. Folgende Einstellungen wurden getroffen: Rührerdrehzahl 150 rpm (Propellerrührer), Temperatur 24 °C, Belüftungsrate 0,3 vvm Druckluft (vvm: Volumen Luft pro Volumen Fermenter und Minute; entspricht 2,25 L min⁻¹). Die Druckluft entstammte der Hausleitung mit 2,1 bar und wurde steril über einen 0,2 µm PTFE-Membranfilter (Midisart 2000, Sartorius) filtriert. Die Kultivierungsdauer verlängerte sich im Vergleich zur Kultivierung im Schüttelkolben um einen Tag.

2.6.3.3 150 L Bioreaktor

75 L Medium JA4 (siehe Tabelle 9, 2.6.5) wurden in einen 150 L Bioreaktor mit entsprechender Substratmenge gefüllt und über die Fermentersteuerung, nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 mit 1 M NaOH, autoklaviert. Bei dem Fermenter handelte es sich um einen Biostat D 100 Fermenter der Firma B. Braun International (Melsungen, Deutschland). Folgende Einstellungen wurden für die

Kultivierung getroffen: 24 °C, 150 rpm (Scheibenblattrührer), 3 L min⁻¹ Druckluft. Auch hier wurde die Kultivierungsdauer um einen Tag im Vergleich zum Schüttelkolben verlängert.

Da für die Inokulation 7,5 L Vorkultur benötigt wurden, wurde diese aus einer Vor-Vorkultur hergestellt. Dazu wurden 750 mL Vorkultur (2.6.2) angesetzt, mit der, nachdem sie vollständig bewachsen war, die zweite Vorkultur inokuliert wurde (7,5 L Malzextraktmedium). Diese wurde homogenisiert und zur Inokulation des Fermenters verwendet.

2.6.4 Gewinnung des Pilzmyzels

Je nach Ansatzgröße wurde das Pilzmyzel auf verschiedene Weisen gewonnen: Kleinere Ansätze (bis 200 mL) wurden zentrifugiert (3.823 g, 4 °C, 10 min) und drei Mal mit vollentmineralisiertem Wasser (VE-Wasser) unter gleichen Bedingungen gewaschen. Bei größeren Ansätzen wurde das Myzel über ein Passiertuch vom Überstand getrennt und so lange gewaschen, bis der Ablauf klar erschien. Das Myzel wurde zunächst tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet.

2.6.5 Medienoptimierung

Mit dem Ziel der Produktionskostensenkung wurde das Medium M1 in der Zusammensetzung verändert (Tabelle 9). Weiterhin wurde auf den Zusatz von Salzen verzichtet, sodass der Pilz einmal in reinem VE-Wasser mit Reststoffstrom (15 g L⁻¹ Kohlenhydratgehalt) und andererseits mit VE-Wasser, SE-Lösung (1 mL L⁻¹, 2.6.3) und Reststoffstrom (15 g L⁻¹ Kohlenhydratgehalt) kultiviert wurde.

Tabelle 9: Zur Medienoptimierung verwendete Variationen von Medium M1.

Komponente	M1	JA1	JA2.1	JA2.2	JA3	JA4
Mono-Natrium-L-Aspartat-Monohydrat [g L ⁻¹]	6,24	3,12	6,24	6,24	6,24	3,12
Ammoniumnitrat [g L ⁻¹]	2,40	2,40	-	-	2,40	-
Ammoniumsulfat [g L ⁻¹]	-	-	3,96	2,40	-	2,40
Kaliumdihydrogenphosphat [g L ⁻¹]	1,50	1,50	1,50	1,50	0,50	0,50
Magnesiumsulfat-Hydrat [g L ⁻¹]	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Spurenelementlösung [mL L ⁻¹] (2.6.3)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

2.7 Analysenmethoden

2.7.1 Bestimmung der Restfeuchte

Die Restfeuchte der Substrate und der Pilzbiomassen wurde mittels Infrarot-Feuchtemessgerät MA 35 der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) nach Herstelleranleitung bestimmt.

2.7.2 Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

Der Kohlenhydratgehalt wurde auf zwei verschiedene Weisen bestimmt. Bei der ersten Methode (2.7.2.1) wurde der Kohlenhydratgehalt analytisch mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay erfasst und der Fettanteil des Probenmaterials über Differenzbildung (analog zu 2.7.2.2) rechnerisch ermittelt. Bei der zweiten Methode (2.7.2.2) wurde der Fettgehalt nach Soxhlet mittels Soxtherm-Apparatur analysiert und der Kohlenhydratanteil rechnerisch ermittelt. Sofern nichts Gegenteiliges vermerkt ist, wurde der Kohlenhydratgehalt rechnerisch nach Methode 2.7.2.2 erfasst.

2.7.2.1 Orcinol-Schwefelsäure-Assay

10 mg Probe wurden in 2 mL 2 M HCl hydrolysiert (2 h, 100 °C, 700 rpm) und anschließend membranfiltriert. Nach 1:50-Verdünnung mit Reinstwasser wurden 200 µL Hydrolysat (bzw. Glucosestandardlösung) mit 800 µL Reagenzlösung (2 g L⁻¹ Orcinol in konz. Schwefelsäure) versetzt, geschüttelt und 15 min bei 80 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Gehalt an Gesamtkohlenhydraten bei 420 nm photometrisch gegen Wasser bestimmt. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Glucose im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100 µg mL⁻¹ verwendet (Abbildung 3).

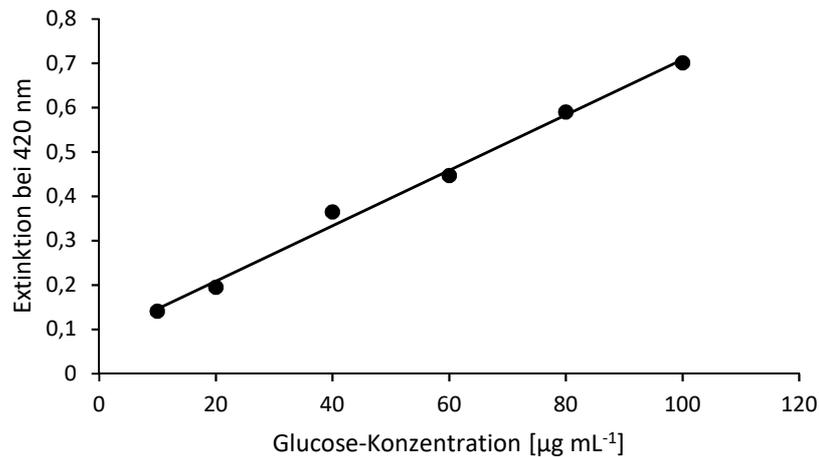


Abbildung 3: Kalibriergerade zur Quantifizierung des Gesamtkohlenhydratgehaltes mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay; $y = 0,0062 x + 0,0836$, $R^2 = 0,9940$.

2.7.2.2 Rechnerische Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

Der Kohlenhydratgehalt wurde rechnerisch aus Differenzbildung der analysierten Gehalte an Gesamtfett, Rohasche und Rohprotein (Gleichung 1) berechnet.

$$\text{KH [g (100 g TM)}^{-1}] = 100 - \text{Gesamtfett} - \text{Rohasche} - \text{Rohprotein} \quad (1)$$

KH	Kohlenhydrate [g (100 g TM) ⁻¹]
Gesamtfett	Gesamtfettgehalt [g (100 g TM) ⁻¹] nach 2.7.13
Rohasche	Rohaschegehalt [g (100 g TM) ⁻¹] nach 2.7.15
Rohprotein	Rohproteingehalt [g (100 g TM) ⁻¹] nach 2.7.10

2.7.3 Bestimmung des Chitingehaltes

Chitin kann, nach Spaltung in die entsprechenden 2,5-Anhydrohexosen, photometrisch mittels 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon Hydrochlorid Monohydrat (MBTH) quantifiziert werden. Eine 1979 von Smith und Gilkerson veröffentlichte Methode wurde leicht modifiziert und angewendet.

Etwa 20 mg Probenmaterial wurden in ein druckfestes Röhrchen eingewogen und nach Zugabe von 2,5 mL 6 M Salzsäure für 24 h bei 105 °C hydrolysiert. Hierbei wird Chitin zu Chitosan deacetyliert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 6 M, 1 M und 0,1 M Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt und mit VE-Wasser *ad* 10 mL

aufgefüllt. Anschließend wurde durch einen Faltenfilter filtriert. 100 µL dieser Lösung wurden 1:10 durch Zugabe von 500 µL 0,5 M HCl und 400 µL VE-Wasser verdünnt und für weitere 2 h bei 105 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2 mL 2,5%ige Natriumnitritlösung hinzugefügt, kurz vermischt, sodass sich bei Raumtemperatur salpetrige Säure bilden kann, die die Bildung von 2,5-Anhydro-D-Mannose aus Chitosan bewirkt (Seong, Kim und Ko 1999). Nach 15 min wurde 1 mL 12,5%ige Ammoniumsulfamatlösung zur Neutralisation hinzugefügt, durchmischt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur reagieren lassen. 1 mL 0,25%ige MBTH-Lösung (Farbreagenz) wurde hinzugefügt, durchmischt und für 30 min bei 37 °C erhitzt. Nach Zugabe von 1 mL 0,5%iger Eisen(III)-chlorid Hexahydrat-Lösung wurde erneut bei 37 °C für 5 min inkubiert. Abbildung 4 (nach Tsuji, Kinoshita und Hoshino 1969) zeigt die ablaufenden Reaktionen. Der entstehende Farbkomplex kann bei 650 nm photometrisch quantifiziert werden. Als Blindwert wurde die Probenlösung durch VE-Wasser ersetzt und als Positivkontrolle wurde Chitin aus Krabbenschalen (Carl Roth) eingesetzt (12 mg mit einer Verdünnung von 1:20). Die Kalibrierung erfolgte über *N*-Acetyl-D-Glucosamin in einem Konzentrationsbereich von 6,18 – 61,8 µg mL⁻¹. Die Reaktion der Standards wurde analog zur Probenaufarbeitung durchgeführt. Für die Kalibrierung ergab sich nach Auftragung der Extinktion bei 650 nm gegen die Konzentration [µg mL⁻¹] eine Geradengleichung von $y = 0,0172x + 0,0119$ mit einem Regressionskoeffizienten von 0,9981.

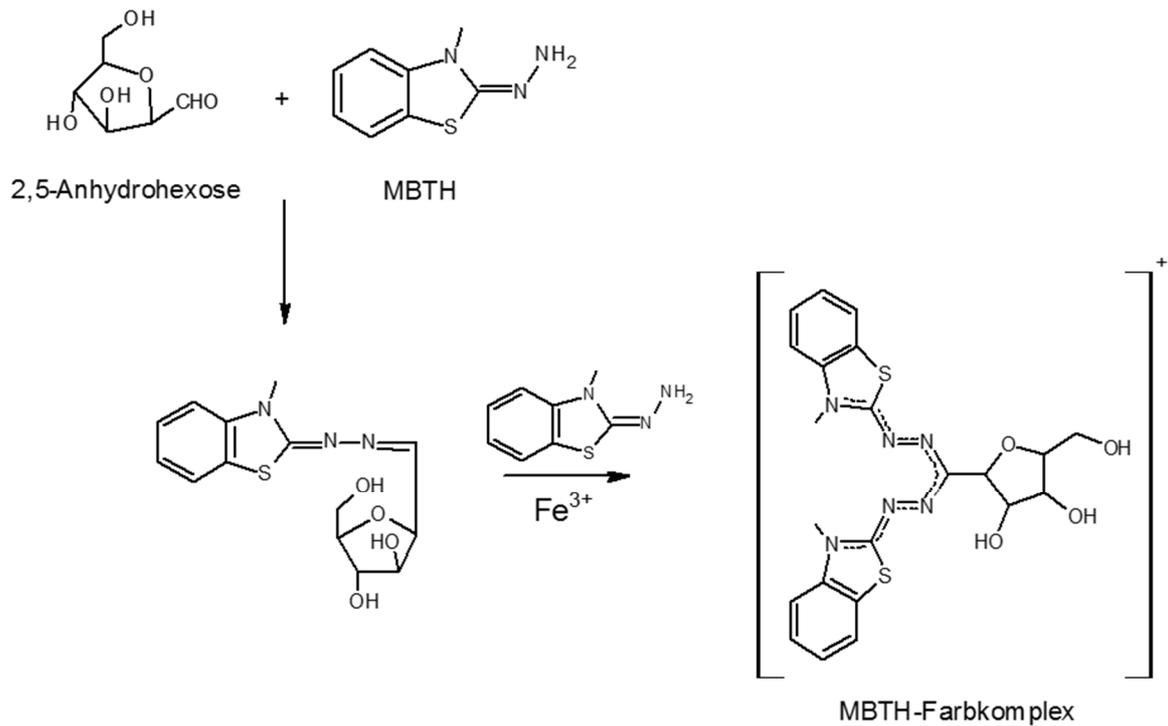


Abbildung 4: Farbreaktion von 2,5-Anhydrohexosen mit 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon Hydrochlorid Monohydrat (MBTH). Farbkomplex kann bei 650 nm photometrisch quantifiziert werden; nach Tsuji, Kinoshita und Hoshino 1969.

Die Berechnung des Chitingehaltes erfolgte nach Gleichung 2.

$$\text{Chitin [g (100 g TM)}^{-1}] = \frac{c \cdot F \cdot V \cdot 100}{E \cdot 1000} \quad (2)$$

- c Konzentration *N*-Acetyl-D-Glucosamin [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
- F Verdünnungsfaktor
- V Volumen [mL]
- 100 Umrechnung auf g (100 g TM)⁻¹
- E Einwaage [mg TM]
- 1000 Umrechnung μg in mg

2.7.4 Pektin

2.7.4.1 Isolierung von Pektin aus Apfeltrester

5 g Apfeltrester wurden mit 150 mL Reinstwasser versetzt und der pH-Wert durch Zugabe von Citronensäure auf pH 2,5 eingestellt. Unter Rückfluss wurde für

30 min bei 97 °C erhitzt und alle 10 min geschwenkt. Die heiße Lösung wurde über ein Leinentuch filtriert und auf 4 °C abgekühlt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Ethanol (≥ 99,8%) wurde das Pektin 1 h im Eisbad gefällt und erneut über ein Leinentuch filtriert, mit Ethanol (70%ig und 95%ig) gewaschen, ausgepresst und gefriergetrocknet. Die Isolierung erfolgte nach Devi *et al.* (2014) und Canteri-Schemin *et al.* (2005).

2.7.4.2 Charakterisierung des isolierten Pektins

Die Charakterisierung des Pektins kann Aufschluss über dessen Eigenschaften, wie z. B. die Gelbildungsfähigkeit, geben. Dazu wurden folgende Eigenschaften bestimmt:

Äquivalentgewicht (ÄG)

Eine von Devi *et al.* (2014) beschriebene Methode zur Bestimmung der Pektineigenschaften wurde leicht modifiziert: 0,5 g Probenmaterial wurden mit 100 mL frisch aufgekochtem VE-Wasser für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 5 mL Ethanol und 1 g Natriumchlorid wurden 6 Tropfen Phenolrot (0,1 g in 100 mL 20%igem Ethanol) hinzugefügt und gegen 0,1 M NaOH titriert. Es erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach violett. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 3.

Das Äquivalentgewicht wurde zur Berechnung des Gesamt Anhydro-Uronsäure-Gehaltes und des Veresterungsgrades verwendet.

$$\text{ÄG} = \frac{E \cdot 1000}{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}}} \quad (3)$$

ÄG	Äquivalentgewicht
E	Probeneinwaage [g]
V_{NaOH}	Volumen an Natronlauge [mL]
N_{NaOH}	Normalität der Natronlauge

Methoxy-Gehalt (MeO)

Um den Methoxy-Gehalt von Pektin zu bestimmen, wurde die neutralisierte Lösung der ÄG-Bestimmung verwendet und mit 25 mL 0,25 M NaOH für 30 min bei Raumtemperatur verseift. Anschließend wurden 25 mL 0,25 M HCl hinzugefügt

und die freigesetzten Methoxy-Gruppen durch Titration mit 0,1 M NaOH gegen Phenolrot nach Gleichung 4 quantifiziert.

$$\text{MeO [\%]} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot 3,1}{E} \quad (4)$$

MeO	Methoxy-Gehalt [%]
V_{NaOH}	Volumen an Natronlauge [mL]
N_{NaOH}	Normalität der Natronlauge
E	Probeneinwaage [g]

Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt

Der Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt (AUA) wurde nach Gleichung 5 berechnet. Er dient der Berechnung des Veresterungsgrades und gibt einen Hinweis auf die Reinheit des isolierten Pektins.

$$\text{AUA [\%]} = \frac{176 \cdot 0,1 \cdot V_{\text{NaOH}(\text{ÄG})} \cdot 100}{E \cdot 1000} + \frac{176 \cdot 0,1 \cdot V_{\text{NaOH}(\text{MeO})} \cdot 100}{E \cdot 1000} \quad (5)$$

AUA	Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt [%]
176	Masse einer AUA-Einheit [g]
V_{NaOH}	Volumen an Natronlauge [mL]
E	Probeneinwaage [g]

Veresterungsgrad (DE)

Der Veresterungsgrad (*degree of esterification*, DE) wurde aus dem Methoxy-Gehalt und dem Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt mittels Gleichung 6 berechnet.

$$\text{DE [\%]} = \frac{176 \cdot \text{MeO} \cdot 100}{31 \cdot \text{AUA}} \quad (6)$$

DE	Veresterungsgrad [%]
MeO	Methoxy-Gehalt [%]
AUA	Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt [%]

2.7.4.3 Enzymatische Quantifizierung von Pektin

Für die Quantifizierung des Pektins mittels photometrischem Enzymassay wurden die Pektat-Lyase und die Vorgehensweise, wie sie im *Pectin Identification Assay* von Megazyme beschrieben sind, verwendet. Pektat-Lyase (1.400 U mL^{-1}) wurde 1:100 mit Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) verdünnt und für den Assay eingesetzt. Folgende Vorgehensweisen wurden angewendet:

Probenvorbereitung

Je nach zu erwartendem Pektingehalt wurden 3 – 8 g Probenmaterial in einen 250 mL Rundkolben eingewogen, mit 150 mL VE-Wasser versetzt und der pH-Wert mit Citronensäure auf 2,5 eingestellt. Unter Rückfluss wurde für 30 min bei $97 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und alle 10 min geschwenkt. Die heiße Lösung wurde über einen Faltenfilter filtriert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Der pH-Wert wurde mit 0,5 M NaOH auf pH 12 eingestellt und die Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,5 M HCl auf pH 8 eingestellt und die Lösung in einen 200 mL bzw. 250 mL Messkolben überführt und mit VE-Wasser *ad* Marke aufgefüllt. Myzelproben wurden 1:10, Apfeltresterproben 1:100 mit VE-Wasser verdünnt und zur enzymatischen Reaktion eingesetzt.

Kalibrierung

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Polygalacturonsäure verwendet. Dazu wurden 100 mg Polygalacturonsäure eingewogen, mit 4 Tropfen 2-Propanol befeuchtet, 50 mL VE-Wasser hinzugegeben und für 30 min gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,5 M NaOH auf pH 12 eingestellt. Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert mit 0,5 M HCl auf pH 8 eingestellt und im Messkolben *ad* 100 mL aufgefüllt. Aus dieser Stammlösung wurden Aliquote entnommen und auf 25 mL aufgefüllt, um Konzentrationen zwischen $4 - 128 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ zu erhalten. Diese Lösungen wurden zur enzymatischen Reaktion eingesetzt.

Enzymatische Reaktion

Die Lösungen wurden nach folgendem Pipettierschema vereint (Tabelle 10) und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei 235 nm in

einer Quarzglasküvette mittels Photometer. Für jede Probe wurde ein separater Enzym-Blank erstellt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur enzymatischen Pektin-Quantifizierung.

	Tris-HCl-Puffer	Probe/Standard	VE-Wasser	verd. Enzym
Enzym-Blank	0,5 mL	1,0 mL	1,0 mL	-
Proben-Blank	0,5 mL	-	1,5 mL	0,5 mL
Reaktion	0,5 mL	1,0 mL	0,5 mL	0,5 mL

Auswertung

Für die Quantifizierung des Pektingehaltes wurde die Extinktion der Reaktion mit den Extinktionen der Blanks bereinigt (Gleichungen 7 und 8). Die sich ergebende $\Delta_{\text{Extinktion}}$ wurde gegen die Konzentration der Standardlösungen (c [$\mu\text{g mL}^{-1}$]) aufgetragen (Abbildung 5). Die Berechnung des Pektingehaltes erfolgte nach Gleichung 9.

$$\text{Blank-Extinktion} = \text{Enzym-Blank} + \text{Proben-Blank} \quad (7)$$

$$\Delta_{\text{Extinktion}} = \text{Reaktion-Extinktion} - \text{Blank-Extinktion} \quad (8)$$

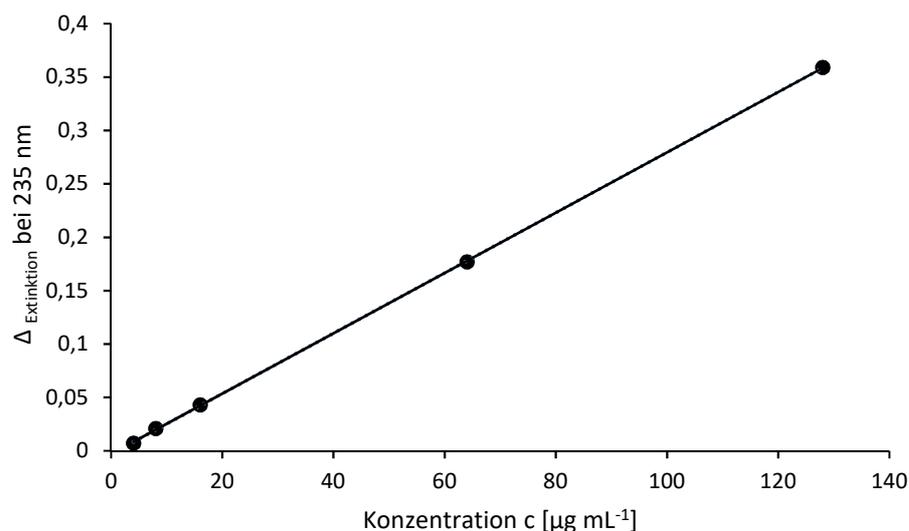


Abbildung 5: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Pektin mittels Pektat-Lyase bei 235 nm; $y = 0,0028x - 0,0029$, $R^2 = 0,9999$.

$$\text{Pektin [g (100 g TM)}^{-1}] = \frac{c \cdot V \cdot F \cdot 100}{E \cdot 10^6} \quad (9)$$

Pektin	Pektingehalt [g (100 g TM) ⁻¹]
c	Konzentration [µg mL ⁻¹]
V	Volumen [mL]
F	Verdünnungsfaktor
100	Umrechnung auf g (100 g TM) ⁻¹
E	Einwaage [g TM]
10 ⁶	Umrechnung µg in g

2.7.5 Enzymatische Bestimmung frei vorliegender D-Glucose und D-Fructose

Für die Quantifizierung frei vorliegender D-Glucose und D-Fructose wurde ein UV-Test-Kit der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland) verwendet (2.2).

0,5 – 1 g Probenmaterial wurden in einem 100 mL Messkolben mit 60 mL VE-Wasser extrahiert, mit je 5 mL Carrez-Lösung I (150 g L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]) und Carrez-Lösung II (230 g L⁻¹ Zinkacetat) und 1 mL 1 M NaOH geklärt und mit VE-Wasser *ad* Marke aufgefüllt. Die Quantifizierung erfolgte nach Herstelleranleitung mit halber Ansatzgröße.

Die Konzentration an D-Glucose und D-Fructose wurde nach Gleichung 10 berechnet.

$$c = \frac{V \cdot MG \cdot \Delta E \cdot 100}{\varepsilon \cdot v \cdot d \cdot 1000 \cdot E \cdot 10} \quad (10)$$

c	Konzentration an Glucose bzw. Fructose [g (100 g TM) ⁻¹]
V	Testvolumen [mL] (1,51 mL bei D-Glucose, 1,52 mL bei D-Fructose)
MG	Molekülmasse des Zuckers [g mol ⁻¹]
ΔE	ΔE _{D-Glucose} = (E ₂ – E ₁) _{Probe} – (E ₂ – E ₁) _{Leerwert} ΔE _{D-Fructose} = (E ₃ – E ₂) _{Probe} – (E ₃ – E ₂) _{Leerwert}
100	Umrechnung auf g (100 g TM) ⁻¹
ε	Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = 6,3 L mmol ⁻¹ cm ⁻¹
v	Probenvolumen [mL]
d	Schichtdicke [cm]
1000	Umrechnung auf g L ⁻¹
E	Einwaage [g TM]
10	Umrechnung Einwaage in g L ⁻¹

2.7.6 Enzymatische Bestimmung von Saccharose

Für die Quantifizierung von Saccharose wurde ein Saccharose/D-Glucose UV-Test-Kit der Firma R-Biopharm verwendet (2.2).

2.7.6.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu 2.7.5, ebenso die Auswertung. ΔE (Gleichung 11) ist in diesem Fall definiert als:

$$\Delta E_{\text{Saccharose}} = [(E_2 - E_1)_{\text{Ansatz Saccharose}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert Saccharose}}] - [(E_2 - E_1)_{\text{Ansatz D-Glucose}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert D-Glucose}}] \quad (11)$$

2.7.7 Bestimmung des Aminosäureprofils

Die in Substrat und Myzel enthaltenen proteinogenen Aminosäuren wurden nach Totalhydrolyse mittels Aminosäureanalysator S433 von Sykam (Fürstenfeldbruck, Deutschland) nach europäischer Richtlinie 98/64/EG (für saure Hydrolyse und Oxidation vor saurer Hydrolyse) analysiert. Die Geräteparameter sind in Tabelle 11 dargestellt. Tryptophan wurde mit einer speziell für Trp entwickelten Methode analysiert. Die Änderungen der Kurzmethode sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Geräteparameter zu Bestimmung des Aminosäureprofils.

Parameter	Bezeichnung/Einstellung
Gerät	Aminosäureanalysator S433
Trennsäule	Kationentrennsäule LCA K13/Na, für erweitertes Hydrolysat-Programm, 4,6 x 175 mm
Filtersäule	Ammoniakfiltersäule LCA K04/Na für Protein-Hydrolysat, 4,6 x 100 mm
Eluenten	A: Natrium-Citrat Puffer, 0,12 N, pH 3,45 (Sykam) B: Natrium-Citrat Puffer, 0,20 N, pH 10,85 (Sykam) Regenerierlösung (Reg Sol): 0,5 M NaOH mit 0,68 mM EDTA
Aminoreagenz	Ninhydrin, 0,1 M in Methanol (Sykam)
Flussraten	Eluenten: 0,45 mL min ⁻¹ , Ninhydrin: 0,25 mL min ⁻¹
Modus	Eluenten: Gradient, Ninhydrin: isokratisch
Gradient	0-5 min A: 100%, B: 0%, Reg Sol: 0% 5-11 min A: 100% → 95%, B: 0% → 5%, Reg Sol: 0% → 0% 11-13 min A: 95% → 80%, B: 5% → 20%, Reg Sol: 0% → 0% 13-25 min A: 80% → 70%, B: 20% → 30%, Reg Sol: 0% → 0% 25-29 min A: 70% → 30%, B: 30% → 70%, Reg Sol: 0% → 0% 29-31 min A: 30% → 20%, B: 70% → 80%, Reg Sol: 0% → 0% 31-33 min A: 20% → 10%, B: 80% → 90%, Reg Sol: 0% → 0% 33-41 min A: 10% → 0%, B: 90% → 100%, Reg Sol: 0% → 0% 41-49 min A: 0%, B: 100%, Reg Sol: 0% 49-49,1 min A: 0% → 0%, B: 100% → 0%, Reg Sol: 0% → 100% 49,1-52 min A: 0%, B: 0%, Reg Sol: 100% 52-52,1 min A: 0% → 100%, B: 0% → 0%, Reg Sol: 100% → 0% 52,1-65 min A: 100%, B: 0%, Reg Sol: 0%
Säulenofentemperatur	5 min 49 °C, in 5 min auf 56 °C, 56 °C für 13 min, in 5 min auf 74 °C, 74 °C für 6 min, in 5 min auf 50 °C;
Reaktortemperatur	130 °C
Injektionsvolumen	50 µL
Detektor	UV/Vis-Detektor bei 570 nm und 440 nm
Software	Chromstar, Version 7

Tabelle 12: Einstellungen zur Bestimmung von Tryptophan mittels Kurzmethode

Parameter	Einstellung
Gradient	0-5 min A: 30%, B: 70%, Reg Sol: 0%
	5-7 min A: 30% → 10%, B: 70% → 90%, Reg Sol: 0% → 0%
	7-15 min A: 10% → 0%, B: 90% → 100%, Reg Sol: 0% → 0%
	15-20 min A: 0% → 0%, B: 100% → 100%, Reg Sol: 0% → 0%
	20-20,1 min A: 0% → 0%, B: 100% → 0%, Reg Sol: 0% → 100%
	20,1-23 min A: 0%, B: 0%, Reg Sol: 100%
	23-23,1 min A: 0% → 30%, B: 0% → 70%, Reg Sol: 100% → 0%
	23,1-32 min A: 30%, B: 70%, Reg Sol: 0%
Säulenofentemperatur	74 °C
Detektor	UV/Vis-Detektor bei 570 nm

Um alle proteinogenen Aminosäuren analysieren zu können, sind verschiedene Aufarbeitungsmethoden nötig. Bei der klassischen, sauren Hydrolyse zur Bestimmung der Gesamtaminosäuren werden Cystein, Methionin und Tryptophan zerstört. Cystein und Methionin können durch vorherige Oxidation als Cysteinsäure und Methioninsulfon erfasst werden. Tryptophan wird nach alkalischer Hydrolyse quantifiziert. Die Aminosäuren Asparagin und Glutamin werden als entsprechende Säure detektiert und sind daher nicht von Asparaginsäure und Glutaminsäure unterscheidbar. Nach Auftrennung an einer Kationenaustauschersäule wurden die Aminosäuren mittels Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin bei 570 bzw. 440 nm für Prolin detektiert. Quantifiziert wurde über eine Einpunktkalibrierung (Standard-Lösung H-Ox von Sykam, $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$, Ausnahme Cystin $0,5 \mu\text{mol mL}^{-1}$, 1:10 mit Citratpuffer (siehe 2.7.7.1, Tabelle 13) verdünnt, Abbildung 6). Ein L-Tryptophan-Einzelstandard wurde selbst angesetzt ($1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ in 0,1 M HCl mit 0,1% Phenol) und 1:20 mit Citratpuffer verdünnt (Abbildung 7).

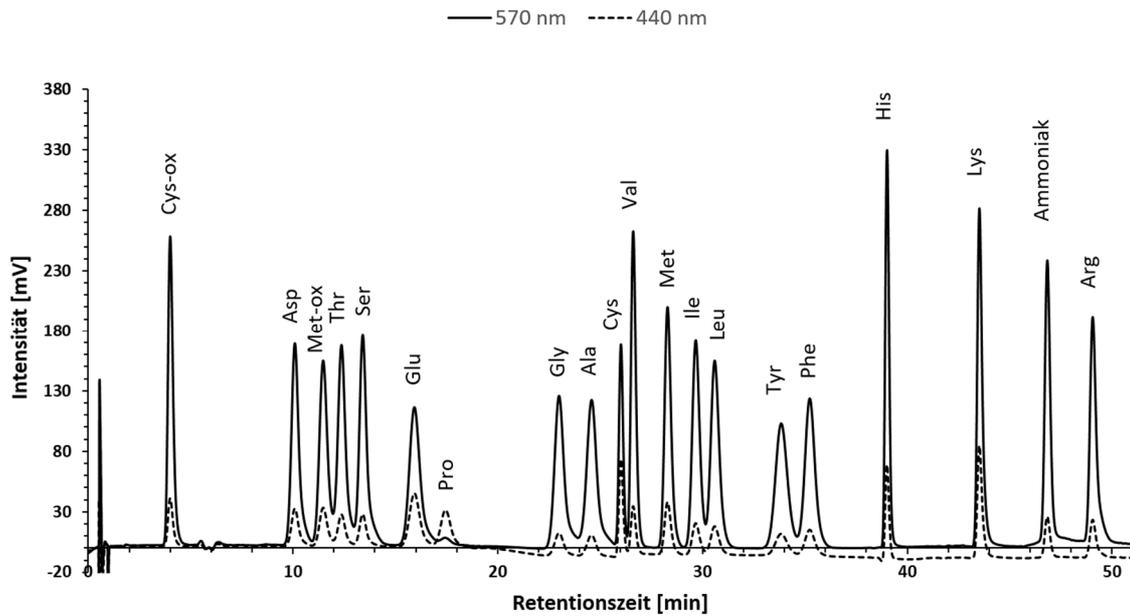


Abbildung 6: Standard-Chromatogramm zur Quantifizierung von Aminosäuren bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (440 nm für Prolin, 570 nm für alle weiteren Aminosäuren). $c = 100 \text{ nmol mL}^{-1}$ je Aminosäure, Cystin 50 nmol mL^{-1} .

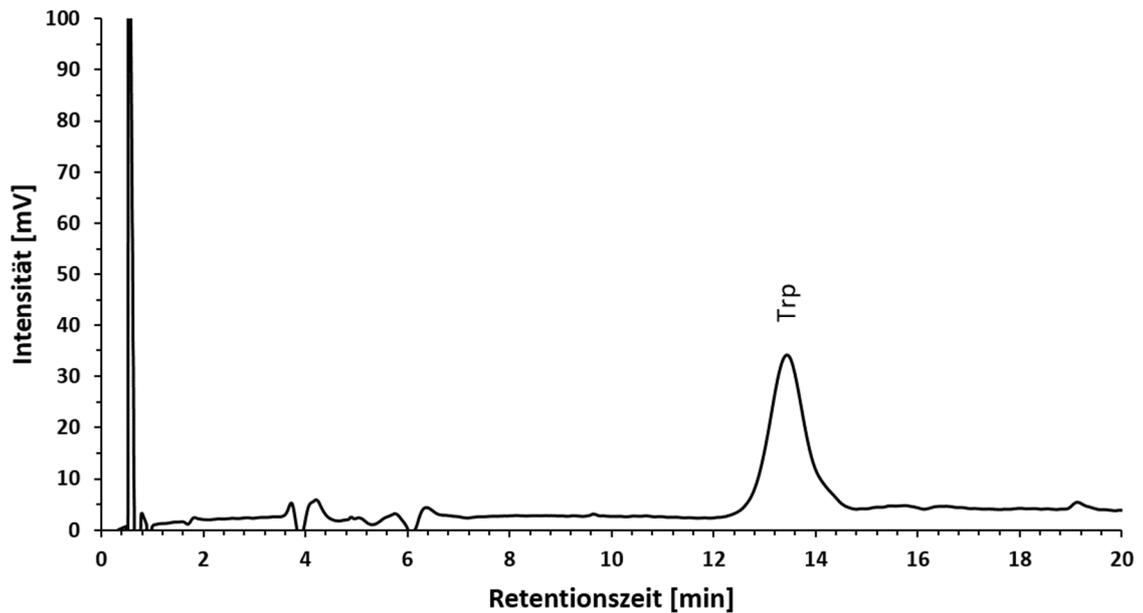


Abbildung 7: Standard-Chromatogramm von Tryptophan, $c = 50 \text{ nmol mL}^{-1}$ bei 570 nm.

Die Berechnung des Gehaltes jeder einzelnen Aminosäure im Substrat bzw. Myzel wurde nach Gleichung 12 berechnet. Die Summe aller Aminosäuren ergab den Gesamtproteingehalt, der häufig in der Literatur angegeben wird. Diese Art der Berechnung impliziert, dass die Aminosäuren frei und nicht als Protein vorliegen. Wird die Berechnung mit einer um die Molekülmasse von Wasser reduzierten Molekülmasse jeder Aminosäure durchgeführt, so wird berücksichtigt, dass bei der Bildung einer Peptidbindung ein Molekül Wasser abgespalten wird. In diesem Berechnungsmodell liegen die Aminosäuren als ein langes, ringförmiges Protein vor, welches eine Näherung des wahren Proteingehalts darstellt. Die Ergebnisse dieses Berechnungsmodells werden im Folgenden als proteingebundene Aminosäuren bezeichnet. In der englischsprachigen Literatur wird dafür die Abkürzung AA_{res} (*Amino Acid Residue*) verwendet; so auch in dieser Arbeit. AA_{res} wird zur Berechnung der Kjeldahlfaktoren verwendet.

$$AS [g (100 g TM)^{-1}] = \frac{c \cdot MG \cdot V \cdot 100}{E \cdot 10^9} \quad (12)$$

AS	Aminosäure [g (100 g TM) ⁻¹]
c	Konzentration der entsprechenden Aminosäure [nmol mL ⁻¹]
MG	Molekülmasse der entsprechenden Aminosäure [g mol ⁻¹]
V	Volumen [mL]; hier: 200 mL
E	Einwaage [g TM]
100	Umrechnung auf g (100 g TM) ⁻¹
10 ⁹	Umrechnung von nmol in mol

Der Stickstoffanteil jeder einzelnen Aminosäure im Protein wurde über Gleichung 13 berechnet. Die Summe der Stickstoffgehalte aller Aminosäuren ergab den Gesamtproteinstickstoffgehalt nach ASA (N_{ges}). Der durchschnittliche Stickstoffgehalt im Protein wurde mittels Gleichung 14 berechnet.

$$\text{Stickstoffanteil [g (100 g TM)^{-1}] = } \frac{\text{Anteil Stickstoff an MG} \cdot AS}{100} \quad (13)$$

Anteil Stickstoff an MG	Anteil Stickstoff an der Molekülmasse der entsprechenden Aminosäure [%]
AS	Quantifizierter Gehalt der entsprechenden Aminosäure [g (100 g TM) ⁻¹]
100	Umrechnungsfaktor %

$$\text{Durchschnitt N im Protein [\%]} = \frac{N_{\text{ges}} \cdot 100}{\sum AA_{\text{res}}} \quad (14)$$

N_{ges} Gesamtproteinstickstoffgehalt nach ASA [g (100 g TM)⁻¹]

$\sum AA_{\text{res}}$ Summe aller proteingebundenen Aminosäuren [g (100 g TM)⁻¹]

2.7.7.1 Saure Hydrolyse zu Bestimmung der Gesamtaminosäuren

250 bis 300 mg Probe wurden in eine 100 mL Laborgewindeflasche eingewogen, mit 25 mL 6 M HCl (enthielt 0,1% Phenol) versetzt, mit einem teflonbeschichteten Deckel verschlossen und für 24 h bei 110 °C hydrolysiert. Zum Schutz vor Explosion wurde der Deckel für die erste Stunde der Hydrolyse nur leicht verschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im Eiswasserbad wurde die Lösung erst mit 7,5 M NaOH, anschließend mit 1 M NaOH auf pH 2,2 eingestellt. Mit Citratpuffer (Tabelle 13) wurde die Lösung in einen 200 mL Messkolben überführt und dieser *ad* Marke aufgefüllt. Nach Membranfiltration (0,45 µm) wurde die Lösung direkt zur Analyse eingesetzt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Citratpuffers zur Aminosäurebestimmung

Substanz/Parameter	Zusammensetzung
Konzentration	0,12 M
pH	2,2
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	11,0 g
Citronensäure	6,0 g
Thiodiglycol	14 mL
HCl, 32%	12 mL
Phenol	2,0 g
Volumen (Wasser)	1 L

2.7.7.2 Bestimmung von Cystein und Methionin nach Oxidation

250 bis 300 mg Probe wurden in eine 100 mL Laborgewindeflasche eingewogen und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 5 mL Oxidationsmischung hinzugefügt, mit einem Glasstab umgerührt und die Flasche inklusive Glasstab mit

Parafilm verschlossen. Für 16 h wurde die Mischung im Eiswasserbad im Kühlschrank bei 4 °C oxidiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,84 g Natriumdisulfit gestoppt. Unter Abspülen des Glasstabs wurden 25 mL 6 M HCl (enthält 0,1% Phenol) hinzugefügt und die Schottflasche analog zu 2.7.7.1 behandelt.

Die Oxidationsmischung (pro Probe) setzte sich aus 0,5 mL Wasserstoffperoxid (w = 30%) und 4,5 mL phenolhaltiger Ameisensäurelösung (88,9 g Ameisensäure, w = 98-100%, 11,1 g Wasser und 0,473 g Phenol) zusammen.

2.7.7.3 Alkalische Hydrolyse zur Bestimmung von Tryptophan

250 bis 300 mg Probe wurden analog zu 2.7.7.1 in eine 100 mL Laborgewindeflasche eingewogen und mit 25 mL 5 M NaOH (enthält 0,1% Phenol) versetzt. Nach 24 h bei 110 °C wurde die Probe in einem Wasserbad leicht abgekühlt und langsam mit 10 mL 0,5 M Phosphorsäure versetzt. Der pH wurde anschließend mit 3,75 M und 1 M HCl auf 2,2 eingestellt. Nach Auffüllen auf 200 mL mit Citratpuffer und Membranfiltration wurde Tryptophan sofort analysiert.

2.7.8 Berechnung der Kjeldahlfaktoren

Bei der klassischen Proteinbestimmung nach Kjeldahl wird der Stickstoffgehalt quantifiziert und über einen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor (N, Gleichung 15) der Rohproteingehalt berechnet. Diese Umrechnungsfaktoren sind substanzspezifisch und resultieren aus dem in den Aminosäuren enthaltenen Stickstoffgehalt. Durchschnittlich enthalten Proteine 16% Stickstoff, woraus der Faktor N = 6,25 für Lebensmittel allgemein resultiert.

$$N = \frac{\sum AA_{res} [g (100 g TM)^{-1}]}{N_{ges \text{ in AS }} [g (100 g TM)^{-1}]} \quad (15)$$

N	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
$\sum AA_{res}$	Summe aller proteingebundenen Aminosäuren [g (100 g TM) ⁻¹] (siehe 2.7.7)
$N_{ges \text{ in AS }}$	Gesamtproteinstickstoff, über AS-Verteilung ermittelt [g (100 g TM) ⁻¹]

Wird nun die Aminosäurezusammensetzung analysiert und der Stickstoffanteil im Protein berechnet, so kann der Faktor N für jede Probe direkt bestimmt werden. Bei der Berechnung nach Kjeldahl impliziert dieser Faktor jedoch, dass sämtlicher Stickstoff aus Proteinen stammt. Bei Pilzen bleibt so z. B. Chitin als Stickstoffquelle außer Acht. Der aus dem Chitin stammende Stickstoffgehalt wird somit zu den Proteinen gerechnet, was zu einer Überschätzung des Proteingehaltes führt.

Aus diesem Grund wird der Reinproteingehalt über einen netto Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor (N_{net}) berechnet (Gleichung 16). N_{net} berücksichtigt somit die proteinfremden Stickstoffquellen. Folglich liegen diese Faktoren deutlich niedriger als N zur Berechnung des Rohproteingehaltes.

$$N_{net} = \frac{\sum AA_{res}}{\text{Stickstoffgehalt nach Kjeldahl [g (100 g TM)}^{-1}]} \quad (16)$$

N_{net} netto Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor

$\sum AA_{res}$ Summe aller proteingebundenen Aminosäuren [g (100 g TM)⁻¹] (siehe 2.7.7)

2.7.9 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl

Der Gesamtstickstoffgehalt wurde nach Kjeldahl (Kjeldahl 1883, modifiziert nach Matissek, Steiner und Fischer 2010) analysiert. Die Proben wurden mit 15 mL konzentrierter Schwefelsäure unter Zuhilfenahme eines Katalysatorgemisches (Titandioxid, Kupfersulfat, Natriumsulfat, Kaliumsulfat) bei 400 °C für mindestens 3 h aufgeschlossen, bis die Lösung eine klare, grünlich-blaue Färbung aufwies. Im Anschluss wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt und das gebildete Ammoniak in einen borsäurehaltigen Vorlagekolben übergetrieben. Die Lösung wurde dann mit 0,1 M Salzsäure gegen Sher-Indikator titriert.

Die Berechnung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl erfolgte nach Gleichung 17.

$$\text{Stickstoff [g (100 g TM)}^{-1}] = \frac{a \cdot 1,4008}{E \cdot 10} \cdot \frac{100}{100 - \%Feuchte} \quad (17)$$

a	Verbrauch an 0,1 M HCl-Maßlösung [mL]
1,4008	1 mL 0,1 M HCl entspricht 1,4008 mg Stickstoff
E	Einwaage [g]
10	Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe und mg Stickstoff in g
$\frac{100}{100 - \%Feuchte}$	Umrechnung auf Trockenmasse

2.7.10 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl

Der Rohproteingehalt nach Kjeldahl wurde nach Gleichung 18 berechnet.

$$\text{RP [g (100 g TM)}^{-1}] = \frac{a \cdot 1,4008 \cdot N}{E \cdot 10} \cdot \frac{100}{100 - \%Feuchte} \quad (18)$$

RP	Rohproteingehalt [g (100 g TM) ⁻¹]
a	Verbrauch an 0,1 M HCl-Maßlösung [mL]
1,4008	1 mL 0,1 M HCl entspricht 1,4008 mg Stickstoff
N	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Rohproteingehaltes (siehe 2.7.8)
E	Einwaage [g]
10	Umrechnungsfaktor auf 100 g Probe und mg Stickstoff in g
$\frac{100}{100 - \%Feuchte}$	Umrechnung auf Trockenmasse

2.7.11 Berechnung der Proteinqualität

2.7.11.1 FAO/WHO Referenzprotein

Ein in der Literatur sehr häufig zitiertes Referenzprotein zur Bewertung der Proteinqualität ist das 1973 von der FAO/WHO festgelegte Referenzprotein (Tabelle 14; FAO 1973). Es spiegelt die optimale Zusammensetzung an essentiellen, schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren wider, die zur menschlichen Ernährung benötigt werden. In früheren Zeiten wurde als Referenzprotein Vollei oder Casein verwendet.

Tabelle 14: Zusammensetzung des von der FAO/WHO 1973 festgelegten Referenzproteins.

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

2.7.11.2 Amino Acid Score (AAS) und Chemical Score (CS)

Zur Berechnung der Proteinqualität werden der *Amino Acid Score* (AAS) bzw. der daraus berechnete *Chemical Score* (CS) herangezogen (Gleichungen 19 und 20). Die Zusammensetzung des Referenzproteins wurde in Abschnitt 2.7.11.1 aufgeführt. Anhand des niedrigsten CS wird die limitierende Aminosäure eines Proteins bestimmt. Werte über 100 sind möglich, wenn das Testprotein einen höheren Gehalt einer Aminosäure als das Referenzprotein aufweist.

$$\text{Amino Acid Score (AAS)} = \frac{\text{Aminosäure im Testprotein [\%]}}{\text{Aminosäure im Referenzprotein [\%]}} \quad (19)$$

$$\text{Chemical Score (CS)} = \text{AAS} \cdot 100 \quad (20)$$

AAS *Amino Acid Score*

2.7.11.3 Essentieller Aminosäure Index EAAI

Für die Berechnung der Biologischen Wertigkeit wird der Essentielle Aminosäure Index (*Essential Amino Acid Index*, EAAI) benötigt (Gleichung 21). CS-Werte über 100 werden vor der Berechnung des EAAIs auf 100 gesetzt.

$$EAAI = \sqrt[8]{CS_{Ile} \cdot CS_{Leu} \cdot CS_{Lys} \cdot CS_{Met+Cys} \cdot CS_{Phe+Tyr} \cdot CS_{Thr} \cdot CS_{Trp} \cdot CS_{Val}} \quad (21)$$

EAAI Essentieller Aminosäure Index

CS *Chemical Score*

2.7.11.4 *Biologische Wertigkeit BW*

Die Biologische Wertigkeit (BW) ist definiert als die Menge Nahrungsprotein, die 100 g Körpereweiß ersetzen kann. In der Literatur sind verschiedene Berechnungsansätze zu finden. Die hier verwendete Berechnung nach Oser (1959) ist eine aus der Korrelation von EAAI und ermittelten Biologischen Wertigkeiten abgeleitete Formel (Gleichung 22). Die BW berücksichtigt nicht die wahre Verdaubarkeit, sondern ist nur eine Annäherung an diese (vorhergesagte BW). Der PDCAAS (*Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score*) berücksichtigt den Bedarf an Aminosäuren für den Menschen und die Verdaubarkeit des Proteins. Die Berechnung der BW nach Oser wird meistens für *in vitro* Analysen, unter anderem auch für Pilze, eingesetzt (Crisan und Sands 1978).

$$\text{Biologische Wertigkeit (BW)} = (1,09 \cdot \text{EAAI}) - 11,7 \quad (22)$$

EAAI Essentieller Aminosäure Index

2.7.12 Bestimmung freier Aminosäuren

Der Gehalt an freien Aminosäuren in Kulturüberständen von PSA ATD, wurde ebenfalls nach europäischer Richtlinie 98/64/EG durchgeführt. Dazu wurden 5 mL Probenmaterial in ein geeignetes Gefäß vorgelegt und mit 100 mL Extraktionslösung (0,1 M HCl mit 2% Thiodiglykol) 1 h bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss extrahiert. Nach Absetzen etwaiger Partikel wurden 10 mL Überstand in ein weiteres Gefäß überführt und mit 5 mL 5-Sulfosalicylsäure ($\beta = 6\%$) unter Rühren versetzt und für 5 min geschwenkt. Anschließend wurden nach Zentrifugieren (3.283 g, 10 min, 4 °C) 10 mL klarer Überstand in ein 100 mL-

Becherglas gegeben und der pH mit 1 M Natronlauge auf 2,20 eingestellt. Die Lösung wurde in einem Messkolben mit Citratpuffer (2.7.7.1, Tabelle 13) *ad* 20 mL aufgefüllt und nach geeigneter Verdünnung mit Citratpuffer sowie Membranfiltration (0,45 µm) für die Analyse eingesetzt. Dieselben Parameter wie bei der Bestimmung der Aminosäuren nach Totalhydrolyse (2.7.7, Tabelle 11) wurden zur Trennung und Quantifizierung mittels Aminosäureanalysator angewendet.

Das durch die Probenaufarbeitung vorgegebene Gesamtverdünnungsvolumen F (nach europäischer Richtlinie 98/64/EG) berechnet sich nach Gleichung 23. Die Quantifizierung erfolgte für Flüssigkeiten nach Gleichung 24.

$$F = 100 \cdot \frac{10 + 5}{10} \cdot \frac{V}{10} \quad (23)$$

F	Gesamtverdünnungsvolumen [mL]
100	Volumen Extraktionslösung [mL]
10 & 5	Volumen an Überstand und 5-Sulfosalicylsäure [mL]
V	Endvolumen [mL]

$$\text{Freie AS [mol L}^{-1}\text{]} = \frac{c \cdot F \cdot \text{MG} \cdot 1000}{V \cdot 10^9} \quad (24)$$

Freie AS	Gehalt einer freien Aminosäure in Flüssigkeiten [mol L ⁻¹]
c	Konzentration in Probenlösung [nmol mL ⁻¹]
F	Gesamtverdünnungsvolumen [mL]
MG	Molekülmasse einer Aminosäure [g mol ⁻¹]
V	Volumen der eingesetzten Probe [mL]
1000	Umrechnung auf L
10 ⁹	Umrechnung von nmol in mol

2.7.13 Bestimmung des Gesamtfettgehaltes

Für die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes wurde zuerst ein Säureaufschluss nach Weibull-Stoldt durchgeführt. Die Proben wurden mit 150 mL 4 M Salzsäure für 30 min am Sieden gehalten. Anschließend wurden 100 mL heißes Wasser hinzugefügt, die Lösung filtriert und neutral gewaschen. Das Fett wurde mittels Soxtherm-Apparatur SE-416 von Gerhardt (Königswinter, Deutschland) mit

170 mL Petrolether (tiefsiedend, 35-60 °C) diskontinuierlich extrahiert. Die eingestellten Parameter sind Tabelle 15 zu entnehmen. Nach Ende der Extraktion wurde der restliche Petrolether unter Stickstoff bis zur Trockene entfernt und die Extraktionsbecher bei 105 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet und ausgewogen. Die Berechnung des Fettgehaltes erfolgte nach Gleichung 25.

Die Bestimmung des Fettgehaltes von gefriergetrockneten und gemörserten Pilzmyzelien erfolgte ohne vorherigen Säureaufschluss.

Tabelle 15: Parameter der halbautomatischen Soxtherm-Apparatur SE-416.

Parameter	Einstellung
T-Klasse	200 °C
Extraktionstemperatur	150 °C
Absenintervall	4 min
Absenkimpuls	2 s
Kochphase	30 min
Abdestillieren AA	6 x Intervall
Extraktionszeit	1 h 30 min
Abdestillieren AB	3 x Intervall
Abdestillieren AC	5 min
Programmdauer	2 h 41 min

$$\text{Fett [g (100 g TM)}^{-1}] = \frac{\Delta_{\text{Kolben}} \cdot 100}{E} \cdot \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} \quad (25)$$

Fett	Fettgehalt [g (100 g TM) ⁻¹]
Δ_{Kolben}	Differenz des Kolbengewichts vor und nach der Extraktion
E	Probeneinwaage [g]
$\frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}}$	Umrechnung auf Trockenmasse

2.7.14 Bestimmung des Fettsäureprofils mittels GC-FID

Zu dem, wie unter 2.7.13 beschriebenen, extrahierten Fett wurden 3 mL Isooctan gegeben. 1 mL dieser Lösung wurde in ein 10 mL-Derivatisierungsröhrchen mit Teflon beschichtetem Deckel gegeben und mit 1 mL Isooctan geschüttelt. Nach

Zugabe von 0,1 mL methanolischer Kalilauge (13,1 g KOH mit 100 mL Methanol unter leichtem Erwärmen gelöst) wurde sofort kräftig geschüttelt und die Lösung für 2 min stehen gelassen. Anschließend wurden 2 mL gesättigte Natriumchloridlösung hinzugegeben und kurz geschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und 1:10 mit Isooctan für die gaschromatographische Analyse verdünnt. Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden eine Alkanreihe (Anhang 7.5, Abbildung 53) sowie ein Fettsäuremethylester-Standard (Anhang 7.5, Abbildung 54) gemessen. Die Parameter zur Gaschromatographie (GC) sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Parameter des Gaschromatographen zur Bestimmung des Fettsäureprofils.

Parameter	Einstellung
Gerät	7890A, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Säule	19091N-113 HP Innowax, 30 m x 320 µm x 0,25 µm, Agilent Technologies
Trägergas	Wasserstoff, 2 mL min ⁻¹
Injektortemperatur	250 °C
Splitverhältnis	Standard 5:1, Proben 25:1
Detektor	Flammenionisationsdetektor FID (250 °C, H ₂ 40 mL min ⁻¹ , Luft 400 mL min ⁻¹)
Programm	40 °C für 3 min, mit 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C, 240 °C für 7 min
Injektionsvolumen	1 µL
Semptumspülung	3 mL min ⁻¹
Software	GC ChemStation

Über die Berechnung der Retentionsindices wurden die Fettsäuren identifiziert und über die Peakflächen nach Gleichung 26 quantifiziert.

$$FS_i [\%] = \frac{P_i \cdot 100}{\sum P_i} \quad (26)$$

FS_i Anteil der i-ten Komponente am Fettsäuregemisch [%]

P_i korrespondierende Peakfläche [pA s]

100 Umrechnung auf %

∑P_i Summe der berücksichtigten Peakfläche [pA s]

2.7.15 Bestimmung der Rohasche

Der Rohaschegehalt wurde nach Vorveraschung und anschließender vollständiger Veraschung bei 550 °C im Muffelofen durch Differenzwägung der Quarztiegel ermittelt. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 27.

$$\text{Rohasche [g (100 g TM)}^{-1}] = \frac{\Delta_{\text{Tiegel}} \cdot 100}{E} \cdot \frac{100}{100 - \% \text{Feuchte}} \quad (27)$$

Δ_{Tiegel} Differenz des Tiegels vor und nach Veraschung [g]

E Probeneinwaage [g]

100 Umrechnung auf g (100 g)⁻¹

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

2.7.16 Bestimmung des Mineralstoffgehaltes

Die Zusammensetzung der Mineralstoffe wurde nach Mikrowellenaufschluss mittels ICP-OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) bestimmt. Etwa 250 mg Probenmaterial wurden mit 2 mL Reinstwasser, 6 mL 37%iger Salzsäure und 2 mL 65%iger Salpetersäure gemischt und mittels Mikrowelle (One Touch Technology Mars, CEM, Kamp-Lintfort, Deutschland) wie folgt aufgeschlossen: bei 500 W in 15 min auf 110 °C, bei 1300 W binnen 15 min auf 180 °C, halten für weitere 15 min auf 180 °C, 30 min abkühlen lassen.

Die Messung mittels ICP-OES (Varian 720 ES) wurde am Institut für Bodenkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen nach DIN ISO 22036 durchgeführt. Für jedes Element wurde eine spezifische Emissionswellenlänge verwendet (Tabelle 17).

Tabelle 17: Zur Quantifizierung der Mineralstoffe verwendete Emissionswellenlängen.

Element	Emissionswellenlänge [nm]	Element	Emissionswellenlänge [nm]
Calcium	220,861	Mangan	257,610
Chrom	205,560	Molybdän	202,032
Kupfer	327,395	Natrium	589,592
Eisen	240,489	Phosphor	213,618
Kalium	766,491	Schwefel	182,562
Magnesium	182,731	Zink	213,857

2.7.17 Bestimmung der Schwermetalle Blei, Cadmium und Quecksilber

Die Gehalte der giftigen Schwermetalle Blei, Cadmium und Quecksilber wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt. Für die Bestimmung von Blei und Cadmium wurde eine Graphitrohr-AAS von Thermo Scientific (iCE 3000 Series mit GFS Furnace Autosampler und GFS Graphite Furnace) verwendet, für Quecksilber wurde eine Kaltdampf-Einheit (PDS-6, Neptune Instruments) hinzugeschaltet.

2.7.17.1 Blei

In ein 100 mL-Becherglas wurden ca. 0,35 g fein gemahlene Probe eingewogen und mit 10 mL 65%iger Salpetersäure sowie 5 mL Wasserstoffperoxid (30%) versetzt. Abgedeckt wurde die Lösung für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das überschüssige Wasserstoffperoxid durch Hitzezufuhr ausgetrieben. Nach Beginn der Bildung von nitrosen Gasen wurde die Probe für 21 h stehen gelassen. Die Lösung wurde anschließend über einen Filter in einen 50 mL-Messkolben überführt und *ad* 50 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Eine Kalibrierung für Blei wurde im Bereich von 0 – 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ mit Reinstwasser, dem 1 mL 65%ige Salpetersäure pro 100 mL zugesetzt wurde, aus einer Blei-Referenzlösung (1 g L^{-1}) angesetzt (Abbildung 8). Die AAS-Parameter waren wie folgt: Inertgas Argon, Zeeman-Untergrundkorrektur, ELC Küvette, Injektionstemperatur 70 °C, Wellenlänge 283,3 nm, 0,5 nm Bandbreite, 90% Lampenstrom, 10 μL Proben- und 10 μL Modifiervolumen. Als Modifier wurde ein Pd-Mg-Modifier (1,84 mL Pd-Modifier [10 g L^{-1}] mit 14 mg Magnesiumnitrat *ad* 10 mL mit 0,5 M Salpetersäure) verwendet. Das Temperaturprogramm ist Tabelle 18 zu entnehmen. Die Berechnung erfolgte mittels Gleichung 28.

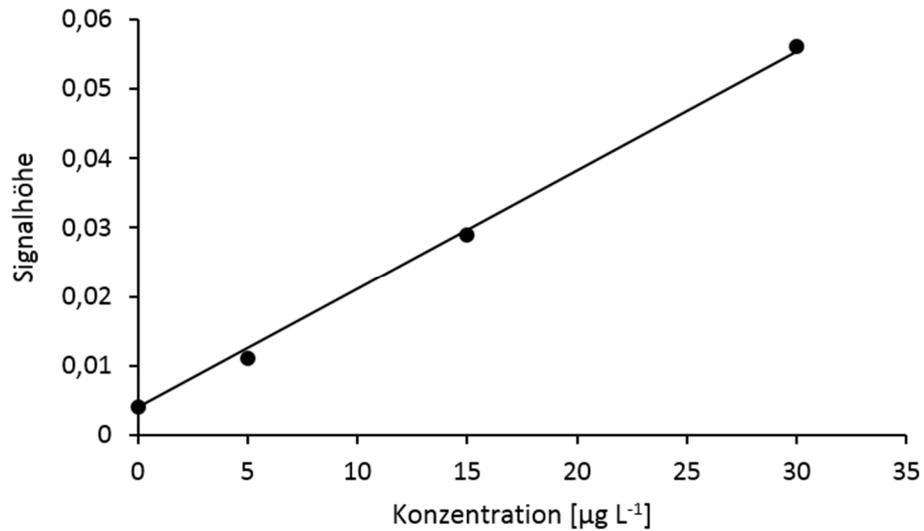


Abbildung 8: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Blei; $y = 0,0017x + 0,0040$, $R^2 = 0,9980$.

Tabelle 18: AAS-Temperaturprogramm zur Bestimmung von Blei.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Argon [mL min^{-1}]
Trocknung	115	40	0,2
Pyrolyse	1100	20	0,2
Atomisierung	1800	3	-
Reinigung	2500	3	0,2

$$\text{Pb } [\mu\text{g (kg TM)}^{-1}] = \frac{c \cdot 0,05 \cdot 1000}{E} \quad (28)$$

Pb Blei [$\mu\text{g (kg TM)}^{-1}$]

c Konzentration [$\mu\text{g L}^{-1}$]

0,05 Volumen [mL]

1000 Umrechnung auf $\mu\text{g (kg)}^{-1}$

E Probeneinwaage [g TM]

2.7.17.2 Cadmium

Für die Bestimmung von Cadmium wurde derselbe Probenextrakt wie für die Blei-Bestimmung verwendet (2.7.17.1). Für Cadmium wurde im Bereich von 0 - 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ kalibriert (Abbildung 9).

Folgende AAS-Parameter wurden eingestellt: Inertgas Argon, Zeeman-Untergrundkorrektur, ELC Küvette, Injektionstemperatur 70 °C, Wellenlänge 228,8 nm, 0,5 nm Bandbreite, 30% Lampenstrom, 15 µL Proben- und 10 µL Modifiervolumen (2.7.17.1). Das Temperaturprogramm ist Tabelle 19 zu entnehmen. Die Berechnung erfolgte ebenfalls analog zu der Quantifizierung von Blei (Gleichung 28).

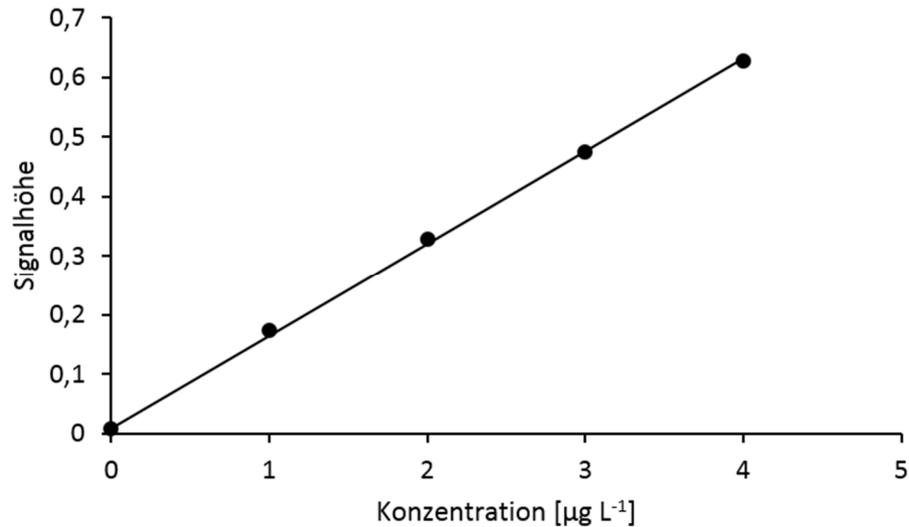


Abbildung 9: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Cadmium; $y = 0,1563x + 0,0070$, $R^2 = 0,9992$.

Tabelle 19: AAS-Temperaturprogramm zur Bestimmung von Cadmium.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Argon [mL min ⁻¹]
Trocknung	120	40	0,2
Pyrolyse	650	20	0,2
Atomisierung	1050	3	-
Reinigung	2100	3	0,2

2.7.17.3 Quecksilber

Ca. 0,3 g Probe wurden in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 10 mL 2 M Salpetersäure 1 h im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde 10 min bei 2.514 g zentrifugiert und der Überstand mit Reinstwasser im Messkolben *ad* 25 mL aufgefüllt. 10 mL dieser Lösung wurden in das AAS-Reaktionsgefäß überführt und der absolute Gehalt an Quecksilber bestimmt. Für

die Kalibrierung (Abbildung 10) wurden aus einer Standardlösung (1 g L⁻¹) über Zwischenverdünnungen 0 – 15 ng Quecksilber absolut in das Reaktionsgefäß gegeben und mit etwas Wasser versetzt. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 29.

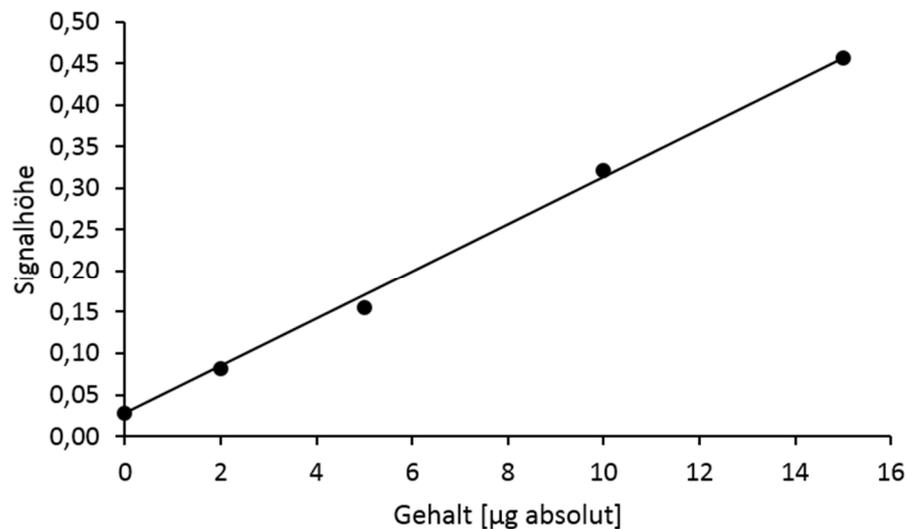


Abbildung 10: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Quecksilber; $y = 0,0286 + 0,0280x$, $R^2 = 0,9974$.

$$\text{Hg} [\mu\text{g} (\text{kg TM})^{-1}] = \frac{c \cdot 2,5 \cdot 100}{E} \quad (29)$$

Hg	Quecksilber [$\mu\text{g} (\text{kg TM})^{-1}$]
c	Menge an Quecksilber [μg]
2,5	Faktor durch Aliquotierung
100	Umrechnung auf $\mu\text{g} (\text{kg})^{-1}$
E	Probeneinwaage [g TM]

2.7.18 Biomassenquantifizierung über Ergosterol

Das zellmembrangebundene Mykosterol Ergosterol (Abbildung 11 A), welches fast ausschließlich in Pilzen zu finden ist, eignet sich als Biomarker, um den Biomassenanteil des Pilzes am fermentierten Substrat zu quantifizieren. Um den Pilzanteil am Lyophilisat zu quantifizieren, kann Ergosterol nach alkalischer Verseifung mit internem Standard 7-Dehydrocholesterol (Abbildung 11 B) mittels

HPLC-DAD quantifiziert werden. Die Analyse wurde nach einer modifizierten Methode nach Wittig, Krings und Berger (2013) durchgeführt, welche ursprünglich für die Analyse von Vitamin D konzipiert wurde.

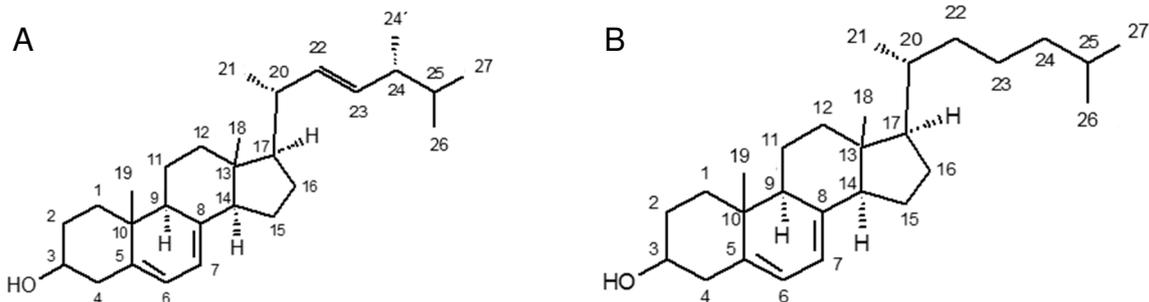


Abbildung 11: Struktur von Ergosterol (A) und 7-Dehydrocholesterol (B).

2.7.18.1 Probenaufarbeitung

Die gefriergetrocknete Probe wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff mittels Pistill aufgeschlossen. 0,15 – 0,20 g Probenmaterial wurden in einen Braunglas-Rundkolben (250 mL) eingewogen und mit 50 mL Ethanol, 4 mL Natriumascorbat-Lösung (175 g L^{-1} in 1 M NaOH), 10 mL Kaliumhydroxid/Wasser-Lösung (50/50, w/w) und 0,5 mL internem Standard für 1 h bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ verseift. Als interner Standard wurde 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) mit einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} in Methanol gewählt. Anschließend wurden 50 mL VE-Wasser hinzugefügt und die Lösung etwas abgekühlt. Nach Filtration durch einen Faltenfilter wurde im Scheidetrichter nacheinander mit 50 mL Diethylether, 50 mL *n*-Pentan/10 mL Ethanol, 50 mL *n*-Pentan und schließlich mit 20 mL *n*-Pentan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden drei Mal mit je 50 mL 3%iger KOH in 5%igem Ethanol gewaschen und anschließend drei Mal mit je 100 mL VE-Wasser neutralgewaschen. Die organische Phase wurde über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtration am Rotationsverdampfer ($40 \text{ }^\circ\text{C}$, kein Vakuum) eingeengt. Lösungsmittelreste wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockene entfernt. Der Rückstand wurde sofort in 1,5 mL Methanol (Ultraschallbad für 4 min) resuspendiert, zentrifugiert (18.000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min) und membranfiltriert ($0,45 \text{ } \mu\text{m}$) zur Analyse mittels HPLC eingesetzt.

2.7.18.2 Absorptionsmaxima von Ergosterol

Die Detektion von Ergosterol erfolgte bei 282 nm, dem Absorptionsmaximum von Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol (Abbildung 12), aufgezeichnet mittels 8-fach Multiphotometer Specord 50 von Analytik Jena und Software Win Aspect Version 2.2.1.0.

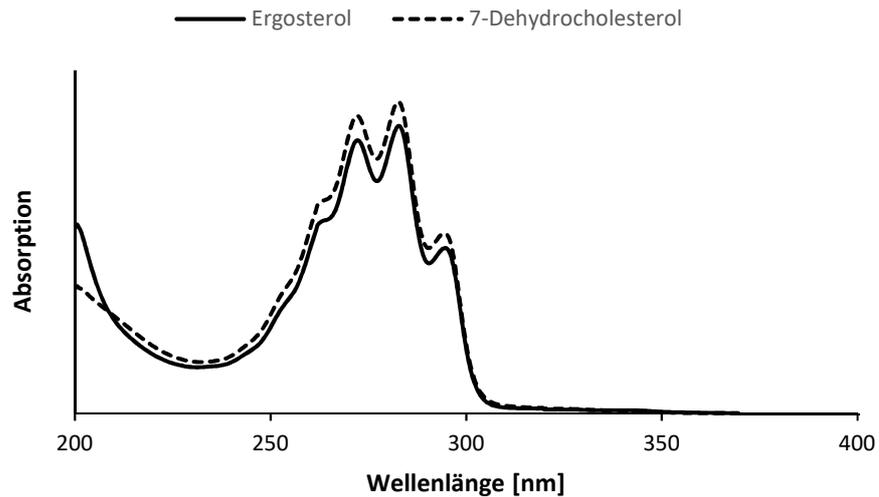


Abbildung 12: Absorptionsspektrum von Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol in Ethanol: Maxima bei 202, 263, 273, 282 und 294 nm.

2.7.18.3 HPLC-Parameter

Die Geräteparameter sind Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: HPLC-DAD Parameter zur Bestimmung von Ergosterol.

Parameter	Einstellung
Gerät	LaChrom (Merck, Darmstadt, DE) Interface D-7000, Autosampler L-7200, Pumpe L-7100
Säulen	Vorsäule: Chromolith High Resolution RP-18 endcapped 5-4,6 (Merck) 1. Trennsäule: Chromolith Performance RP-18 e 100-4,6 (Merck) 2. Trennsäule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Düren, DE)
Säulenofen	Jetstream 2 Plus (Waters, Eschborn, DE)
Eluenten	A: Methanol B: Acetonitril C: 0,05%ige Ameisensäure
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Modus	Gradient
Gradient	0-2 min A: 0% → 0%, B: 70% → 100%, C: 30% → 0% 2-10 min A: 0% → 0%, B: 100% → 100%, C: 0% → 0% 10-20 min A: 0% → 5%, B: 100% → 95%, C: 0% → 0% 20-30 min A: 5% → 5%, B: 95% → 95%, C: 0% → 0% 30-35 min A: 5% → 0%, B: 95% → 100%, C: 0% → 0% 35-40 min A: 0% → 0%, B: 100% → 70%, C: 0% → 30%
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Detektor	Diodenarraydetektor L-7455 (DAD)
Software	HPLC System Manager Version 4.1

2.7.18.4 Kalibrierung von Ergosterol

Für die Quantifizierung von Ergosterol wurde eine externe Kalibrierung verwendet, bei der die Peakflächenverhältnisse von Ergosterol zum internen Standard 7-DHC gegen die Konzentration an Ergosterol aufgetragen wurde. Die Kalibrierung (Abbildung 13) wurde in einem Konzentrationsbereich von 2,9 – 750 µg mL⁻¹ Ergosterol durch Serienverdünnung einer 1,5 mg mL⁻¹ Stammlösung in Methanol hergestellt (Anhang 7.6, Abbildung 57). Die Konzentration des internen Standards 7-DHC betrug stets 500 µg mL⁻¹ (Stammlösung: 1 mg mL⁻¹ in Methanol).

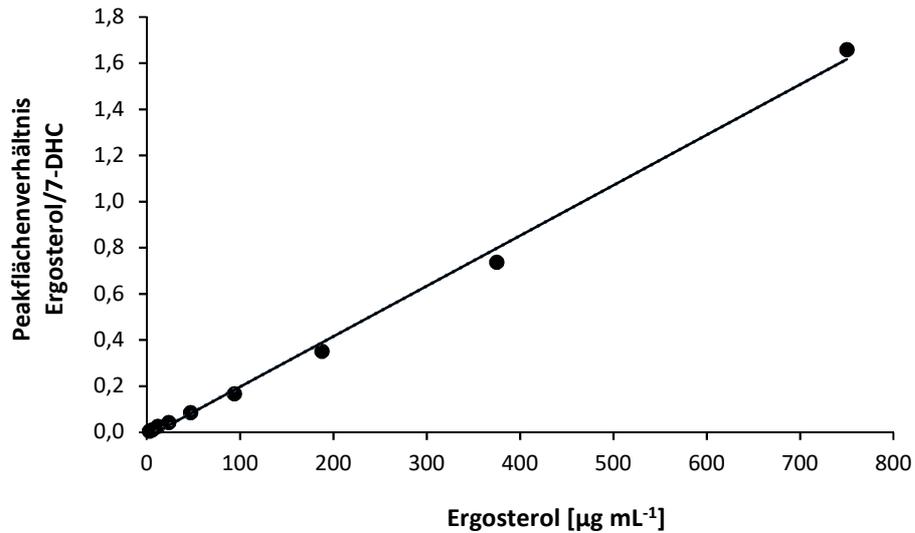


Abbildung 13: Kalibriergerade Ergosterol. $2,9 - 750 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0,0022x - 0,0212$, $R^2 = 0,9965$.

2.7.18.5 Quantifizierung des Pilzanteils

Um den Pilzanteil der fermentierten und lyophilisierten Biomasse zu quantifizieren, wurde Myzel in Medien kultiviert, die aus 100% löslichen Substanzen bestanden. Das so erhaltene Myzel wurde als reines Pilzmyzel den Berechnungen zugrunde gelegt. Von diesen Pilzmyzelien wurde der Ergosterolgehalt nach 2.7.18.1 - 2.7.18.4 analysiert (Anhang 7.6, Abbildung 58). Drei verschiedene Medien wurden untersucht:

- 1) Malzextraktmedium (20 g L^{-1})
- 2) Medium M1 ohne Kohlenstoffquelle (Tabelle 7, 2.6.3)
- 3) ausgekochter Apfeltrester.

Ausgekochter Apfeltrester wurde hergestellt, indem $24,60 \text{ g}$ Apfeltrester mit 1 L Wasser für 10 min gekocht wurden. Anschließend wurde wieder *ad* 1 L aufgefüllt und nach Entfernen der Feststoffe durch Filtration wurde die Lösung autoklaviert.

Die Berechnung des Ergosterolgehaltes erfolgte nach Gleichung 30. Die Berechnung des prozentualen Pilzanteils am Lyophilisat erfolgte durch Dreisatz, wobei der Ergosterolgehalt des Myzels aus Malzextraktmedium als 100% festgesetzt wurde.

$$\text{Ergosterol } [\mu\text{g (g TM)}^{-1}] = \frac{c \cdot 1,5}{E} \quad (30)$$

Ergosterol	Gehalt an Ergosterol [$\mu\text{g (g TM)}^{-1}$]
c	Konzentration Ergosterol, über 2.7.18.4 berechnet [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
1,5	Volumen an Methanol [mL]
E	Einwaage [g TM]

2.7.18.6 *Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Ergosterol*

Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NWG und BG) von Ergosterol wurde nach DIN 32645 eine vorläufige Nachweisgrenze mittels Kalibriergeradenmethode (indirekte Methode) berechnet ($n = 7$, Signifikanzniveau 99%, $k = 3$; $2,9 - 187,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Der 10-fache Wert dieser vorläufigen Nachweisgrenze wurde als die neue, maximale Konzentration einer neuen Kalibrierung zur Berechnung der NWG und BG festgesetzt. Die zweite Kalibrierreihe wurde im Bereich von $2,9 - 46,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ angesetzt ($n = 5$).

2.7.19 Anreicherung von Vitamin D₂ im Pilzmyzel

Sofern nichts Anderes angegeben, wurde die Anreicherung mit Vitamin D₂ in Kristallisierschalen mit 19,5 cm Durchmesser (entspricht $298,6 \text{ cm}^2$) durchgeführt. Für die Belichtung wurden drei UV-B Medical Hg-Lampen Arimed B12 9 W (kompakt) von Philips (Amsterdam, NL) mit einem Emissionsmaximum von 290 – 310 nm verwendet. Der Abstand zur Arbeitsfläche betrug dabei 10 cm. Die Lampen wurden im Abstand von 13 cm nebeneinander montiert. Das Emissionsspektrum wurde mittels Ocean Optics FLAME-S-XR1-ES im Wellenlängenbereich von 200 bis 1.000 nm aufgezeichnet. Abbildung 14 zeigt einen Ausschnitt zwischen 250 und 400 nm. Die Bestrahlungsstärke betrug zwischen zwei Lampen $4,00 \text{ mW cm}^{-2}$ und direkt unterhalb der Lampe $4,25$ bzw. $5,08 \text{ mW cm}^{-2}$ (Lampe außen bzw. in der Mitte). Im Mittel betrug die Bestrahlungsstärke $4,44 \text{ mW cm}^{-2}$. Sie wurde mittels Newport Power Meter Model 1918R mit Sensor 818P-015-19 über den gesamten Wellenlängenbereich gemessen.

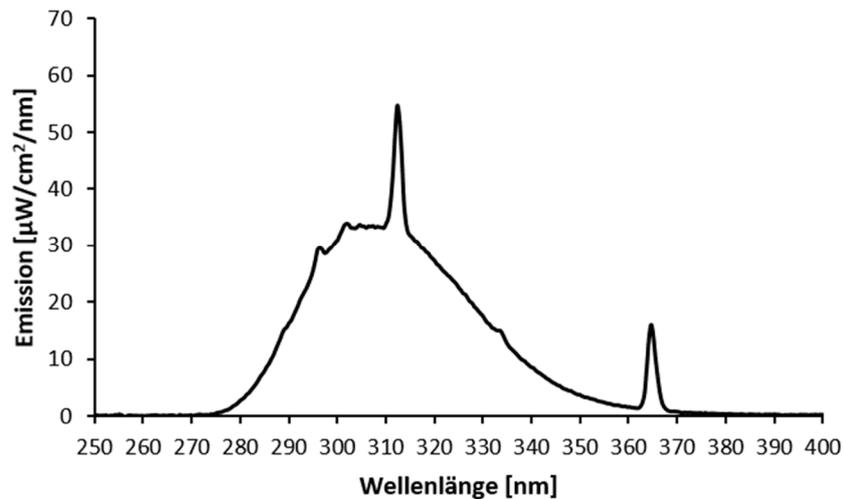


Abbildung 14: Emissionsspektrum der UV-B Lampen Arimed B 12 9 W (kompakt). Emissionsbereich ca. 275 bis 360 nm mit Emissionsmaximum zwischen ca. 295 und 320 nm. Im Abstand von 10 cm zur Lampe gemessen.

Proben wurden sowohl als Pulver als auch als vollständige Submerskultur belichtet. *P. sapidus* kultiviert auf Apfeltrester wurde als pulverförmiges Lyophilisat zur Aufnahme einer Belichtungskurve belichtet. Submerskulturen von PSA in Malzextraktmedium (Kultur aus 200 mL 2%igem Malzextrakt mit 20 mL Inokulum, vier Tage kultiviert) wurden als vollständige Kulturen belichtet, um damit den Einfluss verschiedener Oberflächengrößen zu ermitteln. Für die Überprüfung des Oberflächeneinflusses wurden Kristallisierschalen in zwei weiteren Größen verwendet: 9,1 cm Durchmesser mit 65,0 cm² und 13,8 cm Durchmesser mit 149,6 cm².

Um einen metabolischen Einfluss des Pilzmyzels auszuschließen, wurden PSA Kulturen auf Malzextraktmedium autoklaviert (20 min 121 °C), homogenisiert (30 s, 10.000 rpm) und anschließend belichtet. Zum Vergleich wurden nicht autoklavierte Kulturen ebenfalls belichtet. Die Kultivierungsdauer betrug vier Tage.

Kulturen, die als Flüssigkultur belichtet wurden, wurden mit einer anderen Belichtungsanlage bestrahlt: zwei 1,7 m lange Arimed B 12 100 W Lampen (JW Sales GmbH, Brand Division Cosmedico Medical Systems, Stuttgart, Deutschland) wurden im Abstand von 30 cm zueinander und mit einem Abstand von 10,6 cm zur Oberfläche, auf der die Kristallisierschalen platziert wurden, montiert. Das Emissionsspektrum entsprach dem der ersten Lampen. Die Bestrahlungsstärke

dieses Systems wurde von Wittig, Krings und Berger (2013) publiziert. Sie betrug $1,15 \text{ mW cm}^{-2}$ im UV-B Bereich von 280 – 315 nm.

2.7.19.1 *Probenaufarbeitung und Absorptionsmaxima von Vitamin D*

Die Probenaufarbeitung zur Quantifizierung von Vitamin D₂ (Abbildung 15 A) erfolgte analog zu der Bestimmung des Ergosterolgehaltes (2.7.18.1). Abweichend davon wurden ca. 1,5 g belichtetes Probenmaterial eingesetzt und die Detektion erfolgte bei 265 nm, dem Absorptionsmaximum von Vitamin D₂ und D₃ (Abbildung 16). Als interner Standard wurde Vitamin D₃ verwendet (Abbildung 15 B).

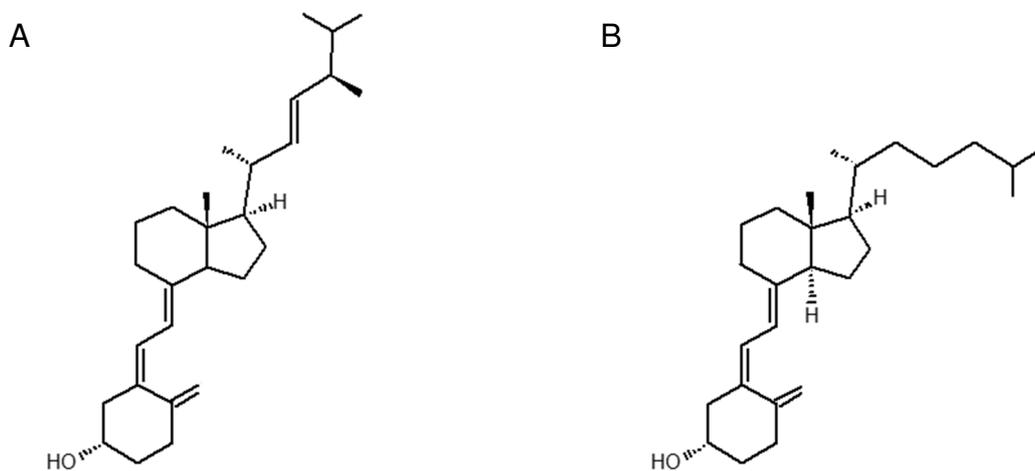


Abbildung 15: Struktur von Vitamin D₂ (A) und Vitamin D₃ (B).

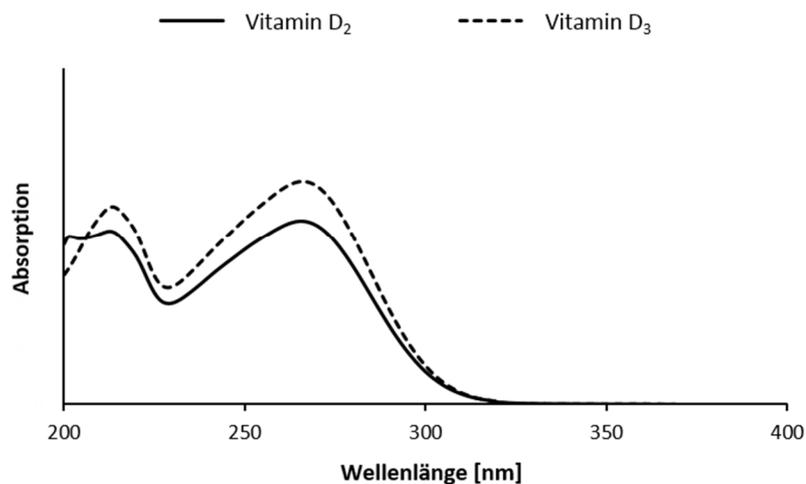


Abbildung 16: Absorptionsspektrum von Vitamin D₂ und D₃ in Methanol: 215 und 265 nm.

2.7.19.2 HPLC-Parameter

Für die Quantifizierung von Vitamin D wurden dieselben Parameter, wie für die Quantifizierung von Ergosterol verwendet (2.7.18.3).

2.7.19.3 Kalibrierung von Vitamin D₂

Für die Quantifizierung von Vitamin D₂ wurde eine externe Kalibrierung verwendet, bei welcher die Peakflächenverhältnisse von Vitamin D₂ zum internen Standard Vitamin D₃ gegen die Konzentration an Vitamin D₂ aufgetragen wurde. Die Kalibrierung (Abbildung 17) wurde in einem Konzentrationsbereich von 3,9 – 250 µg mL⁻¹ Vitamin D₂ durch Verdünnung einer 1,0 mg mL⁻¹ Stammlösung in Methanol hergestellt (Anhang 7.7, Abbildung 62). Die Konzentration des internen Standards Vitamin D₃ betrug stets 100 µg mL⁻¹ (Stammlösung: 1,0 mg mL⁻¹ in Methanol, 1:5 verdünnt).

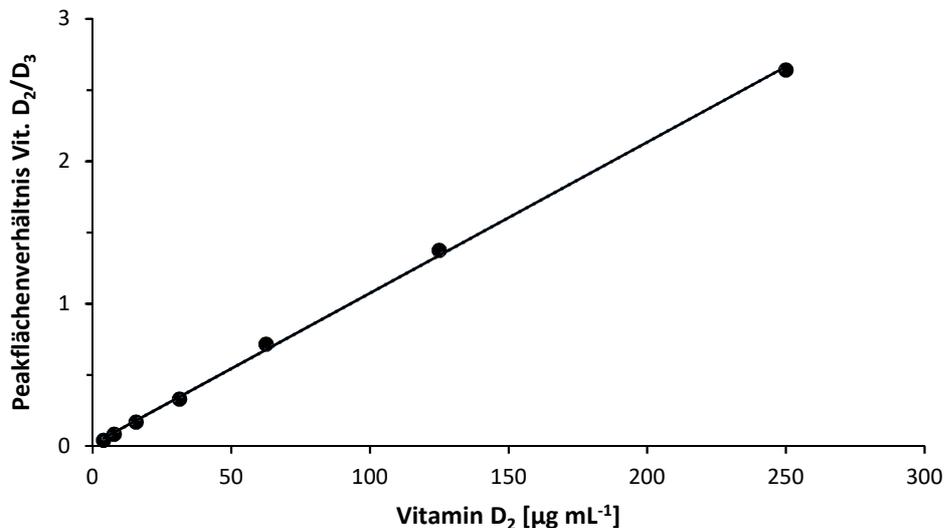


Abbildung 17: Kalibriergerade Vitamin D₂. 3,9 – 250 µg mL⁻¹; $y = 0,0106x - 0,0128$, $R^2 = 0,9992$.

2.7.19.4 Quantifizierung des Vitamin D Gehaltes

Zur Quantifizierung des Vitamin D₂ Gehaltes wurde Gleichung 31 verwendet.

$$\text{Vitamin D}_2 [\mu\text{g (g TM)}^{-1}] = \frac{c \cdot 1,5}{E} \quad (31)$$

- c Konzentration Vitamin D₂, über 2.7.19.3 berechnet [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
 1,5 Volumen an Methanol [mL]
 E Einwaage [g TM]

2.7.19.5 Lagerungsversuch belichteter Proben

Um die Stabilität von Vitamin D₂ zu untersuchen, wurde das Lyophilisat von *P. sapidus* (kultiviert auf Apfeltrester) belichtet (2.7.19). Genau 6 g wurden in Dreifachbestimmung in Kristallisierschalen mit einem Durchmesser von 19,5 cm eingewogen und für 10 min belichtet. Anschließend wurde jede Schale in drei Portionen aufgeteilt, von denen jeweils ein Anteil sofort analysiert wurde. Die verbleibenden Anteile wurden sowohl bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss als auch bei -20 °C im Gefrierschrank für 91 Tage (13 Wochen) gelagert und anschließend ebenfalls analysiert.

2.7.19.6 Belichtung einer Ergosterol-Standardlösung

Um zu zeigen, dass Ergosterol allein durch Belichtung in Vitamin D₂ umgewandelt werden kann, wurden 50 mL einer Ergosterollösung ($c = 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Methanol) für unterschiedliche Zeiten (0 min bis 30 min) in Kristallisierschalen mit einem Durchmesser von 7,4 cm belichtet. Anschließend wurde das Volumen wieder auf 50 mL mit Methanol aufgefüllt, um eine potentielle Konzentrierung durch Verdunstung zu vermeiden. Ein Aliquot von 500 μL wurde mit 500 μL einer Mischstandardlösung aus 7-DHC ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) und Vitamin D₃ ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) vermischt, membranfiltriert und wie unter 2.7.18.3 angegeben bei 282 und 265 nm vermessen und der Gehalt an Ergosterol und Vitamin D₂ quantifiziert. Da die Endkonzentration an 7-DHC durch Verdünnung nur noch $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ betrug,

wurde eine neue Kalibrierung mit $7,8 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ergosterol und $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ 7-DHC angesetzt ($y = 0,0039x - 0,0001$, $R^2 = 0,9997$).

2.7.19.7 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Vitamin D₂

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Vitamin D₂ wurden analog zu denen von Ergosterol (2.7.18.6) bestimmt. Die vorläufige NWG wurde im Bereich von $7,8 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ mit $n = 7$ bestimmt. Dieser Wert multipliziert mit 10 ergab die neue maximale Konzentration für die Bestimmung der NWG. Sie wurde im Bereich von $0,98 - 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ mit $n = 7$ ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Screening verschiedener Pilz-Substrat-Kombinationen

Mit der Zielsetzung Pilz-Substrat-Kombinationen zu finden, die eine möglichst hohe Biotrockenmasse mit hohem Proteingehalt in einer kurzen Zeitspanne produzieren, wurde ein Screening durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Substrate Blattspinat, Rübenmelasse und Aroniatrester nicht geeignet waren, da kein bzw. nur ein sehr geringes Wachstum beobachtet wurde. Ebenfalls wurde bei Granatapfeltrester bei drei Pilzen (LED, LSU und SRU) kein Wachstum beobachtet. Tabelle 21 zeigt die weiteren Screening-Ergebnisse. Der Rohproteingehalt wurde über verschiedene Kjeldahlfaktoren N aus der Literatur berechnet, die ebenfalls in Tabelle 21 aufgeführt sind. Der Faktor 4,97 wurde von Mattila *et al.* (2002) für *Pleurotus ostreatus* bestimmt und zur besseren Vergleichbarkeit für die im Screening in dieser Arbeit verwendeten *Pleurotus*-Spezies angewendet. Der Vergleichbarkeit halber wurden bei diesen Ergebnissen die mittels Aminosäureanalysator bestimmten Kjeldahlfaktoren für PSA ATD noch nicht berücksichtigt.

Das Screening zeigte eindeutig, dass der Apfeltrester von Döhler (ATD) sich am besten zur Kultivierung von Pilzen eignete. *Pleurotus sapidus* wuchs auf ATD (Abbildung 18) sehr schnell (4 d) und erzeugte nicht nur die höchste Biotrockenmasse, sondern auch den höchsten Proteingehalt. Daher wird im Folgenden – abgesehen von der Grundanalytik der Substrate – nur noch auf die Ergebnisse von PSA ATD eingegangen. Da am Anfang der Arbeit ATD noch nicht zur Verfügung stand, wurde ein Teil der Medienoptimierung (2.6.5) mit frischem Apfeltrester durchgeführt und die Optimierung im späteren Verlauf der Arbeit auf ATD übertragen.

Tabelle 21: Screening verschiedener Pilze auf Reststoffströmen. AAE: *Agrocybe aegerita*, LED: *Lentinula edodes*, LSU: *Laetiporus sulphureus*, PSA: *Pleurotus sapidus*, PSC: *Pleurotus sajor-caju*, PSS: *Pleurotus salmoneostramineus*, SRU: *Stropharia rugosoannulata*, WCO: *Wolfiporia cocos*. ATD: Apfeltrester (Döhler), TM: Trockenmasse, N: Kjeldahlfaktor, VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur.

Pilz	Substrat	TM [g L ⁻¹]	Rohprotein [% TM]	N	VK [d]	HK [d]
AAE	Apfel	10,5 ± 2,1	18,0 ± 0,4	4,38 ^b	11	7
	ATD	13,3 ± 0,1	18,6 ± 0,2	4,38 ^b	11	6
	GA	9,9 ± 0,1	18,6 ± 0,3	4,38 ^b	11	17
LED	Apfel	6,8 ± 0,2	20,6 ± 0,8	4,50 ^c	13	10
	ATD	9,6 ± 0,1	20,4 ± 0,2	4,50 ^c	13	6
LSU	Apfel	2,0 ± 1,2	15,5 ± 0,3	4,38 ^b	13	13
PSA	Apfel	13,3 ± 1,9	21,6 ± 0,0	4,97 ^c	6	4
	ATD	14,5 ± 0,2	25,4 ± 0,3	4,97 ^c	6	4
	GA	7,4 ± 0,8	20,7 ± 4,1	4,97 ^c	6	17
PSC	ATD	15,3 ^a	14,6 ^a	4,97 ^c	6	3
PSS	ATD	11,7 ± 0,1	20,9 ± 0,3	4,97 ^c	6	3
SRU	Apfel	9,6 ± 0,7	24,4 ± 0,6	4,38 ^b	7	6
	ATD	13,6 ± 0,5	12,3 ± 0,3	4,38 ^b	7	13
WCO	Apfel	8,7 ± 1,6	17,2 ± 2,1	4,38 ^b	7	8
	ATD	13,2 ± 0,9	9,6 ± 0,1	4,38 ^b	7	26
	GA	7,2 ± 0,1	16,9 ± 0,2	4,38 ^b	7	15

^a n=1; ^b allgemeine Pilzfaktor nach Crisan & Sands (1978); ^c Mattila *et al.* (2002)



Abbildung 18: Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester (ATD) für 4 Tage im Schüttelkolben kultiviert.

3.1.1 Substratzusammensetzung

Bei allen untersuchten Substraten dominierte der Kohlenhydratanteil (Abbildung 19). Die Substrate wurden als alleinige Kohlenstoffquelle für das Wachstum der Pilze eingesetzt. Für die Berechnung des Rohproteingehaltes wurde der für Lebensmittel allgemein gültige Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor $N = 6,25$ angewendet, mit Ausnahme von Apfeltrester ATD. Hier wurde der Umrechnungsfaktor über das Aminosäureprofil nach 2.7.7 und 2.7.8 bestimmt. Dieser betrug $N = 6,33$ für ATD. Im Falle von Apfeltrester Döhler (ATD) führte die Substratzusammensetzung zu einer Einwaage von $24,6 \text{ g L}^{-1}$ Medium; mit einer Restfeuchte von 3,74% entspricht dies $23,7 \text{ g TM}$ pro Liter Medium.

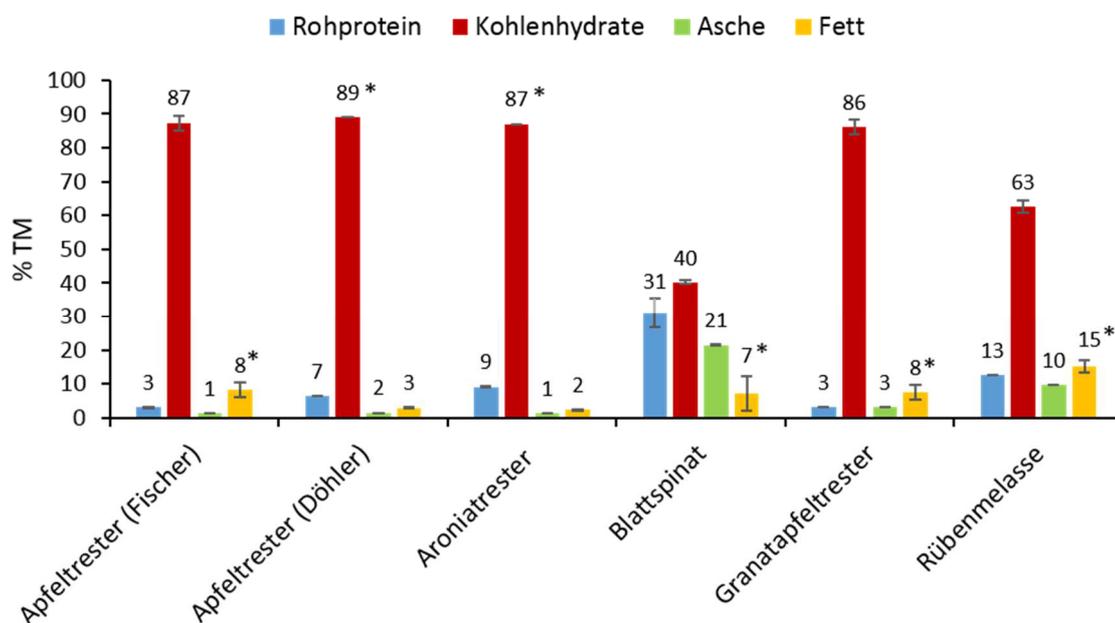


Abbildung 19: Zusammensetzung der Substrate. Die mit * gekennzeichneten Werte wurden durch Differenzbildung berechnet.

3.1.2 Zusammensetzung der Pilzmyzelien

Wie unter 2.6.3 ausgeführt wurde im Laufe der Arbeit nicht nur im Schüttelkolben kultiviert, sondern auch ein Upscaling in einem 150 L Bioreaktor durchgeführt. Da sich bei den Analysen zeigte, dass sich die Zusammensetzung dieser Myzelien deutlich unterschied, werden in Abbildung 20 und Abbildung 21 beide Zusammensetzungen vergleichend gegenübergestellt. Das Myzel aus dem

Schüttelkolben besaß 1% weniger Asche, dafür 3% mehr Fett und 6% mehr Reinprotein. Da das Upscaling erst gegen Ende der Arbeit durchgeführt wurde, erfolgten einige Analysen am Myzel aus dem Schüttelkolben, andere am Myzel aus dem 150 L Bioreaktor und einige Analysen wurden an beiden Myzelien durchgeführt. Im Folgenden wird daher stets vermerkt, um welches Myzel es sich bei der jeweiligen Analyse handelte.

In der Literatur werden häufig nicht die Reinproteingehalte, sondern die Rohproteingehalte angegeben. Für PSA ATD aus dem Schüttelkolben betrug der Kjeldahlfaktor zur Berechnung des Reinproteins 4,11, zur Berechnung des Rohproteins 5,60. Daraus resultieren ein Rohproteingehalt von 28,6% und (daraus berechnet) 66,1% Kohlenhydrate. Bei PSA ATD (Fermenter) bewirkte ein Umrechnungsfaktor von 5,86 (Rohprotein) anstatt 3,90 (Reinprotein) einen Rohproteingehalt von 22,7% (und daraus berechnet 73,0% Kohlenhydrate) anstatt 15,1% Reinprotein. Die Umrechnungsfaktoren wurden nach 2.7.8 berechnet (siehe dazu 3.7.1).

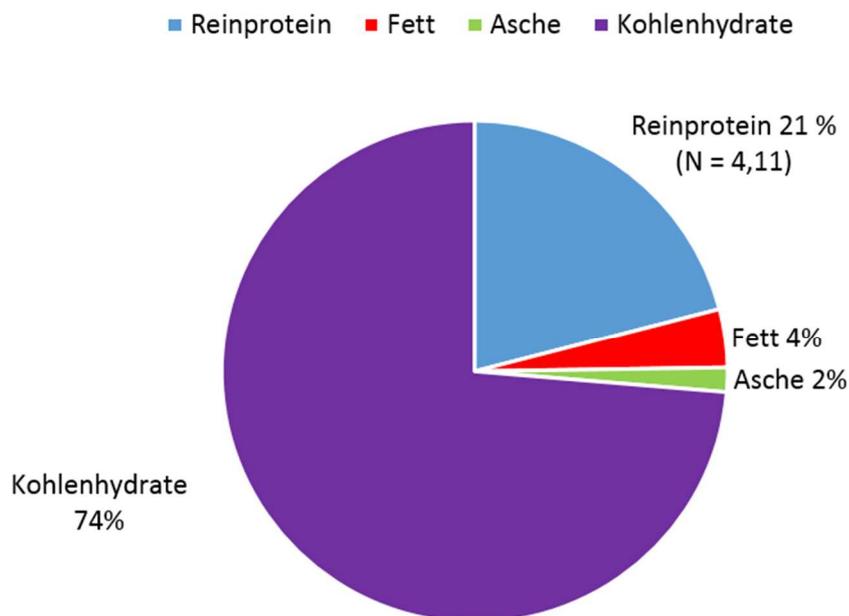


Abbildung 20: Zusammensetzung des Lyophilisats PSA ATD aus dem Schüttelkolben.

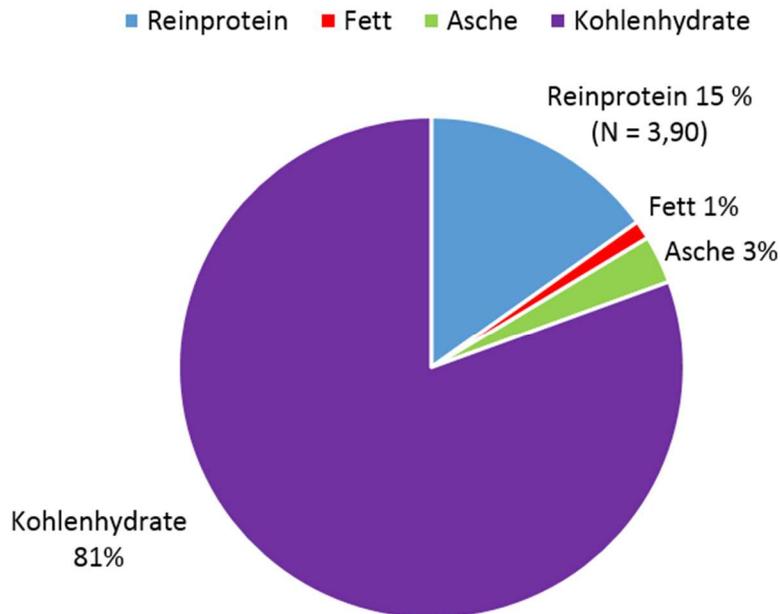


Abbildung 21: Zusammensetzung des Lyophilisats PSA ATD aus dem 150 L Bioreaktor.

3.2 Upscaling im 150 L Bioreaktor

PSA ATD wurde in einem 150 L Bioreaktor kultiviert, der mit 75 L Medium befüllt war. Aus 75 L Medium konnten 14,4 kg Frischmasse erzielt werden (192 g L^{-1}). Da die Feuchte von Pilzmyzel erfahrungsgemäß ca. 90% beträgt, konnte hierüber eine Trockenmasse von $19,2 \text{ g L}^{-1}$ berechnet werden. Das Lyophilisat, das nach der Gefriertrocknung bei einer externen Firma zurückerhalten wurde, betrug nach Berücksichtigung einer Restfeuchte von 4,64% $12,2 \text{ g L}^{-1}$ Trockenmasse. Der wahre Wert liegt zwischen 12 und 19 g L^{-1} TM und somit ist der Wert mit dem aus dem Schüttelkolben ($14,5 \text{ g L}^{-1}$ TM) vergleichbar.

3.3 Medienoptimierung

Die in Tabelle 9 (2.6.5) aufgeführten Medien M1 bis JA3 wurden mit der Pilz-Substrat-Kombination PSA auf frischem Apfeltrester untersucht. Alle Ansätze wurden für vier Tage kultiviert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Medien in Bezug auf Biotrockenmassen und

Proteingehalten im Vergleich zu denen in Medium M1 (Tabelle 22). Ein Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor von 4,97 (Mattila *et al.* 2002) wurde für die Berechnung der Proteingehalte zugrunde gelegt, um die Daten mit denen des Screenings (Tabelle 21, 3.1) zu vergleichen.

Tabelle 22: Ergebnisse der Medienoptimierung bei PSA Apfel; n=2.

PSA Apfel	Biotrockenmasse [g L ⁻¹]	Protein [% TM]	Protein [g L ⁻¹]
M1	13,8 ± 0,1	16,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2
JA1	13,8 ± 0,5	18,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2
JA 2.1	13,1 ± 0,6	16,8 ± 0,0	2,2 ± 0,0
JA 2.2	13,9 ± 0,6	17,9 ± 0,3	2,5 ± 0,3
JA 3	14,1 ± 0,5	16,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1

Anhand dieser Ergebnisse wurde das Medium JA4 erstellt, das 50% weniger Aspartat, 66% weniger Kaliumdihydrogenphosphat und Ammoniumsulfat anstatt Ammoniumnitrat beinhaltete (Tabelle 9, 2.6.5). Dieses Medium wurde an PSA ATD im Schüttelkolben getestet, ebenso wie reines VE-Wasser bzw. VE-Wasser mit Spurenelementlösung und Reststoffstrom (Tabelle 23). Die Kultivierungsdauer betrug ebenfalls vier Tage. Dabei zeigte sich, dass die höchsten Biotrockenmassen durch die Kultivierung in VE-Wasser mit bzw. ohne Spurenelementen erzielt wurde. Gleichzeitig sank der Proteingehalt jedoch auf 7 - 8%, sodass der Proteingehalt lediglich bei ca. 1,2 g L⁻¹ anstatt ca. 3,4 g L⁻¹ lag.

Tabelle 23: Ergebnisse der Medienoptimierung bei PSA ATD. SE: Spurenelementlösung; n=2.

ATD mit	Biotrockenmasse [g L ⁻¹]	Protein [% TM]	Protein [g L ⁻¹]
Medium M1	13,7 ± 0,0	25,2 ± 0,0	3,5 ± 0,0
Medium JA4	14,1 ± 0,0	24,0 ± 0,0	3,4 ± 0,0
VE-Wasser	17,1 ± 0,6	7,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0
VE-Wasser + SE	16,6 ± 0,1	7,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0

Zusätzlich wurde PSA ATD in reinem VE-Wasser mit Reststoffstrom für drei, vier und fünf Tage im Schüttelkolben kultiviert (Tabelle 24) und hinsichtlich der

Biotrockenmassen und Proteingehalten untersucht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Proteingehalt.

Tabelle 24: Ergebnisse der Medienoptimierung bei PSA mit ATD in VE-Wasser für drei verschiedene Kultivierungsdauern; n=2.

PSA ATD VE-Wasser	Biotrockenmasse [g L ⁻¹]	Protein [% TM]	Protein [g L ⁻¹]
3 Tage	16,4 ± 0,1	7,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0
4 Tage	17,1 ± 0,6	7,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0
5 Tage	15,8 ± 0,2	7,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0

3.4 Bestimmung des Chitingehaltes von PSA ATD und ATD

Der nach 2.7.3 analysierte Chitingehalt von PSA ATD (Schüttelkolben) betrug (6,27 ± 0,41)%. Im Substrat ATD konnte kein Chitin quantifiziert werden. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des photometrischen Assays wurde Chitin aus Krabbschalen (Carl Roth) als Positivkontrolle analysiert. Der ermittelte Gehalt ergab im Mittel (100 ± 6)%.

3.5 Quantifizierung und Charakterisierung des Pektins in PSA ATD und ATD

Bevor Pektin charakterisiert werden konnte, musste eine Extraktion mit anschließender Fällung durchgeführt werden. Für ATD wurden mittels der in 2.7.4.1 beschriebenen Fällungsmethode 11,0% Pektin quantifiziert. Für PSA auf ATD (Fermenter) konnte auf diese Weise kein Pektin isoliert werden.

Die charakteristischen Werte des Pektins sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Charakterisierung des Pektins aus ATD.

Parameter	ATD
Äquivalentgewicht ÄG	693,1 ± 0,7
Methoxy-Gehalt MeO [%]	9,40 ± 0,1
Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt AUA [%]	78,75 ± 0,53
Veresterungsgrad DE [%]	67,76 ± 0,27

Da der Pektingehalt bei PSA ATD für eine Isolierung zu niedrig war, wurde der Pektingehalt mittels eines photometrischen Assays ermittelt (2.7.4.3). Die Fermentation von ATD mit PSA führte zu einem Abbau des Pektins (Tabelle 26).

Tabelle 26: Pektingehalte von PSA ATD und ATD über photometrischen Assay bestimmt; n=2.

	Pektin [% TM]
PSA ATD (Fermenter)	0,72 ± 0,13
ATD	8,68 ± 0,72

3.6 Enzymatische Bestimmung frei vorliegender D-Glucose, D-Fructose und Saccharose in PSA ATD und ATD

Das Lyophilisat von PSA ATD (Schüttelkolben) und ATD wurde nach wässriger Extraktion auf den Gehalt an D-Glucose, D-Fructose und Saccharose hin untersucht. Diese Zucker lagen im Myzel von PSA ATD in geringen Gehalten vor (Tabelle 27). Bei ATD dominierte der Fruchtzucker mit 5,15%.

Tabelle 27: Gehalte an frei vorliegender D-Glucose, D-Fructose und Saccharose; n=2.

	D-Glucose [% TM]	D-Fructose [% TM]	Saccharose [% TM]
PSA ATD	0,55 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,34 ± 0,01
ATD	1,50 ± 0,00	5,15 ± 0,02	0,32 ± 0,06

3.7 Aminosäureprofile von PSA ATD und ATD

Die nach 2.7.7 analysierten Aminosäureprofile von PSA ATD aus Schüttelkolben und Fermenter sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt. Die Summe aller einzelnen Aminosäuren betrug $(24,01 \pm 0,35) \text{ g } (100 \text{ g TM})^{-1}$ für die Biomasse aus dem Schüttelkolben und $(17,60 \pm 0,26) \text{ g } (100 \text{ g TM})^{-1}$ bei der Biomasse aus dem Fermenter. Für Apfeltrester, dessen Aminosäureprofil in Abbildung 24 dargestellt ist, betrug die Summe aller einzelnen Aminosäuren $(4,98 \pm 0,06) \text{ g } (100 \text{ g TM})^{-1}$. Chromatogramme des Aminosäureprofils von PSA ATD und ATD sind im Anhang 7.1 und 7.2 (Abbildung 38 bis Abbildung 43) angefügt.

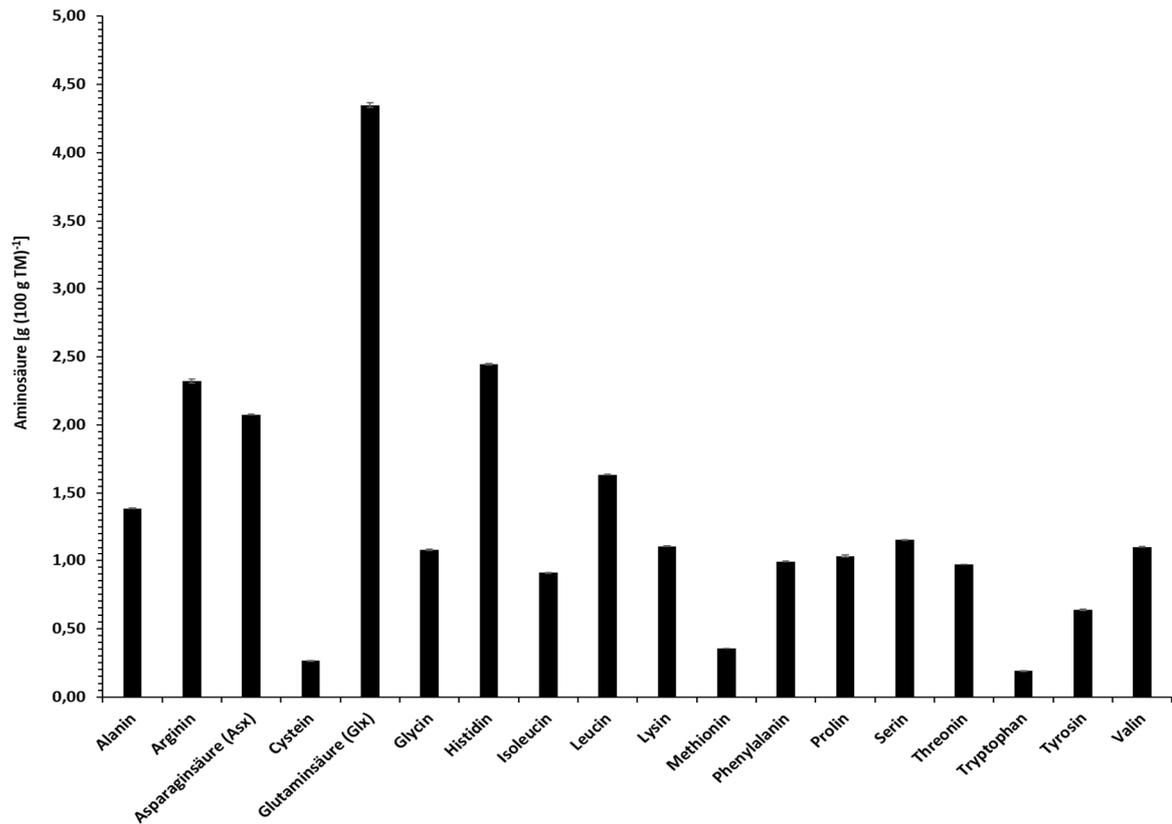


Abbildung 22: Aminosäureprofil von *P. sapidus* auf Apfeltrester (Schüttelkolben); n=3.

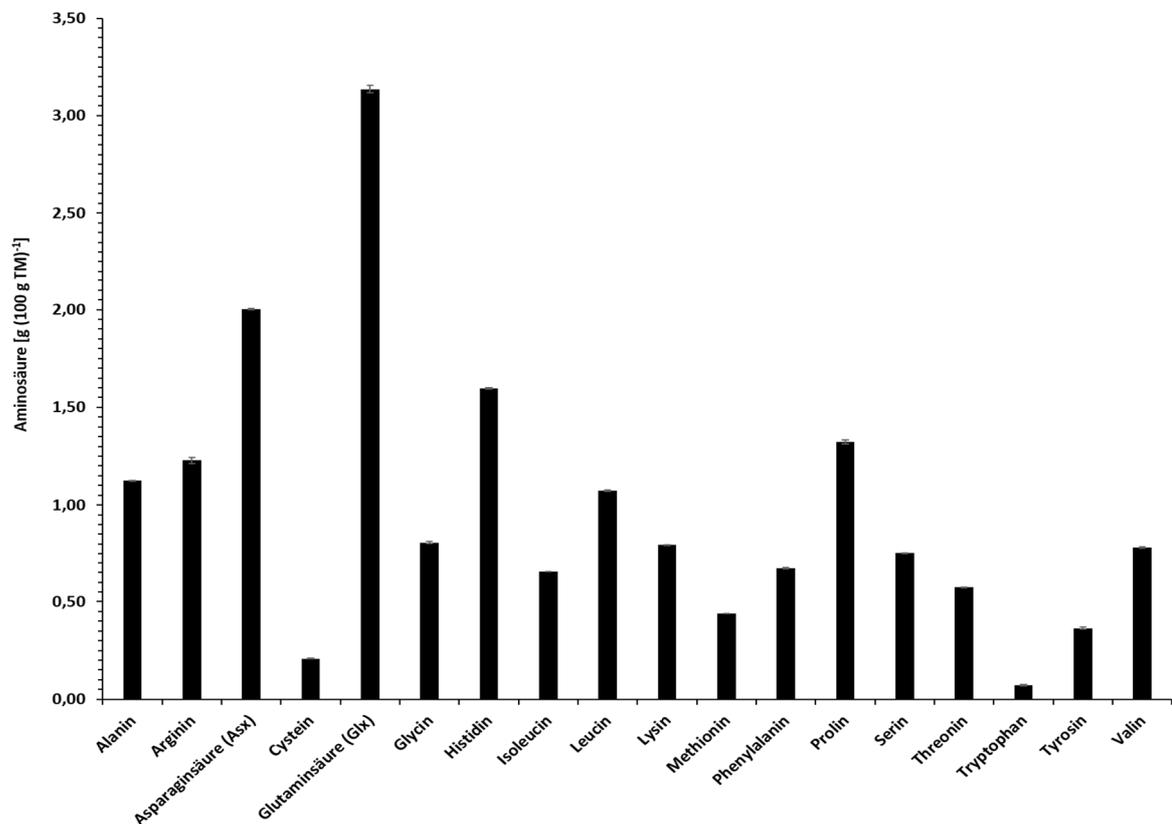


Abbildung 23: Aminosäureprofil von *P. sapidus* auf Apfeltrester (Fermenter); n=3.

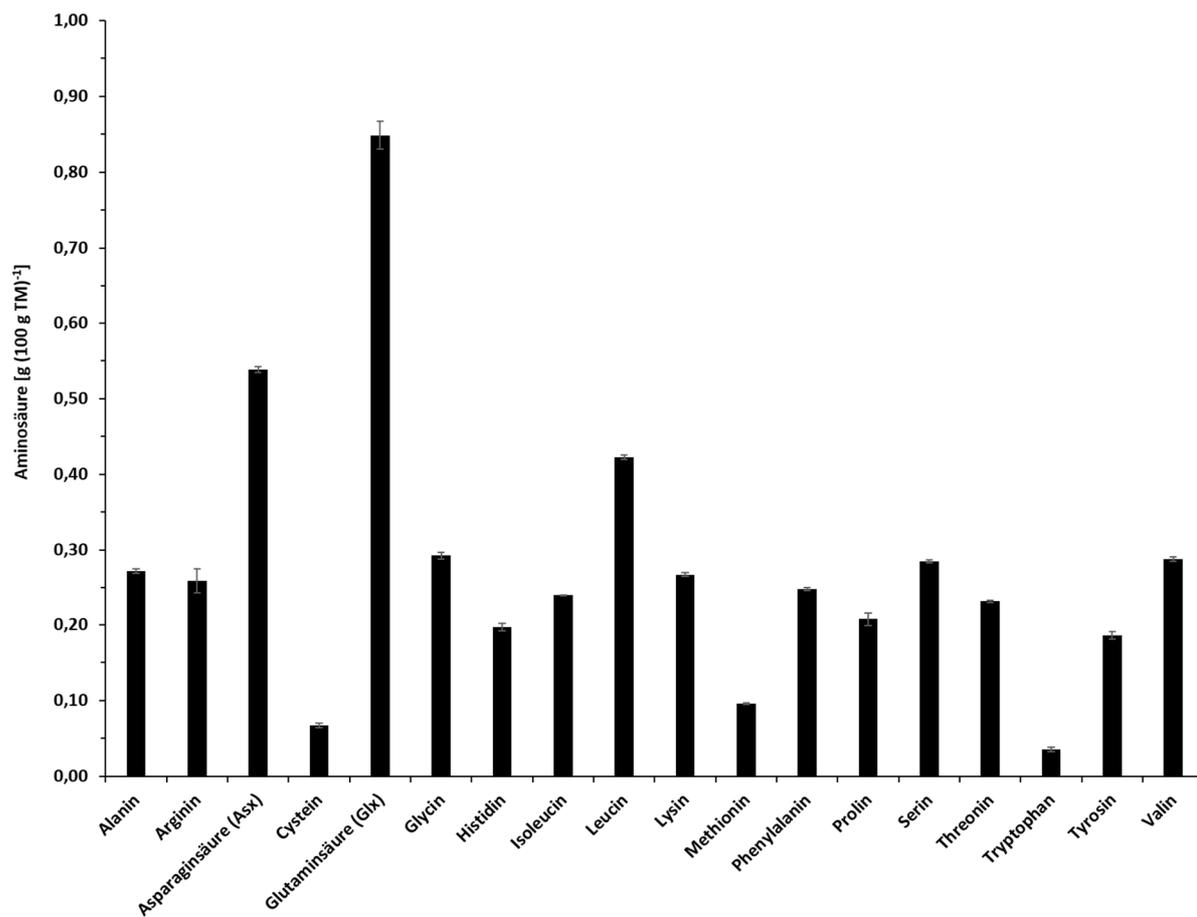


Abbildung 24: Aminosäureprofil von Apfeltrester ATD; n=3.

3.7.1 Berechnung der Kjeldahlfaktoren für PSA ATD und ATD

Die für die Berechnung der Kjeldahlfaktoren von PSA ATD und ATD benötigten Daten sind in Tabelle 28 aufgeführt. Sie wurden, wie in den Abschnitten 2.7.7 und 2.7.8 erläutert, berechnet.

Tabelle 28: Daten zur Berechnung der Kjeldahlfaktoren. AS: Summe aller Aminosäuren, AA_{res}: Summe der proteingebundenen Aminosäuren nach Abzug der Molekülmasse von Wasser.

	PSA ATD	PSA ATD Fermenter	ATD
AS [g (100 g TM) ⁻¹]	24,01 ± 0,35	17,60 ± 0,26	4,98 ± 0,06
AA _{res} [g (100 g TM) ⁻¹]	20,70 ± 0,31	15,14 ± 0,22	4,27 ± 0,05
Gesamtproteinstickstoff nach ASA N _{ges} (2.7.7) [g (100 g TM) ⁻¹]	3,69 ± 0,04	2,58 ± 0,05	0,68 ± 0,01
Gesamtstickstoff nach Kjeldahl (2.7.9) [g (100 g TM) ⁻¹]	5,04 ± 0,07	3,88 ± 0,03	1,03 ± 0,01
Durchschnittlicher Stickstoffgehalt im Protein [%] nach Gleichung 14 (2.7.7)	17,85 ± 0,10	17,07 ± 0,07	15,80 ± 0,05
Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor N	5,60 ± 0,03	5,86 ± 0,02	6,33 ± 0,02
Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor N _{net}	4,11 ± 0,06	3,90 ± 0,06	4,15 ± 0,02

3.7.2 Proteinqualität von PSA ATD und ATD

Die Berechnung der Proteinqualität wurde nach den Angaben in Abschnitt 2.7.11 durchgeführt. Die Biologische Wertigkeit für das Myzel von PSA ATD (150 L Bioreaktor) betrug 77, wohingegen die des Myzels aus dem Schüttelkolben 86 betrug. ATD wies mit einer Biologischen Wertigkeit von 92 den höchsten Wert auf (Tabelle 29 bis Tabelle 31). Tryptophan bzw. Methionin und Cystein lagen dabei als limitierende Aminosäuren vor.

Tabelle 29: Daten zur Proteinqualität von *Pleurotus sapidus* auf ATD (150 L Bioreaktor). AS: Aminosäure, AAS: Amino Acid Score, CS: Chemical Score, EAAI: Essentieller Aminosäure Index; n= 3.

	Anteil AS an Gesamt-AS [%]	AAS	CS
Isoleucin	3,72 ± 0,04	0,93 ± 0,01	93 ± 1
Leucin	6,10 ± 0,05	0,87 ± 0,01	87 ± 1
Lysin	4,51 ± 0,03	0,82 ± 0,00	82 ± 0
Methionin & Cystein	3,68 ± 0,12	1,05 ± 0,03	105 ± 3
Phenylalanin & Tyrosin	5,88 ± 0,07	0,98 ± 0,01	98 ± 1
Threonin	3,25 ± 0,01	0,81 ± 0,00	81 ± 0
Tryptophan	0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,03	41 ± 3
Valin	4,44 ± 0,07	0,89 ± 0,01	89 ± 1
EAAI		81 ± 1	
Biologische Wertigkeit		77 ± 1	
1. limitierende Aminosäure	Tryptophan		
2. limitierende Aminosäure	Threonin		

Tabelle 30: Daten zur Proteinqualität von *Pleurotus sapidus* auf ATD (Schüttelkolben). AS: Aminosäure, AAS: Amino Acid Score, CS: Chemical Score, EAAI: Essentieller Aminosäure Index; n= 3.

	Anteil AS an Gesamt-AS [%]	AAS	CS
Isoleucin	3,78 ± 0,04	0,95 ± 0,01	95 ± 1
Leucin	6,81 ± 0,09	0,97 ± 0,01	97 ± 1
Lysin	4,62 ± 0,06	0,84 ± 0,01	84 ± 1
Methionin & Cystein	2,59 ± 0,04	0,74 ± 0,01	74 ± 1
Phenylalanin & Tyrosin	6,79 ± 0,07	1,13 ± 0,01	113 ± 1
Threonin	4,04 ± 0,05	1,01 ± 0,01	101 ± 1
Tryptophan	0,80 ± 0,02	0,80 ± 0,02	80 ± 2
Valin	4,60 ± 0,06	0,92 ± 0,01	92 ± 1
EAAI	90 ± 0		
Biologische Wertigkeit	86 ± 0		
1. limitierende Aminosäure	Methionin & Cystein		
2. limitierende Aminosäure	Tryptophan		

Tabelle 31: Daten zur Proteinqualität von Apfeltrester. AS: Aminosäure, AAS: Amino Acid Score, CS: Chemical Score, EAAI: Essentieller Aminosäure Index; n= 3.

	Anteil AS an Gesamt-AS [%]	AAS	CS
Isoleucin	4,82 ± 0,04	1,20 ± 0,01	120 ± 1
Leucin	8,48 ± 0,05	1,21 ± 0,01	121 ± 1
Lysin	5,37 ± 0,04	0,98 ± 0,01	98 ± 1
Methionin & Cystein	3,28 ± 0,08	0,94 ± 0,02	94 ± 2
Phenylalanin & Tyrosin	8,71 ± 0,07	1,45 ± 0,01	145 ± 1
Threonin	4,66 ± 0,04	1,16 ± 0,01	116 ± 1
Tryptophan	0,72 ± 0,07	0,72 ± 0,07	72 ± 7
Valin	5,78 ± 0,02	1,16 ± 0,00	116 ± 0
EAAI	95 ± 1		
Biologische Wertigkeit	92 ± 1		
1. limitierende Aminosäure	Tryptophan		
2. limitierende Aminosäure	Methionin & Cystein		

3.8 Aspartatkonzentration im Kulturüberstand von PSA ATD

Da Mono-Natrium-L-Aspartat-Monohydrat eine vergleichsweise teure Chemikalie ist, wurde die Konzentration an Aspartat im Rahmen einer möglichst kostengünstigen Produktion von Pilzmyzel im Kulturüberstand im Schüttelkolben bestimmt (2.7.12). Überschüssiges Aspartat, das nach der Kultivierung noch im Überstand vorhanden ist und nicht vom Pilz verbraucht wurde, könnte so eingespart werden. Die entsprechenden Chromatogramme finden sich in Anhang 7.4 (Abbildung 47 bis Abbildung 52).

Im ursprünglichen Medium, wie unter 2.6.3, Tabelle 7 beschrieben, wurden 6,24 g L⁻¹ Aspartat eingesetzt. Nach Kultivierung von PSA auf ATD konnten nach viertägiger Kultivierung noch über die Hälfte des Aspartats im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Tabelle 32). Daraufhin wurde die Konzentration um 50% verringert und erneut die Konzentration im Überstand vermessen (Tabelle 32).

Auch hier konnten noch immer zwischen 1,38 und 1,70 g L⁻¹ Aspartat nachgewiesen werden.

Tabelle 32: Nach Kultivierung von PSA auf ATD verschiedener Konzentrationen im Kulturüberstand nachgewiesene Aspartatkonzentrationen. SD: Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Eingesetztes Aspartat [g L ⁻¹]	ATD [g L ⁻¹]	Aspartat im Überstand [g L ⁻¹]	SD Aspartat im Überstand [g L ⁻¹]	n
6,24	24,6	3,23	0,28	2
6,24	12,3	3,81	0,06	2
6,24	6,2	3,71	0,04	2
3,12	24,6	1,38	0,03	3
3,12	12,3	1,57	0,07	3
3,12	6,2	1,70	0,04	3

3.9 Fettsäureprofil von PSA ATD und ATD

Die mittels GC-FID (2.7.14) analysierten Fettsäureprofile von PSA ATD (Schüttelkolben) und ATD unterschieden sich vor allem in dem Linolsäuregehalt (Abbildung 25 und Abbildung 26), der bei ATD um 6% höher lag als bei PSA ATD.

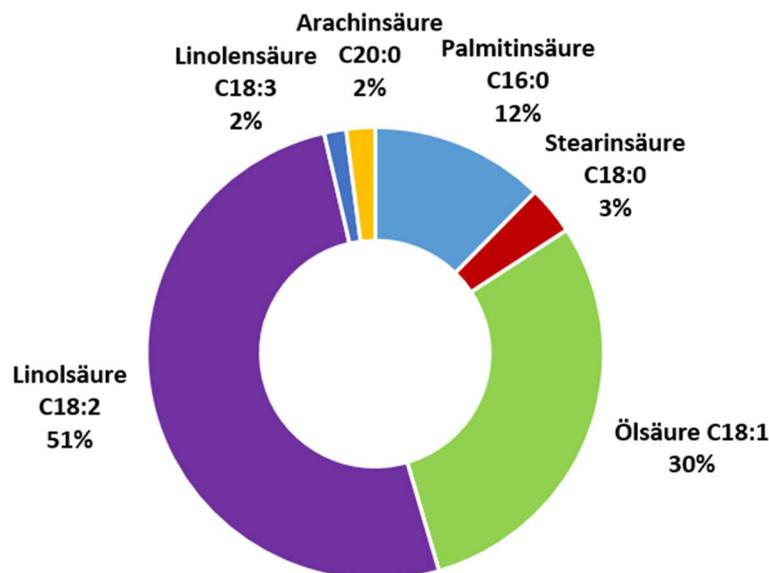


Abbildung 25: Fettsäureprofil von Apfeltrester ATD mittels GC-FID analysiert.

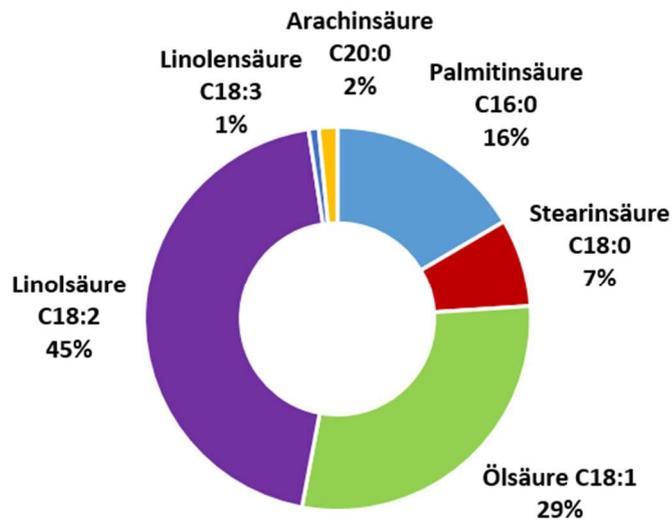


Abbildung 26: Fettsäureprofil von PSA ATD (Schüttelkolben) mittels GC-FID analysiert.

3.10 Bestimmung des Mineralstoffgehaltes

Die nach Königswasseraufschluss mittels ICP-OES (2.7.16) ermittelten Mineralstoffgehalte sind in Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt. Die Summe aller quantifizierten Mineralstoffe ergab für Apfeltrester 1% und für PSA ATD (Fermenter) 3% in Trockenmasse.

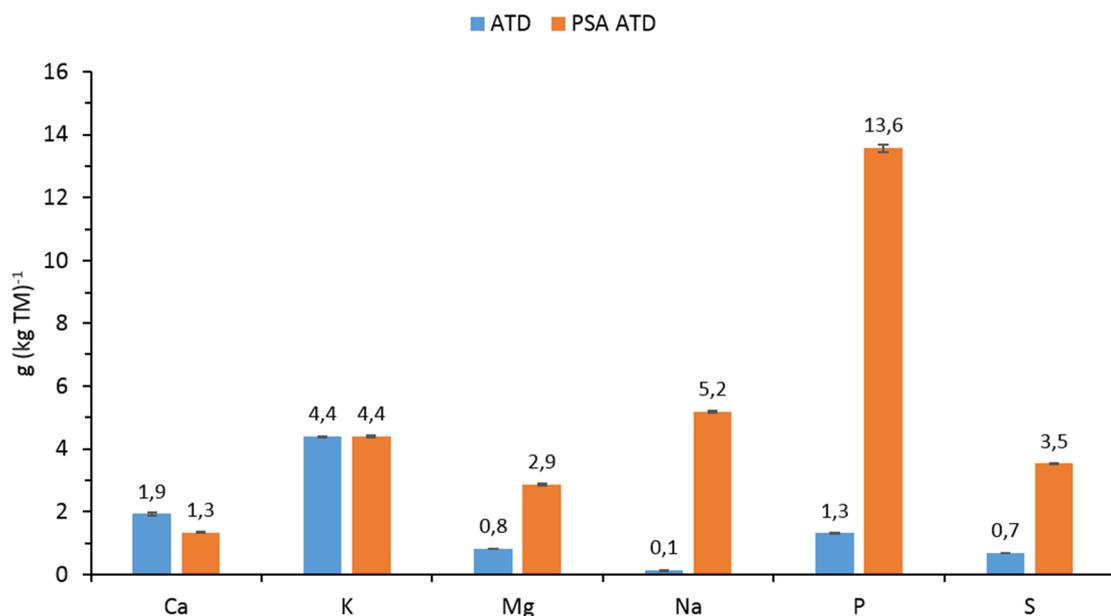


Abbildung 27: Zusammensetzung der Mineralstoffe (Mengeelemente) von ATD und PSA ATD (Fermenter).

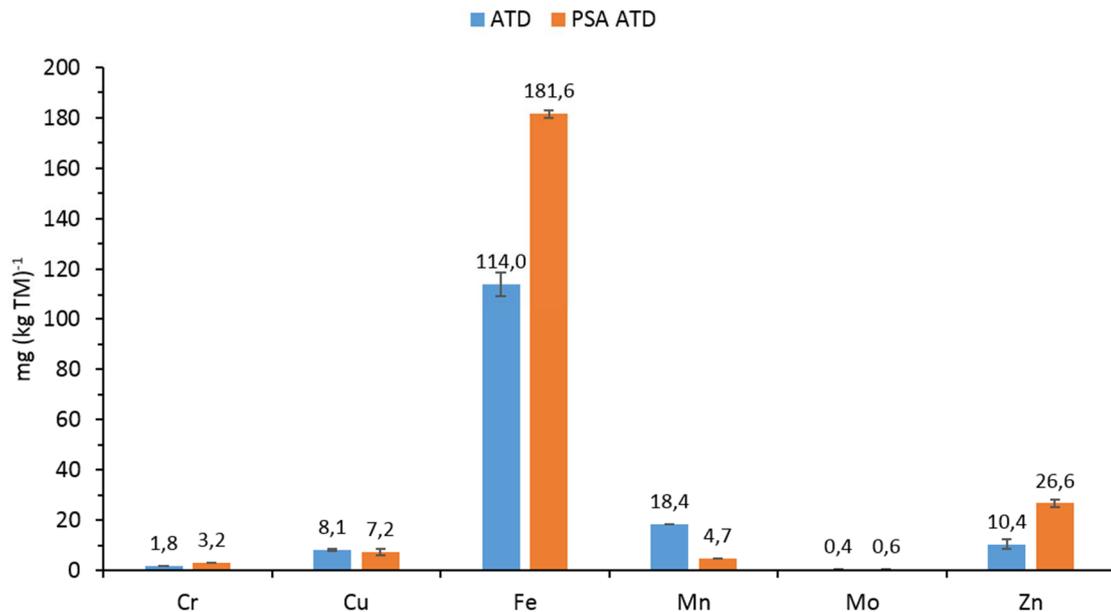


Abbildung 28: Zusammensetzung der Mineralstoffe (essentielle Spurenelemente) von ATD und PSA ATD (Fermenter).

3.11 Bestimmung von Blei, Cadmium und Quecksilber

Sowohl in Apfeltrester als auch im Lyophilisat von *Pleurotus sapidus*, der auf Apfeltrester kultiviert wurde, konnten weder Quecksilber noch Blei nachgewiesen werden. Für Cadmium wurden $(12,3 \pm 1,9) \mu\text{g (kg TM)}^{-1}$ für Apfeltrester und $(13,3 \pm 1,9) \mu\text{g (kg TM)}^{-1}$ für PSA ATD (Schüttelkolben) nachgewiesen ($n=2$).

3.12 Biomassenquantifizierung von PSA ATD

3.12.1 Ermittlung des Bezugswertes

Für die Biomassenquantifizierung von Pilzmyzel über Ergosterol muss ein Bezugswert festgelegt werden, der aus reinem Pilzmyzel ermittelt wurde. Dazu wurde *Pleurotus sapidus* in Malzextraktmedium für vier Tage kultiviert und das Myzel abgetrennt. Der über eine externe Standard-Kalibrierung ermittelte Ergosterolgehalt (2.7.18) für PSA auf Malzextraktmedium (MEM) betrug $(7.147,5 \pm 353,7) \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ ($n = 6$). Dieser Wert wurde als 100% angesehen und

die folgenden Ergosterolgehalte in Bezug dazu gesetzt, um den prozentualen Anteil an Pilzmyzel zu errechnen.

Um auszuschließen, dass das Medium einen Einfluss auf die in der Zellmembran gebildeten Menge an Ergosterol hat, wurden zwei weitere Medien untersucht (2.7.18.5), die sich ebenfalls aus rein löslichen Bestandteilen zusammensetzten. Hierbei lagen die Ergosterolgehalte für Myzel aus Medium M1 ohne Kohlenstoffquelle bei $(7.654,5 \pm 201,8) \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ ($n = 2$) und in ausgekochtem Apfeltrester bei $(6.653,3 \pm 229,7) \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ ($n = 3$). Die Biomassen dieser zwei Kultivierungen betrugen $1,5 \text{ g L}^{-1}$ (Medium M1 ohne Kohlenstoffquelle) und $1,1 \text{ g L}^{-1}$ (ausgekochter Apfeltrester). In Bezug auf den Ergosterolgehalt von PSA auf MEM unterschieden sich die Gehalte des Myzels aus beiden Medien nicht signifikant voneinander (einfaktorielle Varianzanalyse mit Signifikanzniveau von 95%).

3.12.2 Wachstumskurve von PSA auf ATD

Um den optimalen Erntezeitpunkt zu ermitteln, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Abbildung 29 zeigt die Wachstumskurve von *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester (ATD) mit $24,6 \text{ g ATD pro Liter Medium M1}$. Ab dem 4. Kulturtag stieg der Pilzanteil nicht weiter an, wohingegen die Gesamtmenge an Biomasse im weiteren Verlauf leicht abnahm. Auch der Proteingehalt stagnierte ab Tag 4. Als Blindwert wurden nicht inokulierte Kolben mit Medium M1 und Apfeltrester verwendet, die unter gleichen Bedingungen zentrifugiert wurden. Tabelle 33 zeigt die zugehörigen Gehalte an Ergosterol. Die zur Wachstumskurve zugehörigen Chromatogramme sind im Anhang 7.6 (Abbildung 59) aufgeführt. Wird der Anteil an Protein in Bezug auf den reinen Pilzanteil unter Abzug des Proteingehaltes im Blindwert berechnet, so ergaben sich ab Tag 2 Proteinanteile von 44%, 38%, 33%, 35% bzw. 32%.

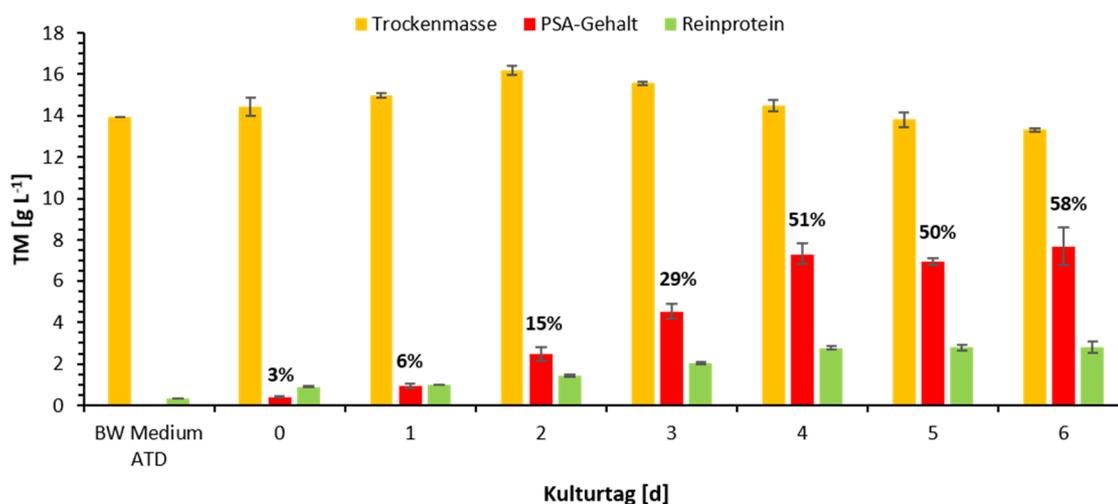


Abbildung 29: Wachstumskurve von *Pleurotus sapidus* (PSA) auf 24,6 g L⁻¹ Apfeltrester (ATD) über einen Zeitraum von 6 Tagen; bestimmt über den Ergosterolgehalt mittels HPLC-DAD. Kjeldahlfaktoren N_{net} : 4,15 für ATD und 4,11 für Lyophilisat, nach 2.7.8 ermittelt; $n = 3$.

Tabelle 33: Ergosterolgehalte von *P. sapidus* zu verschiedenen Wachstumsstadien; BW: Blindwert mit Medium und Apfeltrester; SD: Standardabweichung; $n=3$.

Kulturtag	Ergosterol [$\mu\text{g (g TM)}^{-1}$]	SD [$\mu\text{g (g TM)}^{-1}$]
BW Medium ATD	0	0
0	199,3	13,7
1	451,2	41,8
2	1.102,7	146,2
3	2.079,6	159,8
4	3.606,7	207,9
5	3.588,8	124,8
6	4.113,6	128,0

3.12.3 Optimierung des Pilzanteils

Ausgehend von den Ergebnissen der Wachstumskurve (3.12.2) wurde der Anteil an Apfeltrester pro Liter Medium um 50% reduziert (von 24,6 auf 12,3 g L⁻¹). Eine weitere Versuchsreihe mit nur 25% ATD (6,15 g L⁻¹) wurde ebenfalls analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Pilzanteil mit sinkendem Tresteranteil von 43% auf 90% angestiegen ist (Abbildung 30). Die Biomasse wurde an Tag 4 abgetrennt (Chromatogramme Anhang 7.6, Abbildung 60).

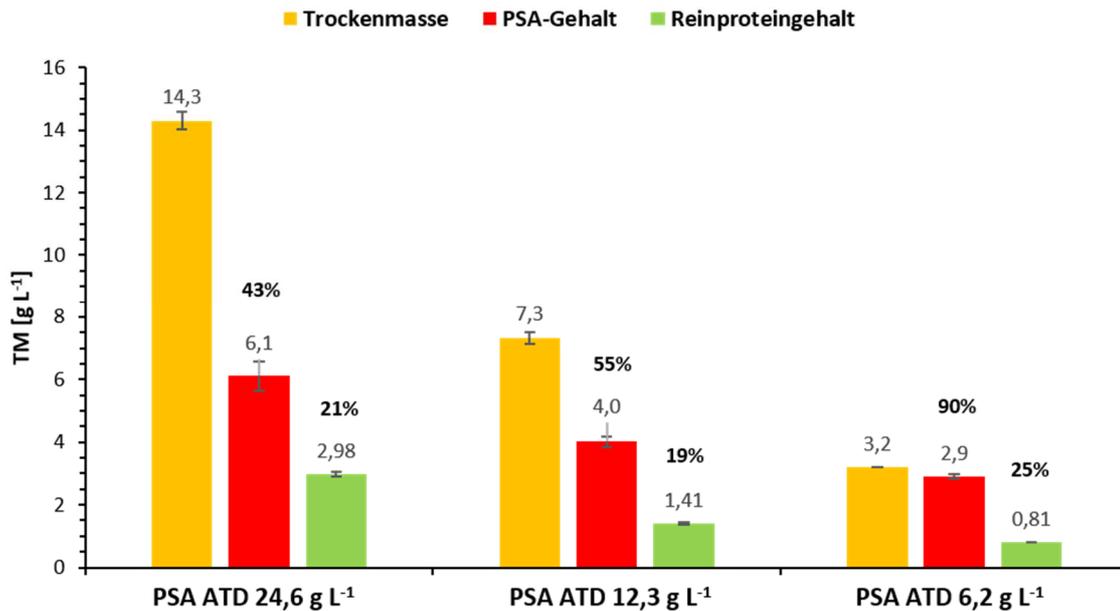


Abbildung 30: Pilzanteil von *Pleurotus sapidus* (PSA) auf Apfeltrester (ATD) verschiedener Konzentrationen nach 4 Kultivierungstagen; bestimmt über Ergosterolgehalt mittels HPLC-DAD. Kjeldahlfaktoren N_{net} : 4,11, nach 2.7.8 ermittelt; $n = 3$.

Durch die Senkung des Apfeltresteranteils konnte zwar der Pilzanteil auf 90% gesteigert werden, allerdings sank die Biotrockenmasse um 78% auf 3,2 g L⁻¹. Um die Trockenmasse wieder zu steigern, den Pilzanteil jedoch auf einem hohen Niveau von 90% zu erhalten, wurden Fed-Batch-Kultivierungen durchgeführt (2.6.3.1). Hierbei stellte sich eine Kultivierung mit 6,15 g ATD L⁻¹ für vier Tage mit einer weiteren Zugabe von 6,15 g ATD L⁻¹ an Kulturtag 4 als beste Methode heraus. Die Biomasse wurde an Tag 6 abgetrennt. Die Gesamtmenge an ATD betrug somit 12,3 g L⁻¹. Durch diese Methode konnte der Pilzanteil auf einem hohen Niveau von 89% gehalten werden, während die Biotrockenmasse auf 5,4 g L⁻¹ gesteigert werden konnte. Dies entspricht einem reinen PSA-Gehalt von 4,8 g L⁻¹. Die quantifizierten Ergosterolgehalte sind in Tabelle 34 zusammengefasst. Der Proteingehalt lag mit 22% der TM (N_{net} : 4,11) über dem Gehalt der mittels Batch-Verfahren erzeugten Biomasse (Abbildung 30). Bezogen auf das Volumen des Medium wurden somit 1,2 g L⁻¹ Protein erzeugt.

Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergosterolgehalte bei verringerter Apfeltresterkonzentration und Fed-Batch-Verfahren. SD: Standardabweichung; n=3.

	Ergosterol [$\mu\text{g (g TM)}^{-1}$]	SD [$\mu\text{g (g TM)}^{-1}$]
PSA ATD (24,6 g L ⁻¹ ATD)	2.839,4	180,8
PSA ATD (12,3 g L ⁻¹ ATD)	3.644,0	146,1
PSA ATD (6,2 g L ⁻¹ ATD)	5.986,8	156,1
Fed-Batch (12,3 g L ⁻¹ ATD)	6.363,6	119,2

3.12.4 Quantifizierung des Pilzanteils nach Verringerung des Aspartatgehaltes im Medium

Wie unter 3.8 beschrieben, wurde der Aspartatgehalt im Medium M1 um 50% reduziert. Die entsprechenden Chromatogramme sind im Anhang 7.6, Abbildung 61 dargestellt. Das Lyophilisat wurde auf den Pilzanteil und den Proteingehalt hin untersucht. Obwohl im Kulturüberstand noch zwischen 1,38 und 1,70 g L⁻¹ Aspartat enthalten war, wurde weniger Pilzanteil und weniger Biotrockenmasse (Abbildung 31) im Vergleich zur Ausgangsdatenlage (Abbildung 30) erhalten. Der Proteingehalt hingegen stieg bei 6,15 g L⁻¹ ATD auf bis zu 28% der TM an. Die Ergosterolgehalte betragen 4.937,1, 4.271,9 bzw. 2.685,4 $\mu\text{g (g TM)}^{-1}$ für Ansätze mit 6,15, 12,3 bzw. 24,6 g L⁻¹ ATD.

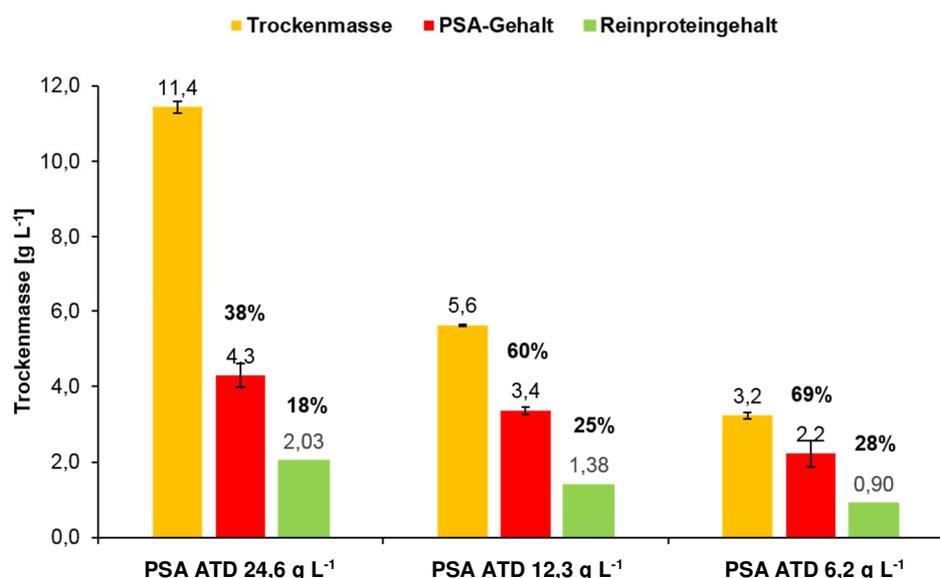


Abbildung 31: Anteil Pilz-Biomasse (PSA) und Proteingehalt in Medium M1 mit Apfeltrester verschiedener Konzentrationen unter Einsatz von 3,12 g L⁻¹ Aspartat. Kjeldahlfaktoren N_{net} : 4,11, nach 2.7.8 ermittelt; n=3.

3.12.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Ergosterol

Die wie unter 2.7.18.6 beschriebene Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Ergosterol ergab eine NWG von $7,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ und eine BG von $25,10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Unter Berücksichtigung der Probenaufarbeitung ($0,2 \text{ g}$ Einwaage und $1,5 \text{ mL}$ Methanol) entspricht dies einer NWG von $53,2 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ und einer BG von $188,3 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$.

3.13 Anreicherung von Vitamin D₂ in Pilzmyzel

3.13.1 Vitamin D₂ Gehalte in PSA ATD in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer

Die durch Belichtung mittels UV-B erzeugte Anreicherung von Vitamin D₂ im Lyophilisat von *P. sapidus*, der auf Apfeltrester ATD kultiviert wurde, ist in Abbildung 32 gezeigt. Nach 20-minütiger Belichtung wurde ein Maximum von $115 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ Vitamin D₂ erreicht. Alle Chromatogramme sind im Anhang 7.7, Abbildung 63 dargestellt.

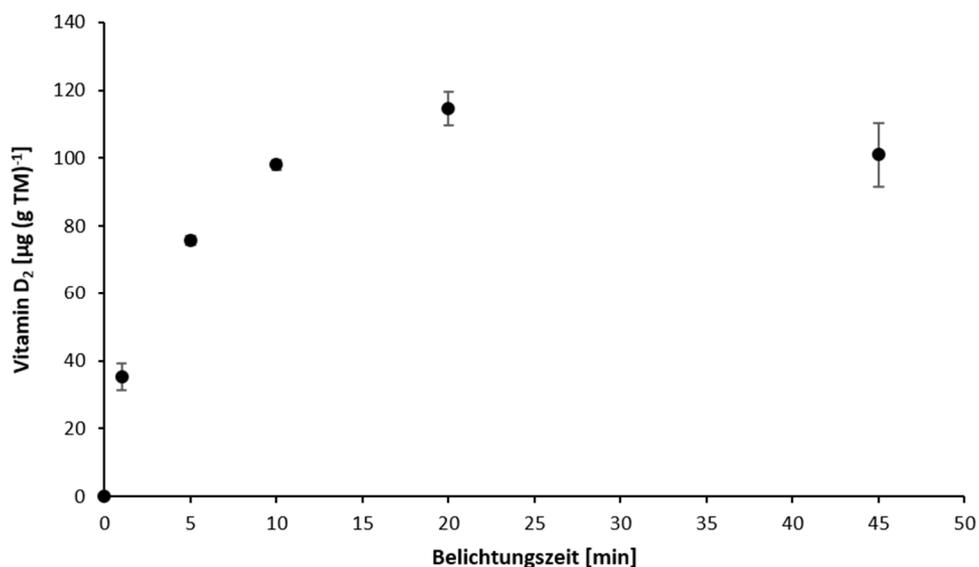


Abbildung 32: Anreicherung von Vitamin D₂ in *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester ATD in Abhängigkeit von der Belichtungszeit der lyophilisierten Biomasse.

3.13.2 Einfluss der Oberflächengröße auf die Bildung von Vitamin D₂

Flüssige Submerskulturen von *P. sapidus* in 200 mL Malzextraktmedium (2%ig) wurden in verschieden große Kristallisierschalen (Durchmesser 9,1 cm, 13,8 cm bzw. 19,5 cm; resultierend in 65,0 cm², 149,6 cm² und 298,6 cm²) gefüllt und für 10 min im Abstand von 10 cm zur Strahlungsquelle belichtet. Mit steigender Belichtungsoberfläche stieg auch der Vitamin D₂ Gehalt an (Abbildung 33).

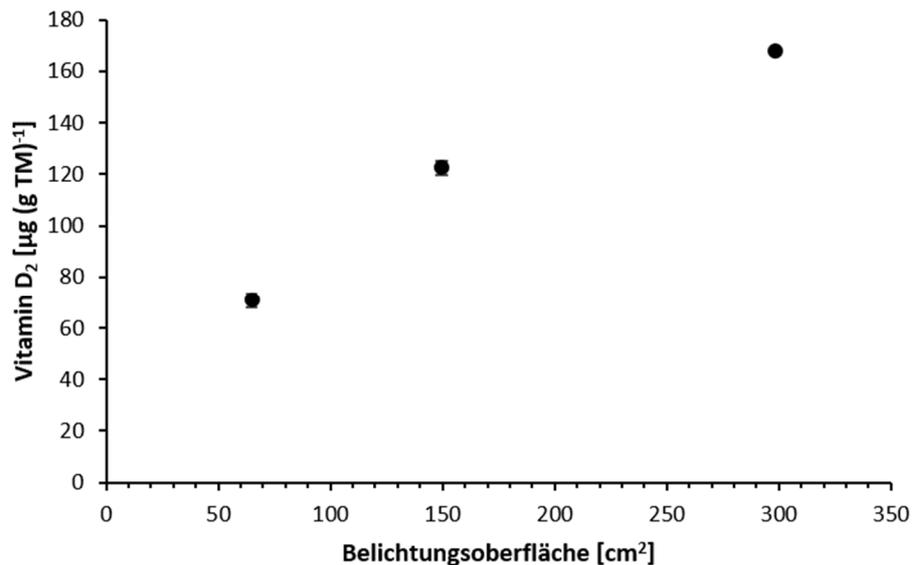


Abbildung 33: Einfluss verschieden großer Oberflächen auf den Vitamin D₂ Gehalt einer flüssigen PSA Kultur auf Malzextraktmedium; Belichtungszeit: 10 min.

3.13.3 Auswirkung des lebenden Myzels auf den Vitamin D Gehalt

Wie in Abbildung 32 (3.13.1) gezeigt, stieg der Vitamin D₂ Gehalt nach 20 min nicht weiter an. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen metabolischen Abbau durch das aktive Pilzmyzel handelte, wurden Kulturen durch Autoklavieren inaktiviert und anschließend belichtet. Abbildung 34 zeigt den Vergleich von aktiven und hitzeinaktivierten PSA Kulturen, die auf Malzextrakt kultiviert und anschließend als flüssige Kultur belichtet wurden. Die Gehalte an Vitamin D₂ unterschieden sich nicht signifikant voneinander und die Gehalte beider Kulturreihen stagnierten bei etwa 300 µg (g TM)⁻¹.

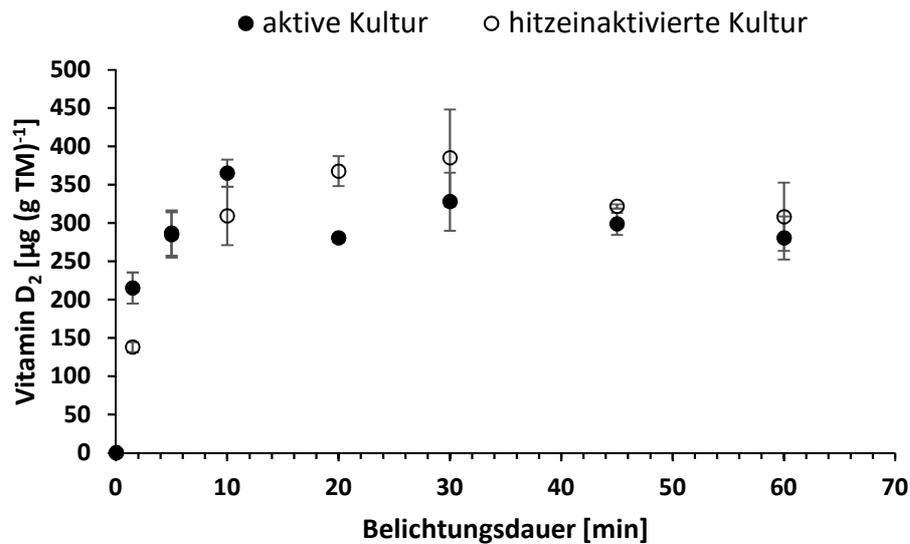


Abbildung 34: Vergleich der Vitamin D₂ Gehalte von aktiven und inaktivierten Kulturen von PSA, die auf Malzextraktmedium gewachsen und als flüssige Kultur belichtet wurden.

3.13.4 Lagerstabilität von Vitamin D₂ in Pilzmyzel

Der Vitamin D₂ Gehalt in belichtetem Lyophilisat von *P. sapidus* auf ATD wurde nach einer Lagerungsdauer von 13 Wochen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen erneut analysiert (Abbildung 35). Während der Lagerung bei -20 °C wurde ein Verlust an Vitamin D₂ von 6,4% im Vergleich zur sofortigen Messung festgestellt. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse mit Signifikanzniveau von 95%). Die Lagerung bei Raumtemperatur (22 °C) hingegen bewirkte eine Verringerung um 36,5%.

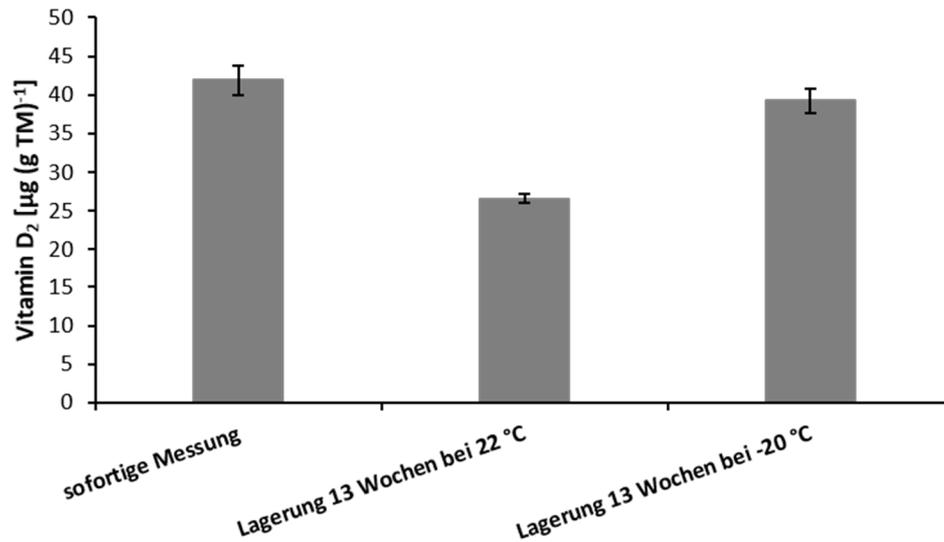


Abbildung 35: Einfluss der Lagerungsdauer bei zwei verschiedenen Temperaturen auf den Vitamin D₂ Gehalt von belichteten Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester.

3.13.5 Belichtung einer Ergosterolstandardlösung

Die durch UV-B Strahlung induzierte Transformation von Ergosterol zu Vitamin D₂ kann nicht nur im Pilzmyzel, sondern auch in einer Standardlösung durchgeführt werden (Anhang 7.7, Abbildung 64 und Abbildung 65). Hierbei war zu erkennen, dass die Ergosterolkonzentration kontinuierlich abnahm (Abbildung 36) und die Vitamin D₂ Konzentration anstieg (Abbildung 37). Die Differenz der Ergosterolkonzentration zwischen 0 min und 30 min betrug 231,4 µg mL⁻¹, wohingegen die gebildete Vitamin D₂ Konzentration lediglich 16,2 µg mL⁻¹ betrug.

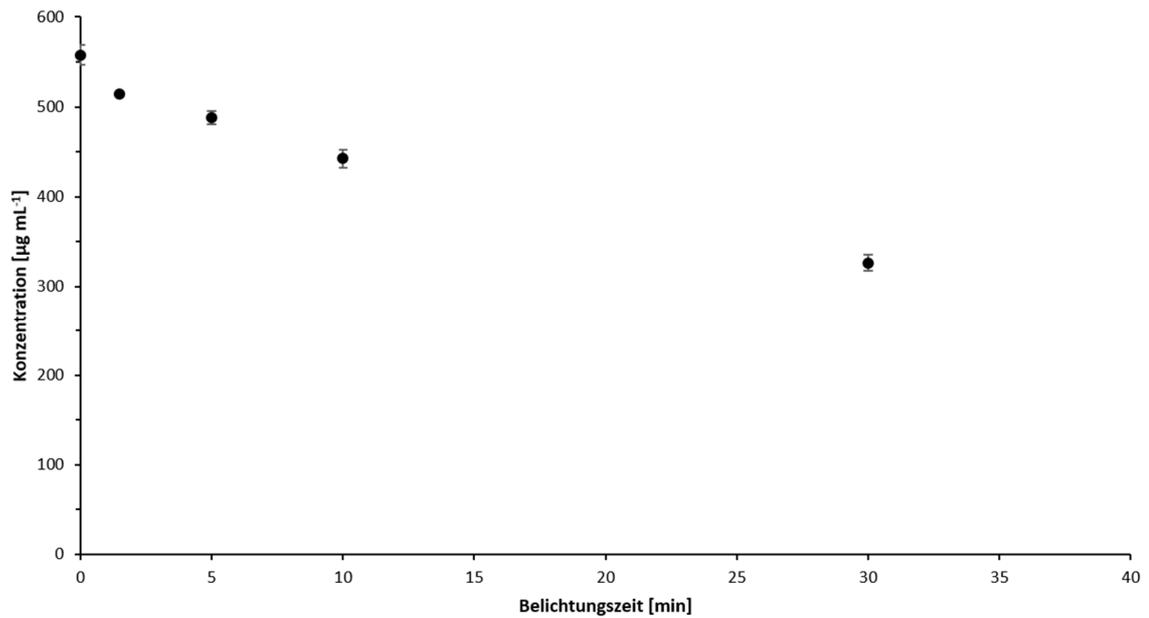


Abbildung 36: Abnahme der Ergosterolkonzentration in einer belichteten Standardlösung über einen Zeitraum von 30 min.

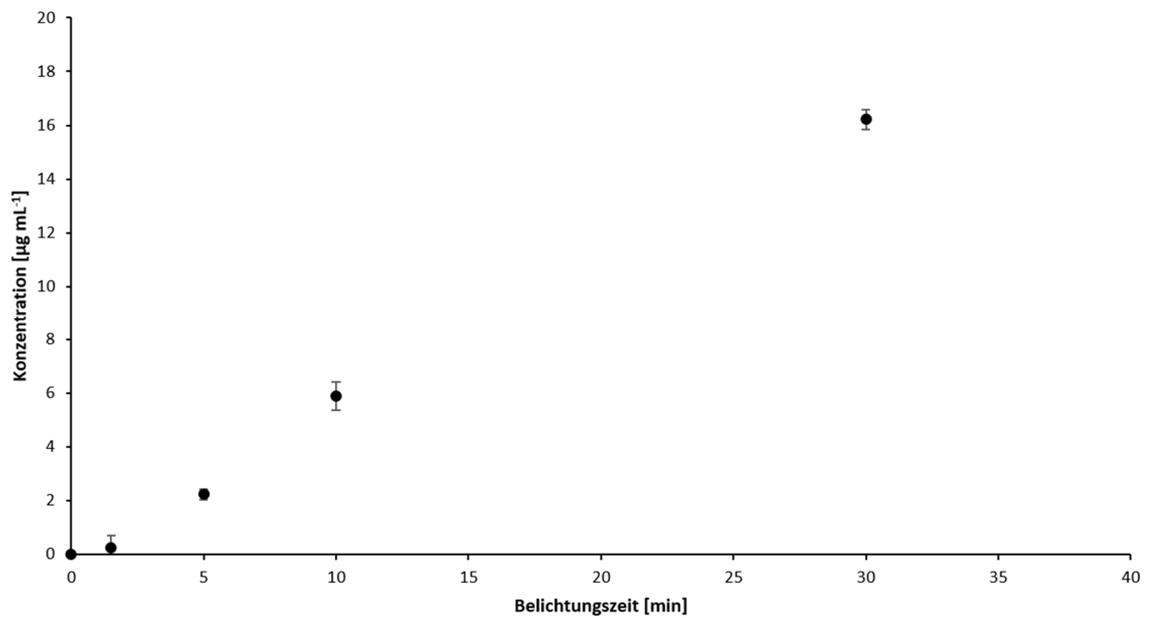


Abbildung 37: Zunahme der Vitamin D₂ Konzentration in einer belichteten Ergosterolstandardlösung über einen Zeitraum von 30 min.

3.13.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Vitamin D₂

Die wie unter 2.7.19.7 beschriebene Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Vitamin D₂ ergab eine NWG von 1,13 µg mL⁻¹ und eine BG von 3,98 µg mL⁻¹. Unter Berücksichtigung der Probenaufarbeitung (2 g Einwaage und 1,5 mL Methanol) entspricht dies einer NWG von 0,85 µg (g TM)⁻¹ und einer BG von 2,99 µg (g TM)⁻¹.

4 Diskussion

Durch den stetig steigenden Nahrungsmittelbedarf muss in der Nahrungsmittelindustrie ein Umdenken erfolgen. Zum jetzigen Zeitpunkt werden unverhältnismäßig viele landwirtschaftliche Nutzflächen für die Produktion von tierischen Lebensmitteln verwendet, die jedoch nur zu 33% der Deckung des Proteinbedarfs eines Menschen beitragen (WWF 2016). An alternativen Proteinquellen wird daher schon seit Jahren geforscht: Algen, Insekten und pflanzliche Proteinquellen wie Lupinen, Soja oder Erbsen werden derzeit diskutiert. Eine weitere Alternative sind Pilze: Sie sind fett- und kalorienarm, sowie reich an Ballaststoffen. Pilze gehören, ebenso wie Tiere und Pflanzen, zu der Domäne der Eukaryota. Konservative Schätzungen gehen von 1,5 Millionen Spezies aus, neusten Schätzungen zufolge liegt die Zahl eher zwischen 2,2 und 3,8 Millionen (Hawksworth und Lücking 2017).

Ein bekanntes Produkt mit Pilzen als alternative Proteinquelle ist Quorn™. Das in Quorn™ enthaltene Mycoprotein stammt von dem Schimmelpilz *Fusarium venenatum* und wird, um ein stabiles und fleischähnliches Produkt zu erhalten, mit Hühnereieweiß, teilweise auch mit Weizenprotein und Erbsenfasern, stabilisiert. Durch das Hühnereieweiß sind diese Produkte nicht für eine vegane Ernährung geeignet. Ein weiteres, sehr bekanntes Produkt ist Tempeh, welches durch die Fermentation von Sojabohnen mit *Rhizopus oligosporus* hergestellt wird. *Rhizopus*-Arten gehören ebenfalls zu den Schimmelpilzen. In der Abteilung der Ascomyceten und Zygomyceten, zu denen die oben genannten Schimmelpilze gehören, gibt es eine Vielzahl an Pilzen, die Mykotoxine wie Patulin, Aflatoxine oder Fumonisine bilden können.

Die meisten Speisepilze, die seit Jahrhunderten verzehrt werden, zählen zu den Basidiomyceten, die rund 30.000 verschiedene Arten umfassen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Basidiomyceten handelt es sich um genießbare Speisepilze. Unter einem „Speisepilz“ wird klassischerweise der Fruchtkörper, also der überirdisch wachsende Teil des Pilzes, verstanden. Das im Boden verborgene Pilzmyzel stellt jedoch den weitaus größeren Teil des Pilzes dar und kann leichter und schneller als die Fruchtkörper in Bioreaktoren kultiviert werden. Bis

Fruchtkörper herangereift sind, können mehrere Monate vergehen. Myzel kann in einigen Fällen binnen drei Tagen heranwachsen.

4.1 Screening, Optimierung der Medien, Upscaling

Bei allen untersuchten Pilz-Substrat-Kombinationen stellte sich Apfeltrester, unabhängig davon, ob frischer oder getrockneter Apfeltrester verwendet wurde, als das am besten geeignete Substrat heraus, auf dem insbesondere *Pleurotus sapidus* allen Anforderungen gerecht werden konnte: schnelles Wachstum, hohe Biotrockenmasse und hoher Proteingehalt. Veröffentlichungen, die sich mit der Weiterverwertung von Apfeltrester befassen, gibt es viele. Auf der einen Seite wird versucht, Apfeltrester als Ballaststoff z. B. in Weizenbrote einzuarbeiten (Masoodi und Chauhan 2007), andererseits diente es als Substrat für Festphasenfermentationen (Villas-Bôas, Esposito und Mendoça 2003), bei denen die Aufwertung des Apfeltresters als Ziel gesetzt wurde. Insbesondere in der Tierernährung stellt Apfeltrester eine interessante Komponente des Futters dar. Worrall und Yang (1992) zufolge wächst das Myzel von Shiitake und *P. ostreatus* schneller, wenn dem Sägemehl gleiche Anteile an Apfeltrester zugemischt werden, was eine erhöhte Biomasse der Fruchtkörper bewirkte. Ein Großteil des anfallenden Apfeltresters wird allerdings entsorgt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Pleurotus*-Spezies in Submerskultur mit Apfeltrester als alleinige Kohlenstoffquelle lediglich 3 - 4 Tage benötigten, um ein proteinreiches Myzel zu bilden.

Durch Veränderung der Medienzusammensetzung wurde versucht, den Proteingehalt und die Biomasse zu steigern und gleichzeitig die Kosten zu senken. Dabei stellte sich das Medium JA4 als das am besten geeignete Medium heraus; es enthielt 50% weniger Aspartat, Ammoniumsulfat anstelle von –nitrat und 66% weniger KH_2PO_4 . Die Biomasse lag mit $14,1 \text{ g L}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung wie in Medium M1 ($13,7 \text{ g L}^{-1}$). Der Proteingehalt war mit 24,0% nur geringfügig niedriger als im Medium M1 mit 25,2% Protein im Myzel ($N = 4,97$, Mattila *et al.* 2002). Daher wurde Medium JA4 auch für den Großansatz im Fermenter verwendet. Dort konnten 22,7% Rohprotein im Myzel mit einem analysierten Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor von 5,86 erzielt werden. Wird dieser Faktor auch für die Rohproteinberechnung im Schüttelkolben angewendet, so

werden 28,4% Rohprotein erhalten. Damit lag der Proteingehalt im Myzel aus dem Bioreaktor um ca. 20% niedriger.

4.2 Zusammensetzung von PSA ATD und ATD

Vergleichswerte für die Myzel-Zusammensetzung von PSA auf Apfeltrester sind in der Literatur nicht zu finden. Lediglich ein Vergleich mit Fruchtkörpern oder nahen Verwandten ist möglich. So lassen sich Fruchtkörper-Zusammensetzungen von *Pleurotus sapidus*, *P. ostreatus* oder *P. sajor-caju* finden (Tabelle 35). Über die Analyse des Myzels lassen sich nur wenige Publikationen finden. Mukhopadhyay und Guha (2015) analysierten das Myzel von *P. sajor-caju* (Tabelle 35), das in einem Medium mit entproteinisierter Molke kultiviert wurde. Der große Unterschied im Rohproteingehalt im Vergleich zu PSA ATD liegt in dem verwendeten Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor von 6,25 begründet.

Tabelle 35: Vergleich der Zusammensetzung von Myzel und Fruchtkörper (FK) aus der Literatur.

Parameter	PSA ATD Myzel Fermenter (diese Arbeit)	<i>Pleurotus sapidus</i> FK ¹	<i>Pleurotus ostreatus</i> FK ²	<i>Pleurotus sajor-caju</i> Myzel ³	<i>Pleurotus sajor-caju</i> FK ⁴
Protein [% TM]	22,7 ^a	20,4 ^b	10,2 ^b	39,3 ^c	24,6
Asche [% TM]	3,1	5,3	6,1	16,2	8,3
Fett [% TM]	1,2	4,9	1,6	5,8	4,4
Kohlenhydrate [% TM]	73,0	69,4 ^d	81,8	38,8 ^e	66,1 ^e

1: Guo, Lin und Lin (2007); 2: Crisan & Sands (1987); 3: Mukhopadhyay & Guha (2015); 4: Alam et al. (2008); a: Rohprotein (N=5,86); b: Rohprotein (N=4,38); c: Rohprotein (N=6,25); d: Differenz 100-Protein-Fett-Asche; e: Summe Kohlenhydrate und Rohfaser

Bereits 1985 untersuchten Martin und Bailey *Agaricus campestris* in Submerskultur und verglichen die Analysenergebnisse mit denen der Fruchtkörper. Sie stellten fest, dass es keine gravierenden Unterschiede in der Zusammensetzung von Protein-, Asche- und Fettgehalten gab. Hadar und Cohen-Arazi verglichen 1986 *P. ostreatus*, der submers in Glucosemedium kultiviert wurde, mit den Fruchtkörpern, die auf Stroh kultiviert wurden und stellten nur geringfügige Unterschiede in der Zusammensetzung fest. Der Fettgehalt unterschied sich zwar nicht, aber das Myzel wies einen höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren im Vergleich zu den Fruchtkörpern auf. Manu-Tawiah und

Martin (1987) untersuchten das Myzel von *P. ostreatus*, der einerseits in einem synthetischen Medium, andererseits in einem mit Torf-Extrakt angereicherten Medium kultiviert wurde. Sie stellten fest, dass das Myzel aus dem mit Torf-Extrakt angereicherten Medium einen höheren Proteingehalt aufwies, die Aminosäurezusammensetzung vorteilhafter war und mehr essentielle Fettsäuren nachgewiesen wurden als in den Fruchtkörpern von *P. ostreatus*.

Die Zusammensetzung von Apfeltrester ist gut erforscht und die in dieser Arbeit analysierten Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein (Tabelle 36). Schwankungen bzw. Abweichungen zu Literaturwerten sind durch unterschiedliche Prozesse, Reifestadien der Äpfel und Apfelsorten zu erklären, ebenso wie durch verschiedene Analysemethoden.

Tabelle 36: Vergleich der Apfeltrester-Zusammensetzung mit Literaturwerten.

Parameter	ATD (diese Arbeit)	Ravn-Haren <i>et al.</i> (2018)	Masoodi & Chauhan (2007)	Givens & Barber (1987)
Protein [% TM]	6,5 ± 0,0	6,6	1,4	6,7 ± 0,7
Asche [% TM]	1,5 ± 0,0	1,5	2,7	2,3 ± 0,7
Fett [% TM]	3,0 ± 0,3	4,6	1,3	n. b.
Kohlenhydrate [% TM]	89,0 ± 0,1	83,3	93,7	n. b.

n. b.: nicht bestimmt

4.2.1 Aminosäuren

Guo *et al.* (2007) gaben die Summe der einzelnen Aminosäuren (ohne Tryptophan) bei *P. sapidus* Fruchtkörpern mit (11,9 ± 0,2)% TM an. Die für PSA ATD ermittelten Reinproteingehalte betragen (24,0 ± 0,4)% (Schüttelkolben) bzw. (17,6 ± 0,3)% (Fermenter). Damit kann der Aminosäuregehalt im Myzel um bis zu Faktor 2 höher liegen als im Fruchtkörper. Bei einem Vergleich der einzelnen Aminosäuren von Fruchtkörper und Myzel fiel auf, dass im Myzel aus dem Schüttelkolben z. B. Histidin um Faktor 7 höher lag als im Fruchtkörper. Der Fruchtkörper wies jedoch einen etwas höheren Methioningehalt auf. Beim Vergleich des Myzels aus dem Fermenter waren die Gehalte von Lysin und Tyrosin im Vergleich zum Fruchtkörper genau gleich hoch. Die Fruchtkörper wiesen einen leicht höheren Gehalt an Methionin und Threonin auf. Die Gehalte aller weiteren Aminosäuren waren im Myzel erhöht. Auch Manu-Tawiah und

Martin stellten 1987 bei der Kultivierung von *P. ostreatus* fest, dass das Myzel mehr Aminosäuren enthielt als die Fruchtkörper.

Relativ betrachtet besaßen die Fruchtkörper nach Guo *et al.* (2007) mehr essentielle Aminosäuren als Myzelien auf Apfeltrester (37,1% bei Fruchtkörpern, 29% bei dem Myzel aus dem Schüttelkolben und 27% beim Myzel aus dem Fermenter; jeweils in Bezug auf Gesamtaminosäuren). Absolut betrachtet betrug der Gehalt an essentiellen Aminosäuren im Myzel aus dem Kolben $(8,2 \pm 0,1) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ bzw. $(5,6 \pm 0,1) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ bei dem Myzel aus dem Fermenter und nur $5,2 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ bei den Fruchtkörpern (Guo *et al.* 2007). Glutaminsäure (Glx) stellte mit ca. 18% bei *P. sapidus* durchweg die Hauptaminosäure dar. Dies stellte auch schon Manzi *et al.* 1999 fest, als sie verschiedene *Pleurotus*-Spezies untersuchten.

Beim Vergleich der beiden Myzelien von PSA ATD wies das Myzel aus dem Fermenter niedrigere Werte für den EAAI (90 vs. 81) und die biologische Wertigkeit (86 vs. 77) auf. Auch die limitierenden Aminosäuren unterschieden sich: Bei dem Myzel aus dem Schüttelkolben waren dies Met & Cys (CS von 74) sowie Trp (CS von 80). Bei dem Myzel aus dem Fermenter war die erste limitierende Aminosäure jedoch Trp (CS von 41) gefolgt von Thr (CS von 81). Ein möglicher Grund dafür könnte in der Verwendung von Medium M1 im Schüttelkolben und Medium JA4 im Fermenter sein. Auch Manzi *et al.* (1999) fanden hohe CS für *Pleurotus*-Fruchtkörper (>96), die die gute biologische Wertigkeit des Pilzproteins indizieren. Nach den Ergebnissen für ATD wies auch dieses Substrat eine sehr gute biologische Wertigkeit (BW: 92) auf. Wird die Berechnung der Biologischen Wertigkeit von Apfeltrester mit der Aminosäurezusammensetzung von Juśkiewicz *et al.* (2015) durchgeführt, so beträgt diese 87; mit Cystein und Methionin als limitierende Aminosäuren. Der Proteingehalt von ATD liegt lediglich bei 4,98%, sodass ATD nicht als gute Proteinquelle angesehen werden kann. Die Aufwertung durch Fermentation mit einem Pilz stellt daher einen geeigneten Lösungsweg dar, um das zwar hochwertige, aber in geringen Konzentrationen vorkommende Apfeltresterprotein mit ebenfalls hochwertigem Pilzprotein anzureichern. Der Proteingehalt konnte in diese Arbeit von 5% auf bis zu 28% gesteigert werden. Die limitierenden Aminosäuren veränderten sich bei PSA ATD im Vergleich zu ATD nur leicht: Met & Cys lagen bei PSA ATD als erste

limitierende AS vor, Trp als zweite; bei ATD war dies umgekehrt. Auffällig war jedoch die semi-essentielle Aminosäure Histidin, die in PSA ATD relativ betrachtet einen deutlich höheren Anteil als in ATD aufwies. Ein Vergleich der Aminosäuren im Protein mit denen des von der FAO/WHO vorgeschlagenen Referenzproteins (Tabelle 14, 2.7.11.1) zeigte eine fast perfekte Übereinstimmung.

Das Aminosäureprofil von ATD ist sehr gut mit dem von Juśkiewicz *et al.* (2015) publizierten Profil vergleichbar. In Summe analysierte Juśkiewicz *et al.* 5,59% Aminosäuren, mit Trp als erste limitierende Aminosäure. Die Hauptaminosäuren in Apfeltrester waren Glx, Asx und Leu.

Um zu überprüfen, wie gut und vollständig die Hydrolyse von Proteinen während der Probenaufarbeitung war und wie hoch die Wiederfindungsraten waren, wurde ein Referenzprotein mit bekannter Aminosäuresequenz analysiert. Alpha-Lactalbumin mit USP Zertifikat wurde als Referenzprotein ausgewählt und den drei verschiedenen Hydrolysen jeweils in Doppelbestimmung unterzogen (Anhang 7.3 Abbildung 44 bis Abbildung 46). Dazu wurde anhand der AS-Sequenz die in der jeweiligen Einwaage enthaltene Soll-Konzentration berechnet und mit den Daten aus der Analyse verglichen. Die Wiederfindung wurde berechnet und in drei Kategorien ($\pm 10\%$, $\pm 20\%$ und $> 20\%$ Abweichung) eingeteilt. Für die Aminosäuren Asx, Glx, Gly, Leu und Lys konnten Wiederfindungen von $(100 \pm 10)\%$ erzielt werden, für Ala, Cys, Phe, Ser, Thr und Val Wiederfindungen von $(100 \pm 20)\%$ und für Arg, Met, Pro und Trp Abweichungen größer 20% (Tabelle 37). Ein Grund für die teilweise schlechten Wiederfindungsraten können die geringen Anteile von Arg, Met und Pro im Referenzprotein sein. Die letztgenannten Aminosäuren lagen nur mit 1 - 2 AS pro Molekül Lactalbumin vor.

Tabelle 37: Wiederfindungsraten (WF) der Aminosäuren (AS) im Referenzprotein Alpha-Lactalbumin; SD: Standardabweichung.

Abweichung WF	Aminosäure	Anzahl AS pro Molekül	Wiederfindung [%]	SD [%]
± 10%	Asx	21	104	2
	Glx	13	99	3
	Lys	12	93	2
	Gly	6	92	1
	Leu	13	90	2
	Tyr	4	90	1
± 20%	Ala	3	119	1
	His	3	112	2
	Ser	7	89	1
	Phe	4	88	2
	Cys	8	88	0
	Val	6	86	3
	Ile	8	81	3
	Thr	7	80	1
> 20%	Pro	2	203	1
	Met	1	168	0
	Trp	4	69	3
	Arg	1	68	2

Durch die Analyse des Aminosäureprofils konnte der Proteinstickstoffgehalt berechnet werden. Mit $3,69 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ Gesamtproteinstickstoff im PSA ATD Myzel (Schüttelkolben) konnte ein durchschnittlicher Anteil von 17,85% Stickstoff im Protein berechnet werden. Für Lebensmittel allgemein liegt dieser Wert bei 16%. Dies bedeutet, dass das Pilzprotein, im Vergleich zu anderen Lebensmitteln, reich an stickstoffhaltigen Aminosäuren ist. Durch die Methode bedingt liegt der wahre Stickstoffgehalt noch über dem hier ermittelten Wert: Durch die Hydrolyse werden Glutamin und Asparagin in die entsprechenden Säuren umgewandelt. Die Auswertung erfolgt über die Molekülmassen der Säuren, sowie der Berücksichtigung nur eines Stickstoffatoms pro Molekül. Zur Unterscheidung zwischen Säure- und Amid-Struktur könnten weitere Analysen durchgeführt werden, die u. a. auf dem Einsatz von Asparaginasen und Glutaminasen beruhen

(Tower, Peters und Wherrett 1962). Manzi *et al.* (1999) analysierten für verschiedene *Pleurotus*-Spezies Gesamt-Stickstoffgehalte zwischen 4,55 – 7,93 g (100 g TM)⁻¹ und 22,3 – 38,96% Protein als Summe der Aminosäuren. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte des Pilzmyzels liegen somit in der gleichen Größenordnung wie die von Manzi *et al.* analysierten Werte. Dass die Werte der einzelnen Aminosäuren eine große Variabilität ausweisen können, ist in der Literatur bereits bekannt (Crisan und Sands 1978; Manzi 1999).

Für Fruchtkörper von *P. ostreatus* wurden von Fujihara *et al.* (1995) die Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren N und N_{net} berechnet. Den Berechnungen wurde ein Gesamtproteinstickstoffgehalt von 4,80 g (100 g TM)⁻¹, ein Gesamtstickstoffgehalt von 6,82 g (100 g TM)⁻¹ und ein AA_{res} von 28,33 g (100 g TM)⁻¹ zugrunde gelegt. Somit errechnete Fujihara einen Umrechnungsfaktor N_{net} von 4,15 bzw. einen Faktor N von 4,80. Der für PSA ATD errechnete Faktor N_{net} betrug 4,11, welcher sehr genau mit dem von Fujihara *et al.* publizierten Faktor übereinstimmt. Der Faktor N_{net} betrug für das Substrat ATD 4,15 und N betrug 6,33, welcher wiederum mit dem allgemeinen Lebensmittelfaktor von 6,25 korreliert. Die Verwendung des Faktors N würde stets zu einer Überschätzung des wahren Proteingehaltes führen, da hier der Stickstoff aus nicht-Protein-Stickstoffquellen ebenfalls zu den Proteinen gerechnet wird. Der in der Probe enthaltene Stickstoff wird somit gänzlich dem Protein zugeschrieben. Bei der Verwendung des Faktors N_{net} wird der nicht-Protein-Stickstoff berücksichtigt, was teilweise zu deutlich niedrigeren Umrechnungsfaktoren führen kann. Für PSA ATD betrug die Differenz beider Werte 1,49 (Schüttelkolben) bzw. 1,96 (Fermenter). Die Angabe des für die Berechnung des Proteingehaltes angewendeten Faktors ist daher von immenser Bedeutung. Vor allem die Überschätzung des wahren Proteingehaltes kann in der Ernährung ein Problem darstellen.

4.2.2 Freie Aminosäuren

Für den folgenden Abschnitt der Diskussion über die Analytik von freien Aminosäuren, wozu auch die Analytik von Aspartat im Kulturüberstand zählt, muss gesagt werden, dass die hier angewendete Methode nicht optimal gewesen ist. Das für diese Arbeit verwendete System basierte auf einer Natrium-basierenden Trennsäule, die für die Analytik von hydrolysierten Proben ausgelegt ist. Für die

Analytik frei vorliegender Aminosäuren müsste eine Lithium-basierende Trennsäule verwendet werden. Diese Säule ist – mit zugehörigen Puffern – in der Lage zahlreiche freie Aminosäuren zu trennen, die in physiologischen Proben vorliegen; einschließlich aller proteinogenen Aminosäuren. Neben den proteinogenen Aminosäuren gibt es eine Vielzahl an nicht-proteinogenen Aminosäuren wie Sarkosin, Aminoadipinsäure, Citrullin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure oder Phosposerin. Die hier verwendete Probenaufarbeitung ist zwar für die Bestimmung freier Aminosäuren geeignet, die Trennsäule kann die einzelnen Aminosäuren jedoch nicht vollständig trennen, sodass Aminosäuren eventuell zur selben Retentionszeit eluieren und so das Ergebnis verfälschen würden. Bei der Natrium-basierenden Trennsäule weist z. B. Asparagin dieselbe Retentionszeit wie Serin auf. Dies beeinflusst nicht die Analyse der Hydrolysat-Proben, da Asparagin während der Hydrolyse in Asparaginsäure umgewandelt wird.

Da die Chromatogramme zur Quantifizierung von Aspartat im Überstand (Anhang 7.4, Abbildung 47 bis Abbildung 52) neben dem Ammoniak-Peak jedoch nur einen einzigen Peak mit der Retentionszeit von Asparaginsäure aufwies, wurde der Gehalt im Kulturüberstand dennoch berechnet. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Aminosäuren zur selben Retentionszeit eluiert wurden. Wenn dies der Fall wäre, dann würde dies u. a. erklären, warum nach Reduzierung des Aspartatgehaltes um 50% immer noch ca. $1,5 \text{ g L}^{-1}$ nachzuweisen waren. Für technische Applikationen wäre es ratsam, den Kulturüberstand zu recyceln und für die nächste Fermentation zu verwenden.

Die Aspartatgehalte im Überstand wurden in Abhängigkeit von der eingesetzten Apfeltrestermenge untersucht; bei hohem Apfeltrestergehalt war der Gehalt an freiem Aspartat stets am niedrigsten. Dies könnte auf adsorptive Effekte zurückzuführen sein. Die Verringerung des Aspartatgehaltes um 50% führte jedoch ebenfalls zu einer Verringerung des PSA-Gehaltes im Myzel. So wurde bei einer eingesetzten Apfeltrestermenge von $6,15 \text{ g L}^{-1}$ eine Verringerung des PSA-Gehaltes von 21% beobachtet. Bei höheren Tresterkonzentrationen wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Hier lag der PSA-Anteil jedoch nur bei 40-50%. Bei den Ansätzen mit hohen Tresterkonzentrationen wurden allerdings bis zu $2,9 \text{ g TM L}^{-1}$ weniger Biomasse erhalten. Nicht so bei dem Ansatz mit $6,15 \text{ g L}^{-1}$ Apfeltrester. Hier konnte der Biomassengehalt von $3,2 \text{ g L}^{-1}$ aufrechterhalten werden (vgl. dazu

3.12.3, Abbildung 30 und 3.12.4 Abbildung 31). Bei dem Ansatz mit $6,15 \text{ g L}^{-1}$ ATD konnte der Proteingehalt durch Senkung des Aspartatgehaltes auf 28% TM bzw. $(0,90 \pm 0,04) \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden.

4.2.3 C:N-Verhältnisse und deren Einfluss auf Biomasse und Proteingehalt

Dass das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff in der Ernährung der Pilze eine Rolle spielt, ist in der Literatur bereits bekannt (Dundar, Acay und Yildiz 2009; Wu *et al.* 2004). Dundar, Acay und Yildiz (2009) untersuchten Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus*, die auf unterschiedlichen lignocellulosehaltigen Substraten, die unterschiedliche C:N-Verhältnisse aufwiesen, kultiviert wurden. Sie stellten fest, dass die maximale Biomasse und der höchste Proteingehalt der Fruchtkörper auf dem Substrat erzielt wurden, das den meisten Stickstoff enthielt. Dies muss aber laut Dundar, Acay und Yildiz nicht zwangsläufig auf das C:N-Verhältnis zurückzuführen sein, da unterschiedliche Substrate verwendet wurden, die biologisch und chemisch verschieden sind.

Der Kohlenstoffanteil wurde in der vorliegenden Arbeit nicht explizit analysiert. Dundar, Acay und Yildiz (2009) berechneten den Kohlenstoffgehalt aus $100 - \text{Asche} - \text{Gesamtstickstoffgehalt}$. Wird diese Verfahrensweise für das Substrat übernommen und der zusätzliche Eintrag von C und N durch die im Medium eingesetzten Salze berücksichtigt, so ergaben sich C:N-Verhältnisse zwischen 5,5:1 bis 24,9:1 (Tabelle 38). Demnach besaßen alle Medien mit $24,6 \text{ g L}^{-1}$ Apfeltrester den niedrigsten Stickstoffgehalt in Bezug auf den Kohlenstoffanteil.

Tabelle 38: C:N-Verhältnisse der verwendeten Medien.

Apfeltrester [g L^{-1}]	C:N bei		
	6,24 g L^{-1} Asp, M1	3,12 g L^{-1} Asp, M1	3,12 g L^{-1} Asp, JA4
24,6	16,2:1	18,7:1	24,9:1
12,3	9,3:1	10,6:1	
6,15	5,5:1	6,0:1	

Eine Erhöhung des Stickstoffanteils im Substrat führte nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung des Proteingehaltes. Wird die

Menge der Kohlenstoffquelle konstant gehalten und die Asp-Konzentration gesenkt, so konnten sowohl eine Erhöhung als auch eine Verringerung im Proteingehalt beobachtet werden, abhängig von der eingesetzten Apfeltrestermenge (vgl. 3.12.3, Abbildung 30 und 3.12.4, Abbildung 31). Wurde hingegen die Asp-Konzentration konstant gehalten und der Tresteranteil gesenkt, so ist sowohl in Abbildung 30 als auch in Abbildung 31 eindeutig zu erkennen, dass ein hoher Stickstoffanteil zu höheren Proteinkonzentrationen führen kann.

Ein Vergleich der PSA-Gehalte aus dem Medium M1 und dem Medium M1 mit 50% weniger Aspartat zeigte, dass die Pilzbiomasse bei den drei untersuchten Apfeltresterkonzentrationen mit Absenkung des N-Gehaltes zwischen 15 und 30% zurückging (vgl. Abbildung 30 und Abbildung 31). Ähnliches stellten auch Wu *et al.* (2004) fest, als sie das Myzel von *Pleurotus tuber-regium* untersuchten. Sie untersuchten verschiedene C:N-Verhältnisse zwischen 6:1 und 96:1 in einem Glucose/Hefeextrakt-Medium. Die höchste Trockenmasse wurde bei einem Verhältnis von 24:1 erzielt ($9,4 \text{ g L}^{-1}$), wobei sich die Werte zwischen 18:1 und 36:1 nicht signifikant voneinander unterschieden. Auf Apfeltrester wurde die höchste Pilz-Biomasse bei einem C:N-Verhältnis von 16,2:1 mit einer erzielten Biomasse von $6,1 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Weiterhin stellten Wu *et al.* (2004) fest, dass ein höherer Gehalt an Stickstoff im Medium zu einem höheren Chitingehalt führt und ein hoher Glucosegehalt (bis 36:1) zur Glucanbildung beiträgt. Dies wurde bei Wu *et al.* über einen hohen Glucoseanteil in der Gesamtballaststoff-Fraktion festgestellt. Bei einer niedrigeren Glucosekonzentration im Medium wurden mehr Mannose, Galactose und Glucosamin gebildet.

4.2.4 Fett und Fettsäureprofil

Der Fettgehalt von PSA ATD aus dem Fermenter lag um Faktor 4 niedriger als der von Guo *et al.* (2007) angegebene Fettgehalt von PSA Fruchtkörpern. Wird jedoch der Fettgehalt des PSA Myzels aus dem Schüttelkolben mit dem Wert der Fruchtkörper verglichen, so stimmten beide Werte gut überein. Dimou *et al.* (2002) analysierten das Fettsäureprofil von PSA Myzel, das in einem Kartoffel-Dextrose-Medium kultiviert wurde. Die relative Verteilung der Fettsäuren von Dimou *et al.* entspricht den in dieser Arbeit analysierten Verhältnisse. Linolsäure (C18:2) stellte die Hauptfettsäure dar, gefolgt von Ölsäure (C18:1), Palmitinsäure (C16:0) und

Stearinsäure (C18:0). *P. ostreatus* Fruchtkörper wiesen ebenfalls ähnliche Verteilungsverhältnisse auf (Hadar und Cohen-Arazi 1986). Mit 74% ungesättigten Fettsäuren ist das Fett von PSA als ernährungsphysiologisch sehr wertvoll anzusehen.

Bhushan *et al.* (2008) publizierten Fettgehalte für Apfeltrester, die zwischen 1,2 und 3,9% lagen. Der für ATD ermittelte Fettgehalt von 3% liegt somit genau in dieser Größenordnung. Das Fettsäureprofil von ATD ähnelt dem des Öls aus Apfelkernen, die von Apfeltrester separiert wurden: 7% Palmitinsäure, 2% Stearinsäure, 47% Ölsäure, 44% Linolsäure und 1% Arachinsäure (Walia *et al.* 2013). Laut der Nährwert-Tabelle von Souci, Fachmann und Kraut (2008) enthalten Äpfel $3,2 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ Fett, wovon ca. 42% auf Linolsäure, 26% auf Palmitinsäure, 9% auf Linolensäure, 8% auf Stearinsäure und lediglich 4% auf Ölsäure entfallen. Bei Äpfeln, die zwei Wochen bei 0 °C gelagert wurden, wurde eine Fettsäureverteilung von 12 – 22% Palmitinsäure, 1 – 5% Stearinsäure, 3 – 13% Ölsäure, 43 – 59% Linolsäure und 22 – 40% Linolensäure ermittelt (Hopkirk und Wills 1981). Auffällig hierbei ist der hohe Anteil an Linolensäure in den gelagerten Äpfeln. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzen als gesättigte und somit als natürliches Frostschutzmittel dienen, könnte der hohe Anteil an Linolensäure bei den bei 0 °C gelagerten Äpfeln auf eine natürliche Reaktion hindeuten. Der in ATD ermittelte Ölsäuregehalt von 30% deutet darauf hin, dass der Apfeltrester Kerne enthielt, da im Fruchtfleisch nur zwischen 3 – 13% Ölsäure enthalten ist (Hopkirk und Wills 1981).

Im Vergleich der Fettsäureprofile von PSA ATD und ATD enthält PSA ATD etwas mehr ungesättigte Fettsäuren als das Ausgangssubstrat. Dennoch stellen Öl- und Linolsäure den Hauptanteil der Fettsäuren dar, womit auch PSA ATD ernährungsphysiologisch wertvoll ist.

4.2.5 Mineralstoffe

Unter den Mengenelementen wies Phosphor mit $13,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ TM}$ den höchsten Anteil auf, wohingegen Ca mit nur $1,3 \text{ g kg}^{-1} \text{ TM}$ das Mengenelement mit dem niedrigsten Anteil darstellte. Bei den essentiellen Spurenelementen bildete Eisen mit $182 \text{ mg kg}^{-1} \text{ TM}$ den höchsten Anteil.

Ein Vergleich der Mineralstoffzusammensetzung von PSA ATD mit Literaturdaten wies starke Abweichungen auf. Manzi *et al.* (1999) untersuchten Fruchtkörper von *P. ostreatus* und fanden mehr als sechs Mal so viel Kalium, durchschnittlich etwa 28 g kg^{-1} Trockenmasse. Magnesium wies mit $1 - 2 \text{ g kg}^{-1}$ einen ähnlichen Wert auf wie für PSA ATD. Manzi *et al.* publizierten einen niedrigen Gehalt an Ca ($0,2 - 0,5 \text{ g kg}^{-1}$) und Na ($0,3 - 1 \text{ g kg}^{-1}$), der bei PSA ATD nicht bestätigt werden konnte. Guo *et al.* (2007) untersuchten die Fruchtkörper von PSA und fanden ca. 3-Mal mehr Kalium und Zink als in PSA ATD. Die Gehalte an Mg und P lagen in PSA ATD dafür um ca. 2,5-fach höher als bei den von Guo *et al.* untersuchten Fruchtkörpern. Die Gehalte an Eisen und Ca von PSA ATD lagen in der gleichen Größenordnung wie bei Guo *et al.* beschrieben.

Das von Manu-Tawiah und Martin (1987) untersuchte Myzel von *P. ostreatus* auf Torfextrakt wies mit $2,1 \text{ g kg}^{-1}$ Ca, $2,3 \text{ g kg}^{-1}$ Mg und $13,2 \text{ g kg}^{-1}$ Phosphor sehr ähnliche Gehalte auf wie PSA ATD. Die ebenfalls von Manu-Tawiah und Martin untersuchten Spurenelemente Cu, Fe, Mn und Zn wiesen einen deutlich höheren Gehalt auf als in PSA ATD. Der Gehalt an Mn lag bei Manu-Tawiah und Martin z. B. um Faktor 312 höher.

Villas-Bôas *et al.* (2003) fermentierten frischen Apfeltrester in Festphasenkultivierung mit *P. ostreatus*. Dabei fanden sie $0,8 \text{ g kg}^{-1}$ P, $1,2 \text{ g kg}^{-1}$ Ca und $5,8 \text{ g kg}^{-1}$ K. Der Wert für Ca stimmt mit dem in der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Wert gut überein. Der bei PSA ATD stark erhöhte Phosphatgehalt von $13,6 \text{ g kg}^{-1}$ kann unter anderem durch die Zugabe von Kaliumdihydrogenphosphat im Medium erklärt werden, da Villas-Bôas *et al.* (2003) lediglich $0,8 \text{ g kg}^{-1}$ bei der Festphasenkultivierung nachgewiesen hatten.

Die Mineralstoffzusammensetzung des Pilzmyzels ist mit Literaturwerten nur schwer vergleichbar, da die Zusammensetzung nicht nur von der Spezies, sondern auch von den Kultivierungsbedingungen abhängig ist. Guo *et al.* (2007) verglichen die Fruchtkörper von PSA mit anderen Pleuroten und fanden teilweise gute Übereinstimmung der Werte. Da bei PSA ATD nicht nur der Reststoffstrom eine wichtige Rolle spielt, sondern auch die zum Medium hinzugefügten Salze, sind die Analysenwerte nur schwer mit Literaturdaten vergleichbar. Der relativ hohe Natriumgehalt von PSA ATD kann durch das im Medium zugefügte Na-Aspartat erklärt werden. Eventuell wurde das Natrium nicht vom Pilzmyzel

aufgenommen, sondern haftete adsorptiv an der Außenseite des Myzels an. Durch gründlicheres Waschen des Myzels könnte der Na-Gehalt so verringert werden.

Da Apfeltrester ein natürliches Produkt ist, können auch hier Schwankungen auftreten. Ein Vergleich der Mineralstoffe mit denen von Givens und Barber (1987) veröffentlichten Werte, zeigte für die Mengenelemente gute Übereinstimmung, insbesondere für Ca und Mg. Für Na publizierten sie jedoch einen Wert von $0,2 \text{ g kg}^{-1}$, der im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Apfeltrester deutlich niedriger lag. Alibes, Muñoz und Rodriguez untersuchten 1984 die Spurenelemente von frischem Apfeltrester. Dabei stellten sie fest, dass Eisen die höchste Konzentration aufwies, gefolgt von Zn, Mn und Cu. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte diese Reihenfolge bestätigt werden. Dass Apfeltrester einen vergleichsweise hohen Eisengehalt besitzt, ist für die menschliche Ernährung von Vorteil. Produkte, die mit Apfeltrester bzw. dem Myzel von PSA ATD angereichert werden, können somit dazu beitragen, den Tagesbedarf an Eisen von 15 mg d^{-1} (DGE) zu decken.

Ein Vergleich des Substrates ATD mit dem Myzel von PSA ATD zeigte auf, dass Mineralstoffe bis auf wenige Ausnahmen durch die Fermentation angereichert werden konnten. Die Gehalte an K, Cu und Mo blieben gleich, wohingegen der Anteil an Ca und Mn verringert wurde.

4.2.6 Schwermetalle

Die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln legt für folgende Pilze spezielle Grenzwert fest: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* und *Lentinula edodes*. Für Blei beträgt der derzeitige Grenzwert für diese drei Pilze $0,30 \text{ mg (kg FM)}^{-1}$, für Cadmium gilt ein Grenzwert von $0,2 \text{ mg (kg FM)}^{-1}$. Für alle anderen Pilze gilt ein Cadmium-Grenzwert von $1,0 \text{ mg (kg FM)}^{-1}$. Für Früchte gilt ein Cadmium-Grenzwert von $0,050 \text{ mg (kg FM)}^{-1}$ und $0,1 \text{ mg (kg FM)}^{-1}$ für Blei.

Die in der Verordnung angegebenen Grenzwerte sind alle auf Frischmasse bezogen. Zum besseren Vergleich der Grenzwerte mit den Resultaten dieser Arbeit können die in der Verordnung angegebenen Werte für Pilze unter Annahme einer Feuchte von 90% in Trockenmasse umgerechnet werden. Demnach würde

der Cadmium-Grenzwert für *P. ostreatus* z. B. $2 \text{ mg (kg TM)}^{-1}$ betragen. Die unter 3.11 aufgeführten Gehalte an Cadmium in Substrat und Pilzmyzel liegen weit unterhalb der oben genannten Grenzwerte.

Für Apfeltrester gestaltet sich die Angabe etwas schwieriger, da Apfeltrester ein Reststoffstrom einer Frucht und keine Frucht ist. Aber auch hier liegt der Wert in der Größenordnung des Gehaltes im Pilzmyzel und erscheint daher nicht relevant.

Blei und Quecksilber konnten im Pilzmyzel und im Apfeltrester nicht nachgewiesen werden. Einen Grenzwert für Quecksilber gibt es lediglich für Meerestiere ($0,5 - 1 \text{ mg kg}^{-1}$ Frischmasse) bzw. $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ für Nahrungsergänzungsmittel.

4.2.7 Chitin

Der Chitingehalt von Pilzen kann stark variieren. Dabei ist der Gehalt nicht nur von der Abteilung, Klasse oder Ordnung abhängig, sondern auch innerhalb einer Gattung können Unterschiede im Chitingehalt auftreten. Selbst innerhalb eines Fruchtkörpers können Hut und Ständer unterschiedliche Chitingehalte aufweisen. Das Myzel kann zudem ebenfalls abweichende Chitingehalte aufweisen. Vetter (2007) untersuchte verschiedene Varietäten von *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* und *Pleurotus ostreatus* und unterteilte die Fruchtkörper in Hut und Stängel. Bei *A. bisporus* lag ein höherer Chitingehalt im Stängel im Vergleich zum Hut vor. Die Gehalte lagen zwischen 5% und 9%. Bei *P. ostreatus* war die Verteilung umgekehrt und der Gehalt betrug zwischen 2% und 5%. Der in dieser Arbeit ermittelte Chitingehalt von PSA ATD (2.7.3) betrug 6,3% und liegt somit in der gleichen Größenordnung.

Nitschke *et al.* (2011) untersuchten zusätzlich zum Fruchtkörper auch das Myzel verschiedener Pilze. So betrug der Chitingehalt des Myzels von *P. ostreatus* 0,82% (berechnet als Chitosan) und im Fruchtkörper 0,76%. *P. eryngii* wies Chitingehalte von 3,56% im Myzel und 3,16% im Fruchtkörper auf. Hadar und Cohen-Arazi (1986) bestimmten 3,5% GlcN im Myzel von *P. ostreatus*.

4.2.8 Pektin

Villas-Bôas *et al.* (2003) analysierten den Pektingehalt von frischem Apfeltrester und den durch Festphasenfermentation mit *P. ostreatus* fermentierten Apfeltrester.

Dabei sank der Pektinanteil von 5,5% auf 2,9%. Der im fermentierten Ansatz von Villas-Bôas *et al.* analysierte Pektingehalt liegt deutlich über dem in der hier vorliegenden Arbeit analysierten Gehalt von 0,72% Pektin. Villas-Bôas *et al.* führten eine Festphasenfermentation durch, bei der die Nährstoffe im Vergleich zur Submerskultivierung schlechter für den Pilz zugänglich sind. Durch Submerskultivierung und die Verwendung von fein vermahlenem Apfeltresterpulver kann Pektin leichter von dem Pilz verstoffwechselt werden, sodass der Pektinanteil von 8,68% im Substrat auf 0,72% im fermentierten Pilzmyzel sinken konnte. Einige weitere Publikationen befassten sich mit dem Uronsäuregehalt im Myzel bzw. Fruchtkörper von *Pleurotus*-Spezies. So analysierten Cheung und Lee (1998) Fruchtkörper von *P. sajor-caju* und postulierten 0,58% Uronsäuren. Das Myzel von *P. sajor-caju* enthielt laut Cheung (1996) 0,69% Uronsäuren in der TDF-Fraktion (*total dietary fiber*).

Der analysierte Pektingehalt von 8,68% im Apfeltrester der Firma Döhler ist im Einklang mit Literaturdaten. Ravn-Haren *et al.* (2018) analysierten sowohl Apfeltrester, als auch kernlosen Apfeltrester und fanden einen Pektingehalt von 6,5% bzw. 9,6%. Der höhere Gehalt an Pektin im kernlosen Apfeltrester ist auf den höheren Anteil an Schalen und Fruchtfleisch zurückzuführen. Renard und Thibault (1991) untersuchten die Apfelsorte Golden Delicious und publizierten folgende Ergebnisse für den Uronsäuregehalt: 34,5% (frischer Apfel, TM), 25,2% (Apfeltrester) und 13,7% (entpektinierter Apfeltrester).

Sharma, Gupta und Kaushal (2014) publizierten einen Pektingehalt von 7,3% für getrockneten Apfeltrester. Sie analysierten ebenfalls den Gehalt von blanchiertem, getrocknetem Apfeltrester mit 10,5% Pektin und gaben die Werte für Äquivalentgewicht ÄG (1239,8), sowie den Gesamt-Anhydro-Uronsäuren-Gehalt AUA (59,1%) und den Veresterungsgrad DE (71,2%) an. Sie stellten fest, dass die Zusammensetzung des Pektins und der DE von der Extraktionsmethode abhängig sind. Dennoch stimmt der DE von 68% für ATD gut mit dem Literaturwert überein. Auch der ermittelte AUA-Gehalt von 79% liegt über dem von der FAO festgelegten Standardpektin-Wert von mind. 65% (FAO 2007).

4.2.9 Biomassenquantifizierung und Upscaling

Das nach der Biotransformation des Substrates durch Basidiomyceten gewonnene Lyophilisat kann noch immer restliche Bestandteile des Substrates beinhalten, die noch nicht vollständig abgebaut wurden. Um den Pilzanteil zu quantifizieren können Biomarker eingesetzt werden. Ergosterol gilt als geeigneter Biomarker zum Nachweis von Pilzen, da es das Hauptsterol in Pilzen darstellt und es fast ausschließlich in diesen vorkommt. Lediglich in Protozoen und Algen kann Ergosterol ebenfalls vorkommen (Peeler *et al.* 1989; Raederstorff und Rohmer 1987), wohingegen Pflanzen kein Ergosterol enthalten.

Stuedler und Bley (2015) untersuchten 11 verschiedene Methoden zur Biomassenquantifizierung eines Basidiomyceten in Festphasenkultivierung. Dabei stellte sich der Biomarker Ergosterol als einer der drei geeigneten Methoden zur Biomassenquantifizierung heraus. Als ebenfalls geeignet erwiesen sich laut Stuedler und Bley die Bestimmung der Zellkernanzahl durch Fluoreszenzfärbung und die Analyse der Abluft (CO_2 und O_2). Für weniger geeignet hielten die Wissenschaftler die Analyse von Glucosamin, Nucleinsäure, Proteingehalt (flüssige und feste Phase), genomische DNS, Glucosegehalt sowie lignolytische und cellulolytische Enzyme.

Alle Biomarker besitzen Vor- und Nachteile. Ergosterol ist leicht zu analysieren und kommt fast ausschließlich in Pilzen vor. Als Nachteil kann die Tatsache angesehen werden, dass Ergosterol nach dem Zelltod nicht sofort abgebaut wird, sondern einige Zeit danach noch immer nachweisbar ist, bevor es zersetzt wird. Dies kann zu einer Überschätzung des lebenden Pilzanteils führen. Sowohl Stuedler und Bley (2015), als auch Klamer und Bååth (2004) beobachteten bereits teilweise einen signifikanten Anstieg des Ergosterolgehaltes mit steigendem Myzelalter. Dass durch Verwendung eines Biomarkers nicht nur lebende Zellen erfasst werden ist auch bei allen anderen oben genannten Markern, selbst bei der gravimetrischen Bestimmung der Biomasse, der Fall (Stuedler und Bley 2015).

Der mit zunehmendem Myzelalter ansteigende Ergosterolgehalt kann durch die Verwendung einer Kalibrierung korrigiert werden. Dies wurde jedoch bei der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, da die Kultivierungsdauer maximal sechs Tage betrug und der Bezugswert nach vier Tagen ermittelt wurde. Stuedler und

Bley (2015) untersuchten den Einfluss der Kultivierungsdauer in Emerskultur von bis zu 56 Tagen auf das Myzel von *Trametes hirsuta*. Dabei stellten sie fest, dass es zwischen Tag 14 und 56 keinen signifikanten Unterschied im Ergosterolgehalt gab. Auch, wenn die Festphasenkultivierung nicht mit den Wachstumsraten einer Submerskultivierung vergleichbar ist, wird davon ausgegangen, dass der Unterschied im Ergosterolgehalt zwischen Tag 4 und Tag 6 ebenfalls keinen gravierenden Einfluss auf das Endergebnis hat.

Um Einflüsse des Mediums auf den Ergosterolgehalt auszuschließen, wurde nicht nur in Malzextraktmedium, sondern auch in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle und unter Einsatz von Sud aus ausgekochtem Apfeltrester kultiviert. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dass das Substrat keinen Einfluss auf die Ergosterolbildung hat, zeigten auch schon Steudler und Bley (2015), die *T. hirsuta* auf Stroh, Maissilage und Orangenschalen kultivierten. Weiterhin untersuchten sie den Einfluss verschiedener Temperaturen und stellten fest, dass es oberhalb von 28 °C keine großen Unterschiede zwischen den über Ergosterol, gravimetrisch und über die Nucleinsäureanalyse erzielten Ergebnisse gab.

Ergosterol ist daher als Biomarker gut geeignet, jedoch ist die Analyse zeit- und arbeitsintensiv. Für ein online-Monitoring ist die Ergosterolanalytik nicht geeignet; besser geeignet wäre die Analyse der Abluft (Steudler und Bley 2015).

Die Analyse der Wachstumskurve von PSA auf Apfeltrester zeigte, dass der gewählte Zeitpunkt der Biomassenabtrennung an Tag 4, der über optische Abschätzung festgelegt wurde, der beste Zeitpunkt war, an dem die höchste Biomasse erzielt wurde und sowohl der Proteingehalt, als auch der Pilzanteil stagnierten. Für das Stagnieren des Pilzanteils ab Tag 4 bei lediglich 50% können mehrere Ursachen in Frage kommen. Einerseits hatte das bewachsene Medium ab Tag 4 eine sehr hohe Viskosität, sodass der Kolben als vollständig bewachsen angesehen wurde. Wenn der Pilz das Medium vollständig bewachsen hat, dann kann er nicht weiterwachsen und das restliche Substrat kann somit nicht abgebaut werden. Hinzu kommt, dass Basidiomyceten in Submerskultur zur Pelletbildung neigen und so die Nährstoffzufuhr ins Innere der Pellets erschwert werden kann. Weiterhin kann das Myzel das Substrat umwachsen, insbesondere wenn das Substrat inhomogen ist, wie z. B. frischer Apfeltrester. Dadurch ist es optisch nicht

mehr als Substrat zu erkennen und steht anderen Hyphen nicht weiter als Nährstoffquelle zur Verfügung. Das Wachstum würde stagnieren.

Anhand der Ergebnisse aus der Wachstumskurve mit $24,6 \text{ g L}^{-1}$ ATD (3.12.2, Abbildung 29) wurden neue Medien mit $12,3$ bzw. $6,15 \text{ g L}^{-1}$ ATD angesetzt. Parallel dazu wurde der Ansatz mit $24,6 \text{ g L}^{-1}$ erneut angesetzt und gemessen. Hierbei betrug der Pilzanteil nicht mehr 51%, sondern lediglich 43%. Dies könnte auf eine neue Charge Apfeltrester zurückzuführen sein, die verwendet wurde.

Zur Berechnung der Proteingehalte, die zur Ergänzung der Wachstumskurve aufgezeichnet wurden, wurde der für PSA ATD ermittelte Kjeldahlfaktor N_{net} von 4,11 angewendet, der für PSA ATD an Tag 4 in Submerskultur bestimmt wurde. Der ermittelte Kjeldahlfaktor darf eigentlich nur für diese Kultivierungsdauer bei PSA ATD angewendet werden. Da die Aminosäureanalyse jedoch nur von dieser Kombination durchgeführt wurde, wurde sie ebenfalls zur Berechnung der weiteren Proteingehalte der Wachstumskurve angewendet. Die Ergebnisse sind daher unter dieser möglichen Fehlerquelle zu betrachten. Bei Betrachtung des Verhältnisses von Myzel- zu Proteingehalt der Wachstumskurve (Abbildung 29) wurde eine leichte Abnahme des Proteingehaltes bei steigender Kultivierungsdauer beobachtet. Dies wurde auch bereits von Steuder und Bley (2015) und Ooijkaas, Tramper und Buitelaar (1998) festgestellt.

Da zur Optimierung des Pilzanteils verschiedene Medienzusammensetzungen (insbesondere verschiedene Apfeltresterkonzentrationen, aber auch 50% weniger Aspartat) untersucht wurden, müssten auch für diese Zusammensetzungen jeweils Wachstumskurven aufgezeichnet werden und für jede Zusammensetzung das Optimum bestimmt werden. Dies wurde hier nicht durchgeführt, stattdessen wurde bei allen Medien die Biomasse an Tag 4 abgetrennt. Dies kann dazu führen, dass z. B. der Pilzanteil noch über 90% gesteigert werden könnte oder auch eine höhere Biomasse erzielt werden könnte.

Bei allen Messreihen im Batch-Verfahren konnte beobachtet werden, dass eine Steigerung des Pilzanteils mit einer geringeren Biomasse einherging. Durch den Einsatz des Fed-Batch-Verfahrens konnte die Biomasse auf $5,4 \text{ g L}^{-1}$ bei 89% Pilzanteil gesteigert werden. Die Größenordnung der Biotrockenmasse korreliert mit den von Hadar und Cohen-Arazi (1986) erhaltenen Ergebnissen von *Pleurotus*

ostreatus in Submerskultur. Sie untersuchten verschiedene Kohlenstoffquellen (Glucose, Melasse und eine Kombination aus beiden) und fanden ca. $6 - 7 \text{ g L}^{-1}$ TM bei Glucose- bzw. Melasseinsatz nach drei Tagen. Durch Kombination beider C-Quellen erreichten sie sogar ca. 12 g L^{-1} . Das dafür verwendete Grundmedium enthielt Asparagin, Hefeextrakt, Magnesiumsulfat, Kaliumdihydrogenphosphat und Kaliumchlorid.

Das Lyophilisat aus dem Upscaling im 150 L Bioreaktor, der mit 75 L Medium JA4 befüllt wurde, wies jedoch nur einen Pilzanteil von etwa 32% auf. Eine durch Kultivierung im Schüttelkolben vergleichbare Biotrockenmasse konnte auch im Bioreaktor erzielt werden (siehe 3.2). Ursache für den niedrigen Pilzanteil könnte das verwendete Medium gewesen sein. Medium JA4 resultierte aus der Medienoptimierung, bei der lediglich Biotrockenmasse und Proteingehalt berücksichtigt wurden. Und so wurde das vermeintlich optimierte Medium für den Großansatz im Bioreaktor verwendet. Dies beinhaltete eine Verringerung des Aspartatgehaltes um 50%, die Verwendung von Ammoniumsulfat anstatt –nitrat und die Verringerung der Konzentration von KH_2PO_4 um 66%. Vergleichbare Pilzanteile von 38% wurden auch bei den Ansätzen mit 50% weniger Aspartat (3.12.4) beobachtet.

Die analysierten Ergosterolgehalte, die zur Bestimmung des Pilzanteils Verwendung fanden, lagen im Bereich von 6000 bis $7000 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ bei Kulturen mit hohem Pilzanteil bzw. bei den Bezugswerten. Damit können Literaturwerte bestätigt werden, die – abhängig von der Spezies – zwischen 680 und $7800 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ liegen (Jasinghe und Perera 2005). *P. ostreatus* wies nach Jasinghe und Perera einen Ergosterolgehalt von $4400 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ auf, wohingegen Mattila *et al.* (2002) einen Wert von $6740 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ publizierten. Da sich die Literaturwerte auf die Fruchtkörper beziehen, konnte damit ebenfalls gezeigt werden, dass sich Myzel und Fruchtkörper in Bezug auf den Ergosterolgehalt nicht gravierend unterscheiden.

4.2.10 Anreicherung von Vitamin D₂ in Pilzmyzel

Die Aufwertung des Pilzmyzels durch kurzzeitige Belichtung mittels UV-B Strahlung konnte ohne großen apparativen Aufwand schnell und einfach durchgeführt werden. Gezeigt werden konnte, dass die Menge an Vitamin D₂ von der belichteten Oberfläche anhängig ist. Dabei wurden, je nach Medium und Belichtungszeit, bis zu $385 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ Vitamin D₂ gebildet. Sowohl bei der Aufzeichnung der Belichtungskurve von lyophilisiertem PSA ATD Myzel, als auch bei der Belichtung von flüssigen PSA MEM Kulturen, wurde nach 10-minütiger Belichtung eine Stagnation der Vitamin D₂-Bildung beobachtet. Dies kann mehrere Ursachen haben. Einerseits kann die Bildung von Pigmenten, die dem UV-Schutz dienen, dazu führen, dass die UV-Strahlung nur noch geschwächt zur Zellmembran vordringen kann und somit die Strahlungsintensität und die Transformation von Ergosterol zu Vitamin D₂ verringert wird (Jasinghe und Perera 2005). Braune Farbpigmente könnten auch den großen Unterschied in den belichteten Proben von PSA ATD und PSA MEM erklären. PSA ATD besaß durch den Apfeltrester eine deutliche Braunfärbung, die, trotz größerer Oberfläche des belichteten, lyophilisierten Myzels zu einem deutlich niedrigeren Vitamin D₂ Gehalt führte als bei PSA MEM, das als flüssige Kultur belichtet wurde (115 vs $365 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$, Abbildung 32 und Abbildung 34 in Abschnitt 3.13). Eine Braunfärbung des Myzels von PSA MEM während der Belichtung wurde jedoch nicht beobachtet. Eine weitere Ursache könnte die Umsetzung von Vitamin D in hydroxylierte Formen des Vitamin D₂ durch Monooxygenasen sein (Jasinghe und Perera 2005). Da aber sowohl aktives als auch inaktiviertes Myzel untersucht wurde, es bei beiden Ansätzen zu keinem signifikanten Unterschied kam und eine Stagnation auf demselben Niveau zu erkennen war (Abbildung 34), erscheint diese Ursache als unwahrscheinlich. Eine dritte Möglichkeit ist die Photodegradation, die durch oxidativen Stress in den Zellen hervorgerufen werden kann (Jasinghe und Perera 2005). Im Zuge der Vitamin D Analytik wurde auch eine Ergosterolstandardlösung für bis zu 30 min mit UV-B Strahlung belichtet (siehe Anhang 7.7, Abbildung 64 und Abbildung 65). Der Anstieg der Vitamin D₂ Konzentration ging mit einer stetigen Abnahme an Ergosterol einher (Ahlborn *et al.* 2018). Dabei war zu erkennen, dass nicht nur Vitamin D₂ entstand, sondern auch drei weitere Peaks. In einer belichteten Submerskultur von PSA in

Malzextraktmedium konnten diese Peaks mittels LC-MS als cholesterol- bzw. ergosterolbasierende Intermediate bzw. Photoisomere, wie z. B. Lumisterol oder Tachysterol (Ahlborn *et al.* 2018) identifiziert werden. Der Abbau des belichteten Ergosterols in der Standardlösung betrug nach 30 min $231 \mu\text{g mL}^{-1}$. Davon konnten lediglich $16,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ an Vitamin D₂ nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Umsetzungsrate von 7%. Die Summe aller detektierbaren Isomere (inklusive D₂) betrug $82 \mu\text{g mL}^{-1}$ (quantifiziert bei 265 nm über Vitamin D₃ Kalibrierung). Somit blieb eine Differenz von $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ offen. Eine mögliche Ursache für die große Differenz liegt in den vielfältigen Reaktionen, die bei der Belichtung von Ergosterol stattfinden. So können nicht nur Tachysterol und Lumisterol entstehen, sondern auch Überbelichtungsprodukte wie Suprasterole (I und II), Toxisterole und 5,6-trans-Vitamin D (Barrett 1975). Zusätzlich können verschiedene Vinylallene, Vinylcyclobutene und 7-7'-Dimere aus Provitamin D entstehen (Barrett 1975). Ergosterol wurde in dieser Arbeit in Methanol belichtet. Barrett führte 1975 Belichtungsstudien von Ergosterol in Ethanol durch, bei denen er eine Verschiebung des Absorptionsspektrums in den kürzerwelligen Bereich feststellte und sehr viele Photoabbauprodukte identifizieren konnte. Dabei handelte es sich um Abbauprodukte mit intaktem C- und D-Ring.

In dieser Arbeit konnte Pilzmyzel erfolgreich mit Vitamin D angereichert werden. Bereits eine Belichtung von einer Minute führte bei Myzel von PSA ATD zu $35 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$. Damit kann der Tagesbedarf eines Kindes bzw. Erwachsenen von $20 \mu\text{g pro Tag}$ (Deutsche Gesellschaft für Ernährung) leicht gedeckt werden. Um eine Überschreitung des Tagesbedarfs durch die Zufuhr von mit Myzel angereicherten Lebensmitteln zu vermeiden, kann das Myzel mit unbelichtetem Myzel verschnitten, bzw. die eingesetzte Menge im Lebensmittel unter Berücksichtigung der Verzehrsmenge auf den Zielwert angepasst werden.

Der Gehalt an Ergosterol in PSA ATD ($24,6 \text{ g L}^{-1}$ ATD für vier Tage kultiviert) betrug $2839 - 3607 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$. Durch Belichtung konnten $115 \mu\text{g (g TM)}^{-1}$ Vitamin D₂ erzeugt werden. Das entspricht einer Umsetzung von 3 – 4%. Die gleiche Umsetzungsrate konnten auch Jasinghe und Perera (2005 und 2006) in frischen Fruchtkörpern von *P. ostreatus* erreichen.

Da das Myzel als Nahrungsmittel dienen soll, ist die Lagerstabilität des Vitamin D von Bedeutung. Auch am Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums soll eine

ausreichende Menge an Vitamin D vorhanden sein. Aus diesem Grund wurde belichtetes Myzel sowohl bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss als auch im Gefrierschrank bei -20 °C für 13 Wochen gelagert. Soll das belichtete Myzel z. B. Extrudate wie Flips oder Cracker aufwerten, die für gewöhnlich bei Raumtemperatur gelagert werden, so muss mit einem deutlichen Verlust des Vitamins gerechnet werden. Die Lagerung im Gefrierschrank hingegen zeigte keinen Verlust an Vitamin D. Bei der Auswahl der Produkte, die angereichert werden sollen, muss dies berücksichtigt werden und das Mindesthaltbarkeitsdatum gegebenenfalls angepasst werden.

Im Vergleich zu den anderen PSA ATD Proben, die belichtet wurden, besaß das Myzel für die Lagerstabilitätsuntersuchungen einen niedrigeren Gehalt an Vitamin D. Dies kann durch die erhöhte Schichtdicke erklärt werden, denn für die Lagerstabilitätsuntersuchungen wurden 6 g anstelle von 2 g auf einer gleich großen Oberfläche verteilt und belichtet.

5 Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Umsetzung eines industriellen Reststoffstroms aus der Nahrungsmittelindustrie durch Basidiomyceten in Submerskultivierung zur Erzeugung einer hochwertigen, alternativen Proteinquelle, konnte erreicht werden. Von den untersuchten Substraten und Pilzen erwies sich *Pleurotus sapidus*, kultiviert auf Apfeltrester (PSA ATD) als die beste Kombination. Nach nur vier Tagen Kultivierungsdauer konnten ca. 14 g L⁻¹ Trockenmasse erzeugt werden, mit Reinproteingehalten von 21% TM.

Die proteinreiche Biomasse wies mit 86 eine hohe biologische Wertigkeit auf. Alle essentiellen Aminosäuren konnten in dem Myzel nachgewiesen werden; Cystein und Methionin bzw. Tryptophan erwiesen sich als limitierende Aminosäuren.

Das fettarme Myzel besaß einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren, wovon Linolsäure mit 45% den Hauptanteil darstellte.

Das Upscaling in einem 150 L Bioreaktor verlief erfolgreich. Die Biotrockenmasse, die im Schüttelkolben erreicht werden konnte, konnte auch im Bioreaktor erzielt werden. Der Proteingehalt des Myzels aus dem Bioreaktor lag jedoch ca. 20% niedriger im Vergleich zu dem Myzel aus dem Schüttelkolben.

Der Pilzanteil im Lyophilisat wurde über den Ergosterolgehalt als Biomarker ermittelt und das Verfahren daraufhin optimiert. Ein Fed-Batch-Verfahren lieferte dabei den höchsten Pilzanteil von 89% und einer Biotrockenmasse von 5,4 g L⁻¹. Reststoffströme mit niedrigen Proteingehalten können somit aufgewertet und der Nahrungskette wieder zugeführt werden. Auswaagen und Proteingehalte sind durch Verwendung anderer Medien oder Kombinationen von Reststoffströmen sicherlich noch optimierbar.

Eine Anreicherung des Myzels mit Vitamin D₂ erfolgte durch UV-B Belichtung. Dabei wird das in der Zellmembran gebundene Ergosterol in Vitamin D₂ umgewandelt. So ließen sich Gehalte von bis zu 115 µg (g TM)⁻¹ in PSA ATD erzeugen, die zur Deckung des Tagesbedarfs von 20 µg beitragen können.

6 Literatur

Ahlborn J, Calzolari N, Spielmeyer A, Avci SS, Zimmer M, Rühl M (2018) Enrichment of vitamin D₂ in mycelium from submerged cultures of the agaric mushroom *Pleurotus sapidus*. J Food Sci Technol 55: 3833-3839. Doi: 10.1007/s13197-018-3290-z

Alam N, Amin R, Khan A, Ara I, Shim MJ, Lee MW, Lee TS (2008) Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh – *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. Mycobiology 36:228-232. Doi: 10.4489/MYCO.2008.36.4.228

Alibes X, Muñoz F, Rodriguez (1984) Feeding value of apple pomace silage for sheep. Anim Feed Sci Tech 11:189-197. Doi: 10.1016/0377-8401(84)90062-2

Barrett AGM (1975) Studies in the chemistry of ergosterol. Dissertation, Department of Chemistry, Imperial College, London

Becker EW (2007) Micro-algae as a Source of Protein. Biotechnol Adv 25:207-210. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

Belluco S, Losasso C, Maggioletti M, Alonzi CC, Paoletti MG, Ricci A (2013) Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review. Compr Rev Food Sci F 12:296–313. Doi: 10.1111/1541-4337.12014

Berliner Morgenpost (2018) Ernährungstrends: Ikea testet Insekten-Köttbullar. <https://www.morgenpost.de/vermishtes/article/213831889/Ernaehrungstrends-Ikea-testet-Insekten-Koettbullar.html>, eingesehen am: 12.11.2018, 11.00 Uhr

Bhushan S, Kalia K, Sharma M, Singh B, Ahuja PS (2008) Processing of apple pomace for bioactive molecules. Crit Rev Biotechnol 28:285-296. Doi: 10.1080/07388550802368895

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2018) Versorgung mit Fleisch in Deutschland im Kalenderjahr 2017 (vorläufig), https://www.ble.de/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/fleisch_node.html, eingesehen am: 19.06.2018, 14.34 Uhr

Canteri-Schemin MH, Fertoni HCR, Waszczyński N, Wosiacki G (2005) Extraction of pectin from apple pomace. Braz Arch Biol Techn 48:259-266

Cheung PCK (1996) Dietary fiber content and composition of some cultivated edible mushroom fruiting bodies and mycelia. *J Agr Food Chem* 44:468-471. Doi: 10.1021/jf950455I

Cheung PCK, Lee MY (1998) Comparative chemical analysis of fiber material prepared by enzymatic and chemical methods from two mushrooms (*Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus tuber-regium*). *J Agr Food Chem* 46:4854-4857. Doi: 10.1021/jf980561y

Crisan EV, Sands A (1978) Nutritional value. In Chang ST, Hayes WA [Eds.] *The biology and cultivation of edible mushrooms*. 1. Auflage, Academic Press, 137-168

Corradini C, Cavazza A, Cignardi C (2012) High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and applications, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-13

Devi WE, Shukla RN, Bala KL, Kumar A, Mishra AA, Yadav KC (2014) Extraction of pectin from citrus fruit peel and its utilization in preparation of jelly. *IJERT* 5:1925-1932

Dimou DM, Georgala A, Komaitis M, Aggelis G (2002) Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol Res* 106:925-929. Doi: 10.1017/S0953756202006184

Dundar A, Acay H, Yildiz A (2009) Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *Afr J Biotechnol* 8:662-666.

Enzing C, Ploeg M, Barbosa M, Sijtsma L (2014) Microalgaebased Products for the Food and Feed Sector: an Outlook for Europe. In Vigani M, Parisi C, Rodríguez Cerezo E [Eds.] *JRC scientific and policy reports*. Doi: 10.2791/3339

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2007) *Compendium of food additive specifications*. FAO JECFA Monographs 4. ISBN: 978-92-5-105866-4

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2017) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>, eingesehen am: 18.06.2018, 15.06 Uhr

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2018) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, eingesehen am: 12.07.2018, 14.09 Uhr

Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1973) Energy and Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. WHO Tech Rep Series Nr. 522, Genf, Schweiz

Fujihara S, Kasuga A, Aoyagi Y, Sugahara T (1995) Nitrogen-to-protein conversion factors for some common edible mushrooms. *J Food Sci* 60:1045-1047. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb06289.x

Givens DI, Barber WP (1987) Nutritive value of apple pomace for ruminants. *Anim Feed Sci Tech* 16:311-315. Doi: 10.1016/0377-8401(87)90020-4

Guo LQ, Lin JY, Lin JF (2007) Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. *Food Chem* 100:643-649. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.087

Hadar Y, Cohen-Arazi E (1986) Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl Environ Microb* 51:1352-1354

Hawksworth DL, Lücking R (2017) Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum* 5:1-17. Doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016

Herrero M, Henderson B, Havlík P, Thornton PK, Conant RT, Smith P, Wirsenius S, Hristov AN, Gerber P, Gill M, Butterbach-Bahl K, Valin H, Garnett T, Stehfest E (2016) Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nat Clim Change* 6:452-461. Doi: 10.1038/NCLIMATE2925

Hopkirk G, Wills RBH (1981) Variation in fatty acid composition of apples in relation to soft scald, *Phytochemistry* 20:193-195. Doi: 10.1016/0031-9422(81)85091-1

Hove EL (1974) Composition and protein quality of sweet lupin seed. *J Sci Food Agr* 25:851-859. Doi: 10.1002/jsfa.2740250715

Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N, Khan MS (2006) Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem* 97:331-335. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.011

Jasinghe VJ, Perera CO (2005) Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chem* 92:541-546. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.022

Jasinghe VJ, Perera CO (2006) Ultraviolet irradiation: the generator of vitamin D₂ in edible mushrooms. *Food Chem* 95:638–643. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.046

Jongema Y (2017) List of Edible Insects of the World (April 1, 2017), Laboratory of entomology, Wageningen University. <https://www.wur.nl/en/Research-Results/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>, eingesehen am: 29.06.2018, 13.20 Uhr

Juśkiewicz J, Jankowski J, Zduńczyk Z, Kołodziejczyk K, Mikulski D and Zduńczyk P (2015) The chemical composition of selected dried fruit pomaces and their effects on the growth performance and post-slaughter parameters of young turkeys. *J Anim Feed Sci* 24:53-60. Doi: 10.22358/jafs/65653/2015

Kammerer DR, Kammerer J, Valet R, Carle R (2014) Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Res Int* 65:2-12. Doi: 10.1016/j.foodres.2014.06.012

Kjeldahl J (1883) Neue Methoden zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius J Anal Chem* 22:366-382

Klamer M, Bååth E (2004) Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2ω6,9. *Soil Biol Biochem* 36:57-65. Doi: 10.1016/j.soilbio.2003.08.019

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

Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L (1999) Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem* 65:477-482. Doi: 10.1016/S0308-8146(98)00212-X

Martin AM, Bailey VI (1985) Growth of *Agaricus campestris* NRRL 2334 in the form of pellets. *Appl Environ Microb* 49:1502-1506

- Masoodi FA, Chauhan GS (2007) Use of apple pomace as a source of dietary fiber in wheat bread. *J. Food Process. Preserv* 22:255-263. Doi: 10.1111/j.1745-4549.1998.tb00349.x
- Matissek R, Steiner G, Fischer M (2010) Aminosäuren, Peptide, Proteine, Nucleinsäuren. In Matissek R, Steiner G, Fischer M [Eds.] *Lebensmittelanalytik*, 5. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 271-279
- Mattila PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ, Koivistoinen PE (1994) Vitamin D contents in edible mushrooms. *J Agric Food Chem* 42:2449–2453. Doi: 10.1021/jf00047a016
- Mattila PH, Lampi AM, Ronkainen R, Toivo J, Piironen VI (2002) Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chem* 76:293-298. Doi: 10.1016/S0308-8146(01)00275-8
- Micha R, Wallace SK, Mozaffarian D (2010) Red and Processed Meat Consumption and Risk of Incident Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes Mellitus. *Circulation* 121:2271-2283. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924977
- Mitsuhashi J (2010) The Future Use of Insects as Human Food. In Durst PB, Johnson DV, Leslie R, Shono K [Eds.] *Forest Insects as Food: Humans Bite Back*. FAO, Bangkok, 115-122
- Mukhopadhyay R, Guha AK (2015) A comprehensive analysis of the nutritional quality of edible mushroom *Pleurtus sajor-caju* grown in deproteinized whey medium. *Food Sci Technol-Leb* 61:339-345. Doi: 10.1016/j.lwt.2014.12.055
- Nitschke J, Altenbach HJ, Malolepszy T, Mölleken H (2011) A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr Res* 346:1307-1310. Doi: 10.1016/j.carres.2011.03.040
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH (2011) Microalgal Production – A Close Look at the Economics. *Biotechnol Adv* 29:24-27. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.005
- Ooijkaas LP, Tramper J, Buitelaar RM (1998) Biomass estimation of *Coniothyrium Minitans* in solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 22:480-486. Doi: 10.1016/S0141-0229(97)00246-9

Oonincx DGAB, de Boer IJM (2012) Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans – A Life Cycle Assessment. Plos One 7:1-5. Doi: 10.1371/journal.pone.0051145

Oser BL (1975) An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins. In Albanese A [Ed.] Protein and amino acid nutrition. 1. Auflage 1959, Academic Press, 281-295

Our World in Data (OWID) (2018) <https://ourworldindata.org/>, eingesehen am: 19.07.2018, 13.31 Uhr

Peeler TC, Stephenson MB, Einspahr KJ, Thompson GA (1989) Lipid characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity. Plant Physiol 89:970-976

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

Ravn-Haren G, Krath BN, Markowski J, Poulsen M, Hansen M, Kotodziejczyk K, Kosmala M, Dragsted LO (2018) Apple pomace improves gut health in fisher rats independent of seed content. Food Funct 9:2931-2941. Doi: 10.1039/c7fo01932g

Renard CMGC, Thibault (1991) Composition and physico-chemical properties of apple fibres from fresh fruits and industrial products. Lebensm Wiss Technol 24:523-527

Richtlinie 98/64/EG der Kommission vom 3. September 1998 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Aminosäuren, Rohfetten und Olaquinox in Futtermitteln und zur Änderung der Richtlinie 71/393/EWG, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L 257/14

Roberts JS, Teichert A, McHugh TH (2008) Vitamin D₂ formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. J Agric Food Chem 56:4541-4544. Doi: 10.1021/jf0732511

Rodger G (2001) Mycoprotein – a meat alternative new to the U.S. Food Technology Magazine 55:36-41

Rumpold BA, Schlüter OK (2013) Nutritional Composition and Safety Aspects of Edible Insects. *Mol Nutr Food Res* 57:802-823. Doi: 10.1002/mnfr.201200735

Seong HS, Kim JP, Ko SW (1999) Preparing Chito-Oligosaccharides as Antimicrobial Agents for Cotton. *Text Res J* 69:483-488. Doi: 10.1177/004051759906900704

Sharma PC, Gupta A, Kaushal P (2014) Optimization of method for extraction of pectin from apple pomace. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 5:184-189

Smith RL, Gilkerson E (1979) Quantitation of Glycosaminoglycan Hexosamine Using 3-Methyl-2-Benzothiazolone Hydrazone Hydrochloride. *Anal Biochem* 98:478-480. Doi: 10.1016/0003-2697(79)90170-2

Souci SW, Fachmann W, Kraut H (2008) Früchte. In Souci SW, Fachmann W, Kraut H [Eds.] *Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2017-2019

Sujak A, Kotlarz A, Strobel W (2006) Compositional and Nutritional Evaluation of Several Lupin Seeds. *Food Chem* 98:711-719. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.06.036

Statistisches Bundesamt (2018) Land- und Forstwirtschaft, Fischerei – Wachstum und Ernte – Baumobst 2017 – Fachserie 3 Reihe 3.2.1. <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/ErnteOErn/ObstJahr.html>, eingesehen am: 12.07.2018, 14.17 Uhr

Stuedler S, Bley T (2015) Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioproc Biosyst Eng* 38:1313-1323: Doi: 10.1007/s00449-015-1372-0

Tao J, Li YO (2018) Edible Insects as a Means to Address Global Malnutrition and Food Insecurity Issues. *Food Quality and Safety* 2:17-26. Doi: 10.1093/fqsafe/fyy001

Tower DB, Peters EL, Wherrett JR (1962) Determination of protein-bound glutamine and asparagine. *J Biol Chem* 237:1861-1869

Tsuji A, Kinoshita T, Hoshino M (1969) Microdetermination of Hexosamines. Chem Pharm Bull 17:217-218.

United Nations (2017) <https://esa.un.org/unpd/wpp/Download/Standard/Population/> (World Population Prospects 2017), eingesehen am: 19.06.2018, 12.05 Uhr

van Huis A (2013) Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. Annu Rev Entomol 58:532-583. Doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153704

Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union L 364/5

Vetter J (2007) Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. Food Chem 102:6-9. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.037

Villas-Bôas SG, Esposito E, Mendonça MM (2003) Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*. World J Micro Biot 19:461-467.

Wacker M, Holick MF (2013) Sunlight and vitamin D. Dermato-Endocrinol 5:51-108. Doi: 10.4161/derm.24494

Walia M, Rawat K, Bhushan S, Padwad YS, Singh B (2014) Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. J Sci Food Agric 94:929-934. Doi: 10.1002/jsfa.6337

Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V. (2018) <http://www.zuckerverbaende.de/zuckermarkt/zahlen-und-fakten/zuckermarkt-deutschland/melasse.html>, eingesehen am: 13.7.2018, 10.37 Uhr

Williams CD, Oxon BM, Lond H (1935) Kwashiorkor: a Nutritional Disease of Children Associated With a Maize Diet. Lancet 1151-1152

Wittig M, Krings UK, Berger RG (2013) Single-run analysis of vitamin D photoproducts in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) after UV-B treatment. J Food Compos Anal 31:266-274. Doi: 10.1016/j.jfca.2013.05.017

World Wide Fund (WWF) (2016). Living Planet Report 2016. Risk and resilience in a new era. WWF International, Gland, Switzerland

Worrall JJ, Yang CS (1992). Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. Hort Science 27:1131–1133

Wu JZ, Cheung PCK, Wong KH, Huang NL (2004) Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. Food Chem 85:101-105. Doi: 10.1016/j.foodchem.2003.06.009

7 Anhang

7.1 Chromatogramme zum Aminosäureprofil von PSA ATD

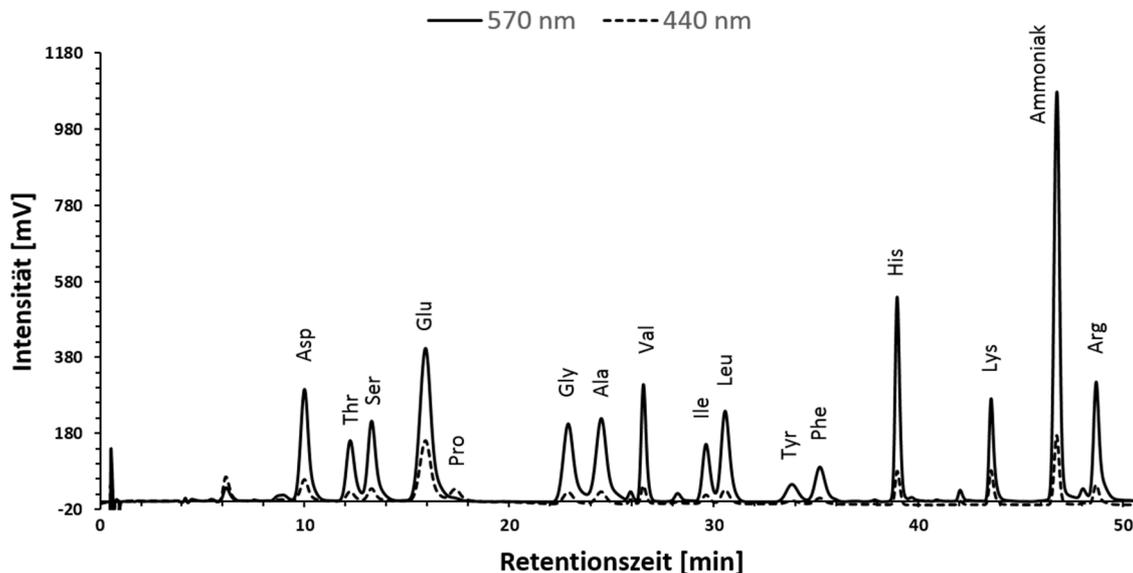


Abbildung 38: Chromatogramm zur Quantifizierung der Gesamtaminosäuren (570 nm) in PSA ATD (Schüttelkolben). Prolin wurde bei 440 nm quantifiziert.

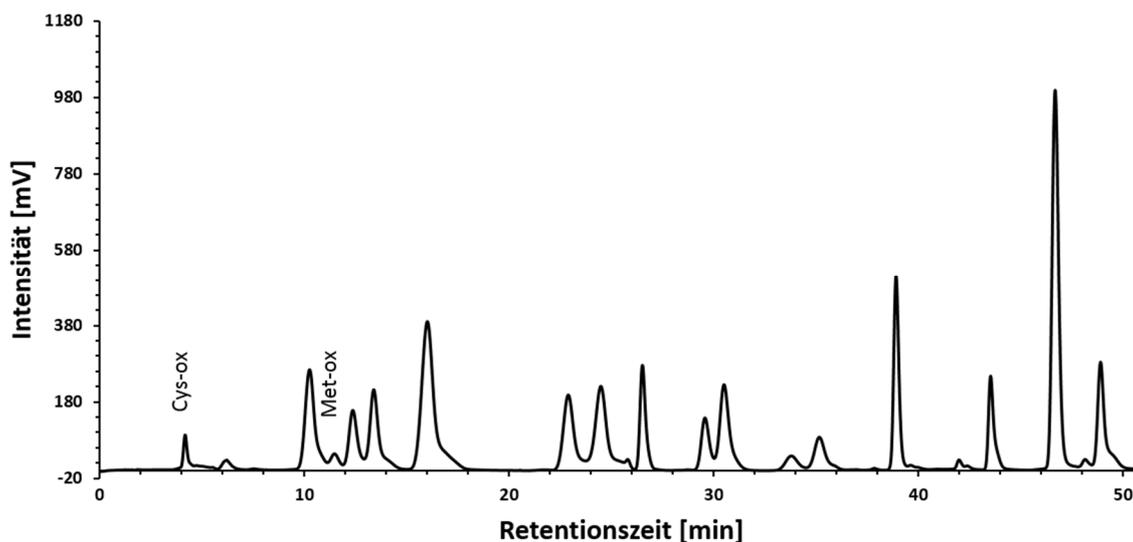


Abbildung 39: Chromatogramm zur Quantifizierung von Cystein und Methionin nach Oxidation in PSA ATD (Schüttelkolben) bei 570 nm.

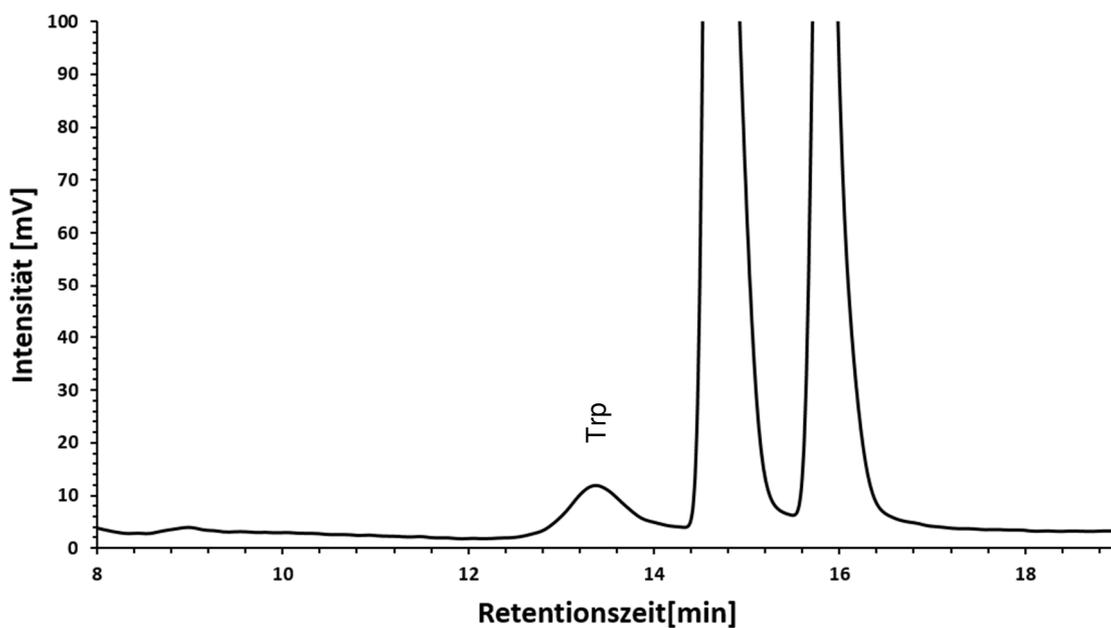


Abbildung 40: Chromatogramm zur Quantifizierung des Tryptophans in PSA ATD (Schüttelkolben) bei 570 nm.

7.2 Chromatogramme zum Aminosäureprofil von ATD

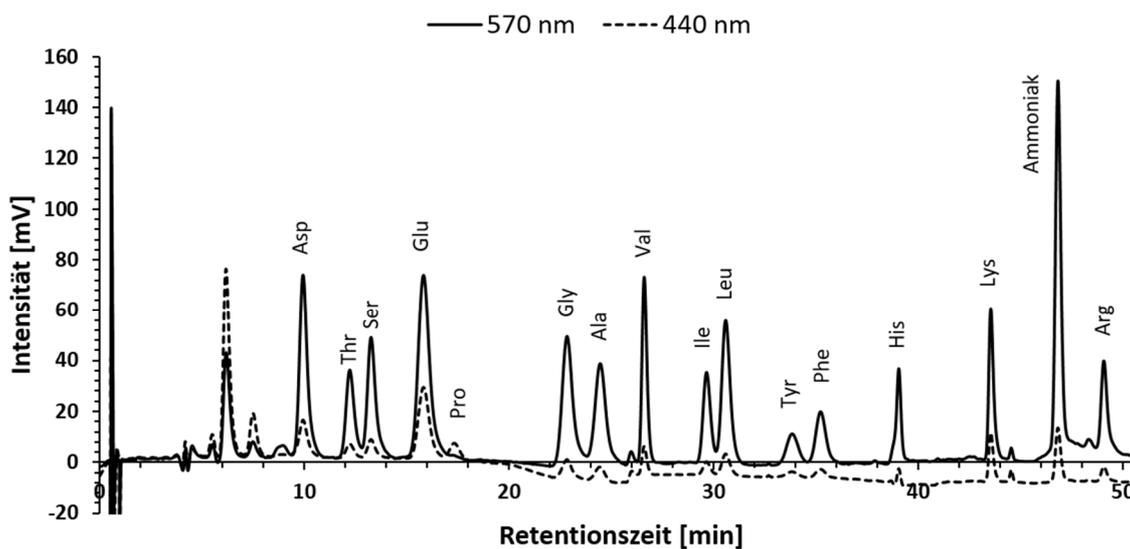


Abbildung 41: Chromatogramm zur Quantifizierung der Gesamtaminosäuren (570 nm) in ATD. Prolin wurde bei 440 nm quantifiziert.

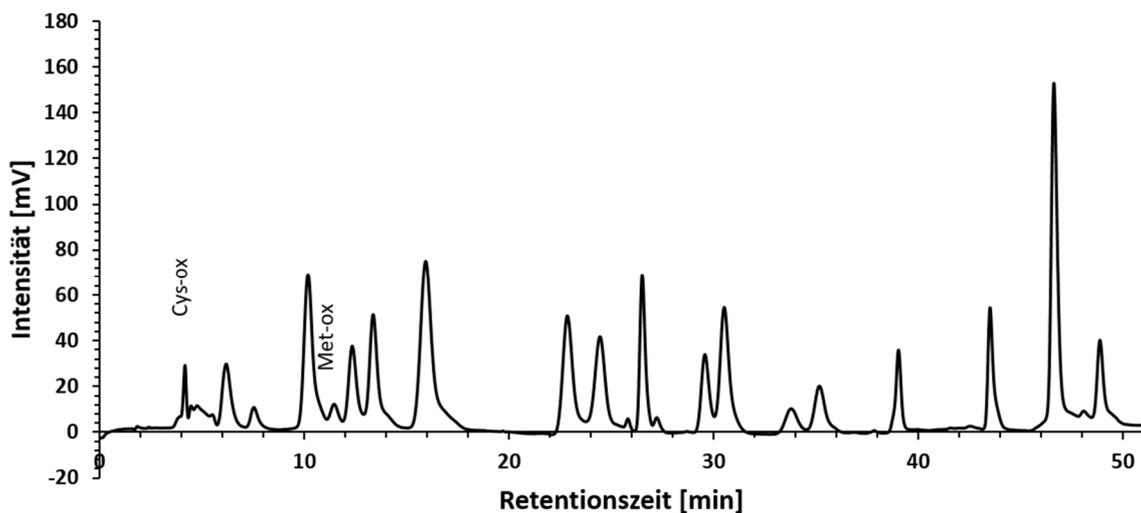


Abbildung 42: Chromatogramm zur Quantifizierung von Cystein und Methionin nach Oxidation in ATD bei 570 nm.

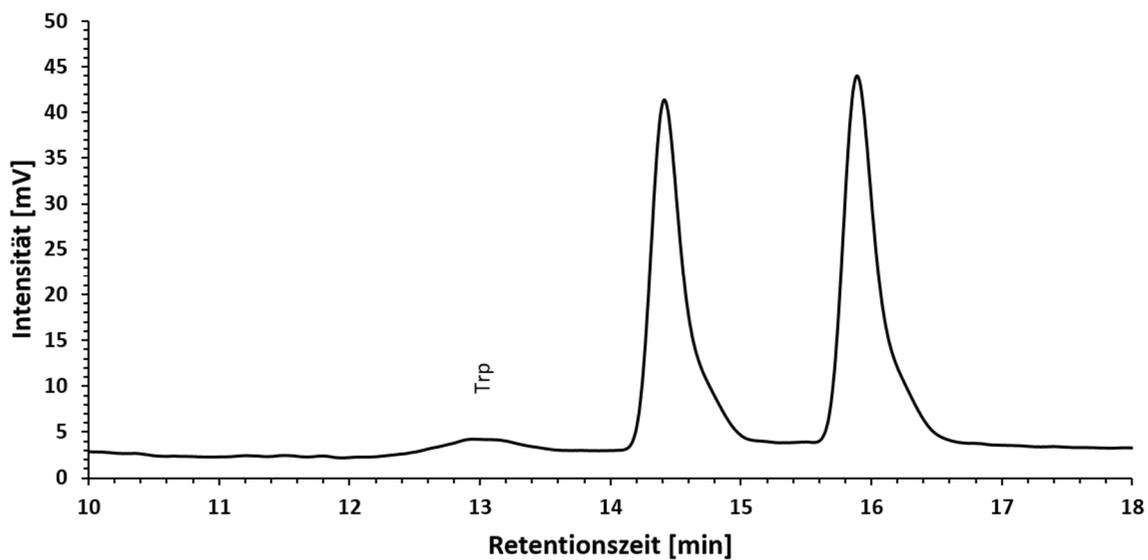


Abbildung 43: Chromatogramm zur Quantifizierung von Tryptophan in ATD bei 570 nm.

7.3 Chromatogramme zum Aminosäureprofil des Referenzproteins

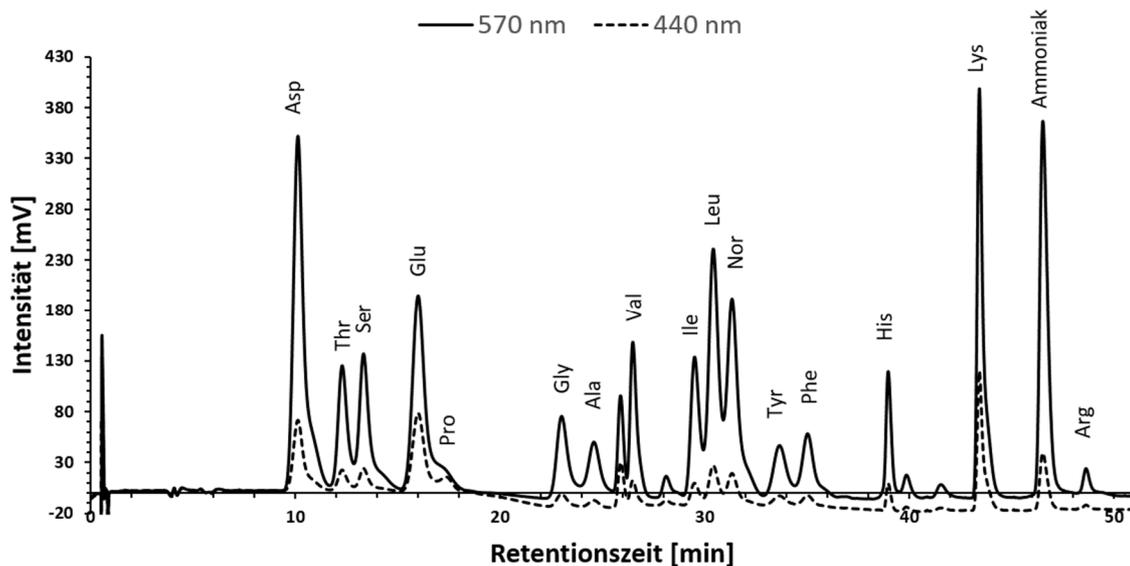


Abbildung 44: Chromatogramm zur Quantifizierung der Gesamtamino säuren (570 nm) des Referenzproteins Alpha-Lactalbumin. Prolin wurde bei 440 nm quantifiziert.

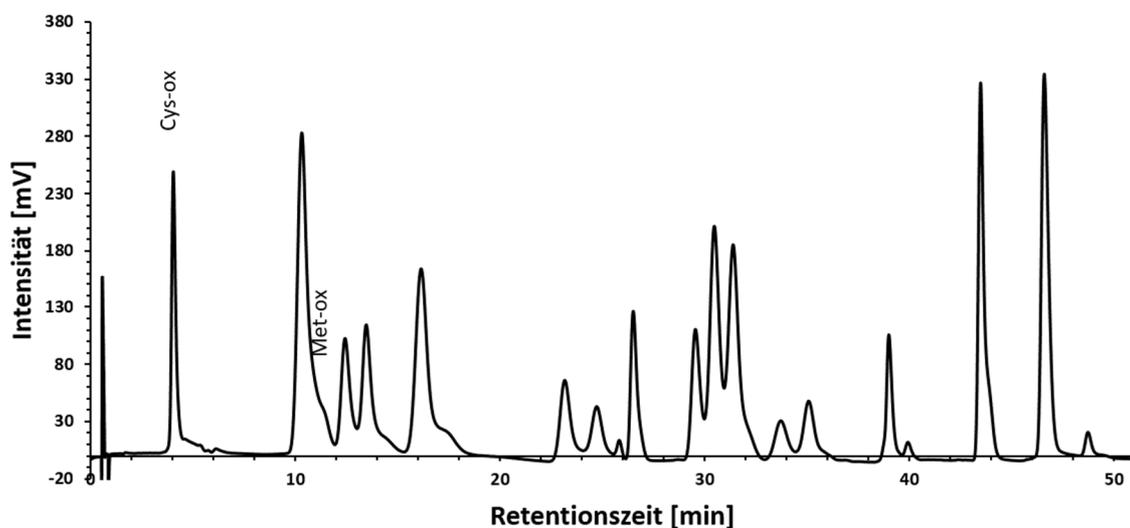


Abbildung 45: Chromatogramm zur Quantifizierung von Cystein und Methionin nach Oxidation des Referenzproteins Alpha-Lactalbumin bei 570 nm.

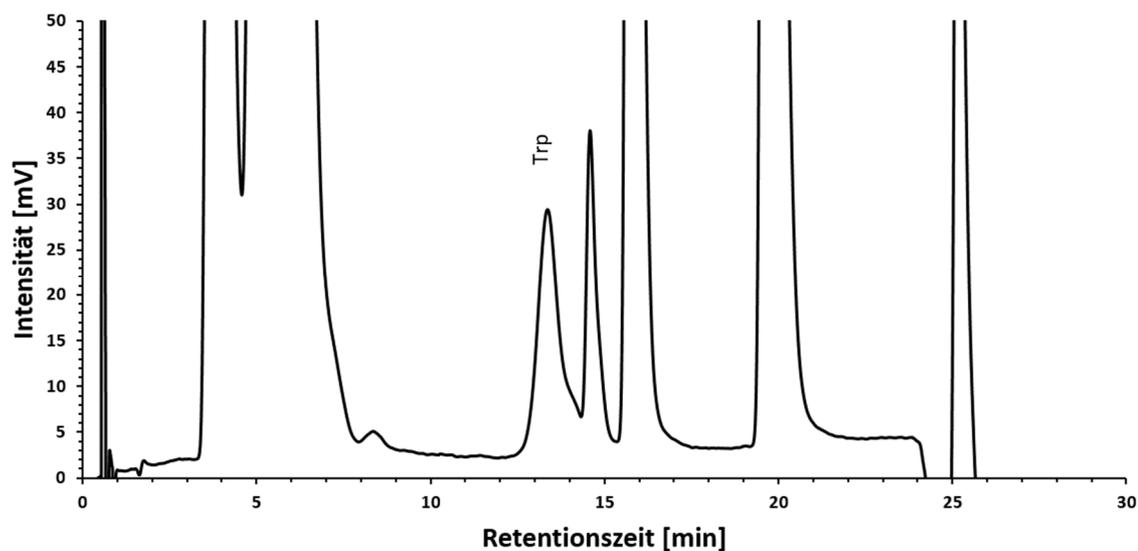


Abbildung 46: Chromatogramm zur Quantifizierung von Tryptophan im Referenzprotein Alpha-Lactalbumin bei 570 nm.

7.4 Chromatogramme zur Quantifizierung freier Aminosäuren

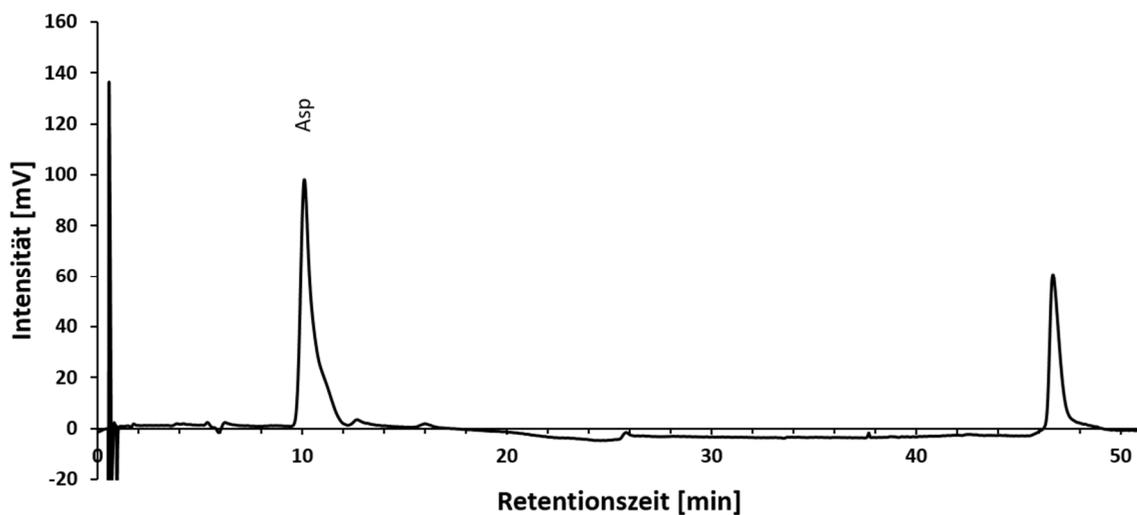


Abbildung 47: Chromatogramm einer 1:4 Verdünnung zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit $24,6 \text{ g L}^{-1}$ ATD und $6,24 \text{ g L}^{-1}$ Aspartat im Medium.

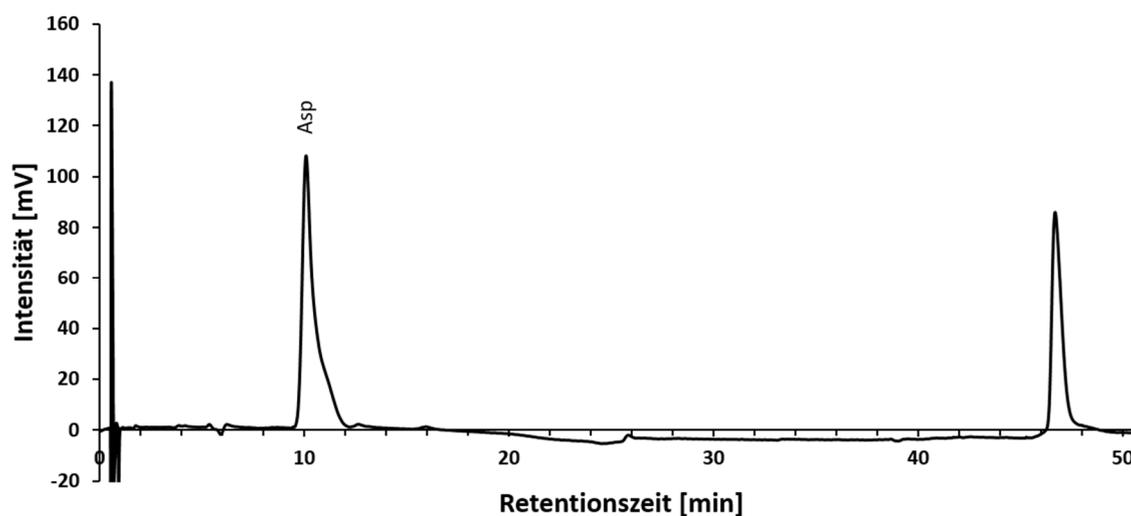


Abbildung 48: Chromatogramm einer 1:4 Verdünnung zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit $12,3 \text{ g L}^{-1}$ ATD und $6,24 \text{ g L}^{-1}$ Aspartat im Medium.

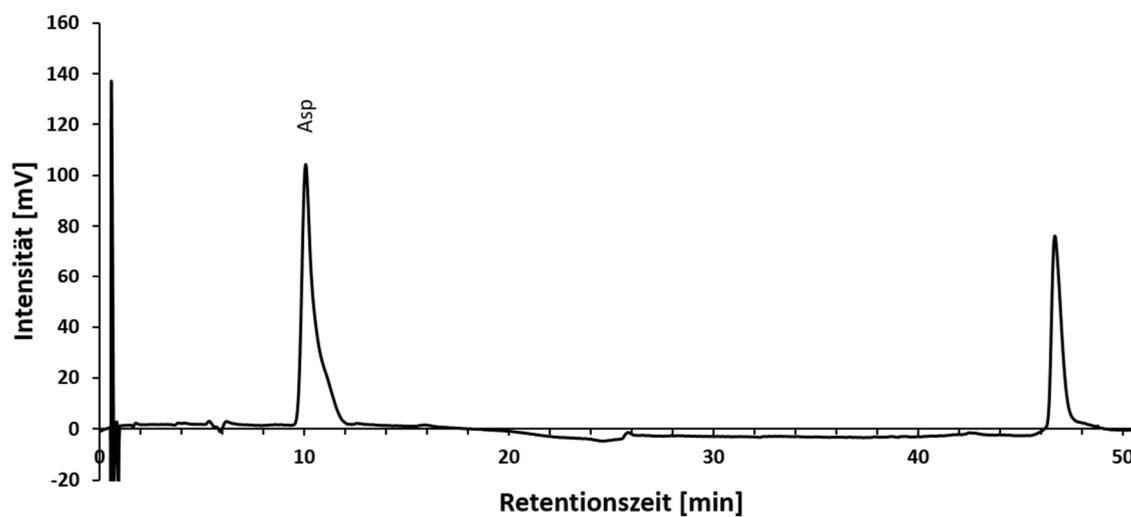


Abbildung 49: Chromatogramm einer 1:4 Verdünnung zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit $6,15 \text{ g L}^{-1}$ ATD und $6,24 \text{ g L}^{-1}$ Aspartat im Medium.

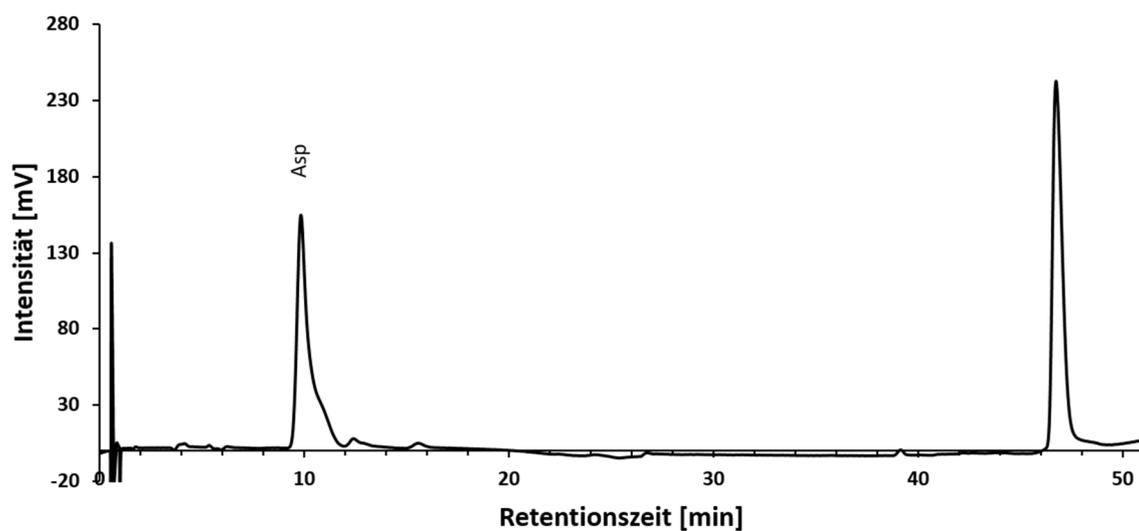


Abbildung 50: Chromatogramm zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit $24,6 \text{ g L}^{-1}$ ATD und $3,12 \text{ g L}^{-1}$ Aspartat im Medium.

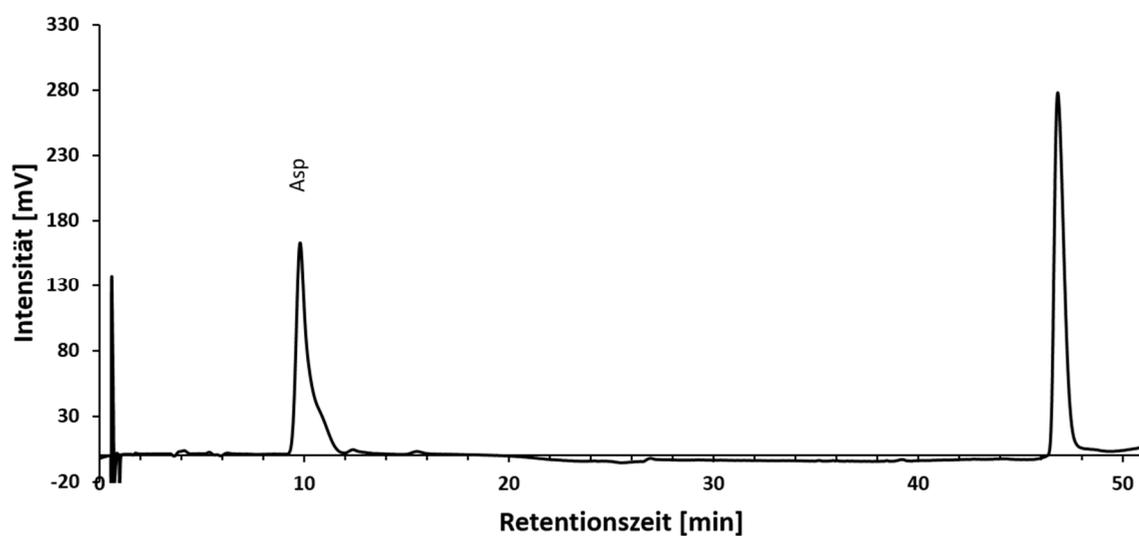


Abbildung 51: Chromatogramm zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit $12,3 \text{ g L}^{-1}$ ATD und $3,12 \text{ g L}^{-1}$ Aspartat im Medium.

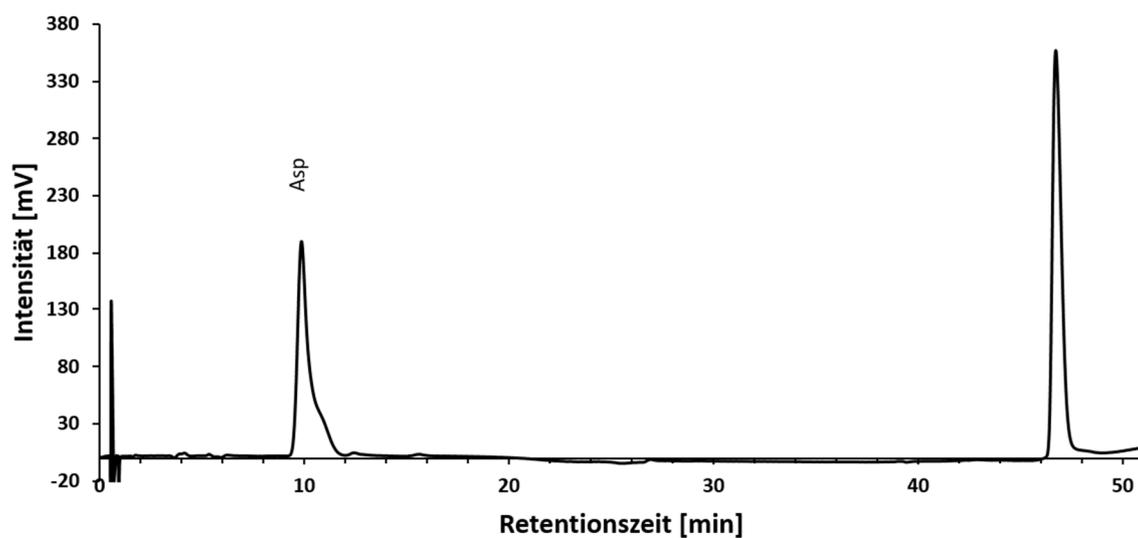


Abbildung 52: Chromatogramm zur Quantifizierung von Aspartat im Kulturüberstand von PSA ATD mit $6,15 \text{ g L}^{-1}$ ATD und $3,12 \text{ g L}^{-1}$ Aspartat im Medium.

7.5 Chromatogramme zur Bestimmung des Fettsäureprofils mittels GC-FID

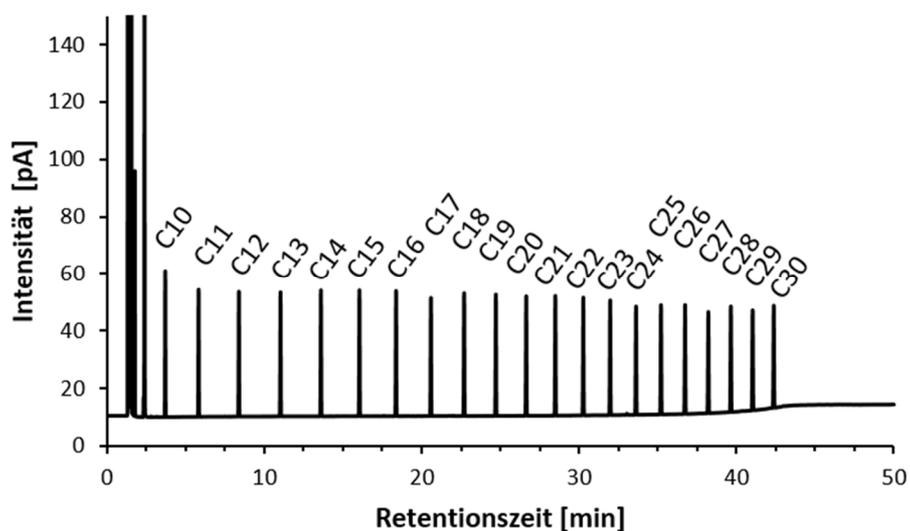


Abbildung 53: Alkanreihe (C10 bis C30).

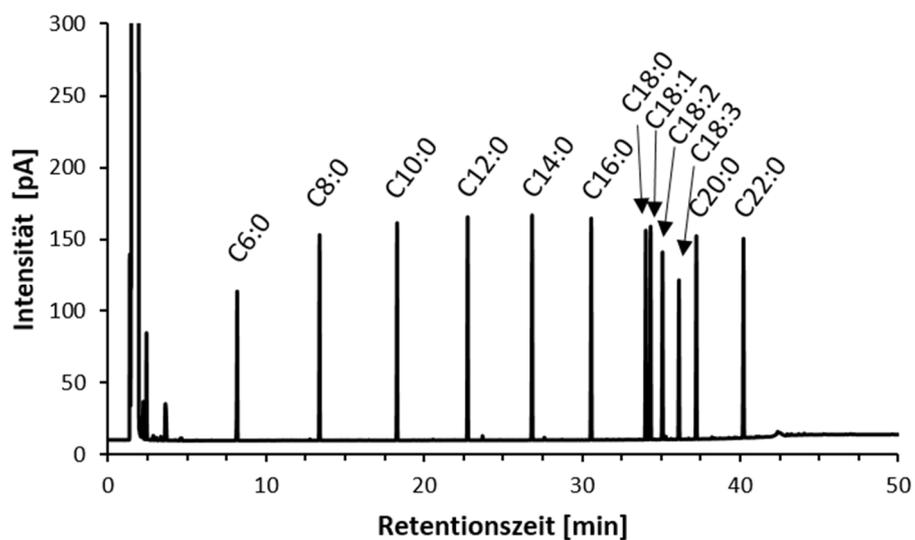


Abbildung 54: Fettsäuremethylester-Standard.

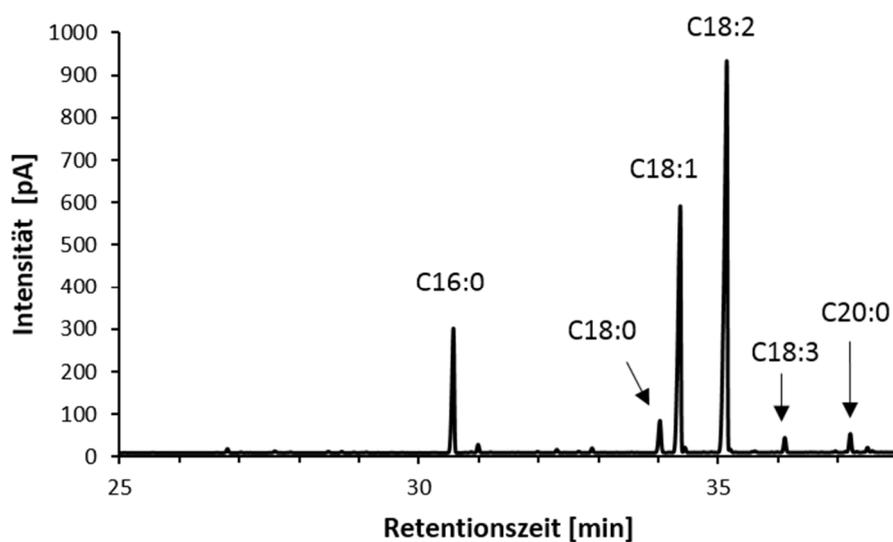


Abbildung 55: Fettsäureprofil von ATD.

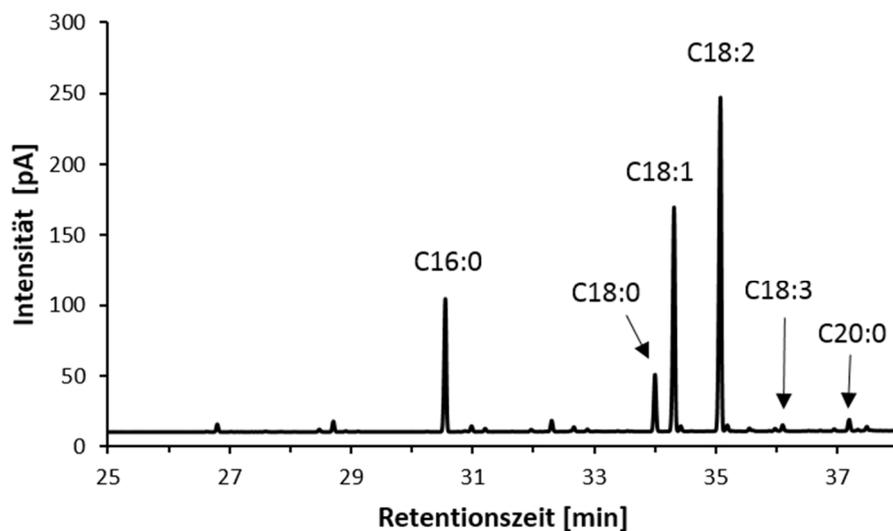


Abbildung 56: Fettsäureprofil von PSA ATD.

7.6 Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung mittels Ergosterol

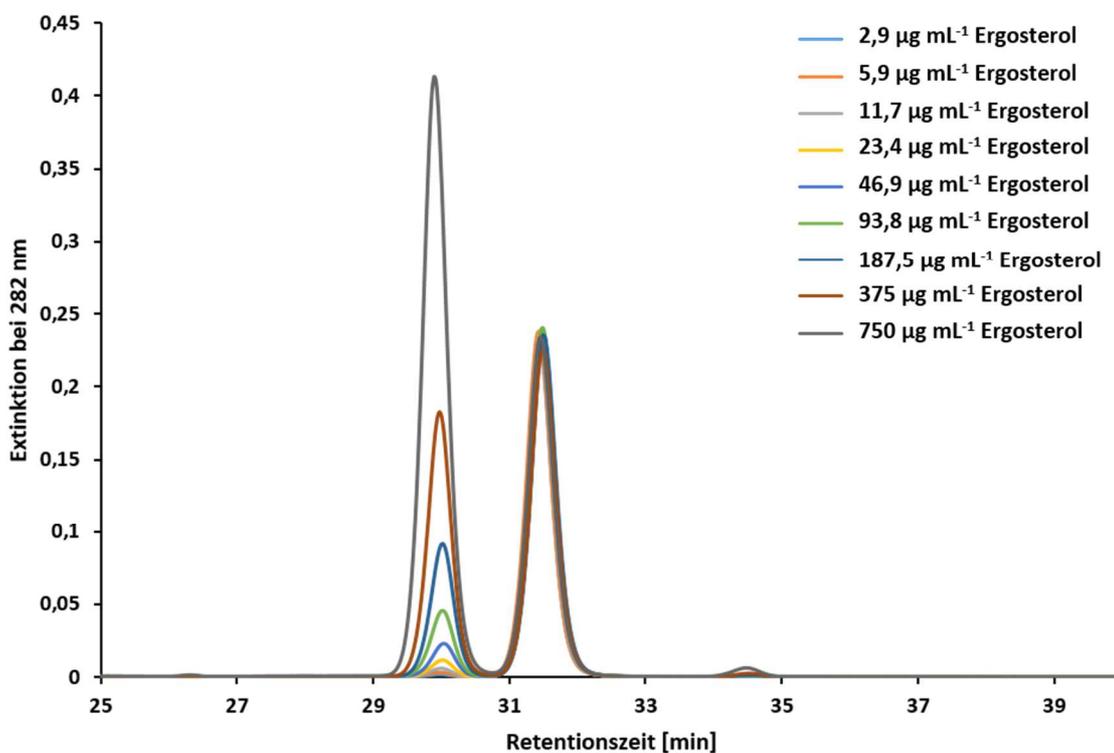


Abbildung 57: Ausschnitt übereinandergelegter Chromatogramme zur Kalibrierung des Ergosterols für die Biomassenquantifizierung. Mischstandard aus Ergosterol (2,9 – 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und 7-Dehydrocholesterol (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Retentionszeiten: 30,0 min Ergosterol, 31,5 min 7-DHC bei 282 nm.

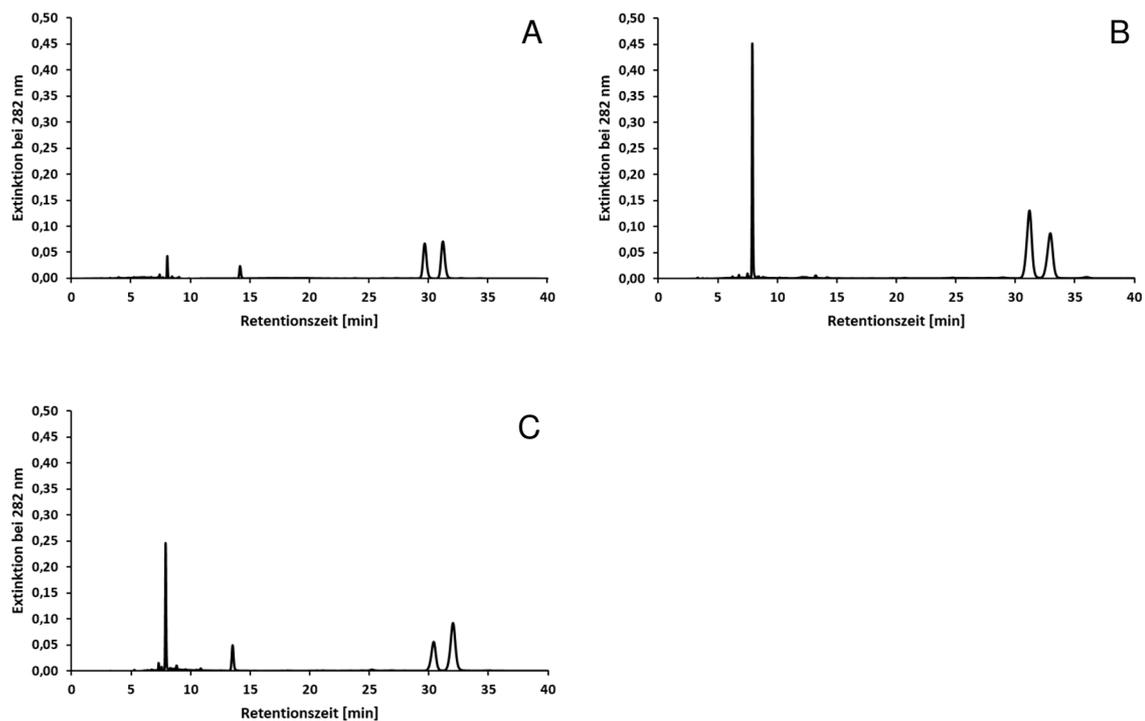


Abbildung 58: Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung über Ergosterol (Ermittlung des Bezugswertes, 3.12.1. A: PSA MEM, B: PSA M1, C: PSA ATD ausgekocht. Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.

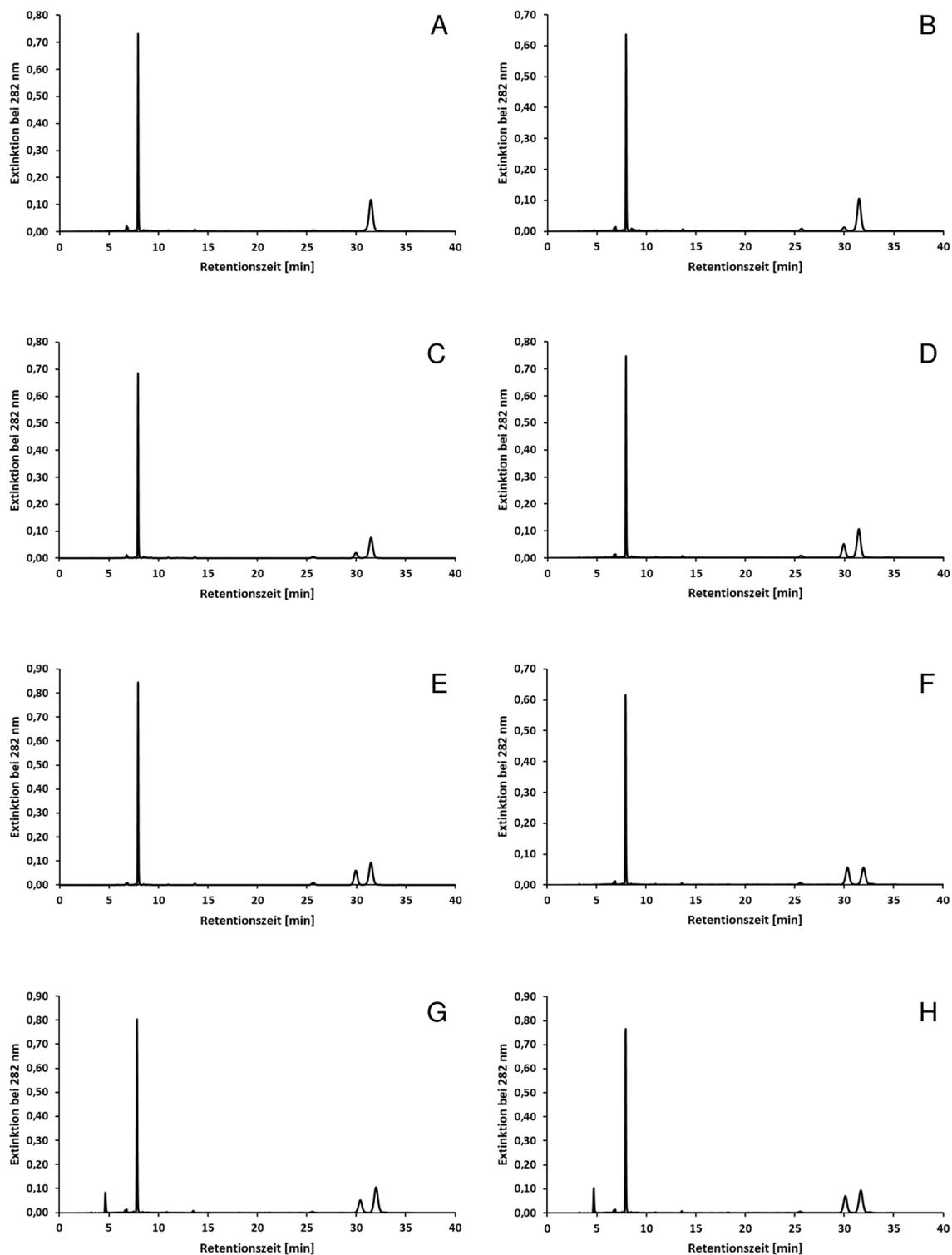


Abbildung 59: Chromatogramme zur Wachstumskurve von PSA ATD (3.12.2). A: Blindwert Medium, B: Tag 0, C: Tag 1, D: Tag 2, E: Tag 3, F: Tag 4, G: Tag 5, H: Tag 6. Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.

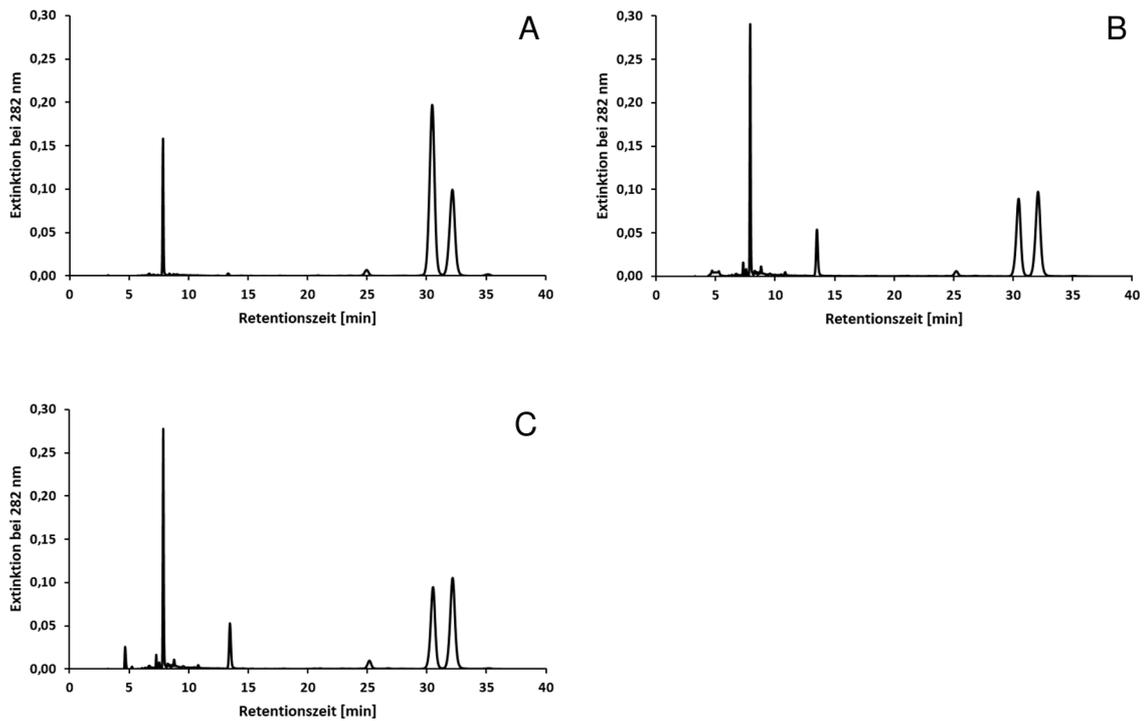


Abbildung 60: Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung von PSA ATD mit verschiedenen Apfeltresterkonzentrationen im Medium. A: $6,15 \text{ g L}^{-1}$, B: $12,3 \text{ g L}^{-1}$, C: $24,6 \text{ g L}^{-1}$. Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.

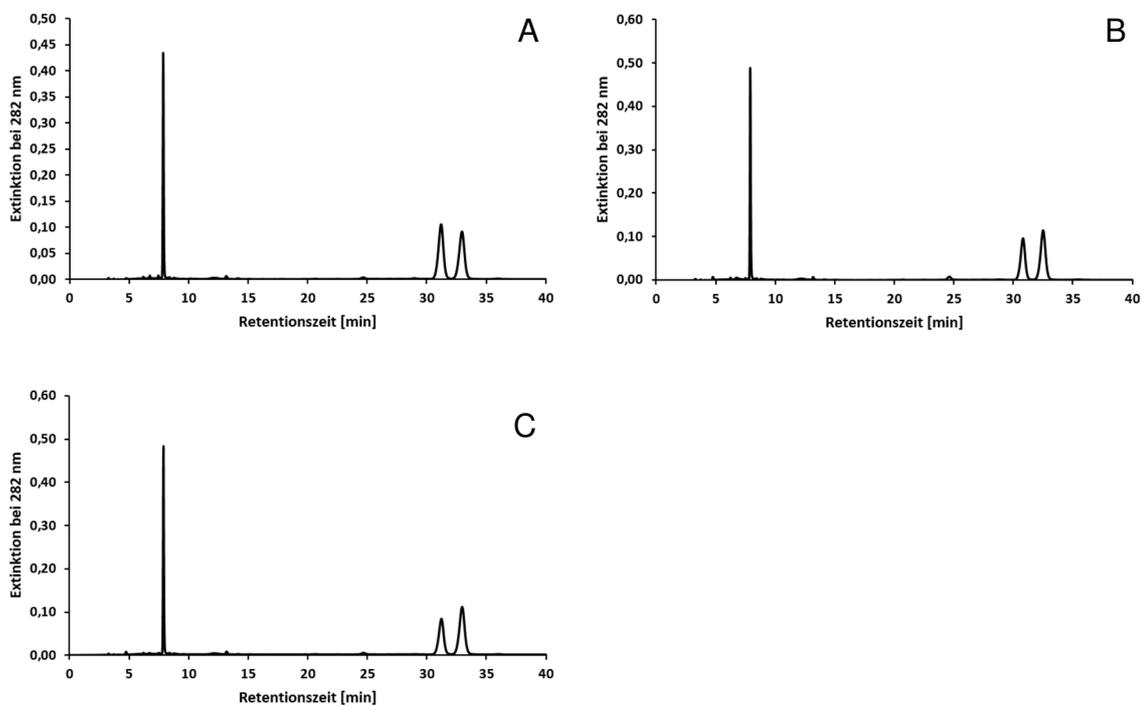


Abbildung 61: Chromatogramme zur Biomassenquantifizierung von PSA ATD mit 50% weniger Aspartat im Medium und verschiedenen Apfeltresterkonzentrationen. A: $6,15 \text{ g L}^{-1}$, B: $12,3 \text{ g L}^{-1}$, C: $24,6 \text{ g L}^{-1}$. Retentionszeiten: 30,5 min Ergosterol, 32,0 min 7-DHC bei 282 nm.

7.7 Chromatogramme zur Anreicherung von Vitamin D₂

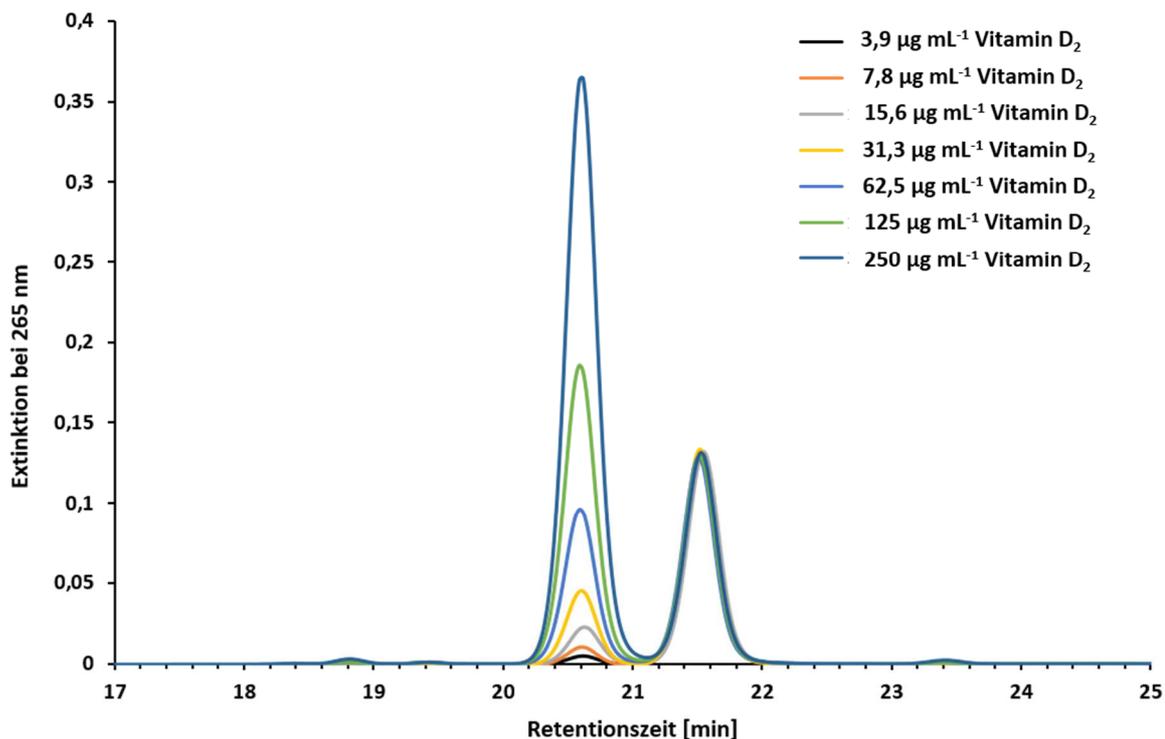


Abbildung 62: Ausschnitt übereinandergelegter Chromatogramme zur Kalibrierung des Vitamin D₂. Mischstandard aus Vitamin D₂ (3,9 – 250 µg mL⁻¹) und Vitamin D₃ (100 µg mL⁻¹). Retentionszeiten: 20,6 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃ bei 265 nm.

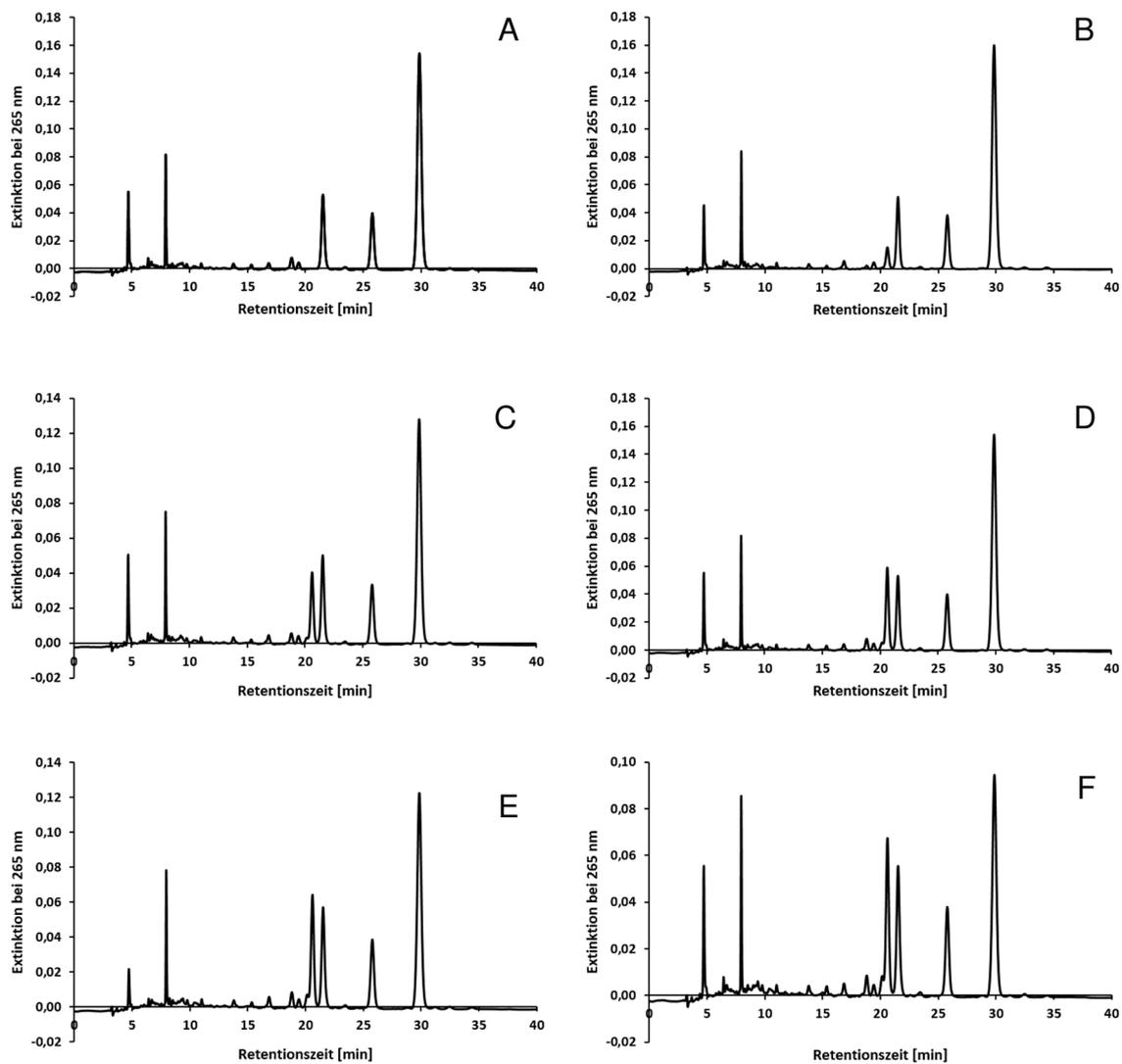


Abbildung 63: Chromatogramme belichteter PSA ATD Proben mit unterschiedlichen Belichtungszeiten: A: 0 min, B: 1 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 20 min, F: 45 min. Retentionszeiten: 20,6 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃ bei 265 nm.

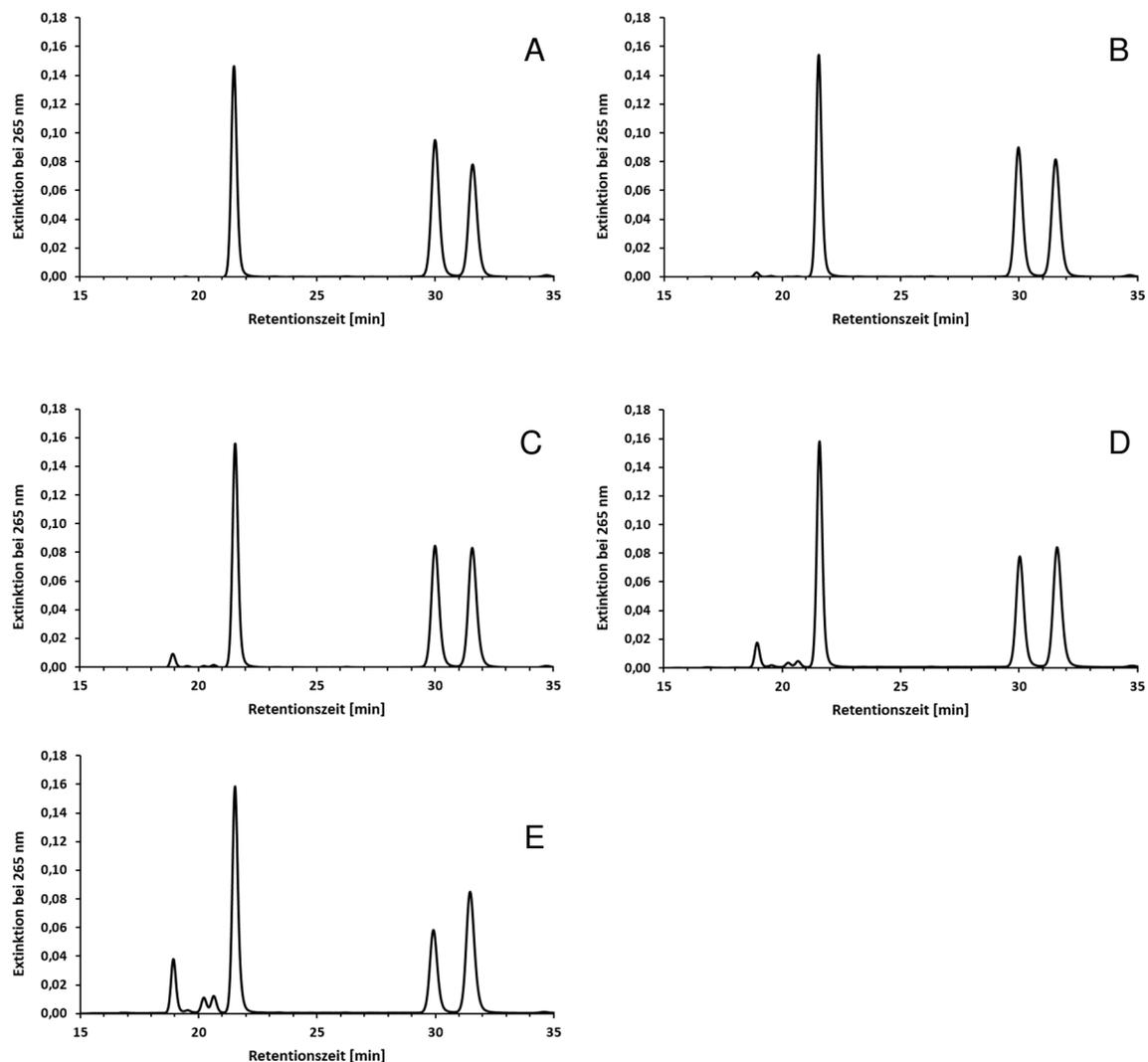


Abbildung 64: Ausschnitte von Chromatogrammen einer belichteten Ergosterolstandardlösung. A: 0 min, B: 1,5 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 30 min Belichtung. Retentionszeiten: 20,7 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃, 30,0 min Ergosterol, 31,5 min 7-DHC bei 265 nm.

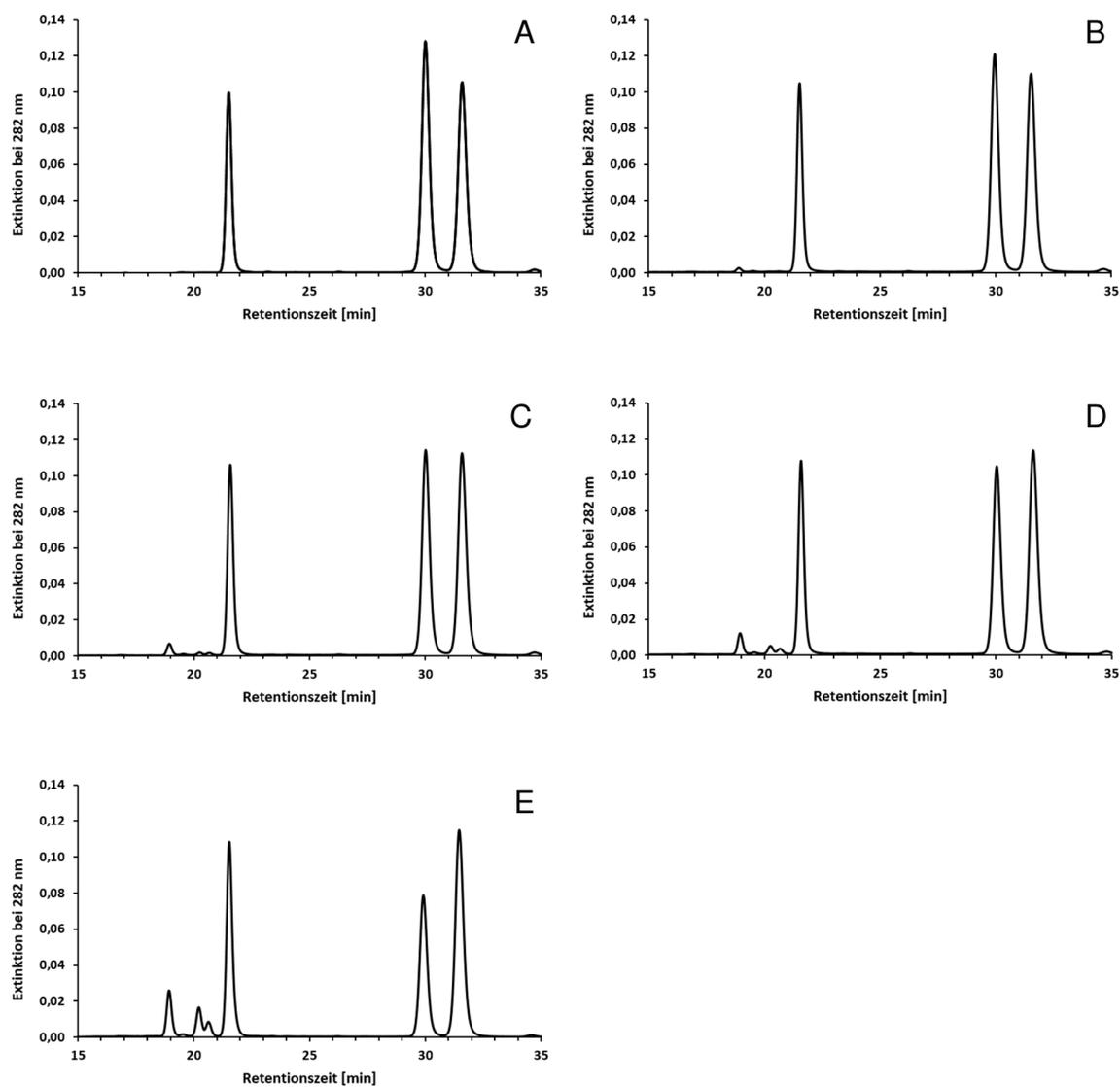


Abbildung 65: Ausschnitte von Chromatogrammen einer belichteten Ergosterolstandardlösung. A: 0 min, B: 1,5 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 30 min Belichtung. Retentionszeiten: 20,7 min Vitamin D₂, 21,5 min Vitamin D₃, 30,0 min Ergosterol, 31,5 min 7-DHC bei 282 nm.