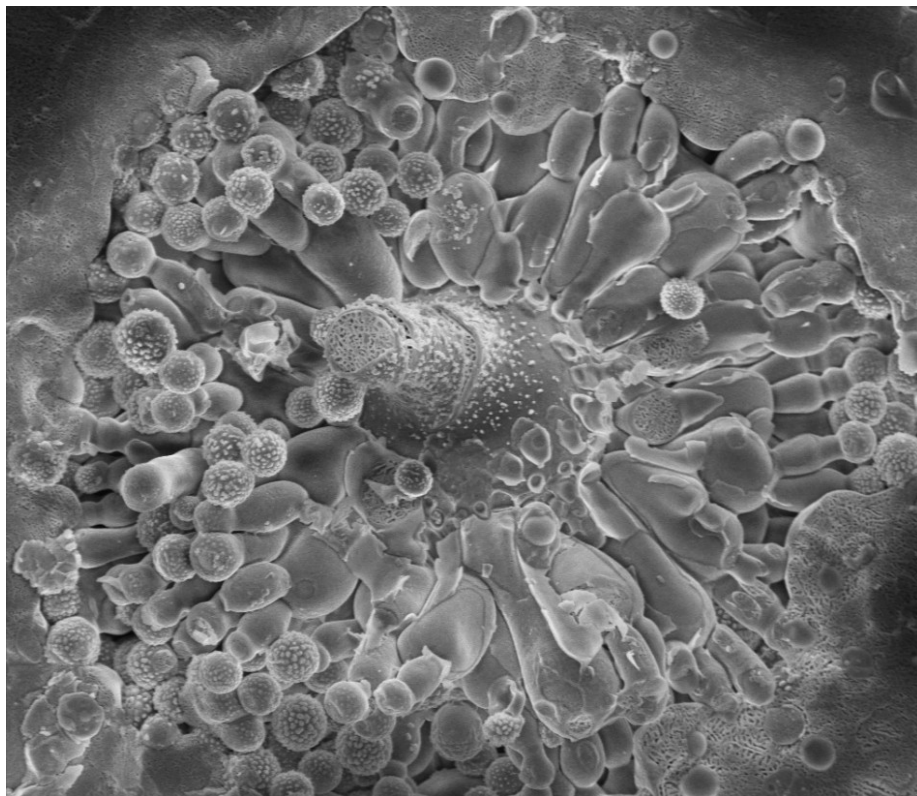


MycoRice

Vergleich des Wachstums und der ernährungsphysiologischen
Bewertung des Proteingehaltes von Pilz-Reis-Hybridprodukten



Abschlussbericht der Kooperationsphase 2024/2025

durchgeführt am Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse
des Max Rubner-Instituts (MRI)

betreut von PD Dr. Markus Schmidt-Heydt,
Dr. Adetoye Wolfgang Adeyemo, Katharina Neumeier

Silas Hauck
haucksi@hector-seminar.de

Amaia Rodman
rodmanam@hector-seminar.de

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	1
1. Einleitung.....	2
2. Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Pilze.....	3
2.1.1 Ascomyceten (Schlauchpilze).....	3
2.1.2 Mykoproteine.....	3
2.2 Fermentation mit filamentösen Pilzen.....	4
2.2.1 Solid State Fermentation.....	4
2.2.2 Submerged Fermentation.....	5
2.3 Ausgewählte Pilze im Projekt.....	5
2.3.1 <i>Aspergillus oryzae</i>	5
2.3.2 <i>Penicillium camemberti</i>	6
3. Material und Methoden.....	8
3.1 Herstellung der Suspension.....	8
3.2 Beimpfung des Reises.....	11
3.3 Bestimmung der Kolonien bildenden Einheiten.....	12
3.4 Kryo-REM am Rasterelektronenmikroskop.....	13
3.4.1 Vorbereitung.....	14
3.4.2 Funktionsweise.....	15
3.5 SDS-PAGE.....	16
3.5.1 Funktionsweise.....	16
3.5.2 Herstellung der Gele.....	16
3.5.3 Vorbereitung der Proben.....	17
3.5.4 Probenauftrag und Gelelektrophorese.....	18
3.6 Bradford-Test.....	19
3.6.1 Funktionsweise.....	19

3.6.2 Durchführung.....	19
4. Ergebnisse.....	21
4.1 Bestimmung der KBE.....	22
4.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Hilfe des Bradford-Tests.....	23
4.3 Qualitative Proteinbestimmung durch eine SDS-PAGE.....	24
5. Diskussion.....	25
5.1 Vergleich der untersuchten Reis-Hybride.....	25
5.2 Vergleich mit anderen Ergebnissen.....	25
6. Zusammenfassung mit Zukunftsausblick.....	27
7. Danksagung.....	29
8. Quellen.....	30
Anhang.....	31
Chemikalienverzeichnis.....	31
Geräteliste.....	32
Messwerte Bradford.....	33

Abstract

Alternative proteins and meat substitutes have been gaining popularity in recent years, but they are still not considered to be a solution for the existing need of a guaranteed sustainable worldwide nutrition. Especially regions highly affected by climate change depend on high quality products with good nutritional content, long shelf life and an easy way to produce them.

While fungi are usually perceived negatively in public and while they do pose a threat in different aspects of our lives, they do offer plenty of opportunities in a variety of different fields.

Research does not only explore a potential increase in protein content or improving shelf life, but also how certain fungi might be able to process and degenerate already synthesized mycotoxins. Furthermore, some fungi could prevent mycotoxin producing fungi from growing.

Within this project, we analyzed the cultivation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium camemberti* on rice to evaluate their potential for enhancing protein content. We investigated the optimal temperature for both molds to grow, as well as the most effective duration for this process. Later on, we performed a Bradford Assay and used SDS-PAGE to analyze the total protein concentration together with the detailed protein profiles. Ultimately, the work provides insights into how traditional fungal species can be harnessed in innovative ways to help meet the urgent need for sustainable, nutritious, and easily produced food.

1 Einleitung

Alternative Proteinquellen erfreuen sich in den letzten Jahren immer größerer Beliebtheit und gewinnen als potenzielle Lösungen für globale Ernährungsherausforderungen große Aufmerksamkeit. Trotz des zunehmenden Interesses werden sie weiterhin nicht als potenzielle Lösung für den bestehenden und dringenden Bedarf an gesicherter nachhaltiger Ernährung betrachtet. Dieser Bedarf ist besonders groß in Regionen, die vom Klimawandel betroffen sind. Dort sind die Menschen stark auf den Zugang zu hochwertigen Lebensmitteln angewiesen, die einen guten Nährstoffgehalt, eine lange Haltbarkeit und eine einfache Art der Herstellung bieten. Hier bilden Pilze eine Möglichkeit, diese Qualitäten bei Lebensmitteln zu verbessern.

Während Pilze von der Öffentlichkeit meist negativ wahrgenommen und häufig mit Bedrohungen in Verbindung gebracht werden, bieten sie zahlreiche Möglichkeiten zur Nutzung. Die aktuelle Forschung konzentriert sich nicht nur auf das Potenzial von Pilzen, den Proteingehalt von Lebensmitteln zu erhöhen und deren Haltbarkeit zu verbessern, sondern untersucht auch, inwiefern bestimmte Pilzarten in der Lage sein könnten, bereits synthetisierte Giftstoffe, so genannte Mykotoxine, abzubauen. Zudem können einige Pilze das Wachstum von Mykotoxin produzierenden Pilzen verhindern.

Im Projekt wurde das Wachstum von *Aspergillus oryzae* und *Penicillium camemberti* auf Reis analysiert, mit dem Ziel, ihr Potenzial zur Steigerung des Proteingehalts dieses Grundnahrungsmittels zu bewerten. Dazu wurde der optimale Temperaturbereich für die Kultivierung untersucht. Außerdem wurde analysiert, welcher der beiden Pilze sich besser zur Kultivierung auf Reis eignet. Mit Hilfe eines Bradford-Tests wurde die Gesamtkonzentration an Proteinen in den verschiedenen Ansätzen bestimmt und verglichen. Die Zusammensetzung der erhaltenen Proteine wurde mittels einer SDS-PAGE analysiert.

Die Arbeit liefert so wichtige Erkenntnisse darüber, wie diese traditionellen Pilzarten auf innovative Weise genutzt werden können, um den dringenden weltweiten Bedarf an nachhaltigen, nahrhaften und einfach herzustellenden Lebensmitteln zukünftig zu decken.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Pilze

2.1.1 Ascomyceten (Schlauchpilze)

Bei den verwendeten Pilzen, *Aspergillus oryzae* und *Penicillium camemberti*, handelt es sich um Ascomyceten. Die Abteilung der Ascomycota umfasst eine große Bandbreite an verschiedenen Spezies, welche als Destruenten und Mykorrhiza eine wichtige Rolle in globalen Ökosystemen spielen.

Ascomyceten zeigen als typische Merkmale mikroskopische Strukturen, sogenannte „asci“, in denen endogen Ascosporen gebildet werden.

Ascomycota können sich zusätzlich zu dieser teleomorphen (sexuellen) Art der Fortpflanzung auch anamorph (asexuell) vermehren, was bei den meisten Pilzen die einzige Fortpflanzungsart in Kulturen darstellt. Zu dieser Fortpflanzung gehören die Konidien, kugelartige Strukturen, die der Verbreitung und Massenvermehrung dienen.

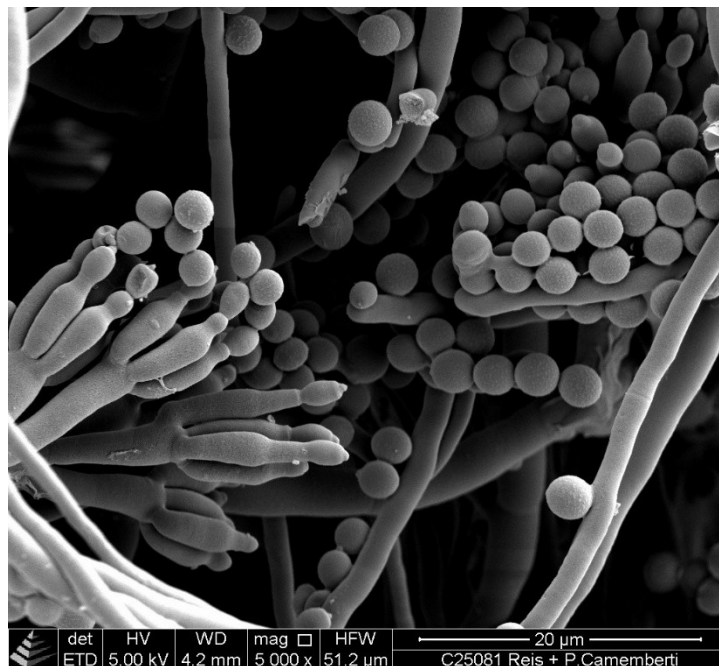


Abb. 1: *P. camemberti* mit Konidien, HFW = 51,2 µm

Darüber hinaus gehören sie zu den primären Zersettern von organischem Material in zahlreichen Ökosystemen.¹

1 Antonio Pedro, Fungal Genom Biol., Vol.14 Iss.2 No: 1000250

2.1.2 Mykoproteine

Der Begriff Mykoproteine bezeichnet Proteine, welche aus Pilzen gewonnen werden. Dabei handelt es sich um Zellmassen filamentöser Pilze mit einem vergleichsweise hohen Proteingehalt, einer erhöhten Menge an Ballaststoffen und einem geringen Anteil an gesättigten Fettsäuren. Sie enthalten alle für den Menschen notwendige Aminosäuren. Mykoproteine besitzen somit das Potenzial, ein wichtiger Bestandteil der Nahrung zu werden. Experimentelle Studien deuten darauf hin, dass Mykoproteine weitere Vorteile für die Gesundheit bieten könnten. Dazu zählen beispielsweise die Kontrolle des Cholesterinspiegels und die Blutzuckerregulation. Mit 6 g Ballaststoffen auf 100 g sind Mykoproteine laut der Vorgaben der Europäischen Kommission „reich an Ballaststoffen“, wobei es sich bei 12 % um lösliche und bei 88 % um unlösliche handelt. Laut der Europäischen Kommission sind Mykoproteine zudem eine potentielle Quelle für verschiedene Mineralstoffe, darunter Zink, Phosphate, Calcium und Eisen.²

All diese Aspekte zeigen, dass es sich bei Mykoproteinen um eine mögliche Alternative zu tierischen Proteinen handelt.

2.2 Fermentation mit filamentösen Pilzen

Die Herstellung von Mykoprotein enthaltender Biomasse erfolgt in der Industrie durch die Fermentation von landwirtschaftlichen Abfällen, wie Seegras, Soja oder Ananasschalen. Hierbei werden vor allem zwei Verfahren angewendet: Die Solid State Fermentation und die Submerged Fermentation.

2.2.1 Solid State Fermentation

Bei der Feststofffermentation (SSF) werden Pilze auf festen, meist getreidebasierten Substraten unter minimalem Flüssigkeitseinsatz kultiviert. Dazu wird zunächst ein Substrat aus Rohstoffen wie Weizen, Gerste oder Hafer vorbereitet, sodass es sowohl nährstoffreich als auch strukturell stabil bleibt. Nach der Inokulation mit einem ausgewählten Pilz, häufig aus der Gattung *Fusarium* oder *Pleurotus*, folgt die Fermentation in einem kontrollierten Umfeld. Hierbei werden Parameter wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Belüftung gezielt gesteuert, um ein optimales Myzelwachstum und die Synthese von Proteinen zu fördern.

Während des Fermentationsprozesses nutzt das Pilzmyzel die im Substrat enthaltenen Nährstoffe und bildet dabei eine proteinreiche Biomasse. Diese wird

2 Reshab Majumder, Sustainable Food Technol., 2024, 2, 81

anschließend durch Extraktions-, Filtrations- und Zentrifugationsschritte von Restmaterial und Sporen getrennt. Weitere Verarbeitungsschritte wie Texturierung, Aromatisierung und Formgebung sorgen dafür, dass das so gewonnene Mykoprotein sensorisch und technologisch den Anforderungen an Fleischalternativen entspricht und dementsprechend vielfältig eingesetzt werden kann.

2.2.2 Submerged Fermentation

Die Submerged Fermentation (SmF) beschreibt ein Verfahren, bei dem Mikroorganismen, meist Pilze wie *Fusarium*-Arten, in einem flüssigen Nährmedium kultiviert werden, das reich an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Vitaminen und Mineralstoffen ist. Nach Anzucht eines geeigneten Inokulums wird dieses in den Fermenter eingebracht, wo die eigentliche Fermentation unter streng festgelegten Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffverfügbarkeit und Rührgeschwindigkeit stattfindet. Dabei verwerten die Pilzzellen die gelösten Nährstoffe und bilden eine Biomasse, die einen hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren aufweist. Während des Prozesses werden Parameter wie Biomassekonzentration, pH-Stabilität und Sauerstoffgehalt kontinuierlich überwacht, um optimale Wachstums- und Produktionsbedingungen sicherzustellen.

Ist der gewünschte Gehalt an Mykoprotein erreicht, wird die Fermentation beendet und die Pilzbiomasse durch Zentrifugation und Filtration vom Medium getrennt. Anschließend wird sie weiterverarbeitet, um Textur und Geschmackseigenschaften zu verbessern. Industriell kommen dafür häufig Airlift-Bioreaktoren zum Einsatz, die im Vergleich zu herkömmlichen Rührkesseln energieeffizienter arbeiten und durch schonende Strömungsbedingungen ein längeres Hyphenwachstum fördern – ein wichtiger Faktor, um fleischähnliche Strukturen zu erzeugen. Das Endprodukt kann dann als vielseitiger Rohstoff für Fleischersatzprodukte genutzt werden, wobei der höhere Energieaufwand für die Belüftung und Bewegung des flüssigen Mediums für die Beurteilung der Ökobilanz berücksichtigt werden muss.³

2.3 Ausgewählte Pilze im Projekt

2.3.1 *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae ist ein filamentöser Schlauchpilz aus der Abteilung der Ascomyceten, der traditionell in Ostasien für die Herstellung fermentierter Lebensmittel wie Sojasauce, Miso und Sake genutzt wird. Er zeichnet sich durch ein

3 Reshab Majumder, Sustainable Food Technol., 2024, 2, 81

schnelles Myzelwachstum und eine ausgeprägte Enzymausstattung aus: *A. oryzae* produziert große Mengen an Amylasen, Proteasen und Lipasen, die Stärke, Proteine und Fette abbauen. Physiologisch gedeiht dieser Pilz optimal bei Temperaturen zwischen 30 °C und 35 °C und einem leicht sauren bis neutralen pH-Wert. Charakteristisch ist seine hohe Toleranz gegenüber osmotischem Stress, was ihn ideal für Substrate mit hohem Salz- oder Zuckergehalt macht. Durch seine GRAS-Einstufung („generally recognized as safe“) durch die „Food and Drug Administration“ der USA gilt *A. oryzae* zudem als unbedenklich für Lebensmittelanwendungen. All diese Eigenschaften machen ihn zu einem bevorzugten Organismus für fermentative Prozesse, insbesondere wenn eine enzymatische Vorverdauung komplexer Substrate erforderlich ist.⁴



Abb. 2: REM-Bild eines *A. oryzae*, HFW = 256 µm

2.3.2 *Penicillium camemberti*

Penicillium camemberti, ebenfalls ein Ascomycet, ist der klassische Weißschimmelpilz zur Reifung von Weichkäsen wie Camembert oder Brie. Er wächst als dichter, weißer Filz auf Oberflächen und bildet dabei charakteristische Konidienketten. *P. camemberti* ist physiologisch auf Temperaturen um 20 °C bis 25 °C und leicht saure Bedingungen angepasst. Seine Besonderheit liegt in der Produktion von Lipasen und Proteasen, welche während der Käsureifung komplexe

4 Machida, M et al., (2008), Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. DNA Res. (4), 173–183.

Aromastoffe freisetzen und für die weiche Textur sowie den typischen Geschmack verantwortlich sind. In der Forschung zu Mykoproteinen und neuartigen Fermentationsprozessen wird *P. camemberti* eingesetzt, da er schnell Myzelmasse bildet und dabei weniger Pigmente produziert als andere *Penicillium*-Arten. Dadurch wird der Pilz optisch neutral wahrgenommen und kann so gut in der Nahrungsmittelproduktion eingesetzt werden. Dies macht *P. camemberti* zu einem interessanten Kandidaten für zukünftige Fermentationsansätze.⁵

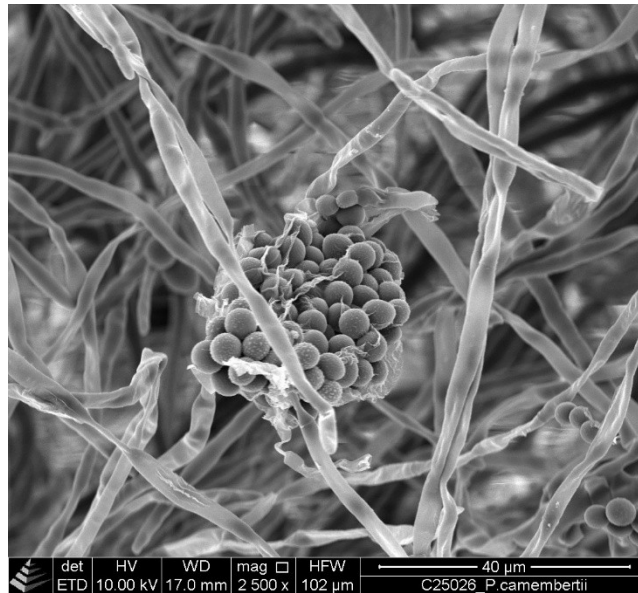


Abb. 3: REM-Bild eines *P. camemberti*, HFW = 102 µm

5 Dufossé, L et al. *Penicillium camemberti*: the white cheese mold. *Microorganisms*. 2021;9(10):2118.

3 Material und Methoden

Im Experiment soll das Wachstum der gewählten Pilzarten auf Reis und entstehende Unterschiede im Proteingehalt und der Proteinzusammensetzung des Hybridprodukts im Vergleich zum unbehandelten Reis untersucht werden. Dazu wird zunächst ein Pilz-Reis-Ferment hergestellt. Hierzu werden die Pilze der Art *Aspergillus flavus* var. *oryzae* (im Folgenden *A. oryzae*) und *Penicillium camemberti* (im Folgenden *P. camemberti*) sowie handelsüblicher Rundkornreis verwendet.

Der in Wasser gekochte Reis wird mittels einer Sporensuspension beimpft.

3.1 Herstellung der Suspension

Zur Herstellung der Sporensuspension werden die Pilze einzeln zunächst auf einem Kartoffel-Dextrose-Agar (kurz: PDA) angeimpft und 23 Tage lang bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wächst das Myzel heran und bildet Sporen aus, sodass anschließend eine Sporensuspension hergestellt werden kann.



Abb. 4: *P. camemberti* auf PDA nach 23 Tagen



Abb. 5: *A. oryzae* auf PDA nach 23 Tagen



Abb. 6: Filtration der Sporensuspension um Myzelrückstände zu entfernen

Hierfür wird auf einer sauberen und desinfizierten Arbeitsfläche unter sterilen Arbeitsbedingungen eine Probe vom PDA-Medium entnommen und in ein mit NaCl-Tween®-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt.

NaCl-Tween® enthält Kochsalz, welches die Dichte der Lösung erhöht und Tween-80® (Polysorbat-80), ein nicht-ionisches Tensid, das die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzt und somit eine homogene Sporenverteilung in der Suspension ermöglicht.

Die Sporensuspension wird durch Glaswolle filtriert, sodass Myzelreste aus den Sporensuspensionen entfernt werden. Nur die Sporen verbleiben in der Lösung. So kann gewährleistet werden, dass der Pilz tatsächlich nur aus den Sporen wächst und nicht aus Myzelrückständen.

Anschließend wird die filtrierte Sporensuspension ausgezählt, um eine Suspension mit definierter Sporenkonzentration herzustellen. Dazu verwendet man eine Thoma-Zählkammer. Um die durchschnittliche Sporenkonzentration pro Milliliter zu bestimmen, werden fünf der sechzehn Kammern ausgezählt. Diese fünf sind die vier Kammern von oben links diagonal über die Kammer bis zur unteren rechten Ecke sowie die Kammer in der oberen rechten Ecke (Abb. 7). Deren Sporenanzahl wird addiert, durch die Anzahl der ausgezählten Kammern geteilt und mit dem Kammerfaktor und bei Verdünnungen dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

$$\frac{S_1+S_2+\text{usw.}}{n} \cdot \text{Kammerfaktor} \cdot \text{evtl. Verdünnungsfaktor} = \text{Sporen/mL}$$

Hierbei ist S die Anzahl der Sporen in der jeweiligen Kammer und n die Anzahl der ausgezählten Kammern.

Diese Auszählung sieht dann beispielsweise folgendermaßen aus:

A. oryzae

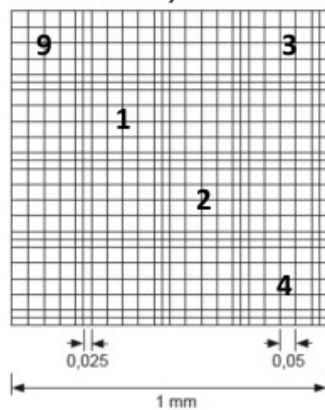


Abb. 7: Thoma-Zählkammer mit Werten für *A. oryzae*

$$S_{\text{Sporen ges.}} = 9+1+2+4+3=19$$

$$S_{\text{Sporen ges.}} / n_{\text{Anzahl Kammern}} = 19:5=3,8$$

$$3,8 \cdot 250000 = 9,5 \cdot 10^5 \text{ Sporen/mL}$$

P. camemberti (1:100)

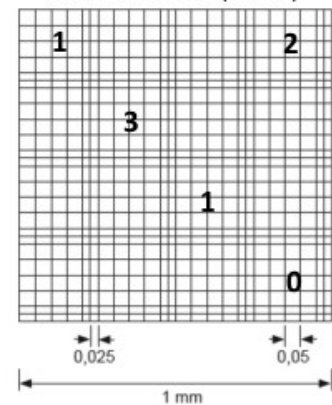


Abb. 8: Thoma-Zählkammer mit Werten für *P. camemberti*

$$S_{\text{Sporen ges.}} = 1+3+1+0+2=7$$

$$S_{\text{Sporen ges.}} / n_{\text{Anzahl Kammern}} = 7:5 = 1,4$$

$$1,4 \cdot 250000 = 3,5 \cdot 10^5 \text{ Sporen/mL}$$

Da in der Sporensuspension des *P. camemberti* zu viele Sporen enthalten waren, um die unverdünnte Suspension auszuzählen, wurde sie 1:100 verdünnt. Weitergearbeitet wurde mit der Verdünnung.

Die vorliegenden Suspensionen wurden mit Pufferlösung auf eine Konzentration von 10^5 Sporen pro Milliliter verdünnt. Hierfür rechnet man mit der Konzentration, die man erreichen möchte (Konz. 2), und teilt diese durch die ermittelte Konzentration (Konz. 1), und multipliziert diese mit dem Ansatzvolumen (Vol. 2), um die Anteile der jeweiligen Sporensuspension (Vol. 1) und dem Puffer zu erhalten.

Die Berechnung erfolgt grundsätzlich über die nachstehende Formel, in die die vorliegenden Werte eingesetzt werden.

$$\frac{\text{Konz. 2}}{\text{Konz. 1}} \cdot \text{Vol. 2} = \text{Vol. 1}$$

A. oryzae:

$$\frac{1 \cdot 10^5 \text{ Sporen/mL}}{9,5 \cdot 10^5 \text{ Sporen/mL}} * 4500 \mu\text{L} = 474 \mu\text{L} \text{ (NaCl-Tween} = 4026 \mu\text{L)}$$

P. camemberti:

$$\frac{1 \cdot 10^5 \text{ Sporen/mL}}{3,5 \cdot 10^5 \text{ Sporen/mL}} * 4500 \mu\text{L} = 1286 \mu\text{L} \text{ (NaCl-Tween} = 3214 \mu\text{L)}$$

3.2 Beimpfung des Reises

Der zu beimpfende Reis wird zunächst autoklaviert und anschließend werden ungefähr 250 g bei 200 °C in etwa 600 mL voll entsalztes Wasser (VE-Wasser) gegeben, umgerührt und unter Zugabe weiterer 400 mL VE-Wasser für ca. 25 Minuten gekocht. Nach den ersten acht Minuten Kochzeit wird der Reis vom Heizblock genommen, umgerührt und auf den Heizblock zurückgestellt.

Je ca. 200 g des gekochten Reises wird in Bechergläser abgewogen und zum Abkühlen auf Eis gestellt. Der Reis wird mit 4 mL der zuvor hergestellten Sporensuspension von *A. oryzae* der Konzentration 10^5 Sporen/mL beimpft und umgerührt. In einem zweiten Ansatz wird das entsprechend mit der *P. camemberti*-Suspension verfahren.

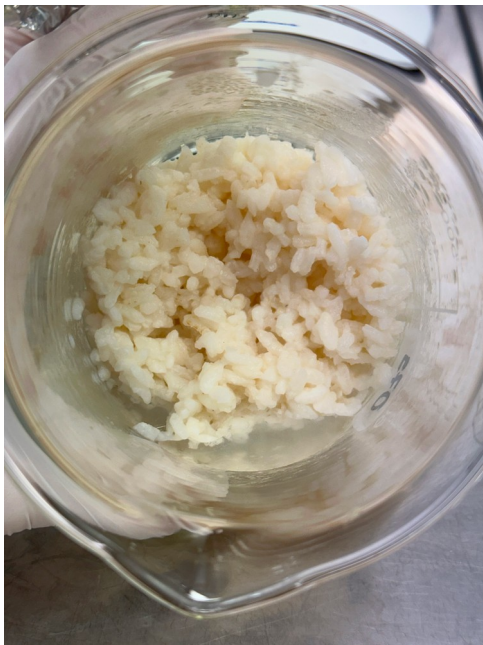


Abb. 9: mit *A. oryzae* beimpfter Reis
an Tag 0



Abb. 10: mit *P. camemberti* beimpfter
Reis an Tag 0

3.3 Bestimmung der Kolonien bildenden Einheiten

Um das Wachstum der Pilze auf dem Reis bei verschiedenen Temperaturen bestimmen und vergleichen zu können, werden alle zwei bis drei Tage ca. 1 g Probe entnommen und bei -20 °C eingelagert. Hiermit können später in einem weiteren Arbeitsschritt die Kolonien bildenden Einheiten (KBE) bestimmt werden.

Mit diesen Proben wird anschließend pro Pilz je eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem die Proben in jedem Schritt jeweils 1:10 verdünnt werden. Hierfür wird die aufgetaute Probe in 9 mL NaCl-Tween® gegeben und gemischt.

Die verwendeten Verdünnungsstufen werden im Laufe der Zeit höher, da der Pilz den gesamten Reis bewächst und somit mehr Sporen und dementsprechend mehr KBE in der Probe enthalten sind. Um die KBE weiterhin auszählen zu können, verwendet man daher höhere Verdünnungen.

Von diesen Verdünnungen werden nun 100 µL mit einem sterilen Drigalskispatel auf Malzextrakt-Agar (MEA) ausgestrichen und drei Tage bei 25 °C inkubiert. In dieser Zeit wachsen die sichtbaren Kolonien heran (Abb. 11, 12).

Somit können nach drei Tagen Inkubationszeit die KBE ausgezählt und die Sporenkonzentration ausgerechnet werden. Aus den gewonnenen Daten wird eine Wachstumskurve des Pilzes erstellt (→ 5.1).

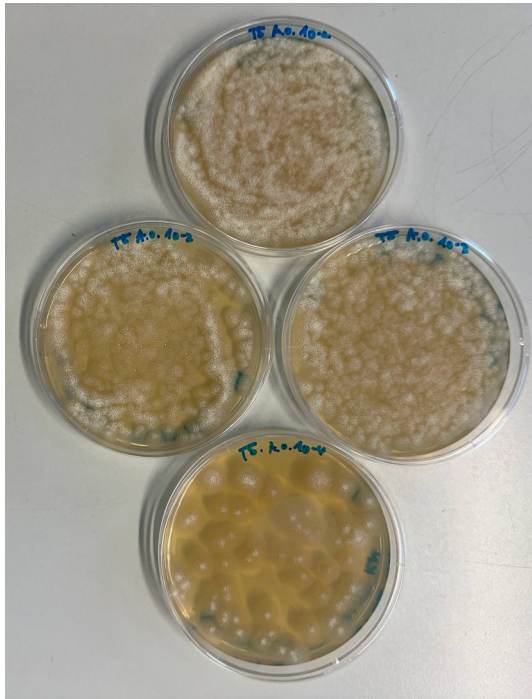


Abb. 11: MEA-Platten der KBE-Bestimmung von Tag 5, entnommen von *A. oryzae*, Verdünnungen 10^{-2} (oben), 10^{-3} (Mitte) und 10^{-4} (unten).

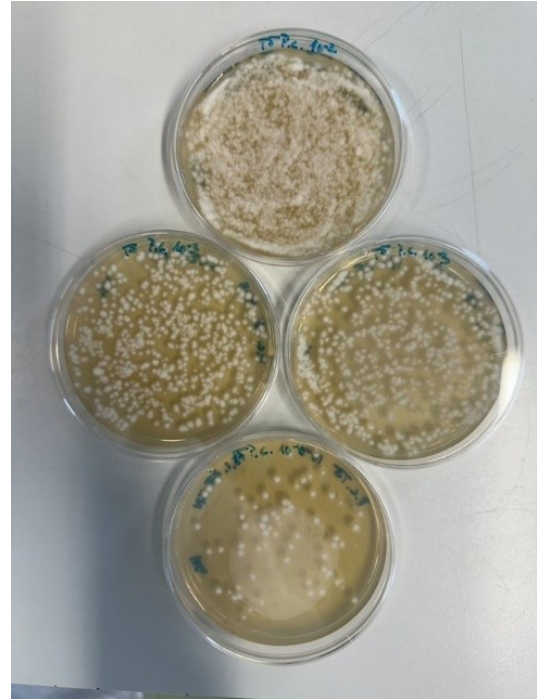


Abb. 12: MEA-Platten der KBE-Bestimmung von Tag 5, entnommen von *P. camemberti*, Verdünnungen 10^{-2} (oben), 10^{-3} (Mitte) und 10^{-4} (unten).

3.4 Kryo-REM am Rasterelektronenmikroskop

Die Strukturen von Reis und Pilz sowie des fermentierten Reises wurden mithilfe von Aufnahmen eines Rasterelektronenmikroskops (REM) untersucht und miteinander verglichen.

Um REM-Aufnahmen wasserhaltiger Proben zu machen, sind spezielle Verfahren notwendig, da ansonsten im Vakuum bei Raumtemperatur Wasser verdampft und dabei biologische Strukturen zerstört werden. Wasserhaltige Proben müssten dementsprechend entwässert werden, wodurch allerdings Artefakte auftreten.

Alternativ kann man die Kryo-REM Methode verwenden, bei der die Probe vor der Untersuchung im Vakuum in „slushy“ Stickstoff eingefroren und so der Prozess der Sublimation verlangsamt wird. Hierdurch wird beinahe der natürliche Zustand der Probe erhalten und es kann deren tatsächliche Struktur fotografiert werden. Sie wird daher vor allem bei wasserhaltigen und biologischen Proben bevorzugt.

3.4.1 Vorbereitung

Die Proben werden zur weiteren Bearbeitung und Untersuchung mit Graphitkleber auf einem so genannten Shuttle befestigt (Abb. 13).

Um die Bildung größerer Eiskristalle in der Probe beim Einfrieren zu vermeiden, wird die Probe in „slushy“ Stickstoff, also einem gelartigen, -210 °C kalten Stickstoff, schockgefroren. Hiermit umgeht man die langsamere Abkühlung durch den Leidenfrost-Effekt (Bildung eines isolierenden Gaspolsters um die Probe), der beim Eintauchen in flüssigen Stickstoff aufträte.

Nach dem Einfrieren wird die Probe auf dem Shuttle in die Vakuumkammer des REM transferiert. Dort wird sie hauchdünn mit Platin beschichtet, wodurch sie leitfähig wird (Abb. 14). Die Arbeitstemperatur in Vakuumkammer und im REM, welche direkt miteinander verbunden sind, liegt zwischen -170 °C und -130 °C .

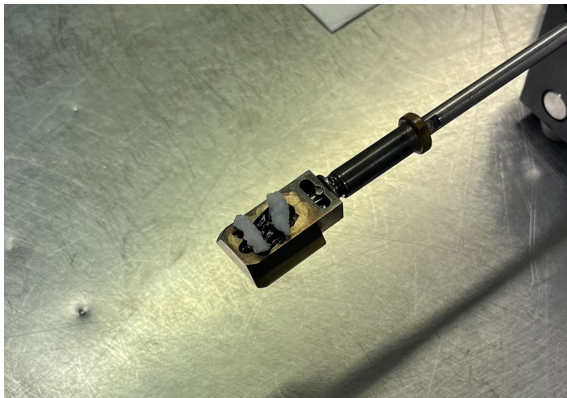


Abb. 13: Befestigen der Probe mit Graphitkleber auf dem Shuttle

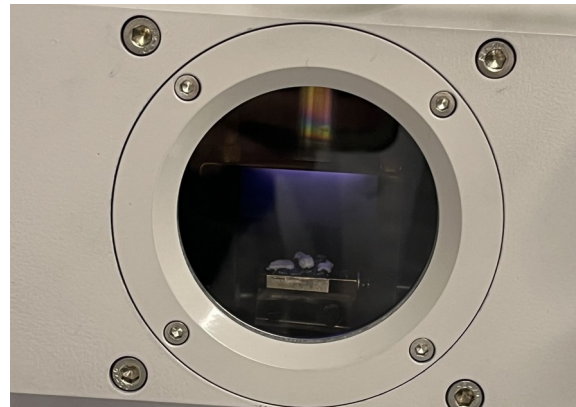


Abb. 14: Aufbringen des Platins auf die Probe

3.4.2 Funktionsweise

Im REM wird ein sehr dünner und starker Elektronenstrahl erzeugt. Trifft dieser auf die Probe, interagiert er mit dieser. Hierbei werden Sekundärelektronen freigesetzt, die sich durch den Elektronenstrahl des REM aus der Probe lösen. Zudem werden die Elektronen des Elektronenstrahls teilweise von der Probe zurückgestreut. Diese *backscattered electrons* (BSE) haben eine höhere Energie als die Sekundärelektronen. Auch Röntgenstrahlung wird bei der Untersuchung einer Probe im REM frei, wenn ein Elektron des Elektronenstrahls ein kernnahes Elektron der Probe aus seiner Position schlägt. Diese Lücke wird aufgefüllt mit einem energiereicheren Elektron aus einer weiter vom Kern entfernten Position im Atom, wobei Röntgenstrahlung frei wird.

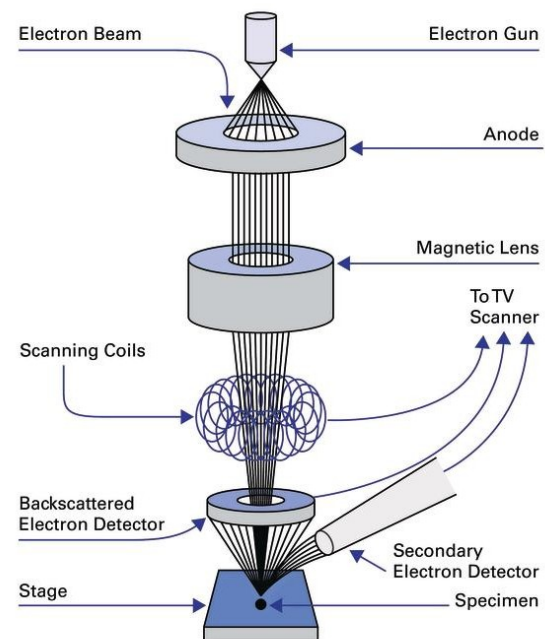


Abb. 15: Prinzip des REM (<https://epp.industrie.de/wp-content/uploads/3/6/3616061.jpg>)

All diese und weitere Interaktionen kann man am REM messen und so ein Bild der Probe erstellen. Dies passiert mithilfe signalspezifischer Detektoren, die beispielsweise die Sekundär- und Rückstrahlelektronen oder auch die charakteristische Röntgenstrahlung erfassen.

Die Stage, auf der das Shuttle mit der Probe, fixiert ist, lässt sich in alle Richtungen – also auf der x-, y- und z-Achse – verschieben. Somit können Aufnahmen von allen Seiten der Probe gemacht und ein dreidimensionales Bild erzeugt werden.

3.5 SDS-PAGE

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine nach ihrer Molekülmasse trennen.

3.5.1 Funktionsweise

Flüssige Proteinextrakte werden in kleine Öffnungen, sogenannte Taschen, eines Gels gegeben. Sobald alle Proben im Gel sind, wird eine Spannung angelegt. Bei einer SDS-Gelelektrophorese liegen die Proteine, deren Sekundär- und Tertiärstruktur in der Vorbereitung durch SDS zerstört wurden, negativ geladen vor und wandern im elektrischen Feld vom Minuspol zum Pluspol. Das obere Drittel des Gels besteht aus einem weitporigen Sammelgel, in das die zuvor denaturierten Proteinextrakte geladen werden. Die unteren zwei Drittel des Gels hingegen bildet das engporigere Trenngel. Im Sammelgel werden die Proben so konzentriert, sodass sie eine schmale Bande bilden. Im Trenngel findet anschließend die Trennung nach dem Molekulargewicht statt. Die Auftrennung der Proteine im Gel dauert in der Regel ungefähr eineinhalb Stunden.

Sobald diese erfolgt ist, werden die Proben im Gel fixiert, indem das Gel in Eisessig gelegt wird. Dann wird es in eine Coomassie®-Färbelösung überführt, wobei das Gel gefärbt und die Farbe an die Proteinbanden gebunden wird. Nachfolgend wird das Gel wieder entfärbt, wobei die Farbe nur an den Proteinbanden verbleibt und diese so als blaue Banden sichtbar werden.

3.5.2 Herstellung der Gele

Das Gel wird in drei Schichten hergestellt und gegossen: Die erste Schicht bildet das Verschlussgel, welches das Herausfließen des Trenngels der zweiten Schicht beim Gießen verhindert, die dritte und letzte Schicht bildet das Sammelgel. In dieses wird im noch flüssigen Zustand ein Kamm gesteckt, durch den Probentaschen entstehen werden, in die die Proben pipettiert werden. Der Kamm wird vor der Durchführung der Gelelektrophorese aus dem Gel entfernt und die Taschen durch Ausspülen mit einer Pipette von eventuellen Gelresten gereinigt.

Zur Herstellung des Gels werden bidestilliertes Wasser, eine 30%ige Acrylamid-Lösung (mit dem Verhältnis von 37,5:1 von Acrylamid zu *N,N*-Methylenbisacrylamid), Tris-HCl Lösung ($c = 1,5 \text{ mol/L}$, pH 8,8) mit 0,4 % SDS (Trenngelpuffer) beziehungsweise Tris-HCl Lösung ($c = 0,5 \text{ mol/L}$, pH 6,8) mit 0,4 % SDS (Sammelgelpuffer), TEMED und eine 10%ige APS-Lösung benötigt.

Für das Sammelgel werden 1500 mL Wasser, 350 µL Acrylamidlösung und 625 µL Sammelgelpuffer mit 12,5 µL APS-Lösung und 10 µL TEMED benötigt. Zunächst werden alle Lösungen bis auf TEMED und die APS-Lösung gemischt und diese erst direkt vor dem Gießen hinzugegeben, um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern.

Das Trenngel wird aus 180 µL Wasser, 165 µL Acrylamid-Lösung, 125 µL Sammelgelpuffer sowie 30 µL APS-Lösung und 6,5 µL TEMED auf dieselbe Art hergestellt.

Um das Verschlussgel herzustellen, werden 1715 µL Wasser, 2000 µL Acrylamidlösung, 1250 µL Sammelgelpuffer sowie 25 µL APS-Lösung und 5 µL TEMED benötigt.

Zwischen dem Gießen der einzelnen Schichten werden diese mit Isopropanol bedeckt, sodass beim Gießen entstandene Luftblasen verschwinden und man eine gerade Abschlusslinie des Gels erhält. Danach wird es mit Watman-Papier wieder abgenommen, bevor die nächste Schicht gegossen wird.

3.5.3 Vorbereitung der Proben

Die Proteine müssen aus den Proben extrahiert werden. Hierfür werden sie zunächst in Reinstwasser gegeben, die Lösung wird mit Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt und eine Stunde lang bei 25 °C inkubiert. Danach werden die Proben bei 9000 g und 4 °C 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird aufgehoben.

Anschließend wird der gesamte Vorgang mit dem Pellet (fester Anteil des Zentrifugationsprodukts) wiederholt und der Überstand mit dem ersten gemischt. In diesen Schritten werden die Proteine aus den Proben gelöst und sind dann in der Lösung enthalten.

Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 4,5 eingestellt. Hierbei tritt die Proteinfällung ein. Wieder wird die Probe eine Stunde lang bei 25 °C inkubiert und bei 9000 g und 4 °C 30 Minuten zentrifugiert. Das entstandene, aus den extrahierten Proteinen bestehende Pellet wird in ultrapurem Wasser gelöst und auf pH 7 eingestellt. Die fertig aufbereitete Probe wird bei -20 °C eingefroren und dann gefriergetrocknet. Bei Bedarf kann sie gemörsert werden und dann in Wasser gelöst in der Gelelektrophorese eingesetzt werden.

3.5.4 Probenauftrag und Gelelektrophorese

Jeweils 15 μL Probe werden mit 15 μL Laemmli-Puffer versetzt, gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wird sie 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und wieder auf Eis gelegt. Das gesamte Probenvolumen von 30 μL wird vorsichtig in die Probentaschen des Sammelgels pipettiert (Abb. 13). Die erste Tasche wird mit einer Vergleichsprobe beladen, dem Marker, ein Gemisch aus Proteinen bekannter Molekülmassen, mit dessen Hilfe man durch Vergleichen die Molekülmassen der Proteine in der Probe bestimmen kann.

Es wird eine Spannung von zunächst ca. 80 V angelegt, um die Proben im Sammelgel zu sammeln. Sobald ungefähr 30 Minuten später alle Proben das Ende des Sammelgels erreicht haben, wird die Spannung auf 120 V erhöht. Nach ca. eineinhalb Stunden ist die Gelelektrophorese beendet.

Die Gele werden 5 Minuten in Eisessig gelegt, um die Proben im Gel zu fixieren. Anschließend wird das Gel mit den Proben zur Färbung 20 Minuten in die Coomassie®-Färbelösung überführt. Über Nacht wird das Gel in Entfärbelösung entfärbt.

Für die Auswertung wird das Gel mit ChemiDoc dokumentiert. Anhand dieses Bildes und dem Vergleich mit den Banden der Markerproteine können nun die Molekülmassen der Proteine bestimmt werden. Mithilfe von Literaturwerten können zudem Rückschlüsse auf die enthaltenen Proteinarten gezogen werden.



Abb. 16: SDS-Gel, mit bereits mit Proben befüllten Taschen

3.6 Bradford-Test

Beim Bradford-Test handelt es sich um eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen.

3.6.1 Funktionsweise

Das Bradford-Reagenz besteht aus dem Farbstoff Coomassie®-Brillant Blau, welcher in Kombination mit den protonierten Aminogruppen von Proteinen einen Farbkomplex ausbildet, der einen Farbumschlag ins Blaue bewirkt. Diese blaue Färbung ist abhängig vom Protein, an welches Coomassie®-Brillant Blau bindet, sodass eine Kalibrierung mit einer Proteinstammlösung vor jeder Durchführung eines Bradford-Tests notwendig ist.

Mit einem Photometer wird anschließend die Absorption der Probe gemessen. Anhand der Kalibriergeraden, die zuvor mit Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen erstellt wird, lässt sich die Menge des enthaltenen Proteins feststellen. Gemessen wird hierbei bei $\lambda = 595 \text{ nm}$, dem Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffs, gegen den Leerwert.

3.6.2 Durchführung



Abb. 17: Vorbereitung der Proben für den Bradford-Test

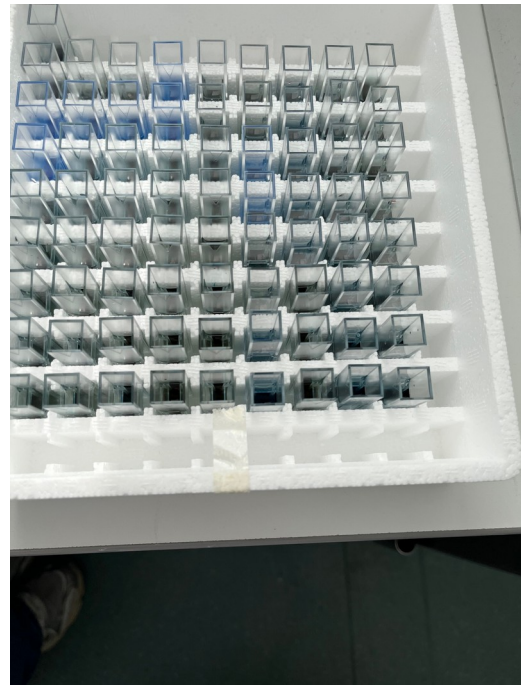


Abb. 18: mit Proben befüllte Küvetten für den Bradford-Test

Die Stammlösung enthält ein Milligramm Rinderserumalbumin (BSA) pro Milliliter Lösung. Für die Kalibriergerade wird diese Lösung mit VE-Wasser auf 100 µg/mL BSA verdünnt.

Die Kalibriergerade wird erstellt mit Proben der oben beschriebenen BSA-Lösung, deren Anteil der Probe zunächst 0 µL bzw. 0 % (Leerwert-Probe) und dann in Zehnerschritten ansteigend bis zu 100 µL bzw. 100 % der Probe ausmacht. Um Fehler zu verringern werden pro BSA-Probe zwei Reaktionsgefäße mit 100 µL der Probe und 900 µL Farblösung gefüllt und deren Extinktion gemessen. Die einzige Ausnahme bildet hierbei die Probe zur Bestimmung des Leerwerts, sprich die erste Probe der Kalibriergeraden, die kein Protein enthält.

Je 100 µL der zu untersuchenden Probe werden ebenfalls mit 900 µL der Bradford-Reagenz gemischt (Abb. 17) und etwa fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich der Farbkomplex bildet. Auch hier werden pro Probe zwei Reaktionsgefäße verwendet, um Fehler zu verringern.

Die gefärbten Proben werden in Küvetten umgefüllt, in denen sie in das Photometer eingesetzt werden können (Abb. 18).

Untersucht wurden jeweils ein Ferment der beiden Pilze auf Reis, einmal inkubiert bei 25 °C und einmal bei 30 °C, und des unfermentierten, gekochten Reises.

Verdünnungen der Proben

Temperatur der Fermentierung	25 °C	30°
<i>A. oryzae</i>	unverdünnt	1:15
<i>P. camemberti</i>	1:10	1:15
Reis	unverdünnt	

Sobald alle Proben vorbereitet sind, werden am Photometer die Extinktionswerte gemessen.

4 Ergebnisse

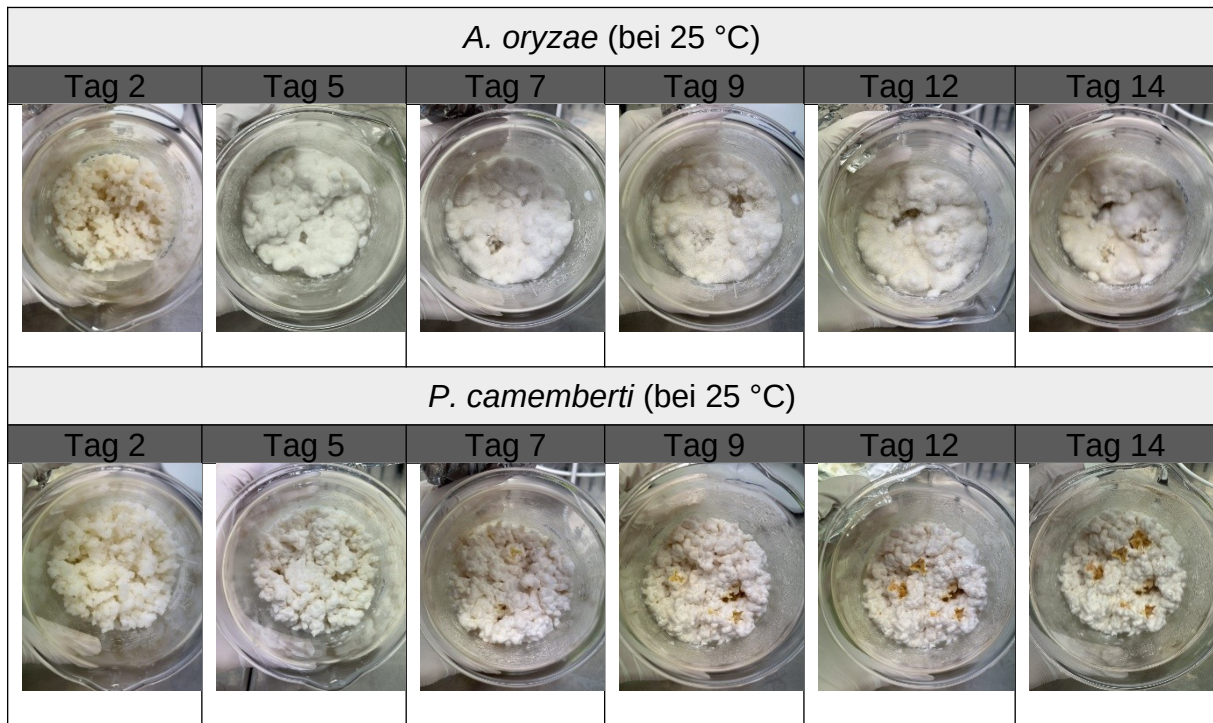


Abb 19: Fermentationsprozess der beiden Pilze bei 25 °C

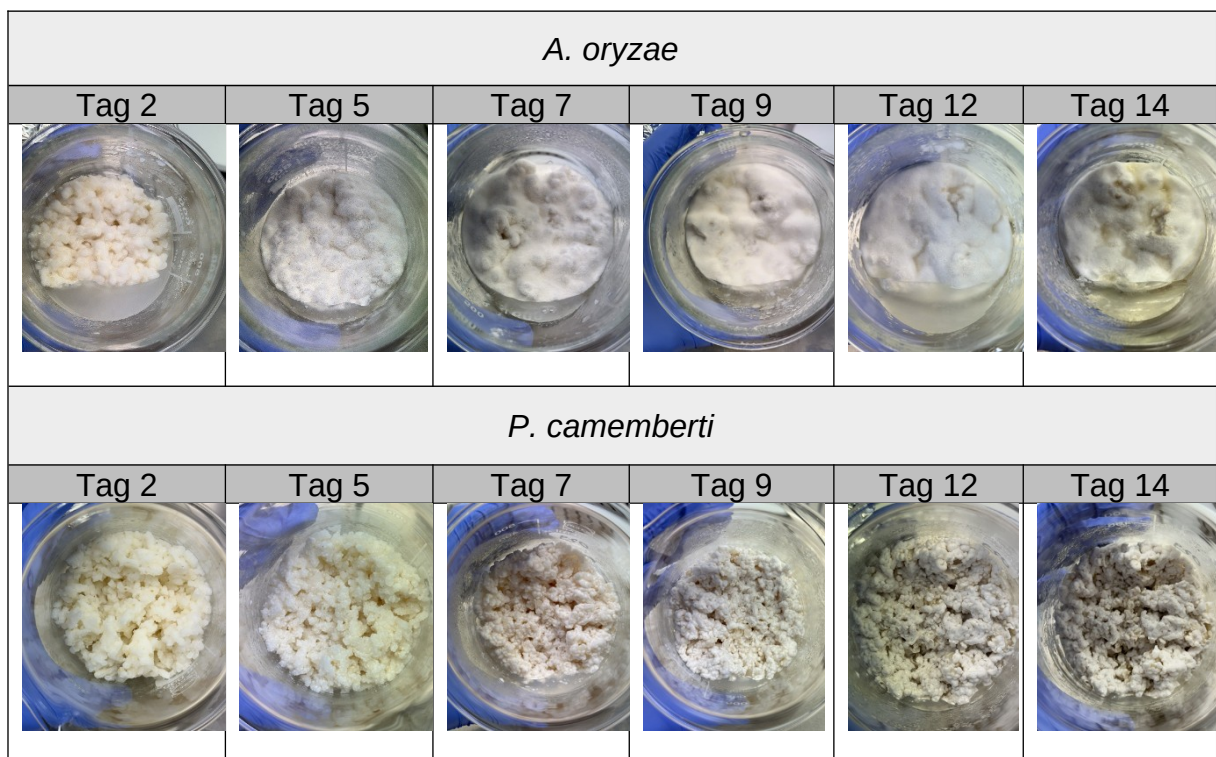


Abb. 20: Fermentationsprozess der beiden Pilze bei 30 °C

4.1 Bestimmung der KBE

Die beiden folgenden Diagramme zeigen die Anzahl Kolonien bildender Einheiten (KBE) in Abhängigkeit von der Länge der Inkubationszeit in Tagen für die beiden Ansätze bei jeweils 25 °C und 30 °C.

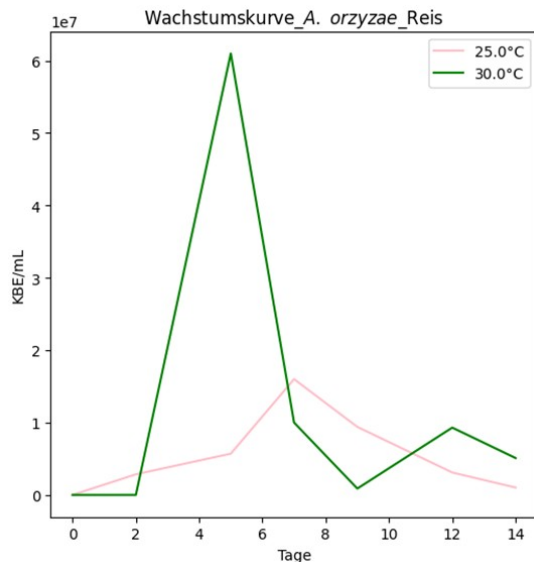


Abb. 21: Wachstumskurve von *A. oryzae* während einer 14-tägigen Inkubation bei 25 °C und 30 °C

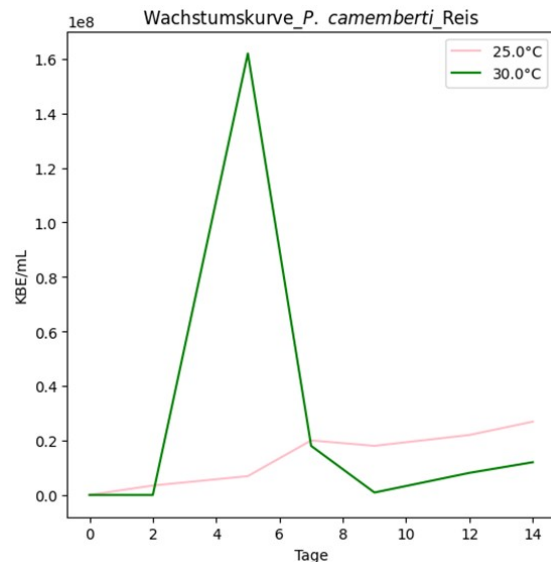


Abb. 22: Wachstumskurve von *P. camemberti* während einer 14-tägigen Inkubation bei 25 °C und 30 °C

Bei beiden Pilzen lässt sich erkennen, dass die Inkubation bei einer Temperatur von 30 °C eine höhere Wachstumsrate zur Folge hat, als die Inkubation bei 25 °C. Sowohl bei *A. oryzae* als auch bei *P. camemberti* liegt das Optimum zwischen fünf und sechs Tagen Inkubation.

Im Vergleich der beiden Kurven lässt sich erkennen, dass *A. oryzae* lediglich ein Maximum von $6,1 \times 10^7$ KBE/mL erreicht, während *P. camemberti* mit $1,62 \times 10^8$ KBE/mL ein rund 2,5-fach höheren Wert erreicht.

Auch die Wachstumskurven der beiden Pilze bei 25 °C weisen starke Ähnlichkeiten auf. Beide Pilze wachsen deutlich langsamer. Im Falle der Wachstumskurve des Pilzes *A. oryzae* handelt es sich weiterhin um eine Optimumkurve. *A. oryzae* erreicht sein Optimum von $1,6 \times 10^7$ KBE/mL am Tag sieben. Danach fallen die Werte bis Tag 14 ab.

Hier zeigt sich der erste größere Unterschied zwischen den beiden Pilzen: Bei *P. camemberti* lässt sich ein durchgängiger Anstieg der KBE/mL auf bis zu $2,2 \times 10^7$ KBE/mL an Tag 12 erkennen.

Bei beiden Pilzen wurden die Tage 2 und 14 für 25 °C interpoliert bzw. extrapoliert, da an diesen Tagen keine Bestimmung der KBE erfolgte. Demnach handelt es sich für diese Punkte lediglich um eine Annahme, wie die Kurven an diesen Tagen hätten verlaufen können.

4.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Hilfe des Bradford-Tests

Mit Hilfe des Bradford-Tests und der erstellten Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt sowohl des Reis-Pilz-Hybriden bestimmt, als auch der Gehalt des unbehandelten Reises.

Für alle Proben nahm man ein Volumen von 1,5 mL. Unter Berücksichtigung des Volumens und des Gewichts der Probeneinwaage errechnet man mit dem ermittelten Proteingehalt den prozentuelle Proteingehalt.

Für den Reis wurde beispielweise eine unverdünnte Probe analysiert. Hier ergab sich ein Proteingehalt von 0,06 mg/mL, dies entspricht bei einer Probeneinwaage von 10,3 mg 0.92 %.

In Tabelle 1 sind die Proteingehalte aller ausgewerteten Proben aufgeführt.

Tab. 1: Darstellung des Proteingehalts für alle Proben

Probe	Proteingehalt		Probeneinwaage
<i>A. oryzae</i> -Reis (25 °C)	0,05 mg/ml	2,68 %	2,9 mg
<i>A. oryzae</i> -Reis (30 °C)	1,07 mg/ml	5,25 %	30,6 mg
<i>P. camemberti</i> -Reis (25 °C)	0,49 mg/ml	2,38 %	30,6 mg
<i>P. camemberti</i> -Reis (30 °C)	0,85 mg/ml	4,24 %	30,1 mg
Reis	0,06 mg/ml	0,92 %	10,3 mg

Im Gesamten lässt sich sagen, dass in allen Hybridprodukten der Proteingehalt deutlich erhöht war gegenüber dem unbehandelten Reis, wobei die Ansätze bei 30 °C rund den doppelten Proteingehalt gegenüber den Ansätzen bei 25 °C aufwiesen. Dies geht auch mit den vermehrten KBE bei den Proben bei höherer Temperatur einher.

4.3 Qualitative Proteinbestimmung durch eine SDS-PAGE

Für die qualitative Proteinbestimmung wurde ein SDS-Gel genutzt (→ 3.5). Daraus ergaben sich die unten gezeigten Banden.

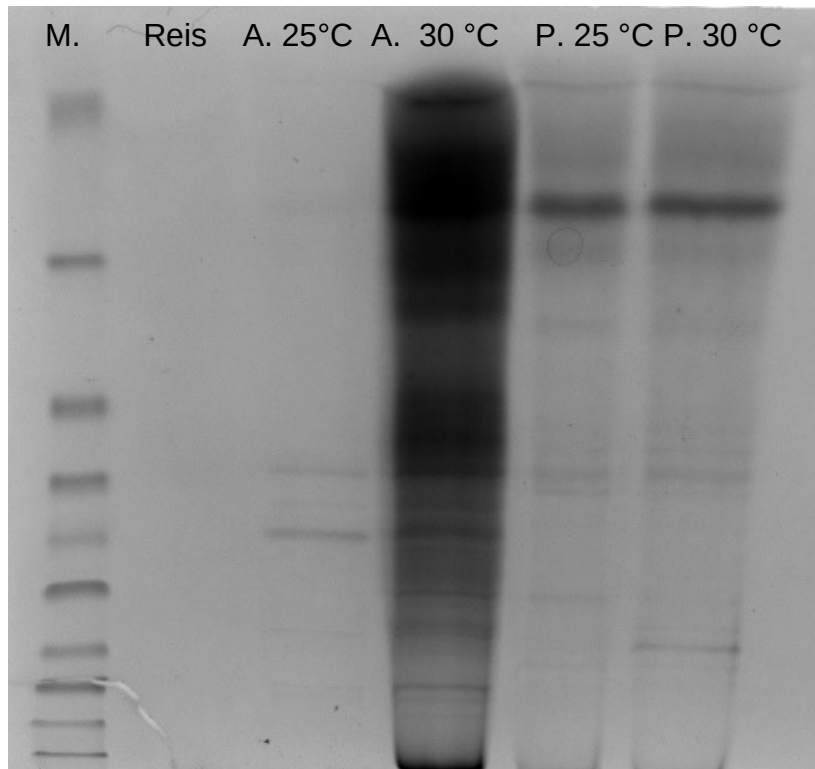


Abb. 23: SDS-Gelbild. Reihenfolge der aufgetragenen Proben (unverdünnt):

Marker, Reis, *A. oryzae* 25 °C / 30 °C, *P. camemberti* 25 °C / 30 °C

Im Gelbild sind sowohl Unterschiede in der Anzahl als auch der Stärke der Banden erkennbar, was auf eine quantitative und qualitative Zunahme an Proteinen bei den Hybriden gegenüber dem unbehandelten Reis schließen lässt. Im Falle von *P. camemberti* verändert sich die qualitative Zusammensetzung, bei einer Veränderung der Inkubationstemperatur, der enthaltenen Proteine nur marginal. Zwar sind die Banden für den Ansatz *A. oryzae* bei 30 °C verschmiert, dennoch sieht man in diesem Fall eine deutliche Veränderung bei den enthaltenen Proteinen. Es lassen sich mehr Banden erkennen, was auf eine qualitative Proteinzunahme schließen lässt.

4.4 Auswertung der REM-Aufnahmen

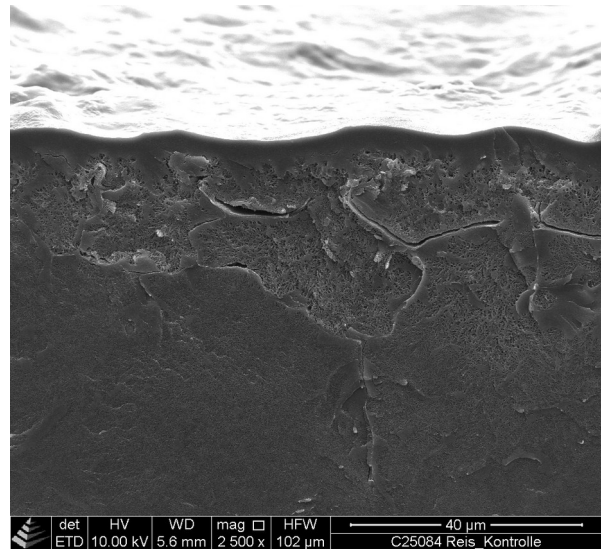
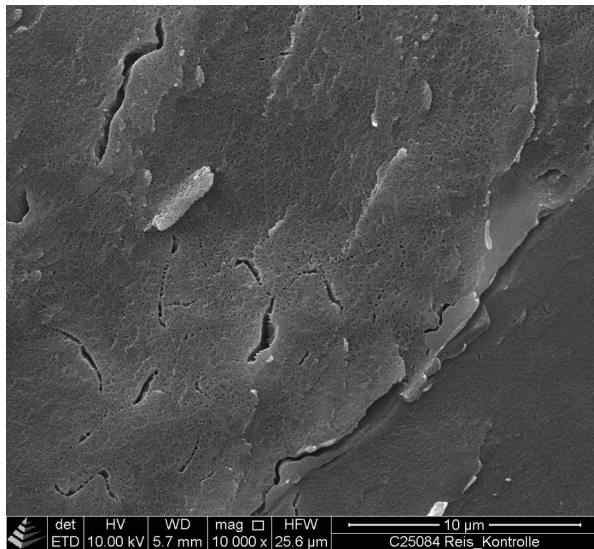


Abb. 24: Reisoberfläche, HFW = 25,6 µm **Abb. 25:** Reisinnes, HFW = 102 µm

Die Kryo-REM-Aufnahmen vom unbewachsenen Reis zeigen eine leicht poröse Struktur. Seine Oberfläche ist relativ glatt, besitzt aber kleine Risse und Poren (Abb. 24). Sein Inneres ist ebenfalls porös (Abb. 25).

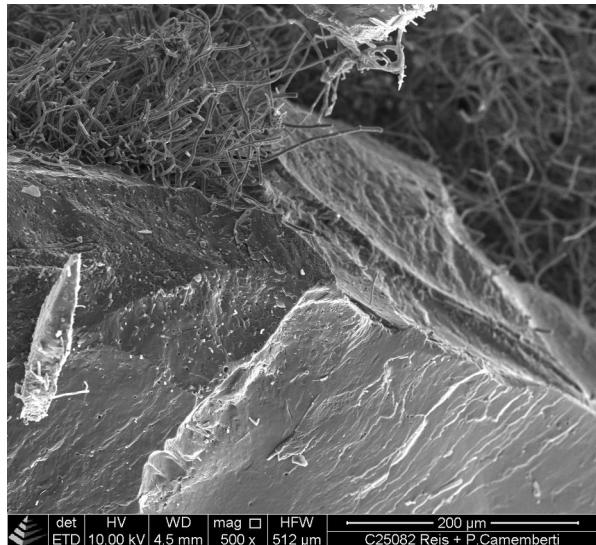
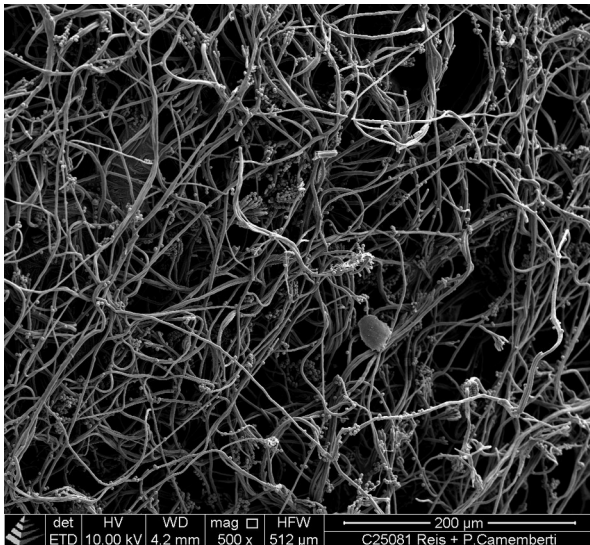


Abb. 26: Myzel des *P. camemberti* auf Reis, HFW = 512 µm **Abb. 27:** *P. camemberti* im Inneren des Reises, HFW = 512 µm

Auf den Aufnahmen des mit *P. camemberti* bewachsenen Reises kann man gut das dichte Myzel auf der Oberfläche des Reises erkennen (Abb. 26). Mithilfe eines Gefrierbruchs des Reises sind zudem Blicke in das Innere dieses möglich, wo man vor allem in den äußeren Randschichten des Reises Hyphen erkennen kann (Abb. 27). Allerdings ist *P. camemberti* nicht sehr tief in das Innere eingedrungen, dort kann man nur sehr vereinzelte bis gar keine Hyphen erkennen.

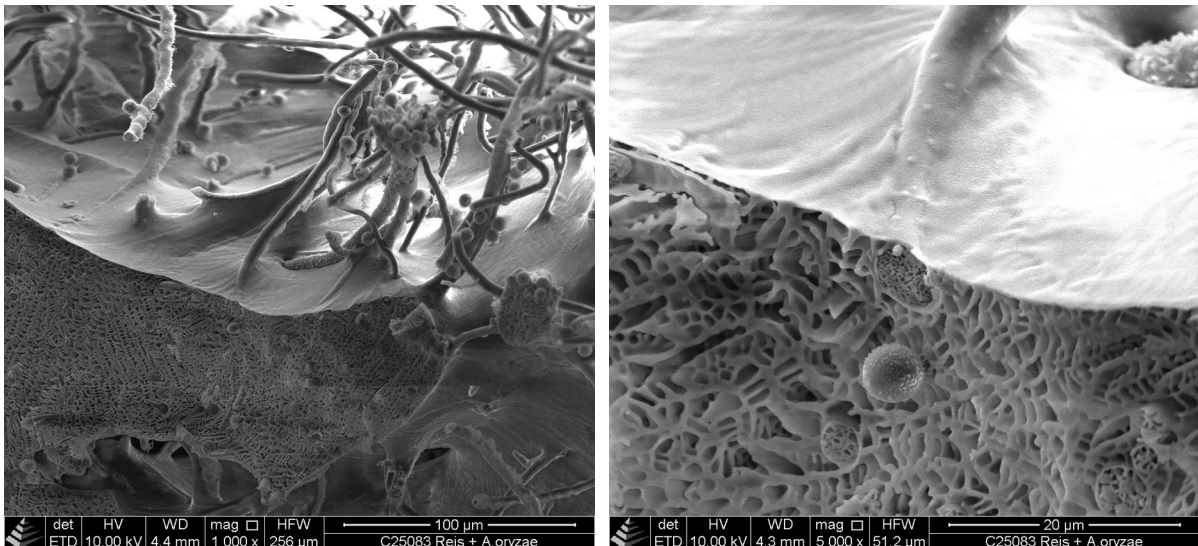


Abb. 28: *A. oryzae* auf Reis, **Abb. 29:** Eindringen des *A. oryzae* in Reis, HFW = 256 µm HFW = 51,2 µm

Beim *A. oryzae* erkennt man ebenfalls ein dichtes Myzel auf der Oberfläche des Reises (Abb. 28), das teilweise in die äußeren Randschichten des Reises hineinwächst (Abb. 29).

Es kann verschiedene Gründe haben, dass die Pilze nur in die äußeren Randschichten des Reises eingedrungen sind. Sie hatten eine Inkubationszeit von nur 5 Tagen, vielleicht bräuchten sie mehr Zeit, um auch in das Innere des Reises vorzudringen. Möglicherweise war es den Pilzen auch zu wässrig und sie sind deshalb nicht weiter in den Reis reingewachsen.

5 Diskussion

5.1 Vergleich der untersuchten Reis-Hybride

Die vorgestellten Ergebnisse lassen einen abschließenden Vergleich zwischen den gewählten Pilzen zu. Es zeigt sich, dass beide Pilze bei 30 °C näher an ihrem Temperaturoptimum liegen, da sie hier deutlich mehr Kolonien bildende Einheiten bilden und somit besser wachsen. Auffällig ist, dass beide Pilze nach fünf Tagen ihr Wachstumsmaximum erreichen. Diese Eigenschaft macht beide Pilze für eine zukünftige wirtschaftliche Nutzung interessant, da hierdurch eine Herstellung innerhalb von kurzer Zeit ermöglicht ist. Unterschiede lassen sich in der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit beobachten. *P. camemberti* bildet rund die zweieinhalbfache Anzahl an KBE gegenüber *A. oryzae*. Trotz des deutlich geringeren Wachstums zeigt *A. oryzae* beim Proteingehalt und bei der qualitativen Zusammensetzung der Proteine größeres Potential: In beiden Fällen schneidet *A. oryzae* gegenüber *P. camemberti* besser ab.

Im Hinblick auf die Zielsetzung, den Proteingehalt des Reises durch die Fermentation zu erhöhen, wäre der *A. oryzae* die näherliegende Wahl. Allerdings lässt sich keine abschließende Empfehlung formulieren. Unsere Analysen fokussierten sich lediglich auf das Wachstum der Pilze unter verschiedenen Bedingungen sowie deren Quantität im Produkt. Aspekte wie Haltbarkeit oder Feuchtigkeitstoleranz der Reis-Pilz-Hybride, aber auch andere Punkte, so zum Beispiel der mögliche Geschmack und Geruch, wurden nicht betrachtet.

5.2 Vergleich mit anderen Ergebnissen

Im Falle der optimalen Temperatur finden sich für *P. camemberti* Werte zwischen 20 °C bis 25 °C, in einigen Fällen wurden Temperaturen darunter angegeben. Dies deckt sich nicht mit den im Projekt ermittelten Werten. Eine mögliche Fehlerquelle könnte hier in der Aufarbeitung des Reises bestehen. Der Reis wurde gemäß der Packungsanweisung in einem Becherglas auf einer Heizplatte zubereitet. Bei der Inkubation mit *A. oryzae* ließ sich nach einiger Zeit ein Wasseranstieg auf bis zu $\frac{3}{4}$ des Reises beobachten. Dementsprechend ist der Pilz nur oberflächlich gewachsen, da er aerob ist. Dies könnte zur deutlich geringeren Wachstumsrate gegenüber *P. camemberti* geführt haben. Da dieses Phänomen bei beiden Temperaturen aufgetreten ist, lässt sich vermuten, dass etwas im Fermentationsprozess zum

Wasseraustritt führte. Allerdings könnte eine weitere Ursache in der gewählten Reissorte liegen, bei dieser handelte es sich um Rundkornreis, welcher vermutlich mehr Wasser aufnimmt als Langkornreis. Man hätte hier das austretende Wasser regelmäßig abgießen müssen, sodass der Pilz überall hätte wachsen können.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Projekts mit ähnlich gelagerten Projekten, verzeichneten auch diese einen Anstieg im Proteingehalt der untersuchten Hybride, allerdings fiel dieser meist deutlich geringer aus. Der Anstieg lag bei rund 0,4 % gegenüber der Kontrollprobe. Der deutlich höhere Anstieg im Proteingehalt könnte mit dem sehr geringen Proteingehalt im untersuchten Reis zusammenhängen. Der Eiweißgehalt lag laut Verpackung bei 7,2 %. Der ermittelte Wert von 0,92 % liegt deutlich unter diesem Wert. Ein leichter Abfall hätte sich durch die lange Lagerung oder den hohen Wasseranteil durch die Zubereitung erklären lassen. Der deutliche Abfall lässt sich so jedoch nicht erklären. Allerdings liefert auch das SDS-Gel ein ähnliches Bild für den Proteingehalt. Auch in diesem Fall sind beim Reis keine Banden zu erkennen, was zu dem geringen Proteingehalt passt. Dies macht einen Messfehler beim Bradford-Test unwahrscheinlich. Durch diesen Umstand wirken die erhobenen Daten für die Hybridprodukte allerdings plausibel. Dennoch sollte hier angemerkt werden, dass es sich beim Bradford-Test nicht um den „Goldstandard“ zur Bestimmung der Protein-Konzentration handelt, welchen die Kjeldahl-Methode darstellt. Außerdem war die genutzte Methode zur Proteinisolation bei Reis nur für Kichererbsen validiert. Hier sollte bei einem zukünftigen Projekt weiter getestet werden, welche Methode für Reis am besten geeignet ist. Auch für die Hybridprodukte fehlt eine validierte Methode. Die im Projekt identifizierten Abweichungen und potenziellen Fehlerquellen unterstreichen die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf optimierte Fermentationsbedingungen, Substrataufbereitung und sensorische Eigenschaften, um eine fundierte Empfehlung für den praktischen Einsatz treffen zu können.

6 Zusammenfassung mit Zukunftsausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass fermentative Prozesse mit den Pilzarten *Aspergillus oryzae* und *Penicillium camemberti* das Potenzial besitzen, den Proteingehalt eines Grundnahrungsmittels wie Reis zu erhöhen. Insbesondere bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C konnte bei beiden Pilzarten eine deutliche Zunahme an Kolonien bildenden Einheiten sowie ein erheblich gesteigerter Proteingehalt im Vergleich zur unbehandelten Reisprobe festgestellt werden. Diese Ergebnisse belegen die grundsätzliche Eignung traditionell genutzter Pilzarten für biotechnologische Anwendungen in der Lebensmittelveredelung. Angesichts der zunehmenden klimatischen und ökologischen Herausforderungen gewinnt dieser Ansatz an Relevanz.

Die qualitativen Analysen durch SDS-PAGE ergänzen diese Befunde und zeigen, dass nicht nur die Menge, sondern auch die Vielfalt der gebildeten Proteine durch die Pilzfermentation erweitert wurde. *A. oryzae* erwies sich im Vergleich zu *P. camemberti* als leistungsfähiger Organismus, sowohl in quantitativer als auch qualitativer Hinsicht. Diese Ergebnisse untermauern das Potenzial von *A. oryzae* als geeigneten Organismus zur funktionellen Aufwertung pflanzlicher Lebensmittel.

Gleichzeitig zeigten sich aber auch methodische Schwächen, insbesondere im Hinblick auf die Reiszubereitung und deren Einfluss auf das Wachstum der Pilze. Der ungleichmäßige Wassergehalt, insbesondere beim *A. oryzae*-Reis, könnte Wachstumsunterschiede mitverursacht haben. Auch der auffallend niedrige Proteingehalt des unbehandelten Reises wirft Fragen hinsichtlich der Rohstoffqualität oder methodischer Verluste während der Probenvorbereitung auf. Die gewonnenen Ergebnisse bieten somit wichtige Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen.

Neben der weiteren Optimierung der Kulturbedingungen könnte die Kombination verschiedener Pilzarten untersucht werden, um synergistische Effekte zu erzielen. Auch die Erweiterung der Nährwertanalysen um essentielle Aminosäuren, Ballaststoffe oder sekundäre Pflanzenstoffe wäre sinnvoll. Zusätzlich könnten sensorische Tests, mikrobiologische Stabilitätsprüfungen oder Langzeitlagerungsexperimente wichtige Erkenntnisse für eine mögliche Anwendung in der Praxis liefern.

Nicht zuletzt eröffnet die potenzielle Fähigkeit bestimmter Pilze, Mykotoxine abzubauen oder deren Bildung zu verhindern, ein weiteres spannendes Anwendungsfeld, das mit den hier erzielten Ergebnissen verknüpft werden könnte. So könnten fermentierte Produkte nicht nur nährstoffreicher, sondern auch sicherer gemacht werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass traditionelle Pilzarten wie *A. oryzae* und *P. camemberti* nicht nur Teil historischer Fermentationstraditionen sind, sondern auch in Zukunft weiterhin genutzt werden können. Ihre gezielte Nutzung zur Aufwertung pflanzlicher Lebensmittel kann einen wertvollen Beitrag leisten, um der steigenden Nachfrage nach nachhaltigen, nährstoffreichen und ressourcenschonenden Nahrungsmitteln gerecht zu werden.

7 Danksagung

Zum Ende dieser Arbeit bleibt uns noch einiges an Dank auszusprechen.

Unser Dank gilt zunächst PD Dr. Markus Schmidt-Heydt, der die Durchführung dieses Projekts im Rahmen der Kooperationsphase am Max Rubner-Institut überhaupt erst ermöglicht hat und in dessen Arbeitsgruppe für Mykotoxin-bildende und pathogene Pilze und Mykotoxine wir unsere Forschung durchgeführt haben.

Herzlich danken möchten wir auch Dr. Adetoye Wolfgang Adeyemo und insbesondere Katharina Neumeier, die uns in die Welt der Pilze eingeführt und uns während unserer Laborarbeit tatkräftig unterstützt haben.

Ebenso möchten wir uns bei unserer betreuenden Kursleiterin Anke Richert und unserem langjährigen Kursleiter Dietmar Gruber herzlich bedanken, die uns mit fachlicher Kompetenz und viel Geduld durch die Kooperationsphase sowie unsere gesamte Hector-Seminar-Zeit begleitet haben.

Darüber hinaus danken wir allen weiteren Kursleiterinnen und Kursleitern, die uns im Laufe der Jahre unterstützt und gefördert haben.

Zu guter Letzt geht unser Dank an das Ehepaar Dr. Hans-Werner und Josephine Hector. Durch die Gründung des Hector-Seminars und ihre großzügige Förderung ermöglichen sie interessierten und begabten Jugendlichen, ihr Potential zu entdecken und zu nutzen.

8 Quellen

Literatur:

Machida, M et al., (2008), Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res.* (4), 173–183.

Kitamoto, K. (2015), Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.*;79(6): 863–869.

Ropars J et al. (2020) Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Curr Biol.* 2020 ;30(22): 4441-4453.

Dufossé, L et al. *Penicillium camemberti*: the white cheese mold. *Microorganisms.* 2021;9(10):2118.

Majumder, R et al. (2023) Mykoprotein: production and nutritional aspects: a review, *Sustainable Food Technol*, 2024, 2, 81

Dissanayake, A.J.; Liu, J.-K. *Ascomycota: Diversity, Taxonomy and Phylogeny*, 2nd Edition: Editorial. *J. Fungi* 2025, 11, 419. <https://doi.org/10.3390/jof11060419> (20.07.2025)

Challacombe et al. *BMC Genomics* (2019) 20:976

Kretschmer, J. (2015) Kryo-Rasterelektronenmikroskopie; *Mikroskopie*, Jahrgang 2, Nr. 4/2015, S. 180-188

Abbildungen:

Abbildung 15: <https://epp.industrie.de/wp-content/uploads/3/6/3616061.jpg> (30.07.2025)

Anhang

Chemikalienverzeichnis

Chemikalie	Zusammensetzung
Natriumchlorid	
Tween-80®	
Potato Dextrose Agar (PDA)	
Malzextrakt	
Glukose	
Ultrapure Wasser (Milli-Q)	
Natronlauge (NaOH) (2M)	
Salzsäure (HCl) (2M)	
Salzsäure, 37 %, rauchend	
Bovines Serumalbumin (BSA, 0,1 %)	
Bradford-Reagenz	
Acrylamid/Bis-Lsg. (30 %)	
Tris	
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	
APS-Lsg (10 %)	
TEMED	
Isopropanol	
Lämmli-Puffer	- Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M) - Glycerol (50 %) - Bromophenol Blau (1,0 %) - SDS (10 %) - H₂O
Elektrophoresepuffer (TGS-Puffer)	- Tris - Glycin - SDS - H₂O
G1 Färbelösung	- CuSO₄*5H₂O - Essigsäure - H₂O
G2 Färbelösung	- Coomassie Brilliant Blue R250 - Methanol - H₂O
Entfärbelösung	- CuSO₄*5H₂O - Wasser

	- Methanol - Essigsäure
--	--

Geräteliste

Gerät	Spezifizierung	Hersteller
Sterilbank (Klasse 2)	BIOAIR Safemate 1.8	Euroclone, Milan, Italien
Magnetrührer mit Heizfunktion	RCT classic	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Inkubator	Heraeus B20	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Kühlschrank, 8°C		Liebherr
Tiefkühlschrank, -20°C		Siemens
Gefriertrocknungsanlage	Beta 2-8 LSCbasic	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Präzisionswaage	CPA224S-OCE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Superspeed-Zentrifuge	Sorvall Lynx6000 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Tischzentrifuge	Hareus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Vortexer	Genius 3	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	Quanta Feg 250	Thermo Fisher Scientific, FEI Deutschland GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland

Photometer	BioMate 3	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Abzug		Wesemann GmbH, Syke, Deutschland
Elektrophoresegerät	PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
ChemiDoc	Molecular Imager ChemiDoc™ XRS ⁺ Imaging Systems	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Bunsenbrenner	GASI	Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland
Autoklav	VE-150	Systec GmbH & Co. KG, Linden, Deutschland
Lichtmikroskop	Aristoplan	Leica, Wetzlar, Deutschland

Messwerte Bradford

Extinktionswerte, gemessen am Photometer bei 595 nm gegen den Leerwert		
	Ext 1	Ext 2
LW	-	
10	0,048	0,050
20	0,146	0,150
30	0,227	0,230
40	0,317	0,323
50	0,419	0,404
60	0,484	0,472

70	0,568	0,531
80	0,639	0,647
90	0,705	0,701
100	0,785	0,778
A. oryzae 25 °C UV	0,412	0,399
A. oryzae 30 °C 1:15	0,577	0,549
P. camemberti 25 °C 1:10	0,375	0,383
P. camemberti 30 °C 1:10	0,671	0,647
P. camemberti 30 °C 1:15	0,438	0,462
Reis UV	0,496	0,498

Abb. 23: Rohdaten Bradford

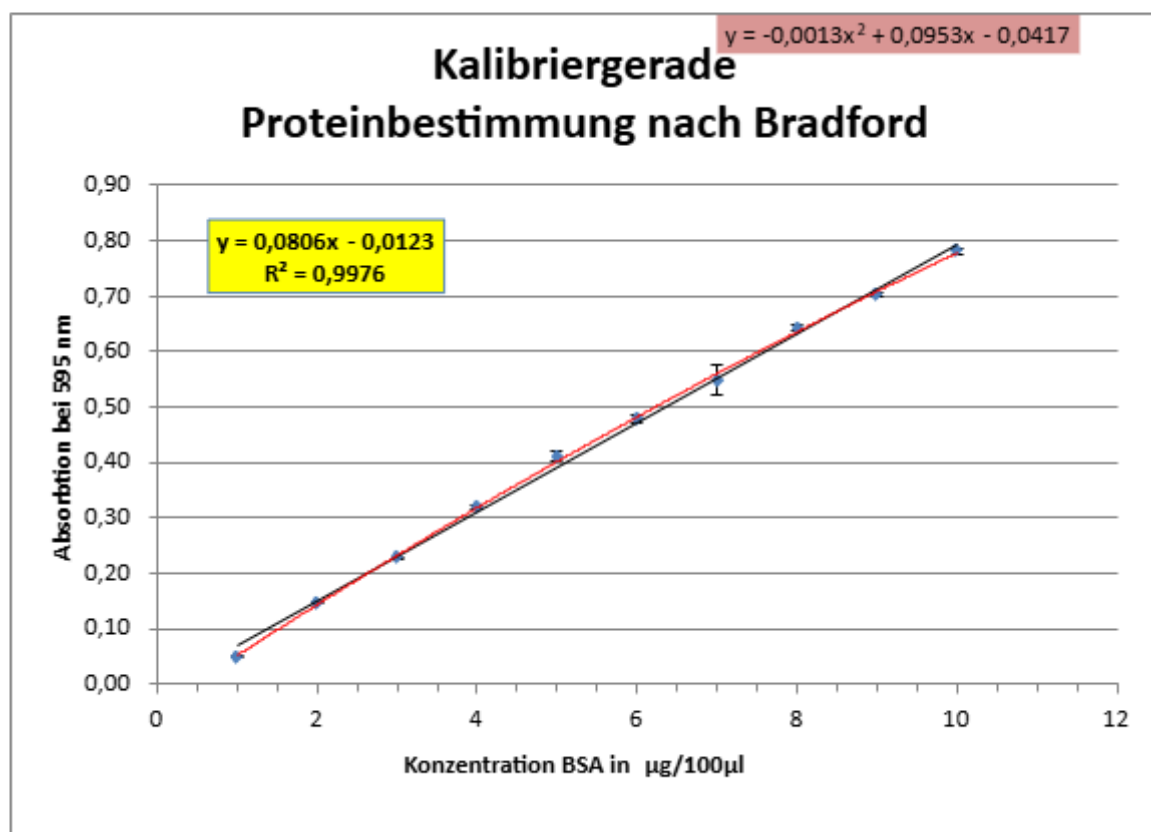


Abb. 24: Kalibriergerade zum Bradford-Test

Selbstständigkeitserklärung

Wir versichern hiermit, dass wir die vorgelegte Arbeit eigenständig unter Beratung von Anke Richert und Katharina Neumeier verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzen Quellen entnommenen Passagen als solche kenntlich gemacht haben.

Karlsruhe, den

.....

Silas Hauck

.....

Amaia Rodman