

Abschlussberichtbericht: MykoMeat

Erzeugung Vitamin B₁₂ und Vitamin D₂ enthaltender Proteine nicht tierischen Ursprungs zur Herstellung nachhaltiger Lebensmittel und als Beitrag zur Reduktion von Intensivtierhaltung

**Gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt AZ
34451**

Projektbeginn: 01.04.2020

Projektlaufzeit: 35 Monate

Bettina Manns, Thomas Kirner

Hochschule Hamm-Lippstadt

Marker Allee 76-78

59063 Hamm

Danielle Rhen, Martin Frettlöh

Quh-Lab

Lebensmittelsicherheit

Siegener Str. 29

57080 Siegen

Gerrit Martens

Quality Food & Products GmbH

Hauptstraße 118

D-26188 Edeweicht



1 Projektkennblatt

der

Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Az	34451	Referat	Lebensmittel	Fördersumme	426.701 €
----	--------------	---------	---------------------	-------------	------------------

Antragstitel **MykoMeat – Erzeugung Vitamin B₁₂ und Vitamin D₂ enthaltender Proteine nicht tierischen Ursprungs zur Herstellung nachhaltiger Lebensmittel und als Beitrag zur Reduktion von Intensivtierhaltung**

Stichworte Vitaminhaltiges Fleischersatzprodukt, Proteinmasse, Pilze

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
35 Monate	01.04.2020	28.02.2023	

Zwischenberichte 1

Bewilligungsempfänger Hochschule Hamm-Lippstadt Marker Allee 76-78 59063 Hamm	Tel	BewillempfTelefon
	Fax	
	Projektleitung	
	BewillempfLeitung	
	Bearbeiter	
	BewillempfBearbeite	

Kooperationspartner Quh-Lab Lebensmittelsicherheit
Siegener Straße 29
57080 Siegen

Quality Food & Products GmbH
Oldenburger Str. 1a,
26160 Bad Zwischenahn

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Innerhalb des Projektes wurden Methoden zur Erzeugung Vitamin B₁₂ und Vitamin D₂ enthaltender Proteine nicht tierischen Ursprungs erforscht. Diese Proteine dienen als Baustein einer gesunden Ernährungsweise, z. B. in Fleischersatzprodukten. Die Forschungsergebnisse des Projektes tragen zu einer ressourcenschonenden Lebensmittelproduktion bei, indem alternative Nahrungsquellen erschlossen werden und dadurch die für die Fleischproduktion derzeit notwendige industrielle Nutztierhaltung reduziert wird. Durch eine Verringerung bzw. Vermeidung eines weiteren Ausbaus der Nutztierhaltung reduzieren sich auch die damit verbundenen Einflüsse auf die Umwelt, wie z. B. die Belastung der Böden und des Grundwassers durch

Gülle. Zur Herstellung dieser vitaminreichen Proteine werden zudem Reststoffe aus der Landwirtschaft eingesetzt, was ebenfalls zur Ressourcenschonung beiträgt. Basis des Prozesses sind Ständerpilze (Basidiomycota), die im Bioreaktor (agro-) industrielle Nebenströme (z.B. Obst und Gemüsetrester) fermentieren. Eine weitere Aufwertung erfolgt zum einen durch Behandlung des Pilzmyzels mit UV-Licht, um das in den Pilzen enthaltene Ergosterol in Vitamin D₂ umzuwandeln. Zum anderen führt die Fermentation von Cobalamin produzierenden Mikroorganismen zur Aufwertung des Produktes mit Vitamin B₁₂.

Im Labormaßstab ist das Verfahren bereits etabliert. Im Rahmen des hier durchgeführten Projektes soll ein „**Scale-up**“ inklusive **Optimierung des Systems** erfolgen. Es soll gewährleistet sein, dass hohe Mengen des Produktes erzeugt werden können, um den geschätzten Marktbedarf decken zu können.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Das Projekt gliedert sich in drei Teilprojekte:

- Fermentation großer Mengen einer Co-Kultur von Pilzen und Bakterien zur Herstellung einer Proteinrohmasse (Pilz/Bakterienprotein) für die Weiterverarbeitung zu einem Fleisch-/Wurstersatzprodukt
- Analyse des Pilz-/Bakterienproteins hinsichtlich enthaltener Vitamine, Geschmacksstoffe und mikrobiologischer Eigenschaften
- Erstellung von Rezepturen für unterschiedliche Fleischersatzprodukte auf Basis der protein- und vitaminhaltigen Pilz-/Bakterienmasse

Alle drei Teilprojekte beginnen zunächst mit einer Konzeptionsphase.

In einem ersten Schritt wurde das Konzept für den notwendigen Reaktor entworfen. Dabei wurde soweit möglich auf kommerziell erhältliche Reaktoren zurückgegriffen. Dazu wurden Fermentationen in kleineren Reaktoren durchgeführt. **Im zweiten Schritt** wird der Reaktor anhand verschiedener Pilz- und Bakterienkulturen evaluiert. Zunächst werden *Pleurotus cornucopiae* als Pilz und *L. reuteri* und Propionibakterium als Vitamin B₁₂ Produzenten eingesetzt. Bevorzugtes Substrat sollte Isomaltulose (Palatinose) sein. Es werden dabei Protokolle zur Prozessführung erarbeitet. **In einem dritten Schritt** erfolgt dann die Optimierung des Betriebsbereiches und Überprüfung der Stoffwechselprodukte mittels verschiedener Analyseverfahren. Dazu wird ein kompletter Testlauf von der Fermentation mit Pilzen einschließlich der UV-Belichtung zur Erzeugung von Vitamin D₂ und der Erzeugung von Vitamin B₁₂ durch Mikroorganismen durchgeführt. Das erhaltene Biomassepellet wird dann in ein Fleisch – oder Wurstersatzprodukt umgearbeitet.

Ergebnisse und Diskussion

Für sämtliche Fermentationsversuche an der HSHL wurde der Rillstilige Seitling (*Pleurotus cornucopiae*, Synonym: *Pleurotus sapidus*), ein Speisepilz aus der Abteilung der Basidiomycota verwendet. Bei Quh-Lab wurden zudem weitere Stämme und Substrate verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Feedstrategien gegenüber Batchverfahren nicht zu mehr Myzel trockenmasse führte. Deshalb wurde sich für die Myzelproduktion auf Batchverfahren konzentriert. Als optimales Fermentationsmedium hat sich eine Mischung aus den Reststoffen Zuckerrübenmelasse und Birtreber herausgestellt. Diese nicht glucosehaltigen Komponenten neigten zu sehr wenig Schaumbildung während der Batch-Fermentation. Dadurch konnte auf Antischaummittel verzichtet und der Sauerstoffeintrag während der Wachstumsphase des Pilzes gut dosiert werden. Die Ausbeuten an lyophilisierter Trockenmasse liegen je nach Prozessführung und Fermenter bei ca. 4,5 g l⁻¹ bis 10 g l⁻¹ und müssen noch weiter optimiert werden. Aus Kostengründen wurden alternative Stickstoffquellen für Hefeextrakte gesucht. Durch frische Hefe sowie Trockenhefe wurde eine ähnliche Pilzausbeute erreicht wie auch mit Birtreber. Für zukünftige Versuche und den Produktionsprozess kann daher der vergleichsweise teure Hefeextrakt durch die günstigeren Alternativprodukte ersetzt werden.

Mikrobiologische Kontaminationen des Fermentationsproduktes konnten mit den gängigen Analysemethoden der Quh-Lab nicht festgestellt werden, sodass das Myzel im Hinblick auf die mikrobiologische Beschaffenheit als unbedenklich einzustufen ist. Eine Prüfung der Produkthygiene mit den bisherigen Kultivierungsmethoden ist zum jetzigen Stand nicht nötig, da die bisherigen Ergebnisse auf eine saubere Arbeitsweise hindeuten.

Der Proteingehalt aus den Experimenten mit *Pleurotus sapidus* und einer Birtreber/Zuckerrübenmelasse-Mischung als Substrat ergaben mit ca. 40 % in der Trockenmasse und einem essentiellen Aminosäureindex (EAAi) von 97,86 und einer biologischen Wertigkeit von 94,97 die besten Werte für die Proteinausbeute und -qualität.

Quh-Lab hat sich für ein neues festes Substrat und ein neues flüssiges Substrat (beide Nebenströme aus der Zuckerindustrie) entschieden und die Zusammensetzung des Mediums insoweit optimiert, damit keine zusätzliche Stickstoffquelle benötigt wird. Das Medium wird als semifestes Substrat-Medium bezeichnet. Die Nährwertanalyse zeigte einen Proteingehalt von ca. 15 % in der Trockenmasse bei den Experimenten von Quh-Lab. Die Kultivierung mit dem neuen semifesten Substrat-Medium wurde erfolgreich auf 5 l- und 30 l-Maßstäbe durchgeführt.

Erste Prototypen des Endprodukts in Form von Fleischwurst, Würstchen und Burgerpatties wurden entwickelt und getestet. Für ein weiteres Scale-up wurde ein 195 l-Bioreaktor entwickelt, der sich noch in der Test- und Optimierungsphase befindet.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Jahr 2020

Das Projekt wurde im Rahmen der Bioeconomy Days 2020 (5.11. – 12.11.2020): Neue biotechnologische Prozesse und Verfahren Vom Startup bis zum etablierten Unternehmen!; Biotechnologie in der Lebensmittelproduktion vorgestellt (Bioeconomy Days Handout.pdf unter <https://www.hshl.de/forschung-unternehmen/forschungscluster/cluster-nachhaltige-entwicklung/themenfeld-biooekonomie/>). Weiterhin gab es einen Fernsehbericht in der Reihe Terra Xpress des ZDF (<https://www.zdf.de/wissen/terra-xpress/besser-essen-und-besser-leben-landwirte-im-stress-100.html>).

Jahr 2022

Onepager für die DBU: anschauliche Darstellung des MykoMeat Projektes für fachfremde Personen (erstellt am 18.08.2022)

Fazit

Die Fermentationsversuche verliefen erfolgreich. Die Ausbeute der Trockenmasse von ca. 4,5 g l⁻¹ bis 10 g l⁻¹ ist noch zu optimieren. Ein Betrieb ohne Schaumbildung ist möglich. Für den Vertrieb von Mykoproteinen als Lebensmittel ist wichtig, dass ein reproduzierbarer Prozess etabliert wird und alle dafür notwendigen Parameter genauestens erfasst werden. Außerdem müssen Qualitätskontrollen etabliert werden, die einerseits garantieren, dass keine Keime im so hergestellten Mykoprotein vorliegen und zum anderen auch keine Toxine unter den gegebenen Prozessbedingungen gebildet werden. Weiterhin sollte auch die Nährstoffzusammensetzung unter den gegebenen Bedingungen genau erfasst werden. Zur Beurteilung der Klimaneutralität für die Herstellung von Mykoprotein müsste ähnlich wie bei Quorn ein Klimabilanzierungsbericht erstellt werden (Carbon Trust 2022).

Für den weiteren Projektverlauf ist es daher von Bedeutung, das Aminosäureprofil genauer zu untersuchen. Aufgrund des hohen Fettgehaltes ist es ebenso interessant und bedeutsam, das Fettsäurespektrum des Pilzmyzels zu analysieren und somit Aussagen über die ernährungsphysiologische Qualität zu treffen. Ebenso ist es für das Nährwertprofil relevant, die erzielten Gehalte an den Vitaminen B₁₂ und D₂ im Pilzmyzel nach der durchgeführten Optimierung des Fermentationsprozesses zu bestimmen. Dies wird ebenfalls im weiteren Verlauf des Projektes durchgeführt. Weitere Schritte zur Einführung des Produkts ist -daher eine qualitätsgesicherte Produktion aufzubauen sowie Toxizitätsstudien durchzuführen und eine Zulassung nach der Novel Food Verordnung zu prüfen. Ein wesentliches Projektziel war die Erhöhung des Vitamingehalts durch Co-Kultivierung. Durch Co-Kultivierung mit den Bakterien *L. reuteri* und *P. freudenreichii* der Pilzmasse sollte der Vitamin B₁₂-Gehalt erhöht werden. Der Vitamin B₁₂-Gehalt wurde enzymatisch bestimmt. Es konnte bei den Kultivierungen allerdings keine Vitamin B₁₂ – Abgabe der Bakterien ins Medium gemessen werden. Im Überstand von *P. freudenreichii* war zwar Vitamin B₁₂ nachweisbar, jedoch in nicht signifikanten Mengen. Da auch eine Kultivierung ohne Pilzmasse in reinem Medium der Bakterien kein Vitamin B₁₂ nachweisbar war, wird der Abbau des Vitamins vermutet. Um die Co-Kultivierung zu optimieren müssten die Prozessparameter und vor allem das Medium noch angepasst werden. Spätere Versuche zeigen aber, dass eine sequentielle Kultivierung für einen Produktionsprozess besser geeignet sein dürfte. Messungen der Ergosterol- und Vitamin D₂ Mengen konnten innerhalb des Projektzeitraums nicht mehr durchgeführt werden. Damit ist zusammenfassend zu sagen, dass zwar eine gute Proteinausbeute bei sehr guter Proteinqualität erreicht werden konnte, jedoch keine Vitaminerhöhung durch Co-Kultivierung.

2 Inhaltsverzeichnis

1	Projektkennblatt.....	2
	Jahr 2020.....	1
	Jahr 2022.....	1
2	Inhaltsverzeichnis.....	2
3	Abbildungsverzeichnis.....	4
4	Tabellenverzeichnis.....	5
5	Abkürzungsverzeichnis.....	6
6	Kurzfassung des Abschlussberichtes.....	0
7	Einführung/ Motivation:.....	0
8	Methodik/Vorgehensweise/Projekttablauf.....	3
8.1	Phase 1 Vorbereitungs- und Konzeptphase - Arbeitspaket 1.....	3
8.1.1	Erstellung eines Konzepts zur Übertragung der Pilz/Bakterien vom Labormaßstab bis hin zu 40 l- bis 50 l-Fermentern. (HSHL und Quh-Lab).....	3
8.1.2	Erfassung der notwendigen technischen Bedingungen (HSHL).....	4
8.1.3	Zusammenstellung der benötigten Mengen an Medium, Substrat, Bakterien, Pilzvorkulturen (Quh-Lab).....	6
8.1.4	Konzeption des Betriebs unter Berücksichtigung steriler Bedingungen und gleichmäßiger Temperierung ohne Temperaturgradient (HSHL).....	7
8.1.5	Betrieb unter Sterilbedingungen.....	7
8.1.6	Konzept zum Betrieb mit regelbarer Sauerstoffzufuhr und Temperaturregelung (Anfangsphase unter aeroben Bedingungen, dann Umstellung auf aerobe Bedingungen im weiteren Verlauf nach Bakterienzugabe kombiniert mit Temperaturshift).....	8
8.1.7	Zusammenstellung, Beschaffung und Vortestung der benötigten Sensoren, wie Sensoren für pH, Sauerstoff, Temperaturregelung.....	8
8.1.8	Alternative Stickstoffquellen (Quh-Lab).....	9
8.1.9	Erstellung eines Konzeptes zur Herstellung von unterschiedlichen Fleisch- und Wurstersatzprodukten (Quality Foods and Products, QFP).....	10
8.1.10	Meilenstein 1.....	11
8.2	Phase 2: Entwicklungs- und Produktionsphase: Arbeitspaket 2.....	11
8.2.1	Entwicklung der Co-Kultur im 40 l- bis 50 l-Fermenter (HSHL, Quh-Lab).....	11
8.2.2	Nährwertanalytik (<i>Pleurotus sapidus</i>).....	27
8.2.3	Evaluation des 195 l-Bioreaktors.....	31
8.2.4	Kultivierungsversuche im 5 l-Fermenter mit flüssigem Substrat.....	40
8.2.5	Neues semifest-Substrat-Medium (Quh-Lab).....	41

8.2.6	Kultivierung im 5 l-Reaktor mit semifest-Substrat-Medium.....	43
8.2.7	Kultivierung im 30 l-Fermenter mit semifest-Substrat-Medium	49
8.2.8	Co-Kultivierung mit semifest-Substrat-Medium	55
8.2.9	Herstellung von Rezepturen für die Weiterverarbeitung der Rohproteinmasse (QFP) ..	57
8.2.10	Prototypen des Endprodukts.....	58
8.2.11	Meilenstein 2: Vorlage eines evaluierten Reaktors als Demonstratorversion	58
9	Projektergebnisse.....	59
10	Öffentlichkeitsarbeit.....	61
10.1	Jahr 2020.....	61
10.2	Jahr 2022.....	61
11	Fazit/Ausblick.....	61
	Literaturverzeichnis.....	62
12	Anhang.....	64
12.1	Detailliertes Anforderungsprofil für den 50 l (später 195 l)-Reaktor.....	64

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Planetary Health Diet (PHD)	1
Abbildung 2: Prozessschritte für das Scale-up: I) submerse, aerobe Fermentation eines Basidiomycota-Pilzes mit einem kohlenhydrathaltigen (agro-) industriellen Nebenstrom; II) anoxische Co-Kultivierung von Speisepilz und Bakterium, dass Vitamin B ₁₂ und Glutamat produziert; III) Separation von Myzel und Filtrat und anschließende Wärmebehandlung des Myzels; IV) UVB-Bestrahlung des Myzels zwecks Umwandlung von Ergosterol zu Vitamin D ₂	4
Abbildung 3: Prozessschritte der Co-Kultivierung von Pilzen und Bakterium.....	5
Abbildung 4: Pilzmyzel-Trockenmassen in [g/l] nach 6 Tagen Inkubation im Schüttelkolben; Verwendung verschiedener Stickstoffquellen in M2-Medium.....	10
Abbildung 5: Rillstieliger Seitling (<i>Pleurotus cornucopiae</i>).	12
Abbildung 6: Plattenkultur von <i>Pleurotus sapidus</i>	13
Abbildung 7: Vorkultur auf Malzextraktmedium; links: geschüttelt bei 150 rpm; rechts: gerührt bei 300 rpm.	16
Abbildung 8: links: Vorkultur auf Magnetrührplatten; rechts: DIY-Dunkelkammer	16
Abbildung 9: Hauptkultur in Erlenmeyerkolben	17
Abbildung 10: Minifors 2 (Infors) Fermenter im Betriebszustand.....	17
Abbildung 11: Fermentationsprozess ohne Schaumbildung	19
Abbildung 12: Fermentation mit Inokulationstechnik	20
Abbildung 13: Filtrieren und trocknen der Myzelmasse	21
Abbildung 14: Nasse und getrocknete Myzelmasse	22
Abbildung 15: Fermentation im 2 l-Reaktor. Die blaue Kurve zeigt den Sauerstoffpartialdruck. Die grüne Kurve die Säurezufuhr, die lila Kurve stellt die Luftzufuhr in den Reaktor dar.	23
Abbildung 16: 2 l-Fermentation mit dem Nährmedium BT30ZRM50 kurz vor Ernte des Produkts.....	24
Abbildung 17: Positionierung und Bestrahlung der Myzelproben im UV-Kabinett.....	26
Abbildung 18: Elektrostatisch aufgeladene Myzelprobe in Petrischale	26
Abbildung 19: Vergleich von nicht-oxidierten und oxidierten Hydrolysaten der Pilzmyzelproben (orange: nichtoxidiert, blau: oxidiert).....	30
Abbildung 20: Technische Skizze des 195 l-Bioreaktors mit Kran.....	32
Abbildung 21: Schematische Zeichnung des Bioreaktors mit den wichtigsten Komponenten	32
Abbildung 22: Technische Zeichnung der Rührwelle mit Rührblättern und Antrieb.....	33
Abbildung 23: 195 Liter - Fermenter.....	34
Abbildung 24: Zuluftstrecke über Filtereinrichtung und Lufzufuhrregulator.....	35
Abbildung 25: Bedienpanel mit Steuerungssoftware	35
Abbildung 26: Kalibrierung des Reaktorfüllstands [cm] zu Kulturvolumen [L]. Links: kompletter Fermenter, rechts: bis zu 25 l-Kulturvolumen.....	36
Abbildung 27: Anschluss des Dampfsterilisators über das Probenahmeventil.....	37
Abbildung 28: Abluftstrecke durch Flaschen, die wie folgt befüllt waren: 1 leer, 2 1 mol/l H ₂ SO ₄ 3 VE-Wasser, 4 leer.....	38
Abbildung 29: Abluftstrecke im Eisbad.....	38
Abbildung 30: Probe nach 48 h Kultivierung. Links auf LB-Agar und rechts Flüssigprobe unter dem Mikroskop.	40
Abbildung 31: Inokulierter 5 l-Bioreaktor vor dem Start der Inkubation.....	41
Abbildung 32: Prozessablauf zur Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> auf flüssigem Substrat im 5 l-Bioreaktor.	41

Abbildung 33: Fruchtkörpereinsätze zweiter Pilzstämmen, die jeweils über 2,5 Monate kultiviert wurden.....	42
Abbildung 34: A Fruchtkörper von Stamm 1 vor der Ernte; B Unterseite/Lamellen des Fruchtkörpers von Stamm 1 nach der Ernte; C Isolierte Sporen unter dem Mikroskop betrachtet (Vergrößerung 400x)	43
Abbildung 35: Unterseite/Lamellen des Fruchtkörpers von Stamm 2 nach der Ernte; B Isolierte Sporen von Stamm 2 unter dem Mikroskop betrachtet (Vergrößerung 400x)	43
Abbildung 36: 5 l-Reaktor beim Abkühlen nach der Sterilisierung im Autoklaven.	44
Abbildung 37: 5 l-Reaktor nach einem erfolgreichen Fermentationslauf mit Stamm 1	45
Abbildung 38: Schaumbildung während des Fermentationlaufs.....	46
Abbildung 39: Ein Fermentationslauf im 5 l-Reaktor ohne Antischaummittel führte zu Myzelwachstum in der Peripherie.....	46
Abbildung 40: Proteingehalt von Stamm 2 über eine Kultivierungsdauer von 10 Tagen.	47
Abbildung 41: Kultivierung von Stamm 2. Darstellung von Proteingehalt und Trockenmasse	48
Abbildung 42: links der Behälter des 30 l-Reaktors (vorne) - belichtete Schaufenster, Anschlüsse der pH und pO ₂ Sonden; rechts die obere Hälfte des 30 l-Reaktors - Abluft, Ventile, Druckmessung, Anschluss der Sonde für Erkennung der Schaumhöhe, Peristaltikpumpen.....	49
Abbildung 43: Schaumbildung im 30 l-Reaktor. Links sind Luftzufuhr und Rührwerk ausgeschaltet. Rechts sind beide in Betrieb.	51
Abbildung 44: links: frühe geerntete Myzelmasse aus dem 30 l-Reaktor (Stamm 1), ca. 4 kg; rechts; ein Bild derselben geernteten Myzelmasse beim Abtropfen durch ein Muslintuch....	52
Abbildung 45: Auslaufventil des 30 l-Fermenters.....	52
Abbildung 46: Wachstum des Myzels nach einem 5-tägigen Fermentationslauf.....	53
Abbildung 47: Ablassventil rot gekennzeichnet. Kontaminationsquelle ist Lila markiert.	54
Abbildung 48: 30 l-Fermenter befüllt mit LB-Medium nach 10 Tagen Standzeit und Dampfsterilisation des Ablassventils.....	54
Abbildung 49: Myzel nach Optimierung des Prozesses.....	55
Abbildung 50: Myzelmasse nach der Entwässerung durch Abtropfen/Pressen durch ein Muslintuch.....	55
Abbildung 51: P. freudenreichii und L. reuteri in semifest-Substrat-Medium.....	56
Abbildung 52: Myzelbasierter veganer Burgerpatty und Würstchen von QFP in der Bratpfanne bei Quh-Lab.....	58
Abbildung 53: Schema des Scale-ups für den 30 l-Fermenter.....	59
Abbildung 54: Wöchentlicher Ablaufplan der Fermentation im 30 l-Fermenter.....	59

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 D-A-CH Referenzwerte für die tägliche Nährstoffzufuhr bei Erwachsenen im Alter von 19 und 65 Jahre.....	2
Tabelle 2: Sensoren für den 195 l-Reaktor	8
Tabelle 3: Zusammensetzung des Plattenmediums: Malzextrakt-Agarplatte (MEA)	13
Tabelle 4: Zusammensetzung des Vorkulturmediums: Malzextrakt-Medium (MEM).....	14
Tabelle 5: Zusammensetzung von Nährmedium M2	14
Tabelle 6: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SE1	14
Tabelle 7: Zusammensetzung des Fertigmediums Vitamin B ₁₂ Assay Medium (Merck)	14
Tabelle 8: Menge der Myzelproben und Belichtungsdauer im UV-Kabinett.....	25
Tabelle 9: Ergebnisse der Nährwertanalyse bezogen auf die Feuchtmasse des frischen Pilzmyzels	27

Tabelle 10: Analyseergebnisse der Proteinbestimmung.....	28
Tabelle 11: Aminosäureprofil durch die Universität Parma ermittelt.	28
Tabelle 12: Aminosäureprofil an der HSHL analysiert.	29
Tabelle 13: Aminosäureprofil des Referenzproteins der WHO (1985).....	30
Tabelle 14: Zusammensetzung der Nährmedien und der Salzlösung für die 195 l-Fermentation.....	39
Tabelle 15: Ergebnisse der Trockenmassebestimmung nach Gefriertrocknung und der mittels Kjeldahl bestimmten Proteingehalte (Umrechnungsfaktor: 5,90); Stamm 1, 7-tägige Kultivierung auf semifestes-Substrat-Medium bei 24 °C, pH6 und 170 rpm Rührgeschwindigkeit.....	47
Tabelle 16 Ergebnisse der Kohlenhydrat-Bestimmung mittels Orcinol-Schwefelsäure-Methode.....	48
Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung der Kulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten.	50
Tabelle 18: Proteingehalte und Trockenmasse von den ersten zwei Fermenterläufen im 30 l-Bioreaktor.....	51
Tabelle 19: Versuchsansatz zur Überprüfung des Vitamin B ₁₂ -Gehalts.....	57

5 Abkürzungsverzeichnis

AS.....	Aminosäure
BT.....	Biertreber
BW.....	Biologische Wertigkeit
C-Quellen	Kohlenstoff-Quellen
deion.....	deionisiert
dest.....	destilliertes
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAAI.....	Essentieller Aminosäure Index
EHEDG.....	European Hygienic Engineering Design Group
ELISA.....	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
GRAS.....	Generally-Regarded-As-Safe
HK.....	Hauptkultur/Hauptkultivierung
HPLC.....	High-Performance-Liquid-Chromatographie
HSHL.....	Hochschule Hamm-Lippstadt
LB-Agar.....	Lysogeny Broth Agar
MEA.....	Malzextrakt-Agarplatten
MEM.....	Malzextrakt Medium
N _{ges}	Gesamtstickstoff
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PP.....	Polypropylen
PSA.....	Pleurotus sapidus
QFP.....	Quality Foods and Products
RNA.....	Ribonucleic Acid
RT.....	Raumtemperatur
UV.....	Ultra Violett
UVB.....	Ultraviolettstrahlung 280 bis 315 nm
VE-Wasser.....	Vollentsalztes Wasser
VK.....	Vorkulturen
VRBG.....	Violet Red Bile Glucose Agar (Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar)
vvm.....	Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium
YGC.....	Yeast Glucose Chloramphenicol
ZRM.....	Zuckerrübenmelasse (=BETApur-Melasse)

6 Kurzfassung des Abschlussberichtes

Ziel des Projektes MykoMeat war es einen Bioprozess zu etablieren mit dem sich ein Vitamin D₂ und Vitamin B₁₂ haltiges proteinreiches Pilzmyzelprodukt in größerem Maßstab erzeugen lässt. Die daraus erhaltene Proteinrohmasse soll als Ausgangsprodukt für Nahrungsmittelalternativen zu reinen Fleischprodukten dienen. Der Gesamtprozess soll möglichst nachhaltig und ressourcenschonend geführt werden, weshalb als Substrate Agrarnebenströme vorgesehen sind. Im Labormaßstab wurde ein solches Verfahren bereits in Schüttelkolben etabliert und sollte innerhalb dieses Projektes auf einen 30 l- bis 50 l- Fermenter übertragen werden. Dazu wurden Versuche in 2 l-, 5 l- und 30 l-Laborfermentern durchgeführt. Auf Grundlage der Ergebnisse aus diesen Versuchen wurde ein Fermenter mit 195 l Gesamtvolumen entwickelt, in welchen der Prozess übertragen werden sollte. Erste Versuche zeigen, dass der Prozess in diesem Fermenter durchgeführt werden kann. Die Prozesse wurden mit Ständerpilzen (Basidiomycota) submers mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Die besten Ergebnisse lieferte dabei *Pleurotus sapidus* (wissenschaftlich als *Pleurotus cornocopiae* geführt). Gleichzeitig wurden Vorkulturen von *Limosilactobacillus reuteri* (ehemals *Lactobacillus reuteri*) angesetzt. Co-Kulturen der Bakterien mit den Pilzen zeigten bisher keine ausreichende Verbesserung in der Prozessführung. Als sehr gut geeignetes Substrat hat sich eine Mischung aus Zuckerrübenmelaase und Biertreber herausgestellt. Da Pilze Ammoniumsalze als Stickstoffquelle schlecht verwerten, wurde im Projekt nach kostengünstigen Stickstoffquellen gesucht. Als gut geeignet hat sich Frischhefe und Trockenhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie Biertreber herausgestellt. Die im Vergleich zu Hefeextrakt günstigeren Hefevarianten zeigten keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Kulturen. Die Analysen bei QH-Lab zeigen mikrobiologische Unbedenklichkeit des geernteten Pilzmyzels. Nährwertanalysen ergaben bis zu ca. 40 g Gesamteiweiß pro 100 g. Bei QFP wurden bereits komplette Fleischersatzprodukt auf sensorisches Verhalten getestet. Dabei zeigte sich eine geschmackliche Abhängigkeit des Pilzmyzels durch Einsatz unterschiedlicher Substrate.

7 Einführung/ Motivation:

Bereits für den 15. November 2022 wurde von den Vereinten Nationen eine Weltbevölkerung von 8 Milliarden (Mrd.) Menschen prognostiziert, die weiter ansteigen wird auf geschätzte 8,5 Mrd. in 2030, 9,7 Mrd. in 2050 und mit 10,4 Mrd. Menschen ab 2080 ein vorläufiges Maximum erreichen könnte (UN DESA 2022). Obwohl die Landwirtschaft derzeit etwa ein Drittel mehr Kalorien produziert als zur Versorgung der Weltbevölkerung rein rechnerisch benötigt wird, litten 2014 ungefähr 805 Millionen Menschen an Hunger. Das sind aktuell bereits mehr als 10 % und dieser Anteil dürfte sich bei weiter steigender Weltbevölkerung vergrößern. Um die Weltbevölkerung im Jahr 2050 ausreichend mit Nahrungsmitteln zu versorgen, müsste die Agrarproduktion um etwa zwei Drittel gesteigert werden. Gleichzeitig gehen durch Erosion, Infrastrukturmaßnahmen und Überweidung derzeit ungefähr 12 Millionen Hektar Agrarfläche pro Jahr verloren (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) 2018), so dass ein gewaltiger Druck auf der Landwirtschaft lastet die gegebenen Ressourcen zur Erzeugung von Nahrungsmitteln effektiver zu nutzen und nach alternativen Lebensmitteln zu forschen, die sowohl ernährungsphysiologisch wertvoll, schmackhaft und gesund sind und dabei möglichst nachhaltig, ressourcenschonend und kostengünstig produziert werden können.

Als Grundlage für eine gesunde Ernährung wird die Planetary Health Diet (PHD) herangezogen (Abbildung 1). Hierbei handelt es sich um einen wissenschaftlich fundierten globalen Ernährungsplan, der verschiedene Lebensmittel so gruppiert, dass sie eine optimale Ernährung für die menschliche Gesundheit bereitstellen und dabei gleichzeitig möglichst ökologisch nachhaltig produziert werden. Ein Großteil dieser Lebensmittel sollten Vollkornprodukte, Obst, Gemüse, Nüsse und Hülsenfrüchte sein. Fleisch- und Milchprodukte stellen einen wichtigen, aber deutlich geringeren Anteil dar. 2019 wurde dieser Plan von der EAT-Lancet-Kommission mit dem Ziel entwickelt im Jahr 2050 10 Milliarden Menschen auf diesem Planeten gesund und nachhaltig zu ernähren (Willett et al. 2019); <https://eatforum.org/eat-lancet-commission/the-planetary-health-diet-and-you/> - aufgerufen 20.04.2023). Pro Mensch und Tag werden laut Plan 2500 Kilokalorien veranschlagt.



Abbildung 1: Planetary Health Diet (PHD)¹

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) hat zur Abschätzung der täglichen Energie- und Nährstoffzufuhr für Deutschland, Österreich und Schweiz (D-A-CH) auf ihrer Homepage Referenzwerte für verschiedene Personengruppen zusammengestellt (<https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/> - abgerufen am 10.03.2022). In Tabelle 1 sind diese Werte für Erwachsene im Alter zwischen 19–65 Jahre wiedergegeben. Dabei hängt der tägliche Energiebedarf stark vom Geschlecht und der körperlichen Belastung ab, d.h. inaktive Frauen benötigen mit 1700 kcal/Tag die geringste und körperlich stark belastete Männer mit 3100 kcal/Tag die meiste Energie. Der Fettanteil der zugeführten Nahrung sollte

¹ Kopie aus <https://eatforum.org/eat-lancet-commission/the-planetary-health-diet-and-you/> - aufgerufen 20.04.2023)

ungefähr 30 %, der Kohlenhydratanteil über 50 % betragen und wichtige Nährstoffe wie Proteine, Vitamine, Ballaststoffe, Mineralstoffe und Spurenelemente enthalten sein.

Tabelle 1 D-A-CH Referenzwerte für die tägliche Nährstoffzufuhr bei Erwachsenen im Alter von 19 und 65 Jahre

Energie / Nährstoffe	Erwachsene- im Alter zwischen 19 und 65 Jahren
Energiebedarf	1700–3100 kcal/Tag
Fettanteil	30 %
Kohlenhydratanteil	> 50 %
Ballaststoffe	≥ 30 g/Tag
Protein	0,8 g Protein/kg Körpergewicht pro Tag (\approx 48–57 g Protein pro Tag)
Vitamin C	95–110 mg/Tag
Vitamin D	20 μ g/Tag
Vitamin B ₁₂	4,0 μ g/Tag

Ein wichtiger Nährstoff ist Eiweiß, von dem täglich 0,8 g pro kg Körpergewicht, das sind zwischen 48–57 g bei Erwachsenen über die Nahrung aufgenommen werden sollten. Sie sind in Fleisch- und Wurstwaren, Geflügelprodukten, Fisch, Eiern, Milch und Milch-, Soja- und Getreideprodukten enthalten, aber auch in Nüssen, Ölsamen, Hülsenfrüchten und Pilzen.

In Deutschland wird der Energie- und Proteinbedarf in hohem Maße über tierische Lebensmittel wie Eier, Milch und Milchprodukte sowie Fleisch-, Wurst- oder Geflügelprodukte abgedeckt. So hat sich der Fleischkonsum innerhalb des letzten Jahrhunderts fast verdoppelt, und zwar von 47 kg Fleisch pro Kopf und Jahr um 1900 auf 84,48 kg im Jahre 2020 (darin sind Fleisch für Nahrung, Kleintierfutter, industrielle Verwertung sowie alle Verluste miteinberechnet), ist allerdings seit 4 Jahren leicht rückläufig. Tatsächlich verzehrt, also ohne Knochen, Haut und Mageninhalt wurden 2020 durchschnittlich 57,33 kg pro Person und Jahr, wobei Männer mit 103 g Fleisch pro Tag fast doppelt so viel Fleisch verzehrten wie Frauen mit etwa 53 g (MRI BMEL 2008). Anteilig entfallen etwa 57 % auf Schweinefleisch, 23 % auf Geflügel, 17 % auf Rind- und Kalbfleisch und die restlichen 3 % verteilen sich auf Schaf- und Ziegenfleisch, Wild, andere Fleischsorten und Innereien (Mackensen et al. 2021).

Die Produktion dieser tierischen Lebensmittel erfolgt vorwiegend über konventionelle Nutztierhaltung mit negativen Effekten für Mensch und Umwelt. So werden weltweit durch Tierhaltung mehr als 15 % der klimaschädlichen Treibhausgase wie Methan und CO₂ freigesetzt. 2017 entfielen in Deutschland ungefähr 7,3 % der gesamten Treibhaus-Emissionen auf die Landwirtschaft, für Methan waren das 1,2 Mio. Tonnen (Umweltbundesamt 2019). Weitere ökologische Nachteile bei der Nutztierhaltung sind der große Flächenbedarf, der hohe Wasserverbrauch, eine hohe Nitratbelastung des Grundwassers durch Gülle. Bei der Intensivtierhaltung können zudem Antibiotika-Resistenzen durch den erhöhten Antibiotikaeinsatz entstehen und Tierwohl-Kriterien aus Kostengründen nur begrenzt gewährleistet werden. All dies hat zur erhöhten Nachfrage an

tierfreien Proteinalternativen geführt. Hinzu kommen religiöse (z. B. halal) und gesundheitliche Aspekte, denn einige tierfreie Proteinquellen enthalten zusätzlich Sekundärstoffe mit gesundheitsfördernder Wirkung (Nutriceuticals), wohingegen Fleischprodukte auch negative Effekte auf die Gesundheit haben können, z. B. bei Menschen mit einer Purin-Stoffwechselerkrankung, die bei verstärktem Verzehr von Fleisch, Innereien und Alkohol aufgrund des erhöhten Harnsäurespiegels Gicht entwickeln. Dieser Trend nach Fleischalternativen wird durch die vegetarisch, vegane Bewegung weiter verstärkt. Allerdings können in Proteinprodukten aus Pflanzen und Pilzen auch Antinährstoffe sein, die die Aufnahme wertvoller Nährstoffe behindern, giftig oder allergen sind. Durch geeignete Verarbeitungsmethoden lassen sich diese Antinährstoffe jedoch entfernen oder inaktivieren (Asgar et al. 2010). Im Projekt MykoMeats sollen daher Prozesse entwickelt werden, um ein unbedenkliches vitamin- und proteinhaltiges Produkt in einem größeren Maßstab herzustellen. Dieses Vitamin D₂- und Vitamin B₁₂-haltige proteinreiche Pilzmyzelprodukt soll zu einem Nahrungsmittel weiter verarbeitet werden und als Alternative zu reinen Fleischprodukten dienen. Der Gesamtprozess soll möglichst nachhaltig und ressourcenschonend geführt werden, weshalb als Substrate Agrarnebenströme vorgesehen sind. Im Labormaßstab wurde ein solches Verfahren bereits in Erlenmeyerkolben etabliert und sollte innerhalb dieses Projektes auf einen 30 l- bis 50 l-Fermenter übertragen werden.

8 Methodik/Vorgehensweise/Projektlauf

8.1 Phase 1 Vorbereitungs- und Konzeptphase - Arbeitspaket 1

8.1.1 Erstellung eines Konzepts zur Übertragung der Pilz/Bakterien vom Labormaßstab bis hin zu 40 l- bis 50 l-Fermentern. (HSHL und Quh-Lab)

Ziel des Projektes ist es einen biotechnologischen Prozess für die submerse Co-Kultivierung eines Ständerpilzes (Basidiomycota) und eines Bakteriums im 40 l- bis 50 l-Maßstab unter Verwendung von (agro-)industriellen Nebenströmen als Substrat zu realisieren. Die gesamte Prozessführung sowie das Pilzmyzelprodukt sollen vegan, mindestens jedoch vegetarisch gestaltet werden und zusätzlich halal und kosher zulässig sein. Klimaaspekte sollen berücksichtigt werden.

Die geplante Gesamtprozessführung ist schematisch in Abbildung 2 aufgeführt und soll sequentiell in 4 Phasen verlaufen.

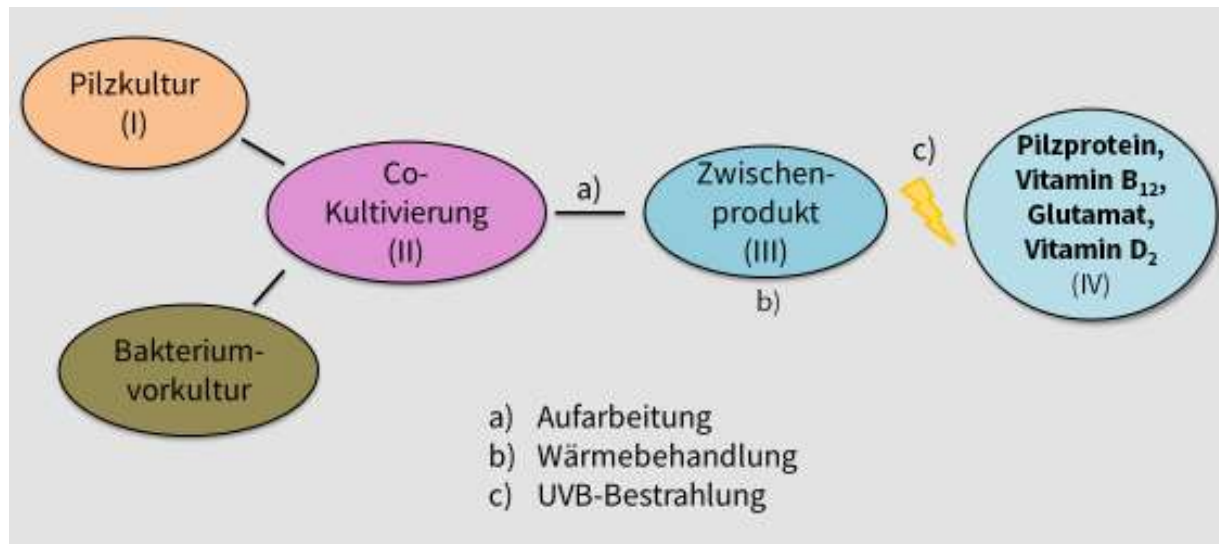


Abbildung 2: Prozessschritte für das Scale-up: I) submerse, aerobe Fermentation eines Basidiomycota-Pilzes mit einem kohlenhydrathaltigen (agro-) industriellen Nebenstrom; II) anoxische Co-Kultivierung von Speisepilz und Bakterium, das Vitamin B₁₂ und Glutamat produziert; III) Separation von Myzel und Filtrat und anschließende Wärmebehandlung des Myzels; IV) UVB-Bestrahlung des Myzels zwecks Umwandlung von Ergosterol zu Vitamin D₂

Demnach soll in Phase I ein Basidiomycota-Pilz im Fermenter unter aeroben Bedingungen vorkultiviert und Bakterien unter anaeroben Bedingungen separat angezogen werden. Nach Umstellung der Prozessparameter am Fermenter soll in Phase II die Co-Kultivierung nach Zugabe der Bakterienkultur zur Pilzkultur erfolgen. Hierbei sollen die Bakterien Vitamin B₁₂ synthetisieren und die vom Pilz erzeugte Aminosäure Glutamin soll mit Hilfe des Glutaminase-Enzyms der Bakterien in den Geschmacksverstärker Glutamat umgewandelt werden. Daran soll sich Phase III anschließen bei der das Pilzmyzel und das Filtrat separiert werden und das Pilzmyzel einer Hitzebehandlung unterzogen wird, um es abzutöten, proteinabbauende Enzyme zu deaktivieren und RNA zu reduzieren, die beim Verzehr für den Menschen einen erhöhten Purin- und Harnsäuregehalt verursachen würde. In Phase IV soll durch die UVB-Bestrahlung des Myzels Ergosterol in Vitamin D₂ umgewandelt werden, so dass im Gesamtprozess ein Pilzmyzelprodukt erhalten wird, das reich an Proteinen ist und die Vitamine D₂ und B₁₂ sowie Glutamat enthält.

Ausgehend von den Arbeiten von M. Zajul (Zajul 2017) und dem Patent DE 10 2017 212 564 A1 (Frettlöh et al. 2017) sollen die darin gewonnenen Erkenntnisse erfasst und zunächst eine Auswahl der Organismen und Agrarstoffe getroffen werden, die an der HSHL und bei Quh-Lab weiterverfolgt werden und für das Scale-up am Vielversprechendsten erscheinen. In einem ersten Schritt sollen die Methoden aus dem Labormaßstab zur Kultivierung in Schüttelkolben und Kleinfementern an der HSHL und bei Quh-Lab etabliert werden. Davon ausgehend sollen Anforderungen an einen Fermenter mit 30 - 50 l Arbeitsvolumen erstellt und ausgeschrieben werden. Im nächsten Schritt sollen standardisierte Prozessabläufe für automatisierte 2 l- (bei der HSHL) und 5 l- (bei Quh-Lab) Biofermenter entwickelt werden. Nach Auswahl des vielversprechendsten Prozesses in den 2 l- und 5 l-Fermentern soll die Übertragbarkeit auf den Produktionsmaßstab demonstriert werden.

8.1.2 Erfassung der notwendigen technischen Bedingungen (HSHL)

Benötigt wird ein Fermenter zur Produktion eines vitamin- und proteinhaltigen Nahrungsmittels. Daher sind Komponenten, die in Kontakt mit dem Reaktorvolumen, den Zuführungen und Ableitungen stehen lebensmitteltauglich zu halten. Die Prozessführung soll als Batch oder Fed-Batch erfolgen. Da als Substrate kohlenhydrathaltige Agrar- bzw. Lebensmittelnebenströme eingesetzt werden sollen, muss bei der Prozessführung

besonders auf sterile Bedingungen geachtet werden. Zunächst soll im Fermenter ein ausgewählter Speisepilz (Basidiomycota) submers und aerob angezogen werden und nach Prozessumstellung auf anoxische Bedingungen soll ein anaerobes GRAS-Bakterium (Generally-Regarded As Safe) zugesetzt und beide Organismen co-kultiviert werden. Der Prozess ist in Abbildung 3 dargestellt.

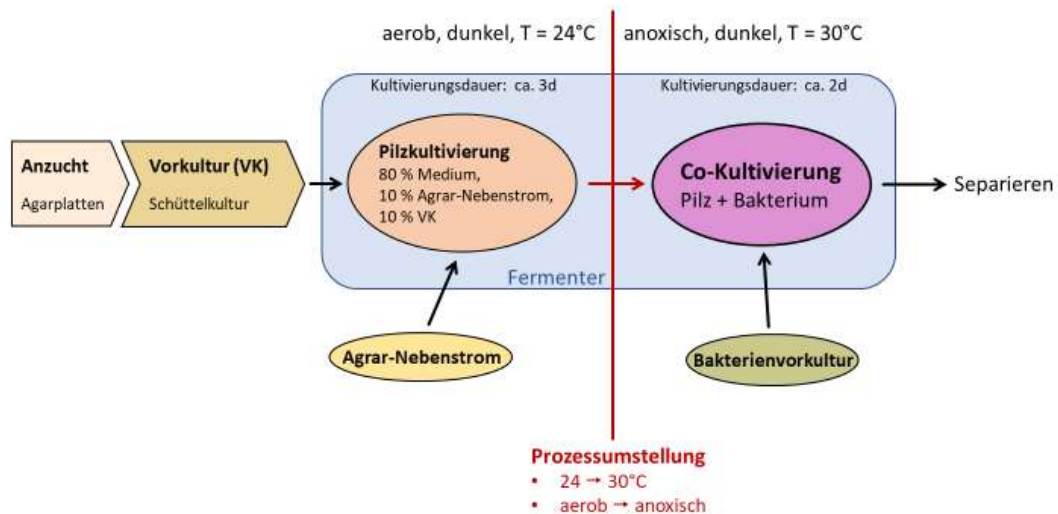


Abbildung 3: Prozessschritte der Co-Kultivierung von Pilzen und Bakterium.

Die Pilze bilden pelletartige Gebilde mit einer Größe von ca. 1–3 mm aus, können allerdings auch noch größere schwammartige Agglomerate ausbilden, die sich bevorzugt an alle vorhandenen Oberflächen setzen. Das Arbeitsvolumen des Reaktors soll möglichst groß sein, d.h. mindestens 30 Liter im Idealfall 50 Liter. Die Temperatur soll in einem Bereich von 20°C – 40°C regelbar und der pH-Wert für den Prozess zwischen 5,7–6,3 einstellbar sein. Belüftungsraten von 0,1–0,5 vvm sollen realisiert werden können. Im Fermenter soll ein Kulturmedium vorgelegt werden, das eine Stickstoffquelle (Hefeextrakt, ggf. Ammoniumnitrat, L-Asparagin), eine Kaliumquelle (Kaliumdihydrogenphosphat), eine Magnesiumquelle (Magnesium-Hydrat) und die Spurenelemente Eisen, Zink, Mangan und Kupfer enthält. Als Kohlenstoffquelle sollen kohlenhydrathaltige Agrar-Nebenströme eingesetzt werden. Der optimale Kohlenhydratgehalt liegt bei 10–20 g l⁻¹ für die Kultivierung. Die Agrar-Nebenströme sollen im einfachsten Fall mit dem Kulturmedium im Fermenter vorgelegt werden, aber es sollte auch eine Möglichkeit bestehen sie steril und separat zuzuführen. Die Pilzkultivierungsdauer beträgt ca. 7 Tage. Da der Pilz unter Lichtabschluss kultiviert werden soll wird ein Edelstahlreaktor ohne Strombrecher benötigt, ein Schauglas wäre wünschenswert. Das Rührwerk soll so konzipiert sein, dass die Rührblätter auf der senkrecht angeordneten Rührerwelle angepasst und ausgetauscht werden können. Als Rührblätter werden Schrägblattrührer bevorzugt. Vor der Inokulation mit dem Bakterium müssen die beiden Prozessparameter Temperatur und Begasung angepasst werden. Die Temperatur soll von 24°C auf 37°C erhöht und die Begasung von Sauerstoff auf Stickstoff umgestellt werden, damit anoxische Bedingungen im Fermenter gewährleistet werden können. Die Zuführung des Bakteriums soll bevorzugt über ein Septum mit einer Spritze erfolgen. Das Volumen der Bakterienvorkultur soll ca. 1 Vol.-% des Gesamtkulturvolumens und die Co-Kultivierungsdauer ca. 2 Tage betragen.

Eine einfache Entleerung des Fermenters über ein Ablassventil wäre wünschenswert. Der Fermenter soll möglichst einfach zu reinigen sein.

Die Ausschreibung umfasst die Lieferung, Aufstellung, Inbetriebnahme und Einweisung (inkl. Fahrt- und Wegezeiten). Weiterhin sind eine Konformitätserklärung sowie eine Bedienungsanleitung in deutscher oder englischer Sprache mitzuliefern. Die genauen technischen Spezifikationen für den Fermenter sind im Anhang zu finden. Aufgrund der auf die Ausschreibung erhaltenen Angebote wurde der Reaktor MayaFerm 50l V 1.0 der Anvium GmbH in Auftrag gegeben. Dabei handelt es sich um eine Eigenentwicklung unter Führung von Quh-Lab.

8.1.3 Zusammenstellung der benötigten Mengen an Medium, Substrat, Bakterien, Pilzvorkulturen (Quh-Lab)

Die benötigten Mengen an Medium, Substrat, Bakterien und Pilzvorkulturen wurden durch Kultivierungsversuche ermittelt. Für die Kultivierung der Basidiomycota werden die nachfolgend beschriebenen Substrat-Kombinationen verwendet.

8.1.3.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Pleurotus sapidus* und der zwei von Quh-Lab weiter entwickelten Stämme erfolgt auf Malzextrakt-Agar. Für die Herstellung des Agars werden 20 g/l Malzextrakt und 20 g/l Agar eingewogen und mit dest. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Die Agarplatten werden mit einem ca. 1 cm² großen, bewachsenden Agarstück beimpft und für etwa 10 Tage bei 24°C unter Lichtausschluss inkubiert.

8.1.3.2 Vorkultur

Die Mengen sind abhängig von dem geplanten Maßstab (z.B. Schüttelkoben, 2 l-, 5 l-, 30 l-Fermenter), den Pilzstämmen und den Substraten.

Die Vorkulturen werden in Malzextrakt-Medium kultiviert. Für die Herstellung des Malzextrakt-Mediums wird eine Malzextrakt-Konzentration von 20 g/l verwendet.

8.1.3.2.1 Vorbereitung der Vorkulturen für eine Fermentation mit flüssigen Substraten

Für die Vorbereitung der Vorkultur werden 500 ml-Bechergläser verwendet. In jedes Becherglas werden 6 g Malzextrakt eingewogen und 300 ml dest. Wasser zugegeben. Nach dem Abdecken der Bechergläser mit Aluminiumfolie werden diese für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Jedes Becherglas wird mit etwa 3 cm² Pilzmyzel (entnommen von den Agarplatten) inokuliert. Nach der Homogenisierung mittels ULTRA-TURRAX-Stab werden je 100 ml des Homogenisats in einen zuvor autoklavierten 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt. Die Vorkulturen werden 6 Tage unter Lichtausschluss bei 24°C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

8.1.3.2.2 Vorbereitung der Vorkulturen für Fermentation mit einem semifesten-Substrat-Medium

Für Fermentationen in Kolben oder im 5 l-Maßstab wurden Schüttelkolben (300 ml) mit Malzextrakt und Wasser (2 g/100 ml) angesetzt und mit einem 1 cm² großen Agarstück, das mit Pilzmycel bewachsen ist, inokuliert.

Für Fermentationen im 30 l-Maßstab wurden fünf 1 l-Kolben mit Malzextrakt und VE-Wasser (20 g/l) mit drei bewachsenen Vorkulturen zu je 100 ml angesetzt.

Fermentation mit flüssigen Substraten

Sowohl im Schüttelkolben als auch im 2 l- und 5 l-Fermenter wurde das Nährmedium M2 aus Tabelle 5 mit den dort angegebenen Konzentrationen verwendet.

Im 195 l-Fermenter wurden die Nährmedien in Tabelle 14 mit den dort angegebenen Konzentrationen verwendet.

Fermentation mit semi-festen Substraten

8.1.3.2.3 In Schüttelkolben

Es wurden Kolben (250 ml) mit 100 ml VE-Wasser, festem Substrat (1,5 g/100 ml) und flüssigem Substrat (0,75 g/100 ml) befüllt. Die entsprechenden Vorkulturen (s. oben) sollen nach der Sterilisierung den Medien zugefügt werden.

8.1.3.2.4 Im 5 l-Reaktor

- so viel VE-Wasser zufügen, dass einschließlich des Vorkulturvolumens ein Gesamtvolumen von 2 l vorliegt
- 45 g festes Substrat
- 15 g flüssiges Substrat
- 2 ml Antischaum
- entsprechende Vorkulturvolumen
- 300 ml KOH
- 300 ml H₂SO₄

8.1.3.2.5 Im 30 l-Reaktor:

- mit VE-Wasser auf ein Gesamtvolumen einschließlich des Vorkulturvolumens von 24 l auffüllen
- 300 g festes Substrat
- 100 g flüssiges Substrat
- 30 ml Antischaum
- Entsprechende Vorkulturen
- 1 l KOH
- 1 l H₂SO₄

8.1.4 Konzeption des Betriebs unter Berücksichtigung steriler Bedingungen und gleichmäßiger Temperierung ohne Temperaturgradient (HSHL)

Die Temperierung im Schüttelkolben erfolgte mit Unterheizung ohne Thermocouple oder bei Raumtemperatur. Die Schüttelkolben wurden in beiden Fällen abgedunkelt. Die 2 l-Reaktoren (Minifors 2, Infors, CH-Bottmingen) wurden mit einem Heizblock von hinten beheizt. Die Temperierung erfolgte über ein Umwälzthermostat. Zur Abdunkelung der Reaktoren wurden diese mit Moosgummi ummantelt. Die Temperierung der 5 l-Reaktoren erfolgte mit Hilfe von Heizmatten, die um den Reaktor gewickelt waren und über einen Thermostaten geregelt wurden. Die Reaktoren waren ebenfalls abgedunkelt. Das Animpfen der Reaktoren erfolgte in einer Sterilbank. Die Temperierung des 30 l-Reaktors erfolgt über Dampf. Zum Animpfen wurde das Inokulum über einen sterilen Trichter zugeschüttet und die Umgebungsluft mit einem Bunsenbrenner abgeflammt.

Der in dieser Phase geplante größere Reaktor sollte zunächst ein Arbeitsvolumen von 30 – 50 l fassen. Dies wurde dann während des Reaktorbaus auf 195 Liter erhöht. Für die Temperierung dieses Reaktors wurden verschiedene Konzepte diskutiert. Neben Wasserbeheizung über ein Umwälzthermostat, kamen noch Öl und Dampf in Frage. Aufgrund des Preises und der Arbeitssicherheit im Labor fiel die Entscheidung auf die Temperierung mit Wasser in einem Doppelmantel über einen Thermostaten. Der Doppelmantel konnte für die Sterilisierung auch mit Dampf befüllt werden.

8.1.5 Betrieb unter Sterilbedingungen

Um einen sterilen Betrieb zur Vermeidung von Kontaminationen zu gewährleisten wurden die Vorkulturmedien autoklaviert. Der 5 l-Reaktor wurde mit Medium befüllt und auf 120°C autoklaviert oder auf 100°C geheizt. Der 30 l-Reaktor wurde nach Befüllung mit Medium durch ein 100 - 120°C Sterilisationsprogramm sterilisiert und anschließend erfolgte

die Inokulation. Beim 195 l-Reaktor sollte der Fermenterinnenraum einschließlich der Anschlüsse mit Hilfe eines externen Dampfsterilisators sterilisiert werden. Dann sollte das Medium eingefüllt werden und der externe Dampfsterilisator an den Doppelmantel des Fermenters geschlossen werden und mit dem Dampf im Doppelmantel eine Temperatur von 134°C erzeugt werden, um auch Sporen abzutöten. Da sich beim Bau Änderungen ergaben, ist für diesen Reaktor noch ein Sterilisationsprozess zu entwickeln.

8.1.6 Konzept zum Betrieb mit regelbarer Sauerstoffzufuhr und Temperaturregelung (Anfangsphase unter aeroben Bedingungen, dann Umstellung auf aerobe Bedingungen im weiteren Verlauf nach Bakterienzugabe kombiniert mit Temperaturshift)

Die Pilze wachsen unter aeroben Bedingungen, während die vorgesehenen Bakterien bevorzugt anaerob wachsen. Für die Co-Kultivierung sollte deshalb eine sterile Umstellung der Bedingungen während des Betriebs möglich sein. Die Umstellung sollte durch Wechsel von Zuluft auf Stickstoffzufuhr mit Hilfe eines 3-Wege-Ventil erfolgen.

8.1.7 Zusammenstellung, Beschaffung und Vortestung der benötigten Sensoren, wie Sensoren für pH, Sauerstoff, Temperaturregelung

In Tabelle 2 werden die benötigten Sensoren für den 195 l-Reaktor aufgelistet und beschrieben.

Tabelle 2: Sensoren für den 195 l-Reaktor

Messung physikalische Größe	Messbereich	Artikelbeschreibung
CO ₂	0–2000 ppm	CO ₂ -Messfühler Edelstahl für Luftkanäle, Ausgangssignal 4–20 mA/0–10 V
Gasdurchfluss	20 – 100 l, max. Eingangsdruck: 1 – 6 bar	Proportional-Durchflussregelventil VPCF, zur Regelung des Durchflusses, unabhängig von Strömungswiderstand und Druckluftschwankungen
pO ₂		Memosens COS22E, amperometrischer Sensor zur Messung von gelöstem Sauerstoff, 12 mm und membranbedeckt, Memosens 2.0, Hygienisches Design, FDA, Ex zertifiziert. Zuverlässige Sauerstoffüberwachung in Life Sciences und Lebensmittel z.B. Fermentation im Standardmessbereich, EHEDG-Zulassung
pH	0 –14	pH Kombisensor, Memosense 2.0, Diaphragma: Keramik, Signalübertragung: Digital Referenzsystem: Ag/AgCl, Gel Prozesse mit hygienischen Anforderungen bei Lebensmitteln, Life Sciences und BioTechnologie, EHEDG-Zulassung
Schaumhöhe		Vegaplug PS21, kompakter Radarsensor zur kontinuierlichen Füllstandsmessung, Radartechnologie: 80 GHz-Technologie, Prozessanschluss Gewinde G 1 ½

		Lebensmittelbescheinigung, FDA EG1935/2004
Füllstand	2 l–195 l	Cerabar PMP23, Druck, piezoresistiv, Genauigkeit +/- 0,3 %, Membran: 316 L, verschweißt: SIP/CIP-fähig. Prozessanschluss: EHEDG-Zulassung mit Clamp 1,5" (Hygieneklemmverbindung)
Temperatur	-200°C – 600°C	iTHERM TM411, modulares, hygienisches Widerstandsthermometer, metrische Version mit austauschbarem Messeinsatz für Anwendungen in der Getränke- und Nahrungsmittel- sowie in der pharmazeutischen Industrie. Material: 316 L (prozessberührende Teile), mit Clamp 1,5" (Hygieneklemmverbindung)

8.1.8 Alternative Stickstoffquellen (Quh-Lab)

Eine kostengünstige Stickstoffquelle ist, vor allem in Hinblick auf eine industrielle und rentable Produktion, ein wichtiger Faktor bei der Optimierung des Prozesses. Die Literaturrecherche ergab, dass es sich bei Hefeextrakt um eine optimale Stickstoffquelle für die Gattung *Pleurotus* handelt. Versuche mit anderen gängigen Stickstoffquellen wie Pepton oder Harnstoff führte zu einem verringerten Wachstum bzw. einer geringeren Ausbeute (Manu-Tawiah und Martin 1988; Zajul 2017).

Auf Grund der Literaturrecherchen wurden für die Versuche als alternative Stickstoffquellen ausschließlich Tests mit unterschiedlichen Formen von Hefe durchgeführt. Als neue Stickstoffsubstrate wurden Trockenhefe sowie frische Hefe (Hefewürfel/ Bäckerhefe) getestet, als Vergleich wurde stets auch Hefeextrakt mitgeführt. Vorteile der frischen Hefe sowie der Trockenhefe ist vor allem der entsprechend niedrigere Preis. Bei allen Hefen handelte es sich um *Saccharomyces cerevisiae*.

Im 250 ml Schüttelkolben konnte gezeigt werden, dass die günstigeren Hefealternativen (frische Hefe und Trockenhefe) keinen negativen Einfluss auf das Pilzwachstum aufweisen. Bei der Verwendung gleicher Mengen von Hefeextrakt und den entsprechenden Alternativen konnte teilweise sogar verbessertes Wachstum beobachtet werden (Konzentrationen von 6 g/l und 12 g/l). Auf Grund der ermittelten Ergebnisse kann das vergleichsweise teure Hefeextrakt auch durch günstigere Alternativen, wie frische Hefe (Bäckerhefe) und Trockenhefe, ersetzt werden, ohne dass mit entsprechenden Einbußen bei der Ausbeute zu rechnen ist (Abbildung 4).

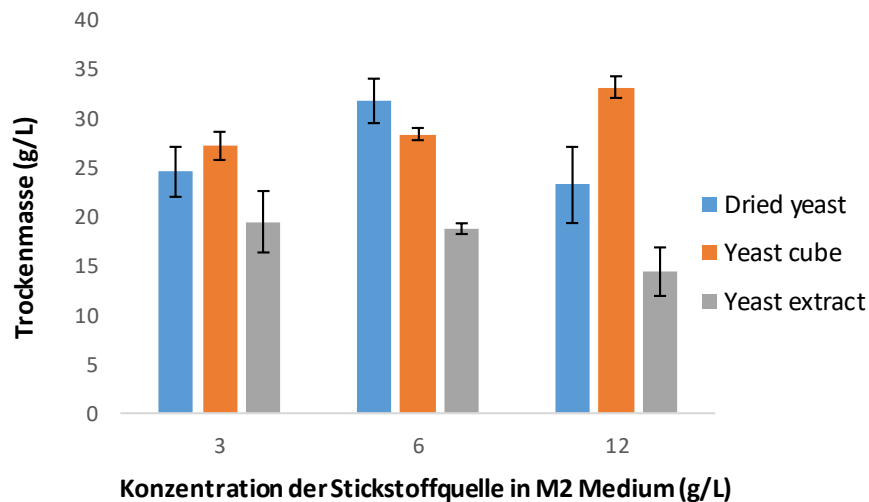


Abbildung 4: Pilzmyzel-Trockenmassen in [g/l] nach 6 Tagen Inkubation im Schüttelkolben; Verwendung verschiedener Stickstoffquellen in M2-Medium

Seit dem Zwischenbericht hat Quh-Lab Stickstoffquellen in anderen Substraten bzw. Medien gemischter Substrate untersucht und festgestellt, dass für andere Pilz-Gattungen das Wachstum mit und ohne Hefeextrakt ähnlich verlief. In solchen Fällen wird keine zusätzliche Stickstoffquelle benötigt und das Rezept wird sehr vereinfacht. Daher hat sich Quh-Lab für ein Rezept bzw. ein Substrat ohne zusätzliche Stickstoffquelle entschieden.

8.1.9 Erstellung eines Konzeptes zur Herstellung von unterschiedlichen Fleisch- und Wurstersatzprodukten (Quality Foods and Products, QFP)

Ziel dieses Arbeitspaktes war die Erstellung eines Konzeptes zur Herstellung von unterschiedlichen Fleisch- und Wurstersatzprodukten. Es sollte die Zusammenstellung möglicher texturgebender Zusätze, Gewürze zur geschmacklichen Verbesserung, verwendeter Geräte und Techniken erfolgen.

Dazu wurden

- Recherchen am Markt an aktuellen veganen Fleischersatzprodukten
- Vorversuche über die Emulgierbarkeit von Pilzmyzel
- Zusammenstellung von Verdickungsmitteln
- Gewürzzusammenstellung auf Basis von bestehenden Artikeln am Markt
- Testen des Sensorischen Verhaltens vom Pilzmyzel nach thermischer Behandlung
- Vorversuche von kompletten Produkten in Kleinstchargen

durchgeführt.

Es wurde zunächst ein Konzept zur Herstellung eines veganen Fleischersatzproduktes erstellt. QFP erstellte Rezepturen für die Weiterverarbeitung des Pilz-/Bakterienmyzels; dafür wurden die von Quh-Lab kultiviert Pilze und Bakterien eingesetzt. Diese wurden auf Agrarnebenströmen nach bereits etablierten Protokollen kultiviert und das geerntete Myzel an QFP geliefert. QFP machte sich mit der Biomasse und den technofunktionellen Eigenschaften vertraut und entwickelte erste Methoden zur Produktherstellung und Rezepturen.

Es wurde zunächst ein Konzept zur Herstellung eines veganen Fleischersatzproduktes erstellt. Mit ausgewählten Rezepturen wurden erste Kostproben erstellt. In einem weiteren Schritt

wurden größere Mengen getestet. Weitere Schritte und Optimierungen waren durch die Produktionskapazitäten der Partner beschränkt.

8.1.10 Meilenstein 1

„Es liegen geprüfte Konzepte für den Reaktorbau und die Übertragung der Co-Kultur aus dem Labormaßstab auf den 40 l- bis 50 l-Fermenter vor.“ Dieser Meilenstein wurde erreicht. Allerdings war es zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich eine qualitätsgesicherte größere Menge an Rohproteinmasse an den Partner QFP zu liefern.

8.2 Phase 2: Entwicklungs- und Produktionsphase: Arbeitspaket 2

8.2.1 Entwicklung der Co-Kultur im 40 l- bis 50 l-Fermenter (HSHL, Quh-Lab)

Nach der Konzeptphase lag die technische Beschreibung für einen Reaktor mit einem Arbeitsvolumen von 40 bis 50 Liter vor. Es wurden Angebote eingeholt mit der Vorgabe eines möglichst großen Arbeitsvolumens aber mindestens 40 l und im Idealfalls 50 l. Aufgrund der gestiegenen Preise für Edelstahl und weiterer Ausgangsprodukte und der durch COVID-19 bedingten langen Lieferzeiten der bekannten Reaktorhersteller wurde durch den Projektpartner Quh-Lab die Eigenentwicklung des Fermenters vorgeschlagen und angeboten. Ziel war es hier einen geeigneten Fermenter zu entwickeln, welcher die technischen Anforderungen erfüllte und ein Arbeitsvolumen von 100 l hat. Die anvisierte Entwicklungszeit konnte allerdings durch die allgemeinen Lieferschwierigkeiten und die gestiegenen Preise für Ausgangsprodukte nicht eingehalten werden. Daher wurden die weiteren Versuche in kleineren Fermentern mit 2 l- bis 5 l-Arbeitsvolumen durchgeführt.

8.2.1.1 Verwendete Organismen

Die für dieses Projekt verwendeten Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Leibniz-Institut - DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig GmbH) bezogen. Als Pilz wurde dort *Pleurotus sapidus* mit der Bezeichnung: ***Pleurotus sapidus*** (Schulzer apud Kalchbrenner) Saccardo und der internen Stammnummer DSM 8266 bezogen. Beim Bakterium handelt es sich um das Milchsäurebakterium ***Limosilactobacillus reuteri*** (Kandler et al. 1980)(Li et al. 2021) mit der internen Stammnummer DSM 20016. Bis 12/2022 wurde es unter dem Basynom *Lactobacillus reuteri* Kandler et al. 1982 geführt.

8.2.1.1.1 Basidiomycota: *Pleurotus sapidus* (DSM 8266)

Für das Scale-up bei der HSHL wurde einzig der Rillstielige Seitling (*Pleurotus cornucopiae*) (Abbildung 5), ein Speisepilz aus der Gattung der Seitlinge ausgewählt, der einen leicht anisartigen Geruch hat und mild und mehlig im Geschmack ist. Der Pilz ist ein Schwächeparasit und befällt als Saprobiont bevorzugt Laubbäume wie Pappeln und Ulmen. In Europa ist er verstärkt im Balkanraum verbreitet und in Deutschland kommt er eher seltener vor, wenn dann bevorzugt in wärmebegünstigten Gebieten und an warmen Auen (https://de.wikipedia.org/wiki/Rillstieliger_Seitling - abgerufen am 17.06.2021)



Abbildung 5: Rillstieliger Seitling (*Pleurotus cornucopiae*)².

Taxonomisch handelt es sich bei Pilzen um eine hyperdiverse Klade von heterotropen Eukaryoten, die genetisch Tieren ähnlicher als Pflanzen sind. Weltweit wird ihre Anzahl auf 1,5–5,0 Millionen Arten geschätzt (was mittlerweile als übertrieben hoch betrachtet wird), aber erst 80–100 Tausend Arten sind bis heute dokumentiert (Jones et al. 2017). Aufgrund ihrer Merkmale und Vielfältigkeiten waren sie taxonomisch schwer zu fassen und Zuordnungen änderten sich laufend. Erst seit Beginn der Genomik und der Phylogenomik erfolgt eine strukturierte und geregelte Einteilung. Das hat zur Folge das sehr unterschiedliche Synonyme für ein und denselben Pilz existieren. Der wissenschaftliche Name für den Rillstieligen Seitling lautet *Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland 1910 und wurde bereits 1910 vom französischen Pilzforscher Léon Louis Rolland eingeführt. Daneben existieren noch die Synonyme: *Agaricus cornucopiae* (Paulet) Pers., *Agaricus dimidiatus* Bull., *Agaricus sapidus* Schulzer, *Crepidotus cornucopiae* (Paulet) Murrill, *Dendrosarcus cornucopiae* Paulet, *Dendrosarcus sapidus* (Sacc.) Kuntze, *Fungus cornucopiae* Paulet, *Pleurotus ostreatus* f. *cornucopiae* (Paulet) Quél., *Pleurotus ostreatus* var. *cornucopiae* (Paulet) Pilát, *Pleurotus sapidus* Sacc. und *Pocillaria cornucopioides* (Paulet) Kuntze (<http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDspecies.asp> - abgerufen am 01.10.2021).

Im weiteren Verlauf des Berichtes wird die in der DSMZ-Datenbank verwendete Bezeichnung *Pleurotus sapidus* beibehalten.

8.2.1.1.2 Bakterium: *Limosilactobacillus reuteri* (ehemals: *Lactobacillus reuteri* DSM 20016)

Ursprünglich handelte es sich bei *Lactobacillus reuteri* um grampositive Bakterien der sehr diversen Gattung der Milchsäurebakterien (Laktobazillus), von denen es 261 (Stand: März 2020) verschiedene Arten gibt. Ihr Name ist dem Veterinärmediziner Gerhard Reuter gewidmet, der sich in den 60er Jahren intensiv mit Laktobazillen in Lebensmitteln beschäftigte (Reuter 1965). Komplette Genomsequenzierungen verschiedener Laktobazillen führten 2020 zu einer taxonomischen Neubewertung dieser Gattung und es wurde vorgeschlagen sie in 25 Gattungen aufzuteilen (Zheng et al. 2020). Nach dieser Reklassifizierung wurde *Lactobacillus reuteri* der Gattung *Limosilactobacillus* zugeordnet und damit verbunden in *Limosilactobacillus reuteri* umbenannt. Weitere phylogenetische Untersuchungen an Stämmen von *L. reuteri* aus verschiedenen Stammsammlungen zeigten, dass unterschiedliche Abstammungslinien bei dieser Art vorliegen, weshalb sie weiter in Unterarten aufgeteilt werden sollten. Als exaktere wissenschaftliche Bezeichnung für DSM

² Foto:

https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Pleurotus_cornucopiae?uselang=de#/media/File:2011-06-30_Pleurotus_cornucopiae_5_70824.jpg – abgerufen am 18.03.2021

20016 wurde *L. reuteri* subsp. *reuteri* subsp. nov. vorgeschlagen (Li et al. 2021). *L. reuteri* kommt im Tierreich ubiquitär vor aus und konnte aus dem Magen-Darm-Trakt verschiedener Säuger isoliert werden. Es handelt sich um ein anaerobes und mesophiles Bakterium.

8.2.1.2 Stammhaltung der Basidiomyceten

Die Stammhaltung erfolgte auf Malzextrakt-Agarplatten (MEA). Dazu wurde ein ca. 1 cm² großes mit Myzel bewachsenes Agarstück aus einer zu 80 % bewachsenen Platte herausgestantzt (mit Spatel abgestochen) und mittig auf eine neue Agar-Platte platziert, die anschließend mit Parafilm verschlossen und im Brutschrank bei Raumtemperatur (RT = 21–25°C) unter Lichtausschluss über 7–10 Tage inkubiert wurde. Die zu ca. 80 % bewachsenen Platten wurden bei 4°C gelagert und regelmäßig nach dem gleichen Verfahren überimpft (Abbildung 6).

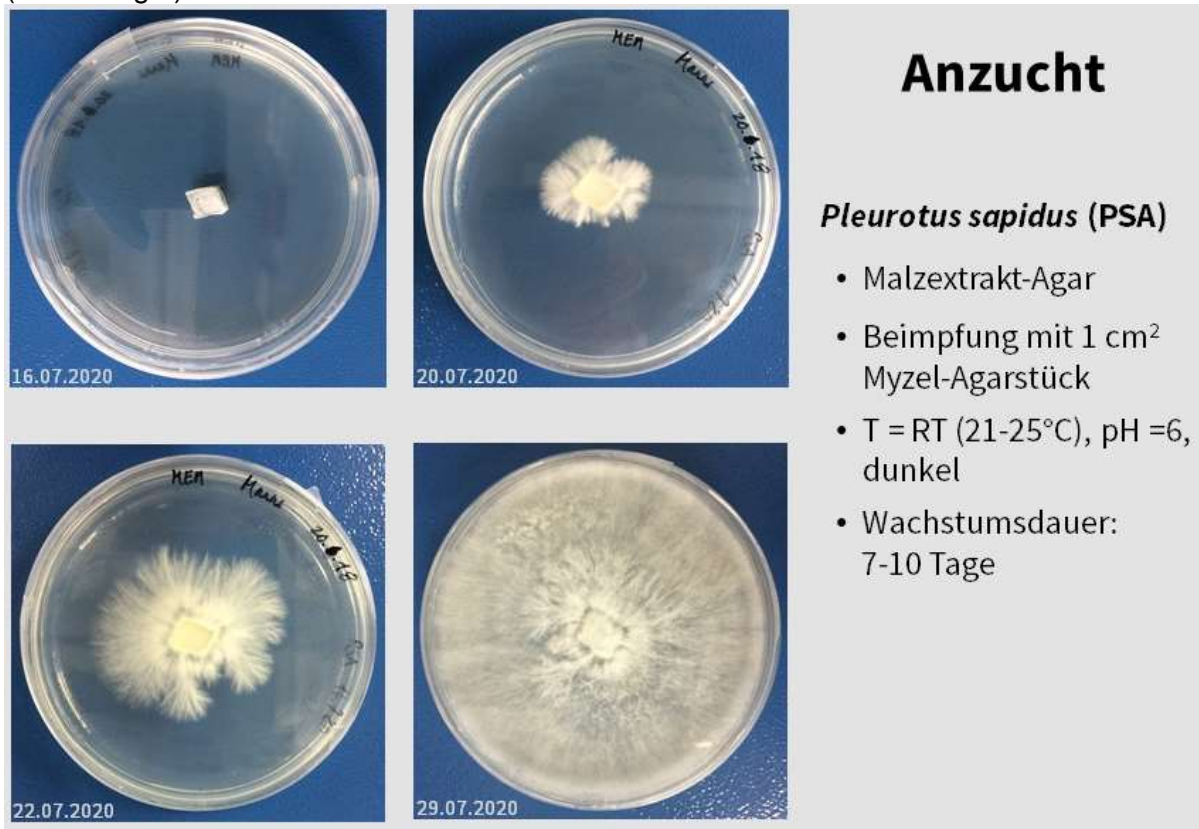


Abbildung 6: Plattenkultur von *Pleurotus sapidus*

8.2.1.3 Kultivierung des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*

Die Kultivierung von *P. sapidus* erfolgte in verschiedenen Nährmedien, die mit 1 molarer NaOH auf den pH-Wert von 6,0 eingestellt und danach bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert wurden (Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6).

8.2.1.3.1 Verwendete Nähr- und Kulturmedien

Tabelle 3: Zusammensetzung des Plattenmediums: Malzextrakt-Agarplatte (MEA)

Substanz	Konzentration
Malzextrakt	20,0 g l ⁻¹
Agar-Agar	15,0 g l ⁻¹
VE-H ₂ O	auf 1 l auffüllen

Tabelle 4: Zusammensetzung des Vorkulturmediums: Malzextrakt-Medium (MEM)

Substanz	Konzentration
Malzextrakt	20,0 g l ⁻¹
VE-H ₂ O	auf 1 l auffüllen

Tabelle 5: Zusammensetzung von Nährmedium M2

Substanz	Konzentration
Hefeextrakt	3,0 g l ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g l ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g l ⁻¹
Spurenelementlösung SE1	1,0 ml l ⁻¹
VE-H ₂ O	auf 1 l auffüllen

Tabelle 6: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SE1

Substanz	Konzentration
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,080 g l ⁻¹
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,090 g l ⁻¹
MnSO ₄ *H ₂ O	0,030 g l ⁻¹
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,005 g l ⁻¹
Titriplex III (EDTA)	0,400 g l ⁻¹
VE-H ₂ O	auf 1 l auffüllen

8.2.1.4 Kultivierung des Bakteriums *Limosilactobacillus reuteri*

Für die Anzucht des Bakteriums *Limosilactobacillus reuteri* hatte der Kooperationspartner Quh-Lab als Optimalmedium das komplexe Fertigmedium Vitamin B₁₂ Assay Medium (Merck) verwendet, das auch bei der HSHL Verwendung finden sollte (Tabelle 7).

Für die Kultivierung werden 8,5 g des Fertigmediums Vitamin B₁₂ Assay Mediums in 200 ml VE-Wasser suspendiert und anschließend so lange gekocht bis es sich vollständig aufgelöst hat. Dann wird das Medium gut gemischt, damit sich der leichte Niederschlag gleichmäßig verteilt. Anschließend soll der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt und das Medium bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Fertigmediums Vitamin B₁₂ Assay Medium (Merck)

Substanz	Menge / [mg l ⁻¹]
D(+)-Glucose	40000
Caseinhydrolysat, sauer, vitaminfrei	15000
Asparagin	200
Natriumacetat	20000
Ascorbinsäure	4000
L-Cystin	400
DL-Tryptophan	400
Adeninsulfat	20
Guanin-hydrochlorid	20
Uracil	20
Xanthin	20

Riboflavin (Vitamin B ₂)	1
Thiamin-hydrochlorid	1
Biotin	0,01
Niacin	2
p-Aminobenzoesäure	2
Calciumpantothenat	1
Pyridoxin-hydrochlorid	4
Pyridoxal-hydrochlorid	4
Folsäure	0,2
KH ₂ PO ₄	1000
K ₂ HPO ₄	1000
Magnesiumsulfat	400
NaCl	20
Eisen(II)-sulfat	20
Mangan(II)-sulfat	20
Tween® 80 (Polysorbat 80)	2000
Reinstwasser	1000 ml l ⁻¹

8.2.1.5 Vorkultur (VK)

Für die Vorkulturen (VK) wurden 250 ml und 500 ml Erlenmeyerkolben zu 40 % v/v mit Malzextrakt-Medium (MEM) befüllt, mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 gestellt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Inokulation erfolgte auf zwei Arten. Zum einen kamen 120 ml PP-Proberöhrchen zum Einsatz, die zunächst leer autoklaviert wurden. Dann wurden ca. 60 ml MEM aus einem befüllten Erlenmeyerkolben in ein Proberöhrchen geschüttet, mit einem Myzel-Agarstückchen (1 cm² pro 100 ml Kulturlösung) versehen und ca. 30 s bei 10.000 U min⁻¹ mit dem ULTRA-TURRAX®-Stab (T18 digital, IKA, Deutschland) homogenisiert. Die Inokulation erfolgte durch das Zurückschütten der Pilzsuspension in den Erlenmeyerkolben. Der ULTRA-TURRAX®-Stab wurde vor jeder Anwendung 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der Umweg über die 120 ml PP-Proberöhrchen war nötig, da das verwendete Dispergierwerkzeug nur 10 cm lang ist. Zum anderen wurde das für die Inokulation vorgesehene Myzel-Agarstück mit einer sterilen Lanzette auf der Petrischale grob zerkleinert und die Fragmente in die autoklavierten, mit MEM gefüllten Erlenmeyerkolben gegeben. Diese Vorgehensweise wurde bevorzugt, da sie schneller und weniger kontaminationsanfällig ist. Anschließend wurden die Kulturen in einem abgedunkelten Schüttelinkubator bei Raumtemperatur (RT = 21–25°C) und 150 rpm 7 Tage lang submers kultiviert. Als weitere Variante wurde der Erlenmeyervorkultur vor dem Autoklavieren ein Rührfisch zugesetzt und statt zu schütteln wurden diese Kulturen 6 Tage bei ca. 27°C auf einer Magnetplatte bei 300 rpm gerührt und mit einem großen Karton abgedunkelt (Abbildung 7 und Abbildung 8).

Vorkulturmedium - Malzextraktmedium (MEM):

Substanz	Konzentration [g l ⁻¹]
Malzextrakt	20,0
VE-H ₂ O	auf 1 L auffüllen

Das Vorkulturmedium wurde mit 1 molarer NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert.



Abbildung 7: Vorkultur auf Malzextraktmedium; links: geschüttelt bei 150 rpm; rechts: gerührt bei 300 rpm.



Abbildung 8: links: Vorkultur auf Magnetrührplatten; rechts: DIY-Dunkelkammer

8.2.1.6 Hauptkultur (HK) im Erlenmeyerkolben (HSHL)

Zur Hauptkultivierung (HK) von *Pleurotus sapidus* im Erlenmeyerkolben (Abbildung 9) diente mit 15 g l⁻¹ Glucose (Fraatz et al. 2014) angereichertes M2 Medium. Die Erlenmeyerkolben wurden zu 36 % v/v mit Medium befüllt, mit 1 molarer NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Inokuliert wurden sie mit 4 % v/v *Pleurotus sapidus*-VK, die zuvor unter sterilen Bedingungen mit dem ULTRA-TURRAX®-Stab in 120 ml PP-Proberöhrchen homogenisiert (30 s, 10.000 U min⁻¹) wurden. Die

Submerskultivierung erfolgt 4–6 Tage bei RT und 150 rpm im abgedunkeltem Schüttelinkubator oder als Rührkultur mit einem Rührfisch bei 300 rpm (siehe VK).



Abbildung 9: Hauptkultur in Erlenmeyerkolben

8.2.1.7 Hauptkultur im Fermenter (HSHL)

Die Hauptkultivierung in den 2 l-Fermentern (Minifors 2, infors, CH-Bottmingen) erfolgte als Batch und als Fed-Batch. Beim Batch-Prozess wurde M2 Medium direkt mit dem Agrarnebenstrom im Fermenter vorgelegt und beim Fed-Batch wurde nur M2 Medium vorgelegt und der Agrarnebenstrom wurde über eine Vorlageflasche zugeführt (Abbildung 10).

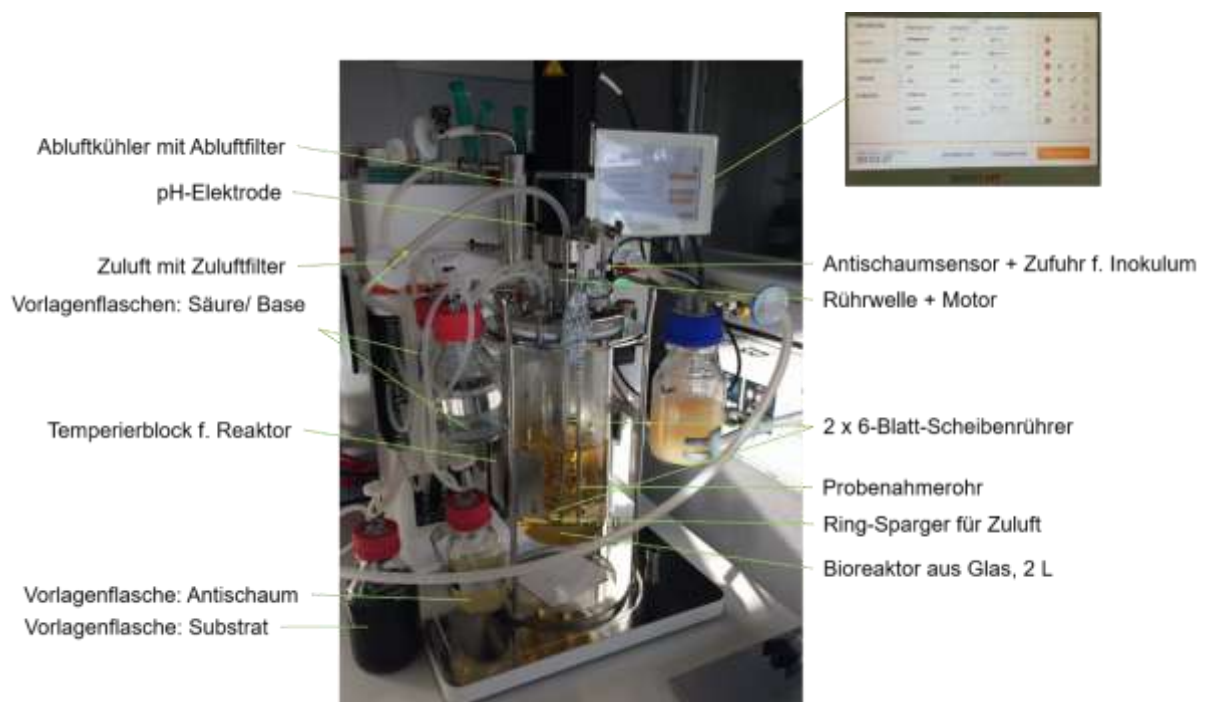


Abbildung 10: Minifors 2 (Infors) Fermenter im Betriebszustand

Beim Batch-Prozess lagen vor Inokulation also 1800 ml Nährmedium im Fermenter vor.

Für den Fed-Batch Prozess wurden 1600 ml M2 Medium vorgelegt, wobei die Medienbestandteile von M2 auf 2000 ml statt 1600 ml bezogen wurden (2 l Gesamtvolumen im Fermenter). Als Kohlenstoffquelle diente neben Glucose, Saccharose und *BETA*pur®-Melasse, die bei der Zuckerherstellung aus Zuckerrüben als Nebenstrom anfällt. Damit das Myzelwachstum bei Verwendung unterschiedlicher C-Quellen miteinander verglichen werden kann, wurde ein Gesamtkohlenhydratgehalt von 15 g l⁻¹ im Kulturmedium gewählt. Für *BETA*pur®-Melasse mit einem Gesamtzuckergehalt (als Saccharose) von min. 47 % i. OS sind das ungefähr 32 g l⁻¹, eingesetzt wurden 35 g l⁻¹. Für die 2 l Fermentation wurden somit 70 g *BETA*pur®-Melasse benötigt, die in 200 ml VE-Wasser gelöst wurde und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über eine separate 250 ml-Vorlagenflasche nach Inokulation zugeführt wurde. Dabei hat sich herausgestellt, dass es keinen Unterschied macht, ob die Lösung nach der Inokulation schnellstmöglich oder über einen Zeitraum von 10 h schrittweise zugeführt wurde. Der Fed-Batch-Prozess wurde bevorzugt, da im Falle einer Kontamination des Fermenters die C-Quelle weiter genutzt werden konnte.

2 l-Fermenter: Nährmedium M2 + Kohlenhydrat:

Substanz	Menge
Hefeextrakt	6,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	3,0 g
Magnesiumsulfat-Hydrat (MgSO ₄ · x H ₂ O)	1,0 g
Spurenelementlösung SE1	2,0 ml
Kohlenhydrat-Lösung	200 ml
VE- H ₂ O	auf 1800 ml auffüllen

Kohlenhydrat-Lösung:

Substanz	Menge	gelöst in VE-H ₂ O
Glucose	30 g	200 ml
Saccharose	30 g	200 ml
<i>BETA</i> pur®-Melasse	70 g	200 ml

Zur pH-Kontrolle befanden sich am Fermenter zwei 250 ml Vorratsflaschen, die mit 200 ml 1 molarer NaOH und mit 200 ml 1 molarer H₃PO₄ gefüllt waren und zur Schaumregelung war eine weitere mit 150 ml Raps-Öl (Fa. Brölio) als Antischaum gefüllt. Der Fermenter einschließlich der 4 Vorratsflaschen wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert. Der pH-Wert im Fermenter wurde nach dem Autoklavieren auf 6,0 gestellt. Die Rührgeschwindigkeit wurde erst auf 250 rpm später auf 150 rpm gestellt und die Temperatur auf 24°C. Die Belüftungsrate betrug bei den ersten Fermentationen 1,2 l/min und bei den späteren 1,0 l/min, wobei letztere Variante wegen der geringeren Schaumbildung bevorzugt (Abbildung 11). Mit Aluminiumfolie und später mit Moosgummimatten wurde der Glasfermenter während der Fermentation abgedunkelt.

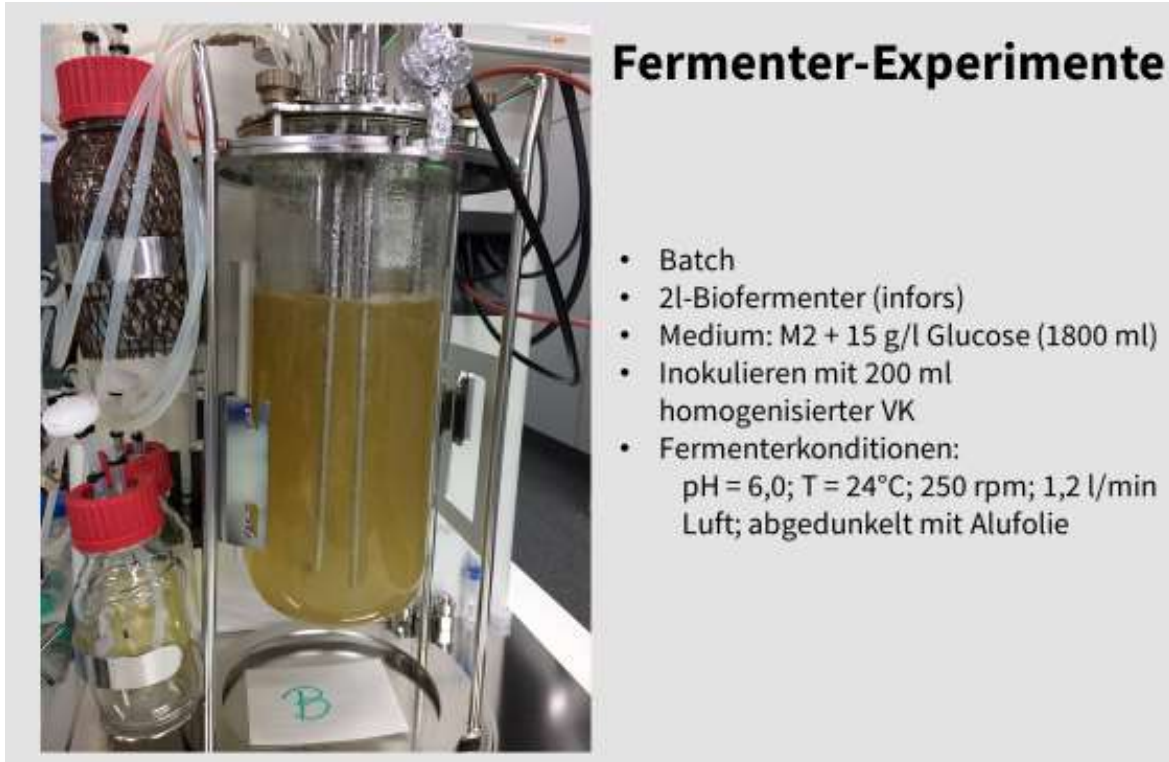


Abbildung 11: Fermentationsprozess ohne Schaumbildung

8.2.1.8 Inokulationstechnik (HSHL)

Für die Inokulation wurde die Vorkultur über die 120 ml Proberöhrchen per ULTRA-TURRAX®-Stab ca. 30 s bei 10.000 rpm homogenisiert, dann in eine zuvor autoklavierte 250 ml Gewindeflasche gegeben, die mit einem Spezialverschluss verschlossen war. Dieser Verschluss hatte einen Mehrfachteiler mit 2 Oliven, wobei das eine Ende per Schlauch mit einem Sterilfilter verknüpft wurde und die andere Seite per Schlauch mit einem geraden Schlauchverbinder versehen wurde. Ein weiteres Schlauchstück befand sich im Inneren der Gewindeflasche. Die Verknüpfung von Animpfflasche und Fermenter erfolgte über den Schlauchverteiler, der steril mit dem Schlauchende am Antischaumsensor gekoppelt werden musste. Am Sterilfilter der anderen Seite der Animpfflasche wurde Druckluft von ca. 1,5 bar angeschlossen. Zur Inokulation wurde die Schlauchschelle am Schlauchstück des Antischaumsensors geöffnet und in weniger als 1 Minute gelangte so die Vorkultursuspension in den Fermenter (Abbildung 12).



Abbildung 12: Fermentation mit Inokulationstechnik

8.2.1.8.1 Downstream Processing: Separieren, Trocknen

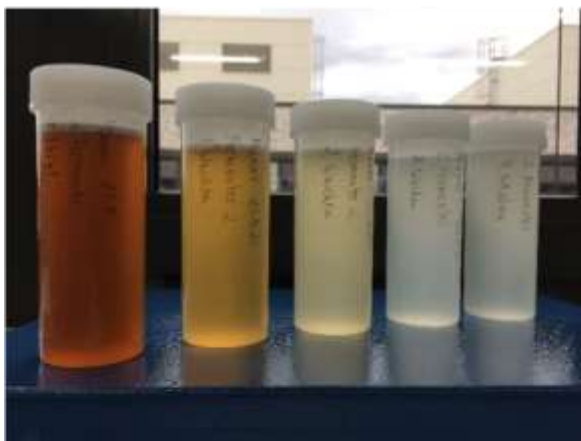
Abhängig von der verwendeten C-Quelle waren die aufzuarbeitenden Kulturbrühen unterschiedlich stark schleimig, viskos. Bei Verwendung von Glucose waren sie deutlich schleimiger und viskoser als bei Verwendung von Saccharose und *BETA*pur®-Melasse. Die ersten Separierungen von Myzelmasse und Flüssigkeit erfolgten über Vakuumfiltration mittels Büchner-Trichter und Rundfilter aus Cellulose vom Typ 11A mit einem Rückhaltebereich von 12–15 µm. Da die Kulturbrühe sehr schleimig war, setzten sich die Filterporen schnell zu, so dass diese Methode verworfen wurde. Weitere Separierungen erfolgten zunächst über Einmalsiebe bestehend aus wasserabweisendem Karton und einem Siebgewebe aus Nylon mit einer Maschenweite von 260 µm (Abbildung 13 a), wobei geringe Myzelmassen im Filtrat verblieben, das verworfen wurde. Dafür erfolgte die Filtration relativ zügig. Nachteil dieser Siebe war ihre geringe Sieboberfläche und dass der Karton leicht durchweichte und es zu Undichtigkeiten kam. Später wurden Analysensiebe aus Edelstahl mit einem Durchmesser von 200 mm verwendet, deren Siebboden aus Edelstahl-Drahtgewebe und einer Maschenweite von 300 µm bestand (Abbildung 13 b). Diese waren für die Abtrennung der Myzelmasse optimal, da die Filtration sehr zügig verlief und nur wenig Myzelmasse im Filtrat verblieb, das verworfen wurde. Als Alternative zu den Edelstahlsieben könnte Baumwollgaze (Seihtuch, Passiertuch, Käsetuch) eingesetzt werden, wurde jedoch noch nicht getestet. Nach der Filtration wurde das Pilzmyzel 4 x mit VE-Wasser gewaschen, bis das Filtrat klar war (Abbildung 13 c) und danach das Nassgewicht bestimmt (Abbildung 13 d).



a) Einmalsieb, Maschenweite 260 μm



b) Analysensieb, Maschenweite 300 μm



c) Filtrate aus Fermenter mit
BETApur[®]-Melasse




d) nasses Pilzmyzel

Abbildung 13: Filtrieren und trocknen der Myzelmasse

Anschließend erfolgte die Trocknung im Lyophilisator und die Bestimmung des Trockengewichtes. Für die Schüttelkultur mit Glucose wurde eine Trockenmasse von 4,5 g l⁻¹ erzielt (Abbildung 14).

Ernte



- Ernte nach 4 – 6 Tagen
- Trennung Myzel / Filtrat
 - Zentrifugieren: 10 min bei 26912.53 g
 - Filtrieren über Einmalsieb, Maschenweite von 260 µm
 - Filtrieren über Analysesieb, Maschenweite von 300 µm
 - Myzel 3 x Waschen mit VE-Wasser
 - ▷ Nassgewicht
- Trocknen des Myzels mittels Lyophilisator
 - ▷ Trockengewicht

Trockenmasse (Schüttelkultur): 4,5 g / l

Abbildung 14: Nasse und getrocknete Myzelmasse

Das Separieren von Kulturbrühe und Pilzmyzel gelang deutlich schneller, wenn als C-Quelle **BETApur®**-Melasse oder Saccharose eingesetzt wurde.

8.2.1.8.2 Fermentationen im 2 l-Maßstab

In Abbildung 15 ist ein typischer Verlauf für eine Kultivierung von PSA mit BT30ZRM50 als Medium im Batch-Prozess beschrieben.

Als Medium wurde die beiden Reststoffe BT und ZRM eingesetzt. Zur Herstellung des Mediums BT30ZRM50 wurden 60 g BT und 100 g ZRM mit 1800 ml VE-Wasser versetzt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Zur Abtrennung der Feststoffe wurde diese Suspension 15 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Der Überstand wurde mit 2 ml Spurenelementlösung SE2, 3,0 g Kaliumhydrogenphosphat und 1,0 g Magnesiumhydrat angereichert und mit VE-Wasser auf 1800 ml aufgefüllt. Dieses Medium wurde in den Fermenter überführt und der 2 l-Fermenter komplett autoklaviert. Über die Beobachtung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) kann auf das Wachstum des Pilzes rückgeschlossen werden. In dem Verlauf in Abbildung 15 sinkt nach ca. 2 Tagen der Sauerstoffpartialdruck stark ab. Am pO_2 -Minimum ist der erste Wachstumsschub des Pilzes weitestgehend abgeschlossen. Die Zugabe der Säure (1 molare H_2SO_4) erfolgt zeitversetzt zum Abfall des Sauerstoffpartialdruckes. Anfangs ist die Zugabe stark, dann schwächt sie ab. Die Zugabe der Säure ist so geregelt, dass im Fermenter ein konstanter pH-Wert von 6,0 gehalten werden kann. Steigt der Sauerstoffpartialdruck wieder an, so ist die Myzelproduktion abgeschlossen.

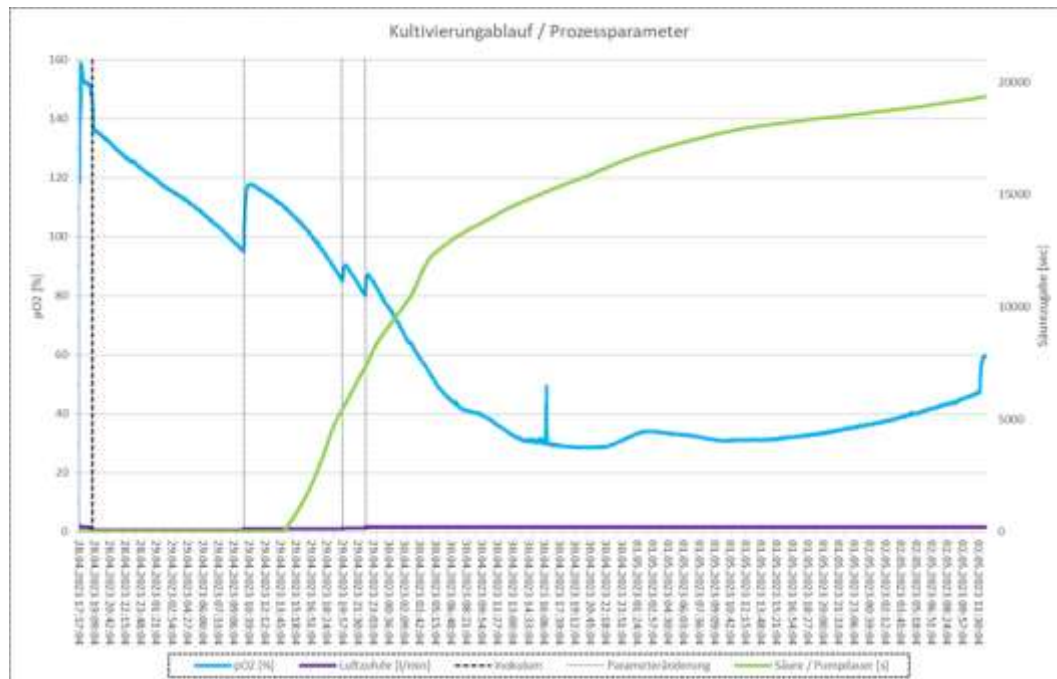


Abbildung 15: Fermentation im 2 l-Reaktor. Die blaue Kurve zeigt den Sauerstoffpartialdruck. Die grüne Kurve die Säurezugabe, die lila Kurve stellt die Luftzufuhr in den Reaktor dar.

8.2.1.8.3 Ausgewählte Parameter aus den 2 l-Fermentationen

Obwohl viele Fed-Batch Verfahren mit den 2 l-Minifors2 (infors-ht, Schweiz) getestet wurden, bei denen verschiedene Mengen an Zuckerrübenmelasse in jeweils 200 ml VE-Wasser gelöst und als Feed zugeführt wurden, konnte keine Steigerung der Myzelmasse erzielt werden. Da Batch-Kultivierungen einfacher zu steuern sind, wurde für die Scale-up Kultivierung dieses Verfahren bevorzugt. Als Kulturmedium hatte sich BT30ZRM50 (30 g Biertreber und 50 g Zuckerrübenmelasse und 900 ml VE-Wasser) bewährt, da es gute Ausbeuten an Trockenmyzel lieferte, wenig Schaumbildung während der Fermentation auftrat und die beiden Restströme Zuckerrübenmelasse und Biertreber als C- und N-Quelle nutzte. Außerdem war die Kulturbrühe nicht schleimig-viskos wie bei Kultivierungen mit glucosehaltigen C-Quellen, so dass das Downstream Processing deutlich beschleunigt und erleichtert wurde. Das Beispiel einer Fermentation kurz vor Ernte des Produkts ist in Abbildung 16 gezeigt.



Abbildung 16: 2 l-Fermentation mit dem Nährmedium BT30ZRM50 kurz vor Ernte des Produkts.

Optimale Kultivierungen in den Minfors2 Tischreaktoren erfolgten mit einem maximalen Kulturvolumen von 2 l, wobei 90 % (1800 ml) auf das Nährmedium BT30ZRM50 und 10 % (200 ml) auf das Inokulum entfielen.

Für die Herstellung des Nährmediums BT30ZRM50 wurden 100 g Zuckerrübenmelasse und 60 g Biertreber mit 1800 ml VE-Wasser versetzt und autoklaviert. Anschließend wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugation bei 4.000 rpm für 15 Minuten abgetrennt. Der gesammelte Überstand wurde mit 3,0 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,0 g Magnesiumhydrat und 2 ml Spurenelementlösung SE1 oder SE2 versetzt und mit VE-Wasser erneut auf 1800 ml aufgefüllt. Diese 1800 ml Nährmedium wurden in den Glasreaktor gefüllt, dann die pH-Elektrode kalibriert und zusammen mit der Sauerstoffsonde in den Fermenter eingebaut. Zur pH-Kontrolle wurde 1 molare NaOH-Lösung und 1 molare Phosphorsäure oder Schwefelsäure eingesetzt. Das Fermentersystem wurde komplett autoklaviert.

Für die Herstellung des Inokulums wurden 200 ml PSA-Vorkultur als Schüttelkultur im Erlenmeyerkolben wie unter Kapitel Vorkultur angegeben, hergestellt. Anschließend wurde die Vorkultur mit Hilfe der Inokulationstechnik erst homogenisiert und dann in das Inokulationsgefäß überführt.

Für die 2 l-Fermentation wurde das autoklavierte Fermentersystem mit dem Nährmedium und den pH-Lösungen an das Minifors2-Gerät angeschlossen und dann die Sauerstoffsonde kalibriert. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt: Temperatur wurde auf 24°C, pH-Wert auf 6,0, Rührgeschwindigkeit auf 250 rpm und Luftzufuhr auf 1,5 l min⁻¹ eingestellt. Hierbei handelte es sich um die Werte mit maximalem Sauerstoffeintrag während der Fermentation. Für diese Parametereinstellungen wurde der Sauerstoffwert auf 100 % gesetzt. Anschließend wurden die Parameter auf die Startbedingungen eingestellt, d.h. Temperatur und pH-Wert blieben gleich, aber die Rührgeschwindigkeit wurde auf 150 rpm und die Luftzufuhr auf 0,3 l min⁻¹ geregelt. Dann erfolgte die Inokulation über die Inokulationstechnik. Dazu wurde das Inokulationsgefäß mit dem Fermenter verbunden und das Inokulum per Druckluft in den Fermenter befördert. Mit der Inokulation wurden die Rührgeschwindigkeit auf 200 rpm und die Luftzufuhr auf 0,5 l min⁻¹ erhöht. Während der Fermentation wurde mit Hilfe der Batch-Strategie die Rührgeschwindigkeit und Luftzufuhr erhöht, sobald ein gewisser Sauerstoffwert unterschritten wurde, damit der Sauerstoffeintrag sich wieder erhöht. Folgende Einstellungen erfolgten:

- ist Sauerstoffwert < 80 %, dann Rührgeschwindigkeit auf 250 rpm, Luftzufuhr auf 1,0 l min⁻¹
- ist Sauerstoffwert < 70 %, dann Luftzufuhr auf 1,2 l min⁻¹
- ist Sauerstoffwert < 60 %, dann Luftzufuhr auf 1,5 l min⁻¹

8.2.1.9 Belichtung der trockenen Myzelproben mit UV-Licht (HSHL)

Ergosterol absorbiert UV-Licht im Bereich von 200–310 nm und hat ein Absorptionsmaximum bei 282 nm. Es wandelt sich unter UV-Bestrahlung zu Vitamin D₂ um (Ahlborn, 2018; Schümmer, 2021; Jiang 2020). Für die Belichtungstests wurde zunächst eine 2 l-Kultivierung im abgedunkelten Tischbioreaktor mit PSA in BT30ZRM Medium durchgeführt und nach 89 h beendet. Das Myzel wurde vom Filtrat bei Tageslicht separiert, über Vakuumfiltration vorgetrocknet und dann in einer Alufolienhülle lyophilisiert, so dass insgesamt 8,026 g Trockenmyzel erhalten wurde. Im abgedunkelten Raum wurde dieses Myzel im Mörser feinst zerrieben und ein weißes, homogenes Pulver erhalten, das auf 7 Petrischalen mit jeweils 800 mg verteilt wurde. Zum Schutz vor weiterer Belichtung wurden die Petrischalen einzeln in Alufolie gewickelt.

Anschließend wurden die Proben mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und der Stärke 8 W unterschiedlich lang im UV-Kabinett 4 CAMAG® bestrahlt, siehe Tabelle 8. Dabei wurde das Myzelpulver möglichst gleichmäßig auf der zu belichteten Petrischale durch leichtes Rütteln verteilt und die Petrischale dann ohne Deckel auf die markierte Position im Kabinett gestellt (Abbildung 17).

Tabelle 8: Menge der Myzelproben und Belichtungsdauer im UV-Kabinett

Probe	Menge [mg]	Belichtungsdauer [Minuten]
S0	802,4	0
S1	802,4	1
S2	801,4	2
S3	801,9	5
S4	801,4	10
S5	800,7	20
S6	802,7	40
S7	800,5	80

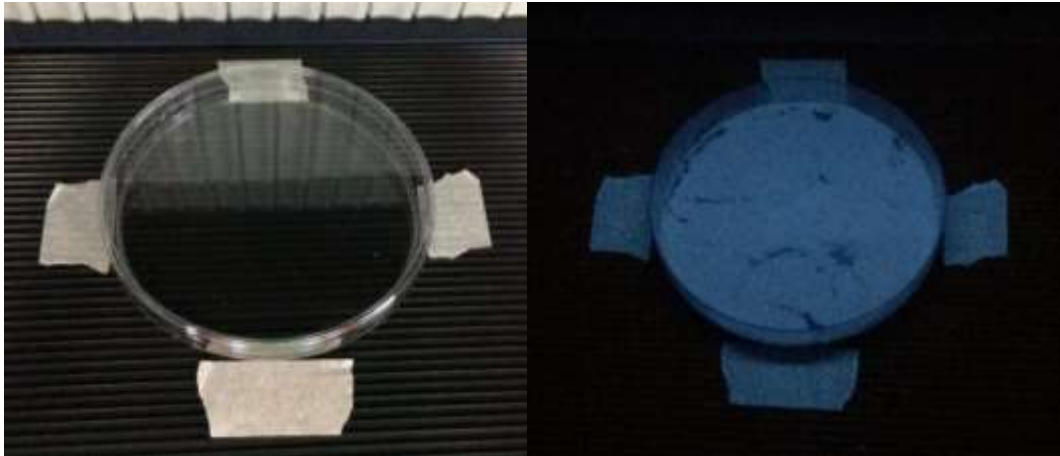


Abbildung 17: Positionierung und Bestrahlung der Myzelproben im UV-Kabinett

Als problematisch bei den Bestrahlungsversuchen ist zu erwähnen, dass das Myzelpulver sehr feinpulvrig und trocken war und sich elektrostatisch auflud. Dabei hefteten sich Partikel an den Deckel, siehe Abbildung 18. Diese wurden mit Hilfe eines Pinsels zurück in die Petrischalen gefördert. Außerdem war es sehr schwierig eine gleichmäßige, sehr dünne Myzelschicht zu generieren. Es wäre vorteilhafter gewesen, wässrige bzw. alkoholische Myzelsuspensionen mit UV-Licht zu bestrahlen, das mehr im UV-B Bereich gelegen hätte.



Abbildung 18: Elektrostatisch aufgeladene Myzelprobe in Petrischale

Die Messung der Ergosterol- und Vitamin D₂-Mengen sind noch in Bearbeitung und konnten nicht rechtzeitig für den Abschlussbericht bestimmt werden.

8.2.1.10 Mikrobiologische Analysen des kultivierten Pilzmyzels (Quh-Lab)

Die Analyse des geernteten Pilzmyzels wurde entsprechend der gängigen und bei der Quh-Lab etablierten mikrobiologischen Analytik-Methoden durchgeführt.

Die Gesamtkeimzahl wurde auf Plate-Count-Agar, einem nicht selektiven, nährstoffreichen Nährboden, mithilfe des Tropfplattenverfahrens bestimmt. Die Enterobakterien wurden mithilfe des Plattengussverfahrens auf VRBG-Agar (Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar) bestimmt.

Hefen und Schimmelpilze wurden mithilfe von YGC-Agar (Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar), einem Selektivagar zur Keimzählung und Isolierung von Hefen und Schimmelpilzen, quantifiziert.

Die Auswertung der inokulierten Nährmedien ergab, dass weder Enterobakterien noch Hefen nachgewiesen werden konnten. Auf den YGC-Platten zur Quantifizierung von Schimmelpilzen

war zwar Wachstum zu erkennen, dies ist jedoch auf das Wachstum des Kulturpilzes auf diesem Nährmedium zurückzuführen. Es konnten keine typischen Schimmelpilze auf den YGC-Platten gezählt werden.

Das Pilzmyzel wird daher aus mikrobiologischer Sicht als unbedenklich eingestuft und weist keine Kontaminationen auf. Weitere mikrobiologische Kontrollen der einzelnen Prozessschritte sind somit zum aktuellen Zeitpunkt nicht erforderlich.

8.2.2 Nährwertanalytik (*Pleurotus sapidus*)

Für die Analytik der Nährwerte wurde das geerntete Pilzmyzel mit dest. Wasser gewaschen, bis dies optisch keine Verfärbung aufgrund anhaftender Medienbestandteile mehr aufwies. Anschließend wurde das Myzel eingefroren und die entsprechende Feuchtmasse durch ein Partnerlabor der Quh-Lab auf die Nährstoffbestandteile analysiert. In der nachfolgenden Tabelle 9 sind die entsprechenden Ergebnisse der Analytik abgebildet.

Mithilfe der Trockenschrank-Methodik wurde außerdem der Wasseranteil des Pilzmyzels bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass 100 g Feuchtmasse etwa 5 g Trockenmasse entsprechen.

Tabelle 9: Ergebnisse der Nährwertanalyse bezogen auf die Feuchtmasse des frischen Pilzmyzels

Parameter	Ergebnis	Einheit
Energie	70	kJ/100g
	17	kcal/100g
Fett	1,1	g/100g
Kohlenhydrate - davon Zucker	1,1	g/100g
	1,1	
Gesamteiw eiß	0,6	g/100g
Salz	< 0,03	g/100g

Die Proteinzusammensetzung bezüglich des Aminosäureprofils und somit der biologischen Wertigkeit wurde im weiteren Verlauf des Projekts ermittelt. Relevant in Bezug auf die physiologische Güte des Lebensmittels ist ebenfalls die Fettsäurezusammensetzung, besonders hinsichtlich des Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren (omega-3 und omega-6-Fettsäuren).

8.2.2.1 Proteingehalt und Aminosäureprofil

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Dumas für verschiedene Fermenterläufe bestimmt (Lukas Sacher 2023). Bei der Methode von Dumas handelt es sich um eine Elementaranalyse bei welcher der Gesamtstickstoffgehalt bestimmt wird. Dagegen wird bei der häufiger verwendeten Methode nach Kjeldahl wird dagegen nur organischer Stickstoff bestimmt. In Tabelle 10 ist die Gesamtsumme an Aminosäuren zu 45,7 g/100 g in Trockenmasse angegeben. Davon sind 39,40 g/100 g proteingebunden. Der Gesamtstickstoffgehalt wurde sowohl über Elementaranalyse nach der Methode von Dumas als auch mit HPLC bestimmt. Über den durchschnittlichen Anteil an Stickstoff im Protein wurde ein Konversionsfaktor von 4,69 ermittelt (Summe Aminosäuren proteingebunden/Gesamtstickstoff HPLC-Analytik). Mit diesem kann aus dem nach Dumas ermittelten Stickstoffgehalt auf den Proteingehalt rückgeschlossen werden. Für Fermenterproben im 2 l-Fermenter mit und 30 g/l Biertreber und 50 g/l Zuckerrübenmelasse als Substrat nach Prozessoptimierung wurde mit einem Konversionsfaktor von 4,69 ein Proteingehalt von $40,79 \pm 0,12$ % ermittelt (Tabelle 10 (2)). Bei den Werten (1) war die Sauerstoffzufuhr nicht optimal geregelt. Zwischen den Werten unter (1) und (2), (3) wurde die Prozessführung geändert. Im ersten Fall wurde die Zuckerrübenmelasse kontinuierlich

zugeführt. Für 1 min wurde 35 g /l zugeführt dann 1 min Pause usw. Im zweiten Fall wurde Substrat komplett im Batch vorgelegt. Sauerstoffzufuhr war hier am Start der Fermentation 0,5 l/min Luftzufuhr und 200 rpm Rührgeschwindigkeit. Weiterhin wurde, wenn der $pO_2 < 80$ % die Rührgeschwindigkeit auf 250 rpm und Luftzufuhr auf 1 l/min erhöht. Wenn der pO_2 -Wert wieder unterschritten wurde, wurde die Luftzufuhr wieder auf 70% reduziert. Wenn der pO_2 -Wert erneut unterschritten wurde, wurde die Luftzufuhr auf 1,2 l/min und bei einer weiteren Unterschreitung auf 1,5 l/min erhöht.

Tabelle 10: Analyseergebnisse der Proteinbestimmung

Analysewert	Gehalt in g/100 g Trockenmasse
Summe Aminosäuren	45,71±01,2
Summe Aminosäuren proteingebunden	39,40
Gesamtstickstoff HPLC-Analyse	8,39
Gesamtstickstoff nach der Dumas-Methode	
(1)	3,61±0,03
(2)	8,69±0,09
(3)	8,27±0,05
Durchschnittlicher Stickstoffanteil im Protein	21,30
Stickstoff-zu-Protein-Konversionsfaktor	4,69
Proteingehalt	
(1)	16,95±0,15
(2)	40,79±0,40
(3)	38,82±0,25

Von der Universität Parma (einem Partner von Quh-Lab) wurde nach Kjeldahl mit einem Konversionsfaktor von 4,07 für die Rohproteinmasse mit *Pleurotus sapidus* und 30 g/l Biertreber und 50 g/l Zuckerrübenmelasse als Substrat ein Proteingehalt von $38,1 \pm 3,9$ % ermittelt. Vergleiche von Kulturen mit anderen Pilzen bei Quh-Lab zeigten hier deutlich geringere Proteingehalte. Das ebenfalls von der Universität Parma ermittelte Aminosäureprofil zeigt einen hohen Anteil an Leucin und Glutaminsäure. Insgesamt zeigt die Analyse der Universität Parma allerdings zu geringe Mengen an Aminosäuren (Tabelle 11).

Tabelle 11: Aminosäureprofil durch die Universität Parma ermittelt.

Aminosäure	Kürzel	% w/w	essentiell
Alanin	ALA	0,87	nein
Arginin	ARG	0,66	semi
Asparaginsäure	ASP	0,89	nein
Cystein	CYS	0,17	nein
Glutaminsäure	GLU	1,87	nein
Glycin	GLY	0,18	nein
Histidin	HIS	1,22	semi
Isoleucin	ILE	1,37	ja
Leucin	LEU	2,46	ja
Lysin	LYS	0,01	ja
Methionin	MET	0,22	ja
Phenylalanin	PHE	1,35	ja
Prolin	PRO	0,63	nein
Serin	SER	0,60	nein
Threonin	THR	0,85	ja

Tryptophan	TRP	0,18 ja
Tyrosin	TYR	0,74 nein
Valin	VAL	1,35 semi

Semi bedeutet, dass diese Aminosäuren unter bestimmten Bedingungen, wie beim Wachstum oder bei schweren Verletzungen, mit der Nahrung aufgenommen werden müssen.

Für die Proteinmasse aus Tabelle 10 wurden an der HSHL 17 Aminosäuren identifiziert und quantifiziert. Das folgende Aminosäureprofil wurde ermittelt (Tabelle 12):

Tabelle 12: Aminosäureprofil an der HSHL analysiert.

Aminosäure	Kürzel	% w/w	essentiell
Alanin	ALA	2,59	nein
Arginin	ARG	4,38	semi
Asparaginsäure	ASP	3,94	nein
Cystein	CYS	0,57	nein
Glutaminsäure	GLU	8,14	nein
Glycin	GLY	2,08	nein
Histidin	HIS	3,20	semi
Isoleucin	ILE	1,80	ja
Leucin	LEU	3,00	ja
Lysin	LYS	2,70	ja
Methionin	MET	0,86	ja
Phenylalanin	PHE	1,76	ja
Prolin	PRO	2,11	nein
Serin	SER	2,11	nein
Threonin	THR	2,30	ja
Tryptophan	TRP		ja
Tyrosin	TYR	1,65	nein
Valin	VAL	2,20	semi

Die Analyse der proteinogenen Aminosäuren wurde nach internationaler Norm EN ISO 13903:2005 durchgeführt. Verwendet wurde die Nexera HPLC-Anlage der Firma Shimadzu Corp. in Kombination mit einer Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin, das als spezielle Lösung von der Firma SYKAM stammte. Anhand des Balkendiagramms ist zu erkennen, dass TRP nicht identifiziert werden konnte. Die ausgewählte Methode gilt nicht für die Bestimmung von Tryptophan oder hydroxylhaltigen Analogen von Aminosäuren. Cystin/Cystein und Methionin wurden vor der Hydrolyse zu Cysteinsäure bzw. Methioninsulfon oxidiert. Tyrosin muss in Hydrolysaten von nicht oxidierten Proben bestimmt werden. Alle anderen aufgeführten Aminosäuren können entweder in der oxidierten oder nicht oxidierten Probe bestimmt werden (Abbildung 19).

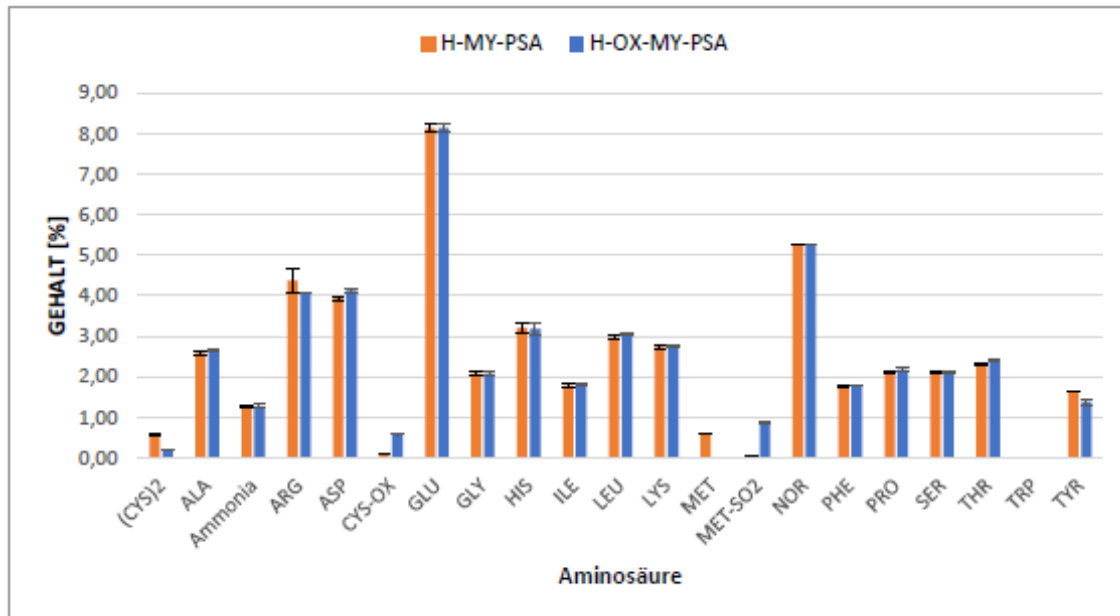


Abbildung 19: Vergleich von nicht-oxidierten und oxidierten Hydrolysaten der Pilzmyzelproben (orange: nichtoxidiert, blau: oxidiert)

Daraus lässt sich der essentielle Aminosäureindex und die biologische Wertigkeit nach Oser (Oser 1959) berechnen. Als Referenz dient das 1985 von der WHO festgelegte Referenzprotein (WHO, Technical Report Series No. 724, Energy and protein requirements, 1985, S. 121, Table 38) (Tabelle 13).

Tabelle 13: Aminosäureprofil des Referenzproteins der WHO (1985)

Aminosäuren	g pro 100 g Eiweiß
Histidin	1,6
Isoleucin	1,3
Leucin	1,9
Lysin	1,6
Methionin + Cystein	1,7
Phenylalanin + Tyrosin	1,9
Threonin	0,9
Tryptophan	0,5
Valin	1,3

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$EAAi = \sqrt[n]{\left(\frac{AS1p}{AS1r} \cdot 100\right) \cdot \left(\frac{AS2p}{AS2r} \cdot 100\right) \dots}$$

Die Berechnung erfolgt analog zu Dissertation von J. Ahlborn (Ahlborn 2019). CS-Werte über 100 werden damit vor der Berechnung des EAAs auf 100 gesetzt. Die Biologische Wertigkeit (BW) ist definiert als die Menge Nahrungsprotein, die 100 g Körpereweiß ersetzen kann.

Die biologische Wertigkeit ergibt sich damit zu

$$Biologische\ Wertigkeit\ (BW) = EAAi \cdot 1,09 - 11,7$$

Daraus wird ein EAAi von 97,86 erhalten und eine biologische Wertigkeit von 94,97 erhalten. Bei der Berechnung wurde der Wert für Tryptophan nicht berücksichtigt. Die Werte aus der Dissertation von Martina Zajul (Zajul 2017) ergaben für die Fermentation von *Pleurotus sapidus* in Isomaltulose einen EAAi von 86 und eine BW von 82, während die Dissertation von Jenny Ahlborn (Ahlborn 2019) von *Pleurotus sapidus* auf Apfeltrester einen EAAi von 82 und eine BW von 77 zeigte.

8.2.2.2 Bestimmung der Kjeldahl-Faktoren

Für die Proteingehalte wurden zwei Methoden eingesetzt.

Klassisch wird der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt und mit einem Umrechnungsfaktor N in den Proteingehalt umgerechnet:

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

N Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor

$\sum AA_{res}$ Summe der proteingebundenen Aminosäuren in g / 100 g Trockenmasse

$N_{ges \text{ in AS}}$ Gesamtproteinstickstoff über AS-Verteilung ermittelt in g / 100 g Trockenmasse

In den Proben die nach Dumas analysiert wurden wurde ein Gesamtstickstoffgehalt von 8,39 g/100 g durch HPLC-Analyse gemessen. Die Summe der proteingebundenen Aminosäuren wurde zu 39,40 g/100 g bestimmt. Dabei wurden die nicht gemessenen Aminosäuren nicht berücksichtigt. Damit ergibt sich der Umrechnungsfaktor N zu 4,69.

8.2.3 Evaluation des 195 l-Bioreaktors

Der im ersten Arbeitspaket definierte Bioreaktor wurde aufgrund der während des Projektablaufes herrschenden Lieferschwierigkeiten von Produktions- und Zubehöerteilen, bedingt durch COVID-19, erst am 15.08.2022 an die HSHL geliefert. Es gab, durch die stark gestiegenen Preise von Rohstoffen in diesem Zeitraum und den während der Entwicklungsphase des Reaktors durchgeführten Kultivierungen, Änderungen in der Bauweise des Reaktors. Die wesentlichen waren die Abweichung von der Druckbehälterrichtlinie und die Erhöhung des Volumens des Reaktors. Der Reaktor hat jetzt ein Arbeitsvolumen von 195 Litern. Durch die Abweichung von der Druckbehälterrichtlinie kann der Reaktor nur mit einem Überdruck von bis zu 0,5 bar betrieben werden, was eine Temperatur im Reaktorinneren von maximal 110°C zulässt. Daher müssen neue Sterilisationsprozesse angepasst und evaluiert werden. Durch das größere Arbeitsvolumen war auch der Reaktor größer als geplant und zum Anheben des Reaktordeckels zur Reinigung und für Wartungsarbeiten wurde ein Kran entwickelt und mitgeliefert.

8.2.3.1 Technischer Aufbau des 195 l-Bioreaktors

Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen den Aufbau des Bioreaktors. In Abbildung 22 ist das zugehörige Rührwerk dargestellt. Der Reaktor hat eine Ernteventil am Boden. Um zu Ernten kann der Reaktor über das Gestell mit dem Kran höher gesetzt werden. Zur Prozessüberwachung sind eine Füllstandsonde, eine Schaumsonde, eine pH-Sonde ein Temperaturfühler und eine Sauerstoffsonde integriert. In der Abluft ist ein CO₂-Sensor eingebaut (nicht in der Zeichnung dargestellt). Die Temperierung geschieht durch ein an den Doppelmantel angeschlossenes Umwälzthermostat, welches auch in die Regelung integriert ist. Zur Sterilisierung des Fermenterinhalt wird Wasserdampf in den Doppelmantel gegeben.

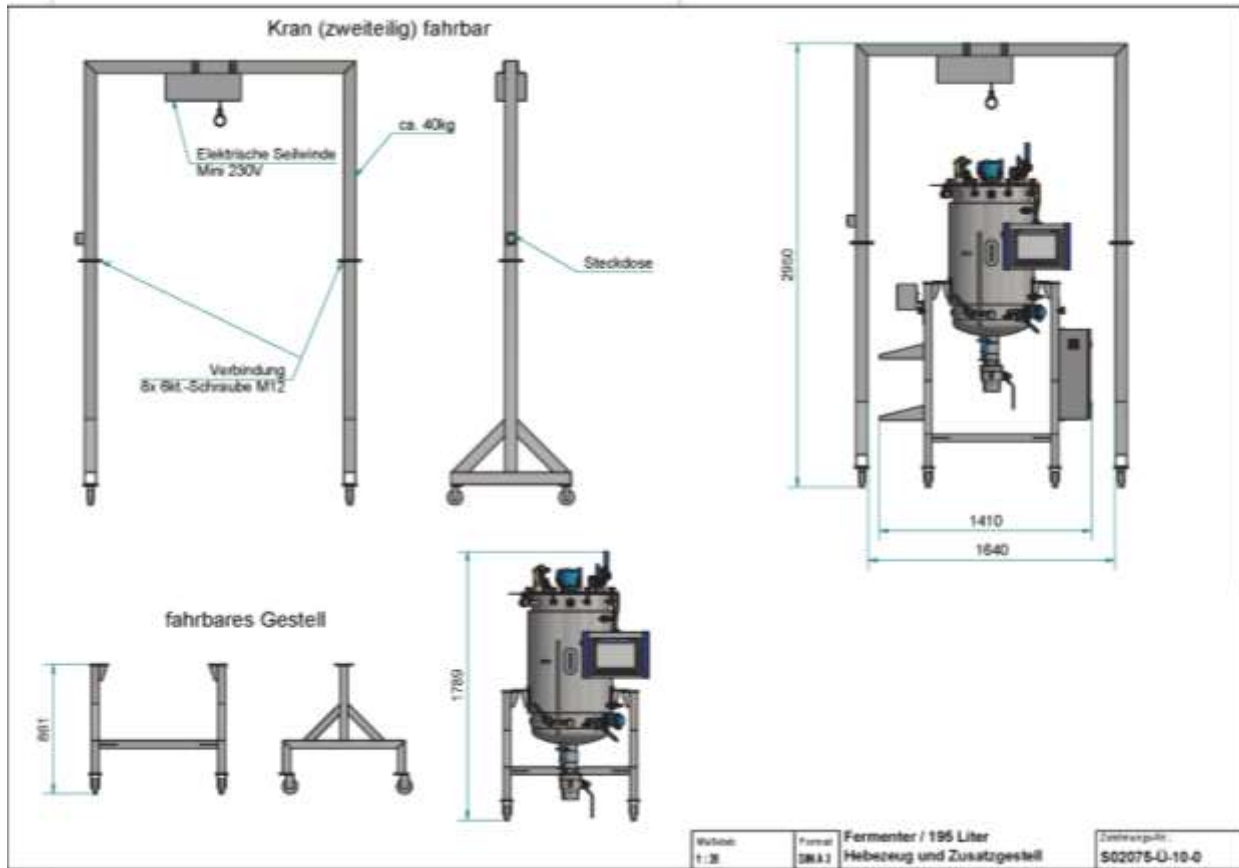


Abbildung 20: Technische Skizze des 195 l-Bioreaktors mit Kran

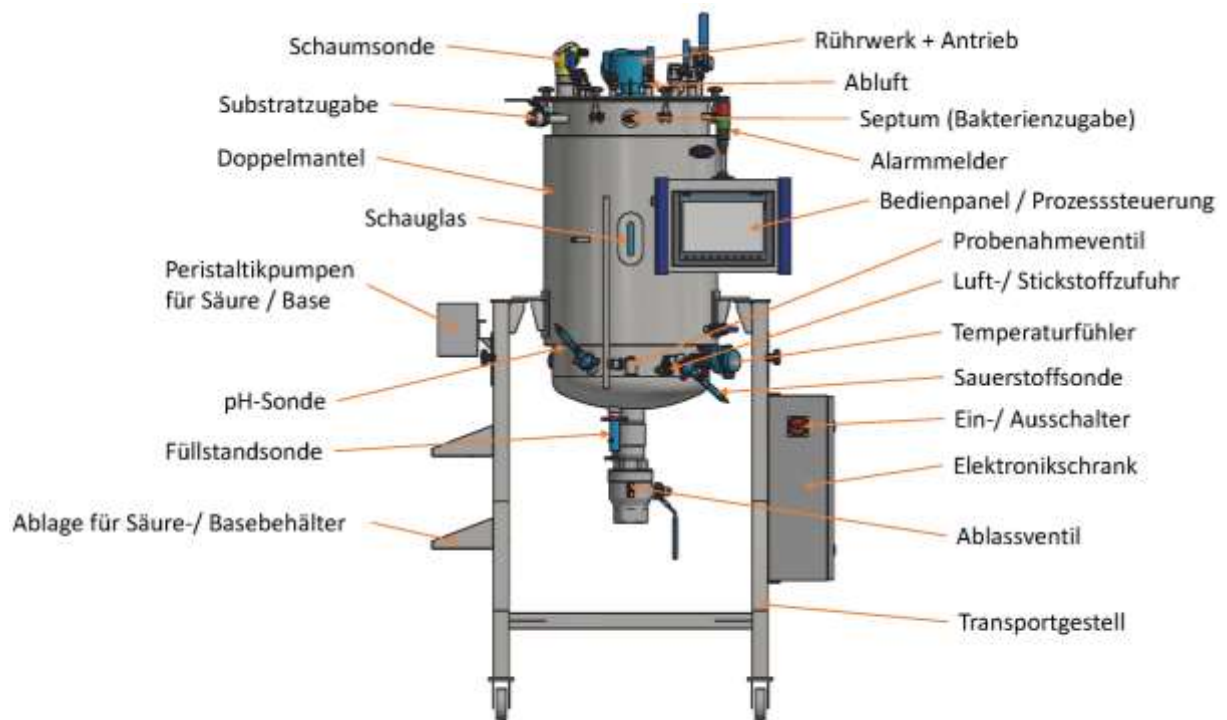


Abbildung 21: Schematische Zeichnung des Bioreaktors mit den wichtigsten Komponenten



Abbildung 22: Technische Zeichnung der Rührwelle mit Rührblättern und Antrieb

Der im Labor aufgebaute Reaktor ist in Abbildung 23 zu sehen. Die Zuluft wird über eine Fitereinheit steril filtriert (Abbildung 24), um Kontaminationen über die Abluft zu vermeiden. Der Reaktor kann über ein Bedienpanel (Abbildung 25) geregelt und gesteuert werden. Regelt wird die Temperatur und der pH-Wert sowie die Luftzufuhr. Da es sich bei dem Fermenter um einen Prototypen handelt, waren zunächst Vorversuche mit VE-Wasser notwendig, um die Funktionsfähigkeit des Fermenters, der Sonden, des Rührwerks und der Prozesssteuerung zu überprüfen.



Abbildung 23: 195 Liter - Fermenter.



Abbildung 24: Zuluftstrecke über Filtereinrichtung und Lufzufuhrregulator.



Abbildung 25: Bedienpanel mit Steuerungssoftware

8.2.3.2 Bestimmung des Kulturvolumens bzw. Auslitern des Fermenters

Die Bestimmung des Kulturvolumens im Fermenter erfolgt mit Hilfe des Füllstandsensors. Allerdings gibt dieser nur die Höhe des Kulturvolumenstandes in Zentimeter an. Deshalb wurde eine Kalibrierkurve (Abbildung 26) erstellt, anhand der das Kulturvolumen im Fermenter aus dem Füllstand ermittelt werden konnte, wenn dieser zusätzlich mit Rührwelle und 2 Impellern bestückt ist. Der Fermenter wurde dafür geschlossen und über einen Trichter wurden definierte Volumina an VE-Wasser zugeführt und die zugehörigen Füllstände

notiert. Anfangs wurden kleinere Volumina von 500 ml Wasser zugeführt, dann auf 1 l-, 2 l- und schließlich 5 l-Volumina Schritte erhöht. Daraus ergab sich die in Abbildung 26 aufgeführte Kalibriergerade, wobei Volumina von weniger als 4 l von der Kalibriergeraden abweichen. Das liegt an dem langen Ablassstutzen am Fermenter.

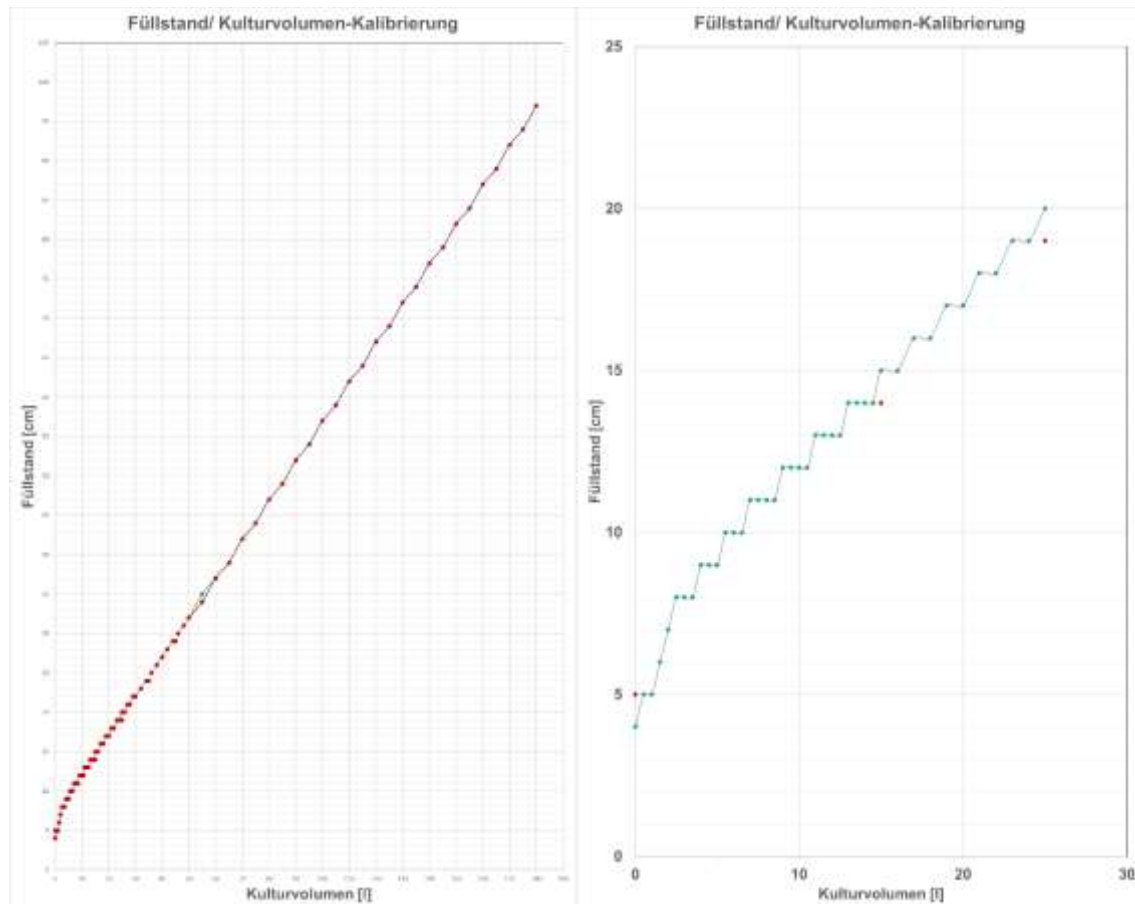


Abbildung 26: Kalibrierung des Reaktorfüllstands [cm] zu Kulturvolumen [L]. Links: kompletter Fermenter, rechts: bis zu 25 l Kulturvolumen.

Insgesamt fasst der Fermenter bis zu den oberen seitlich angebrachten Öffnungen 180 l.

8.2.3.3 Temperierung des Reaktors

Die Temperierung des Fermenters erfolgt über den Doppelmantel am Fermenter, der mit Wasser gefüllt wird und mit einem externen Thermostaten verbunden ist. Die Steuerung des Thermostaten wird über die Prozesssteuerung am Bedienpanel geregelt. Zur Überprüfung der Regelung wurde der Fermenter mit 50 l VE-Wasser befüllt und eine Solltemperatur von 90°C eingestellt. Diese Temperatur konnte zunächst nicht erreicht werden, da die Aufheizintervalle für den Thermostaten zu sensibel gesteuert wurden und so sich das Wasser im Fermenter extrem langsam aufwärmte. Eine Nachjustierung war nötig und wurde durchgeführt. Zur Sterilisation des Fermenters wurde der Fermenter mit einem Dampfsterilisator, wie in Abbildung 27 ersichtlich ist, über das Probenahmeventil verbunden. Der Innenraum einschließlich der Anschlüsse wurde ca. 40 Minuten dampfsterilisiert, wobei eine Temperatur von 100,9°C erreicht wurde. Da der Fermenter nicht druckstabil ist, konnte die Sterilisation bisher nicht mit Überdruck betrieben werden. Ein Überdruck von 0,5 bar und damit 110°C wäre möglich aber ist bisher noch nicht getestet.



Abbildung 27: Anschluss des Dampfsterilisators über das Probenahmeventil

8.2.3.4 Probelauf im 195 l-Fermenter

Die erste Scale-up Kultivierung mit PSA im 195 l-Fermenter erfolgte als Batch-Prozess mit 45 l-Kulturvolumen. Da bei einem solchen Volumen nicht beide Rührblätter in das Kulturgut eintauchen, wurde das 1. Rührblatt auf der untersten Position der Rührwelle fixiert und das 2. Rührblatt einfach etwas höher angebracht und der Deckel geschlossen, das Abluftventil jedoch geöffnet.

Um eine Kontamination des Fermenters über die Abluft zu vermeiden, wurde diese über ein zuvor autoklaviertes System bestehend aus 4 miteinander verbundenen 1 l-Gewindeflaschen geleitet, die jeweils mit einem Mehrfachverteiler mit 2 Oliven verschlossen waren. Die Gewindeflaschen wurden nach dem Prinzip einer Woulff'schen Flasche mit der Abluft durchströmt. Dazu wurde die Fermenterabluft nacheinander in eine leere Flasche, in eine, die zur Hälfte mit 1 molarer Schwefelsäure gefüllt war, in eine, die zur Hälfte mit VE-Wasser gefüllt war und erneut in eine leere Flasche geleitet und schließlich über einen Abzug nach draußen transportiert. Sämtliche Flaschen standen zudem in einem Eisbad, um Kondensat abzuscheiden (Abbildung 28 und Abbildung 29).



Abbildung 28: Abluftstrecke durch Flaschen, die wie folgt befüllt waren: 1 leer, 2 1 mol/l H_2SO_4 3 VE-Wasser, 4 leer.



Abbildung 29: Abluftstrecke im Eisbad.

Für die pH-Kontrolle am Fermenter wurden jeweils 2 l einer 1 molaren Natronlauge und 0,97 molaren Schwefelsäure hergestellt und in 5 l-Kanister mit Schwimmfühler gefüllt.

Als Batchmedium wurde BT30ZRM25 verwendet. Da eine perfekte Sterilisation des Mediums im Fermenter bei 120°C nicht möglich war und eine Sterilisation bei 70°C sehr zeitintensiv gewesen wäre, wurde beschlossen, aufkonzentriertes Medium in 1 l-Gewindeflaschen zu autoklavieren und über einen sterilen Trichter in den Fermenter zu füllen. Anschließend sollte so viel UV-bestrahltes Reinstwasser zugefügt werden bis der Füllstandsensoren eine Füllhöhe von 30 cm anzeigt, was laut Kalibriergeraden einem Volumen von 45 l entspricht. Für die Aufkonzentrierung wurden ein BT-Medium, ein ZRM-Medium und eine Salzlösung wie in Tabelle 14 aufgeführt ist, hergestellt. Dazu wurden die Substrate in 5 l-Eimern eingewogen, mit der angegebenen Menge Wasser versetzt, gut umgerührt und auf 1 l-Gewindeflaschen verteilt. Sämtliche Nährmedien und die Salzlösung wurden anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach Einfüllen der autoklavierten Medien und der Salzlösung in den Fermenter wurde das keimfreie Reinstwasser in Literschritten hinzugefügt. Beim BT-Medium wurde nach Sedimentation nur der Überstand in den Fermenter transferiert, wobei auch Feststoffteilchen mit in den Fermenter gelangten.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Nährmedien und der Salzlösung für die 195 I-Fermentation

Medien / Lösung	Komponente	Menge
BT-Medium	Biertreber	1349,44 g
	Reinstwasser	4,3 l
ZRM-Medium	Zuckerrübenmelasse	1125,45 g
	Reinstwasser	4,3 l
Salzlösung	KH ₂ PO ₄	67,534 g
	MgSO ₄ · x H ₂ O	22,506 g
	SE1-Lösung	45 ml
	Reinstwasser	1 l

Als nächstes wurde der Rührer mit 40 rpm in Betrieb genommen, der pH-Wert des Mediums am Bedienpanel auf 6,0 und die Temperatur für das Kulturgut auf 24°C eingestellt. Nach ca. 4 h war die Temperatur des Kulturgutes auf 29,2°C gesunken und es konnte inokuliert werden.

Zur Herstellung des Inokulums wurden 300 ml PSA-Vorkultur als Schüttelkultur angesetzt, die nach 23 Tagen mit dem Dispergiergerät homogenisiert wurden. Für die 2. PSA-Vorkultur wurden 5 x 1 l Erlenmeyerkolben mit 350 ml MEM befüllt und mit jeweils 50 ml der 1. PSA-Vorkultur angeimpft. Nach einer 5-tägigen Schüttelinkubation bei 150 rpm und einer Raumtemperatur von 20°C wurden 4 der 5 Kulturen in einen autoklavierten 2 l Eimer geschüttet und mit einem handelsüblichen Haushaltspürerstab (sterilisiert mit 70 %iger Ethanol-Lösung) homogenisiert, so dass 1,6 l Inokulum erhalten wurde. Die 5. Kultur wurde verworfen, da eine Eintrübung auf eine Kontamination hindeutete, die restlichen Kulturen dufteten hingegen stark nach Anis, ein Zeichen, dass die Kulturen von guter Qualität sind.

Zur Animpfung des Fermenters wurden die 1,6 l Inokulum über einen sterilen Trichter in den Fermenter geschüttet. Das entsprach nur 3 % des Kulturvolumens. Bei den 2 l Fermentationen wurden immer 10 % Inokulum eingesetzt. Schließlich wurde noch 20 l min⁻¹ steriltfiltrierte Luft über einen Ringsparger am Boden in den Fermenter geleitet. Nach 15,5 h wurde die Luftzufuhr auf 40 l min⁻¹ erhöht, da der Sauerstoffgehalt stark gesunken war. Nach weiteren 3:08 h wurde eine 50 ml Probe genommen und 200 µl davon auf eine LB-Agarplatte zur Keimkontrolle ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag nach 43:48 h wurde die Rührgeschwindigkeit auf 70 rpm erhöht, da der Sauerstoffgehalt weiter gesunken war und einen Wert von 0,1 mg l⁻¹ anzeigte. Inzwischen waren 1,08 l 0,97 molare Schwefelsäure zum Kulturmedium zugepumpt worden. Nach 44:43 h wurde eine 2. Probe (45 ml) genommen. 200 µl wurden erneut auf LB-Agar ausgestrichen und ein Tropfen unter dem Mikroskop untersucht. Pilzsporen waren deutlich sichtbar, aber auch eine Vielzahl von Stäbchenbakterien, wie auf Abbildung 30 zu erkennen ist. Nach 64:04 h wurde eine 3. Probe (45 ml) entnommen und die Fermentation beendet. Es wurden insgesamt 1,15 l der 0,97 molaren Schwefelsäure zur Kulturlösung hinzugefügt, die mittlerweile sauerkrautartig stank und keine Anisaromen mehr verströmte.

Nach etwa 24 Stunden Inkubation auf dem LB-Agar zeigte die erste Probe nur einen ca. 1 cm² großen, schleimigen Fleck. Der Fermenter war zu diesem Zeitpunkt kaum kontaminiert, aber bei der 2. Probe ist auf dem LB-Agar ein durchgehend weißer, schleimiger Belag sichtbar, siehe Abbildung 30, d.h. dass der Fermenter nach 44:00 h schon stark kontaminiert war. Der Fermenterinhalt wurde nicht weiter bearbeitet, sondern entsorgt.



Abbildung 30: Probe nach 48 h Kultivierung. Links auf LB-Agar und rechts Flüssigprobe unter dem Mikroskop.

Die Prozessführung ist bezüglich der Sterilisation noch zu optimieren. Längere Aufheizzeiten des Kulturmediums sind notwendig. Die Menge des Inokulums muss vermutlich erhöht werden und die Befüllung muss zusätzlich über eine Flamme steril gehalten werden. Für den Produktionsbetrieb wäre eine Zufuhr von Medien über einen direkt angeschlossenen Autoklav sinnvoll.

8.2.4 Kultivierungsversuche im 5 l-Fermenter mit flüssigem Substrat

Die Hauptkultur von *Pleurotus sapidus* im 5 l-Fermenter wurde in M2-Medium (siehe Tabelle 5) unter Zusatz von Isomaltulose-Melasse durchgeführt.

Als Stickstoffquelle diente zunächst Hefeextrakt, welches in einer Konzentration von 3 g/l verwendet wurde. In weiteren Versuchen wurde Hefeextrakt teilweise durch Frischhefe (Hefewürfel) und Trockenhefe ersetzt. Als Kohlenstoffquelle wird Isomaltulose-Melasse in einer Konzentration von 100 ml/L eingesetzt.

Der für die Hauptkultur eingesetzte Bioreaktor (RALF der Firma Bioengineering) weist ein Volumen von 5 Litern auf und verfügt über folgende Sensoren und Dosiereinrichtungen (Abbildung 31):

- pH-Sonde
- pO₂-Sonde
- Schaum-Sonde
- Temperatursonde
- automatisierte Schlauchpumpe zur pH-Wert-Einstellung mit Vorratsflaschen für Säure (0,5 mol/l Schwefelsäure) und Lauge (0,5 mol/l Kaliumhydroxid)
- Temperaturkontrolle durch Kühl- und Heizelemente



Abbildung 31: Inokulierter 5 l-Bioreaktor vor dem Start der Inkubation.

Die Inokulation erfolgt mit 10 % Vorkultur (300 ml), die anschließende Kultivierung erfolgt für 5 Tage bei 24°C, einem pH-Wert von 6 und einer Rührerdrehzahl von 200 rpm unter Lichtausschluss. Der prinzipielle Prozessablauf ist in Abbildung 32 gezeigt.



Abbildung 32: Prozessablauf zur Kultivierung von *Pleurotus sapidus* auf flüssigem Substrat im 5 l-Bioreaktor.

Die Ernte des Myzels erfolgt über ein Passiertuch. Das feuchte Myzel wird mit dest. Wasser gewaschen, bis die orange-bräunliche Färbung nicht mehr sichtbar ist. Anschließend wird direkt nach der Ernte die Feuchtmasse bestimmt. Nach entsprechender Trocknung im Trockenschrank (6 h bei 105°C) wird für eine bessere Vergleichbarkeit zusätzlich die Trockenmasse bestimmt.

8.2.5 Neues semifest-Substrat-Medium (Quh-Lab)

Quh-Lab hat sich für ein neues festes Substrat (Nebenstrom aus der Zuckerindustrie) entschieden und die Zusammensetzung des Mediums insoweit optimiert, damit keine zusätzliche Stickstoffquelle benötigt wird. Die Fermentation wurde auch mit entsprechend auf

dem neuen Substrat gut wachsenden neue Pilzstämmen durchgeführt. Das entwickelte Rezept bzw. Medium ist viel einfacher als das mit *Pleurotus Sapidus* und benötigt nur drei Zutaten außer den Vorkulturen (das feste Substrat, ein flüssiges Substrat und Wasser). Dies wird als semifestes Substrat-Medium bezeichnet.

8.2.5.1 Züchten von Fruchtkörpern für die Sporenisolation der zwei neuen Stämme

Das gequollene Substrat wurde leicht ausgedrückt, in Mikrofilterbeutel gefüllt und der Beutel anschließend mit Autoklavierband verschlossen. Nach dem Autoklavieren wurden die Beutel mit den entsprechenden Stämmen angeimpft. Dazu wurde für jeden Beutel ein etwa 3 cm² großes Stück einer bewachsenen Agarplatte in 30 ml Malzextrakt (20 g/l) homogenisiert und anschließend die Suspension zu dem Substrat in den Beutel gegeben. Durch leichtes Durchkneten wurde das Inokulum im gesamten Substrat verteilt.

Die Beutel wurden dann bei 24°C im Dunkeln gelagert, bis das Substrat vollständig mit Myzel durchzogen war. Danach wurden die Beutel so gelagert, dass sie tagsüber Licht bekamen und alle 3–4 Tage mit einigen Millilitern sterilem Wasser beträufelt, sodass keine Staunässe entstanden ist.

In Abbildung 33 werden die Fruchtkörpereinsätze von den zwei Stämmen gezeigt, die jeweils 2,5 Monaten kultiviert wurden.



Abbildung 33: Fruchtkörpereinsätze zweiter Pilzstämmen, die jeweils über 2,5 Monate kultiviert wurden

Die Sporenisolation erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank. Alle verwendeten Materialien wurden autoklaviert oder ausgeglüht, um das Kontaminationsrisiko gering zu halten. Die Lamellen wurden mit PBS ausgespült. Die erhaltene Suspension wurde in ein auf Eis gelagertes Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach abgeschlossener Sporenisolation wurde dieses bei –80°C eingefroren.

Da bei dem Ansatz von Stamm 1 nur ein großer Fruchtkörper (Abbildung 34) erhalten wurde, konnten nur geringe Mengen Sporen isoliert werden. Bei dem Ansatz von Stamm 2 waren mehrere Fruchtkörper (Abbildung 35) vorhanden.

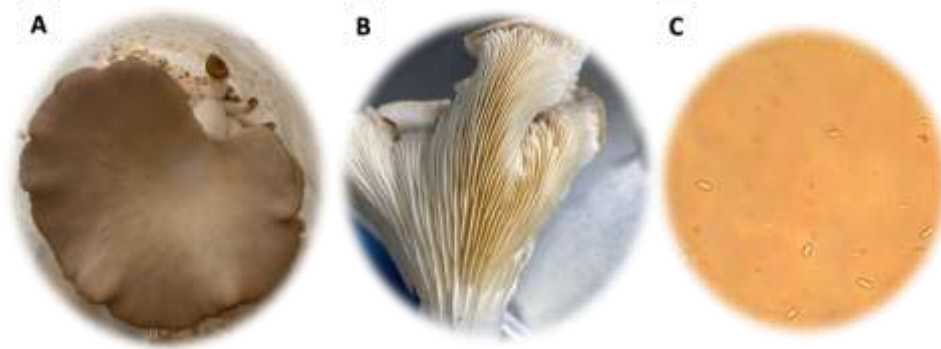


Abbildung 34: A Fruchtkörper von Stamm 1 vor der Ernte; B Unterseite/Lamellen des Fruchtkörpers von Stamm 1 nach der Ernte; C Isolierte Sporen unter dem Mikroskop betrachtet (Vergrößerung 400x)

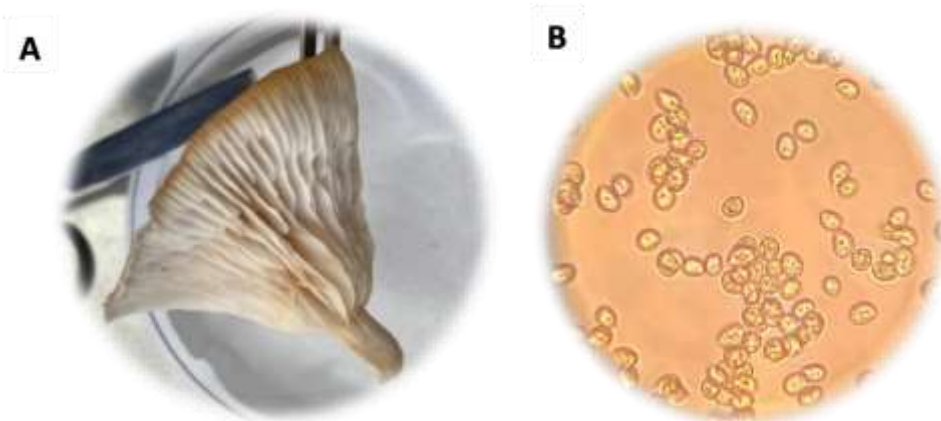


Abbildung 35: A Unterseite/Lamellen des Fruchtkörpers von Stamm 2 nach der Ernte; B Isolierte Sporen von Stamm 2 unter dem Mikroskop betrachtet (Vergrößerung 400x)

8.2.6 Kultivierung im 5 l-Reaktor mit semifest-Substrat-Medium

Mit den von Quh-Lab verwendeten neuen Stämmen und mit dem von Quh-Lab entwickelten semifest-Substrat-Medium läuft die Kultivierung der Vorkulturen 7 Tage und die Hauptkultur im 5 l-Reaktor dauert bis zu 7 Tagen.

Im 5 l-Reaktor wurden Optimierungen des semifest-Substrat-Mediums, der Rührgeschwindigkeit und der Nutzung vom Antischaummittel durchgeführt. Auch wurde die Sterilisationsmethodik getestet und durchgeführt (sowohl in einem Autoklav (120°C) als auch in einem selbst-designten Desinfektionsbehälter (100°C), um den Prozess wirtschaftlicher zu betreiben und auf das Scale-up vorzubereiten.

Der 5 l-Reaktor wurde mit dem semifesten-Substrat-Medium befüllt. Dann wird der Reaktor vorbereitet, indem er komplett einschließlich Säure, Lauge und aller Schläuche auf 100°C bis 120°C erhitzt wurde. Nach Abkühlen das Medium wurde der Reaktor in der Sterilbank mit der Vorkultur innokuliert. Abbildung 36 zeigt den 5 l-Reaktor in der Abkühlphase.³

³ Der Prozess wurde für das flüssige Substrat entwickelt und auf dem semifest-Substrat-Medium weiter verwendet.



Abbildung 36: 5 l-Reaktor beim Abkühlen nach der Sterilisierung im Autoklaven.

In Abbildung 37 ist der Reaktor nach einem erfolgreichen Fermentationslauf und vor der Ernte dargestellt. Hier sieht man Myzelmasse (Pellets) unterschiedlicher Größe und einen Überstand. Nicht nur Myzel aber auch feste Substratreste (kleine schwarze Punkte) sind an den Seiten des Reaktors zu sehen. Diese wurden durch die Bildung vom Schaum während der Fermentation auf die Seiten des Reaktors übertragen und wurden nicht weiter verstoffwechselt.



Abbildung 37: 5 l-Reaktor nach einem erfolgreichen Fermentationslauf mit Stamm 1

Bei einer erfolgreichen Fermentation stellte die Schaumbildung eine erhebliche Herausforderung an den Prozess dar, wie in Abbildung 37 zu sehen ist. Auch in einigen Fällen, wenn nicht zeitnah drauf reagiert wurde, sind die Pilze in der Peripherie des Reaktors gewachsen (Abbildung 38). Ein Nachteil der Schaumbildung ist das Absetzen der Pilze und Substrate auf die Wände des Reaktors (Abbildung 37, Abbildung 38 und Abbildung 39), was die Fermentation bzw. die komplette Verstoffwechslung des Substrats verhindert. Zusätzlich wird dadurch die Füllmenge des Reaktors begrenzt, was wiederum die Ausbeute/Volumen des Myzelmasse bei der Ernte limitiert. Daher wurde das Medium mit einem Antischaummittel ergänzt und andere Ansätze und Methodik wie vorübergehende höhere Rührgeschwindigkeit getestet, um die Schaumbildung zu bekämpfen. Verschiedene lebensmittelkonforme Antischaummittel wurden getestet, wobei eins davon sich als optimal (vom Geruch und effektive Schaumbekämpfung mit geringer Menge) herausgestellt hat.



Abbildung 38: Schaumbildung während des Fermentationlaufs.



Abbildung 39: Ein Fermentationslauf im 5 l-Reaktor ohne Antischaummittel führte zu Myzelwachstum in der Peripherie.

Im 5 l-Reaktor hat eine erfolgreiche Fermentation mit den ausgewählten semi-festen Substraten und neuen Pilzstämmen regelmäßig zu Ausbeuten von >600 g (Abtropfgewicht) Pilzmyzel geführt.

Mit optimierten Parametern (Zugabe von Antischaummittel vor der Inokulation sowie an Tag 5 und 6) wurden weitere Fermenterläufe in 5 l-Reaktor gestartet und jeweils die Trockenmasse sowie der Proteingehalt bestimmt. Bei einem Fermentationslauf ohne optimierte oder mit defekter Temperaturkontrolle, wurde entsprechend schlechteres Wachstum beobachtet. Dies wird auch im verminderten Proteingehalt (Tabelle 15) deutlich. Bei einem Fermentationslauf mit korrekter Temperaturkontrolle hingegen weist die Trockenmasse einen Proteingehalt von 15,6 g/100 g Trockenmasse auf. Die Trockenmassebestimmung erfolgte nach Gefriertrocknung und die Proteingehalte wurden mit einem Umrechnungsfaktor von 5,90 über das Kjeldahl-Verfahren bestimmt. In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Kultivierung des Stammes 1 nach 7-tägiger Kultivierung auf

semifestem-Substrat-Medium bei 24°C, pH6 und 170 rpm Rührgeschwindigkeit (Scheibenrührer) aufgelistet.

Tabelle 15: Ergebnisse der Trockenmassebestimmung nach Gefriertrocknung und der mittels Kjeldahl bestimmten Proteingehalte (Umrechnungsfaktor: 5,90); Stamm 1, 7-tägige Kultivierung auf semifestes-Substrat-Medium bei 24 °C, pH 6 und 170 rpm Rührgeschwindigkeit.

	Trockenmasse [%]	Gesamtrockenmasse [g]	Proteingehalt [g/100 g TM]
Myzel Lauf mit korrekter Temperaturkontrolle	8,2	22,2	15,6 ± 0,6
Myzel Lauf mit defekter Temperaturkontrolle	10,5	30,3	12,4 ± 0,9

Der Fokus im Projekt hat bei Quh-Lab vor allem auf Stamm 1 gelegen, da der Geruch angenehmer und daher besser für die Lebensmittelproduktion geeignet ist.

Stamm 2 wurde parallel dazu untersucht und weiteroptimiert. Dieser zeigt einen leicht erhöhte Proteingehalt im Vergleich zu Stamm 1. Fermentation vom Stamm 2 wurde auf dem semifesten-Substrat in 250 ml Erlenmeyer Kolben durchgeführt und eine Wachstumskurve mit den Ergebnissen erstellt und ausgewertet. Über 10 Tage hinweg wurden täglich Kolben durch Zentrifugation geerntet und die Trockenmasse sowie der Proteingehalt bestimmt (Abbildung 40 und Abbildung 41). Die Medienzusammensetzung war 1,5 g festes Substrat (gemahlen), 0,75 g flüssiges Substrat, 100 ml Wasser. Die Kultivierung erfolgte bei einer Rührgeschwindigkeit von 150 rpm im 250 ml Schüttelkolben bei 24°C. Geerntet wurden jeweils 2 Kulturen/Tag außer am Start- und Endtag (1 Kultur). Wie in Abbildung 40 zu sehen steigt der Proteingehalt bis Tag 4 an, sinkt dann leicht ab und steigt ab Tag 7 nochmals an. Dies deutet darauf hin, dass nicht die gesamten Nährstoffe zu Beginn umgesetzt werden, sondern ein Teil der Nährstoffe erst nach 7-tägiger Kultivierung assimiliert wird. Um das Wachstum genauer zu beurteilen zu können, wurde zusätzlich noch die Trockenmasse bestimmt.

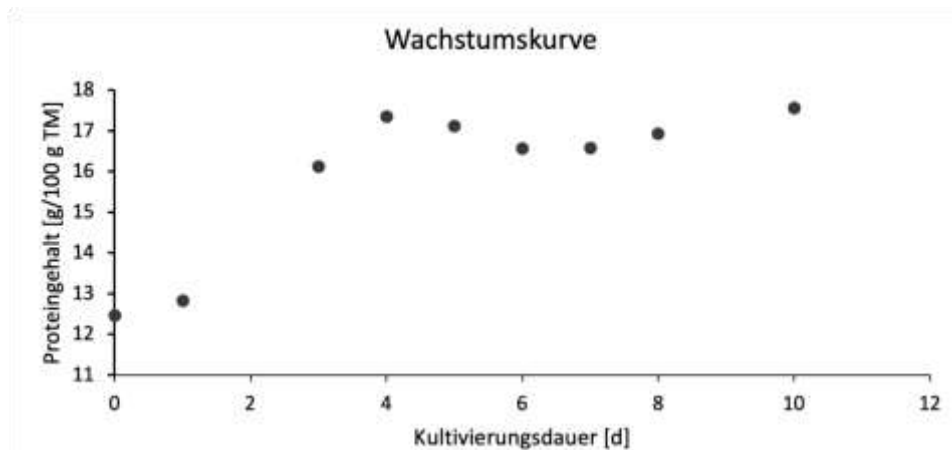


Abbildung 40: Proteingehalt von Stamm 2 über eine Kultivierungsdauer von 10 Tagen.

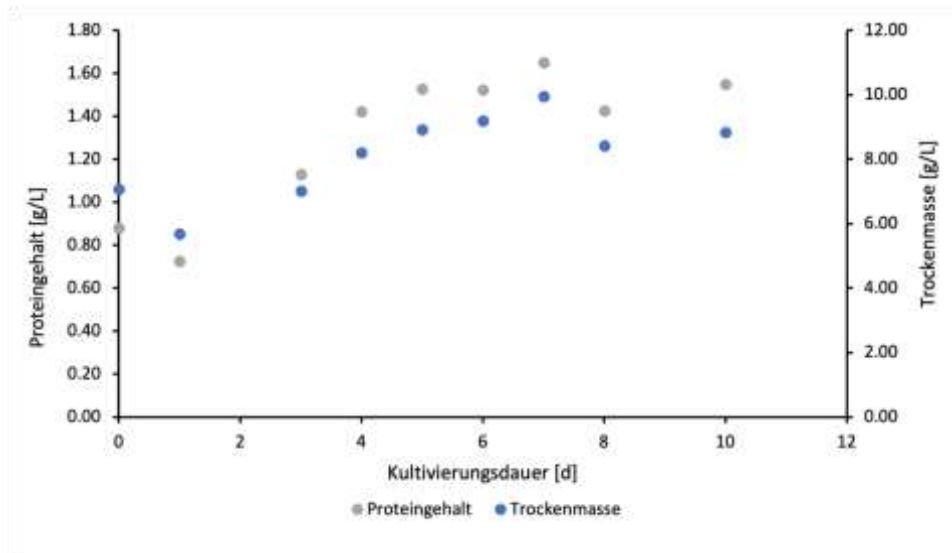


Abbildung 41: Kultivierung von Stamm 2. Darstellung von Proteingehalt und Trockenmasse

Wird der Proteingehalt pro Liter betrachtet (Abbildung 41), so fällt auf, dass dieser Wert bis Tag 7 ansteigt und dann abfällt. Der Wert korreliert sehr stark mit der ermittelten Trockenmasse, die ebenfalls bis Tag 7 ansteigt und dann abfällt. Der maximale Proteingehalt pro Liter wird somit an Kulturtag 7 erreicht.

8.2.6.1 Kohlenhydrat-Bestimmung Myzel und Fermenterüberstand

Über die photometrische Orcinol-Schwefelsäure-Methode (Chaplin und Kennedy 1994) wurde der Gesamtkohlenhydratgehalt im Myzel und Fermenterüberstand untersucht.

Dazu wurden 10 mg Probe mit 2 ml 2 mol/l HCl für zwei Stunden (100°C, 700 U/min) erhitzt und anschließend membranfiltriert. Eisgekühltes Orcinol wurde in konzentrierter Schwefelsäure gelöst (2 g/l) und Proben und Standards (200 µl, 4°C; Proben vorher 1:50 verdünnt) mit 800 µl Reagenz vermischt und für 15 Minuten bei 80°C erhitzt. Die Proben wurden auf RT mit Eis abgekühlt und die Extinktionen bei 420 nm gemessen. Die Konzentrationen wurden durch das Ablesen einer Kalibriergeraden bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16 Ergebnisse der Kohlenhydrat-Bestimmung mittels Orcinol-Schwefelsäure-Methode

Versuch Nr.	Probe	Kohlenhydratgehalt [g/100 g TM]
1	Myzel Stamm 1 (Malzextrakt)	76 ± 18
2	Myzel Stamm 2 (Malzextrakt)	61 ± 15
3	Fermenterüberstand nach Kultivierung (7 Tage, semifestes-Substrat-Medium)	95 ± 2
4	Fermenternte Stamm 1 (7 Tage, semifestes-Substrat-Medium)	59 ± 7

Der Fermenterüberstand weist nach 7-tägiger Kultivierung einen sehr hohen Kohlenhydratgehalt auf. Es wurden daher noch die Überstände vor dem Animpfen sowie nach der Ernte überprüft, um Veränderungen im Kohlenhydrat-Gehalt feststellen zu können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden später im Bericht gezeigt, da die Medienüberstände des 30 l-Reaktors berücksichtigt werden.

8.2.7 Kultivierung im 30 l-Fermenter mit semifest-Substrat-Medium

Ein Scale-up des Prozesses wurde vom 5 l- auf 30 l-Maßstab erfolgreich durchgeführt. Der 30 l-Reaktor ist in Abbildung 42 gezeigt.



Abbildung 42: links der Behälter des 30 l-Reaktors (vorne) - belichtete Schaufenster, Anschlüsse der pH und pO₂ Sonden; rechts die obere Hälfte des 30 l-Reaktors - Abluft, Ventile, Druckmessung, Anschluss der Sonde für Erkennung der Schaumhöhe, Peristaltikpumpen.

Nach nur einigen Kultivierungsläufen im 30 l-Reaktor konnten die ersten Proben an Myzelmasse für Untersuchungen entnommen werden. Proben wurden nach der Ernte und ggf. nach Entwässerung eingefroren. Bei einem Fermentationslauf mit Stamm 1 wird >4 kg an Abtropfgewicht geerntet.

8.2.7.1 Enzymatische Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose im Kulturüberstand und Medium

Um Veränderungen des Mono- und Disaccharid-Musters im Kulturüberstand zu erkennen, wurden die Zuckerkonzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose mittels eines Enzymkits der Firma r-biopharm untersucht.

Für die Probenvorbereitung wurden die entnommenen Kulturüberstände zunächst im Kühlschrank aufgetaut und dann für 15 Minuten in ein 80°C-Wasserbad gestellt, um enzymatische Reaktionen zu beenden. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 6000 g zentrifugiert und der klare Überstand für die Analyse eingesetzt. Die Proben für die Saccharose-Bestimmung wurden 1:10 verdünnt (1 Teil Probe + 9 Teile dd-H₂O). Für die Glucose- und Fructose-Bestimmung wurden die Proben unverdünnt eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. Alle Proben wurden im Jahr 2022 entnommen. Die

Messung der Zucker erfolgte mithilfe des Enzymkits von r-biopharm. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 430 nm gemessen.

Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung der Kulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten.

	D-Glucose [g/l]	D-Fructose [g/l]	Saccharose [g/l]
Medienüberstand vor dem Autoklavieren (5 l-Reaktor)	0,10	0,14	5,4
Medienüberstand nach dem Autoklavieren (5 l-Reaktor)	0,31	0,35	5,1
Medienüberstand nach der Kultivierung (5 l-Reaktor) Lauf 1	0,02	0,00	2,4
Medienüberstand nach der Kultivierung (5 l-Reaktor) Lauf 2 (defekte Temperaturkontrolle)	0,02	0,02	4,2
Medienüberstand nach der Kultivierung (30 l-Reaktor)	0,02	0,02	4,6

Der Tabelle 17 ist zu entnehmen, dass durch den Autoklaviervorgang die Konzentration von Saccharose leicht abnimmt und die Konzentrationen von D-Glucose und D-Fructose zunehmen. Dies lässt vermuten, dass ein geringer Teil der Saccharose durch den Autoklavierprozess in die beiden Monosaccharide D-Glucose und D-Fructose gespalten wurde.

Nach einer 7-tägigen Kultivierung ist nahezu keine D-Glucose und D-Fructose mehr nachweisbar. Auch der Saccharose-Gehalt im Kulturüberstand wurde deutlich weniger, was auf eine Verstoffwechslung durch Stamm 1 schließen lässt. Im direkten Vergleich zweier Läufe - einer unter Optimalbedingungen, einer mit defekter Temperaturkontrolle - im 5 l-Reaktor kann festgestellt werden, dass beim Lauf unter Optimalbedingungen deutlich mehr Saccharose metabolisiert wurde als beim Lauf mit defekter Temperaturkontrolle.

Nach der Kultivierung im 30 l-Reaktor im Jahr 2022 war noch ein deutlich höherer Saccharose-Gehalt nachweisbar, was auf einen verminderten Stoffwechsel von Stamm 1 und somit noch nicht idealen Wachstumsbedingungen hindeutet.

8.2.7.2 Schaumbildung im 30 l-Fermenter

Auch beim 30 l-Reaktor war die Schaumbildung eine Herausforderung (Abbildung 43). Die Menge an benötigtem Antischaummittel konnte nicht linear auf das größere Volumen umgesetzt werden.



Abbildung 43: Schaumbildung im 30 l-Reaktor. Links sind Luftzufuhr und Rührwerk ausgeschaltet. Rechts sind beide in Betrieb.

Nach mehreren erfolglosen Versuchen der Schaumbekämpfung durch manuelle Zugabe von Antischaummittel an bestimmten Tagen des Fermentationslaufes, wurde sich für den Einbau und Betrieb einer Antischaum-Pumpe bei Fermenterläufen im 30 l-Reaktor entschieden.

Mittels Kjeldahl-Analytik wurden die Proteingehalte der ersten Läufe im 30 l-Reaktor bestimmt. Die Umrechnung von Stickstoff auf Proteingehalt erfolgte mit 5,9. Die Kultivierung erfolgte auf semifestem-Substrat-Medium für 6 Tage. Kultivierungsparameter: pH6, 24°C, 230 rpm, 0,1 vvm Luftzufuhr. Die Proteingehalte sowie die Trockenmassen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Proteingehalte und Trockenmasse von den ersten zwei Fermenterläufen im 30 l-Bioreaktor.

	Trockenmasse (TM) [g/ 100 g]	Proteingehalt [g/ 100 g TM]
Lauf 1	9,3±0,2	13,1±0,1
Lauf 2 (Probleme mit pH-Regulierung)	5,4±0,1	12,0±0,2

Im Lauf 1 konnte ein Proteingehalt von 13,1 % in 0,1 g /100 g TM erreicht werden. Dieser Wert war deutlich niedriger als im 5 l-Reaktor (15–16 g Protein/100 g TM). Weitere Optimierungsversuche zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen und möglichst vollständiger Verstoffwechslung des festen Substrats waren somit nötig. Beim Lauf 2 gab es Probleme mit der pH-Regulation. Sowohl die Trockenmasse als auch der Proteingehalt in der Trockenmasse waren deshalb deutlich niedriger.

Einer der ersten aus dem 30 l-Reaktor geernteten Myzelmassen ist in Abbildung 44 gezeigt. Hier wurden die Fermentationsbedingungen im 30 l-Reaktor noch nicht optimiert. Vor dem Abtropfen (Abbildung 44, rechts) kann man die unterschiedlichen Größen der einzelnen Myzelien erkennen.



Abbildung 44: links: frühe geerntete Myzelmasse aus dem 30 l-Reaktor (Stamm 1), ca. 4 kg; rechts; ein Bild derselben geernteten Myzelmasse beim Abtropfen durch ein Muslintuch.

Die Ernte aus solchen Reaktoren (für pharmazeutischen Zwecke und flüssige Substrate bzw. Medien konzipiert) über das vorhandene Auslaufventil neben der Probeentnahme, das den Behälterinhalt über zwei 90° Winkel (Abbildung 45) führt, ist nur begrenzt möglich, da es zur Verstopfung neigt. Oft musste der Reaktordeckel entfernt werden, um die Gesamtmenge an Myzel zu ernten und den Reaktor zu reinigen, da die Myzelmasse an den Seiten des Reaktors haftete (Abbildung 46).



Abbildung 45: Auslaufventil des 30 l-Fermenters



Abbildung 46: Wachstum des Myzels nach einem 5-tägigen Fermentationslauf.

Die Prüfung von Kontaminationsquellen hat gezeigt, dass die rechte Leitung am Auslaufventil, die in Abbildung 45 zu sehen ist, eine Kontaminationsquelle darstellt. In Abbildung 47 ist die entsprechende Leitung in lila markiert. Das Ventil (roter markiert) muss während der Sterilisierung 20 Minuten lang durchdampft werden, um Kontamination zu vermeiden.



Abbildung 47: Ablassventil rot gekennzeichnet. Kontaminationsquelle ist Lila markiert.

Zur Bestätigung, wurde eine Sterilkontrolle mit LB-Medium durchgeführt. Dazu wurden; 20 l LB Medium in den Fermenter überführt und dort sterilisiert. Nach 10 Tagen konnte keine Trübung des Mediums beobachtet werden (Abbildung 48).



Abbildung 48: 30 l-Fermenter befüllt mit LB-Medium nach 10 Tagen Standzeit und Dampfsterilisation des Ablassventils

Daraus folgt, dass die Kontamination durch Öffnen und Halten des genannten Ventils vermieden werden kann. Eine erfolgreiche Sterilisierung des mit Medium gefüllten 30 l-Reaktors kann durch 100°C Erhitzung gewährleistet werden.

Durch weitere Optimierungen, wie Homogenisierung der Vorkulturen vor dem Animpfen, konnte die Homogenität des Myzels erhöht und damit das Ernten vereinfacht werden (Abbildung 49).



Abbildung 49: Myzel nach Optimierung des Prozesses.

Abbildung 50 zeigt ein Bild der Myzelmasse (Entwässerung durch Abtropfen/Pressen durch ein Muslintuch) nach einigen Optimierungsmaßnahmen.



Abbildung 50: Myzelmasse nach der Entwässerung durch Abtropfen/Pressen durch ein Muslintuch.

8.2.8 Co-Kultivierung mit semifest-Substrat-Medium

Als Vorversuch zur Co-Kultivierung der Pilze mit den Vitamin B₁₂-produzierenden Bakterien wurden die ausgewählten Bakterien-Stämme in semifest-Substrat-Medium kultiviert.

Um das Wachstum der Bakterien zu untersuchen, wurde das semifest-Substrat-Medium zunächst autoklaviert und anschließend sterilfiltriert, um Feststoffe zu entfernen und ein klares Medium zu erhalten. Entsprechendes Bakterienwachstum kann dann durch Trübung des Mediums festgestellt werden.

Je 5 ml des Bakterienmediums wurde in Anaerobier-Röhrchen gegeben und mit je 20 μ l beider Bakteriensuspensionen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte ohne Schütteln bei 37°C.

Wie in Abbildung 51 dargestellt, konnte im entsprechenden Medium kein Bakterienwachstum festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass das Medium nicht ausreichend Nährstoffe für die verwendeten Bakterien aufweist.



Abbildung 51: *P. freudenreichii* und *L. reuteri* in semifest-Substrat-Medium.

8.2.8.1 ELISA zur Untersuchung von Vitamin B₁₂ in Kulturüberständen

Teil 1

Zur Untersuchung der B₁₂-Bildung von *L. reuteri* und *P. freudenreichii* wurden diese zunächst für 24 h bei 37°C inkubiert. Für *P. freudenreichii* wurde Medium DSMZ 91 (Propionibacterium Medium) verwendet, für *L. reuteri* wurde Medium DSMZ 11 (MRS-Medium) verwendet. Nach 24 h wurden die Bakterien noch einmal in frisches Medium überimpft. Die Kultivierung erfolgte ohne Schütteln in Anaerobierröhrchen bei 3°C. Für *L. reuteri* wurde zusätzlich ein Ansatz unter aeroben Bedingungen mitgeführt.

Nach der Kultivierung wurden die Kulturen für 7 min bei 4500 g zentrifugiert und der Überstand für die Analyse eingesetzt. Die Pellets wurden mit PBS gewaschen und für spätere Versuche eingefroren; 1 ml des Überstandes wurde in ein schwarzes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 0,2 ml einer 1 % KCN-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 100°C im Heizblock erhitzt und anschließend für den ELISA verwendet.

Teil 2

Neben den Überständen der Bakterien wurden auch Kulturüberstände der Pilze untersucht. Der Versuchsaufbau ist in Tabelle 19 dargestellt. Der Vitamin B₁₂-Abbau über die Kultivierungsdauer und der Vitamin B₁₂-Aufnahme durch Stamm 1 wurde in vier Ansätzen auf Malzextrakt-Basis vorbereitet, um den Abbau von Vitamin B₁₂ über die Kultivierungsdauer sowie den Einfluss von Stamm 1 auf den Vitamin B₁₂-Gehalt zu untersuchen.

Tabelle 19: Versuchsansatz zur Überprüfung des Vitamin B₁₂-Gehalts.

Ansatz	Zugabe von B ₁₂	Zugabe von 10 ml Pilzsuspension
1	+	+
2	+	-
3	-	-
4	-	+

Für die Versuchsdurchführung wurden zunächst 8 Schüttelkolben mit Malzextrakt-Medium vorbereitet. Um die entsprechenden Kolben vor Lichteinstrahlung zu schützen, wurde diese in Aluminium-Folie verpackt. Die Versuche wurden am frühen Morgen durchgeführt.

Wie in Tabelle 19 dargestellt, wurden die Kolben der Ansätze 1 und 4 mit Pilzsuspension beimpft. Dazu wurde eine Vorkultur von Stamm 1 nach 6-tägiger Kultivierung homogenisiert und anschließend die Ansätze 1 und 4 jeweils mit 10 ml der Pilzsuspension versetzt. Ansatz 1 und 2 wurden zusätzlich mit 1 ml einer 1 µg/ml Vitamin B₁₂-Lösung versetzt.

Anschließend erfolgte eine Kultivierung bei 24°C, 150 rpm und Lichtausschluss für 7 Tage. Danach wurden Myzel und Überstand durch Zentrifugieren (4500 g, 10 min) separiert und der Überstand für die Analyse entnommen. Die Pellets wurden mit PBS gewaschen und für weitere Analysen eingefroren. Mit dem Überstand wurde wie bei den Bakterien verfahren.

Ergebnisse:

Leider konnte nach Durchführung des ELISA bei keinem der Bakterien eine Vitamin B₁₂-Abgabe ins Medium detektiert werden. Im Überstand von *P. freudenreichii* war zwar Vitamin B₁₂ nachweisbar, jedoch war ein vergleichbarer Gehalt auch im Blindwert (Ansatz 3, reines Medium) enthalten.

In keinem der untersuchten Kulturüberstände aus Teil 2 war Vitamin B₁₂ nachweisbar. Dies deutet auf einen Abbau von Vitamin B₁₂ im Kulturmedium hin, da auch bei Ansatz 3 (reines Medium), kein Vitamin B₁₂ mehr nachweisbar war.

Entscheidung über die Co-Kultivierung mit semifestem-Substrat-Medium

Das Medium müsste angereichert werden oder eine getrennte Kultivierung der Pilze und Bakterien stattfinden. Weitere Versuche deuteten darauf hin, dass eine sequentielle Kultivierung besser geeignet ist. Die Entwicklung bleibt auf dem Labormaßstab, bis die Strategie einer sequentiellen Kultivierung mit dem ausgewählten Medium und Bakterien erfolgreich wird. Medium und Prozessführung müssen hier noch optimiert werden.

8.2.9 Herstellung von Rezepturen für die Weiterverarbeitung der Rohproteinmasse (QFP)

Aufgabe von QFP war die Herstellung von Rezepturen für die Weiterverarbeitung des Pilz/Bakterienmyzels. Dafür kultivierte Quh-Lab Pilze und Bakterien auf Nebenströmen nach bereits etablierten Protokollen und liefert das geerntete Myzel an QFP. Diese machen sich mit der Biomasse und den technofunktionellen Eigenschaften vertraut und entwickeln erste Methoden zur Produktentwicklung und Rezepturen.

Durchgeführt wurde

- Rezepturerstellung von Fleischersatzprodukten mit Pilzmyzel
- Herstellung diverser Muster

- Sensorische Ausarbeitung der Muster und damit Nacharbeiten an den bestehenden Rezepturen

Dabei ergab sich, dass das Pilzmyzel geschmacklich stark variierte. Das lag daran, dass die Chargen ungleichmäßig waren und unterschiedliche Substrate eingesetzt wurden. Eine weitere Herausforderung war, dass die bisher von den Partnern produzierten Mengen zu gering waren, um größere Tests durchzuführen.

8.2.10 Prototypen des Endprodukts

Nach Erhalt der Prototyp Fleischwurst, Würstchen und Burgerpatties von QFP, die mit *Pleurotus sapidus* hergestellt wurden, wurden sie eingefroren. Kostproben bei Quh-Lab wurden durchgeführt. Sie hatten einen leichten Pilzgeschmack und konnte gut in der Pfanne mit etwas Öl gebraten oder gegrillt werden (Abbildung 52).



Abbildung 52: Myzelbasierter veganer Burgerpatty und Würstchen von QFP in der Bratpfanne bei Quh-Lab.

Das größere Volumen der Myzelmasse vom 30 l-Reaktor im Jahr 2022 enthielt noch nicht verstoffwechseltes Substrat. Diese kleinen Stücke konnten im Mund als Sand erkannt werden, was für die Vorbereitung von Lebensmitteln nachteilhaft ist. Im Jahr 2023 hat die Optimierung der Fermentation bzw. Myzelmasse vom 30 l-Reaktor gezeigt, dass das Substrat komplett verstoffwechselt werden konnte. Da dieses Ergebnis erst Anfang 2023 erreicht wurde konnte Quh-Lab innerhalb des Projektzeitraums (bis 28.02.2023) die optimierte Myzelmasse für die Herstellung neuer Prototypen nicht liefern.

8.2.11 Meilenstein 2: Vorlage eines evaluierten Reaktors als Demonstratorversion

Aufgrund von Lieferschwierigkeiten der Ausgangsprodukte konnte der in Arbeitspaket 1 definierte Reaktor nicht im eingeplanten Zeitfenster in Betrieb genommen werden. Die Evaluierung wurde dadurch verzögert. Die Kulturen im 2 l-Maßstab bei der HSHL und im 5 l-Maßstab bei Quh-Lab zeigten jedoch, dass die Produktion einer Proteinrohmasse erfolgreich in Fermentern durchgeführt werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine getrennte Kultivierung von Bakterien und Pilzen möglich ist, aber eine Co-Kultivierung konnte nicht erfolgreich umgesetzt werden. Nach systematischen Experimenten einschließlich

Optimierungen der Vorkulturen, des Mediums und der Fermentationsparameter konnten die Prozessschritte auf einen 30 l-Fermenter übertragen werden (Schema in Abbildung 53).

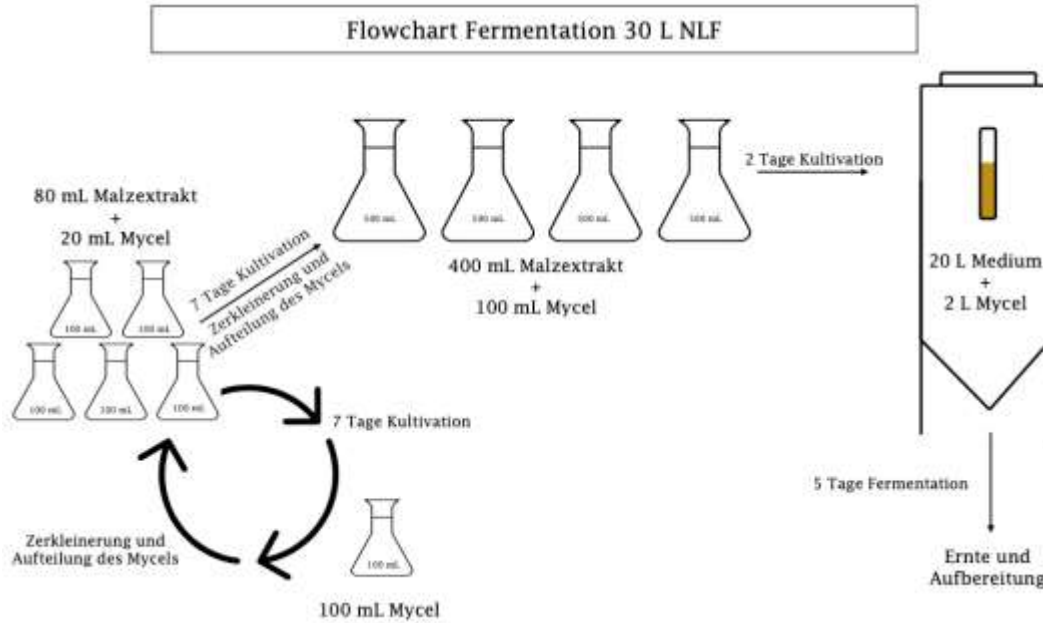


Abbildung 53: Schema des Scale-ups für den 30 l-Fermenter.

Die Vorbereitung der Vorkulturen für den 30 l-Fermenter sind mehrstufig im Vergleich zu denen für kleinere Fermenter. Trotzdem konnte der Ablauf so optimiert, dass einmal pro Woche ein kompletter Fermenterlauf einschließlich der Ernte der Myzelmasse durchgeführt werden konnte, indem die Vorkulturen immer parallel zur nächsten Fermentation mitgeführt wurden, wie im Ablaufplan Abbildung 54 dargestellt.

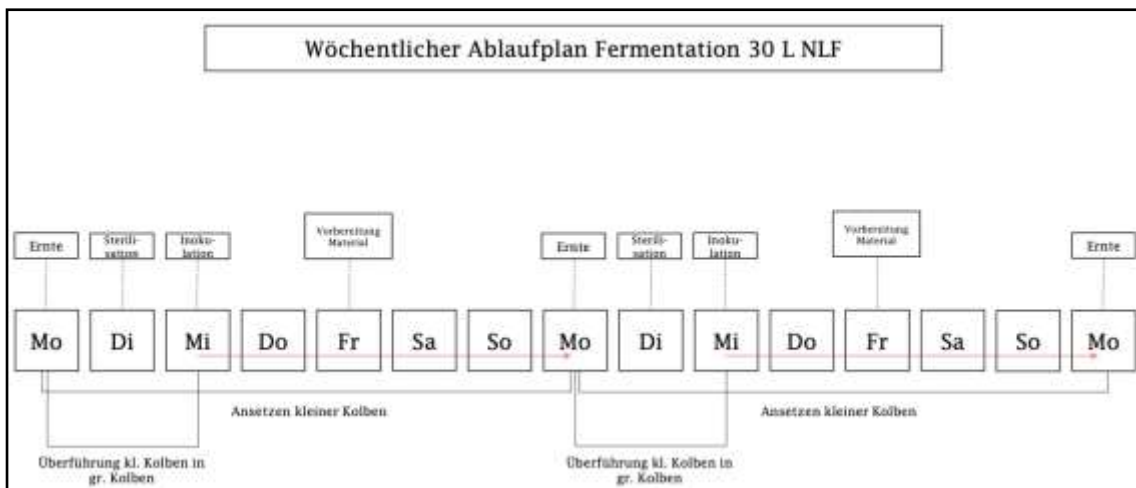


Abbildung 54: Wöchentlicher Ablaufplan der Fermentation im 30 l-Fermenter.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Projekt haben sich QPF und Quh-Lab auf eine weitere Kollaboration nach Projektende entschlossen.

9 Projektergebnisse

Für sämtliche Fermentationsversuche an der HSHL wurde ausschließlich der Rillstilige Seitling (*Pleurotus cornucopiae*, Synonym: *Pleurotus sapidus*), ein Speisepilz aus der Abteilung der Basidiomycota verwendet. Für die Kultivierung von Pilzmyzel im 2 l-Fermenter wurden unterschiedliche Feed- und Batchstrategien durchgeführt. Hierbei wurden Medien,

Rührgeschwindigkeit und Sauerstoffzufuhr variiert, während Temperatur mit 24°C und pH-Wert mit 6,0 konstant gehalten wurden. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Feedstrategien gegenüber Batchverfahren nicht zu mehr Myzel trockenmasse führte. Deshalb wurde sich für das Scale-up auf das Batchverfahren zur für die Myzelproduktion konzentriert. so dass sich für die Myzelproduktion auf Batchverfahren konzentriert wurde. Als optimales Fermentationsmedium hat sich eine Mischung aus den Reststoffen Zuckerrübenmelasse und Biotreber herausgestellt, da diese nicht glucosehaltigen Komponenten sehr wenig Schaumbildung während der Batch-Fermentation verursachten, ein gutes Wachstum der Pilzmyzelien garantierten und ein leichteres Downstream Processing ermöglichten. Dadurch konnte auf Antischaummittel verzichtet und der Sauerstoffeintrag während der Wachstumsphase des Pilzes gut dosiert werden. Die Ausbeuten an lyophilisierter Trockenmasse liegen je nach Prozessführung und Reaktor bei ca. 4,5 g l⁻¹ bis 10 g l⁻¹ und müssen noch weiter optimiert werden.

Für die Beschaffung eines handelsüblichen Fermenters mit einem Arbeitsvolumen von 30–50 l war ein Budget von 100.000 € (Brutto) eingeplant und ein Lastenheft erstellt worden. Da das Preis-/Leistungsverhältnis sehr knapp kalkuliert war erhielt die Anvium GmbH (später EVI GmbH, Unternehmen des Projektpartners Quh-Lab) nach Ausschreibung den Zuschlag. Der von ihr entwickelte Fermenter war mit einem Gesamtvolumen von 195 l deutlich größer als gefordert und konnte die ausgewiesenen Bedingungen weitestgehend erfüllen. Allerdings handelte es sich bei dem Fermenter um einen Prototypen und seine Betriebstauglichkeit musste zunächst in verschiedenen Versuchen mit VE-Wasser überprüft und entsprechend justiert werden. Ein erster Versuch mit *Pleurotus sapidus* 45 l Medium bestehend aus Zuckerrübenmelasse, Biotreber und verschiedenen Salzen, verlief negativ, da es zu einer Verkeimung kam. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Fermenter nur mit Dampf sterilisiert wurde und das Medium anschließend über einen Trichter zugeführt wurde. Der Trichter war zwar zuvor autoklaviert worden, die Umgebungsluft wurde aber nicht mit einem Bunsenbrenner sterilisiert. Außerdem wurde konzentriertes Medium zwar zuvor autoklaviert, aber das Reinstwasser zum Auffüllen wurde nur mit UV-Licht bestrahlt und zudem in 1 l-Schritten per Gewindeflasche zugeführt.

Als Stickstoffquelle kann Hefeextraktes durch frische Hefe sowie Trockenhefe ersetzt werden, bei gleichbleibender Pilzausbeute. Bei der HSHL hat sich Biotreber als Stickstoffquelle bewährt. Für zukünftige Versuche und den Produktionsprozess kann daher der vergleichsweise teure Hefeextrakt durch die günstigeren Alternativprodukte ersetzt werden.

Mikrobiologische Kontaminationen konnten mit den gängigen Analysemethoden der Quh-Lab nicht festgestellt werden, sodass das Myzel im Hinblick auf die mikrobiologische Beschaffenheit als unbedenklich einzustufen ist. Eine Prüfung der Produkthygiene mit den bisherigen Kultivierungsmethoden ist zum jetzigen Stand nicht nötig, da die bisherigen Ergebnisse auf eine saubere Arbeitsweise hindeuten.

Der Proteingehalt aus den Experimenten mit *Pleurotus Sapidus* und dem Biotreber/Zuckerrübenmelasse – Medium als Substrat ergaben mit ca. 40 % in der Trockenmasse und einem essentiellen Aminosäureindex (EAAi) von 97,86 und einer biologischen Wertigkeit von 94,97 die besten Werte für die Proteinausbeute und –qualität.

Quh-Lab hat sich für ein neues festes Substrat und ein neues flüssiges Substrat (beide Nebenströme aus der Zuckerindustrie) entschieden und die Zusammensetzung des Mediums insoweit optimiert, damit keine zusätzliche Stickstoffquelle benötigt wird. Das Medium wird als semifestes Substrat-Medium bezeichnet. Die Nährwertanalyse zeigte einen

Proteingehalt von ca. 15 % in der Trockenmasse. Die Kultivierung mit dem neuen semifestes Substrat-Medium wurde erfolgreich auf 5 l- und 30 l-Maßstäbe übertragen.

Erste Prototypen des Endprodukts in Form von Fleischwurst, Würstchen und Burgerpatties wurden entwickelt und getestet. Für ein weiteres Scale-up wurde ein 195 l-Bioreaktor entwickelt, der sich noch in der Test- und Optimierungsphase befindet.

10 Öffentlichkeitsarbeit

10.1 Jahr 2020

Das Projekt wurde im Rahmen der Bioeconomy Days 2020 (5.11. – 12.11.2020): Neue biotechnologische Prozesse und Verfahren Vom Startup bis zum etablierten Unternehmen!; Biotechnologie in der Lebensmittelproduktion vorgestellt (Bioeconomy Days Handout.pdf unter <https://www.hshl.de/forschung-unternehmen/forschungscluster/cluster-nachhaltige-entwicklung/themenfeld-biooekonomie/>). Weiterhin gab es einen Fernsehbericht in der Reihe Terra Xpress des ZDF (<https://www.zdf.de/wissen/terra-xpress/besser-essen-und-besser-leben--landwirte-im-stress-100.html>).

10.2 Jahr 2022

Onepager für die DBU: anschauliche Darstellung des MykoMeat Projektes für fachfremde Personen, am 18.08.2022 der DBU zugesandt.

11 Fazit/Ausblick

Die Fermentationsversuche verliefen erfolgreich. Die Ausbeute der Trockenmasse von 4,5 g l⁻¹ bis 10 g l⁻¹ ist noch zu Optimieren. Ein Betrieb ohne Schaumbildung ist möglich. Für den Vertrieb von Mykoproteinen als Lebensmittel ist wichtig, dass ein reproduzierbarer Prozess etabliert wird und alle dafür notwendigen Parameter genauestens erfasst werden. Außerdem müssen Qualitätskontrollen etabliert werden, die einerseits garantieren, dass keine Keime im so hergestellten Mykoprotein vorliegen und zum anderen auch keine Toxine unter den gegebenen Prozessbedingungen gebildet werden. Weiterhin sollte auch die Nährstoffzusammensetzung unter den gegebenen Bedingungen genau erfasst werden. Zur Beurteilung der Klimaneutralität müsste ähnlich wie bei Quorn ein Bericht erstellt werden (Carbon Trust 2022).

Soll das im Projekt hergestellte Mykoprotein als alternative Proteinquelle für die Lebensmittelindustrie dienen, müssen weitere Optimierungen stattfinden. Neben der Erhöhung der Ausbeute an Trockenmasse ist das Aminosäureprofil reproduzierbar zu erhalten.

Aufgrund des hohen Fettgehaltes ist es ebenso interessant und bedeutsam, das Fettsäurespektrum des Pilzmyzels zu analysieren und somit Aussagen über die ernährungsphysiologische Qualität zu treffen. Ebenso ist es für das Nährwertprofil relevant, die erzielten Gehalte an den Vitaminen B₁₂ und D₂ im Pilzmyzel nach der durchgeführten Optimierung des Fermentationsprozesses zu bestimmen. Weitere Schritte zur Einführung des Produkts ist es daher eine qualitätsgesicherte Produktion aufzubauen sowie Toxizitätsstudien durchzuführen und eine Zulassung nach der Novel Food Verordnung zu prüfen.

Ein wesentliches Projektziel war die Erhöhung des Vitamingehalts durch Co-Kultivierung. Durch Co-Kultivierung mit den Bakterien *L. reuteri* und *P. freudenreichii* der Pilzmasse sollte

der Vitamin B₁₂-Gehalt erhöht werden. Der Vitamin B₁₂-Gehalt wurde enzymatisch bestimmt. Es konnte bei den Kultivierungen allerdings keine Vitamin B₁₂ – Abgabe der Bakterien ins Medium gemessen werden. Im Überstand von *P. freudenreichii* war zwar Vitamin B₁₂ nachweisbar, jedoch in nicht signifikanten Mengen. Da auch eine Kultivierung ohne Pilzmasse in reinem Medium der Bakterien kein Vitamin B₁₂ nachweisbar war, wird der Abbau des Vitamins vermutet. Um die Co-Kultivierung zu optimieren müssten die Prozessparameter und vor allem das Medium noch angepasst werden. Spätere Versuche zeigen aber, dass eine sequentielle Kultivierung für einen Produktionsprozess besser geeignet sein dürfte. Messungen der Ergosterol- und Vitamin D₂ Mengen konnten innerhalb des Projektzeitraums nicht mehr durchgeführt werden. Damit ist zusammenfassend zu sagen, dass zwar eine gute Proteinausbeute bei sehr guter Proteinqualität erreicht werden konnte, jedoch keine Vitaminerhöhung durch Co-Kultivierung.

Literaturverzeichnis

Ahlborn, Jenny (2019): Biotechnologische Produktion einer Vitamin D reichen, alternativen Proteinquelle durch Basidiomyceten auf industriellen Nebenströmen. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie. Online verfügbar unter http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2020/15110/pdf/AhlbornJenny_2020_04_02.pdf, zuletzt geprüft am 29.05.2023.

Asgar, M. A.; Fazilah, A.; Huda, Nurul; Bhat, Rajeev; Karim, A. A. (2010): Nonmeat Protein Alternatives as Meat Extenders and Meat Analogs. In: *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9 (5), S. 513–529. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00124.x.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (Hg.) (2018): Welternährung verstehen. Fakten und Hintergründe. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Online verfügbar unter https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/Welternaehrung-verstehen.pdf;jsessionid=A2A81125A66B9A19B79E6C25D3E6646D.live852?__blob=publicationFile&v=6, zuletzt geprüft am 17.06.2021.

Carbon Trust (2022): Quorn Footprint Comparison Report. Unter Mitarbeit von John Kazer, George Orfanos und Charlie Gallop. Hg. v. The Carbon Trust. UK. Online verfügbar unter <https://www.quorn.ch/assets/files/content/Carbon-Trust-Comparison-Report-2022.pdf>, zuletzt geprüft am 15.03.2023.

Chaplin, Martin F.; Kennedy, John F. (Hg.) (1994): Carbohydrate analysis. A practical approach. 2. ed. Oxford: IRL Press at Oxford Univ. Press (The practical approach series, 143).

Fraatz, Marco A.; Naeve, Stefanie; Hausherr, Vanessa; Zorn, Holger; Blank, Lars M. (2014): A minimal growth medium for the basidiomycete *Pleurotus sapidus* for metabolic flux analysis. In: *Fungal Biol. Biotechnol.* 1, S. 9. DOI: 10.1186/s40694-014-0009-4.

Frettlöh, Martin; Haag, Tanja; Zorn, Holger; Zajul, Martina; Ahlborn, Jenny (2017): Sequentielles Co-Kultivierungsverfahren zur Herstellung eines vitamin- und proteinreichen Nahrungsmittels. Angemeldet durch Frettlöh, Martin, 57080 Siegen, DE; Justus-Liebig-Universität Gießen, 35390 Gießen, DE am 21.07.2017. Anmeldenr: 10 2017 212 564.0. Veröffentlichungsnr: DE 10 2017 212 564 A1.

- Jones, Mitchell; Huynh, Tien; Dekiwadia, Chaitali; Daver, Fugen; John, Sabu (2017): Mycelium Composites: A Review of Engineering Characteristics and Growth Kinetics: American Scientific Publishers (11). Online verfügbar unter <https://www.ingentaconnect.com/contentone/asp/jobn/2017/00000011/00000004/art00001>.
- Kandler, Otto; Stetter, Karl-Otto; Köhl, Ruth (1980): *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. In: *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 1 (3), S. 264–269. DOI: 10.1016/S0172-5564(80)80007-8.
- Li, Fuyong; Cheng, Christopher C.; Zheng, Jinshui; Liu, Junhong; Quevedo, Rodrigo Margain; Li, Junjie et al. (2021): *Limosilactobacillus balticus* sp. nov., *Limosilactobacillus agrestis* sp. nov., *Limosilactobacillus albertensis* sp. nov., *Limosilactobacillus rudii* sp. nov. and *Limosilactobacillus fastidiosus* sp. nov., five novel *Limosilactobacillus* species isolated from the vertebrate gastrointestinal tract, and proposal of six subspecies of *Limosilactobacillus reuteri* adapted to the gastrointestinal tract of specific vertebrate hosts. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 71 (2). DOI: 10.1099/ijsem.0.004644.
- Lukas Sacher (2023): Analyse proteinreicher Fermenterproben mit chromatographischen Methoden und durch Elementaranalyse. Bachelorarbeit. Hochschule Hamm-Lippstadt, Hamm-Lippstadt.
- Mackensen, Annette; Annette; de, Marcel Helfmeier@ble (2021): Bericht zur Markt- und Versorgungslage Fleisch 2021, Artikel. Online verfügbar unter https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/2021BerichtFleisch.pdf;jsessionid=74CFBBA818E7AE9AFA6C2EA236DD661B.1_cid325?__blob=publicationFile&v=2, zuletzt geprüft am 25.06.2021.
- Manu-Tawiah, W.; Martin, A. M. (1988): Nitrogen Sources and the Growth Response of *Pleurotus ostreatus* Mushroom Mycelium. In: *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 21 (2), S. 194–199. DOI: 10.1016/S0315-5463(88)70776-2.
- MRI BMEL (2008): Nationale Verzehrsstudie II (NVS II). Ergebnisbericht, Teil 2. Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen. Hg. v. Max Rubner-Institut (MRI) - Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel. Max Rubner-Institut (MRI) - Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel. Online verfügbar unter https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/NVS_ErgebnisberichtTeil2.pdf;jsessionid=08B4D3500B75D56CA54A48D680C6C97A.live851?__blob=publicationFile&v=2, zuletzt geprüft am 29.06.2021.
- Oser, Bernard L. (1959): An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins. In: Anthony Albanese (Hg.): Protein and Amino acid nutrition. New York: Academic Press, S. 281–295.
- Reuter, Gerhard (1965): Das Vorkommen von Laktobazillen in Lebensmitteln und ihr Verhalten im menschlichen Intestinaltrakt. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung 1. Originale* 197, S. 468–487.
- Umweltbundesamt (2019): Die Zukunft im Blick: Fleisch der Zukunft. Trendbericht zur Abschätzung der Umweltwirkungen von pflanzlichen Fleischersatzprodukten, essbaren Insekten und In-vitro-Fleisch. Unter Mitarbeit von Tobias Jetzke, Stephan Richter, Benno Keppner, Lena Domröse, Stephanie Wunder und Arianna Ferrari. Hg. v. Umweltbundesamt. Online verfügbar unter <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen>, zuletzt geprüft am 28.07.2022.

UN DESA (2022): World Population Prospects 2022. Summary of Results. UN DESA/POP/2021/TR/NO. 3. Hg. v. United Nations - Department of Economic and Social Affairs, Population Division. New York.

Willett, Walter; Rockström, Johan; Loken, Brent; Springmann, Marco; Lang, Tim; Vermeulen, Sonja et al. (2019): Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. In: *Lancet (London, England)* 393 (10170), S. 447–492. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4.

Zajul, Martina Maria (2017): Biotechnologische Produktion von Basidiomyceten-Proteinen auf industriellen Nebenströmen zur Herstellung von Nahrungsmitteln. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie. Online verfügbar unter http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2018/13429/pdf/ZajulMartina_2017_12_19.pdf, zuletzt geprüft am 17.06.2021.

Zheng, Jinshui; Wittouck, Stijn; Salvetti, Elisa; Franz, Charles M. A. P.; Harris, Hugh M. B.; Mattarelli, Paola et al. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 (4), S. 2782–2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.

Li, Fuyong; Cheng, Christopher C.; Zheng, Jinshui; Liu, Junhong; Quevedo, Rodrigo Margain; Li, Junjie et al. (2021): *Limosilactobacillus balticus* sp. nov., *Limosilactobacillus agrestis* sp. nov., *Limosilactobacillus albertensis* sp. nov., *Limosilactobacillus rudii* sp. nov. and *Limosilactobacillus fastidiosus* sp. nov., five novel *Limosilactobacillus* species isolated from the vertebrate gastrointestinal tract, and proposal of six subspecies of *Limosilactobacillus reuteri* adapted to the gastrointestinal tract of specific vertebrate hosts. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 71 (2). DOI: 10.1099/ijsem.0.004644.

Fraatz, Marco A.; Naeve, Stefanie; Hausherr, Vanessa; Zorn, Holger; Blank, Lars M. (2014): A minimal growth medium for the basidiomycete *Pleurotus sapidus* for metabolic flux analysis. In: *Fungal Biol. Biotechnol.* 1, S. 9, zuletzt geprüft am 01.10.2021.

12 Anhang

12.1 Detailliertes Anforderungsprofil für den 50 l (später 195 l)-Reaktor

Fermenter:

- Reaktorbehälter mit Doppelmantel zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Temperaturverteilung
- Reaktordeckel
- Reaktorleuchte,
- Berstscheibe
- Schauglas
- Sterilisierbares Bodenablassventil
- Einfache Produktentnahme (Myzel) möglich
- Anschluss für Gasleitung

- Sterile Anschlussmöglichkeiten für Sensoren
- Reserveanschlüsse (optional)
- Blindstopfen für alle Anschlüsse mit Reservefunktion
- Temperaturregelung zwischen 20–40°C
- pH-Kontrolle über Säure/Base-Zufuhr durch Peristaltikpumpen o. a.
- Belüftung über Begasungsrohr mit Ring-Sparger
- Druckbereich 1–3 bar
- Rührwerk 20–500 rpm
- Rührwerk für höhere Viskositäten ausgelegt
- Mindestens zwei Rührelemente (Schrägblattimpeller)
- In-situ sterilisierbar
- Rührelemente auswechselbar
- Vier Pumpen für Substrat, Lauge- und Säurezufuhr, Antischaum
- Septum, worüber die Bakterienkultur zugeführt wird
- Zufuhr der Substrate und Medien muss steril möglich sein
- Umstellung von Luft- auf Stickstoffzufuhr muss möglich sein
- Luft- und Stickstoffzufuhr regelbar
- Möglichst geringes Totvolumen bei allen Anschlüssen
- Sterilfilter für Abgas und Luftzufuhr
- Sicherheitstechnische Ausrüstung für den sicheren Reaktorbetrieb
- Fermentertank entsprechend der aktuellen Druckgeräterichtlinie
- Einfache Reinigung des Fermenters möglich
- Oberfläche Fermentertank innen Ra <0,8 µm
- Schweißnähte innen vollflächig verschliffen
- Fermentertank aus korrosionsbeständigem Edelstahl, Produktberührt 1.4404 bzw. AISI 316L, nichtproduktberührt 1.4301 bzw. AISI 304.
- Korrosionsbeständige Zuführungen
- Ernte/Probenahmeventil sterilisierbar
- Verwendete Materialien, die mit der Probe und den zugeführten Substanzen in Kontakt kommen, müssen lebensmittelecht nach 1935/2004/EG-Verordnung sein

Sterile Gasversorgung:

- Durchflussanzeige
- Stellventil
- Gasmengenregelventil (Option)
- Rückschlagklappen
- Sterilfilter
- Kondensatventil
- Kondensatabscheider
- SIP-Ventile
- Absperrventile
- Rohrleitungen, Verschlauchungen und Fittings

Abluffführung:

- Rohrleitung und Fittings
- Absperrventil
- Kondensatstrecke für die Sterilisation
- Abluftkühler (optional)

- Sterilfilter (optional)
- Kondensatabscheider

Sensoren:

- pH-Sonde Fermenter
- Temperatursonde Fermenter
- pO₂-Sonde Fermenter
- Druckanzeige im Fermenter
- Durchflussanzeige Luft
- Anti-Schaumkontrolle
- Massendurchflussmessung (Optional)
- Füllstandsmessung (Optional)

Rohrleitungssystem für Kühlung/Aufheizung:

- Anschlüsse für Kühlwasser und Warmwasser
- Möglichkeit ein laborübliches Thermostatsystem anzuschließen
- Sicherheitsventil
- Dampfventil
- Kühlwasserventil
- Warmwasserventil
- Entleerung
- Kondensatableiter
- Rohrleitungen, Verschlauchungen und Fittings

Automatisierungssystem:

- Kommunikation mit den Sensoren und Aktoren
- Verbindung mit Software am PC
- Steuerung muss über Software des PCs möglich sein
- Bedienelement zur Steuerung der Sensoren und Aktoren
- Datenerfassung
- Transfer der Daten an PC (CSV-Datei)
- VPN-Verbindung zur Bedienung und Ferndiagnose (optional)

PC und Software:

- PC und Software zur Steuerung und Datenerfassung bzw. -analyse
 - Erfassung der Prozessparameter
 - Gleichzeitige Anzeige von mindestens sechs Prozessparametern
 - Anzeigebereich der Prozessparameter individuell einstellbar
 - Graphische Nutzeroberfläche
 - Kalibrierung der Sensoren über Benutzeroberfläche
 - Steuerung der Prozessparameter, wie Gaszufuhr, Temperatur und Rührgeschwindigkeit
 - Steuerung der Pumpen für Substrat- und Medienzufuhr
 - Begrenzungsfunktion der Kontrollparameter mit Alarmfunktion
 - Steuerung des Sterilisationsprozesses
 - Sicherheitsabschaltung bei Überdruck und Übertemperatur
 - Datenspeicherung

- Datenexport in excel bzw. .csv oder ASCII-Format

Sonstiges:

- Alle notwendigen Pumpen, Trägergasfilter, Anschlüsse usw.
- Kleinmaterial Erstausrüstung wie Betriebsflüssigkeiten, Filter, Schmiermittel, Ersatzteile bis zur Abnahme, notwendige Spezialwerkzeuge
- Lieferantendokumentation incl. CE-Kennzeichnung und Konformitätserklärung
- Komplette Ausführungsplanung für Equipment, Rohrleitungen, MSR und Elektrotechnik innerhalb des Lieferumfangs
- Funktionstest und Probelauf aller Anlageteile

Zu berücksichtigende Verordnungen und Richtlinien:

- 1935/2004/EG Verordnung über Materialien und Gegenstände für Lebensmittelkontakt
- 2006/42/EC Allgemeine Maschinenrichtlinie
- 2014/30/EU Richtlinie über die elektromagnetische Verträglichkeit
- 2014/68/EU Druckgeräterichtlinie
- 2014/35/EU Niederspannungsrichtlinie