

Aufbau eines Bioraffineriekonzeptes für Biertreber mit vorgelagertem Pressschritt

Alexander Akermann[‡], Jens Weiermüller[‡] und Roland Ulber*

DOI: 10.1002/cite.201900017

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.



Supporting Information
available online

Herrn Prof. Dr. techn. Hans-Jörg Bart zum 65. Geburtstag gewidmet

Ein Bioraffineriekonzept für (Bier-)Treber wird vorgeschlagen, bei dem im Gegensatz zu bestehenden Konzepten wasserlösliche Komponenten durch Pressen abgetrennt und als Grundlage für eine Milchsäurefermentation mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* verwendet werden. Die verbleibenden strukturellen Kohlenhydrate des Treberückstandes werden durch hydrothermale und enzymatische Vorbehandlung in fermentierbare Zucker überführt. Es entstehen deutlich weniger Nebenprodukte, die das Wachstum von Mikroorganismen inhibieren können, als bei der Nutzung von nicht abgepresstem Treber.

Schlagwörter: Biertreber-Bioraffinerie, Fermentation, Hydrothermale/enzymatische Vorbehandlung, Treberpresssaft

Eingegangen: 23. Januar 2019; *revidiert:* 24. Juni 2019; *akzeptiert:* 16. Juli 2019

Development of a Biorefinery Concept for Brewers' Spent Grain with a Preliminary Pressing Step

This work proposes a biorefinery concept for brewers' spent grain where, in contrast to existing concepts, water-soluble components are separated by pressing. Subsequently, the obtained liquid is used for lactic acid fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. The structural carbohydrates of the residue are converted into fermentable sugars by hydrothermal and enzymatic pretreatments. Lower amounts of inhibitory compounds for microbial growth are observed after the removal of soluble components than without removal.

Keywords: Fermentation, Hydrothermal/enzymatic pretreatment, Spent grains biorefinery, Spent grains liquor

1 Einleitung

Der Bierbrauprozess basiert auf der Fermentation einer zuckerhaltigen Würze, die nach Maischekochen und Läutern gewonnen wird. Beim Maischen werden hierzu, in einer sehr vereinfachten Betrachtungsweise, verschiedene geschrotete Getreidemalze in Wasser erhitzt, wobei die im Malz enthaltenen Enzyme die vorhandene Stärke in fermentierbare Zucker und nicht fermentierbare Dextrine transformieren. Zusätzlich werden enthaltene Proteine in Peptide und Aminosäuren gespalten, die als wichtige Nährstoffquelle für die eingesetzten Hefen dienen [1]. Im Läuterprozess werden die Feststoffbestandteile, der sogenannte (Bier-)Treber, von der flüssigen Würze abgetrennt. Treber bildet den größten Nebenproduktstrom, der beim Bier-

brauen anfällt. Bei jedem produzierten Liter Bier fallen ungefähr 200 g Treber an [2], was bei einer weltweiten Jahresproduktion von $1952 \cdot 10^6$ hL Bier im Jahr 2017 [3] in ca. $39 \cdot 10^6$ t Treber resultierte. Aufgrund hoher Ballaststoff- und Proteingehalte eignet sich Treber gut als Futterzusatz in der Viehmast [4,5]. Die Auswirkungen auf die Produktqualität werden jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits gibt

Alexander Akermann, Jens Weiermüller, Prof. Dr. Roland Ulber
ulber@mv.uni-kl.de

Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik, Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik, Gottlieb-Daimler-Straße 49, 67663 Kaiserslautern, Deutschland.

[‡]Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen

es Studien, die von einem um 15 % gesteigerten Milchertrag bei Milchkühen aufgrund von Treber-Zufütterung berichten [6]. Andererseits wurde gezeigt, dass die grasbasierte Fütterung von Mastvieh zu einer besseren Fettsäureausstattung und einem höheren Anteil an Antioxidantien im Fleisch führt, als es bei getreidebasierter Fütterung der Fall ist [7, 8]. Zusätzlich zur Nutzung als Futterzusatz, wird das Potential von Treber in verschiedenen Einsatzgebieten mit steigendem Interesse untersucht. Neben dem Einsatz bei der Herstellung von Backwaren [9], kann Treber als Substrat für die Produktion von verschiedenen Enzymen, wie z. B. Amylasen oder Cellulasen dienen [10, 11]. Außerdem können die phenolischen Ligninbestandteile enzymatisch freigesetzt werden und so als Quelle für Antioxidantien wie beispielsweise Hydroxymethylfurfural [12] oder Ferulasäure [12, 13] dienen. Eine weitere Verarbeitungsmöglichkeit, unter die auch diese Ausführung fällt, liegt in der Vorbehandlung der strukturellen Kohlenhydrate Cellulose und Hemicellulose, um monomere Saccharide zu generieren. Diese können anschließend chemisch oder fermentativ zu unterschiedlichen Grund- und Feinchemikalien transformiert werden. Auf diese Weise werden Energieträger und Grundchemikalien wie Biogas [14] und Bioethanol [15] produziert. Aber auch Milchsäure [16] und Xylitol [17] als Feinchemikalien, z. B. für die Biopolymer- und Lebensmittelindustrie, sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die genannten Verfahren basieren überwiegend auf einer Kombination von thermischen, chemischen und/oder enzymatischen Vorbehandlungsschritten. Gängige thermochemische Vorbehandlungsmethoden sind dabei saure, basische und mikrowellenunterstützte Aufschlüsse [18–20], meist gefolgt von einer enzymatischen Verzuckerung [21, 22]. In Abb. 1 ist das neu entwickelte Bioraffineriekonzept schematisch gezeigt. Der Treber wird zunächst abgepresst, um alle wasserlöslichen Bestandteile aus dem Brauprozess zu entfernen. Mit dem so erhaltenen Treberpresssaft können, nach Supplementation verschiedener Nährstoffe, Fermentationen durchgeführt werden. Der Rückstand kann hydrothermal vorbehandelt werden, um die strukturelle Integrität der Lignocellulose aufzubrechen und enzymatisch verfügbar zu machen. Einerseits kommt in dieser Studie, das in der Literatur schon häufig beschriebene Liquid-Hot-Water-Verfahren (LHW, Abschn. 2.4) zum Einsatz [18, 23–25], andererseits wird das Organosolv-Verfahren (OS, Abschn. 2.4) genutzt [20]. Die aufgeschlossene Biomasse kann anschließend enzymatisch verzuckert werden und ebenfalls als Nährmedium für Fermentationen dienen. Die Aufreinigung des Produktes (z. B. Lactat) kann aus komplexen Medien, beispielsweise enzymatischen Hydrolysaten oder auch supplementiertem Treberpresssaft, mittels präparativer Chromatographie [26] oder Extraktion [27, 28] erfolgen.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Prozess unterscheidet sich von den herkömmlichen Bioraffineriekonzepten für Treber durch den Pressschritt und in der Nutzung der abgepressten Komponenten. Die meisten Konzepte verzichten vor dem hydrothermalen Aufschluss auf die Abtrennung

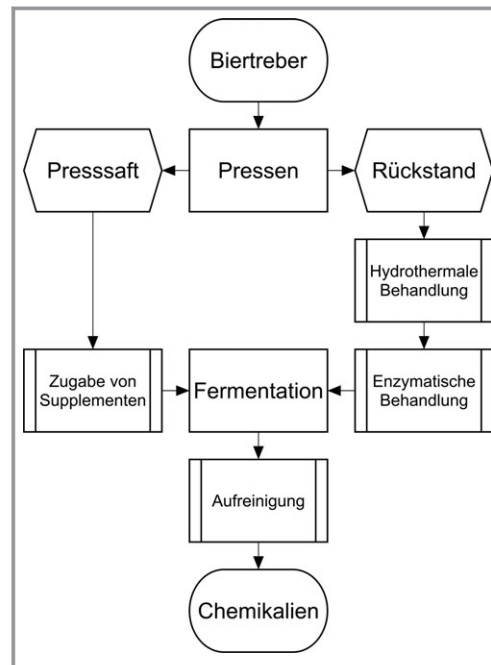


Abbildung 1. Vorgeschlagenes Bioraffineriekonzept: Der feuchte Treber wird abgepresst. Die löslichen, anhaftenden Komponenten (Presssaft) können nach Zugabe von Supplementen als Fermentationsmedium genutzt werden. Die im Rückstand enthaltenen strukturellen Kohlenhydrate können durch hydrothermale und enzymatische Verzuckerung nutzbar gemacht und ebenfalls als Fermentationsgrundlage verwendet werden. Durch die Aufreinigung der Wertstoffe aus der Fermentationsbrühe können Plattformchemikalien, wie z. B. Milchsäure, gewonnen werden.

der wasserlöslichen, anhaftenden Komponenten des Trebers [10, 16, 18]. Einige Konzepte entfernen die anhaftenden Glucosaccharide durch mehrmaliges Waschen [29, 30] oder durch Abkochen bei 100 °C im Autoklaven [23, 31], da eine Temperaturerhöhung die Löslichkeit dieser Verbindungen erhöht. Die angesprochenen Ansätze nutzen diese zuckerhaltige Fraktion jedoch nicht weiter. Das Abpressen hat vier Vorteile: (i) Da lösliche Zucker abgetrennt werden, ist beim folgenden hydrothermalen Aufschluss eine geringere Produktion von hydrothermalen Abbauprodukten zu erwarten. Hydrothermale Abbauprodukte sind u. a. Hydroxymethylfurfural (HMF), Furfural, Essigsäure und Ameisensäure, die vielfach als hemmend für das Wachstum von Mikroorganismen beschrieben werden [5, 16, 20, 30]. Changzhi Li et al. beobachteten bei der HMF-Produktion mittels Mikrowellenaufschluss eine geringere Ausbeute bei der Nutzung von Cellulose anstelle von Glucose als Substrat, was die Annahme bestätigt, dass lösliche Zucker leichter zu Inhibitoren abgebaut werden als strukturell gebundene Cellulose [32]. (ii) Der Treberpresssaft kann in Fermentationen zu Wertstoffen umgesetzt werden. Das Pressen stellt einen kostengünstigen und weit verbreiteten Verfahrensschritt zur Komprimierung von Biomasse dar [33], der zur Abtrennung von Kohlenhydraten führt, die bereits ohne hydrothermale oder

enzymatische Verzuckerung nutzbar sind. (iii) Sofern der Treberrückstand an Viehmastbetriebe oder an die biobasierte, chemische Industrie geliefert werden soll, spart der Pressschritt Transportkosten. (iv) Bei Lagerung des Trebers startet nach einigen Stunden eine fermentative Umsetzung von Zuckern zu Buttersäure durch ubiquitär vorkommende Bakterien, wie z. B. *Clostridium butyricum*. Die entstehende Buttersäure führt dazu, dass der Treber in seiner weiteren Verwendung stark eingeschränkt ist. Die Haltbarkeit kann durch Abpressen deutlich verlängert werden [34].

Die biotechnologische Nutzung von Treberpresssaft wurde erstmals 1975 beschrieben. So wurde er zur Produktion von *A. niger*-Biomasse [35], zur Herstellung von Single-Cell-Protein bei gleichzeitiger Reduktion des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BOD) [36, 37] und als Antischaum-Zusatz in Bioreaktoren [38] verwendet. In den folgenden Jahrzehnten wurde die fermentative Herstellung von Zitronensäure und Pullulan aus Treberpresssaft beschrieben [39, 40]. Seit 2010 finden sich Anwendungen zur Kultivierung von *Bacillus*-Stämmen [41] und zur Lipid-, Carotenoid- [42] sowie Biodieselproduktion [43] in synthetischen, flüssigen Brauereiabwässern. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass es sich bei Treberpresssaft um ein biotechnologisch sehr interessantes Substrat handelt und die hier vorgestellte Kombination der biotechnologischen Nutzung von Treberpresssaft und unlöslichem Treberrückstand ein vielversprechendes Konzept für eine nachhaltige Bioraffinerie darstellt. Das Prinzip der Biertreber-Bioraffinerie wird in der vorliegenden Arbeit anhand von zwei Beispielen erläutert. Der Treberpresssaft wird zur Produktion von Milchsäure mittels *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 20072 genutzt. Bei Milchsäure handelt es sich um eine wichtige Plattformchemikalie, da daraus eine Vielzahl an Precursor-Molekülen für die chemische Industrie und der biodegradierbare Kunststoff PLA hergestellt werden können [44]. Zusätzlich wird aus dem Treberrückstand mittels hydrothormaler und enzymatischer Methoden fermentierbarer Zucker gewonnen, der als Ausgangsstoff für Grund- und Feinchemikalien dienen kann.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien sind mit Hersteller- und Reinheitsangaben in Abschn. S4, Supporting Information angegeben.

2.1 Herstellung von Treberpresssaft und Treberrückstand

Für den Pressschritt wurden 998 g feuchter, selbsthergestellter Treber (Abschn. S1, Supporting Information) mittels einer Tinkturenpresse (Hochdrucktinkturenpresse HP 2 H, Fischer Maschinenfabrik GmbH, Neuss, Deutschland) bei $p = 200$ bar abgepresst, so dass 0,49 kg (0,5 L) Presssaft und

0,48 kg des Presskuchens anfielen. Der Presskuchen wurde mit 0,5 L VE-H₂O, d. h. dem abgepressten Volumen, rückbefeuchtet und erneut abgepresst. Auf diese Weise wurden vier aufeinanderfolgende Pressgänge durchgeführt, bis im Presssaft keine wasserlöslichen Saccharide mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mehr detektiert werden konnten (Abschn. S3, Supporting Information). Der Feuchtegehalt wurde mit einem Feuchtebestimmer (MLB50-3N, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland) ermittelt. Vor dem Pressen ergab sich ein Wassergehalt von $\omega = 0,68$ g g⁻¹; nach den vier Pressschritten von $\omega = 0,54$ g g⁻¹. Der von wasserlöslichen Komponenten befreite Presskuchen wurde anschließend bei 50 °C getrocknet, bis der Wassergehalt $\omega \leq 0,05$ g g⁻¹ betrug. Danach erfolgte eine Zerkleinerung des Treberrückstandes mit einer Scheibenmühle (Fidibus Classic, Komo GmbH & Co. KG, Hopfgarten, Deutschland).

2.2 Stammhaltung

Der Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 20072 wurde von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die Zellen wurden in anaerobem MRS-Medium [45] mit der folgenden Zusammensetzung kultiviert [Angaben in g L⁻¹]: Glucose [20], Casein Pepton [10], Fleischextrakt [10], Hefeextrakt [5], Tween 80 [1], K₂HPO₄ [2], Na-Acetat [5], (NH₄)₃-Citrat [2], MgSO₄ · 7 H₂O [0,2], MnSO₄ · 2 H₂O [0,05]. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 45 °C und 100 rpm im Schüttelinkubator (Ecotron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). In der exponentiellen Wachstumsphase wurden 0,75 mL Zellsuspension geerntet und mit 0,75 mL 80 Vol.-% sterilem Glycerin versetzt. Die Cryo-Kulturen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3 Fermentation

Es wurde ein Seed-Train bestehend aus zwei Vorkulturen genutzt. Vorkultur 1 wurde in 50 mL anaerobem MRS-Medium (Abschn. 2.2) in einer 100 mL Laborglasflasche (Pressure Plus, DWK Life Science GmbH, Mainz, Deutschland) durch die Zugabe einer Cryo-Kultur inokuliert. Nach 24 h wurde die Zellsuspension der Vorkultur 1 genutzt, um Vorkultur 2 zu inokulieren. Vorkultur 2 wurde in 100 mL MRS-Medium in einer 250 mL Schottflasche für 16 h kultiviert. Um die Hauptkulturen vorzubereiten, wurde der Treberpresssaft in einer Zentrifuge für 20 min bei 4200 g zentrifugiert, um aus dem Brauprozess stammende Feststoffpartikel zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand mit VE-H₂O auf eine Zuckerkonzentration (Summenparameter Glucose, Maltose und Maltotriose) äquivalent zum MRS-Medium verdünnt und mit den

MRS-Komponenten, exklusive Glucose, versetzt. Die Zellsuspension von Vorkultur 2 wurde zentrifugiert, in Treberpresssaft resuspendiert und die Hauptkulturen auf eine Zelldichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ inokuliert. Während der Wachstumsphase wurden stündlich Proben genommen und die optische Dichte (UV Photospektrometer Lambda Bio+, Perkin Elmer Corporation, Waltham, Vereinigte Staaten) sowie der pH-Wert (Microprozessor pH Meter 211, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland) bestimmt. Außerdem wurden zentrifugierte Aliquote bei -20 °C für die analytischen HPLC-Messungen (Abschn. 3, Supporting Information) gelagert.

Die Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse (BTM) wurde in vier biologischen Replikaten mit MRS-Medium ermittelt. Dazu wurden 5 mL der Biosuspension dreimal für 20 min bei 4200 g zentrifugiert und mit $\text{VE-H}_2\text{O}$ gewaschen. Das Zellpellet wurde in ein HPLC-Vial überführt und bei 50 °C für 48 h getrocknet. Die BTM wurde gravimetrisch mit einer Analysenwaage bestimmt (LA 214, VWR LLC, Radnor, USA).

In allen Vor- und Hauptkulturen wurden zudem folgende Schritte durchgeführt: Alle Medienkomponenten wurden für 30 min bei 121 °C im Autoklaven (V-150, Systec GmbH, Linden, Deutschland) sterilisiert; Zucker bzw. Treberpresssaft und die restlichen MRS-Komponenten wurden getrennt autoklaviert. Zur Anaerobisierung wurden die Schottflaschen mit Septen (Butylstopfen – massiv, Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden, Deutschland) direkt nach dem Autoklavieren verschlossen und unter Eiskühlung über Kanülen mit Stickstoff begast. Um die anaeroben Bedingungen zu verifizieren, wurde der O_2 -Indikator Resazurin in der Konzentration 1 mg L^{-1} eingesetzt. Sofern kein Farbumschlag zu sehen war, wurde Cystein-HCl in der Konzentration 1 g L^{-1} hinzugefügt, um den restlichen Sauerstoff zu reduzieren und den Farbumschlag des Indikators herbeizuführen.

2.4 Hydrothermale Behandlungen von Treber

Die hydrothermalen Vorbehandlungen wurden in einem 23 mL Aufschlussgefäß (Modell 4749, Parr Instrument GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Um ein Flottenverhältnis von 1:5 zu erreichen, wurden für die LHW Behandlungen 3 g vorbehandelter Treber (Abschn. 2.1), in 15 g $\text{VE-H}_2\text{O}$ suspendiert. Die OS-Behandlungen erfolgten entsprechend in 15 g 50% Ethanol (EtOH). Das Reaktionsgefäß wurde für 90 min in einem Universalwärmeschrank (UF110, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 25 rpm und 160 °C bzw. 180 °C wärmebehandelt. Die, nach dem Aufschluss erhaltende, Suspension wurde für 5 min bei 4200 g zentrifugiert, um den flüssigen Aufschlussüberstand vom festen Aufschlussrückstand abzutrennen. Der Aufschlussüberstand wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert. Der Aufschlussrückstand wurde viermal mit 45 mL $\text{VE-H}_2\text{O}$

gewaschen, bei 50 °C getrocknet und die Biomasse-Rückgewinnung BM_R berechnet (Gl. (1)). Bei der, zur Berechnung herangezogenen, Masse des Aufschlussrückstandes m_{AR} und der ursprünglich eingesetzten Biomasse m_{BM} handelte es sich um Trockengewichte.

$$BM_R = \frac{m_{AR}}{m_{BM}} \cdot 100 \quad (1)$$

Nach der Analyse der Zusammensetzung des Aufschlussrückstandes (Abschn. S2, Supporting Information), wurde mithilfe von Gl. (2) die Solubilisierung von Glucan G_S berechnet. Hierbei stellt C_{AR} den Cellulosegehalt im Aufschlussrückstand und G_{BM} den Glucangehalt in der ursprünglich eingesetzten Biomasse dar. Die Berechnung der Solubilisierung von Hemicellulose und Lignin erfolgten analog.

$$G_S = 100 - \frac{C_{AR}}{G_{BM}} BM_R \quad (2)$$

2.5 Enzymatische Verzuckerung von Aufschlussrückständen

Die enzymatische Umsetzung des hydrothermal vorbehandelten Trebers erfolgte für 72 h in 100 mM Na-Acetat Puffer bei einer Temperatur von 50 °C , 25 rpm und einem pH-Wert von 4,8. Der Feststoffgehalt betrug 100 g L^{-1} und es wurden $0,08\text{ g}_{\text{Enzymlösung}}\text{g}_{\text{Treber}}^{-1}$ (Ultraflo[®] Max, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) eingesetzt. Zusätzlich wurden $0,2\text{ g L}^{-1}$ NaN_3 zugegeben, um mikrobielle Kontaminationen zu unterbinden [22]. Während der Verzuckerung wurden alle 24 h Aliquote entnommen. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden die Proben für 10 min auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurden Feststoffpartikel und denaturierte Proteine in einer Zentrifuge für 2 min, bei 16900 g abgetrennt und der Überstand bezüglich der freigesetzten Glucose mittels HPLC (Abschn. S3, Supporting Information) analysiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Fermentationen mit Treberpresssaft

In Abb. 2 sind Substratverbrauch, Produktbildung, Zellwachstum und Abfall des pH-Wertes der Fermentation mit Treberpresssaft gezeigt. Die Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse ergab $0,23 \pm 0,02\text{ BTM} [\text{g L}^{-1}] \sim 1 [OD_{600\text{ nm}}]$.

Mit dieser Korrelation wurden die folgenden kinetischen sowie in Abb. 3 und Abb. 4 visualisierten Prozessparameter berechnet. Die biomassespezifische Lactatbildungsrate ergab für die Fermentation mit Treberpresssaft: $4,89\text{ g}_{\text{Lac}}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{h}^{-1}$. Die biomassespezifischen Verbrauchsraten wurden mit $0,66\text{ g}_{\text{Tri}}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{h}^{-1}$ für Maltotriose, $2,90\text{ g}_{\text{Mal}}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{h}^{-1}$ für Maltose und $1,69\text{ g}_{\text{Glu}}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{h}^{-1}$ für Glucose bestimmt. Alle

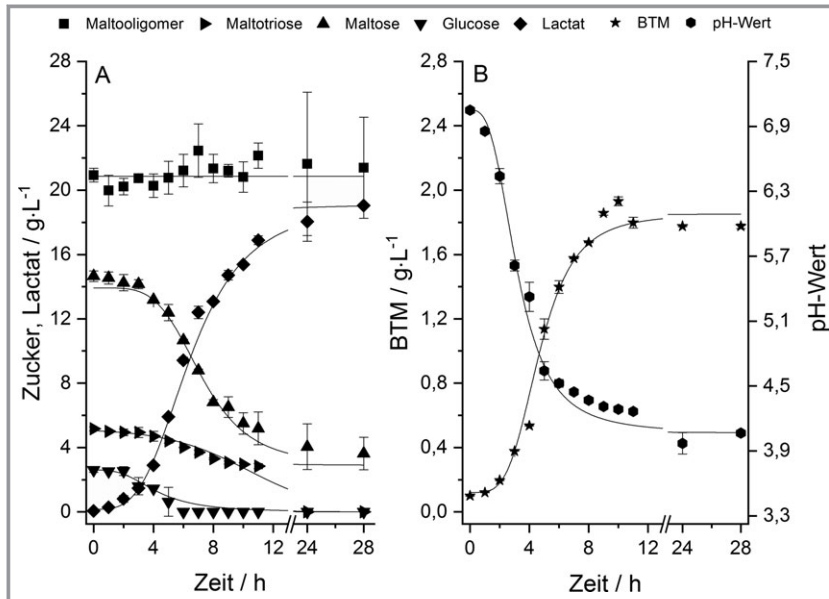


Abbildung 2. Fermentation mit supplementiertem Treberpresssaft und dem Organismus *L. delbrueckii* subsp. *lactis* bei einer Temperatur von 45 °C und einer Schüttlerfrequenz von 100 rpm. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Kurven für Maltotriose, Maltose, Glucose, Lactat, Biotrockenmasse (BTM) und den pH-Wert wurden durch sigmoide Fits angenähert; für die Maltooligomere wurde ein linearer Fit verwendet. A) Maltooligomer- (Quadrat), Maltotriose- (rechtsgekippte Dreiecke), Maltose- (aufrechte Dreiecke), Glucose- (umgedrehte Dreiecke) und Lactat-Konzentration (Rauten) im Verlaufe der Fermentation. B) pH-Wert (Hexaeder) und BTM (Sterne) im Verlaufe der Fermentation.

kurzkettigen Zucker des Treberpresssaftes dienen dem Organismus als Substrat, während die langkettigen Maltooligomere nicht nutzbar waren. Die Prozessausbeute wurde mit $0,93 \text{ g}_{\text{Lac}} \text{g}_{\text{Zucker}}^{-1}$ berechnet; die maximale Lactatkonzentration erreichte $19,05 \text{ g}_{\text{Lac}} \text{L}^{-1}$. Die maximale Wachstumsrate wurde mit $0,57 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Die kinetischen Prozessparameter für die Referenzfermentation mit MRS-Medium sind ebenfalls in Abb. 3 und Abb. 4 gezeigt.

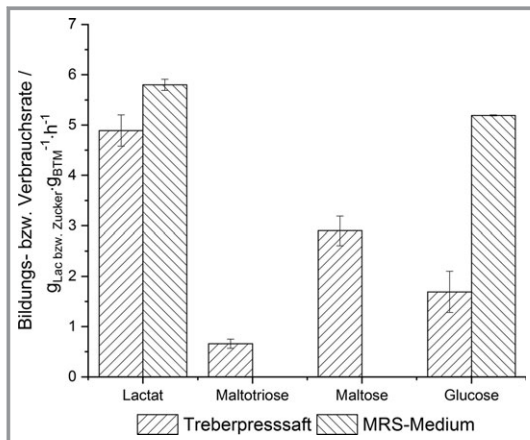


Abbildung 3. Lactatbildungsrate sowie Verbrauchsrate für Maltotriose, Maltose und Glucose der Fermentation mit Treberpresssaft im Vergleich zu einer Referenzfermentation mit MRS-Medium. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

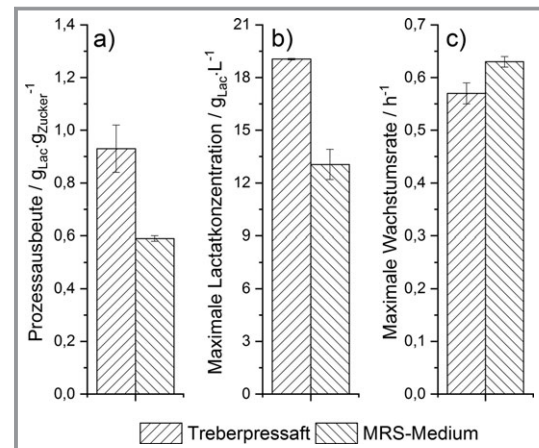


Abbildung 4. a) Prozessausbeute, b) Maximale Lactatkonzentration und c) Maximale Wachstumsrate der Fermentation mit Treberpresssaft im Vergleich zu einer Referenzfermentation mit MRS-Medium. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

sind [50]. Der Treberpresssaft kann daher eine gute Alternative zu klassischen Medien für die Produktion von Lactat sein.

Verglichen mit Literaturwerten konnten für das MRS-Medium höhere Wachstumsraten [46, 47] und ähnliche Prozessausbeuten [46] beobachtet werden. Die höheren Wachstumsraten sind vermutlich auf die strikt anaeroben Bedingungen zurückzuführen. Trotz der guten Ausbeuten und Wachstumsraten gab es nur geringfügige Unterschiede zwischen der Fermentation mit MRS-Medium und der Treberpresssaft-Fermentation in Bezug auf die Lactatbildungsrate, die Summe aller Substratverbrauchsrate und die maximale Wachstumsrate. Die Prozessausbeute und die maximale Lactatkonzentration der Treberpresssaft-Fermentation waren im Vergleich zum MRS-Medium um 58 % bzw. 46 % erhöht. Dies kann mehrere Gründe haben: (i) Der Treberpresssaft enthält zahlreiche Aminosäuren und Proteine [35, 37]. Viele Aminosäuren sind essentiell für den Stoffwechsel von *Lactobacillen* [48]. (ii) Der Treberpresssaft stellt Vitamine wie z. B. Pantothenäure, Riboflavine und Pyridoxine zur Verfügung [49], die für das Wachstum von *Lactobacillen* wichtig

3.2 Hydrothermale und enzymatische Behandlung von Treber

In Abb. 5 sind die Zusammensetzungen des eingesetzten Trebers und der Aufschlussrückstände dargestellt. Außerdem wird die, durch den Aufschluss erzielte, Solubilisierung von Glucan, Hemicellulose und Lignin in Tab. 1 gezeigt.

Die Aufschlussrückstände der OS-Behandlungen zeigten höhere Cellulosegehalte als die der LHW-Behandlungen. Mit 25,48 m% wurde bei der Behandlung OS 180 °C der höchste Cellulosegehalt im Aufschlussrückstand in dieser Versuchsreihe erzielt (Abb. 5b). Die berechnete Glucansolubilisierung, die hauptsächlich aus der Entfernung des Stärkeanteils resultiert, war bei den OS-Behandlungen mit 17,51 % bei 160 °C und 19,60 % bei 180 °C geringer als bei den entsprechenden LHW Behandlungen (Tab. 1).

Außerdem führten die LHW-Behandlungen mit 27,36 m% bei 160 °C und 26,67 m% bei 180 °C zu niedrigeren Hemicellulosegehalten als die jeweiligen OS-Behand-

Tabelle 1. Effektivität von Organosolv(OS)- und Liquid-Hot-Water(LHW)-Aufschlüssen. Die geringste Glucansolubilisierung, sowie die höchste Hemicellulose- und Ligninsolubilisierung sind kursiv hervorgehoben. Alle Behandlungen wurden mit einem Flottenverhältnis von 1:5 (Biomasse:Lösungsmittel) bei 25 rpm für 90 min durchgeführt.

	OS 160 °C	OS 180 °C	LHW 160 °C	LHW 180 °C
Biomasse-Rückgewinnung [%]	85,31	79,23	81,68	72,32
Glucansolubilisierung [%]	17,51	19,60	44,44	41,33
Hemicellulosesolubilisierung [%]	0,44	8,69	12,81	24,75
Ligninsolubilisierung [%]	20,03	15,60	8,89	1,32

lungen (Abb. 5c). Die Hemicellulosesolubilisierung war bei 180 °C mit 24,75 m% und bei 160 °C mit 12,81 m% höher als bei den entsprechenden OS-Behandlungen (Tab. 1).

Demgegenüber wiesen die OS-Behandlungen bei 160 °C mit 23,18 m% und bei 180 °C mit 26,34 m% geringere Ligningehalte als die entsprechenden LHW-Behandlungen auf (Abb. 5d). Zusätzlich war die Ligninsolubilisierung bei den OS-Behandlungen mit 20,03 % bei 160 °C und mit 15,60 % bei 180 °C höher als bei den OS-Behandlungen (Tab. 1). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen aus hydrothermalen Behandlungen von anderen Biomassearten [18, 20, 51].

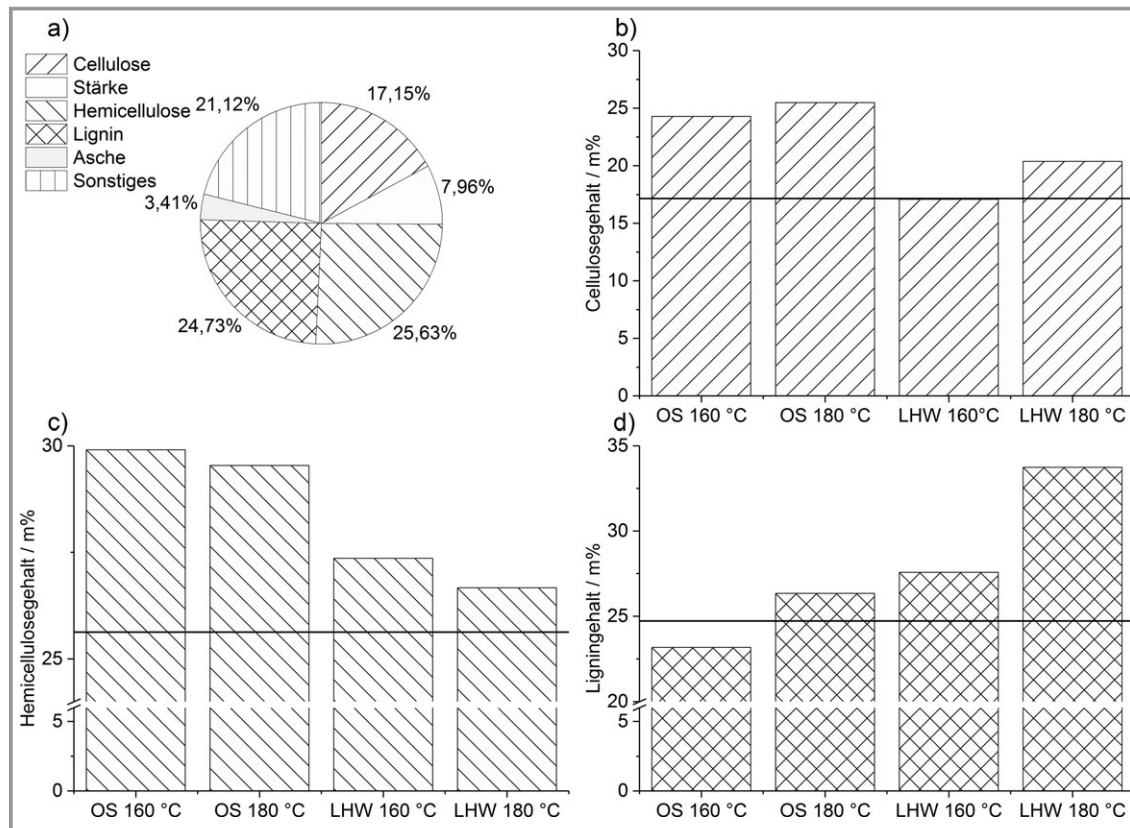


Abbildung 5. Zusammensetzung von unbehandeltem bzw. hydrothermal aufgeschlossenem Biertreber. a) Zusammensetzung des unbehandelten Biertrebers. Zusammensetzung der Aufschlussrückstände bezüglich b) Cellulose, c) Hemicellulose, d) Lignin. Zum Vergleich ist jeweils der Anteil im unbehandelten Treber als Horizontale gegeben. Alle Behandlungen wurden mit einem Flottenverhältnis von 1:5 (Biomasse:Lösungsmittel) bei 25 rpm für 90 min durchgeführt.

Zusätzlich zu den Vorbehandlungen mit abgepresstem Treber wurden OS- und LHW-Vorbehandlungen bei 180 °C mit nicht abgepresstem Treber durchgeführt. Dabei wurden ähnliche Rückstandszusammensetzungen erzielt, wie bei den entsprechenden Vorbehandlungen mit abgepresstem Treber (Daten nicht gezeigt). Die Biomasse-Rückgewinnung bei den Behandlungen mit nicht abgepresstem Treber von 52,91 % (LHW) respektive 58,16 % (OS) fiel jedoch deutlich geringer aus als bei den Vorbehandlungen mit abgepresstem Treber (Tab. 1) und ist auf die Entfernung der wasserlöslichen Bestandteile zurückzuführen.

In Tab. 2 sind die hydrothermalen Abbauprodukte Ameisensäure, Essigsäure, Furfural und HMF in den Aufschlussüberständen von abgepresstem bzw. nicht abgepresstem Treber dargestellt.

Grundsätzlich zeigte sich, dass die Vorbehandlungen, welche mit abgepresstem Treber durchgeführt wurden eine geringe Menge an hydrothermalen Abbauprodukten freisetzen. Bei den Behandlungen von nicht abgepresstem Treber zeigte sich mit 0,47 g L⁻¹ (OS) und 1,27 g L⁻¹ (LHW) eine höhere Bildung von organischen Säuren (Summenparameter: Ameisen- und Essigsäure) im Vergleich zu den Behandlungen mit abgepresstem Treber.

Zusätzlich konnte HMF in den Konzentrationen 0,44 g L⁻¹ (OS) und 0,05 g L⁻¹ (LHW) als hydrothermales Degradationsprodukt von Glucose [52] ausschließlich in den Aufschlussüberständen der Behandlungen mit nicht abgepresstem Treber detektiert werden. Dies bestätigte die anfangs postulierte Erwartung, dass kurzkettige Saccharide leichter zu hydrothermalen Abbauprodukten degradiert werden als langkettige Saccharide. Somit konnten die Vorteile des hier gewählten Prozessschemas mit einem vorgelegerten Pressschritt bestätigt werden.

Zur Überprüfung der Effektivität der hydrothermalen Behandlungen, wurde eine enzymatische Hydrolyse mit den Aufschlussrückständen des abgepressten Trebers durchgeführt. Die resultierenden Konzentrationsverläufe von Glucose sind in Abb. 6 dargestellt.

Die enzymatischen Hydrolysen der OS-Vorbehandlungen lieferten nach 72 h mit 10,7 g L⁻¹ und 11,9 g L⁻¹ höhere Glu-

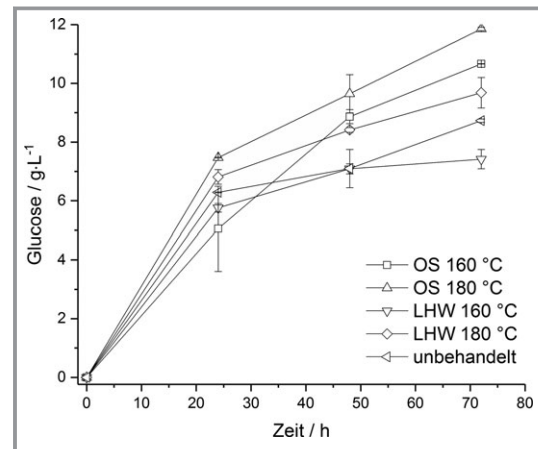


Abbildung 6. Konzentrationsverlauf von enzymatischen Hydrolysen mit unbehandeltem und hydrothermal vorbehandeltem Treber als Substrat. Die Hydrolysen wurden für 72 h bei 50 °C, 25 rpm und einem pH-Wert von 4,8 (100 mM Natriumacetatpuffer) in Duplikaten durchgeführt. Der Feststoffgehalt betrug 100 g L⁻¹ und die Enzymlösung Ultraflo® Max wurde mit 0,08 g_{Enzymlösung}g_{Treber}⁻¹ eingesetzt. Zusätzlich wurden 0,2 g L⁻¹ Na₂S₂O₅ zugegeben; Liquid-Hot-Water (LHW), Organosolv (OS).

cosetiter als die entsprechenden Hydrolysen der LHW-behandelten Aufschlussrückstände mit 7,4 g L⁻¹ und 9,7 g L⁻¹. Außerdem zeigte sich, dass höhere Temperaturen bei der hydrothermalen Behandlung zu höheren Glucosekonzentrationen im enzymatischen Schritt führten. Dies kann einerseits auf die leicht höheren Cellulosegehalte in den Aufschlussrückständen OS 180 °C und LHW 180 °C im Vergleich mit den Aufschlussrückständen OS 160 °C und LHW 160 °C zurückgeführt werden. Andererseits wird durch Entfernen von Lignin im Falle der OS-Behandlungen und Hemicellulose im Falle der LHW-Behandlungen die Struktur der Lignocellulose aufgebrochen, was eine enzymatische Umsetzung sterisch vereinfacht. Die enzymatischen Umsetzungen der Aufschlussrückstände zeigten mit Ausbeuten zwischen 0,34 und 0,37 g_{Glucose}g_{Glucan}⁻¹ nur geringe Unterschiede. Jedoch war im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse von unbehandeltem Treber, der eine Ausbeute von 0,27 g_{Glucose}g_{Glucan}⁻¹ erzielte, eine Ausbeutesteigerung um ca. 25 % feststellbar. Bei den Ergebnissen der enzymatischen Hydrolyse muss jedoch beachtet werden, dass lediglich die Effektivität der hydrothermalen Behandlungen überprüft werden sollte und eine Optimierung der Hydrolysebedingungen nicht durchgeführt wurde. Aus diesem Grund ist ein Vergleich mit bereits durchgeführten Untersuchungen nicht aussagekräftig, da durch eine enzymatische Hydrolyse mit optimierten Bedingungen weitaus höhere Ausbeuten erwartet werden [18, 22].

Tabelle 2. Konzentrationen an organischen Säuren und hydrothermalen Abbauprodukten sowie pH-Wert im Aufschlussüberstand von Organosolv(OS)- und Liquid-Hot-Water(LHW)-Behandlungen von Treber. Alle Behandlungen wurden mit einem Flottenverhältnis von 1:5 (Biomasse:Lösungsmittel) bei 25 rpm für 90 min durchgeführt; Hydroxymethylfurfural (HMF), nicht detektiert (n.d.).

	OS 180 °C ^{a)}	OS 180 °C ^{b)}	LHW 180 °C ^{a)}	LHW 180 °C ^{b)}
Ameisensäure [g L ⁻¹]	0,10	0,06	0,12	0,80
Essigsäure [g L ⁻¹]	n.d.	0,41	n.d.	0,47
Furfural [g L ⁻¹]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HMF [g L ⁻¹]	n.d.	0,44	n.d.	0,05
pH Wert	5,58	5,30	5,42	5,14

a) Durchführung mit abgepresstem Treber; b) Durchführung mit nicht abgepresstem Treber.

4 Fazit

Am Beispiel der fermentativen Herstellung von Lactat konnte gezeigt werden, dass die löslichen Komponenten des Trebers (Treberpresssaft) mikrobiell umgesetzt werden können. Die Prozessausbeute und die maximal erzielbare Lactatkonzentration konnten bei gleichbleibender Zuckerkonzentration, im Vergleich zu einem Standardmedium, um 58 % bzw. 46 % erhöht werden, da der Treberpresssaft zusätzliche Nährstoffe, wie z. B. Aminosäuren und Vitamine bereitstellt. Bei Treberpresssaft handelt es sich somit um ein vielversprechendes Substrat für die Biotechnologie. Bezüglich der hydrothermalen Vorbehandlungen kann festgehalten werden, dass OS-Behandlungen von Treber einerseits höhere Cellulosegehalte im Aufschlussrückstand und andererseits höhere Biomasse-Rückgewinnungsraten, als LHW-Behandlungen lieferten. Zusätzlich wurden mit OS-vorbehandeltem Treber, durch enzymatische Hydrolyse höhere Glucosekonzentrationen erreicht, als bei LHW-vorbehandeltem Treber. Außerdem wurde gezeigt, dass eine hydrothermale Vorbehandlung von abgepresstem Treber in einer geringeren Bildung von inhibitorischen Komponenten resultierte, als von nicht abgepresstem Treber. Daher ist das vorgestellte Bioraffineriekonzept mit vorgelagertem Pressschritt vorteilhaft gegenüber herkömmlichen Konzepten. Zum technischen Einsatz müssen die hydrothermalen Vorbehandlungen jedoch in größeren Aufschlussgefäßen und die Fermentationen in Bioreaktoren mit größerem Arbeitsvolumen und höheren Substrattitern durchgeführt werden.

Diese Forschung wurde durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung EFRE-Interreg (018-4-09-021) finanziert.

Formelzeichen

BM_R	[%]	Biomasse-Rückgewinnung
BOD	[%]	Biochemical oxygen demand
BTM	[g L ⁻¹]	Biotrockenmasse
C_{AR}	[Gew.-%]	Cellulosegehalt des Aufschlussrückstandes
g	[m s ⁻²]	Erdbeschleunigung
G_{BM}	[Gew.-%]	Glucangehalt der Biomasse (Treber)
g_{BTM}	[g]	Masse an Zellen
g_{Glu}	[g]	Masse an Glucose
g_{Lac}	[g]	Masse an Produkt
g_{Mal}	[g]	Masse an Maltose
G_S	[%]	Glucansolubilisierung
g_{Tri}	[g]	Masse an Maltotriose
m_{AR}	[g]	Masse des Aufschlussrückstandes

m_{BM}	[g]	Masse an eingewogener Biomasse (Treber)
p	[bar]	Druck
ω	[g g ⁻¹]	gravimetrisch bestimmter Wassergehalt

Abkürzungen

EtOH	Ethanol
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
LHW	Liquid-Hot-Water
OS	Organosolv
PLA	Polylactic acid
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser

Literatur

- [1] L. Narziss, W. Back, *Chem. Ing. Tech.* **2016**, *88* (12), 1869–1879. DOI: <https://doi.org/10.1002/cite.201600038>
- [2] J. Buffington, *Adv. Chem. Eng. Sci.* **2014**, *4*, 308–318. DOI: <https://doi.org/10.4236/aces.2014.43034>
- [3] *Der Barth-Bericht*, Barth & Sohn, Nürnberg **2018**. www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/357/barth-bericht20172018de.pdf
- [4] K. M. Lynch, E. J. Steffen, E. K. Arendt, *J. Inst. Brew.* **2016**, *122* (4), 553–568. DOI: <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- [5] C. Xiros, P. Christakopoulos, *Waste Biomass Valorization* **2012**, *3* (2), 213–232. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>
- [6] N. G. Belibasakis, D. Tsirigianni, *Anim. Feed Sci. Technol.* **1996**, *57* (3), 175–181. DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00860-8](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00860-8)
- [7] C. A. Daley, A. Abbott, P. S. Doyle, G. A. Nader, S. Larson, *Nutr. J.* **2010**, *9* (1), 10. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-10>
- [8] F. Leiber, I. K. Schenk, A. Maeschli, S. Ivemeyer, J. O. Zeitz, S. Moakes, P. Klocke, P. Staehli, C. Notz, M. Walkenhorst, *Animal.* **2017**, *11* (11), 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731117000830>
- [9] V. Stojceska, P. Ainsworth, *Food Chem.* **2008**, *110* (4), 865–872. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.074>
- [10] C. Xiros, E. Topakas, P. Katapodis, P. Christakopoulos, *Bioresour. Technol.* **2008**, *99* (13), 5427–5435. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.010>
- [11] H. Xu, L. Sun, D. Zhao, B. Zhang, Y. Shi, Y. Wu, *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88* (3), 529–535. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3118>
- [12] C. B. Faulds, G. Mandalari, R. B. Lo Curto, G. Bisignano, K. W. Waldron, *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86* (11), 1623–1630. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2480>
- [13] C. Xiros, M. Moukouli, E. Topakas, P. Christakopoulos, *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (23), 5917–5921. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.018>
- [14] M. Čater, L. Fanel, Š. Malovrh, R. Marinšek Logar, *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 261–269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.029>
- [15] J. S. White, B. K. Yohannan, G. M. Walker, *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8* (7), 1175–1184. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x>

- [16] S. I. Mussatto, M. Fernandes, G. Dragone, I. M. Mancilha, I. C. Roberto, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29* (12), 1973–1976. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9494-3>
- [17] S. I. Mussatto, D. Giuliano, I. C. Roberto, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1352–1356. DOI: <https://doi.org/10.1109/CCDC.2014.6852944>
- [18] M. Michelin, J. A. Teixeira, *Bioresour. Technol.* **2016**, *216*, 862–869. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.018>
- [19] K. Rommi, P. Niemi, K. Kempainen, K. Kruus, *J. Cereal Sci.* **2018**, *79*, 168–173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.10.005>
- [20] R. Ravindran, S. Jaiswal, N. Abu-Ghannam, A. K. Jaiswal, *Bioresour. Technol.* **2017**, *248*, 272–279. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>
- [21] P. Forsell, H. Kontkanen, H. A. Schols, S. Hinz, V. G. H. Eijssink, J. Treimo, J. A. Robertson, K. W. Waldron, C. B. Faulds, J. Buchert, *J. Inst. Brew.* **2008**, *114* (4), 306–314. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00774.x>
- [22] S. I. Mussatto, G. Dragone, M. Fernandes, A. M. F. Milagres, I. C. Roberto, *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *15* (5), 711–721. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9215-7>
- [23] F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Lopes, J. C. Parajó, H. Pereira, F. M. Girio, *Process Biochem.* **2005**, *40* (3–4), 1215–1223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.015>
- [24] G. Pierre, F. Sannier, R. Goude, A. Nouvinaire, Z. Maache-Rezzoug, S. A. Rezzoug, T. Maugard, *J. Cereal Sci.* **2011**, *54* (3), 305–310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.06.004>
- [25] J. Steiner, K. Franke, M. Kiefling, S. Fischer, S. Töpfl, V. Heinz, T. Becker, *Carbohydr. Polym.* **2018**, *184*, 315–322. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.038>
- [26] V. H. Thang, S. Novalin, *Bioresour. Technol.* **2008**, *99* (10), 4368–4379. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.045>
- [27] P. Von Frieling, K. Schugerl, *Process Biochem.* **1999**, *34*, 685–696. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00143-5)
- [28] F. S. Oliveira, J. M. M. Araújo, R. Ferreira, L. P. N. Rebelo, I. M. Marrucho, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *85*, 137–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.10.002>
- [29] S. I. Mussatto, M. Fernandes, I. M. Mancilha, I. C. Roberto, *Biochem. Eng. J.* **2008**, *40* (3), 437–444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.013>
- [30] J. A. Rojas-Chamorro, C. Cara, I. Romero, E. Ruiz, J. M. Romero-García, S. I. Mussatto, E. Castro, *Energy and Fuels.* **2018**, *32* (4), 5226–5233. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b00343>
- [31] F. Carvalheiro, G. Garrote, J. C. Parajó, H. Pereira, F. M. Girio, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21* (1), 233–243. DOI: <https://doi.org/10.1021/bp049764z>
- [32] C. Li, Z. Zhang, Z. K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (38), 5403–5405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.07.053>
- [33] D. S. Bajwa, T. Peterson, N. Sharma, J. Shojaeiarani, S. G. Bajwa, *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *96*, 296–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.040>
- [34] E. I. El-Shafey, M. L. F. Gameiro, P. F. M. Correia, J. M. R. de Carvalho, *Sep. Sci. Technol.* **2004**, *39* (14), 3237–3261. DOI: <https://doi.org/10.1081/SS-200028775>
- [35] Y. D. Hang, D. F. Splittstoesser, E. E. Woodams, *Appl. Microbiol.* **1975**, *30* (5), 879–880.
- [36] L. J. Shannon, K. E. Stevenson, *J. Food Sci.* **1975**, *40* (4), 830–832. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb00568.x>
- [37] L. J. Shannon, K. E. Stevenson, *J. Food Sci.* **1975**, *40* (4), 826–829. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb00567.x>
- [38] R. T. Roberts, *J. Inst. Brew.* **1976**, *82* (2), 96–96. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03733.x>
- [39] T. Roukas, P. Kotzekidou, *J. Food Sci.* **1986**, *51* (1), 225–228. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb10876.x>
- [40] T. Roukas, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *15* (4), 447–450. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008996522115>
- [41] G. A. Plaza, M. Pacwa-Plociniczak, Z. Piotrowska-Seget, K. Jangid, K. A. Wilk, *Environ. Prot. Eng.* **2011**, *37* (3), 63–71. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0252-6>
- [42] T. Schneider, S. Graeff-Hönninger, W. T. French, R. Hernandez, N. Merkt, W. Clausepein, M. Hetrick, P. Pham, *Energy* **2013**, *61*, 34–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.12.026>
- [43] T. M. Mata, A. C. Melo, S. Meireles, A. M. Mendes, A. A. Martins, N. S. Caetano, *Chem. Eng. Trans.* **2013**, *32*, 901–906. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1332151>
- [44] M. Dusselier, P. Van Wouwe, A. Dewaele, E. Makshina, B. F. Sels, *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (6), 1415–1442. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3ee00069a>
- [45] J. C. De Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe, *J Appl Bacteriol.* **1960**, *23*, 130–135.
- [46] S. R. Reddy Tadi, E. V. R. Arun, A. M. Limaye, S. Sivaprakasam, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2016**, *64* (2), 279–289. DOI: <https://doi.org/10.1002/bab.1470>
- [47] L. M. D. Gonçalves, A. M. R. B. Xavier, J. S. Almeida, M. J. T. Carrodo, *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13* (4), 314–319. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90150-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90150-9)
- [48] G. Zhang, D. A. Mills, D. E. Block, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (4), 1080–1087. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01416-08>
- [49] L. Narziß, W. Back, *Die Bierbrauerei, Band 2: Technologie Der Würzezubereitung*, Wiley-VCH, Weinheim **2009**.
- [50] E. M. Hébert, R. R. Raya, G. S. De Giori, *Curr. Microbiol.* **2004**, *49* (5), 341–345. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4357-9>
- [51] Y. C. Park, T. H. Kim, J. S. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2017**, *22* (4), 431–439. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0088-1>
- [52] H. Rasmussen, H. R. Sørensen, A. S. Meyer, *Carbohydr. Res.* **2014**, *385*, 45–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.029>