

Entwicklung von Fermentationsstrategien zur stofflichen Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen

Vom Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

von

Herrn

M.Sc. Alexander Akermann

aus Heidelberg

Datum der mündlichen Prüfung: 13.12.2021

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Tilman Beck

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Sergiy Antonyuk

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Ulber

Prof. Dr. Werner Thiel

Kaiserslautern, 2022

D 386

¡Seamos realistas y hagamos lo imposible!

Bleiben wir realistisch und versuchen wir das Unmögliche!

Ernesto Guevara de la Serna

Einführung

I. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulber für die Möglichkeit, dass ich mich im Rahmen meiner Doktorarbeit am Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik mit einem äußerst interessanten Themenkomplex im Zusammenhang mit dem Brauprozess beschäftigen durfte. Ich möchte mich bei Ihnen für die gute Betreuung, zahlreiche gute und zielführende Hinweise zum Forschungsgegenstand, die weitgehend freie Hand bei der Wahl der Mittel zur Erreichung der gesetzten Ziele, und die Unterstützung bei der Anfertigung von Publikationen bedanken. Außerdem möchte ich die guten Gegebenheiten an Ihrem Institut hervorheben, welche durch unzählige Gerätschaften und etablierte Analyseverfahren sowie faire vertragliche Rahmenbedingungen als sehr gut zu bezeichnen und als Grundpfeiler für erfolgreiche Forschung mit Sicherheit unerlässlich sind.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Werner Thiel für das Anfertigen des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr.-Ing. Sergiy Antonyuk für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich danke allen Kolleg:innen für die gute Zusammenarbeit während meiner 3 Jahre und 9 Monate am Lehrgebiet – die Zeit hat sehr viel Spaß gemacht und ist, rückwirkend betrachtet, wie im Flug vergangen. Insbesondere möchte ich Doris Geib für die ausdauernde Unterstützung bei Analytik-Problemen jeglicher Art danken. Ohne das Heraussuchen neuer Trennungsmethoden, die Etablierung von Regenerationsmethoden für (aufgrund meiner komplexen Probenmatrix) schnell gealterte Säulen und ohne die fortlaufende Reparatur von Analysengeräten, wären die umfangreichen Messungen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich Jens Weiermüller danken, welcher in zahlreichen Gesprächen stets wertvolle Ideen zum Vorantreiben des Forschungsgegenstandes geliefert und diese Arbeit zudem vorab Korrektur gelesen hat. Außerdem möchten wir zusammen eine Idee, die während der Promotionszeit entwickelt wurde, mithilfe der Gründung eines Start-Up's weiterverfolgen. Mal sehen, wie weit wir damit kommen können...

Ich danke Anette Knaus (Wasser Infrastruktur Ressourcen, TUK) für die Analyse von Phosphationen und Ruth Maria Bergsträßer (Chemie, AG Hartung, TUK) für die Durchführung diverser Kationen- und Anionenmessungen in den Treberpresssäften.

Ich danke allen beteiligten Kolleg:innen des BIOVAL-Projektes aus Luxemburg, Belgien, Frankreich und Deutschland für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Hervorheben möchte ich hierbei insbesondere Verena Kirsch und Daniela Becker (Chemie, AG Richling, TUK), sowie Ranja Saynisch und Pascal Weingart (Chemie, AG Thiel, TUK).

Ich danke meiner Familie, ohne die ich niemals an den Punkt gekommen wäre, meine Dissertationsschrift anfertigen zu können. Ich danke meiner Mutter Sieglinde für das Korrekturlesen der Arbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen

Gespräche in der letzten Zeit. Ich weiß, dass ich mich auf dich immer verlassen kann. Außerdem danke ich meinem Vater Winfried für die schönen Kindheits- und Jugenderinnerungen. In besonderem Maße danke ich meinen beiden Geschwistern Kathrin und Johannes, die für mich seit jeher wie gute Freunde sind und mich schon in zahlreichen Lebenslagen tatkräftig unterstützt haben. Nicht zuletzt möchte ich meinen Großeltern Helene und Franz danken, welche mich früher wie heute immer exzellent umsorgt haben. Außerdem habt ihr, vermutlich wegen eurer ereignisreichen Biografie, früh mein Interesse in Bereichen wie Geschichte, Sport, Musik, Handwerk und nicht zuletzt Naturwissenschaft zu wecken versucht, wodurch euch sicherlich ein großer Anteil am Entstehen dieser Arbeit zukommt.

Ich danke meiner Freundin Constanze Still, die sich stets liebevoll um mich gekümmert hat und mir immer die nötige Unterstützung hat zukommen lassen – z.B. in der Form eines riesigen „Care-Paketes“ zum Beginn der Schreibphase dieser Arbeit. Außerdem danke ich dir für das sorgsame Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke allen meinen Freunden aus Heidelberg, Stuttgart und Kaiserslautern. Ich hoffe zu den bisherigen außergewöhnlichen Erlebnissen auf unseren Touren durch Deutschland, Europa und rund um die Welt werden noch zahlreiche weitere Anekdoten hinzukommen. Insbesondere möchte ich mich bei meinem Freund Kevin bedanken, der leider viel zu früh nach schwerer Krankheit verstorben ist. Danke, dass wir uns kennen lernen durften, Amigo!

II. Abstract

'Brewers' spent grain (BSG) is an important renewable resource, as it is a low-value by-product of the brewing process, which is produced in large quantities every year. In the present work, BSG of seven different brewing recipes, both self-made and industrially produced, was analyzed, and classified in terms of the related brewing processes. Furthermore, BSG was separated into two streams by pressing: a liquid and a solid fraction. For both fractions, bioprocesses were established to convert the liquid substrate (BSG liquor) into lactate with a lactic acid bacterium (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) and the solid substrate (BSG residue) into ethanol and acetate with a lignocellulolytic and mixed acid fermenting strain (*Cellulomonas uda*). A kinetic model was established, that could (amongst others) predict lactate formation and cell growth of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* for three BSG liquors of different origin, in other words with different nutrient equipment, in a simultaneous saccharification and fermentation'. Moreover, the developed fermentation strategies for the utilization of the BSG liquor and BSG residue, as well as the underlying process monitoring and optimization strategies, were transferred to fermentations with the same organisms but the substrate grass – another representative of a renewable resource.

III. Zusammenfassung

Biertreber stellt einen wichtigen Vertreter eines nachwachsenden Rohstoffes dar, da es sich dabei um ein niedrigpreisiges Nebenprodukt des Brauprozesses handelt, welches jedes Jahr in großen Mengen anfällt. In der vorliegenden Arbeit wurde Biertreber aus sieben verschiedenen Braurezepten, sowohl aus eigener Herstellung als auch industriellen Ursprungs, analysiert und in Bezug auf die zugrundeliegenden Braugänge klassifiziert. Darüber hinaus wurde der Treber durch Pressen in zwei separate Stoffströme aufgeteilt: eine flüssige und eine feste Fraktion. Für beide Fraktionen wurden Bioprozesse etabliert, um einerseits das flüssige Substrat (Treberpresssaft) mit einem Milchsäurebakterium (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) zu Milchsäure und andererseits das feste Substrat (Treberrückstand) mit einem lignocellulolytischen und gemischtsäuregärung-betreibenden Stamm (*Cellulomonas uda*) zu Ethanol und Essigsäure umzusetzen. Außerdem wurde ein kinetisches Modell aufgestellt, welches u.a. die Milchsäurebildung und das Zellwachstum von *L. delbrueckii* subsp. *lactis* für drei Treberpresssäfte unterschiedlicher Braurezepturen, d.h. mit unterschiedlicher Nährstoffausstattung, in einer simultanen Verzuckerung und Fermentation vorhersagen konnte. Des Weiteren konnten die entwickelten Fermentationsstrategien zur Verwertung des Treberpresssaftes und Treberrückstandes sowie die zugrundeliegenden Prozessüberwachungs- und Regelungsstrategien auf Fermentationen mit den gleichen Organismen aber dem Substrat Wiesenschnitt – also einen weiteren nachwachsenden Rohstoff – übertragen werden.

IV. Inhaltsverzeichnis

I.	DANKSAGUNGEN	V
II.	ABSTRACT	VII
III.	ZUSAMMENFASSUNG	VIII
IV.	INHALTSVERZEICHNIS	IX
V.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XV
VI.	ALLGEMEINES SYMBOLVERZEICHNIS	XVIII
VII.	SYMBOLVERZEICHNIS DES KINETISCHEN MODELLS	XXII
VIII.	WISSENSCHAFTLICHE BEGRIFFSERKLÄRUNGEN	XXIV
IX.	BRAUSPEZIFISCHE BEGRIFFSERKLÄRUNGEN	XXV
1.	EINLEITUNG	- 1 -
2.	ZIELSETZUNG	- 2 -
3.	GRUNDLAGEN & STAND DER TECHNIK	- 3 -
3.1.	Kurzer Abriss über den Brauprozess	- 3 -
3.2.	Eckdaten zu Biertreber	- 5 -
3.2.1.	Die Verwendung von Biertreber in der Landwirtschaft	- 6 -
3.2.2.	Anwendung von Biertreber für die menschliche Ernährung	- 8 -
3.2.3.	Anwendung von Biertreber zur Energiegewinnung	- 9 -
3.2.4.	Sonstige Anwendungsmöglichkeiten von Biertreber	- 10 -
3.2.5.	Biertreber als Substrat für Mikroorganismen	- 10 -
3.2.6.	Industrielle Nutzung von Biertreber in Bioraffinerie-Konzepten	- 16 -
3.2.7.	Industrielles Upcycling von Biertreber	- 16 -
3.3.	Verwendete Mikroorganismen und produzierte Plattformchemikalien	- 17 -
3.3.1.	Der Stoffwechsel von <i>Lactobacillen</i>	- 17 -
3.3.2.	Ökonomische Relevanz von Milchsäure	- 19 -
3.3.3.	Der Stoffwechsel von <i>Cellulomonadaceae</i>	- 19 -
3.3.4.	Ökonomische Relevanz von Ethanol	- 20 -
3.3.5.	Ökonomische Relevanz von Essigsäure	- 21 -

4.	MATERIAL & METHODEN	- 22 -
4.1.	Herstellung der verwendeten Rohstoffe	- 22 -
4.1.1.	Produktion von Biertreber	- 22 -
4.1.2.	Herstellung von Hefeextrakt	- 22 -
4.1.3.	Fraktionierung von Biertreber	- 23 -
4.2.	HPLC-Analytik	- 24 -
4.2.1.	Analytik organischer Säuren	- 24 -
4.2.2.	Zucker- und Ethanolanalytik	- 24 -
4.2.3.	Aminosäureanalytik	- 25 -
4.3.	Bestimmung der Bestandteile lignocellulosehaltiger Biomasse	- 25 -
4.3.1.	Bestimmung von strukturellen Kohlenhydraten, Lignin und Asche	- 25 -
4.3.2.	Bestimmung des Protein- und Lipidgehaltes	- 26 -
4.3.3.	Bestimmung des Heizwertes	- 26 -
4.4.	Analytik der löslichen Fraktion lignocellulosehaltiger Biomasse	- 27 -
4.4.1.	Zuckeranalytik der löslichen Fraktion	- 27 -
4.4.2.	Mineralien-Analytik	- 27 -
4.4.3.	Proteinbestimmung mittels Bradford	- 28 -
4.5.	Verwertung von Treberpresssaft mit <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	- 28 -
4.5.1.	Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen	- 28 -
4.5.2.	Der Seed-Train zur Anzucht von <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	- 29 -
4.5.3.	Zusammensetzung des Hauptkulturmediums	- 29 -
4.5.4.	Fermentationsparameter im Kolben-Maßstab und Bioreaktor	- 29 -
4.5.5.	Methoden zur Zellbestimmung	- 30 -
4.5.6.	Optimierung der Nährstoffzugabe mit statistischer Versuchsplanung	- 30 -
4.5.7.	Optimierungen mit verdünntem Weizenbock-Presssaft im Bioreaktor	- 31 -
4.5.8.	Fermentationen mit unverdünnten Pale Ale- bzw. Maibock-Presssäften	- 32 -
4.6.	Kinetische Modellierung der Treberpresssaftfermentationen	- 33 -
4.6.1.	Modellentwicklung	- 33 -

4.6.2.	Validierung des Modells	- 33 -
4.6.3.	Modellierung der enzymatischen Verzuckerung von Dextrin und der mikrobiellen Aufnahme von Zucker	- 33 -
4.6.4.	Die mathematische Beschreibung des Zellwachstums	- 35 -
4.6.5.	Gleichungen für die mikrobielle Aufnahme stickstoffhaltiger Verbindungen	- 35 -
4.6.6.	Die mathematische Beschreibung der Produktbildung	- 36 -
4.6.7.	Die Gleichung für die Wachstumsrate des Organismus	- 36 -
4.6.8.	Grenzbedingungen des Modells	- 37 -
4.6.9.	Initialisierungsbedingungen des Modells	- 37 -
4.7.	Verwertung des Treberrückstandes mit <i>Cellulomonas uda</i>	- 38 -
4.7.1.	Stammhaltung	- 38 -
4.7.2.	Aerobe und anaerobe Treberfermentationen im Kolbenmaßstab	- 38 -
4.7.3.	Fermentation im Mineral-Medium	- 39 -
4.7.4.	Optimierung der Fermentation im Kolbenmaßstab	- 40 -
4.7.5.	Fermentation im Bioreaktor	- 42 -
4.7.6.	Aufklärung des Zentralstoffwechsels von <i>C. uda</i>	- 43 -
4.7.7.	Bestimmung der Zellzahl	- 43 -
4.7.8.	Bildgebende Verfahren	- 44 -
4.7.9.	2D-Fluoreszenzspektroskopie	- 44 -
4.7.10.	Bestimmung der Enzymaktivität	- 45 -
4.8.	Übertragung der entwickelten Strategien auf Wiesenschnitt	- 46 -
4.8.1.	Prozessschema	- 46 -
4.8.2.	Analytik	- 46 -
4.8.3.	Fermentationen mit Wiesenschnittpresssaft	- 46 -
4.8.4.	Fermentationen mit abgepresstem Wiesenschnitt	- 46 -
4.9.	Bestimmung bioverfahrenstechnischer Kenngrößen für die Prozesse	- 46 -
4.9.1.	Bestimmung in den Submersfermentationen	- 47 -
4.9.2.	Bestimmung in den Suspension- bzw. Feststofffermentationen	- 47 -

5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	- 49 -
5.1.	Rohstoffanalyse von Biertreber unterschiedlicher Braurezepturen	- 49 -
5.1.1.	Die Trockenmassezusammensetzung des Biertreibers	- 49 -
5.1.2.	Die Trockenmasse des Trebers unter Einbeziehung löslicher Anteile	- 51 -
5.1.3.	Zusammenhang zwischen Braurezeptur & löslichen Treberbestandteilen	- 54 -
5.1.4.	Einordnung des kommerziellen Bischoff-Treibers	- 56 -
5.1.5.	Analyse des Treberpresssaftes	- 56 -
5.2.	Fermentationen mit Treberpresssaft	- 60 -
5.2.1.	Fermentationen im Schüttelkolben mit Helles-Presssaft	- 60 -
5.2.2.	Strategien zur Reduktion des Nährstoffzusatzes	- 61 -
5.2.3.	Fermentations-Optimierung im Bioreaktor	- 65 -
5.2.4.	Fermentationen mit unverdünnten Pale Ale- bzw. Maibock-Presssäften	- 69 -
5.2.5.	Kohlenstoffbilanz des Prozesses mit Maibock-Presssaft	- 72 -
5.3.	Kinetische Modellierung der Treberpresssaftfermentationen	- 73 -
5.3.1.	Die Wachstumsrate im Modell	- 74 -
5.3.2.	Die Produktbildungskinetik des Modells	- 75 -
5.3.3.	Enzymatischer Abbau von Kohlenhydraten und Glucoseaufnahme im Modell	- 76 -
5.3.4.	Die Simulation der Fermentation mit unverdünntem Maibock-Presssaft	- 77 -
5.3.5.	Die Übertragung der Simulation auf einen Prozess mit unverdünntem Pale Ale- bzw. verdünntem Weizenbock-Presssaft	- 79 -
5.3.6.	Vergleich der drei Modellierungen	- 83 -
5.4.	Fermentationen mit dem festen Rückstand	- 83 -
5.4.1.	Aufklärung des Zentralstoffwechsels von <i>Cellulomonas uda</i>	- 84 -
5.4.2.	Wachstum von <i>C. uda</i> unter aeroben & anaeroben Bedingungen	- 86 -
5.4.3.	Enzymaktivität von <i>C. uda</i> unter aeroben & anaeroben Bedingungen	- 89 -
5.4.4.	Fluorophore unter aeroben & anaeroben Bedingungen	- 90 -
5.4.5.	Prozesstechnische Optimierung der anaeroben Fermentation	- 93 -
5.4.6.	Fermentationen mit Mineral-Medium bzw. mit Treber und variiertes Gasphase	- 93 -

5.4.7.	Reduzierende vs. oxidierende Bedingungen und Variation des pH-Wertes.....	- 95 -
5.4.8.	Einsatz von technischen Enzymen und hydrothermalen Vorbehandlungen	- 97 -
5.4.9.	Einsatz von nicht-gepresstem Treber und vorgelagerte Lipidextraktion	- 99 -
5.4.10.	Die Feststofffermentation im Bioreaktor	- 102 -
5.4.11.	Erhöhung des Feststoffgehaltes	- 104 -
5.5.	Das entwickelte bioraffineriekonzept für Biertreber	- 106 -
5.5.1.	Vorteile des Pressschrittes	- 106 -
5.5.2.	Gesamtheitliche Nutzung aller anfallenden Stoffströme	- 108 -
5.6.	Übertragung der Fermentationsstrategien auf Wiesenschnitt.....	- 109 -
5.6.1.	Die Rohstoffanalyse von Wiesenschnitt.....	- 110 -
5.6.2.	Fermentationen mit Wiesenschnittpresssaft	- 113 -
5.6.3.	Fermentationen mit abgepresstem Wiesenschnitt.....	- 115 -
6.	FAZIT	- 118 -
6.1.	Rohstoffanalyse	- 118 -
6.2.	Treberpresssaftfermentation	- 118 -
6.3.	Simulation	- 119 -
6.4.	Feststofffermentation	- 120 -
6.5.	Gesamt-Fazit.....	- 121 -
7.	AUSBLICK.....	- 123 -
7.1.	Rohstoffanalyse	- 123 -
7.2.	Treberpresssaftfermentation	- 123 -
7.3.	Simulation	- 123 -
7.4.	Feststofffermentation	- 123 -
7.5.	Gesamt-Ausblick.....	- 124 -
8.	LITERATURVERZEICHNIS	- 125 -
9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 151 -
10.	TABELLENVERZEICHNIS.....	- 156 -
11.	FINANZIELLE FÖRDERUNG	- 157 -

A.	GERÄTELISTE	A
B.	CHEMIKALIENLISTE	C
C.	VERSUCHSPROTOKOLLE UND VORSCHRIFTEN.....	E
D.	DAS SKRIPT DES KINETISCHEN MODELLS.....	F
E.	ZUSÄTZLICHE VERSUCHSERGEBNISSE	I
F.	VERÖFFENTLICHUNGEN	L
G.	BETREUTE STUDENTISCHE ARBEITEN	N
H.	LEBENS LAUF	O

V. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AAS	Atomadsorptionsspektroskopie
AC	Essigsäure
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
AD	Anaerobic Digestion
ADP	Adenosindiphosphat
AES	Atomemissionsspektroskopie
AGU	Amyloglucosidase Units
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Bier(-treber) eines Bieres der Bischoff Brauerei
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
BSG	Brewers' spent grain
BTM	Biotrockenmasse (entspricht Zelltrockenmasse)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C/N	Verhältnis von kohlenstoffhaltigen zu stickstoffhaltigen Molekülen/Atomen
ca.	circa
Cell	Cellulose
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CoA	Coenzym A
Cys-HCl	Cystein-Hydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E.C.	Enzyme Comission (Numbers)
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
F	Wiesenschnitt einer Frühjahrsernte
FOR	Ameisensäure
ggfs.	gegebenenfalls
H	Wiesenschnitt einer Herbsterte
HE	Helles-Bier(-treber) bzw. Bier(-treber) nach heller Brauart

Abkürzung	Bedeutung
HMF	Hydroxymethylfurfural
Hemicell	Hemicellulose
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
incl.	inclusive
KBE	Koloniebildende Einheiten
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank
KÖ	Bier(-treber) eines Kölsch-Bieres
LAC	Milchsäure
LHW	Liquid Hot Water
MB	Bier(-treber) eines Maibock-Bieres
Mio.	Millionen
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
MRS	Medium zur Kultivierung von <i>Lactobacillen</i> von de Man, Rogosa & Sharpe
NAD ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid (reduziert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.g.	nicht gemessen
NO _x	Stickoxide
NREL	National Renewable Energy Laboratory
n.v.	nicht verfügbar
OS	Organosolv
PA	Bier(-treber) eines Pale Ales
pH	potentia Hydrogenii
P _i	Phosphat
PLA	Polymilchsäure
PP _i	Diphosphat
ppm	Parts per million
Prot	Protein
px	Pixel
RFU	Relative fluorescence units
RK4	Runge-Kutta Algorithmus 4. Ordnung
ROS	Reactive Oxygen Species
SCFA	Short-Chain Fatty Acids

Abkürzung **Bedeutung**

sog.	sogenannte
Sonst	Sonstige
sp.	Spezies
SSF	Simultane Verzuckerung und Fermentation
SUC	Bernsteinsäure
UOL	Ubiquitol
UON	Ubiquinon
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
u.a.	unter anderem
VK1	Vorkultur 1
VK2	Vorkultur 2
vs.	versus
W	Bier(-treber) eines Weizen-Bieres
WeBo	Bier(-treber) eines Weizenbock-Bieres

VI. Allgemeines Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Bedeutung
°Brix	$\text{g}_{\text{Glucose}} \cdot 100 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$	Stammwürzegehalt in Grad Brix
°C	-	Grad Celsius
μ	h^{-1}	Wachstumsrate
μm	-	Mikrometer
μ_{max}	h^{-1}	Maximale spezifische Wachstumsrate
A	$\text{nkcat} \cdot \text{mL}^{-1}$	Cellulase-/ Xylanaseaktivität
$A_{\text{Cell,max}}$	$\text{nkcat} \cdot \text{mL}^{-1}$	Maximale Cellulaseaktivität
A_{STotal}	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Gesamt-Aminosäurekonzentration
$A_{\text{Xyl,max}}$	$\text{nkcat} \cdot \text{mL}^{-1}$	Maximale Xylanaseaktivität
BTM	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Biotrockenmasse (entspricht Zelltrockenmasse)
BTM_{max}	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Maximale Biotrockenmasse (entspricht maximaler Zelltrockenmasse)
C	$\text{Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$	Zellzahl
$C_{\text{Biomasse,0d}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Biomassekonzentration zu Beginn der Fermentation (0. Tag)
$C_{\text{Biomasse,14d}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Biomassekonzentration am Ende der Fermentation (14. Tag)
$C_{\text{Biomassebestandteil}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Konzentration eines Biomassebestandteils
C_{Gluc}	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Glucosekonzentration
$C_{\text{Lac,max}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Maximale Milchsäurekonzentration
$C_{\text{Treberprotein}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Konzentration Treberprotein
C_{Trp}	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Tryptophankonzentration
$C_{\text{Zucker,Assay}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Zuckerkonzentration nach Enzymassay
$C_{\text{Zucker,Fermentation}}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Zuckerkonzentration in Fermentationsbrühe
Em	nm	Emissionswellenlänge
E_{Met}	$\text{MJ} \cdot \text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$	Metabolisierbare Energie
Ex	nm	Extinktionswellenlänge
$\times g$	$\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$	Gravitationsbeschleunigung
g	-	Gram
g_{AC}	g	Masse Essigsäure
$g_{\text{Aminosäuren}}$	g	Masse Aminosäuren
g_{BTM}	g	Masse Zellen
g_{Cell}	g	Masse Cellulose

Symbol	Einheit	Bedeutung
g_{Cit}	g	Masse Citronensäure
g_{Enzym}	g	Masse Enzym
g_{EtOH}	g	Masse Ethanol
Gew.-%	$g \cdot g^{-1}$	Gewichtsprozent
g_{Glucose}	g	Masse Glucose
$g_{\text{H}_2\text{O}}$	g	Masse Wasser
g_{Lac}	g	Masse Milchsäure
$g_{\text{Maltooligomere}}$	g	Masse Maltooligomere
g_{Maltose}	g	Masse Maltose
$g_{\text{Maltotriose}}$	g	Masse Maltotriose
g_{Prod}	g	Masse Produkt
g_{Pul}	g	Masse Pullulan
g_{Serin}	g	Masse Serin
g_{Treber}	g	Masse Treber
g_{Zucker}	g	Masse Zucker
h	-	Stunde
HHV	$\text{MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$	Higher Heating Value
K	-	Kelvin
kg	-	Kilogramm
kg_{TM}	-	Kilogramm Trockenmasse
$\text{kg}_{\text{Treber}}$	-	Kilogramm Treber
kJ	-	Kilojoule
L	-	Liter
M	$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Molar
m^3	-	Kubikmeter
$m_{\text{Biomasse,0d}}$	g	Lignocellulosehaltige Biomasse zu Beginn der Fermentation
$m_{\text{Biomasse,14d}}$	g	Lignocellulosehaltige Biomasse am Ende der Fermentation
mg	-	Milligramm
Min	-	Minute
MJ	-	Megajoule
mL	-	Milliliter
mM	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Millimolar

Symbol	Einheit	Bedeutung
mm	-	Millimeter
mol _{Ac}	mol	Mol Essigsäure
mol _{EtOH}	mol	Mol Ethanol
m _{Produkt,0d}	g	Produktmasse zu Beginn der Fermentation (0. Tag)
m _{Produkt,14d}	g	Produktmasse am Ende der Fermentation (14. Tag)
m _{Zellen,0d}	g	Zellbiomasse zu Beginn der Fermentation (0. Tag)
m _{Zellen,14d}	g	Zellbiomasse am Ende der Fermentation (14. Tag)
M _{Zucker}	g·μmol ⁻¹	Molekulargewicht Zucker
N	rpm	Rührerdrehzahl
nkat	nmol·s ⁻¹	Nanokat
NL	L	Normliter (bei 0 °C und 1013 mbar)
nm	-	Nanometer
OD _{600 nm}	-	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OD _{600 nm,max}	-	Maximale optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p	bar	Druck
P	g _{Lac} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹	Produktivität
P _{11 h}	g _{Lac} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹	Produktivität in den ersten 11 h des Prozesses
P _{14 h}	g _{Lac} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹	Produktivität in den ersten 14 h des Prozesses
P _{15 h}	g _{Lac} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹	Produktivität in den ersten 15 h des Prozesses
pH _{Ist}	-	Aktuell gemessener pH-Wert
pH _{Soll}	-	Einzustellender pH-Wert
P _{max}	g·L ⁻¹	Maximale Produkt (Milchsäure) Konzentration
Q _{N2}	L·h ⁻¹	Stickstoffvolumenstrom
q _P	g _{Lac} ·g _{BTM} ⁻¹ ·h ⁻¹	Biomassespezifische Produkt (Milchsäure) Bildungsrate
q _{S1}	g _{Maltooligomere} ·g _{BTM} ⁻¹ ·L ⁻¹	Substrat 1 (Maltooligomere) Aufnahme­rate
q _{S2}	g _{Maltotriose} ·g _{BTM} ⁻¹ ·L ⁻¹	Substrat 2 (Maltotriose) Aufnahme­rate
q _{S3}	g _{Maltose} ·g _{BTM} ⁻¹ ·L ⁻¹	Substrat 3 (Maltose) Aufnahme­rate
q _{S4}	g _{Glucose} ·g _{BTM} ⁻¹ ·L ⁻¹	Substrat 4 (Glucose) Aufnahme­rate
R ²	%	Bestimmtheitsmaß
R ² _{adjust}	%	Adjustiertes Bestimmtheitsmaß
s	-	Sekunde
S _{Total}	g·L ⁻¹	Gesamt-Kohlenhydratkonzentration

Symbol	Einheit	Bedeutung
t_{Assay}	min	Zeitspanne des Enzymassays
U	$1,67 \cdot 10^{-8}$ kat	Units
V_{Assay}	mL	Volumen des Enzymassays
$V_{\text{Kultur,Ist}}$	mL	Aktuelles Volumen des Fermentationsmediums
V_{NaOH}	mL	Volumen der 5 M NaOH Zugabe
Vol.-%	$L \cdot L^{-1}$	Volumenprozent
$Y_{P/S}$	$g_{\text{Prod}} \cdot g_{\text{Sub}}^{-1}$	Produkt/Substrat-Ausbeute, die nur flüssige Produkte berücksichtigt
$Y_{P+CO_2/S}$	$g_{\text{Prod}+CO_2} \cdot g_{\text{Sub}}^{-1}$	Produkt/Substrat-Ausbeute, die flüssige Produkte und gasförmiges CO ₂ berücksichtigt
$Y_{P/X}$	$g_{\text{Prod}} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1}$	Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute
$Y_{S/X}$	$g_{\text{Sub}} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1}$	Substrat/Zellbiomasse-Ausbeute
$Y_{X/KH}$	$g_{\text{BTM}} \cdot g_{\text{Kohlenhydrate}}^{-1}$	Zellbiomasse/Kohlenhydrate-Ausbeute
$Y_{X/S}$	$g_{\text{BTM}} \cdot g_{\text{Sub}}^{-1}$	Zellbiomasse/Substrat-Ausbeute
$X_{\text{Biomassebestandteil}}$	%	Anteil einer Komponente an Gesamtheit der Biomasse
X_C	%	Kohlenstoffanteil des Trebers
X_H	%	Wasserstoffanteil des Trebers
X_O	%	Sauerstoffanteil des Trebers
$X_{\text{Trp/Gerstenprotein}}$	%	Anteil von Tryptophan an Gerstenprotein

VII. Symbolverzeichnis des kinetischen Modells

Symbol	Einheit	Bedeutung
μ	h^{-1}	Wachstumsrate
μ_{max}	h^{-1}	Maximale spezifische Wachstumsrate
Ala	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Alanin
AS_{Total}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Gesamt-Aminosäuren; im englischen Modellskript: AA statt AS
f	-	Dimensionsloser Exponent für Inhibierung durch Zelldichte
h	-	Dimensionsloser Exponent für Produktinhibierung
k_1	h^{-1}	Reaktionskonstante von R_1
k_2	h^{-1}	Reaktionskonstante von R_2
k_3	h^{-1}	Reaktionskonstante von R_3
k_{Ala}	h^{-1}	Reaktionskonstante Alanin
$K_{\text{AS_Total}}$	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Monodkonstante für Gesamt-Aminosäuren; im englischen Modellskript: AA statt AS
K_{Prot}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Monodkonstante für Protein
K_{S4}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Monodkonstante für Glucose
K_{Ser}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Monodkonstante für Serin
M_i	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	Molekulargewicht Zucker i
$M_{i,\text{hydrolysiert}}$	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	Molekulargewicht Zucker i in der hydrolysierten, monomeren Form
P	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Produkt (Milchsäure)
P_m	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibierende Milchsäurekonzentration
P_{max}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Maximale Produkt (Milchsäure) Konzentration
Prot	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Protein
R_1	-	Enzymatische Reaktion 1
R_2	-	Enzymatische Reaktion 2
R_3	-	Enzymatische Reaktion 3
r_p	$\text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	Biomassespezifische Produkt (Milchsäure) Bildungsrate
S_{Total}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Gesamt-Kohlenhydrate
S_1	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Maltooligomere
S_{12}	-	Massenkorrekturfaktor für R_1
S_2	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Maltotriose

Symbol	Einheit	Bedeutung
S_{23}	-	Massenkorrekturfaktor für R_2
S_3	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Maltose
S_{34}	-	Massenkorrekturfaktor für R_3
S_4	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Glucose
Ser	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Serin
X	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Zellkonzentration
X_m	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Stationäre Zellkonzentration
X_{\max}	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Maximale Zellkonzentration
$Y_{P/X}$	$\text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute
Y_{X/AS_Total}	$\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{g}_{\text{Aminosäuren}}^{-1}$	Zellbiomasse/Aminosäure-Ausbeute; im englischen Modellskript: AA statt AS
$Y_{X/Prot}$	$\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{g}_{\text{Protein}}^{-1}$	Zellbiomasse/Protein-Ausbeute
Y_{X/S_4}	$\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$	Zellbiomasse/Glucose-Ausbeute
$Y_{X/Ser}$	$\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{g}_{\text{Serin}}^{-1}$	Zellbiomasse/Serin-Ausbeute
α	$\text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$	Faktor der wachstumsgekoppelten Produktbildung
β	$\text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	Faktor der wachstumsentkoppelten Produktbildung

VIII. Wissenschaftliche Begriffserklärungen

Baseline-Separation	Bezeichnet bei der Auswertung von Chromatogrammen die Trennung zwischen zwei Spitzenwerten (engl. Peaks), wobei das Signal zwischen diesen Spitzenwerten bis auf die Grundlinie (engl. Baseline) abfällt.
Batch	Diskontinuierlicher Satz-Betrieb eines verfahrenstechnischen Prozesses, welcher sich dadurch auszeichnet, dass die Reaktanden einmalig vorgelegt werden.
Chemostat	Kontinuierlicher verfahrenstechnischer Prozess, welcher sich durch eine kontinuierliche Zufütterung von Substrat und einen kontinuierlichen Abzug von Produkt kennzeichnet. Die Steuerung erfolgt beim Chemostaten über die Konzentration eines Reaktanden (zumeist eines Substrates).
Cryo-Kultur	Die Cryo-Kultur bezeichnet eine Bakterienkultur, welche für die dauerhafte Lagerung bei sehr geringen Temperaturen präpariert wurde.
Fed-Batch	Verfahrenstechnischer Prozess, der sich durch eine anfängliche Batch-Phase und eine (oder mehrere) anschließende Zufütterungsphasen (von engl. feed) kennzeichnet.
Heatmap	Bezeichnet die Darstellung von dreidimensionalen Daten in einem zweidimensionalen Raum in x- und y-Richtung, wobei die z-Richtung zumeist über eine Farbskala oder Farbschattierungen dargestellt wird.
Higher Heating Value	Beschreibt die Menge an Wärme, die bei kompletter Verbrennung eines Stoffes in wasserfreier (hier in getrockneter) Form freigesetzt wird. Im Gegensatz dazu berücksichtigt der Lower Heating Value die Energie, welche zur Evaporation von Wasser benötigt wird.
Lag-Phase	Bezeichnet die erste Phase mikrobiellen Wachstums, in der sich die Zellen an die Umgebungsbedingungen anpassen.
Präkursor	Bezeichnet einen Vorläuferstoff für die chemische Synthese weiterer Verbindungen.
p-value	Beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese bei einem statistischen Test irrtümlicherweise abgelehnt wird.
Resistente Stärke	Bezeichnet den Anteil der Stärke am Biertreber, welcher nicht enzymatisch zugänglich ist.
Seed Train	Der Seed-Train bezeichnet die Strategie zur Anzucht von Mikroorganismen für einen bioverfahrenstechnischen Prozess in einer oder mehrerer Vorkulturen. Ziel des Seed-Trains ist die Bereitstellung einer hinreichend großen Anzahl vitaler und perfekt adaptierter Zellen für die Hauptkultur des Prozesses.
Shotgun-Sequenz	Beschreibt eine DNA-Sequenz, die durch Nukleasen in mehrere überlappende kurze DNA-Fragmente gespalten wurde, aus welchen dann der komplette DNA-Strang rekonstruiert wird.

IX. Brauspezifische Begriffserklärungen

Abläutern/ Läutern	Bezeichnet das iterative Abwaschen der löslichen Treberbestandteile.
Anstelltemperatur	Bezeichnet die Temperatur, bei der die Zugabe der Hefe erfolgt.
Aussüßen	Es handelt sich um ein Synonym für Läutern.
Biertreber	Bezeichnet die festen Bestandteile, die aus dem Maischvorgang resultieren.
Darren	Bezeichnet den Trocknungsschritt während des Mälzens.
Einmaischen	Bezeichnet das Suspendieren des geschroteten Braumalzes in vorgewärmtem Brauwasser.
Endosperm	Bezeichnet einen Teil des Samens einer Pflanze; beim Getreidekorn handelt es sich um den Speicherort der Stärke.
Extraktbildner	Bezeichnet alle Substanzen, die zur Erhöhung des Extraktgehaltes beitragen (vornehmlich Zucker und Dextrin).
Extraktgehalt	Bezeichnet den Anteil löslicher Bestandteile (vornehmlich Zucker und Dextrin) an der Würze.
Filterkuchen	Bezeichnet alle Feststoffpartikel, die sich auf der Oberfläche eines Filters oder Siebes ablagern.
Hauptguss	Bezeichnet das Wasservolumen, das zum Einmaischen verwendet wird.
Heißstrub	Bezeichnet alle festen Würzebestandteile, die nach dem Hopfenkochen anfallen.
Hopfenkochen	Bezeichnet das Lösen von Hopfeninhaltsstoffen bei erhöhter Temperatur.
Ion-Negativ/ Iod- Normal	Bezeichnung für eine negative Iodprobe mit Lugol'scher Lösung; steht beim Maischekochen für einen vollständigen Abbau der Stärke.
Keimung	Bezeichnet den Prozessschritt während des Mälzens, welcher zur Enzymbildung führt.
Läuterbottich	Bezeichnet das Gefäß, welches zur Durchführung des Läutervorgangs genutzt wird.
Läutersieb	Bezeichnet den Siebboden, der sich im Läuterbottich befindet.
Maischen	Bezeichnet den Prozess des Lösens von Malzbestandteilen in Wasser bei verschiedenen Temperaturstufen.
Mälzen	Bezeichnet den Prozess der Malzherstellung.
Malzigkeit	Bezeichnet den Geschmack eines Bieres, bei dem der Malzgeschmack dominant ist; Biere mit einem hohen Anteil unvergorener Zucker schmecken malzig.
Malzschüttung	Bezeichnet die Zusammensetzung des eingesetzten Braumalzes.

Brauspezifische Begriffserklärungen

Nachguss	Bezeichnet das Wasservolumen, welches zum Aussüßen des Trebers verwendet wird.
Obergärig	Bezeichnung für Bier, welches mit Hefe fermentiert wird, die auf der Oberfläche der Würze aufschwimmt.
Pudermehl	Bezeichnet die feinste Schrotfraktion.
Rast	Bezeichnet eine Temperaturstufe während des Maischevorgangs.
Restextraktgehalt	Bezeichnet den Extraktgehalt des fermentierten Bieres, d.h. den Anteil unvergärbbarer Substanzen an der Würze.
Rohwürze	Bezeichnung für die unfermentierte Bierwürze.
Schroten	Bezeichnet die mechanische Zerkleinerung des Malzes.
Spelzen	Bezeichnet einen Teil des Samens einer Pflanze; beim Getreidekorn handelt es sich um die äußere Schale.
Stammwürze	Bezeichnet den Extraktgehalt des unfermentierten Bieres.
Untergärig	Bezeichnung für Bier, welches mit Hefe fermentiert wird, die am Kesselboden sedimentiert.
Vollmundigkeit	Bezeichnet den Geschmack beim Antrunk eines Bieres; Biere mit hohem Alkohol- und Restextraktgehalt gelten als vollmundig.
Vorderwürze	Bezeichnung für den Anteil der Würze, welcher vor der Zugabe des Nachgusses abgezogen werden kann.
Weiche	Bezeichnet die Befeuchtung des Getreides während des Mälzens.
Whirlpool	Bezeichnet das "In-Rotation-Versetzen" der Würze nach dem Hopfenkochen. Durch die Zentripetalkräfte setzen sich Feststoffpartikel in der Mitte des Bottichs ab.
Würze	Bezeichnet die flüssigen Bestandteile, die aus dem Maischevorgang resultieren.

Haupttext

1. Einleitung

Lignocellulosehaltige, nachwachsende Rohstoffe, wie z.B. Biertreber, sind bereits seit geraumer Zeit Gegenstand von wissenschaftlichen Untersuchungen. Die Biomassevergasung zur Gewinnung von energiereichen Gasen (z.B. aus Torf), als einer der ältesten industriellen Prozesse auf Basis von lignocellulosehaltiger Biomasse, ist bereits seit rund 200 Jahren bekannt [1]. Da fossile Energieträger – in erster Linie aber Erdöl – über Jahrzehnte unbegrenzt verfügbar waren, rückte auch die Technologie der Biomassevergasung lange Zeit in den Hintergrund (wobei hier eine Ausnahme für einige Staaten während der beiden Weltkriege getroffen werden kann). Erst durch die Ölkrise des Jahres 1973 kehrte wieder eine globale Rückbesinnung auf altbekannte Technologien ein, da fossile Brennstoffe unvermittelt knapp wurden. Außerdem führte das Jahr 1973 dazu, dass lignocellulosehaltige Biomasse erneut als Ausgangsstoff zur Energieträgerproduktion oder für chemische Synthesen in Betracht gezogen wurde. Zudem wurde in den darauffolgenden Jahrzehnten davon ausgegangen, dass die Ölpreise kontinuierlich ansteigen würden – nicht nur wegen diversen politischen und militärischen Konflikten, sondern in erster Linie wegen der natürlichen Verknappung des Rohöls. In der Realität änderten sich die Ölpreise bis zum Jahr 2000 aber kaum [2]. Diese Fehleinschätzung bzgl. des Ölpreises führte zu verschiedenen wissenschaftlichen Vorschlägen für den Einsatz von lignocellulosehaltiger Biomasse, z.B. als Düngemittel [3], zur Herstellung von Treibstoffen aus Pflanzenextrakten [4], aber auch zu einem verstärkten Interesse an der Herstellung von Energieträgern wie Ethanol aus diesem Substrat [5]. Bis heute hat die Forschung zur Nutzbarmachung von lignocellulosehaltiger Biomasse nicht abgerissen, allerdings steht sie nicht mehr mit der Verknappung von Rohöl in Zusammenhang – die Zielsetzung hat sich im Laufe der Zeit deutlich verändert: So wird die Forschung an lignocellulosehaltigen Ausgangsmaterialien heutzutage mit wichtigen Themen wie der globalen Erderwärmung [6], der Treibhausgasemission [7], der Einsparung fossiler Ressourcen [8] und der Transformation von linearen zu zirkulären Wertschöpfungsprozessen [9] in Verbindung gebracht. Die stoffliche Verwertung von lignocellulosehaltiger Biomasse, insbesondere mit dem Ziel der Kraftstoffproduktion, wird dabei in jüngerer Vergangenheit gerne in vier Generationen eingeteilt: (a) In der ersten Generation wurden die Produkte aus eigens angebauten Agrarprodukten, welche auch zum menschlichen Verzehr geeignet sind, hergestellt – z.B. aus Mais, Getreide oder Zuckerrohr. (b) Die zweite Generation umfasst als Substrat alle lignocellulosehaltigen Rohstoffe, wie z.B. Stroh, Gras, Holz oder auch Biertreber. (c) Die dritte und vierte Generation beinhaltet u.A. die Nutzung von Algen als biologischen Katalysator, wobei sich die vierte Generation von der dritten Generation durch den Einsatz von gentechnisch-modifizierten Organismen abhebt [10, 11].

2. Zielsetzung

Biertreber stellt einen kostengünstigen Rohstoff dar, der zuverlässig – in Deutschland und weltweit – in großen Mengen anfällt (Kapitel 3.2). Es gibt unzählige Vorschläge zur Verwendung dieses Stoffstroms in der tierischen oder menschlichen Ernährung (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) sowie zur Energieträger- oder Chemikalienproduktion (Kapitel 3.2.3 – 3.2.5). Die ganzheitliche Verwertung von Biertreber zur Chemikalien- oder Energieträgerproduktion (im Rahmen einer Bioaffinerie) ist allerdings nur in seltenen Fällen großtechnisch gegeben (Kapitel 3.2.6). Außerdem werden ca. 20% des jährlich anfallenden Biertreibers auf der Mülldeponie entsorgt und die Anwendung als Viehfutter stellt die Landwirte vor große logistische und Haltbarkeit-bedingte Hürden. Überdies werden die Auswirkungen der Getreide- bzw. Biertreber-basierten Fütterung auf die Milch- und Fleischqualität kontrovers diskutiert (Kapitel 3.2.1).

Daher sollen in dieser Arbeit bioverfahrenstechnische Methoden zur Produktion von Milchsäure, Essigsäure und Ethanol auf Basis von Biertreber, als Vertreter eines nachwachsenden Rohstoffs, untersucht werden, da diese Stoffe die Grundlage für eine Vielzahl von technischen Anwendungen bilden (Kapitel 3.3.2, 3.3.4 und 3.3.5). Zu diesem Zwecke sollen die Organismen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Kapitel 3.3.1) und *Cellulomonas uda* (Kapitel 3.3.3) genutzt werden, um bioverfahrenstechnische Prozesse zur Produktion dieser Wertstoffe zu etablieren (und optimieren) sowie die zugrundeliegenden biologischen Vorgänge mit Hilfe analytischer Methoden und kinetischer Modellierung besser verstehen zu können. Um geeignete Substrate für die Prozesse zu identifizieren, sollen zudem Vergleiche zwischen der Biertreberzusammensetzung, in Bezug auf feste und flüssige Bestandteile, und der zugrundeliegenden Braurezeptur gezogen werden. Die kinetische Modellierung soll überdies einen Beitrag dazu leisten, die kinetischen Daten der Prozesse bereits aufgrund der vorausgegangenen Rohstoffanalyse abschätzen zu können. Um die Nutzung im industriellen Maßstab in Aussicht zu stellen, soll der Fokus bei allen entwickelten Prozessen auf hohe Produktkonzentrationen und Ausbeuten, gute kinetische Parameter sowie milde Prozessbedingungen, ohne die Verwendung von hydrothermalen Vorbehandlungsmethoden (bei hohen Drücken und Temperaturen), sowie die Minimierung des Zusatzes von weiteren Nährstoffen gelegt werden. Um eine breite Anwendbarkeit zu gewährleisten, sollen die entwickelten Prozesse zudem auf Biertreber unterschiedlichster Braurezepturen und andere Biomassearten (in diesem Falle Wiesenschnitt) übertragen werden.

3. Grundlagen & Stand der Technik

Die Möglichkeiten zur (stofflichen) Nutzung lignocellulosehaltiger, nachwachsender Materialien, zu denen auch Birtreber gezählt wird, stellen ein sehr breites Feld dar. Dies ist einerseits auf die komplexe Zusammensetzung der Materialien mit unterschiedlichen chemischen Stoffklassen (Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, etc.) zurückzuführen, die zudem noch von geografischen und jahreszeitlichen Einflüssen vergrößert wird. Andererseits sind potenzielle Anwendungsfelder enorm divers und umfassen die Verwendung als Reinstoff, in der fraktionierten Form oder im Verbund mit anderen Materialien [12]. Daher soll im folgenden Kapitel ein Ausschnitt der (wichtigsten) Forschungs- und tatsächlichen, industriellen Anwendungsfelder für Birtreber sowie einige Eigenschaften der verwendeten Organismen und hergestellten Produkte dargestellt werden. Zunächst soll aber der industrielle Prozess, in welchem Birtreber akkumuliert, etwas näher beleuchtet werden: Der Brauprozess (Abbildung 1).

3.1. Kurzer Abriss über den Brauprozess

In Vorbereitung auf den Brauprozess muss das verwendete Getreide (zumeist Gerste, mitunter aber auch Weizen, Roggen, Dinkel, etc.) zunächst in Malz umgewandelt werden. Der Prozess des Mälzens unterteilt sich dabei in drei Teilschritte: Die Weiche, die Keimung und das Darren. Während der Weiche werden die gereinigten Getreidekörner in einem Wassertank bei einer Temperatur zwischen 5 °C und 18 °C für ca. 2 Tage eingeweicht, wobei das Wasser alle 6 h erneuert wird. Durch diesen Prozess erhöht sich der Feuchtegehalt der Getreidekörner auf ca. 45%, wodurch im Korn die Keimung ausgelöst wird. Im zweiten Schritt des Mälzens, der Keimung, werden die Getreidekörner unter ständiger Umschichtung, z.B. durch Extruder-Schnecken, dazu gebracht, Enzyme wie Amylasen und Proteasen zu produzieren, die im späteren Brauprozess von enormer Bedeutung sind. Dabei wird die Temperatur für 7 – 9 Tage durch ständige Begasung mit feuchter Luft im Bereich zwischen 12 °C und 21 °C gehalten. Beim darauffolgenden Darren werden die Getreidekörner bei einer Temperatur zwischen 40 °C und 60 °C getrocknet, wodurch die Keimung – und die enzymbildenden biochemischen Vorgänge – zum Erliegen kommen. Je intensiver das Darren erfolgt, d.h. je höher die Temperatur und je länger die Einwirkzeit, desto dunkler wird das Malz, was im späteren Bier nicht nur die Röstaromen bedingt, sondern auch maßgeblich für die Farbe des Bieres verantwortlich ist. Am Ende des Darrens haben die Getreidekörner einen geringen Wassergehalt von 4% – 5%, wodurch eine lange Lagerungsbeständigkeit des Malzes gewährleistet wird.

Vor dem eigentlichen Braugang wird die strukturelle Integrität der Malzkörner mechanisch aufgebrochen, um das Endosperm – d.h. den stärkehaltigen Mehlkörper der Körner – freizulegen. Dieser Prozess wird als Schrotten bezeichnet. Die geschroteten Getreidekörner werden dann im sogenannten Maischevorgang in vorgewärmtem Wasser bei

einer Temperatur von etwa 45 °C eingemaischt, d.h. suspendiert. Nun wird ein 150 bis 180-minütiges Temperaturprofil abgefahren. Die einzelnen Temperaturstufen, in der brauspezifischen Fachsprache auch Rasten genannt, entsprechen dabei den Temperaturoptima der Enzymklassen, welche in der Keimung gebildet wurden. Bei der ersten Rast – der Proteinrast – bauen die Proteinasen bei einer Temperatur zwischen 45 °C und 55 °C Getreideeiweiß zu Aminosäuren ab. Bei der zweiten Rast – der Maltoserast – sorgen β -Amylasen bei einer Temperatur zwischen 60 °C und 65 °C durch ihre Exoglucanaseaktivität für den Abbau der Stärkemoleküle zu Maltose. In der dritten und letzten Rast – der Verzuckerungsrast – werden verbliebene Stärkemoleküle durch die α -Amylasen (Endoglucanaseaktivität) zu Dextrin abgebaut. Dextrin besteht dabei aus unverzweigter Amylose (α -1,4-glykosidisch verknüpft) sowie verzweigtem Amylopektin (α -1,4- und α -1,6-glykosidisch verknüpft) unterschiedlicher Kettenlängen. Während die Aminosäuren und die Maltose der Hefe in der späteren Gärung als Substrate dienen, kann Dextrin nicht von der Hefe metabolisiert werden und trägt daher maßgeblich zum Geschmack (Stichwort: Vollmundigkeit, Malzigkeit) und zum Kaloriengehalt des Bieres bei.

Sofern die Maische Iod-Negativ (Iod-Normal) ist, wird die heiße Würze in den Läuterbottich umgefüllt. Auf den, im Läuterbottich enthaltenen, Siebböden bildet sich ein Filterkuchen aus, der maßgeblich von den Spelzen der Malzkörner, d.h. der mechanisch aufgebrochenen Schale, gebildet wird. Im Läuterprozess wird zunächst die sogenannte Vorderwürze abgezogen, um anschließend in einem iterativen Prozess den restlichen Extrakt (d.h. Zucker, Dextrin, Aminosäuren, etc.) mittels vorgewärmten Wassers vom Treber abzuwaschen. Der Rohstoff „Biertreber“ für das, in dieser Dissertation beschriebene, Forschungsvorhaben kann nun aus dem Brauprozess entnommen werden. Hierbei lässt sich gut erkennen, wie verschiedene Prozessschritte des Brauens ineinandergreifen und sich gegenseitig beeinflussen: Im Mehlkörper der Malzkörner befindet sich der größte Anteil der Extraktbildner (Stärke und Eiweiß), welche möglichst vollständig gelöst werden sollen, um Ausbeuteverluste zu minimieren. Daher ist einerseits eine feine Schrotung gewünscht, um die Oberfläche des Mehlkörpers zu vergrößern und damit die Löslichkeit zu erhöhen, aber andererseits ist durch die Porengröße des Läutersiebes – und vor allem die Undurchlässigkeit des Filterkuchens bei sehr feinen Schrotten – auch eine untere Grenze für die durchschnittliche Partikelgröße gegeben.

Um ein fertiges Bier zu brauen, benötigt es allerdings noch eine ganze Reihe weiterer Schritte: Nach der Abtrennung der festen Bestandteile (Biertreber), werden die verbleibenden flüssigen Bestandteile (Würze) für ca. 100 Minuten zum Kochen gebracht und klassischerweise zweimal mit Hopfen versetzt, was neben der Sterilisation der Würze und der Präzipitation von überschüssigem Protein durch die hydrophoben Hopfenpolyphenole vor allem geschmacksgebende Aufgaben erfüllt. Einerseits werden (maßgeblich durch die

erste Hopfengabe) α -Säuren in Lösung gebracht und zu den bitteren *iso*- α -Säuren isomerisiert. Andererseits kommt es (vor allem durch die zweite Hopfengabe) zur Lösung vieler aroma- und geruchsbestimmender Substanzen, welche bereits bei sehr geringen Schwellwerten ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) für fruchtige, zitrusartige und kräuterwürzige Geruchs- und Geschmacksstoffe sorgen. Nach dem Hopfenkochen wird der sogenannte Heißstrub, bestehend aus festen Hopfenpartikeln und agglomeriertem Eiweiß, abgetrennt. Dies erfolgt meist mittels des sogenannten Whirlpools, durch welchen die Feststoffpartikel am Boden des konisch zulaufenden Behälters sedimentieren. Nach Abkühlung auf Anstelltemperatur kann die Rohwürze, je nach Braurezept, durch obergärige Hefen ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) oder untergärige Hefen ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $9\text{ }^{\circ}\text{C}$) fermentiert werden. Nach einer Hauptgärzeit von ein bis zwei Wochen sind alle vergärbaren Substanzen in Ethanol, CO_2 und Hefe-Zellbiomasse konvertiert worden. Im Anschluss daran erfolgt eine Nachgärphase (Reifung), in welcher das Bier durch zahlreiche biochemische und mikrobielle Vorgänge seinen charakteristischen Geschmack erhält. Zum Schluss kann das Bier (ggfs. nach einem Filtrationsschritt) in Fässer oder Flaschen abgefüllt, mit technischer Kohlensäure versetzt und an den Kunden verteilt werden [13–16].

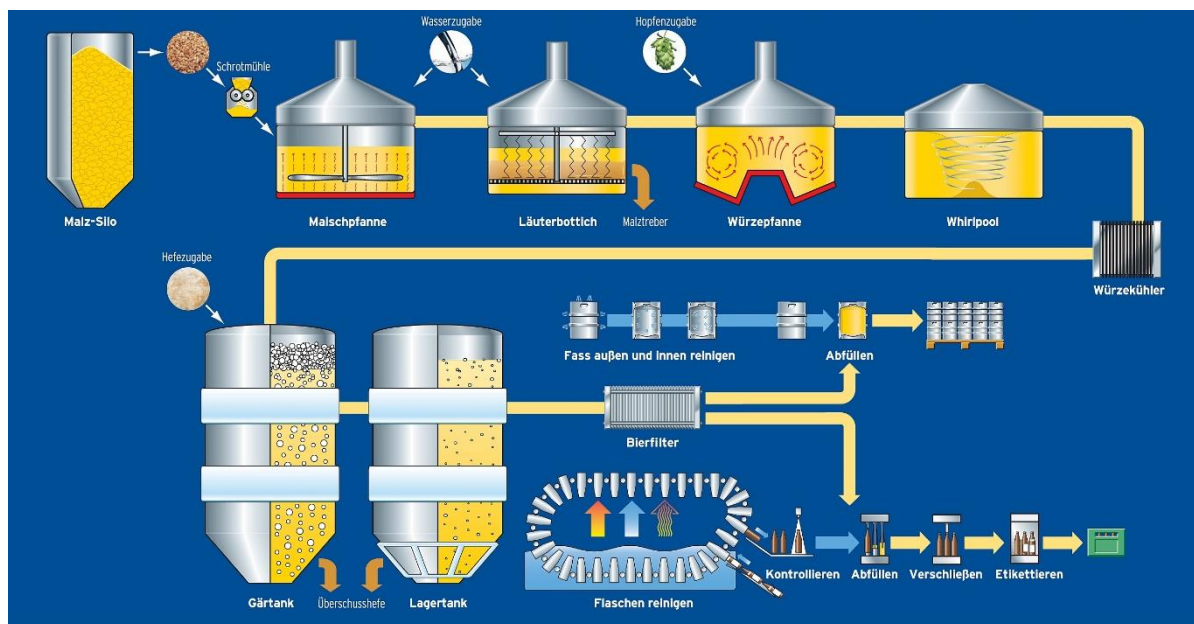


Abbildung 1: Der Brauprozess. Die Abbildung stellt einen Ausschnitt einer Abbildung des Deutschen Brauer Bundes e.V. dar [17].

3.2. Eckdaten zu Biertreber

Biertreber (Abbildung 2) stellt ein, in großen Massen anfallendes, lignocellulosehaltiges Nebenprodukt eines industriellen Prozesses – des Brauprozesses – dar [18, 19]. Da die weltweite jährliche Bierproduktion 2019 bei 1.913 Mio. Hektolitern lag [20], und pro Liter Bier etwa 0,2 kg Biertreber anfallen [21], ergaben sich daraus weltweit etwa 38,26 Mio. Tonnen Biertreber. Von diesen rund 38 Mio. Tonnen entfielen ca. 8 Mio. Tonnen auf die Europäische Union und ca. 1,8 Mio. Tonnen auf Deutschland [18]. Auch in

den Vorjahren lag der weltweite Bierausstoß mit 1.905 Mio. Hektolitern im Jahr 2018 [22] bzw. 1.952 (1.951) Mio. Hektolitern im Jahr 2017 (2016) [23] in einer ähnlichen Größenordnung, sodass von einer gleichbleibenden Verfügbarkeit von Biertreber ausgegangen werden kann. Biertreber hat am Weltmarkt einen Preis von ca. 35 € pro Tonne, womit es sich um einen niedrigpreisigen Rohstoff handelt [19]. Im Brauprozess stellt Biertreber den mengenmäßig größten, festen Nebenproduktstrom dar: Während ca. 85% der Brauereirückstände auf Biertreber entfallen, ergeben sich für Heißtrub (Hopfenbestandteile) und Brauhefe in Summe 15% [13]. Dabei kann als Faustregel angenommen werden, dass die Brauhefe in etwa 1,5% – 3,0% des produzierten Bieres ausmacht, wohingegen auf den Heißtrub ca. 0,2% – 0,4% entfallen [24, 25]. Zusätzlich entstehen pro produziertem Liter Bier etwa 2,5 – 6 Liter Abwasser [26].

Aufgrund des Läutervorgangs hat der Biertreber direkt nach dem Brauprozess einen hohen Feuchtegehalt, welcher je nach Quelle mit Werten zwischen 70% – 85% angegeben wird [21, 27–29]. In der Trockensubstanz des Trebers sind jedoch zahlreiche interessante Inhaltsstoffe enthalten [18, 21]: So finden sich in der Trockenmasse, neben den festen Bestandteile Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lignin, Lipid und Asche, ebenfalls anhaftende, lösliche Komponenten, bei denen es sich vor allem um kurzkettige Zucker und Dextrin (in geringerem Umfang auch um Aminosäuren und Peptide) aus dem Brauprozess handelt, welche durch das Läutern nicht vollständig entfernt wurden [13, 19, 30].



Abbildung 2: Biertreber direkt nach dem Brauprozess, d.h. als Nasstreber.

3.2.1. Die Verwendung von Biertreber in der Landwirtschaft

Biertreber wird zu ca. 70% in der Viehmast eingesetzt [31], wobei der überwiegende Anteil für die Fütterung von Milchkühen und Mastrindern aufgewendet wird [32, 33]. Die Anwendung als Futtermittel wurde allerdings auch für Tiere wie Fische [34, 35], Schweine [36] und Hühner [37] untersucht. Die Nutzung als Futtermittel ist vornehmlich auf den hohen Proteingehalt von bis zu 30% zurückzuführen [38], welcher im Vergleich zur Rohfrucht –

bedingt durch die Stärkedegradation im Brauprozess – verdoppelt ist [27]. Allerdings kann von wiederkäuendem Vieh auch 32% der Rohfaser (d.h. der Cellulose- und Hemicellulosefraktion) bei Weizenbiertreber bzw. 52% bei reinem Gerstentreber verdaut werden. Da es bei Biertreber, im Gegensatz zu Soja oder Raps, keines gesonderten Anbaus bedarf, sondern Biertreber jährlich sowieso in großen Mengen anfällt, stellt dieses Nebenprodukt aus dem Brauprozess ein interessantes Krafffutter für viele Landwirte dar. Aufgrund der hohen Nährstoffverfügbarkeit hat Biertreber(-silage) zudem eine metabolisierbare Energie von $10,8 - 11,1 \text{ MJ}\cdot\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$ und liegt damit nur leicht hinter anderen Futtermitteln wie Soja- oder Rapsextraktionsschrot mit $11,8 - 13,7 \text{ MJ}\cdot\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$ [27]. Neben den ökonomisch interessanten Aspekten der Biertreberfütterung wird die Auswirkung auf die Milch- und Fleischqualität allerdings kontrovers diskutiert. Einerseits wurde für äthiopische, reinrassige Milchkühe gezeigt, dass Baumwollsaamen komplett oder anteilig durch Biertreber als Krafffutter ersetzt werden können, ohne dass es zu relevanten Ausbeuteverlusten von Milch oder einer drastischen Nährwertminderung in Bezug auf Milchfett, Milchprotein und den Lactosegehalt kam [32]. Des Weiteren wurde für friesische Milchkühe eine Ertragssteigerung um 15% beschrieben, sofern die Kühe mit Biertreber gefüttert wurden, wobei sich der Gesundheitszustand der Kühe (bezogen auf die Blutplasmawerte) nicht veränderte [33]. Allerdings wurde aber auch gezeigt, dass die Ausstattung an Fettsäuren, Antioxidantien und Vitaminen in Fleisch aus Grasfütterung, im Vergleich zu Fleisch aus getreidebasierter Fütterung, verbessert ist [39]. Bei Schweizer Milchvieh wurde zudem ermittelt, dass der Verzicht auf Krafffutter (wie z.B. Getreide) zugunsten der Grasfütterung zwar eine Reduzierung der Milchausbeute, aber andererseits auch höhere Milchfett- und Milchproteinanteile und damit eine Qualitätssteigerung, mit sich bringt [40].

Der Feuchtegehalt von Treber (70% – 85%) wird im Vergleich zu Soja- oder Rapsextraktionsschrot (11%) deutlich höher angegeben, was die Landwirte vor zahlreiche Probleme stellt [21, 27–29]: Aufgrund des hohen Wasser- und Nährstoffgehaltes ist Biertreber leicht verderblich, was sich in einer Besiedelung durch Organismen wie *Clostridium butyricum* [28], diverse Schimmelpilze wie *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* [13] und Hefen [27] zeigt. Aufgrund der hohen Temperaturen beim Maischen (Kapitel 3.1) und der Einfüllung im heißen Zustand in sog. Trebersilos, gilt Treber als praktisch keimfrei, wenn er die Brauerei verlässt und hat deshalb Lebensmittelqualität [27]. Allerdings tötet der Maischevorgang thermophile, aerobe Bakterien-Sporen nicht ab, wodurch mikrobielle Kontaminationen innerhalb von wenigen Stunden auftreten können [41]. Spätestens nach 1,5 – 3 Tagen ist die schnelle Verderblichkeit durch die genannten Mikroorganismen aber sensorisch nachweisbar, was sich in einem intensiven Schimmel- bzw. Ammoniakgeruch zeigt [27]. Problematisch ist zudem, dass die genannten Organismen eine Vielzahl an Mycotoxinen produzieren können, wie dies z.B. für *Fusarium culmorum*

gezeigt wurde [42]. Zum Schutz vor Kontaminationen wird Biertreber deshalb häufig in silierter Form gelagert [43]. Allerdings werden von der bayrischen Landesregierung selbst für silierten Biertreber 12% der Proben als „qualitätsgemindert“ und nochmals 12% als „verdorben“ deklariert, was in erster Linie auf das Siliermanagement zurückgeführt wird [27]. Dies ist insofern beachtlich, da die Grenzwerte für Schimmelpilze bezüglich qualitätsgeminderter Biertreber ($3 \cdot 10^4 \text{ KBE} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$), verdorbener Biertreber ($2 \cdot 10^5 \text{ KBE} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$) und eines separaten Grenzwertes für Hefen ($1 \cdot 10^8 \text{ KBE} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$) beispielsweise im Vergleich zu den Grenzwerten für Trinkwasser ($10^2 \text{ KBE} \cdot \text{mL}^{-1}$) deutlich höher ausfallen [27, 44].

Zudem ergeben sich bei der Distribution des Trebers an die Landwirte einige Probleme: Während die Bereitstellung von Biertreber für die Viehmast durch große Brauereien aufgrund der Vielzahl an Braugängen pro Tag reibungslos funktioniert, kommt diese Art der Verwendung bei kleineren Brauereien an ihre Grenzen, da häufig nur zwei bis vier Braugänge pro Woche durchgeführt werden. Die unregelmäßige Bereitstellung von Biertreber stellt für den Landwirt ein unüberwindbares Problem dar, sodass kleine Brauereien häufig nicht als Lieferant für Viehmastbetriebe dienen können [45]. Auch wenn diese Analyse bereits 20 Jahre in der Vergangenheit liegt, ist die Relevanz aufgrund der Craft-Bier-Revolution, welche zu einem exponentiellen Anstieg von kleinen und mittelständischen Brauereien in vielen westlichen Industrienationen seit 2010 geführt hat, nach wie vor relevant [46, 47]. Aufgrund des dezentralen Anfalles und der genannten Problematik mit kleineren Brauereien, ist das Angebot an Biertreber zum Teil größer als die Nachfrage [18], sodass ca. 20% des Biertrebers auf der Mülldeponie entsorgt werden [31, 48].

Neben dem Einsatz als Futtermittel kann Biertreber auch direkt oder indirekt als Düngemittel eingesetzt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass sich Biertreber aufgrund des hohen Feuchtegehaltes, des pH-Wertes und eines unvorteilhaften C/N-Verhältnis nicht sonderlich gut für die direkte Kompostierung eignet [29]. Andererseits wurde zum Beispiel die Herstellung von Kompost durch den, im Erdreich lebenden, Wurm *Eisenia fetida* beschrieben, welcher Biertreber in einem 5-monatigen Prozess in stickstoffreichen Dünger verwandeln konnte [49]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Einbringung von Biokohle (aus pyrolysiertem Biertreber) in den Boden das Wachstum verschiedener Hopfenpflanzen (Hallertauer, Perle, Spalter) signifikant verbessern kann [50]. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass der Zusatz von Treber die Kultivierung des Pilzes *Beauveria bassiana* verbessern kann, welcher als biologisches Insektizid in der Landwirtschaft eingesetzt werden kann [51].

3.2.2. Anwendung von Biertreber für die menschliche Ernährung

Aufgrund der zahlreichen Hürden bei der Nutzung von Biertreber als tierisches Futtermittel, werden vermehrt auch andere Anwendungsfelder untersucht. Dabei wird

Biertreber aufgrund eines hohen Faseranteils und antioxidativer Eigenschaften auch für die menschliche Ernährung vorgeschlagen. So können wasserlösliche Arabinoxylane des Trebers durch die Mikroflora im Darm (z.B. *Bifidobacterien* und *Lactobacillen*) zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) umgesetzt werden, denen pathogen-hemmende, cholesterin-senkende und antitumorale Eigenschaften zugeschrieben werden [19]. Des Weiteren wird β -Glucan bei einer faserreichen Ernährung mit einer Resistenz gegenüber Bluthochdruck, Diabetes und Übergewicht verbunden [52]. Phenolische Substanzen, welche in Biertreber u.a. in der Form von Hydroxyzimtsäuren (z.B. *p*-Coumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure oder Sinapinsäure) vorkommen und der Ligninfraktion entstammen, werden mit dem Zell- bzw. DNA-Schutz vor Reactive Oxygen Species (ROS) und daher antikarzinogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht [19, 53, 54]. Aufgrund dieser positiven Attribute wird die potenzielle Anwendbarkeit in zahlreichen Produkten, wie z.B. in (Sauerteig-)Brot, Gebäck, Pasta oder Tortillas genannt [13, 55, 56]. Aufgrund von geschmacksgebenden Einflüssen und der dunklen Farbe von Treber sind der Nutzung allerdings in Bezug auf den zugesetzten Anteil am Produkt und der Art des Produktes (Anwendung nur in Vollkornprodukten möglich) gewisse Grenzen gesetzt [13]. Zudem muss der Treber zumeist in der Form von Mehl eingesetzt werden, was wiederum eine energieintensive Trocknung und Vermahlung voraussetzt.

Ferner kann Biertreber nicht nur in seiner Gesamtheit für die menschliche Ernährung eingesetzt werden – es besteht auch die Möglichkeit diverse Fraktionen aus dem Treber zu isolieren. So kann eine feste Proteinfraction durch hydromechanische Vermahlung in einer Kolloidmühle gewonnen werden, welche z.B. Öl-Wasser Emulsionen stabilisieren kann [57]. Andererseits wurde gezeigt, dass die Proteinfraction des Trebers durch enzymatischen Abbau gewonnen werden kann (und ggfs. in Lebensmitteln Anwendung finden könnte), wohingegen sich der Nährwert des Treberrückstandes dieser Behandlung für Wiederkäuer nur geringfügig änderte [58]. Auch die gesundheitsfördernden Polyphenole können aus dem Treber mittels ethanolischer oder acetonbasierter Extraktion gewonnen werden, wobei sich hierfür Biertreber mit hellen Malzschüttungen als vorteilhaft im Vergleich zu Trebern aus stark gerösteten Malzschüttungen herausgestellt haben [59]. Aufgrund der zahlreichen gesundheitsfördernden Eigenschaften wird daher die Anwendung von Biertreber oder Biertreberfraktionen als Zusatz in sog. „functional food“ diskutiert [60].

3.2.3. Anwendung von Biertreber zur Energiegewinnung

Des Weiteren kann Biertreber zur Energieproduktion genutzt werden: Dabei kann Biertreber, nach Trocknung auf einen Wassergehalt von maximal 55-60 Gew.-%, verbrannt werden [18, 61]. So wird z.B. die Verbrennung von Mischungen aus Biertreber und Illinois No. 6 Kohle als Möglichkeit genannt, um den Anteil erneuerbarer Kraftstoffe am Gesamtmarkt zu erhöhen, ohne dass dafür große Investitionen getätigt werden müssen [62].

Darüber hinaus wird auch die Verbrennung von reinem Biotreber zur Energiegewinnung und Nutzung der produzierten Energie direkt in der Brauerei diskutiert, wobei der Heizwert von Biotreber mit etwa 63% des Heizwertes von Kohle angegeben wird [63]. Biotreber kann auch mittels Mikroorganismen in Biogasanlagen zu gasförmigen Energieträgern wie Methan umgesetzt werden [64–66], wobei es sich hierbei um eine tatsächlich praktizierte Anwendungsform handelt, welche für ca. 10% der Biotreberverwertung verantwortlich ist [31]. Des Weiteren kann Biotreber zu flüssigen Kraftstoffen wie Ethanol [67] oder Butanol [68] umgesetzt werden. Außerdem kann Biotreber durch Pyrolyse bei Temperaturen zwischen 350 °C – 450 °C in die Energieträger Kohle (29%), Bio-Öl (51%) und Gas (19%) überführt werden [48]. Allerdings wurde auch berichtet, dass bei der Verbrennung von Protein-extrahiertem Biotreber die gesetzlichen Grenzwerte für die NO_x-Emission von 500 mg·m⁻³ und Feinstaub von 50 mg·m⁻³ nicht immer eingehalten werden konnten [61].

3.2.4. Sonstige Anwendungsmöglichkeiten von Biotreber

Neben den Hauptanwendungsfeldern für Biotreber in der Viehmast (70%) und der Biogasproduktion (10%), gibt es unzählige weitere Vorschläge, wie der ungenutzte Biotreber (20%) einem Wertschöpfungsprozess zugeführt werden könnte oder wie die bestehenden Anwendungsfelder nachhaltiger bzw. ökonomisch sinnvoller gestaltet werden könnten. Zahlreiche dieser Vorschläge im Bereich der menschlichen Ernährung sowie auf dem Feld der Düngemittel- und Energieproduktion wurden bereits angesprochen – daneben sollen aber auch ausgewählte weitere Anwendungsfelder kurz genannt werden: So konnte gezeigt werden, dass Biotreber in Kohlenstoff-Mikro-Tubes oder in Hydrokohle [69] konvertiert werden kann. Die Produkte besitzen jeweils eine sehr hohe Oberfläche und könnten daher potenziell als Adsorbens in zahlreichen industriellen Prozessen genutzt werden [70]. Außerdem wurde, durch Schneckenpressen thermo-mechanisch vorbehandelter, Biotreber als Füllmaterial für polymere Verbundstoffe vorgeschlagen [71]. Überdies wurde die Anwendung von Biokohle aus der Biotreberpyrolyse als Elektrodenmaterial untersucht. Dabei wurde der Biotreber-Grafit mittels der sogenannten Drop-Casting-Technik mit Glutaraldehyd quervernetzt, wodurch sogar verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu kommerziellem Grafit erzielt werden konnten [72]. Des Weiteren wird die Anwendung in Holzspanplatten diskutiert, wobei sich durch die Zumischung von Biotreber verschlechterte mechanische Eigenschaften des Materials ergaben [73].

3.2.5. Biotreber als Substrat für Mikroorganismen

In dieser Arbeit soll es allerdings schwerpunktmäßig um Biotreber als Substrat für die mikrobielle Produktion von Plattformchemikalien gehen. Diese Nutzungsmöglichkeit wird in der Literatur seit geraumer Zeit diskutiert, wurde aber bisher nicht im industriellen Maßstab umgesetzt.

Sofern Biertreber als Rohstoff zur Chemikalien-Produktion genutzt werden soll, werden klassischerweise zwei- oder dreistufige Prozesse beschrieben, welchen gemein ist, dass die strukturelle Integrität der lignocellulosehaltigen Biomasse aufgebrochen werden soll, um die Zugänglichkeit für eine folgende Hydrolyse durch technische Enzyme zu erhöhen. Die gängigsten Vorbehandlungsmethoden für Biertreber umfassen dabei u.a. die Behandlungen mit verdünnter Schwefelsäure [74, 75], verdünnter Phosphorsäure [76], Alkali-Behandlungen [77–79], Liquid-Hot-Water (LHW) Aufschlüsse [80–83], Organosolv (OS) Aufschlüsse [84, 85] sowie Mikrowellen-unterstützte Aufschlüsse [86, 87], welche allesamt zumeist bei hohen Temperaturen zwischen 110 °C und 155 °C durchgeführt werden. Die anschließende, enzymatische Hydrolyse wird mit technischen Cellulase- bzw. Hemicellulasemixturen durchgeführt, wodurch eine zuckerhaltige Lösung gewonnen wird, welche durch Mikroorganismen zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden kann. Zum Teil werden auch Co-Fermentationen beschrieben, in welchen zunächst ein lignocellulose-hydrolysierender Stamm verwendet wird, um in einem zweiten Schritt die entstandenen Zucker durch einen heterotrophen Produkt-produzierenden Stamm zu verwerten [88]. Viele Studien weisen diesen Technologien positive Eigenschaften in Bezug auf akute globale Probleme, wie. z.B. die Treibhausgasemission oder die Erderwärmung, zu (Kapitel 1). Allerdings gibt es auch Studien, welche dies weitaus kritischer beurteilen und z.B. postulieren, dass der Bedarf fossiler Energieträger bei der Nutzung von Mais, Gras, Holz, Sojabohnen oder Sonnenblumen zur Produktion von Bio-Ethanol oder Bio-Diesel um 27% – 118% höher ausfällt als die Energie, welche in den hergestellten Produkten vorhanden ist [89].

In Tabelle 1 sind die (aktuellen) Entwicklungen in Bezug auf diese klassischen (stofflichen) Verwertungsmöglichkeiten für Biertreber zur Produktion von Plattformchemikalien inklusive Prozessaufbau, maximalen Produkttitern und Ausbeuten sowie Publikationsjahr aufgezeigt. Dabei wird ein Fokus auf die, auch in dieser Arbeit produzierten, Produkte Milchsäure und Ethanol gelegt. Strategien zur Produktion von Essigsäure aus Biertreber, welche in dieser Arbeit ebenfalls verfolgt wurden, sind bisher allerdings nicht beschrieben worden. So konnten nach hydrothormaler Vorbehandlung in einer simultanen Verzuckerung und Fermentation Ethanol-Konzentrationen von $42,27 \text{ g}_{\text{EtOH}} \cdot \text{L}^{-1}$ erzielt werden [67]. Für eine Fed-Batch-Fermentation von Phosphorsäure- und enzymatisch vorbehandeltem Biertreber wurden sogar Milchsäurekonzentrationen von bis zu $70,17 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{L}^{-1}$ berichtet [90]. Allerdings ist der Vergleich der Prozesse nicht immer trivial, da zur Beurteilung der Prozesseffektivität in der Literatur zahlreiche Größen herangezogen werden: Die gegebenen Ausbeuten beziehen sich zum Teil auf die eingesetzte Menge an Treber und zum Teil auf die verfügbare Menge an Kohlenhydraten im Treber, wobei sich die Berechnung hierbei teils auf den Gesamt-Kohlenhydratanteil im

Rohstoff und teils auf die (enzymatisch) hydrolysierten Zucker bezieht. Da bei ethanolischer Gärung durch Hefen, aufgrund der obligatorischen CO₂-Produktion während der Fermentation, eine maximale theoretische Ausbeute von 0,51 g_{EtOH}·g_{Zucker}⁻¹ erzielt werden kann, wird die Ausbeute in manchen Literaturstellen zudem als Prozentsatz dieser theoretischen Maximalausbeute angegeben.

Daneben wird Biertreber für die Produktion von zahlreichen weiteren Stoffen vorgeschlagen, von welchen hier einige genannt werden sollen: So wurde beispielsweise die Produktion von Butanol in einer ABE-Fermentation mit *C. beijerinckii* nach vorherigem Mikrowellen-Aufschluss des Biertreibers beschrieben [91]. Nach einem OS-Aufschluss, gefolgt von einer enzymatischen Verzuckerung, konnte zudem die Produktion von Itakonsäure mittels des Organismus *U. maydis* MB215Δ*cyp3ΔP_{ria1}::P_{etef}* bewerkstelligt werden [85]. Außerdem konnte mit dem Organismus *C. guilliermondii* aus xylosehaltigen Treberhydrolysaten Xylitol in hohen Konzentrationen (62,3 g·L⁻¹) gewonnen werden [92]. Des Weiteren finden sich techno-ökonomische Analysen zum Zwecke der Xylitol-, Ethanol- und/oder Polyhydroxybutyrat-Produktion aus Biertreber [93].

Dabei wurde das Potenzial von Biertreber, abseits der mehrstufigen Prozesse (incl. Aufschluss, enzymatischer Verzuckerung und Fermentation) auch zur Nutzung in einstufigen mikrobiellen Prozessen beschrieben, wobei sich die Anwendung zumeist auf das Lebensmittelsegment und/oder die Enzymproduktion fokussiert.

Tabelle 1: (Teil 1) Zusammenfassung der aktuellen Prozesse zur stofflichen Nutzung von Biertreber in klassischen zwei- oder dreistufigen Verfahren bezüglich maximaler Produktkonzentration P_{max}, Produkt/Substrat-Ausbeute Y_{P/S} (bezogen auf hydrolysierte, lösliche Zucker oder eingesetzten Treber) sowie Publikationsjahr; ¹Prozentsatz von maximal möglicher theoretischer Ausbeute; ²bezogen auf verbrauchten Treber [11].

Prozess-Schema	P _{max} / g _{Prod} ·L ⁻¹	Y _{P/S} / g _{Prod} ·g _{Zucker} ⁻¹	Y _{P/S} / g _{Prod} ·g _{Treber} ⁻¹	Jahr	Quelle
a) Vorbehandlung mit Schwefelsäure bei 120 °C	Milchsäure / 35,54 g _{Lac} ·L ⁻¹	0,99	-	2007	[74]
b) Enzymatische Verzuckerung					
c) Fermentation mit <i>L. delbrueckii</i> in supplementiertem Hydrolysat					
a) Vorbehandlung mit Schwefelsäure und NaOH bei 120 °C	Ethanol / 12,79 g _{EtOH} ·L ⁻¹	0,28 ¹	-	2015	[94]
b) Enzymatische Verzuckerung					
c) Fermentation mit <i>S. cerevisiae</i>					
Verzuckerung mit filamentösen Pilzen, z.B. <i>A. oryzae</i> , und parallele Fermentation mit Hefen, z.B. <i>S. cerevisiae</i>	Ethanol / 37 g _{EtOH} ·L ⁻¹	-	0,09	2016	[88]

Tabelle 1: (Teil 2) Zusammenfassung der aktuellen Prozesse zur stofflichen Nutzung von Biertreber in klassischen zwei- oder dreistufigen Verfahren bezüglich maximaler Produktkonzentration P_{max} , Produkt/Substrat-Ausbeute $Y_{P/S}$ (bezogen auf hydrolysierte, lösliche Zucker oder eigesetzten Treber) sowie Publikationsjahr; ¹Prozentsatz von maximal möglicher theoretischer Ausbeute; ²bezogen auf verbrauchten Treber.

a) Vorbehandlung mit Phosphorsäure	Milchsäure / 39,38 g _{Lac} ·L ⁻¹	0,81	-	2017	[90]
b) Enzymatische Verzuckerung					
c) Fermentation mit <i>L. rhamnosus</i> in supplementiertem Hydrolysat					
a) Vorbehandlung: Autohydrolyse bei mind. 150 °C	Ethanol / 42,27 g _{EiOH} ·L ⁻¹	0,94 ¹	0,17	2018	[67]
b) Enzymatische Verzuckerung und parallele Fermentation mit <i>S. cerevisiae</i> (SSF)					
a) Vorbehandlung mit Phosphorsäure bei 155 °C	Ethanol / 16 g _{EiOH} ·L ⁻¹	0,4	0,18	2018	[76]
b) Enzymatische Verzuckerung					
c) Fermentation mit <i>E. coli</i>					
a) Vorbehandlung einer Mischung aus Biertreber und Malzkeimlingen mit Phosphorsäure	Milchsäure / 28,43 g _{Lac} ·L ⁻¹ (Batch)	0,93 (Batch)	-	2018	[24]
b) Enzymatische Verzuckerung	70,17 g _{Lac} ·L ⁻¹ (Fed-Batch)	0,95 (Fed-Batch)			
c) Fermentation mit <i>L. rhamnosus</i> unter Zusatz von Brauhefe-Extrakt					
a) Vorbehandlung mit Schwefelsäure bei mind. 110 °C	Ethanol / 27 g _{EiOH} ·L ⁻¹	0,71	0,23	2019	[95]
b) Fermentation mit <i>S. stipidis</i> und <i>E. coli</i>					
a) Vorbehandlung mit Schwefelsäure bei mind. 110 °C	Ethanol / 27 g _{EiOH} ·L ⁻¹	0,71	0,23	2019	[95]
b) Fermentation mit <i>S. stipidis</i> und <i>E. coli</i>					
Fermentation von abgepresstem Biertreber mit <i>C. uda</i>	Gemischt-säuregärung / 8,96 g·L ⁻¹	-	0,41	2021	Diese Arbeit [11]
Fermentation von abgepresstem Biertreber mit <i>C. uda</i>	Gemischt-säuregärung / 36,03 g·L ⁻¹	-	0,15	2021	Diese Arbeit [11]

So wurde zum Beispiel gezeigt, dass der Nährstoffgehalt des Biertreibers bzgl. Aminosäuren, Vitaminen und Antioxidantien durch Fermentationen mit *Rhizopus oligosporus* oder *Bacillus subtilis* WX-17 verbessert werden kann, was eine Anwendung im

Lebensmittelsegment nahelegt [96, 97]. Überdies konnte der Zusatz von Treber zu fermentiertem Brot, welches ebenfalls mit dem Ziel der Verbesserung der Nährstoffausstattung in einer Feststofffermentation prozessiert wurde, eine Verbesserung der Brot-Textur erzielen [98]. Außerdem wurde die Nutzung von Biertreber zur Produktion von Cellulasen, Lipasen und Laccasen mit Organismen wie *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus fumigatus* oder *Trametes versicolor* ATCC 20869 beschrieben [99, 100]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich Saccharose-supplementierter Biertreber als Substrat für die Kultivierung von *L. pseudomesenteroides* DSM 20193 and *W. confusa* A16 zum Zwecke der Produktion von Dextran eignet, welches als Lebensmittelzusatzstoff genutzt werden kann [101]. Erstmals wurde zudem die Produktion von organischen Säuren und Ethanol in einem einstufigen Prozess mit dem Organismus *C. uda* beschrieben (diese Arbeit) [11].

Bei fast allen genannten (mehrstufigen) Prozessen wird keine Unterscheidung zwischen festen und löslichen, anhaftenden Biertreberbestandteilen getroffen. Die feste Fraktion (Cellulose, Hemicellulose, Lignin, etc.) wird also nicht separat betrachtet, sondern – wie aus dem Brauprozess kommend – inklusive aller anhaftenden Moleküle (Zucker, Dextrin, etc.) verwertet. Um die klassischen, mehrstufigen Verfahren anwenden zu können, ist es mitunter aber ratsam, die löslichen Treberbestandteile abzutrennen. Dies kann entweder durch Pressen (vorliegende Arbeit), Waschen [74, 76], Membrantrenntechnik [102] oder durch Autoklaven-unterstützte Vorbehandlungen bei 100 °C erfolgen, da sich die Löslichkeit der anhaftenden Moleküle mit steigender Temperatur ebenfalls erhöht [83, 103]. Des Weiteren kommt in neueren Brauereien auch der sogenannte Presstreber vor, bei welchem der Treber im Sudhaus zum Zwecke der Ausbeutesteigerung von einem Wassergehalt von ca. 80% auf 72% abgepresst wird [27]. In den meisten Publikationen wird für diese löslichen, anhaftenden Treberbestandteile keine Nutzungsmöglichkeit aufgezeigt. Zudem wird dieser Stoffstrom auf sehr unterschiedliche Art und Weise bezeichnet, wobei die Bezeichnung zumeist einen Bezug zur Gewinnungsmethode der flüssigen Fraktion nimmt. In allen beschriebenen Fällen handelt es sich aber um die (Malz-)Zucker und Dextrin-haltige flüssige Bier(treber-)fraktion, sodass in dieser Arbeit – wieder in Bezug zur Herstellungsmethode – der Begriff Treberpresssaft verwendet wird.

Einige, zumeist ältere Studien, beschreiben den Treberpresssaft und zeigen zum Teil auch potenzielle Nutzungsmöglichkeiten auf, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind: 1975 wurde erstmals das Wachstum von *A. niger* und die Zitronensäureproduktion ausgehend von *Brewery Spent Grain Liquor* beschrieben [104]. Im gleichen Jahr wurde zudem die Produktion von Einzellerprotein mit Pilzen wie *Calvatia gigantea* und *Candida steatolytica* beschrieben, wobei durch das Wachstum mit *Grain Press Liquor* und anderen flüssigen Brauereiabfällen eine Reduzierung des biochemischen Sauerstoffbedarfs

(BSB) im Kulturmedium erfolgte [105, 106]. Folglich wurden durch die Kultivierung eher abwasserreinigende als wertstoffproduzierende Ziele verfolgt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Prozesse zur stofflichen Nutzung von Treberpresssaft bezüglich maximaler Produktkonzentration P_{max} , Produkt/Substrat-Ausbeute $Y_{P/S}$ und Publikationsjahr.

Prozess-Schema	$P_{max} / g_{Prod} \cdot L^{-1}$	$Y_{P/S} / g_{Prod} \cdot g_{Zucker}^{-1}$	Jahr	Quelle
Wachstum von <i>C. gigantea</i> und <i>C. steatolytica</i> auf (supplementiertem) Treberpresssaft	Zellbiomasse / 15,19 $g_{BTM} \cdot L^{-1}$	0,66	1975	[106]
Fermentation von <i>A. niger</i> auf Treberpresssaft mit Zn^{2+} Supplementation	Zitronensäure / 21,08 $g_{Cit} \cdot L^{-1}$	0,82	1986	[107]
Fermentation von <i>A. pullulans</i> auf (supplementiertem) Treberpresssaft	Pullulan / 11,0 $g_{Pul} \cdot L^{-1}$	0,48	1999	[108]
Fermentation von <i>R. glutinis</i> in Glucose-supplementiertem Treberpresssaft	Carotenoide / 1,2 $mg \cdot L^{-1}$ Lipide / 0 $mg \cdot L^{-1}$	-	2013	[109]
Fermentation von <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> in supplementiertem Treberpresssaft	Milchsäure / 79,06 $g_{Lac} \cdot L^{-1}$	0,89	2020	Diese Arbeit [30]

Im Jahr 1976 wurde ein Extrakt aus Biertreber zudem als Antischaumzusatz für Bioreaktoren vorgeschlagen [110]. Ein Jahrzehnt später wurde *Spent Grain Liquor* erneut als Nährmedium zur Produktion von Zitronensäure [107, 111] und im Jahr 1999 zur Pullulan-Produktion vorgeschlagen [108]. Aktuell wurden wachstumsfördernde Effekte von *Brewery effluents* auf das Wachstum von *Bacillus* Stämmen [112] und die mikrobielle Lipid- sowie Carotenoidproduktion (zur Verwendung als Biodiesel bzw. Pigment) aus *Brauerei-Prozesswasser* mittels *Rhodotorula glutinis* untersucht [109]. Des Weiteren wurden in jüngerer Vergangenheit potenzielle Anwendungsfelder für die stoffliche Nutzung von *Treberwasser* in Lebens- oder Nahrungsergänzungsmitteln beschrieben [102]. Zudem wurde die Milchsäureproduktion ausgehend von Treberpresssaft mit hohen finalen Titern und guten Ausbeuten in einer simultanen Verzuckerung und Fermentation demonstriert (diese Arbeit) [30].

Auch für andere biologische Abfallstoffe wurde festgestellt, dass der Fokus der aktuellen Forschung zumeist nur feste Substrate für die Weiterverarbeitung in Betracht zieht, während flüssige Abfallprodukte häufig herkömmlich entsorgt werden. So wurde beispielsweise beschrieben, dass Nutztierexkremate sowohl eine flüssige als auch eine feste Fraktion beinhalten. Während für die feste Fraktion zahlreiche Anwendungsfelder, z.B. zur Methan, Bioöl- oder Biokohle-Gewinnung diskutiert werden, wird die flüssige Fraktion zumeist in der direkten Umgebung entsorgt, was zahlreiche Umweltprobleme zur Folge haben kann [113].

3.2.6. Industrielle Nutzung von Biotreber in Bioraffinerie-Konzepten

Ein Bioraffinerie-Konzept beschreibt die Anwendung von interdisziplinären Technologien zur Nutzung eines Reststoffes als Substrat, die Fraktionierung in verschiedene Stoffströme in Analogie zur Erdölraffinerie und schließlich die Herstellung von Produkten des täglichen Bedarfs aus diesen Fraktionen [114, 115]. Diese Strategien untergliedern sich nach zahlreichen Gesichtspunkten, wobei zumeist eine Klassifizierung anhand des verwendeten Substrates getroffen wird. So wird beispielsweise folgende Unterteilung vorgeschlagen: (a) Die Ganzpflanzenbioraffinerie, in welcher z.B. Getreide oder Mais genutzt wird, (b) die Grüne Bioraffinerie, in welcher feuchte Grünpflanzen, wie z.B. Wiesenschnitt verwertet werden und (c) die Lignocellulose-Bioraffinerie, in welcher natürlich-getrocknete Pflanzenabfälle genutzt werden [115]. Ausgehend von dieser Klassifizierung würde es sich bei der Biotreber-Bioraffinerie um eine Mischform der drei genannten Bioraffinerie-Typen handeln, da zwar (bis auf das Endosperm) das komplette Getreidekorn verwendet wird und es sich bei Malz um ein (industriell) getrocknetes Substrat handelt, aber andererseits der Feuchtegehalt durch den Maische- und Läuterprozess wieder deutlich erhöht wurde. Daneben gibt es aber auch noch zahlreiche weitere Bioraffineriekonzepte, welche z.B. die Nutzung von CO-, H₂- und CO₂-reichem Synthesegas mittels chemolithoautotropher Mikroorganismen (Synthesegas-Bioraffinerie) [116] oder die Nutzung von städtischem Abfall als Substrat vorschlagen (Abfall-Bioraffinerie) [117, 118]. Des Weiteren finden sich Konzepte, bei welchen die verwendeten Mikroorganismen bzw. das erzielte Produkt namensgebend sind, was z.B. auf die Algen-Bioraffinerie [119, 120] oder die Biogas-Bioraffinerie [121, 122] zutrifft.

Neben den zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen zur Verwertung von Biotreber (Kapitel 3.2.1 – 3.2.5), sind die tatsächlichen industriellen Anwendungen (im Rahmen einer Biotreber-Bioraffinerie) allerdings rar gesät. In Österreich hat die Brauerei Göss aus Loeben im Jahr 2015 eine Biogasanlage für Biotreber errichtet, welche die formalen Kriterien für die ganzheitliche Nutzung im Rahmen einer Bioraffinerie erfüllt. Mit dieser Anlage können rund 16.500 Tonnen an Brauereirückständen, welche in dieser Brauerei jährlich anfallen, verwertet werden. Dabei wird entstehendes Heißwasser sowohl in der Brauerei als auch in der Biogasanlage zu Heizzwecken genutzt und produziertes Biogas entweder direkt zur Befeuerung der Sudkessel (anstelle von Erdgas) oder zur Produktion von Ökostrom verwendet, welcher ins Stromnetz eingespeist werden kann. Alle Gärreste der Anaerobic Digestion (AD) werden im Anschluss als Dünger verwendet [123].

3.2.7. Industrielles Upcycling von Biotreber

Darüber hinaus sind einige (zumeist junge) Unternehmen aus dem Alpenraum, Deutschland oder den USA bekannt, welche Biotreber in verschiedenster Weise nutzbar machen – allerdings kein klassisches Bioraffinerie-Konzept verfolgen, sondern eher die Anwendung im sogenannten „functional food“ vorantreiben. So hatte beispielsweise die

Schweizer Föhrenbier Manufaktur zeitweise ein Müsli auf Treberbasis im Angebot; die Produktion wurde aber aufgrund des großen Produktionsaufwandes wieder eingestellt [124]. Auch die Schweizer Brauerei Locher AG aus Appenzell hat Produkte auf Treberbasis im Angebot, u.A. werden Chips und Pizza verschiedener Geschmacksrichtungen vertrieben [125]. Die US-amerikanischen Firmen Regrained und Rise produzieren hingegen Mehl aus Biertreber, welches im Falle von Regrained noch zu diversen gesalzenen Snacks weiterverarbeitet wird [126, 127]. Eine ähnliche Idee verfolgt das Darmstädter Unternehmen [RE]BERT, welches sowohl Treberbrot als auch diverse Energieriegel auf Treberbasis vertreibt [128]. Die Gründer der Firma Eco Sixpack-Ring entwickelten zudem eine umweltfreundliche Verpackung aus Biertreber, welche u.a. für Pakete aus vier bzw. sechs Bierdosen genutzt werden kann [129].

3.3. Verwendete Mikroorganismen und produzierte Plattformchemikalien

Um die stoffliche Nutzung des Trebers zu untersuchen, werden in dieser Arbeit verschiedene Fermentationsstrategien für die löslichen und festen Treberbestandteile untersucht. In Bioraffineriekonzepten werden häufig Ethanol und Milchsäure als Zielprodukte genannt, da somit sowohl der Treibstoffbedarf (Bioethanol und Biodiesel) als auch der Plastikbedarf (Polymilchsäure) adressiert werden kann [8]. Daher soll auf den Stoffwechsel und die produzierten Produkte der verwendeten Organismen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Nutzung des Treberpresssaftes zur Milchsäureproduktion) und *Cellulomonas uda* (Nutzung des festen Treberrückstandes, u.A. zur Ethanolproduktion) näher eingegangen werden.

3.3.1. Der Stoffwechsel von *Lactobacillen*

Bei Milchsäurebakterien handelt es sich um Gram-positive, nicht-sporulierende, nicht-bewegliche, fakultativ anaerobe Kokken oder Stäbchen [130]. Sie werden in insgesamt sechs Familien eingeteilt, welchen allesamt gemein ist, dass sie Milchsäure als primäres Stoffwechselprodukt besitzen. In fünf der sechs aufgeführten Familien finden sich zudem Vertreter, welche seit alters her zur Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzt werden, z.B. zur Produktion von Sauermilchprodukten, Sauerteig oder Sauerkraut [12, 131]. Während die meisten Milchsäurebakterien wenige Mikrometer lang werden, bildet *L. delbrueckii* subsp. *lactis* hingegen deutlich längere Stäbchen aus (Abbildung 3) [132].

Es gibt sowohl hetero- als auch homofermentative Milchsäurebakterien, wobei *L. delbrueckii* subsp. *lactis* zu den homofermentativen Vertretern gezählt wird [133]. Während bei heterofermentativen Milchsäurebakterien Nebenprodukte wie Essigsäure oder Ethanol gebildet werden, wird bei den homofermentativen Bakterien nur Milchsäure als finales Stoffwechselprodukt in das Medium sekretiert [130, 131, 134].

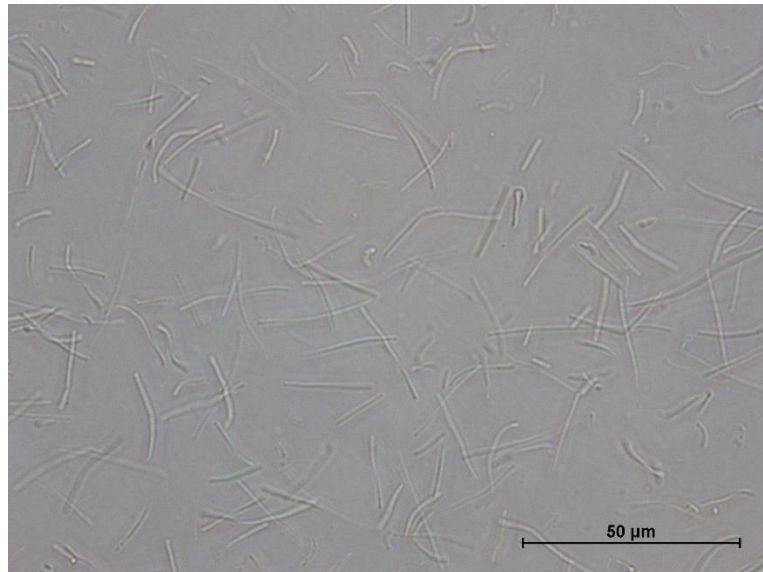


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von *L. delbrueckii* subsp. *lactis* in MRS-Medium; aufgenommen mit einem Wasserimmersionsobjektiv ($40 \times 0,65 \infty/0,17$ WD 0,56) bei 40-facher Vergrößerung und unter Verwendung von Phasenkontrast Ph1.

Beim Wachstum mit Glucose wird dabei ein Mol Glucose durch die Enzyme Aldolase und Lactatdehydrogenase in 2 Mol Milchsäure umgesetzt, wobei ein äquimolares Verhältnis von ATP gebildet wird (Abbildung 4). Da *L. delbrueckii* subsp. *lactis* keine großen Mengen kohlenstoffhaltiger Nebenprodukte produziert, was wiederum hohe Milchsäureausbeuten erlaubt [135], und gute kinetische Parameter, wie z.B. eine hohe Wachstumsrate, aufweist [136], stellt der Stamm einen interessanten Vertreter für technische Anwendungen dar. Einer der größten Vorteile der bioverfahrenstechnischen Milchsäureproduktion findet sich zudem in der Fähigkeit vieler *Lactobacillen* enantiomerenreine Milchsäure herzustellen. So kann auch *L. delbrueckii* subsp. *lactis* optisch reine, linksdrehende D(-)-Milchsäure bilden [135, 137], während andere Stämme rechtsdrehende L(+)-Milchsäure herstellen können.

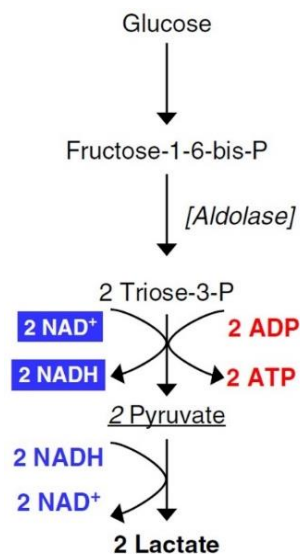


Abbildung 4: Mechanismus der homofermentativen Milchsäurebildung aus Glucose. Die Abbildung stellt einen Ausschnitt einer Abbildung aus Gänzle (2015) dar [131].

3.3.2. Ökonomische Relevanz von Milchsäure

2-Hydroxypropanoat, d.h. das Anion der Milchsäure, stellt eine wichtige Plattformchemikalie dar, welche in den letzten Jahren zunehmend durch mikrobielle Verfahren hergestellt wurde. Während 1990 noch 65% der damaligen Jahresproduktion von 65.000 Tonnen fermentativ hergestellt wurden [138], gibt es heutzutage eine jährliche Produktionskapazität von bis zu 400.000 Tonnen [139]. Dabei handelt es sich um ein Paradebeispiel für eine Plattformchemikalie, die mittlerweile überwiegend aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt wird, da rund 90% – 95% der aktuellen Produktion auf fermentative Gewinnungsmethoden zurückzuführen sind [12, 140].

Milchsäure besitzt eine große Relevanz als Präkursor für die Produktion von zahlreichen weiteren Chemikalien [135]: So kann Milchsäure über eine Reduktion zu 1,2-Propandiol, über eine Oxidation zu Pyruvat und über eine Dehydratisierungsreaktion zu Produkten wie Acetaldehyd, Acrylsäure oder 2,3-Pentandion umgesetzt werden [140]. Eine weitere wichtige Anwendung ist der Einsatz in der polymerisierten Form als Polymilchsäure (PLA). Dieser biokompatible und biologisch abbaubare Polyester hat zahlreiche Anwendungen in Verpackungsmaterialien, Biomüll-Tüten, der Medizin (Fäden, Prothesen, Medikamentenbeschichtungen) und als Lebensmittelzusatzstoff [140]. Der steigende Bedarf an PLA ist auch maßgeblich für die große Nachfrage nach Milchsäure in den letzten Jahren verantwortlich [141]. Insbesondere stereokomplexes PLA, welches aus Mischungen von L-Lactyl- und D-Lactyl-Oligomeren besteht, zeigte dabei vorteilhafte mechanische, thermische und hydrolysebeständige Eigenschaften [142]. Aufgrund dieser zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten ist die Herstellung von Milchsäure von hohem wirtschaftlichen Interesse [82].

3.3.3. Der Stoffwechsel von *Cellulomonadaceae*

Cellulomonas uda ist ein Gram-positives, nicht-sporulierendes, nicht-bewegliches, fakultativ anaerobes Bakterium mit einer Länge von ca. 1-2 μm (Abbildung 5), welches zur Familie der *Cellulomonadaceae* gehört. Die Zellen haben die Fähigkeit, Cellulose, Hemicellulose sowie Chitin zu hydrolysieren und mit diesen Substraten eine klassische Gemischtsäuregärung durchzuführen. Dabei werden die Carbonsäuren Bernsteinsäure, Ameisensäure, Milchsäure, Essigsäure sowie das Solvens Ethanol in das Fermentationsmedium sekretiert. Außerdem entsteht durch den Stoffwechsel der *Cellulomonadaceae*, neben der Bildung dieser löslichen Produkte, häufig gasförmiges CO_2 [143–147].

Cellulomonadaceae exprimieren eine breite Palette an membrangebundenen und freien, sekretierbaren Cellulasen und Hemicellulasen [148, 149]. So wurde die Expression von β -Glucanasen und β -Glucosidasen z.B. für *C. biazotea* [150] und *C. uda* [151] nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *C. uda* membrangebundene β -Xylanase-

und β -Xylosidase-Aktivität aufweist, welche sowohl konstitutiv vorhanden ist, aber auch durch Xylotriase induziert und durch Xylose inhibiert werden konnte [152]. Für *Cellulomonas* sp. wurden neben der membrangebundenen Xylanaseaktivität auch freie Enzyme für den Abbau von Hemicellulose identifiziert [153]. Die industrielle Anwendbarkeit von *Cellulomonadaceae* wurde bisher zur Entfernung von Schwermetallen und Radionukliden aus Abwässern [154], zur Produktion von Einzellerprotein [155], zur Cellulase- und Xylanaseproduktion [156, 157] und zur Erzeugung von Elektrizität in mikrobiellen Brennstoffzellen diskutiert [158]. Das Interesse an diesem Genus zeigt sich auch an der großen Anzahl kürzlich isolierter und neu beschriebener Stämme, u.a.: *C. telluris* [159], *C. timonensis* [160], *C. endophytica* [161], *C. aurantiaca* [162] und *C. algicola* [163].

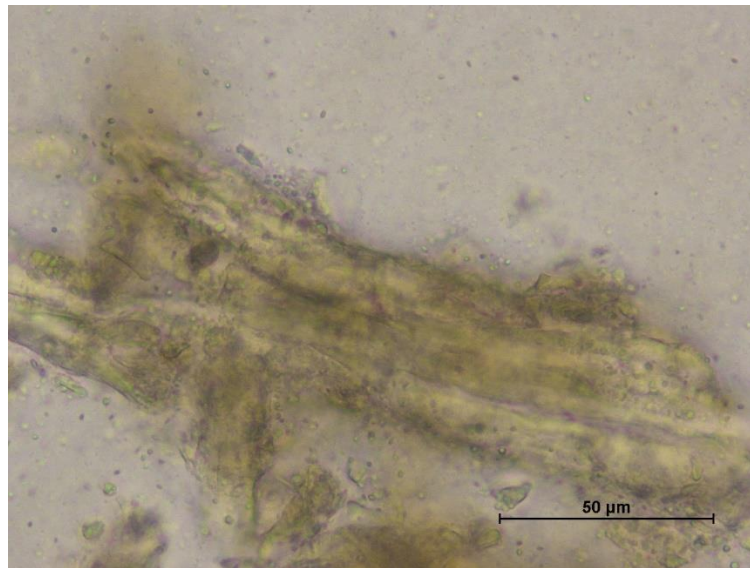


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. uda* in einem Medium bestehend aus 5 Gew.-% MB-Treber in 0,2 M MOPS-Puffer pH = 7,4; aufgenommen mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40 × 0,65 ∞/0,17 WD 0,56) bei 40-facher Vergrößerung ohne Phasenkontrast; Anmerkung: Zentral ist ein Treberpartikel zu sehen; bei den kleinen Punkten handelt es sich um die Zellen; MB, Maibock.

Im Gegensatz zu *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ist der Zentralstoffwechsel von *C. uda* nicht bekannt. In der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-Datenbank (KEGG) sind allerdings die annotierten Gene der artverwandten Organismen *C. gilvus* (CP002665.1), *C. fimi* (CP002666.1) und *C. flavigena* (NC_014151.1) hinterlegt.

3.3.4. Ökonomische Relevanz von Ethanol

Ethanol hat seit Jahrtausenden eine große Relevanz in der Form von vergorenen Getränken, z.B. in der Form von Bier, Wein oder Sake. Die historisch-bedingte menschliche Fokussierung auf diese psychoaktive Substanz könnte dabei ursprünglich auf die jahreszeitliche Verbindung zwischen Fruchtreife und dadurch bedingte große Nährstoffbereitstellung, aber auch Vergärung durch Hefen bei weiter fortschreitender Fruchtreife, zurückzuführen sein [164]. Auch in der aktuellen Zeit stellt Ethanol einen interessanten Wertstoff dar, da er z.B. für die Kraftstoff- oder H₂-Herstellung genutzt werden kann, sodass Ethanol aus agroindustriellen Reststoffen einen Beitrag zur Energieversorgung

der Zukunft leisten kann [94, 165]. Weitere Anwendungsfelder für Ethanol umfassen u.a. die Anwendung als Desinfektionsmittel [166] oder die Nutzung als Ausgangsstoff zur Synthese weiterer Chemikalien [167].

Im Jahre 2000 lag die weltweite Produktion von Ethanol noch bei jährlich 29,2 Mio. m³, wovon ca. 59% auf die Biokraftstoffherstellung entfielen. Im Jahr 2018 wurden bereits 127,6 Mio. m³ Ethanol produziert und davon 84% für die Kraftstoffsynthese aufgewendet [168], was recht genau mit der, im Jahr 2018 produzierten, Bioethanolproduktion von 110 Mio. m³ übereinstimmt, die in anderen Quellen genannt wird [169]. Im Jahr 2020 wurden bereits, allein durch fermentative Methoden, 131 Mio. m³ Ethanol hergestellt [167]. Allerdings wurden 2020 ca. 96% des Bioethanols aus Nahrungsmittel-relevanten Agrarerzeugnissen, wie z.B. aus Mais, Weizen oder Zuckerrohr, produziert. Aufgrund der sogenannten Teller/Tank-Diskussion ist diese 1. Generation an Biotreibstoffen jedoch in die Kritik geraten. Dementsprechend entfielen im Jahr 2020 nur 4% der weltweiten Bioethanolproduktion auf die Biokraftstoffe 2., 3., und 4. Generation, sprich auf Basis von lignocellulosehaltiger Biomasse sowie aus Algenfermentationen bzw. Fermentationen unter Zuhilfenahme gentechnisch modifizierter Algen [10].

3.3.5. Ökonomische Relevanz von Essigsäure

Essigsäure stellt eine wichtige Chemikalie dar, wobei nur ca. 10% der weltweiten Produktion fermentativ und 90% mittels Synthese aus Methanol, Acetaldehyd, Butan oder Ethylen hergestellt werden [170]. Im Jahr 2015 wurden weltweit ca. 13 Mio. Tonnen Essigsäure produziert [171], wohingegen die Produktionsmenge in den kommenden Jahren noch auf bis zu 17,3 Mio. Tonnen ansteigen soll [172]. In erster Linie wird Essigsäure in der Form von Polyvinylacetat genutzt, welches in Farben und Lacken breite Anwendung findet [171]. Eine spezielle Anwendung der fermentativ-hergestellten Essigsäure liegt in der Form von Haushalts-Essig (4-6%-ige wässrige Essigsäurelösung), da viele Lebensmittelgesetzte den biologischen Ursprung für Essigsäure im Lebensmittelsegment vorschreiben [170].

4. Material & Methoden

4.1. Herstellung der verwendeten Rohstoffe

Beim Brauprozess fallen vorrangig drei Nebenproduktströme an: Biertreber, Heißtrub und Brauhefe [13]. Da in dieser Arbeit für zwei der drei Nebenprodukte (Biertreber und Brauhefe) Strategien zur bioverfahrenstechnischen Nutzung aufgezeigt werden, wurden diese Rohstoffe auch aus eigens durchgeführten Brauprozessen gewonnen.

4.1.1. Produktion von Biertreber

Insgesamt wurden sechs Braugänge zum Zwecke der Biertreber-Herstellung durchgeführt. Dazu wurden in einer 100 L Pilotbrauanlage die Bierrezepturen Pale Ale (PA), Helles (HE), Kölsch (KÖ), Weizen (W), Maibock (MB) und Weizenbock (WeBo) gebraut. Die zugrunde liegenden Braurezepturen sind in Tabelle 3 dargestellt. Biertreber eines kommerziell erhältlichen Bieres wurde von einer lokalen Brauerei (Bischoff GmbH & Co. KG, Winnweiler, Deutschland) zu Vergleichszwecken zur Verfügung gestellt, welcher in der vorliegenden Arbeit als Bischoff (B) bezeichnet wird.

Tabelle 3: Rezepturen, der für diese Arbeit durchgeführten Braugänge, in Bezug auf Malzschüttung, Flüssigkeitsvolumen (Haupt- und Nachguss) sowie Stammwürzegehalt; kg, Kilogramm; L, Liter; °Brix, Grad Brix.

	Pale Ale	Helles	Kölsch	Weizen	Maibock	Weizenbock
Gerstenmalz / kg	17,5	21,4	15,3	9,2	25,2	14
Weizenmalz / kg	1,5	0	1,4	9,2	0	15
Roggenmalz / kg	0,5	0	0	0	0	0
Hauptguss / L	71	67	58	70	67	72
Nachguss / L	50	50	50	50	45	25
Stammwürze / °Brix	13	13,1	13	12	17	17,5

4.1.2. Herstellung von Hefeextrakt

Hefeextrakt wurde durch Autolyse aus Brauhefe auf Grundlage eines Protokolls durchgeführt, welches u.a. Vorbereitungen für die Autolyse (z.B. Waschschriffe), notwendige Schritte zur Einstellung des pH-Wertes und für die Entfernung bakteriostatischer Hopfenbitterstoffe beinhaltet [173]. Dazu wurde 750 g frische Brauhefe-Aufschlammung (SafAle US-05, Lesaffre, Marc-en-Baroel, Frankreich), welche zuvor für fünf Tage im Bier fermentiert worden war, in 5 L sterilem, deionisiertem Wasser suspendiert. Der Prozess der Autolyse wurde für 24 h bei einer Temperatur von 55 °C und einer Rührerdrehzahl von 300 rpm in einem Bioreaktor (RALF, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) bei einem Arbeitsvolumen von 5 L durchgeführt. Nach der Autolyse wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min bei 4200 × g abgetrennt (Z 383 K, Hermle Labortechnik GmbH, Balingen, Deutschland) und der Überstand mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Laborota 4003, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) aufkonzentriert. Das

entstandene Hefeextrakt-Konzentrat wurde im Folgenden für 48 h bei 50 °C getrocknet. Insgesamt konnten auf diese Weise 62 g pulverförmiges Hefeextrakt gewonnen werden [30].

4.1.3. Fraktionierung von Biertreber

Der Biertreber wurde direkt nach dem Brauprozess durch einen Pressschritt in eine flüssige Fraktion (Treberpresssaft) und eine feste Fraktion (Treberrückstand) aufgeteilt. Dazu kamen zwei unterschiedliche Pressen zum Einsatz, die in Abbildung 6 dargestellt sind: (a) Für Trebermengen < 1 kg wurde eine Tinkturenpresse (Hochdrucktinkturenpresse HP 2 H, Fischer Maschinenfabrik GmbH, Neuss, Deutschland) bei einem Druck von 200 bar betrieben. (b) Für größere Mengen kam eine Spindelpresse (ENOL OP 20, Wein GmbH, Bönningheim, Deutschland) zum Einsatz, die bei 4-5 bar betrieben wurde.

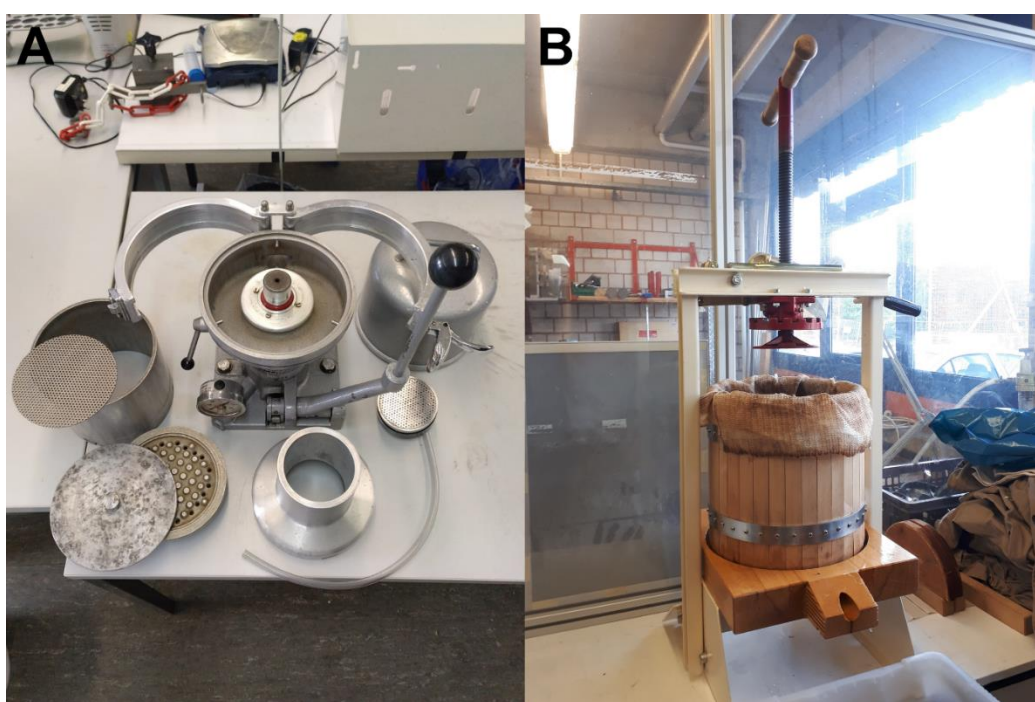


Abbildung 6: A) Tinkturenpresse B) Spindelpresse

Für die Nutzung des Treberrückstandes in Feststofffermentationen (Kapitel 4.7) und zu Analysezwecken (Kapitel 4.3) wurde der Treber insgesamt viermal abgepresst und nach jedem Pressschritt mit einem Volumen deionisierten Wassers, welches mit dem zuvor abgepressten Volumen identisch war, rückbefeuchtet, um alle löslichen Bestandteile zu entfernen. Der abgepresste Treber wurde im Anschluss für 48 h bei 50 °C getrocknet (UF110, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland), mit einer Scheibenmühle (Fidibus Classic, Komo GmbH & Co. KG, Hopfgarten, Deutschland) gemahlen, vakuumiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Im Gegensatz dazu wurde für den Einsatz in submersen Bioprozessen (Kapitel 4.5) nur die erste der abgepressten Fraktion (mit dem höchsten Nährstoffgehalt) genutzt. Um

Schwebstoffe abzutrennen, wurde der Treberpresssaft im Anschluss an den Pressvorgang für 20 min bei 4200 × g zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

Aufgrund des höheren Druckes konnten mit der Tinkturenpresse höhere Nährstoffkonzentrationen in der ersten Pressfraktion erzielt werden, wodurch diese Methode für Fermentationen genutzt wurde, bei denen eine hohe Substratkonzentration gewünscht war (wie z.B. in Kapitel 4.5.8 näher erläutert). Um den Anteil löslicher Zucker an der Trockensubstanz des Trebers zu bestimmen, spielte die Wahl der Presse jedoch keine Rolle, da eine Massenbilanz der enthaltenen Stoffe über alle erhaltenen Pressfraktionen ermittelt wurde.

4.2. HPLC-Analytik

In diesem Kapitel werden Analysemethoden für lösliche Substanzen, wie z.B. organische Säuren, Zucker(-polymere), Alkohole und Aminosäuren erläutert, die allesamt durch Flüssigchromatographie bestimmt wurden.

4.2.1. Analytik organischer Säuren

Organische Säuren wurden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) bestimmt. In das „Separation Modul“ mit integriertem Säulenthermostaten (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, USA) wurde zur Auftrennung des Analyten eine Säule mit einer polymeren Phase aus Polystyren-Divinylbenzen incl. integrierter Vorsäule eingebaut (Reprogel H+ 9 µm, 300 mm × 4,6 mm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland). Die Trennung erfolgte bei 55 °C mit 9 mM H₂SO₄ als Eluent und einem Fluss von 0,3 mL·min⁻¹. Zur Detektion der Säuren stand ein Fotodiodenarray-Detektor (PDA 2996, Waters Corp., Milford, USA) bereit; die Quantifizierung wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der zugehörigen Software (Empower 3, Waters Corp., Milford, USA).

4.2.2. Zucker- und Ethanolanalytik

Zucker- und Ethanolkonzentrationen wurden mittels eines modularen HPLC-Systems bestimmt. Die Anlage bestand aus einem 2-Kanal-Degaser (Duratec GmbH, Hockenheim, Deutschland), einer externen Pumpe (Merck Hitachi L 6200, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), einem Autosampler (Midas cool, Spark Holland B.V., Emmen, Niederlande) und einem Säulenthermostaten (Jetstream II plus, Duratec, Hockenheim, Deutschland). Die Instrumentensteuerung und Datenauswertung erfolgte mit einem separatem Softwaresystem (Clarity, Data Apex, Prag, Tschechien). Je nach Anwendung wurden zwei unterschiedliche Säulen zur Trennung des Analyten eingebaut: (a) Einerseits wurde eine Säule mit einer polymeren Phase aus 8 %-igem quervernetztem Resin (Rezex ROA-Organic Acid H+, 300 mm × 7,8 mm, Phenomenex Inc., Torrance, USA) verwendet. Die Säulentemperatur lag dabei bei 25 °C und als Eluent wurde 2,5 mM H₂SO₄ mit einem Fluss von 0,5 mL·min⁻¹ genutzt. Diese Säule kam insbesondere zum Einsatz, wenn Ethanol quantifiziert werden

musste und in der Probe andere, spät eluierende (Puffer-)Substanzen, wie z.B. MOPS-Puffer, vorhanden waren. Da die komplexe Probenmatrix häufig zu einer deutlichen Verringerung der Trennleistung führte, wurde die Säule nach jeder Messung gereinigt (Protokoll in Tabelle A 1). (b) Andererseits wurde eine Säule mit einer polymeren Phase aus Polystyren-Divinylbenzen (Repro-Gel Ca++ 9 µm, 300 mm × 8 mm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland) genutzt, wobei die Säulentemperatur 80 °C betrug. Als Eluent wurde Reinstwasser bei einem Fluss von 0,5 mL·min⁻¹ verwendet. In beiden Fällen wurde die „SecurityGuard“ Vorsäule (Carbo-H 4 mm x 3,0 mm ID, Phenomenex Inc., Torrance, USA) im Vorsäulenhalter (KJ0-4282, Phenomenex Inc., Torrance, USA) eingebaut. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Brechungsindexdetektor (RI 101, Shodex, Kawasaki, Japan).

4.2.3. Aminosäureanalytik

Aminosäurekonzentrationen wurden mit dem, in Kapitel 4.2.1 vorgestellten, „Separation-Modul“ per HPLC gemessen. Im Gegensatz zur Messung organischer Säuren, wurde allerdings eine Säule mit einer aliphatischen stationären Phase genutzt (C18 Säule, 150 mm × 3,9 mm, Waters Corp., Milford, USA). Die Trennung der Aminosäuren erfolgte bei 30 °C und unter Nutzung einer Gradiententrennung bei einem Fluss von 1 mL·min⁻¹. Alle nötigen Schritte zur Probenvorbereitung und die Zusammensetzung der Laufmittel werden in Tabelle A 2 näher erläutert. Zur Detektion der Aminosäuren war ein Fluoreszenzdetektor (Alliance 2475 multi λ fluorescence detector, Waters Corp., Milford, USA) bei Ex = 330 nm und Em = 420 nm verbaut.

4.3. Bestimmung der Bestandteile lignocellulosehaltiger Biomasse

In diesem Kapitel werden die Analysemethoden zur Bestimmung von lignocellulosehaltiger Biomasse erläutert – im Speziellen wird damit die Analytik des festen Treber-Rückstandes bezeichnet, welcher gemäß Kapitel 4.1.3 von allen anhaftenden, löslichen Substanzen befreit wurde. Sofern die Summe der untersuchten Komponenten unter 100% lag, wurde der verbleibende Anteil der Biomasse über eine Massenbilanz als „Sonstige Bestandteile“ definiert.

4.3.1. Bestimmung von strukturellen Kohlenhydraten, Lignin und Asche

Die Gehalte an Cellulose, Hemicellulose, Lignin (als Summe des säurelöslichen und säureunlöslichen Anteils) und der Aschegehalt wurden, wie vom National Renewable Energy Laboratory (NREL) beschrieben, bestimmt [174]: Die Cellulose- und Hemicellulose-Gehalte wurden durch saure Hydrolyse in druckdichten Reaktionsgefäßen mit einem Gesamt-Volumen von 100 mL (Pressure Plus, DWKLife Science GmbH, Mainz, Deutschland) und anschließende HPLC-Analytik (Kapitel 4.2.2) der monomeren Zucker bestimmt. Säureunlösliches Lignin und Asche wurden gravimetrisch bestimmt (Skala LA 214, VWR LLC, Radnor, USA), nachdem zuvor eine vierstündige Verbrennung bei 800 °C in

einem Muffelofen (Modell 301, Carbolite Gero Ltd, Sheffield, Großbritannien) erfolgt war. Der Anteil des säurelöslichen Lignins wurde mittels eines UV-Vis-Spektrometers (Cary 60, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei 210 nm ermittelt [175].

4.3.2. Bestimmung des Protein- und Lipidgehaltes

Der Stickstoffgehalt der lignocellulosehaltigen Biomasse wurde durch eine Elementaranalyse (vario Micro tube, Elementar Analysentechnik GmbH, Langenselbold, Deutschland) bestimmt.* Aus dem Stickstoffgehalt wurde mittels eines Konversionsfaktors von 5,7 der Proteingehalt berechnet [176]. Der Lipidgehalt wurde gravimetrisch ermittelt, nachdem 2 g bis 7,5 g getrockneter Treber in Soxhlet-Apparaturen (Normschliff Gerätebau GmbH, Wertheim, Deutschland), welche in Abbildung 7 dargestellt sind, für 4 h (~30 Zyklen) mit 200 mL Diethylether extrahiert wurden [177].†



Abbildung 7: Soxhlet-Apparaturen

4.3.3. Bestimmung des Heizwertes

Der Heizwert, genauer gesagt der Higher Heating Value (HHV), von Biertreber wurde aus der Elementarzusammensetzung des Trebers gemäß Gl. (1) berechnet [178]. Dabei

* Die Elementaranalyse wurde durch Ranja Saynisch (Chemie, AG Thiel, TUK) veranlasst.

† Die Lipid-Analyse des HE-Trebers wurde von Pascal Weingart (Chemie, AG Thiel, TUK) durchgeführt.

wurden die Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalte durch Elementaranalyse bestimmt (vgl. Kapitel 4.3.2) und der Sauerstoffgehalt mit $\chi_O = 34,37\%$ als konstant angenommen [64].

$$HHV = -1,3675 + 0,3137 \cdot \chi_C + 0,7009 \cdot \chi_H + 0,0318 \cdot \chi_O \quad \text{Gl. (1)}$$

4.4. Analytik der löslichen Fraktion lignocellulosehaltiger Biomasse

Im folgenden Kapitel werden die Analysemethoden für die löslichen, abpressbaren Bestandteile der lignocellulosehaltigen Biomasse beleuchtet, welche unter dem Begriff Treberpresssaft zusammengefasst werden. Alle flüssigen Proben wurden vor der Analyse für 10 min bei $16900 \times g$ zentrifugiert und durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von $0,22 \mu\text{m}$ (KX Syringe Filter Nylon, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) filtriert, um Feststoffpartikel abzutrennen.

4.4.1. Zuckanalytik der löslichen Fraktion

Die Bestimmung des Zuckergehaltes wurde analog zu den, in Kapitel 4.2.2 beschriebenen, Methoden durchgeführt. Im Treberpresssaft wurden neben Glucose, Maltose und Maltotriose auch längerkettige Maltooligomere identifiziert. Diese Maltooligomere wurden mit einem α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucosepolymer, bestehend aus sieben Monomeren (d.h. mit Maltoheptaose), quantifiziert, da die Retentionszeit vornehmlich Oligomere dieser Kettenlänge nahelegte.

4.4.2. Mineralien-Analytik

Natrium und Kalium wurden mittels Atomemissionsspektroskopie (AES), gemäß DIN 38406, gemessen. Für alle anderen Metallionen (außer Aluminium und Nickel) wurde die Atomadsorptionsspektroskopie (AAS) nach DIN 38406 bzw. DIN EN ISO 7980 verwendet. Sowohl für AES als auch für AAS wurde ein Atomadsorptionsspektrometer (contrAA®, Analytik Jena, Jena, Deutschland) genutzt. Als Brenngas wurde in beiden Fällen ein Gemisch aus Acetylen und Luft verwendet. Die Aluminium- und Nickelanalyse wurde nach DIN EN ISO 15586 mit einer Graphitrohreinheit durchgeführt. Dabei wurden eine Atomisierungstemperatur von $2400 \text{ }^\circ\text{C}$ und $0,1 \%$ -iges $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ als Matrix-Modifier eingesetzt. Ammonium wurde photometrisch, gemäß DIN 38406, bestimmt (Spectroquant Pharo 100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Die Anionen Chlorid, Sulfat und Nitrat wurden mittels Ionenchromatographie, gemäß DIN EN ISO 10304, analysiert (883 Basic IC plus, Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland). Phosphat wurde, wie in DIN EN ISO 6878 beschrieben, mit einem Spektralphotometer (DR 5000, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bestimmt*.

* Die Messungen wurden als Auftragsarbeit von Ruth Maria Bergsträßer (Chemie, AG Hartung, TUK) bzw. für Phosphat von Anette Knaus (Wasser Infrastruktur Ressourcen, TUK) durchgeführt.

4.4.3. Proteinbestimmung mittels Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode ermittelt [179]. Das Wort Protein wird in diesem Zusammenhang allerdings als Synonym für alle Peptide und Proteinfragmente verwendet, die beim Maischen im Brauprozess entstehen, daher im Treberpresssaft zu finden sind und über die Bradford-Methode bestimmt werden konnten [16].

4.5. Verwertung von Treberpresssaft mit *L. delbrueckii* subsp. *lactis*

Der Organismus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* wurde verwendet, um die Inhaltsstoffe des Treberpresssaftes zur Produktion von Milchsäure nutzbar zu machen. Dazu wurden zunächst Fermentationen mit verdünnten Presssäften im Kolben-Maßstab durchgeführt. Nach Optimierung der Nährstoffzugabe unter Zuhilfenahme statistischer Versuchsplanung, wurden die Fermentationen im Bioreaktor weiter optimiert und auf unverdünnte Presssäfte anderer Braugänge übertragen [30, 180].

4.5.1. Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen

Der Organismus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 20072 wurde von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die Zellen wurden in anaerobem MRS-Medium [181] mit der folgenden Zusammensetzung kultiviert [Angaben in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]: Glucose [20], Caseinpepton [10], Fleischextrakt [10], Hefeextrakt [5], Tween 80 [1], K_2HPO_4 [2], Na-Acetat [5], $(\text{NH}_4)_3\text{-Citrat}$ [2], $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ [0,2] und $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ [0,05]. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Der pH-Wert wurde dabei mit einem pH-Meter (Microprocessor pH Meter 211, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland) bestimmt.

Alle Medienkomponenten wurden in einem Autoklav sterilisiert (V-150, Systec GmbH, Linden, Deutschland), wobei Zucker und andere Medienbestandteile separat autoklaviert wurden. Direkt nach dem Sterilisationsprozess wurden die Kulturgefäße mit Septen verschlossen (Butylstopfen-massiv, Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden, Deutschland) und anaerobisiert, indem die Kulturflaschen für 2 h über eine Kanüle mit Stickstoff begast und gleichzeitig auf Eis abgekühlt wurden. Zur Überprüfung der anaeroben Bedingungen wurde der Sauerstoffindikator Resazurin in einer Konzentration von $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ zugesetzt. Sofern keine strikt anaeroben Bedingungen erzielt werden konnten, wurde das Reduktionsmittel Cystein-HCl in einer Konzentration von $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ eingesetzt, um den verbliebenen Sauerstoff in den Kulturgefäßen zu reduzieren.

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei einer Temperatur von $45\text{ }^\circ\text{C}$, einer Schüttlerfrequenz von 100 rpm und einem Hub von 25 mm in einem Schüttelinkubator (Ecotron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). In der exponentiellen Wachstumsphase wurden 0,75 mL der Zellsuspension geerntet und mit 0,75 mL 80 Vol.-% sterilen Glycerins versetzt. Direkt im Anschluss wurden die Cryo-Kulturen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und

bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Ultra Low Temperature Freezer, Haier Biomedical, Qingdao, China).

4.5.2. Der Seed-Train zur Anzucht von *L. delbrueckii* subsp. *lactis*

Für den Seed-Train wurde *L. delbrueckii* subsp. *lactis* in zwei Vorkulturen, bestehend aus anaerobem MRS-Medium, analog zu Kapitel 4.5.1, kultiviert. Die erste Vorkultur (VK1) bestand aus 50 mL MRS-Medium in einem 100 mL Gefäß (Pressure Plus, DWK Life Science GmbH, Mainz, Deutschland), welche durch die Zugabe einer Cryo-Kultur inokuliert wurde. Nach 24 h wurde die Zellsuspension verwendet, um die zweite Vorkultur (VK2), bestehend aus 300 mL anaeroben MRS-Mediums in einem 500 mL Gefäß (Pressure Plus, DWK Life Science GmbH, Mainz, Deutschland), anzupflanzen. Nach weiteren 16 h Kultivierungszeit wurde VK2 genutzt, um die Hauptkultur zu inokulieren. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension steril entnommen, für 10 min bei 4200 × g zentrifugiert, das Zellpellet in einem Aliquot des Hauptkulturmediums resuspendiert und die Hauptkultur schließlich auf $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ angeimpft.

4.5.3. Zusammensetzung des Hauptkulturmediums

Das Hauptkulturmedium bestand aus Treberpresssaft verschiedener Braugänge (vgl. Kapitel 4.1), wobei dem Medium die Nährstoffe des MRS-Mediums in beschriebener Konzentration (allerdings excl. Glucose) zugesetzt wurden [181]. Der Treberpresssaft wurde in zahlreichen Versuchen (HE- bzw. WeBo-Presssaft) auf eine Gesamtzuckerkonzentration von $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Summenparameter aus Glucose, Maltose und Maltotriose) verdünnt, um hinreichend viele Optimierungsversuche mit dem Treberpresssaft eines Braugangs durchführen und die Ergebnisse mit den Referenzfermentationen in MRS-Medium ($C_{\text{Gluc}} = 20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) vergleichen zu können. Vorhandene Maltooligomere wurden bei der Verdünnung jedoch nicht als Kohlenstoffquelle berücksichtigt, da der bakterielle Verbrauch dieser Polysaccharide sehr gering ausfiel.

4.5.4. Fermentationsparameter im Kolben-Maßstab und Bioreaktor

Die Hauptkulturen wurden sowohl im Kolbenmaßstab als auch im Bioreaktor kultiviert: (a) Im Falle des Kolbenmaßstabs wurden 100 mL des Hauptkulturmediums in einem 250 mL Gefäß (Pressure Plus, DWK Life Science GmbH, Mainz, Deutschland) bei ansonsten identischen Fermentationsparametern (vgl. Kapitel 4.5.1 und 4.5.2) verwendet. (b) Bei den Fermentationen im Reaktormaßstab, wurden Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1 L (RALF, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) genutzt, die in Abbildung 8 dargestellt sind. Um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten wurden die Bioreaktoren direkt nach dem Autoklavieren (vgl. Kapitel 4.5.1) mit einem Volumenstrom von $Q_{\text{N}_2} = 10\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ begast und die Begasungsrate über den kompletten Prozesszeitraum aufrechterhalten. Die Durchmischung erfolgte bei einer Rührerdrehzahl von 400 rpm durch eine Rushton-Turbine, die Temperatur wurde auf 45 °C eingestellt und der pH-Wert wurde automatisch auf pH = 6,0 durch die

Zugabe 5 M NaOH geregelt. Resazurin und Cystein-HCl wurden, wie in Kapitel 4.5.1 berichtet, eingesetzt.



Abbildung 8: RALF-Reaktorsysteme

4.5.5. Methoden zur Zellbestimmung

Das Wachstum der Bakterienzellen wurde in den submersen Treberpresssaftfermentationen über zwei Methoden bestimmt: (a) In allen Fermentationen wurden Trübungsmessungen zur Bestimmung der optischen Dichte durchgeführt. Die optische Dichte der Kulturbrühe wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem UV-Spektralphotometer (LAMBDA Bio+, Perkin Elmer Corp., Waltham, USA) bestimmt. (b) In zahlreichen Fermentationen wurde zudem die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt. Zur Bestimmung der BTM wurden 5 mL der Zellsuspension aus dem Kulturgefäß entnommen. Daraufhin wurde die Zellsuspension für 20 min bei $4200 \times g$ zentrifugiert und mit deionisiertem Wasser gewaschen, wobei dieser Vorgang dreimal wiederholt wurde. Das Zellpellet wurde schließlich in 400 μL deionisiertem Wasser aufgenommen und in ein HPLC-Vial pipettiert. Dann wurden die, in der Pipettenspitze verbliebenen, Zellen ebenfalls mit 400 μL deionisiertem Wasser in das HPLC-Vial überführt, für 48 h bei 50 °C getrocknet und gravimetrisch bestimmt.

4.5.6. Optimierung der Nährstoffzugabe mit statistischer Versuchsplanung

Um die Nährstoffzugabe zum Hauptkulturmedium (Kapitel 4.5.3) zu optimieren, wurde ein statistischer Versuchsplan mit der Software Visual XSel (CRGRAPH GbR, Starnberg, Deutschland) aufgestellt. Dabei sollte die Nährstoffzugabe minimiert werden, wobei die Bildung des Zielproduktes Milchsäure möglichst nicht verringert werden sollte. Folglich

wurden die neun Substanzen des MRS-Mediums (excl. Glucose) Caseinpepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Tween 80, K_2HPO_4 , Na-Acetat, $(NH_4)_3$ -Citrat, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ und $MnSO_4 \cdot H_2O$ als Einflussparameter festgelegt, wohingegen die finale Milchsäurekonzentration als (zu optimierender) Zielwert definiert wurde. Der Versuchsplan wurde kategoriell aufgesetzt, da die optimierten Konzentrationen aus dem MRS-Medium übernommen wurden [181]. Das kategorielle Grundgerüst (d.h. Komponente vorhanden vs. nicht-vorhanden) wurde in ein D-optimales Design eingebettet, weil die Vielzahl an notwendigen Experimenten andere Testpläne ausschloss [30]. Auf diese Weise wurden durch den Versuchsplan 52 Einzelexperimente vorgegeben.

Die Versuche wurden analog zu den, in den Kapiteln 4.5.1, 4.5.2 und 4.5.3 beschriebenen, Vorgehensweisen durchgeführt. Für alle Versuche des statistischen Versuchsplans wurden 50 mL WeBo-Treberpresssaft verwendet, welcher vorher gemäß Kapitel 4.5.3 auf eine Zuckerkonzentration von $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Summenparameter aus Maltotriose, Maltose und Glucose) verdünnt worden war. Die optische Dichte (Kapitel 4.5.5) und Milchsäurekonzentration (Kapitel 4.2.1) wurden zu Beginn der Fermentation sowie nach 24 h und 28 h gemessen. Durch die Messung der optischen Dichte konnte abgesichert werden, dass die stationäre Wachstumsphase beim Abbruch des Experiments bereits erreicht wurde. Der Mittelwert der beiden Milchsäure-Messungen nach 24 h bzw. 28 h wurde genutzt, um mittels Visual XSel eine multiple Regression durchzuführen, da die Werte keine großen Abweichungen aufwiesen. Dabei wurden lineare Wechselwirkungen zwischen den Einflussparametern, unter der Berücksichtigung von Parameter-zu-Parameter-Wechselwirkungen, angenommen. Nicht-signifikante Terme des Regressionsmodells wurden über die „autostepwise“-Funktion der Software anhand ihres p-values entfernt ($p > 0,05$).

4.5.7. Optimierungen mit verdünntem Weizenbock-Presssaft im Bioreaktor

Die Optimierung der Nährstoffzugabe, gemäß Kapitel 4.5.6, wurde durch weitere iterative Optimierungsschritte des Fermentationsprozesses ergänzt, um die kinetischen Daten der Fermentation zu verbessern. Positive Optimierungsversuche können am Beispiel von sieben Fermentationen aufgezeigt werden, welche in dieser Arbeit mit den römischen großen Ziffern (I) bis (VII) gekennzeichnet werden. Die Visualisierung der Optimierungsschritte kann zudem in Abbildung 9 eingesehen werden: Zu Vergleichszwecken wurden zwei Referenzfermentationen in biologischen Duplikaten durchgeführt. Der erste Referenzprozess (I) wurde mit MRS-Medium gemäß Literaturvorgaben durchgeführt [181]. Im zweiten Referenzprozess (II) wurden dem WeBo-Treberpresssaft alle neun MRS-Komponenten excl. Glucose in beschriebener Konzentration zugesetzt [181]. Die dritte Fermentation (III) enthielt MRS-Komponenten entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 5.2.2, d.h. Caseinpepton, Fleischextrakt und $(NH_4)_3$ -Citrat wurden nicht zugesetzt, um den

Prozess ökonomischer zu gestalten. In der darauffolgenden Fermentation (IV) wurde der Fermentationsbrühe zusätzlich 100 µL eines sterilfiltrierten α -1,4-Glucoamylase-Mixes (Attenuzyme® Core, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) zugesetzt, um oligomere Zucker zu dem bevorzugten Substrat Glucose abzubauen und somit die kinetischen Daten des Prozesses zu verbessern. Die Zugabe der MRS-Komponenten wurde dabei aus Fermentation (III) übernommen. Im einem weiteren Optimierungsschritt (V) wurde kommerzielles Hefeextrakt durch Hefeextrakt ersetzt, welches aus Brauhefe hergestellt wurde (vgl. Kapitel 4.1.2). Damit sollte eine Möglichkeit aufgezeigt werden, wie andere Nebenproduktströme des Braugangs in den entwickelten Prozess integriert werden können. Die Supplementation der Zusätze und der Enzymeinsatz wurden von Fermentation (IV) übernommen.

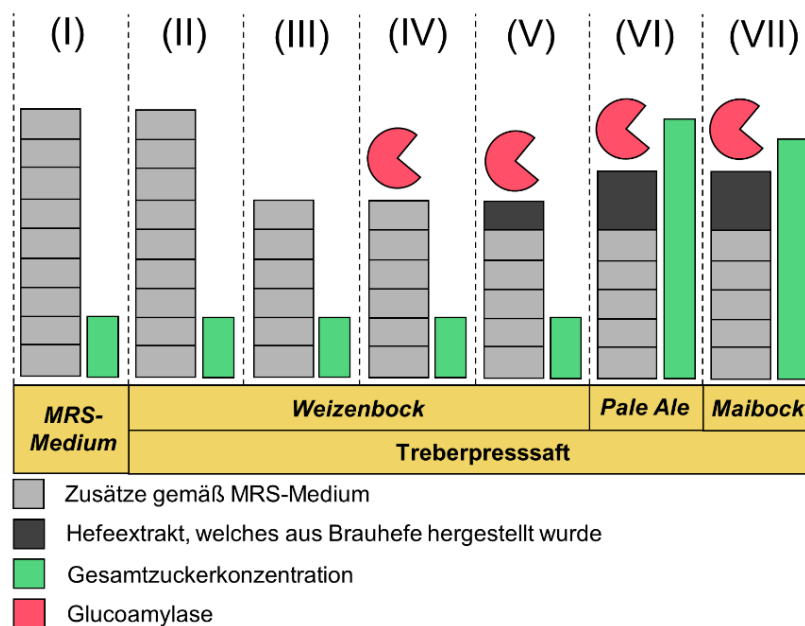


Abbildung 9: Optimierungsansätze der Fermentationen mit Treberpresssaft: (I) Referenzfermentation mit MRS-Medium, (II) Referenzfermentation mit verdünntem WeBo-Presssaft und voller Nährstoffsupplementation gemäß MRS-Medium, (III) Optimierte Nährstoffzugabe, (IV) Optimierte Nährstoffzugabe und Zusatz der Glucoamylase, (V) Einsatz von Hefeextrakt aus Brauhefe, (VI) Nutzung von unverdünntem PA-Presssaft, (VII) Nutzung von unverdünntem MB-Presssaft; WeBo, Weizenbock; PA, Pale Ale; MB, Maibock [30].

4.5.8. Fermentationen mit unverdünnten Pale Ale- bzw. Maibock-Presssäften

Um den finalen Titer der Milchsäure zu erhöhen und die Übertragbarkeit auf andere Presssaft-Zusammensetzungen zu überprüfen, wurden zudem zwei Prozesse mit Treberpresssäften anderer Braugänge durchgeführt, wobei die Presssäfte mit der Tinkturenpresse gewonnen wurden: Einerseits wurde ein PA-Presssaft (VI) und andererseits ein MB-Presssaft (VII) verwendet. Mit zwei Ausnahmen wurden diese Fermentationen analog zu Fermentation (V) durchgeführt: Zum einen wurden die Treberpresssäfte jedoch unverdünnt eingesetzt. Dadurch wurde eine Gesamtzuckerkonzentration (Summenparameter aus Maltooligomeren, Maltotriose, Maltose und Glucose) von $\sim 93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MB) bzw. $\sim 107 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (PA) erreicht. Zum anderen wurde die Hefeextrakt-Konzentration in

einer Weise erhöht, welche proportional zur Erhöhung der Gesamtzuckerkonzentration stand, sodass insgesamt $\sim 23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MB) bzw. $\sim 27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (PA) des Hefeextrakts eingesetzt wurden.

4.6. Kinetische Modellierung der Treberpresssaftfermentationen

Die empirische Untersuchung von Fermentationen mit Treberpresssäften unterschiedlicher Braurezepte gestaltete sich äußerst aufwendig. Daher wurde ein Modell entwickelt, welches die finale Milchsäure- und Zellkonzentration, aber auch die zugrunde liegenden Fermentationskinetiken, in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit eines Treberpresssaftes berechnen konnte [82].

4.6.1. Modellentwicklung

Die Entwicklung des kinetischen Modells wurde mit einem Mathematiksoftware-Paket (Berkeley Madonna 9.1.0., entwickelt von Robert Macey and George Oster, University of California at Berkeley, USA) durchgeführt. Die Integration der im Modell enthaltenen gewöhnlichen Differentialgleichungen 1. Ordnung erfolgte mit dem Runge-Kutta-Algorithmus 4. Ordnung (RK4) und die Integrationsschrittweite, für den Gesamtprozess von 28 h, wurde auf einen Wert von 0,02 h festgesetzt. Der Aufbau des Modells erfolgte dabei ausgehend von den empirischen Messwerten (bzgl. Zucker, Protein, Aminosäuren, Milchsäure und Zellbiomasse) der Fermentation mit MB-Presssaft (VII). Das Modellskript ist im Anhang dieser Arbeit, aufgrund der nötigen Dezimaltrennzeichen, in englischer Sprache hinterlegt (Kapitel D).

4.6.2. Validierung des Modells

Das entwickelte Modell wurde auf zwei weitere empirische Datensätze angewendet, nämlich auf die Fermentationen mit PA-Presssaft (VI) und WeBo-Presssaft. Da der Einsatz von selbst hergestelltem Hefeextrakt im Vergleich zu kommerziellem Hefeextrakt den Fermentationsprozess kaum beeinflusste (vgl. Kapitel 5.2.3), wurden im Falle des WeBo-Presssaftes die Mittelwerte aus den Fermentationen (IV) und (V) verwendet. Für die Initialisierung des Modells, d.h. die Festlegung der Startwerte für die numerische Integration, wurden empirisch-ermittelte Messwerte der jeweiligen Fermentationen (MB, PA oder WeBo) verwendet. Im Gegensatz zur Fermentation mit MB-Presssaft, wurden die Fermentationskinetiken der Validierungsfermentationen jedoch nur für Kohlenhydrate, Milchsäure und die Zellbiomasse experimentell bestimmt; die Aminosäure- und Proteinausstattung dieser Presssäfte wurde nur zu Beginn des Prozesses empirisch ermittelt.

4.6.3. Modellierung der enzymatischen Verzuckerung von Dextrin und der mikrobiellen Aufnahme von Zucker

Die schrittweise enzymatische Umsetzung von α -1,4-verknüpften Glucose-Oligomeren wurde unter der Annahme modelliert, dass Maltooligomere über die

Zwischenprodukte Maltotriose und Maltose zu Glucose umgesetzt werden (vgl. Abbildung 10). Für die enzymatischen Reaktionsschritte (R_1 bis R_3) wurden unidirektionale Reaktionen 1. Ordnung mit den Reaktionskonstanten k_i und den Substratkonzentrationen S_i , wie in Gl. (1) – (3) dargestellt, angenommen [182–184].

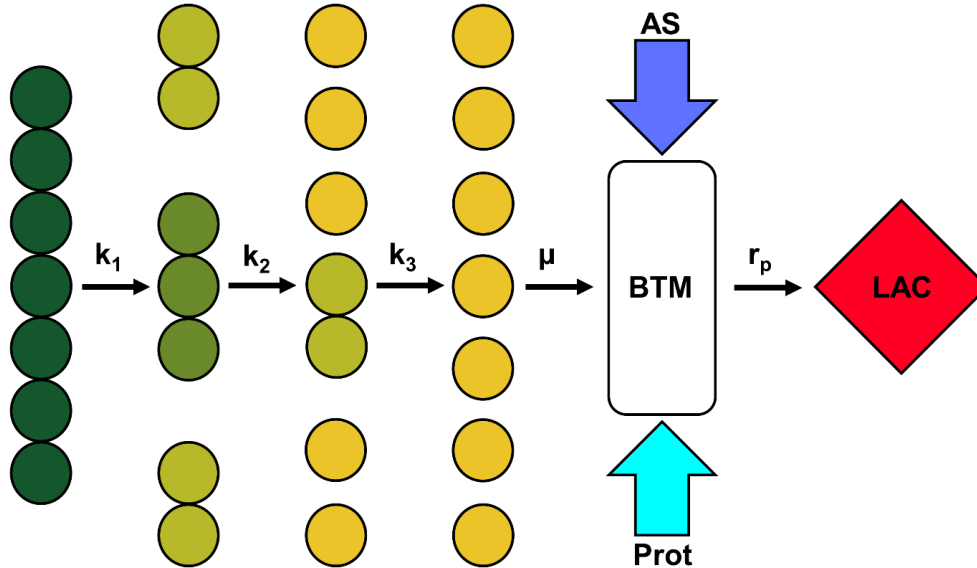


Abbildung 10: Visualisierung der Modellgleichungen: Zunächst erfolgt der enzymatische Abbau von Maltooligomeren (dunkelgrün) über die Zwischenprodukte Maltotriose (mittelgrün) und Maltose (hellgrün) zu Glucose (gelb). Glucose, Aminosäuren und Proteine werden vom Organismus zur Produktion von Milchsäure und zum Wachstum genutzt. Allen Umsätzen liegen Raten zugrunde, die oberhalb der Pfeile dargestellt sind; k_1 , k_2 , k_3 : Reaktionskonstanten der Kinetik 1. Ordnung; μ , bakterielle Wachstumsrate, r_p , Produkt-Bildungsrate; AS, Aminosäuren; Prot, Protein, LAC, Milchsäure; BTM, Biotrockenmasse [82].

$$R_1 = k_1 \cdot S_1 \quad \text{Gl. (1)}$$

$$R_2 = k_2 \cdot S_2 \quad \text{Gl. (2)}$$

$$R_3 = k_3 \cdot S_3 \quad \text{Gl. (3)}$$

Beim Abbau von polymeren Kohlenhydraten nimmt das Molekulargewicht, dank der zugrundeliegenden Hydrolysereaktion, zu. Dies führt zwangsläufig auch zu einer Erhöhung der Gesamt-Masse der zu betrachtenden Substrate im Laufe der enzymatischen Verzuckerung. Diesem Sachverhalt wurde Rechnung getragen, indem die Massenkorrekturfaktoren (S_{12} , S_{23} und S_{34}) als Quotient der Molekulargewichte zwischen hydrolysierten und oligomeren Form eingeführt wurden, wie aus den Gl. (4) – (6) ersichtlich wird.

$$S_{12} = \frac{M_{\text{Maltooligomere,hydrolysiert}}}{M_{\text{Maltooligomer}}} = \frac{1261,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}}{1153,00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}} \quad \text{Gl. (4)}$$

$$S_{23} = \frac{M_{\text{Maltotriose,hydrolysiert}}}{M_{\text{Maltotriose}}} = \frac{540,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}}{504,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}} \quad \text{Gl. (5)}$$

$$S_{34} = \frac{M_{\text{Maltose,hydrolysiert}}}{M_{\text{Maltose}}} = \frac{360,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}}{342,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}} \quad \text{Gl. (6)}$$

Die Massenbilanzen für die Kohlenhydrate (S_1 : Maltoligomere, S_2 : Maltotriose, S_3 : Maltose, S_4 : Glucose) ergaben sich durch Multiplikation dieser Massenkorrekturfaktoren mit den Gleichungen der zugehörigen enzymatischen Reaktionen R_i . Dabei wurde die Stöchiometrie der Teilreaktionen, gemäß Abbildung 10, berücksichtigt. Die Massenbilanz für Glucose enthielt zudem einen Term für den mikrobiellen Verbrauch von Glucose, welcher entsprechend der Gleichung für das exponentielle Wachstums in einem Batch-Reaktor implementiert wurde. Außerdem wurde in die Massenbilanz für Glucose ein Term für den Substratbedarf der wachstumsentkoppelten Milchsäurebildung eingeführt, der mit dem Parameter β multipliziert wurde, wie dies in der Literatur vorgeschlagen wird [185]. Die Massenbilanz für die Gesamtheit der Kohlenhydrate S_{Total} (Gl. (11)) ergab sich aus der Summe der einzelnen Massenbilanzen, gemäß Gl. (7) – (10).

$$\frac{d(S_1)}{dt} = -S_{12} \cdot R_1 \quad \text{Gl. (7)}$$

$$\frac{d(S_2)}{dt} = \frac{3}{7} \cdot S_{12} \cdot R_1 - S_{23} \cdot R_2 \quad \text{Gl. (8)}$$

$$\frac{d(S_3)}{dt} = \frac{4}{7} \cdot S_{12} \cdot R_1 + \frac{2}{3} \cdot S_{23} \cdot R_2 - S_{34} \cdot R_3 \quad \text{Gl. (9)}$$

$$\frac{d(S_4)}{dt} = \frac{1}{3} \cdot S_{23} \cdot R_2 + S_{34} \cdot R_3 - \frac{\mu}{Y_{X/S_4}} \cdot X - \beta \cdot \frac{S_4}{S_4 + K_{S_4}} \cdot X \quad \text{Gl. (10)}$$

$$\frac{d(S_{Total})}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/S_4}} \cdot X - \beta \cdot \frac{S_4}{S_4 + K_{S_4}} \cdot X \quad \text{Gl. (11)}$$

4.6.4. Die mathematische Beschreibung des Zellwachstums

Das Zellwachstum wurde anhand einer Differentialgleichung 1. Ordnung, gemäß den Vorgaben beim Wachstum in einen Batch-Prozess, in das Modell implementiert (Gl. (12)).

$$\frac{d(X)}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Gl. (12)}$$

4.6.5. Gleichungen für die mikrobielle Aufnahme stickstoffhaltiger Verbindungen

Das Modell umfasst Massenbilanzen für Protein sowie für die 16 Aminosäuren: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Arginin, Alanin, Tyrosin, Methionin, Valin, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Lysin. Die Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein sind für den Stoffwechsel von *Lactobacillen* von besonderer Bedeutung [186]. Cystein war jedoch mittels HPLC-Analytik (Kapitel 4.2.3) nicht bestimmbar, sodass die Massenbilanzen für Alanin und Serin separat betrachtet werden konnten, während die Konzentrationen der restlichen 14 Aminosäuren in einer Massenbilanz zusammengefasst wurden. Die Alaninaufnahme (Gl. (14)) wurde als unidirektionale Reaktion 1. Ordnung in das Modell implementiert. Die Massenbilanzen für Serin (Gl. (13)), die

verbliebenen 14 Aminosäuren (Gl. (15)) und die Proteine (Gl. (16)) entsprachen den Differentialgleichungen 1. Ordnung eines Batch-Prozesses.

$$\frac{d(Ser)}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/Ser}} \cdot X \quad \text{Gl. (13)}$$

$$\frac{d(Ala)}{dt} = -k_{Ala} \cdot Ala \quad \text{Gl. (14)}$$

$$\frac{d(AS_{Total})}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/AS_{Total}}} \cdot X \quad \text{Gl. (15)}$$

$$\frac{d(Prot)}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/Prot}} \cdot X \quad \text{Gl. (16)}$$

4.6.6. Die mathematische Beschreibung der Produktbildung

Der Term für die Produktbildung (Gl. (17)) wurde in zwei Teile aufgeteilt: Der erste Term spiegelte die wachstumsgekoppelte Milchsäureproduktion, entsprechend der Differentialgleichung 1. Ordnung eines Batch-Prozesses, wider. Der zweite Term entsprach der wachstumsentkoppelten Milchsäurebildung mit einer Monod-ähnlichen Erweiterung, wie dies in der Literatur vorgeschlagen wird [187].

$$\frac{d(P)}{dt} = \mu \cdot Y_{P/X} \cdot X + \frac{S_4}{S_4 + K_{S_4}} \cdot X \quad \text{Gl. (17)}$$

4.6.7. Die Gleichung für die Wachstumsrate des Organismus

Die Wachstumsrate (Gl. (18)) wurde durch eine klassische, Glucose-abhängige Monod-Kinetik beschrieben, die um zusätzliche Terme für Serin, Aminosäuren und Protein erweitert wurde. Außerdem wurden zwei hemmende Terme eingeführt, die einerseits die Zellbiomasse-Konzentration und andererseits die Milchsäurebildung betrafen. Der erste Term berücksichtigte, dass die Zellkonzentration nicht unendlich exponentiell ansteigt, sondern sich logistisch der Zellkonzentration X_m annähert, die im stationären Zustand der Fermentation maximal erreicht werden kann [185]. Der zweite Term spiegelte die Hemmung des Bakterienwachstums durch die entstehende Milchsäure (ab einer kritischen Milchsäurekonzentration P_m) wider, wie dies von Levenspiel vorgeschlagen wurde [188]. Die Exponenten f (stationäre Zellkonzentration) und h (hemmende Milchsäurekonzentration) variieren dabei jedoch in Abhängigkeit von der anfänglichen Substratkonzentration und wurden für eine vergleichbare Zuckerkonzentration aus der Literatur übernommen [185].

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S_4}{S_4 + K_{S_4}} \cdot \frac{Ser}{Ser + K_{Ser}} \cdot \frac{AS_{Total}}{AS_{Total} + K_{AS_{Total}}} \cdot \frac{Prot}{Prot + K_{Prot}} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^f \cdot \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^h \quad \text{Gl. (18)}$$

4.6.8. Grenzbedingungen des Modells

Die Konzentrationen von Maltotriose, Maltose und Glucose wurden als $\geq 0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ definiert. Da die Maltooligomere im Prozesszeitraum nicht komplett verbraucht wurden, wurden hierfür die empirisch ermittelten Werte am Ende der Fermentationen eingesetzt, d.h. $\geq 4,76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MB), $\geq 3,38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (PA) und $\geq 1,53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (WeBo).

4.6.9. Initialisierungsbedingungen des Modells

Modelle müssen in Berkeley Madonna initialisiert werden [189]. Bei den Initialisierungsbedingungen handelt es sich um die numerischen Werte, mit denen der erste Integrationsschritt ausgeführt wird. Im vorliegenden Modell handelte es sich hierbei um die Konzentrationen für Biotrockenmasse (X), die Substrate Maltooligomere (S_1), Maltotriose (S_2), Maltose (S_3), Glucose (S_4), Gesamt-Kohlenhydrate (S_{Total}), Alanin (Ala), Serin (Ser), Gesamt-Aminosäuren (AS_{Total}), Proteine (Prot) und das Produkt Milchsäure (P). Diese Werte wurden aus den empirischen Messwerten der zugrundeliegenden Fermentation übernommen und sind in Tabelle 4 dargestellt. Überdies werden in Tabelle 4 die benötigten Konstanten und Raten dargestellt, bei denen es sich um die folgenden Größen handelt: Einen Faktor für den Substratbedarf der wachstumsentkoppelten Produktbildung (β), die Reaktionskonstanten der unidirektionalen Reaktionen 1. Ordnung (k_i), die maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}), die Zellbiomasse/Substrat-Ausbeute bezogen auf Glucoseäquivalente (Y_{X/S_4}) und die Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute $Y_{P/X}$. Diese Konstanten und Raten wurden gemäß Kapitel 4.9.1 bestimmt.

Tabelle 4: (Teil 1) Initialisierungsbedingungen (d.h. Startkonzentrationen) sowie Raten & Konstanten für die Simulationen mit unverdünntem MB- bzw. PA-Presssaft und verdünntem WeBo-Presssaft; X, Biotrockenmasse; S_1 , Maltooligomere; S_2 , Maltotriose; S_3 , Maltose; S_4 , Glucose; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydrate bezogen auf Glucoseäquivalente; Ala, Alanin; Ser, Serin; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäuren; Prot, Protein; β , Faktor für den Substratbedarf der wachstumsentkoppelten Produktbildung; k_i , Reaktionskonstanten der unidirektionalen Reaktionen 1. Ordnung; μ_{max} , maximale spezifische Wachstumsrate; Y_{X/S_4} , Zellbiomasse/Substrat-Ausbeute bezogen auf Glucoseäquivalente; $Y_{P/X}$, Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute; MB, Maibock; PA, Pale Ale; WeBo, Weizenbock [82].

Parameter / Einheit	MB	PA	WeBo
X / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,129	0,179	0,118 ± 0,02
S_1 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	20,25	20,74	5,31 ± 0,14
S_2 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10,61	8,82	3,37 ± 1,68
S_3 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	41,31	49,56	11,9 ± 1,65
S_4 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	17,34	22,88	6,12 ± 3,02
S_{Total} / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	93,44	107,17	26,28 ± 3,98
Ala / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,141	0,037	0,038
Ser / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,338	0,091	0,088
AS_{Total} / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6,78	1,594	1,519
Prot / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,459	0,281	0,164
P / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,29	0,09	0,06 ± 0,03
β / $\text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0,9	0,9	0,9

Tabelle 4: (Teil 2) Initialisierungsbedingungen (d.h. Startkonzentrationen) sowie Raten & Konstanten für die Simulationen mit unverdünntem MB- bzw. PA-Presssaft und verdünntem WeBo-Presssaft; X, Biotrockenmasse; S₁, Maltooligomere; S₂, Maltotriose; S₃, Maltose; S₄, Glucose; S_{Total}, Gesamt-Kohlenhydrate bezogen auf Glucoseäquivalente; Ala, Alanin; Ser, Serin; AS_{Total}, Gesamt-Aminosäuren; Prot, Protein; β, Faktor für den Substratbedarf der wachstumsentkoppelten Produktbildung; k_i, Reaktionskonstanten der unidirektionalen Reaktionen 1. Ordnung; μ_{max}, maximale spezifische Wachstumsrate; Y_{X/S4}, Zellbiomasse/Substrat-Ausbeute bezogen auf Glucoseäquivalente; Y_{P/X}, Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute; MB, Maibock; PA, Pale Ale; WeBo, Weizenbock.

k_1 / h^{-1}	0,074	0,107	0,08 ± 0,01
k_2 / h^{-1}	4	4	4
k_3 / h^{-1}	0,289	0,282	0,315 ± 0,06
k_{Ala} / h^{-1}	0,472	0,472	0,472
μ_{max} / h^{-1}	0,46	0,49	0,43 ± 0,08
$Y_{X/S4} / g_{BTM} \cdot g_{Glucose}^{-1}$	0,083	0,05	0,085 ± 0,02
$Y_{P/X} / g_{Lac} \cdot g_{BTM}^{-1}$	8,865	8,68	9,34 ± 0,47

4.7. Verwertung des Treberückstandes mit *Cellulomonas uda*

Der Organismus *Cellulomonas uda* wurde verwendet, um den Treberfeststoff zur Umwandlung in die Produkte einer klassischen Gemischtsäuregärung zu nutzen – vornehmlich aber zur Herstellung von Essigsäure und Ethanol [190]. Zu diesem Zwecke wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien zunächst unter aeroben und anaeroben Bedingungen charakterisiert. Um die Fermentation weiter zu optimieren, wurden in einem folgenden Schritt 20 anaerobe Fermentationen durchgeführt, welche mit den römischen kleinen Ziffern (i) bis (xx) gekennzeichnet sind und in Abbildung 12 visualisiert werden.

4.7.1. Stammhaltung

Cellulomonas uda DSM 20108 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden unter aeroben Bedingungen in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 in einer Suspension mit 5 Gew.-% MB-Treber kultiviert. Nach viertägiger Inkubation wurden Aliquote der Suspension entnommen und mit einem gleichen Volumen sterilen 80 Vol.-% Glycerins vermischt. Die Cryo-Kulturen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.7.2. Aerobe und anaerobe Treberfermentationen im Kolbenmaßstab

Bei den Fermentationen im Kolbenmaßstab kamen sowohl aerobe als auch anaerobe Bedingungen zum Einsatz: Aerobe Fermentationen wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen (Erlenmeyer flask, Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland) durchgeführt, welche mit Baumwollstopfen verschlossen wurden. Für anaerobe Fermentationen wurden 250 mL Kolben (Schikanenkolben GL 45 Gewinde, DWK Life Sciences, Wertheim/ Main, Deutschland) verwendet. Beide Kulturgefäße sind in Abbildung 11 abgebildet.



Abbildung 11: Kulturgefäße für *C. uda* unter aeroben (Mitte) und anaeroben Bedingungen (links und rechts); Bild: Malte Nestriepke.

Die Sterilisation und Anaerobisierung des Kulturmediums wurden analog zu Kapitel 4.5.1 durchgeführt. Bei beiden Kultivierungsmethoden wurde 100 mL eines Mediums, bestehend aus 5 Gew.-% MB-Treber, 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4, verwendet. Nach Inokulation durch eine Cryo-Kultur (Kapitel 4.7.1), wurden die Kulturen bei einer Temperatur von 30 °C, einer Schüttlerfrequenz von 120 rpm und einem Hub von 25 mm im Schüttelinkubator kultiviert. Der pH-Wert wurde manuell alle 24 h angepasst. Das benötigte Volumen des Korrekturmittels ergab sich aus der, empirisch durch Titration ermittelten, Gl. (19).

$$V_{\text{NaOH}} = \frac{\text{pH}_{\text{Soll}} - \text{pH}_{\text{Ist}}}{47,85} \cdot V_{\text{Kultur,Ist}} \quad \text{Gl. (19)}$$

4.7.3. Fermentation im Mineral-Medium

Zu Vergleichszwecken wurde *C. uda* in einem Medium aus 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 in einem 250 mL Kolben (Schikanenkolben GL 45 Gewinde, DWK Life Sciences, Wertheim/ Main, Deutschland) kultiviert. Das Fermentationsmedium dieser Referenzfermentation (i) enthielt neben dem Puffer die folgenden Bestandteile [Angaben in g·L⁻¹]: Cellulose [10], NaCl [1,5], (NH₃)₂SO₄ [6,2], Na₂HPO₄ [9,1], KH₂PO₄ [0,9], EDTA [0,05], MgSO₄·7 H₂O [0,2], ZnSO₄·7 H₂O [0,008], FeSO₄·7 H₂O [0,02], MnSO₄·H₂O [0,015], CaCl₂·2 H₂O [0,026], Hefeextrakt [0,3], Biotin [0,001], Thiamin [0,001]. Die Vitamine wurden sterilfiltriert hinzugegeben (Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm steril, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) – die Sterilisation der restlichen Medienbestandteile erfolgte analog zu Kapitel 4.5.1. Die Zellen wurden zunächst für drei Tage aerob kultiviert, dann für 2 h über eine Kanüle mit Stickstoff begast, das Kulturgefäß mit einem Septum verschlossen und anaerob weiter kultiviert [146].

4.7.4. Optimierung der Fermentation im Kolbenmaßstab

Die anaeroben Fermentationen, welche in Kapitel 4.7.2 beschrieben wurden, wurden weitergehend optimiert, wodurch drei Ziele erreicht werden sollten: (a) Einerseits sollte die metabolische Reaktion des Organismus auf veränderte Kultivierungsbedingungen untersucht werden. (b) Des Weiteren sollten die finalen Produktkonzentrationen gesteigert werden und (c) nicht zuletzt sollten Strategien zur Unterdrückung der Nebenproduktbildung erprobt werden. Zu diesem Zwecke wurden zahlreiche Variationen, unter Anderem bezüglich Medien- und Kopfraumzusammensetzung, hydrothormaler, enzymatischer und extraktiver Vorbehandlung des Trebers sowie Feststoffbeladung des Trebers, getestet.

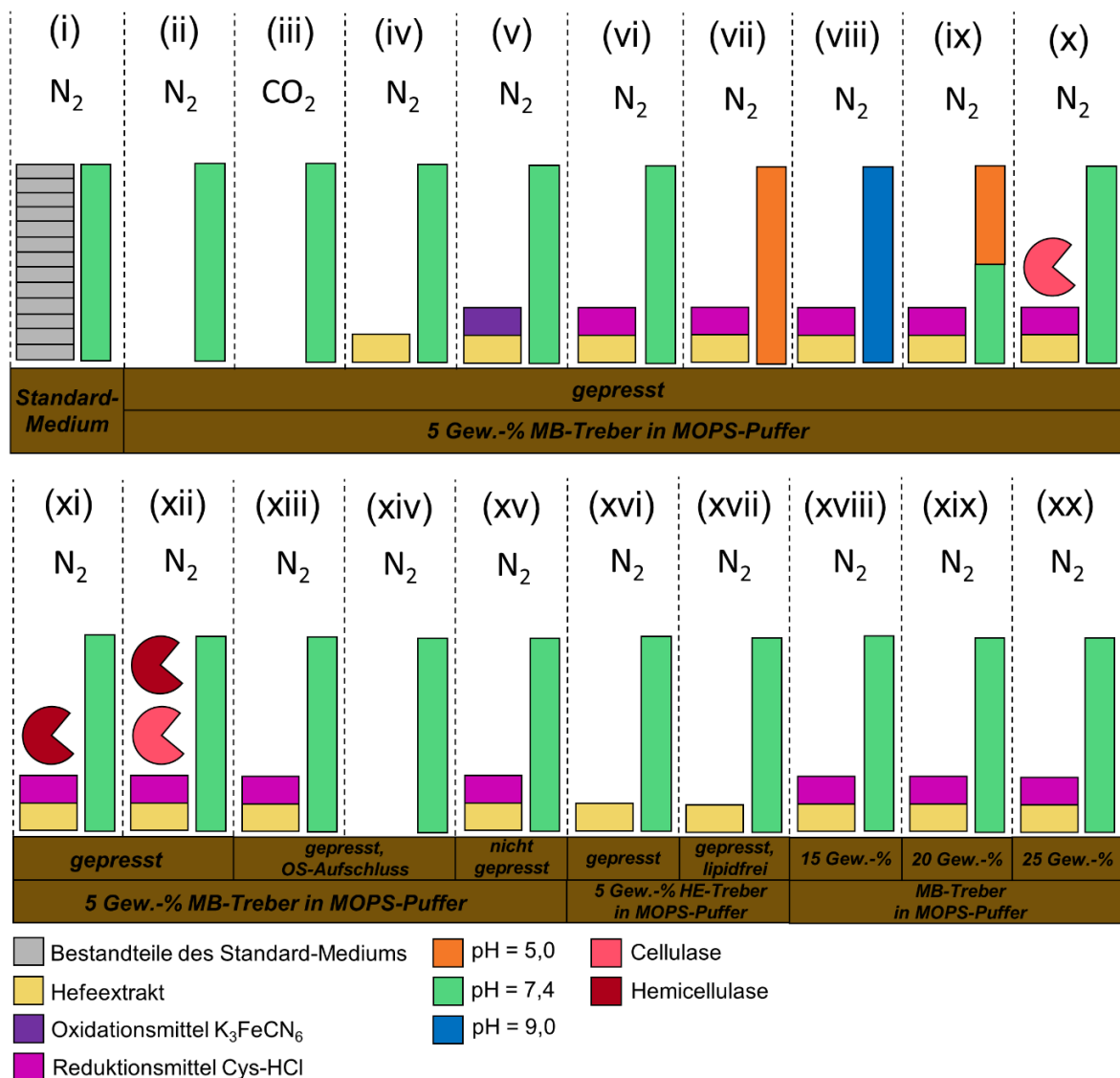


Abbildung 12: Optimierungsansätze der Fermentationen mit dem festen Treberrückstand: (i) Referenzfermentation mit Standard-Mineral-Medium, (ii) Referenzfermentation mit Treber, (iii) Einsatz von CO₂ im Kopfraum, (iv) Einsatz von Hefeextrakt, (v) Einsatz von Hefeextrakt und Oxidationsmittel, (vi) Einsatz von Hefeextrakt und Reduktionsmittel, (vii) pH = 5,0, (viii) pH = 9,0, (ix) Switch des pH-Wertes, (x) Einsatz eines technischen Cellulasemixes, (xi) Einsatz eines technischen Hemicellulasemixes, (xii) Einsatz eines Cellulase- und Hemicellulasemixes, (xiii) OS-Aufschluss + Zusatz von Hefeextrakt und Reduktionsmittel, (xiv) OS-Aufschluss, (xv) Verwendung nicht-gepressten MB-Treibers, (xvi) Nutzung von HE-Treber, (xvii) Nutzung lipidfreien HE-Treibers, (xviii) Fermentation mit 15 Gew.-% MB-Treber im Bioreaktor, (xix) Fermentation mit 20 Gew.-% MB-Treber im Kolbenmaßstab, (xx) Fermentation mit 25 Gew.-% MB-Treber im Kolbenmaßstab.

Neben der Kultivierung im cellulosehaltigen Standard-Mineral-Medium (i), wurde eine weitere Referenzfermentation mit Treber durchgeführt (ii). Diese Fermentation wurde mit einem Basis-Medium durchgeführt, welches aus 5 Gew.-% (gepresstem) MB-Treber in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 unter N₂-Atmosphäre bestand. Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellungen wurde dieses Medium folgendermaßen abgeändert: In der dritten Fermentation (iii) wurde CO₂ im Kopfraum anstelle des zuvor verwendeten N₂ eingesetzt. In weiterführenden Versuchsansätzen wurde zudem die Zugabe von Hefeextrakt (iv), Hefeextrakt + Oxidationsmittel K₃FeCN₆ (v) und Hefeextrakt + Reduktionsmittel Cys-HCl (vi) untersucht. Um den Einfluss des pH-Wertes zu beleuchten, wurden die Bedingungen aus Fermentation (vi) zudem bei verringertem pH = 5 (vii) und erhöhtem pH = 9 (viii) analysiert. Des Weiteren wurden die Effekte untersucht, die auftreten, wenn der pH-Wert während der Fermentation von anfänglich pH = 7,4 auf pH = 5,0 abgesenkt wird (ix), da sich von all diesen Variationen Auswirkungen auf den Zentralstoffwechsel und somit die Produktsekretion des Organismus erhofft wurden.

Um den mikrobiellen Abbau des Trebers zu unterstützen, kamen in Fermentation (x) kommerzielle Cellulasen zum Einsatz, in Fermentation (xi) wurden kommerzielle Hemicellulasen genutzt und in Fermentation (xii) wurde eine Kombination der beiden Enzymklassen eingesetzt. Beide Enzymmixturen (Cellulase: NS22192 bzw. Hemicellulase: NS22083, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) wurden in einer Konzentration von $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ zugegeben. In weiterführenden Versuchen sollte die bakterielle Treberdegradation erleichtert werden, indem der Treber vor der Fermentation einer Organosolv-Behandlung (OS) mit einem 50 Vol.-% Ethanol-Wasser-Gemisch bei T = 160 °C für 10 min in einem Hochdruck-Laborreaktor (BR 500, Berghof Products + Instruments GmbH, Eningen, Deutschland) unterzogen wurde. Hierbei wurden sowohl die Aufschlussparameter als auch die folgenden Prozessschritte zur Abtrennung von Ethanol und hydrothermalen Degradationsprodukten aus der Literatur übernommen [85]. Diese Fermentationen wurden einerseits unter Zusatz von Hefeextrakt + Cys-HCl (xiii) als auch mit dem Basis-Fermentationsmedium (xiv) durchgeführt. Des Weiteren wurde ermittelt, welche Effekte auftreten, wenn der Pressschritt zur Abtrennung der löslichen Treberbestandteile (wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben) nicht durchgeführt wurde, da dies für die holistische Nutzung von Biertreber im Rahmen eines Bioraffinerie-Konzeptes von Interesse war (xv). Schließlich wurden Experimente mit abgepresstem HE-Treber unter Einsatz von Hefeextrakt (xvi) bzw. unter identischen Bedingungen – jedoch mit lipid-extrahiertem HE-Treber (xvii) – durchgeführt. Mit diesen Experimenten sollten zwei Fragestellungen adressiert werden: Einerseits sollte untersucht werden, ob die Fermentation auf den Treber eines anderen Braugangs (mit anderer Zusammensetzung) übertragen werden konnte. Andererseits sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die ökonomisch interessante Lipidfraktion des

Trebers vor der Fermentation extraktiv entfernt werden konnte bzw. welche Auswirkungen dadurch auf die Fermentation entstehen würden. Schlussendlich wurde die Feststoffbeladung der Fermentationen erhöht, da hohe Substratbeladungen häufig in Zusammenhang mit hohen Produktkonzentrationen gebracht werden. Während eine Fermentation mit 15 Gew.-% MB-Treber (xviii) im Reaktor durchgeführt wurde (Erläuterungen im nachfolgenden Kapitel 4.7.5), wurden die Fermentationen mit 20 Gew.-% (xix) bzw. 25 Gew.-% MB-Treber (xx) – analog zu den bereits beschriebenen Versuchen – im Kolbenmaßstab durchgeführt.

Sofern dem Fermentationsmedium Zusätze supplementiert wurden, kamen in allen Versuchen, mit Ausnahme der Prozesse bei höheren Feststoffbeladungen, die gleichen Konzentrationen zum Einsatz: [Angaben $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]: Hefeextrakt [5], Cystein-HCl [1] und K_3FeCN_6 [0,329], wobei die Konzentrationen für die beiden letztgenannten Stoffe aus Literaturangaben übernommen wurden [180, 191]. In den Fermentationen mit erhöhten Feststoffbeladungen ((xix) und (xx)), wurde die Hefeextraktkonzentration proportional zum Treberanteil auf $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht. Alle Experimente wurden in unabhängigen biologischen Duplikaten durchgeführt, mit Ausnahme der Fermentationen mit OS-behandeltem Treber ((xiii) und (xiv)), die aufgrund von Rohstofflimitierungen als Einzelexperimente durchgeführt werden mussten sowie der Referenzfermentation (i), die ebenfalls als Einzelexperiment durchgeführt wurde. Um eine verlässliche Aussage über die Treberfermentationen vor der Optimierung zu erhalten, wurde die Referenzfermentation mit dem Basis-Fermentationsmedium (ii) in unabhängigen biologischen Quadruplikaten durchgeführt.

4.7.5. Fermentation im Bioreaktor

Die Fermentation mit einer Feststoffbeladung von 15 Gew.-% (xviii) wurde im Bioreaktor durchgeführt, da auf diese Weise Feststoffproben während des laufenden Betriebs genommen werden konnten. Um eine hohe Zellbiomassekonzentration sowie hohe Cellulase- und Xylanaseaktivitäten zu erzielen, wurde eine aerobe Vorkultur (100 mL) für fünf Tage in einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen, wie in Kapitel 4.7.2 beschrieben, kultiviert. Aliquote, bestehend aus jeweils 25 mL der Vorkultur, wurden zur Inokulation der Hauptkulturen genutzt, die bei einem Arbeitsvolumen von 350 mL in Bioreaktoren (Biostat Q Plus, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) kultiviert wurden, welche in Abbildung 13 zu sehen sind. Die Hauptkulturen bestanden aus 15 Gew.-% Treber, $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt und $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$. Der pH-Wert wurde durch die automatische Zugabe von 5 M NaOH mit einer Peristaltikpumpe gewährleistet. Die anaeroben Bedingungen wurden durch einen konstanten Stickstofffluss von $0,15\text{ NL}\cdot\text{min}^{-1}$ aufrechterhalten, das Abgas wurde über eine Kühlfalle geleitet und die Rührerdrehzahl wurde auf $N = 200\text{ rpm}$ eingestellt. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten durchgeführt. Durch die Erhöhung des Feststoffgehaltes von 5 Gew.-%

(Trebersuspension) auf 15 Gew.-% entstand ein breiförmiges Substrat, wodurch diese Fermentation die formale Definition einer Feststofffermentation erfüllte [192].



Abbildung 13: Biostat-Reaktorsystem

4.7.6. Aufklärung des Zentralstoffwechsels von *C. uda*

Da der Zentralstoffwechsel von *C. uda* bis dato noch nicht bekannt war, wurde er mittels bioinformatischer Methoden durch Genhomologien zu den verwandten Stämmen *Cellulomonas gilvus*, *Cellulomonas fimi* und *Cellulomonas flavigena* aufgeklärt. Dazu wurde das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verwendet, das online auf der Website des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Rockville Pike, USA) verfügbar ist. Die Sequenzidentität wurde einerseits für die kompletten Genome ermittelt und andererseits für annotierte Gene des Zentralstoffwechsels, die für die drei artverwandten Organismen in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-Datenbank (KEGG) vorhanden waren. Zur Aufklärung des Zentralstoffwechsels von *C. uda* wurde ein Nukleotid-Blast zwischen annotierten Genen von *C. gilvus* (CP002665.1), *C. fimi* (CP002666.1) und *C. flavigena* (NC_014151.1) und einer Shotgun-Sequenz von *C. uda* durchgeführt, die im NCBI verfügbar ist (NZ_BJLP00000000.1). Wurden signifikante Ähnlichkeiten festgestellt (in diesem Fall: $80,21\% < \text{Sequenzidentität} < 93,29\%$), wurde postuliert, dass die Enzyme der zugrundeliegenden annotierten Gene aus *C. gilvus*, *C. fimi* und/oder *C. flavigena* auch in *C. uda* vorhanden sein könnten.

4.7.7. Bestimmung der Zellzahl

Das Wachstum der Mikroorganismen in den Suspensions- bzw. Feststofffermentationen wurde über zwei Methoden ermittelt: (a) Einerseits wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem UV-Spektralphotometer bestimmt. Aufgrund der Feststoffpartikel wurde die Suspension davor stark verdünnt. Dazu

wurden 0,1 g der Zellsuspension mit 0,9 mL MOPS-Puffer gemischt. Diese „quasi“ 1:10-Verdünnung wurde weiter auf 1:100 verdünnt. Die Trübungsmessung erfolgte nachdem die Probe zunächst durchmischt und dann für 30 s vibrationsfrei gelagert wurde, da die Treberpartikel deutlich schneller sedimentierten als die Zellen. (b) Andererseits wurde die Zellzahl durch Auszählung einer Zählkammer (Neubauer improved 0,0025 mm², Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland) unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

Für eine Fermentation mit 5 Gew.-% Treber und 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt in aerobem MOPS-Puffer bei pH = 7,4 wurde eine Korrelation der beiden Methoden für zwei biologische Replikate aufgenommen. Diese Korrelation wurde auf alle, in dieser Arbeit gezeigten, Wachstumsverläufe der Suspensions- bzw. Feststofffermentationen übertragen.

4.7.8. Bildgebende Verfahren

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Lichtmikroskop Eclipse Ni mit einer DS-I 1 Kamera aufgenommen, die mit einem Wasserimmersionsobjektiv 40 × 0,65 ∞/0,17 WD 0,56 ausgestattet war (alle Komponenten von der Nikon Group, Tokio, Japan).

Des Weiteren kam die Methode der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) zum Einsatz. Dafür wurde 1 mL der Kulturbrühe mit 3 µL 5 mM grün-fluoreszierender Nukleinsäurefärbelösung (Syto 9, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Dunkeln und Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit 0,2 M MOPS-Puffer pH = 7,4 gewaschen. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (SP5 II, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit einem 63 × 0,9 Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen. Dabei kam ein Argonlaser bei 15% AOTF@15% Laserpower bei einer Anregungslaserlinie von 488 nm und einer Detektion zwischen 500 nm und 560 nm zum Einsatz. Die Bildgröße betrug 4096 px in x- und y-Richtung.*

4.7.9. 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Mit einem 2D-Fluoreszenzspektrometer (LS 55, Perkin Elmer Inc., Waltham, USA) wurden Fluorophore in der Fermentationsbrühe der Suspensions- bzw. Feststofffermentationen nachgewiesen. Dazu wurden 0,2 mL der Fermentationsbrühe in eine 96-Well-Platte (Black plate clear bottom with lid, Corning Inc., New York, USA) gegeben und bei Exzitationswellenlängen zwischen 200 nm und 600 nm mit einer Schrittweite von 10 nm angeregt. Das emittierte Licht wurde im Bereich zwischen 200 nm und 600 nm mit einer Schrittweite von 0,5 nm detektiert. Dabei wurde die „slit width“ sowohl für Exzitations- als auch für die Emissionsseite auf einen Wert von „sieben“ und der „gain“ auf „medium“

* Die Messungen wurden in Kooperation mit Jonas Chodorski (Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik) durchgeführt.

gesetzt. Einige der resultierenden Heatmaps, sowohl für aerobe als auch für anaerobe Fermentationen, sind in Abbildung A 1 zu finden. Zwei Emissionsmaxima im Bereich zwischen $\lambda_{\text{Ex}} = 210 \text{ nm} - 360 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 350 \text{ nm} - 480 \text{ nm}$ wurden Pyridoxin zugeordnet und ein Peak im Bereich zwischen $\lambda_{\text{Ex}} = 240 \text{ nm} - 310 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 300 \text{ nm} - 450 \text{ nm}$ wurde als Tryptophan identifiziert. Mittels eines Umrechnungsfaktors, der aus dem Tryptophangehalt von Gerstenprotein bestimmt wurde [41], konnte im Anschluss der Proteingehalt in der Fermentationsbrühe gemäß Gl. (20) ermittelt werden.

$$C_{\text{Treberprotein}} = \frac{1}{\chi_{\text{Trp/Gerstenprotein}}} \cdot C_{\text{Trp}} \quad \text{Gl. (20)}$$

Kalibrationen wurden mit reinem Tryptophan bzw. Pyridoxin in einem Bereich zwischen $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ und $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erstellt. Dabei wurde jeweils das Peakvolumen mit der Konzentration der zugrundeliegenden Substanzen korreliert. Quantitative Werte für Protein (Tryptophan) und Pyridoxin wurden immer aus den Subtraktionsspektren zwischen Fermentationsprobe und dem Spektrum des ursprünglichen Fermentationsmediums (vor der Inokulation) berechnet. Die Integration der Peakvolumina erfolgte mit einem Tool, welches von Malte Nestriepke im Rahmen seiner Bachelorarbeit entwickelt worden war [193].

4.7.10. Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von, durch *C. uda* exprimierten, Enzymen, wurde sowohl ein Cellulase- als auch ein Xylanase-Assay durchgeführt.

Als Grundlage zur Bestimmung der Cellulase-Aktivität diente ein Filter-Paper-Assay, wie von der NREL beschrieben [194]. Allerdings wurde der Assay an die Anforderungen des vorliegenden Prozesses auf die folgende Weise angepasst: (a) Anstelle von Citrat-Puffer wurde $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer $\text{pH} = 7,4$ genutzt. (b) 1 mL MOPS-Puffer, 1 mL Kulturbrühe und 6 cm^2 Filterpapier (Whatman grade 1, Whatman plc, Little Chalfont, Großbritannien) wurden bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1400 rpm für 240 min inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Zur Bestimmung der Xylanase-Aktivität wurde ein bereits bestehendes Protokoll an den vorliegenden Prozess angepasst [152]: (a) Anstelle von Phosphatpuffer wurde $0,05 \text{ M}$ Natriumcitratpuffer $\text{pH} = 5$ verwendet, um die $0,7 \text{ Gew.}\%$ Xylanlösung herzustellen. (b) 1 mL Xylanlösung und 1 mL der Kulturbrühe wurden für 90 min bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1400 rpm inkubiert.

Für beide Assays wurde die enzymatische Reaktion nach der Inkubationszeit durch Erhitzen der Probe für 10 min auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ abgestoppt. Die Konzentrationen der freigesetzten monomeren Zucker wurde gemäß Kapitel 4.2.2 bestimmt; die Enzymaktivität A ergab sich aus diesen Zuckerkonzentrationen analog zu Gl. (21).

$$A = \frac{(C_{\text{Zucker, Assay}} - 0,5 \cdot C_{\text{Zucker, Fermentation}}) \cdot V_{\text{Assay}}}{M_{\text{Zucker}} \cdot t_{\text{Assay}}} \cdot 16.67 \quad \text{Gl. (21)}$$

4.8. Übertragung der entwickelten Strategien auf Wiesenschnitt

Um die Übertragbarkeit der entwickelten Fermentationsstrategien auf eine weitere Biomasseart zu testen, wurde Wiesenschnitt – analog zu Biertreber – in eine feste und in eine flüssige Fraktion aufgeteilt (Kapitel 4.1.3). Anschließend wurden sowohl die submersen Fermentationen mit *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Kapitel 4.5) als auch die Suspensionsfermentation mit *C. uda* (Kapitel 4.7) in der beschriebenen Form untersucht. Dabei kam es zu geringfügigen Unterschieden in der Durchführung, welche im Folgenden genannt werden sollen.

4.8.1. Prozessschema

Zur Herstellung von Presssaft aus Wiesenschnitt wurde stets die Tinkturenpresse verwendet (vgl. Abbildung 6 A). Dabei wurden je ein Wiesenschnitt aus dem Frühjahr (F) und ein Wiesenschnitt aus dem Herbst (H) untersucht.

4.8.2. Analytik

Zur Analyse von organischen Säuren, Zuckern, Ethanol und Aminosäuren wurden die beschriebenen Analysemethoden verwendet (Kapitel 4.2). Im Wiesenschnittpresssaft befanden sich, im Gegensatz zum Treberpresssaft, jedoch keine α -1,4-verknüpften Abbauprodukte der Stärke. Stattdessen wurden die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose identifiziert und quantifiziert.

4.8.3. Fermentationen mit Wiesenschnittpresssaft

Im Gegensatz zu den Treberpresssaftfermentationen wurden die Fermentationen in biologischen Triplikaten im Biostat-Reaktorsystem (Abbildung 13) durchgeführt und nicht wie zuvor im RALF-Reaktorsystem (Abbildung 8). Außerdem wurde die zweite Vorkultur (VK2) nicht in MRS-Medium, sondern bereits in H-Presssaft kultiviert, um die Lag-Phase während der Hauptkultur möglichst kurz zu halten. Der weitere Zusatz von Nährstoffen (z.B. in der Form von Hefeextrakt oder Mineralien) war nicht notwendig.

4.8.4. Fermentationen mit abgepresstem Wiesenschnitt

Die, in Kapitel 4.7 beschriebenen, Fermentationsstrategien zur Nutzung des abgepressten Biertreibers konnten ohne Veränderungen auf Wiesenschnitt übertragen werden. Die Fermentationen wurden im Kolbenmaßstab in biologischen Duplikaten durchgeführt. Dabei wurden Fermentationen mit 5 Gew.-% bzw. 15 Gew.-% abgepresstem H-Wiesenschnitt, 5 bzw. 15 g·L⁻¹ Hefeextrakt und 1 g·L⁻¹ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 in unabhängigen biologischen Duplikaten durchgeführt.

4.9. Bestimmung bioverfahrenstechnischer Kenngrößen für die Prozesse

Die Bestimmung bioverfahrenstechnischer Kenngrößen (Ausbeuten, Raten, etc.) ist wichtig, sofern Prozesse miteinander verglichen werden und quantitative Aussagen getroffen werden sollen. Außerdem sind sie unerlässlich, sofern Modellierungsansätze verfolgt

werden. Zur Bestimmung dieser Größen wurden in den Submers- bzw. Suspensions- oder Feststofffermentationen unterschiedliche Strategien genutzt.

4.9.1. Bestimmung in den Submersfermentationen

Die Zellbiomasse/Substrat-Ausbeuten $Y_{X/S}$, $Y_{X/Ser}$, Y_{X/AS_Total} und $Y_{X/Prot}$ sowie die Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute $Y_{P/X}$ wurden empirisch durch lineare Regression oder einen Differenzenquotienten in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt, wobei gilt: $Y_{X/S} = Y_{S/X}^{-1}$, etc. Die Prozessausbeute $Y_{P/S}$ wurde durch einen Differenzenquotienten bestimmt. Sofern oligomere Zucker als Substrat verwendet wurden, wurde die Ausbeute in Bezug auf die Molekulargewichte in der hydrolysierten (d.h. monomeren) Form berechnet. Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} wurde durch Regression in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die Produktivität des Prozesses wurde durch einen Differenzenquotienten in den ersten 11 h (bei verdünnten Presssäften) bzw. 14 h oder 15 h (bei unverdünnten Presssäften) bestimmt. Zellbiomassenspezifische Substratverbrauchs- (q_s) und Produktbildungsraten (q_p) wurden gemäß Gl. (22) und Gl. (23) aus Wachstumsrate und Ausbeute berechnet [195].

$$q_s = \mu_{max} \cdot Y_{S/X} \quad \text{Gl. (22)}$$

$$q_p = \mu_{max} \cdot Y_{P/X} \quad \text{Gl. (23)}$$

4.9.2. Bestimmung in den Suspension- bzw. Feststofffermentationen

Die Bestimmung der Zell- und Produktausbeuten bezogen auf den Einsatz lignocellulosehaltiger Biomasse ($Y_{X/S}$ und $Y_{P/S}$) in Fermentationen mit festem Substrat ist nicht trivial, da die Bestimmung der Substratzusammensetzung gemäß Kapitel 4.3 die Veränderung der prozentualen Zusammensetzung des Rohstoffes darstellen kann, aber keine absoluten Aussagen über den Abbau des Substrates zulässt. Deshalb wurde der Abbau des Trebers (bzw. des Wiesenschnitts) und die resultierende Akkumulation von Zellen sowohl in einer aeroben als auch in einer anaeroben Fermentation bestimmt, welche analog zu Kapitel 4.7.2 in biologischen Duplikaten durchgeführt wurden. Allerdings wurden während der Fermentation keine Proben für analytische Zwecke genommen (um keinen Feststoff aus dem Kulturgefäß auszutragen). Lediglich der pH-Wert wurde alle 24 h (gemäß Kapitel 4.7.2) reguliert. Nach vierzehntägiger Inkubationszeit wurde die gesamte Fermentationsbrühe für 45 min bei 4200 x g zentrifugiert, was zu drei Phasen führte: (a) Die unterste Phase, welche die Treberpartikel (bzw. die Wiesenschnittpartikel) beinhaltete, (b) die mittlere Phase mit den Zellen und (c) die obere, flüssige Phase. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in ein separates, zuvor ausgewogenes, Gefäß überführt. Daraufhin wurde die unterste, Treber- bzw. Wiesenschnitt-haltige Phase mit deionisiertem Wasser gewaschen, wobei diese Prozedur insgesamt dreimal wiederholt wurde. Im

Anschluss wurde die Fraktion der Zellen sowie der lignocellulosehaltigen Biomasse für 48 h bei 50 °C getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Die „Konzentration“ der lignocellulosen Bestandteile konnte dann gemäß Gl. (24) bestimmt werden. Sofern es zu einer Überbestimmung der analysierten Komponenten kam, d.h. sofern die Summe aller Einzelkomponenten die 100%-Marke überschritt, wurden die Bestandteile auf 100% normiert und die sonstigen Bestandteile auf 0% gesetzt. Dies traf allerdings nur auf den Bischoff-Treber (B) mit 107%, den Weizentreber (W) mit 103% und den Herbst-Wiesenschnitt (H) mit 101% zu.*

$$c_{\text{Biomassebestandteil}} = c_{\text{Biomasse,0d}} \cdot \chi_{\text{Biomassebestandteil}} \cdot \frac{m_{\text{Biomasse,14d}}}{m_{\text{Biomasse,0d}}} \quad \text{Gl. (24)}$$

Auf diese Weise wurden ebenfalls die Zell- und Produktausbeuten gemäß Gl. (25) und Gl. (26) berechnet.

$$Y_{X/S} = \frac{m_{\text{Zellen,14d}} - m_{\text{Zellen,0d}}}{m_{\text{Biomasse,0d}} - m_{\text{Biomasse,14d}}} \quad \text{Gl. (25)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{m_{\text{Produkt,14d}} - m_{\text{Produkt,0d}}}{m_{\text{Biomasse,0d}} - m_{\text{Biomasse,14d}}} \quad \text{Gl. (26)}$$

Sofern Feststoffproben während einer Fermentation genommen und hinsichtlich der Zusammensetzung der lignocellulosehaltigen Biomasse untersucht wurden, wurde eine lineare Abnahme des Trebers im Zeitraum der Kultivierung angenommen.

* Die Analyse des He-, W- und B-Trebers erfolgte in Kooperation mit Jens Weiermüller (Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TUK).

5. Ergebnisse und Diskussion

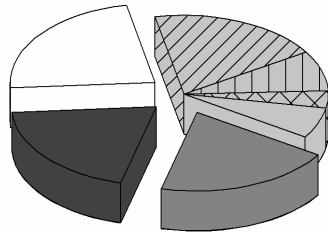
5.1. Rohstoffanalyse von Biertreber unterschiedlicher Braurezepturen

Sofern lignocellulosehaltige Biomasse, wie z.B. Biertreber, in bioverfahrenstechnischen Prozessen Anwendung finden soll, stellt die Inhomogenität des Rohstoffes aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden, Erntezeitpunkt, Geologie des Herkunftsorts oder Gewebetyp ein großes Problem dar [196]. Im Vergleich zu anderen Biomassearten wird die Inhomogenität des Rohstoffes im Falle von Biertreber zusätzlich erhöht, da im Brauprozess eine Mischung verschiedener gemälzter und nicht-gemälzter Getreidesorten eingesetzt wird (neben Gerste/ Weizen u.A. auch Hafer, Roggen und Dinkel), welche von Braurezeptur zu Braurezeptur stark variieren kann (vgl. Tabelle 3). Außerdem haben die Prozessschritte während des Brauens (z.B. Mälzen, Maischen und Läutern) einen weiteren signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung des Biertrebers. Da die Größenverteilung der Malzschüttung und somit des Biertrebers von sehr feinen Partikeln (Pudermehl) bis hin zu deutlich größeren Partikeln (Spelzen) reicht, kann selbst die Schichtung im Läuterbottich (oben/unten) die Analyse der Bestandteile beeinflussen [13, 16]. Deshalb soll in den folgenden Kapiteln eine detaillierte Analyse von sechs Biertrebern unterschiedlichster Braurezepturen aus eigener Herstellung und eines kommerziellen Biertrebers erfolgen [197–200].

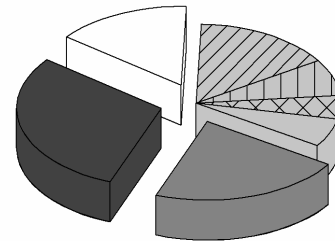
5.1.1. Die Trockenmassezusammensetzung des Biertrebers

Biertreber enthält in der festen Fraktion, d.h. nach Abtrennung des Treberpresssaftes (Kapitel 4.1.3) die Hauptbestandteile Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche sowie einen geringen Prozentsatz sonstiger, nicht genauer spezifizierter Bestandteile, wobei die Gesamtheit dieser Komponenten (d.h. die Trockenmasse des Trebers) nur etwa ein Viertel des Nasstreber-Gewichts ausmacht. Entsprechend wurde der Feuchtegehalt der sieben analysierten Biertreber in der vorliegenden Arbeit mit 75 – 80 Gew.-% bestimmt, was auch in der Literatur als gängiger Wert angegeben wird [16, 21, 27–29]. Werden diese festen Bestandteile der Trebertrockenmasse betrachtet (Abbildung 14), so wird ersichtlich, dass die Summe aus Cellulose, Hemicellulose und Protein bei den untersuchten Trebern bis zu 75,8% (W), mindestens jedoch 56,8% (WeBo) der Trockenmasse ausmachte. Insbesondere Cellulose und Hemicellulose sind hierbei von besonderer Bedeutung für bioverfahrenstechnische Prozesse, da es sich um Kohlenhydrate – und somit um prinzipiell mikrobiell verwertbare Kohlenstoffquellen – handelt. Einen weiteren wichtigen Bestandteil stellen die Proteine dar, da sie als Stickstoffquelle in biotechnologischen Prozessen dienen können.

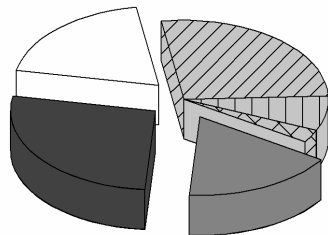
A) Pale Ale (PA)



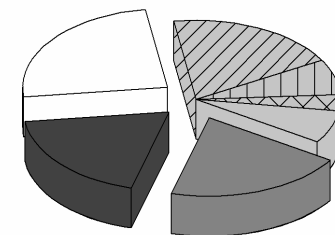
B) Helles (HE)



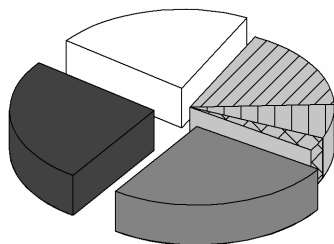
C) Bischoff (B)



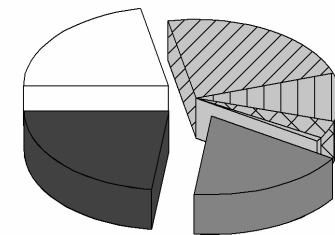
D) Kölsch (KÖ)



E) Weizen (W)



F) Maibock (MB)



G) Weizenbock (WeBo)

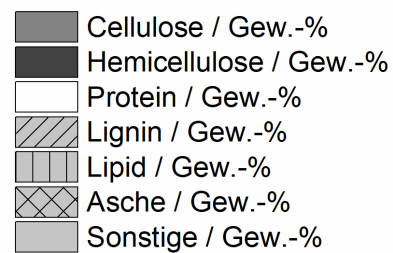
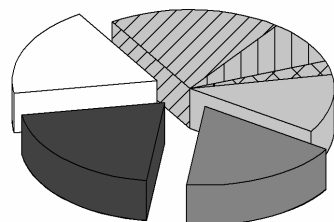


Abbildung 14: Prozentuale Zusammensetzung einiger Birtreber, nachdem die löslichen Bestandteile abgetrennt wurden. Gezeigt werden ausschließlich die festen Bestandteile des Trebers (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent.*

* Die Analyse des He-, W- und B-Trebers erfolgte in Kooperation mit Jens Weiermüller (Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TUK). Die Lipidanalytik des HE-Trebers wurde von Pascal Weingart (Chemie, AG Thiel, TUK) durchgeführt.

Die Zusammensetzung von Biertreber wurde in der Literatur häufig beschrieben, wobei 12% – 40% für Cellulose, 12,8% – 28,4% für Hemicellulose, 15,2% – 30% für Protein, 4% – 28% für Lignin, 5,8% – 18% für Lipid und 2,4% – 5% für die Aschefraktion angegeben werden [13, 21, 27, 38, 41]. Obwohl sich aus den Biertreber-Analysen in der Literatur, aufgrund der in Kapitel 5.1 genannten Gründe, kein einheitliches Bild ergibt, wird die Homogenität von Treber eines Braurezeptes aus einer gleichbleibenden Brauerei als recht groß beschrieben [201]. In der vorliegenden Arbeit wurden Biertreber aus sieben sehr unterschiedlichen Braurezepten untersucht – die Zusammensetzungen unterschieden sich zwischen den analysierten Trebern mit $20,2 \pm 3,0\%$ (Cellulose), $23,9 \pm 4,5\%$ (Hemicellulose), $21,0 \pm 3,2\%$ (Protein), $20,3 \pm 4,4\%$ (Lignin), $8,1 \pm 1,0\%$ (Lipid) und $3,4 \pm 0,7\%$ (Asche) allerdings geringfügiger, als dies aufgrund der (stark variierenden) Literaturwerte zu erwarten gewesen wäre.

Kurzzusammenfassung:

- Für bioverfahrenstechnische Anwendungen sind die Komponenten des Trebers Cellulose, Hemicellulose und Protein besonders relevant. Diese Komponenten machen mindestens 56,8% der festen Trockensubstanz aus.
- Die Zusammensetzung der sieben analysierten Biertreber aus unterschiedlichsten Braurezepten unterscheidet sich hinsichtlich der festen Bestandteile nur geringfügig.

5.1.2. Die Trockenmasse des Trebers unter Einbeziehung löslicher Anteile

Neben den festen Bestandteilen befinden sich am Biertreber auch zahlreiche lösliche Moleküle – der mit Abstand größte Anteil entfällt dabei auf Degradationsprodukte der Stärke, die in der Literatur wahlweise als (resistente) Stärke, (Malto-)Dextrin, Nicht-Cellulose-Polysaccharide oder Äquivalente reduzierender Zucker bezeichnet werden [31, 38, 41, 106, 202]. Allerdings wird in einigen Literaturstellen keine Unterscheidung zwischen α -1,4-verknüpften Stärkeabbauprodukten und β -1,4-verknüpfter Cellulose getroffen, sondern stattdessen nur von Glucan gesprochen [18, 92]. Möglicherweise findet sich hierin auch ein Grund für die sehr unterschiedlichen Cellulose-Literaturwerte, welche in Kapitel 5.1.1 berichtet wurden: Bei der Bestimmung des Cellulosegehalts in lignocellulosehaltiger Biomasse kommt zumeist (wie auch in dieser Arbeit) die Methode der „Sauren Totalhydrolyse“ zum Einsatz, bei welcher Cellulose gespalten und von den entstehenden Glucosemonomeren auf den ursprünglichen Cellulosegehalt geschlossen wird (Kapitel 4.3.1). Bei dieser Bestimmungsmethode werden allerdings auch Stärkederivate zu Glucose abgebaut, sofern sie nicht vorab entfernt wurden. Daher können sehr unterschiedliche Cellulose-Gehalte ermittelt werden, je nachdem wie effektiv die Entfernung dieser Stärkeabbauprodukte vor der Analyse war.

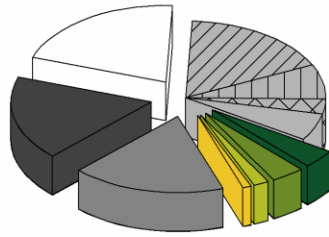
Werden die löslichen α -1,4-verknüpften Glucosepolymere separat bzgl. des Anteils an der Trockenmasse des Trebers berücksichtigt, ergibt die Zusammensetzungsanalyse ein deutlich heterogeneres Bild, als dies beim reinen Feststoff der Fall war: Bevor die Zucker

Glucose, Maltose, Maltotriose sowie die längerkettigen Maltooligomere gemäß Kapitel 4.1.3 durch Pressen entfernt wurden, machte diese Stoffklasse 10,6% (PA), 12,6% (HE), 13,4% (B), 14,0% (KÖ), 16,9% (W) bzw. 18,2% (MB) der ursprünglichen Trebertrockenmasse aus (Abbildung 15). Der Stärkeanteil von Biertreber wird in der Literatur mit 1,2% [88], 0,6% – 4,0% [38], 5% [68] und ~10% [203] beschrieben, wobei dieser Stärkeanteil nicht zwangsläufig mit der Gesamtheit der, in dieser Arbeit bestimmten, α -1,4-verknüpften Glucosepolymere gleichgesetzt werden kann, da unterschiedliche Bestimmungsmethoden zugrunde liegen. Die Summe aus anhaftenden Zuckern, Cellulose, Hemicellulose und Protein machte mindestens 66,6% (PA) und maximal sogar 77,8% (W) der Trockenmasse des Trebers aus. Wenigstens Zweidrittel der Trockensubstanz von nicht-prozessiertem Biertreber sind somit für bioverfahrenstechnische Anwendungen von großem Interesse. Natürlich befinden sich am Treber auch zahlreiche (Oligo-)Peptide und Aminosäuren. Da sie aber in geringeren Konzentrationen als die Zucker vorkamen, wurden sie für die gezeigten Massenbilanzen nicht berücksichtigt.

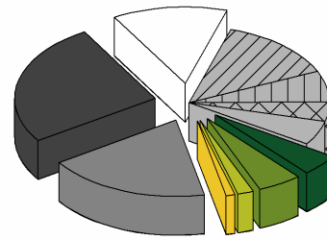
Im Falle des WeBo-Trebers ergab die Analyse, dass die löslichen Zucker bereits für 52,9% des Trockengewichts verantwortlich waren. Dieser hohe Wert war allerdings auf Probleme beim zugrundeliegenden Brauprozess (und nicht nur auf die Braurezeptur) zurückzuführen: Einerseits konnten die vorgegebenen Temperaturen im Maischeprozess nicht vorschriftsgemäß eingestellt werden, da die Temperatursteuerung immer wieder ausfiel, wodurch vermutlich nicht die gesamte Stärke zu Zucker abgebaut wurde. Andererseits war das Malz aufgrund des hohen Weizenanteils recht grob geschrotet worden, da das Perikarp von Weizenmalz eine sehr harte Schale ausbildet, was die Schroteffizienz negativ beeinflussen kann [204]. Sofern Malz sehr grob geschrotet ist, kann ein geringerer Prozentsatz der löslichen Zucker mit den Nachgüssen ausgewaschen werden, da das Auswaschen des Zuckers durch die geringfügig aufgebrochene Struktur des Kornes verhindert wird, was zu einem „erheblichen Extraktverlust“ führen kann [16].^{*} Einerseits war beim Weizenbockbier also weniger Zucker in der Rohwürze vorhanden und andererseits konnte dieser Zucker schlecht ausgewaschen werden. Daher war der hohe Stammwürzegehalt von 17,5 °Brix bereits bei einem geringen Nachgussvolumen von 25 L erreicht (vgl. Tabelle 3), was den schwerkraft-getriebenen und Läuervolumen-abhängigen Prozess des Aussüßens ebenfalls nicht positiv beeinflusste. Aufgrund dieser Unzulänglichkeiten im Brauprozess enthielt der WeBo-Treber eine große Menge anhaftenden Zuckers, welcher durch die Druckausübung bei der Fraktionierung des Biertrebers (Kapitel 4.1.3) aber dennoch in den Treberpresssaft überführt werden konnte.

* Um diesem Effekt zu begegnen, wurde der Weizenanteil in den übrigen Bieren zweimal geschrotet.

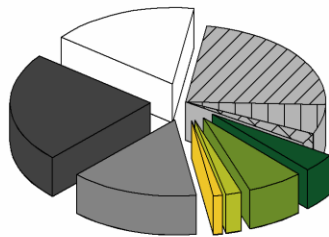
A) Pale Ale (PA)



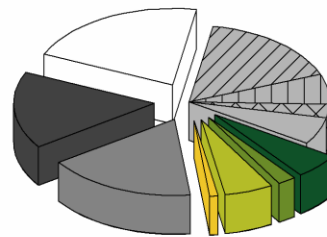
B) Helles (HE)



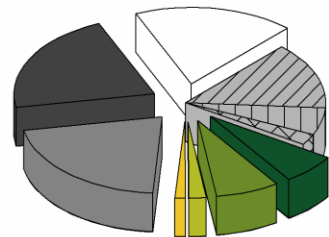
C) Bischoff (B)



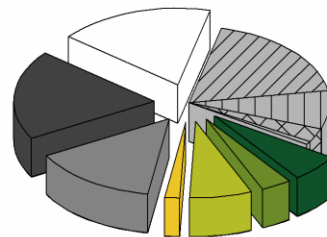
D) Kölsch (KÖ)



E) Weizen (W)



F) Maibock (MB)



G) Weizenbock (WeBo)

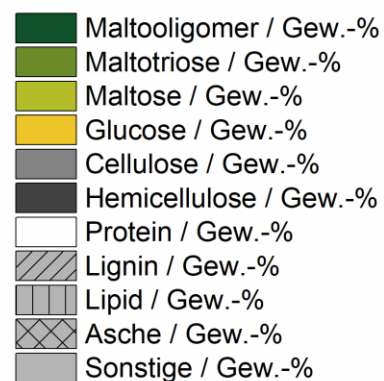
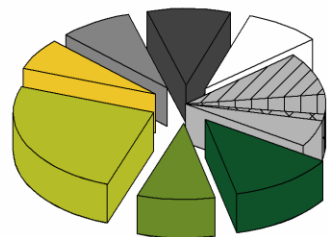


Abbildung 15: Prozentuale Zusammensetzung einiger Biertreber direkt nach dem Brauprozess, d.h. ohne vorherigen Pressschritt. Gezeigt werden die Bestandteile des Treberpresssaftes (Grün- und Gelbtöne) sowie die festen Bestandteile (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent.*

* Die Analyse des HE-, W- und B-Trebers erfolgte in Kooperation mit Jens Weiermüller (Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TUK). Die Lipid-Analyse des HE-Trebers wurde von Pascal Weingart (Chemie, AG Thiel, TUK) übernommen.

Was für den Brauprozess als ungünstig zu bewerten war, stellte sich somit für die bioverfahrenstechnischen Arbeiten als vorteilhaft heraus, da aufgrund der hohen Zuckerkonzentration im WeBo-Presssaft (näher beleuchtet in Kapitel 5.1.5) viele der Optimierungsschritte (vgl. Kapitel 5.2.2 & 5.2.3) mit dem Presssaft eines Batches durchgeführt werden konnten.

Kurzzusammenfassung:

- Direkt nach dem Läuterprozess enthält Biertreber lösliche α -1,4-verknüpfte Glucosepolymere verschiedener Kettenlängen (Zucker & Dextrin), die bei den sieben analysierten Biertrebern mindestens 10,6% der Trockensubstanz ausmachen.
- Die Summe aus löslichem Dextrin & Zucker sowie den festen Bestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Protein ist für mindestens 66,6% der Trockenmasse des Trebers verantwortlich.

5.1.3. Zusammenhang zwischen Braurezeptur & löslichen Treberbestandteilen

Wie in Kapitel 5.1.2 dargelegt, unterschied sich der Anteil der löslichen, anhaftenden Zucker an der Trockenmasse des Trebers mitunter deutlich. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob dieser Anteil bereits aus der Braurezeptur abgeschätzt werden könne. Folglich wurden einige Brauparameter bzgl. Malzschüttung, Flüssigkeitsvolumen und Stammwürzegehalt dem Gehalt löslicher Zucker des resultierenden Trebers gegenübergestellt, was in Abbildung 16 zu sehen ist.

Dabei ließen sich mehrere Tendenzen ablesen: (a) Wurde eine große Menge Malz eingesetzt, so enthielt der resultierende Treber einen hohen Anteil anhaftender Zucker, da insgesamt auch viel Stärke vorhanden war, die im Brauprozess zu Zuckern abgebaut werden konnte. Außerdem befand sich an Trebern, welche aus einer weizenreichen Malzschüttung stammten, tendenziell ein höherer Zuckeranteil als in Solchen, die nur Gerstenmalz enthielten. Dieser Unterschied war maßgeblich darauf zurückzuführen, dass Weizen mit ~78% einen höheren Stärkeanteil als Gerste mit ~54% aufweist [202]. Verstärkt wurde dieser Effekt vermutlich dadurch, dass die Stärkedegradation in Weizen im Vergleich zu Gerste erleichtert ist [205]. (b) Wurde ein geringes Flüssigkeitsvolumen (in Haupt- und Nachguss) eingesetzt, so waren die Zuckeranteile am Treber ebenfalls erhöht, da die Zucker während des Maischevorhangs in geringerem Maße verdünnt wurden (betrifft den Hauptguss) und entstandene Zucker im Läuterprozess zu geringeren Anteilen vom Treber abgewaschen wurden (betrifft den Nachguss). (c) Sofern der Stammwürzegehalt des Bieres hoch gewählt wurde, war auch mit einem hohen Zuckeranteil am Treber zu rechnen, wobei diese Größe eigentlich aus den vorher beschriebenen Effekten abgeleitet werden kann: Soll ein Bier mit hohem Alkohol- und daher Stammwürzegehalt gebraut werden, kann entweder der Zuckeranteil in der Würze erhöht werden (durch eine große Menge Malz bzw. einen hohen Stärkeanteil in der Rohfrucht) oder die Verdünnung der vorhandenen Zucker kann gering gehalten werden (durch den Einsatz geringer Wasservolumina). Beide Vorgehensweisen

werden für Biere mit hohem Stammwürzegehalt, wie z.B. bei Bockbieren, in der Praxis angewendet [16].

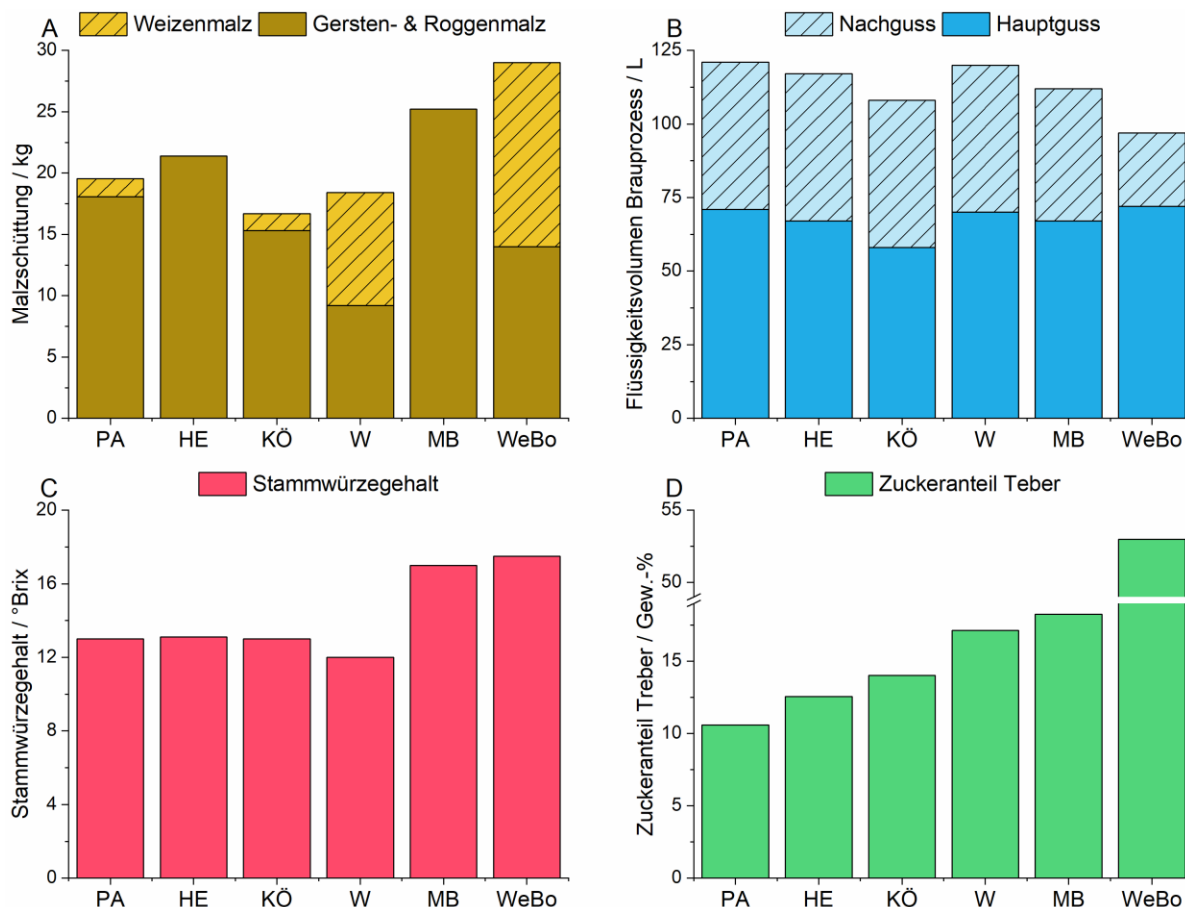


Abbildung 16: Auswirkungen der Braurezeptur in Bezug auf: **A)** Menge des verwendeten Malzes und Anteil von Weizenmalz, **B)** genutztes Flüssigkeitsvolumen unterteilt in Haupt- und Nachguss, **C)** Stammwürzegehalt des Bieres und **D)** daraus resultierender Anteil löslicher Zucker (Summenparameter aus Maltooligomeren, Maltotriose, Maltose und Glucose) an der Trockenmasse des Biertrebers; °Brix, Grad Brix; Gew.-%, Gewichtsprozent; PA, Pale Ale; HE, Helles; KÖ, Kölsch; W, Weizen; MB, Maibock; WeBo, Weizenbock.

Diese Überlegungen sollen im Folgenden an zwei Beispielen verdeutlicht werden: (a) Bei den Brauprozessen Pale Ale und Weizen waren die Malzmenge (W: 18,4 kg, PA: 19,5 kg) und das Flüssigkeitsvolumen (PA: 121 L, W: 120 L) ungefähr identisch – der Zuckergehalt des Trebers war aufgrund des höheren Weizenanteils (PA: 7,7%, W: 50%) beim W-Treber aber deutlich erhöht. (b) Die eingesetzten Flüssigkeitsvolumina in der Braurezepten Helles und Maibock (HE: 117 L, MB: 112 L) und der Weizenanteil (jeweils 0 kg) waren sehr ähnlich – der Zuckergehalt des Trebers war aufgrund der höheren Malzmenge (HE: 21,4 kg, MB: 25,2 kg) beim MB-Treber jedoch signifikant erhöht.

Kurzzusammenfassung:

- Die Menge und Zusammensetzung der Malzschüttung, das verwendete Flüssigkeitsvolumen im Brauprozess, und daraus resultierend der Stammwürzegehalt des Bieres, beeinflussen den Anteil anhaftender Zucker am Biertreber.

5.1.4. Einordnung des kommerziellen Bischoff-Trebers

Zum kommerziellen Bischoff-Treber konnten keine Informationen bzgl. des zugrundeliegenden Braurezeptes eingeholt werden. Da die Trockenmasse des B-Trebers aber zu 13,4% aus löslichen Zuckern bestand, und er sich damit in der Klassifizierung nach dem Anteil löslicher Zucker, zwischen dem HE- und dem KÖ-Treber eingruppierte (vgl. Abbildung 15), dürfte ihm ebenfalls ein (helles) Bier mit mäßigem Stammwürzegehalt zugrunde gelegen haben. In Frage kämen z.B. Biere der Richtung „Premium Pilsner“ oder „Pils“ – beide mit einem Stammwürzegehalt von 11 °Brix, ein „Export“ mit einem Stammwürzegehalt von 12 °Brix oder das „Pälzer Hell“ mit einem Stammwürzegehalt von 12,5 °Brix, welche sich zum Zeitpunkt der Arbeiten in der Produktpalette der Privatbrauerei Bischoff befanden [206]. Durch den Vergleich mit dem kommerziellen Treber konnte zudem bestätigt werden, dass auch der Läuterprozess im industriellen Maßstab nicht alle Degradationsprodukte aus dem Maischvorgang vom Treber abwäscht und der Treberpresssaft somit ein reales Phänomen darstellt.

Kurzzusammenfassung:

- Die Biertreber aus eigenen Brauprozessen sind bzgl. Zusammensetzung und Anteil des löslichen Dextrins vergleichbar mit einem kommerziellen Biertreber der Bischoff-Brauerei.

5.1.5. Analyse des Treberpresssaftes

Wie in den Kapiteln 5.1.2 und 5.1.3 erläutert, konnte gezeigt werden, dass nicht alle Zucker im schwerkraft-getriebenen Läuterprozess abgetrennt werden, sondern ein Teil davon am Treber verbleibt. Diese Zucker konnten durch einen mechanischen Pressschritt bei erhöhtem Druck vom Feststoff abgetrennt werden (vgl. Kapitel 4.1.3). Für den Einsatz in bioverfahrenstechnischen Prozessen sind jedoch auch die weiteren Bestandteile des Presssaftes von Interesse, sodass mehrere Treberpresssäfte hinsichtlich relevanter Stoffklassen untersucht wurden (Tabelle 5). Dabei zeigte sich, dass insbesondere die Wahl der Presse bzw. der Druck des Abpressens die Zusammensetzung der ersten Presssaftfraktion beeinflusste. Sofern die Tinkturenpresse bei einem Druck von 200 bar genutzt wurde (PA, MB), konnten bereits die meisten Nährstoffe in die erste Presssaftfraktion überführt werden, wohingegen die restlichen Fraktionen recht nährstoffarm waren. Sofern größere Trebermengen mit der Spindelpresse bei einem Druck zwischen 4 – 5 bar verarbeitet wurden (HE, W, WeBo), waren auch in den nachfolgenden Pressfraktionen noch höhere Nährstoffkonzentrationen zu finden. Nach maximal vier Pressschritten konnten aber auch in diesem Fall alle löslichen Nährstoffe vom Treberfeststoff entfernt werden, sodass die Massenbilanz über alle Pressfraktionen nicht beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Zur Zusammensetzung von Treberpresssäften gibt es sehr wenige, vor allem aktuelle, Publikationen. Da Treberpresssaft allerdings als eine, unter Druckausübung gewonnene,

letzte Läuterfraktion angesehen werden kann, ist auch ein Vergleich mit der Bierwürze zulässig.

Tabelle 5: Zusammensetzung der ersten Pressfraktion der Treberpresssäfte Pale Ale (PA), Helles (HE), Weizen (W), Maibock (MB) und Weizenbock (WeBo); n.g., nicht gemessen. Anmerkung: Für PA, HE und W wurde eine Spindelpresse genutzt, für PA und MB wurde eine Tinkturenpresse genutzt [30].

		PA	HE	W	MB	WeBo
pH-Wert		n.g.	5,98	5,13	n.g.	5,83
Zucker / g·L⁻¹						
	Maltooligomere	20,7	15,6	19,3	20,3	20,8
	Maltotriose	8,8	4,2	7,8	10,6	18,2
	Maltose	49,6	12,7	23,7	41,3	47,1
	Glucose	22,9	2,4	3,2	17,3	12,9
	Gesamt	107,2	37,2	57,6	93,4	104,6
Protein / mg·L⁻¹	Gesamt	281	50	233	451	662
Aminosäuren / mg·L⁻¹						
	Asparaginsäure	135,7	1,6	1,9	383,6	6,1
	Glutamin	212,1	2,5	4,7	899,8	10,6
	Serin	76,2	1,4	2,1	305,4	5,9
	Histidin	28,2	1,7	1,7	172,8	4,8
	Glycin	38,9	0,8	1,2	183,0	4,0
	Threonin	48,3	1,4	1,7	249,4	4,8
	Arginin	226,3	4,7	7,1	1240,2	21,3
	Alanin	65,9	2,0	2,3	132,9	5,9
	Tyrosin	25,4	2,9	2,0	348,5	7,1
	Methionin	137,3	0,7	1,2	0,0	3,3
	Valin	6,8	2,8	3,4	638,8	9,6
	Tryptophan	89,2	1,8	2,7	132,9	6,9
	Phenylalanin	0,0	3,3	4,1	423,9	10,7
	Isoleucin	70,5	1,6	2,2	385,2	6,2
	Leucin	131,9	3,7	4,9	720,7	14,2
	Lysin	43,9	3,1	3,4	301,8	10,4
	Gesamt	1336,7	36,0	46,4	6518,9	131,6
Kationen / mg·L⁻¹						
	Calcium	n.g.	19	38	n.g.	14
	Magnesium	n.g.	26	48	n.g.	63
	Natrium	n.g.	11	17	n.g.	25
	Kalium	n.g.	160	206	n.g.	450
	Zink	n.g.	0,22	1,2	n.g.	0,3
	Eisen	n.g.	0,05	0,06	n.g.	0,08
	Mangan	n.g.	0,36	0,19	n.g.	0,22
	Kupfer	n.g.	0,13	0,1	n.g.	0,1
	Nickel	n.g.	0,01	0,01	n.g.	0,01
	Aluminium	n.g.	0,23	0,5	n.g.	0,1
	Ammonium	n.g.	< 0,01	< 0,01	n.g.	0,02
Anionen / mg·L⁻¹						
	Chlorid	n.g.	24	42	n.g.	78
	Sulfat	n.g.	22	48	n.g.	99
	Nitrat	n.g.	5,5	11	n.g.	8,3
	Phosphat	n.g.	95	108	n.g.	228

Der Gesamtzuckeranteil der Treberpresssäfte unterschied sich in Abhängigkeit von Braurezept und eingesetzter Presse. Sofern die Spindelpresse genutzt wurde, lag der Gesamtzuckeranteil im Bereich zwischen $37,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (HE) und $104,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (WeBo). Der hohe Zuckeranteil beim WeBo-Treber war hier allerdings vor allem auf die Schwierigkeiten beim Maischen und Läutern (vgl. Kapitel 5.1.2) und weniger auf die verwendete Presse zurückzuführen. Wurde hingegen die Tinkturenpresse genutzt, so fielen die Gesamtzuckeranteile tendenziell höher aus als dies bei der Spindelpresse der Fall war. Beim MB-Treber war schon Braurezept-bedingt eine hohe Zuckerkonzentration erwartet worden, die mit einem Gesamtzuckeranteil von $93,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auch erzielt werden konnte. Beim PA-Treber gab das Braurezept keinen Anlass auf eine hohe Zuckerkonzentration im Treberpresssaft zu hoffen. Aufgrund des Pressens bei hohem Druck mit der Tinkturenpresse, wurde mit einem Gesamtzuckeranteil von $107,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aber dennoch ein sehr hoher Wert erreicht. In der Literatur wurde der Gesamtzuckeranteil der flüssigen Treberfraktion mit Werten von $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [104, 108], $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [111] bzw. $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [105], und damit deutlich niedriger als in der vorliegenden Arbeit, bestimmt. Dies kann mitunter auf zwei Aspekte zurückzuführen sein: (a) Einerseits wurde die flüssige Fraktion in einigen Arbeiten als Sickerwasser erhalten, d.h. ohne mechanische Druckausübung, wie sie z.B. beim Pressen auftritt. (b) Andererseits wurde der Zuckeranteil nicht mittels HPLC (vorliegende Arbeit) sondern als Äquivalent reduzierender Zucker ermittelt, wie es von Clark oder Nelson & Somogyi bereits Mitte des letzten Jahrhunderts beschrieben wurde [104–106]. Bei dieser Methode werden die Konzentrationen polymerer Zucker (z.B. zutreffend auf Maltose, Maltotriose und insbesondere auf die Maltooligomere) tendenziell zu gering bestimmt, da pro Molekül nur ein reduzierendes Ende vorliegt.

Der pH-Wert der flüssigen Treberfraktion wurde in der Literatur bereits mit 6,0 [111], 5,96 [105], 5,5 [108] bzw. 4,4 [104] angegeben. Bei den untersuchten Treberpresssäften wurde ein durchschnittlicher pH-Wert von $5,65 \pm 0,45$ ermittelt, sodass unabhängig vom Braurezept keine großen Unterschiede auftraten und sich die Werte im Bereich der genannten Literaturstellen wiederfanden.

Die Proteinkonzentrationen nach Bradford wurden in dieser Arbeit im Bereich zwischen $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (HE) und $662 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (WeBo) bestimmt. In der Literatur wurde der Kjeldahl-Stickstoffgehalt in Treberpresssäften mit $336 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [104] bzw. $434 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [105] angegeben, woraus sich mit einem Umrechnungsfaktor von 5,7 [176] eine Proteinkonzentration zwischen $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ergeben würde. Allerdings ist zu beachten, dass mit der Methode nach Kjeldahl weitere stickstoffhaltige Moleküle im Treberpresssaft, wie z.B. Anthocyanogene oder Polyphenole [16], mitbestimmt werden, was den ermittelten Wert fälschlicherweise erhöhen kann. Sofern der Proteingehalt nach Abtrennung der flüssigen Treberfraktion durch Ultra- oder Nanofiltration erfolgte, wurden mit

Proteingehalten zwischen $480 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und $560 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ aber auch Werte berichtet, die mit den hier ermittelten Werten in Einklang stehen, obwohl die Kjeldahl-Methode zur Anwendung kam [102]. Im Gegensatz zur Zuckerkonzentration, konnten für den Proteingehalt keine signifikanten Presse-spezifischen Unterschiede beobachtet werden. Allerdings schienen die Treberpresssäfte, denen eine weizenreiche Malzschüttung zugrunde lag (MB und WeBo), tendenziell eine höhere Proteinkonzentration zu beinhalten als solche, für die vornehmlich Gerstenmalz genutzt wurde. Dies war vermutlich auf den höheren Proteinanteil in Weizenmalz (11,5% – 12,5%) im Vergleich zu Gerstenmalz (9% – 11%) zurückzuführen [16].

Die Aminosäurezusammensetzung von Treberprotein ist bekannt [31, 41]. Zu ungebundenen, löslichen Aminosäuren, die am Treber anhaften und in Form des Treberpresssaftes gewonnen werden können, gibt es bisher aber keine Studien, wodurch nur Vergleiche mit der Bierwürze gezogen werden konnten. In der Bierwürze wird die Gesamt-Aminosäurenkonzentration, in der brauspezifischen Fachsprache auch freier Aminostickstoff (FAN) genannt, je nach Quelle mit Konzentrationen von rund $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [16] bis hin zu $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [207] angegeben. Im Falle der Treberpresssäfte, welche mit einer Spindelpresse hergestellt wurden (HE, W, WeBo), stimmten diese Literaturwerte mit den ermittelten Werten gut überein. Wie schon beim anhaftenden Zucker, konnten die Aminosäurekonzentrationen durch das Abpressen bei hohem Druck mit der Tinkturenpresse (PA, MB) jedoch auf Konzentrationen von bis zu $6,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MB) gesteigert werden.

Die Biertreberzusammensetzung wurde im Hinblick auf die enthaltenen Mineralien bereits in der Literatur beschrieben; so werden z.B. folgende Werte genannt: [Angaben in $\text{mg}\cdot\text{kg}_{\text{Treber}}^{-1}$]: Calcium [2200 – 3515], Magnesium [1900 – 2900], Natrium [50 – 309], Kalium [258 – 1000], Zink [82 – 178], Mangan [46], Kupfer [18] und Schwefel [1980 – 2900] [27, 31]. Die Spurenelementkonzentrationen in der Bierwürze sind für folgende Mineralstoffe bekannt [Angaben in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]: Calcium [23 – 60], Magnesium [80 – 100], Natrium [10 – 25], Kalium [500 – 550], Zink [0,1 – 0,25], Chlorid [100 – 200], Sulfat [40 – 200], Nitrat [10 – 50] und Phosphat [600 - 850] [16]. Bisher wurde in der Literatur jedoch nicht beschrieben, ob oder in welchem Ausmaß die Mineralien in den Treberpresssaft überführt werden können. Da die hier ermittelten Konzentration (Tabelle 5) aber in der Größenordnung der Bierwürze lagen, ist davon auszugehen, dass nur ein geringer Prozentsatz der Mineralien aus dem Treber entfernt werden kann und die meisten Mineralien sich auch nach dem Pressschritt in der Aschefraktion des Rückstandes befinden [30].

Kurzzusammenfassung:

- Treberpresssaft enthält mit Zucker, Proteinen, Aminosäuren und Mineralien zahlreiche Nährstoffe.
- Die Konzentration dieser Nährstoffe hängt (neben dem Braurezept) auch von der Art der Presse ab, die zur Gewinnung des Treberpresssaftes genutzt wird.

5.2. Fermentationen mit Treberpresssaft

Wie in Kapitel 5.1.5 dargestellt, handelt es sich bei Treberpresssaft um ein Nährmedium, welches sowohl Kohlenhydrate (C-Quelle), Proteine und Aminosäuren (N-Quellen), sowie eine ganze Bandbreite an Spurenelementen und Mineralien zur Verfügung stellen kann. Daher wurde ein Prozess entwickelt, der die vielversprechenden Inhaltsstoffe in einen Bioprozess inkludierte, mit welchem Milchsäure mittels des Organismus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* produziert werden konnte [30, 180, 197–200].

5.2.1. Fermentationen im Schüttelkolben mit Helles-Presssaft

Zunächst wurden Versuche mit verdünntem HE-Presssaft im Kolbenmaßstab, d.h. ohne pH-Regulation, aber unter Supplementation der Medienbestandteile des MRS-Mediums excl. Glucose durchgeführt (vgl. Kapitel 4.5). Die erzielten Fermentationsverläufe sind in Abbildung 17 zu sehen, wohingegen die berechneten kinetischen Daten in Tabelle A 3 gezeigt werden. In dieser Tabelle wird auch ein Vergleich hinsichtlich prozessrelevanter kinetischer Parameter zu einer Referenzfermentationen mit MRS-Medium bzw. HE-Presssaft ohne weitere Zusätze gezogen.

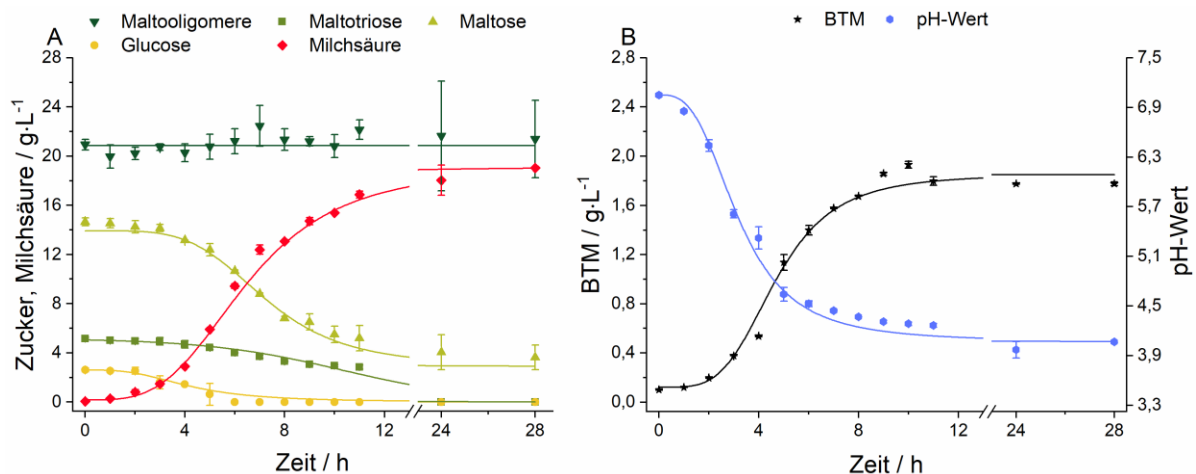


Abbildung 17: Fermentation im Kolbenmaßstab mit verdünntem HE-Presssaft und dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bei einer Temperatur von 45 °C und einer Schüttelfrequenz von 100 rpm: **A)** Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose-, Glucose- und Milchsäure-Konzentration, **B)** BTM und pH-Wert. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten. Die Datenpunkte für Maltotriose, Maltose, Glucose, Milchsäure, BTM und den pH-Wert wurden durch sigmoidale Fits angenähert; für die Maltooligomere wurde ein linearer Fit verwendet; BTM, Biotrockenmasse [180].

Während der Fermentation mit supplementiertem HE-Presssaft wurden die Zucker Glucose, Maltose und Maltotriose zu Milchsäure umgesetzt, wohingegen die Maltooligomere kaum als Substrat genutzt wurden (Abbildung 17 A). Die Produkt/Substrat-Ausbeute wurde mit $Y_{P/S} = 0,93 \pm 0,09 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ berechnet und war damit im Vergleich zum Referenzprozess mit MRS-Medium ($Y_{P/S} = 0,59 \pm 0,1 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$) deutlich erhöht. Während sich die Wachstumsraten des Organismus mit $\mu_{\text{max}} = 0,57 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ für Treberpresssaft und $\mu_{\text{max}} = 0,63 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ für MRS-Medium in einer ähnlichen Größenordnung befanden, lag die finale Milchsäurekonzentration mit $19,05 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{L}^{-1}$ (Treberpresssaft) zu

$13,36 \pm 1,41 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{L}^{-1}$ (MRS-Medium) wiederum deutlich höher. In pH-unregulierten Kulturen von *Lactobacillus delbrueckii* mit MRS-Medium ($c_{\text{Gluc}} = 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) werden in der Literatur Wachstumsraten von $\mu = 0,35 - 0,51 \text{ h}^{-1}$ und Ausbeuten von $Y_{\text{P/S}} = 0,35 - 0,9 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ berichtet [135, 137], sodass die durchgeführten Fermentationen hinsichtlich dieser Größen durchaus mit den Literaturwerten konkurrieren können.

Die besseren kinetischen Daten der Fermentation mit Treberpresssaft im Vergleich zum MRS-Medium waren auf zwei Aspekte zurückzuführen: (a) Der Treberpresssaft stellt zahlreiche Aminosäuren und Proteine zur Verfügung, die vielfach essentiell für den Stoffwechsel von *Lactobacillen* sind [208]. b) Überdies sind im Treber und daher vermutlich auch im Treberpresssaft Vitamine, wie z.B. Biotin, Cholin, Folinsäure, Niacin, Panthothensäure, Riboflavin, Thiamin und Pyridoxin, vorhanden, welche das Wachstum der *Lactobacillen* ebenfalls positiv beeinflussen können [16, 27, 30, 31]. Allerdings muss auch darauf hingewiesen werden, dass in HE-Presssaft ohne weitere Zusätze (trotz der genannten Nährstoffe) kein Wachstum möglich war (Tabelle A 3). Eine weitere Verbesserung der Fermentationsdaten, z.B. durch noch höhere Milchsäuretitere, wurde wohl einerseits durch den (nahezu) vollständigen Verbrauch von Glucose, Maltose und Maltotriose und andererseits durch den (Milchsäure-bedingten) pH-Sturz verhindert (Abbildung 17 B), da niedrige pH-Werte ($\text{pH} < 4,2 - 4,3$) häufig als inhibierend für *Lactobacillen* beschrieben werden [74, 209, 210].

Somit konnte gezeigt werden, dass die Glucose des MRS-Mediums durch die Kohlenhydrate des Treberpresssaftes ersetzt werden kann und die Kinetik des Prozesses durch enthaltene Spurenelemente, Vitamine, Aminosäuren und Proteine sogar verbessert wird. Allerdings mussten dem Presssaft immer noch neun Bestandteile gemäß Kapitel 4.5.1 supplementiert werden. Um die ökonomische Bilanz des Prozesses zu verbessern, ergab sich daher die Notwendigkeit die Nährstoffsupplementation zum Treberpresssaft zu verringern [180].

Kurzzusammenfassung:

- Eine Fermentation mit Nährstoff-supplementiertem Helles-Treberpresssaft liefert vergleichbare Wachstumsraten, aber höhere Milchsäuretitere und Ausbeuten als eine Referenzfermentation mit Glucose-haltigem MRS-Medium.
- Die guten kinetischen Daten der Fermentation mit supplementiertem Treberpresssaft sind auf die Aminosäure-, Spurenelement- und Vitaminbereitstellung durch den Treberpresssaft zurückzuführen.

5.2.2. Strategien zur Reduktion des Nährstoffzusatzes

Da 68% der Produktionskosten für Milchsäure auf die Kosten für die Rohstoffe zurückzuführen sind [211], und dem Treberpresssaft zahlreiche Komponenten zugesetzt werden mussten, wurde ein statistischer Versuchsplan aufgesetzt, um die Notwendigkeit der einzelnen Komponenten zu evaluieren (vgl. Kapitel 4.5.6). Die Optimierung der

Supplementzugabe zum Fermentationsmedium soll im Folgenden anhand der Effektstärke der einzelnen Komponenten (Abbildung 18) erläutert werden. Darüber hinaus soll durch einen Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Werten (Abbildung 19 A) sowie anhand der Verteilungsfunktion der Modellresiduen (Abbildung 19 B) die Güte des Modells geklärt werden.

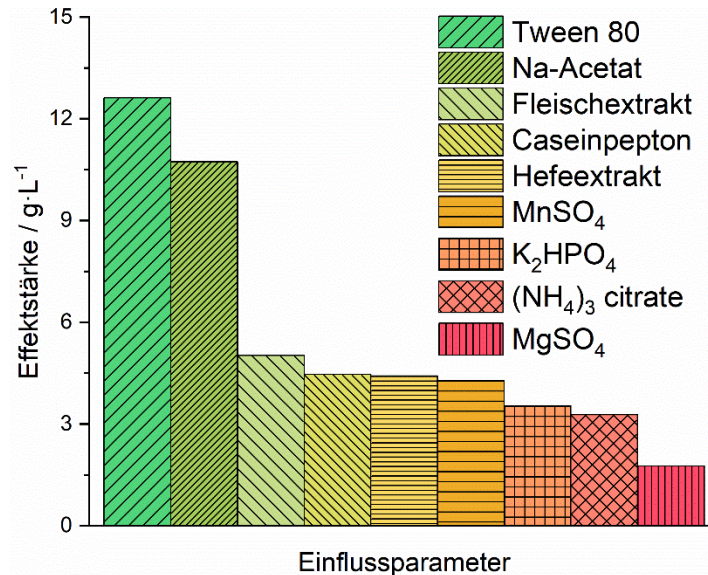


Abbildung 18: Ergebnisse des statistischen Versuchsplans zum Zwecke der Reduzierung der Nährstoffsupplementation in der Fermentation mit Treberpresssaft. Gezeigt ist die Effektstärke des zu optimierenden Zielwertes (Milchsäurekonzentration) in Bezug auf die neun untersuchten Einflussparameter (d.h. Bestandteile des MRS-Mediums) [30].

Die Effektstärke eines Einflussparameters entspricht der maximalen Erhöhung des Zielwertes, welcher durch die Zugabe der entsprechenden Komponente höchstens erzielt werden kann [212]. Dabei haben der zu optimierende Zielwert (d.h. die Milchsäurekonzentration) und die Effektstärke die gleiche Einheit ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Da ein kategorielles Design genutzt wurde, kann allerdings nicht zwangsläufig abgeleitet werden, dass die Konzentrationserhöhung eines Einflussparameters, welcher eine hohe Effektstärke innehat, auch zwangsläufig zu einer weiteren Erhöhung des Zielwertes führen muss. Beim kategoriellen Design besagt die Effektstärke nur, wie hoch der maximale Effekt durch den Zusatz der Komponente in der gegebenen, bereits optimierten Konzentration (in diesem Fall definiert durch das MRS-Medium) sein kann.

In diesem Versuchsplan waren insbesondere die Effektstärken für Tween 80 und Na-Acetat auffällig, welche mit $12,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $10,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ deutlich höher ausfielen als die Effektstärken der anderen Einflussparameter. Da *Lactobacillus delbrueckii* keine Gene zur Synthese von langkettigen, ungesättigten Fettsäuren besitzt, sind die Zellen auf die Bereitstellung dieser Fettsäuren durch das Fermentationsmedium angewiesen [213]. Tween 80 besteht zu 92% aus Ölsäure (C18:1) und kann die Defizienz des Organismus daher ausgleichen. Außerdem erhöht Tween 80 die Permeabilität der Zellmembran und kann

deshalb die Aufnahme weiterer Nährstoffe erleichtern [211]. Dementsprechend berechnete das Modell für Tween 80 positive Interaktionen zu sechs weiteren Supplementen (Daten nicht gezeigt). Zahlreiche positive Wechselwirkungen mit Tween 80 wurden auch bei der Optimierung eines Kultivierungsmediums auf Basis von Weizenstroh mit dem Organismus *Lactobacillus amylophilus* GV6 beschrieben [214]. Außerdem wurde eine positive Interaktion zwischen Tween 80 und MnSO_4 im Falle von *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466, welcher in einem Maisquellwasser-basierten Medium kultiviert wurde, beobachtet [215]. Vermutlich ist die hohe Effektstärke für Tween 80 also mitunter auch auf synergistische Effekte mit anderen Nährstoffen und nicht nur auf die Bereitstellung von Fettsäuren zurückzuführen. Auf jeden Fall wird der positive Effekt von Tween 80 auf das Wachstum von *Lactobacillen* auch an anderer Stelle in der Literatur beschrieben [216]. In einigen Publikationen wird Na-Acetat ebenfalls eine positive Wirkung auf das Zellwachstum von *Lactobacillen* [217] oder die Produktbildung [218] zugeschrieben. Andere Literaturstellen beziehen sich bei Na-Acetat aber nur auf dessen pilzhemmende Eigenschaften [219] und weisen der Komponente keine wachstumsfördernden Eigenschaften zu [211]. Da in der vorliegenden Versuchsreihe für Na-Acetat aber eine hohe Effektstärke und positive Wechselwirkungen zu vier weiteren Supplementen ermittelt wurden (Daten nicht gezeigt), ist von einem positiven Effekt (zumindest auf die Produktbildung) auszugehen.

Mit Caseinpepton, Fleischextrakt und Hefeextrakt wurden dem Fermentationsmedium drei Komplexbestandteile zugesetzt, die allerdings nur mittelmäßige Effektstärken zwischen $4,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreichten, obwohl mindestens eines (meist mehrere) dieser Komplexbestandteile zu praktisch jeder, in der Literatur beschriebenen, Milchsäurefermentation auf Basis eines nachwachsenden Rohstoffes wie Treberhydrolysat [74], Palmyra Palmen Jaggery [135] oder Rübenmolasse [133] zugegeben werden. Die Komplexbestandteile beinhalten Aminosäuren, Peptide, Spurenelemente und Vitamine, wodurch eigentlich hohe Effektstärken erwartet wurden. Allerdings kann der Treberpresssaft ebendiese Stoffklassen auch zur Verfügung stellen (vgl. Tabelle 5) und dem Medium wurden gleich drei Komplexbestandteile unterschiedlichen Ursprungs, in z.T. recht hohen Konzentrationen, supplementiert, was die Bedeutung der einzelnen Komponenten vermutlich wieder schmälerte.

Die weiteren Komponenten MnSO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_3\text{-Citrat}$ and MgSO_4 hatten einen geringen Einfluss auf die finale Milchsäurekonzentration, was sich in Effektstärken zwischen $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $4,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ widerspiegelte. Mangan-Ionen dienen der Lactatdehydrogenase als Cofaktor, weshalb der positive Effekt von MnSO_4 auf Milchsäurefermentationen bereits mehrfach beschrieben wurde [215, 220]. Di-Kalium-Hydrogenphosphat erfüllt in nicht pH-regulierten Kulturen zwei Aufgaben: (a) Einerseits kann es Protonen der entstehenden Milchsäure abfangen und den pH-Wert des Fermentationsmediums daher in gewissem

Umfang puffern. In den, hier beschriebenen, Kulturen im Schüttelkolbenmaßstab war dies noch von Interesse – in pH-regulierten Reaktorfermentationen (vgl. nachfolgendes Kapitel 5.2.3) konnte dieser Effekt allerdings vernachlässigt werden. (b) Des Weiteren kann die Supplementierung von K_2HPO_4 dem Organismus anorganisches Phosphat zur Verfügung stellen, wodurch z.B. eine Steigerung der Milchsäureausbeute bei Kulturen von *Lactobacillus helveticus* erzielt werden konnte [221]. Sowohl Mangan und Phosphat (als auch Magnesium) waren allerdings bereits im Treberpresssaft vorhanden (vgl. Tabelle 5), was die Notwendigkeit für den Zusatz verringerte. Insbesondere bei $MnSO_4$ und $MgSO_4$ wurden überdies nur sehr geringe Konzentration eingesetzt, sodass die Kosten nicht sonderlich schwer ins Gewicht fallen dürften, sofern dieser Aspekt bei der Supplementierung der Nährstoffe Berücksichtigung finden soll.

Die experimentellen (empirischen) Werte und die berechneten (Modell-)Werte lagen nahe an der 1. Winkelhalbierenden (Abbildung 19 A). Je geringer die Werte von der 45°-Linie abweichen, desto geringer sind die Residuen und desto höher kann die Güte des Modells eingestuft werden [212]. Des Weiteren sollten die Residuen normalverteilt sein, was im vorliegenden Modell der Fall war (Abbildung 19 B). Da außerdem das Bestimmtheitsmaß mit $R^2 = 0,976$ hoch ausfiel, konnten die ermittelten Ergebnisse als valide angenommen werden [212]. Der Tatsache geschuldet, dass das adjustierte Bestimmtheitsmaß mit $R^2_{\text{adjust}} = 0,955$ ebenfalls einen hohen Wert annahm, enthielt das multiple Regressionsmodell keine unnötigen Terme mehr [222].

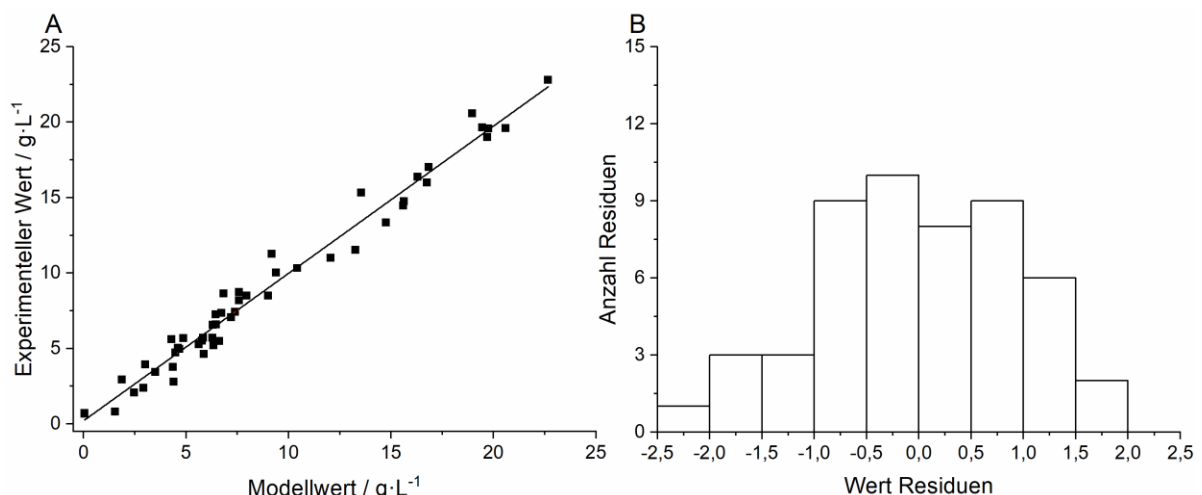


Abbildung 19: Ergebnisse des statistischen Versuchsplans bzgl. der Modellgüte: **A)** Experimentelle (empirische) Werte gegenüber den berechneten (Modell-)Werten für alle 52 Einzelversuche des D-optimalen Testplans, **B)** Gaußsche Residuen-Normalverteilung [30].

Somit konnte das Modell genutzt werden, um verlässliche Aussagen über die Unerlässlichkeit bzw. Ersetzbarkeit der Nährstoffe im Fermentationsmedium zu generieren. Bei der Auswertung der Supplementationsstrategie mit dem Modell wurde folgende Supplementierung gewählt [g·L⁻¹]: Hefeextrakt [5], Tween 80 [1], K_2HPO_4 [2], Na-Acetat [5], $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ [0,2] und $MnSO_4 \cdot H_2O$ [0,05]. Die Supplementierung wurde folglich um

Caseinpepton [10], Fleischextrakt [10] und $(\text{NH}_4)_3\text{-Citrat}$ [2] verringert. Bei der Evaluation der Modellergebnisse wurde allerdings nicht nur der „harte“ Faktor der absoluten Milchsäurekonzentration berücksichtigt, sondern auch ein Augenmerk auf die „weichen“ Faktoren, wie Kilopreis und Einsatzmenge, gelegt. Caseinpepton und Fleischextrakt stellen kostenintensive Supplemente im MRS-Medium dar, die überdies in hohen Konzentrationen eingesetzt wurden [223]. Aufgrund der gewählten Supplementation war somit nur noch ein komplexer Medienbestandteil notwendig (nämlich Hefeextrakt), bei welchem sich zusätzlich noch die Möglichkeit auftat, ihn aus einem weiteren Nebenproduktstrom des Braugangs (nämlich der Brauhefe) zu produzieren (vgl. Kapitel 4.1.2). Das Modell errechnete für diese Einstellung eine Milchsäurekonzentration von $16,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und der vergleichende Schüttelkolbenversuch ergab einen finalen Titer von $16,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [30].

Kurzzusammenfassung:

- Mit Hilfe eines statistischen Versuchsplans kann die Nährstoffsupplementation zur Fermentation um je $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Caseinpepton & Fleischextrakt sowie um $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_3\text{-Citrat}$ verringert werden.
- Der Zusatz von Hefeextrakt als alleiniger Komplexbestandteil ist ausreichend, um die Fermentation durchführen zu können. Es besteht die Möglichkeit, Hefeextrakt aus Brauhefe herzustellen.
- Tween 80 und Na-Acetat beeinflussen die Milchsäurebildung stärker als die restlichen Supplemente. Dies zeigt sich an hohen Effektstärken.
- Statistische Kriterien wie Bestimmtheitsmaß und Residuen-Verteilung legen eine hohe Güte des Modells nahe.

5.2.3. Fermentations-Optimierung im Bioreaktor

Um die Fermentation weiter zu optimieren, wurden zahlreiche Fermentationen im Bioreaktor gemäß Kapitel 4.5.7 durchgeführt. Die ermittelten kinetischen Daten und bioverfahrenstechnischen Kenngrößen dieser Fermentationen sind in Tabelle 6 gezeigt. Die zugrundeliegenden Fermentationskinetiken können in Abbildung 20 eingesehen werden.

Bei der Referenzfermentation mit MRS-Medium (I) wurde eine Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,55 \text{ h}^{-1}$ ermittelt, welche für eine Kultivierung von *L. delbrueckii* NRRL B445 im Bioreaktor auch in der Literatur genannt wird [136]. Die Produkt/Substrat-Ausbeute wird in der Literatur für eine Fermentation mit MRS-Medium im Bioreaktor mit $Y_{P/S} = 0,8 \text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ beschrieben [224]. Diese Ausbeute erscheint jedoch recht gering, da das MRS-Medium neben $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose noch insgesamt $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ kohlenstoffhaltige Komplexbestandteile enthält, die zwar zur Zellbiomasse- und Milchsäurebildung beitragen können, aber für die Berechnung der Ausbeute nicht herangezogen werden, wobei die geringe Ausbeute in dieser Literaturstelle auch durch einen unvollständigen Glucoseverbrauch im Fermentationszeitraum erklärt werden könnte. Die Milchsäurebildungs- und Glucoseverbrauchsraten werden in der Literatur mit $0,72 \text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. $-0,96 \text{ g}_{\text{Glucose}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{h}^{-1}$ angegeben [224] – und damit deutlich niedriger als in der

vorliegenden Arbeit. Sofern eine Gesamtzuckerkonzentration von ca. $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in einem Komplexmedium eingesetzt wird, werden – in Analogie zur vorliegenden Arbeit – finale Milchsäurekonzentrationen von $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ – $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ berichtet [225]. Allerdings ist die Milchsäurebildung in erster Linie von der initialen Glucosekonzentration abhängig, sodass bei höherer Substratverfügbarkeit auch Milchsäurekonzentrationen von bis zu $\sim 130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ beschrieben werden [136].

Tabelle 6: Kinetische Parameter und bioverfahrenstechnische Kenngrößen der Fermentationen mit **(I)** MRS-Medium sowie mit **(II)** verdünntem WeBo-Presssaft und vollständiger Supplementation, **(III)** optimierter Supplementation, **(IV)** optimierter Supplementation und Glucoamylase sowie **(V)** optimierter Supplementation, Glucoamylase und Hefeextrakt aus Brauhefe. Außerdem sind die Daten der Fermentationen mit **(VI)** unverdünntem PA-Presssaft und **(VII)** unverdünntem MB-Presssaft gezeigt. Die Daten der beiden Referenzfermentationen (I) und (II) zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten: μ_{\max} , maximale Wachstumsrate; $\text{OD}_{600 \text{ nm}} \sim \text{BTM}$, Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse; BTM_{\max} , maximale Zellbiomasse; $c_{\text{Lac,max}}$, maximale Milchsäurekonzentration; $Y_{\text{P/S}}$, Milchsäure/Zucker-Ausbeute; q_{P} , Milchsäurebildungsrate; $q_{\text{S1,S2,S3,S4}}$, Substratverbrauchsraten; P , Produktivität in den ersten 11 h der Fermentation (I) – (V) bzw. in den ersten 15 h der Fermentationen (VI) – (VII); n.v., nicht verfügbar, da die Komponente im Fermentationsansatz nicht vorhanden war; n.b., nicht bestimmbar, aufgrund der Überlagerung von enzymatischer und mikrobieller Konversion; WeBo, Weizenbock, PA, Pale Ale; MB, Maibock [30].

Fermentations-Nr.	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)
$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	$0,55 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,02$	0,24	0,38	0,49	0,49	0,47
$\text{OD}_{600 \text{ nm}} \sim \text{BTM}$	$0,23 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,05$	0,30	0,26	0,22	0,22	0,24
$\text{BTM}_{\max} / \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1,60 \pm 0,09$	$2,25 \pm 0,01$	1,98	1,67	1,42	3,16	5,07
$c_{\text{Lac,max}} / \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$26,56 \pm 1,61$	$24,43 \pm 0,44$	26,07	28,54	26,22	57,08	79,06
$Y_{\text{P/S}} / \text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$	$1,28 \pm 0,16$	$0,83 \pm 0,02$	1,18	1,04	1,02	0,56	0,89
$q_{\text{P}} / \text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	$4,58 \pm 0,20$	$5,93 \pm 0,16$	3,33	3,68	5,14	4,25	4,18
$q_{\text{S1}} / \text{g}_{\text{Maltooligomere}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	n.v.	$-0,37 \pm 0,12$	-0,19	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$q_{\text{S2}} / \text{g}_{\text{Maltotriose}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	n.v.	$-0,91 \pm 0,01$	-0,56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$q_{\text{S3}} / \text{g}_{\text{Maltose}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	n.v.	$-2,99 \pm 0,32$	-1,06	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$q_{\text{S4}} / \text{g}_{\text{Glucose}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	$-2,79 \pm 0,78$	$-1,55 \pm 0,14$	-0,54	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$P / \text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	$2,16 \pm 0,18$	$2,13 \pm 0,05$	2,18	2,05	1,98	3,58	4,93

In der zweiten Referenzfermentation mit verdünntem WeBo-Presssaft und vollständiger Supplementation (II) wurde im Vergleich zur Fermentation mit MRS-Medium (I) eine ähnliche Wachstumsrate und ein vergleichbarer finaler Milchsäuretitel beobachtet. Allerdings war die Zelldichte am Ende der Fermentation um 41% erhöht. Sofern andere natürliche Substrate für Fermentationen mit *L. delbrueckii* genutzt werden, werden die Wachstumsraten mit $0,2 \text{ h}^{-1}$ bis $0,35 \text{ h}^{-1}$ für Fermentationen mit Reiskleie [225] und $0,31 \text{ h}^{-1}$ für Prozesse mit Molkenpermeat angegeben [226], was damit deutlich geringer als bei der vorliegenden Fermentation mit Treberpresssaft war ($\mu_{\max} = 0,52 \text{ h}^{-1}$). In dieser Arbeit wurden alle Kohlenhydrate parallel vom Organismus aufgenommen, da *L. delbrueckii* sowohl Glucose, Maltose als auch längerkettige α -1,4-glykosidisch verknüpfte Glucoseoligomere nutzen kann [227]. Diauxisches Wachstum konnte im Treberpresssaft also nicht beobachtet

werden – allerdings unterschieden sich die Aufnahmeraten der kurzkettigen Zucker mit Werten von $-0,91 \text{ g}_{\text{Maltotriose}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, $-2,99 \text{ g}_{\text{Maltose}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ und $-1,55 \text{ g}_{\text{Glucose}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ in beachtlichem Maße. Die längerkettigen Maltooligomere wurden, im Unterschied zu pH-unregulierten Kulturen im Kolbenmaßstab (vgl. Kapitel 5.2.1), zwar als Substrat genutzt, allerdings sank die Konzentration insgesamt nur um $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei einer recht geringen Aufnahmerate von $-0,37 \text{ g}_{\text{Maltooligomere}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Produkt/Substrat-Ausbeute war im Vergleich zum Prozess mit MRS-Medium (I) um 35% reduziert, was vornehmlich auf die stärkere Zellbiomassebildung zurückzuführen war. In beiden Referenzfermentationen wurden nur geringfügige Abweichungen zwischen den biologischen Replikaten beobachtet, woraus auf eine gute Replizierbarkeit der Prozesse geschlossen werden konnte.

Sofern die Fermentation mit der optimierten Supplementationsstrategie gemäß Kapitel 5.2.2 durchgeführt wurde (d.h. ohne Caseinpepton, Fleischextrakt und $(\text{NH}_4)_3\text{-Citrat}$), verringerten sich die Wachstumsrate um 54% und die finale Zelldichte um 12%, was vermutlich auf die geringere Nährstoffverfügbarkeit zurückzuführen war. Die geringere Nährstoffverfügbarkeit beeinflusste insbesondere auch die Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten, welche zwischen 38% und 65% im Vergleich zur vollständigen Supplementationsstrategie (II) verringert waren. Demgegenüber war die Produkt/Substrat-Ausbeute um 42% erhöht, da Maltotriose nicht vollständig abgebaut wurde (Abbildung 20D), aber die Milchsäurekonzentration mit $26,07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in der bekannten Größenordnung lag. Dies war sehr beachtlich, da der Zielwert der Milchsäurekonzentration trotz der schlechteren kinetischen Daten auf einem konstanten Level gehalten werden konnte. Im Vergleich zum pH-unregulierten Schüttelkolben (vgl. Kapitel 5.2.2), konnte der finale Milchsäuretiter sogar um ca. $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gesteigert werden.

Sofern zusätzlich Glucoamylase zum Einsatz kam (IV), wurden die Maltooligomere, sowie Maltotriose und Maltose in einer simultanen Verzuckerung und Fermentation enzymatisch zu Glucose abgebaut und gleichzeitig von den Mikroorganismen aufgenommen. Maltotriose wurde dabei so schnell enzymatisch degradiert, dass bereits nach einer Stunde keine Maltotriose mehr detektiert werden konnte. Durch die höhere Verfügbarkeit der monomeren Glucose, wurde die Wachstumsrate im Vergleich zu Fermentation (III) um 58% erhöht und die Milchsäurekonzentration wurde moderat von $26,07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $28,54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ angehoben. Die Konzentration der Maltooligomere sank im Prozesszeitraum nun um $4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (anstelle der vorherigen $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Möglicherweise floss der zusätzliche Kohlenstoff aus dem Maltooligomer-Abbau also in eine verstärkte Milchsäurebildung ein.

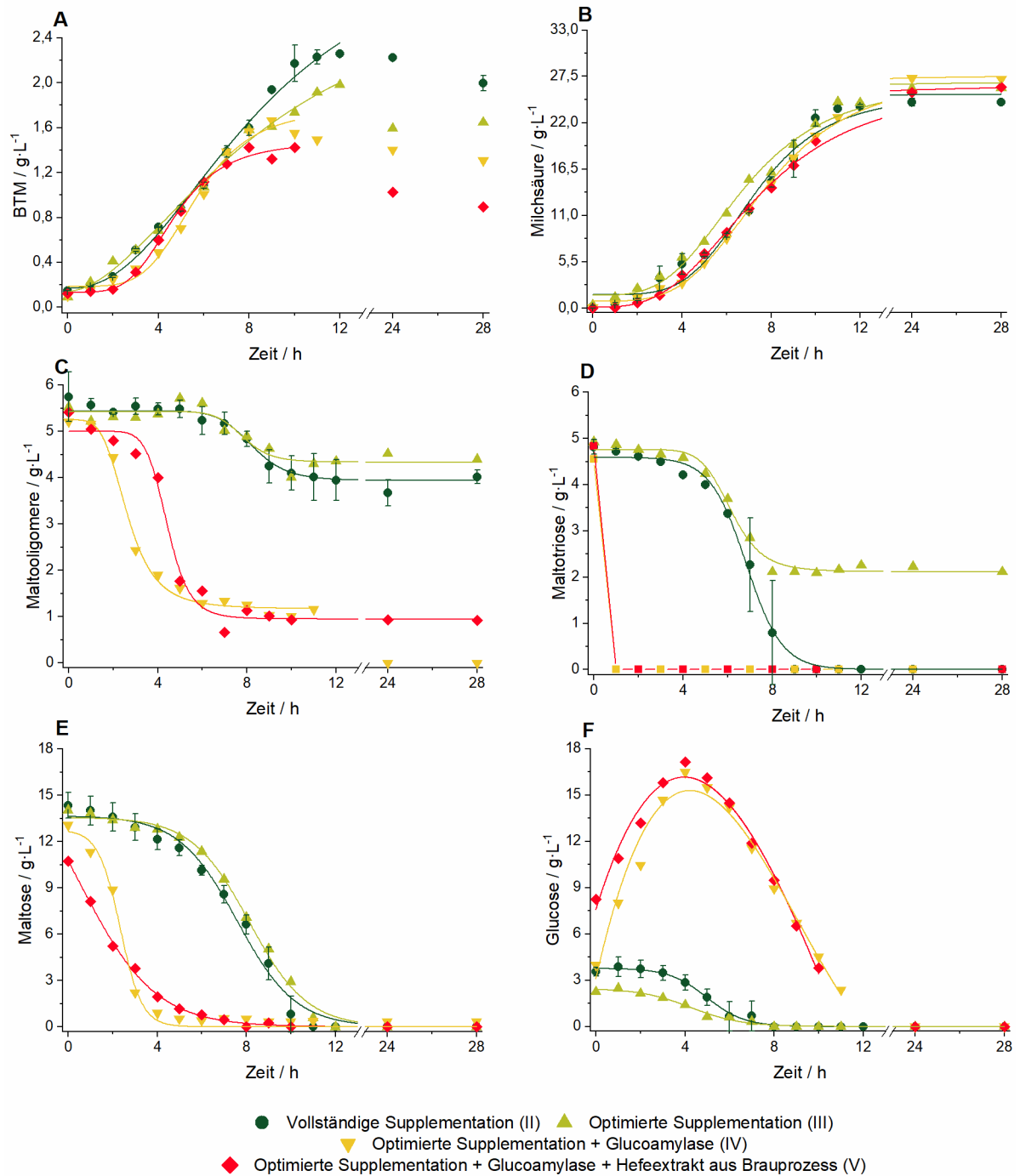


Abbildung 20: Fermentationen mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und verdünntem WeBo-Treiberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$. Die Datenpunkte der Fermentation bei vollständiger Supplementation (Fermentation (II)) zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten. Die Fermentationen bei optimierter Supplementation (Fermentation (III)), optimierter Supplementation und Glucoamylase (Fermentation (IV)) und optimierter Supplementation, Glucoamylase und Hefeextrakt aus Brauhefe (Fermentation (V)) stellen Einzelversuche dar. **A)** Biotrockenmasse, Konzentration von **B)** Milchsäure, **C)** Maltoligomeren, **D)** Maltotriose, **E)** Maltose, **F)** Glucose. Die Glucose-Datenpunkte der Fermentationen mit Glucoamylase wurden mit Polynomen 2. Grades gefittet, alle anderen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl; WeBo, Weizenbock [30].

Sobald kommerzielles Hefeextrakt durch Hefeextrakt, welches aus Brauhefe hergestellt worden war, ersetzt wurde (V), konnten, abgesehen von einer Erhöhung der Wachstumsrate um 29% und einer geringfügigen Reduktion der Milchsäurekonzentration (möglicherweise durch eine andere Nährstoffzusammensetzung des eigenständig

hergestellten Hefeextraktes), keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Fermentation (IV) beobachtet werden. Dies war beachtenswert, da somit ein weiterer Nebenproduktstrom des Brauprozesses in diesen Bioprozess implementiert werden konnte (vgl. Kapitel 4.1.2), wobei die Herstellung von Hefeextrakt aus Brauhefe (zumindest im kleinen Maßstab) ggfs. teurer sein könnte als es die großtechnische Herstellung ist. Auch in der Literatur wird der Einsatz von Hefeextrakt aus Brauhefe beschrieben. So konnte bei Fermentationen von *L. rhamnosus* ATCC 7469 auf einer hydrolysierten Mischung aus Biertreber und Malzkeimlingen eine Steigerung der Milchsäurekonzentration um bis zu 9,8% erzielt werden, sofern Sojalecithin und Hefeextrakt aus Brauhefe anstelle von Tween 80 und kommerziellem Hefeextrakt eingesetzt wurden. Allerdings musste, im Gegensatz zum vorliegenden Prozess, mit 19,12 Gew.-% eine sehr hohe Konzentration des Hefeextraktes aus Brauhefe eingesetzt werden [24]. Die Produktivität aller gezeigten Fermentationen (I) – (V) befand sich in der Größenordnung von ca. $2 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und damit deutlich höher als dies zuvor für Fermentationen von *L. rhamnosus* ATCC 7469 mit besagtem Biertreber- und Malzkeimlingaufschluss berichtet worden war [24, 30].

Kurzzusammenfassung:

- Durch die iterative Optimierung der Fermentation mit verdünntem Weizenbock-Presssaft (Nährstoffreduktion und Zusatz von Glucoamylase) können die kinetischen Daten der Fermentation aufrechterhalten werden.
- Die finale Milchsäurekonzentration kann bei einer Fermentation im pH-regulierten Bioreaktor im Vergleich zum pH-unregulierten Schüttelkolben um ca. $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ angehoben werden.
- Der Einsatz von Hefeextrakt aus Brauhefe weist in Bezug auf die kinetischen Daten der Fermentation keinerlei Nachteile im Vergleich zu kommerziellem Hefeextrakt auf.

5.2.4. Fermentationen mit unverdünnten Pale Ale- bzw. Maibock-Presssäften

Beim Einsatz von unverdünntem PA-Presssaft (VI) mit einem Gesamt-Zuckergehalt von $107,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, wurde eine maximale Zellbiomassekonzentration von $3,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ beobachtet (Abbildung 21 A), was eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den bisherigen Fermentationen mit verdünntem WeBo-Presssaft darstellte. Außerdem konnte der finale Milchsäuretitert auf $57,08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gesteigert werden, was allerdings eine deutliche Verringerung der Produkt/Substrat-Ausbeute ($Y_{P/S} = 0,56 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$) mit sich brachte (Abbildung 21 B). Die maximale Wachstumsrate änderte sich im Vergleich zur Fermentation mit verdünntem WeBo-Presssaft (V) nicht und die Produktivität konnte von $1,98 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf $3,58 \text{ g}_{\text{Lac}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (und damit um ca. 180%) gesteigert werden.

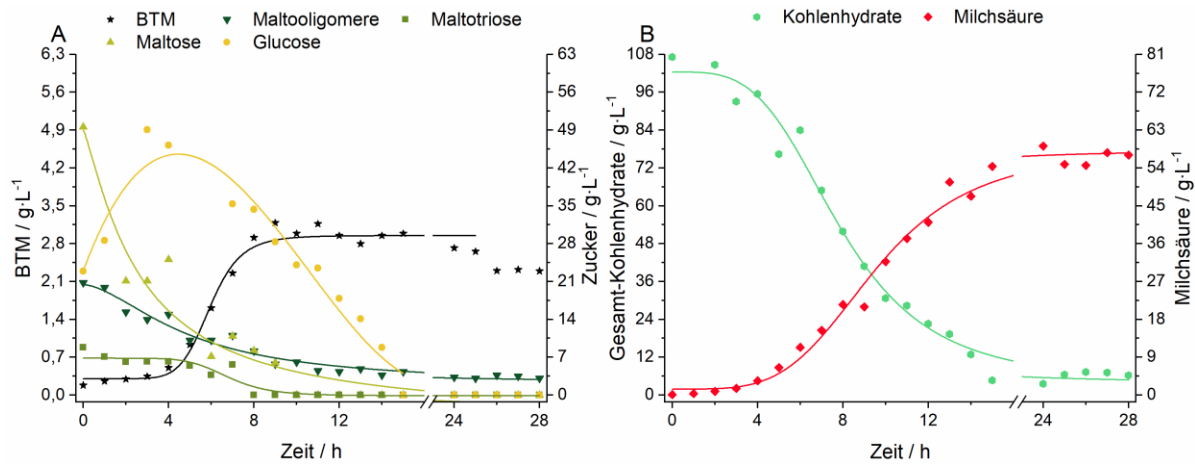


Abbildung 21: Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem PA-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation (VI)): **A**) Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B**) Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration. Die Glucose-Datenpunkte wurden mit Polynomen 2. Grades angepasst; alle anderen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl; PA, Pale Ale.

Sofern unverdünnter MB-Presssaft mit einer Zuckerkonzentration von $93,4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ genutzt wurde, konnte eine weitere Steigerung der maximalen Zellkonzentration auf einen Wert von $5,07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erzielt werden (Abbildung 22 A). Dies entsprach einer Steigerung um 357% im Vergleich zur Fermentation mit verdünntem WeBo-Presssaft (V). Die finale Milchsäurekonzentration wurde auf $79,06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ angehoben, was bedeutete, dass die Produkt/Substrat-Ausbeute einen Wert von $Y_{P/S} = 0,89\text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ annahm (Abbildung 22 B). Die maximale Milchsäurekonzentration konnte im Vergleich zur Fermentation mit verdünntem WeBo-Presssaft (V) um 302% erhöht werden. Die Produktivität betrug in diesem Prozess mit MB-Presssaft $4,93\text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und war damit um ~250% im Vergleich zu allen Fermentationen mit verdünntem WeBo-Presssaft erhöht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Prozess auf Presssäfte anderer Braurezepte und überdies hinaus auf deutlich höhere Zuckerkonzentrationen (PA: $107,2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, MB: $93,4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) übertragen werden konnte, ohne dass die Supplementationsstrategie (mit Ausnahme der Hefeextrakt-Zugabe) angepasst werden musste.

Allerdings zeigte sich auch, dass die maximale Milchsäurekonzentration nicht nur von der anfänglichen Zuckerkonzentration abhing, da in der Fermentation mit MB-Presssaft trotz geringerer anfänglicher Kohlenhydratkonzentration mehr Milchsäure als bei der Fermentation mit PA-Presssaft gebildet wurde. Um einen Überblick über alle relevanten Nährstoffe im Fermentationsmedium zu erhalten, wurden daher die Gesamt-Aminosäure- und Proteinkonzentration während des Prozesses mit MB-Treberpresssaft bestimmt (Abbildung 22 C). *Lactobacillen* haben ein breites proteolytisches System, welches aus intrazellulären und extrazellulären Proteasen und Peptidasen besteht, die ihnen den Abbau und/oder die Aufnahme von Di- und Oligopeptiden ermöglichen [228]. Außerdem können sie zahlreiche Aminosäuren aufnehmen, wobei den Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein

hierbei eine besondere Bedeutung beigemessen wird [186]. Da Cystein mit den analytischen Methoden (Kapitel 4.2.3) nicht gemessen werden konnte, wurden die Kinetik der Alanin- und Serinaufnahme separat betrachtet (Abbildung 22 D), wohingegen die restlichen Aminosäuren mittels einer Massenbilanz als „Gesamt-Aminosäuren“ dargestellt wurden (Abbildung 22 C).

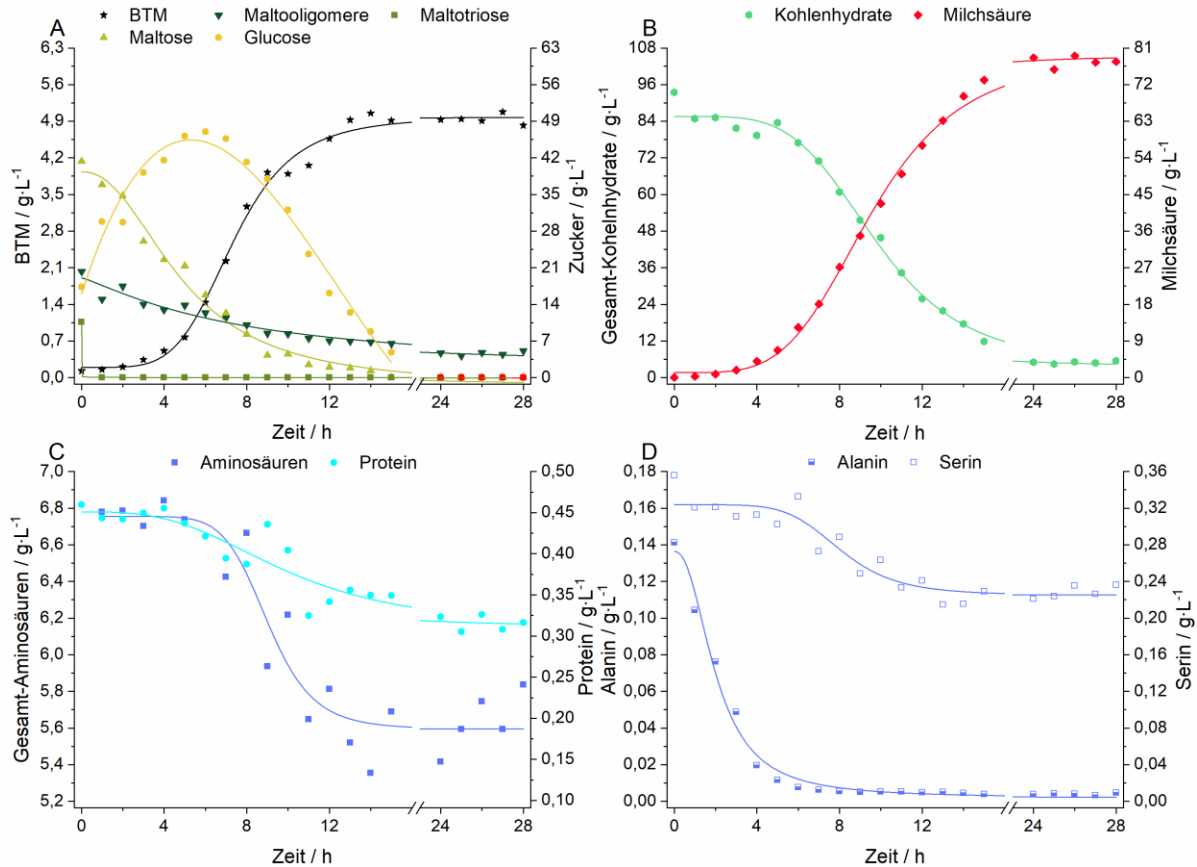


Abbildung 22: Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem MB-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation (VII)): **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration. Die Glucose-Datenpunkte wurden mit Polynomen 2. Grades angepasst; alle anderen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl; MB, Maibock.

Während im Treberpresssaft eine Protein-Konzentration von $451\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabelle 5) gemessen wurde, änderte sich die Proteinkonzentration im Fermentationsmedium (incl. Hefeextrakt) mit einem Wert von $459\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kaum. Bei der Gesamt-Aminosäurekonzentration war durch die Zugabe des Hefeextraktes ein leichter Anstieg von $6,52\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $6,78\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erfolgt – das Gros der Aminosäuren wurde aber immer noch durch den Treberpresssaft und nicht durch das supplementierte Hefeextrakt zur Verfügung gestellt. Da im MB-Presssaft eine deutlich höhere Protein- und Aminosäurekonzentration (aber geringere Kohlenhydratkonzentration) als im PA-Presssaft vorhanden waren, lag der Schluss nahe, dass die Verfügbarkeit von N-Quellen immer in Relation zur Verfügbarkeit von C-

Quellen betrachtet werden musste, sofern die finale Milchsäurekonzentration aufgrund der Zusammensetzung eines Treberpresssaftes vorausgesagt werden sollte [30].

Kurzzusammenfassung:

- Der Fermentationsprozess kann auch mit unverdünntem Pale Ale- bzw. Maibock-Presssaft durchgeführt werden. Die finale Milchsäurekonzentration beträgt dabei $57,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $79,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Prozesstechnische relevante Daten, wie Produktivität und finale Milchsäurekonzentration, können im Vergleich zu den Fermentationen mit verdünntem Weizenbock-Presssaft deutlich gesteigert werden.
- Die maximal erzielbare Milchsäurekonzentration hängt, neben der Gesamtkohlenhydratkonzentration, maßgeblich von der Aminosäure- und Proteinausstattung des verwendeten Presssaftes ab.

5.2.5. Kohlenstoffbilanz des Prozesses mit Maibock-Presssaft

In Abbildung 23 ist die Massenbilanz für die wichtigsten kohlenstoffhaltigen Komponenten der Fermentation mit MB-Presssaft im Verlaufe des 28-stündigen Prozesszeitraumes aufgezeigt. Diese Komponenten beinhalten Kohlenhydrate, Aminosäuren und Proteine auf der Substratseite und die Zellbiomasse sowie das Stoffwechselendprodukt Milchsäure auf der Produktseite.

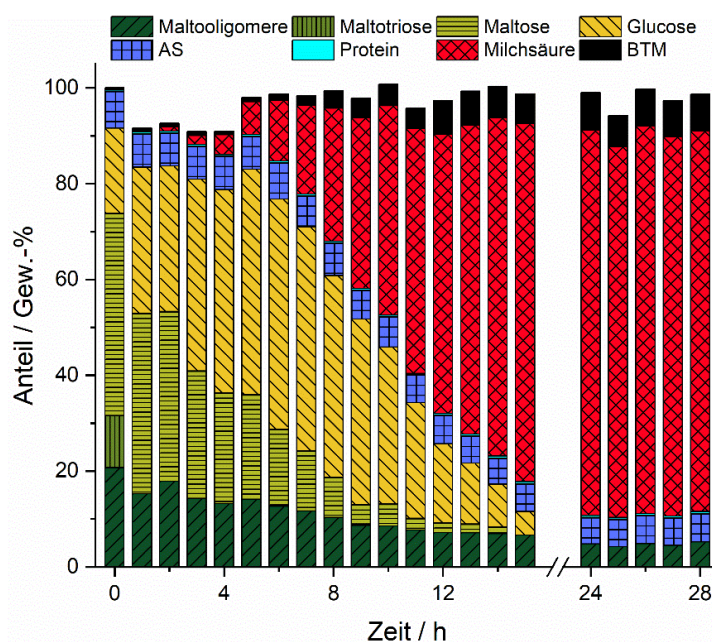


Abbildung 23: Massenbilanz in Bezug auf die wichtigsten kohlenstoffhaltigen Komponenten Maltoligomere, Maltotriose, Maltose, Glucose, Gesamt-Aminosäuren einschließlich Alanin und Serin, Protein, Milchsäure und Biotrockenmasse der Fermentation mit unverdünntem MB-Presssaft (Fermentation (VII)); BTM, Biotrockenmasse; AS, Aminosäuren; MB, Maibock [82].

Während einer mikrobiellen Fermentation werden die genannten Substrate (zumeist vorwiegend Kohlenhydrate) zu Zellbiomasse und Produkten (z.B. organischen Säuren) umgesetzt. Dabei können auch unerwünschte Nebenprodukte gebildet werden (wie z.B. CO_2 oder Alkohole). Da *L. delbrueckii* subsp. *lactis* allerdings einen homofermentativen Stoffwechsel besitzt, wurden neben der gebildeten Milchsäure keine weiteren gasförmigen

oder löslichen Nebenprodukte in großer Konzentration erwartet [131]. Die Bilanzierung aller Substrate und (Neben-)Produkte ist wichtig, sofern der Bioprozess ganzheitlich beschrieben werden soll. Wenn die Kohlenstoffbilanz eines Prozesses Lücken aufweist (insbesondere mit fortschreitender Prozessdauer), deutet dies entweder auf eine fehlerhafte Analytik oder auf nicht-bilanzierte unerwartete Nebenprodukte hin [229]. Diesbezüglich ist es wichtig zu betonen, dass im vorliegenden Prozess alle maßgeblichen Komponenten der Fermentation bestimmt werden konnten und die Summe dieser Moleküle sich stets nahe der 100%-Marke befand [82]. Geschlossene Kohlenstoffbilanzen sind nicht nur für die ganzheitliche Beschreibung von Bioprozessen wichtig, sondern erlangen zusätzliche Bedeutung, sofern Modellierungsansätze für die zugrundeliegenden Prozesse verfolgt werden. Dies kann die intrazelluläre metabolische Stoffflussanalyse betreffen, gilt aber ebenso für kinetische Modellierungsansätze des gesamten Bioprozesses [82, 229].

Kurzzusammenfassung:

- Die Fermentation mit Maibock-Presssaft hat im Prozesszeitraum von 28 h eine geschlossene Kohlenstoffbilanz, d.h. die Konzentrationen aller wesentlichen Substrate und Produkte können jederzeit korrekt quantifiziert werden.
- Diese vollständige Beschreibung der Fermentation eröffnet die Möglichkeit zur kinetischen Modellierung der Prozesse.

5.3. Kinetische Modellierung der Treberpresssaftfermentationen

In Kapitel 5.2.3 und 5.2.4 konnte gezeigt werden, dass die Optimierungsansätze, welche für WeBo-Presssaft verfolgt wurden, auch auf Treberpresssäfte anderer Braurezepturen mit abweichender Nährstoffausstattung (PA-, MB-Presssaft) übertragen werden konnten. Des Weiteren hatte sich gezeigt, dass die finale Milchsäurekonzentration (sowie die Zellkonzentration und die Produktivität) maßgeblich von einem komplexen Zusammenspiel aus Kohlehydrat-, Protein- und Aminosäurekonzentration im Fermentationsmedium beeinflusst wurde. Allerdings war dieser empirische, iterative Erkenntnisgewinn recht aufwendig. Da die Prozesse lückenlos beschrieben werden konnten, was sich in einer geschlossenen Kohlenstoffbilanz zeigte (Kapitel 5.2.5), ergab sich die Möglichkeit ein kinetisches Modell zu entwickeln, welches die finale Milchsäure- und Zellkonzentration, aber auch die zugrunde liegenden Fermentationskinetiken, in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit eines Treberpresssaftes berechnen konnte [82]. Im folgenden Kapitel soll zunächst auf die aufgestellten Differentialgleichungen des besagten Modells eingegangen werden, um dann Vergleiche zwischen berechneten und empirisch bestimmten Daten für die Prozesse mit unverdünnten MB- bzw. PA-Presssäften und verdünntem WeBo-Presssaft anzustellen [197–200]. Um eine Verwechslung mit gefitteten Kurven (durchgezogene Linien) zu vermeiden, werden simulierte Daten dabei immer als

unterbrochene Linien dargestellt und in der Abbildungslegende mit „[...]_M“ (für Modell) bezeichnet.

5.3.1. Die Wachstumsrate im Modell

Die Wachstumsrate wurde im Modell mit einer klassischen Glucose-abhängigen Monod-Kinetik berechnet, welche um zusätzliche Faktoren für Protein, Gesamt-Aminosäuren und Serin erweitert wurde (Gl. (18)). Während diese Konzentrationen somit einen direkten Einfluss auf das Wachstum des Organismus hatten, wurde die Alaninaufnahme nicht für die Berechnung der Wachstumsrate berücksichtigt, da es sich um eine wachstumsentkoppelte Aufnahme in der stationären und frühen exponentiellen Phase handelte. Im Gegensatz zur gewählten Beschreibung der Wachstumsrate, wird die Wachstumsrate in der Literatur häufig nur in Abhängigkeit von der Konzentration der wichtigsten Kohlenstoffquelle (zumeist Glucose) berechnet [133, 187, 230, 231]. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* kann Maltose, Maltotriose und in geringem Maße Maltooligomere als Kohlenstoffquelle nutzen, was sowohl in eigenen Experimenten beobachtet (Abbildung 20 C – E), als auch in der Literatur bereits beschrieben wurde [227]. Dem erstellten Modell lag allerdings die Annahme zugrunde, dass nur Glucose als Kohlenhydrat in die Zelle aufgenommen wird und somit zum Wachstum und zur Produktbildung beiträgt, während die anderen Kohlenhydrate gemäß Gl. (7) – (10) in einem iterativen Prozess enzymatisch zu Glucose umgesetzt werden. Diese Annahme konnte getroffen werden, da die Vorkultur in Glucose-haltigem MRS-Medium angezogen wurde, sodass von einer Adaption auf Glucose als präferiertes Substrat ausgegangen werden konnte [181].

Nebst dem Einfluss der Substrate, haben auch die maximal erzielbare Zelldichte und der inhibierende Milchsäuretitert einen Einfluss auf die Wachstumsrate des Organismus. Dies wurde im Modell durch zwei Terme berücksichtigt, welche aus der Literatur übernommen wurden [185]. Diese Terme verhinderten, dass der Organismus im Modell dauerhaft exponentiell wuchs, und führten durch die Inhibierungen zur typischen sigmoidalen Wachstumskurve eines Batch-Prozesses. Dabei wurde die maximal erzielbare Zelldichte mit $X_m = 5,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ leicht höher als die, in den vorliegenden Versuchsreihen beobachteten, Zelldichten gesetzt. Des Weiteren wurde eine inhibierende Milchsäurekonzentration von $P_m = 95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, welche in der Literatur für dem Stamm *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* beschrieben wurde, übernommen [232]. Die inhibierenden Effekte der Milchsäure sind dabei vor allem auf die Diffusion ins Zellinnere in undissoziierter Form und Dissoziation im Zellinneren zurückzuführen. Dadurch wird der intrazelluläre pH-Wert abgesenkt, was zwar durch ATP-abhängige Protonenpumpen ausgeglichen werden kann – der Energieverbrauch führt dann in der Folge aber zu einer Verlangsamung der Wachstumsrate und/oder zu einer geringeren Zellbiomassebildung, was wiederum die (wachstumsgekoppelte) Produktbildung negativ beeinflusst [233]. Die Produktinhibierung spielte bei den durchgeführten

Berechnungen allerdings keine übergeordnete Rolle, da in keiner der Fermentationen ein Milchsäuretitert von $79,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ übertroffen werden konnte. Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass für *Lactobacillus helveticus*, welcher bei $\text{pH} = 6$ auf Molkenpermeat mit einer Lactosekonzentration von $48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ kultiviert wurde, bereits ab (initialen) Milchsäurekonzentration von $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} - 50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ starke inhibierende Effekte auf die Zellbiomasse- und Milchsäurebildung beobachtet wurden [82, 234].

Kurzzusammenfassung:

- Die Wachstumsrate im Modell besteht aus einer Monod-Kinetik, welche die Substrate Glucose, Protein, Gesamt-Aminosäuren und Serin berücksichtigt.
- Des Weiteren finden in der Wachstumsrate die inhibierenden Effekte durch hohe Zell- bzw. Milchsäurekonzentrationen Beachtung.

5.3.2. Die Produktbildungskinetik des Modells

In der Literatur wird die Produktbildungskinetik häufig in der Form von Gl. (27) beschrieben, wobei α und β empirisch-bestimmte Parameter für die wachstumsgekoppelte (α) bzw. wachstumsentkoppelte (β) Produktbildung sind, die sich von Fermentationslauf zu Fermentationslauf unterscheiden können [185, 231, 235, 236].

$$\frac{d(P)}{dt} = \alpha \cdot \mu \cdot X + \beta \cdot X \qquad \text{Gl. (27)}$$

Im Allgemeinen werden recht breite Fermentations-spezifische Abweichungen für die Parameter berichtet, sodass Werte zwischen $0,38 < \alpha < 13,2$ und $0,06 < \beta < 3,2$ auftreten [185]. Sofern der Quotient aus wachstumsgekoppelter und wachstumsentkoppelter Produktbildung einen niedrigen Wert aufweist, d.h. verhältnismäßig viel Produkt wachstumsunabhängig gebildet wird, wird dabei von einer schlechten Stickstoffausstattung des Fermentationsmediums ausgegangen [234].

Der Parameter α (Literatur) ist identisch zur Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute $Y_{P/X}$, welche in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Werte für $Y_{P/X}$ wurden empirisch durch lineare Regression bestimmt (Kapitel 4.9.1) und unterschieden sich nur geringfügig zwischen den untersuchten Fermentationen (vgl. Tabelle 4). In Bezug auf den Parameter β konnte im Falle der Milchsäure-Massenbilanz (Gl. (17)) mit $\beta = 1,0$ die beste Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment für alle untersuchten Presssäfte erzielt werden. Dies war insofern beachtlich, da die geringen Abweichungen zwischen den Fermentationen – im Gegensatz zur Literatur – eine Übertragbarkeit auf weitere Treberpresssäfte unterschiedlichster Braurezepte nahelegte. In kinetischen Modellierungsansätzen muss die wachstumsentkoppelte Produktbildung allerdings auf den Zeitraum begrenzt werden, in dem Substrate vorhanden sind, um eine „unendliche“ Produktbildung im Modell zu unterbinden. Dies wurde im vorliegenden Modell durch eine Monod-ähnliche Erweiterung bewerkstelligt, wie es in Gl. (17) dargestellt und in der Literatur vorgeschlagen wird [82, 187].

Kurzzusammenfassung:

- Die wachstumsgekoppelte Produktbildung wird im Modell mit Hilfe der Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute $Y_{P/X}$ beschrieben. Es ergeben sich nur geringfügige Abweichungen zwischen den betrachteten Fermentationen.
- Die wachstumsentkoppelte Produktbildung kann in allen Fermentationen durch den Parameter $\beta = 1,0$ beschrieben werden.

5.3.3. Enzymatischer Abbau von Kohlenhydraten und Glucoseaufnahme im Modell

In einigen kinetischen Modellen wird die enzymatische Stärkedegradation anhand einer Michaelis-Menten-Kinetik modelliert [237]. In anderen Ansätzen wird dieser Abbau mit einer Kinetik (Pseudo) 1. Ordnung modelliert [182–184]. Im vorliegenden Modell wurde der Abbau aller α -1,4- verknüpften Glucoseoligomere jeweils mit einer Kinetik 1. Ordnung in das Modell implementiert, da dies die empirisch-ermittelten Werte am besten abbildete (Gl. (1) – (3)). Die zugrundeliegenden Geschwindigkeitskonstanten k_1 (Maltooligomerabbau zu Maltotriose) und k_3 (Spaltung von Maltose zu Glucose) wurden mittels Regression aus den empirischen Daten zu Beginn der Fermentationen bestimmt. Demgegenüber konnte die Rate für die sehr schnelle Degradation von Maltotriose zu Maltose und Glucose (k_2) nicht aus den empirischen Datensätzen ermittelt werden, weswegen ein Wert von $k_2 = 4 \text{ h}^{-1}$ gewählt wurde.

Die wachstumsentkoppelte Produktbildung läuft, unabhängig vom Wachstum der Zellen, unter Glucoseverbrauch ab. Dieser Glucoseverbrauch wurde, analog zur wachstumsentkoppelten Produktbildung (Kapitel 5.3.2), durch eine Monod-ähnliche Erweiterung des Glucoseverbrauchsterms beschrieben (Gl. (11)). Im Gegensatz zur Produktbildung wurde der Term aber durch $\beta = 0,9$ an die experimentellen Werte angepasst, da somit die empirischen Messwerte am besten beschrieben werden konnten. Aus stöchiometrischer Sicht ergab dies keinen Sinn, da somit einem wachstumsentkoppelten Substratverbrauch von 0,9 Mol Glucose (pro Zeiteinheit) die Bildung von 2 Mol Milchsäure (in derselben Zeiteinheit) gegenüberstand*. Allerdings ist die wachstumsentkoppelte Produktbildung nicht zu jedem Prozesszeitpunkt gleich stark ausgeprägt – stattdessen wurde die Abhängigkeit von zahlreichen Einflussfaktoren beschrieben, wie z.B. der Stickstoffverfügbarkeit bei Fermentationen mit *Lactobacillus helveticus* [234], der Höhe der Wachstumsrate bei Prozessen mit *Lactobacillus rhamnosus* [187] oder der Art der Kohlenstoffquelle (Glucose, Lactose oder Molken-, bzw. Hefepermeat) bei einer Fermentation mit *Lactobacillus helveticus* [238]. Diese zahlreichen Einflussfaktoren mussten unweigerlich dazu führen, dass der Quotient von $Y_{P/X}$ und β in den untersuchten Fermentationen nicht über den kompletten Prozesszeitraum konstant war. Dies konnte in den Modellgleichungen aber nicht berücksichtigt werden, da hier eine Art „Netto“-Faktor für

* Stöchiometrisch können 2 Mol Milchsäure aus 1 Mol Glucose gebildet werden.

den kompletten Prozesszeitraum ermittelt ($Y_{P/X}$) bzw. vorgegeben (β) wurde. Hierin findet sich auch eine Erklärung, warum keine strikte Stöchiometrie zwischen wachstumsentkoppelter Glucoseaufnahme und Milchsäuresekretion gegeben war. Grundsätzlich ergaben sich aber – in Analogie zur Produktbildungskinetik – auch für die substrat-assoziierten Raten nur geringe fermentationspezifische Abweichungen, was für die Übertragbarkeit auf Simulationen, denen andere Presssäfte zugrunde lagen, von Vorteil war.

Kurzzusammenfassung:

- Die enzymatische Konversion der Kohlenhydrate (Maltooligomere, Maltotriose, Maltose und Glucose) kann jeweils durch eine Kinetik 1. Ordnung beschrieben werden.
- Der wachstumsentkoppelte Substratverbrauch wird mit einem Faktor von $\beta = 0,9$ beschrieben; die Abweichungen zur wachstumsentkoppelten Produktsekretion ergeben sich vermutlich aus der wachstumsphasenbedingten Veränderung des Quotienten von $Y_{P/X}$ und β .

5.3.4. Die Simulation der Fermentation mit unverdünntem Maibock-Presssaft

Die Wachstumskurve der Fermentation mit MB-Presssaft konnte gut durch das Modell beschrieben werden (Abbildung 24 A), sodass die final-berechnete Zellkonzentration lediglich um 1,6% höher als der empirisch-bestimmte Wert ausfiel (Tabelle 7). Scheinbar trat nach ca. 9 h eine Diauxie in der Wachstumskurve auf, wobei zu diesem Zeitpunkt sowohl Glucose als auch Proteine und Aminosäuren in hinreichender Konzentration vorhanden waren und dieses Wachstumsverhalten auch in weiteren Fermentationen mit PA-Presssaft (Abbildung 25 A) bzw. WeBo-Presssaft (Abbildung 26 A) nicht bestätigt werden konnte. Daher wurde angenommen, dass die plötzliche Verringerung der Wachstumsrate bei einer Prozesszeit von ca. 9 h auf prozesstechnische Einflüsse, wie z.B. die übermäßige Zugabe von Korrekturmittel, zurückzuführen war. Die Kohlenhydratkonzentrationen konnten gut durch das Modell beschrieben werden, wobei die Glucosekonzentration (in der frühen exponentiellen Phase) leicht überschätzt und die Maltosekonzentration leicht unterschätzt wurde. Sofern die Gesamt-Kohlenhydratkonzentration betrachtet wurde (Abbildung 24 B), ergaben sich allerdings nur noch minimale Unterschiede zwischen experimentellen und modellierten Daten. Auch bei der Milchsäurebildung konnten die empirischen Messpunkte sehr gut durch das Modell beschrieben werden – der finale empirische Milchsäuretitert wurde lediglich um 5% durch das Modell unterschätzt (Tabelle 7). Auch die Produktivität des Prozesses nach 15 h wurde durch das Modell lediglich um 1,2% unterschätzt, gleichwohl es sich dabei nicht um einen fixen Endwert, wie bei Zell- bzw. Milchsäurekonzentration, sondern um einen kinetischen Wert handelte.

Obwohl die empirischen Protein- und Gesamt-Aminosäurekonzentrationen eine breitere Streuung aufwiesen, konnten auch diese Konzentrationsverläufe tendenziell gut durch das Modell beschrieben werden (Abbildung 24 C). Dabei wurde keine der

Stickstoffquellen komplett verbraucht, was überdies für jede einzelne Aminosäure der Gesamt-Aminosäuren Massenbilanz galt (Daten nicht gezeigt).

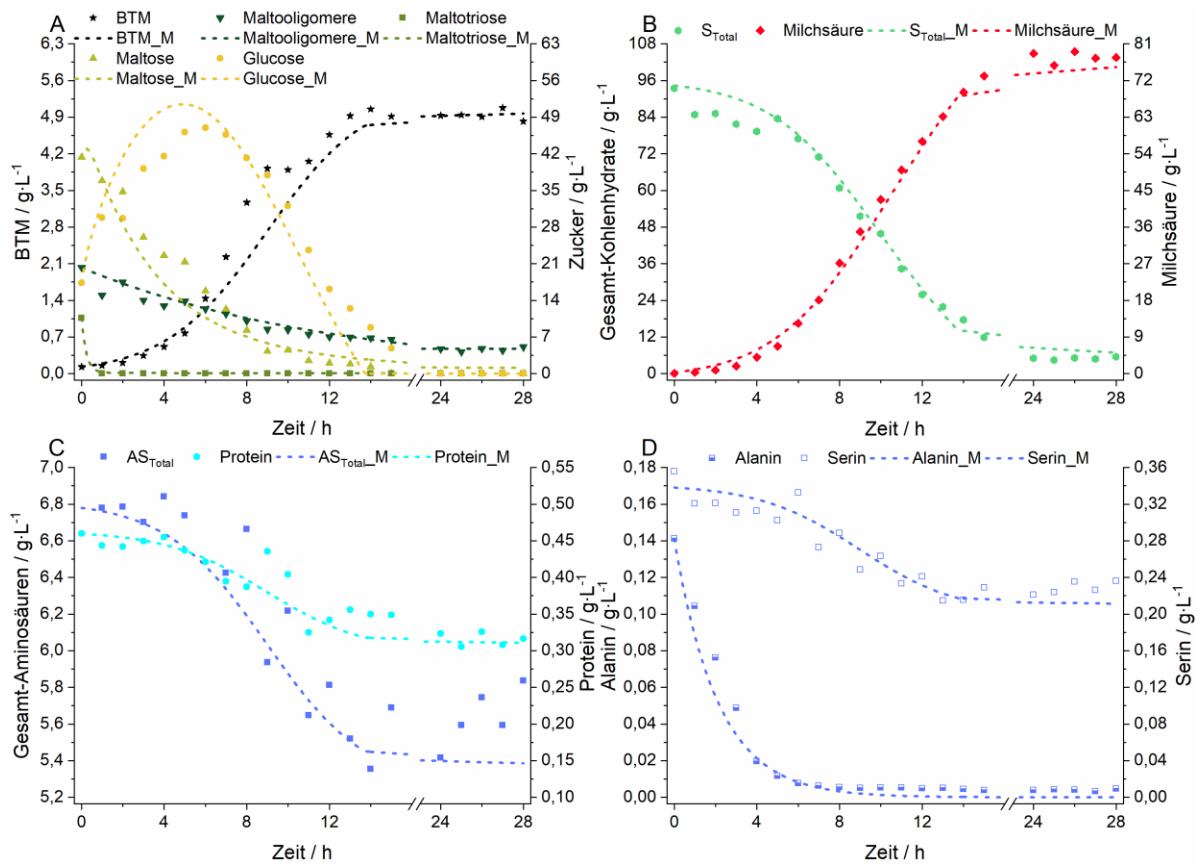


Abbildung 24: Simulationsergebnisse zur Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem MB-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation (VII)). Die berechneten Modellwerte werden durch unterbrochene Linien dargestellt und in der Legende durch „_M“ gekennzeichnet. **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration; BTM, Biotrockenmasse; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydratkonzentration; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäurekonzentration; N, Rührerdrehzahl; MB, Maibock [82].

Demgegenüber wurde das anfangs vorhandene Alanin sehr schnell komplett verbraucht, während Serin auch am Ende der Fermentation in einer Konzentration von $\sim 0,22\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ zur Verfügung stand (Abbildung 24 D). Interessanterweise folgte die Alaninaufnahme dabei einer unidirektionalen Kinetik 1. Ordnung. In der Literatur ist beschrieben, dass Alanin eine besondere Bedeutung für den Aufbau der Zellwand in *Lactobacillen* inne hat, und daher wachstumsentkoppelt in der Lag-Phase und frühen exponentiellen Phase aufgenommen wird, was die hier ermittelte Kinetik bestätigte [186]. Im Gegensatz dazu erfolgte die Aufnahme aller anderen Aminosäuren (inclusive Serin) wachstumsgekoppelt in der exponentiellen Phase gemäß der Differentialgleichung 1. Ordnung eines Batch-Prozesses. Serin besitzt (neben Cystein) eine besondere Bedeutung für den Stoffwechsel von *Lactobacillen*, da es intrazellulär in die Aminosäure Alanin umgewandelt werden kann, weswegen Serin auch nicht in die Massenbilanz für „Gesamt-Aminosäuren“ mit aufgenommen wurde [186]. Da Serin während der Fermentation allerdings

nicht vollständig verbraucht wurde, konnte im Umkehrschluss auch eine Limitation durch Alanin in dieser Fermentation ausgeschlossen werden [82].

Tabelle 7: Vergleich zwischen Experiment und Simulation für die drei Fermentationen mit unverdünntem MB-, PA-, und verdünntem WeBo-Presssaft in Bezug auf die maximale Zelldichte X_{max} , die maximale Produktkonzentration P_{max} und die Produktivität P in den ersten 11 h der Fermentation (WeBo) bzw. in den ersten 15 h der Fermentationen (MB & PA); MB, Maibock; PA, Pale Ale, WeBo, Weizenbock.

	Experiment			Simulation		
	MB	PA	WeBo	MB	PA	WeBo
$X_{max} / g \cdot L^{-1}$	5,04	3,16	1,56 ± 0,01	4,96	3,63	1,68
$P_{max} / g \cdot L^{-1}$	79,05	57,08	26,7 ± 0,69	75,3	67,03	22,76
$P / g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	4,93	3,58	2,01 ± 0,05	4,87	3,79	1,74

Die Proteinkonzentration verringerte sich vermutlich, da *L. delbrueckii* subsp. *lactis* die (Oligo-)Peptide intra- und extrazellulär hydrolysierte und die entstehenden Aminosäuren für den Metabolismus nutzte [228]. Obwohl bei vielen *Lactobacillen* die Fähigkeit zur Sekretion von extrazellulären Proteasen vorhanden ist, scheint diese Fähigkeit bei *L. delbrueckii* subsp. *lactis* besonders ausgeprägt zu sein, da hier von einer weitaus höheren Aminopeptidaseaktivität in zellfreien Überständen als für andere Stämme des gleichen Genus berichtet wurde [82, 239].

Kurzzusammenfassung:

- Die Fermentation mit Maibock-Presssaft kann durch das Modell bzgl. aller relevanten Stoffklassen (kohlenstoff- und stickstoffhaltige Substrate, Produkte & Zellbiomasse) sehr gut beschrieben werden.
- Die Alaninaufnahme folgt einer Kinetik 1. Ordnung, während alle anderen Aminosäuren durch die Differentialgleichungen 1. Ordnung eines Batch-Prozesses beschrieben werden können.

5.3.5. Die Übertragung der Simulation auf einen Prozess mit unverdünntem Pale Ale bzw. verdünntem Weizenbock-Presssaft

Der Aufbau der Modellgleichungen war anhand der empirischen Daten der Fermentation mit MB-Presssaft erfolgt – nun sollte die Vorhersagegenauigkeit des Modells für zwei weitere Fermentationen mit unverdünntem PA-Presssaft bzw. verdünntem WeBo-Presssaft begutachtet werden.

Die maximale Zellkonzentration der Fermentation mit PA-Presssaft (Tabelle 7) konnte durch das Modell recht gut beschrieben werden (Überschätzung durch das Modell um 12,9%), allerdings wurde die Wachstumsgeschwindigkeit, vor allem gegen Ende der exponentiellen Phase, leicht unterschätzt (Abbildung 25 A). Die Konzentrationsverläufe der einzelnen Kohlenhydrat-Spezies wurden weniger akkurat als für die Fermentation mit MB-Presssaft (Kapitel 5.3.4) beschrieben. Dies war aber auch auf die schwierige Analytik der Zucker in der komplexen Probenmatrix des Fermentationsmediums zurückzuführen und

weniger auf die Güte des Modells. Die Zuckeranalytik führte mitunter dazu, dass die Peakfläche eines Zuckers geringfügig falsch (z.B. zu hoch) bestimmt wurde, da eine Baseline-Separation nicht immer gegeben war. Dies wirkte sich dann direkt auf die ermittelte Peakfläche eines Zuckers mit naheliegender Retentionszeit aus, welcher dann entsprechend auch falsch (z.B. zu gering) bestimmt wurde. Dadurch war die Übereinstimmung zwischen Modell und Simulation in Bezug auf die einzelnen Zucker z.T. verbesserungswürdig, was aber nicht auf die Gesamt-Kohlenhydratkonzentration zutraf, bei der eine sehr gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Werten erzielt wurde (Abbildung 25 B). Die Milchsäurekonzentration wurde durch das Modell in der Wachstumsphase gut abgebildet, während die stationäre Milchsäurekonzentration mit 14,8% moderat überschätzt wurde (Tabelle 7). Die Produktivität wurde durch das Modell um 5,9% überschätzt, was wiederum als recht genau zu bezeichnen war.

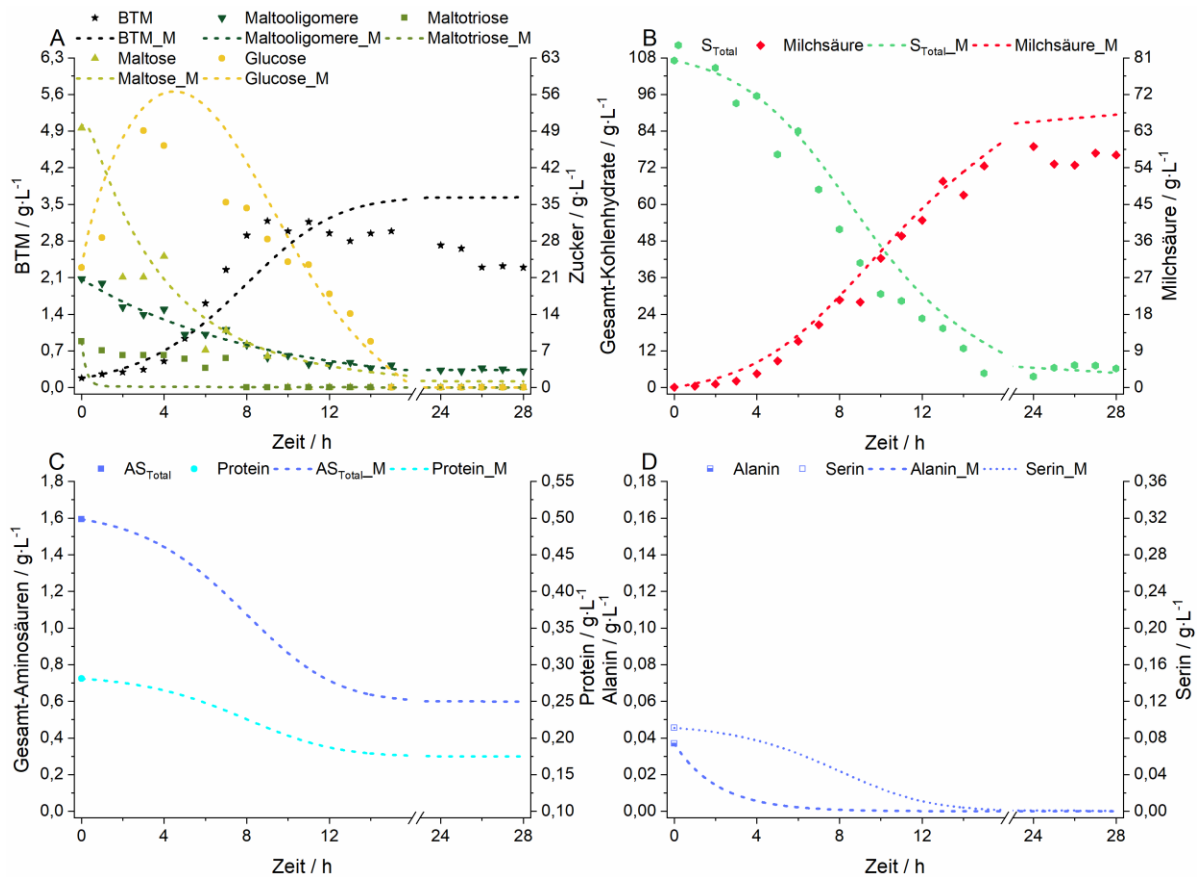


Abbildung 25: Simulationsergebnisse zur Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem PA-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation (VI)). Die berechneten Modellwerte werden durch unterbrochene Linien dargestellt und in der Legende durch „_M“ gekennzeichnet. **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration; BTM, Biotrockenmasse; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydratkonzentration; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäurekonzentration; N, Rührerdrehzahl; PA, Pale Ale [82].

Die anfänglichen Protein- und Aminosäurekonzentrationen (Abbildung 25 C & D) fielen in der Fermentation mit PA-Presssaft deutlich geringer als in der Fermentation mit MB-Presssaft aus, was auf geringere Konzentrationen im zugrundeliegenden Presssaft

zurückgeführt werden konnte (vgl. Tabelle 5). Daher berechnete das Modell nicht nur einen kompletten Alaninverbrauch in der Lag- und frühen exponentiellen Phase (wie beim MB-Presssaft), sondern auch eine vollständige Aufnahme des Serins. Möglicherweise kam es während dieser Fermentation also zu einer unzureichenden Aminosäure- und damit Stickstoffbereitstellung, was insbesondere auf die wichtige Aminosäure Serin zugetroffen haben könnte [186]. Vermutlich führte die unzureichende Serinbereitstellung, nicht nur im Modell, zu einer Limitation des Wachstums und einer geringeren finalen Zellbiomassekonzentration. Das limitierte Wachstum bzw. die verringerte Zellbiomassekonzentration könnte dann wiederum dazu geführt haben, dass die finale Milchsäurekonzentration der Fermentation mit MB-Presssaft um 38,5% höher als mit PA-Presssaft ausfiel, obwohl die initiale Gesamt-Kohlenhydratkonzentration um 12,8% verringert war [82].

Wie schon bei der Fermentation mit PA-Presssaft konnte die maximale Zelldichte für die Fermentation mit WeBo-Presssaft durch das Modell recht genau bestimmt werden (Überschätzung durch das Modell um 8,2%), wohingegen die Wachstumsrate wiederum zu gering berechnet wurde (Abbildung 26 A, Tabelle 7). Die finale Milchsäurekonzentration wurde durch das Modell um 24,8% und die Produktivität um 13,5% unterschätzt. Außerdem zeigte sich, dass die Absterbephase der Zellen nicht durch das Modell vorhergesagt werden konnte. Die Absterbephase könnte ohne Probleme durch weitere Terme in der Zellbiomassebilanz beschrieben werden [240–242], allerdings müssten zusätzliche Kriterien für das Einsetzen eines Absterbeprozesses definiert werden, da in der MB-Fermentation mit hohen Aminosäurekonzentration kein Rückgang der Zelldichte in der stationären Phase zu erkennen war, wohingegen dieser Effekt mit PA-Presssaft und insbesondere mit WeBo-Presssaft sichtbar wurde (in beiden Fällen waren deutlich geringere Aminosäurekonzentrationen im Fermentationsmedium vorhanden). Im Gegensatz zur Fermentation mit PA-Presssaft berechnete das Modell für die Fermentation mit WeBo-Presssaft aber keinen vollständigen Verbrauch der Aminosäure Serin (Abbildung 26 D). Ansonsten ließen sich für die Simulation des WeBo-Prozesses aber ähnliche Aussagen wie bei der Fermentation mit PA-Presssaft treffen: (a) Die Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment war für die einzelnen Zucker verbesserungswürdig – die Gesamt-Kohlenhydratkonzentration konnte aber äußerst valide vorhergesagt werden (Abbildung 26 B). (b) Die Kinetik der Milchsäurebildung hatte für die exponentielle Wachstumsphase eine große Übereinstimmung – der finale Titer wurde allerdings um 24,8% unterschätzt (Tabelle 7) [82].

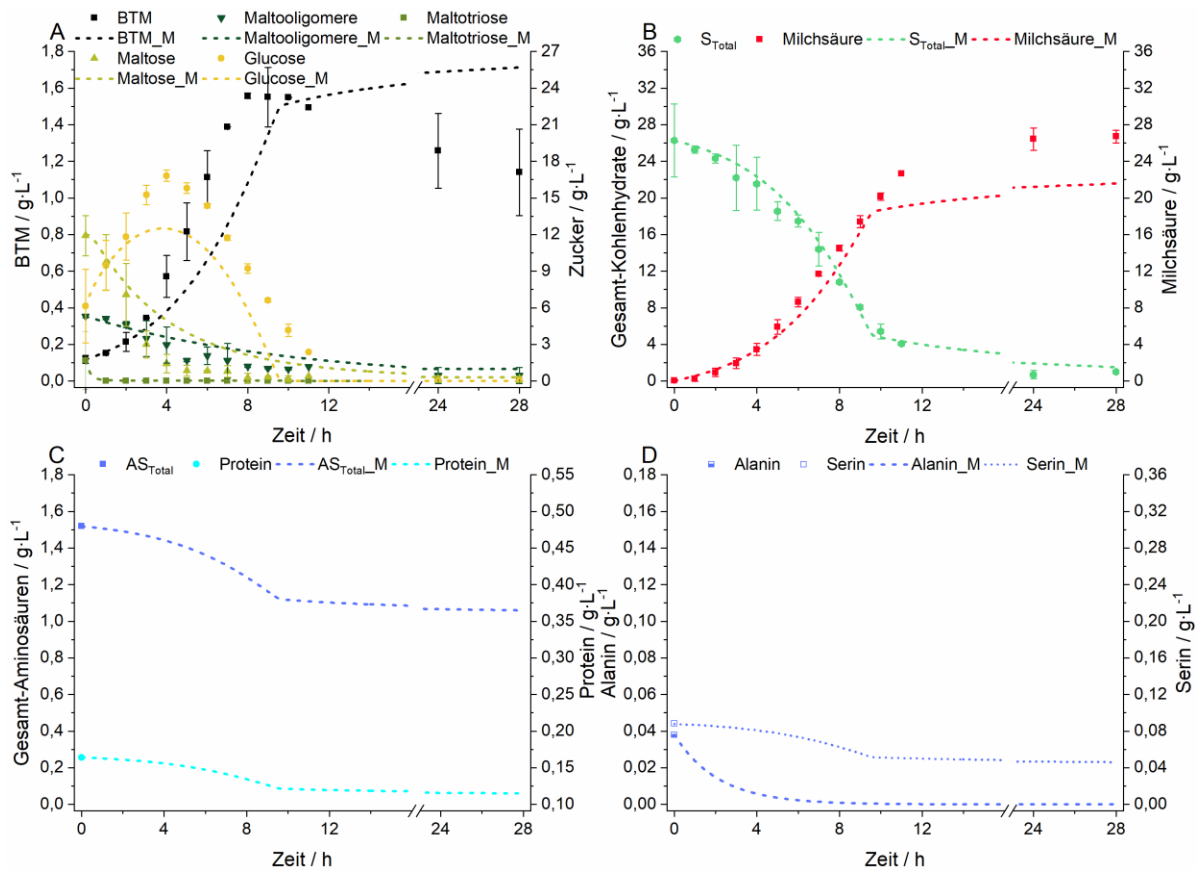


Abbildung 26: Simulationsergebnisse zur Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und verdünntem WeBo-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$. Die berechneten Modellwerte werden durch unterbrochene Linien dargestellt und in der Legende durch „_M“ gekennzeichnet. Die empirischen Werte zeigen die Mittelwerte aus den Fermentationen (IV) und (V), welche in Kapitel 4.5.7 vorgestellt wurden. **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration; BTM, Biotrockenmasse; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydratkonzentration; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäurekonzentration; N, Rührerdrehzahl; WeBo, Weizenbock [82].

Kurzzusammenfassung:

- Die Fermentation mit Pale Ale-Presssaft kann durch das Modell recht genau bzgl. der Gesamt-Kohlenhydratkonzentration sowie der Milchsäure-, und Zellbiomassekonzentration beschrieben werden; die Abweichungen für die einzelnen Kohlenhydrat-Spezies sind etwas größer.
- Die geringe Milchsäureausbeute und die, im Verhältnis zur anfänglichen Zuckerkonzentration, geringe finale Milchsäurekonzentration bei der Fermentation mit Pale Ale-Presssaft könnten auf den vollständigen Verbrauch von Serin im Fermentationsmedium zurückzuführen sein.
- Die Berechnungen durch das Modell weisen für die Fermentation mit Weizenbock-Presssaft größere Abweichungen zwischen simulierten und experimentellen Werten auf als dies für Maibock- und Pale-Presssaft der Fall ist.
- Das Modell kann den Absterbeprozess der Zellen in der stationären Wachstumsphase (bei der Fermentation mit Pale Ale- bzw. Weizenbock-Presssaft) nicht beschreiben. Vermutlich gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Einsetzen des Absterbevorgangs und der Aminosäure- bzw. Proteinausstattung des Treberpresssaftes.

5.3.6. Vergleich der drei Modellierungen

Die anfängliche Kohlenhydratzusammensetzung der untersuchten Fermentationsmedien unterschied sich nicht nur im Hinblick auf die Zusammensetzung der Kettenlängen, sondern auch hinsichtlich der Gesamtzuckerkonzentration sehr deutlich. So reichte die Gesamt-Kohlenhydratkonzentration von $26,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $107,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, was einer Variation um den Faktor 4,1 gleichkam. Auch die Gesamt-Aminosäurekonzentration bewegte sich im Bereich zwischen $1,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $6,78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Variation: Faktor 4,5) und die Proteinkonzentration variierte ebenfalls stark zwischen $0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $0,46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Variation: Faktor 2,9). Demgegenüber erschienen die, in den Kapitel 5.3.4 und 5.3.5 berichteten, Abweichungen zwischen Simulation und Experiment von 1,2% – 24,8% recht gering. Darüber hinaus konnte das Modell das komplexe Zusammenspiel von kohlenstoffhaltigen und stickstoffhaltigen Substraten recht genau beschreiben, sodass die Kinetik von Fermentationen mit Treberpresssaft in Zukunft vorhergesagt werden kann, sofern die anfängliche Konzentration von Maltooligomeren, Maltotriose, Maltose, Glucose, Bradford-Protein und 16 Aminosäuren bekannt ist. Dabei kann die Simulation mit einem der bereitgestellten Parametersätze (Tabelle 4) erfolgen, sofern Informationen zum zugrundeliegenden Brauprozess vorhanden sind. Andernfalls könnten die Berechnungen auch mit einem Mittelwert der Parameter durchgeführt werden, da diesbezüglich keine großen Abweichungen zwischen den Fermentationen festgestellt wurden. Allerdings wird die Simulation umso genauer, desto besser diese Parameter abgeschätzt werden können – insbesondere trifft dies auf den Faktor für die wachstumsentkoppelte Produktbildung β und die Zellbiomasse/Substrat-Ausbeute $Y_{X/S4}$ zu.

Kurzzusammenfassung:

- Die Abweichungen zwischen Modell und Experiment erscheinen recht gering, sofern die großen Variationen des Nährstoffgehaltes der verwendeten Fermentationsmedien (auf Basis von unterschiedlichen Treberpresssäften) betrachtet werden.

5.4. Fermentationen mit dem festen Rückstand

In Kapitel 5.2 wurde die Entwicklung eines Prozess beleuchtet, durch welchen die abpressbaren Treberbestandteile fermentativ zu Milchsäure konvertiert werden konnten. Da der Rückstand dieses Pressschrittes mit Cellulose, Hemicellulose (C-Quellen) und Proteinen (N-Quelle) zahlreiche interessante Rohstoffe für Bioprozesse enthielt, wurde ein Prozess entwickelt, bei dem der Organismus *Cellulomonas uda* die festen Treberbestandteile in suspendierter Form zu löslichen Wertstoffen (hauptsächlich Essigsäure und Ethanol) in einer Gemischtsäuregärung umsetzen konnte [11]. Das Monitoring von Bioprozessen mit hohen Feststoffgehalten gestaltet sich oft schwierig [243–245]. Zudem ist wenig über den Organismus *C. uda* bekannt, wodurch prozesstechnische Einflussmöglichkeiten auf den Stoffwechsel ebenfalls weitgehend unerforscht sind. Dementsprechend wurde der

Zentralstoffwechsel des Organismus aufgeklärt, um in einem zweiten Schritt die fermentations- und prozesstechnischen Einflussmöglichkeiten auf den Stoffwechsel zu untersuchen. Dabei wurden zahlreiche Analyse-, Regulations- und Monitoring-Verfahren eingesetzt und (weiter) entwickelt. Schlussendlich wurde die Fermentation vom Kolbenmaßstab (mit niedrigen Feststoffbeladungen) auf den Reaktormaßstab und auf höhere Feststoffkonzentrationen übertragen [193].

5.4.1. Aufklärung des Zentralstoffwechsels von *Cellulomonas uda*

Die Genome von *C. uda* und *C. gilvus* enthielten ca. 3,5 Mio. Nukleotide und stimmten in ihrer Sequenz zu 89,3% überein. Demgegenüber hatte das Genom von *C. fimi* (*C. flavigena*) sogar 4,2 (4,1) Mio. Nukleotide, wobei die Sequenzidentität zu *C. uda* mit 84,7% (87,8%) etwas geringer ausfiel. Obwohl auch *C. fimi* und *C. flavigena* als artverwandte Organismen von *C. uda* identifiziert worden waren [246, 247], schien die genetische Ähnlichkeit und somit die evolutionäre Nähe zu *C. gilvus*, in Bezug auf das komplette Genom, also größer zu sein.

Bei der Beurteilung des Zentralstoffwechsels ergab sich ein ähnliches Bild: So war die Sequenzidentität für das Gen der Formiat:NAD⁺ Oxidoreduktase (E.C.: 1.17.1.9), welches für die Umwandlung von Ameisensäure in CO₂ verantwortlich ist, zwischen *C. fimi* und *C. uda* am höchsten, während alle anderen untersuchten Gene die größte Übereinstimmung zwischen *C. gilvus* und *C. uda* aufwiesen. Abbildung 27 zeigt den postulierten Zentralstoffwechsel von *C. uda*, der aus den Genhomologien zwischen *C. uda* und *C. gilvus* bzw. *C. fimi* aufgebaut wurde.

Dabei zeigte sich, dass *C. uda* die aufgenommenen Kohlenhydrate in den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg einspeist und ausgehend von Pyruvat fünf lösliche Produkte (Organische Säuren: Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Solvens: Ethanol) und CO₂ als gasförmiges Produkt produzieren kann. Diese Stoffwechselendprodukte stellen die Produkte einer klassischen Gemischtsäuregärung dar, wurden zuvor bereits in empirischen Versuchsreihen für den Organismus beschrieben [143, 144, 146, 190] und nun durch die bioinformatische Genanalyse bestätigt. Während bei der Essigsäureproduktion der Energieträger ATP über zwei der drei Stoffwechselwege gebildet werden kann, dienen die anderen Stoffwechselendprodukte vornehmlich der Regulation des Redoxzustandes der Zelle, indem das intrazelluläre NADH/NAD⁺ Verhältnis beeinflusst werden kann.

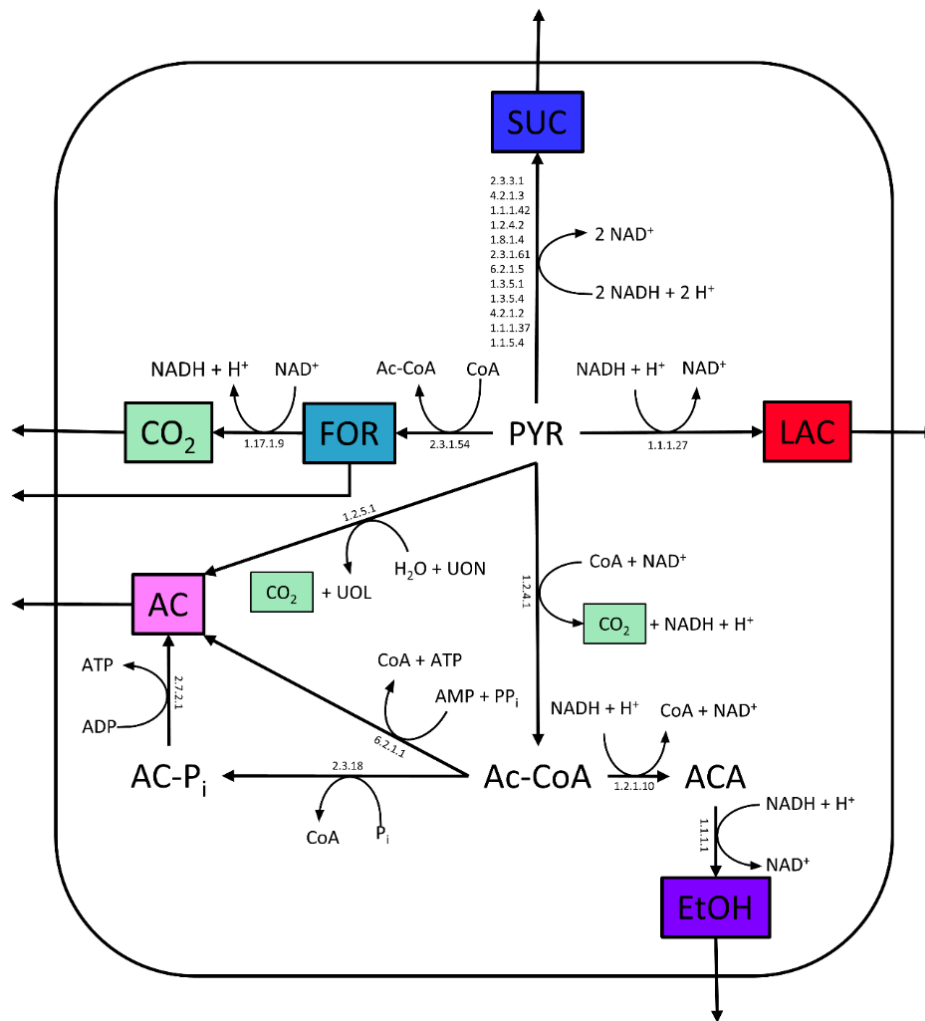


Abbildung 27: Potenzieller Zentralstoffwechsel von *C. uda*; Anmerkung: Zu jeder Reaktion sind die zugehörigen E.C.-Nummern gegeben; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; EtOH, Ethanol; AC, Essigsäure; FOR, Ameisensäure; CO₂, Kohlenstoffdioxid; H₂O, Wasser; NADH, Nicotinamid Adenin Dinucleotid (reduziert); NAD⁺, Nicotinamid Adenin Dinucleotid (oxidiert); CoA, Coenzym A; Ac-CoA, Acetyl-Coenzym A; AT(D,M)P, Adenosintri-(di-,mono-)phosphat; P_i, Phosphat; PP_i, Diphosphat; UON, Ubiquinon; UOL, Ubiquinol [11].

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die unidirektionalen Reaktionspfeile nicht zwangsläufig einen unidirektionalen Charakter der Reaktion beschreiben. Die meisten der beteiligten Enzyme katalysieren bidirektionale Reaktionen: So wurde die Fähigkeit zur Reassimilation von Milchsäure in anderen *Cellulomonadaceae* berichtet [144] und die Fähigkeit zur Wiederaufnahme von Essigsäure wurde für *C. uda* in eigenen Fermentationen beobachtet (vgl. Abbildung A 2). Die Reaktionspfeile symbolisieren folglich nur die wahrscheinlichste Gleichgewichtslage unter fermentativen Bedingungen [11].

Kurzzusammenfassung:

- Genhomologien zu den artverwandten Organismen *C. fimi* und *C. gilvus* legen nahe, dass *C. uda* alle Gene zur Produktion von Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Ethanol und CO₂ aus Pyruvat besitzt.
- ATP kann als Nebenprodukt der Essigsäureproduktion über zwei von drei möglichen Stoffwechselwegen gebildet werden.

5.4.2. Wachstum von *C. uda* unter aeroben & anaeroben Bedingungen

Abbildung 28 zeigt das Wachstum von *C. uda* unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Bezug auf (Teilabbildung in Klammern): Produktbildung und Treberverbrauch (A,B), Zellwachstum (C,D) sowie Cellulase- und Xylanase-Aktivität (E,F). Außerdem sind der Gehalt an hydrolysiertem Treber-Protein (C) für die anaerobe Fermentation und die Konzentration von Pyridoxin (D) für den aeroben Fall dargestellt.

In der anaeroben Fermentation wurden in einer Gemischtsäuregärung fünf lösliche Produkte (Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol) gebildet, die bereits zuvor für das Wachstum mit Cellulose identifiziert worden waren [146]. In erster Linie wurden dabei Essigsäure und Ethanol in einem äquimolaren Verhältnis von $1,15 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}_{\text{Ac}}^{-1}$ in das Fermentationsmedium sekretiert. Ein ähnliches Verhältnis dieser beiden Produkte wurde bereits für das Wachstum von *Cellulomonas* sp. (ATCC 21399) mit Cellulose beschrieben [248]. Die Produkt/Treber-Ausbeute nahm, bezogen auf die löslichen Stoffwechselendprodukte, einen Wert von $Y_{P/S} = 0,41 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{Prod}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ an.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich wird, kann aber sowohl für die Bildung von Essigsäure als auch von Ethanol die Produktion einer äquimolaren Menge CO_2 vorausgesetzt werden. Sofern dieses gasförmige Produkt in der Ausbeute berücksichtigt wurde, erhöhte sich der Wert auf $Y_{P/S+\text{CO}_2} = 0,73 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{Prod}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$. Die Zellbiomasse/Treber-Ausbeute wurde gemäß Kapitel 4.9.2 mit einem Wert von $Y_{X/S} = 0,11 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ berechnet, wobei Zellwachstum erst gegen Ende des Prozesses in geringem Maße stattfand (Abbildung 28 C).

Cellulomonadaceae können Ameisensäure zu CO_2 oxidieren, um reduzierte NADH-Spezies zu regenerieren [144]. Interpretiert man den Rückgang der Ameisensäurekonzentration nach einer Fermentationszeit von ca. 6 Tagen (Abbildung 28 A) als Reassimilation von Ameisensäure und Oxidation zu CO_2 , würde sich auch die Lücke in der Kohlenstoffbilanz von ca. 16 % erklären lassen. Die Treber-Konzentration sank unter sauerstofffreien Bedingungen von $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $28,1 \pm 0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 28 A), wobei die Bestandteile zu unterschiedlichen Anteilen verbraucht wurden: Die Proteinfraction wurde zu 85,7% degradiert, wobei bis zu 7,5% des abgebauten Proteins (6,5% des ursprünglichen Proteins) in der Fermentationsbrühe akkumulierten und nicht in die Zelle aufgenommen wurden. Die Lipidfraktion wurde um 51,2% reduziert, die Cellulose- und Hemicellulosefraktion wurden zu 32,8% bzw. 23,2% abgebaut. Lignin wurde nur in geringerem Maße degradiert (Abbau von 19,7%). Lignin besitzt für *Cellulomonas* zwar keinen Nährwert, aber der Abbau könnte ggfs. notwendig sein, da es sich bei der bakteriellen Degradation von lignocellulosehaltiger Biomasse immer um einen synergistischen Prozess handelt [249–251].

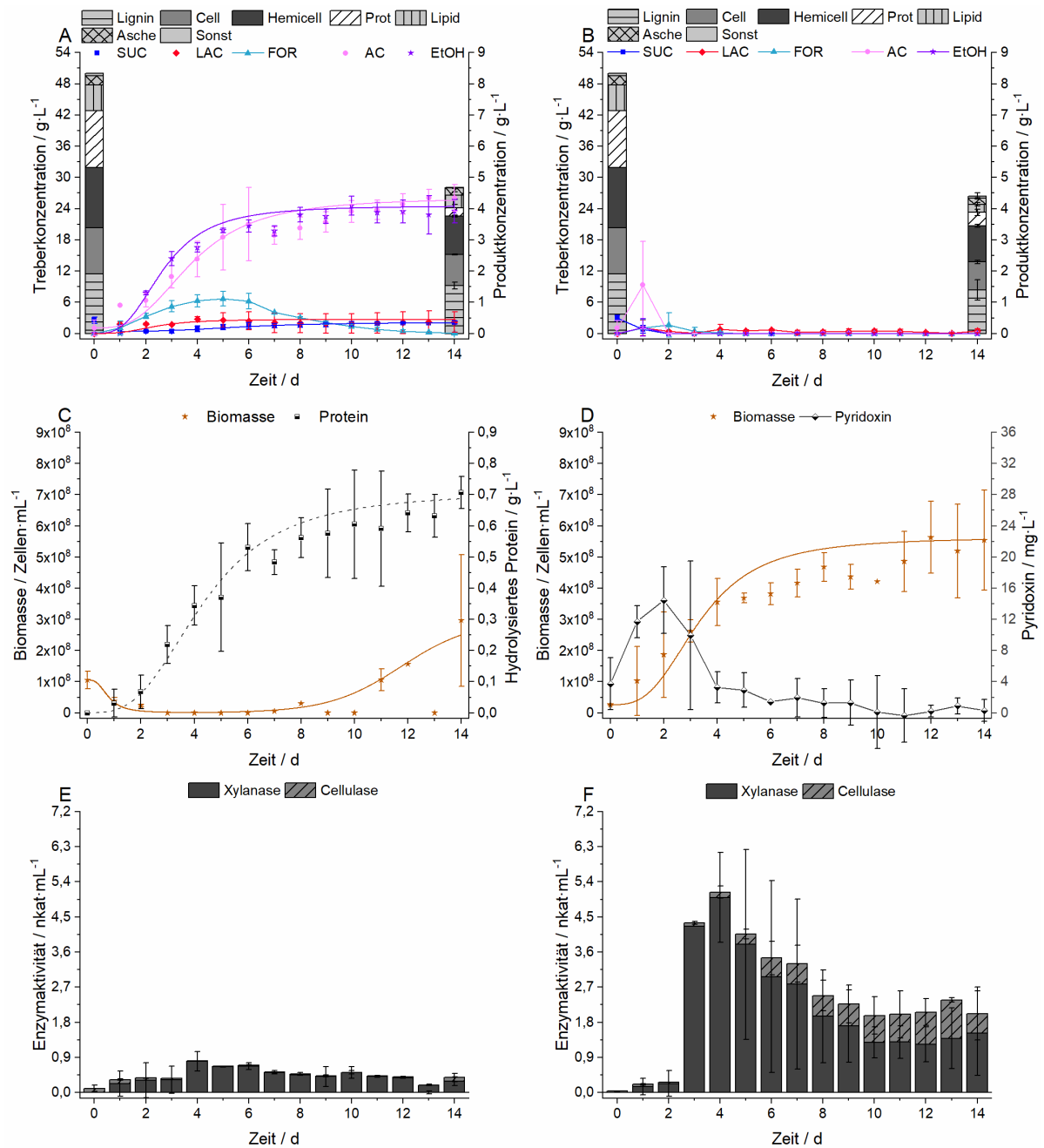


Abbildung 28: Fermentationen mit *C. uda* in einem Medium aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber und 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 und 120 rpm. Die Teilabbildungen A, C und E zeigen anaerobe Bedingungen; die Teilabbildungen B, D und F beschreiben den aeroben Versuch. **A+B)** Produktkonzentrationen von Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol sowie Substratkonzentration unter Einbeziehung der Treber-Bestandteile: Lignin, Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche und sonstiger Bestandteile, **C+D)** Zellbiomassebildung und hydrolysierte Proteinkonzentration bzw. Pyridoxin-Konzentration, **E+F)** Xylanase- und Cellulase-Aktivität. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten mit Ausnahme der Treberkonzentration zu Beginn der Fermentation; Cell, Cellulose; Hemicell, Hemicellulose; Prot, Protein; Sonst, Sonstige; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11].

Unter sauerstoffhaltigen Bedingungen produzierte *C. uda* hauptsächlich Zellbiomasse und sekretierte kaum lösliche Produkte in das Fermentationsmedium (Abbildung 28 B), was so auch schon in der Literatur beschrieben worden war [146]. Dabei war für ca. 7 Tage ein sigmoidaler Anstieg der Zelldichte zu beobachten (Abbildung 28 D),

der zu einer Zellbiomasse/Treber-Ausbeute von $Y_{X/S} = 0,22 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ führte, was einer Verdopplung der Ausbeute (im Vergleich mit den anaeroben Bedingungen) entsprach. Wurde die Zellausbeute nur auf die verbrauchten Kohlenhydrate im Treber bezogen, so stieg sie auf $Y_{X/KH} = 0,64 \pm 0,14 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{Kohlenhydrate}}^{-1}$, was etwas höher war, als dies zuvor für *C. biazotea* in der Literatur beschrieben worden war ($Y_{X/KH} \approx 0,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{Kohlenhydrate}}^{-1}$) [150]. Die ermittelten Zellausbeuten wurden außerdem durch bildgebende Verfahren gemäß Kapitel 4.7.8 untersucht und verifizierten die höheren Zelldichten unter aeroben Bedingungen (Abbildung 29). Des Weiteren wurde gemäß Kapitel 4.7.7 eine Korrelation zwischen optischer Dichte $OD_{600 \text{ nm}}$ und Zellzahl C ermittelt, die in Gl. (27) gegeben ist:

$$C = OD_{600 \text{ nm}} \cdot 10^7 \quad \text{Gl. (27)}$$

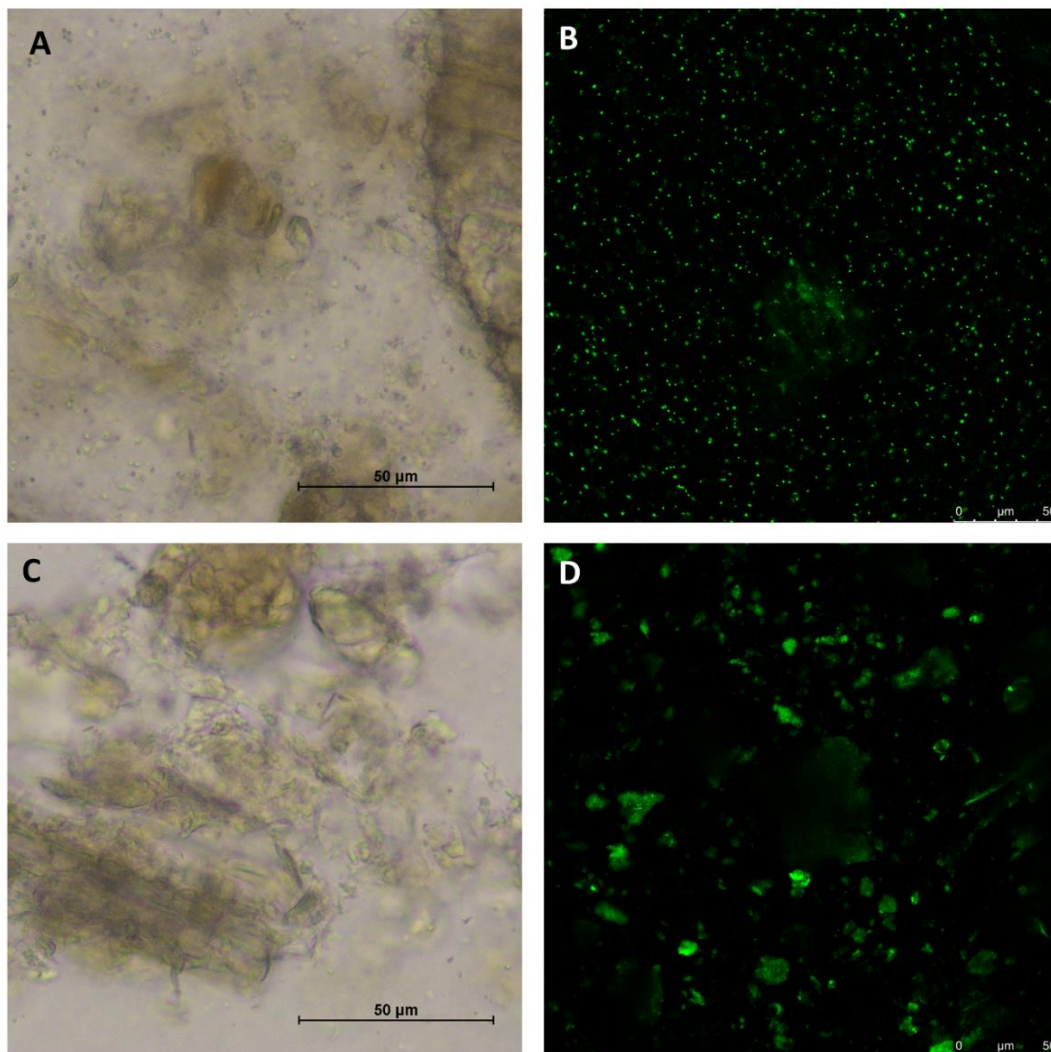


Abbildung 29: Visualisierung des Wachstums von *C. uda* nach 4 Tagen mit 5 Gew.-% gepresstem MB-Treber und $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$ und 120 rpm : **A)** Lichtmikroskop, aerob, **B)** CLSM nach Färbung mit Syto 9, aerob, **C)** Lichtmikroskop, anaerob, **D)** CLSM nach Färbung mit Syto 9, anaerob. Anmerkung: Die lichtmikroskopischen Bilder wurden quadratisch ausgeschnitten, der Maßstab in den CLSM-Aufnahmen befindet sich am rechten unteren Bildrand; CLSM, Confokale Laser-Scanning Mikroskopie [11].

Da praktisch keine löslichen Stoffwechselendprodukte in der aeroben Fermentation akkumulierten, fiel auch die Produkt/Treber-Ausbeute mit $Y_{P/S} = 0,004 \pm 0,033 \text{ g}_{\text{Prod}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ entsprechend gering aus. Für den Organismus *Cellulomonas gelida* UQM 2480 wurde jedoch eine um das 81,6-fach erhöhte CO_2 -Produktion berichtet, sofern (quasi) anaerobe Bedingungen mit einer Sauerstoffkonzentration $<0,1\%$ mit aeroben Bedingungen bei einer Sauerstoffkonzentration von 21% verglichen wurden [252]. Wenn diese vermehrte CO_2 -Produktion für die beschriebene Fermentation angenommen wurde, erhöhte sich die Ausbeute auf $Y_{P/S+\text{CO}_2} = 1,11 \pm 0,16 \text{ g}_{\text{Prod}} \cdot \text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$. Die Treberkonzentration sank während der aeroben Fermentation von $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $26,1 \pm 1,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 28 B), wobei die Komponenten wiederum unterschiedlich stark vom bakteriellen Abbau betroffen waren. Die Proteinfraction wurde zu 76% abgebaut und war damit erneut diejenige Fraction des Trebers mit dem stärksten Rückgang. Lipide, Cellulose, Hemicellulose und Lignin wurden zu 68,5%, 39%, 40,1% bzw. 27,1% abgebaut. Im Allgemeinen wurde unter aeroben Bedingungen also ein etwas höherer Anteil der Kohlenhydratfraction und ein etwas geringerer Anteil der Proteinfraction als unter anaeroben Bedingungen verbraucht [11].

Kurzzusammenfassung:

- Unter anaeroben Bedingungen findet Zellwachstum in geringem Maße statt; es werden die Produkte einer klassischen Gemischtsäuregärung – vornehmlich aber Essigsäure und Ethanol – gebildet.
- Unter aeroben Bedingungen steigt die Zelldichte für 7 Tage sigmoidal an, lösliche Stoffwechselendprodukte werden nicht gebildet.
- Beim bakteriellen Abbau des Trebers handelt es sich um einen synergistischen Prozess, der alle Fractionen des Trebers beeinflusst; insbesondere die Proteinfraction wird in hohem Maße degradiert.

5.4.3. Enzymaktivität von *C. uda* unter aeroben & anaeroben Bedingungen

In den meisten Literaturstellen, die sich mit *Cellulomonadaceae* beschäftigen, wird entweder die Cellulase/Glucanase-Aktivität [150, 151, 253] oder die Xylanase-Aktivität [152, 153, 254, 255] des Organismus dargestellt. Gelegentlich werden aber auch ganzheitliche Ansätze verfolgt, die verschiedene Enzymklassen beinhalten [7, 256]. In dieser Arbeit fielen die Enzymaktivitäten unter anaeroben Bedingungen mit $A_{\text{Cell,max}} = 0,10 \pm 0,02 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $A_{\text{Xyl,max}} = 0,80 \pm 0,25 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ recht gering aus (Abbildung 28 E), wohingegen sie unter sauerstoffhaltigen Bedingungen auf $A_{\text{Cell,max}} = 0,98 \pm 0,05 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $A_{\text{Xyl,max}} = 5,0 \pm 1,14 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ anstiegen (Abbildung 28 F). Unter aeroben Bedingungen wurde die Enzymaktivität von *Cellulomonas* sp. B6 mit ca. $3,3 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ für Cellulase und $10,0 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ für Xylanase angegeben, wenn die Zellen auf lignocellulosehaltigen Substraten, wie z.B. Extruder-vorbehandeltem Weizenstroh oder Zuckerrohrstroh, kultiviert wurden, was gut mit den hier beobachteten Werten übereinstimmte [256]. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Tendenzen bzgl. der Enzymaktivität beim Wachstum von *C. uda* mit

Treber festgestellt werden: (a) Die enzymatische Aktivität war unter aeroben Bedingungen stets höher als in einer sauerstofffreien Umgebung, was in der Literatur bereits für das Wachstum von *C. uda* mit Cellulose berichtet wurde [146]. (b) Die Xylanaseaktivität war sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen höher als die Cellulaseaktivität. Dieser Effekt wurde bereits für *C. flavigena* NIAB 441 und verschiedene lignocellulosehaltige Substrate, wie Weizenstroh, Grasstroh oder Bagasse, beschrieben. In der entsprechenden Literaturstelle wird erläutert, dass die Xylanaseaktivität zwar um den Faktor 3 bis 6 verringert (aber niemals komplett heruntergefahren) werden kann, sofern xylanfreie Substrate, wie z.B. Carboxymethylcellulose, Watte, Baumwollstängel oder Filterpapier eingesetzt werden [257]. Überraschend war zudem, dass die Xylanaseaktivität zu späteren Fermentationszeitpunkten wieder abnahm, was am besten in Abbildung 28 F zu erkennen ist. Einerseits kann die Präsenz von Xylan den Celluloseabbau hemmen, was sowohl für technische Enzymmischungen [258] als auch für gentechnisch modifizierte *Saccharomyces cerevisiae*, welche Cellobiose metabolisieren kann, berichtet wurde [259]. Andererseits wurde auch gezeigt, dass der Zusatz von Cellobiose zum Kulturmedium die Expression von membrangebundenen und sekretierten Cellulasen in *Cellulomonadaceae* reprimieren kann [148]. Darüber hinaus können viele Enzyme durch physikalische Interaktion mit lignocellulosehaltigen Materialien inaktiviert werden [260–262]. Die Aktivitätsverluste, welche bei der Xylanase beobachtet wurden, könnten durch vergleichbare Effekte ausgelöst worden sein und wurden in der Literatur bereits für die Cellulaseaktivität anderer *Cellulomonadaceae* beschrieben [11, 148].

Kurzzusammenfassung:

- Unter aeroben Bedingungen sind die Xylanase- und Cellulaseaktivitäten deutlich höher als unter anaeroben Bedingungen.
- Zu späten Prozesszeitpunkten kommt es zu Aktivitätsverlusten – möglicherweise durch regulatorische Mechanismen oder physikalische Interaktion zwischen Enzymen und lignocellulosehaltiger Biomasse.

5.4.4. Fluorophore unter aeroben & anaeroben Bedingungen

In der Literatur sind für biologische Prozesse vier wichtige Fluorophore beschrieben worden: Tryptophan, Riboflavin, NAD(P)H, Pyridoxin sowie Pyridoxin-Derivate wie Pyridoxamin und Pyridoxal-5'-phosphat. Außerdem handelt es sich bei den Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin um weitere wichtige, biogene Fluorophore [263, 264]. In Fermentationen mit lignocellulosehaltigen Substraten können zusätzlich Humin- und Fulvosäuren, welche durch Degradation aus Lignin entstehen können, Fluorophore darstellen [265]. In den Fermentationen dieser Arbeit wurde Pyridoxin ausschließlich zu Beginn der aeroben Fermentation detektiert (Abbildung 28 D), während Tryptophan (als Hinweis auf hydrolysiertes Treber-Protein) nur in der anaeroben Fermentation zu sehen war

(Abbildung 28 C). Beide Signale zeigten im gefilterten Überstand die gleiche oder sogar eine erhöhte Intensität im Vergleich zur unbehandelten Fermentationssuspension, sodass nicht von einer zell- oder treberassoziierten Fluoreszenz ausgegangen werden konnte.

Pyridoxin spielt eine wichtige Rolle im Aminosäurestoffwechsel vieler Organismen, was beispielhaft bereits für *E. coli* K12 gezeigt wurde [266]. Die große Bedeutung kann auch anhand der folgenden Beispiele erläutert werden: (a) In *S. cerevisiae* RTY110/pRB58 kann die intrazelluläre Pyridoxinkonzentration mit der metabolischen Aktivität und dem exponentiellen Zellwachstum korreliert werden [263]. (b) Die Respirationsrate von aerob kultivierter *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 erhöht sich um das 3,5-fache, wenn der Fermentationsbrühe Pyridoxin zugesetzt wird [267]. (c) Pyridoxin ist ein wichtiger Co-Faktor im Krebs-Zyklus [268]. (d) Pyridoxal-5'-phosphat, welches aus Pyridoxin synthetisiert werden kann, ist ein Cofaktor für die Synthese von 5-Aminolävulinsäure, welche wiederum die Vorstufe für die Synthese verschiedener Tetrapyrrole in Bakterien darstellt [269]. Diese Moleküle spielen eine wichtige Rolle als Cofaktoren für Häm-haltige Enzyme, die in der Atmungskette lokalisiert sind. In diesem Zusammenhang ist Cytochrom C eines der wichtigsten Proteine, welches bereits in der Membran von *Cellulomonas fimi* nachgewiesen werden konnte [8]. Da sich das Fluoreszenzsignal im Kulturüberstand befand, erscheint es wahrscheinlich, dass *C. uda* Pyridoxin aus dem Treber extrahiert und es in einem zweiten Schritt in die Zelle aufnimmt, um Cofaktoren für die Aminosäuresynthese und/oder die Zellatmung zu generieren. Da Pyridoxin jedoch ausschließlich in aeroben Prozessen nachgewiesen werden konnte, spricht einiges dafür, dass Pyridoxin mit der Zellatmung in Verbindung steht. Allerdings muss erwähnt werden, dass der Pyridoxingehalt von Treber in der Literatur mit 0,7 ppm in deutlich geringen Konzentrationen bestimmt wurde, als dies in der vorliegenden Arbeit der Fall war [13].

Viele Bodenbakterien sind in der Lage, extrazelluläre Proteasen zu sezernieren, da die Stickstoff-Verfügbarkeit in ihrem Habitat meist auf proteinhaltige Quellen beschränkt ist [270, 271]. Unter diesen Bodenbakterien befinden sich auch *Cellulomonadaceae*, z. B. *C. bogoriensis* [272] oder *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 [273], die (temperatur- und pH-resistente) Proteinasen produzieren können. Die Proteinverwertung ist einerseits durch die direkte Aufnahme von Aminosäuren und/oder Peptiden möglich, wobei die Peptide der Zelle als Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle dienen. Zum anderen ist die Aufnahme nach Desaminierung (z. B. hydrolytisch, reduktiv oder oxidativ) und in Form von Ammoniak oder Nitrat (nach Nitrifikation von NH_4^+) möglich. In diesem Falle wird nur der Stickstoffbedarf der Bakterien gedeckt. Die zweite Strategie greift insbesondere dann, wenn die Kohlenstoffverfügbarkeit hoch ist (in der vorliegenden Arbeit z.B. unter aeroben Bedingungen), da die Expression einer Aminosäure-Oxidase und eines NH_4^+ -Transporters energetisch günstiger ist, als es die Expression von zahlreichen Proteasen und aktiven (d.h.

ATP-verbrauchenden) Transportern für verschiedene Aminosäuren, Di- und Oligopeptide sein kann. Zudem ist der Kohlenstoff des Proteins/ der Aminosäuren für die Zellen bei großer Kohlenstoff-Verfügbarkeit häufig nicht nötig, da dieser Bedarf z.B. durch Kohlenhydrate gedeckt werden kann [3, 274–276]. Die Desaminierung von Aminosäuren durch eine Aminosäureoxidase wurde in der Literatur bereits für *C. cellulans* AM8 beschrieben [277]. Außerdem wurde in einem peptonhaltigen Medium die Freisetzung von NH_4^+ durch *C. uda* nachgewiesen, was ein starkes Indiz für die Expression einer Aminosäureoxidase darstellt [143]. In der aeroben Fermentation wurden vermutlich alle, durch den Abbau des Treberproteins entstehenden, Aminosäuren durch eine der genannten Mechanismen verbraucht, da zu keinem Zeitpunkt eine Tryptophanfluoreszenz beobachtet wurde (Abbildung A 1 Teilabbildung E), aber der Proteingehalt im Treber deutlich reduziert wurde (Kapitel 5.4.2). Im Gegensatz dazu reicherten sich bei der anaeroben Fermentation Tryptophan oder tryptophanhaltige Peptide in der Fermentationsbrühe an, die einer Proteinkonzentration von etwa $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ entsprachen (vgl. Gl. (20)). Sofern Tryptophan durch UV-Bestrahlung desaminiert (oder decarboxyliert) wurde, zeigte sich, dass die Abbauprodukte, welche häufig noch einen Indolring besaßen, trotzdem keine fluoreszierenden Eigenschaften mehr aufwiesen [278]. Da bei enzymatischer Desaminierung ähnliche Effekte auftreten dürften, könnte dies auf das Fehlen oder zumindest die verminderte Expression einer Aminosäureoxidase unter anaeroben Bedingungen hindeuten. Dies könnte wiederum durch eine geringe Kohlenstoffverfügbarkeit induziert worden sein, da die Cellulase- bzw. Xylanase-Aktivitäten in der anaeroben Fermentation geringer waren und es somit auch zu einem geringeren Abbau von Strukturkohlenhydraten kam.

In beiden Fermentationen (aerob und anaerob) bildete sich im Laufe der Fermentation ein zusätzlicher Peak im Bereich von $\text{Ex} = 320 \text{ nm} - 420 \text{ nm}$, $\text{Em} = 400 \text{ nm} - 540 \text{ nm}$, welcher in der Literatur als Fulvinsäure-ähnliche Fluoreszenz beschrieben wurde (Abbildung A 1 Teilabbildung E/F) [279]. Viele Bodenbakterien sind in der Lage, Lignin mit Hilfe von Peroxidasen oder Laccasen abzubauen [280]. Im Speziellen wurde bei *Cellulomonas* sp. eine Mangan-Peroxidase beschrieben [281], bei welcher es sich um eines der weitverbreitetsten Lignin-abbauenden Enzyme überhaupt handelt [282]. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass der beschriebene, breite Peak, der überdies im aeroben Falle eine erhöhte Intensität aufwies, auf den Abbau von Lignin zurückzuführen war, da der Ligninabbau in der aeroben Fermentation ebenfalls stärker ausfiel (Kapitel 5.4.2). Ein Nachweis konnte jedoch nicht erbracht werden, da Calciumlignosulfonat und Fulvosäure andere fluoreszierende Eigenschaften als die Fermentationsproben zeigten (Abbildung A 4) [11].

Kurzzusammenfassung:

- Unter aeroben Bedingungen kann zu Beginn der Fermentation eine Pyridoxinfluoreszenz nachgewiesen werden. Vermutlich wird Pyridoxin aus dem Treber extrahiert und dient *C. uda* als Co-Faktor für Enzyme der Atmungskette.
- Unter anaeroben Bedingungen akkumulieren fluoreszierendes Tryptophan und/oder tryptophanhaltige Peptide in der Fermentationsbrühe. Unter Umständen deutet dies auf die fehlende oder verringerte Expression einer Aminosäureoxidase unter diesen Bedingungen hin.

5.4.5. Prozesstechnische Optimierung der anaeroben Fermentation

Um Biertreber stofflich zu verwerten, hatte sich die anaerobe Fermentationsstrategie als vorteilhaft herausgestellt, da lösliche Wertstoffe, wie Essigsäure oder Ethanol, produziert werden konnten (vgl. Kapitel 5.4.2). Dementsprechend sollte diese Fermentation weiter optimiert werden, um einerseits die absoluten Produktkonzentrationen zu erhöhen und andererseits die Nebenproduktbildung möglichst gering zu halten. Außerdem sollte die Variation von Fermentationsparametern Einblicke in die physiologischen Vorgänge bei der Kultivierung von *C. uda* mit Treber ermöglichen, die dann anhand des aufgeklärten Zentralstoffwechsels (Abbildung 27) interpretiert werden konnten. Die Optimierungen werden in den folgenden Kapitel 5.4.6 – 5.4.11 beleuchtet.

5.4.6. Fermentationen mit Mineral-Medium bzw. mit Treber und variiertes Gasphase

Um Basiswerte für weitere Optimierungen zu erhalten, wurden einige Referenzfermentation durchgeführt, die in Abbildung 30 gezeigt sind. Zunächst wurde eine Referenzfermentation mit Standard-Mineral-Medium (i) durchgeführt, bei welcher im Laufe der achttägigen Fermentationszeit eine geringe Gesamt-Produktkonzentration von $3,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ im Medium akkumulierte, wobei die Essigsäurebildung mit $1,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ noch den größten Anteil am Produktspektrum ausmachte. Zwar war die Fermentationszeit mit 8 Tagen deutlich kürzer als die aller weiterer Fermentationen (14 bzw. 18 Tage), allerdings zeigte sich bereits nach dieser kurzen Zeitspanne kein signifikanter Anstieg der Produktbildung mehr (vgl. Abbildung A 3). Sofern *C. uda* mit dem hier verwendeten Mineral-Medium oder dem (ähnlichen) M9-Medium kultiviert wurde, werden in der Literatur keine Aussagen zu maximalen Produktkonzentrationen getroffen und der Fokus stattdessen auf die Enzymaktivitäten gelegt [146, 148, 273]. Demgegenüber wurden für eine viertägige Fermentationszeit mit *C. uda* ATCC 491 in Hefe-Dextrose-Medium (d.h. in Komplexmedium) Konzentrationen von $0,61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ für Essigsäure und $0,089 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ für Milchsäure berichtet, was sogar unter den hier ermittelten Werten zurückblieb [144].

Höhere Gesamt-Produktkonzentrationen von $8,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ konnten erzielt werden, sofern Biertreber als Substrat in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer und unter anaeroben Bedingungen (N_2 -Atmosphäre) eingesetzt wurde (ii). Dies war insofern bemerkenswert, da die komplexen Nährstoffansprüche des Organismus (vgl. Kapitel 4.7.3) allesamt durch den Treber gedeckt

werden konnten. Sofern anaerobe Bedingungen durch CO₂-Begasung erzielt wurden (iii), konnte die Gesamt-Produktkonzentration auf einen Wert von 11,34 g·L⁻¹ gesteigert werden, wobei etwas mehr Ameisensäure und Essigsäure im Vergleich zum Versuch mit Stickstoff gebildet wurden. Da es sich bei der, durch die Formiat:NAD⁺ Oxidoreduktase (E.C.: 1.17.1.9) katalysierten, Reaktion um eine bidirektionale Reaktion handelt, könnte die vermehrte Akkumulation von Ameisensäure hierbei durch das Prinzip von Le Chatelier erklärt werden, da die Beaufschlagung von CO₂ im Kopfraum das Gleichgewicht der Reaktion zu Gunsten von Ameisensäure verschoben haben könnte (vgl. Abbildung 27). Allerdings kann die Erhöhung der Gesamt-Produktkonzentration auch im Bereich von fermentationspezifischen Unterschieden liegen, sodass keine abschließende Aussage getroffen werden konnte.

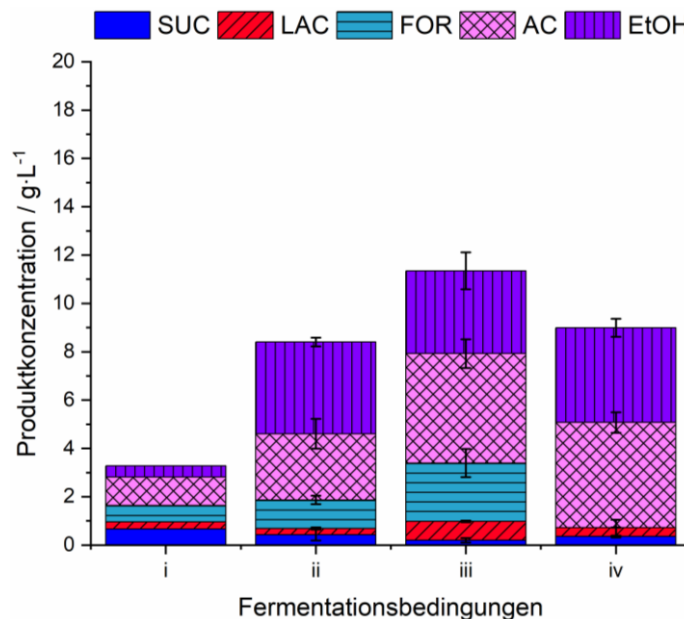


Abbildung 30: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol: **(i)** Referenzfermentation mit Standard-Mineral-Medium. In allen weiteren Fermentationen bestand das Medium aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4: **(ii)** N₂-Atmosphäre, **(iii)** CO₂-Atmosphäre, **(iv)** N₂-Atmosphäre + Einsatz von 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 bzw. 4 biologischen Replikaten mit Ausnahme der Referenzfermentation (i); SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock.

Sofern der anaeroben Fermentation (N₂-Atmosphäre) auch Hefeextrakt zugesetzt wurde (iv), änderte sich die Gesamt-Produktkonzentration kaum – allerdings wurden weniger Nebenprodukte als in den Fermentationen ohne Hefeextrakt (ii) bzw. (iii) gebildet, wodurch dieser Fermentationsansatz für die weiteren Optimierungen genutzt wurde.

Da der Fokus in der Literatur bei der Kultivierung von *Cellulomonadaceae* mit lignocellulosehaltigen Substraten (z.B. mit Dattelnkernen oder Weizenstroh) meist auf der Enzymproduktion [156, 281] oder der Degradation von lignocellulosehaltiger Biomasse in Co-Fermentationen liegt [252], konnten für die Fermentationen (ii) bis (iv) keine Vergleichswerte in der Literatur gefunden werden [11].

Kurzzusammenfassung:

- Biertreber kann die komplexen Nährstoffansprüche von *C. uda* bedienen. Die finalen Produktkonzentrationen sind höher als mit einem Standard-Mineral-Medium.
- Der Zusatz von Hefeextrakt zu einem Fermentationsmedium aus Biertreber in MOPS-Puffer ist nicht zwingend nötig – verringert aber die Nebenproduktbildung.

5.4.7. Reduzierende vs. oxidierende Bedingungen und Variation des pH-Wertes

Das Redoxpotential und der pH-Wert eines Kulturmediums können einen großen Einfluss auf die Durchführung einer Fermentation haben, weswegen die Veränderung dieser Parameter in mehreren Versuchen untersucht wurde (Abbildung 31). So ist aus der Literatur bekannt, dass das Redoxpotential das Produktspektrum in Gemischtsäurefermentationen von *E. coli* K12 beeinflussen [283], die Produktion von 1,3-Propandiol in *Klebsiella pneumoniae* fördern [284], die Bildung von Aromaten aus Aminosäuren in *Lactococcus lactis* verstärken [285], die Bildung von Zitronensäure in *Aspergillus niger* erhöhen [286] und die Expression von Enzymen in *Yarrowia lipolytica* aktivieren kann [287]. Aufgrund dieser großen physiologischen Einflussmöglichkeiten wurden dem Fermentationsmedium, neben Hefeextrakt, wahlweise ein Oxidationsmittel (K_3FeCN_6) oder ein Reduktionsmittel (Cys-HCl) zugesetzt. Der Zusatz von Oxidationsmittel (v) erhöht das intrazelluläre NAD(P)⁺/NAD(P)H-Verhältnis [284, 288], wodurch in dieser Fermentation oxidierte Verbindungen auch in leicht erhöhter Konzentration akkumulierten, sofern dies mit einer identischen Fermentation – aber ohne Oxidationsmittel (iv) – verglichen wurde. Im Gegensatz dazu senkt ein niedriges Redoxpotential das intrazelluläre NAD(P)⁺/NAD(P)H-Verhältnis, sodass vornehmlich NAD(P)⁺ regenerierende Produkte (wie z.B. Ethanol) beim Einsatz des Reduktionsmittels gebildet wurden (vi). Die Zugabe von Reduktionsmittel beeinflusste auch das Verhältnis von Ethanol zu Essigsäure, welches von $1,15 \text{ mol}_{EtOH} \cdot \text{mol}_{Ac}^{-1}$ (vgl. Kapitel 5.4.2) auf $1,59 \text{ mol}_{EtOH} \cdot \text{mol}_{Ac}^{-1}$ erhöht wurde. Ähnliche Abhängigkeiten bzgl. Redoxzustand des Kulturmediums und Produktbildung wurden bereits für verschiedene *Clostridien* – nicht aber für *Cellulomonadaceae* – beschrieben [116].

Die günstigen reduzierenden Bedingungen, welche die vermehrte Ethanolbildung bewirkt hatten, wurden in der Folge mit abgesenktem pH = 5 (vii) und erhöhtem pH = 9 (viii) getestet. Für pH = 5 waren die finale Ethanolkonzentration und die Produktivität vergleichbar mit pH = 7,4 (Abbildung 32), aber das Ethanol/Essigsäure-Verhältnis war mit $9,2 \text{ mol}_{EtOH} \cdot \text{mol}_{Ac}^{-1}$ deutlich erhöht. Allerdings konnte nicht geklärt werden, wie der Organismus unter anaeroben Bedingungen, d.h. ohne die Möglichkeit der Energiegewinnung über die Atmungskette, und ohne Essigsäure-Bildung den Energieträger ATP herstellen konnte. Im Umkehrschluss bewirkte die Erhöhung auf pH = 9 ein Absenken des Ethanol/Essigsäure-Verhältnis auf $0,08 \text{ mol}_{EtOH} \cdot \text{mol}_{Ac}^{-1}$. Die pH-Abhängigkeit in der Produktbildung von Solventogenese zu Acidogenese war bisher hauptsächlich für

Clostridiaceae bekannt [116, 289, 290] und konnte an dieser Stelle nun auch für *Cellulomonas uda* gezeigt werden.

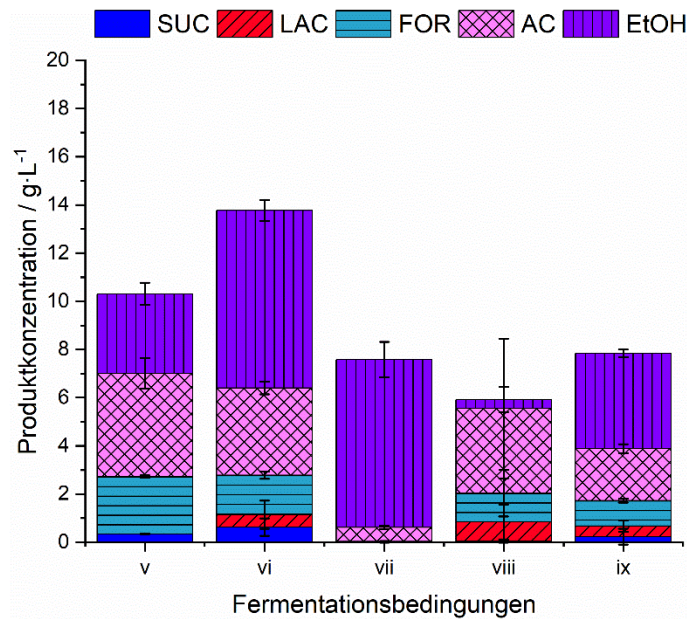


Abbildung 31: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(v)** Oxidationsmittel K_3FeCN_6 ($0,329 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{pH} = 7,4$, **(vi)** Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{pH} = 7,4$, **(vii)** Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{pH} = 5,0$, **(viii)** Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{pH} = 9,0$, **(ix)** Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Switch von $\text{pH} = 7,4$ auf $\text{pH} = 5,0$. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock.

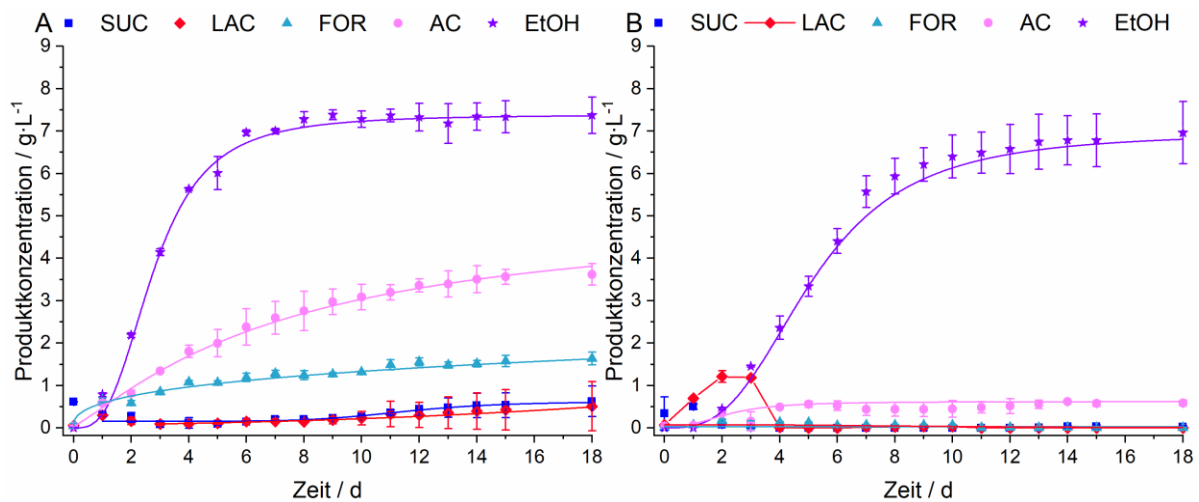


Abbildung 32: Kinetik von Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **A)** $\text{pH} = 7,4$ (Fermentation **(vi)**) und **B)** $\text{pH} = 5$ (Fermentation **(vii)**). Alle Datenpunkte wurden durch sigmoide Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11].

Aufgrund dieser Beobachtungen erschien es sinnvoll einen zweistufigen Prozess zu testen, bei dem zunächst $\text{pH} = 7,4$ eingestellt wurde, um den pH -Wert anschließend auf $\text{pH} = 5,0$ abzusenken (ix). Der Gedanke hierbei war, dass dadurch bei $\text{pH} = 7,4$ zunächst

eine Adaptions- und Wachstumsphase der Zellen eintreten könnte, welche im Anschluss bei pH = 5,0 in eine wachstumsentkoppelte Ethanolbildung (und ggfs. Reassimilation der Nebenprodukte) übergehen könnte. Die plötzliche Absenkung des pH-Wertes führte jedoch zu einer Zellinaktivierung, die sich einerseits in einem Stopp der Produktsekretion (Abbildung 33 A) und andererseits in der Akkumulation der löslichen Zucker Cellobiose, Xylose und Arabinose zeigte, da die sekretierten Enzyme augenscheinlich noch aktiv waren, aber der mikrobielle Verbrauch wegfiel (Abbildung 33 B) [11].

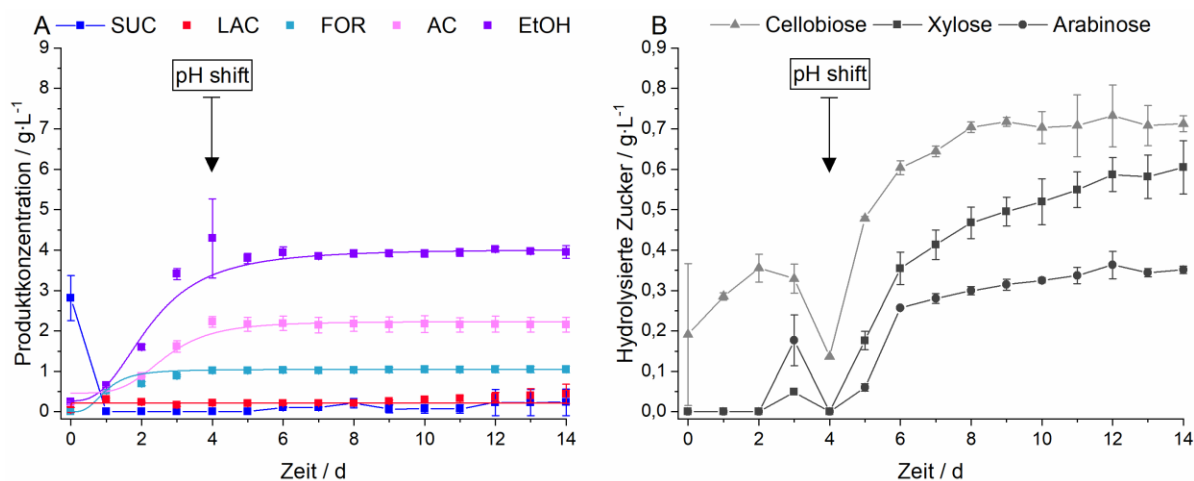


Abbildung 33: Fermentation von *C. uda* in anaerobem Medium (N₂) aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt, 1 g·L⁻¹ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer, 120 rpm und pH-Shift von pH = 7,4 auf pH = 5,0 (Fermentation (ix)): **A)** Produktbildung in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol, **B)** Abbauprodukte der strukturellen Kohlenhydrate in Bezug auf Cellobiose, Xylose und Arabinose. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11].

Kurzzusammenfassung:

- Reduzierende Bedingungen können die vermehrte Ethanolproduktion herbeiführen.
- Die Sekretion von Nebenprodukten kann bei reduzierenden Bedingungen und abgesenktem pH-Wert komplett unterbunden werden.
- Wird der pH-Wert während der Fermentation abgesenkt, so führt dies zu einer Zellinaktivierung.

5.4.8. Einsatz von technischen Enzymen und hydrothermalen Vorbehandlungen

Um die bakterielle Treberdegradation zu erleichtern, wurden zudem technische Cellulase-Mixturen (x), Hemicellulasemixturen (xi) oder eine Kombination beider Enzymklassen (xii) eingesetzt. Allerdings konnten die finalen Produktkonzentrationen, verglichen mit identischen Bedingungen ohne Enzymzugabe (vi), maximal leicht angehoben werden (Abbildung 34). Außerdem wurde der Treber hydrothermalen Organosolv-Behandlungen (OS) unterzogen. Durch die ethanolische Extraktion bei hohen Temperaturen und Drücken, welche vornehmlich Lignin aus der Biomasse entfernt [180, 291], sollte der bakterielle Abbau von strukturellen Kohlenhydraten ebenfalls erleichtert werden. Allerdings führte der Einsatz von OS-behandeltem Treber, trotz Zugabe von Hefeextrakt und Cys-HCl (xiii), nur eine geringfügige Steigerung der Produktkonzentrationen im Vergleich zu

identischen Bedingungen mit unbehandeltem Treber (vi) herbei. Sofern dem OS-behandelten Treber kein Hefeextrakt und Cys-HCl zugesetzt wurden (xiv), war die Produktbildung sogar deutlich reduziert. Nach aktuellem Stand der Forschung ist es zwingend erforderlich die widerstandsfähige Struktur von lignocellulosehaltiger Biomasse durch geeignete hydrothermale Vorbehandlungsmethoden aufzubrechen, sofern das Ziel der Chemikalien- bzw. Treibstoffsynthese mittels Mikroorganismen gewünscht ist [95].

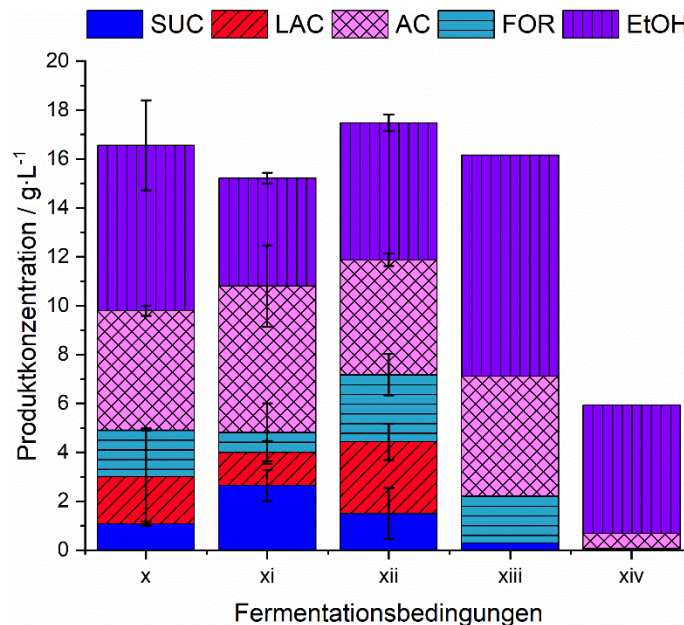


Abbildung 34: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(x)** $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Cellulase NS22192, **(xi)** $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Hemicellulase NS22083, **(xii)** $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Cellulase NS22192 und $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Hemicellulase NS22083, **(xiii)** Organosolv-vorbehandelter Treber, **(xiv)** Organosolv-vorbehandelter Treber ohne Zusatz von Hefeextrakt und Cys-HCl. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock.

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe konnte aber gezeigt werden, dass durch die Wahl eines geeigneten Organismus, wie z.B. *C. uda*, die Wertstoffproduktion auch ohne diese Vorbehandlungsmethoden auskommt. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass die Anpassung des Redox-Milieus einen größeren Einfluss auf die Produktkonzentrationen zu haben scheint als die hydrothermale und enzymatische Vorbehandlung des Substrates. Die ökonomische Nutzung dieser Strategien (OS-Behandlung und Enzymzugabe) würde sich zudem schwierig gestalten, da OS-Behandlungen einen hohen Energiebedarf aufweisen [292] und technische Enzyme hohe Herstellungskosten haben [9]. Außerdem zeigte sich, dass die Milchsäurekonzentration in den Kulturen unmittelbar nach der Zugabe der Enzyme anstieg, wie beispielhaft in Abbildung 35 A gezeigt wird. Die vermehrte Milchsäurebildung kann auf einen Überschuss an Kohlenhydraten hindeuten, welcher Energieverschüttungsreaktionen durch Mechanismen wie z.B. „futile cycles“, „metabolische Shifts“, „Kohlenstoff-Dissipation“ oder den sogenannten „Overflow Metabolismus“ herbeiführen kann [233, 293–295]. So

wurde eine vermehrte Milchsäureproduktion z.B. für *Klebsiella aerogenes* bei Glukoseüberschuss [296] und für *Clostridium cellulolyticum* bei Cellobioseüberschuss [297] beobachtet.

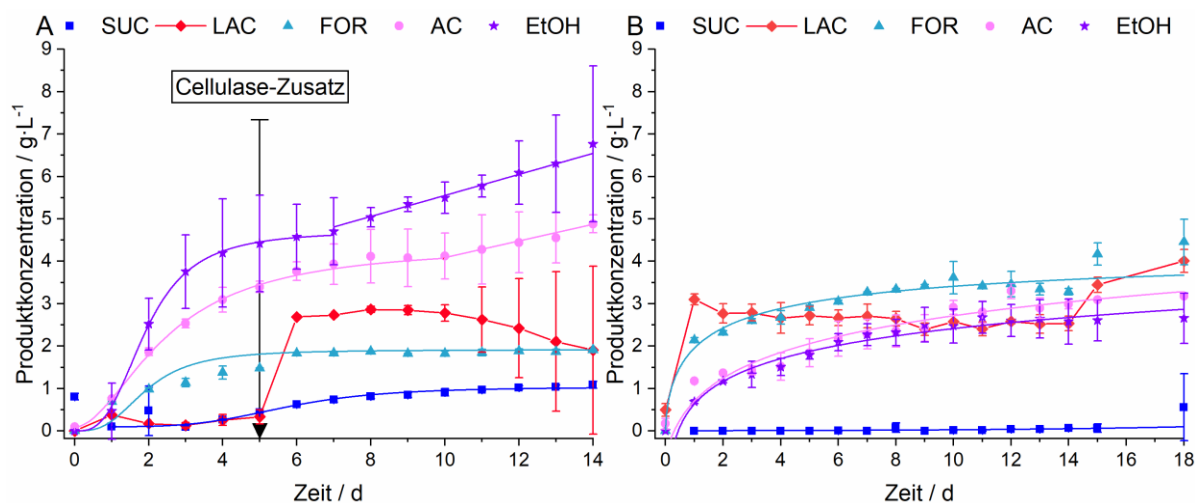


Abbildung 35: Kinetik von Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **A)** gepresster Treber und Einsatz von $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Cellulase NS22192 (Fermentation **(x)**), **B)** Treber, nicht gepresst (Fermentation **(xv)**). Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11].

Das vermehrte Auftreten kurzkettiger Zuckermoleküle, welches durch die Enzymzugabe induziert wurde, könnte die katalytische Fähigkeit der intrazellulären Enzyme zur Produktion von Essigsäure und Ethanol überstiegen haben. Daher könnte ein metabolischer „Rückstau“ zur Akkumulation von Glykolyse-Intermediaten geführt haben, welche wiederum als Induktoren für eine erhöhte Milchsäureproduktion gedient haben könnten. So ist beispielsweise für Fruktose 1,6-Diphosphat bekannt, dass es Laktatdehydrogenase-Tetramere mit hoher Aktivität in *Streptococcus bovis* aktiviert [298]. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die geringen Steigerungen der Produktkonzentration (und die damit einhergehende Diversifizierung des Produktspektrums, z.B. durch die Milchsäurebildung) die Anwendung dieser kostenintensiven Behandlungen nicht rechtfertigen würden [11].

Kurzzusammenfassung:

- Der Einsatz von hydrothermalen oder enzymatischen Vorbehandlungen erscheint aufgrund der kosten- und energieintensiven Prozesse, einer geringen Steigerung der Produktkonzentrationen und einer damit einhergehenden Diversifizierung des Produktspektrums nicht sinnvoll.

5.4.9. Einsatz von nicht-gepresstem Treber und vorgelagerte Lipidextraktion

In den vorangegangenen Kapiteln zur fermentativen Nutzung des festen Treberückstandes wurden vornehmlich Methoden zur Steigerung der Produktkonzentration oder Verminderung der Nebenproduktbildung beleuchtet. In diesem Kapitel sollen nun Strategien untersucht werden, die bei einer ganzheitlichen Nutzung des Biertreibers in einem

Bioraffinerie-Konzept ggfs. von Vorteil sein könnten. Die Ergebnisse dieser Fermentationen mit nicht-abgepresstem bzw. lipid-extrahiertem Treber sind in Abbildung 36 gezeigt.

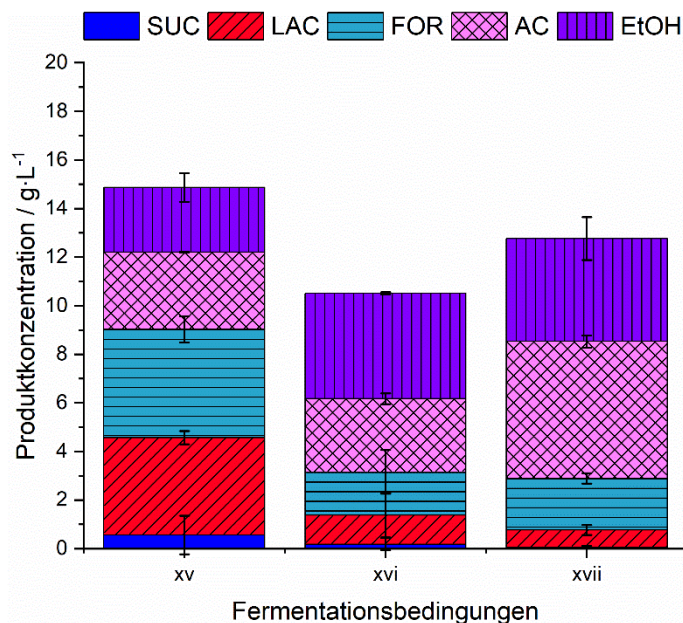


Abbildung 36: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: (xv) MB-Treber, nicht abgepresst, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl, (xvi) HE-Treber, (xvii) lipidfreier HE-Treber. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock; HE, Helles.

Einerseits sollte evaluiert werden, ob die Abtrennung der löslichen Treberbestandteile für die Fermentationen mit suspendiertem Biertreber und *C. uda* notwendig war, sodass nicht-gepresster Treber eingesetzt wurde (xv). Dabei zeigte sich, in Analogie zur Enzymzugabe, eine vermehrte Milchsäurebildung zu Beginn der Fermentation (Abbildung 35 B). Dies war darauf zurückzuführen, dass anhaftende Moleküle wie Glukose, Maltose und Maltotriose nicht vom Treber entfernt wurden und somit die, in Kapitel 5.4.8 beschriebenen, Effekte zum Tragen kamen [30, 190]. Damit stellte sich die Abtrennung der löslichen Treberbestandteile, und separate Nutzung zur Milchsäureherstellung (vgl. Kapitel 5.2), auch für die Fermentation zur Verwertung des festen Rückstandes als vorteilhaft heraus.

Die Lipidfraktion des Biertreibers besteht zu 18% aus freien Fettsäuren sowie aus Mono- (1,8%), Di- (7,7%), Triglyceriden (67%), und enthält mit rund 5% eine breite Palette an Steroidverbindungen, weshalb die Lipidfraktion interessant für die Anwendung in der pharmazeutischen, kosmetischen, lebensmittel-verarbeitenden oder Kraftstoff-Industrie ist [299, 300]. Dies soll im Folgenden anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden: (a) Fettsäuren spielen in der Lebensmittelindustrie eine wichtige Rolle, um die sensorischen und strukturellen Eigenschaften von Lebensmitteln zu beeinflussen. Außerdem sind einige Fettsäuren essenziell für den Körper (z.B. Omega-3- oder Omega-6-Fettsäuren), um verschiedene fettlösliche Nährstoffe, wie z.B. Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin K, aus der Nahrung aufzunehmen. (b) Des Weiteren werden insbesondere pflanzliche (Sphingo-)Lipide

häufig als Zusatz in kosmetischen Pflegeprodukten genutzt, um den trans-epidermalen Wasserverlust der Haut zu minimieren [299, 301]. (c) Triglyceride können beispielsweise in der Biodieselherstellung genutzt werden, indem sie mit kurzkettigen Alkoholen durch (Lipase-katalysierte) Transesterifikationen zu langkettigen Fettsäureestern umgesetzt werden [300]. (d) Obwohl sie nur einen geringeren Anteil an der Lipidfraktion des Trebers ausmachen, stellen die Sterole ebenfalls eine interessante Fraktion (insbesondere für die humane Gesundheit) dar. So wird Phytosterolen beispielsweise eine Cholesterolsenkende Wirkung zugeschrieben [302, 303]. Außerdem wird lipophilen Weizenkleie-Extrakten eine starke cytotoxische Wirkung auf humanes Prostata-Adenokarzinom zugewiesen. Die antitumoralen Eigenschaften konnten dabei auf die Lipidfraktion (bestehend aus Fettsäuren, Phytosteroiden und Alkylresorcinol) und nicht auf den Faseranteil der lignocellulosehaltigen Biomasse zurückzuführen werden [304].

Deshalb wurde untersucht, inwiefern eine vorgeschaltete Lipid-Extraktion, welche gemäß Kapitel 4.3.2 durchgeführt wurde, die Fermentation beeinflussen kann. Zu diesem Zwecke wurde ein Versuch mit HE-Treber (xvi) bzw. lipid-extrahiertem HE-Treber (xvii) durchgeführt, um gleichzeitig noch die Übertragbarkeit auf Treber anderer Braugänge zu evaluieren. Aus vorherigen Versuchen war bekannt, dass die Lipidfraktion in anaeroben Fermentationen mit MB-Treber zu 51,2% abgebaut wird (vgl. Kapitel 5.4.2). In der Versuchsreihe dieses Kapitels konnte allerdings sogar eine leicht erhöhte Gesamtproduktkonzentration bei lipidfreien HE-Treber im Vergleich zu unbehandeltem HE-Treber beobachtet werden (Abbildung 36) – das Fehlen der Lipidfraktion war also für die entwickelte Fermentation mit *C. uda* nicht von Nachteil. Daher kann die Degradation des Lipidanteils, in Analogie zum Ligninanteil, möglicherweise auf synergistische Effekte beim Abbau lignocellulosehaltiger Biomasse und weniger auf die Nährstoffbereitstellung dieser Fraktion für *C. uda* zurückgeführt werden.

Da die vorgeschaltete Lipidextraktion die maximalen Produkttiter nicht negativ beeinflusste, ergab sich hier eine interessante Option zur Generierung einer ökonomisch relevanten Fraktion. Zudem ließ sich der Prozess auf Treber eines anderen Braugangs übertragen, was beim Einsatz von inhomogenen, lignocellulosehaltigen Substraten nicht immer gegeben ist. So wurde zum Beispiel die Rohstoffzusammensetzung von Weizenstroh als sehr bedeutsam für die Effizienz aller folgenden Prozessschritte zur stofflichen Nutzung (d.h. inklusive hydrothermalems Aufschluss, enzymatischer Verzuckerung und Fermentation) bewertet [11, 305].

Kurzzusammenfassung:

- Die Nutzung von abgepresstem Biertreber ist für die Fermentationen mit *C. uda* vorteilhaft, da die große Verfügbarkeit kurzkettiger Kohlenhydrate ansonsten zur vermehrten Milchsäurebildung, und damit einer Diversifikation des Produktspektrums, führt.

- Die entwickelte Fermentationsstrategie kann auf den Biertreber einer anderen Braurezeptur übertragen werden.
- Die industriell-interessante Lipidfraktion des Trebers kann vor der Fermentation extraktiv entfernt werden, ohne dass es dadurch zu einer Verringerung der Produktbildung in der folgenden Fermentation kommt.

5.4.10. Die Feststofffermentation im Bioreaktor

Um die Produktkonzentrationen weiter zu steigern, wurden die vorteilhaftesten Bedingungen, welche im Kolbenmaßstab identifiziert worden waren, auch im Bioreaktor getestet, da auf diese Weise Feststoffproben im laufenden Betrieb genommen werden konnten. Dazu wurden die Bedingungen aus Fermentation (vi), d.h. gepresster MB-Treber mit Zusatz von Hefeextrakt und $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl bei $\text{pH} = 7,4$, übernommen, wobei der Feststoffgehalt auf 15 Gew.-% erhöht wurde (xviii). Proportional dazu wurde auch die Hefeextrakt-Konzentration auf $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ gesteigert.

Bei dieser Fermentation wurde, mit einer Endkonzentration von $14,7 \pm 1,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, hauptsächlich Essigsäure gebildet (Abbildung 37 A). Aufgrund der Verdreifachung der Treberkonzentration (5 vs. 15 Gew.-%) konnte also eine Vervierfachung der Essigsäurekonzentration ($3,62$ vs. $14,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) erzielt werden. Unter der Annahme des, in Kapitel 5.4.7 ermittelten, Ethanol/Essigsäure-Verhältnisses von $1,59 \text{ mol}_{\text{EtOH}}\cdot\text{mol}_{\text{Ac}}^{-1}$, wurde in diesem Versuch folglich eine Ethanolkonzentration von etwa $18,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erwartet. In der Fermentationsbrühe wurde jedoch nur eine maximale Konzentration von $4,53 \pm 0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ beobachtet. Dahingegen führte der niedrige Siedepunkt von Ethanol ($\sim 78 \text{ }^\circ\text{C}$) zur Akkumulation von Ethanol in der Kühlfalle bis zu einer maximalen Konzentration von $22,3 \pm 2,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Abbildung 37 B). Allerdings nahm die Ethanolkonzentration – sowohl in der Fermentationsbrühe als auch in der Kühlfalle – ab einem gewissen Fermentationszeitpunkt wieder ab, was vermutlich auf den konstanten Stickstoffstrom zurückzuführen war, welcher nötig war, um die anaeroben Bedingungen aufrecht zu erhalten. Einerseits war die Evaporation von Ethanol im Labormaßstab unerwünscht, andererseits könnte dieser ungünstige Effekt in einem potenziellen Produktionsprozess auch genutzt werden, um Ethanol durch Gas-Stripping abzutrennen [116]. Stripping stellt eine interessante Methode zur Aufreinigung von Ethanol aus einer Fermentationsbrühe dar, da destillative Ansätze (insbesondere bei niedrigen Ethanolkonzentrationen) recht kostenintensiv sind und sich erst ab einer Ethanolkonzentrationen $> 5 - 8$ Gew.-% wirtschaftlich rentieren [116, 306, 307].

Augenscheinlich wurden Cellulose und Hemicellulose gleichzeitig als Substrat genutzt, sodass kein diauxisches Wachstum erkannt werden konnte (Abbildung 37 B). Übereinstimmende Berichte finden sich in der Literatur, da die parallele Nutzung von Glucose und Xylose durch *C. uda* bereits zuvor beschrieben worden war [143]. Der Proteingehalt wurde zu einem großen Teil (57,9%) und der Ligningehalt zu einem geringeren Teil (12,5%) abgebaut. Die Anteile an Cellulose, Hemicellulose und Lipid wurden um 46,1%, 48,9% bzw.

52,3% reduziert, sodass ähnliche Tendenzen wie beim Versuch mit 5 Gew.-% Treber im Kolbenmaßstab beobachtet wurden (Kapitel 5.4.2).

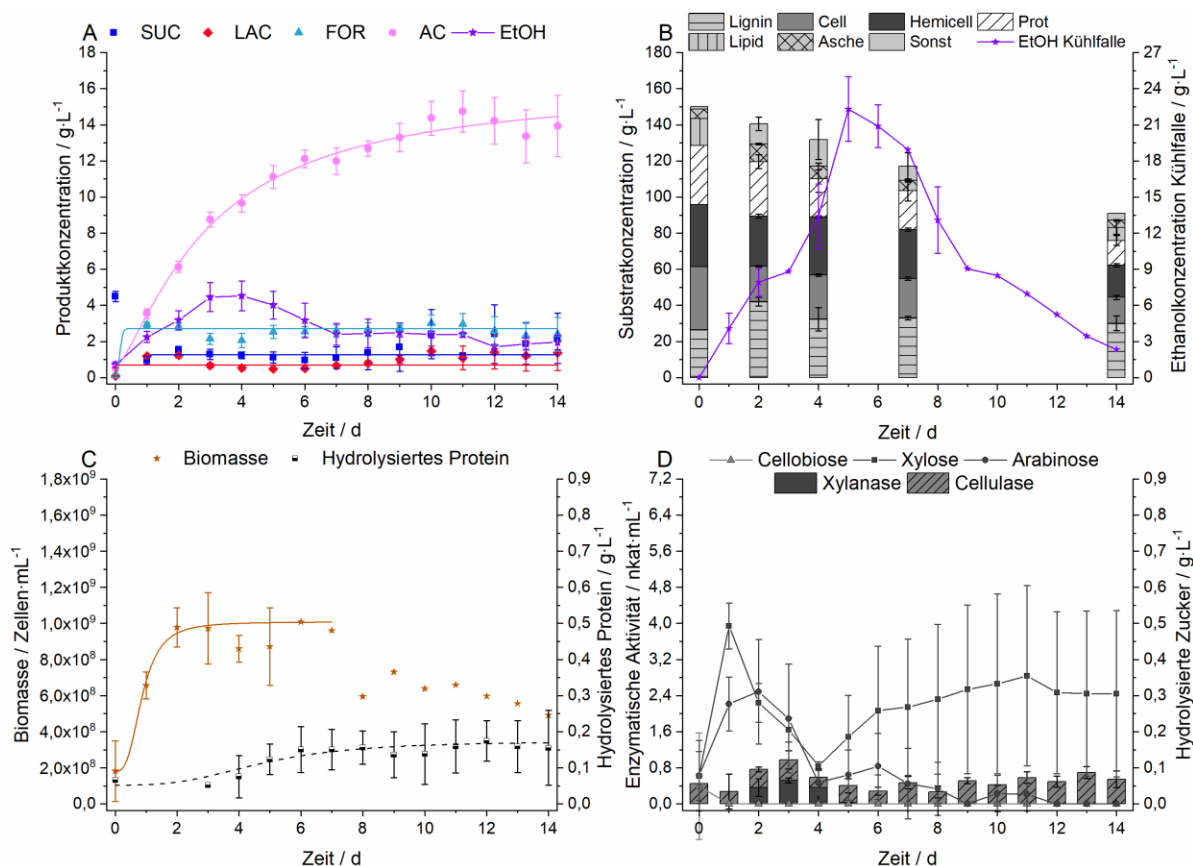


Abbildung 37: Fermentation mit *C. uda* in einem Medium aus 15 Gew.-% abgepresstem MB-Treber, 15 g·L⁻¹ Hefeextrakt und 1 g·L⁻¹ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 und N = 200 rpm (Fermentation (xviii)): **A**) Produktkonzentrationen in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Essigsäure und Ethanol, **B**) Substratkonzentration unter Einbeziehung der Treber-Bestandteile: Lignin, Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche und sonstiger Bestandteile sowie Ethanolkonzentration in der Kühlfalle, **C**) Zellbiomassebildung und hydrolysierte Proteinkonzentration, **D**) Xylanase- und Cellulase-Aktivität sowie, aufgrund von bakteriellem Abbau, freigesetzte Zucker Cellobiose, Xylose und Arabinose. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angepasst, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten, allerdings mit einer Ausnahme: Die Zellkonzentration, beginnend an Tag 6, zeigt Einzelbestimmungen, da die Zellen in zwei von drei Replikaten am Rührer klebten; Cell, Cellulose; Hemicell, Hemicellulose; Prot, Protein; Sonstige, Sonstige; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11].

Der Anstieg der Zellkonzentration folgte zunächst einem sigmoidalen Trend (Abbildung 37 C), was wahrscheinlich auf den aeroben Charakter der Vorkultur zurückzuführen war. Die aerobe Vorkultur beeinflusste mutmaßlich auch die folgenden Aspekte: (a) Tryptophanhaltige Proteinfragmente akkumulierten nur bis zu einer Konzentration von $0,17 \pm 0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in der Fermentationsbrühe. Damit war die Proteinkonzentration um 75,3 % im Vergleich zu einer Fermentation, bei der keine (aerobe) Vorkultur genutzt wurde, erniedrigt (Abbildung 37 C vs. Abbildung 28 C). (b) Eine basale Cellulaseaktivität war während der kompletten Fermentation vorhanden, während die Xylanaseaktivität nur zwischen Tag 2 und 5 der Fermentation bestimmt werden konnte (Abbildung 37 D), was im Gegensatz zu bisherigen Literaturangaben [146] und vorangegangenen, anaeroben Fermentation (Abbildung 28 E) zu stehen schien. Zudem

wurden während des gesamten Prozesses niedrige Konzentrationen von Xylose und Arabinose gemessen, wohingegen sich jedoch keine Cellobiose anreicherte. Dies könnte auf eine Adaption an Cellulose (bzw. Cellobiose) als bevorzugtes Substrat in der Vorkultur hinweisen, welche in der anaeroben Hauptkultur nicht mehr verändert wurde [11].

Kurzzusammenfassung:

- Durch die Verdreifachung der Treberkonzentration wird die finale Essigsäurekonzentration vervierfacht; Ethanol wird durch einen konstanten Stickstoffstrom ausgetrieben.
- Durch die Nutzung einer aeroben Vorkultur werden zahlreiche Veränderungen in der Fermentation bewirkt.

5.4.11. Erhöhung des Feststoffgehaltes

Sofern die Feststoffbeladung in den Fermentationen gesteigert wurde, konnten auch die Produktkonzentrationen weiter angehoben werden. Wurde statt 5 Gew.-% MB-Treber (vi) ein Feststoffgehalt von 20 Gew.-% (xix) gewählt, so erhöhte sich die Gesamtproduktkonzentration auf $31,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, bei einer Erhöhung auf 25 Gew.-% (xx) ergab sich sogar ein Wert von $36,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Abbildung 38 A). Betrug die Produkt/Substrat-Ausbeute bei 5 Gew.-% noch $Y_{P/S} = 0,41 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ (bezogen auf die löslichen Produkte, d.h. ohne Einbeziehung der CO_2 -Bildung, vgl. Kapitel 5.4.2) sank sie mit zunehmender Feststoffbeladung auf $Y_{P/S} = 0,24 \pm 0,07 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ für 20 Gew.-% bzw. $Y_{P/S} = 0,15 \pm 0,004 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ für 25 Gew.-% ab (Abbildung 38 B). Ähnliche Effekte wurden auch in der Literatur beschrieben: So nahm die Glucose/Cellulose-Ausbeute bei enzymatischen Verzuckerungen von Heißdampf-vorbehandeltem Gerstenstroh von $Y_{P/S} = 0,53 \text{ g}_{\text{Glucose}}\cdot\text{g}_{\text{Cell}}^{-1}$ bei einer Substratbeladung von 5 Gew.-% auf $Y_{P/S} \approx 0,43 \text{ g}_{\text{Glucose}}\cdot\text{g}_{\text{Cell}}^{-1}$ bei einer Substratbeladung von 10 Gew.-% ab [308]. Im Falle von Heißdampf-vorbehandeltem Weichholz wurde für die Glucose/Cellulose-Ausbeute bei der enzymatischen Verzuckerung ebenfalls eine Abhängigkeit von der Substratbeladung ermittelt: Während die Ausbeute bei einem Einsatz von 2 Gew.-% Weichholz $Y_{P/S} = 0,80 \text{ g}_{\text{Glucose}}\cdot\text{g}_{\text{Cell}}^{-1}$ betrug, sank sie beim Einsatz von 5 Gew.-% Weichholz auf $Y_{P/S} = 0,69 \text{ g}_{\text{Glucose}}\cdot\text{g}_{\text{Cell}}^{-1}$ ab [309]. Auch bei der Produktion einer Phytase aus *Aspergillus ficuum* nahm die Aktivität bei hohen Feststoffeinsätzen ab: So wurde beim Einsatz von 100 g Weizenstroh noch eine Aktivität von 2589 U ermittelt, während bei 200 g Weizenstroh (welches mit einem identischen Volumen einer Mineralienlösung befeuchtet worden war) nur noch eine Aktivität von 672 U bestimmt werden konnte [310]. Grundsätzlich kann durch eine höhere Feststoffbeladung die finale Produktkonzentration also gesteigert werden. Eine Erhöhung über 20 – 25 Gew.-% ist dabei allerdings nicht möglich, da bei diesen Feststoffbeladungen kein breiförmiges Substrat, sondern ein feuchter Feststoff vorliegt,

welcher in etwa den selben Feuchtegehalt wie frischer, aus dem brauprozess-stammender, Biertreber aufweist.

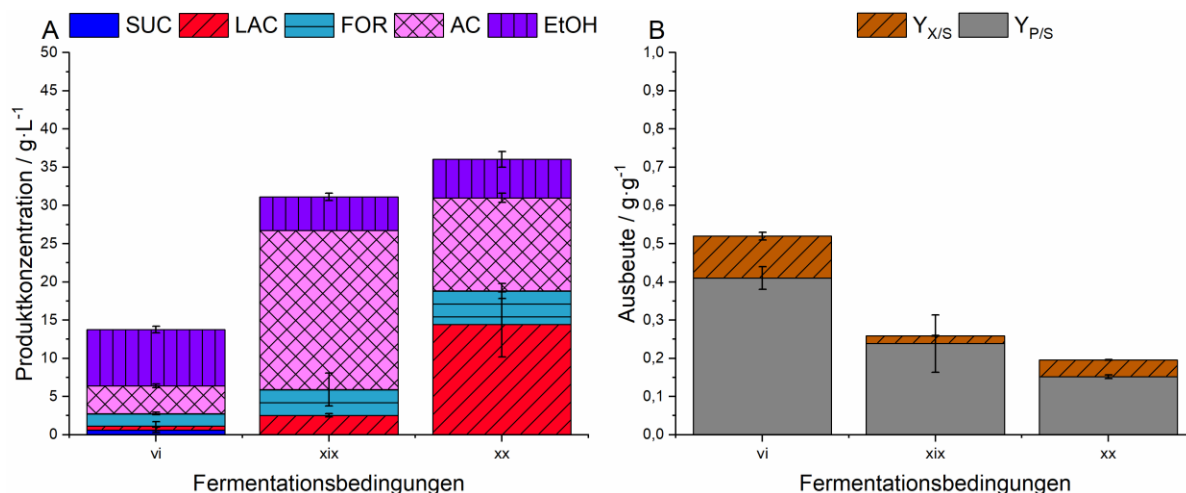


Abbildung 38: Fermentationen von *C. uda* in anaerobem Medium (N_2) aus abgepresstem MB-Treber mit $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer, 120 rpm und $\text{pH} = 7,4$. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(vi)** 5 Gew.-% Treber, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, **(xix)** 20 Gew.-% Treber, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, **(xx)** 25 Gew.-% Treber, $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt: **A)** Endproduktkonzentrationen in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol, **B)** Zellbiomasse/Treber-Ausbeute $Y_{X/S}$ und Produkt/Treber-Ausbeute $Y_{P/S}$. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock.

Die Gründe für die Reduktion der Ausbeute beim Einsatz von hohen Feststoffbeladungen, welche für technische Enzymmixturen berichtet wurden und sich vermutlich auch auf die mikrobiellen Enzyme von *C. uda* übertragen lassen, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt [308]. Für die zeitabhängige Reduktion der Enzymaktivität während einer enzymatischen Verzuckerung (oder Fermentation) werden vornehmlich Gründe wie Endprodukthemmung, z.B. durch Akkumulation von Cellobiose [258, 259], oder die physikalische Adsorption der Enzyme an lignocellulosehaltige Biomasse und im Speziellen an Lignin angeführt [260–262]. Möglicherweise treten diese Effekte verstärkt auf, sofern mehr Substrat zur Verfügung steht, da dann vermehrt Polyphenole in Form von Lignin vorhanden sind, welche zur Adsorption und u.U. Denaturierung der Enzyme führen können und mehr inhibierende, kurzkettige Zucker zur Verfügung stehen, da auch mehr strukturelle Kohlenhydrate abgebaut werden können. Des Weiteren könnte es auch zu einer Inhibierung des mikrobiellen Wachstums durch entstandene Produkte gekommen sein, da Essigsäure bereits in geringen Konzentrationen von $11,66 \text{ mM}$ als hemmend für das Wachstum von *C. uda* im Chemostat beschrieben wurde [11, 311].

Kurzzusammenfassung:

- Höhere Feststoffbeladungen führen zu einer Erhöhung der finalen Produktkonzentrationen, welche allerdings mit einer Verringerung der Ausbeute einhergehen.

5.5. Das entwickelte Bioraffineriekonzept für Biertreber

Im folgenden Kapitel sollen die entwickelten Strategien zur Nutzung von Biertreber im Kontext der holistischen Nutzung des Trebers im Rahmen eines Bioraffineriekonzeptes diskutiert werden. Dazu wird zunächst ein Fokus auf den vorgeschlagenen Pressschritt zur Trennung der löslichen und festen Treberbestandteile gelegt, um dann die demonstrierten und potenziellen Nutzungsmöglichkeiten für alle (in den Prozessen anfallenden) Stoffströme aufzuzeigen.

5.5.1. Vorteile des Pressschrittes

Das entwickelte Konzept zur Nutzung von Biertreber weist einige Unterschiede zu bereits bestehenden Methoden der stofflichen Verwertung von Treber auf: Meist werden in der Literatur zwei- oder dreistufige Prozesse, bestehend aus hydrothormaler/ enzymatischer Vorbehandlung und anschließender Fermentation der entstehenden monomeren Zucker, beschrieben [67, 68, 75]. Mitunter werden auch Feststofffermentationen mit cellulolytischen/ hemicellulolytischen Organismen, meist zur Enzymproduktion [77], zur Verbesserung des Nährstoffprofils [97], oder für Co-Fermentationen mit einem lignocellulose-abbauenden Stamm und einem heterotrophen Stamm zur Produktbildung diskutiert [88] (vgl. Kapitel 3.2.5). In kaum einem der genannten Fälle wird die lösliche Fraktion aber separat genutzt, obwohl das Pressen zahlreiche Vorteile aufweist: (a) Die hydrothermale Vorbehandlung lignocellulosehaltiger Biomasse führt zur Bildung von Verbindungen, wie Hydroxymethylfurfural (HMF), Furfural, Essigsäure, Ameisensäure und Lävulinsäure. Diese Stoffe wurden bereits vielfach als hemmend für mikrobielles Wachstum beschrieben [75, 76, 312, 313]. Außerdem wurden höhere HMF-Konzentrationen bei Mikrowellen-unterstützten Aufschlüssen beobachtet, wenn Glucose statt Cellulose als Substrat eingesetzt wurde [208]. Dies impliziert, dass einige Inhibitoren generell leichter aus kurzkettigen Zuckern (in der löslichen Fraktion) als aus strukturellen Kohlenhydraten (im Treberfeststoff) gebildet werden können. Bei hydrothermalen Aufschlüssen mit dem Substrat Treber konnte der positive Effekt, d.h. die verminderte Bildung von Inhibitoren bei Abtrennung der löslichen Zucker, bestätigt werden [180]. (b) Die Entfernung der flüssigen Treberfraktion (z.B. durch Pressen) reduziert das Gewicht des Trebers um bis zu 50%. Dadurch können Transportkosten eingespart werden, sofern der Treberrückstand zu Viehmastbetrieben oder zur weiterverarbeitenden Chemie- oder Lebensmittelbranche transportiert werden soll [19, 314]. (c) Die Haltbarkeit von zuckerreichem Treber ist sehr begrenzt. Einerseits wird Treber häufig siliert [43], was die spontane Vergärbarkeit mit Milchsäurebakterien voraussetzt, und andererseits können ubiquitär vorkommende Bakterien (z.B. *Clostridium butyricum*) zur Entstehung von Buttersäure und damit zur Verderblichkeit beitragen [28]. Des Weiteren finden sich am Treber zahlreiche Schimmelpilze und Hefen, welche u.A. Mycotoxine bilden können [13, 27, 42]. Durch das Maischekochen wird eine Vielzahl von Mikroorganismen zwar

abgetötet, sodass der Treber direkt nach dem Abläutern als mikrobiologisch unbelastet anzusehen ist – allerdings sind selbst nach dieser Hitzeeinwirkung noch Sporen von thermophilen, aeroben Bakterien am Treber anhaftend, wodurch relevante mikrobielle Kontaminationen innerhalb von wenigen Stunden auftreten können [41]. Die Reduktion des Wasser- sowie Zuckergehaltes, z.B. durch einen vorgelagerten Pressschritt, kann der Verderblichkeit entschieden entgegenwirken [19]. Um die Verderblichkeit zu verringern, wären natürlich auch andere Methoden, wie der Zusatz von antimikrobiellen Substanzen, denkbar. Der Zusatz von Antibiotika oder Antimykotika verbietet sich allerdings aufgrund der Kosten. Im Versuchsmaßstab wird Biertreber häufig auch durch die Zugabe von Natriumazid vor unerwünschter mikrobieller Besiedlung geschützt [315, 316] – aufgrund der hohen Toxizität dieser Substanz wäre der Einsatz des Trebers im Lebensmittelsegment dadurch aber nicht mehr möglich [317]. Für die Verwendung als Tierfutter ist allerdings der Zusatz von 0,2 – 0,6% Propionsäure, Natriumbenzoat und/oder Kaliumsorbat zugelassen, was die Haltbarkeit von wenigen Stunden bis Tagen auf bis zu zehn Tage erhöhen soll [27]. (d) Sofern Treber zur Energiegewinnung durch Verbrennen genutzt werden soll, muss der Wassergehalt zuvor auf mindestens 55 Gew.-% reduziert werden [18]. Zur Trocknung von Biertreber wurden zahlreiche Vorschläge unterbreitet, wie z.B. durch Ofentrocknung [318], konvektive Heißlufttrocknung [319] oder durch heißen Dampf in einer rotierbaren Trommel im Gleichstrom-Prinzip [320]. Da die Verdampfungsenthalpie von Wasser ($4,19 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) zu einem hohen Energiebedarf bei der thermischen Trocknung führt, erscheint diese Form der Trocknung von lignocellulosehaltiger Biomasse allerdings nicht sinnvoll [314, 321]. Der Pressschritt könnte in diesem Fall eine geeignete und kostengünstige Alternative zur Verringerung des Feuchtegehalts sein [18]. (e) Ganz grundsätzlich ergibt sich noch ein weiterer Vorteil aus der Abtrennung der löslichen Bestandteile: Unabhängig davon, ob der feste Rückstand als Viehfutter, zur Energiegewinnung oder zur Chemikalienproduktion verwendet werden soll, stellt die flüssige Fraktion des Trebers einen nährstoffreichen Produktstrom dar, der leicht in diversen, herkömmlichen, submersen Bioprozessen eingesetzt werden kann, ohne dass zuvor energie- oder kostenintensive Vorbehandlungsmethoden notwendig sind [30]. Dementsprechend wurde der Einsatz einer Schneckenpresse (bei erhöhter Temperatur) zur Abtrennung der löslichen Treberfraktion als vorteilhaft beschrieben, da diesem Prozessschritt mehrere positive Attribute zugeschrieben werden können: Zunächst wird, durch die mechanische Beanspruchung des Trebers, die enzymatische Zugänglichkeit des lignocellulosehaltigen Rückstandes erhöht, was wiederum von Vorteil ist, sofern klassische, enzymatische Verzuckerungen genutzt werden sollen [321]. Neben der Reduktion des Feuchtegehalts des Trebers (mit allen genannten Vorteilen), könnte durch diesen Prozessschritt zudem die flüssige Fraktion des Trebers zur Fermentation bereitgestellt werden [30].

Kurzzusammenfassung:

- Bei der Verwertung von Biertreber erscheint es vorteilhaft den Biertreber durch einen Pressschritt in eine flüssige und eine feste Fraktion aufzuteilen, welche dann separat genutzt werden können.

5.5.2. Gesamtheitliche Nutzung aller anfallenden Stoffströme

Im Sinne eines Bioraffineriekonzeptes ist ein ganzheitlicher Ansatz zur Nutzung aller anfallenden Stoffströme zwingend erforderlich: (a) Der durch Pressen abgetrennte, flüssige Anteil des Trebers kann als Basis für ein Fermentationsmedium mit dem Ziel der Milchsäureproduktion durch den Organismus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* verwendet werden (Kapitel 5.2), wobei die Produkttiter aus den Inhaltsstoffen des Treberpresssaftes mittels kinetischer Modellierung im Vorfeld abgeschätzt werden können (Kapitel 5.3). Die entstandene Milchsäure könnte aus der Fermentationsbrühe durch Extraktion mittels ionischer Liquide [322–324] oder auch mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt werden [325]. (b) Der Pressrückstand kann dann einer Lipidextraktion unterzogen werden, welche für die nachfolgende fermentative Weiterverarbeitung des Trebers keine Nachteile aufweist, aber die Treberlipide, z.B. zur Anwendung in der pharmazeutischen, kosmetischen, lebensmittel-verarbeitenden oder Kraftstoff-Industrie [299, 300] bereitstellen kann (Kapitel 5.4.9). (c) Der lipidfreie Pressrückstand kann dann durch den lignocellulose-abbauenden und gemischtsäuregärung-betreibenden Stamm *Cellulomonas uda* zu Ethanol und Essigsäure umgesetzt werden (Kapitel 5.4). Ethanol kann dabei schon während der Fermentation durch einen kontinuierlichen Stickstoff-Strom in einer wässrigen Ethanol-Wasser-Mischung angereichert werden (Kapitel 5.4.10). (d) Entstandene Essigsäure könnte entweder direkt genutzt oder mit Organismen, die normalerweise zur Abwasserreinigung eingesetzt werden (z. B. in Belebtschlamm enthalten), weiter zu Methan umgesetzt werden [116]. Nebenprodukte der Fermentation sollten dabei kein Hindernis für die Methanogenese darstellen, da die Produktion von Methan bereits aus Essigsäure, Ameisensäure und einem Gemisch aus CO₂/H₂ beschrieben wurde [326]. Die Abtrennung dieser, für die Methanogenese notwendigen, löslichen Bestandteile von suspendierten Treber- und Zellpartikeln könnte durch einen zusätzlichen Pressschritt erfolgen. (d) Anschließend könnte *C. uda*-Biomasse durch einen Zentrifugationsschritt von Biertreber abgetrennt werden (Kapitel 4.9.2) und, ggfls. in Kombination mit der *L. delbrueckii* subsp. *lactis*-Biomasse, als Quelle für Einzellerprotein eingesetzt werden. (e) Schließlich kann der einzig verbliebende Stoffstrom – der feste Treberrest der Fermentation – zur Energiegewinnung genutzt werden, da sich der HHV des Trebers der, in Abbildung 37 dargestellten, Fermentation während des Prozesses nicht änderte, wie aus den folgenden Werten ersichtlich wird: 19,66 MJ·kg⁻¹ (Rohstoff), 18,93 ± 0,3 MJ·kg⁻¹ (2 d Fermentation), 18,63 ± 0,56 MJ·kg⁻¹ (4 d Fermentation), 19,17 ± 0,42 MJ·kg⁻¹ (7 d Fermentation) und

19,72 ± 0,49 MJ·kg⁻¹ (14 d Fermentation). Vergleichbare HHVs wurden sowohl für andere lignocellulosehaltige Biomassearten [327] als auch für Biertreber [63] berichtet. Somit ergeben sich für alle anfallenden Stoffströme tatsächlich demonstrierte oder zumindest potenzielle Anwendungsfelder, welche in Abbildung 39 dargestellt sind [11].

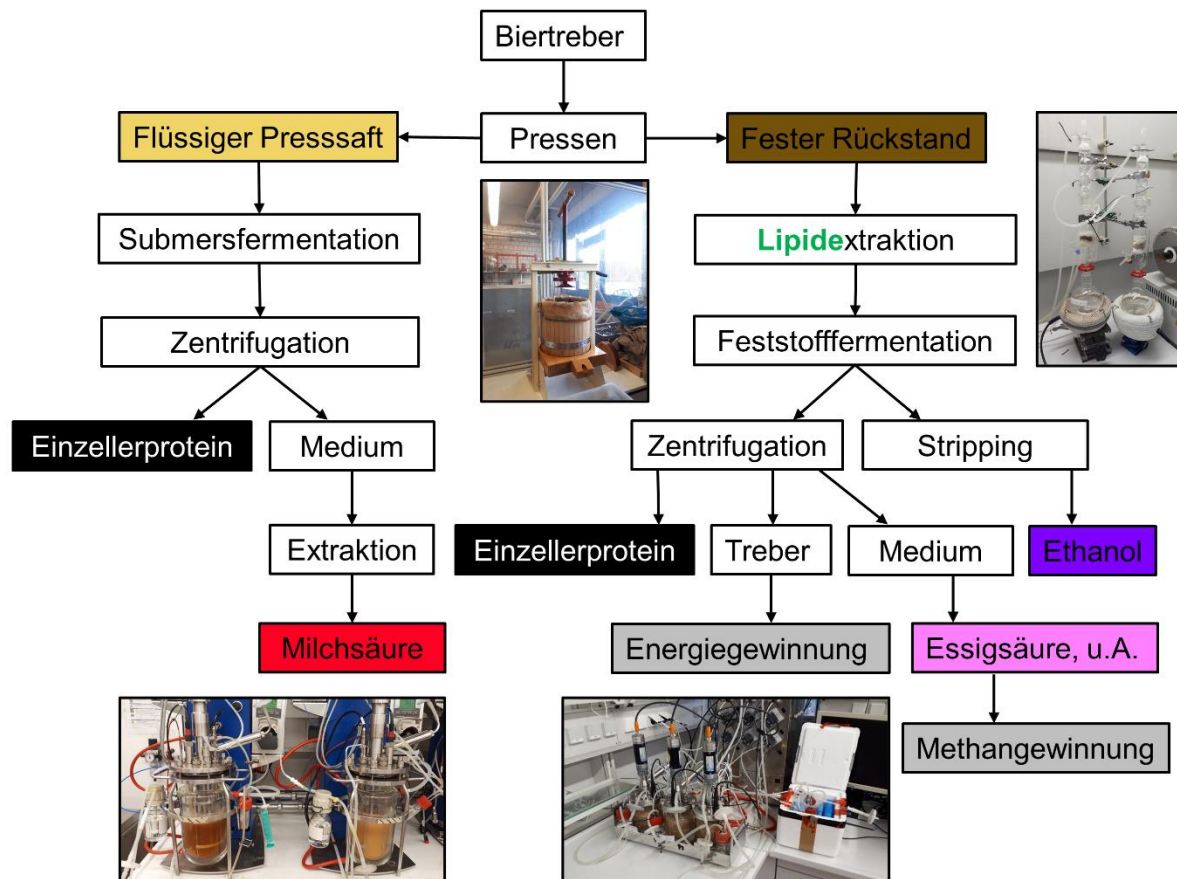


Abbildung 39: Vorgeschlagenes Bi Raffineriekonzept zur stofflichen Verwertung von Biertreber. Substrate und Produkte sind farblich hervorgehoben.

Kurzzusammenfassung:

- Durch die, in dieser Arbeit aufgezeigten, Nutzungsmöglichkeiten für Biertreber erscheint eine ganzheitliche Verwendung aller anfallenden Stoffströme möglich.

5.6. Übertragung der Fermentationsstrategien auf Wiesenschnitt

In einem ersten Schritt wurde die Übertragbarkeit der entwickelten Fermentationsstrategien auf Biertreber, denen unterschiedliche Braurezepturen zugrunde lagen, gezeigt. Dies traf sowohl auf die Fermentationen mit der flüssigen Fraktion als auch für die Fermentationen mit der festen Fraktion zu (vgl. Kapitel 5.2.4 und 5.4.9). Des Weiteren wurde dargelegt, warum das vorgeschlagene Nutzungskonzept vorteilhaft gegenüber anderen Konzepten sein könnte (Kapitel 5.5). In einem zweiten Schritt sollte das Konzept der stofflichen Verwertung mit Pressschritt und separater Nutzung der flüssigen und festen Fraktion auf eine weitere Biomasse-Art übertragen werden: Dazu wurde Wiesenschnitt aus einer Ernte im Frühjahr (F) bzw. im Herbst (H) ausgewählt [328].

5.6.1. Die Rohstoffanalyse von Wiesenschnitt

Der Feuchtegehalt des Wiesenschnitts wurde mit 64,5 Gew.-% (F) bzw. 69,6 Gew.-% (H) bestimmt. In der Literatur werden für den Feuchtegehalt von Gräsern, je nach Gewebetyp, Werte zwischen 24 Gew.-% (Mesophyll, Epidermis) bis hin zu 61 Gew.-% (Leitgewebe) bzw. 66 Gew.-% (Sklerenchym) berichtet [329]. Da Sklerenchym und Leitgewebe in Summe nur etwa 45 Gew.-% von Gras ausmachen [330], lagen die hier ermittelten Werte somit leicht über den genannten Literaturwerten. In jedem Fall enthielt der Wiesenschnitt einen geringeren Wasseranteil als der Treber (vgl. Kapitel 5.1.1), was aufgrund des Läuterprozesses beim Brauen aber nicht verwunderlich war. In Analogie zu den analysierten Biertreberproben wurde zunächst die Trockenmassezusammensetzung des Wiesenschnitts ohne anhaftende Komponenten untersucht (Abbildung 40): Der Cellulosegehalt wurde im Bereich zwischen 0,23 Gew.-% (F) und 0,27 Gew.-% (H) bestimmt, wohingegen für die Hemicellulose Werte von 0,2 Gew.-% (F) bzw. 0,19 Gew.-% (H) ermittelt wurden. Diese Werte befanden sich im Bereich gängiger Literaturwerte (25,0 – 41,9 Gew.-% für Cellulose und 19,2 – 25,0 Gew.-% für Hemicellulose) [331, 332].

A) Wiesenschnitt Frühjahr (F)

B) Wiesenschnitt Herbst (H)

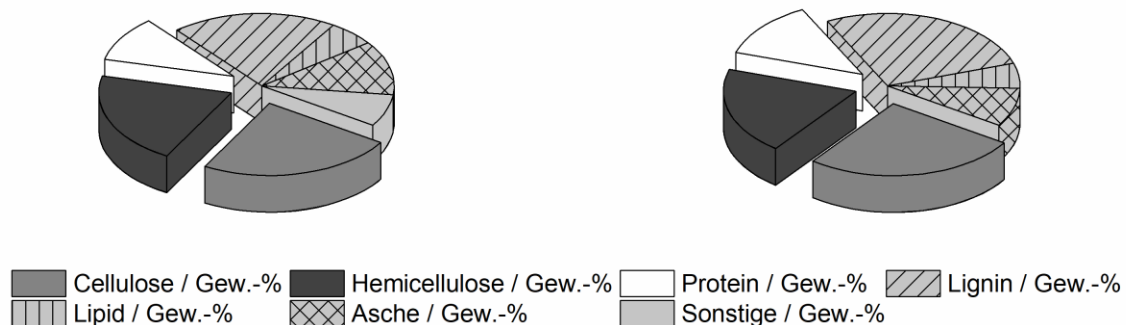


Abbildung 40: Prozentuale Zusammensetzung von Wiesenschnitt aus dem Frühjahr (F) bzw. Herbst (H), nachdem die löslichen Bestandteile abgetrennt wurden. Gezeigt werden ausschließlich die festen Bestandteile des Wiesenschnitts (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent.

Der Proteingehalt beträgt 10,2 Gew.-% (F) bzw. 12,9 Gew.-% (H), wobei der Proteingehalt in Gras mit 2% – 4% zuvor deutlich geringer beschrieben wurde [333]. Die Zusammensetzung von Gras hängt maßgeblich vom Reifegrad der Pflanze (d.h. vom jahreszeitlichen Erntezeitpunkt) ab [331], was sich bei den gezeigten Analysen am besten am Beispiel von Lignin verdeutlichen ließ, da der H-Wiesenschnitt einen deutlich höheren Ligninanteil als der F-Wiesenschnitt aufwies: 20,2 Gew.-% (F) und 27,8 Gew.-% (H). Auch in der Literatur findet sich für den Ligningehalt in Gräsern ein sehr breit gestreutes Spektrum an Werten von 3,0 Gew.-% bis 25,4 Gew.-% [331, 332]. Die grundsätzlich hohen Ligninanteile am analysierten Wiesenschnitt waren aber vermutlich auch auf die trockene Witterung beim jeweiligen Erntezeitpunkt zurückzuführen, was (insbesondere beim H-Wiesenschnitt) zu zahlreichen vertrockneten Grashalmen führte. Der Lipidgehalt betrug

sowohl für den F- als auch den H-Wiesenschnitt rund 5,7 Gew.-%, was damit leicht höher war, als es zuvor für Roggengras in der Literatur beschrieben wurde (3,0 – 3,5 Gew.-%) [331]. Der Asche-, d.h. Mineraliengehalt, der Gräser wurde mit 12,1 Gew.-% (F) bzw. 8,7 Gew.-% ermittelt und bewegte sich in einer Größenordnung, welche mit 4 – 10 Gew.-% zuvor auch in der Literatur genannt wurde [331]. Folglich machten die bioverfahrenstechnisch-relevantesten Komponenten Cellulose, Hemicellulose und Protein 54,8 Gew.-% (F) bzw. 59,3 Gew.-% (H) des Feststoffes aus, was vergleichbar mit den untersuchten Biertreberückständen (d.h. den Trebern in abgepresster Form) war. Sofern die anhaftenden Zucker mit in diese Betrachtung einbezogen wurden, erhöhte sich der Anteil der bioverfahrenstechnisch-relevantesten Komponenten geringfügig auf 58,5 Gew.-% bzw. 61,9 Gew.-% (Abbildung 41). Dabei zeigte sich, dass die abpressbare Kohlenhydratfraktion bei Wiesenschnitt mit 8,3 Gew.-% (F) bzw. 6,5 Gew.-% (H) einen deutlich geringeren Anteil an der Gesamtheit der Trockenmasse ausmachte, als dies bei den analysierten Biertrebern der Fall war.

A) Wiesenschnitt Frühjahr (F)

B) Wiesenschnitt Herbst (H)

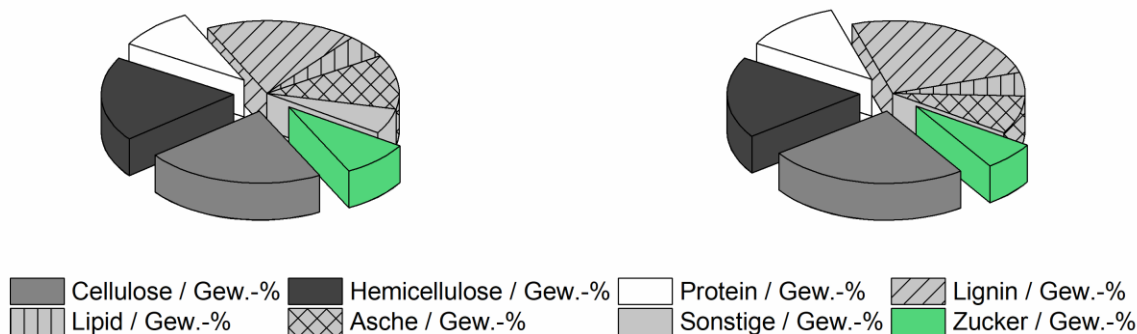


Abbildung 41: Prozentuale Zusammensetzung von Wiesenschnitt aus dem Frühjahr (F) bzw. Herbst (H) in der geernteten Form, d.h. ohne vorherigen Pressschritt. Gezeigt werden die Bestandteile des Wiesenschnittpresssaftes als Summenparameter von Saccharose, Fructose und Glucose (grün) sowie die festen Bestandteile (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent.

Die Fraktion der löslichen Zucker bestand nicht aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucosepolymeren (wie beim Biertreber), sondern enthielt die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose, welche bereits zuvor für Graspresssaft beschrieben worden waren (vgl. Tabelle 8) [334]. Der höhere Zuckeranteil am F-Wiesenschnitt zeigte sich auch in höheren Gesamtzucker-Konzentrationen im Presssaft. Während beim H-Presssaft eine Gesamtzucker-Konzentration von $30,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erzielt wurde, ergab die Analyse beim F-Presssaft eine Gesamtzuckerkonzentration von exakt $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ – grundsätzlich konnten die hohen Zuckerkonzentrationen aus den Treberpresssäften aber nicht erzielt werden. In der Literatur wird der Anteil der wasserlöslichen Kohlenhydrate auf Trockenmassebasis in Roggen- oder Klee graspresssaft mit 33,08 Gew.-% bis 44,94 Gew.-% beschrieben [335], was in etwa zu den hier beobachteten Anteilen passt. Der pH-Wert der Presssäfte wurde mit

5,75 (F) bzw. 5,66 (H) bestimmt, was um ca. eine halbe pH-Stufe höher war, als dies zuvor in der Literatur berichtet wurde [336].

Tabelle 8: Zusammensetzung der ersten Pressfraktion der Wiesenschnittpresssäfte aus dem Frühjahr (F) bzw. Herbst (H); n.g., nicht gemessen. Anmerkung: Für alle Presssäfte wurde eine Tinkturenpresse genutzt.

		F	H
pH-Wert		5,75	5,66
Zucker / g·L⁻¹	Saccharose	3,2	7,0
	Fructose	26,9	15,0
	Glucose	19,9	8,5
	Gesamt	50	30,5
Protein / mg·L⁻¹	Gesamt	92	103
Aminosäuren / mg·L⁻¹	Asparaginsäure	0,23	n.g.
	Glutamin	0,32	n.g.
	Serin	0,02	n.g.
	Histidin	0,01	n.g.
	Glycin	0,02	n.g.
	Threonin	0,06	n.g.
	Arginin	1,41	n.g.
	Alanin	0,00	n.g.
	Tyrosin	0,04	n.g.
	Methionin	0,01	n.g.
	Valin	0,24	n.g.
	Tryptophan	0,02	n.g.
	Phenylalanin	0,06	n.g.
	Isoleucin	0,04	n.g.
	Leucin	0,08	n.g.
	Lysin	0,01	n.g.
Gesamt	2,57	n.g.	
Kationen / mg·L⁻¹	Calcium	n.g.	264
	Magnesium	n.g.	206
	Natrium	n.g.	72
	Kalium	n.g.	3540
	Zink	n.g.	1,94
	Eisen	n.g.	< 0,1
	Mangan	n.g.	3,74
	Kupfer	n.g.	< 0,1
	Nickel	n.g.	0,28
	Aluminium	n.g.	0,5
	Ammonium	n.g.	1,11
Anionen / mg·L⁻¹	Chlorid	n.g.	779
	Sulfat	n.g.	507
	Nitrat	n.g.	53,1
	Phosphat	n.g.	n.g.

Die Gesamt-Aminosäurekonzentration wurde für den F-Presssaft mit 2,57 g·L⁻¹ bestimmt, wobei 54,9% der Aminosäuren auf Arginin entfielen. Dieser hohe Anteil dürfte vermutlich

darauf zurückzuführen sein, dass Arginin in Pflanzen häufig als Speichermolekül für organischen Stickstoff dient, da es das höchste N/C-Verhältnis aller 21 proteinogenen Aminosäuren beinhaltet [337]. Der Proteingehalt wurde mit $92 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (F) bzw. $103 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (H) ermittelt. In der Literatur wurden für Presssäfte aus italienischem Roggengras Proteingehalte von $9,6 \text{ g}\cdot\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$ berichtet – Konzentrationsangaben wurden nicht getätigt [338]. Bei der Mineralienanalytik stach mit einer Konzentration von $3540 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ insbesondere der Kalium-Wert ins Auge. Auch die Magnesium-, Natrium- und Calciumwert fielen mit $206 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, bzw. $264 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ recht hoch aus, während die restlichen untersuchten Mineralien in sehr geringen Konzentrationen im Presssaft zu finden waren. Sehr hohe Kalium- und etwas erhöhte Calciumgehalte wurden in der Literatur auch für die Kreich-Quecke beschrieben, welche zur Familie der Süßgräser gehört [339]. In einer anderen Arbeit wurde hingegen für eine Mischung aus Roggengras, Leguminosen, Kräutern und sonstigen Gräsern keine erhöhten Kalium-, Natrium- oder Calciumgehalte ermittelt [340].

Kurzzusammenfassung:

- Wiesenschnittpresssaft stellt – wie Treberpresssaft – ein interessantes Fermentationsmedium dar, da er sowohl Kohlenhydrate, Proteine, Aminosäuren als auch diverse Spurenelemente enthält.
- Im Gegensatz zum Treberpresssaft besteht die lösliche, d.h. abpressbare, Kohlenhydratfraktion aus Glucose, Fructose und Saccharose. Die hohen Zuckergehalte von Treberpresssäften können in Wiesenschnittpresssäften nicht erreicht werden.

5.6.2. Fermentationen mit Wiesenschnittpresssaft

Wie in Kapitel 5.6.1 dargestellt, handelte es sich bei Graspresssaft – in Analogie zum Treberpresssaft – ebenfalls um ein Nährmedium, welches sowohl Kohlenhydrate (C-Quelle), Proteine und Aminosäuren (N-Quelle), sowie eine ganze Bandbreite an Spurenelementen und Mineralien zur Verfügung stellen kann. Daher wurde untersucht, inwieweit die Fermentationsstrategien mit dem Organismus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* von Treberpresssaft auf Wiesenschnittpresssaft übertragen werden konnten.

In Vorversuchen im Schüttelkolben zeigte sich, dass die Nährstoffsupplementation der MRS-Medienkomponenten die Milchsäureproduktivität deutlich erhöhen konnte und auch einen positiven Effekt auf den finalen Milchsäuretiter hatte. Außerdem konnte die Lag-Phase der Organismen durch den Zusatz der MRS-Supplemente deutlich verkürzt werden, was jeweils in Abbildung A 5 dargestellt ist. Allerdings war der Zusatz der MRS-Komponenten – im Gegensatz zum Treberpresssaft – nicht zwingend erforderlich (vgl. Kapitel 5.2.1). Um einen möglichst kostengünstigen Prozess zu erhalten, wurden deshalb in der gezeigten Fermentation im Bioreaktor (Abbildung 42) keinerlei Nährstoffe supplementiert. Um die Lag-Phase zu verringern, genügte die Anzucht der zweiten Vorkultur im Hauptkulturmedium, d.h. in Wiesenschnittpresssaft anstelle von MRS-Medium (vgl. Kapitel 4.8.3).

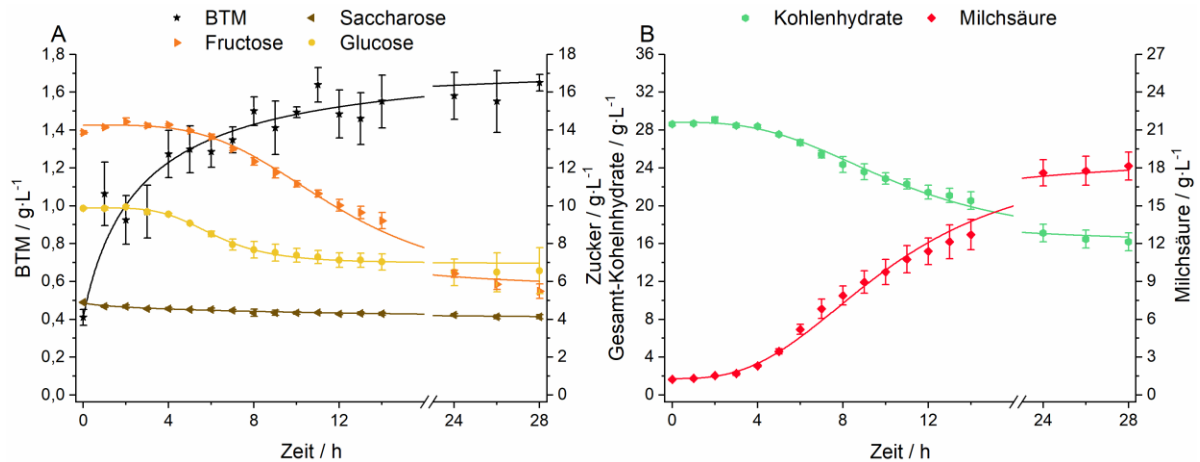


Abbildung 42: Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und Herbst-Presssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ im Bioreaktor: **A)** Biotrockenmasse-, Saccharose-, Fructose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoide Fits angenähert; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl.

Die Kohlenhydrate des Wiesenschnittpresssaftes wurden im Fermentationszeitraum nicht vollständig verbraucht, sodass Glucose und Fructose teilweise im Medium zurückblieben und die Saccharose augenscheinlich gar nicht genutzt wurde (Abbildung 42 A). Die Wachstumskurve zeigte nicht den typischen exponentiellen Anstieg – stattdessen war eher eine Art Sättigungskinetik zu erkennen. Aufgrund der starken Trübung und tiefbraunen Farbe von Wiesenschnittpresssäften handelt es sich bei der Messung der optischen Dichte in diesem Fermentationsmedium aber um eine stark fehlerbehaftete Größe [336]. Da nur ca. 43% der Kohlenhydrate verbraucht wurden, war auch die finale Milchsäurekonzentration mit $18,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ mäßig hoch (Abbildung 42 B). Allerdings konnte eine hohe Produkt/Substrat-Ausbeute von $Y_{P/S} = 1,32 \pm 0,07\text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ erzielt werden. Obwohl keine MRS-Zusätze supplementiert wurden, lässt sich diese hohe Ausbeute – in Analogie zu den Treberpresssaftfermentationen – vermutlich auf die zusätzliche Nährstoffbereitstellung durch den Presssaft zurückführen. Sofern *L. delbrueckii* in einem Batch-Prozess mit Graspresssaft kultiviert wurde, konnten Milchsäurekonzentrationen von $18,89\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und Ausbeuten von $Y_{P/S} = 1,1\text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ beobachtet werden, was in etwa den hier ermittelten Werten entsprach [336]. Die Produktivität wurde mit $P_{14\text{ h}} = 0,62 \pm 0,11\text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bestimmt und lag damit deutlich unter denjenigen Produktivitäten, welche mit Treberpresssaft erzielt werden konnten (vgl. Tabelle 6). Grundsätzlich ließ sich die Fermentation aber auf Wiesenschnittpresssaft übertragen.

Kurzzusammenfassung:

- Die, für Treberpresssaft entwickelte, Fermentationsstrategie kann auf Wiesenschnittpresssaft übertragen werden. Sofern die 2. Vorkultur bereits mit Wiesenschnittpresssaft kultiviert wird, kann eine lange Lag-Phase verhindert werden. Zudem müssen dem Wiesenschnittpresssaft – im Gegensatz zum Treberpresssaft – keinerlei zusätzliche Nährstoffe, wie z.B. Hefeextrakt oder Mineralsalze zugesetzt werden.

- Die kinetischen Daten sind deutlich schlechter als bei vergleichbaren Fermentationen mit Treberpresssaft. Dies zeigt sich insbesondere im Hinblick auf den finalen Milchsäuretitert, die Produktivität und die Nutzung der vorhandenen Kohlenhydrate.

5.6.3. Fermentationen mit abgepresstem Wiesenschnitt

Die Nutzung von Wiesenschnittpresssaft war also grundsätzlich möglich. Nun sollte untersucht werden, ob auch der – vom Pressen übrigbleibende – Wiesenschnittrückstand für die Feststofffermentation mit *Cellulomonas uda* genutzt werden kann. Dazu wurden Fermentationen mit einer Feststoffbeladung von 5 Gew.-% (Abbildung 43 A,C,E) und 15 Gew.-% (Abbildung 43 B,D,F) durchgeführt. Die Fermentationen wurden wiederum hinsichtlich (Teilabbildung in Klammern) Produktbildung und Wiesenschnittverbrauch (A,B), Zellwachstum und Protein- bzw. Tryptophankonzentration (C,D) sowie Cellulase- und Xylanase-Aktivität (E,F) untersucht.

Bei der Fermentation mit 5 Gew.-% wurde eine finale Essigsäurekonzentration von $13,85 \pm 3,99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und eine maximale Ethanolkonzentration von $2,4 \pm 0,71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erzielt. Dies steigerte sich für den Einsatz von 15 Gew.-% auf $28,71 \pm 0,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ für Essigsäure, während sich der finale Ethanoltitert mit $2,41 \pm 0,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nicht veränderte.

Die Produkt/Substrat-Ausbeute betrug für die geringere Feststoffbeladung $Y_{P/S} = 0,89 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$, während für die höhere Feststoffbeladung ein Wert von $Y_{P/S} = 0,84 \pm 0,08 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ ermittelt wurde. Allerdings muteten diese Werte etwas zu hoch an, da sich unter Einbeziehung der obligatorischen CO_2 -Bildung Werte von $Y_{P/S+\text{CO}_2} = 1,59 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ für 5 Gew.-% bzw. $Y_{P/S+\text{CO}_2} = 1,48 \pm 0,14 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ für 15 Gew.-% ergeben würden. Der Wiesenschnitt wurde zu einem geringeren Maße abgebaut, als dies bei den Versuchen mit Treber der Fall war. So verringerte sich die Wiesenschnittkonzentration bei einem Einsatz von 5 Gew.-% insgesamt auf $38,79 \pm 1,64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, was einer Abnahme um 27,2% gleichkam, während beim Treber noch knapp die Hälfte des Rohstoffs verbraucht worden war. Auch bei der höheren Feststoffbeladung von 15 Gew.-% wurde die endgültige Konzentration mit $122,63 \pm 4,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ermittelt (Abnahme um 23,3%), während beim Treber mit gleicher Feststoffbeladung (allerdings im Bioreaktor statt im Schüttelkolben) mehr als ein Drittel der anfänglichen lignocellulosehaltigen Biomasse abgebaut worden war.

In Analogie zu den anaeroben Versuchen mit Treber stieg die Zelldichte nur moderat – und vor allem gegen Ende des Prozesses – an. Außerdem akkumulierten kaum tryptophanhaltige Peptide in der Fermentationsbrühe, obwohl das Wiesenschnittprotein zu 5,4% (15 Gew.-%) bzw. 32,1% (5 Gew.-%) abgebaut wurde. Außerdem wurde – wie schon mit Treber als Substrat – kaum Cellulaseaktivität, sondern hauptsächlich Xylanaseaktivität detektiert. Die Gründe hierfür dürften identisch zu den zuvor, in Kapitel 5.4.3, genannten Gründen sein.

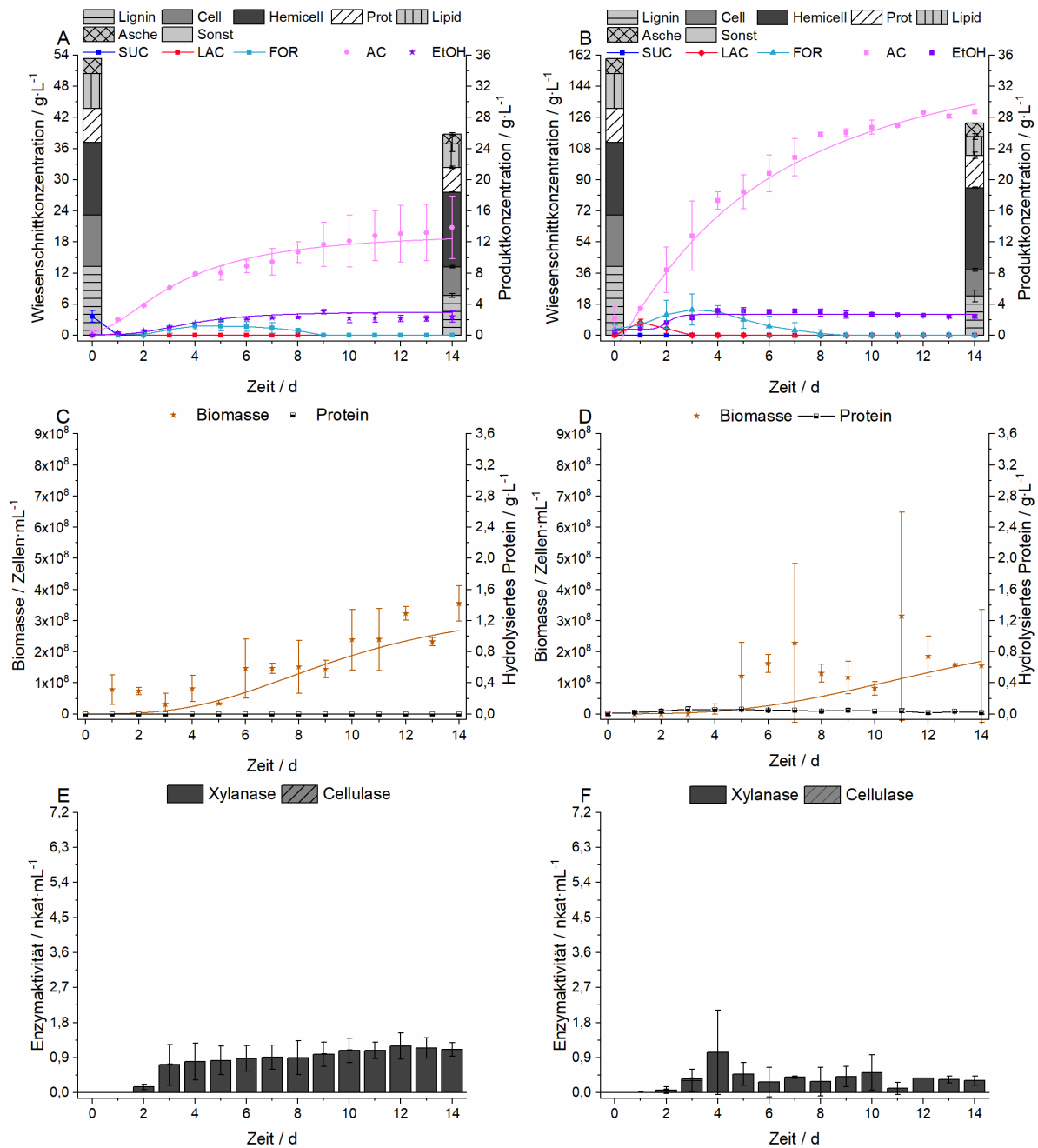


Abbildung 43: Fermentationen mit *C. uda* in einem anaeroben Medium (N₂) aus abgepresstem Herbst-Wiesenschnitt mit 1 g L⁻¹ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 und 120 rpm. Die Teilabbildungen A, C und E zeigen den Versuch mit 5 Gew.-% Wiesenschnitt und einer Hefeextraktkonzentration von 5 g L⁻¹; die Teilabbildungen B, D und F zeigen den Versuch mit 15 Gew.-% Wiesenschnitt und einer Hefeextraktkonzentration von 15 g L⁻¹: **A+B)** Produktkonzentrationen in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol sowie Substratkonzentration unter Einbeziehung der Wiesenschnitt-Bestandteile: Lignin, Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche und sonstiger Bestandteile, **C+D)** Zellbiomassebildung und hydrolysierte Proteinkonzentration, **E+F)** Xylanase- und Cellulase-Aktivität. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; Cell, Cellulose; Hemicell, Hemicellulose; Prot, Protein; Sonst, Sonstige; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol.

Alles in Allem konnte gezeigt werden, dass die entwickelten Fermentationsstrategien mit *C. uda* auf Wiesenschnitt übertragen werden konnten, und dabei tendenziell sogar höhere Essigsäuretitere erreicht werden konnten, auch wenn weniger Ethanol (möglicherweise aufgrund von unerwünschter Evaporation) detektiert werden konnte.

Kurzzusammenfassung:

- Die, für den festen Treberrückstand entwickelte, Fermentationsstrategie kann auf Wiesenschnitt übertragen werden, wobei analog zu den Fermentationen mit Treber vorgegangen werden kann.
- Bei den untersuchten Prozessen werden geringere Ethanolkonzentrationen aber dafür höhere Essigsäurekonzentrationen erzielt, als dies bei der Verwendung von Treber der Fall ist.

6. Fazit

Im folgenden Kapitel sollen die eingangs formulierten Ziele (Kapitel 2) nochmals aufgegriffen und bewertet werden, wobei eine Untergliederung in die Hauptthemenkomplexe dieser Arbeit in Bezug auf das Substrat Biertreber (Rohstoffanalyse, Treberpresssaftfermentation, Modellierung, Feststofffermentation) getroffen wird. Im Anschluss soll jeweils die Übertragbarkeit der Methoden auf das Substrat Wiesenschnitt kurz beleuchtet werden.

6.1. Rohstoffanalyse

Die wichtigsten Bestandteile des Trebers konnten allesamt analysiert werden. Dabei wurden Cellulose, Hemicellulose, Lignin, Protein, Lipid und die Aschefraktion als feste Bestandteile des Trebers identifiziert. Die flüssige, abpressbare Fraktion beinhaltete anteilmäßig vor allem Glucose, Maltose, Maltotriose und Maltooligomere (Dextrin), aber zu geringeren Anteilen auch Peptide, diverse Aminosäuren und Mineralien.

Mit der Rohstoffanalyse von sechs eigens hergestellten Biertrebern (Pale Ale, Helles, Kölsch, Weizen, Maibock und Weizenbock) konnten zahlreiche Korrelationen zwischen der Treberzusammensetzung und dem zugrundeliegenden Braugang identifiziert werden. Insbesondere die flüssige Fraktion des Biertrebers unterschied sich dabei in Abhängigkeit von der Braurezeptur deutlich. So führten große Malzschüttungen, hohe Weizenanteile und geringe Läutervolumina zu einem hohen Anteil von löslichen Zuckern und Dextrin an der Trockensubstanz des Trebers. Somit konnte die Nutzbarkeit von Biertreber für Fermentationen (insbesondere in Bezug auf die flüssige Fraktion) bereits aus der Braurezeptur abgeschätzt werden. Durch die Analyse eines kommerziellen Biertrebers (Bischoff) wurde zudem bestätigt, dass es sich bei den löslichen Komponenten, welche in Form von Treberpresssaft gewonnen werden können, um ein industriell-relevantes Phänomen handelt.

Die verwendeten Analysemethoden zur umfassenden Beschreibung des Trebers und Treberpresssaftes konnten überdies auf Wiesenschnitt und Wiesenschnittpresssaft übertragen werden.

6.2. Treberpresssaftfermentation

Durch die Fermentationen mit Treberpresssaft zum Zwecke der Milchsäureproduktion konnten hohe Produktkonzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten erzielt werden. Die sehr guten Ausbeuten und die vollständige Nutzung der vorhandenen Substrate spiegelten dabei einen vollständigen Umsatz von Kohlenhydraten zu Milchsäure wider. Zudem konnte der Prozess über den kompletten Versuchszeitraum vollständig beschrieben werden, was sich in einer geschlossenen Kohlenstoffbilanz in Bezug auf die wichtigsten C-haltigen Edukte und Produkte zeigte. Während die Produktivitäten sehr hoch lagen, waren noch höhere finale

Milchsäuretiter vor allem durch die Substratverfügbarkeit des verwendeten Treberpresssaftes limitiert. Durch diverse Optimierungsschritte konnten zudem die folgenden Resultate erzielt werden: (a) Mittels statistischer Versuchsplanung wurde der Nährstoffzusatz zum Fermentationsmedium auf Basis von Treberpresssaft verringert; Caseinpepton, Fleischextrakt und $(\text{NH}_4)_3\text{-Citrat}$ mussten nicht mehr zugesetzt werden. (b) Der Zusatz einer geringen Menge Glucoamylase führte zu einer Verbesserung der kinetischen Daten der Fermentationen. (c) Kommerzielles Hefeextrakt konnte durch Hefeextrakt, welches mittels Autolyse aus Brauhefe hergestellt wurde, substituiert werden. Die kinetischen Parameter für die optimierten Prozessbedingungen mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* waren: maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max} = 0,47 \text{ h}^{-1}$, maximale Milchsäurekonzentration $c_{\text{Lac,max}} = 79,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Produkt/Substrat-Ausbeute $Y_{\text{P/S}} = 0,89 \text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$, zellbiomassespezifische Milchsäurebildungsrate $q_{\text{P}} = 4,18 \text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und Produktivität $P_{15 \text{ h}} = 4,93 \text{ g}_{\text{Lac}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Somit wurde erstmalig ein Prozess beschrieben, der die flüssige Fraktion des Biertreibers separat nutzte und dabei hohe, ggfs. ökonomisch interessante, Produktkonzentrationen und kinetische Parameter erzielen konnte, ohne dass dafür hydrothermale Vorbehandlungsmethoden nötig waren. Allerdings mussten dem Treberpresssaft immer noch zahlreiche Supplemente, wenn auch zumeist in geringer Konzentration, zugesetzt werden.

Die entwickelte Fermentation konnte mit Treberpresssäften verschiedener Braurezepturen und sogar mit Wiesenschnittpresssaft durchgeführt werden, wobei in letzterem Fall zwar geringere Milchsäurekonzentrationen erzielt wurden (aufgrund geringerer anfänglicher Kohlenhydratkonzentrationen und einer unvollständigen Substratnutzung) aber andererseits auch keine Nährstoffe supplementiert werden mussten.

6.3. Simulation

Mit Hilfe eines kinetischen Modells konnten Fermentationen mit verschiedenen Treberpresssäften (Maibock, Pale Ale, Weizenbock) simuliert werden. Dabei wurden eine hohe Ähnlichkeit zwischen Modell und Experiment für die maximale Zelldichte, die maximale Milchsäurekonzentration sowie die Produktivität des Prozesses erzielt. Die Übereinstimmung der Fermentationskinetiken war in Bezug auf die Zellbiomasse, die Gesamt-Kohlenhydrate, die Milchsäure sowie die Aminosäuren und Proteine gut, wobei für die kurzkettigen Zucker etwas größere Abweichungen zwischen empirischen und simulierten Daten beobachtet wurden. Die Nährstoffgehalte der Fermentationsmedien auf der Basis von Treberpresssaft variierten aufgrund der unterschiedlichen Braurezepturen stark in Bezug auf die Gesamt-Kohlenhydrate ($26,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $107,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Aminosäuren ($1,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $6,78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) und Proteine ($0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $0,46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Die Abweichung zwischen Experiment und Simulation war – im Verhältnis zu den großen Unterschieden in der Medienzusammensetzung – recht gering

und reichte von 1,6% bis 12,9% (finale Zelldichte), 5,0% bis 24,8% (finale Milchsäurekonzentration) und 1,2% bis 13,5% (Produktivität des Prozesses).

Durch das Modell konnten überdies empirisch nicht-bestimmbare Aussagen über das Wachstum von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* getroffen werden: (a) Die Aminosäuren Alanin und Serin haben eine besondere Bedeutung für den Stoffwechsel des Organismus. Während Alanin wachstumsentkoppelt in einer unidirektionalen Reaktion 1. Ordnung in der Lag-Phase und frühen exponentiellen Wachstumsphase aufgenommen wird, erfolgt die Serinaufnahme wachstumsgekoppelt anhand der klassischen Differentialgleichung 1. Ordnung eines Batch-Prozesses. (b) Die finale Milchsäurekonzentration hängt nicht nur von der Zuckerkonzentration ab, sondern wird maßgeblich durch das Zusammenspiel von Kohlenhydrat- und Aminosäureverfügbarkeit des Treberpresssaftes beeinflusst.

Durch das entwickelte kinetische Modell ergab sich somit die Möglichkeit die Fermentationskinetiken bereits aufgrund der Zusammensetzung des verwendeten Treberpresssaftes abzuschätzen.

6.4. Feststofffermentation

Zur Verwertung des abgepressten Rückstandes wurden zahlreiche Fermentationsstrategien mit dem Organismus *Cellulomonas uda* erprobt. Aerobe Fermentationen führten zu einem sigmoidalen Anstieg der Zelldichte und einer starken Expression von Cellulasen und Hemicellulasen. So wurden unter diesen Bedingungen maximale Cellulaseaktivitäten von $0,98 \text{ nkat}\cdot\text{ml}^{-1}$, maximale Xylanaseaktivitäten von $5,0 \text{ nkat}\cdot\text{ml}^{-1}$ und Zellausbeuten von $0,22 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ erreicht. Unter anaeroben Bedingungen waren die Enzymaktivitäten und Zellausbeuten geringer, allerdings wurden lösliche Produkte (organische Säuren, Ethanol) mit einer Ausbeute von $0,41 \text{ g}_{\text{Prod}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ produziert. Somit ergaben sich mit der Einzellerprotein-/ Enzymproduktion oder Chemikalienproduktion zwei potenzielle Anwendungsmöglichkeiten mit nur einem Organismus. Darüber hinaus wurden diese Fermentationen genutzt, um verschiedene Strategien zur Überwachung und Regulation der Fermentationen mit suspendiertem Biertreber zu entwickeln: (a) Im Kolbenmaßstab wurde eine Strategie entwickelt, um den pH-Wert konstant zu halten. (b) Die schnelle und nicht-invasive Methode der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde genutzt, um die Wachstumsphase des Organismus durch Messung von Pyridoxin (aerob) und Tryptophan (anaerob) zu überwachen. (c) Außerdem wurde eine Korrelation zwischen Zellzahl und optischer Dichte ermittelt, die für Fermentationen mit festem Treber als Substrat bisher nicht beschrieben wurde und eine einfache Möglichkeit zur Bestimmung der Zellkonzentration bietet.

Durch die Variation der Medienzusammensetzung konnte zudem von der metabolischen Antwort des Organismus bei Veränderung der Kultivierungsbedingungen auf dessen Zentralstoffwechsel, welcher erstmalig durch bioinformatische Methoden aufgeklärt

wurde, geschlossen werden. Bei der Optimierung der anaeroben Fermentation wurden dadurch die folgenden Ergebnisse erhalten: (a) Reduzierende Bedingungen im Fermentationsmedium förderten die Bildung von Ethanol, wodurch in den durchgeführten Experimenten das Verhältnis von Ethanol zu Essigsäure von 1,08 auf 1,59 mol_{EtOH}·mol_{Ac}⁻¹ erhöht werden konnte. (b) Ein Absenken des pH-Wertes von 7,4 auf 5 verringerte die Bildung von Nebenprodukten (z.B. Essigsäure und Ameisensäure) bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Ethanolproduktion, wodurch das Ethanol/Essigsäure-Verhältnis weiter auf 9,2 mol_{EtOH}·mol_{Ac}⁻¹ angehoben wurde. (c) Eine hohe Verfügbarkeit kurzkettiger Zucker fördert die Milchsäurebildung – wahrscheinlich aufgrund eines sogenannten Overflow Metabolismus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hydrothermale Aufschlüsse – entgegen der aktuellen Meinung – nicht zwingend erforderlich sind, um die widerstandsfähige Struktur von lignocellulosehaltiger Biomasse zum Zwecke der Chemikalien- und Treibstoffsynthese mittels Mikroorganismen aufzubrechen. Somit konnte eine Alternative zu energie- und kostenintensiven hydrothermalen Vorbehandlungsmethoden aufgezeigt werden. Überdies handelt es sich bei dem entwickelten Prozess um eine Strategie zur Produktion von Biokraftstoffen und Chemikalien der 2. Generation, d.h. auf Basis von lignocellulosehaltiger Biomasse, was aufgrund des hohen Anteils an Biokraftstoffen 1. Generation, d.h. auf Basis von Lebensmitteln, zukunftssträftig erscheint. Allerdings waren die Produktkonzentrationen des entwickelten Prozesses auch nach zahlreichen Optimierungsansätzen gering. Die kinetischen Daten waren ebenfalls nicht besonders gut (wenn auch nicht schlechter als bei den meisten herkömmlichen mehrstufigen Prozessen), was wohl auf die widerstandsfähige Struktur lignocellulosehaltiger Biomasse zurückzuführen war. Die Ausbeuten waren bei geringen Feststoffeinsätzen von 5 Gew.-% recht gut – allerdings waren hier die finalen Produktkonzentration gering. Eine Fermentation im Bioreaktor mit 15 Gew.-% anstelle von 5 Gew.-% Treber vervierfachte die Essigsäurekonzentration, während Ethanol durch einen kontinuierlichen Stickstoffstrom schon während der Fermentation abgetrennt wurde. Mit steigender Feststoffbeladung auf 25 Gew.-% erhöhten sich zwar die Produkttiter weiter auf maximal 36,03 g·L⁻¹, allerdings sank dabei auch die Ausbeute in gleichem Maße ab, sodass hier eine Abwägung zwischen finalen Produktkonzentrationen und einer möglichst vollständigen Nutzung des Substrates getroffen werden muss.

Der Prozess konnte auf abgepressten Wiesenschnitt übertragen werden, wobei bei identischen Feststoffbeladungen insbesondere die Essigsäureproduktion deutlich erhöht war.

6.5. Gesamt-Fazit

In dieser Arbeit wurde ein Bioraffineriekonzept zur Verwendung von Biertreber aufgezeigt, wobei der Treber durch einen Pressschritt, welcher für den Gesamtprozess

zahlreiche Vorteile beinhaltet, in eine flüssige und eine feste Fraktion aufgeteilt wurde. Für die Stoffströme wurden separate Nutzungsmöglichkeiten aufgezeigt, wobei mit den Organismen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* und *Cellulomonas uda* die Wertstoffe, Milchsäure (aus der flüssigen Fraktion) und Ethanol sowie Essigsäure (aus der festen Fraktion) hergestellt werden konnten. Zur Überwachung, Optimierung, Steuerung und Vorhersage der Prozesse kamen dabei zahlreiche analytische Methoden, Submers- sowie Feststofffermentationen im Kolben- und Reaktormaßstab und kinetische Modellierungsansätze zum Einsatz. Für extrahierbare Lipide, die Verwendung der mikrobiellen Biomasse und der Fermentationsrückstände wurden zudem weitere Anwendungsfelder für die pharmazeutische, Lebensmittel-verarbeitende und Energie-produzierende Industrie vorgeschlagen. Außerdem wurde die Anwendung der, mit Biertrebern zahlreicher Braurezepturen erprobten, Strategien erfolgreich auf das Substrat Wiesenschnitt übertragen, sodass eine breite Anwendbarkeit in Aussicht steht.

Möglicherweise kann durch diese Arbeit ein kleiner Beitrag zur Lösung aktueller, globaler Probleme, wie der Treibhausgasemission durch die Verbrennung fossiler Ressourcen, geleistet werden und die Konversion von einem linearen zu einem zirkulären Wirtschaftssystem, zumindest für die Verwertung von Biertreber und unter Umständen für Wiesenschnitt, unterstützt werden. Denn wie der saudische Minister für Öl und mineralische Ressourcen (1962–1986) in seinem bekannten Ausspruch prophezeite: „Die Steinzeit wurde nicht wegen eines Mangels an Steinen beendet und das Ölzeitalter wird nicht wegen eines Mangels an Öl beendet werden“ [12].

7.Ausblick

Im folgenden Kapitel sollen kurz einige Anknüpfungspunkte zur Fortführung bzw. Erweiterung des dargelegten Forschungsgegenstandes gegeben werden. Dies soll insbesondere mögliche Strategien zur weiteren Optimierung und Leistungssteigerung der entwickelten Prozesse beinhalten.

7.1. Rohstoffanalyse

Die Strategien zur Analyse von Biertreber und Wiesenschnitt können mutmaßlich ohne Weiteres auf andere lignocellulosehaltige Biomassearten übertragen werden. In einer groß angelegten Studie könnte zudem der Einfluss des Brauvorgangs und des Rohstoffeinsatzes auf die Zusammensetzung des anfallenden Biertreibers genauer untersucht werden, um die Anwendbarkeit für die dargelegten (oder weiterführende) Prozesse genauer zu spezifizieren.

7.2. Treberpresssaftfermentation

Die Konzentrationen der, zu den Fermentationen zugesetzten, Supplemente könnten durch ein quantitatives anstelle des verwendeten qualitativen Designs im Rahmen einer weiteren statistischen Versuchsplanung ggfs. weiter reduziert werden. Mit Ausnahme der Hefeextraktkonzentration konnten alle Supplemente – unabhängig von der Kohlenhydratkonzentration des Presssaftes – eingesetzt werden, sodass es sich vermutlich um eine Zugabe im Überschuss gehandelt haben dürfte. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass insbesondere die Konzentrationen von K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ und $MnSO_4 \cdot H_2O$ weiter verringert werden können, da der Treberpresssaft die Ionen Mg^{2+} , Mn^{2+} , SO_4^{2-} und PO_4^{3-} bereits von sich aus zur Verfügung stellt und die puffernden Eigenschaften von K_2HPO_4 überdies in pH-regulierten Fermentationen nicht von besonderer Bedeutung sein dürften.

7.3. Simulation

Das Modell könnte weiter verbessert werden, indem fermentations-spezifische Besonderheiten, wie z.B. die $OD_{600\text{ nm}}/BTM$ -Korrelation, die Absterberate und eine Bedingung für das Einsetzen des Absterbevorgangs sowie der Serin- bzw. Alaninanteil am Protein des Treberpresssaftes Berücksichtigung in den Modellgleichungen fänden. Insbesondere das Absterbeverhalten unterschied sich, je nach eingesetztem Treberpresssaft, zum Teil deutlich, sodass Kriterien definiert werden müssten, ab welchem Zeitpunkt der Fermentation ein „Netto“-Absterbeprozess der Zellen einsetzt und mit welchen Molekülen (Substraten oder Produkten) dies ggfs. in Zusammenhang stehen könnte.

7.4. Feststofffermentation

Um einen wirtschaftlich sinnvollen Einsatz der Feststofffermentationen zu gewährleisten, müsste eine deutliche Steigerung der Produktkonzentrationen erfolgen, was im besten Falle nicht mit einer Verringerung der Ausbeute einhergehen sollte. Dies könnte

z.B. durch den Einsatz gentechnisch veränderter *C. uda* Spezies erreicht werden. So erscheint es wahrscheinlich, dass Reaktionen des Zentralstoffwechsels, welche durch ein einziges Enzym katalysiert werden, z.B. die Konversionen von Pyruvat zu Milchsäure oder Ameisensäure, recht einfach durch gentechnische Arbeiten ausgeknockt werden könnten. Da in diesem Falle keine Diversifizierung des Produktspektrums bei hoher Verfügbarkeit kurzkettiger Zuckermoleküle zu erwarten wäre, könnten dann erneut die Fermentationen mit nicht-abgepresstem Biertreber oder unter Zusatz von technischen Enzymmixturen untersucht werden, um so ggfs. höhere Produktkonzentrationen zu erzielen. Überdies könnte der Einsatz von speziellen Feststofffermentern (mit rotierender Trommel) die Stoffübergänge bei Fermentationen mit sehr hohen Feststoffbeladungen von ca. 25 Gew.-% erleichtern, was ebenfalls in erhöhten Produktkonzentrationen resultieren dürfte.

Des Weiteren sollte die Übertragbarkeit der entwickelten Prozessüberwachungs- und Regulierungsstrategien auf Suspensions- oder Feststofffermentationen mit anderen Substraten und/oder Mikroorganismen möglich sein, sodass sich hier weitergehende, potenzielle Forschungsfelder ergeben dürften.

7.5. Gesamt-Ausblick

Es wäre wünschenswert, wenn die entwickelten Verwertungsmöglichkeiten für Biertreber dazu führen würden, dass in der Zukunft auch die stoffliche Nutzung des Substrates Biertreber im Rahmen eines Bioraffinerie-Konzeptes in Betracht gezogen würde. Insbesondere durch den vorgeschlagenen Pressschritt und die separate Nutzung des Treberpresssaftes zur Produktion von Milchsäure könnte sich dabei eine plausible Anwendungsmöglichkeit auf tun, die zahlreiche Vorteile entlang der kompletten weiteren Wertschöpfungskette mit sich bringt. Durch die guten kinetischen Daten der Fermentation, hohe Ausbeuten und das „Tool“ der kinetischen Modellierung zur „Vorab-Abschätzung“ eines potenziellen Fermentationsertrages, dürfte sich hier eine Nutzungsmöglichkeit ergeben, welche leicht auf zahlreiche Standorte übertragen werden könnte. Die feste Fraktion könnte dann herkömmlichen Nutzungsmöglichkeiten zugeführt werden, oder nach Verbesserung der kinetischen Fermentationsdaten, zu Ethanol und Essigsäure konvertiert werden. Darüber hinaus können die entwickelten Prozessüberwachungs-, Regelungs- und Modellierungsstrategien in Zukunft möglicherweise auf zahlreiche andere Substrate und/oder Organismen übertragen werden, was in dieser Arbeit bereits für das Substrat Wiesenschnitt gezeigt wurde.

8.Literaturverzeichnis

- [1] Rajvanshi, A.K., Biomass gasification in: Alternative Energy in Agriculture, Vol. II, Kap. 4, Hrsg.: D. Y. Goswami, CRS Press, Cleveland (Ohio), USA, 83-102, 1986.
- [2] Huntington, H.G., Oil price forecasting in the 1980s: What went wrong? *Energy J.* 1994, 15, 1–22.
- [3] Loll, M.J., Bollag, J.M., Protein transformation in soil in. *Adv. Agron.* 1983, 36, 351–382.
- [4] Weisz, P.B., Haag, W.O., Rodewald, P.G., Catalytic production of High-Grade Fuel (Gasoline) from Biomass Compounds by Shape-Selective Catalysis. *Science.* 1979, 206, 57–58.
- [5] Wyman, C.E., Ethanol from Lignocellulosic biomass: Technology, Economics, and Opportunities. *Bioresour. Technol.* 1994, 50, 3–16.
- [6] Mandegari, M.A., Farzad, S., Van Rensburg, E., Görgens, J.F., Multi-criteria analysis of a biorefinery for co-production of lactic acid and ethanol from sugarcane lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2017, 11, 971–990.
- [7] Saratale, G.D., Saratale, R.G., Lo, Y.C., Chang, J.S., Multicomponent Cellulase Production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and Its Applications for Cellulosic Biohydrogen Production. *Biotechnol. Prog.* 2010, 26, 406–416.
- [8] Khawdas, W., Watanabe, K., Karatani, H., Aso, Y., u. a., Direct electron transfer of *Cellulomonas fimi* and microbial fuel cells fueled by cellulose. *J. Biosci. Bioeng.* 2019, 128, 593–598.
- [9] Ferreira, R.G., Azzoni, A.R., Freitas, S., On the production cost of lignocellulose-degrading enzymes. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2020, 15, 1–15.
- [10] Robak, K., Balcerek, M., Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Microbiol. Res.* 2020, 240, 126534.
- [11] Akermann, A., Weiermüller, J., Chodorski, J.N., Nestriepke, M.J., u. a., Optimization of bioprocesses with Brewers' spent grain and *Cellulomonas uda*. *Eng. Life Sci.* 2021, n.v., 1–20.
- [12] Türk, O., Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe, Springer Vieweg, Wiesbaden, Deutschland, 2014.
- [13] Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J. Cereal Sci.* 2006, 43, 1–14.
- [14] Narziss, L., Back, W., Brauwissenschaft und Brauereitechnologie. *Chemie Ing. Tech.* 2016, 88, 1869–1879.

-
- [15] Biendl, M., Engelhard, B., Forster, A., Gahr, A., u. a., Hopfen: Vom Anbau bis zum Bier, n. v., Kap. 2.1.1., Hrsg.: n.v., Fachverlag Hans Carl GmbH Nürnberg, Deutschland, 2012.
- [16] Narziss, L., Back, W., Die Bierbrauerei, Band 2: Technologie der Würzezubereitung, 8. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Hrsg.: n.v., Weinheim, Deutschland, 2009.
- [17] Deutscher Brauer Bund e.V., <https://brauer-bund.de/>, aufgerufen: 06.09. 2021.
- [18] Mussatto, S.I., Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci. Food Agric.* 2014, 94, 1264–1275.
- [19] Lynch, K.M., Steffen, E.J., Arendt, E.K., Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* 2016, 122, 553–568.
- [20] Barth, S.J., Barth, A.W., Barth, R., Barth/Haas Bericht 2019/2020, 2020.
- [21] Buffington, J., The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Adv. Chem. Eng. adn Sci.* 2014, 4, 308–318.
- [22] Barth, S.J., Barth, A.W., Barth, R., Der Barth-Bericht 2018/2019, 2019.
- [23] Barth, S.J., Barth, A.W., Barth, R., Der Barth-Bericht 2017/2018, 2018.
- [24] Radosavljević, M., Pejin, J., Pribić, M., Kocić-Tanackov, S., u. a., Brewing and malting technology by-products as raw materials in L-(+)-lactic acid fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2020, 95, 339–347.
- [25] Thiago, R. dos S.M., Pedro, P.M. de M., Eliana, F.C.S., Solid wastes in brewing process: A review. *J. Brew. Distill.* 2014, 5, 1–9.
- [26] Fahrenbach, H., Giegrich, J., Köppen, S., Wern, B., u. a., BioRest: Verfügbarkeit und Nutzungsoptionen biogener Abfall- und Reststoffe im Energiesystem (Strom-, Wärme- und Verkehrssektor), Abschlussbericht im Auftrag des Umweltbundesamtes, 2019.
- [27] Preißinger, W., Obermaier, A., Söldner, K., Steinhöfel, O., Biertreber: Futterwert, Konservierung und erfolgreicher Einsatz beim Wiederkäuer, Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), in Kooperation mit dem Deutschen und dem Bayrischen Brauerbund, 2008.
- [28] El-Shafey, E.I., Gameiro, M.L.F., Correia, P.F.M., de Carvalho, J.M.R., Dewatering of brewer's spent grain using a membrane filter press: A pilot plant study. *Sep. Sci. Technol.* 2004, 39, 3237–3261.
- [29] Assandri, D., Pampuro, N., Zara, G., Cavallo, E., u. a., Suitability of Composting Process for the Disposal and Valorization of Brewer's Spent Grain. *Agric.* 2021, 11, 1–12.
- [30] Akermann, A., Weiermüller, J., Christmann, J., Guirande, L., u. a., Brewers' spent

- grain liquor as a feedstock for lactate production with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Eng. Life Sci.* 2020, 20, 1–13.
- [31] Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., u. a., The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 104, 8661–8678.
- [32] Getu, K., Getachew, A., Berhan, T., Getnet, A., Supplementary value of ensiled brewers spent grain used as replacement to cotton seed cake in the concentrate diet of lactating crossbred dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020, 52, 3675–3683.
- [33] Belibasakis, N.G., Tsiroggianni, D., Effects of wet brewers grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1996, 57, 175–181.
- [34] San Martin, D., Orive, M., Iñarra, B., Castelo, J., u. a., Brewers' Spent Yeast and Grain Protein Hydrolysates as Second-Generation Feedstuff for Aquaculture Feed. *Waste and Biomass Valorization* 2020, 11, 5307–5320.
- [35] Kaur, V.I., Saxena, P.K., Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Bioresour. Technol.* 2004, 91, 101–104.
- [36] Amoah, K.O., Asiedu, P., Wallace, P., Bumbie, G.Z., u. a., The performance of pigs at different phases of growth on sun-dried brewers spent grain. *Livest. Res. Rural Dev.* 2017, 29, n.v.
- [37] El-Hack, M.E.A., Alagawany, M., Patra, A., Abdel-Latif, M., u. a., Use of Brewers Dried Grains as an Unconventional Feed Ingredient in the Diets of Broiler Chickens: A Review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2019, 7, 218–224.
- [38] Steiner, J., Procopio, S., Becker, T., Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res. Technol.* 2015, 241, 303–315.
- [39] Daley, C.A., Abbott, A., Doyle, P.S., Nader, G.A., u. a., A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutr. J.* 2010, 9, 1–12.
- [40] Leiber, F., Schenk, I.K., Maeschli, A., Ivemeyer, S., u. a., Implications of feed concentrate reduction in organic grassland-based dairy systems: a long-term on-farm study. *Animal* 2017, 11, 2051–2060.
- [41] Robertson, J.A., l'Anson, K.J.A., Treimo, J., Faulds, C.B., u. a., Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Sci. Technol.* 2010, 43, 890–896.
- [42] Mastanjević, K., Šarkanj, B., Warth, B., Krska, R., u. a., *Fusarium culmorum* multi-toxin screening in malting and brewing by-products. *Lwt* 2018, 98, 642–645.

-
- [43] Allen, W.R., Stevenson, K.R., Influence of Additives on the Ensiling Process of Wet Brewers' Grains. *J. Anim. Sci.* 1975, 55, 391–402.
- [44] Trinkwasseranalyse nach Trinkwasserverordnung, Anlagen 1,2 und 3, Stadtwerke Kaiserslautern (Wasserwerk Rote Hohl), 2018.
- [45] Ben-Hamed, U., Seddighi, H., Thomas, K., Economic Returns of Using Brewery's Spent Grain in Animal Feed. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 2011, 50, 142–145.
- [46] Garavaglia, C., Swinnen, J., The Craft Beer Revolution: An International Perspective. *Choices* 2017, 32, 1–8.
- [47] Reid, N., Gatrell, J.D., Craft Breweries and Economic Development: Local Geographies of Beer. *Polymath An Interdiscip. Arts Sci. J.* 2017, n.v., 90–110.
- [48] Mahmood, A.S.N., Brammer, J.G., Hornung, A., Steele, A., u. a., The intermediate pyrolysis and catalytic steam reforming of Brewers spent grain. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2013, 103, 328–342.
- [49] Saba, S., Zara, G., Bianco, A., Garau, M., u. a., Comparative analysis of vermicompost quality produced from brewers' spent grain and cow manure by the red earthworm *Eisenia fetida*. *Bioresour. Technol.* 2019, 293, 122019.
- [50] Amoriello, T., Fiorentino, S., Vecchiarelli, V., Pagano, M., Evaluation of Spent Grain Biochar Impact on hHop (*Humulus lupulus* L.) growth by Multivariate Image analysis. *Appl. Sci.* 2020, 10, 1–11.
- [51] Qiu, L., Li, J.J., Li, Z., Wang, J.J., Production and characterization of biocontrol fertilizer from brewer's spent grain via solid-state fermentation. *Sci. Rep.* 2019, 9, 1–9.
- [52] El Khoury, D., Cuda, C., Luhovyy, B.L., Anderson, G.H., Beta glucan: Health Benefits in Obesity and Metabolic Syndrome. *J. Nutr. Metab.* 2012, 2012, 1–28.
- [53] McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., Connolly, A., Piggott, C.O., u. a., Phenolic extracts of brewers' spent grain (BSG) as functional ingredients - Assessment of their DNA protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells. *Food Chem.* 2012, 134, 641–646.
- [54] Ikram, S., Huang, L.Y., Zhang, H., Wang, J., u. a., Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *J. Food Sci.* 2017, 82, 2232–2242.
- [55] Vriesekoop, F., Haynes, A., van der Heijden, N., Liang, H., u. a., Incorporation of Fermented Brewers Spent Grain in the Production of Sourdough Bread. *Fermentation* 2021, 7, 1–13.
- [56] Nocente, F., Natale, C., Galassi, E., Taddei, F., u. a., Using einkorn and tritordeum brewers' spent grain to increase the nutritional potential of durum wheat pasta. *Foods* 2021, 10, 1–9.
-

- [57] Ibbett, R., White, R., Tucker, G., Foster, T., Hydro-mechanical processing of brewer's spent grain as a novel route for separation of protein products with differentiated techno-functional properties. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2019, 56, 102184.
- [58] Shen, Y., Abeynayake, R., Sun, X., Ran, T., u. a., Feed nutritional value of brewers' spent grain residue resulting from protease aided protein removal. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2019, 10, 1–10.
- [59] Birsan, R.I., Wilde, P., Waldron, K.W., Rai, D.K., Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains. *Antioxidants* 2019, 8, 1–12.
- [60] Ivanova, K., Denkova, R., Kostov, G., Petrova, T., u. a., Extrusion of brewers' spent grains and application in the production of functional food. Characteristics of spent grains and optimization of extrusion. *J. Inst. Brew.* 2017, 123, 544–552.
- [61] Weger, A., Binder, S., Franke, M., Hornung, A., u. a., Solid Biofuel Production by Mechanical Pre-Treatment of Brewers' Spent Grain. *Chem. Eng. Trans.* 2014, 37, 661–666.
- [62] Celaya, A.M., Lade, A.T., Goldfarb, J.L., Co-combustion of brewer's spent grains and Illinois No. 6 coal: Impact of blend ratio on pyrolysis and oxidation behavior. *Fuel Process. Technol.* 2015, 129, 39–51.
- [63] Manyuchi, M.M., Frank, R., Techno-economic feasibility of using sorghum brewers spent grain to generate one megawatt of electricity using direct combustion technology, in: *47th Ghana Institution of Engineers (GhIE) Annual Conference*, 2016, S. 45–51.
- [64] Dudek, M., Świechowski, K., Manczarski, P., Koziel, J.A., u. a., The effect of biochar addition on the biogas production kinetics from the anaerobic digestion of brewers' spent grain. *Energies* 2019, 12, 1–22.
- [65] Panjičko, M., Zupančič, G.D., Fanedl, L., Logar, R.M., u. a., Biogas production from brewery spent grain as a mono-substrate in a two-stage process composed of solid-state anaerobic digestion and granular biomass reactors. *J. Clean. Prod.* 2017, 166, 519–529.
- [66] Malakhova, D. V., Egorova, M.A., Prokudina, L.I., Netrusov, A.I., u. a., The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 31, 2015–2023.
- [67] Pinheiro, T., Coelho, E., Romani, A., Domingues, L., Intensifying ethanol production from brewer's spent grain waste: Use of whole slurry at high solid loadings. *N. Biotechnol.* 2019, 53, 1–8.
- [68] Giacobbe, S., Piscitelli, A., Raganati, F., Lettera, V., u. a., Butanol production from

- laccase-pretreated brewer's spent grain. *Biotechnol. Biofuels* 2019, 12, 1–8.
- [69] Osman, A.I., O'Connor, E., McSpadden, G., Abu-Dahrieh, J.K., u. a., Upcycling brewer's spent grain waste into activated carbon and carbon nanotubes for energy and other applications via two-stage activation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2020, 95, 183–195.
- [70] de Araújo, T.P., Quesada, H.B., Bergamasco, R., Vareschini, D.T., u. a., Activated hydrochar produced from brewer's spent grain and its application in the removal of acetaminophen. *Bioresour. Technol.* 2020, 310, 123399.
- [71] Hejna, A., Marć, M., Kowalkowska-Zedler, D., Pladzyk, A., u. a., Insights into the Thermo-Mechanical Treatment of Brewers' Spent Grain as a Potential Filler for Polymer Composites. *Polymers.* 2021, 13, 1–20.
- [72] Cancelliere, R., Carbone, K., Pagano, M., Cacciotti, I., u. a., Biochar from brewers' spent grain: A green and low-cost smart material to modify screen-printed electrodes. *Biosensors* 2019, 9, 1–16.
- [73] Barbu, M.C., Montecuccoli, Z., Förg, J., Barbeck, U., u. a., Potential of Brewer's Spent Grain as a Potential Replacement of Wood in pMDI, UF or MUF Bonded Particleboard. *Polymers (Basel).* 2021, 13, 1–12.
- [74] Mussatto, S.I., Fernandes, M., Mancilha, I.M., Roberto, I.C., Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochem. Eng. J.* 2008, 40, 437–444.
- [75] Mussatto, S.I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I.M., u. a., Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol. Lett.* 2007, 29, 1973–1976.
- [76] Rojas-Chamorro, J.A., Cara, C., Romero, I., Ruiz, E., u. a., Ethanol Production from Brewers' Spent Grain Pretreated by Dilute Phosphoric Acid. *Energy and Fuels* 2018, 32, 5226–5233.
- [77] Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 2008, 28, 213–224.
- [78] Xiros, C., Christakopoulos, P., Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnol. Biofuels* 2009, 2, 1–12.
- [79] Xiros, C., Katapodis, P., Christakopoulos, P., Factors affecting cellulose and hemicellulose hydrolysis of alkali treated brewers spent grain by *Fusarium oxysporum* enzyme extract. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 1688–1696.
- [80] Michelin, M., Teixeira, J.A., Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and

- enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. *Bioresour. Technol.* 2016, 216, 862–869.
- [81] Pierre, G., Sannier, F., Goude, R., Nouviaire, A., u. a., Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *J. Cereal Sci.* 2011, 54, 305–310.
- [82] Akermann, A., Weiermüller, J., Lenz, S., Christmann, J., u. a., Kinetic Model for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Brewers' Spent Grain Liquor Using *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *lactis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2021, 26, 114–124.
- [83] Carvalheiro, F., Garrote, G., Parajó, J.C., Pereira, H., u. a., Kinetic Modeling of Brewery's Spent Grain Autohydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 233–243.
- [84] Patel, A., Mikes, F., Bühler, S., Matsakas, L., Valorization of Brewers' Spent Grain for the Production of Lipids by Oleaginous Yeast. *Molecules* 2018, 23, 1–16.
- [85] Weiermüller, J., Akermann, A., Laudensack, W., Chodorski, J., u. a., Brewers' spent grain as carbon source for itaconate production with engineered *Ustilago maydis*. *Bioresour. Technol.* 2021, 336, 125262.
- [86] Lorente, A., Remón, J., Salgado, M., Huertas-Alonso, A.J., u. a., Sustainable Production of Solid Biofuels and Biomaterials by Microwave-Assisted, Hydrothermal Carbonization (MA-HTC) of Brewers' Spent Grain (BSG). *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2020, 8, 18982–18991.
- [87] Kan, X., Zhang, J., Tong, Y.W., Wang, C.H., Overall evaluation of microwave-assisted alkali pretreatment for enhancement of biomethane production from brewers' spent grain. *Energy Convers. Manag.* 2018, 158, 315–326.
- [88] Wilkinson, S., Smart, K.A., James, S., Cook, D.J., Bioethanol Production from Brewers Spent Grains Using a Fungal Consolidated Bioprocessing (CBP) Approach. *Bioenergy Res.* 2017, 10, 146–157.
- [89] Pimentel, D., Patzek, T.W., Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Nat. Resour. Res.* 2005, 14, 65–76.
- [90] Pejin, J., Radosavljević, M., Kocić-Tanackov, S., Djukić-Vuković, A., u. a., Lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate by *Lactobacillus rhamnosus* with yeast extract addition and pH control. *J. Inst. Brew.* 2017, 123, 98–104.
- [91] López-Linares, J.C., García-Cubero, M.T., Lucas, S., Coca, M., Integral valorization of cellulosic and hemicellulosic sugars for biobutanol production: ABE fermentation of the whole slurry from microwave pretreated brewer's spent grain. *Biomass and Bioenergy*

- 2020, *135*, 1–12.
- [92] Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006, *81*, 268–274.
- [93] Dávila, J.A., Rosenberg, M., Cardona, C.A., A biorefinery approach for the production of xylitol, ethanol and polyhydroxybutyrate from brewer's spent grain. *AIMS Agric. Food* 2016, *1*, 52–66.
- [94] Liguori, R., Soccol, C.R., de Souza Vandenberghe, L.P., Woiciechowski, A.L., u. a., Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. *Energies* 2015, *8*, 2575–2586.
- [95] Rojas-Chamorro, J.A., Romero, I., López-Linares, J.C., Castro, E., Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment. *Renew. Energy* 2020, *148*, 81–90.
- [96] Cooray, S.T., Chen, W.N., Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *J. Funct. Foods* 2018, *42*, 85–94.
- [97] Tan, Y.X., Mok, W.K., Lee, J., Kim, J., u. a., Solid State Fermentation of Brewers' Spent Grains for Improved Nutritional Profile Using *Bacillus subtilis* WX-17. *Fermentation* 2019, *5*, 1–13.
- [98] Gmoser, R., Fristedt, R., Larsson, K., Undeland, I., u. a., From stale bread and brewers spent grain to a new food source using edible filamentous fungi. *Bioengineered* 2020, *11*, 582–598.
- [99] Casas-Godoy, L., González-Escobar, J.L., Mathis, A.G., Barrera-Martínez, I., Revalorization of untreated Brewer's spent grain: novel and versatile feedstock to produce cellulases, lipases, and yeast biomass in a biorefinery approach. *Biomass Convers. Biorefinery* 2020, *n.v.*, n.v.
- [100] Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K., In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2012, *72*, 67–75.
- [101] Koirala, P., Maina, N.H., Nihtilä, H., Katina, K., u. a., Brewers' spent grain as substrate for dextran biosynthesis by *Leuconostoc pseudomesenteroides* DSM20193 and *Weissella confusa* A16. *Microb. Cell Fact.* 2021, *20*, 1–13.
- [102] Grahl, F., Beitlich, N., Fechter, M., Speer, K., u. a., Neuer stofflicher Nutzungspfad von Treberpresswasser aus Biertreber unter Einsatz von Membrantrenntechnik in Lebens- oder Nahrungsergänzungsmitteln. *Chemie Ing. Tech.* 2019, *91*, 1314–1325.
- [103] Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Lopes, S., Parajó, J.C., u. a., Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by

- Debaryomyces hansenii CCMI 941. *Process Biochem.* 2005, 40, 1215–1223.
- [104] Hang, Y.D., Splittstoesser, D.F., Woodams, E.E., Utilization of Brewery Spent Grain Liquor by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol.* 1975, 30, 879–880.
- [105] Shannon, L.J., Stevenson, K.E., Growth of Fungi and BOD Reduction in Selected Brewery Wastes. *J. Food Sci.* 1975, 40, 826–829.
- [106] Shannon, L.J., Stevenson, K.E., Growth Of *Calvatia gigantea* And *Candida steatolytica* In Brewery Wastes For Microbial Protein Production Aand BOD Rreduction. *J. Food Sci.* 1975, 40, 830–832.
- [107] Roukas, T., Kotzekidou, P., Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery wastes by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 1987, 9, 291–294.
- [108] Roukas, T., Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 15, 447–450.
- [109] Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., u. a., Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy* 2013, 61, 34–43.
- [110] Roberts, R.T., Use of an Extract of Spent Grains As an Antifoaming Agent in Fermentors. *J. Inst. Brew.* 1976, 82, 96–96.
- [111] Roukas, T., Kotzekidou, P., Production of Citric Acid from Brewery Wastes by Surface Fermentation Using *Aspergillus niger*. *J. Food Sci.* 1986, 51, 225–228.
- [112] Płaza, G.A., Pacwa-Płociniczak, M., Piotrowska-Seget, Z., Jangid, K., u. a., Agroindustrial Wastes As Unconventional Substrates For Growing Of *Bacillus* Strains And Production Of Biosurfactant. *Environ. Prot. Eng.* 2011, 37, 63–71.
- [113] Khoshnevisan, B., Duan, N., Tsapekos, P., Awasthi, M.K., u. a., A critical review on livestock manure biorefinery technologies: Sustainability, challenges, and future perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2021, 135, 110033.
- [114] Ohara, H., Biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 62, 474–477.
- [115] Kamm, B., Kamm, M., Biorefinery - Systems. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2004, 18, 1–6.
- [116] Molitor, B., Richter, H., Martin, M.E., Jensen, R.O., u. a., Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases - Turning steel mills into biorefineries. *Bioresour. Technol.* 2016, 215, 386–396.
- [117] Nizami, A.S., Shahzad, K., Rehan, M., Ouda, O.K.M., u. a., Developing waste biorefinery in Makkah: A way forward to convert urban waste into renewable energy. *Appl. Energy* 2017, 186, 189–196.
- [118] Dahiya, S., Kumar, A.N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., u. a., Food waste

- biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* 2018, 248, 2–12.
- [119] Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., u. a., Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour. Technol.* 2017, 229, 53–62.
- [120] Brasil, B.S.A.F., Silva, F.C.P., Siqueira, F.G., Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *N. Biotechnol.* 2017, 39, 90–98.
- [121] Kutsay, A., Kratky, L., Jirout, T., Kutsay et al. (2020) - Biogas Plant Upgrade to CO₂-Free Technology: A Techno-Economic Case Study. *Cehmical Eng. Technol.* 2020, 43, 1981–1993.
- [122] Koniuszewska, I., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Czatzkowska, M., Intensification of biogas production using various technologies: A review. *Int. J. Energy Res.* 2020, 44, 6240–6258.
- [123] Riedmann, C., <https://www.oesterreich-isst-informiert.at/industrie/neue-wege-bioraffinerien-verwerten-rohstoffe/>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [124] Thöni, F., <https://gradplato.com/kategorien/portraits-all/recycling-upcycling-oder-das-potential-von-biertreber>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [125] Brauerei Locher AG, <https://www.appenzellerbier.ch/de/home.html>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [126] Rise, <https://www.riseproducts.co/>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [127] Regrained; <https://www.regrained.com/>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [128] [RE]BERT, <https://www.re-bert.de/>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [129] E6PR, <https://www.e6pr.com/about-e6pr>, aufgerufen: 06.07. 2021.
- [130] Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., u. a., Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* 2020, 6, 1–21.
- [131] Gänzle, M.G., Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* 2015, 2, 106–117.
- [132] Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M.K., Alahyaribeik, S., The effect of lactobacillus cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe* 2020, 62, 102103.
- [133] Monteagudo, J.M., Rodríguez, L., Rincón, J., Fuertes, J., Kinetics of lactic Acid Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* Grown on Beet Molasses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1997, 68, 271–276.
- [134] Ahmad, A., Banat, F., Taher, H., A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environ. Technol. Innov.* 2020, 20, 101138.

- [135] Reddy Tadi, S.R., Arun, E.V.R., Limaye, A.M., Sivaprakasam, S., Enhanced production of optically pure d (-) lactic acid from nutritionally rich Borassus flabellifer sugar and whey protein hydrolysate based-fermentation medium. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2017, 64, 279–289.
- [136] Gonçalves, L.M.D., Xavier, A.M.R.B., Almeida, J.S., Carrondo, M.J.T., Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 1991, 13, 314–319.
- [137] Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., Shibata, K., u. a., Continuous D-lactic acid production by a novelthermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 89, 1741–1750.
- [138] John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 74, 524–534.
- [139] Dosuky Atiat, S., Nasr, F.N., Yousef Eman, T.A., Barakat Olfat, S., Bio-production of lactic acid from salted whey and whey permeate. *Plant Arch.* 2019, 19, 793–798.
- [140] Dusselier, M., Van Wouwe, P., Dewaele, A., Makshina, E., u. a., Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 2013, 6, 1415–1442.
- [141] Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31, 877–902.
- [142] Tsuji, H., Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 569–597.
- [143] Rau, U., Doktorarbeit: Anwendung Der Kontinuierlichen Messenspektrometrie Zur Bestimmung Von Ethanol Und Gelösten Gasen Bei Fermentation Von Cellulose und Hemicellulosen Durch *Cellulomonas uda*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 1985.
- [144] Stackenbrandt, E., Doktorarbeit: Biochemisch-taxonomische Untersuchungen an der Gattung *Cellulomonas*, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1974.
- [145] Reguera, G., Leschine, S.B., Biochemical and genetic characterization of ChiA, the major enzyme component for the solubilization of chitin by *Cellulomonas uda*. *Arch. Microbiol.* 2003, 180, 434–443.
- [146] Poulsen, H.V., Willink, F.W., Ingvorsen, K., Aerobic and anaerobic cellulase production by *Cellulomonas uda*. *Arch. Microbiol.* 2016, 198, 725–735.
- [147] Bagnara, C., Toci, R., Gaudan, C., Belaich, S.P., Isolation and Characterization of a Cellulolytic Microorganism, *Cellulomonas fermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*

- 1985, 35, 502–507.
- [148] Béguin, P., Eisen, H., Free and Cellulose-bound Cellulases in a *Cellulomonas* Species. *J. Gen. Microbiol.* 1977, 101, 191–196.
- [149] Sami, A.J., Akhtar, M.W., Malik, N.N., Naz, B.A., Production of free and substrate-bound cellulases of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme Microb. Technol.* 1988, 10, 626–631.
- [150] Rajoka, M.I., Malik, K.A., Cellulase Production By *Cellulomonas biazotea* Cultured In Media Containing Different Cellulosic Substrates. *Bioresour. Technol.* 1997, 59, 21–27.
- [151] Stoppok, W., Rapp, P., Wagner, F., Formation, Location, and Regulation of Endo-1,4 ,beta- Glucanases and beta-Glucosidases from *Cellulomonas uda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44, 44–53.
- [152] Rapp, P., Wagner, F., Production and Properties of Xylan-Degrading Enzymes from *Cellulomonas uda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 51, 746–752.
- [153] Rodriguez, H., Enriquez, A., Volfova, O., The localization and activity of *Cellulomonas xylanase* on sugarcane bagasse pith. *Can. J. Microbiol.* 1985, 31, 754–756.
- [154] Sani, R., Peyton, B., Smith, W., Apel, W., u. a., Dissimilatory reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by *Cellulomonas* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 60, 192–199.
- [155] Rajoka, M.I., Production of single cell protein through fermentation of a perennial grass grown on saline lands with *Cellulomonas biazotea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 21, 207–211.
- [156] Swathy, R., Rambabu, K., Banat, F., Ho, S.H., u. a., Production and optimization of high grade cellulase from waste date seeds by *Cellulomonas uda* NCIM 2353 for biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 2020, 45, 22260–22270.
- [157] Ontañón, O.M., Bed, S., Ghio, S., Garrido, M.M., u. a., Optimisation of xylanases production by two *Cellulomonas* strains and their use for biomass deconstruction. *Biotechnol. Relev. Enzym. Proteins* 2021, 105, 4577–4588.
- [158] Xu, R., Zhang, K., Xie, S., Liu, P., u. a., Evaluation of electricity production from paper industry wastewater by *Cellulomonas iranensis* LZ-P1 isolated from giant panda. *J. Clean. Prod.* 2021, 278, 123576.
- [159] Shi, Y.L., Sun, Y., Ruan, Z.Y., Su, J., u. a., *Cellulomonas telluris* sp. nov., an endoglucanase-producing actinobacterium isolated from Badain Jaran desert sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020, 70, 631–635.
- [160] Ndongo, S., Bittar, F., Beye, M., Robert, C., u. a., '*Cellulomonas timonensis*' sp. nov.,

- taxonogenomics description of a new bacterial species isolated from human gut. *New Microbes New Infect.* 2018, 23, 7–16.
- [161] Li, Y.Q., Zhang, H., Xiao, M., Dong, Z.Y., u. a., *Cellulomonas endophytica* sp. nov., isolated from *Gastrodia elata* Blume. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020, 70, 3091–3095.
- [162] Kim, S.K., Kook, M.C., Yan, Z.F., Trinh, H., u. a., *Cellulomonas aurantiaca* sp. nov., isolated from a soil sample from a tangerine field. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2019, 112, 1623–1632.
- [163] Yamamura, H., Hayashi, T., Hamada, M., Kohda, T., u. a., *Cellulomonas algicola* sp. nov., an actinobacterium isolated from a freshwater alga. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019, 69, 2723–2728.
- [164] Dudley, R., Ethanol, Fruit Ripening, and the Historical Origins of Human Alcoholism in Primate Frugivory. *Integr. Comp. Biol.* 2004, 44, 315–323.
- [165] Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energy* 2012, 37, 19–27.
- [166] Hasan, T.H., Kadhum, H.A.L.I., Alasedi, K.K., The Using of Ethanol and Isopropyl Alcohol as a disinfectant: Review. *Int. J. Pharm. Res.* 2021, 13, 2150–2152.
- [167] Dagle, R.A., Winkelman, A.D., Ramasamy, K.K., Lebarbier Dagle, V., u. a., Ethanol as a Renewable Building Block for Fuels and Chemicals. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2020, 59, 4843–4853.
- [168] Statista GmbH, Weltweite Produktion von Ethanol für Kraftstoffe in den Jahren 2000 bis 2018 (in Millionen Kubikmeter), 2020.
- [169] Sharma, B., Larroche, C., Dussap, C.G., Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 2020, 313, 123630.
- [170] Vidra, A., Németh, Á., Bio-produced Acetic Acid: A review. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 2018, 62, 245–256.
- [171] Pal, P., Nayak, J., Acetic Acid Production and Purification: Critical Review Towards Process Intensification. *Sep. Purif. Rev.* 2017, 46, 44–61.
- [172] Budsberg, E., Morales-Vera, R., Crawford, J.T., Bura, R., u. a., Production routes to bio-acetic acid: life cycle assessment. *Biotechnol. Biofuels* 2020, 13, 1–15.
- [173] Tanguler, H., Erten, H., Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food Bioprod. Process.* 2008, 86, 317–321.
- [174] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R.O., Scarlata, C., u. a., Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, National Renewable Energy Laboratory (NREL), Department of Energy, USA, 2012.
- [175] Lin, S.Y., Dence, C.W., Methods in Lignin Chemistry, Kap. 2.2.2.3, Hrsg.: T.E. Timell,

- Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland, 1992.
- [176] Kindred, D.R., Verhoeven, T.M.O., Weightman, R.M., Swanston, J.S., u. a., Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. *J. Cereal Sci.* 2008, 48, 46–57.
- [177] Matissek, R., Steiner, G., Lebensmittelanalytik: Grundzüge, Methoden, Anwendungen, 3. Auflage, Kap. 2.1.1., Hrsg.: F. M. Schnepel, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland, 2006.
- [178] Sheng, C., Azevedo, J.L.T., Estimating the higher heating value of biomass fuels from basic analysis data. *Biomass and Bioenergy* 2005, 28, 499–507.
- [179] Bradford, M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 1976, 254, 248–254.
- [180] Akermann, A., Weiermüller, J., Ulber, R., Development of a Biorefinery Concept for Brewers' Spent Grain with a Preliminary Pressing Step. *Chemie Ing. Tech.* 2019, 91, 1606–1614.
- [181] De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., A medium used for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 1960, 23, 130–135.
- [182] Goni, I., Garcia-Alonso, A., Saura-Calixto, F., A Starch Hydrolysis Procedure to Estimate Glycemic Index. *Nutr. Res.* 1997, 17, 427–437.
- [183] Schnell, S., Mendoza, C., The condition for pseudo-first-order kinetics in enzymatic reactions is independent of the initial enzyme concentration. *Biophys. Chem.* 2004, 107, 165–174.
- [184] Edwards, C.H., Warren, F.J., Milligan, P.J., Butterworth, P.J., u. a., A novel method for classifying starch digestion by modelling the amylolysis of plant foods using first-order enzyme kinetic principles. *Food Funct.* 2014, 5, 2751–2758.
- [185] Altioik, D., Tokatli, F., Harsa, S., Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006, 81, 1190–1197.
- [186] Liu, E., Zheng, H., Hao, P., Konno, T., u. a., A Model of Proteolysis and Amino Acid Biosynthesis for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Whey. *Curr. Microbiol.* 2012, 65, 742–751.
- [187] Berry, A.R., Franco, C.M.M., Zhang, W., Middelberg, A.P.J., Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnol. Lett.* 1999, 21, 163–167.
- [188] Levenspiel, O., The Monod Equation: A Revisit and a Generalization to Product

- Inhibition Situations. *Biotechnol. Bioeng.* 1980, 22, 1671–1687.
- [189] Macey, R., Oster, G., Zahnley, T., Berkeley Madonna User's Guide 8.0, University of California, Department of Molecular and Cellular Biology, Berkeley, USA, 2000.
- [190] Weiermüller, J., Akermann, A., Sieker, T., Ulber, R., Biorefineries Based on Weakly Lignified Biomass. *Chemie Ing. Tech.* 2020, 92, 1711–1722.
- [191] Bagramyan, K., Galstyan, A., Trchounian, A., Redox potential is a determinant in the *E. coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant. *Bioelectrochemistry* 2000, 51, 151–156.
- [192] Pandey, A., Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2003, 13, 81–84.
- [193] Nestriepke, M., Bachelorarbeit: Optimierung der Feststofffermentation mit *Cellulomonas uda*, Technische Universität Kaiserslautern, 2020.
- [194] Adney, B., Baker, J., Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure, National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008.
- [195] Takors, R., Kommentierte Formelsammlung Bioverfahrenstechnik, Hrsg.: B. Häcker, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland, 2013.
- [196] Chen, H., Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice, Kap. 1.2.2., Hrsg.: n.v., Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Deutschland, 2012.
- [197] Christmann, J., 3. Vertiefungspraktikum: Optimierung der fermentativen Prozessierung von Biertreber zur Milchsäuregewinnung, Technische Universität Kaiserslautern, 2017.
- [198] Christmann, J., Masterarbeit: Bioprozessentwicklung mit Treberpresssaft zur Produktion von Plattformchemikalien, Technische Universität Kaiserslautern, 2019.
- [199] Christmann, J., Forschungspraktikum: Vorversuche zur Bioprozessentwicklung mit Treberpresssaft zur Produktion von Plattformchemikalien, Technische Universität Kaiserslautern, 2018.
- [200] Guirande, L., Forschungsarbeit: Optimierung von Fermentationen zur Milchsäureherstellung durch *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* mit Treberpresssaft, Technische Universität Kaiserslautern, 2018.
- [201] Santos, M., Jiménez, J.J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., u. a., Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chem.* 2003, 80, 17–21.
- [202] Ragaei, S., Abdel-Aal, E.S.M., Noaman, M., Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chem.* 2006, 98, 32–38.
- [203] Jay, A.J., Parker, M.L., Faulks, R., Husband, F., u. a., A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *J. Cereal Sci.* 2008, 47, 357–364.
- [204] Pasha, I., Anjum, F.M., Morris, C.F., Grain Hardness: A Major Determinant of Wheat

- Quality. *Food Sci. Technol. Int.* 2010, 16, 511–522.
- [205] Herrera-Saldana, R.E., Huber, J.T., Poore, M.H., Dry Matter, Crude Protein, and Starch Degradability of Five Cereal Grains. *J. Dairy Sci.* 1990, 73, 2386–2393.
- [206] Privatbrauerei Bischoff GmbH + Co. KG, <http://www.bischoff-bier.de/produkte/?A=1>, aufgerufen: 27.04. 2021.
- [207] Schwill-Miedaner, A., Verfahrenstechnik im Brauprozess, Hrsg.: n.v., Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Deutschland, 2011.
- [208] Li, C., Zhang, Z., Zhao, Z.K., Direct conversion of glucose and cellulose to 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquid under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 5403–5405.
- [209] Idris, A., Suzana, W., Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 2006, 41, 1117–1123.
- [210] Zhang, G., Mills, D.A., Block, D.E., Development of Chemically Defined Media Supporting High-Cell-Density Growth of Lactococci, Enterococci, and Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 1080–1087.
- [211] Coelho, L.F., De Lima, C.J.B., Rodovalho, C.M., Bernardo, M.P., u. a., Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: Optimization of medium composition. *Brazilian J. Chem. Eng.* 2011, 28, 27–36.
- [212] Ronniger, C., Design of Experiments & Statistics, 2014.
- [213] Partanen, L., Marttinen, N., Alatossava, T., Fats and Fatty Acids as Growth Factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2001, 24, 500–506.
- [214] Naveena, B.J., Altaf, M., Bhadrappa, K., Madhavendra, S.S., u. a., Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. *Process Biochem.* 2005, 40, 681–690.
- [215] Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X., u. a., Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem. Eng. J.* 2008, 39, 496–502.
- [216] Qi, B.K., Yao, R.S., Lai, M., Deng, S.S., Effect of Tween 80 on production of lactic acid by *Lactobacillus casei*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2009, 31, 85–89.
- [217] Hébert, E.M., Raya, R.R., De Giori, G.S., Nutritional requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* 2004, 49, 341–345.
- [218] Iino, T., Uchimura, T., Komagata, K., The effect of sodium acetate on the growth yield

- , the production of L- and D-lactic acid, and the activity of some enzymes of the glycolytic pathway of *Lactobacillus sakei* NRIC 1071 and *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2002, 48, 91–102.
- [219] Stiles, J., Penkar, S., Plocková, M., Chumchalová, J., u. a., Antifungal Activity of Sodium Acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Prot.* 2002, 65, 1188–1191.
- [220] Fitzpatrick, J., Ahrens, M., Smith, S., Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochem.* 2001, 36, 671–675.
- [221] Amrane, A., Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2000, 75, 223–228.
- [222] Bender, R., Ziegler, A., Lange, S., Multiple Regression. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* 2007, 132, 30–32.
- [223] Wang, J.Z., Yue, J.Y., Zhang, C.H., Jia, W., u. a., Preparation of peptone from chicken bone residue by using natural pancreas as catalyst. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2016, 91, 2852–2861.
- [224] Demirci, A., Pometto, A.L., Enhanced production of D(-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649. *J. Ind. Microbiol.* 1992, 11, 23–28.
- [225] Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K., u. a., Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 211–217.
- [226] Prasad, S., Srikanth, K., Limaye, A.M., Sivaprakasam, S., Homo-fermentative production of D-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. *Biotechnol. Lett.* 2014, 36, 1303–1307.
- [227] Carr, J.G., Cutting, C. V., Whiting, G.C., Lactic acid bacteria in beverages and food, Hrsg.: n.v., Academic Press, New York, USA, S. 373, 1975.
- [228] Kunji, R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., u. a., Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996, 70, 187–221.
- [229] Buchholz, J., Graf, M., Blombach, B., Takors, R., Improving the carbon balance of fermentations by total carbon analyses. *Biochem. Eng. J.* 2014, 90, 162–169.
- [230] Burgos-Rubio, C.N., Okos, M.R., Wankat, P.C., Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 305–314.
- [231] Kumar Dutta, S., Mukherjee, A., Chakraborty, P., Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996, 46,

- 410–413.
- [232] Youssef, C. Ben, Goma, G., Olmos-Dichara, A., Kinetic modelling of *Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus* growth and lactic acid production in batch cultures under various medium conditions. *Biotechnol. Lett.* 2005, 27, 1785–1789.
- [233] Yáñez, R., Marques, S., Gírio, F.M., Roseiro, J.C., The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. *Process Biochem.* 2008, 43, 356–361.
- [234] Amrane, A., Prigent, Y., Influence of an initial addition of lactic acid on growth, acid production and their coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Bioprocess Eng.* 1998, 19, 307–312.
- [235] Amrane, A., Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, 28, 827–834.
- [236] Åkerberg, C., Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G., Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49, 682–690.
- [237] Polakovič, M., Bryjak, J., Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochem. Eng. J.* 2004, 18, 57–63.
- [238] Roy, D., Leduy, A., Goulet, J., Kinetics of Growth and Lactic Acid Production from Whey Permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Can. J. Chem. Eng.* 1987, 65, 597–603.
- [239] Sasaki, M., Bosman, B.W., Tan, P.S.T., Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J. Dairy Res.* 1995, 62, 601–610.
- [240] Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W., Rogers, P.L., Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: Experimental data and model development. *Biochem. Eng. J.* 2003, 14, 127–135.
- [241] Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., De Vuyst, L., Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 81, 41–52.
- [242] Biazar, J., Tango, M., Babolian, E., Islam, R., Solution of the kinetic modeling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. *Appl. Math. Comput.* 2003, 144, 433–439.
- [243] Bellon-Maurel, V., Orliac, O., Christen, P., Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochem.* 2003, 38, 881–896.

- [244] Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T. V., Karanth, N.G., Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2003, 13, 127–135.
- [245] Bhargev, S., Panda, B.P., Ali, M., Javed, S., Solid-state Fermentation: An overview. *Chem. Biochem. Eng.* 2008, 22, 49–70.
- [246] Christopherson, M.R., Suen, G., Bramhacharya, S., Jewell, K.A., u. a., The Genome Sequences of *Cellulomonas fimi* and „*Cellvibrio gilvus*“ Reveal the Cellulolytic Strategies of Two Facultative Anaerobes, Transfer of „*Cellvibrio gilvus*“ to the Genus *Cellulomonas*, and Proposal of *Cellulomonas gilvus* sp. nov. *PLoS One* 2013, 8, 1–10.
- [247] Zhuang, W., Zhang, S., Xia, X., Wang, G., Draft genome sequence of *Cellulomonas carbonis* T26 and comparative analysis of six *Cellulomonas* genomes. *Stand. Genomic Sci.* 2015, 10, 1–8.
- [248] Clemmer, J.E., Tseng, C.L., Identification Of The Major Anaerobic End Products Of *Cellulomonas* sp. (ATCC 21399). *Biotechnol. Lett.* 1986, 8, 823–826.
- [249] Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N., Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 1999, 15, 804–816.
- [250] Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 2012, 30, 1458–1480.
- [251] Pavón-Orozco, P., Santiago-Hernández, A., Rosengren, A., Hidalgo-Lara, M.E., u. a., The family II carbohydrate-binding module of xylanase CflXyn11A from *Cellulomonas flavigena* increases the synergy with cellulase TrCel7B from *Trichoderma reesei* during the hydrolysis of sugar cane bagasse. *Bioresour. Technol.* 2012, 104, 622–630.
- [252] Halsall, D.M., Gibson, A.H., Cellulose Decomposition and Associated Nitrogen Fixation by Mixed Cultures of *Cellulomonas gelida* and *Azospirillum* species or *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 50, 1021–1026.
- [253] Prasertsan, P., Doelle, H.W., Separation and characterization of endoglucanases from culture filtrates of *Cellulomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986, 1, 326–333.
- [254] Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Del Carmen Montes-Horcasitas, M., Hidalgo-Lara, M.E., Purification and characterization of two sugarcane bagasse-absorbable thermophilic xylanases from the mesophilic *Cellulomonas flavigena*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 34, 331–338.
- [255] Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R.H., Characterization of Xylanolytic Enzymes in *Clostridium cellulovorans*: Expression of Xylanase Activity Dependent on Growth Substrates. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 7037–7043.
- [256] Piccinni, F.E., Ontañón, O.M., Ghio, S., Sauka, D.H., u. a., Secretome profile of

- Cellulomonas sp. B6 growing on lignocellulosic substrates. *J. Appl. Microbiol.* 2019, 126, 811–825.
- [257] Rajoka, M.I., Malik, K.A., Cellulase and Hemicellulase Production by *Cellulomonas flavigena* NIAB 441. *Biotechnol. Lett.* 1984, 6, 597–600.
- [258] Zhang, J., Tang, M., Viikari, L., Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresour. Technol.* 2012, 121, 8–12.
- [259] Chomvong, K., Kordić, V., Li, X., Bauer, S., u. a., Overcoming inefficient cellobiose fermentation by cellobiose phosphorylase in the presence of xylose. *Biotechnol. Biofuels* 2014, 7, 1–11.
- [260] Lu, X., Wang, C., Li, X., Zhao, J., Temperature and pH influence adsorption of cellobiohydrolase onto lignin by changing the protein properties. *Bioresour. Technol.* 2017, 245, 819–825.
- [261] Eriksson, T., Karlsson, J., Tjerneld, F., A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002, 101, 41–60.
- [262] Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M., Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.* 2004, 107, 65–72.
- [263] Li, J.-K., Asali, E.C., Humphrey, A.E., Horvath, J.J., Monitoring Cell Concentration and Activity by Multiple Excitation Fluorometry. *Biotechnol. Prog.* 1991, 7, 21–27.
- [264] Marose, S., Lindemann, C., Scheper, T., Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring. *Biotechnol. Prog.* 1998, 14, 63–74.
- [265] Matthews, B.J.H., Jones, A.C., Theodorou, N.K., Tudhope, A.W., Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs. *Mar. Chem.* 1996, 55, 317–332.
- [266] Zhao, G., Winkler, M.E., Kinetic Limitation and Cellular Amount of Pyridoxine (Pyridoxamine) 5'-phosphate Oxidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1995, 177, 883–891.
- [267] Nakamura, I., Nishikawa, Y., Kamihara, T., Fukui, S., Thiamine-Induced Reversible Deficiency In Respiratory Activity Of *Saccharomyces carlsbergensis*: Respiratory Adaption Caused By Pyridoxine. *FEBS Lett.* 1976, 62, 354–358.
- [268] Assawajaruwan, S., Eckard, P., Hitzmann, B., On-line monitoring of relevant fluorophores of yeast cultivations due to glucose addition during the diauxic growth.

- Process Biochem.* 2017, 58, 51–59.
- [269] Frankenberg, N., Moser, J., Jahn, D., Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63, 115–127.
- [270] Watanabe, K., Asakawa, S., Hayano, K., Evaluation Of Extracellular Protease Activities Of Soil Bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 1994, 26, 479–482.
- [271] Geisseler, D., Horwath, W.R., Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biol. Biochem.* 2008, 40, 3040–3048.
- [272] Li, F., Yang, L., Lv, X., Liu, D., u. a., Purification and characterization of a novel extracellular alkaline protease from *Cellulomonas bogoriensis*. *Protein Expr. Purif.* 2016, 121, 125–132.
- [273] Poulsen, O.M., Petersen, L.W., Growth of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source Induction of extracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, 29, 480–484.
- [274] Geisseler, D., Joergensen, R.G., Ludwig, B., Temporal effect of straw addition on amino acid utilization by soil microorganisms. *Eur. J. Soil Biol.* 2012, 53, 107–113.
- [275] Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., Ludwig, B., Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. *Soil Biol. Biochem.* 2010, 42, 2058–2067.
- [276] Farrell, M., Prendergast-Miller, M., Jones, D.L., Hill, P.W., u. a., Soil microbial organic nitrogen uptake is regulated by carbon availability. *Soil Biol. Biochem.* 2014, 77, 261–267.
- [277] Braun, M., Kim, J.M., Schmid, R.D., Purification and some properties of an extracellular l-amino acid oxidase from *Cellulomonas cellulans* AM8 isolated from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 37, 594–598.
- [278] Roshchupkin, D.I., Talitsky, V. V., Pelenitsyn, A.B., Fluorometric Study of Tryptophan Photolysis. *Photochem. Photobiol.* 1979, 30, 635–643.
- [279] Mostofa, K.M.G., Yoshioka, T., Konohira, E., Tanoue, E., u. a., Three-dimensional fluorescence as a tool for investigating the dynamics of dissolved organic matter in the Lake Biwa watershed. *Limnology* 2005, 6, 101–115.
- [280] Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., Singh, R., The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22, 394–400.
- [281] Emtiazi, G., Nahvi, I., Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw. *Biomass and Bioenergy* 2000, 19, 31–37.
- [282] Hofrichter, M., Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme*

- Microb. Technol.* 2002, 30, 454–466.
- [283] Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, G., u. a., Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 620–626.
- [284] Du, C., Yan, H., Zhang, Y., Li, Y., u. a., Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 69, 554–563.
- [285] Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., Yvon, M., Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101, 1114–1122.
- [286] Berovič, M., Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 64, 552–557.
- [287] Husson, F., Tu, V.P., Santiago-Gomez, M., Cachon, R., u. a., Effect of redox potential on the growth of *Yarrowia lipolytica* and the biosynthesis and activity of heterologous hydroperoxide lyase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2006, 39, 179–183.
- [288] Feron, G., Mauvais, G., Lherminier, J., Michel, J., u. a., Metabolism of fatty acid in yeast: Addition of reducing agents to the reaction medium influences β -oxidation activities, γ -decalactone production, and cell ultrastructure in *Sporidiobolus ruinenii* cultivated on ricinoleic acid methyl ester. *Can. J. Microbiol.* 2007, 53, 738–749.
- [289] Mohammadi, M., Mohamed, A.R., Najafpour, G.D., Younesi, H., u. a., Effect of Organic Substrate on Promoting Solventogenesis in Ethanogenic Acetogene *Clostridium ljungdahlii* ATCC 55383. *Int. J. Eng. Trans. B Appl.* 2014, 27, 185–194.
- [290] Maddox, I.S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., u. a., The cause of „acid crash“ and „acidogenic fermentations“ during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 2, 95–100.
- [291] Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 82, 815–827.
- [292] Weinwurm, F., Drljo, A., Silva, T.L.S., Friedl, A., Principles of Ethanol Organosolv Lignin Precipitation: Process Simulation and Energy Demand. *Chem. Eng. Trans.* 2014, 39, 583–588.
- [293] Kosmachevskaya, O. V., Shumaev, K.B., Topunov, A.F., Carbonyl Stress in Bacteria: Causes and Consequences. *Biochem.* 2015, 80, 1655–1671.
- [294] Thompson, R.A., Trinh, C.T., Overflow metabolism and growth cessation in *Clostridium thermocellum* DSM1313 during high cellulose loading fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 2017, 114, 2592–2604.

- [295] Russell, J.B., Cook, G.M., Energetics of bacterial growth: Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 1995, 59, 48–62.
- [296] Teixeira de Mattos, M.J., Tempest, D.W., Metabolic and energetic aspects of the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glucose in anaerobic chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 1983, 134, 80–85.
- [297] Desvaux, M., Unravelling Carbon Metabolism in Anaerobic Cellulolytic Bacteria. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 1229–1238.
- [298] Russell, J.B., Strategies That Ruminant Bacteria Use to Handle Excess Carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 1955–1963.
- [299] del Río, J.C., Prinsen, P., Gutiérrez, A., Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *J. Cereal Sci.* 2013, 58, 248–254.
- [300] Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., u. a., Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 2001, 16, 53–58.
- [301] Hernandez, E.M., Pharmaceutical and Cosmetic Use of Lipids in: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 7. Edition, Hrsg.: F. Shahidi, John Wiley & Sons LTd., New York, USA, 2020.
- [302] Quílez, J., García-Lorda, P., Salas-Salvadó, J., Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.* 2003, 22, 343–351.
- [303] MacKay, D.S., Jones, P.J.H., Phytosterols in human nutrition: Type, formulation, delivery, and physiological function. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, 113, 1427–1432.
- [304] Liu, L., Winter, K.M., Stevenson, L., Morris, C., u. a., Wheat bran lipophilic compounds with in vitro anticancer effects. *Food Chem.* 2012, 130, 156–164.
- [305] Hongzhang, C., Hongqiang, L., Liying, L., The inhomogeneity of corn stover and its effects on bioconversion. *Biomass and Bioenergy* 2011, 35, 1940–1945.
- [306] Vane, L.M., Alvarez, F.R., Effect of membrane and process characteristics on cost and energy usage for separating alcohol-water mixtures using a hybrid vapor stripping-vapor permeation process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2015, 90, 1380–1390.
- [307] Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P., Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 19, 595–603.
- [308] Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., u. a., Effects of Substrate Loading on Enzymatic Hydrolysis and Viscosity of Pretreated Barley Straw. *Appl.*

- Biochem. Biotechnol.* 2007, 143, 27–40.
- [309] Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G., Influence of Enzyme Loading and Physical Parameters on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Softwood. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17, 110–117.
- [310] Shahryari, Z., Fazaelpoor, M.H., Shaabani, M.S., Ghasemi, Y., Production of Fungal Phytase in an Innovative Trickle Bed Bioreactor. *Waste and Biomass Valorization* 2020, 11, 3273–3280.
- [311] Dermoun, Z., Gaudin, C., Belaich, J.P., Effects of End-Product Inhibition of *Cellulomonas uda* Anaerobic Growth on Cellobiose Chemostat Culture. *J. Bacteriol.* 1988, 170, 2827–2831.
- [312] Xiros, C., Christakopoulos, P., Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. *Waste and Biomass Valorization* 2012, 3, 213–232.
- [313] Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., Jaiswal, A.K., A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresour. Technol.* 2017, 248 Part A, 272–279.
- [314] Bajwa, D.S., Peterson, T., Sharma, N., Shojaeiarani, J., u. a., A review of densified solid biomass for energy production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2018, 96, 296–305.
- [315] Faria, N.T., Marques, S., Ferreira, F.C., Fonseca, C., Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces* spp. using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates. *N. Biotechnol.* 2019, 49, 137–143.
- [316] Beldman, G., Hennekam, J., Voragen, A.G.J., Enzymatic Hydrolysis of Beer Brewers' Spent Grain and the Influence of Pretreatments. *Biotechnol. Bioengi* 1987, 30, 668–671.
- [317] Tat, J., Heskett, K., Satomi, S., Pilz, R.B., u. a., Sodium azide poisoning: a narrative review. *Clin. Toxicol.* 2021, 59, 683–697.
- [318] Aboltins, A., Palabinskis, J., Research in Brewer's Spent Grain Drying Process. *Eng. Rural Dev.* 2015, n.v., 230–235.
- [319] Arranz, J.I., Miranda, M.T., Sepúlveda, F.J., Montero, I., u. a., Analysis of Drying of Brewers' Spent Grain. *Proceedings* 2018, 2, 1467–1471.
- [320] Stroem, L.K., Desai, D.K., Hoadley, A.F.A., Superheated steam drying of Brewer's spent grain in a rotary drum. *Adv. Powder Technol.* 2009, 20, 240–244.
- [321] Zheng, J., Rehmann, L., Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 18967–18984.
- [322] Pérez, A.D., Rodríguez-Barona, S., Fontalvo, J., Liquid-Liquid Equilibria for Trioctylamine/1-Dodecanol/Lactic Acid/Water System at 306.1, 310.1 and 316.1 K:

- Experimental Data and Prediction. *J. Chem. Eng. Data* 2016, 61, 2269–2276.
- [323] Frieling, P. Von, Schugerl, K., Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation broths. *Process Biochem.* 1999, 34, 685–696.
- [324] Oliveira, F.S., Araújo, J.M.M., Ferreira, R., Rebelo, L.P.N., u. a., Extraction of L-lactic, L-malic, and succinic acids using phosphonium-based ionic liquids. *Sep. Purif. Technol.* 2012, 85, 137–146.
- [325] Thang, V.H., Novalin, S., Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 4368–4379.
- [326] Pan, X., Angelidaki, I., Alvarado-Morales, M., Liu, H., u. a., Methane production from formate, acetate and H₂/CO₂; focusing on kinetics and microbial characterization. *Bioresour. Technol.* 2016, 218, 796–806.
- [327] Demirbaş, A., Relationships between lignin contents and heating values of biomass. *Energy Convers. Manag.* 2001, 42, 183–188.
- [328] Maus, A.-L., Masterarbeit: Fermentative Herstellung von Grund- und Feinchemikalien auf Basis von Grünschnitt-Fractionen, Technische Universität Kaiserslautern, 2021.
- [329] Garnier, E., Laurent, G., Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytol.* 1994, 128, 725–736.
- [330] Akin, D.E., Burdick, D., Percentage of Tissue Types in Tropical and Temperate Grass Leaf Blades and Degradation of Tissues by Rumen Microorganisms. *Crop Sci.* 1975, 15, 661–668.
- [331] Sharma, H.S.S., Lyons, G., McRoberts, C., Biorefining of perennial grasses: A potential sustainable option for Northern Ireland grassland production. *Chem. Eng. Res. Des.* 2011, 89, 2309–2321.
- [332] Takara, D., Khanal, S.K., Characterizing compositional changes of Napier grass at different stages of growth for biofuel and biobased products potential. *Bioresour. Technol.* 2015, 188, 103–108.
- [333] Jarrige, R., Chemical methods for predicting the energy and protein value of forages. *Ann. Zootech.* 1980, 29, 299–323.
- [334] Lieberei, R., Reisdorff, C., Nutzpflanzen, 8. Auflage, Hrsg.: n.v., Thieme Medical Publishers, Stuttgart, Deutschland, o. J.
- [335] Andersen, M., Kiel, P., Integrated utilisation of green biomass in the green biorefinery. *Ind. Crops Prod.* 2000, 11, 129–137.
- [336] Thomsen, M.H., Kiel, P., Selection of lactic acid bacteria for acidification of brown juice (grass juice) with the aim of making a durable substrate for L-lysine fermentation. *J.*

- Sci. Food Agric.* 2008, 88, 976–983.
- [337] Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., u. a., Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 1–14.
- [338] Sharma, H.S.S., Mandl, M., Green biorefinery in: Sustainable Bioenergy Production, 1. Auflage, Hrsg.: L. Wang, CRC Press, Cleveland (Ohio), USA, 2014.
- [339] Juknevičius, S., Sabienė, N., The content of mineral elements in some grasses and legumes. *Ekologija* 2007, 44–52.
- [340] Schlegel, P., Wyss, U., Arrigo, Y., Hess, H.D., Mineral concentrations of fresh herbage from mixed grassland as influenced by botanical composition, harvest time and growth stage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016, 219, 226–233.

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Der Brauprozess. Die Abbildung stellt einen Ausschnitt einer Abbildung des Deutschen Brauer Bundes e.V. dar [17]. - 5 -
- Abbildung 2:** Biertreber direkt nach dem Brauprozess, d.h. als Nasstreber..... - 6 -
- Abbildung 3:** Lichtmikroskopische Aufnahme von *L. delbrueckii* subsp. *lactis* in MRS-Medium; aufgenommen mit einem Wasserimmersionsobjektiv ($40 \times 0,65 \infty/0,17$ WD 0,56) bei 40-facher Vergrößerung und unter Verwendung von Phasenkontrast Ph1..... - 18 -
- Abbildung 4:** Mechanismus der homofermentativen Milchsäurebildung aus Glucose. Die Abbildung stellt einen Ausschnitt einer Abbildung aus Gänzle (2015) dar [131]. - 18 -
- Abbildung 5:** Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. uda* in einem Medium bestehend aus 5 Gew.-% MB-Treber in 0,2 M MOPS-Puffer pH = 7,4; aufgenommen mit einem Wasserimmersionsobjektiv ($40 \times 0,65 \infty/0,17$ WD 0,56) bei 40-facher Vergrößerung ohne Phasenkontrast; Anmerkung: Zentral ist ein Treberpartikel zu sehen; bei den kleinen Punkten handelt es sich um die Zellen; MB, Maibock. - 20 -
- Abbildung 6: A)** Tinkturenpresse **B)** Spindelpresse - 23 -
- Abbildung 7:** Soxhlet-Apparaturen - 26 -
- Abbildung 8:** RALF-Reaktorsysteme - 30 -
- Abbildung 9:** Optimierungsansätze der Fermentationen mit Treberpresssaft: **(I)** Referenzfermentation mit MRS-Medium, **(II)** Referenzfermentation mit verdünntem WeBo-Presssaft und voller Nährstoffsupplementation gemäß MRS-Medium, **(III)** Optimierte Nährstoffzugabe, **(IV)** Optimierte Nährstoffzugabe und Zusatz der Glucoamylase, **(V)** Einsatz von Hefeextrakt aus Brauhefe, **(VI)** Nutzung von unverdünntem PA-Presssaft, **(VI)** Nutzung von unverdünntem MB-Presssaft; WeBo, Weizenbock; PA, Pale Ale; MB, Maibock [30]. - 32 -
- Abbildung 10:** Visualisierung der Modellgleichungen: Zunächst erfolgt der enzymatische Abbau von Maltooligomeren (dunkelgrün) über die Zwischenprodukte Maltotriose (mittelgrün) und Maltose (hellgrün) zu Glucose (gelb). Glucose, Aminosäuren und Proteine werden vom Organismus zur Produktion von Milchsäure und zum Wachstum genutzt. Allen Umsätzen liegen Raten zugrunde, die oberhalb der Pfeile dargestellt sind; k_1 , k_2 , k_3 : Reaktionskonstanten der Kinetik 1. Ordnung; μ , bakterielle Wachstumsrate, r_p , Produkt-Bildungsrate; AS, Aminosäuren; Prot, Protein, LAC, Milchsäure; BTM, Biotrockenmasse [82]. - 34 -
- Abbildung 11:** Kulturgefäße für *C. uda* unter aeroben (Mitte) und anaeroben Bedingungen (links und rechts); Bild: Malte Nestriepke. - 39 -
- Abbildung 12:** Optimierungsansätze der Fermentationen mit dem festen Treberrückstand: **(i)** Referenzfermentation mit Standard-Mineral-Medium, **(ii)** Referenzfermentation mit Treber, **(iii)** Einsatz von CO_2 im Kopfraum, **(iv)** Einsatz von Hefeextrakt, **(v)** Einsatz von Hefeextrakt und Oxidationsmittel, **(vi)** Einsatz von Hefeextrakt und Reduktionsmittel, **(vii)** pH = 5,0, **(viii)** pH = 9,0, **(ix)** Switch des pH-Wertes, **(x)** Einsatz eines technischen Cellulasemixes, **(xi)** Einsatz eines technischen Hemicellulasemixes, **(xii)** Einsatz eines Cellulase- und Hemicellulasemixes, **(xiii)** OS-Aufschluss + Zusatz von Hefeextrakt und Reduktionsmittel, **(xiv)** OS-Aufschluss, **(xv)** Verwendung nicht-gepressten MB-Trebers, **(xvi)** Nutzung von HE-Treber, **(xvii)** Nutzung lipidfreien HE-Trebers, **(xviii)** Fermentation mit 15 Gew.-% MB-Treber im Bioreaktor, **(xix)** Fermentation mit 20 Gew.-% MB-Treber im Kolbenmaßstab, **(xx)** Fermentation mit 25 Gew.-% MB-Treber im Kolbenmaßstab. - 40 -
- Abbildung 13:** Biostat-Reaktorsystem..... - 43 -
- Abbildung 14:** Prozentuale Zusammensetzung einiger Biertreber, nachdem die löslichen Bestandteile abgetrennt wurden. Gezeigt werden ausschließlich die festen Bestandteile des Trebers (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent..... - 50 -
- Abbildung 15:** Prozentuale Zusammensetzung einiger Biertreber direkt nach dem Brauprozess, d.h. ohne vorherigen Pressschritt. Gezeigt werden die Bestandteile des Treberpresssaftes (Grün- und Gelbtöne) sowie die festen Bestandteile (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für

diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent. - 53 -

Abbildung 16: Auswirkungen der Braurezeptur in Bezug auf: **A)** Menge des verwendeten Malzes und Anteil von Weizenmalz, **B)** genutztes Flüssigkeitsvolumen unterteilt in Haupt- und Nachguss, **C)** Stammwürzegehalt des Bieres und **D)** daraus resultierender Anteil löslicher Zucker (Summenparameter aus Maltooligomeren, Maltotriose, Maltose und Glucose) an der Trockenmasse des Biertreibers; °Brix, Grad Brix; Gew.-%, Gewichtsprozent; PA, Pale Ale; HE, Helles; KÖ, Kölsch; W, Weizen; MB, Maibock; WeBo, Weizenbock..... - 55 -

Abbildung 17: Fermentation im Kolbenmaßstab mit verdünntem HE-Presssaft und dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bei einer Temperatur von 45 °C und einer Schüttlerfrequenz von 100 rpm: **A)** Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose-, Glucose- und Milchsäure-Konzentration, **B)** BTM und pH-Wert. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten. Die Datenpunkte für Maltotriose, Maltose, Glucose, Milchsäure, BTM und den pH-Wert wurden durch sigmoidale Fits angenähert; für die Maltooligomere wurde ein linearer Fit verwendet; BTM, Biotrockenmasse [180]. . - 60 -

Abbildung 18: Ergebnisse des statistischen Versuchsplans zum Zwecke der Reduzierung der Nähstoffsupplementation in der Fermentation mit Treberpresssaft. Gezeigt ist die Effektstärke des zu optimierenden Zielwertes (Milchsäurekonzentration) in Bezug auf die neun untersuchten Einflussparameter (d.h. Bestandteile des MRS-Mediums) [30]. - 62 -

Abbildung 19: Ergebnisse des statistischen Versuchsplans bzgl. der Modellgüte: **A)** Experimentelle (empirische) Werte gegenüber den berechneten (Modell-)Werten für alle 52 Einzelversuche des D-optimalen Testplans, **B)** Gaußsche Residuen-Normalverteilung [30]. - 64 -

Abbildung 20: Fermentationen mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und verdünntem WeBo-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$. Die Datenpunkte der Fermentation bei vollständiger Supplementation (Fermentation **(II)**) zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten. Die Fermentationen bei optimierter Supplementation (Fermentation **(III)**), optimierter Supplementation und Glucoamylase (Fermentation **(IV)**) und optimierter Supplementation, Glucoamylase und Hefeextrakt aus Brauhefe (Fermentation **(V)**) stellen Einzelversuche dar. **A)** Biotrockenmasse. Konzentration von **B)** Milchsäure, **C)** Maltooligomeren, **D)** Maltotriose, **E)** Maltose, **F)** Glucose. Die Glucose-Datenpunkte der Fermentationen mit Glucoamylase wurden mit Polynomen 2. Grades gefittet, alle anderen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl; WeBo, Weizenbock [30]. - 68 -

Abbildung 21: Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem PA-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation **(VI)**): **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration. Die Glucose-Datenpunkte wurden mit Polynomen 2. Grades angepasst; alle anderen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl; PA, Pale Ale. - 70 -

Abbildung 22: Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem MB-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation **(VII)**): **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration. Die Glucose-Datenpunkte wurden mit Polynomen 2. Grades angepasst; alle anderen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl; MB, Maibock. - 71 -

Abbildung 23: Massenbilanz in Bezug auf die wichtigsten kohlenstoffhaltigen Komponenten Maltooligomere, Maltotriose, Maltose, Glucose, Gesamt-Aminosäuren einschließlich Alanin und Serin, Protein, Milchsäure und Biotrockenmasse der Fermentation mit unverdünntem MB-Presssaft (Fermentation **(VII)**); BTM, Biotrockenmasse; AS, Aminosäuren; MB, Maibock [82]. - 72 -

Abbildung 24: Simulationsergebnisse zur Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem MB-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation **(VII)**). Die berechneten Modellwerte werden durch unterbrochene Linien dargestellt und in der Legende durch „M“ gekennzeichnet. **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-

Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration; BTM, Biotrockenmasse; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydratkonzentration; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäurekonzentration; N, Rührerdrehzahl; MB, Maibock [82]. - 78 -

Abbildung 25: Simulationsergebnisse zur Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und unverdünntem PA-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ (Fermentation **(VI)**). Die berechneten Modellwerte werden durch unterbrochene Linien dargestellt und in der Legende durch „_M“ gekennzeichnet. **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration; BTM, Biotrockenmasse; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydratkonzentration; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäurekonzentration; N, Rührerdrehzahl; PA, Pale Ale [82]. - 80 -

Abbildung 26: Simulationsergebnisse zur Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und verdünntem WeBo-Treberpresssaft bei $T = 45\text{ °C}$, $N = 400\text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$. Die berechneten Modellwerte werden durch unterbrochene Linien dargestellt und in der Legende durch „_M“ gekennzeichnet. Die empirischen Werte zeigen die Mittelwerte aus den Fermentationen **(IV)** und **(V)**, welche in Kapitel 4.5.7 vorgestellt wurden. **A)** Biotrockenmasse-, Maltooligomer-, Maltotriose-, Maltose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration, **C)** Gesamt-Aminosäure- und Protein-Konzentration, **D)** Alanin- und Serin-Konzentration; BTM, Biotrockenmasse; S_{Total} , Gesamt-Kohlenhydratkonzentration; AS_{Total} , Gesamt-Aminosäurekonzentration; N, Rührerdrehzahl; WeBo, Weizenbock [82]. - 82 -

Abbildung 27: Potenzieller Zentralstoffwechsel von *C. uda*; Anmerkung: Zu jeder Reaktion sind die zugehörigen E.C.-Nummern gegeben; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; EtOH, Ethanol; AC, Essigsäure; FOR, Ameisensäure; CO_2 , Kohlenstoffdioxid; H_2O , Wasser; NADH, Nicotinamid Adenin Dinucleotid (reduziert); NAD^+ , Nicotinamid Adenin Dinucleotid (oxidiert); CoA, Coenzym A; Ac-CoA, Acetyl-Coenzym A; AT(D,M)P, Adenosintri-(di-, mono-)phosphat; P_i , Phosphat; PP_i , Diphosphat; UON, Ubiquinon; UOL, Ubiquinol [11]. - 85 -

Abbildung 28: Fermentationen mit *C. uda* in einem Medium aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber und $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$ und 120 rpm. Die Teilabbildungen A, C und E zeigen anaerobe Bedingungen; die Teilabbildungen B, D und F beschreiben den aeroben Versuch. **A+B)** Produktkonzentrationen von Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol sowie Substratkonzentration unter Einbeziehung der Treber-Bestandteile: Lignin, Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche und sonstiger Bestandteile, **C+D)** Zellbiomassebildung und hydrolysierte Proteinkonzentration bzw. Pyridoxin-Konzentration, **E+F)** Xylanase- und Cellulase-Aktivität. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten mit Ausnahme der Treberkonzentration zu Beginn der Fermentation; Cell, Cellulose; Hemicell, Hemicellulose; Prot, Protein; Sonst, Sonstige; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11]. - 87 -

Abbildung 29: Visualisierung des Wachstums von *C. uda* nach 4 Tagen mit 5 Gew.-% gepresstem MB-Treber und $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$ und 120 rpm: **A)** Lichtmikroskop, aerob, **B)** CLSM nach Färbung mit Syto 9, aerob, **C)** Lichtmikroskop, anaerob, **D)** CLSM nach Färbung mit Syto 9, anaerob. Anmerkung: Die lichtmikroskopischen Bilder wurden quadratisch ausgeschnitten, der Maßstab in den CLSM-Aufnahmen befindet sich am rechten unteren Bildrand; CLSM, Confokale Laser-Scanning Mikroskopie [11]. - 88 -

Abbildung 30: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol: **(i)** Referenzfermentation mit Standard-Mineral-Medium. In allen weiteren Fermentationen bestand das Medium aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber in 0,2 M MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$: **(ii)** N_2 -Atmosphäre, **(iii)** CO_2 -Atmosphäre, **(iv)** N_2 -Atmosphäre + Einsatz von $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 bzw. 4 biologischen Replikaten mit Ausnahme der Referenzfermentation (i); SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock. - 94 -

Abbildung 31: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(v)** Oxidationsmittel K_3FeCN_6 ($0,329\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{pH} = 7,4$,

(vi) Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH = 7,4, (vii) Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH = 5,0, (viii) Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH = 9,0, (ix) Reduktionsmittel Cys-HCl ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Switch von pH = 7,4 auf pH = 5,0. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock. - 96 -

Abbildung 32: Kinetik von Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **A**) pH = 7,4 (Fermentation (vi)) und **B**) pH = 5 (Fermentation (vii)). Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11]. - 96 -

Abbildung 33: Fermentation von *C. uda* in anaerobem Medium (N_2) aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer, 120 rpm und pH-Shift von pH = 7,4 auf pH = 5,0 (Fermentation (ix)): **A**) Produktbildung in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol, **B**) Abbauprodukte der strukturellen Kohlenhydrate in Bezug auf Cellobiose, Xylose und Arabinose. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11]. - 97 -

Abbildung 34: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(x)** $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Cellulase NS22192, **(xi)** $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Hemicellulase NS22083, **(xii)** $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Cellulase NS22192 und $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Hemicellulase NS22083, **(xiii)** Organosolv-vorbehandelter Treber, **(xiv)** Organosolv-vorbehandelter Treber ohne Zusatz von Hefeextrakt und Cys-HCl. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock. - 98 -

Abbildung 35: Kinetik von Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% MB-Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **A**) gepresster Treber und Einsatz von $0,08 \text{ g}_{\text{Enzym}}\cdot\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ Cellulase NS22192 (Fermentation (x)), **B**) Treber, nicht gepresst (Fermentation (xv)). Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11]. - 99 -

Abbildung 36: Endproduktkonzentrationen verschiedener Fermentationen mit *C. uda* in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Das anaerobe Medium (N_2) bestand aus 5 Gew.-% abgepresstem Treber mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(xv)** MB-Treber, nicht abgepresst, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl, **(xvi)** HE-Treber, **(xvii)** lipidfreier HE-Treber. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock; HE, Helles. - 100 -

Abbildung 37: Fermentation mit *C. uda* in einem Medium aus 15 Gew.-% abgepresstem MB-Treber, $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt und $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 und $N = 200 \text{ rpm}$ (Fermentation (xviii)): **A**) Produktkonzentrationen in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol, **B**) Substratkonzentration unter Einbeziehung der Treber-Bestandteile: Lignin, Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche und sonstiger Bestandteile sowie Ethanolkonzentration in der Kühlfalle, **C**) Zellbiomassebildung und hydrolysierte Proteinkonzentration, **D**) Xylanase- und Cellulase-Aktivität sowie, aufgrund von bakteriellem Abbau, freigesetzte Zucker Cellobiose, Xylose und Arabinose. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angepasst, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten, allerdings mit einer Ausnahme: Die Zellkonzentration, beginnend an Tag 6, zeigt Einzelbestimmungen, da die Zellen in zwei von drei Replikaten am Rührer klebten; Cell,

Cellulose; Hemicell, Hemicellulose; Prot, Protein; Sonst, Sonstige; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock [11]. - 103 -

Abbildung 38: Fermentationen von *C. uda* in anaerobem Medium (N_2) aus abgepresstem MB-Treber mit $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer, 120 rpm und $\text{pH} = 7,4$. Es wurden die folgenden Variationen durchgeführt: **(vi)** 5 Gew.-% Treber, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, **(xix)** 20 Gew.-% Treber, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt, **(xx)** 25 Gew.-% Treber, $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt: **A)** Endproduktkonzentrationen in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol, **B)** Zellbiomasse/Treber-Ausbeute $Y_{X/S}$ und Produkt/Treber-Ausbeute $Y_{P/S}$. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock. - 105 -

Abbildung 39: Vorgeschlagenes Bioraffineriekonzept zur stofflichen Verwertung von Biertreber. Substrate und Produkte sind farblich hervorgehoben. - 109 -

Abbildung 40: Prozentuale Zusammensetzung von Wiesenschnitt aus dem Frühjahr (F) bzw. Herbst (H), nachdem die löslichen Bestandteile abgetrennt wurden. Gezeigt werden ausschließlich die festen Bestandteile des Wiesenschnitts (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent. - 110 -

Abbildung 41: Prozentuale Zusammensetzung von Wiesenschnitt aus dem Frühjahr (F) bzw. Herbst (H) in der geernteten Form, d.h. ohne vorherigen Pressschritt. Gezeigt werden die Bestandteile des Wiesenschnittpresssaftes als Summenparameter von Saccharose, Fructose und Glucose (grün) sowie die festen Bestandteile (Grautöne und Weiß) in Gew.-%. Die Komponenten, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sind im Tortendiagramm hervorgehoben; Gew.-%, Gewichtsprozent. - 111 -

Abbildung 42: Fermentation mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und Herbst-Presssaft bei $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, $N = 400 \text{ rpm}$ und $\text{pH} = 6$ im Bioreaktor: **A)** Biotrockenmasse-, Saccharose-, Fructose- und Glucose-Konzentration, **B)** Gesamt-Kohlenhydrat- und Milchsäure-Konzentration. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert; BTM, Biotrockenmasse; N, Rührerdrehzahl. - 114 -

Abbildung 43: Fermentationen mit *C. uda* in einem anaeroben Medium (N_2) aus abgepresstem Herbst-Wiesenschnitt mit $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys-HCl in 0,2 M MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$ und 120 rpm. Die Teilabbildungen A, C und E zeigen den Versuch mit 5 Gew.-% Wiesenschnitt und einer Hefeextraktkonzentration von $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; die Teilabbildungen B, D und F zeigen den Versuch mit 15 Gew.-% Wiesenschnitt und einer Hefeextraktkonzentration von $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$: **A+B)** Produktkonzentrationen in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol sowie Substratkonzentration unter Einbeziehung der Wiesenschnitt-Bestandteile: Lignin, Cellulose, Hemicellulose, Protein, Lipid, Asche und sonstiger Bestandteile, **C+D)** Zellbiomassebildung und hydrolysierte Proteinkonzentration, **E+F)** Xylanase- und Cellulase-Aktivität. Alle Datenpunkte wurden durch sigmoidale Fits angenähert, wenn die Daten dieser mathematischen Beziehung folgten. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten; Cell, Cellulose; Hemicell, Hemicellulose; Prot, Protein; Sonst, Sonstige; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol. - 116 -

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: (Teil 1) Zusammenfassung der aktuellen Prozesse zur stofflichen Nutzung von Biertreber in klassischen zwei- oder dreistufigen Verfahren bezüglich maximaler Produktkonzentration P_{max} , Produkt/Substrat-Ausbeute $Y_{P/S}$ (bezogen auf hydrolysierte, lösliche Zucker oder eigesetzten Treber) sowie Publikationsjahr; ¹Prozentsatz von maximal möglicher theoretischer Ausbeute; ²bezogen auf verbrauchten Treber [11]. - 12 -

Tabelle 2: Zusammenfassung der Prozesse zur stofflichen Nutzung von Treberpresssaft bezüglich maximaler Produktkonzentration P_{max} , Produkt/Substrat-Ausbeute $Y_{P/S}$ und Publikationsjahr. - 15 -

Tabelle 3: Rezepturen, der für diese Arbeit durchgeführten Braugänge, in Bezug auf Malzschüttung, Flüssigkeitsvolumen (Haupt- und Nachguss) sowie Stammwürzegehalt; kg, Kilogramm; L, Liter; °Brix, Grad Brix. - 22 -

Tabelle 4: (Teil 1) Initialisierungsbedingungen (d.h. Startkonzentrationen) sowie Raten & Konstanten für die Simulationen mit unverdünntem MB- bzw. PA-Presssaft und verdünntem WeBo-Presssaft: X, Biotrockenmasse; S₁, Maltooligomere; S₂, Maltotriose; S₃, Maltose; S₄, Glucose; S_{Total}, Gesamtkohlenhydrate bezogen auf Glucoseäquivalente; Ala, Alanin; Ser, Serin; AS_{Total}, Gesamt-Aminosäuren; Prot, Protein; β, Faktor für den Substratbedarf der wachstumsentkoppelten Produktbildung; k_i, Reaktionskonstanten der unidirektionalen Reaktionen 1. Ordnung; μ_{max}, maximale spezifische Wachstumsrate; Y_{X/S4}, Zellbiomasse/Substrat-Ausbeute bezogen auf Glucoseäquivalente; Y_{P/X}, Produkt/Zellbiomasse-Ausbeute; MB, Maibock; PA, Pale Ale; WeBo, Weizenbock [82]. - 37 -

Tabelle 5: Zusammensetzung der ersten Pressfraktion der Treberpresssäfte Pale Ale (PA), Helles (HE), Weizen (W), Maibock (MB) und Weizenbock (WeBo); n.g., nicht gemessen. Anmerkung: Für PA, HE und W wurde eine Spindelpresse genutzt, für PA und MB wurde eine Tinkturenprese genutzt [30]. - 57 -

Tabelle 6: Kinetische Parameter und bioverfahrenstechnische Kenngrößen der Fermentationen mit (I) MRS-Medium sowie mit (II) verdünntem WeBo-Presssaft und vollständiger Supplementation, (III) optimierter Supplementation, (IV) optimierter Supplementation und Glucoamylase sowie (V) optimierter Supplementation, Glucoamylase und Hefeextrakt aus Brauhefe. Außerdem sind die Daten der Fermentationen mit (VI) unverdünntem PA-Presssaft und (VII) unverdünntem MB-Presssaft gezeigt. Die Daten der beiden Referenzfermentationen (I) und (II) zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten: μ_{max}, maximale Wachstumsrate; OD_{600 nm} ~ BTM, Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse; BTM_{max}, maximale Zellbiomasse; c_{Lac,max}, maximale Milchsäurekonzentration; Y_{P/S}, Milchsäure/Zucker-Ausbeute; q_P, Milchsäurebildungsrate; q_{S1,S2,S3,S4}, Substratverbrauchsraten; P, Produktivität in den ersten 11 h der Fermentation (I) – (V) bzw. in den ersten 15 h der Fermentationen (VI) – (VII); n.v., nicht verfügbar, da die Komponente im Fermentationsansatz nicht vorhanden war; n.b., nicht bestimmbar, aufgrund der Überlagerung von enzymatischer und mikrobieller Konversion; WeBo, Weizenbock, PA, Pale Ale; MB, Maibock [30]. ... - 66 -

Tabelle 7: Vergleich zwischen Experiment und Simulation für die drei Fermentationen mit unverdünntem MB-, PA-, und verdünntem WeBo-Presssaft in Bezug auf die maximale Zelldichte X_{max}, die maximale Produktkonzentration P_{max} und die Produktivität P in den ersten 11 h der Fermentation (WeBo) bzw. in den ersten 15 h der Fermentationen (MB & PA); MB, Maibock; PA, Pale Ale, WeBo, Weizenbock. - 79 -

Tabelle 8: Zusammensetzung der ersten Pressfraktion der Wiesenschnittpresssäfte aus dem Frühjahr (F) bzw. Herbst (H); n.g., nicht gemessen. Anmerkung: Für alle Presssäfte wurde eine Tinkturenprese genutzt. - 112 -

11. Finanzielle Förderung

Dieses Forschungsvorhaben wurde durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung EFRE-Interreg (018-4-09-021) im Rahmen des Projektes „BIOVAL“ und durch das Projekt „GreenToGreen – kommunaler Grünschnitt als Basis für eine grüne Chemie“ (031B0903B) finanziert.

Anhang

A. Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
2D-Fluoreszenzspektrometer LS 55	Perkin Elmer Inc.	Waltham, USA
2-Kanal-Degaser	Duratec GmbH	Hockenheim, Deutschland
96-Well-Platte (Black plate clear bottom with lid)	Corning Inc.	New York, USA
Atomadsorptionsspektrometer contrAA®	Analytik Jena	Jena, Deutschland
Autoklav V-150	Systemec GmbH	Linden, Deutschland
Bioreaktor RALF (Arbeitsvolumen von 1 L bzw. 5 L)	Bioengineering AG	Wald, Schweiz
Bioreaktor Biostat Q Plus	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Brechungsindexdetektor RI 101	Shodex	Kawasaki, Japan
Butylstopfen-massiv	Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K.	Bovenden, Deutschland
Cryo-Schrank Ultra Low Temperature Freezer	Haier Biomedical	Qingdao, China
Fluoreszenzdetektor Alliance 2475 multi λ fluorescence detector	Waters Corp.	Milford, USA
Druckfeste Flasche Pressure Plus (50 mL, 100 mL, 250 mL oder 500 mL)	DWK Life Science GmbH	Mainz, Deutschland
Elementaranalysengerät vario Micro tube	Elementar Analysentechnik GmbH	Langenselbold, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Duran Produktions GmbH & Co. KG	Mainz, Deutschland
Fotodiodenarray-Detektor PDA 2996	Waters Corp.	Milford, USA
Hochdruck-Laborreaktor BR 500	Berghof Products + Instruments GmbH	Eningen, Deutschland
Hochdrucktinturenpresse HP 2 H	Fischer Maschinenfabrik GmbH	Neuss, Deutschland
HPLC-Autosampler Midas cool	Spark Holland B.V.	Emmen, Niederlande
HPLC-Anlage Alliance 2695	Waters Corp.	Milford, USA
HPLC-Pumpe Merck Hitachi L 6200	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
HPLC-Säule C18, 150 mm x 3,9 mm	Waters Corp.	Milford, USA
HPLC-Säule Reprogel H+ 9 μ m, 300 mm x 4,6 mm	Dr. Maisch GmbH	Ammerbuch, Deutschland
HPLC-Säule Rezex ROA-Organic Acid H+, 300 mm x 7,8 mm	Phenomenex Inc.	Torrance, USA

HPLC-Säule Repro-Gel Ca++ 9 µm, 300 mm x 8 mm	Dr. Maisch GmbH	Ammerbuch, Deutschland
HPLC-Säulenthermostat Jetstream II plus	Duratec	Hockenheim, Deutschland
Ionenchromatograph 883 Basic IC plus	Metrohm GmbH & Co. KG	Filderstadt, Deutschland
Lichtmikroskop Eclipse Ni mit DS-I 1 Kamera und Wasserimmersionsobjektiv 40 x 0,65 ∞/0,17 WD 0,56	Nikon Group	Tokio, Japan
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop SP5 II mit einem 63 x 0,9 Wasserimmersionsobjektiv	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Muffelofen Modell 301	Carbolite Gero Ltd	Sheffield, Großbritannien
Nylonfilter 0,22 µm KX Syringe Filter Nylon	Cole-Parmer GmbH	Wertheim, Deutschland
pH-Meter Microprocessor pH Meter 211	Hanna Instruments Deutschland GmbH	Vöhringen, Deutschland
Rotationsverdampfer Laborota 4003	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Scheibenmühle Fidibus Classic	Komo GmbH & Co. KG	Hopfgarten, Deutschland
Schüttelinkubator Ecotron	Infors AG	Bottmingen, Schweiz
Software Berkeley Madonna 9.1.0.	Robert Macey and George Oster	University of California at Berkeley, USA
Software Empower 3	Waters Corp.	Milford, USA
Software Clarity	Data Apex	Prag, Tschechien
Software Visual XSel	CRGRAPH GbR	Starnberg, Deutschland
Soxhlet-Apparatur	Normschliff Gerätebau GmbH	Wertheim, Deutschland
Schikanenkolben GL 45 Gewinde	DWK Life Sciences	Wertheim/ Main, Deutschland
Spectroquant Pharo 100	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Spindelpresse ENOL OP 20	Wein GmbH	Bönnigheim, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm steril	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Trockenschrank UF110	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
UV-Spektralphotometer	Perkin Elmer Corp.	Waltham, USA
UV-Vis-Spektrometer Cary 60	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Vorsäule „SecurityGuard“ Carbo-H 4 mm x 3,0 mm ID	Phenomenex Inc.	Torrance, USA
Vorsäulenhalter KJ0-4282	Phenomenex Inc.	Torrance, USA
Waage Skala LA 214	VWR LLC	Radnor, USA
Zählkammer Neubauer improved 0,0025 mm ²	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Z 383 K	Hermle Labortechnik GmbH	Balingen, Deutschland

B. Chemikalienliste

Bezeichnung, Reinheit [CAS-Nr.]	Hersteller
Ameisensäure >98% [64-18-6]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Attenuzyme® Core, aus <i>Aspergillus niger</i> , 1600 AGU·g ⁻¹	Novozymes A/S
Bernsteinsäure >99% [110-15-6]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bierhefe SafAle US-05	Lesaffre
Biotin >99% [58-85-5]	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid Dihydrat >99% [10035-04-8]	Sigma-Aldrich
Calciumlignosulfonat >93% [8061-52-7]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cellulasemix: NS22192	Novozymes A/S
Cellulose Avicel PH-101 [9004-34-6]	Sigma-Aldrich
Coomassie Bradford Reagenz [Art. Nr. 23236]	ThermoFisher Scientific
D(+)-Cellobiose >98% [528-50-5]	Carl Roth GmbH & Co. KG
D(+)-Glucose >99,5 % [50-99-7]	Carl Roth GmbH & Co. KG
D(+)-Maltose Monohydrat >97 % [6363-53-7]	Santa Cruz Biotechnology
D(+)-Xylose >99% [58-86-6]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Di-Natirumhydrogenphosphat >99% [7558-79-4]	Sigma-Aldrich
Diethylether >99,5% [60-29-7]	Sigma-Aldrich
EDTA Dinatriumsalz [6381-92-6]	Sigma-Aldrich
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat >99% [7782-63-0]	Sigma-Aldrich
Essigsäure 100% [64-19-7]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol >99,8% [64-17-5]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Filterpapier (Whatman grade 1)	Whatman plc
Fleischextrakt [68990-09-0]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fulvosäure	Dennerle GmbH
Glycerol >99,5 % [56-81-5]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hefeextrakt [8013-01-2]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hemicellulasemix: NS22083	Novozymes A/S
K ₂ HPO ₄ >98 % Anhydrat [231-834-5]	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄ >99 % [7778-77-0]	Sigma-Aldrich
K ₃ FeCN ₆ >99% [13746-66-2]	Sigma-Aldrich
L(+)-Arabinose [5328-37-0]	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Cysteine-Hydrochlorid Monohydrat >98.5 % [7048-04-6]	Carl Roth GmbH & Co. KG

L(+)-Milchsäure 80-92% [79-33-4]	Sigma-Aldrich
L-Tryptophan >98% [73-22-3]	Sigma-Aldrich
Maltoheptaose >80% [34620-78-5]	Santa Cruz Biotechnology
Maltotriose Hydrat >95 % [1109-28-0]	Santa Cruz Biotechnology
MgSO ₄ ·7 H ₂ O >98 % [10034-99-8]	Sigma-Aldrich
MnSO ₄ ·H ₂ O >99 % [10034-96-5]	Sigma-Aldrich
MOPS-Puffer >99,5% [1132-61-2]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat >99 % [127-09-3]	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat tribasisch Dihydrat >99,5% [6132-04-3]	Sigma-Aldrich
NaCl [7647-14-5]	Sigma-Aldrich
NaOH >98 % [1310-73-2]	Carl Roth GmbH & Co. KG
(NH ₄) ₃ -Citrat >97 % [3458-72-8]	Carl Roth GmbH & Co. KG
(NH ₄) ₂ SO ₄ > 99% [7783-20-2]	Sigma-Aldrich
Pepton aus Casein, Tryptischer Abbau [91079-40-2]	Sigma-Aldrich
Pyridoxinhydrochlorid >98% [58-56-0]	Sigma-Aldrich
Resazurin Natriumsalz [62758-13-8]	Sigma-Aldrich
Syto 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain	Invitrogen Corp.
Thiamine chloride hydrochloride [67-03-8]	Sigma-Aldrich
Tween 80 [9005-65-6]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Xylan aus Buchenholz [232-760-6]	Carl Roth GmbH & Co. KG
Zinksulfat Heptahydrat >99% [7446-20-0}	Sigma-Aldrich

C. Versuchsprotokolle und Vorschriften

Tabelle A 1: Reinigungsprotokoll für HPLC-Säulen nach Messung von Proben aus Suspensions- bzw. Feststofffermentationen mit komplexer Probenmatrix, entwickelt von Doris Geib in der Funktion als Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TUK.

Schritt	Vorgehen
1	Säule ausbauen, Vorsäule entfernen, Vorsäulenhalter in Essigreiniger für 10 min im Ultraschallbad reinigen
2	Säule gegen die Flussrichtung in den Säulenthermostaten einbauen
3	Säule mit 30 Vol.-% Acetonitril für 24 h bei 65 °C und einem Fluss von 0,1 ml·min ⁻¹ regenerieren
4	Neue Vorsäule einbauen, Säule in Flussrichtung in den Säulenthermostaten einbauen
5	Säule mit 9 mM H ₂ SO ₄ für mindestens 12 h bei 25 °C und einem Fluss von 0,1 ml·min ⁻¹ konditionieren

Tabelle A 2: Probenvorbereitung für die Aminosäureanalytik, entwickelt von Niklas Erdmann im Rahmen einer studentischen Arbeit, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TUK

Schritt	Vorgehen
1	Eluent A herstellen: <ol style="list-style-type: none"> a) 8,2 g (0,05 M) Natriumacetatanhydrat, 13,8 g (0,05 M) Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat in 1,8 L deionisiertem H₂O lösen, pH = 7 mit NaOH einstellen, auf 2 L auffüllen b) 42 mL Tetrahydrofuran und 42 mL Methanol zugeben c) Eluent A filtrieren
2	Eluent B herstellen: 460 mL deionisiertes Wasser und 540 mL Methanol mischen
3	OPA-Reagenz herstellen: <ol style="list-style-type: none"> a) 270 mg Ortho-Phtaldialdehyd (OPA) in 5 mL Ethanol lösen b) 200 µL Mercaptoethanol mit 0,4 M Boratpuffer (pH = 9,5) auf 50 mL auffüllen c) Die Lösung 24 h „altern“ lassen
4	Proteinfällung in den Proben durchführen: <ol style="list-style-type: none"> a) 200 µL Probe + 800 µL Methanol mischen und 24 h bei -20 °C lagern b) Gefälltes Protein durch Zentrifugation und Filtration abtrennen
5	Zu analysierende Proben bei Bedarf mit 0,4 M Boratpuffer (pH = 9,5) verdünnen
6	Einstellungen für Gradiententrennung: <ol style="list-style-type: none"> a) 0 – 50 min: 100% Eluent A b) 51 – 60 min: 100% Eluent B c) 61 – 67 min: 100% Eluent A
7	Derivatisierungsreaktion durch Autosampler: <ol style="list-style-type: none"> a) 6 µL verdünnte Probe vorlegen lassen b) 10 µL OPA-Reagenz aufziehen lassen c) Probe nach Derivatisierungszeit von 1,5 min injizieren lassen

D. Das Skript des kinetischen Modells

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 28

DT = 0.02

{Initialising}

INIT X = 0.129	{Cell Dry Weight; g/L}
INIT S1 = 20.25	{Malto oligomer; g/L}
INIT S2 = 10.61	{Maltotriose; g/L}
INIT S3 = 41.31	{Maltose; g/L}
INIT S4 = 17.34	{Glucose; g/L}
INIT Ala = 0.1411	{Alanine; g/L}
INIT Ser = 0.3381	{Serine; g/L}
INIT AA_total = 6.78	{Amino acids total; g/L}
INIT Prot = 0.4596	{Protein; g/L}
INIT S_total = S12*S1+S23*S2+S34*S3+S4	{Substrate total; g/L}
INIT P = 0.287	{Lactate; g/L}

{Mass change sugar hydrolysis}

S12 = 1261.09/1153.00

S23 = 540.47/504.44

S34 = 360.32/342.30

{Constants}

u_max4 = 0.46	{empiric}
K_S4 = 0.1	{Dutta et al. 1996; [231]}
Y_XS4 = 0.083	{empiric}
Y_PX = 8.865	{empiric}
h = 0.5	{Altiok et al. 2006, [185]}
P_m = 95	{Youssef et al. 2005, [232]}
f = 0.7	{Altiok et al. 2006, [185]}
X_m = 5.5	{Altiok et al. 2006, [185]}
Y_XProt = 32.55	{empiric}
K_Prot = 0.02	
Y_XSer = 38.21	{empiric}

$$K_Ser = 0.02$$

$$Y_XAA_total = 3.47 \quad \{\text{empiric}\}$$

$$K_AA_total = 0.02$$

$$kAla = 0.472 \quad \{\text{empiric}\}$$

$$\beta = 0.9 \quad \{\text{empiric}\}$$

{Kinetics}

$$r_x = u_4 \cdot x$$

$$r_{S4} = -u_4 / Y_{XS4} \cdot x$$

$$r_{Ala} = -k_{Ala} \cdot Ala$$

$$r_{Ser} = -u_4 / Y_{XSer} \cdot x$$

$$r_{AA_total} = -u_4 / Y_{XAA_total} \cdot x$$

$$r_{Prot} = -u_4 / Y_{XProt} \cdot x$$

$$r_p = u_4 \cdot Y_{PX} \cdot x \cdot (S_4 / (S_4 + K_{S4}))$$

$$u_4 = u_{\max} \cdot (S_4 / (S_4 + K_{S4})) \cdot (Ser / (Ser + K_{Ser})) \cdot (AA_total / (AA_total + K_{AA_total})) \cdot ((1 - P/P_m)^h) \cdot ((1 - X/X_m)^f) \cdot (Prot / (Prot + K_{Prot}))$$

{Enzymatic conversion}

$$R_1 = k_1 \cdot S_1$$

$$R_2 = k_2 \cdot S_2$$

$$R_3 = k_3 \cdot S_3$$

{Reaction constants of enzymatic degradation}

$$k_1 = 0.074 \quad \{\text{empiric}\}$$

$$k_2 = 4 \quad \{\text{empiric}\}$$

$$k_3 = 0.289 \quad \{\text{empiric}\}$$

{Mass balances}

$$d/dt(X) = r_x$$

$$d/dt(S_1) = -S_1 \cdot R_1$$

$$d/dt(S_2) = 3/7 \cdot S_1 \cdot R_1 - S_2 \cdot R_2$$

$$d/dt(S_3) = 4/7 \cdot S_1 \cdot R_1 + 2/3 \cdot S_2 \cdot R_2 - S_3 \cdot R_3$$

$$d/dt(S_4) = 1/3 \cdot S_2 \cdot R_2 + S_3 \cdot R_3 + r_{S4} - \beta \cdot x \cdot (S_4 / (S_4 + K_{S4}))$$

$$d/dt(S_total) = r_{S4} - \beta \cdot x \cdot (S_4 / (S_4 + K_{S4}))$$

$$d/dt(Ala) = r_{Ala}$$

$$d/dt(Ser) = r_{Ser}$$

$$d/dt(AA_total) = r_{AA_total}$$

$$d/dt(\text{Prot}) = r\text{Prot}$$

$$d/dt(P) = r_p$$

{Boundaries}

LIMIT S1 ≥ 4.76 {empiric; Pale ale, 3.38; Wheat bock, 1.53}

LIMIT S2 ≥ 0

LIMIT S3 ≥ 0

LIMIT S4 ≥ 0

LIMIT S_total ≥ 4.76 {empiric; Pale ale, 3.38; Wheat bock, 1.53}

E. Zusätzliche Versuchsergebnisse

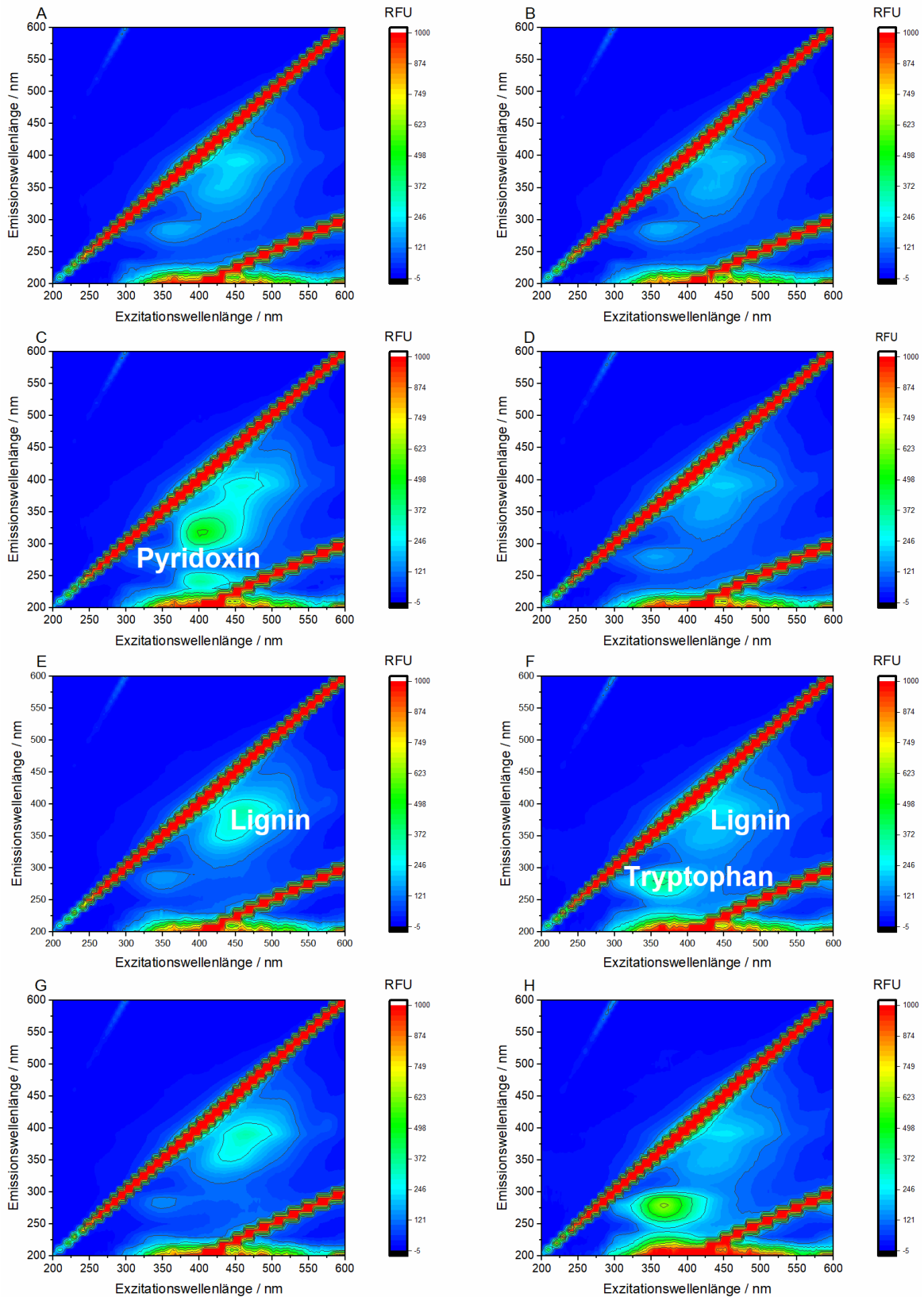


Abbildung A 1: 2D-Fluoreszenzspektren von Fermentationen mit *C. uda* in einem Medium bestehend aus 5 Gew.-% gepresstem MB-Treber und 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4: Aerobe Fermentation von Tag **A)** 0 **C)** 2 **E)** 4 **G)** 14 und anaerobe Fermentation von Tag **B)** 0 **D)** 2 **F)** 4 **H)** 14; RFU, relative Fluoreszenzeinheiten; MB, Maibock [11].

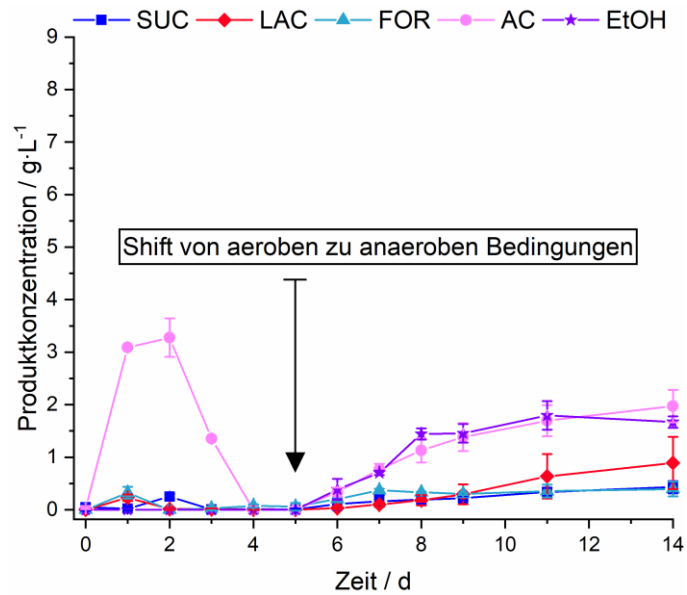


Abbildung A 2: Produktbildung von *C. uda* in einem Medium aus 5 Gew.-% abgepresstem MB-Treber in 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 und 120 rpm in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Am 5. Tag wurde die Fermentation von aeroben auf anaerobe Bedingungen (N_2) umgestellt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock.

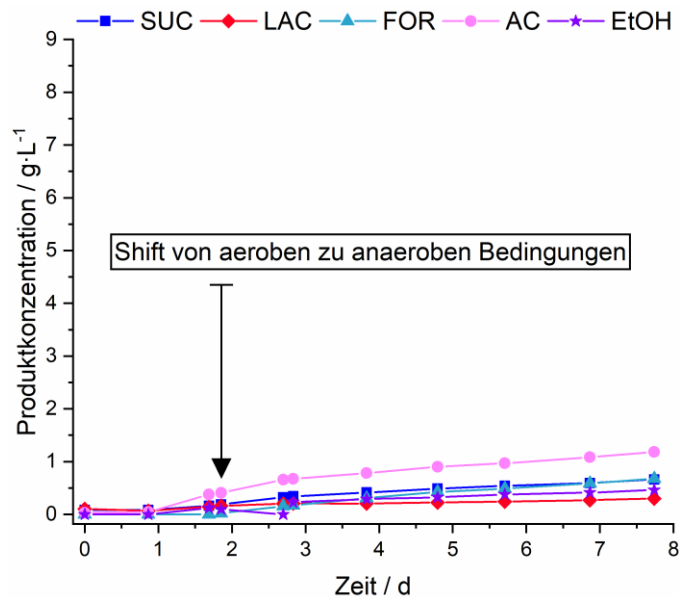


Abbildung A 3: Produktbildung von *C. uda* mit Standard-Mineral-Medium auf Basis von 0,2 M MOPS-Puffer bei pH = 7,4 (Fermentation (ii)) in Bezug auf Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol. Am 2. Tag wurde die Fermentation von aeroben auf anaerobe Bedingungen (N_2) umgestellt; SUC, Bernsteinsäure; LAC, Milchsäure; FOR, Ameisensäure; AC, Essigsäure; EtOH, Ethanol; MB, Maibock.

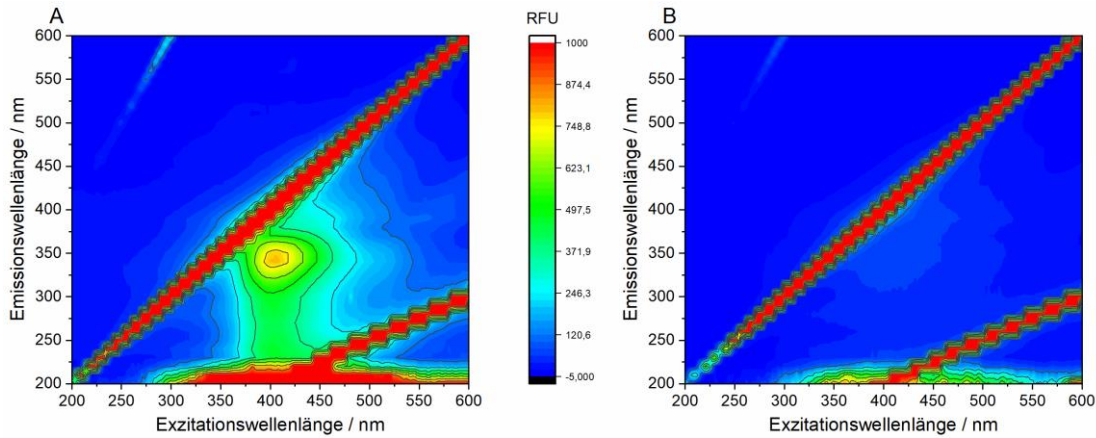


Abbildung A 4: 2D-Fluoreszenzspektren von: **A)** $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Calciumlignosulfonat in $0,2 \text{ M}$ MOPS-Puffer bei $\text{pH} = 7,4$ und **B)** unverdünnter Fulvosäure; RFU, relative Fluoreszenzeinheiten [11].

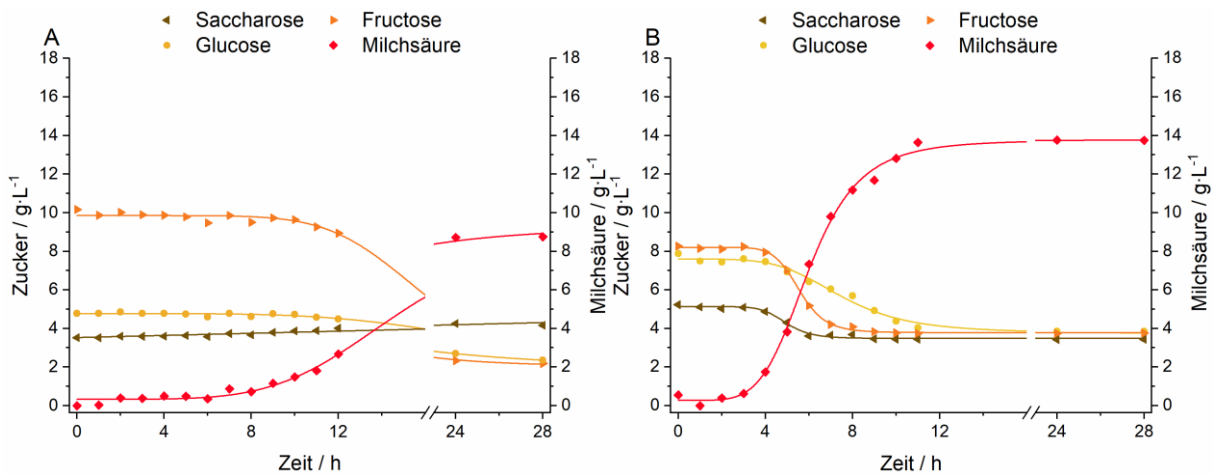


Abbildung A 5: Produktbildung in Bezug auf die Saccharose-, Fructose-, Glucose- und Milchsäure-Konzentration bei Fermentationen mit dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und Herbst-Presssaft bei $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Schüttlerfrequenz von 100 rpm : **A)** Ohne weitere Zusätze, **B)** Zusatz der MRS-Komponenten (excl. Glucose). Die Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Fits angenähert; N, Rührerdrehzahl.

Tabelle A 3: Fermentationen im Kolbenmaßstab mit MRS-Medium, verdünntem HE-Presssaft bzw. verdünntem HE-Presssaft + Supplementation von MRS-Medienzusätzen und dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bei einer Temperatur von $45 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Schüttlerfrequenz von 100 rpm ; μ_{max} , maximale Wachstumsrate; $\text{OD}_{600 \text{ nm,max}}$, maximale optische Dichte; $c_{\text{Lac,max}}$, maximale Milchsäurekonzentration; $Y_{\text{P/S}}$, Milchsäure/Zucker-Ausbeute; HE-P, Presssaft aus Helles-Treber; n.v., nicht verfügbar.

Fermentationsmedium	$\mu_{\text{max}} / \text{h}^{-1}$	$\text{OD}_{600 \text{ nm,max}}$	$c_{\text{Lac,max}} / \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$Y_{\text{P/S}} / \text{g}_{\text{Lac}}\cdot\text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$
MRS-Medium	$0,63 \pm 0,01$	$4,29 \pm 0,13$	$13,36 \pm 1,41$	$0,59 \pm 0,1$
HE-P. ohne Zusätze	n.v.	$1,08 \pm 0,06$	$1,46 \pm 0,09$	n.v.
HE-P. + MRS-Zusätze	$0,57 \pm 0,02$	$8,39 \pm 0,12$	$19,05 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,09$

F. Veröffentlichungen

Einige Passagen dieser Arbeit sind wörtlich oder sinngemäß aus bereits angefertigten Publikationen übernommen worden (vgl. nachfolgende Auflistungen). Bei (nahezu) wörtlicher Reproduktion sind die Passagen in Anführungszeichen geführt; bei sinngemäßer – meist aus dem englischen übersetzter – Übereinstimmung ist die entsprechende Quelle am Anfang oder am Ende des jeweiligen Abschnitts gegeben.

Publikationen als Erstautor

- A. Akermann, J. Weiermüller, J. Christmann, Léa Guirande, Gregor Glaser, Annette Knaus, Roland Ulber, Brewers' spent grain liquor as a feedstock for lactate production with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Eng. Life Sci.* 2020, 20 (5-6), 168 – 180. DOI: [10.1002/elsc.201900143](https://doi.org/10.1002/elsc.201900143).
- A. Akermann, J. Weiermüller, S. Lenz, J. Christmann, R. Ulber, Kinetic model for simultaneous saccharification and fermentation of Brewers' spent grain liquor using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Biotech. And Bioprocess Eng.* 2021, 26 (1), 114 – 124. DOI: [10.1007/s12257-020-0153-z](https://doi.org/10.1007/s12257-020-0153-z).
- A. Akermann, J. Weiermüller, J. N. Chodorski, M. J. Nestriepke, M. T. Baclig, R. Ulber, Optimization of bioprocesses with Brewers' spent grain and *Cellulomonas uda*, *Eng. Life Sci.* 2021, n.v. (n.v.), n.v. DOI: [10.1002/elsc.202100053](https://doi.org/10.1002/elsc.202100053).

Publikationen mit geteilter Erstautorenschaft

- A. Akermann, M. Bold, A. Mehring, R. Ulber, L. Van Waveren, J. Weiermüller, 90 Jahre CIT – 90 Jahre Entwicklungen in Biotechnologie und Bioverfahrenstechnik, *Chemie Ing. Techn.* 2018, 90 (11), 1658-1657. DOI: [10.1002/cite.201800066](https://doi.org/10.1002/cite.201800066).
- A. Akermann, J. Weiermüller, R. Ulber, Aufbau eines Bioraffineriekonzeptes für Biertreber mit vorgelagertem Pressschritt, *Chemie Ing. Techn.* 2019, 91 (11), 1606 – 1614. DOI: [10.1002/cite.201900017](https://doi.org/10.1002/cite.201900017).
- J. Weiermüller, A. Akermann, T. Sieker, R. Ulber, Bioraffinerien auf Basis schwach verholzter Biomasse, *Chemie Ing. Techn.* 2020, 92 (11), 1711 – 1722. DOI: [10.1002/cite.202000070](https://doi.org/10.1002/cite.202000070).

Publikationen als Co-Autor

- J. Weiermüller, A. Akermann, W. Laudensack, J. Chodorski, L. M. Blank, R. Ulber, Brewers' spent grain as a carbon source for itaconate production with engineered *Ustilago maydis*, *Bioresour. Technol.* 2021, 336 (Sept. 2021), 125262. DOI: [10.1016/j.biortech.2021.125262](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125262).

Vorträge

- A. Akermann, J. Weiermüller, R. Ulber (2018), A biorefinery concept based on brewers' spent grain, GreenWin (Green Chemistry & White Biotechnology), Louvain-la-Neuve (Belgien)
- A. Akermann, J. Weiermüller, R. Ulber (2018), Konzept einer Biertreber-Bioraffinerie: Treberpresssaft-Fermentationen mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, 9. ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen

- J. Weiermüller, A. Akermann, R. Ulber (2018), Development of pretreatment strategies for brewers' spent grain to obtain optimal yields of fermentable sugars, DECHEMA Himmelfahrtstagung, Magdeburg
- J. Weiermüller, A. Akermann, R. Ulber (2018), Optimierung von Aufschlussverfahren für lignocellulolytische Biomasse aus Brauereirückständen, 9. ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen
- A. Akermann, J. Weiermüller, R. Ulber (2019), Prozesstechnik für nachwachsende Rohstoffe, Tag der Verfahrenstechnik am Fraunhofer ITWM, Kaiserslautern
- J. Weiermüller, A. Akermann, R. Ulber (2019), Biorefineries – A sustainable Approach of Utilizing Brewers' Spent Grains, Circular Economy – A Fresh View on Petrochemistry, DGMK Konferenz, Dresden

Poster

- A. Akermann, R. Ulber (2018), A biorefinery concept based on brewers' spent grain, Trends in Brewing, Gent (Belgien)
- A. Akermann, J. Weiermüller, R. Ulber (2018), A biorefinery concept based on brewers' spent grain, DECHEMA Himmelfahrtstagung, Magdeburg
- C. Capitain, J. Weiermüller, A. Akermann, S. Möhring, R. Ulber, N. Tippkötter (2018), Compositional analysis of brewer's spent grain using differential scanning calorimetry or AT-IR-spectroscopy combined with multivariate data analysis, Trends in Brewing, Gent (Belgien)
- A. Akermann, J. Weiermüller, R. Ulber (2020), Biertreber und Hefeextrakt aus Brauereife als Substrate für die mikrobielle Produktion von Plattformchemikalien, 10. ProcessNet-Jahrestagung und 34. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Online-Konferenz
- J. Weiermüller, A. Akermann, W. Laudensack, L. M. Blank, R. Ulber (2020), Herstellung von zuckerreichen Hydrolysaten aus Biertreber zur fermentativen Wertstoffgewinnung, 10. ProcessNet-Jahrestagung und 34. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Online-Konferenz

G. Betreute studentische Arbeiten

Name	Titel & Art der Arbeit, Jahr	Beteiligung*
Jens Christmann	Optimierung der fermentativen Prozessierung von Biertreber zur Milchsäuregewinnung, 3. Vertiefungspraktikum Biologie, 2017	Kapitel 5.1 - 5.3
Léa Guirande	Optimierung von Fermentationen zur Milchsäureherstellung durch <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> mit Treberpresssaft, Forschungsarbeit Master (BCI), 2018	Kapitel 5.1 - 5.2
Jens Christmann	Vorversuche zur Bioprozessentwicklung mit Treberpresssaft zur Produktion von Plattformchemikalien, Forschungspraktikum Biologie (Vorpraktikum zur Masterarbeit), 2018	Kapitel 5.1 - 5.3
Maria Teresa Baclig	Entwicklung von Feststofffermentationen mit Biertreber, DAAD Rise-Praktikum, 2018	Kapitel 5.4
Jens Christmann	Bioprozessentwicklung mit Treberpresssaft zur Produktion von Plattformchemikalien, Masterarbeit, 2019	Kapitel 5.1 - 5.3
Maximilian Rech	Herstellung eines Lifestyle-Getränkes aus Treberpresssaft, Forschungsarbeit Master (BCI), 2019	-
Jens Christmann	Treberpresssaftfermentationen, Hilfwissenschaftler, 2019	Kapitel 5.1 - 5.3
Malte Nestriepke	Feststofffermentationen mit <i>Cellulomonas uda</i> , Forschungsarbeit Bachelor (BCI), 2019	Kapitel 5.4
Gregor Glaser	Durchführung von Braugängen, Unterstützung bei Fermentationen, Hilfwissenschaftler, 2017 – 2019	Kapitel 5.1 - 5.2
Malte Nestriepke	Optimierung der Feststofffermentationen mit <i>Cellulomonas uda</i> , Bachelorarbeit, 2020	Kapitel 5.4
Martin Weisbrodt	Fermentationsoptimierung mit <i>Actinobacillus succinogenes</i> zum Zwecke der Bernsteinsäureproduktion, Teamarbeit, 2020	-
Hatice Bektas	Fermentationsoptimierung mit <i>Actinobacillus succinogenes</i> zum Zwecke der Bernsteinsäureproduktion, Teamarbeit, 2020	-
Andrea Koch	Routinearbeiten im Labor, Hilfwissenschaftlerin, 2018 – 2020	Kapitel 5.1 - 5.4
Martin Weisbrodt	Fermentationen mit <i>Cellulomonas uda</i> auf Grasschnitt sowie Biertreber, Forschungsarbeit Bachelor (BCI), 2021	Kapitel 5.6
Anna-Lena Maus	Fermentative Herstellung von Grund- und Feinchemikalien auf Basis von Grünschnitt-Fractionen, Masterarbeit, 2021	Kapitel 5.6
Dennis Wagner	Durchführung von Braugängen, Hilfwissenschaftler, 2019 – 2021	Kapitel 5.1
Malte Nestriepke	Fermentationen mit <i>C. uda</i> , Hilfwissenschaftler, 2020 – 2021	Kapitel 5.4

*Die Beteiligung bezieht sich auf die Kapitel des Teils „Ergebnisse und Diskussion“. Es ist aber möglich, dass die Student:innen auch an der Entwicklung von Methoden mitgewirkt haben.

H. Lebenslauf

Zur Person

Name	Alexander Akermann
Geburtsort	Heidelberg
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Ausbildung

Jul. 2017 – Mär. 2021	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotionsstudent am Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern (Prof. Dr. Roland Ulber)
Okt. 2014 – Mär. 2017	Technische Biologie M.sc., Universität Stuttgart (inklusive 3-monatiger Südamerika-Reise), Note: 1,4 Abschlussarbeit (Institut für Bioverfahrenstechnik, Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors): Untersuchung verschiedener Kultivierungsbedingungen von <i>Clostridium ljungdahlii</i> unter Einbeziehung eines metabolischen Modells
Okt. 2011 – Sep. 2014	Technische Biologie B.sc., Universität Stuttgart, Note: 2,1 Abschlussarbeit (Roche Mannheim, Dr. Kai Küllmer): Charakterisierung von Adsorptions- und Degradationsmechanismen von Enzymen in der Trockenchemie von Teststreifen zur Glukosebestimmung
Sep. 2001 – Jun. 2010	Kurpfalz-Gymnasium-Schriesheim, Note: 1,8

Arbeitserfahrung

Apr. – Sep. 2014	Industriepraktikum mit integrierter Bachelorarbeit, Roche Mannheim
Jun. – Jul. 2011	Industriepraktikum, Roche Mannheim