

---

# **Dampfdruckaufschluss und enzymatische Hydrolyse von Maisstroh und Silagen**

---

## **DISSERTATION**

zur Erlangung der Würde des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Malte Jörn Krafft  
aus Hannover

Hamburg, 2023



## **Prüfungskommission**

Tag der Disputation: 30.08.2023

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

### **Erstgutachter:**

**Prof. Dr. habil. Bodo Saake**

Universität Hamburg

Institut für Holzwissenschaften, Abt. Holzchemie

Haidkrugsweg 1

22885 Barsbüttel

### **Zweitgutachter:**

**Prof. Dr. habil. Joachim Jose**

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie

Corrensstr. 48

48149 Münster

### **Vorsitzende der Prüfungskommission:**

**Prof. Dr. habil. Elisabeth Magel**

Universität Hamburg

Institut für Holzwissenschaften, Abt. Holzbiologie

Leuschnerstraße 91

21031 Hamburg

**Eidesstattliche Versicherung - Declaration on oath**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

I hereby declare, on oath, that I have written the present dissertation by my own and have not used other than the acknowledged resources and aids.

---

*„In dem ‚Ich will!‘ liegt eine mächtige Zauberkraft, wenn es ernst damit ist und  
Tatkraft dahinter steht! Freilich darf man Hindernisse und Umwege nicht scheuen und  
darf in keinem Augenblick sein Ziel aus dem Auge lassen!“*

*Werner von Siemens an seine Frau Mathilde*

*20. März 1854*

## Vorwort

Das vorliegende Manuskript entstand als kumulative Dissertation am Institut für Holzwissenschaften, Abteilung Holzchemie, der Universität Hamburg. Sie ist dabei inhaltlich eine Zusammenfassung nachfolgender Publikationen:

1. **Krafft, M.J.**; Bendler, M.; Schreiber, A.; Saake, B., Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover. *Agronomy* 2020, 10, 811. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060811>
2. **Krafft, M.J.**; Frey, O.; Schwarz, K.U.; Saake, B. Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates. *Molecules* 2020, 25, 6022. <https://doi.org/10.3390/molecules25246022>
3. **Krafft, M.J.**; Berger, J.; Saake, B., Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases Obtained After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage. *Front. Chem.* 2021, 9:760657. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.760657>

Die vorliegenden, referierten Arbeiten entstanden im Rahmen des Projektes „PANDA“ (*Production of organic acids from natural resources with surface display-based consolidated bioprocessing*). Gefördert wurde das Projekt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) über den Projektträger Jülich (Förderkennzeichen 031B0505B). Der Projektzeitraum erstreckte sich dabei vom 1. August 2018 bis zum 30. November 2021. Beteiligte Projektpartner waren die AG Prof. Jose (Westfälische Wilhelms-Universität Münster), die Nanjing Tech University und die Autodisplay Biotech GmbH (Düsseldorf).

Im Rahmen des begleitenden Drittmittelprojektes entstanden eine Bachelorarbeit und eine Masterarbeit. Die Daten wurden gemeinsam in KRAFFT et al. (2020a) und KRAFFT et al. (2020b) publiziert.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. habil. Bodo Saake für die Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe, die jahrelange, stetige Unterstützung in ungewöhnlichen Zeiten, gemeinsame Reisen und Projekttreffen, den einen oder anderen Ratschlag, die Betreuung dieser Arbeit und schließlich auch deren Begutachtung.

Herrn Prof. Dr. habil. Joachim Jose danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gemeinsame Arbeit.

Frau Dr. Ruth Maas danke ich für die anregenden Gespräche und den wissenschaftlichen Austausch. Frau Dr. Eva Kranen, Herrn Dr. Tozakidis und Herrn Christoph Furtmann sei an dieser Stelle für die wissenschaftliche Kooperation und die kollegiale Zusammenarbeit gedankt. Herrn Martin Bellof danke ich für die Projektkoordination, jedes gesellschaftskritische Gespräch und die musikalische Begleitung.

Meinen Co-Autoren Marie Bandler, Olga Frey und Jens Berger sei herzlich für ihre Mitarbeit, Ideen, Anregungen und den konstruktiven Austausch gedankt.

Ein herzlicher Dank gebührt Frau Theresa Burger und Herrn Stefan Thurner (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft) für die Bereitstellung von Maisstroh und Maisstrohsilage. Herrn Johannes Meyn danke ich weiterhin für die Zurverfügungstellung der in dieser Arbeit verwendeten Maissilage.

Für Unterstützung, Betreuung und Durchführung der Laborarbeiten danke ich den Kolleginnen und Kollegen der Holzchemie. Im Besonderen Andreas Schreiber, Maria-Anna Knöpfle, Nicole Erasmy und Sascha Lebioda. Frau Birte Buske sei für die Unterstützung bei den gaschromatographischen Arbeiten und jedes aufmunternde und motivierende Wort und Gespräch gedankt.

Frau Dr. Stephanie Schwarz und Herrn Dr. Sebastian Hagel danke ich für die bereichernde Bürogemeinschaft über die letzten Jahre. Ihr habt jeden Tag zu etwas Besonderem werden lassen!

Meinen Eltern, Laura und meinen Freundinnen und Freunden danke ich dafür, dass ihr mich im Prozess dieser Arbeit immer unterstützt, verstanden und motiviert habt.

## **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis .....	x
Tabellenverzeichnis.....	xii
Abkürzungsverzeichnis .....	xiii
Publikationen mit Beschreibung der eigenen Anteile.....	xiv
Kurzfassung.....	xvi
Abstract .....	xviii
<b>1 Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Allgemeiner Teil .....</b>	<b>4</b>
2.1 Bioraffineriekonzepte.....	4
2.1.1 Definition und Hintergrund.....	4
2.1.2 Lignocellulose-Bioraffinerie und Umsetzungen .....	5
2.2 Nutzung und Verwendung von Mais .....	6
2.3 Gerüstsubstanzen der Maispflanze.....	12
2.4 Zusammensetzung der verwendeten Rohstoffe .....	18
2.4.1 Maisstroh.....	18
2.4.2 Maissilage .....	18
2.4.3 Maisstrohsilage .....	20
2.5 Vorbehandlungsmethoden.....	21
2.5.1 Physiko-chemische Vorbehandlung und Schärfegrad .....	22
2.5.2 Reaktionen im Dampfdruckaufschluss .....	25
2.6 Enzymatische Hydrolyse.....	31
2.6.1 Limitierende Faktoren der EH .....	34
2.6.2 Optimierung der EH durch Ligninextraktion.....	35
2.7 Nebenprodukte und deren Verwendung .....	36
2.7.1 Lignin .....	36
2.7.2 5-Hydroxymethylfurfural.....	36
2.7.3 Furfural.....	37
2.7.4 Weitere Nebenprodukte .....	38
<b>3 Arbeitsbeschreibung .....</b>	<b>39</b>



4	Spezieller Teil – Ergebnisse und Diskussion.....	41
4.1	Rohstoffcharakterisierung .....	41
4.2	Ergebnisse der Dampfdruckaufschlüsse .....	44
4.2.1	Faserstoff- und Extraktausbeuten.....	44
4.2.2	Kohlenhydratgehalte .....	48
4.2.3	Freie KH und Molmassen der Extrakte in DE 1 und MS .....	53
4.2.4	Ligningehalte in Extrakt und Faserstoff.....	55
4.2.5	Entwicklung der pH-Werte im Extrakt .....	58
4.3	Ligninextraktion der Faserstoffe .....	60
4.3.1	Charakterisierung der Dampfdruck-Lignine aus Maisstroh.....	62
4.4	Enzymatische Hydrolyse der Faserstoffe.....	65
4.4.1	EH ohne Vorbehandlung.....	65
4.4.2	EH mit DD-Vorbehandlung .....	67
4.4.3	Einfluss der Ligninextraktion auf die nachfolgende EH.....	70
4.5	Gesamtkohlenhydratbilanzen.....	73
4.6	Inhibitoren und Degradationsprodukte .....	75
4.6.1	Furane.....	75
4.6.2	Organische Säuren im Extrakt .....	77
4.6.3	Phenolische Abbauprodukte des Lignins .....	79
4.6.4	Weitere Degradationsprodukte.....	82
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	83
6	Literaturverzeichnis .....	89
7	Beigefügte Publikationen.....	114

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Illustration der anatomischen Bestandteile der Maispflanze in der Vollreife.....	6
Abbildung 2: Prozesswege und Verarbeitungsformen der in dieser Arbeit verwendeten Rohstoffe.....	7
Abbildung 3: Darstellung der Cellobiose.....	13
Abbildung 4: Illustration eines Xyloglucans mit einer Glucose-Hauptkette (weiß) und Seitenketten.....	14
Abbildung 5: Ein für Süßgräser typisches $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-Glucan .....	15
Abbildung 6: Darstellung des HGS-Lignins, inklusive p-Cumarsäure und Ferulasäure, von Einjahrespflanzen.....	16
Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme (EM) von Pappelholz nach SE bei 224 °C und 180 Sekunden .....	27
Abbildung 8: SEM-Aufnahmen von zwei verschiedenen Lignin-Agglomerat-Typen (A, B) in vorbehandeltem Maisstroh und zum Vergleich unbehandeltes Maisstroh (C) .....	28
Abbildung 9: SEM-Aufnahmen von Weizenstroh mit sichtbaren Lignin-Agglomeraten (A), sowie AFM-Aufnahmen der Oberfläche mit sichtbarer rauer Struktur (B) nach SE.....	28
Abbildung 10: Umwandlung der C5- und C6-Kohlenhydrate zu 5-HMF, Furfural und organischer Säuren.....	30
Abbildung 11: Darstellung der Endoglucanase TfCel6A mit sichtbarer "Rinne" .....	32
Abbildung 12: Cellobiohydrolase I (TrCel7A) mit sichtbarem "Tunnel" .....	32
Abbildung 13: Darstellung einer $\beta$ -D-Glucosidase (Glucoamylase von <i>A. awamori</i> ) mit dem aktiven Zentrum in einer Tasche.....	33
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Endo- und Exoglucanasen .....	33
Abbildung 15: 5-HMF als Plattformchemikalie für eine Vielzahl von Folgeprodukten	37
Abbildung 16: Faserstoff- und Extraktausbeuten der Maisstroh-Rohstoffe nach einem Dampfdruckaufschluss zwischen einem Schärfegrad von $\log R_0 = 2,77-3,94$ . .....	44
Abbildung 17: Die ermittelten Ausbeuten für Maissilage nach Dampfdruckaufschlüssen von $\log R_0 = 2,77$ bis 3,94 .....	46

---

Abbildung 18: Glucose (Glc) und Xylose (Xyl)-Gehalte der Faserstoffe und Extrakte der Maisstroh-Varianten, jeweils fraktions- und rohstoffbezogen in %.....	48
Abbildung 19: Darstellung von Glucose und Xylose in Extrakt- und Faserstofffraktion der dampfdruckbehandelten Maissilage dargestellt als % bezogen auf eingesetzten Rohstoff.....	50
Abbildung 20: Oligomer/Monomer-Verhältnisse von Maisstroh und Maissilage bei verschiedenen Schärfegraden .....	53
Abbildung 21: Illustration der in der Extraktfraktion ermittelten pH-Werte für die verschiedenen Rohstoffe in Abhängigkeit vom Schärfegrad des Aufschlusses. ....	58
Abbildung 22: Prozentuale Wiederfindung der fällbaren Bestandteile im Vergleich zum initial im vorbehandelten Faserstoff ermittelten Hydrolyserückstände.....	61
Abbildung 23: Einfluss des Schärfegrades auf die Verunreinigungen der extrahierten Lignine durch Kohlenhydrate bezogen auf das untersuchte Lignin .....	62
Abbildung 24: Ermittelte $M_w$ (g/mol) und $\bar{D}$ der extrahierten Lignine aus dampfdruckbehandelten Faserstoffen, die im Bereich zwischen $\log R_0 = 3,65$ und $4,25$ erzeugt wurden.....	63
Abbildung 25: Einfluss des Schärfegrades auf die Kohlenhydrat-Ausbeuten (Glucose/Xylose) in Bezug auf die theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate im enzymatisch hydrolysierten Faserstoff. ....	67
Abbildung 26: EH-Ausbeuten mit Cellic <sup>®</sup> CTec2 an verschiedenen Rohstoffen in Abhängigkeit vom Schärfegrad. ....	68
Abbildung 27: Einfluss der Ligninextraktion auf die EH von dampfdruckbehandeltem Maisstroh (DE 1). ....	70
Abbildung 28: Glucose- (A) und Xyloseausbeuten (B) nach der enzymatischen Hydrolyse von extrahierten und nicht extrahierten Faserstoffen bezogen auf den eingesetzten Rohstoff .....	72
Abbildung 29: Einfluss des Schärfegrades auf die Furanhalte in den Extrakten von Maisstroh und Maissilage .....	76
Abbildung 30: Einfluss des Schärfegrades auf den Essig- und Ameisensäuregehalt im Extrakt.....	78
Abbildung 31: Einfluss des Schärfegrades auf die ermittelten phenolischen Komponenten im Extrakt für Maisstroh DE 1 (A) und MS (B).....	80
Abbildung 32: Vergleich der phenolischen Komponenten in den Maisstroh- und Maissilage-Extrakten in Abhängigkeit vom Schärfegrad als %-Peakfläche .....	82

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Anfallende Maisstrohmengen im globalen Kontext. ....	8
Tabelle 2: Zusammenstellung durchschnittlicher Hemicellulosegehalte in Primär- und Sekundärwänden der Gräser .....	13
Tabelle 3: Chemische Zusammensetzung von Maisstroh nach verschiedenen Autoren.	18
Tabelle 4: Futtermittelanalytik-Zielwerte für hochwertige Maissilage .....	19
Tabelle 5: Rohstoffcharakterisierung von Maisstrohsilage.....	20
Tabelle 6: Theoretische Ausbeuten an Furfural aus unterschiedlichen Rohstoffen.....	37
Tabelle 7: Vergleich der Extraktstoff-, Kohlenhydrat-, Lignin- und Aschegehalte der genutzten Rohstoffe. ....	42
Tabelle 8: Die Faserstoff- und Extraktausbeuten von MSS für die drei ermittelten Optima bezogen auf % des eingesetzten Rohstoffs. ....	47
Tabelle 9: Glucose- und Xylosegehalte im Faserstoff und Extrakt der dampfdruckbehandelten MSS bezogen auf % Rohstoff. ....	51
Tabelle 10: Summierung der nach saurer Hydrolyse ermittelten Hauptkohlenhydrate (Glucose, Xylose) in Faserstoff- und Extraktfraktion, berechnet als % vom verwendeten Rohstoff. ....	52
Tabelle 11: Durchschnittliche Molmassen ( $M_w$ ) in g/mol und die jeweiligen Dispersitäten ( $\mathcal{D}$ ) für DE 1- und MS-Extrakte .....	55
Tabelle 12: Ligningehalt der dampfdruckbehandelten Faserstoffe (in % bez. auf Rohstoffeinsatz) für die verschiedenen Rohstoffe mit steigenden Schärfegraden. .	56
Tabelle 13: Hydrolyserückstand nach einstufiger, saurer Hydrolyse (in % bez. auf Rohstoffeinsatz) der durch Dampfdruckaufschluss gewonnenen Extrakte. ....	57
Tabelle 14: Ausbeuten an Faserstoff und Lignin nach der Ligninextraktion, sowie Wiederfindung in Bezug auf die eingesetzte Menge an Faserstoff .....	60
Tabelle 15: Die ermittelten Kohlenhydratgehalte nach EH (in % bezogen auf Rohstoff) und die prozentuale Umsetzung bezogen auf die theoretisch im unbehandelten Rohstoff vorhandenen Kohlenhydrate .....	65
Tabelle 16: Kohlenhydrate aus der einstufigen Hydrolyse der Extrakte, der enzymatischen Hydrolyse der Faserstoffe, sowie die Summe der Gesamtkohlenhydrate, bezogen auf Rohstoff.....	73

## **Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
% RM	Prozent bezogen auf Rohmasse
DD	Dampfdruck-(Aufschluss)
EH	enzymatische Hydrolyse
et al.	et alii
FPU	Filter Paper Units
g	Gramm
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Glc	Glucose
KH	Kohlenhydrate
LCB	Lignocellulosic biomass; lignocellulose Biomasse
LCC	Lignin-Carbohydrate-Complex; Lignin-Kohlenhydrat-Komplex
mg	Milligramm
min	Minute
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel der Molmasse
MS	Maissilage
MSS	Maisstrohsilage
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumkonzentration
SD	Stoffdichte
SE	Steam explosion
SEC	Size-Exclusion-Chromatography / Größenausschluss-Chromatographie
SR	Steam refining
Xyl	Xylose

## Publikationen mit Beschreibung der eigenen Anteile

I Malte Jörn Krafft, Marie Bendler, Andreas Schreiber, Bodo Saake

### **Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover**

*Agronomy*, 2020, 10(6), 811

- Manuskriptidee, Konzeption und Planung
- Erweiterung des Untersuchungsbereichs  $< \log R_0 = 3,65$
- Aufarbeitung der Faser- und Extraktfraktion  $< \log R_0 = 3,65$
- Hydrolyse der Faser- und Extraktfraktion  $< \log R_0 = 3,65$
- Durchführung der alkalischen Ligninextraktion und Fällung
- Hydrolyse der Ligninfraktion
- Durchführung der enzymatischen Hydrolyse nach Extraktion
- Auswertung und Interpretation der Ergebnisse
- Anfertigung des Manuskripts
- Überarbeitung des Manuskripts im Review-Prozess

II Malte Jörn Krafft, Olga Frey, Bodo Saake

### **Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates**

*Molecules*, 2020, 25(24), 6022

- Manuskriptidee, Konzeption und Planung
- Rohstoffbeschaffung
- Unterstützung bei Rohstoffcharakterisierung
- Unterstützung bei Dampfdruckaufschlüssen, Analytik und Aufbereitung der Faser- und Extraktstoffe
- Unterstützung bei enzymatischer Hydrolyse der Faserstoffe
- Durchführung der Kohlenstoffbilanzierung
- Auswertung und Interpretation der Ergebnisse
- Anfertigung des Manuskripts
- Überarbeitung des Manuskripts im Review-Prozess

III Malte Jörn Krafft, Jens Berger, Bodo Saake

**Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases  
Obtained After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage**

*Frontiers in Chemistry, 2021, 9:760657*

- Manuskriptidee, Konzeption und Planung
- Probenvorbereitung für THM-GC/MS
- Auswertung und Interpretation der Ergebnisse
- Anfertigung des Manuskripts
- Überarbeitung des Manuskripts im Review-Prozess

Bestätigung der Autorenanteile:

---

Prof. Dr. Bodo Saake

## **Kurzfassung**

Die Verwendung bisher stofflich nicht genutzter Neben- und Reststoffe der Agrarwirtschaft ist ein wichtiger Baustein für den Wandel zu bioökonomischen Lösungen. Ziel ist die Transformation von erdöl- zu biobasierten Rohstoffen. Ein möglicher Rohstoff ist Maisstroh, das bei dem Dreschen der Maispflanze anfällt und insbesondere im nordamerikanischen und asiatischen Raum signifikante Mengen erreicht. Gängige, bisherige Verwendungen für das anfallende Stroh sind zum einen der Verbleib auf dem Feld mit anschließendem Wenden der Ackerkrume oder die Verbrennung der Biomasse auf dem Feld. Zur Untersuchung der stofflichen Nutzung von Maisstroh wurden in dieser Arbeit verschiedene Maisstroh-Varianten in einem Dampfdruck-Refiner-Prozess untersucht. Diese unterschieden sich in Hinblick auf Erntejahr und den geographischen Ursprung, was Aussagen zur Varianz eines unter verschiedenen Umweltbedingungen wachsenden Rohstoffes zulässt. Weiterhin wurde eine Maissilage verwendet, um den Einfluss einer Silierung auf den Prozess erproben zu können. Abschließend wurden die gesammelten Erkenntnisse auf die Dampfdruckbehandlung einer Maisstrohsilage angewandt.

Die verwendeten Rohstoffe wurden einem Dampfdruck-Refiner-Prozess unterworfen, wobei der Rohstoff erst mit Dampf beaufschlagt und anschließend nach einer definierten Zeit mechanisch zerfasert wird. In dieser Arbeit wurden Schärfegrade in einem Bereich von  $\log R_0 = 2,77$  bis  $3,94$  bearbeitet. Durch die quantitative Bestimmung der festen Faserfraktion und der flüssigen Extraktfraktion konnten Aussagen zu Unterschieden zwischen den Maisstroh-Varianten erlangt werden. Weiterhin konnte auch das grundlegende Verhalten der Maissilage und Veränderungen des Fraktionierverhaltens durch eine Silierung in Bezug auf die verwendete Maisstrohsilage untersucht werden. Maisstroh und Maissilage zeigt im Prozess grundlegend sinkende Faserstoff- und steigende Extraktausbeuten mit zunehmenden Prozessbedingungen. Die Maisstrohsilage zeigte einen ähnlichen Verlauf, wenn auch mit einer weniger deutlichen Mengendifferenz zwischen Faserstoff und Extrakt.

Zur Erzeugung monomerer Kohlenhydrate als Ausgangsprodukt für eine Fermentation wurden die dampfdruckbehandelten Faserstoffe enzymatisch hydrolysiert und die Ausbeuten der Glucose und Xylose bestimmt. Vorab wurden für alle erzeugten Faserstoffe und Extrakte die Kohlenhydratbilanzen bestimmt, um anschließend Aussagen zur enzymatischen Umsetzung treffen zu können. Alle Rohstoffe zeigten eine signifikante Erhöhung der KH-Ausbeuten nach dem Dampfdruck-Refineraufschluss. Mit schärferen Prozessbedingungen stieg die enzymatische Zugänglichkeit der hydrolysierten Faserstoffe. Zur weiteren Optimierung der enzymatischen Hydrolyseeigenschaften wurde an den Faserstoffen einer Maisstroh-Variante exemplarisch eine alkalische Ligninextraktion durchgeführt. Die Ligninentfernung erleichterte die enzymatische



Zugänglichkeit und verbesserte die Ausbeuten. Weiterhin konnte durch die alkalische Extraktion eine Ligninfraktion erzeugt werden, die für weitere stoffliche Verwendungen geeignet und damit im Rahmen der Bioökonomie vorteilhaft sein kann.

Schließlich wurden neben den Faserstoffen auch die Extrakte eingehend charakterisiert. Dies geschah insbesondere vor dem Hintergrund wasserlöslicher Inhibitoren, die sich negativ auf enzymatische und/oder fermentative Prozessschritte auswirken. Furane und organische Säuren wurden neben anderen Abbauprodukten von Kohlenhydraten und Lignin als Hauptinhibitoren identifiziert. Ihr Vorkommen wurde in der flüssigen Extraktfraktion dokumentiert und hinsichtlich ihrer Menge und ihres Einflusses bewertet.

Die Eignung des Dampfdruckaufschlusses unter Verwendung von Maisstroh, Maissilage und Maisstrohsilage zur Herstellung von monomeren Fermentationskohlenhydraten konnte erfolgreich gezeigt werden. Unabhängig von der generellen Eignung dieser Rohstoffe konnte mit der Silierung eine Methode in Betracht gezogen werden, die eine ganzjährige Biomasseversorgung mit nur einem Rohstofferntetermin ermöglicht. Darüber hinaus wurden natürliche Schwankungen im Rohstoff festgestellt, die auf biotische und abiotische Einflussfaktoren zurückzuführen sind. Diese Unterschiede sind bei weiteren Verwendungen und Betrachtungen zu berücksichtigen.

**Abstract**

The use of previously unused agricultural by-products and residues is an essential building block in the transition to a bioeconomy. The goal is the transformation from petroleum-based to bio-based raw materials. One possible raw material is corn stover, produced after threshing the corn plant and reaches significant quantities, particularly in North America and Asia. Common, previous uses for the resulting straw are on the one hand remaining on the field with the subsequent turning of the topsoil or burning the biomass on the field. Different corn stover variants were examined in a steam refining process in this work to investigate the material use of corn stover. These differ in harvest year and geographic origin, allowing statements to be made about the variance of a raw material growing under different environmental conditions. Furthermore, maize silage was used to test the influence of ensiling on the process. Finally, the collected knowledge was applied to the steam refining treatment of a corn stover silage.

The used raw materials were subjected to a steam refining process, in which the raw material was first treated with steam and then mechanically defibrated within a defined period of time. In this work, different severities were processed in a range from  $\log R_0 = 2.77$  to 3.94. Statements on the differences between the corn stover variants were obtained through the quantitative determination of the solid fiber and the liquid extract fraction. Also, the fundamental behavior of the maize silage and changes in the fractionation behavior due to ensiling in relation to the used corn stover were examined. In the process, corn stover and maize silage show fundamentally decreasing fiber yields and increasing extract yields with increasing severity. The corn stover silage showed a similar progression, albeit with a less clear difference in quantity between fiber and extract.

In order to produce monomeric carbohydrates as the preliminary product for fermentation, the fiber fraction was enzymatically hydrolysed and the yields of glucose and xylose were determined. The carbohydrate balances for all the fibers and extracts produced were determined to be able to make statements about enzymatic conversion. All raw materials showed significantly increasing carbohydrate yields after steam refining. The enzymatic accessibility of the hydrolyzed fibers increased with more severe process conditions. For further optimizing the enzymatic hydrolysis properties, an alkaline lignin extraction was carried out on the fibers of a corn stover variant, for example.

Lignin removal facilitated enzymatic accessibility and improved carbohydrate yields. Furthermore, the alkaline extraction produced a lignin fraction suitable for further material uses and can therefore be advantageous in the context of further bioeconomy solutions.

Finally, the extracts were also characterized in detail. This happened in particular because of known water-soluble inhibitors, which have a negative effect on enzymatic or

fermentative process steps. Furans and organic acids were detected as the main inhibitors, along with other degradation products of the carbohydrates and the lignin after steam refining. Their occurrence was documented in the liquid extract fraction and assessed regarding amount and influence.

The suitability of the steam pressure refiner digestion using corn stover, maize silage and, corn stover silage for the production of monomeric fermentation carbohydrates could be successfully demonstrated. Independent of the general suitability of these raw materials, ensiling could be considered as a method that allows year-round biomass supply with only one harvesting time. Furthermore, there are natural variances in the raw material, which can be attributed to biotic and abiotic influencing factors. These differences must be taken into account for further uses and considerations.

## **1 Einleitung und Zielsetzung**

Mit dem Einsetzen der industriellen Revolution vor rund 150 Jahren, beginnend mit der Nutzung von Kohle und der neu entwickelten Dampfmaschine, änderte sich das bis dahin etablierte Wirtschaften: Weg von einer biomassebasierten, zirkularen und nachhaltigen Wirtschaftsgrundlage hin zu einer auf fossilen Energieträgern basierenden Wirtschaft (RIPA et al., 2021). Heutige Herausforderungen, wie die zunehmende globale Erwärmung, sowie begrenzte Ressourcen und Nahrungsmittel bei einer gleichzeitig ansteigenden Weltbevölkerung, zeigen eine notwendige Transformation an, um nachhaltig Wohlstand und Lebensqualität sicherstellen zu können. Neben vielen Teildefinitionen umfasst die Bioökonomie konkretisiert „die Erzeugung, Erschließung und Nutzung biologischer Ressourcen, Prozesse und Systeme, um Produkte, Verfahren und Dienstleistungen in allen wirtschaftlichen Sektoren im Rahmen eines zukunftsfähigen Wirtschaftssystems bereitzustellen“ (BIOÖKONOMIERAT, 2022). WYDRA und HÜSING (2018) unterstreichen, dass diese Transformation einen großen positiven gesellschaftlichen Einfluss habe und intensiv an ihr gearbeitet werden muss. Aktuell Entwicklungen seien dabei gerade in der Forschungs- und Entwicklungsarbeit und der Kommerzialisierungsgrad bisher noch gering (AICHINGER et al., 2016). Aus diesen Gründen unterstützt die Bundesregierung diesen Transformationsprozess durch die „Nationale Bioökonomiestrategie“ (BMBF und BMEL, 2020), aktuelle Fachhandreichungen (BMBF und BMEL, 2022), aber auch, bspw. durch das Kreislaufwirtschaftsgesetz (KrWG), in Hinblick auf Recycling und Wiederverwendung im Abfallrecht.

Vor diesem Hintergrund ist die Nutzung von Lignocellulose ein wichtiges Arbeitsfeld, um das Spektrum an zur Verfügung stehenden Rohstoffen ausbauen zu können. Aktuelle kommerzielle Projekte nutzen insbesondere leicht zugängliche Mono-, Di-, und Polymere, wie Glucose, Saccharose oder Stärke auf agrarischer Basis. Der Nutzung von schwerer zugänglichen Polymeren der Lignocellulosen wird daher eine große Wichtigkeit zugeschrieben, um die Bioökonomie realisieren zu können (AICHINGER et al., 2016).

Die Nutzung agrarischer Rest- und Nebenprodukten wird als umweltfreundliche Möglichkeit beschrieben, Biokraftstoffe und Chemikalien mit hoher Wertschöpfung herzustellen, sowie die Energiesicherheit zu verbessern (KUMAR SARANGI et al., 2023). Neben anderen Rohstoffen mit, unter heutigen Gesichtspunkten, als gering zu bewertender stofflicher Wertschöpfung zeigt Maisstroh gute Voraussetzungen für die Nutzung in einer Bioraffinerie (FLESCHHUT und EDER, 2016). AICHINGER et al. (2016) beschreiben für die Nutzung von Maisstroh in einer Lignocellulose-Bioraffinerie Vor- und Nachteile aus explizit europäischer Sicht. Demnach seien signifikante Mengen in Deutschland und Europa verfügbar. Des Weiteren sei keine Konkurrenz zu weiteren

Produktionsarten, wie Nahrungs- und Futtermitteln zu erwarten. Die Zellstoffindustrie sei gut ausgebaut und die Nutzung von Lignocellulose würde bestehende Standorte in Aspekten der Wettbewerbsfähigkeit aufwerten. Abschließend sei eine gute Forschungs- und Entwicklungstätigkeit am Standort Deutschland vorhanden. Nachteilig sei die bisher noch unterentwickelte Lignin-, Pentosen-, und Hemicellulosenverwertung. Weiterhin würden bisher industrielle Erprobungen fehlen und die Anbindung an die chemische Industrie sei wenig ausgeprägt. Nachteilig seien ebenso konkurrierende Verwertungswege für lignocellulose Biomasse, sowie Forschungs- und Entwicklungskonkurrenz in Skandinavien und den USA (AICHINGER et al., 2016).

Bioraffinerien werden auch als die „großen industriellen Fabriken der Bioökonomie“ bezeichnet (BMBF und BMEL, 2022). In ihnen wird, vergleichbar mit einer herkömmlichen Erdölraffinerie, Biomasse fragmentiert. Dies ermöglicht nicht nur die Nutzung der Biomasse als Energieträger, sondern auch die Erzeugung hochwertiger Chemikalien. Die Kaskadennutzung in einer Bioraffinerie sei besonders ausgeprägt, was zu einer Bereitstellung verschiedener, stofflich verwertbarer Zwischen- und Endprodukte führe (BMBF und BMEL, 2022). Zur Verwendung von Lignocellulose in Bioraffinerien ist eine Vorbehandlung Voraussetzung, um beispielsweise die Ausbeuten an Kohlenhydraten zu erhöhen (YANG und WYMAN, 2008; KUMAR et al., 2020). Eine Vorbehandlung ist weiterhin notwendig, da lignocellulose Biomasse aufgrund ihrer vernetzten Struktur aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin eine natürliche Widerstandsfähigkeit gegen natürlichen Abbau aufweist (HIMMEL et al., 2007).

Verschiedene Vorbehandlungsmethoden sind dabei über die letzten Jahre beschrieben, klassifiziert und erprobt worden. Eine als effektiv, kostengünstig und umweltverträglich beschriebene Methode sieht dabei die Nutzung von Dampf vor (GARROTE et al., 1999). Etablierte Verfahren sind hierbei Steam Explosion (SE) und Steam refining (SR). Beide Verfahren wurden in Hinblick auf ihre Eignung zur Herstellung von Fermentationszuckern aus Lignocellulose und der Eignung im Bioraffineriekontext untersucht (SCHÜTT, 2012; YU et al., 2022).

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen des PANDA-Projektes durchgeführt. Ziel war die Erprobung des Dampfdruck-Refiner-Prozesses auf Maisstroh als Vertreter eines agrarischen Reststoffes ohne bisherige stoffliche Wertschöpfung. In der vorliegenden Arbeit werden die Dampfdruck-Experimente und die daraus resultierenden Produkte und Daten unter Verwendung von kommerziellen Referenzenzymen untersucht und beschrieben.

Die Bedingungen des Dampfdruckprozesses und eine mögliche Aufarbeitung der Faserstoffe wurden im Projektkontext weitergehend für die Nutzung neuartiger Autodisplay-Enzymsysteme optimiert und angepasst, indem durch die Projektpartner

Optima der Hydrolyserate gesucht wurden. Mittels Autodisplay sind die Enzyme auf einer Bakterienbasis fixiert, um die Enzym-Rückgewinnung und Wiederverwendung im Prozess zu erleichtern. Dies ist insbesondere von hoher Relevanz, da die Kosten der eingesetzten Enzyme einen erheblichen Einfluss auf die Rentabilität einer Bioraffinerie haben. Die Untersuchungen der Projektpartner sind allerdings nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Zur Einschätzung der natürlichen Unterschiede von Erntejahr und Ort wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Maisstroh-Varianten untersucht. Der in dieser Arbeit dargestellte Schärfegradbereich erstreckte sich dabei von  $\log R_0 = 2,77$  bis  $3,94$ . Zur Optimierung der Prozessbedingungen wurden die Ausbeuten an Faserstoff und Extrakt bestimmt, sowie die einzelnen Fraktionen charakterisiert. Zur weiteren Optimierung auf das Autodisplay-Enzymsystem wurde weiterhin eine alkalische Ligninextraktion durchgeführt. Als Vergleichsmessungen wurde ein konventionelles Enzymsystem verwendet. Die extrahierten Faserstoffe und das erzeugte Lignin wurden wiederum in Bezug auf Kohlenhydrate und die Lignin-Molmassen charakterisiert.

Neben den Charakterisierungen der Rohstoffe und erzeugten Fraktionen wurde ebenso der Aspekt der Inhibitoren betrachtet. Verschiedene aus der Literatur ersichtliche und für die enzymatische Hydrolyse (EH) und Fermentation relevante, inhibierende Verbindungen wie Furane, organische Säuren und Degradationsprodukte des Lignins, wurden in der Extraktfraktion bestimmt und ihre Menge und Vorkommen beurteilt.

Weitere Aufschlüsse wurden mit Maissilage und Maisstrohsilage durchgeführt. Diese Versuche dienten der Abschätzung zur Eignung des Dampfdruck-Refiner-Prozesses unter Verwendung siliierter Biomasse. Maissilage, als gut verfügbarer und in der Landwirtschaft etablierter Rohstoff, diente gedanklich wie experimentell zur Überleitung der Versuche mit siliertem Maisstroh. Maisstrohsilage bietet dabei den Vorteil einer milchsäurebedingten, erhöhten Lagerstabilität und damit einer möglichen ganzjährigen Biomasseversorgung einer auf nur einen Rohstoff ausgelegten Bioraffinerie.

## **2 Allgemeiner Teil**

Im Folgenden werden theoretische Grundlagen aufgeführt, die die Ergebnisdarstellungen im speziellen Teil dieser Arbeit inhaltlich vorbereiten. Neben einer kurzen Einführung zu Bioraffineriekonzepten werden insbesondere die Charakteristika der verwendeten Substrate vorab besprochen. Dies betrifft neben grundlegenden Daten zu Nutzung und Verwendung vor allem die chemische Komposition der Rohstoffe in Bezug auf die Gehalte und Verhältnisse an Kohlenhydraten und Lignin. Weiterhin werden Gründe und Konzepte der Vorbehandlung dargestellt, wobei der deutliche Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit verwendeten Dampfdruck-Refiner-Aufschluss liegt. Abschließend werden Grundlagen zur Weiterverarbeitung der erzeugten Faser- und Flüssigfraktion beschrieben, indem die EH der Faserstoffe und Neben- bzw. Degradationsprodukte im Extrakt erläutert werden.

### **2.1 Bioraffineriekonzepte**

#### **2.1.1 Definition und Hintergrund**

Die Bioraffinerie ist „[...] ein integratives Gesamtkonzept für die Konversion von nachwachsenden Rohstoffen zu Chemikalien, Werkstoffen, Brenn- und Kraftstoffen sowie ggf. zur Erzeugung von Energie (zur Eigennutzung und/oder Auskopplung) als Beitrag zum Nachhaltigen (sic!) Wirtschaften unter möglichst vollständiger Ausnutzung der Biomasse (BM)“ dar (VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE E.V., 2016). BEHR und SEIDENSTICKER (2018) beschreiben die Bioraffinerie als „Gesamtkonzept einer Verarbeitungsanlage“, in der „Biomasse-Rohstoffe in ein Spektrum an Wertprodukten umgewandelt und extrahiert werden“. Eine weitere Definition, die in der „Roadmap Bioraffinieren“ der Bundesregierung aufgeführt wird, inkludiert den Begriff der Nachhaltigkeit sowie die „vollständige Verwertung aller Rohstoffkomponenten“ und die „Integration unterschiedlicher Verfahren und Technologien“ (WAGEMANN et al., 2014).

Als Hauptbeweggründe für Bioraffinieren werden die Energiesicherheit, die Unterstützung der Landwirtschaft, die Reduktion von Treibhausgasen und die Nutzung von Biomasse, die nicht der Nahrungsmittelproduktion (die sog. „Teller-Tank-Diskussion“) dienen, angeführt (KHATUN et al., 2019). Für die Nutzung von Bioraffinieren wird als Begründung die notwendige Reduktion der Treibhausgase und die Energiesicherheit, aber auch die Reduktion des Handelsdefizites und eine Erhöhung der Preisstabilität angeführt (WYMAN, 1999). BOURGUIGNON (2015) geben weiterhin an, dass ein Treiber für die Entwicklung von biobasierten Kraftstoffen eine gewünschte oder notwendige Reduktion der Schwankungen des Ölpreises sei. Weitere Ziele seien die nachhaltige Entwicklung der Landwirtschaft und die Dekarbonisierung des Transportsektors, ohne signifikante Änderungen der Mobilität und Infrastruktur

(BOURGUIGNON, 2015). ROSENAU (2018) beschreibt als Hauptgrund für die Einführung und Weiterentwicklung der Bioraffinerien den Wandel von fossilen Rohstoffen hin zu erneuerbaren Ressourcen. Dies betreffe nicht nur Energie und Kraftstoffe, sondern ebenso Basis- und Feinchemikalien, Kunststoffe, Farben oder Arzneimitteln. Kritische Betrachtungen zu Kraftstoffen auf Cellulose-Basis, z.B. in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit oder die Verwendung und Züchtung von gentechnisch manipulierten Organismen oder Pflanzen, wurden unter anderem durch in diesem Bereich aktive, nicht staatliche Organisationen publiziert (ERNSTING und SMOLKER, 2018).

### **2.1.2 Lignocellulose-Bioraffinerie und Umsetzungen**

BEHR und SEIDENSTICKER (2018) geben für die Lignocellulose-Bioraffinerie an, dass gerade diese Art der Bioraffinerie besonders sei, da sie nicht mit Nahrungsmitteln in Konkurrenz stehe. Die Nutzung forstlicher Reststoffe wird daher beispielsweise als vorteilhaft in Bezug auf eine Teller-Tank-Diskussion betrachtet (NIE und BI, 2018). Pilot- und Demoanlagen auf Lignocellulose-Basis wurden durch MERGNER und JANSSEN (2013), SIGOILLOT und FAULDS (2016) und PATEL et al. (2019) zusammengestellt, wobei letztere ebenfalls auf diverse, aufgrund von ökonomischen oder technischen Problemen geschlossene Anlagen eingehen. Es sei allerdings auf die Volatilität der Marktteilnehmer hingewiesen, weswegen sich Standorte oft erhalten, aber die beteiligten Firmen sich durch Ver- und Zukäufe bzw. Umbenennungen verändern. HASSAN et al. (2019) geben für die Europäische Union eine Anzahl von 43 operierenden Phase-II-Projekten und 23 durch HORIZON 2020 geförderte lignocellulosebasierte Forschungsprojekte an.

Als agrarischer Reststoff stellt Maisstroh eine nutzbare Biomasse für eine Lignocellulose-Bioraffinerie dar, die in großen Mengen verfügbar und auch in Bezug auf ihre Zusammensetzung für Bioraffinerieprozesse geeignet ist. Der hohe Parenchym-Anteil im Vergleich zu den Fasern begünstigt eine EH, bietet allerdings gleichzeitig wenig Potenzial für hochwertige Faserstoffe (CHEN, 2015). Bei der Nutzung agrarischer Reststoffe werden allerdings auch nachteilige Entwicklungen wie Nährstoffauszehrung und daraus resultierende Kosten für Dünger beschrieben, die mit bedacht werden müssen (SULTANA et al., 2010). Die Nutzung, Verfügbarkeit und Zusammensetzung von Mais und seinen Produktvarianten wird in folgenden Abschnitten näher vorgestellt werden.



## 2.2 Nutzung und Verwendung von Mais

Die Maispflanze (*Zea mays* subsp. *mays* L.) gehört zur Familie der Süßgräser (Poaceae). DOEBLEY et al. (2006) geben an, dass der Ursprung der Domestikation zwischen 9.000 und 7.000 BP in Zentralamerika erfolgte. Dieser Zeitpunkt liegt in guter Übereinstimmung mit dem von MERRILL (1930) angegebenen Zeitpunkt des Überganges der Sammler und Jäger hin zu Ackerbau und Viehzucht vor circa 10.000 Jahren. Mais und seine Bestandteile (Abb. 1) bieten heute, verschiedene Möglichkeiten der Nutzung für Menschen und Tiere und durch die Nutzung aller oder nur bestimmter Bestandteile der Maispflanze ergeben sich verschiedene Zwischen- und Endprodukte.

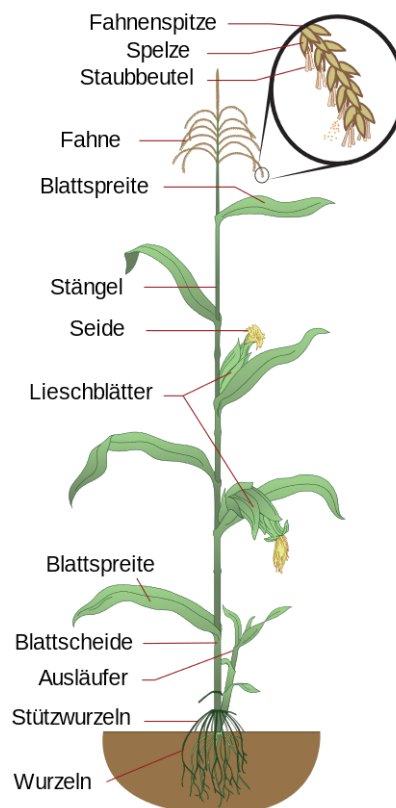


Abbildung 1: Vereinfachte Illustration der anatomischen Bestandteile der Maispflanze in der Vollreife (gemeinfrei).

Der weltweit größte Maisproduzent sind die USA (RANUM et al., 2014). Basierend auf Daten des US-Landwirtschaftsministeriums wurden hier rund 43,6 % der Maisproduktion des Jahres 2013 für Tierfuttermittel inkl. Reststoffen verwendet. Die gleiche Menge der US-Maisproduktion entfiel auf die Ethanolproduktion. Rund 12,7 % verteilen sich auf die Produktion von Nahrungsmitteln und Saatgut, sowie auf industrielle Verwendungen (RANUM et al., 2014).

Reststoffe der Körnermaisherstellung sind weitergehend intensiv verwendete Substrate in Forschung und Wissenschaft. Fragestellungen bezogen auf die nachhaltige Produktion von Plattform- und Drop-in-Chemikalien, die Herstellung von Produkten mit absorptiver

Wirkung oder die Produktion von Biogas sind im Zusammenhang mit Maisstroh beschrieben (ISIKGOR und BECER, 2015; FLESCHHUT und STROBL, 2017; KROTSCHHECK et al., 2003). Maisstroh bietet hier erhebliche Potenziale, da es als Nebenprodukt der Körnermaisproduktion im Wesentlichen keiner signifikanten stofflichen Nutzung unterliegt (FLESCHHUT und EDER, 2016). Auf die Potenziale und die Verwendung von Maisstroh wird daher im Folgenden tiefgehender eingegangen. In dieser Arbeit wurden drei Verarbeitungsformen der Maispflanze für Untersuchungen verwendet (Abb. 2).

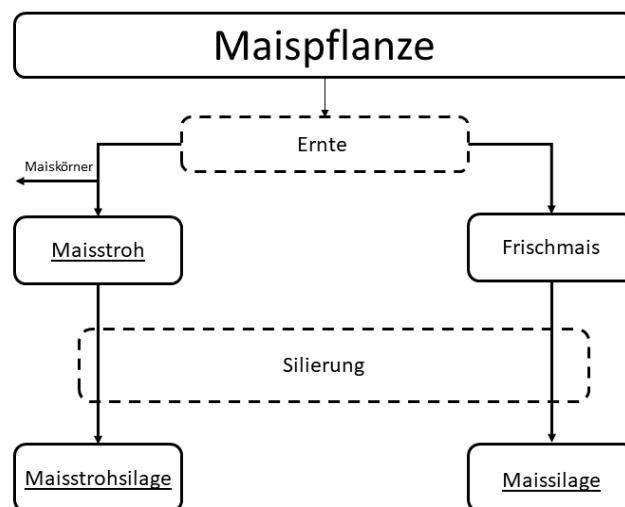


Abbildung 2: Prozesswege und Verarbeitungsformen der in dieser Arbeit verwendeten Rohstoffe.

In dieser Arbeit wurde zum einen Maissilage verwendet. Dazu wird die Pflanze in der Teigreife als Ganzpflanze ohne Wurzeln gehäckselt und anschließend durch Sauerstoffabschluss siliert (TOSZEGI und SORGE, 1984). Weiterhin wurde Maisstroh, das als Ganzpflanze exklusive der Körner und Wurzeln in der Mehltreife geerntet wird (MISTHILGER et al., 2019), und siliertes Maisstroh verwendet. Im Folgenden werden die verwendeten und in Abbildung 2 dargestellten Rohstoffe nähergehend beschrieben. Dabei wird mit Maisstroh als am wenigsten weiterverarbeiteten Rohstoff begonnen, gefolgt von Maissilage und Maisstrohsilage.

**Maisstroh** liegt als zumeist ungenutzter agrarischer Reststoff vor, der bei der Körnermaisproduktion anfällt und in relevanten Mengen verfügbar ist (FLESCHHUT und STROBL, 2017). Für Deutschland wird für 2020 eine Körnermais-Anbaufläche von 424.000 ha angegeben (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2020). Kalkulatorisch fallen dabei lediglich die Bergungskosten vom Feld an (FLESCHHUT und EDER, 2016). Die

verfügbare Menge an Maisstroh ist im globalen Kontext sehr unterschiedlich und wird in der Literatur diskutiert. Wie in Tabelle 3 dargestellt, ergeben sich für die Volksrepublik China und die Vereinigten Staaten von Amerika, im Vergleich zu Europa, deutlich höhere Mengen an anfallendem Maisstroh.

*Tabelle 1: Anfallende Maisstrohmengen im globalen Kontext.*

Volkswirtschaft	Menge (Mio. t TM/a.)	Quelle
China	200–250	(ZHAO et al., 2018; U.S. DEPARTMENT OF ENERGY et al., 2011)
USA	200–220	(ZHAO et al., 2018; LI et al., 2012)
Deutschland	3,8	(FLESCHHUT und STROBL, 2017)
Österreich	2,45	(EISENHUBER et al., 2013)
Belgien	0,58	(BERCHEM et al., 2017)

Grundsätzlich stellen GOLECHA und GAN (2016) unter Bezug auf die Literatur fest, dass weite Transportwege für Maisstroh ökonomisch nicht sinnvoll seien und eine Lagerung zu gesteigerten Kosten und Qualitätsverlusten führen würden. Nach SHINNERS et al. (2007) wird das Maisstroh mit einem Trockengehalt von 75–80 % geerntet. Vielfach werden hier Geräte aus der Heuernte verwendet. Das Maisstroh verbleibt nach der Ernte auf dem Feld, trocknet und wird anschließend zu Rundballen gepresst. Aufgrund der niedrigen Temperaturen und dem Niederschlagsrisiko im Ernte- und Bergungszeitraum kann die Trockenzeit von einigen Tagen bis Wochen andauern (GLASSNER et al., 1998). Aus diesen Gründen wird Maisstroh teilweise auch mit höheren Feuchtegehalten geerntet (> 45 %) und mittels Silierung konserviert (SHINNERS et al., 2007). Auf diesen Aspekt wird im späteren Teil dieses Abschnitts ebenfalls eingegangen werden.

RICHEY et al. (1982) beschreiben in Bezug auf die Lagerung insbesondere die Gefahr von Schimmelbildung und Erhitzung der Maisstroh-Ballen. Dies wird damit begründet, dass Maisstroh in der Freilandtrocknung nicht auf 20 % Feuchtegehalt (= optimale Heufeuchte) trocknet, sondern mit Feuchten zwischen 30 und 35 % geerntet werde. Aus diesen Gründen kommen GOLECHA und GAN (2016) zu dem Ergebnis, dass Bioraffinerien auf Maisstrohbasis ihren Rohstoff lokal beziehen müssen. PERLACK und TURHOLLOW (2003) stellen zusätzlich dar, dass 90 % der Kosten durch Bergung, Pressen, Transport und Bezahlung der Landwirte verursacht würden.

Das Verhältnis von Korn zu Stroh wird für Körnermais vereinfacht mit 1 : 1 angegeben (GLASSNER et al., 1999; EISENHUBER et al., 2013). Andere Autoren postulieren ein Verhältnis von 1 : 1,3 (THRÄN et al., 2016). Andere Untersuchungen legen dagegen ein

Verhältnis von 1 : 0,88 dar (THURNER et al., 2017). Eine vereinfachte 1 : 1-Kalkulation erscheint allerdings grundsätzlich als legitime Annahme.

GARLOCK et al. (2009) geben weiterhin an, dass der Anteil des nachhaltig nutzbaren Maisstrohs von den topographischen, geografischen oder klimatischen Bedingungen, aber auch dem Ernteverfahren abhängt. Im Zusammenspiel dieser vielen Variablen werden nachhaltige Erntemengen von 20–80 % der Strohmenge angegeben. Eine vollständige Nutzung des Maisstrohs kann die Bodenerosion begünstigen und die Kohlenstoffbilanz des Bodens belasten, weswegen eine Vollnutzung des Maisstrohs nicht sinnvoll ist (GARLOCK et al., 2009). RICHEY et al. (1982) beschreiben Ernteveruche, in denen aufgrund von Ernteverlusten beim Häckseln und beim Pressen der Ballen eine Ernteeffizienz von rund 30 % des theoretisch verfügbaren Maisstrohs erreicht wurde und somit rund 70 % auf dem Feld verbleiben. ZHAO et al. (2018) geben weitergehend unter Bezug auf WANG et al. (2010) an, dass in China rund 90 % des Maisstrohs vom Feld entfernt werden und ein großer Teil verbrannt wird, was die Luftqualität und CO<sub>2</sub>-Bilanz belastet. Die Verbrennung von Biomasse stellt damit eine erhebliche Größe in Bezug auf den globalen Klimawandel und die Belastung der Atmosphäre dar (ANDREAE, 1991; ANDREAE und MERLET, 2001). Die Verbrennung von agrarischen Reststoffen wie Maisstroh ist beispielsweise in China eine gängige Methode zur Reduzierung der Rückstände nach der Ernte (LI et al., 2007b). Für die USA geben die Autoren unter Hinweis auf das U.S. DEPARTMENT OF ENERGY et al. (2011) an, dass in den Vereinigten Staaten ungefähr die Hälfte des Maisstrohs auf dem Feld verbleibt. GLASSNER et al. (1999) hingegen geben an, dass über 90 % des Maisstrohs auf dem Feld verbleiben. Der Großteil des Maisstrohs wird demnach untergepflügt, um Aussaat und Feldhygiene zu gewährleisten. Weniger als 1 % werde für Anwendungen in der Industrie und rund 5 % für Tierfutter und Einstreu geborgen.

**Maissilage** ist nach WEIß et al. (2011) die wichtigste Ackerfutterpflanze und hat eine Anbaufläche, die alleine die Gesamtanbaufläche aller anderen Ackerfutterpflanzen und Futterhackfrüchte übersteigt. Die Anbaufläche lag 2020 bei knapp 2,3 Millionen Hektar (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2020). Maissilage ist damit eine günstige, verfügbare und energiereiche Lignocellulose-Biomasse (LCB), deren Trockensubstanz zu ca. 38 % aus Stärke und ca. 36 % aus Cellulose/Hemicellulose in Form von Blättern, Stängeln und Spindeln besteht. Durch den hohen Wassergehalt von rund 70 % sei nur wenig Prozesswasser notwendig, um eine pump- und rührbare Suspension für Vorbehandlung und EH erhalten zu können. Weiterhin weist sie, im Vergleich zu Stroh, den Vorteil einer höheren theoretischen Ethanol-Ausbeute auf. Dabei wird Maissilage auch als „Kompromiss“ zwischen stärke- bzw. zuckerhaltigen und lignocellulosehaltigen Rohstoffen beschrieben (SCHÖBER, 2008).

Maissilage wird insbesondere für die Fütterung von Milchvieh, aber auch in der Bullenmast und der Fütterung von Jungrindern eingesetzt (WEIß et al., 2011). Weiterhin findet ein signifikanter Anteil des Silomaises Verwendung in Biogasanlagen zur Erzeugung von Energie. Von der angegebenen Silomais-Anbaufläche fanden im Anbaujahr 2019 rund eine Million Hektar Verwendung in der Biogaserzeugung (FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E. V., 2020). Die Gesamtanbaufläche teilt sich demnach in 56,5 % zur Produktion von Tierfutter und 43,5 % zur Bioenergieproduktion auf.

Die Silierung, auch als Feuchtkonservierung bezeichnet, ist ein etabliertes Verfahren zur Haltbarmachung von feuchter Biomasse. Durch die Silierung der Biomasse wird eine ganzjährige Biomasseversorgung ermöglicht, wobei biologische Umsetzungsvorgänge und insbesondere Schimmelbildung verhindert werden (WENDT et al., 2018). Grundlage bildet der luftdichte Abschluss des komprimierten Materials, wodurch aerobe Umsetzungsreaktionen verhindert werden und der anaerobe Abbau der wasserlöslichen Kohlenhydrate zu organischen Säuren, insbesondere Milch- und Essigsäure, forciert wird. Die Milchsäuregärung ist dabei der gewünschte Vorgang, der den pH-Wert auf 4–4,5 absenkt. Der Prozess kann in Vor-, Gär-, Lager- und Entnahmephase unterteilt werden. Die Silierung wird hauptsächlich zur ganzjährigen Beschickung von Biogasanlagen und zur Haltbarmachung von Kraftfutter genutzt (DIECKMANN et al., 2016).

Nach der Novellierung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) 2014 sank der Zubau an Biogasanlagen signifikant. Weiterhin entfallen die ersten Biogasanlagen aus der EEG-Förderung, wodurch ohne Folgekonzepte Stilllegungen zu erwarten sind (SCHERZINGER und DEGENHART, 2023). Durch diese Zusammenhänge könnte der Preis für Maissilage deutlich sinken und Maissilage könnte in Zukunft eine haltbare und günstige Biomasse zur Herstellung von Fermentationszuckern sein.

Eine ganzjährige Biomasseversorgung ist für den ökonomischen Betrieb einer Bioraffinerien essenziell. Daher wurden verschieden Konzepte und Ideen in der Literatur diskutiert (CHERUBINI und STRØMMAN, 2011; MIAO et al., 2012; GRISSO et al., 2013; GIULIANO et al., 2016). Nach TANJORE et al. (2012) ist die Silierung der Biomasse eine mögliche Variante der Haltbarmachung von saisonal anfallender Biomasse, die auch für Maisstroh beschrieben wurde (RUSSELL, 1986). Ebenso geben NIE et al. (2021) ein gesteigertes Interesse in der Lagerung, insbesondere mittels Silierung, von vorbehandelter, feuchter Biomasse an. Der Einfluss bzw. die Nutzung einer silierten Biomasse wird daher in dieser Arbeit untersucht werden, um auch den Aspekt der Lagerung zu berücksichtigen.

**Maisstrohsilage** verbindet die Eigenschaften des Maisstrohs mit den Eigenschaften einer silierten LCB. Gerade vor dem Hintergrund der ganzjährigen Rohstoffversorgung einer

Bioraffinerie ist eine Substratlagerung wichtig und die Herausforderungen der saisonale Verfügbarkeit und der Transport von Biomasse eine aktuelle Forschungsfrage (CHERUBINI und STRØMMAN, 2011; MIAO et al., 2012; GIULIANO et al., 2016).

Die Silierung von Biomasse stellt eine mögliche Methode zur Haltbarmachung von Maisstroh dar. Die Silierung von Maisstroh wurde beispielsweise durch OSTERTAG und FLESCHHUT (2016), FLESCHHUT und STROBL (2017) und MISTHILGER et al. (2019) beschrieben. Die höheren Trockenmassegehalte von Maisstroh und die gröbere Textur lassen im Vergleich zu Silomais eine schlechtere Silierfähigkeit erwarten. In der Praxis wurden allerdings, solange Sauerstoffabschluss gegeben war, gute Silierungsergebnisse mit geringen Masseverlusten festgestellt (FLESCHHUT et al., 2017). Herausfordernd ist hier insbesondere die Verdichtung des Silos. OSTERTAG und FLESCHHUT (2016) stellen dazu Ergebnisse aus einem Praxisversuch dar, wonach die Verdichtung des Silos verglichen mit den Zielwerten unzureichend war. Durch das lockere Siliergut führe dies zu einer hohen Eindringtiefe von Sauerstoff verbunden mit entsprechender Schimmelbildung, was durch große Kapillare und eine geringe Barrierewirkung begünstigt würde.

Die Nutzung von Maisstrohsilage wird in der Literatur durch verschiedene Autoren beschrieben. XU et al. (2017) geben als Vorteile von siliertem Maisstroh einen hohen Nährwert und gute Bekömmlichkeit für Nutztiere an. Die leicht verfügbaren, wasserlöslichen Kohlenhydrate begünstigen zudem die notwendige Besiedelung mit Milchsäurebakterien (PANG et al., 2011). IDRIS et al. (2000) beschreiben die Maisstrohsilierung in Malaysia und kommen zu dem Ergebnis, dass die Silierung die beste Möglichkeit für die Haltbarmachung von Maisstroh sei. Diese sei erforderlich, da große Mengen an Maisstroh zu einem Zeitpunkt anfallen und für die sukzessive Verfütterung an Milchkühe gelagert werden müssen. ZHANG et al. (2019) beschreiben für China, dass Milchviehbetriebe Maisstrohsilage einsetzen, um bei gleichbleibenden Raufutteranteil die Milchleistung zu verbessern. Weiterhin beschrieben sie die positiven Eigenschaften zur Futterkonservierung aufgrund der hohen Kohlenhydratgehalte und der leichten Abbaubarkeit.

### 2.3 Gerüstsubstanzen der Maispflanze

Die Struktur der Maispflanze hat einen großen Einfluss auf die Möglichkeiten der Verarbeitung, das Verhalten bei chemischen Konversionen und die EH. Die Hauptbestandteile von LCB sind Cellulose, Hemicellulosen, Lignin und Extraktstoffe / akzessorische Bestandteile (HENRIKSSON und LENNHOLM, 2009; WYMAN et al., 2017). Auf diese wird im Folgendem mit dem Fokus auf deren Vorkommen und Charakteristika in Gräsern Bezug genommen.

**Cellulose** ist der Hauptbestandteil von LCB und macht circa 35–50 % der Gerüstsubstanz aus (WYMAN et al., 2017). Aufgrund dieser Dominanz in der Gerüststruktur stellt Cellulose das meistvorkommende nachwachsende Biomolekül weltweit dar (KAMIDE, 2005; PURANEN et al., 2014). KLEMM et al. (2005a) geben dazu eine jährliche Produktion von 1,5 Billionen Tonnen Cellulose an. Weitere aktuelle Literatur gibt für Cellulose ein jährliches Aufkommen von circa 75 Milliarden Tonnen an, wovon weniger als 0,3 % durch die chemische Industrie genutzt werden (SPÖRL et al., 2018). PURANEN et al. (2014) zeigt Berechnungen für ein jährliches Cellulose-Produktionsvolumen von 180 Milliarden Tonnen an. Verschiedene Modelle führen zu sehr unterschiedlicher verfügbarer und nachwachsender Menge an Cellulose und Biomasse, wobei der Unterschied zwischen kontinentaler und mariner Produktion nicht immer klar definiert ist. Unabhängig von der tatsächlichen Menge ist sich die Literatur einig, dass Cellulose das meist verfügbare Biopolymer ist und dieses bisher unzureichend genutzt wird. In Bezug auf Mais geben KLEMM et al. (2005b) für Maiskolben Cellulosegehalte von ca. 45 % und für Maisstängel von ca. 35 % an.

Als lineares Polymer besteht Cellulose aus  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidisch miteinander verbundener  $\beta$ -D-Glucopyranose, welche in der energiearmen  ${}^4C_1$ -Sesselkonformation vorliegt (WYMAN et al., 2005). Die glycosidische Bindung bietet einen entscheidenden Angriffspunkt für enzymatische und chemische Hydrolysereaktionen der Cellulosekette, die in dieser Arbeit später näher erläutert werden (TEERI und HENRIKSSON, 2009).

Da jeweils zwei Glucose-Bausteine zueinander in der C(1)-C(4)-Achse um 180° gedreht vorliegen ist das Disaccharid Cellobiose (Abb. 3) die sich wiederholende Einheit in der Cellulose (HENRIKSSON und LENNHOLM, 2009). PURANEN et al. (2014) beschreiben die sich wiederholende Einheit der Cellulose, aufgrund der Wasserabspaltung bei der glykosidischen Bindung differenzierter als Anhydrocellobiose. Die Länge eines Cellobiose-Bausteins wird durch BRADY et al. (2015) mit rund 1 nm angegeben. Die Cellulosekette ist von einem reduzierenden und einem nicht-reduzierenden Ende geprägt, wobei das reduzierende Ende der Mutarotation unterliegt und dadurch sowohl in der  $\beta$ -Form, als auch in der  $\alpha$ -Form vorliegen kann (HENRIKSSON und LENNHOLM, 2009).

Die Kenntnis dieser beiden unterschiedlichen Enden spiegelt sich auch in der Arbeitsweise von verschiedenen Enzymen wider, die in Abschnitt 2.6 dieser Arbeit näher beschrieben werden.

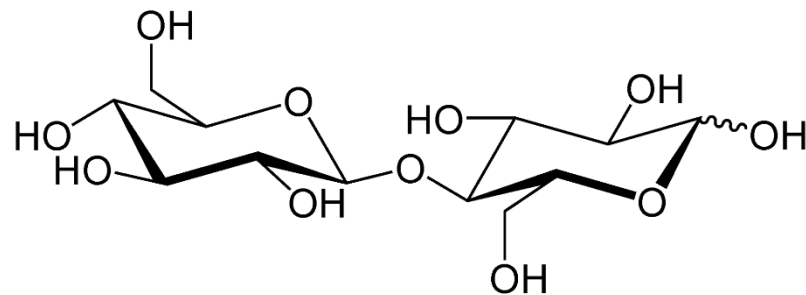


Abbildung 3: Darstellung der Cellobiose (gemeinfrei).

Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP) der Cellulose wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich beschrieben. HENRIKSSON und LENNHOLM (2009) definieren den DP als Anzahl der miteinander verbundenen Anhydroglucosen. Für natürliche Cellulose beschreibt KRÄSSIG (1993) DP-Werte von  $> 10.000$ , während er für technische Cellulose DP-Werte zwischen 800 und 3000 angibt. HENRIKSSON und LENNHOLM (2009) geben für natürlich vorkommende Cellulose bis zu 15.000 Bausteinen an, welche Cellulose zu einem der längsten bekannten Polysaccharide machen.

Die **Hemicellulosen** liegen als weitere strukturgebende Gerüstsubstanz vor (TELEMAN, 2009). Grundlegend unterteilen EBRINGEROVÁ et al. (2005) die Hemicellulosen in Xylane, Mannane, Xyloglucane (XG) und  $\beta$ -Glucane. Xylanbasierte Hemicellulosen bilden bis zu 50 % der Biomasse von monokotylen Pflanzen (STEPHEN, 1983). EBRINGEROVÁ et al. (2005) geben ebenfalls bis zu 50 % Hemicellulosen in der Biomasse ein- und mehrjähriger Pflanzen an. SCHELLER und ULVSKOV (2010) geben für die Zellwände von Gräsern zusammenfassend die in Tabelle 2 dargestellten Mittelwerte von Hemicellulosen an.

Tabelle 2: Zusammenstellung durchschnittlicher Hemicellulosegehalte in Primär- und Sekundärwänden der Gräser (SCHELLER und ULVSKOV, 2010).

	Primärwand	Sekundärwand
Glucuronoarabinoxylan	20–40	40–50
$\beta$ -(1→3,1→4)-Glucan	2–15	Spuren
Xyloglucan	2–5	Spuren
(Gluco)mannan	2	0–5



Für Maiskolben geben KLEMM et al. (2005b) einen Hemicellulosegehalt von 35 % und für Maisstängel 25 % an. NARAN et al. (2009) stellen fest, dass für Xylanstrukturen in Maisstroh im Gegensatz zu anderen Gräsern, wie Weizen, Gerste, Reisstroh oder Roggenkleie, wenige Publikationen existieren.

Die Hauptkomponente der in Gräsern, und damit auch in Mais befindlichen Hemicellulosen sind Xylane, welche grundlegend durch eine aus  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylose bestehende Hauptkette gekennzeichnet sind. Durch zahlreiche Modifikationen der Seitenketten sind unterschiedliche Varianten der Xylane bekannt. REN und SUN (2010) geben für Einjahrespflanzen das Vorkommen von Glucuronoxylan (GX), Arabino(glucurono)xylan (AGX), Glucurono(arabino)xylan (GAX), Arabinoxylan (AX) und weiteren komplexen Heteroxylanen (CHX) an. Für Maiskolben und Maisstroh wird als primäre Hemicellulose AGX beschrieben (EBRINGEROVÁ und HEINZE, 2000; XIAO et al., 2001). NARAN et al. (2009) beschreiben wiederum GAX als Hauptbestandteil des Maiskolben-Xylans. GAX und CHX kommen weiter in der äußeren Schicht des Maiskorns vor (REN und SUN, 2010).

Als weiterer mengenmäßig signifikanter Bestandteile sind für Gräser die Xyloglucane (XyG) zu nennen, welche in nahezu jeder an Land lebenden Pflanzenart vorkommen. Die für Xyloglucane typische  $\alpha$ -D-Xyl-(1 $\rightarrow$ 6)-Glc (X)-Bausteine können hierbei zusätzlich mit  $\beta$ -Galactose (L),  $\alpha$ -L-Arabinose (S) oder  $\alpha$ -L-Fucose (F) substituiert sein. Weiterhin treten auch nicht substituierte Glucose-Reste (G) auf (SCHELLER und ULVSKOV, 2010). NARAN et al. (2009) beschreiben weitergehend eine Acetyl-Substitution der XyG.

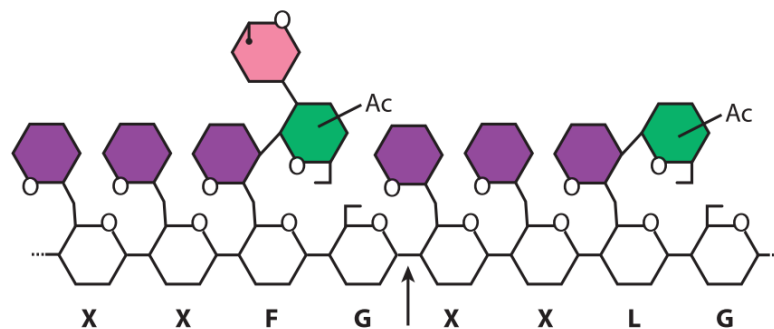


Abbildung 4: Illustration eines Xyloglucans mit einer Glucose-Hauptkette (weiß) und Seitenketten (SCHELLER und ULVSKOV, 2010), Abdruckgenehmigung erteilt.

Als weitere Hemicellulose der Gräser werden in der Literatur Mannane und Glucomannen beschrieben, bei denen die Hauptkette entweder nur aus Mannose-Bausteinen, oder aus Glucose und Mannose ausgebildet ist und die nahezu in allen Zellwänden vorkommen.

Beide Hemicellulosen sind oftmals durch Acetylgruppen substituiert (SCHELLER und ULVSKOV, 2010), die in Dampfdruckprozessen zur Abspaltung von freier Essigsäure und damit, neben weiteren Einflussfaktoren, zum Absinken des pH-Wertes im Prozess führen (MICHALAK et al., 2018).

Die letzte der beschriebenen Hemicellulose-Gruppen stellen die  $\beta$ -Glucane dar. Diese bestehen, wie in Abbildung 5 dargestellt, grundsätzlich aus einer Glucose-Hauptkette ohne Substituenten, die einerseits mit  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-, aber auch mittels  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Bindungen verknüpft sind (EBRINGEROVÁ et al., 2005). SMITH und HARRIS (1999) stellen für Süßgräser das überwiegende Vorkommen von  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-Glucan in der Zellwand fest.

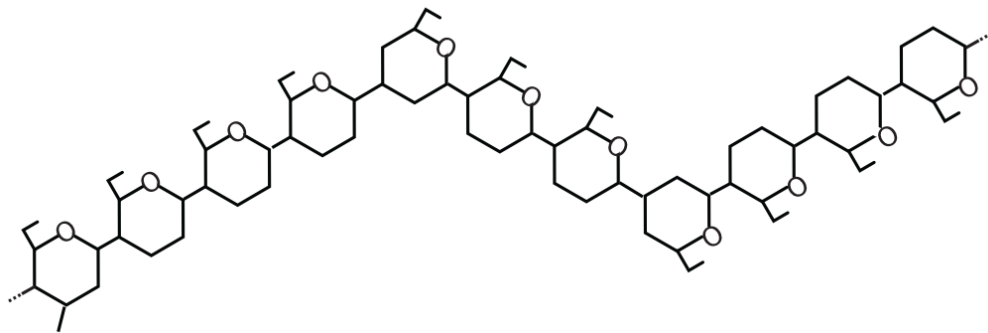


Abbildung 5: Ein für Süßgräser typisches  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-Glucan (SCHELLER und ULVSKOV, 2010), Abdruckgenehmigung erteilt.

Für eine detailliertere Darstellung der beschriebenen Hemicellulosen-Gruppen und weitere Beschreibungen des thermischen Verhaltens verschiedener Hemicellulosen-Fractionen sei an dieser Stelle auf EBRINGEROVÁ et al. (2005) verwiesen.

**Lignin** bildet die dritte relevante Gerüstsubstanz. Im Folgenden wird kurz auf Zusammensetzung und Eigenschaften von (Mais)-Lignin eingegangen werden. BOERJAN et al. (2003) führen dahingehend aus, dass Lignin das am zweitmeisten vorkommende Biopolymer sei und 30 % des organischen Kohlenstoffs in der Biosphäre darstelle. Die Funktion des Lignins wird mit der Erhöhung der Festigkeits- und Steifheit der Zellwände beschrieben. Dieser Effekt ermöglicht ein Höhenwachstum der Pflanzen. Weiterhin wird die hydrophobe Wirkung des Lignins beschrieben, die den Transport von Wasser ermögliche (VANHOLME et al., 2008). Lignin wird aus den Monolignolen *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol synthetisiert. Aus diesen Alkoholen entstehen bei der Vernetzung zum Ligninpolymer die Phenylpropaneinheiten Guajacylpropan (G, aus Coniferylalkohol), Syringylpropan (S, aus Sinapylalkohol) und *p*-Hydroxyphenylpropan (H, aus *p*-Cumarylalkohol). Die Lignine der Nadelhölzer bestehen überwiegend aus G-Bausteinen und Spuren von H-Bausteinen. Diese Lignine werden daher als G-Lignin bezeichnet.

Die Lignine der Laubhölzer hingegen bestehen überwiegend aus G- und S-Bausteinen, mit Spuren von H-Bausteinen, weswegen diese Lignine als GS-Lignine beschrieben werden. Für die Lignine der Gräser werden ähnliche Anteile an G- und S-Bausteinen und einem größeren Anteil an H-Bausteinen im Vergleich zu Nadel- und Laubholz beschrieben. Sie werden daher als (Hydroxyphenyl, Guajakyl, Sinapyl)-Lignin (HGS-Lignin) bezeichnet (BOERJAN et al., 2003). Daten aus TMAH-GC-MS- und FTIR-Experimenten zeigen ein HGS-Lignin für natives Maisstroh (CHEN et al., 2012; QIAO et al., 2018). Das Lignin von Maisstroh sei zu ungefähr 20 % aus *p*-Cumarsäure, ca. 10 % Ferulasäure und einem niedrigen S/G-Verhältnis von 0,62 zusammengesetzt (RALPH et al., 1994; LU und RALPH, 1999). Das Verhältnis von H-, G- und S-Bausteinen wird für Maisstroh mit 4:35:61 angegeben (LAPIERRE, 1993). Der Gehalt an Lignin variiert innerhalb der Maispflanze. So ist beispielsweise für Maiskolben ein Ligningehalt von 15 % und für Maisstängel von 35 % in der Literatur belegt (KLEMM et al., 2005b).

Die erwähnte Ferulasäure dient als Vernetzung zwischen Lignin, Polysacchariden und strukturellen Zellwandproteinen (OLIVEIRA et al., 2015). RALPH et al. (1998) und YOU et al. (2015) beschreiben vor diesem Hintergrund den „Lignin-Ferulat-Polysaccharid“ (LFP)-Komplex mit Esterbindungen zu den Kohlenhydraten und Etherbindungen zum Lignin in der Zellwand. Das HGS-Lignin von Maisstroh, sowie die *p*-Cumarsäure und Ferulasäure, ist als hypothetische Struktur in Abbildung 6 dargestellt.

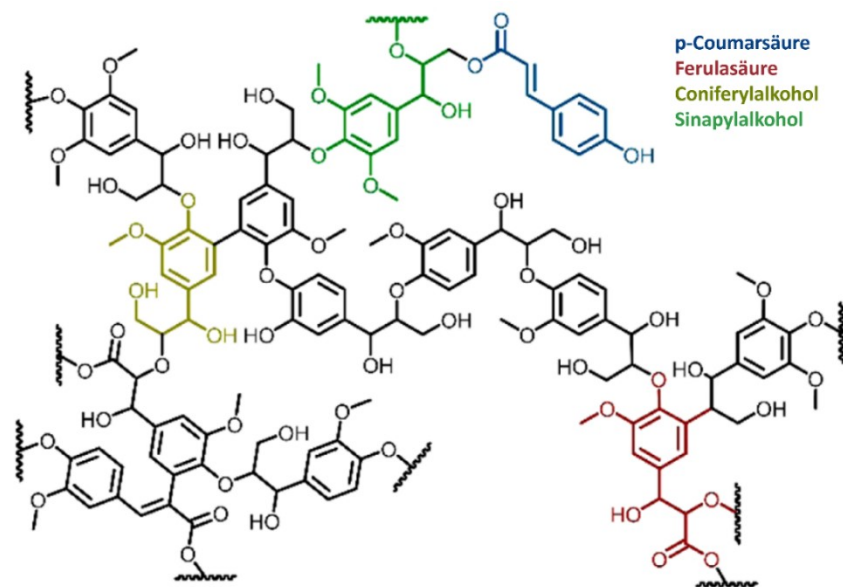


Abbildung 6: Darstellung des HGS-Lignins, inklusive *p*-Cumarsäure und Ferulasäure, von Einjahrespflanzen (ANDERSON et al., 2016), Abdruckgenehmigung nach ACS AuthorChoice.

Die Verwendung des Lignins mit hoher Wertschöpfung ist nicht trivial und eine gängige Verwertung des Lignins stellt die Verbrennung zur Gewinnung von Energie und Wärme für die Prozesse im Werk dar (ANDERSON et al., 2016). Auf die Verwendung des Lignins soll nachfolgend in Abschnitt 2.7.1. näher erläutert werden.

Abschließend soll noch kurz auf die **akzessorischen Bestandteile** eingegangen werden, die für LCB und Mais eine Bedeutung haben. Dabei sind in Bezug auf Maissilage Stärke, Protein und Fette zu nennen (PARAGINSKI et al., 2014). Insbesondere die hohen Stärkegehalte der Maissilage, verursacht durch die im Rohstoff enthaltenen Maiskörner, spielen hier eine Rolle. SINGH SANDHU et al. (2007) beschreiben diesbezüglich für die Maiskörner einen Stärkegehalt von 72–73 %.

## 2.4 Zusammensetzung der verwendeten Rohstoffe

Im Folgenden soll die Zusammensetzung der verwendeten Rohstoffe in Bezug auf die zuvor dargestellten Bestandteile dargestellt werden. Gedanklich soll die zuerst das im Projekt maßgebliche Maisstroh, dann die Maissilage und anschließend die Maisstrohsilage besprochen werden soll.

### 2.4.1 Maisstroh

Maisstroh ist ein typischer Vertreter der lignifizierten Süßgräser mit den Gerüstkomponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Die Spannweite der Zusammensetzung von Maisstroh wird in Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3: Chemische Zusammensetzung von Maisstroh nach verschiedenen Autoren.

Bestandteil	%	Quelle
Cellulose	31–42	ZHANG et al., 2007; KOVAČIĆ et al., 2017
Hemicellulose	19–34	
Xylose	21,4–25,2	KAAR, 2000; KIM et al., 2003; ÖHGREN et al., 2007; SAHA et al., 2013
Arabinose	2,0–5,5	
Galaktose	0,68–2,9	
Mannose	0,29–1,8	
Klason-Lignin	17,2–19,6	KIM et al., 2003; KIM und LEE, 2005; KIM und HOLTZAPPLE, 2006
Säurelösliches Lignin	2,3–7,0	KIM et al., 2003; ZHU et al., 2009
Asche	6–7,3	SAHA et al., 2013; BAUMBACH et al., 2016
Acetylgruppen	1,7–3,2	KIM et al., 2003; ÖHGREN et al., 2007
Essigsäure	3,6	ZHANG et al., 2007
Protein	2,9–5,9	KAAR, 2000; KIM et al., 2003; ZHU et al., 2009

ÖHGREN et al. (2007) vergleichen regionale Unterschiede von Maisstroh aus Italien und den Vereinigten Staaten von Amerika. Die dargestellten Werte zeigen eine ähnliche Zusammensetzung der Maisstroh-Varianten auch bei sehr unterschiedlichem geografischem Ursprung.

### 2.4.2 Maissilage

Maissilage wird, ebenso wie Maisstroh, zu den LCB gezählt (OLESKOWICZ-POPIEL et al., 2008). Maissilage unterscheidet sich von Maisstroh durch die Anwesenheit der Maiskörner im Rohstoff und den früheren Ernte-Zeitpunkt. Sie stellt eine Mischung aus Kraft- und Grobfutter da, bedingt durch die Körner- und Stängel/Blatt-Bestandteile.

Maissilage wird zum Ende der Teigreife geerntet, da zu diesem Zeitpunkt die höchsten energetischen Futterwerte vorherrschen (WEIß et al. (2011)). Die Silageproduktion wird in vier Phasen (Aerobe-, Fermentations-, stabile und Entnahmephase) unterteilt (BAUER, 2004). Richtwerte für eine hochwertige Maissilage sind in Tabelle 5 dargestellt. WYSS (2005) gibt in diesem Zusammenhang, abhängig vom Trockengehalt, einen Ziel-pH-Wert von 3,8–4,2 für Maissilage an. BAUER (2004) definiert ebenso einen Zielbereich von pH 4. Durch den niedrigen pH-Wert seien anschließend die Milchsäurebakterien stark inhibiert und die Maissilage stabilisiert. Die beinhaltete Stärke besteht zu 2/3 aus Amylopektin und zu 1/3 aus Amylose. Basierend auf der Nomenklatur der „Weender Futtermittelanalyse“ entspricht die Rohfaser überwiegend der Cellulose und die sog. „Rohasche“ entspricht Werten nach einer Veraschung bei 550 °C (WEIß et al., 2011).

*Tabelle 4: Futtermittelanalytik-Zielwerte für hochwertige Maissilage (nach WEIß et al. (2011)).*

Bestandteil / Wert	%
Trockenmasse	30–35
Stärke	> 32
Rohfaser	< 20
Rohasche	< 4,5
Milchsäure	1,5–2,5
Essigsäure	0,3–0,5

Die olfaktorische Wahrnehmung soll angenehm, brotartig oder aromatisch sein. In der optischen Wahrnehmung ergeben sich keine Unterschiede zum Ausgangsstoff (WEIß et al. (2011)). Die große Spannweite der Zusammensetzung lässt sich aus der Literatur ableiten. Während SCHOBER (2008) Maissilage mit einer Trockenmasse von 31,9 %, Gesamtkohlenhydraten von 73,9 % und einem Ligningehalt von 2,2 % beschreibt, geben THOMSEN et al. (2008) im Vergleich 51,7 % Glucose, 19,5 % Hemicellulosen und 16,6 % Lignin für ihre verwendete Maissilage an. OLESKOWICZ-POPIEL et al. (2011) beschreiben im Vergleich dazu ihre verwendete Maissilage mit einer Trockenmasse von 29,8 %. Der Cellulosegehalt wird mit 40,3 % und der Gehalt an Hemicellulosen mit 15,1 % angegeben. Während keine Fructose festgestellt wurde, konnte ein Stärkegehalt von 30,5 % Stärke ermittelt werden. Abschließend wird der Ligningehalt mit 7,4 %, die Extraktstoffe mit 13,5 % und die Asche mit 1,5 % beziffert (OLESKOWICZ-POPIEL et al., 2011).

Aus den dargestellten Daten wird ersichtlich, dass die Zusammensetzung der verwendeten Maissilagen in Abhängigkeit biotischer und abiotischer Faktoren eine große Streuung aufweisen. Gerade der Ligningehalt variiert stark, da die Lignifizierung erst

nach dem Ende der Teigreife einsetzt. Die Analyse der Zusammensetzung des für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendeten Maissilage-Rohstoffes ist daher unumgänglich und wird in Abschnitt 4.1. des speziellen Teils dargestellt.

### 2.4.3 Maisstrohsilage

Die Zusammensetzung der Maisstrohsilage unterscheidet sich nur geringfügig von der des Maisstrohs. Beschreibungen der Zusammensetzung von Maisstrohsilage finden sich beispielweise in SUN et al. (2011a), SUN et al. (2011b) oder WENDT et al. (2018). SUN et al. (2019) beschreiben weiterhin die Zusammensetzung der für ihre jeweiligen Arbeiten verwendeten Silagen. Analytisch werden durch LIU et al. (2014) 35 % Cellulose, 25,2 % Hemicellulosen und zusammengefasst 4,3 % Lignin, Extrakte und Asche beschrieben. Eine detaillierte Charakterisierung ist in Tabelle 5 dargestellt. Weitere Arbeiten mit Maisstrohsilage wurden dabei bspw. durch CHEN et al. (2012) durchgeführt. Die Datenlage zu siliertem Maisstroh ist im Vergleich zu herkömmlichem Maisstroh allerdings deutlich rarer.

*Tabelle 5: Rohstoffcharakterisierung von Maisstrohsilage (SUN et al., 2011a)*

Komponente	%
Trockengehalt	16,23
Glucose	39,73
Xylose	18,96
Arabinose	1,75
Milchsäure	0,84
Essigsäure	0,63
Lignin	14,86
Asche	3,84

Im Hinblick auf die in Tabelle 5 dargestellten Werte zeigt sich auch nach der Silierung eine mit nativem Maisstroh ähnliche Zusammensetzung.

## **2.5 Vorbehandlungsmethoden**

Die Vorbehandlung von LCB soll die Zugänglichkeit der Polysaccharide für eine EH und weitere nachfolgende Prozessschritte verbessern (YANG und WYMAN, 2008). Da LCB im Vergleich zu nicht lignifizierter Biomasse gegen biologischen Abbau resistenter ist, ist die Vorbehandlung ein entscheidender Prozessschritt, um hohe Ausbeuten an Monosacchariden nach der enzymatischen Hydrolyse zu erzielen. HIMMEL et al. (2007) definieren diese Eigenschaft der Biomasse als „die natürliche Widerstandsfähigkeit der pflanzlichen Zellwände gegen mikrobiellen und enzymatischen Abbau“.

Verschiedene Autoren definieren Voraussetzungen für Vorbehandlungsprozesse. Laut SUN und CHENG (2002) soll die Vorbehandlung zum einen die Verbesserung des Abbaus zu Monosacchariden während der enzymatischen Hydrolyse oder die Bildung von Monosacchariden während der Vorbehandlung gewährleisten. Zum anderen soll die Bildung von Abbauprodukten und Inhibitoren, sowie Verluste von Kohlenhydraten minimiert werden. Einen abschließenden, bedeutsamen Parameter stellt die positive ökonomische Betrachtung des Prozesses dar.

Die Vorbehandlungskosten bei der Ethanol-Produktion lassen sich mit rund 18 % der Gesamtkosten beziffern und sind damit der kostenintensivste Prozessschritt (WOOLEY et al., 1999a; WOOLEY et al., 1999b; ADEN et al., 2002). YANG und WYMAN (2008) fassen weitergehend einige Anforderungen an mögliche Vorbehandlungsmethoden zusammen. Demnach sollte der Chemikalieneinsatz für den Prozess und nachfolgende Neutralisationen so gering und kostengünstig wie möglich sein. Es sollen zudem keine unerwünschten Nebenprodukte (bspw. Gips) im Prozess erzeugt werden. Eine mechanische Mahlung des Materials sollten wegen des Energiebedarfs vermieden werden. Grundsätzlich sollte die Cellulose innerhalb von drei bis fünf Tagen mit geringen Cellulasekonzentrationen von weniger als 10 FPU/g Cellulose zu 90 % hydrolysierbar sein. Nebenprodukte wie z. B. Lignin sollen für weitere stoffliche Anwendungen genutzt werden. Für effiziente Nachfolgeprozesse sollte die Kohlenhydrat-Konzentration danach über 10 % liegen. Im Rahmen des Anlagenbaus sollte das Volumen der Reaktoren klein und die Reaktoren nicht aus teuren Materialien bestehen. Weiterhin sollte die benötigte Temperatur und der Energieverbrauch gering sein, um Kosten im Anlagenbau und bei der Energiebeschaffung zu reduzieren. In Bezug auf das flüssige Hydrolysat wird durch YANG und WYMAN (2008) eine Fermentierbarkeit vorausgesetzt, wobei eine Ausbeute an fermentierbaren Hemicellulosen von nahezu 100 % der theoretisch vorhandenen Hemicellulosen erreicht werden sollte. Viele dieser Forderungen sind nicht nur auf die Produktion von Ethanol, sondern auch auf die Produktion anderer Plattformchemikalien übertragbar.



YANG und WYMAN (2008) unterteilen die Vorbehandlungsmethoden in biologische, chemische, physikalische und thermische Prozesse. HSU (1996) nutzt die Einteilung in die Kategorien der physikalischen, chemischen und biologischen Verfahren. HENDRIKS und ZEEMAN (2009) benennen die Vorbehandlungs-Kategorien als mechanische Vorbehandlung, thermische Verfahren, saure und alkalische Prozesse, oxidative Methoden, sowie kombinierte Verfahren und Methoden mit Ammoniak und CO<sub>2</sub>. SUN und CHENG (2002) bezeichnen thermischer Prozesse als physiko-chemische Vorbehandlung.

Der in dieser Arbeit angewandte Dampfdruckaufschluss wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich klassifiziert. HSU (1996) definiert Dampfbehandlungen und SE als physikalische Vorbehandlungsmethode. Er gibt dazu an, dass dieser Prozess eine der wenigen Technologien ist, die über die Pilotphase hinaus in kommerzielle Anlagen überführt wurde. SUN und CHENG (2002) definieren Steam Explosion als physiko-chemischen Prozess, da durch die aus der Literatur bekannte Autohydrolyse (vgl. Abschnitt 2.5.2) ebenfalls chemische Vorgänge während dieses Prozesses auftreten. In diesem Zusammenhang definiert GARROTE et al. (1999) eine Vielzahl von wasser- und dampfbasierten Verfahren als hydrothermale Verfahren anhand ihrer verschiedenen Bezeichnungen in der Literatur. OVEREND et al. (1987) hingegen sehen die Dampfdruckexplosion als chemisches Verfahren, da es die chemische Zusammensetzung der Substrate stark verändert. Die Einordnung als physikalisch Methode halten sie daher für falsch. Dem entgegen ordnet SCHÜTT (2012) den Dampfdruckaufschluss ebenfalls als physiko-chemisches Vorbehandlungsverfahren ein. Dieser Einordnung soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit gefolgt werden.

Im Folgenden soll zum einen die Überkategorie der physiko-chemischen Vorbehandlungen, aber auch die Herleitung des Schärfegrades als Vergleichsparameter und der Dampfdruck- bzw. Dampfdruck-Refineraufschluss näher beschrieben werden. Für die genauere Darstellung der weiteren oben genannten Vorbehandlungskategorien soll an dieser Stelle auf systematische Übersichtsarbeiten in der Literatur verwiesen werden (HSU, 1996; SUN und CHENG, 2002; YANG und WYMAN, 2008; CHEN et al., 2010).

### **2.5.1 Physiko-chemische Vorbehandlung und Schärfegrad**

Die Vorbehandlung durch eine Kombination aus physikalischen und chemischen Einflussgrößen wird durch SUN und CHENG (2002) beschrieben. Unter dieser Kategorie werden von den Autoren SE, Ammonia fiber explosion (AFEX) und die CO<sub>2</sub>-Explosion subsumiert. Im Folgenden soll auf Aufschlüsse mittels Dampfdruck näher eingegangen werden.

SCHÜTT et al. (2012) vergleichen und unterscheiden die Dampfbehandlung mittels Steam explosion (SE) und Steam refining (SR). Daher sollen diese beiden Verfahren im Folgenden betrachtet und verglichen werden. Die auftretenden Reaktionen während der beiden Verfahren sind allerdings nahezu identisch. Die Technik des SR wurde bereits in früheren Arbeiten bei Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von Holz (PULS et al., 1985) und zur Herstellung von Chemiezellstoffen (KLUPSCH, 2000; KLUPSCH et al., 2001) verwendet. Grundlegend wird die Biomasse batchweise im Labormaßstab mit Satttdampf bei unterschiedlichen Schärfegraden und anschließender mechanischer Refinerstufe vorbehandelt. Nach der Vorbehandlung wird der Druck abgelassen, der Dampf inklusive seiner Bestandteile kondensiert (SCHÜTT et al., 2013), und die flüssige Extraktfraktion wird von der festen Faserfraktion getrennt.

Der Dampfdruckaufschluss in Form des SE-Prozesses ist eine früh beschriebene und intensiv beforschte Technik zur Herstellung von Fasern oder fermentierbaren Kohlenhydraten aus LCB. Die ersten Beschreibungen sind Arbeiten von MASON (1927) und ein darauffolgendes Patent (MASON, 1928) zur Herstellung von Fasern für die Plattenproduktion (VIGNON et al., 1995). BABCOCK (1932) beschrieb anschließend erstmals die Verwendung von SE zur Herstellung von fermentierbaren Kohlenhydraten und Alkohol aus Holz. Heute stellt die Vorbehandlung mittels SE und die Dampfbehandlung in Verbindung mit oder ohne saure Katalysatoren die meistuntersuchte Vorbehandlungsmethode dar. Am häufigsten werden dabei  $H_2SO_4$  und  $SO_2$  als Katalysatoren eingesetzt. Wesentliche Vorteile der Verfahren sind die hohe Effektivität bei niedrigen Kosten (GARROTE et al., 1999; GALBE und ZACCHI, 2002).

SCHÜTT et al. (2012) verglichen die Einflussgröße der Explosion auf Pappelholz, indem SE und SR unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Rohstoffen verglichen wurden. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass, neben dem Schärfegrad als relevanteste Einflussgröße, die Partikelgröße der Biomasse ebenso einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der enzymatischen Hydrolyse habe. Der Einfluss der schlagartigen Druckentlastung wird durch die Autoren zurückgestellt. Frühere Arbeiten zu Holz durch BROWNELL et al. (1986) zeigten, dass die Explosion auf das Ergebnis der enzymatischen Hydrolyse von bei 240 °C und 3 min vorbehandeltem Pappelholz nicht signifikant und eine Explosion daher nicht notwendig sei. Aufgrund dieser Ergebnisse kann im Anlagenbau auf den Prozessschritt der Explosion verzichtet und dafür eine mechanische Zerfaserung im Reaktor implementiert werden.

Verschiedene technische Umsetzungen im Demonstrations- und Pilotmaßstab sind in der Literatur beschrieben. Aufgrund der teilweise umfangreichen technischen Beschreibungen und Besonderheiten soll an dieser Stelle auf die Beschreibungen in der Literatur verwiesen werden (BENDER, 1979; HEITZ et al., 1991; MARCHESSAULT,

1991; TOLAN, 2002; SIGOILLOT und FAULDS, 2016; ZHAI et al., 2018; THORESEN et al., 2022; VALMET OYJ, 2018, 2021).

In Dampfdruck-Prozessen wird zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse regelmäßig der sogenannte Schärfegrad verwendet. Vorarbeiten zur Prozesskontrolle in der Zellstoff- und Papierindustrie führten als Faktoren basierend auf Zeit und Temperatur beispielsweise den H-Faktor nach VROOM (1957) oder den P-Faktor nach BRASCH und FREE (1965) ein. Diese Vorarbeiten werden von CHORNET und OVEREND (2017) insbesondere im Zusammenhang mit ihrem darauffolgend eingeführten Schärfegrad (*Severity factor*) beschrieben (OVEREND et al., 1987). Ebenso widmen sich aktuelle Quellen explizit den kinetischen Modellen in Bezug auf den Schärfegrad und die Biomassefraktionierung unter hydrothermalen Bedingungen (RUIZ et al., 2021). Der Schärfegrad wird im Allgemeinen für Dampfdruckverfahren verwendet, um verschiedene Kombinationen aus Temperatur und Verweilzeit im Reaktor vergleichbar zu machen. Diese Berechnung des Schärfegrades erfolgt über die Gleichung 1 ( $t$  (min);  $T$  (°C)).

$$R_0 = t \times e^{\frac{(T-100)}{14,75}} \quad (1)$$

KIM et al. (2014) geben an, dass die auf OVEREND et al. (1987) basierende Gleichung 1 die überproportionale Hydrolyse der Cellulose bei Untersuchungen über 200 °C nicht mit einbeziehe.

CHEN und LIU (2015) definieren den Schärfegrad  $R_0$  basierend auf BROWNELL et al. (1986) und OVEREND et al. (1987) grundlegender mittels Gleichung 2. Dabei werden neben den bekannten Kennzahlen ( $t$  (min);  $T_H$  = Vorbehandlungstemperatur (°C);  $T_R$  = Basistemperatur (100 °C)) im Nenner auch die Konstante  $\omega$  gezeigt, die in den meisten Studien mit dem Wert 14,75 angegeben werde.

$$R_0 = t \times e^{\frac{(T_H-T_R)}{\omega}} \quad (2)$$

KIM et al. (2014) beschreiben ebenfalls eine alternative Darstellungsform der Schärfegradformel und zeigen dazu ebenso die Herleitung der Konstante  $\omega$  (Gleichung 3,  $T_f$  als mittlere Temperatur der Experimentierbedingungen in °C;  $R$  als universeller Gaskonstante und  $E_a$  als scheinbarer Aktivierungsenergie).

$$\omega = \frac{T_f^2 R}{E_a} \quad (3)$$

Aufgrund der ersten Beschreibung des Schärfegrades für wässrige Systeme ohne Zusatz von Säuren wird eine Kinetik erster Ordnung, sowie eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Temperatur um 10 °C angenommen (CHEN et al., 2007). Zur besseren Darstellbarkeit der Zahlenwerte des Schärfegrades wird im Regelfall der  $\log(R_0)$  berechnet (GARROTE et al., 1999).

Verschiedene Autoren schlagen alternativ zur verbreiteten Nutzung der empirisch bestimmten Konstante  $\omega = 14,75$  andere Werte für diese Konstante für spezielle Betrachtungen vor. So geben CHUM et al. (1990) ein  $\omega = 11 \pm 1$  für die lösungsmittelbasierte Entfernung von Xylan und Glucan aus Pappelholz, sowie ein  $\omega = 10 \pm 1$  für die Entfernung von Lignin an. KIM et al. (2014) geben weitere Konstanten für die Löslichkeit von Xylan ( $\omega = 12,1$ ) und der Glucose-Ausbeute nach enzymatischer Hydrolyse ( $\omega = 4,6$ ) an.

Da der dargestellte Schärfegrad nur Zeit/Temperaturkombinationen erfasst, haben verschiedene Autoren Abwandlungen und Konkretisierungen des Schärfegrades vorgenommen um noch weitere Parameter, beispielsweise beim Einsatz von zusätzlichen Chemikalien, zu berücksichtigen. Eine vielzitierte Abwandlung von CHUM et al. (1990) und ABATZOGLOU et al. (1992) bezieht für den kombinierten Schärfegrad den pH-Wert der Vorbehandlung über die Gleichung 4 (Zeit in Minuten (t); Temperatur in °C (T) mit ein.

$$R'_0 = [10^{-pH}] \times \left( t \times e^{\frac{(T-100)}{14,75}} \right) \quad (4)$$

Diese Gleichung sei vor allem für Experimente bei niedrigen pH-Werten geeignet, da die Originalexperimente auf sauren Behandlungen von Pappel basieren (PEDERSEN und MEYER, 2010). Aufgrund dieser Beobachtungen schlagen PEDERSEN und MEYER (2010) die Gleichung 5 vor.

$$\log(R''_0) = \log(R_0) + |pH - 7| \quad (5)$$

Diese kann demnach eine gute Vergleichbarkeit verschiedener pH-Werte ermöglichen. Für einen grundlegenden Überblick sei an dieser Stelle auf PEDERSEN und MEYER (2010) verwiesen.

### 2.5.2 Reaktionen im Dampfdruckaufschluss

Als physiko-chemische Vorbehandlung widerfährt die LCB im Prozess verschiedene Veränderungen. DEKKER und WALLIS (1983) und CHEN und LIU (2015) beschreiben in Bezug auf Reaktionen im DD-Aufschluss die sogenannte Autohydrolyse während der SE mit der Bildung von Essigsäure aus den thermisch instabilen Acetylgruppen der Hemicellulosen, welche anschließend die weitere Hydrolyse selbst katalysiert. Die Autohydrolyse ist eine bekannte Reaktion des Dampfdruckaufschlusses und anderer hydrothormaler Verfahren (GARROTE et al., 1999). Grundlage bildet die Autoionisation des Wassers im Bereich zwischen 150 °C und 230 °C. Die dabei gebildeten Hydroniumionen hydrolysieren die glykosidischen Bindungen der Hemicellulosen, was zur Bildung von Oligosacchariden und Essigsäure führt. Im Folgenden trägt auch die Autoionisation der gebildeten Essigsäure zur Bildung von Hydroniumionen bei, welche

die Polysaccharide weiter degradieren. Die Autoionisation des Wassers ist hierbei nur als initialer Schritt beschrieben, während die Autoionisation im Zusammenhang mit der Bildung von Essigsäure in der Literatur stärker hervorgehoben wird. Ähnliche Effekte werden auch für die Uronsäuren dargestellt (GARROTE et al., 1999).

CHEN und LIU (2015) geben für SE-Verfahren Temperaturen von 160–260 °C, das Vorkommen von Autohydrolyse-Reaktionen und eine anschließende Explosion an. Wie bereits dargestellt, ist SE die meistuntersuchte Vorbehandlungsmethode für Biomasse (GALBE und ZACCHI, 2002). Sie wurde bereits für viele Einjahrespflanzen bzw. agrarische Reststoffe, wie Maisstroh, Reisstroh, Sonnenblumenstängel, Zuckerrohrstroh und Ruthenhirse, aber auch für Pappelholz genutzt (CHEN und LIU, 2015). Für Eukalyptus- und Fichten-Hackschnitzel (RAMOS et al., 1992), sowie für Fichtenrinde (KEMPPAINEN et al., 2012) wurden ebenfalls Versuche dazu gezeigt. JANZON et al. (2014) und SCHÜTT et al. (2012) nutzten im SR-Verfahren nicht entrindete Fichten- und Pappelhackschnitzel mit teilweise 17 % Rindenanteil.

MARCHESSAULT (1991) beschreibt weitere Prozesse die während der Dampfdruckbehandlung auftreten. Neben der Spaltung glykosidischer Bindungen wird auch die Spaltung von  $\beta$ -Ethern in der Ligninstruktur, die Spaltung von Bindungen der LCC und weitere chemische Veränderungen an Lignin und Kohlenhydraten beschrieben. Zusammenfassend beschreiben GARROTE et al. (1999) große Einflüsse des Prozesses auf die Hemicellulose, bis hin zu einer nahezu vollständigen Entfernung der Hemicellulosen aus dem Faserstoff. In Bezug auf die Löslichkeit und Degradation der Cellulose legen die Autoren unter Bezug auf Daten von LAMPTEY et al. (1985) 29 % gelöste resp. degradierte Cellulose für Maisstroh dar, das bei 190 °C für 30 min aufgeschlossen wurde. Grundlegend sei die Cellulose aber bedingt durch ihre Struktur (linear, kristallin, hoher Polymerisationsgrad) resistenter gegen hydrolytische Reaktionen im Prozess (GARROTE et al., 1999).

DONALDSON et al. (1988) beschreiben zusätzlich eine Erhöhung der Porosität bei mit SE behandeltem Holz. Dies führt zu einer erhöhten Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse. GRETHLEIN (1985) gibt für *Trichoderma reesei* eine Cellulasen-Größe von 51 Å an, ohne genauer auf die Zusammensetzung aus Endo- oder Exocglucanasen bzw.  $\beta$ -Glucosidasen (vgl. Kapitel 2.6.) einzugehen. Andere Autoren beschreiben ebenfalls für Cellulase aus *T. reesei* einen Durchmesser von 51–90 Å (BURNS et al., 1989). MICHALOWICZ et al. (1991) greifen diese Beobachtung auf und legen durch Versuche mit Modellmolekülen dar, dass in unbehandeltem Pappelholz nur 30 % der Poren für Moleküle mit 51 Å zugänglich seien. Nach einer SE-Behandlung bei 217 °C für 180 Sekunden zeigt sich der Effekt der Dampfdruckbehandlung in einer Zunahme auf 50 % und nach einer Behandlung bei 248 °C auf bis zu 70 %. Grundsätzlich beschreiben

die Autoren schon bei niedrigeren Schärfegraden einen Anstieg der zugänglichen Poren. Dies wird mit der Entfernung der Hemicellulosen aus den Poren erklärt, was zu einer Aufweitung der Poren führe. Erst bei schärferen Prozessbedingungen würden auch die Porenvolumina der kleinen Poren (8 Å) zunehmen, was dann auf die Hydrolyse der Cellulose bei schärferen Prozessbedingungen zurückgeführt wird (MICHALOWICZ et al., 1991).

Weiterhin beschrieben DONALDSON et al. (1988) eine Veränderung der Ligninverteilung in den Zellwandschichten, verbunden mit der Ausbildung von Lignin-Agglomeraten. Diese Agglomerate verschließen nicht die entstandenen Poren. Die beschriebenen Lignin-Agglomerate werden hierbei auch von verschiedenen anderen Autoren nachgewiesen und beschrieben (EXCOFFIER et al., 1991; SELIG et al., 2007; KRISTENSEN et al., 2008; CHANG et al., 2012).

Eine der vielfach zitierten Abbildungen stammt von EXCOFFIER et al. (1991) und ist in Abbildung 7 dargestellt. Ersichtlich sind die sphärischen Lignin-Agglomerate im Faserlumen, sowie in der S2 der Zellwand.

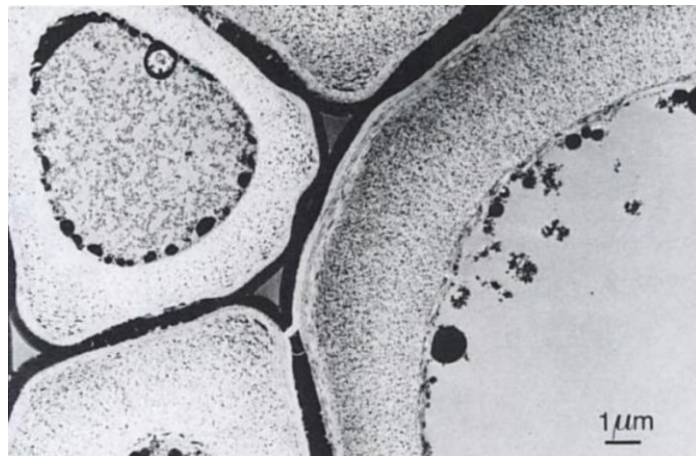


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme (EM) von Pappelholz nach SE bei 224 °C und 180 Sekunden (EXCOFFIER et al., 1991), Abdruckgenehmigung erteilt.

SELIG et al. (2007) zeigen die Verteilung von zwei verschiedenen Typen von Ligninagglomeraten an Maisstroh, welches für 20 min bei 150 °C mit 2 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vorbehandelt wurde (Abb. 8). Zum einen finden sich Lignin-Formationen, die sich auf der Zellwand ablagern und eine raue Oberfläche schaffen (Abb. 8A). Zum anderen treten nahezu perfekt geformte, sphärische Kugeln (Abb. 8B) auf, welche nach SELIG et al. (2007) den Anschein haben, als seien sie wieder an der Oberfläche der Zellwand

angelagert worden. In Abbildung 8C wird zusätzlich die Oberfläche von unbehandeltem Maisstroh ohne die Effekte des Dampfdruckaufschlusses als Vergleich aufgeführt.

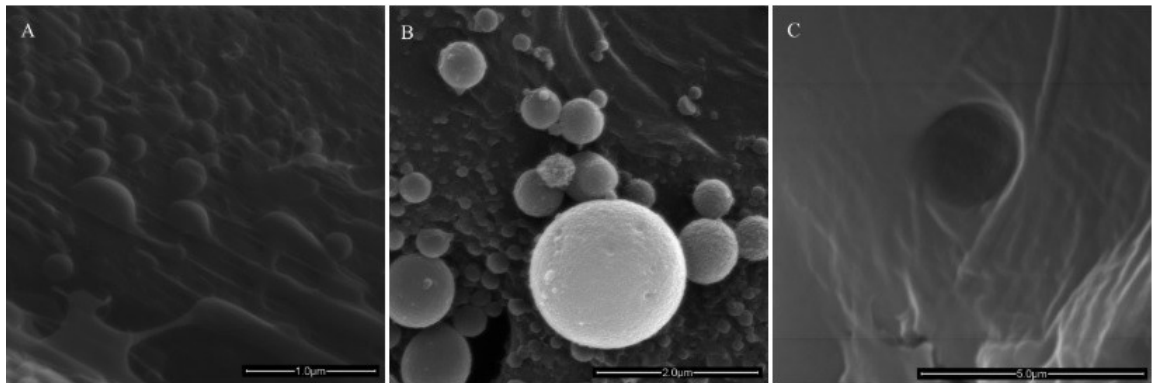


Abbildung 8: SEM-Aufnahmen von zwei verschiedenen Lignin-Agglomerat-Typen (A, B) in vorbehandeltem Maisstroh und zum Vergleich unbehandeltes Maisstroh (C) (SELIG et al., 2007), Abdruckgenehmigung erteilt.

CHANG et al. (2012) berichten ebenfalls über die Bildung von Ligninagglomeraten bei SE-Behandlungen von Maisstroh und auch KRISTENSEN et al. (2008) berichten über die Bildung von zwei verschiedene Agglomerattypen in Weizenstroh (Abb. 9), welches mittels SE vorbehandelt wurde.

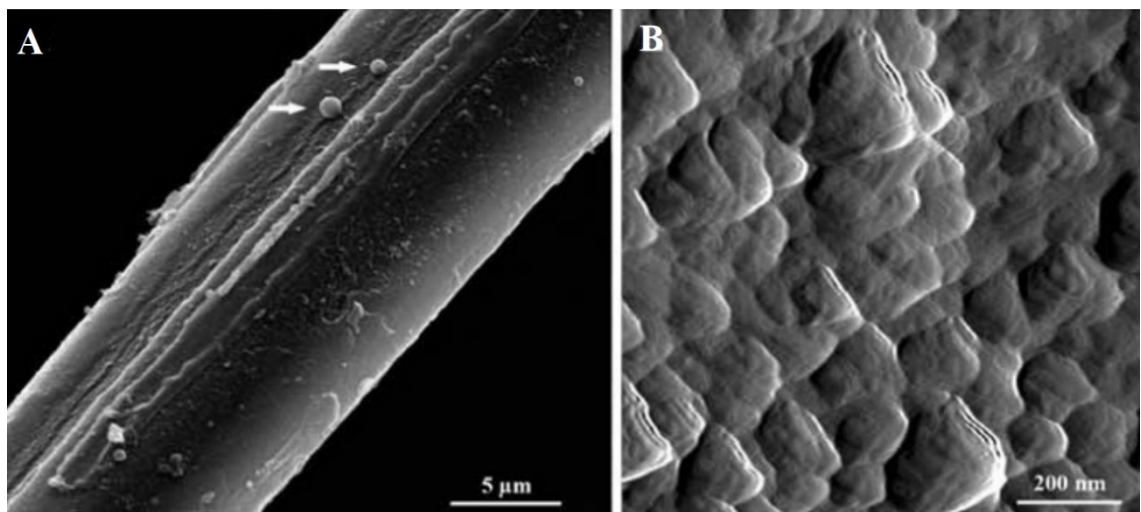


Abbildung 9: SEM-Aufnahmen von Weizenstroh mit sichtbaren Lignin-Agglomeraten (A), sowie AFM-Aufnahmen der Oberfläche mit sichtbarerer rauer Struktur (B) nach SE (KRISTENSEN et al., 2008). Abdruckgenehmigung nach CC BY 2.0.

TAKADA et al. (2019) beschreiben im Vergleich von Douglasie und Maisstroh nach SE und anschließender EH, dass das Lignin des Maisstrohs durch seine geringere Molmasse und im Vergleich hydrophileren Eigenschaft leichter zu verflüssigen und umzulagern war. Nichtsdestoweniger verhindert das delokalisierte Lignin eine effiziente EH (TAKADA et al., 2019).

Hervorzuheben ist die Ansammlung von Lignin in der Faserfraktion nach einer Dampfbehandlung. Dies wird durch verschiedene Autoren auf die Löslichkeit und Degradation der Hemicellulosen, aber auch mit der Bildung von sog. Pseudo-Lignin erklärt (VIVEKANAND et al., 2013; AARUM et al., 2018). HU et al. (2012) definieren Pseudo-Lignin als „aromatische Verbindung, welches den Klason-Lignin-Gehalt erhöht, aber nicht aus nativem Lignin besteht“. Ursache für die Bildung sind Abbauprodukte der Kohlenhydrate, vornehmlich Furfural aber auch 5-HMF und andere Aromaten, welche zu säureunlöslichem Pseudo-Lignin aggregieren (SANNIGRAHI et al., 2011; HU und RAGAUSKAS, 2012).

PALMQVIST und HAHN-HÄGERDAL (2000) beschreiben die in Abbildung 10 dargestellten Reaktionen der Kohlenhydrate während einer Vorbehandlung (222 °C, 7 min, 2 % w/w H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Hierbei bilden sich aus den Hemicellulosen und der Cellulose hydrolytisch die monomeren Kohlenhydrate der Kohlenhydratkette. Weiterhin reagieren die Pentosen (vornehmlich Xylose) unter scharfen Vorbehandlungsbedingungen zu Furfural (DUNLOP, 1948). Die Hexosen reagieren zu 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) (KATŌ und KOMORITA, 1968; ULBRICHT et al., 1984). DUNLOP (1948) beschreibt ebenfalls Experimente zur Zersetzung von Furfural zu Ameisensäure. Die Zersetzung von 5-HMF zu Lävulinsäure wird durch ULBRICHT et al. (1984) dargestellt. Gerade 5-HMF und Furfural und deren Degradationsprodukte haben zu einem großen Teil inhibitorische Wirkungen auf EH und fakultative Fermentation. Aus diesem Grund werden von einigen Autoren Wege zur Aufreinigung (*Detoxification*) der vorbehandelten Biomasse dargestellt (JÖNSSON et al., 2013; JÖNSSON und MARTÍN, 2016). Auf die einzelnen Inhibitoren und ihre Wirkung soll in Abschnitt 2.6.1 tiefer eingegangen und im Ergebnisteils in Bezug auf den vorliegenden Prozess dargestellt werden (vgl. Abschnitt 4.6.).



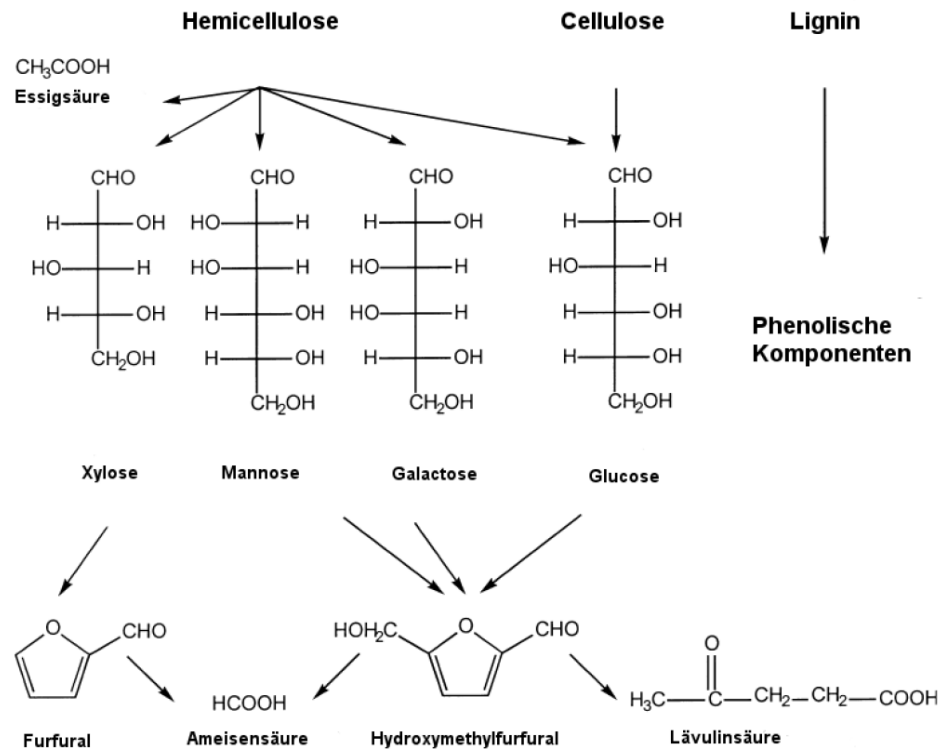


Abbildung 10: Umwandlung der C5- und C6-Kohlenhydrate zu 5-HMF, Furfural und organischer Säuren (modifiziert durch SCHÜTT (2012) nach PALMQVIST und HAHN-HÄGERDAL (2000)), Abdruckgenehmigung erteilt.

Weiter werden die Abbau-Reaktionen des Lignins zu phenolischen Komponenten durch PALMQVIST und HAHN-HÄGERDAL (2000) zusammengefasst. So finden sich verschiedenste Zersetzungsprodukte des Lignins in den Extrakten nach der Vorbehandlung der Biomasse, wie Vanillinsäure und Vanillin aus den Guajacylpropaneinheiten des Lignins. Weiterhin entsteht aus der Zersetzung der Syringylpropaneinheiten Syringaldehyd und Syringasäure. Weitere Produkte der Lignindegradation sind beispielsweise alkoholische Hydroxylgruppen oder Verbindungen wie Hydrochinon, Brenzcatechin oder 4-Hydroxybenzoesäure (PALMQVIST und HAHN-HÄGERDAL, 2000). Auch diese Produkte können teilweise die EH inhibieren, worauf im Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen werden soll (vgl. Abschnitte 2.6.1 und 4.6.).

## 2.6 Enzymatische Hydrolyse

Der enzymatische Abbau von Polysacchariden wird als einer der Engpässe von (Lignocellulose)-Bioraffinerien beschrieben (IGARASHI et al., 2011; BRADY et al., 2015). Im Vergleich zu Säuren bieten Enzyme eine Vielzahl von Vorteilen bei der Hydrolyse, wie hohe Ausbeuten, das Fehlen von Nebenprodukten, sowie die Nutzung einer „grünen Technologie“. Quellen für nutzbare Cellulase-Systeme können zum einen Braun-, Weiß-, Schimmel und Moderfäulepilze, aber auch anaerobe Bakterien sein (HIMMEL et al., 1996; FANG et al., 2010). Herausfordernd ist allerdings die Rückgewinnung der an das Substrat gebundenen Enzyme, was einen Umfang von 30–90 % der eingesetzten Enzyme annehmen kann (LEE et al., 1995). RODRIGUES et al. (2015) beschreiben in diesem Zusammenhang für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Enzyme Celluclast<sup>®</sup> und Cellic<sup>®</sup> CTec 2 ein unterschiedliches Verhalten. Während Celluclast<sup>®</sup> bis 50 °C eine suffiziente Rückgewinnung ermöglichen, zeigt Cellic<sup>®</sup> CTec 2 eine erheblich höhere Enzym-Substrat-Bindung. Dies macht Cellic<sup>®</sup> CTec 2 in Bezug auf eine notwendige Rückgewinnung zu einem herausfordernderen Enzympräparat.

HIMMEL et al. (1996) beschreiben drei verschiedene Gruppen von Enzymen und ihre jeweilige Funktion. Diese sollen im Folgenden kurz dargestellt werden:

1. endo-(1–4)- $\beta$ -Glucanasen
2. exo-(1–4)- $\beta$ -Glucanasen und
3.  $\beta$ -D-Glucosidasen

Die Endoglucanasen (EG) können die Cellulose-Ketten in den amorphen Bereichen spalten und somit neue Kettenenden zum weiteren enzymatischen Abbau produzieren. Es existieren zusätzliche Untergruppen (EG I, II, III, V). Die Endoglucanasen aus *T. reesei*, Cel7B (TrCel7B), findet vielfach Verwendung. Die in Abbildung 11 dargestellte Endoglucanase aus dem Bakterium *Thermobifida fusca* zeigt hierbei die für Endoglucanasen charakteristische „Rinne“. Aufgrund dieser Rinne ist eine Spaltung der Cellulosekette innerhalb der amorphen Bereiche der Kette möglich. (PAYNE et al., 2015).

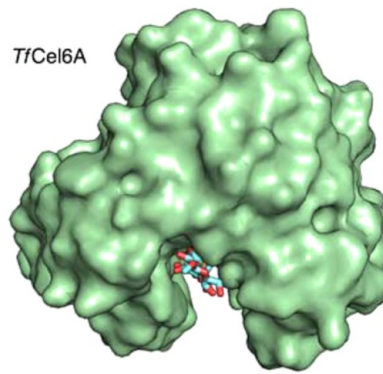


Abbildung 11: Darstellung der Endoglucanase TfCel6A mit sichtbarer "Rinne" (PAYNE et al., 2015). Abdruckgenehmigung nach ACS AuthorChoice.

Die Exoglucanasen oder Cellobiohydrolasen (CBH) lassen sich je nach ihrer Arbeitsweise vom reduzierenden (CBH I) oder nicht reduzierenden Ende (CBH II) unterscheiden (PAYNE et al., 2015). Das aktive Zentrum der CBH liegt jeweils in einem „Tunnel“ (Abb. 12), so dass der Abbau der Cellulosekette nur von den Kettenenden, und nicht innerhalb der Kette (vgl. EG) erfolgen kann. Die CBHs spalten vom reduzierenden, oder nicht reduzierenden Ende Disaccharide (Cellobiose) ab, die anschließend durch  $\beta$ -D-Glucosidasen zu Glucose aufgespalten wird. Einige CBHs sollen allerdings auch in der Lage sein Spaltungen innerhalb der Kette (endo-Spaltungen) durchzuführen (PAYNE et al., 2015; CÜRTEEN und SPIEB, 2018).

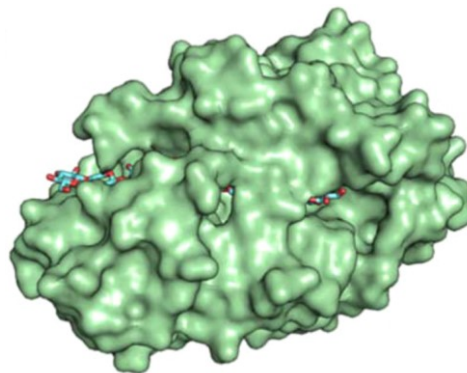


Abbildung 12: Cellobiohydrolase I (TrCel7A) mit sichtbarem "Tunnel" (PAYNE et al., 2015). Abdruckgenehmigung nach ACS AuthorChoice.

Die dritte Gruppe von Enzymen sind die  $\beta$ -D-Glucosidasen bzw. Cellobiasen (Abb. 13). Diese Enzyme spalten Cellobiose, aber auch Oligosaccharide bis DP 6 (JAEGER et al., 2006), zu Glucose.

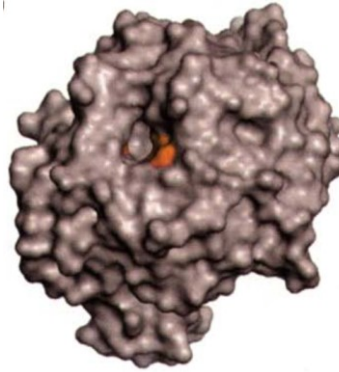


Abbildung 13: Darstellung einer  $\beta$ -D-Glucosidase (Glucoamylase von *A. awamori*) mit dem aktiven Zentrum in einer Tasche (DAVIES und HENRISSAT, 1995), Abdruckgenehmigung erteilt.

Das aktive Zentrum der  $\beta$ -D-Glucosidasen liegt in einer Tasche und die Spaltung erfolgt ebenfalls vom Kettenende. TEUGJAS und VÄLJAMÄE (2013), sowie GALBE und ZACCHI (2002) berichten über die starke inhibitorische Wirkung der Cellobiose auf die Cellulasen. Durch den Abbau der Cellobiose wirken die Cellobiasen dieser inhibitorischen Wirkung entgegen.

Die beschriebene Wirkungsweise der o. g. Enzymtypen mit Kennzeichnung der reduzierenden (R) und nicht reduzierenden (NR) Enden kann zusammenfassend in einer schematischen Darstellung veranschaulicht werden (Abb. 14).

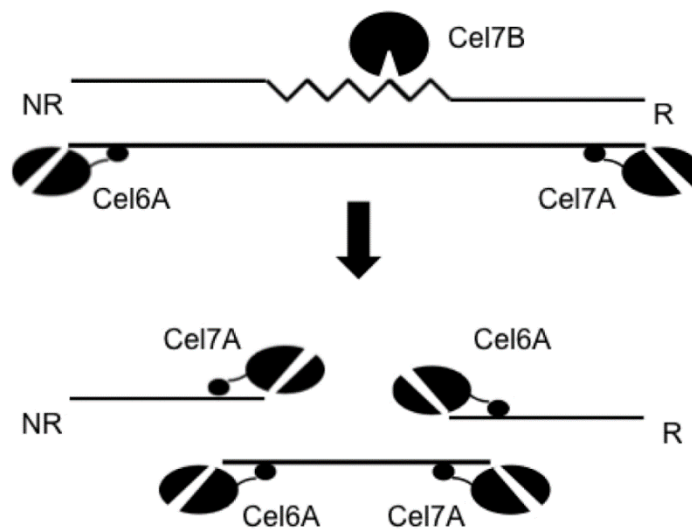


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Endo- und Exoglucanasen (PAYNE et al., 2015). Abdruckgenehmigung nach ACS AuthorChoice.

### **2.6.1 Limitierende Faktoren der EH**

Die Herstellung von Fermentationszuckern aus vorbehandelter Biomasse mittels enzymatischer Hydrolyse hängt insbesondere von den bereits beschriebenen Eigenschaften des Substrates ab (HENDRIKS und ZEEMAN, 2009).

HENDRIKS und ZEEMAN (2009) geben zusammenfassend Faktoren an, die die Hydrolyse von Lignocellulosen beeinflussen können. Dazu gehören neben der Kristallinität der Cellulose ebenfalls der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP), die Feuchtigkeit, die zugängliche Oberfläche und der Ligningehalt. Zum Einfluss der Kristallinität auf die EH entwickelten verschiedene Autoren Theorien. CHANG und HOLTZAPPLE (2000) legen beispielsweise einen negativen Einfluss hoher Kristallinität dar, beschreiben aber, dass auch bei hoher Kristallinität ein (verzögerter) enzymatischer Abbau stattfinden kann. CAULFIELD und MOORE (1974) legen weiterhin dar, dass eine kleinere Partikelgröße und eine größere verfügbare Oberfläche einen größeren Einfluss auf die EH habe, als die Kristallinität.

Weiterhin stellen HENDRIKS und ZEEMAN (2009) dar, dass die Porengröße ebenfalls einen relevanten Einfluss auf die EH hat. Die Entfernung der Hemicellulosen erhöhe die durchschnittliche Porengröße und führe dadurch zu einer verbesserten Zugänglichkeit für die Enzyme. Die Trocknung des Substrates kann zu einem Kollaps der Poren führen, was zu einer Verminderung der Porengröße und damit zu einer schlechteren enzymatischen Hydrolyse führt (GROUS et al., 1986). ZHANG und LYND (2004) beschreiben weiterhin, dass Cellulasen in den Poren „gefangen“ werden können, wenn die interne Oberfläche größer sei als die externe, was zu schlechteren Hydrolyseausbeuten führe. Dies sei den Autoren zufolge bei vielen LCB der Fall.

JÖNSSON und MARTÍN (2016) beschreiben weitere inhibierende Effekte auf eine EH. So kämen ebenfalls unproduktive Bindungen zwischen den Enzymen und verbliebenen Hemicellulosen vor (PAREEK et al., 2013). Ebenfalls wirkten Hemicellulose wie eine blockierende Schicht auf den Fasern und verschlechterten die Zugänglichkeit für Enzyme (BERLIN et al., 2007).

TEUGJAS und VÄLJAMÄE (2013) gehen auf die inhibitorische Wirkung von Glucose und Cellobiose bezüglich der Aktivität von Cellulasen ein. Ebenfalls habe das Vorkommen von Xylooligomeren (QING et al., 2010) und von Mannan-Polysacchariden (KUMAR und WYMAN, 2014) einen negativen Einfluss auf die Hydrolyserate der Cellulasen.

Die Bedeutung von löslichen aromatischen Verbindungen wird durch XIMENES et al. (2011) dargestellt. So wurde der Effekt von Tanninsäure, Gallussäure, Zimtsäure, Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, Sinapinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillin und

Syringaldehyd auf die Aktivität verschiedener Cellulasen und  $\beta$ -Glucosidasen untersucht. Den größten Effekt zeigten hierbei die polymere Tanninsäuren.

### **2.6.2 Optimierung der EH durch Ligninextraktion**

CHANG und HOLTZAPPLE (2000) geben zu dem Einfluss des Lignins an, dass dieses die EH behindere. Grundlegend werden Phenole und Lignin als Inhibitoren für die EH dargestellt (OLIVA-TARAVILLA et al. (2016)). PAREEK et al. (2013) beschreiben dazu ebenfalls den Effekt von unproduktiven Bindungen zwischen den Enzymen und dem Lignin der vorbehandelten Biomasse.

Ergebnisse von SCHÜTT et al. (2011) in Bezug auf eine Ligninextraktion mit nachfolgender EH geben ein für den in dieser Arbeit vorliegenden Prozess detaillierteres Bild. Demnach ergibt sich für dampfdruckbehandelte Pappel bis zu einem Schärfegrad von 4,0 eine verbesserte EH nach einer Ligninextraktion. Ab einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 4,0$  kehrt sich dieser Effekt um und es werden geringere Hydrolyseraten erzielt. ISHIZAWA et al. (2009) zeigen zum Effekt des Lignins und der Delignifizierung, dass eine partielle Entfernung des Lignins zu einer Verbesserung der enzymatischen Hydrolyse führe. Eine nahezu komplette Delignifizierung und Entfernung des Lignins (< 5 %) und des Xylans hingegen führe zu einer Verringerung der Ausbeuten. Dies wird mit einer Aggregation der Cellulose-Mikrofibrillen erklärt, die eintritt, wenn Lignin und Xylan nicht mehr zwischen den Mikrofibrillen vorhanden sind. Der komplette Abbau des Lignins sei nach CHEN et al. (2010) ebenfalls nicht notwendig und eine Reduktion um 15–25 % reiche oftmals aus. Dabei führen die Autoren ebenfalls eine Vermutung aus, dass das verzweigte Lignin der primären Zellwand einen größeren inhibitorischen Effekt habe, als das lineare Lignin der Sekundärwand.

## **2.7 Nebenprodukte und deren Verwendung**

Im Folgenden soll auf die Bildung von Nebenprodukten der in dieser Arbeit gewählten Prozessschritte eingegangen werden. Dies betrifft zum einen Lignin als Produkt einer möglichen Ligninextraktion, Furane aus der Degradation der Kohlenhydrate und weitere in der Literatur beschriebene Verbindungen. Weiterhin soll ein kurzer Überblick über mögliche Verwendungen gegeben werden, die einen positiven Einfluss auf die ökonomische Prozessbetrachtung haben könnten.

### **2.7.1 Lignin**

Die Verwendung des Lignins stellt einen wichtigen Baustein zur Wirtschaftlichkeit einer Bioraffinerie dar (SANNIGRAHI und RAGAUSKAS, 2011). ANDERSON et al. (2016) gehen davon aus, dass ein Großteil des Lignins zur Produktion von Energie und Dampf thermisch verwertet wird. Dies führe zu einer vergleichsweise geringen Wertschöpfung. RAGAUSKAS et al. (2014) führen dagegen Verwendungen auf, die für Bioraffinerie-Lignine Verwertungen mit höheren Wertschöpfungen ermöglichen könnten. Angegeben wird beispielsweise die Herstellung von Carbonfasern zur Produktion von effizienten Leichtfahrzeugen. Weiterhin sei die Produktion von pflanzenbasierten Kunststoffen und Kompositen möglich. Für Ligninfraktionen, die nicht zur Herstellung von technischen Materialien geeignet seien, sei die Weiterverwertung zu Kraftstoffen und Chemikalien über eine katalytische, thermische bzw. pyrolytische Fragmentierung des Lignins möglich. So wird beispielsweise die Herstellung von 1,4-Butandiol, Adipinsäure oder Vanillin beschrieben. Für SE-Lignine geben SHEVCHENKO et al. (1999) an, dass Kondensationsreaktionen einer Verwendungen als niedermolekulare Chemikalien im Wege stehen und chemische Modifikationen des Lignins, wie beispielsweise Oxoammonisierung oder Sulphonierung, für hochwertige Weiterverarbeitungen nötig und möglich seien. LI et al. (2009) geben an, dass zur Verbesserung der stofflichen Ligninnutzung eine homogene, niedermolekulare Ligninfraktion wünschenswert sei. Bisher würden allerdings heterogene, in ihrer Reinheit sehr unterschiedliche Ligninfraktionen nach SE generiert.

### **2.7.2 5-Hydroxymethylfurfural**

Die Nutzung des aus den Hexosen anfallenden 5-Hydroxymethylfurfurals (5-HMF) wird in der Literatur vielfach beschrieben. CHINNAPPAN et al. (2016) stellen dazu fest, dass 5-HMF als Plattformchemikalie eine besondere Rolle spiele, da es nachfolgend zu hochwertigen Polymeren, wie Polyurethan oder Polyamiden, weiterverarbeitet werden kann. Weiterhin sei die Weiterverarbeitung zu Biokraftstoffen oder die Umwandlung zu Dimethylfuran, Lävulinsäure, 2,5-Furandicarbonsäure, 2,5-Diformylfuran oder Dihydroxymethylfuran möglich.

Eine Zusammenfassung der möglichen kommerziellen Chemikalien, die aus 5-HMF erzeugt werden können, ist in Abbildung 15 dargestellt.

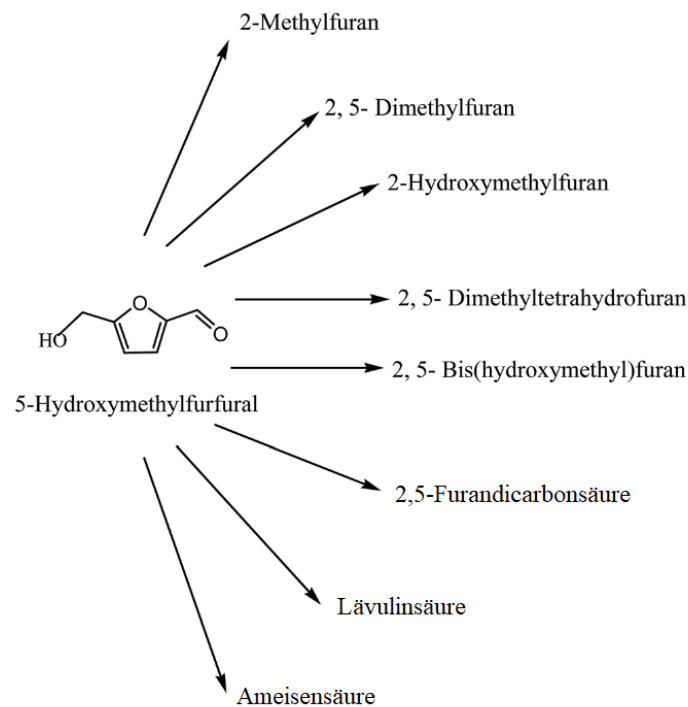


Abbildung 15: 5-HMF als Plattformchemikalie für eine Vielzahl von Folgeprodukten (CHINNAPPAN et al., 2016), Abdruckgenehmigung erteilt.

Das Vorkommen von 5-HMF und seinen Degradationsprodukten ist dabei umfangreich für Dampfdruckaufschlüsse beschrieben (CANTARELLA et al., 2004b; JACQUET et al., 2011; SCHÜTT et al., 2012).

### 2.7.3 Furfural

MAMMAN et al. (2008) geben an, dass aktuell kein synthetischer Weg zur Produktion von Furfural vorliege. Eine Herstellung sei demnach nur über die Dehydrierung von Pentosen aus Lignocellulosen möglich. Die theoretisch möglichen Ausbeuten an Furfural für verschiedene Rohstoffe sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Theoretische Ausbeuten an Furfural aus unterschiedlichen Rohstoffen (MAMMAN et al., 2008).

Rohstoff	Furfural (kg/t atro)
Maiskolben	220
Bagasse	170
Maisstängel	160
Sonnenblumenspelzen	160
Laubholz	150–170



MACHADO et al. (2016) führen als weitere Produkte mit hoher Wertschöpfung, die aus Furfural hergestellt werden können, Düngemittel, Kunststoffe, Tinten, Fungizide, Nematizide, Klebstoffe und Aromastoffe und Antazida, auf.

YAN et al. (2014) beschreiben zusammenfassend die katalytische Hydrierung von Furfural zu Furfurylalkohol, Tetrahydrofurfurylalkohol, 2-Methylfuran, 2-Methyltetrahydrofuran, Furan, Tetrahydrofuran und weiteren hochwertigen Chemikalien wie 1-Butanol, 1,5-Pentandiol, Cyclopentanol, Cyclopentanon, Dihydropyran und Butan

Das Marktvolumen an biobasiertem Furfural liege nach MAMMAN et al. (2008) bei 200–210 Tausend Tonnen pro Jahr, wovon 60–62 % für die Produktion von Furfurylalkohol verwendet werden. Furfural wird aufgrund seiner thermischen, physikalischen und korrosionsschützenden Eigenschaften zudem für die Produktion von Harzen eingesetzt. Der größte Produzent und Exporteur weltweit sei die Volksrepublik China (MAMMAN et al., 2008; YONG et al., 2022).

#### **2.7.4 Weitere Nebenprodukte**

Neben den dargestellten Neben- und Degradationsprodukten fallen insbesondere im Extrakt weitere Komponenten an, die beispielsweise aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung auf nachfolgende Prozesse von Relevanz sind. Basierend auf Vorergebnissen von PALMQVIST und HAHN-HÄGERDAL (2000), sowie KLINKE et al. (2004) beschreiben ZHANG et al. (2013) eine kondensierte Liste von Nebenprodukten aus einem Dampfdruckprozess mit Maisstroh. Als Übergruppen werden schwache Säuren, die bereits beschriebenen Furane und phenolische Bestandteile genannt. Unter den schwachen Säuren werden Essig- und Ameisensäure zusammengefasst. Als Furane werden 5-HMF und Furfural angegeben. Die Reihe der phenolischen Nebenprodukte besteht aus sieben Verbindungen: Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin, Syringasäure und *p*-Coumarsäure. Auf diese Verbindungen und deren Vorkommen in der flüssigen Extraktfraktion wird im speziellen Teil dieser Arbeit weiter eingegangen werden.

### 3 Arbeitsbeschreibung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich anhand der vorgelegten Publikationen sortieren. Dies wird im Folgenden im Rahmen einer systematischen Arbeitsbeschreibung dargestellt.

**Publikation 1** (*Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn*) greift die ursprüngliche Projektidee auf, indem Maisstroh als agrarischer Reststoff charakterisiert, Dampfdruckbehandelt und anschließend enzymatisch hydrolysiert wird. Neben der sauren Hydrolyse zur Charakterisierung der erzeugten Faserstoffe und Extrakte wurde in diesem Projektabschnitt ebenso die alkalische Ligninextraktion zur Optimierung der EH-Ergebnisse für die beteiligten Projektpartner beschrieben und angewandt. Die extrahierten Faserstoffe und die erzeugten Lignine wurden ebenso umfassend beschrieben. Basierend auf dieser Arbeit resultieren daher die Rohstoffbeschreibung des ersten Maisstrohs DE 1, die daraus resultierenden Kohlenhydratbeschreibungen der extrahierten und nicht extrahierten Faserstoffe, sowie der Extrakte. In Bezug auf die Extrakte wurde ebenso die Belastung mit Furanen als Degradationsprodukte der Dampfdruckbehandlung betrachtet. Die EH-Ergebnisse der behandelten Faserstoffe vor und nach Extraktion werden ebenso in dieser Arbeit beschrieben. Weiterhin entstammen die dargestellten Ergebnisse der Lignine und deren Kohlenhydratverunreinigungen dieser Arbeit.

Nach den positiven Ergebnissen für Maisstroh stellte sich im Projektverlauf die Frage nach der ganzjährigen Verfügbarkeit der benötigten Biomasse. Bioraffinerien die prozessbedingt auf Monosubstrate angewiesen sind, stehen mit Maisstroh, das nur einen Erntezeitpunkt im Herbst aufweist, vor einer besonderen Herausforderung. Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, wurde in **Publikation 2** (*Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates*) ein siliertes, agrarisches Material (Maissilage, MS) genutzt, um mögliche Einflüsse der Silierung auf den Prozess abschätzen und beurteilen zu können. Die Silierung stellt dabei eine etablierte und sichere Methode zur Erhöhung der Lagerstabilität mit geringen Kohlenhydratverlusten dar. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Publikation vergleichende Untersuchungen mit den in Publikation 1 gefundenen Daten erstellt. Auf eine Ligninextraktion wurde in diesem Abschnitt verzichtet, da Maissilage im Regelfall vor der Lignifizierung gehäckselt wird. Die Maissilage-Daten zur Rohstoffcharakterisierung, der Kohlenhydratbestimmung der Extrakte und Faserstoffe, die Furanbelastung der Extrakte und die Darstellung der EH-Ergebnisse im speziellen Teil dieser Arbeit entstammen daher der Publikation 2.

Die abschließende **Publikation 3** (*Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases Obtained After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage*) stellt die inhaltliche Verknüpfung der in den vorgenannten Publikationen verwendeten Rohstoffe dar. Nach der eingehenden Bearbeitung der Fragestellungen zur Nutzung der Faserfraktion im Rahmen einer enzymatischen Hydrolyse wurden Möglichkeiten zur stofflichen Verwendung der Extraktfraktion bearbeitet. Die Verwertung der durch Kohlenhydratdegradation mit Inhibitoren belasteten Extraktfraktion stellt hierbei eine Herausforderung dar. Verschiedene Autoren beschreiben dabei bei einer gemeinsamen Nutzung beider Fraktionen den negativen Einfluss des Extraktes auf den Prozess. Andere Autoren fanden hingegen keinen Einfluss in gemeinsamen enzymatischen Hydrolysen, beschreiben aber den negativen Einfluss auf eine anschließende Fermentation, die sensibler in Bezug auf Inhibitoren sei. Eine isolierte Betrachtung der nahezu inhibitorfreien Faserfraktion erschien daher für eine ganzheitliche Betrachtung des Prozesses nicht ausreichend. Basierend auf diesen Überlegungen wurden daher Untersuchungen in Bezug auf die relevantesten Inhibitoren durchgeführt, um Abschätzungen zur Inhibitorbelastung und zur Relevanz einzelner Inhibitoren im daliegenden Prozess abgeben zu können.

Zusätzlich zu den in den Publikationen verwendeten Rohstoffen wurden zwei weitere Maisstroh-Rohstoffe mit in das vorliegende Manuskript aufgenommen. Diese Ergebnisse waren nicht Bestandteil der Publikationen und sollen regionale und saisonale Unterschiede darstellen. Dabei handelt es sich um ein weiteres deutsches Maisstroh (DE 2) und eine chinesische Variante (CHN), die projektbezogen mit aufgenommen wurde.

Weiterhin erlangte im Rahmen des Projektes die Nutzungsmöglichkeit von Maisstrohsilage (MSS) ein großes Interesse, da es die anfallenden, nutzbaren Mengen mit einer möglichen Lagerung verbindet. Daher wurden zum Ende des Projekt- und Promotionszeitraumes einige Referenzaufschlüsse von Maisstrohsilage durchgeführt. Die erlangten Ergebnisse wurden ebenfalls in das Manuskript aufgenommen, um das Potenzial dieses vielversprechenden Rohstoffes erfassen zu können.

## **4 Spezieller Teil – Ergebnisse und Diskussion**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Dampfdruckaufschlusses auf Maisstroh, Maissilage und Maisstrohsilage untersucht. Der Einfluss des Schärfegrades und die Optimierung auf einen bestmöglichen enzymatischen Abbau hin zu monomeren Kohlenhydraten standen dabei im Vordergrund. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls der Einfluss einer alkalischen Extraktion untersucht, um zum einen den Ligningehalt zu reduzieren und zum anderen die Zugänglichkeit für eine optimale EH zu verbessern. Zusätzlich wurde die Eignung von siliierter Biomasse betrachtet. Mit der Silierung steht eine etablierte Methode zur Verfügung, um Biomasse haltbar und damit für Bioraffinerien ganzjährig verfügbar zu machen.

Zur Beurteilung des Schärfegradeinflusses auf die verwendeten Biomassen wurden die entstandenen Fraktionen im Hinblick auf ihre Ausbeuten bilanziert und in Bezug auf ihre Kohlenhydratzusammensetzung charakterisiert. Weiterhin wurden Inhibitoren und Nebenprodukte aus der Degradation der Kohlenhydrate unter hohen Temperaturen in der löslichen Extrakt- oder Flüssigphase analysiert. Ebenso wurden die alkalisch gewonnenen und gefällten Lignine in Bezug auf ihre Kohlenhydratkontamination beschrieben. Im Folgenden werden diese Ergebnisse in ihrem Zusammenhang dargestellt werden, wobei auch hier der Hinweis auf das in Abschnitt 3 beschriebene Arbeitsschema gegeben werden soll.

### **4.1 Rohstoffcharakterisierung**

Die Zusammensetzung der verwendeten Rohstoffe bildet das Fundament für die Eignung als Substrat für den Dampfdruckaufschluss und die folgende EH. Die verwendeten Rohstoffe gehören alle, wie bereits im allgemeinen Teil dargestellt, zu der Obergruppe der LCB. Deren chemische Zusammensetzung, grundlegend bestehend aus Cellulose, Hemicellulosen und Lignin, wird im Folgenden dargestellt.

Die verwendeten Rohstoffe stammen zum einen aus unterschiedlichen Provenienzen und Erntejahren, zum anderen wurden aber auch Rohstoffe mit verschiedentlicher Zusammensetzung und Herstellungstechnik gewählt, um auch analytische ein breitgefächertes Rohstoffspektrum in dieser Arbeit darstellen zu können. Es wurde deutsches Maisstroh aus Fulda, Hessen (Erntejahr: 2018) und aus Grub, Bayern (Erntejahr: 2019) verwendet. Weiterhin Maisstroh aus Nanjing, China (Erntejahr: 2018). Die Maissilage (Erntejahr: 2018) wurde in Bardowick, Niedersachsen geerntet und anschließend siliert. Die Maisstrohsilage (Erntejahr: 2020) wurde durch die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) bereitgestellt. Die jeweilige Rohstoffcharakterisierung ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Rohstoffcharakterisierungen des Maisstrohs aus Fulda sind aus KRAFFT et al. (2020a) und die Charakterisierung der Maissilage aus KRAFFT et al. (2020b) entnommen. Das Maisstroh aus Fulda wurde

lufttrocken und ohne Spindeln eingesetzt. Die restlichen Rohstoffe wurden erntefeucht mit einem Trockengehalt von rund 30–40 % verwendet.

Tabelle 7: Vergleich der Extraktstoff-, Kohlenhydrat-, Lignin- und Aschegehalte der genutzten Rohstoffe.

	Komponenten (%)	Maisstroh			MS	MSS
		DE 1	DE 2	CHN		
Extrakte	Petrolether	0,8	0,7	0,4	2,5	0,5
	Aceton/H <sub>2</sub> O (9:1)	8,1	4,9	11,5	6,6	6,9
	H <sub>2</sub> O	7,3	7,5	10,0	15,6	9,4
	Σ	16,2	13,0	21,9	24,7	16,8
KH	Glc	35,6	38,6	31,3	43,8	37,5
	Xyl	19,5	21,1	17,7	13,7	20,7
	Ara	2,9	2,9	2,2	2,5	2,4
	Gal	0,9	0,9	0,8	0,8	0,7
	Man	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1
	Rha	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Σ	59,3	63,9	52,4	61,2	61,5
Lignin	säureunlöslich	17,1	15,0	14,9	9,3	15,1
	säurelöslich	2,2	2,5	2,4	2,6	3,0
	Σ	19,3	17,5	17,3	11,9	18,1
Asche		6,4	5,5	5,6	3,5	5,7

Wie in Tabelle 7 dargestellt zeigen sich für die verwendeten Rohstoffe unterschiedliche Zusammensetzungen. Verglichen mit den Maisstrohproben aus Deutschland, zeigt die Variante aus Nanjing die höchsten Extraktgehalte. Die höchsten Glucosegehalte weist das Maisstroh DE 1 auf, wohingegen Maisstroh CHN die niedrigsten Glucosegehalte zeigt. In Bezug auf die beschriebenen Literaturwerte (vgl. Abschnitt 2.4.1) liegen die Gehalte aller Maisstrohrohstoffe im Bereich der natürlichen Streuung. Dies gilt ebenso für die ermittelten Xylosegehalte, wobei angenommen werden kann, dass diese im Maisstroh aus Fulda aufgrund der aussortierten Maiskolbenbestandteile im nicht sortierten Rohstoff höher ausfallen könnten. Die weiteren, in kleineren Mengen vorkommenden, Hemicellulosen zeigen eine große Übereinstimmung unter den verschiedenen Maisstrohproben.

Die dargestellten Ligningehalte schwanken im Bereich der erwartbaren Streuung eines natürlichen Rohstoffes unterschiedlicher Erntejahre und Herkünfte. Aus den ebenfalls in Abschnitt 2.4.1 dargestellten Literaturwerten zeigt sich, dass für Maisstroh eine große

Bandbreite der Ligningehalte nachgewiesen wurde. Dies hängt aller Voraussicht nach erheblich vom Erntezeitpunkt und der entsprechenden Lignifizierung der Biomasse ab. Für das säurelösliche Lignin wurden ebenso Messwerte ermittelt, die im unteren Bereich der Literaturwerte nach KIM et al. (2003) und ZHU et al. (2009) liegen. Dies gilt ebenso für die im Rahmen der Rohstoffcharakterisierung durchgeführte Aschebestimmung der Maisstroh-Varianten.

Landwirtschaftliche Maissilage zeigt im Vergleich zu Maisstroh höhere Extraktausbeuten, was insbesondere auf eine Stärke-Fraktion zurückzuführen ist, die während der Heißwasserextraktion gelöst wird. Dies lässt sich durch die im Gegensatz zu Maisstroh vorkommenden, technisch angequetschten Maiskörner im Rohstoff erklären. Auch bei den Kohlenhydraten zeigt sich dieser Einfluss in höheren Glucosegehalten. Für die Hemicellulosen zeigen sich im Vergleich zu Maisstroh niedrigere Gehalte (Tab. 7). Der bereits erwähnte Zusammenhang zwischen Erntezeitpunkt und Ligningehalt lässt sich ebenso für die Maissilage beschreiben, die als Ganzpflanze und insbesondere deutlich früher, vor der Lignifizierung, geerntet wird. Abschließend zeigen sich im direkten Vergleich zu den Maisstroh-Varianten signifikant niedrigere anorganische Komponenten, die als Asche bestimmt wurden. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den in der Literatur verfügbaren (Roh)-Aschegehalten nach WEIß et al. (2011) und OLESKOWICZ-POPIEL et al. (2011), die Werte von < 4,5 % bzw. von rund 1,5 % angeben.

Die Rohstoffanalytik der MSS zeigt Extraktgehalte von 16,8 %. Während LIU et al. (2014) deutlich geringere Werte aufzeigen, stellen WENDT et al. (2018) für labortechnisch siliertes und ASE-extrahiertes Maisstroh Extraktgehalte von 21 % fest. Letztere zeigen allerdings auch wasserlösliche Kohlenhydrate im Wasserextrakt. Die ermittelten Kohlenhydrate nach der Extraktion decken sich weitgehend mit den durch SUN et al. (2011a) dargestellten Werten. Diese stellten in der verwendeten MSS rund 40 % Glucose, 19 % Xylose und 1,75 % Arabinose fest. Die Ligningehalte liegen ohne die Aufsummierung mit dem säurelöslichen Lignin nahezu auf dem gleichen Niveau wie in den Arbeiten von SUN et al. (2011a) mit 14,86 % und WENDT et al. (2018) mit 14,6 %. In beiden Arbeiten wird die Ermittlung des Gehaltes an säurelöslichem Lignin allerdings auch nicht erwähnt, obwohl WENDT et al. (2018) ebenfalls mit einer zweistufigen, sauren Hydrolyse arbeiten. Der in dieser Arbeit ermittelte Aschegehalt liegt über den zusammengefassten Werten von SUN et al. (2011a). WENDT et al. (2018) zeigen eine hohe Bandbreite an Aschegehalten (9,0–19,4 %), abhängig von der Erntemethode. Weiterhin zeigen sie eine Reduktion der ermittelten Asche nach einer der Silierung vorgeschalteten Wäsche. Festzustellen sind verschiedene Faktoren, die den Aschegehalt des verwendeten Materials beeinflussen. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte lassen sich daher in die Literaturwerte einreihen.

## 4.2 Ergebnisse der Dampfdruckaufschlüsse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Dampfdruckaufschlüsse miteinander verglichen werden. Dabei werden nur diejenigen gezeigt, die über den Schärfegrad direkt miteinander vergleichbar und nur durch ihre individuelle Zusammensetzung unterschiedlich sind. Hierbei limitierte die Rohstoffmenge des importierten Maisstrohs aus China den direkt Versuchsrahmen auf fünf Aufschlüsse. Weitere Aufschlussbedingungen und Auswertungen für das Maisstroh aus Fulda sind in KRAFFT et al. (2020a) dargestellt.

### 4.2.1 Faserstoff- und Extraktausbeuten

Abbildung 16 zeigt die nach dem Dampfdruckaufschluss ermittelten Faserstoff- und Extraktausbeuten der Maisstroh-Varianten. Diese zeigen grundlegend ähnliche Muster, die im Folgenden näher erklärt werden.

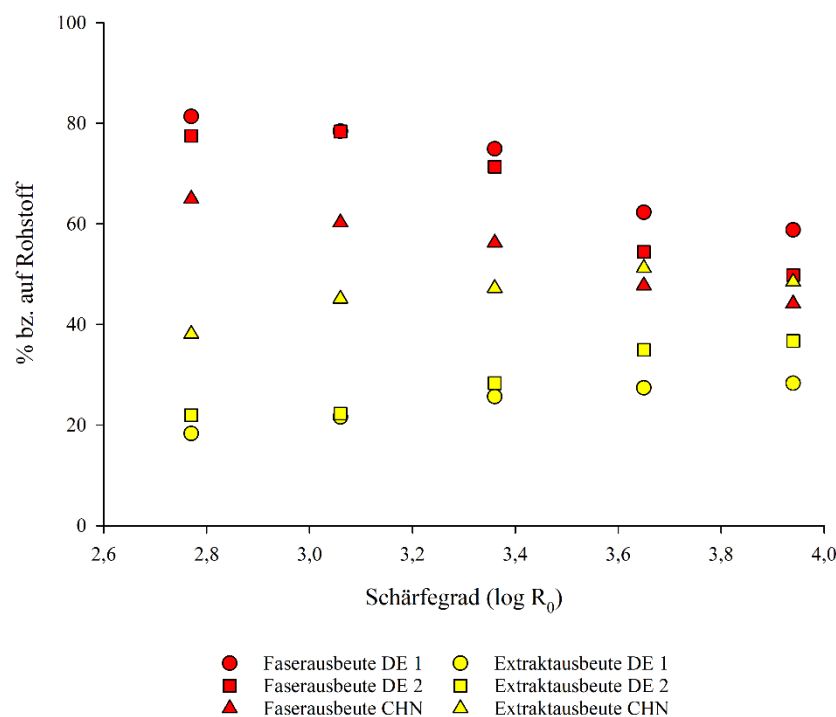


Abbildung 16: Faserstoff- und Extraktausbeuten der Maisstroh-Rohstoffe nach einem Dampfdruckaufschluss zwischen einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 2,77$ – $3,94$ .

Während die Faserstoffausbeuten mit zunehmendem Schärfegrad kontinuierlich abnehmen, stellt sich für die Extraktstoffausbeuten überwiegend, mit der Ausnahme des Rohstoffes CHN, eine stetige Zunahme mit ansteigender Schärfe dar. Die höchsten Faserstoffausbeuten und die niedrigsten Extraktausbeuten zeigt das Maisstroh aus Fulda. Weiterhin lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der Faserstoffausbeute mit zunehmendem Schärfegrad ermitteln. In Bezug auf die Extraktausbeute stellt sich eine

Zunahme dar, die mit zunehmender Schärfe abflacht. Für weitere Untersuchungen des Rohstoffs bei Prozessbedingungen  $> \log R_0 = 3,94$  kann eine Abnahme der Extraktausbeuten bei schärferen Prozessbedingungen beobachtet werden, die auf temperaturinduzierte Degradation zurückzuführen ist (KRAFFT et al., 2020a). Der Vollständigkeit halber hervorzuheben ist, dass der Rohstoff DE 1 aus Fulda, im Vergleich zu den weiteren verwendeten Rohstoffen, lufttrocken und ohne Maisspindelreste eingesetzt wurde. Dies hat insbesondere Auswirkungen auf die enzymatische Abbaubarkeit, aber unter Umständen auch auf andere Prozesse, weswegen diese Rahmenbedingungen an dieser Stelle kurz erwähnt werden soll.

Die beiden weiteren, erntefeuchten Rohstoffe zeigen grundsätzlich das gleiche Verhalten. Im Unterschied zum Maisstroh aus Fulda zeigen sich allerdings niedrigere Faserstoffausbeuten und höhere Extraktausbeuten. Insbesondere der Aufschluss des chinesischen Maisstrohs CHN führt zu höheren Extraktausbeuten. Beide Rohstoffe zeigen hierbei ebenso ein Abflachen bzw. eine Abnahme der Ausbeuten mit höheren Schärfegraden. Abweichend zeigt das Maisstroh CHN bereits eine Abnahme der Extraktausbeute bei  $\log R_0 = > 3,65$ , während für die Extraktausbeute des bayerischen Maisstrohs DE 1 noch eine leichte Zunahme der Ausbeuten ermittelt wurde. Das Maisstroh aus China zeigt sogar einen Schnittpunkt aus Faserstoff- und Extraktausbeute bei einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,94$ . An dieser Stelle übersteigt die Extraktausbeute die Ausbeute an Faserfraktion. Für beide Rohstoffe kann analog zu den publizierten Ergebnissen (KRAFFT et al., 2020a) mit abnehmenden Extraktausbeuten bei schärferen Bedingungen ausgegangen werden.

Zur Überprüfung der Varianz innerhalb der Dampfdruckaufschlüsse wurden Dreifachversuche bei einem hohen Schärfegrad von  $\log R_0 = 4,42$  (200 °C / 30 min) mit der Maisstrohprobe DE 2 durchgeführt (KRAFFT et al., 2020a). Diese Untersuchung zeigen eine Abweichung von  $< \pm 1 \%$  in Bezug auf die Extrakt- und Faserstoffausbeute. Anlagentechnisch waren Temperaturen  $> 200$  °C nicht erzielbar, weswegen der Schärfegrad in diesem Fall maßgeblich über die Zeitdauer eingestellt wurde. SCHÜTT (2012) gibt in diesem Zusammenhang an, dass bei einem kalkulatorisch gleichen Schärfegrad die Temperatur einen größeren Einfluss auf die Ausbeuten habe, als die Zeitdauer der Vorbehandlung.

Bei dieser Dreifachkontrolle zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Extraktausbeuten unter schärferen Prozessbedingungen, was die vorausgegangene Annahme untermauert. In diese Betrachtung sind weitere Faktoren, wie Maissorte, Bodenverhältnisse und die vorherrschenden Klimabedingungen als mögliche Faktoren mit einzubeziehen, die die Zusammensetzung und das Prozessverhalten der Biomasse beeinflussen können. Diese können zu Variationen der Extrakt- und Faserausbeuten der jeweiligen Rohstoffe führen.



Versuche bei unterschiedlichen Temperatur- und Zeitbedingungen, aber vergleichbaren Schärfegraden ( $\log R_0 = 3,94 / 3,95$  für  $190\text{ °C} / 20\text{ min}$  und  $200\text{ °C} / 10\text{ min}$  bzw.  $\log R_0 = 4,24 / 4,25$  für  $200\text{ °C} / 20\text{ min}$  und  $210\text{ °C} / 10\text{ min}$ ) ergaben sehr ähnliche Ergebnisse. Dies belegt, dass im hier gewählten Reaktionsraum die Gültigkeit des Schärfegrades gegeben ist (KRAFFT et al., 2020a).

Aus dem Vergleich der einzelnen Rohstoffe lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ableiten. Grundsätzlich zeigt sich die natürliche Varianz der Proben, hervorgerufen durch unterschiedliche Herkunft, Erntejahre und biotische / abiotische Rahmenbedingungen. Die dargestellten Verhaltensmuster der Fraktionen mit zunehmendem Schärfegrad der Dampfdruckbehandlung sind in der Literatur gleichlautend dargestellt (SCHÜTT et al., 2011; JANZON et al., 2014; TAKADA et al., 2019; HAGEL und SAAKE, 2020).

Neben den Maistroh-Varianten wurde ebenso Maissilage vorbehandelt. Diese zeigt, wie bereits dargestellt, grundlegende Unterschiede, wie Erntezeitpunkt, Zusammensetzung und/oder Silierung, im Vergleich mit den anderen Rohstoffen auf. Die unter gleichen Prozessbedingungen (vgl. Abb. 16) vorbehandelte Maissilage ist daher in Abbildung 17 dargestellt.

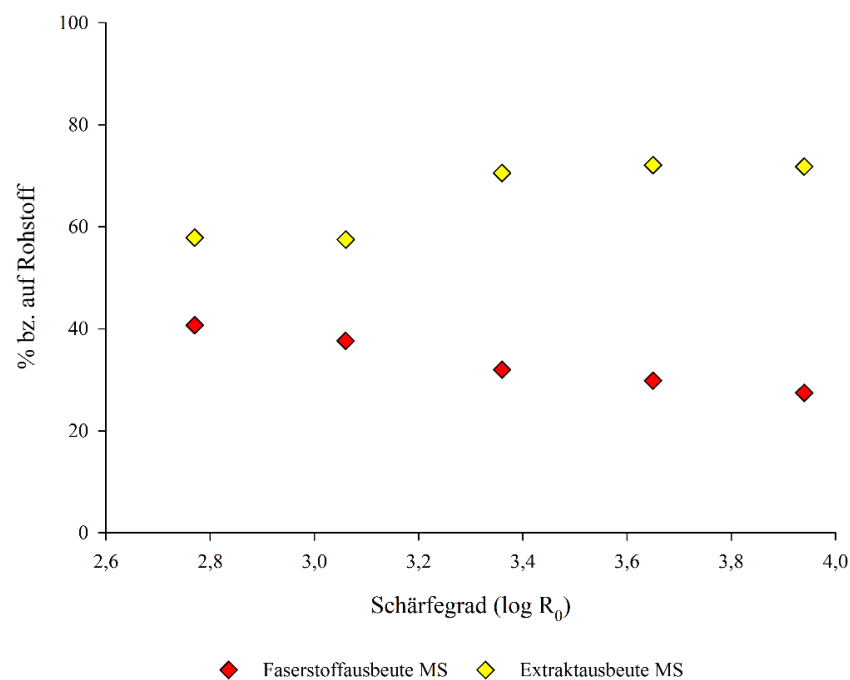


Abbildung 17: Die ermittelten Ausbeuten für Maissilage nach Dampfdruckaufschlüssen von  $\log R_0 = 2,77$  bis  $3,94$  (KRAFFT et al., 2020b).

Wie dargestellt zeigen sich schon bei den niedrigsten Schärfegraden höhere Extraktausbeuten. Dies steht im Kontrast zu den bereits dargestellten Daten der Maistroh-Proben (vgl. Abb. 16). XU et al. (2010) zeigen Faserstoffausbeuten von 46 %

nach hydrothormaler Vorbehandlung von Maissilage bei  $\log R_0 = 2,98$ . Die grundlegende Entwicklung einer sinkenden Faserstoffausbeute und steigender Extraktausbeute mit zunehmendem Schärfegrad, die bereits für Maisstroh gezeigt werden konnten, kann auch bei Maissilage beobachtet werden. XU et al. (2010) berichten ebenso von fallenden Faserausbeuten mit schärferen Prozessbedingungen. Die geringere Resilienz der silierten Biomasse gegenüber den Aufschlussbedingungen kann mitunter durch einen säurekatalytischen Effekt der Milchsäure auf den Prozess begründet werden. Weiterhin liegt die Maissilage durch den früheren Erntezeitpunkt als deutlich weniger lignifizierte Biomasse vor, was ebenfalls zu einer geringeren Widerstandsfähigkeit führen kann und dadurch mehr Bestandteile der Biomasse in Lösung bzw. in die flüssige Extraktfraktion übergehen.

Der Effekt von siliertem Maisstroh, sog. Maisstrohsilage (MSS), auf den in dieser Arbeit gewählten Dampfdruckprozess und seine Folgeprodukte soll ebenfalls untersucht und dargestellt werden. Bei vorbehandeltem Maisstroh und Maissilage wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit verschiedene Prozess-Optima festgestellt, die im späteren Abschnitt 4.5 aufgegriffen werden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit dieses Rohstoffes wurden zusätzliche Aufschlüsse an diesen drei Punkten ( $\log R_0 = 3,53 - 3,65 - 3,94$ ) durchgeführt und die Ausbeuten in Tabelle 8 aufgeführt.

*Tabelle 8: Die Faserstoff- und Extraktausbeuten von MSS für die drei ermittelten Optima bezogen auf % des eingesetzten Rohstoffs.*

Log $R_0$	Faserstoffausbeute (%)	Extraktausbeute
3,53	58,1	41,5
3,65	54,6	44,7
3,94	54,0	43,4

Aus den in Tabelle 8 dargestellten Ausbeuten lässt sich ableiten, dass sich MSS im Prozess grundlegend wie Maisstroh verhält. Dies leitet sich durch im Verhältnis zur Maissilage (vgl. Abb. 17) höheren Faserstoff- und niedrigere Extraktausbeuten ab. Der Einfluss der Silierung auf die Ausbeuten zeigt sich allerdings durch im Vergleich zum Maisstroh höhere Extraktausbeuten nach dem Dampfdruckaufschluss. Die Aufschlüsse der MSS zeigen hierbei eine Verbindung der Erkenntnisse von Maisstroh und Maissilage, indem sich die Verhältnisse der Extrakt- und Faserstoffausbeuten angleichen. Dieses Verhalten ist, bei ähnlichen Werten, ebenso für das aufgeschlossene chinesische Maisstroh (vgl. Abb. 16) zu beobachten, wobei der bereits dargestellte Schnittpunkt zwischen Faserstoff- und Extraktausbeute, beispielsweise bei  $\log R_0 = 3,65$ , nicht vorliegt. Hieraus lässt sich unter Umständen eine biotische Degradation / Silierung des

Maisstrohs CHN ableiten, die während der Lagerung, dem Auftauprozess oder der Verarbeitung eingesetzt haben kann. Aus diesen Beobachtungen heraus kann es möglich sein, den Zustand der Biomasse anhand des Faserstoff-Extraktverhältnisses abschätzen zu können, was insbesondere bei der Nutzung und Lagerung feuchter Biomasse relevant sein kann.

#### 4.2.2 Kohlenhydratgehalte

Zur Beurteilung der Prozessbilanzen im Hinblick auf die Kohlenhydrate, aber auch zur Bilanzierung der enzymatischen Hydrolyse ist die Charakterisierung der Faserstoff- und Extraktfraktion nach dem Dampfdruckaufschluss notwendig. Diese wird im Folgenden dargestellt. Abbildung 18 zeigt hierbei die Gehalte an Glucose- und Xylose von Faserstoff und Extrakt.

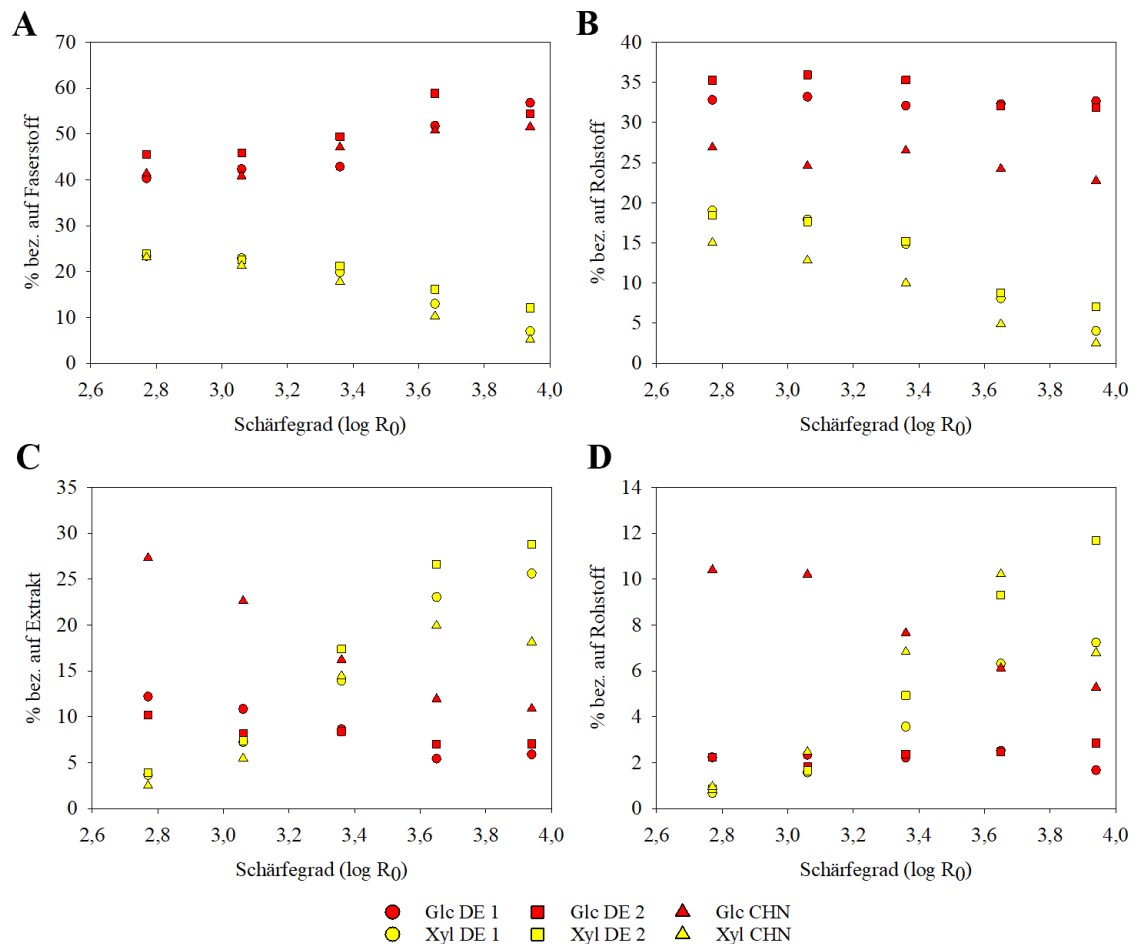


Abbildung 18: Glucose (Glc) und Xylose (Xyl)-Gehalte der Faserstoffe und Extrakte der Maisstroh-Varianten, jeweils fraktions- und rohstoffbezogen in %. Diese ist zum einen berechnet auf die Zusammensetzung in der jeweiligen Fraktion (Abb. 18A/C). Weiterhin, verrechnet mit den jeweiligen Fraktionsausbeuten, bilanziert auf die ursprüngliche Rohstoffmenge (Abb. 18B/D).

Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigen sich verschiedene Effekte im Faserstoff und dem Extrakt. Bezogen auf den Faserstoff (Abb. 18A) ist mit steigendem Schärfegrad durchgehend eine Abnahme des Xylosegehaltes zu beobachten, was auch auf alle anderen Faserstoffe der verschiedenen Maisstrohhrohstoffe zutrifft. Weiterhin zeigt sich in Bezug auf die Faserfraktion eine Zunahme der Glucose, die allerdings durch die verhältnismäßige Abnahme der Hemicellulosen zu erklären ist. Dies wird durch die Betrachtung der mit der Ausbeute verrechneten Faserzusammensetzung deutlich.

Wie in Abbildung 18B dargestellt, zeigt die Glucose vielmehr einen relativ stabilen Verlauf, der auch durch SCHÜTT (2012) beschrieben wird. GARROTE et al. (1999) führen dies auf eine höhere Resilienz der Cellulose zurück. SCHÜTT (2012) zeigt dabei im Faserstoff auf den Rohstoff bezogene Glucosewerte von rund 40 % für Aufschlüsse zwischen  $\log R_0 = 3,05$  und  $5,01$  von Pappelholz mit Rinde. Die vorausgehend in Abb. 18 gezeigte Abnahme der Faserstoffausbeute ist demnach insbesondere auf die Hydrolyse der Hemicellulosen aus der Faserfraktion zu begründen, wohingegen die Glucose eine höhere Resilienz gegenüber einer Hydrolyse bei steigenden Schärfegraden zeigt. LI et al. (2005) stellen dahingehend für Pappel-Holzmehl nach einer Dampfvorbehandlung bis zu einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 4,7$  ebenfalls eine leichte Abnahme des Cellulosegehaltes fest.

Der durch Vorbehandlung erzeugte Faserstoff aus dem Maisstroh CHN zeigt durchweg die niedrigsten Glucosewerte bezogen auf den Rohstoff (vgl. Abb. 18B). Da dies nur für die mit der Ausbeute verrechneten Werte auffällt, ist von einem Übergang der Glucose in die Flüssigfraktion auszugehen, wenngleich der Rohstoff im Vergleich zu den anderen Maisstroh-Rohstoffen auch die geringsten Glucose-Gehalte aufweist. Mögliche Gründe dafür können Standort-, Transport- oder Lagerungsbedingungen sein, die eine höhere Zugänglichkeit bzw. eine geringere Stabilität der Cellulose in der LCB bedingen.

Es zeigen sich für das chinesische Maisstroh ebenfalls überdurchschnittlich hohe Konzentrationen an Glucose im Extrakt, die diese Annahme untermauern. Grundlegend zeigen sich weiterhin, bezogen auf das Extrakt, leicht abnehmende Glucosewerte bei einer gleichzeitigen starken Zunahme der Xylosegehalte mit steigendem Schärfegrad. Dies zeigt sich auch für die auf den Rohstoffeinsatz berechneten Werte (Abb. 18D), wobei sich hier der stabile Verlauf der Glucosekonzentration, mit Ausnahme des chinesischen Maisstrohs, ebenfalls darstellt.

Die Zusammensetzung der erzeugten Faserstoff- und Extraktfraktion wurde ebenso für die dampfdruckbehandelte Maissilage ermittelt, wobei in diesem Fall der Versuchsrahmen auch auf deutlich niedrigere Schärfegrade ausgeweitet wurde (KRAFFT et al., 2020b). Dies geschah vor dem Hintergrund des früheren Erntezeitpunktes und der

Silierung, da hierdurch eine schnellere Degradation des Rohstoffes bei erhöhten Temperaturen erwartet wurde.

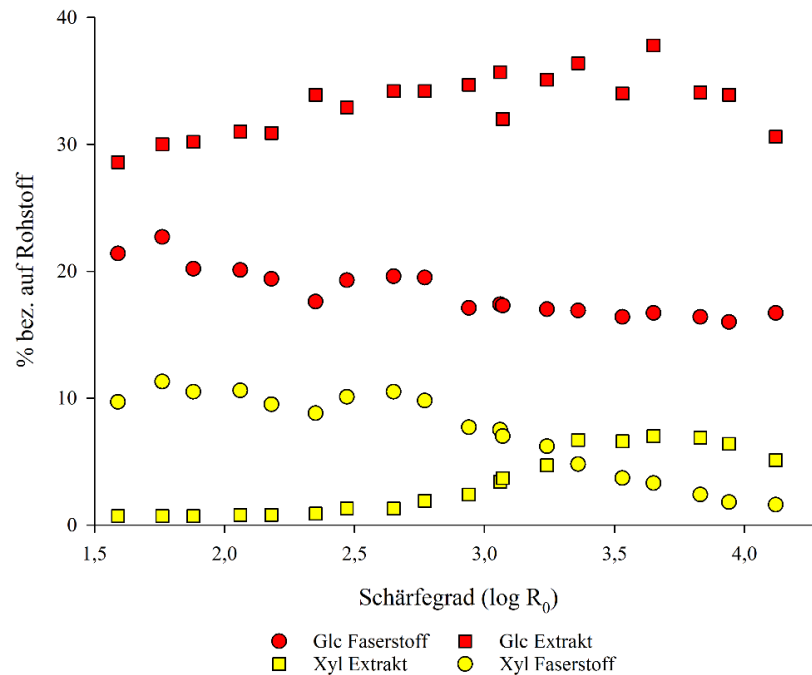


Abbildung 19: Darstellung von Glucose und Xylose in Extrakt- und Faserstofffraktion der dampfdruckbehandelten Maissilage dargestellt als % bezogen auf eingesetzten Rohstoff (KRAFFT et al., 2020b).

Abbildung 19 nimmt Bezug auf die Glucose- und Xylosegehalte der erzeugten Faserstoff- und Extraktfraktionen aus mittels DD behandelter Maissilage. Die Entwicklungen der einzelnen Komponenten über den Schärfegrad sind dabei ähnlich mit den in Abbildung 18 dargestellten Ergebnissen. Der Glucosegehalt im Faserstoff zeigt mit steigenden Prozessbedingungen eine Abnahme, wobei sich bei schärferen Bedingungen ( $\log R_0 = 2,94$ ) eine Stabilisierung einstellt. Der Xylosegehalt im Faserstoff zeigt einen gegenteiligen Effekt des Schärfegrades, wodurch erst stabile Werte bis  $\log R_0 = 2,65$  ermittelt werden konnten und darauffolgend eine Abnahme des Xylosegehaltes zu verzeichnen ist. Dieses Bild konnte ebenso für die dargestellten Maisstroh-Varianten (Abb. 18) ermittelt werden, wobei hier der vergrößerte Versuchsrahmen der Maissilage-Vorbehandlung auch Rückschlüsse auf Bedingungen  $< 160$  °C zulässt.

Das Verhalten der Xylose im Extrakt der dampfdruckbehandelten Maissilage ist ebenso in Übereinstimmung mit vorangegangenen Beobachtungen zu Maisstroh-Extrakten. Sichtbar wird hierbei, dass ein Übergang der Xylose in die Extraktfraktion erst ab einem Schärfegrad von ca.  $\log R_0 = 2,65$  beginnt, was ebenso mit den Beobachtungen des abnehmenden Xylosegehaltes im betreffenden Faserstoff korreliert. Einzig die Glucose im Extrakt zeigt ein deutlich abweichendes Verhalten. Diese sind erheblich höher als im

Maisstroh-Extrakt bei ähnlichen Prozessbedingungen und lassen sich vermutlich auf die in den Maiskörnern dominante und im Prozess gelöste Stärke zurückführen. XU et al. (2010) beschreiben dahingehend für Maissilage nach eine hydrothermale Vorbehandlung im Bereich von  $\log R_0 = 2,98\text{--}3,68$  eine Stärkewiederfindung im Extrakt von 71,6–78,3 %. Verbunden mit der ermittelten Stärke im vorbehandelten Faserstoff zeigen die Autoren eine Gesamtwiederfindung von 79,8–88,2 %, wobei mit zunehmender Schärfe eine abnehmende Stärkewiederfindung zu beobachten ist.

Tabelle 9 zeigt abschließend die ermittelten Glucose- und Xylosegehalte der durch eine Vorbehandlung von MSS gewonnenen Faserstoffe und Extrakte. Diese lassen sich inhaltlich mit den in Abbildung 18 B/D vergleichen.

*Tabelle 9: Glucose- und Xylosegehalte im Faserstoff und Extrakt der dampfdruckbehandelten MSS bezogen auf % Rohstoff.*

Log $R_0$	Faserstoff		Extrakt	
	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose
3,53	32,1	8,6	1,5	10,6
3,65	33,5	5,4	1,4	12,8
3,94	34,4	2,5	1,4	5,9

Die ermittelten Werte der Hauptkohlenhydrate im Faserstoff zeigen dabei große Übereinstimmungen mit den ermittelten Werten und Entwicklungen für nicht siliertes Maisstroh an den verschiedenen Schärfegradpunkten. Ebenso zeigt sich in der Extrakt-Analytik eine große Übereinstimmung mit stabilen, niedrigen Glucosekonzentrationen und steigenden, bei schärferen Prozessbedingungen wieder abnehmenden Xylosegehalten. Die starke Abnahme der Xylose ab einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,94$  ähnelt dabei dem Verhalten des Maisstrohs CHN, was die Vermutung einer säurekatalytischen Unterstützung, bedingt durch die vorhandene Milchsäure aus der Silierung, und weiteren Einflussfaktoren (Sorte, Klima, Boden usw.) unterstützt. Diese Beobachtung lässt sich ebenso für die Xylosegehalte der Maissilage-Extrakte am Ende der Schärfereihe darstellen.

Neben Glucose und Xylose wurden analytisch ebenso weitere Kohlenhydrate (Galaktose, Arabinose, Mannose und Rhamnose) bestimmt. Die grundlegende Entwicklung dieser Kohlenhydrate wurde exemplarisch für Vorbehandlungen von Maisstroh (KRAFFT et al., 2020a) und Maissilage (KRAFFT et al., 2020b) gezeigt. Grundlegend kann dabei festgestellt werden, dass für diese Kohlenhydrate ein nahezu kompletter Übergang von der Faserstoff- in die Extraktphase bei ca.  $\log R_0 = 3,6$  beobachtet werden kann. Anschließend finden mit schärferen Prozessbedingungen Degradationsreaktionen im Extrakt statt, die zu erheblichen Rückgängen der Gehalte an Galaktose, Arabinose,

Mannose und Rhamnose führen. Der Hauptanteil dieser Entwicklung ist hierbei auf die Arabinose zurückzuführen, da die anderen oben genannten Kohlenhydrate nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Die Entwicklung des Arabinosegehaltes mit steigendem Schärfegrad im Prozess soll daher kurz detaillierter beschrieben werden. Für die Maisstroh-Faserfraktion kann dabei von rund 1,5–3 % Arabinose bei  $\log R_0 = 2,77$  ausgegangen werden. Der Arabinosegehalt nimmt konstant mit steigender Schärfe auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze ab. Im Extrakt liegen bei dieser Schärfe rund 0,5 % Arabinose vor. Das Maximum wird mit rund 1,5 % in einem Bereich von  $\log R_0 = 3,65$ – $3,94$ , je nach Strohvariante, erreicht. Anschließend nimmt der Arabinosegehalt, bedingt durch Degradation unter schärferen Prozessbedingungen, wieder ab.

Die Maissilage zeigt eine ähnliche Entwicklung, wenn auch bei niedrigeren Ausgangswerten (KRAFFT et al., 2020b). Für MSS konnten an den drei durchgeführten Versuchspunkten  $\log R_0 = 3,53$  –  $3,65$  –  $3,94$  im Faserstoff bezogen auf den Rohstoffeinsatz Arabinosegehalte von 0,38–0,05 % und für das Extrakt von 1,64–0,00 % ermittelt werden. Zur weiteren Beurteilung möglicher Degradationsreaktionen der ermittelten Kohlenhydrate bei höheren Schärfegraden, ist in Tabelle 10 eine Aufsummierung der prozentual festgestellten Kohlenhydrate in beiden Fraktionen dargestellt worden.

*Tabelle 10: Summierung der nach saurer Hydrolyse ermittelten Hauptkohlenhydrate (Glucose, Xylose) in Faserstoff- und Extraktfraktion, berechnet als % vom verwendeten Rohstoff.*

Log $R_0$	Maisstroh			MS	MSS
	DE 1	DE 2	CHN		
2,77	54,8	56,8	53,3	65,4	-
3,06	55,1	57,1	50,1	60,0	-
3,36	52,8	57,8	51,0	64,8	-
3,53	49,9	55,3	-	60,7	52,8
3,65	48,2	52,6	45,5	64,8	53,0
3,94	46,9	53,5	37,3	58,1	44,2

Durch die dargestellte Aufsummierung der Hauptkohlenhydrate zeigt sich insbesondere der Abbau der Kohlenhydrate mit steigendem Schärfegrad im Prozess, der nicht von der Verschiebung zwischen der Extrakt- und Faserfraktion überlagert wird. Für die Maisstroh-Varianten lässt sich eine Abnahme der Kohlenhydrate vom niedrigsten zum höchsten Schärfegrad ermitteln. Diese kann mit einer Zunahme an Abbauprodukten der Kohlenhydrate beschrieben werden, die in Abschnitt 4.6 dieser Arbeit näher erläutert wird. Die Maissilage zeigt ein weniger homogenes Bild, das allerdings in der

Gesamtbilanz dem gleichen Verlauf entspricht. Hier sorgt, wie auch in Abbildung 19 ersichtlich, der durch Stärke beeinflusste Glucosegehalt der Extraktfraktion für ein weniger einheitliches Bild. Die Messergebnisse der MSS fügen sich in dieses Muster mit ein. Insgesamt zeigt das chinesische Maisstroh, ausgehend von ähnlichen Grundwerten, die geringste Degradationstoleranz, was zu vorausgegangenen Vermutungen der Vorabdegradation des Rohstoffs passt. Die oben genannten Effekte der Degradation bei Erhöhung der Temperatur sind in ihrer theoretischen Begründung (LI et al., 2005), als auch im speziellen für den Dampfdruckaufschluss von verschiedenen Substraten in der Literatur beschrieben (SCHÜTT, 2012; HAGEL und SAAKE, 2020; KRAFFT et al., 2020a; KRAFFT et al., 2020b). Es zeigt sich allerdings gleichsam, dass der Einfluss der Substratfeuchte (DE 1 lufttrocken, restliche Substrate erntefeucht) zumindest auf den Dampfdruckaufschluss als Prozess an sich, keinen herausragenden Einfluss hat. Vielmehr scheint eine Kombination verschiedener biotischer und abiotischer Faktoren, die auf die vorliegenden agrarischen Reststoffe eingewirkt hat, für die festgestellten Unterschiede verantwortlich zu sein.

#### 4.2.3 Freie KH und Molmassen der Extrakte in DE 1 und MS

Zur weiteren Charakterisierung der erzeugten Extrakte wurden die Oligomer/Monomer-Verhältnisse des Maisstrohs DE 1 und der Maissilage verglichen (Abb. 20).

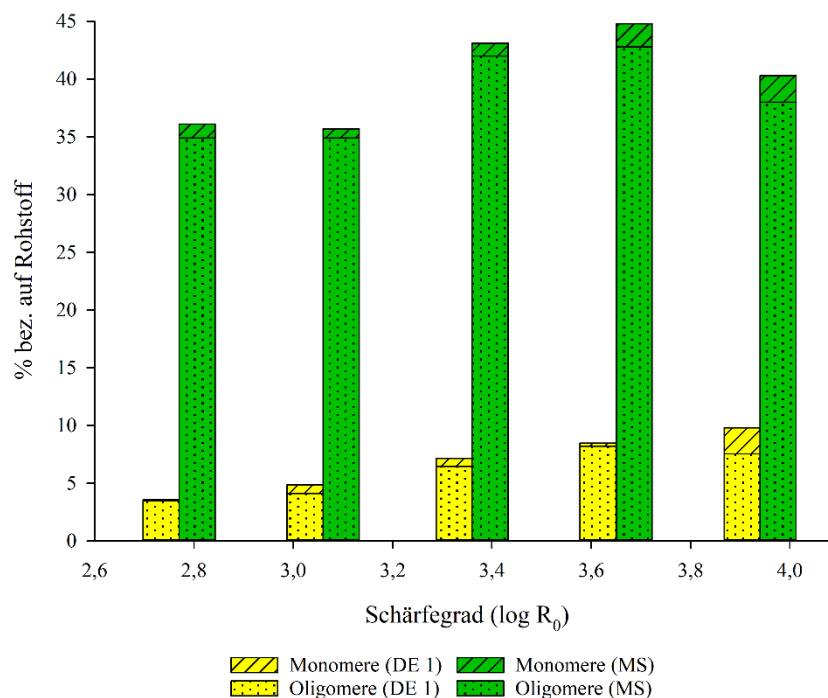


Abbildung 20: Oligomer/Monomer-Verhältnisse von Maisstroh und Maissilage bei verschiedenen Schärfegraden (KRAFFT et al., 2021).



Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kohlenhydratbestimmung mittels saurer Hydrolyse werden die Kohlenhydrate in dieser Arbeit als Monomere bestimmt. Bekannt ist allerdings, dass bei den ursprünglichen Extrakten vor der sauren Kohlenhydratbestimmung, insbesondere bei milden Vorbehandlungsbedingungen, vor allem Oligomere aus der Zellwand gelöst werden, in das Extrakt übergehen und diese erst im Verlauf steigender Schärfe und sinkendem pH-Wert zu Monomeren abgebaut werden (PULS et al., 1985; SCHÜTT, 2012).

Oligomere haben dabei verschiedene Verwendungsmöglichkeiten. PALM und ZACCHI (2004) beschreiben die stoffliche Nutzung von Oligomeren beispielsweise im Hinblick auf die Herstellung von Hydrogelen. Es zeigen sich unterschiedliche Verhaltensmuster für dampfdruckbehandeltes Maisstroh und Maissilage. Grundlegend zeigen die Extrakte der Maissilage, wie teilweise schon dargelegt, stärkebedingt deutlich höhere Kohlenhydratgehalte im Vergleich zu den Maisstroh-Extrakten. Der Monomeranteil steigt dabei mit zunehmendem Schärfegrad von 1,2 % auf 2,3 % bezogen auf den Rohstoffeinsatz. Deutlicher wird die Zunahme bei dem verwendeten Maisstroh. Hier zeigt sich eine Zunahme der auf den Rohstoff bezogenen Monomere von 0,07 % ( $\log R_0 = 2,77$ ) auf 2,25 % bei  $\log R_0 = 3,94$ . In Hinblick auf den höchsten dargestellten Schärfegrad ergibt sich damit ein Oligomer/Polymer-Anteil von 94,3 % (MS) bzw. rund 77 % (CS) für die untersuchten Extrakte (KRAFFT et al., 2021). Schärfere Prozessbedingungen zeigen damit einen deutlichen Einfluss auf den Anteil der Monomere im Extrakt.

Übereinstimmende Ergebnisse zeigen beispielsweise RUIZ et al. (2008) für SE von Sonnenblumenstängeln. Die Autoren geben an, dass ein Großteil (90 %) der Kohlenhydrate als Oligomere vorliege. Erst bei dem höchsten verwendeten Schärfegrad (230 °C, 5 min) wird ein signifikanter Anteil an gelösten Monomeren beschrieben. SHEVCHENKO et al. (2000) zeigen ähnliche Ergebnisse und beschreiben, bedingt durch den Oligomeranteil, eine limitierte, direkte Fermentationsfähigkeit. Zum Abbau der Oligomere wird als Lösung eine mögliche Posthydrolyse der Extrakte aufgezeigt (SHEVCHENKO et al., 2000; GARROTE et al., 2001; RUIZ et al., 2008). KUMAR und WYMAN (2009) zeigen zudem eine inhibitorische Wirkung von Xylooligomeren auf Cellulasen. Abschließend ist daher eine individuelle Betrachtung auf den Prozess und nachgelagerte Verwendungen notwendig, um zu entscheiden ob Oligomere im Extrakt jeweils vorteilhaft oder nachteilig sind.

Die Molmassen der lyophilisierten Extrakte wurden ebenso exemplarisch für das Maisstroh DE 1 und die Extrakte der Maissilage bestimmt. Die ermittelten Molmassen für Maisstroh- und Maissilage-Proben sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Durchschnittliche Molmassen ( $M_w$ ) in g/mol und die jeweiligen Dispersitäten ( $\mathcal{D}$ ) für DE 1- und MS-Extrakte (KRAFFT et al., 2021).

Log $R_0$	DE 1		MS	
	$M_w$	$\mathcal{D}$	$M_w$	$\mathcal{D}$
2,77	7900	13,4	100.000	20,1
3,06	7500	10,3	60.400	20,5
3,36	6850	8,5	59.600	28,1
3,65	4900	5,6	44.000	30,6
3,94	1100	2,1	12.900	13,4

Dies dient der weiteren Charakterisierung, aber auch der Ergänzung der Abschätzungsmöglichkeiten zu Verwendungsarten der Extrakte. Die Molmasse wird beispielsweise, neben anderen Faktoren, als eine Einflussgröße der Stabilität von Emulsionen beschrieben (MIKKONEN et al., 2009). In diesem Zusammenhang sind Experimente zur Erhöhung der Stabilität von Emulsionen auf Basis von holzbasierten Hemicellulosen in der Literatur dokumentiert (MIKKONEN et al., 2019). In den dargestellten Daten zeigt sich jeweils eine Verringerung der Molmassen bzw. eine Reduktion der Kettenlänge der Kohlenhydrate im Extrakt. Die deutlich höheren Molmassen der Maissilage-Extrakte gehen auf gelöste Stärke und deren Fragmenten im Extrakt zurück (KRAFFT et al., 2021). Die Reduktion der Molmassen mit steigenden Prozessbedingungen wurde schon in früheren Arbeiten von PULS et al. (1985) dargestellt. Untersuchungen durch MONTANÉ et al. (1998) an Waschwasser von Weizenstroh nach SE, ähnlich den hier dargestellten Extrakten, zeigen einen Rückgang der Molmasse von 11.000 g/mol ( $\log R_0 = 3,39$ ) hin zu 400 g/mol ( $\log R_0 = 4,13$ ), was ebenso mit Depolymerisationsreaktionen begründet wird.

Für Verwendungszwecke, in denen hohe oder höhere Molmassen gefordert werden, sind daher niedrigere Schärfegrade als vorteilhaft zu bewerten. Die hohen Molmassen der Maissilage-Extrakte könnten weiterhin, im Vergleich zu den Maisstroh-Extrakten, zu höheren Stabilitäten von bspw. Emulsionen führen. Gezielte Untersuchungen zur stofflichen Verwendung der Extrakte, bspw. zur Stabilisierung von Emulsionen, müsste allerdings in weiterführenden Untersuchungen bearbeitet und dargestellt werden.

#### 4.2.4 Ligningehalte in Extrakt und Faserstoff

Im Rahmen der Analytik von Faserstoff und Extrakt wurden neben den Kohlenhydraten ebenso die Ligningehalte, ermittelt als säureunlösliche Bestandteile nach zwei- bzw. einstufiger, saurer Hydrolyse, erfasst. Der Rückstand nach zweistufiger Hydrolyse kann in diesem Fall in etwa mit dem Klason-Ligningehalt gleichgesetzt werden (DEUTSCHLE, 2015).

Im Folgenden werden die auf den eingesetzten Rohstoff bereinigten Ergebnisse dargestellt. Diese geben eine bessere Übersicht über die für den Gesamtprozess relevante Ligninverteilung wieder, da die auf Faserstoff und Extrakt basierenden Werte hauptsächlich durch die Fraktionszusammensetzung und Ausbeute beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass es einen Anstieg des Ligningehaltes bezogen auf den Faserstoff mit steigendem Schärfegrad gibt. Dies wird mit dem Übergang der Hemicellulosen in die Extraktfraktion begründet (KRAFFT et al., 2020a). Dieser Zusammenhang wird auch durch Werte und Vergleiche in der Literatur bestätigt (BURA, 2004; CHANDRA et al., 2007). Durch die Veränderung der Gesamtzusammensetzung ergibt sich eine relative Zunahme des Lignins, die nicht als absolute Zunahme in der Gesamtbilanz fehlinterpretiert werden darf, da die Menge unter Berücksichtigung der Ausbeute nahezu konstant bleibt. In Tabelle 12 sind die Ligningehalte der verschiedenen Rohstoffe bei den unterschiedlichen Dampfdruck-Aufschlüssen bezogen auf den eingesetzten Rohstoff dargestellt. Für weitere Maisstroh- und Maissilage-Werte, die nicht in den nachfolgenden Schärfegradbereich passen, sei an dieser Stelle auf die vorliegenden Publikationen verwiesen (KRAFFT et al., 2020a; KRAFFT et al., 2020b).

*Tabelle 12: Ligningehalt der dampfdruckbehandelten Faserstoffe (in % bez. auf Rohstoffeinsatz) für die verschiedenen Rohstoffe mit steigenden Schärfegraden. Lignin = Hydrolyserückstand nach zweistufiger, saurer Hydrolyse.*

Log R <sub>0</sub>	Maisstroh			MS	MSS
	DE 1	DE 2	China		
2,77	17,3	15,6	15,5	12,0	-
3,06	18,5	14,0	15,5	11,0	-
3,36	19,0	14,4	15,0	9,3	-
3,53	18,9	15,4	-	9,8	12,4
3,65	15,8	11,0	15,2	9,4	13,1
3,94	18,8	14,3	16,5	9,3	15,0

Durch die Verrechnung der Ligningehalte mit den Faserstoffausbeuten zeigt sich, dass das Lignin durch den Dampfdruckaufschluss in seinem Gesamtgehalt nicht beeinflusst wird und nahezu vollständig im Faserstoff verbleibt. Dies stimmt auch mit Betrachtungen aus der Literatur überein, in welchen für dampfvorbehandeltes Holzmehl keine Abnahme des Ligningehaltes festgestellt wurde (LI et al., 2005). HAGEL und SAAKE (2020) zeigen für Dampfdruckaufschlüsse mit Pappel und Fichte ebenfalls, dass das Lignin im Faserstoff erhalten bleibt. Übereinstimmende Werte um 20 % für dampfdruckbehandeltes Maisstroh werden beispielsweise durch TAKADA et al. (2019) dargestellt. Auch hier ist zwischen Rohstoff und den Faserstoffen nach der Vorbehandlung nur ein leichter Rückgang des Ligningehaltes zu verzeichnen. Neben einer leichten Abnahme des Lignins

sind ebenso Furan-Kondensationen als Nebenreaktion im Prozess zu benennen. Weiterhin findet sich eine große Übereinstimmung mit den in Tabelle 7 dargestellten Ligningehalte der Rohstoffe, was ebenfalls belegt, dass das Lignin im Faserstoff verbleibt und den in Abschnitt 2.5.2 präsentierten Agglomerations-Reaktionen unterliegt.

Im Unterschied zu den Faserstoffen, die wie dargelegt den Hauptteil des ursprünglich im Rohstoff vorhandenen Lignins beinhalten, weisen die Extrakte deutlich niedrigere Hydrolyserückstände auf. Diese sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Hydrolyserückstand nach einstufiger, saurer Hydrolyse (in % bez. auf Rohstoffeinsatz) der durch Dampfdruckaufschluss gewonnenen Extrakte.

Log R <sub>0</sub>	Maisstroh			MS	MSS
	DE 1	DE 2	China		
2,77	1,7	3,0	2,7	1,3	-
3,06	2,6	2,7	2,4	1,8	-
3,36	3,0	3,0	2,6	3,9	-
3,53	2,6	4,2	-	2,8	4,7
3,65	2,6	3,5	4,1	4,2	3,3
3,94	0,5	3,9	4,1	5,2	4,0

Die Hydrolyserückstände der Extrakte zeigen im Vergleich zu den Faserstoffen ein inhomogeneres Bild. Dies lässt sich auch in Literaturwerten für Hydrolyserückstände in den Extrakten belegen (HAGEL und SAAKE, 2020). Das Maisstroh DE 1 weist eine Zunahme bis zu  $\log R_0 = 3,36$ , gepaart mit einer anschließenden Abnahme des Rückstands auf. Maisstroh DE 2 und CHN, sowie die MSS zeigen nahezu gleichbleibende bis leicht steigende Werte mit zunehmendem Schärfegrad. Diese Beobachtung wird auch durch HAGEL und SAAKE (2020) dargestellt. Dem entgegen stellt sich für die Maissilage eine Zunahme des Rückstands dar, der mit der Abnahme im Faserstoff verbunden werden kann. Möglicherweise ist dies, bedingt durch den hohen Kohlenhydratgehalt im Extrakt, auf Abbaureaktionen der Kohlenhydrate und die Bildung von sog. „Pseudo-Lignin“ zurückzuführen.

Aufsummierungen der gefundenen Hydrolyserückstände in Extrakt und Faserstoff der Maisstroh-Varianten führen im Vergleich zu den Gesamt-Hydrolyserückständen (säureunlöslich und säurelöslich) im Rohstoff zu einer Zunahme von bis zu 3,3 %-Punkten (CHN,  $\log R_0 = 3,94$ ) bzw. unter Bezug auf allein die säureunlöslichen Rückstände zu einem Anstieg von bis zu 5,7 %-Punkten. Maissilage zeigt sogar, bezogen auf die säureunlöslichen Rückstände, einen Anstieg um 55,9 % bzw. 5,2 %-Punkte. HAGEL und SAAKE (2020) beschreiben in der Massebilanz von Dampfdruckaufschlüssen bei diesem Schärfegrad ebenfalls eine Zunahme der

bestimmbaren Ligninmengen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung kann die o. g. Bildung von Pseudo-Lignin im Prozess sein, die auch in der Literatur beschrieben ist (SANNIGRAHI et al., 2011; HU et al., 2012; SHINDE et al., 2018; AARUM et al., 2018).

#### 4.2.5 Entwicklung der pH-Werte im Extrakt

Das pH-Milieu der Extrakte und dessen Entwicklung über den sich verändernden Schärfegrade stellt einen relevanten Aspekt in Bezug auf die möglichen Reaktionen des Prozesses dar. Maßgeblich für die Entwicklung des pH-Wertes ist die in Abschnitt 2.5.2 beschriebene Autohydrolyse mit der Freisetzung von Essigsäure und damit einhergehend weiteren hydrolytischen Reaktionen unter sauren Bedingungen. Die im Extrakt ermittelten pH-Werte nach dem Dampfdruckaufschluss sind daher in Abbildung 21 dargestellt.

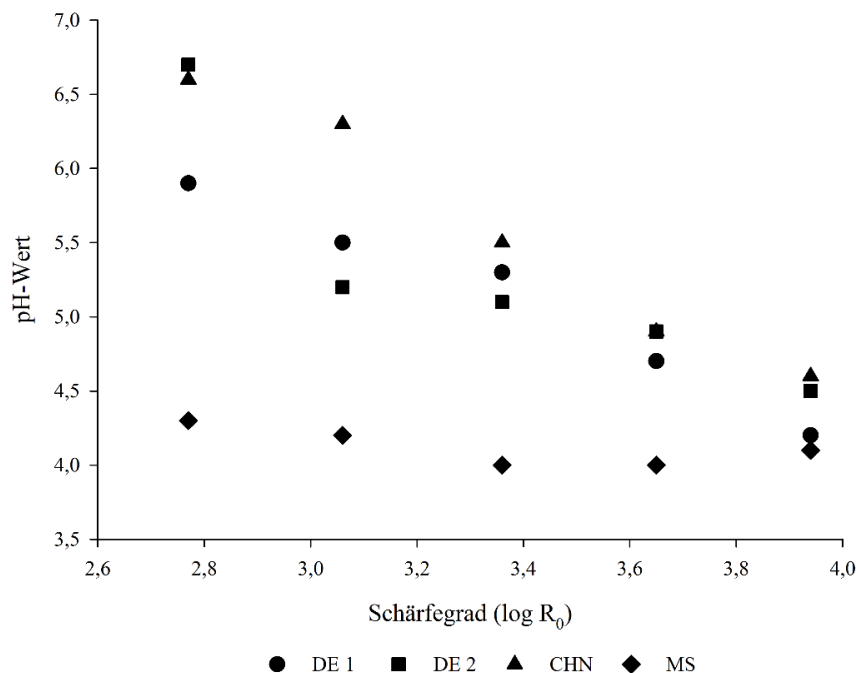


Abbildung 21: Illustration der in der Extraktfraktion ermittelten pH-Werte für die verschiedenen Rohstoffe in Abhängigkeit vom Schärfegrad des Aufschlusses.

Die dargestellten pH-Werte zeigen in Bezug auf die Maisstroh-Varianten eine klare Entwicklung. Startend bei Werten zwischen pH 6–7 im Bereich von  $\log R_0 = 2,77$  findet ein stetiger Abfall bis zu pH 4,5 bei  $\log R_0 = 3,94$  statt. Anfängliche Unterschiede der Rohstoffe gleichen sich bei schärferen Prozessbedingungen weitgehend aus. Untersuchungen bei höheren Schärfegraden (DE 1,  $\log R_0 = 4,54$ ) ergaben pH-Werte von bis zu 3,98. HAGEL und SAAKE (2020) beschreiben ein ähnliches Verhalten mit steigendem Schärfegrad für die gewonnenen Extrakte nach einer Dampfdruckbehandlung

von Pappelholz-Hackschnitzeln und auch PULS et al. (1985) zeigen für Experimente mit Birke zwischen  $\log R_0 = 3,06$  und  $4,24$  einen Abfall des pH-Wertes von pH 4,3 auf pH 3,5.

ÖHGREN et al. (2007) nehmen in einer vergleichenden Studie zu amerikanischem und italienischem Maisstroh ebenso Bezug auf den pH-Wert in den Extrakten. Für Versuche bei  $190\text{ °C} / 5\text{ min}$  ( $\log R_0 = 3,35$ ) ohne Zusatz von  $\text{SO}_2$  stellen sie Werte von pH 3,94 und 4,31, je nach Maisstroh-Variante, fest. Ein niedrigerer pH-Wert beeinflusse weiterhin die Autohydrolyse, was zu leicht höheren Kohlenhydratgehalten in den Extrakten führe. Die Autoren beschreiben weiterhin zwei Hauptgründe für das Absinken des pH-Wertes an. Zum einen führt ein höherer Acetylgruppengehalt in den Rohstoffen durch Abspaltung der Essigsäure zu einem stärkeren Absinken des pH-Wertes in den Extrakten.

Weiterhin wurden durch die Autoren die unterschiedliche Pufferkapazität der Rohstoffe untersucht und in Betracht gezogen. ÖHGREN et al. (2007) führten dazu  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Titrationen der zwei verwendeten Rohstoffe durch. Diese wiesen initiale pH-Werte von pH 7,2 (IT) und 5,7 (USA). Das italienische Maisstroh wies damit eine deutlich höhere Pufferkapazität gegen Säure auf als das amerikanische Maisstroh. Eine Bestimmung der Pufferkapazität der Rohstoffe stellt damit einen Parameter dar, welcher zukünftig ebenso bestimmt werden könnte, um pH-Entwicklungen im Aufschluss abschätzen und besser beurteilen zu können.

Auffallend ist die abweichende Entwicklung der Maissilage-Probe (vgl. Abb. 21). Durch die enthaltenen organischen Säuren ergibt sich bereits bei niedrigen Schärfegraden ein niedriger pH-Werte, der nur eine geringfügige weitere Abnahme zeigt. Für dampfdruckbehandelte Maissilage ( $150\text{ °C} / 60\text{ min}$ ,  $\log R_0 = 3,25$ ) beschreibt SCHOBER (2008) ebenfalls einen pH-Wert von  $4,0 \pm 0,1$ . Die anschließend durchgeführten Versuche mit MSS ( $\log R_0 = 3,53 - 3,65 - 3,94$ ) führten zu pH-Werten von 4,3–4,1. Diese können, wie auch bei der Maissilage, auf die vorausgegangene Silierung zurückgeführt werden.

### 4.3 Ligninextraktion der Faserstoffe

Zur Optimierung der EH wurden alkalische Ligninextraktionen am Rohstoff DE 1 exemplarisch durchgeführt, da grundsätzlich ein negativer Einfluss des Lignins auf die EH aus der Literatur bekannt ist (CHANG und HOLTZAPPLE, 2000). Die extrahierten Lignine wurden durch Fällung isoliert und anschließend die Ausbeuten und grundlegenden Charakteristika bestimmt. Anschließend wurden die EH-Ausbeuten der extrahierten Faserstoffe mit den EH-Ausbeuten der nicht extrahierten Maisstroh-Faserstoffe aus dem Dampfdruckaufschluss verglichen.

*Tabelle 14: Ausbeuten an Faserstoff und Lignin nach der Ligninextraktion, sowie Wiederfindung in Bezug auf die eingesetzte Menge an Faserstoff (KRAFFT et al., 2020a).*

Log R <sub>0</sub>	Faserrückstand	Lignin	Wiederfindung
	%		
2,77	73,9	0,8	74,7
3,06	74,2	1,1	75,3
3,36	72,0	7,8	79,8
3,53	71,5	13,6	85,1
3,65	75,4	15,6	91,0
3,83	71,0	20,6	91,6
3,95	72,1	22,5	94,6
3,94	70,3	23,5	93,8
4,12	70,7	25,3	96,0
4,25	70,2	26,5	96,7
4,24	64,9	29,0	93,9
4,41	67,6	28,1	95,7
4,54	67,4	27,8	95,2

Die Ausbeuten an Faserstoff und Lignin, die nach der alkalischen Ligninextraktion des DD-behandelten Maisstrohs DE 1 erhalten wurden, sind in Tabelle 14 dargestellt. Basierend auf den Ergebnissen lassen sich mit steigender Schärfe verschiedene Effekte erkennen. Der Faserrückstand nach der alkalischen Extraktion zeigt hierbei eine leichte Abnahme von 73,9 % auf 67,4 % mit steigender Behandlungsintensität des DD-Aufschlusses. Ebenfalls zeigt sich eine Zunahme des fällbaren Lignins. Bei der dem niedrigsten Schärfegrad zeigt sich kaum fällbares Lignin (0,8 %), wohingegen sich mit steigender Schärfe bis zu 29 % (log R<sub>0</sub> = 4,24), bezogen auf den anfänglich eingesetzten Rohstoff, fällen lassen. Als Hauptgründe für die Zunahme an fällbarem Lignin kann die Kondensation des Lignins bei höheren Temperaturen, aber auch die Bildung von Pseudolignin (LI et al., 2009) angeführt werden. Als Gründe für eine geringe Fällleistung

geben LI et al. (2009) beispielsweise eine hohe Wasserlöslichkeit der Lignine bzw. eine niedrige Molmasse der vorliegenden Lignine an.

Ein möglicher Zusammenhang der Fällungsausbeuten und der Molmasse der Lignine soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch mittels SEC untersucht werden. SCHÜTT et al. (2011) berichten über Steigerungen des aus der Faserfraktion fällbaren Lignins von dampfdruckbehandelter Pappel mit steigender Schärfe. Bezogen auf das initial im Faserstoff vorliegende Lignin zeigen die Autoren ab einem Schärfegrad von  $> \log R_0 = 4,5$  eine nahezu komplette Fällung des Lignins.

In Abbildung 22 wird die prozentuale Wiederfindung des fällbaren Lignins bezogen auf das initial im vorbehandelten Faserstoff vorhandene Lignin über den Schärfegradverlauf dargestellt. Unter Bezug auf das im Faserstoff verfügbare Lignin ergibt sich eine Steigerung der Wiederfindung der fällbaren Bestandteile von 3,8 % auf über 86 % ( $\log R_0 = 4,41$ ).

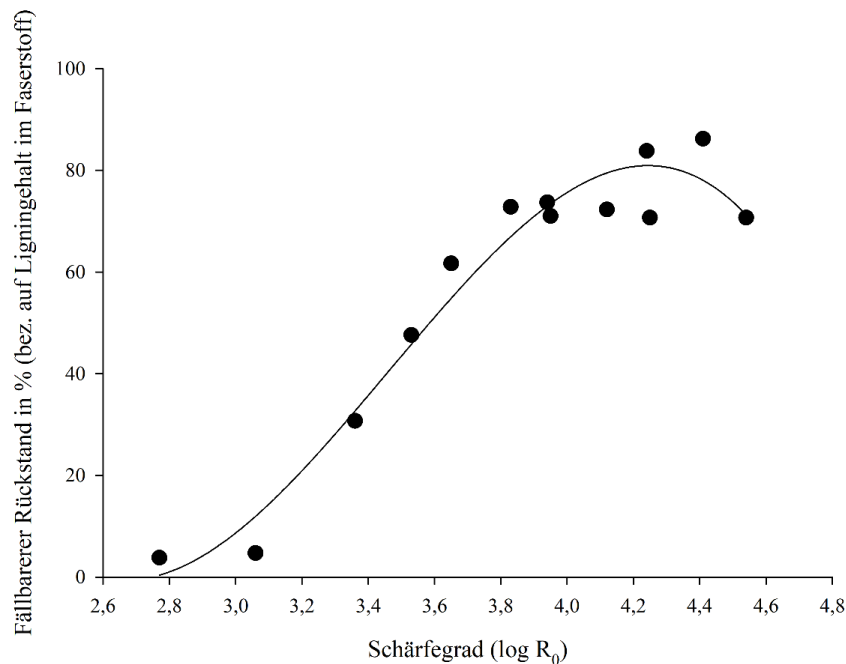


Abbildung 22: Prozentuale Wiederfindung der fällbaren Bestandteile im Vergleich zum initial im vorbehandelten Faserstoff ermittelten Hydrolyserückstände.

Die insgesamt ermittelten Werte liegen hierbei niedriger als die durch SCHÜTT et al. (2011) präsentierten Werte, zeigen aber einen ähnlichen Verlauf in Abhängigkeit vom ansteigenden Schärfegrad. Ein Zusammenhang der Fällungsausbeute mit der ermittelten Molmasse der extrahierten Lignine wird in den folgenden Abschnitten betrachtet.



### 4.3.1 Charakterisierung der Dampfdruck-Lignine aus Maisstroh

Die üblicherweise als Rückstand nach der EH vorliegenden Lignine sind vielfach durch Kohlenhydrate verunreinigt, was die hochwertige, stoffliche Verwendungen erschwert (SCHÜTT, 2012). Der Prozess der vorgeschalteten alkalischen Extraktion erlaubt die Gewinnung von reineren Ligninen, die allerdings trotzdem durch im dampfdruckbehandelten Faserstoff enthaltenen Hemicellulosen, die ebenfalls mit dem Lignin extrahiert werden, verunreinigt sein können. Aus diesem Grund wurden die Kohlenhydrate der extrahierten Lignine untersucht, um deren Qualität beurteilen zu können.

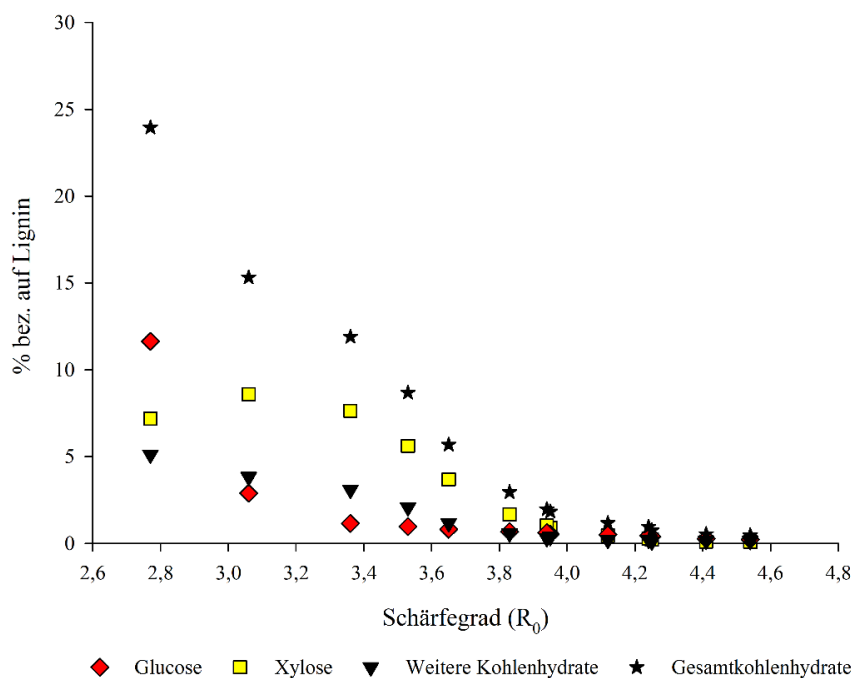


Abbildung 23: Einfluss des Schärfegrades auf die Verunreinigungen der extrahierten Lignine durch Kohlenhydrate bezogen auf das untersuchte Lignin (KRAFFT et al., 2020a).

Vorstehende Darstellung (Abb. 23) gibt die in den NaOH-Ligninen festgestellten Glucose- und Xylosegehalte an. Ferner ist der Abbildung die Aufsummierung der weiteren Kohlenhydrate (Arabinose, Mannose, Galaktose, Rhamnose) und der Gesamtkohlenhydratgehalt zu entnehmen. Sichtbar wird hierbei eine klare Abnahme des Gesamtkohlenhydratgehaltes mit steigendem Schärfegrad. Eine anfängliche Steigerung des Xylosegehaltes im Lignin im Bereich bis  $\log R_0 = 3,36$  kann mit einer möglichen LCC-Bindung der Xylane an das Lignin bei niedrigen Schärfegraden erklärt werden. Mit steigendem Schärfegrad werden die LCC gespalten und das Lignin liegt ohne Bindungen an das Xylan vor. Anschließend zeigen alle Kohlenhydrate eine starke Reduktion, da sie bereits im Dampfdruckaufschluss aus dem Faserstoff entfernt wurden. Diese führen bei

den höchsten Schärfegraden zu fast nicht mehr feststellbaren Kohlenhydratgehalten. SCHÜTT et al. (2011) zeigt in Bezug auf die Kohlenhydratkontaminationen eine übereinstimmende Entwicklung, wenn auch für die vorliegenden Pappel-Experimente höhere Xylangehalte beschrieben werden. In Daten für Fichten-, Kiefern-, Pappel- und Birkenlignine nach SE beschreiben LI et al. (2009) eine nahezu vollständige Reduktion der Kohlenhydrate im Lignin. Für eine einstufige SE, wie in der Arbeit genutzt, wird weitergehend kein Abbau der Cellulose im Prozess festgestellt. Anhand der vorliegenden Daten kann daher gezeigt werden, dass bei höheren Schärfegraden reinere Lignine erhalten werden.

Da nicht nur die Reinheit, sondern auch die Molmasse der extrahierten Lignine eine entscheidende Rolle für weitere Verwendungen dieses Nebenstroms darstellt, sollen im Folgenden ebenso die mittels SEC ermittelten mittleren Molmassen ( $M_w$ ) dargestellt und beschrieben werden. Exemplarisch wurden dafür extrahierte Lignine aus Faserstoffen mit einer Dampfdruckbehandlung von  $\log R_0 = 3,65$  bis  $4,25$  untersucht (Abb. 24).

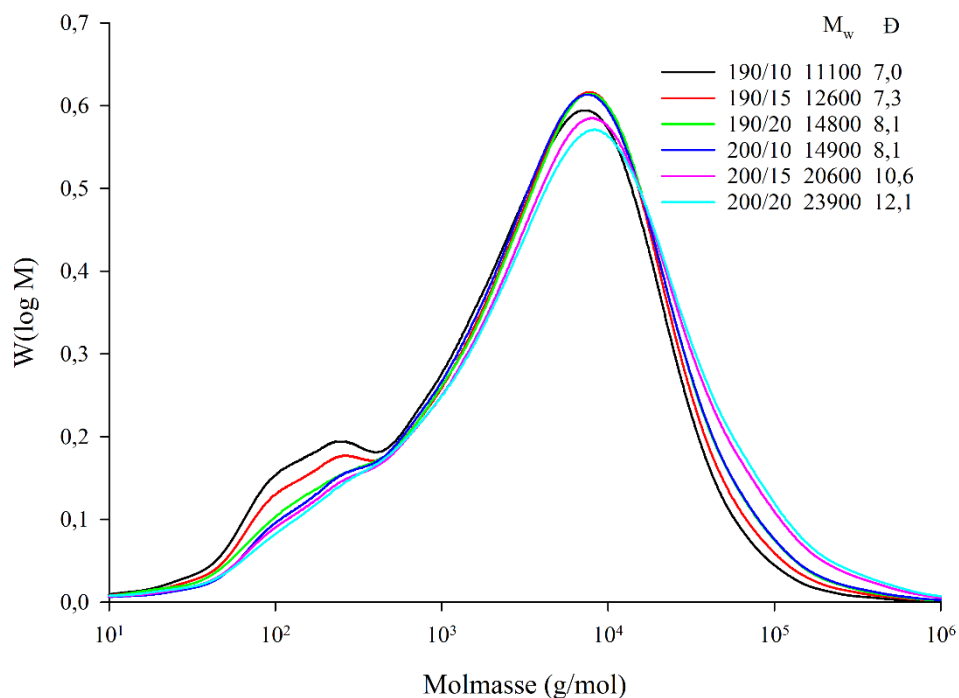


Abbildung 24: Ermittelte  $M_w$  (g/mol) und  $D$  der extrahierten Lignine aus dampfdruckbehandelten Faserstoffen, die im Bereich zwischen  $\log R_0 = 3,65$  und  $4,25$  erzeugt wurden (KRAFFT et al., 2020a).

Für die Molmassenverteilung der untersuchten Lignine zeigt sich grundsätzlich eine Zunahme der Molmasse mit zunehmendem Schärfegrad. Dies kann auf die bereits erwähnte Ligninkondensation unter schärferen Prozessbedingungen zurückgeführt werden (LI et al., 2007a). Dies erklärt auch die verbesserte Fällbarkeit der Lignine, die

aus unter schärferen Prozessbedingungen aufgeschlossenen Faserstoffen gewonnen wurden. In Abbildung 24 stellt sich eine Abnahme der vorderen Flanke und eine Zunahme der hinteren, breiteren Flanke im Bereich höherer Molmassen für die extrahierten Maisstroh-Lignine dar. Eine Verschiebung dieser Flanke und eine zunehmende Dispersität im Bereich höherer Schärfegrade zeigt ebenso SCHÜTT et al. (2011) für NaOH-Lignin dampfdruckbehandelter Pappel. Dabei ergeben sich  $M_w$  von 21.300 g/mol ( $\log R_0 = 4,01$ ) bis 51.600 g/mol ( $\log R_0 = 4,27$ ). SCHÜTT (2012) beschreibt in diesem Zusammenhang, dass Lignine mit hoher Dispersität und/oder hoher Molmasse für weiterführende Verwendungen weniger geeignet sind und gibt ein Optimum von  $\log R_0 = 4,0$  an, wo ein ausreichendes Maß an Zugänglichkeit der Biomasse für eine anschließende EH, verbunden mit ausreichenden Lignineigenschaften für deren weitere Verwendbarkeit gegeben sei. Präferiert sind dabei niedrige Kohlenhydratverunreinigungen, sowie eine niedrige Dispersität und Molmasse.

Da insbesondere die EH von Maisstroh große Potentiale bietet, werden in dem nachfolgenden Abschnitt grundlegende EH-Daten, aber auch Vergleiche der EH von extrahierten und nicht extrahierten Faserstoffen dargestellt.

#### 4.4 Enzymatische Hydrolyse der Faserstoffe

Im Folgenden werden die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse der bei unterschiedlichen Bedingungen vorbehandelten Substrate vorgestellt. Abschließend werden Daten besprochen, die nach der bereits beschriebenen alkalischen Ligninextraktion der vorbehandelten Faserstoffe zur Verbesserung der enzymatischen Hydrolysierbarkeit gewonnen wurden. In dem Drittmittelprojekt, in das die Promotion eingebunden war, wurde zusätzlich die EH mit konventionellen Enzymen mit einem neuartigen, bakterienbasierten Autodisplay-Enzymsystem verglichen (JOSE und MEYER, 2007; TOZAKIDIS et al., 2015; TOZAKIDIS, 2016). Diese Untersuchungen sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Zur Beurteilung von Rohstoff, Vorbehandlung und enzymatischer Hydrolyse erschien auch eine Betrachtung ohne Dampfdruck-Vorbehandlung als Referenz sinnvoll (Tab. 15). Wie alle Rohstoffe wurden die dampfdruckbehandelten Proben in der gleichen Art und Weise (50 µL  $\beta$ -Glucosidase (Novozyme 188), 350 µL Cellulase-Enzymmischung (Cellic<sup>®</sup> CTec2), 45 °C, 72 h) enzymatisch hydrolysiert (vgl. Abschnitt 4.4.2).

##### 4.4.1 EH ohne Vorbehandlung

Nachfolgende Tabelle 15 zeigt die ermittelten Kohlenhydratgehalte der enzymatischen Hydrolyse im Vergleich zu den theoretisch vorhandenen Kohlenhydraten in den verwendeten Rohstoffen.

*Tabelle 15: Die ermittelten Kohlenhydratgehalte nach EH (in % bezogen auf Rohstoff) und die prozentuale Umsetzung bezogen auf die theoretisch im unbehandelten Rohstoff vorhandenen Kohlenhydrate (vgl. Tab. 7).*

Substrat		Ausbeuten nach EH (%)			Hydrolyserate (%)		
		Glucose	Xylose	$\Sigma$	Glucose	Xylose	$\Sigma$
Maisstroh	DE 1	1,6	2,3	3,9	4,5	11,8	7,1
	DE 2	2,2	3,5	5,7	5,7	16,6	9,5
	CHN	15,1	2,2	17,3	48,2	12,4	35,3
MS		30,1	1,6	31,7	68,7	11,6	55,1
MSS		10,6	4,6	15,2	28,3	22,2	26,1

Für das getrocknete Maisstroh DE 1 zeigt sich mit 7,1 % die niedrigste Umsetzung bezogen auf die vorhandenen Kohlenhydrate. Der negative Effekt der Trocknung auf die EH ist beispielsweise durch IOELOVICH und MORAG (2011) beschrieben und wird auf trocknungsbedingte, kollabierte Porenvolumina zurückgeführt. Das nicht getrocknete Maisstroh DE 2 zeigt trotz den beschriebenen Gärungsreaktionen höhere Hydrolyseraten, was diese Annahme stützt. Weitere biotische / abiotische Einflüsse lassen sich allerdings nicht vollends ausschließen. Deswegen wurde beispielhaft ein Blindwert mit Puffer ohne

Zusatz von Cellulasen am Maisstroh DE 2 durchgeführt. Hierbei ergab sich keinerlei Auswaschung von Kohlenhydraten nach 72 h. Dies spricht gegen eine vorhergehenden mikrobiellen Abbau der Probe. SCHOBER (2008) berichtet für Maissilage ebenso über keinerlei messbaren Kohlenhydrate nach einer Inkubation ohne Enzympräparat.

Das chinesische Maisstroh zeigt abweichend von den Ergebnissen der vorangegangenen Maisstroh-Varianten hohe EH-Raten der Glucose (Tab. 15). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit zeigten sich bei diesem Rohstoff vermehrt abweichende Ergebnisse. Diese sind aller Voraussicht nach auf Unterschiede in Bezug auf Klima, Boden, Sorten und weitere biotische, wie abiotische Faktoren zurückzuführen. Kontrolliert siliertes Maisstroh zeigt im Vergleich zu nativem Maisstroh ebenso höhere enzymatische Glucoseausbeuten, die auf die Milchsäuregärung des Rohstoffes zurückgeführt werden können, die die enzymatische Zugänglichkeit erhöht und als Form einer „natürlichen Vorbehandlung“ interpretiert werden kann. Möglicherweise kann ein vorhergehender mikrobieller Abbau des Rohstoffes als Ursache für die Veränderung des chinesischen Maisstrohs angenommen werden. Abschließend zeigt die Maissilage hohe Glucose-Hydrolyseraten. Dies kann mit den in der Silage vorkommenden, stärkehaltigen Maiskörnern, der höheren Zugänglichkeit durch die Silierung und mit dem früheren Erntezeitpunkt erklärt werden, der zu einer geringeren Lignifizierung führt. Dies steht in grober Übereinstimmung mit Daten von SCHOBER (2008), die für dampfdruckbehandelte Maissilage (150 °C / 60 min, log R<sub>0</sub> = 3,25) Hydrolyseraten von 85 % für Glucose und 67 % für die Ausbeute an Monosachariden bei Verwendung eines optimierten, technischen Misch-Enzympräparates (85 % GC 880/ 15 % Novozyme 188) mit einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1 mg Protein / g TS der mittels SE vorbehandelten MS angibt.

Der Vollständigkeit halber ist anzumerken, dass die dargestellten Hydrolyseraten aller Voraussicht nach unterschätzt werden. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass während der enzymatischen Hydrolyse der unbehandelten Rohstoffe, insbesondere bei den feuchten Maisstrohsorten DE 2 und CHN, Gärungsreaktionen auftraten. Bei letztgenannten zeigte sich nach 72 Stunden eine sprudelnde Gasentwicklung mit charakteristischem, stechendem Geruch. Diese Spontangärung ist mit einem Eintrag von Mikroorganismen über den Rohstoff erklärbar. In diesem Zusammenhang sind diverse Pilze, Hefen, sowie Milch- und Essigsäurebakterien beschrieben, die auf Mais und in fermentierten Maisprodukten gefunden wurden (BEN OMAR und AMPE, 2000; CHAVES-LÓPEZ et al., 2020). Da durch deren Vermehrung während der spontan ablaufenden Reaktion Kohlenhydrate abgebaut werden, sollte die theoretische Hydrolyserate höher sein. Interessanterweise war diese Entwicklung nicht bei den Silageprodukten feststellbar, was an der schon bestehenden Dominanz der Milchsäurebakterien liegen könnte. Weiterhin zeigte das getrocknete Maisstroh ebenso ein geringeres Ausmaß des oben beschriebenen Effektes. Eine mögliche Inaktivierung

der Mikroorganismen während der Trocknung und Lagerung könnte dafür ursächlich sein. Für weitere vergleichende Untersuchungen zu diesem Aspekt könnte für zukünftige Experimente eine Sterilisation der Rohstoffe durchgeführt werden. Da die dampfdruckbehandelten Rohstoffe keine Gärungsreaktionen zeigen, käme eine Vorabsterilisation dem Aufschluss am nächsten, könnte aber ebenso zu ersten, leichten Abbaureaktionen führen.

#### 4.4.2 EH mit DD-Vorbehandlung

Vorausgehende Versuche mittels Celluclast® zeigten an dem vorbehandelten Maisstroh ein Optimum der EH nach einer DD-Behandlung bei  $\log R_0 = 4,41$ . Die Ausbeute, bezogen auf die theoretisch im Faserstoff vorhandenen Kohlenhydrate, betrug hierbei 87,2 % (BENDLER, 2018). Vergleichende Untersuchungen mit dem enzymatischen Nachfolgeprodukt Cellic® CTec2 zeigten schon hier, insbesondere bei niedrigeren Schärfegraden, erheblich bessere EH-Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde der Versuchsraum auf mildere Schärfegrade bis zu  $\log R_0 = 2,77$  erweitert (KRAFFT et al., 2020a). Die ermittelten EH-Ausbeuten sind in Abb. 25 dargestellt.

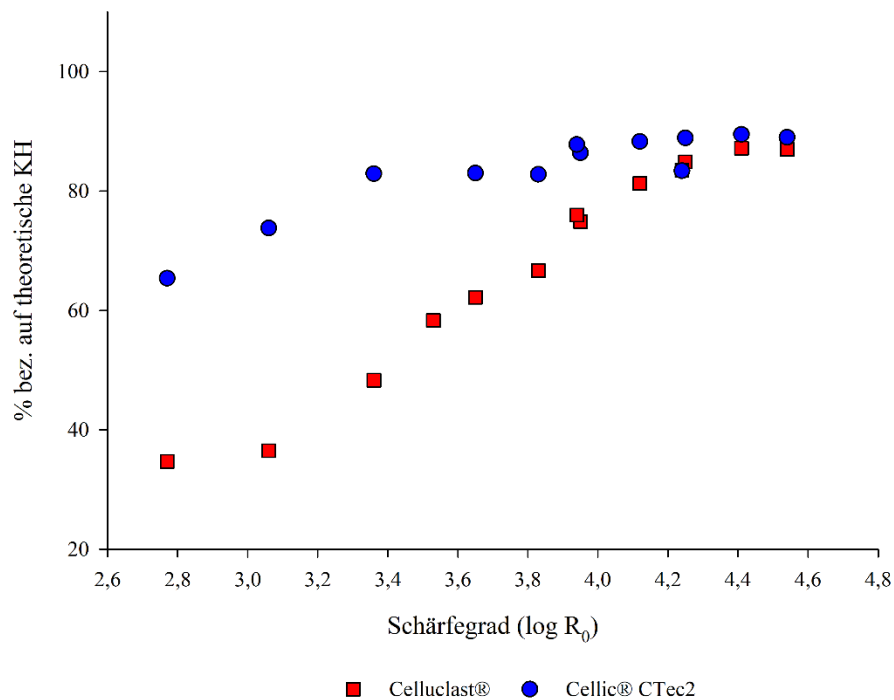


Abbildung 25: Einfluss des Schärfegrades auf die Kohlenhydrat-Ausbeuten (Glucose/Xylose) in Bezüge auf die theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate im enzymatisch hydrolysierten Faserstoff. Datenbasis: Celluclast®  $\log R_0 = 3,65-4,54$  (BENDLER, 2018); Celluclast®  $\log R_0 = 2,77-3,53$  (unpubliziert); Cellic® CTec2 (BENDLER, 2018; KRAFFT et al., 2020a).

Aus dem dargestellten Vergleich zeigt sich die erheblich verbesserte EH bei niedrigen Schärfegraden durch die Verwendung von Cellic® CTec2. RODRIGUES et al. (2015) zeigen als Erklärung eine im Vergleich zu Celluclast® erheblich höhere Aktivitäten von Cel7A, Cel7B und  $\beta$ -Glucosidasen. Weiterhin beschreiben sie eine grundlegend höhere Stabilität von Cel7B im Vergleich zu Cel7A und beschreiben ebenso für die  $\beta$ -Glucosidase aus Cellic® CTec2 eine höhere Stabilität als die auf *Aspergillus niger* basierende  $\beta$ -Glucosidase in Novozyme 188. Grundlegend ist die Entwicklung von Enzymen einer stetigen Optimierung unterlegen, wodurch ältere Daten aus der Literatur überprüft und wiederholt werden müssten. Zukünftig ist ebenso mit einer weiteren Optimierung der Enzympräparate auf Substrate und Prozesse zu erwarten.

Zurückgreifend auf Tabelle 15 zeigte das verwendete Maisstroh DE 1 ohne Vorbehandlung in der Hydrolyse mit Cellic® CTec2 eine Ausbeute von 7,1 %. Die Vorbehandlung, selbst bei niedrigen Schärfegraden, zeigt also bei beiden Enzymen einen deutlichen Effekt auf die Hydrolyse der Polysaccharide. Durch gesteigerte Zugänglichkeit des vorbehandelten Faserstoffs bei höheren Schärfegraden nähern sich die Ausbeuten im Verlauf an.

Folgende Abbildung 26 zeigt die ermittelten Ausbeuten für die zu vergleichenden Maisstroh-Varianten, sowie die EH-Daten der Maissilage in Abhängigkeit vom Schärfegrad der Dampfdruckbehandlung.

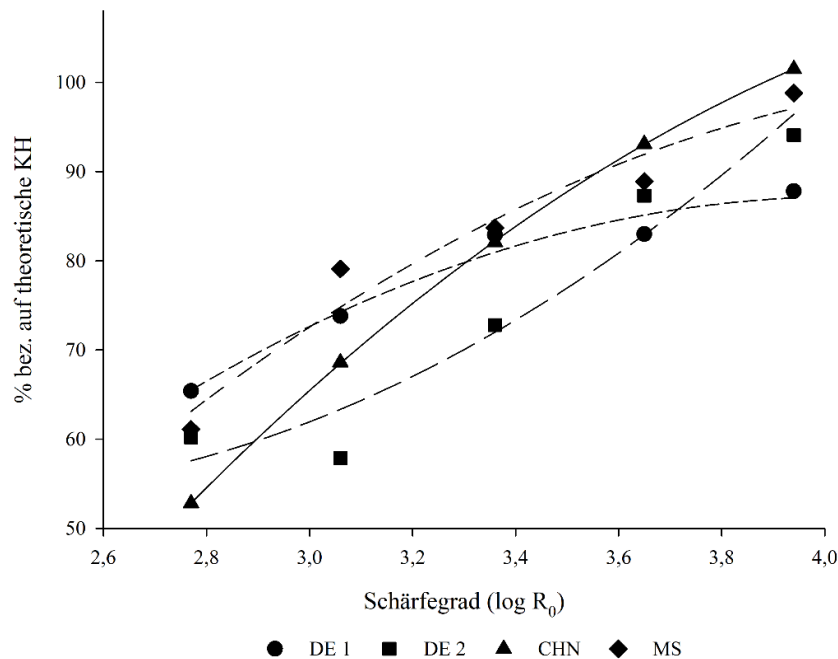


Abbildung 26: EH-Ausbeuten mit Cellic® CTec2 an verschiedenen Rohstoffen in Abhängigkeit vom Schärfegrad. Alle Werte sind bezogen auf die im vorbehandelten Faserstoff theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate (Glc/Xyl).

Da insbesondere Prozessbedingungen mit niedrigen Schärfe in Bezug auf die Ligninverwendung, aber auch Ausbeuteverluste durch Kohlenhydratabbau und die Energiebilanz eine entscheidende Rolle einnehmen, wurden die folgenden EH-Vergleiche der verschiedenen dampfdruckbehandelten Rohstoffe mittels Cellic® CTec2 durchgeführt. Diese sollen im Folgenden dargestellt, beschrieben und in Bezug auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede diskutiert werden.

Die Vorbehandlung führt bei allen Rohstoffen zu höheren EH-Ausbeuten. Bezogen auf die mittels zweistufiger saurer Hydrolyse ermittelten Kohlenhydrate im Faserstoff, finden sich nach einer Vorbehandlung bei 200 °C für 10 min (entspricht  $\log R_0 = 3,94$ ) Ausbeuten zwischen 87,8 % (DE 1) und 101,5 % (CHN). Ausbeuten von > 100 % sind hierbei bereits in der Literatur beschrieben. Sie beruhen darauf, dass bei der Rohstoffanalytik durch die zweistufige, saure Hydrolyse Abbaureaktionen an den Kohlenhydraten auftreten, die zu einer Unterschätzung der vorhandenen Kohlenhydrate führen. Bei einer EH kommen derartige Abbaureaktionen nicht vor. Bei einer perfekten, vollständigen Hydrolyse können daher Ausbeuten > 100 % ermittelt werden (XU et al., 2010; KRAFFT et al., 2020a). Mit einem steigenden Schärfegrad oberhalb  $\log R_0 = 3,94$  sind folgend nur noch geringe Steigerungen der EH-Ausbeute zu erwarten. Die Verbesserung der EH durch Vorbehandlungen ist umfassend in der Literatur beschrieben und findet sich im allgemeinen Teil dieser Arbeit. Speziell auf den in dieser Arbeit verwendeten Dampfdruck-Refiner-Aufschluss lässt sich die Steigerung der EH für verschiedene Substrate ebenfalls durch geeignete Literaturstellen bestätigen (SCHÜTT et al., 2011; SCHÜTT, 2012; SCHÜTT et al., 2013; JANZON et al., 2014; KRAFFT et al., 2020a; KRAFFT et al., 2020b).

Wie in vorausgegangenen Betrachtungen wurden ebenso die EH-Ausbeuten für vorbehandelte MSS untersucht. Diese zeigen im Bereich  $\log R_0 = 3,53 - 3,65 - 3,94$  Ausbeuten der EH von 89,8 % bis 96,5 %. Sie liegen damit höher als Maisstroh DE 1 und 2, gleichauf mit der verwendeten Maissilage und niedriger als Maisstroh CHN. Die ermittelten EH-Ergebnisse reihen sich in die bereits dargestellten EH-Ergebnisse ein und untermauern die aufgestellten Annahmen bspw. in Bezug auf den positiven Aspekt der Silierung oder einen mikrobiellen Abbau. Das chinesische Maisstroh zeigt bei hohen Schärfegraden die höchsten EH-Ausbeuten bezogen auf die theoretischen Kohlenhydrate im Faserstoff und damit verbunden auch die höchste enzymatische Zugänglichkeit. Die beiden silierten Substrate weisen leicht niedrigere Werte auf. Es zeigt sich allerdings auch in diesem Punkt die verbesserte Zugänglichkeit der Substrate durch den Silierungsprozess, die zu höheren EH-Ausbeuten führt. Das bayerischen Maisstroh DE 2, welches feucht gelagert und nicht luftgetrocknet wurde, weist im Vergleich höhere EH-Ausbeuten als getrocknetes Maisstroh auf. LIU et al. (2013) beschreiben dahingehend ebenso höhere EH-Ausbeuten für feucht gelagertes Maisstroh im Vergleich zu einer



Lagerung nach Lufttrocknung. Abschließend zeigt das getrocknete Maisstroh DE 1 die niedrigsten Werte bei  $\log R_0 = 3,94$ . Hervorzuheben ist hierbei, dass dieses Maisstroh bei  $\log R_0 = 2,77$  noch die höchste Ausbeute zeigte. Alternativ könnten die fehlenden Maisspindeln in dieser Maisstroh-Variante einen Einfluss auf die EH-Ausbeuten des Substrates haben, da diese bei niedrigen Schärfegraden Hemicellulosen liefern, die bei höheren Schärfegraden bereits degradiert werden.

#### 4.4.3 Einfluss der Ligninextraktion auf die nachfolgende EH

Die durchgeführte Ligninextraktion sollte die EH-Ausbeuten der dampfdruckbehandelten noch weiter verbessern. Gründe für die alkalische Extraktion der Faserstoffe von Maisstroh DE 1 in Bezug auf Verbesserung der EH und der dieser Arbeit zugrundeliegenden Projektarbeit wurden daher bereits dargelegt. Der für die Beurteilung relevante Vergleich der EH-Ausbeuten zwischen extrahiertem und nicht extrahiertem Maisstroh ist in Abbildung 27 dargestellt.

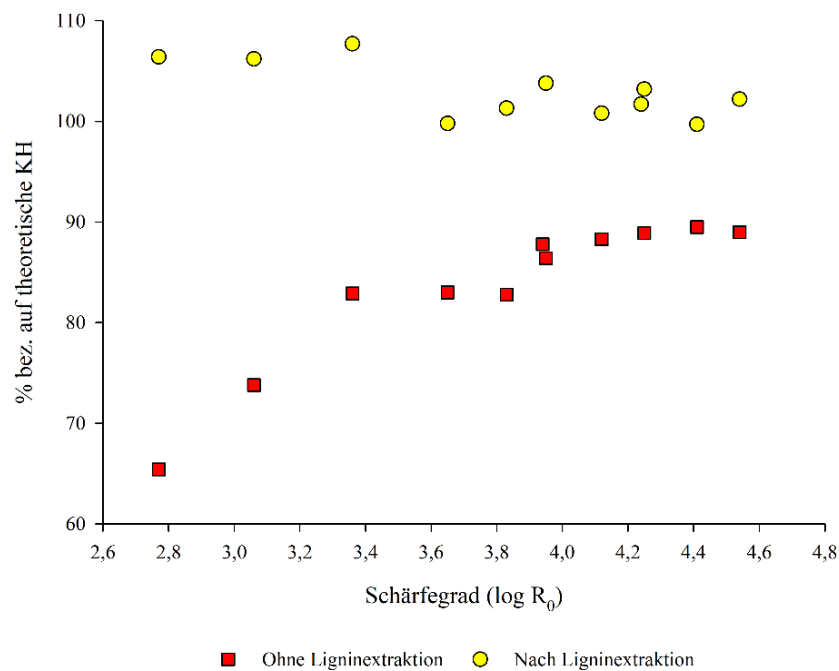


Abbildung 27: Einfluss der Ligninextraktion auf die EH von dampfdruckbehandeltem Maisstroh (DE 1). Ausbeuten sind auf die im verwendeten Faserstoff vorhandenen Kohlenhydrate bezogen (KRAFFT et al., 2020a).

Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigt das extrahierte Material eine weitaus größere Zugänglichkeit für enzymatische Abbauten als das nicht extrahierte Material. Bei den niedrigsten Schärfegraden ( $\log R_0 = 2,77$ ) zeigen sich bis zu 106,4 % Ausbeute, bezogen auf die theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate. Die analytische Begründung zu Ausbeuten > 100 % wurde dahingehend bereits dargestellt (vgl. Abschnitt 4.4.2).

Grundsätzlich zeigt sich in den dargestellten Daten, dass eine alkalische Extraktion den Einfluss des Schärfegrades auf die EH-Ausbeuten verringert und nach einer alkalischen Ligninextraktion auch bei milden Bedingungen alle theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate für eine EH verfügbar sind. Vor diesem Hintergrund ist zu erwähnen, dass Verfahren mittels Alkali ebenso als eigenständige Vorbehandlungsmethoden beschrieben werden (CHEN et al., 2013). Prozesse mit einer alkalischen Extraktion würden so deutlich mildere Prozessbedingungen, eine zusätzlich verwertbare Ligninfraktion, verbunden mit vergleichsweise hohen Faserstoffausbeuten ermöglichen. Nicht vernachlässigt werden darf an dieser Stelle der gegenüberstehende Chemikalieneinsatz und der Aufwand für weitere Prozessschritte, wie das Fällen des Lignins. Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle auf vergleichenden Untersuchungen von Autodisplay-Cellulasen und kommerziellen Produkten hingewiesen werden (KRAFFT und SAAKE (2020)). Hier zeigte sich ebenso eine Erhöhung der Umsätze, verbunden mit einer Verschiebung des Optimums hin zu niedrigeren Schärfegraden ( $\log R_0 = 3,53$ ).

SCHÜTT et al. (2011) und SCHÜTT (2012) zeigen ein durchaus unterschiedliches Verhalten der enzymatischen Glucoseausbeuten für Faserstoffe vor und nach einer alkalischen Extraktion. Diese Betrachtung wurde, ergänzt durch die Xyloseausbeuten für beide Prozessvarianten im Folgenden aufgegriffen (Abb. 28) und soll im kurz dargestellt werden.

Durch die Differenzierung der nach der enzymatischen Hydrolyse betrachteten Hauptkohlenhydrate lassen sich weitere Entwicklungen darstellen. Sichtbar wird in Hinblick auf die Glucoseausbeute (Abb. 28A), bezogen auf die Glucose im Rohstoff, dass der höchste Einfluss der alkalischen Extraktion im Bereich niedrigerer Schärfegrade  $< \log R_0 = 4,0$  liegt. Die Verbesserung der Zugänglichkeit durch die alkalische Extraktion geht mit steigender Schärfe verloren. SCHÜTT (2012) berichtet sogar über abnehmende Glucoseausbeuten mit steigender Schärfe und anschließender Extraktion bei dampfdruckbehandeltem Pappelholz. Die angegebene Begründung stellt die simultane Extraktion niedermolekularer Cellulose dar, die anschließend nicht mehr für die EH zur Verfügung stehe. Dieses Verhalten der Glucose konnte für die betrachteten Faserstoffe nicht gefunden werden. Die Unterschiede in den Xylosegehalten (Abb. 28B) ist dabei im dargestellten Vergleich weniger deutlich ausgeprägt. Im Bereich niedriger Schärfegrade zeigt sich ebenso eine Erhöhung der Xyloseausbeuten nach der Extraktion. Mit steigendem Schärfegrad nimmt der Unterschied in der Xylose-EH-Ausbeute ab und zeigt über den Verlauf vielmehr geringere Ausbeuten für den extrahierten Faserstoff. Dies kann ebenso mit der Extraktion verbliebener Hemicellulosen aus dem Faserstoff erklärt werden, die für eine nachfolgende EH nicht mehr zur Verfügung stehen.

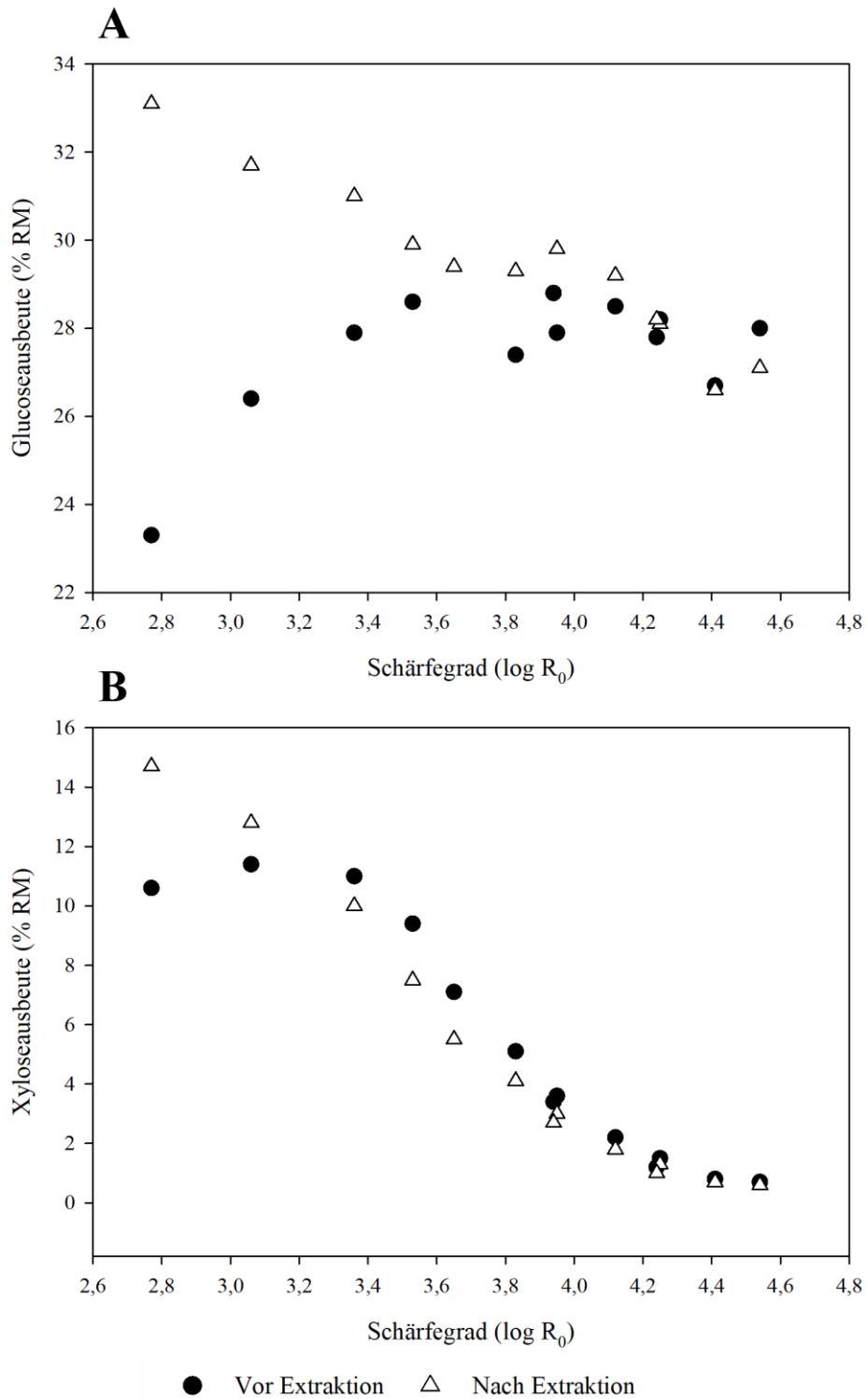


Abbildung 28: Glucose- (A) und Xyloseausbeuten (B) nach der enzymatischen Hydrolyse von extrahierten und nicht extrahierten Faserstoffen bezogen auf den eingesetzten Rohstoff (KRAFFT et al., 2020a).

#### 4.5 Gesamtkohlenhydratbilanzen

Zur Gesamtbetrachtung der Kohlenhydratbilanz des Prozesses in Abhängig vom Schärfegrad werden abschließend Gesamtbilanzen dargestellt. Dies dient auch dazu, Prozess-Optima zu ermitteln. Daher werden im Folgenden Summierungen der EH-Ausbeuten der Faserstoffe und der einstufigen Hydrolyseergebnisse der Extrakte, bezogen auf den eingesetzten Rohstoff, dargestellt. Dies ist für die Beurteilung des Gesamtprozesses sinnvoll, da eine Verwertung der Extrakte, neben der Nutzung der monomeren Kohlenhydrate aus den Faserstoffen, erforderlich ist. Ähnliche Betrachtungen wurden von SCHÜTT et al. (2011) durchgeführt.

Tabelle 16 stellt daher eine Übersicht und Summierung der Daten aus DD-Aufschlüssen von Maisstroh DE 1 und der Maissilage (MS) dar. Dazu werden die Glucose- und Xylose-Werte aus den Extrakten und aus der enzymatischen Hydrolyse der Faserstoffe zusammengefasst.

*Tabelle 16: Kohlenhydrate aus der einstufigen Hydrolyse der Extrakte, der enzymatischen Hydrolyse der Faserstoffe, sowie die Summe der Gesamtkohlenhydrate, bezogen auf Rohstoff (KRAFFT et al., 2020a; KRAFFT et al., 2020b). Optima sind fett dargestellt.*

log R <sub>0</sub>	DE 1					MS				
	Extrakthydr.		Faser EH			Extrakthydr.		Faser EH		
	Glc (%)	Xyl (%)	Glc (%)	Xyl (%)	Σ (%)	Glc (%)	Xyl (%)	Glc (%)	Xyl (%)	Σ (%)
1,59						28,6	0,7	12,6	2,7	44,6
1,88						30,2	0,7	9,9	2,9	43,7
2,18						30,9	0,8	11,9	3,7	47,3
2,47						32,9	1,3	11,7	4,4	50,3
2,77	2,2	0,7	23,3	10,6	36,8	34,2	1,9	12,7	5,2	54,0
3,06	2,3	1,6	26,4	11,4	41,7	32,0	3,7	14,1	5,1	54,9
3,36	2,2	3,6	27,9	11,0	44,7	36,4	6,7	14,4	3,8	61,3
<b>3,53</b>	2,5	6,9	28,6	9,4	<b>47,4</b>	34,0	6,6	15,2	3,0	58,8
<b>3,65</b>	1,5	6,3	26,4	7,1	41,3	37,8	7,0	15,1	2,6	<b>62,5</b>
3,83	1,6	6,8	27,3	5,1	40,8	34,1	6,9	16,2	2,1	59,3
3,94	1,7	7,2	28,8	3,4	41,1	33,9	6,4	15,9	1,7	57,9
4,12	1,4	4,2	28,5	2,2	36,3	30,6	5,1	16,9	1,5	54,1
4,25	1,1	2,5	28,2	1,5	33,3					
4,24	1,1	2,7	27,8	1,2	32,8					
4,41	0,8	1,5	26,7	0,8	29,8					
4,54	0,7	1,3	28,0	0,7	30,7					

Sichtbar wird ein Gesamtoptimum für den Rohstoff DE 1 bei einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,53$ . BENDLER (2018) fand bei Voruntersuchungen an diesem Rohstoff ein Optimum bei  $\log R_0 = 3,65$  verbunden mit dem Hinweis, dass Optima bei niedrigeren Schärfegraden möglich seien. Diese Hypothese konnte mit der Erweiterung des Versuchsraums bestätigt werden.

Nach Alkaliextraktion der Faserstoffe des Rohstoffs DE 1 liegt das Optimum bei  $\log R_0 = \leq 2,77$  (KRAFFT et al., 2020a). Da das Optimum am Rand des Versuchsraumes gefunden wurde, ist ein Gesamtkohlenhydrat-Optimum bei Schärfegraden  $< \log R_0 = 2,77$  nicht auszuschließen.

Im Vergleich zum Maisstroh DE 1 liegt das Optimum für Maissilage bei  $\log R_0 = 3,65$ . Hier zeigt sich ebenso wie für DE 1 erst eine Zu- und anschließend eine Abnahme der Gesamtausbeute mit steigendem Schärfegrad. Weitergehend wurden ebenso die Optima der Kohlenhydratbilanz für die zwei weiteren Maisstroh-Varianten ermittelt. Das Optimum des Maisstrohs DE 2 liegt im verwendeten Prozess mit 51,2 % bei  $\log R_0 = 3,94$ . Die Variante CHN zeigt ein Optimum mit 44,5 % bei  $\log R_0 = 3,36$ . Die Prozessoptima sind abhängig von der jeweiligen Fragestellung und müsste für weitergehende Untersuchungen, sowie für ökonomische Betrachtungen jeweils weiter betrachtet werden. Ökonomische Betrachtungen sind dabei nur wenig in der Literatur vorhanden. SCHOBER (2008) legt dahingehend für den durchgeführten Dampfdruckaufschluss ( $\log R_0 = 3,25$ ) von Maissilage dar, dass dieser wirtschaftlich nicht interessant sei, da eine Stoffdichte (SD) von maximal 2 % ökonomisch nicht darstellbar ist.

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit der MSS lagen für die Untersuchungen nur Rohstoffmengen für drei Versuchspunkte vor. Aufgrund der vorgenannten Ergebnisse für die weiteren Substrate wurden für diesen Aspekt die Schärfegrade  $\log R_0 = 3,53 - 3,65 - 3,94$  ausgewählt. Von diesen drei Prozessbedingungen wurde für die MSS das beste Ergebnis bei  $\log R_0 = 3,65$  ermittelt. Hier wurden 49,8 % der Glucose und Xylose bezogen auf den eingesetzten Rohstoff erhalten. Aus den ermittelten Werten ergibt sich ein Bereich der Optima für die verwendeten Maisstroh-, Maissilage- und Maistrohsilage-Varianten. Dieser Bereich kann mit  $\log R_0 = 3,36-3,94$  angegeben werden, in welchem die Optima substratspezifisch schwanken. Der Einfluss der Silierung kann aus den vorliegenden Daten nicht endgültig beurteilt werden. Hierfür wäre das Originalsubstrat verbunden mit seiner silierten Variante notwendig, um detailliertere Schlüsse zu möglichen Verschiebungen der Optima ziehen zu können. Zum Vergleich der ermittelten Optima mit der Literatur zeigt SCHÜTT et al. (2011) für Pappelholz den Bereich der höchsten Kohlenhydratausbeuten zwischen  $\log R_0 = 4,01$  und 4,75. Bei den schärfsten Prozessbedingungen (220 °C, 30 min,  $\log R_0 = 5,01$ ) zeigen sich in den dargestellten

Daten wieder abnehmende Gesamtkohlenhydrate. Neben dem Einfluss des verwendeten Enzyms könnten agrarische Rest- und Nebenprodukte daher tendenziell mit niedrigeren Schärfegraden aufschließbar und leichter zugänglich sein. Dies müsste in weiteren vergleichenden Untersuchungen untersucht werden.

#### **4.6 Inhibitoren und Degradationsprodukte**

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden die ermittelten Degradationsprodukte der Hex- und Pentosen, aber auch des Lignins unter dem Einfluss steigender Schärfe dargestellt werden. Bekannt ist, wie bereits in Abschnitt 2.6. beschrieben, dass diverse Abbauprodukte negative Einflüsse auf die EH resp. eine anschließende Fermentation zu weiteren Plattformchemikalien haben können (TENGBORG et al., 2001). Vor diesem Hintergrund zeigen frühe Zusammenfassungen von ANDO et al. (1986), dass cellulase-inhibierende Komponenten wasserlöslich sind und nur zu einem sehr kleinen Teil in der Faserfraktion erscheinen. Die Verwendung der hemicellulose- und inhibitorreichen Extraktfraktion ist daher deutlich weniger dokumentiert als die der cellulosedominierten Faserfraktion. Gründe sind die herausforderndere Fermentation der C5-Fraktion und das Vorhandensein der dargestellten Inhibitoren im Extrakt (CUBAS-CANO et al., 2018; CUBAS-CANO et al., 2020).

CANTARELLA et al. (2004b) beschreiben in Bezug auf Hauptinhibitoren niedermolekulare Säuren, die Abbauprodukte der Kohlenhydrate sowie des Lignins. Innerhalb dieser Übergruppen werden elf Komponenten beschrieben, die einen signifikanten Einfluss auf weitere Verarbeitungswege haben. Bei diesen Komponenten handelt es sich um zwei organische Säuren (Essig- und Ameisensäure), zwei Furanderviate (5-HMF und Furfural) und sieben phenolische Bestandteile (ZHANG et al., 2013). Die Konzentration dieser Inhibitoren bei unterschiedlichen Schärfegraden wird im Folgenden für die im Prozess verwendeten Rohstoffe detaillierter beschrieben.

##### **4.6.1 Furane**

Schon PULS et al. (1985) beschreiben die Zunahme von Furfural und 5-HMF im Extrakt in Folge eines ansteigenden Schärfegrades. Diese Entwicklung soll auch für dampfdruckaufgeschlossene Maisstroh- und Silageproben dargestellt werden. Dahingehend soll jeweils das Maisstroh DE 1 mit Mais- und Maisstrohsilage auf die Veränderung in Bezug auf den Schärfegrad und ermittelbare Mengen der Furane verglichen werden.

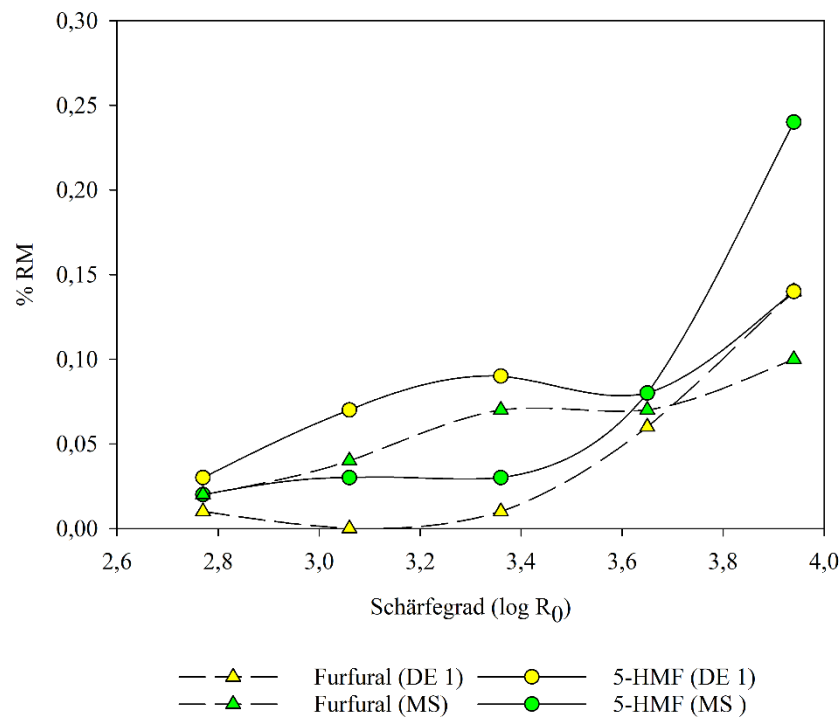


Abbildung 29: Einfluss des Schärfegrades auf die Furangehalte in den Extrakten von Maisstroh und Maissilage (KRAFFT et al., 2021).

Wie in Abbildung 29 dargestellt zeigen die Furane mit steigendem Schärfegrad einen Anstieg in der Konzentration. Hierbei ist die Relation von 5-HMF und Furfural zwischen den zwei untersuchten Rohstoffen unterschiedlich. Das Maisstroh DE 1 weist bei niedrigen Schärfegraden mehr 5-HMF als Furfural auf. Bei einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,94$  sind die Konzentration beider Furane mit 0,14 % bezogen auf den eingesetzten Rohstoff gleich. Bei der Maissilage liegt die Konzentration der Furane bis zu einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,65$  auf ähnlichen Niveaus. Erst beim höchsten verglichenen Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,94$  zeigt die Maissilage deutlich höhere 5-HMF-Gehalte (0,24 %) im Vergleich zum Furfural (0,10 %), jeweils ebenso bezogen auf den eingesetzten Rohstoff. Ursächlich ist hierbei die bei höheren Schärfegraden einsetzende Dehydratisierung der Hexosen zu 5-HMF. Diese liegen, bedingt durch die enthaltene Stärke der Maiskörner, gerade bei der Maissilage in höheren Mengenanteilen vor.

Für die untersuchte MSS wurden, im Gegensatz zum Maisstroh, grundsätzlich höheren Furfural und niedrigeren 5-HMF-Gehalten im Bereich  $\log R_0 = 3,53 - 3,65 - 3,94$  ermittelt. So zeigt das Furfural einen Anstieg von 0,09 % auf 0,29 % bezogen auf den eingesetzten Rohstoff. Der 5-HMF-Gehalt im Extrakt steigt hingegen, bezogen auf den Rohstoff, von 0,03 % auf 0,09 %.

OLIVA et al. (2003) berichten, dass erheblich geringere Mengen an Furfural für eine inhibitorische Wirkung in Anwendungen der Ethanol-Fermentation ausreichen und

Furfural damit für den dargestellten Anwendungsfall deutlich toxischer sei, als 5-HMF. OLIVA et al. (2003) beschreiben dabei für SE von Pappel bei 210 °C für 4 min erheblich höhere Mengen an Furfural (490 mg /L) im Vergleich zu 5-HMF (80 mg / L). HAGEL und SAAKE (2020) zeigen für Dampfdruck-Refinerbehandlungen von Pappel und Fichte, ansteigend ab  $\log R_0 = 3,36$ , höhere Furfuralgehalte.

Für die am Maisstroh DE 2 durchgeführten Mehrfachversuche bei  $\log R_0 = 4,42$  (vgl. Abschnitt 4.2.1.) zeigt sich ein höherer Gehalt an Furfural, als an 5-HMF. Ein hoher Schärfeegrad könnte damit einen stärkeren Einfluss auf die Furfuralbildung, als auf die Gehalte an 5-HMF haben. Eine sichtbare Untermauerung dieser Hypothese zeigt sich auch bereits beim höchsten Schärfeegrad ( $\log R_0 = 3,94$ ) in Abbildung 29, bei denen die Furfuralkonzentration erheblich ansteigt. Unabhängig von der Höhe zeigen alle Autoren eine Zunahme der Furangehalte mit steigendem Schärfeegrad bei niedrigen pH-Werten. Bezugnehmend auf den pH-Wert berichten HAGEL und SAAKE (2020) über Dampfdruckbehandlungen in neutralen pH-Bereichen, die durch den verwendeten Rohstoff hervorgerufen wurden. Bei diesen wurde keine Bildung von Furanen beobachtet. Eine Einstellung des pH-Wertes im Prozess und die Behandlungen bei niedrigeren Schärfeegraden könnte daher ein möglicher Weg sein, die Bildung inhibitorisch wirkender Furane, und dabei vor allem von Furfural, zu vermeiden.

#### **4.6.2 Organische Säuren im Extrakt**

Neben den beschriebenen Furanen haben sowohl substratspezifische wie auch im Prozess gebildete organische Säuren einen Einfluss auf die EH und die nachfolgenden Prozessschritte. In diesem Zusammenhang beschreiben ZHANG et al. (2013) für SE-Experimente an Maisstroh, dass die ermittelten organischen Säuren (Essig- und Ameisensäure) und Furane für 82–96 % der Gesamtinhibitorenmenge verantwortlich seien. In den dargestellten Daten (197,85 °C, 8 min) stellten die beiden genannten organischen Säuren die Hauptmenge der Inhibitoren im Extrakt dar. Um Abschätzungen über den Einfluss des steigenden Schärfegrades auf die entstehenden organischen Säuren anstellen zu können, wurden Untersuchungen an Maisstroh DE 1 und an der Maissilage durchgeführt.



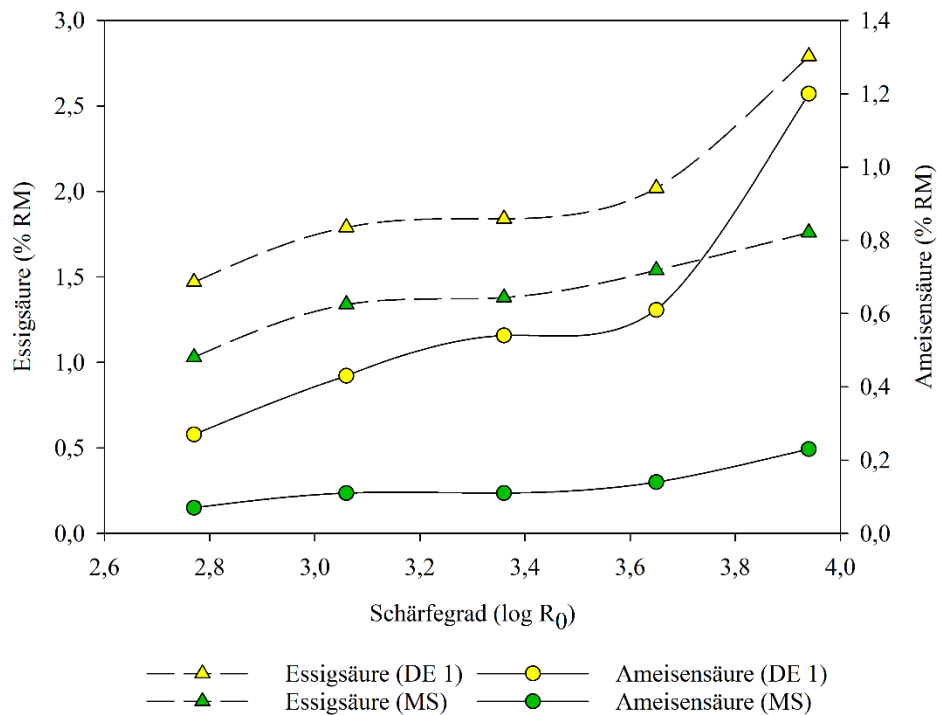


Abbildung 30: Einfluss des Schärfegrades auf den Essig- und Ameisensäuregehalt im Extrakt beim Aufschluss von Maisstroh DE 1 und MS (KRAFFT et al., 2021).

Wie in Abbildung 30 ersichtlich, zeigen beide Substrate mit einem zunehmenden Schärfegrad einen Anstieg der ermittelten Gehalte an organischen Säuren. Bezugnehmend auf die gebildete Essigsäure sind die Verläufe, wenn auch auf leicht unterschiedlichen Niveaus in ihrer Entwicklung übereinstimmend, wobei die Gehalte an Essigsäure in den Maisstroh-Extrakten durchweg höher sind. Der Verlauf der Zunahme verändert sich für den höchsten Schärfegrad. Hier ist im Vergleich zum Maissilage-Extrakt eine stärkere Zunahme des Essigsäuregehaltes im Extrakt des Maisstrohs zu beobachten. Die Gehalte an Essigsäure sind im Vergleich zur Ameisensäure durchweg höher. Dies wird auch in der Literatur beschrieben. CANTARELLA et al. (2004b) ermittelten an dampfdruckvorbehandeltem Pappelholz ( $\log R_0 = 4,13$ ) eine mehr als doppelt so hohe Konzentration an Essigsäure im Vergleich zur Ameisensäure. Die Freisetzung der Essigsäure wurde bereits in Abschnitt 2.5.2 beschrieben und beruht auf der Abspaltung von Acetylgruppen der Hemicellulosen im Rahmen der Autohydrolyse. Die Bildung von freier Ameisensäure wird mit der weiteren Degradation der Furane erklärt (PEDERSEN und MEYER, 2010; RASMUSSEN et al., 2014).

Verschiedene Autoren beschreiben den Einfluss der Essigsäure im Extrakt für enzymatische und fermentative Prozesse (FENG et al., 2012; OLIVA et al., 2003; CANTARELLA et al., 2004b). Die in dieser Arbeit erhaltenen Konzentrationen an Essigsäure würden nach CANTARELLA et al. (2004b) noch nicht zu Inhibierungen

führen. Für die Ameisensäure beschreiben FENG et al. (2012) allerdings bereits einen starken Einfluss auf eine Milchsäurefermentation ab einer Konzentration von 0,1 g/L. Die in den Maisstroh-Extrakten festgestellten 1,2 % Ameisensäure, bezogen auf den eingesetzten Rohstoff, stellen damit einen potentiellen inhibitorischen Parameter für nachfolgende Prozessschritte dar, sodass Strategien zur Vermeidung entwickelt werden müssen. Für das Extrakt der Maissilage wurden maximal 0,23 %, bezogen auf den eingesetzten Rohstoff, ermittelt und stellen damit in Bezug auf inhibitorische Wirkungen kein potentiell Problem dar.

Neben Essig- und Ameisensäure im Extrakt stellt Milchsäure ebenso einen Inhibitor für fermentative Prozesse dar (CUBAS-CANO et al., 2020). Sie wurde daher im Zuge der weiteren Untersuchungen ebenfalls bestimmt (KRAFFT et al., 2020b; KRAFFT et al., 2021). Freie Milchsäure des Substrates könnte auch für eine Abspaltung der Acetylgruppen verantwortlich sein, wobei im Maissilage-Rohstoff schon 0,9 % Essigsäure vorkommen. Für Maissilage-Dampfdruckaufschlüsse unterhalb der Autohydrolyse-Temperatur von 150 °C wurden stabile Essigsäure-Gehalte (1,54–1,82 % bez. a. RM) ermittelt, die damit über den im Rohstoff vorkommenden 0,9 % liegen (KRAFFT et al., 2020b). Dies könnte daher für einen Einfluss der Milchsäure auf die Abspaltung der Acetylgruppen sprechen. Milchsäure wird üblicherweise nicht im Dampfdruckprozess gebildet und die im Extrakt gefundenen Milchsäurekonzentrationen entsprechen mit rund 5 %, bezogen auf den Rohstoff, der im Substrat enthaltenen Milchsäurekonzentration (KRAFFT et al., 2020b).

#### **4.6.3 Phenolische Abbauprodukte des Lignins**

Neben den Furanen und organischen Säuren stellen auch die Abbauprodukte des Lignins einen relevanten Parameter zur Beurteilung der Extraktfraktion dar. Untersuchungen zu diesem Themenkomplex sind weiterhin wichtig, um stoffliche Verwertungsmöglichkeiten der Extrakte beurteilen zu können. Eine mögliche Verwertung zu Biogas ist in der Literatur beschrieben (JANZON et al., 2014). TENGBORG et al. (2001) zeigt Versuche mit dem Extrakt von dampfvorbehandeltem Nadelholz. Mit steigender Extraktmengen sinkt die Celluloseumsetzung in der EH deutlich. SCHÜTT (2012) beschreibt die gemeinsame EH von Faserstoff und Extrakt. Durch die Hinzugabe des Extraktes erhöhten sich die Konzentrationen der Inhibitoren um den Faktor 2–6. Es wurde in dieser gemeinsamen EH allerdings kein negativer Einfluss auf die Ausbeuten gefunden. QURESHI et al. (2010) beschreibt, dass die Fermentation von Maisstroh-Extrakten zu Aceton/Butanol/Ethanol (ABE) in unverdünnten Extrakten nicht möglich sei. Auch neue Untersuchungen widmen sich der Möglichkeit zur gemeinsamen Fermentation der Faserstoff- und Extraktfraktion (DEL G. RÍO et al., 2020).

Abbildung 31 zeigt daher den Einfluss des Schärfegrades auf die Bildung der sieben relevanten, phenolischen Degradationsprodukte nach ZHANG et al. (2013).

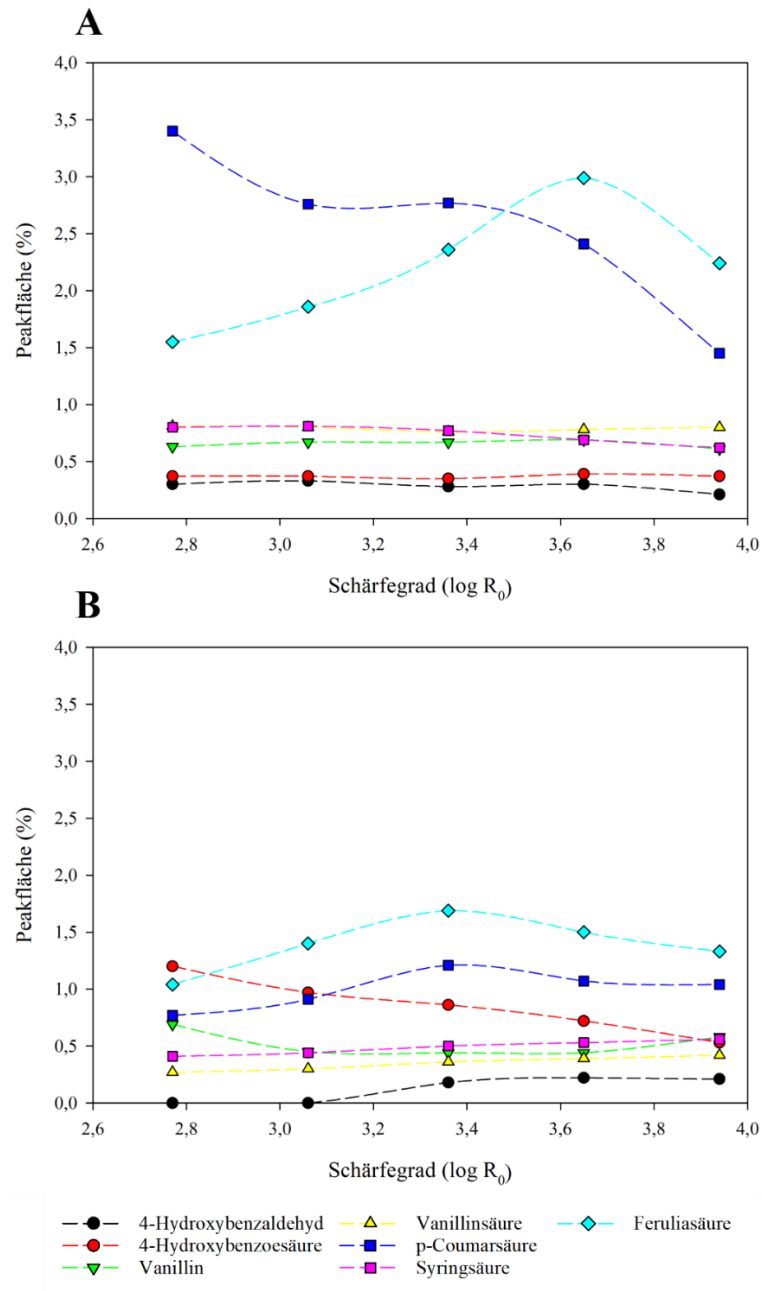


Abbildung 31: Einfluss des Schärfegrades auf die ermittelten phenolischen Komponenten im Extrakt für Maisstroh DE 1 (A) und MS (B). Die Komponenten sind als Peakflächen (%), bezogen auf das Gesamtchromatogramm, dargestellt (KRAFFT et al., 2021).

Wie in Abbildung 31 dargestellt, zeigen sich für die Extrakte der beiden untersuchten Substrate nach dem Dampfdruckaufschluss bei unterschiedlichen Schärfe unterschiedliche Peakflächen-% der phenolischen Inhibitoren. Für die Maisstroh-Extrakte stellen sich als Hauptkomponenten *p*-Coumarsäure und Ferulasäure dar. Erstgenannte zeigt hierbei bei Maisstroh die größte Veränderung mit abnehmenden Gehalten bei steigender Schärfe.

Ursächlich dafür können sekundäre Abbaureaktionen der *p*-Coumarsäure sein. Diese Beobachtung wird ebenso durch ILANIDIS et al. (2021) für hydrothermale Vorbehandlungen > 190 °C an Weizenstroh beschrieben. Die *p*-Coumarsäure in den Maissilage-Extrakten zeigt im Vergleich einen leichten Anstieg mit stabilen Konzentrationen bei steigender Schärfe. Für Ferulasäure, die verschiedene Ursprünge in lignifizierter Biomasse oder körnerhaltigen Substraten hat (NOOR HASYIERAH et al., 2008), ist eine anfängliche Zunahme mit steigender Schärfe zu beobachten. Diese nimmt bei höheren Schärfegradregionen wieder ab. Hier ist bei scharfen Prozessbedingungen ebenso von sekundären Degradationsreaktionen auszugehen. Dies kann beispielsweise, wie in der Literatur beschrieben, zur Bildung von 4-Methylguaiacol, 4-Ethylguaiacol, 4-Vinylguaiacol oder Vanillin führen (FIDDLER et al., 1967; GONG et al., 2012). Dieses Verhalten zeigt sich auch in den untersuchten Maissilage-Proben. Die weiteren phenolischen Abbauprodukte zeigen bei Maisstroh konstante Werte von < 1 % Peakfläche.

Die Extrakte der Maissilage zeigen, bei in der Gesamtheit niedrigeren Peakflächen-%, ein komplexeres Verhalten der Phenole im Extrakt. Die *p*-Coumarsäure und die Ferulasäure wurden dabei bereits beschrieben. 4-Hydroxybenzoesäure zeigt eine stetige Abnahme mit steigender Schärfe, wohingegen Syringa- und Vanillinsäure konstante, wenn auch niedrige, Zunahmen mit einem ansteigenden Schärfegrad zeigen. Die Zunahme des 4-Hydroxybenzaldehyd mit steigender Prozessschärfe wird ebenso durch ILANIDIS et al. (2021) beschrieben. Die Autoren postulieren dahingehen die Annahme, dass Phenole mit einer C-Seitenketten, wie Vanillin oder 4-Hydroxybenzaldehyd, stabiler gegen thermische Degradation seien als solche mit zwei oder drei C-Seitenketten.

Zur Beurteilung der Gesamtbelastung der jeweiligen Extrakte mit den dargestellten Phenolen wurden diese in Abbildung 32 zusammengefasst. Sichtbar wird die deutlich geringere Phenol-Konzentration in den Maissilage-Extrakten. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die verwendete Maissilage (11,9 %) im Vergleich zum Maisstroh DE 1 (19,3) einen niedrigeren Ligningehalt hat und so weniger Potenzial zur Bildung von phenolischen Inhibitoren aus der Lignindegradation vorliegt (vgl. Abschnitt 4.1).

Abgeleitet aus der Gesamtdarstellung der phenolischen Komponenten im Extrakt (Abb. 32) und deren Bildung sind Rohstoffe mit niedrigen Ligningehalten zur Phenol-Prävention vorteilhaft. Alternativ kann über Schritte zur Ligninreduktion mittels Extraktion (vgl. Abschnitt 4.3) nachgedacht werden, um einen Übergang von phenolischen Komponenten ins Extrakt zu verhindern. Weiterhin sind weitere Maßnahmen, wie eine Verdünnung der Extrakte oder der gesamte Aspekt einer *Detoxification* (PALMQVIST et al., 1997; CANTARELLA et al., 2004a) in die

Überlegungen zur Verwertung mit einzubeziehen und jeweils substrat- und prozessspezifisch zu optimieren.

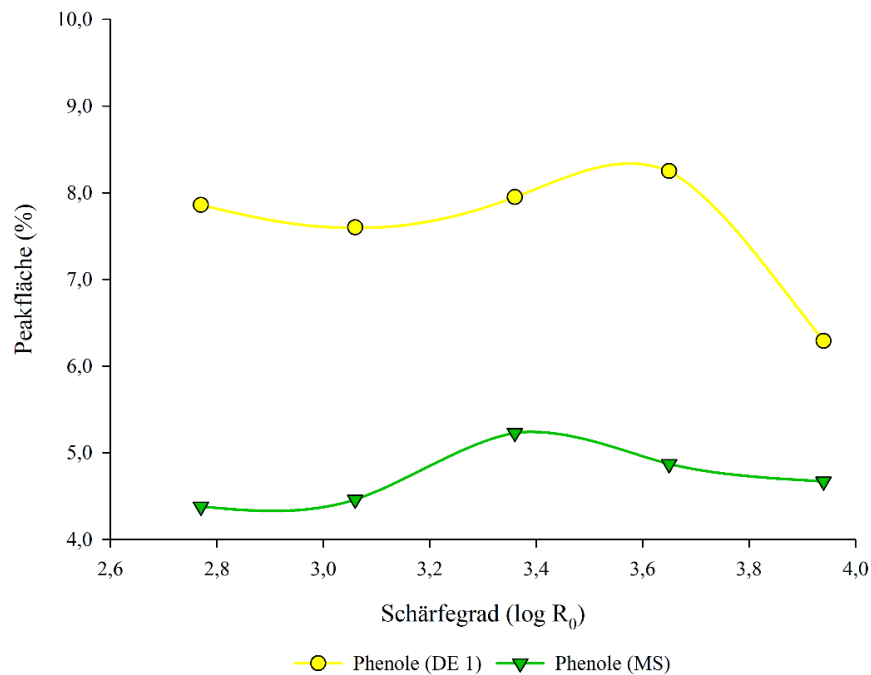


Abbildung 32: Vergleich der phenolischen Komponenten in den Maisstroh- und Maissilage-Extrakten in Abhängigkeit vom Schärfegrad als %-Peakfläche (KRAFFT et al., 2021).

#### 4.6.4 Weitere Degradationsprodukte

Neben den drei Hauptgruppen der Inhibitoren wurden weitere möglicherweise relevante Komponenten detektiert. So zeigt sich das Vorhandensein von Bruchstücken eines bekannten, wasserlöslichen Mykotoxins in den Maissilage-Extrakten (KRAFFT et al., 2021). Der Einfluss solcher Mykotoxine auf Bioaffinerien ist Gegenstand der Literatur (VIQUEZ et al., 1996; MUNKVOLD und DESJARDINS, 1997; MARASAS et al., 2004). Grundsätzlich negative Einflüsse auf die Produktion von Biogas (FERRARA et al., 2021) oder die Ethanolproduktion (BOTHAST et al., 1992) konnten allerdings bisher nicht nachgewiesen werden.

Weitere Komponenten deren Peakflächen mit dem Schärfegrad ansteigen sind 3,4-dihydrocoumarin-6-ol und Alginetin. Ersteres wurde auch durch andere Autoren in Pyrolysedaten von Eukalyptus-Kraftstoff bzw. Co-Pyrolysen von Bagasse und Paraffin gefunden (OUDIA et al., 2007; KOUHI und SHAMS, 2019). Alginetin wird als Karamellisationsprodukt von Hexenuronsäuren- und Pentosen nach thermischen Behandlungen beschrieben (DOI et al., 2020). Inhibitorische Wirkungen der beiden genannten Komponenten sind allerdings nicht in der Literatur dokumentiert.

## **5 Zusammenfassung und Ausblick**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Dampfdruckaufschlusses auf verschiedene maisbasierte Rohstoffe untersucht. Ziel war die Untersuchung und Optimierung einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse zur Produktion von fermentierbaren Kohlenhydraten zur Produktion von biomassebasierten Plattformchemikalien. Als Rohstoffe dienten drei verschiedene Maisstroh-Varianten, eine Maissilage und in der Weiterführung eine Maisstrohsilage. Verschiedene Maisstroh-Produkte wurden eingesetzt, um auf biotische und abiotische Einflussfaktoren zurückzuführende Schwankungen in der Biomassezusammensetzung einschätzen zu können. Dafür wurden die Rohstoffe vor dem Aufschluss umfassend chemisch charakterisiert. Für die in der vorliegenden Arbeit angestellten Vergleiche wurde ein Versuchsrahmen im Schärfegradbereich von  $\log R_0 = 2,77$  bis  $3,94$  gewählt. Die aufgeschlossenen Rohstoffe lagen nach dem Prozess als feste Faserfraktion und flüssige Extraktfraktion vor. Zur Erstellung von Prozessbilanzen wurden die jeweiligen Ausbeuten bestimmt und die erzeugten Faserstoffe und Extrakte chemisch charakterisiert. Die Faserstoffe wurden anschließend einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen und die Hydrolyse-Ausbeuten, basierend auf den im Faserstoff vorhandenen Kohlenhydraten, bestimmt. Eine mögliche Verbesserung der enzymatischen Zugänglichkeit durch eine alkalischen Ligninextraktion wurde in dieser Arbeit ebenso untersucht. Die extrahierten Faserstoffe wurden ebenfalls enzymatisch hydrolysiert und die Ausbeuten bestimmt. Neben den Faserstoffen wurden ebenso die gewonnenen Extrakte umfassend charakterisiert. Diese Untersuchungen dienten insbesondere der Detektion von Inhibitoren, die vornehmlich im flüssigen Extrakt vorkommen. Zur Beurteilung von möglichen negativen Effekten auf eine EH und Fermentation wurden die wichtigsten Degradationsprodukte der Kohlenhydrate und des Lignins ermittelt. Dies geschah vor dem Hintergrund einer angestrebten stofflichen Verwendung der hemicellulosereichen Extraktfraktion bzw. einer gemeinsamen enzymatischen Hydrolyse oder Fermentation.

Die Analyse der verschiedenen Rohstoffe zeigte für das Maisstroh eine Streuung der Kohlenhydratgehalte von 52,4–63,9 %. Für MS konnten 61,2 % und für MSS 61,5 % Gesamtkohlenhydratgehalte ermittelt werden. Die Extraktgehalte einer sukzessiven Extraktion der Maisstroh-Varianten liegen zwischen 13,0 und 21,9 %. Hohe Extraktgehalte, vornehmlich durch das Wasserextrakt bedingt, zeigt die Maissilage. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass wasserlösliche, stärkebasierte Kohlenhydrate auch im Wasserextrakt vorhanden sind und die Kohlenhydratgehalte dadurch unterschätzt werden. Die MSS liegt mit einem Gesamtextrakt von 16,8 % näher an den Werten des Maisstrohs, als an denen der Maissilage. Die ermittelten Lignin- und Aschegehalte schwanken weniger, wenngleich die Maissilage aufgrund ihres früheren Erntezeitpunktes niedrigere Werte aufweist. Grundlegend zeigt sich die große Streuung natürlicher

Rohstoffe, die Auswirkungen auf die Prozesse in einer Bioraffinerie hat jeweils individuell berücksichtigt werden muss. Mögliche Gründe sind hier insbesondere bei klimatischen Unterschieden, unterschiedlichen Erntejahren, den jeweiligen Bodenverhältnissen, der Sortenauswahl oder auch weiteren geographischen Besonderheiten zu finden.

Nach dem Dampfdruckaufschluss der Maisstroh-Varianten ergeben sich die höchsten Faserstoffausbeuten bei den mildesten Prozessbedingungen von  $\log R_0 = 2,77$ . Mit zunehmender Schärfe sinken die Ausbeuten an Faserstoff kontinuierlich ab. Wenngleich der Verlauf über den Schärfegrad ähnlich ist, unterscheiden sich die Rohstoffe deutlich in ihren Ausbeuten. Am niedrigsten Schärfegrad variiert die Faserstoffausbeuten zwischen 81,4 % für das Maisstroh DE 1 und 65,0 % für das Maisstroh CHN. Auch am höchsten Schärfegrad zeigt sich eine Streuung von 58,8 % zu 44,2 %. Das dritte Maisstroh DE 2 zeigt Werte zwischen den beiden Extremen. Eine umgekehrte Entwicklung zeigt sich für das im Prozess gebildete Extrakt des Maisstrohs. Mit den niedrigsten Ausbeuten bei  $\log R_0 = 2,77$  steigt die Ausbeute mit zunehmendem Schärfegrad, was auf den mit steigenden Prozessbedingungen verstärkten Übergang von Hemicellulosen in die Extraktfraktion zu erklären ist. Das Maisstroh DE 2 liegt also zwischen den Maisstroh-Varianten DE 1 und CHN. Die Variation der Extraktausbeuten zwischen den Extremen am niedrigsten Schärfegrade liegt hierbei zwischen 18,3 % und 38,1 %. Beim höchsten in dieser Arbeit verglichenen Schärfegrad ( $\log R_0 = 3,94$ ) zeigen sich je nach verwendetem Rohstoff Ausbeuten der Extrakte von 28,3 % bis zu 48,5 %. So zeigt sich grundsätzlich, dass auch im Vergleich verschiedener Maisstroh-Substrate, im ermittelten Schärfegradbereich höhere Faserstoff- und niedrigere Extraktausbeuten für Maisstroh zu erwarten sind. Gegenläufige Entwicklungen von Faserstoffabnahme und Extraktzunahme mit steigendem Schärfegrad sind gleichsam zu beobachten. Die jeweilige Höhe der Ausbeuten ist hierbei substratspezifisch.

Zur Beurteilung weiterer Prozessschritte wurde die Zusammensetzung der erzeugten Faserstoffe und Extrakte in Hinblick auf pH-Wert, Kohlenhydrate und Ligningehalte analysiert. Über alle Rohstoffe und Extrakte hinweg zeigt sich mit zunehmender Schärfe eine Abnahme des pH-Wertes, was auf die Bildung von Essigsäure im Rahmen autohydrolytischer Reaktionen zurückgeführt werden kann. Für die Faserstoffe und die Extrakte lassen sich grundsätzlich die Betrachtung auf die jeweilige Fraktion und diejenige bezogen auf den eingesetzten Rohstoff unterscheiden. Bezogen auf den Faserstoff zeigt sich mit zunehmendem Schärfegrad für die Maisstroh-Varianten eine durchgehende Abnahme der Xylose im Faserstoff, sowie eine stetige Anreicherung der Glucose auf bis zu 58,9 % (DE 2,  $\log R_0 = 3,65$ ). Durch den Übergang der Hemicellulosen in das Extrakt zeigt sich für das Extrakt über alle Rohstoffe hinweg eine gegenteilige Entwicklung mit sinkenden relativen Glucosegehalten und zunehmenden Gehalten an

Xylose bis zu  $\log R_0 = 3,94$ . Die Betrachtung der rohstoffbezogenen Werte zeigt sich ein differenzierteres Bild. Hierbei lassen sich für die Faserstoffe vielmehr nahezu stabile Glucosewerte mit, bedingt durch den beschriebenen Übergang in die Extraktfraktion, sinkenden Hemicellulosegehalten feststellen. Die Erkenntnisse für die Extrakte bleiben unverändert und zeigen auch in der rohstoffbezogenen Auswertung sinkende Glucose- und steigende Xylosegehalte. Die Ergebnisse für die Faserstoffe und Extrakte der Maissilage ergeben ähnliche Verlaufskurven, wenn auch mit erheblich höheren, stärkebedingten Glucosegehalten von bis zu 37,8 % ( $\log R_0 = 3,65$ ), bezogen auf den Rohstoff, im Extrakt. Der Übergang der Hemicellulosen aus dem Faserstoff in das Extrakt konnte auch für die Versuche mit MSS gezeigt werden. Bei rohstoffbezogenen, stabilen Glucosewerten im Extrakt zeigt sich allerdings schon bei  $\log R_0 = 3,94$  eine Abnahme der Xylose im Extrakt, die auf Degradationsreaktionen im Dampfdruckaufschluss zurückgeführt werden kann.

Die Ligningehalte der Faserstoffe und Extrakte wurden als säureunlöslicher Rückstand nach einer zwei- bzw. einstufigen, schwefelsauren Hydrolyse bestimmt, da hohe Ligningehalte einen negativen Einfluss auf nachgelagerte Prozesse haben können. Durch den beschriebenen Übergang der Hemicellulosen findet, wie bei der Glucose, eine Anreicherung von Lignin im Faserstoff statt. Diese Beobachtung relativiert sich allerdings in der rohstoffbezogenen Betrachtungsweise. Hier zeigen sich stabile bis leicht ansteigende Ligninwerte in den Maisstroh-Faserstoffen. Für die Maissilage-Faserstoffe können leicht abnehmende Daten gezeigt werden, wohingegen eine leichte Zunahme des Lignins für die Faserstoffe der MSS ermittelt wurde. Verschiedene gegenläufige Einflussfaktoren, wie Abbau- und Kondensationsreaktionen oder die Bildung von Pseudo-Lignin können die ermittelten Ergebnisse dabei in verschiedene Richtungen beeinflussen. Dies gilt ebenso für die Ligningehalte der Extrakte. Diese nehmen mit steigender Schärfe zu. Für das Maisstroh DE 1 konnte bei  $\log R_0 = 3,94$  eine Abnahme des Ligningehaltes festgestellt werden, wohingegen die anderen Extrakte eine Zunahme bzw. konstante Werte aufzeigen. Unabhängig davon sollte bei nachfolgenden Arbeiten zur Verwertung von Dampfdruck-Ligninen weitere Analytik, bspw. mittels DSC, betrieben werden.

Die EH wurde vor und nach der Vorbehandlung durchgeführt. Die Spannweite der natürlichen Kohlenhydratausbeuten ohne Vorbehandlung lag dabei zwischen 7,1 % (DE 1) und 55,1 % (MS). Ursächlich für die hohen Zugänglichkeiten sind insbesondere Maiskörner und damit das Vorhandensein von Stärke in der Maissilage. Herausstechend ist die Umsetzung von 35,3 % der theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate des Maisstrohs CHN. Ein früherer Erntezeitpunkt mit einer geringeren Lignifizierung könnte, neben anderen biotischen und abiotischen Einflussfaktoren, mit ein Grund für die im Vergleich zu den anderen Strohvarianten besseren Umsetzung sein. Nach einer Dampfdruck-



Vorbehandlung zeigten alle verwendeten Rohstoffe eine deutliche Verbesserung der Zugänglichkeit für Enzympräparate. Die höchsten Ausbeuten unter Bezug auf die theoretisch im Faserstoff vorhandenen Kohlenhydrate Glucose und Xylose konnten durchweg bei den höchsten Schärfegraden ( $\log R_0 = 3,94$ ) erzielt werden. Die Maisstroh-Varianten streuen hierbei zwischen Ausbeuten von 87,8 % und 101,5 %, wobei Werte über 100 % auf die Bestimmungsmethode der theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate zurückzuführen sind. Bei  $\log R_0 = 3,94$  ergeben sich EH-Ausbeuten von 98,8 % für MS und 96,5 % für MSS, bezogen auf die theoretisch im Faserstoff vorhandenen Kohlenhydrate. So zeigt sich durchweg, dass nach einer Behandlung bei 200 °C für 10 min nahezu alle vorhandenen Kohlenhydrate der Faserstoffe für einen enzymatischen Abbau zu monomeren Kohlenhydraten zur Verfügung stehen.

Zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Faserstoffe für den enzymatischen Abbau wurden exemplarisch Ligninextraktionen an den Faserstoffen des Maisstrohs DE 1 durchgeführt. Weiterhin konnte so eine zusätzliche Ligninfraktion gewonnen werden, die charakterisiert wurde und für weitere stoffliche Verwendungen zur Verfügung steht. Aus diesen Experimenten sind verschiedene Aussagen ableitbar. Zum einen stellt sich eine erheblich verbesserte Zugänglichkeit, insbesondere bei niedrigen Schärfegraden, dar. Am niedrigsten Schärfegrad von  $\log R_0 = 2,77$  ergibt sich eine auf die theoretisch im Faserstoff vorhandenen Kohlenhydrate bezogene Ausbeute von 106,4 %. Bezogen auf den eingesetzten Faserstoff sind bei  $\log R_0 = 4,24$  bis zu 29 % nach der alkalischen Extraktion als Ligninfraktion fällbar. Die resultierende Ligninfraktion ist gekennzeichnet durch sinkende Kohlenhydratverunreinigungen und zunehmende Molmassen mit steigender Schärfe. Bei den unter den höchsten Prozessbedingungen ( $\log R_0 = 4,54$ ) aufgeschlossenen Faserstoffen liegen die KH-Gehalte im Lignin unter 0,5 %. Gleichsam steigen die Molmassen der extrahierten Lignine am höchsten untersuchten Schärfegrad ( $\log R_0 = 4,25$ ) auf 23.900 g/mol. Da aus der Literatur heraus Lignine mit niedrigen Kohlenhydratkontaminationen und niedrigen Molmassen für weiterführende, stoffliche Verwendungen präferiert werden, scheint hier in Bezug auf die zu wählende Prozessbedingungen eine Abwägung notwendig, um die Ligninfraktion bestmöglich nutzen zu können. Weiterhin wären mögliche Anwendungen der Lignine aus den unter unterschiedlichen Schärfegraden vorbehandelten Faserstoffen zu prüfen.

Die Bildung von Inhibitoren in Dampfdruck-Prozessen ist bekannt und sollte daher auch in dieser Arbeit ermittelt werden, um Einflüsse auf Enzyme und fermentative Prozesse bewerten zu können. Hierfür wurden die Extrakte untersucht, die die Hauptfracht an Inhibitoren enthalten, während die Faserstoffe arm an Degradationsprodukten sind. Hierbei wurde der Blick auf Degradationsprodukte der Kohlenhydrate und des Lignins gerichtet, die bekanntermaßen einen Einfluss auf nachgelagerte Prozesse haben.

Vergleichende Untersuchungen zwischen dem Maisstroh DE 1 und der Maissilage zeigten jeweils ansteigende Furanhalte mit ansteigendem Schärfegrad auf bis zu 0,14 % Furfural für das Maisstroh und bis zu 0,24 % 5-HMF für die Maissilage, jeweils bezogen auf den Rohstoff. Die weiteren verwendeten Rohstoffe zeigten ebenso einen Anstieg der Furane mit steigender Schärfe. Neben den Furanen wurden ebenso die inhibitorisch wirkenden Lignin-Degradationsprodukte charakterisiert und die Gesamtkontamination des Extraktes bestimmt. Die Maisstrohextrakte zeigten, aller Voraussicht nach aufgrund des höheren Ligningehaltes, Gesamtmengen an phenolischen Komponenten von bis zu 8,25 Peakflächen-% ( $\log R_0 = 3,65$ ), bezogen auf den eingesetzten Rohstoff. Für die Maissilage wurden niedrigere Werte von bis zu 5,23 Peakflächen-% bei  $\log R_0 = 3,36$  ermittelt. Abschließend wurden die enthaltene Ameisen- und Essigsäure im Extrakt bestimmt. Die höchsten Essigsäurekonzentrationen von rohstoffbezogenen 2,79 % (DE 1) und 1,76 % (MS) wurden beim höchsten Schärfegrad ( $\log R_0 = 3,94$ ) ermittelt. Ameisensäure kann schon bei erheblich niedrigeren Konzentrationen inhibitorisch wirken. Hier zeigte sich ein konstanter Anstieg mit steigendem Schärfegrad auf bis zu 1,20 % (DE 1) und 0,23 % (MS), wieder bezogen auf den eingesetzten Rohstoff. Die Ameisensäuregehalte wurden als möglicher inhibitorischer Parameter festgestellt, weswegen die Verwendung der Extrakte jeweils auf nachfolgende Prozesse getestet werden muss. Neben der Möglichkeit einer robusten und etablierten Biogaserzeugung muss auch die Verwendung für andere auf Bakterien basierenden Prozessen, wie der Fermentation zu weiteren Plattformchemikalien, ermittelt werden, da diese oftmals sehr sensitiv auf Kontaminationen mit Inhibitoren reagieren.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass der Dampfdruckaufschluss für Maisstroh, Maissilage und Maisstrohsilage mit anschließender EH geeignet ist, monomere Kohlenhydrate für nachfolgende Prozesse auf Basis von Lignocellulosen bereitzustellen. Die Maisstroh-Varianten zeigen je nach Rohstoff unterschiedliche Optima der Gesamtkohlenhydratbilanz, bestehen aus den Kohlenhydraten der Extrakte und den EH-Ausbeuten. Während bei dem Maisstroh DE 1 das Optimum bei  $\log R_0 = 3,53$  liegt, zeigen DE 2 ( $\log R_0 = 3,94$ ) und CHN ( $\log R_0 = 3,36$ ) abweichende, allerdings in einem ähnlichen Schärfegradbereich liegende, Optima. Alle Maisstroh-Varianten können nach einer Dampfdruckbehandlung nahezu vollständig, in Bezug auf die theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate, enzymatisch hydrolysiert werden. Niedrigere Schärfegrade sind aus energetischer Perspektive zu bevorzugen. Nach einer alkalischen Extraktion des Maisstrohs DE 1 verbessert sich die enzymatische Zugänglichkeit erheblich. Das Optimum der Gesamtkohlenhydrate ist anschließend im Bereich von  $\log R_0 = \leq 2,77$ . Das Optimum nach einer alkalischen Extraktion muss allerdings nicht nur in Bezug auf die EH-Ausbeute, sondern auch unter dem Hinblick einer fällbaren Ligninfraktion, wenig Kohlenhydratverunreinigungen des Lignins und einer niedrigen Molmasse gewählt

werden. Weiterhin sind die Kosten der alkalischen Extraktion in die Überlegungen mit einzubeziehen. Maissilage bietet einen kostengünstigen, verfügbaren und lagerbaren Rohstoff. Eine Ligninextraktion ist hierbei aufgrund des niedrigeren Ligningehaltes nicht erforderlich. Das Optimum der Gesamtkohlenhydrate stellt sich bei  $\log R_0 = 3,65$  dar. Maisstrohsilage verbindet die Eigenschaften des Maisstrohs als Rohstoff und der Lagerbarkeit durch die Silierung. Das Kohlenhydratoptimum nach einem Dampfdruckaufschluss befindet sich hier ebenfalls bei einem Schärfegrad von  $\log R_0 = 3,65$ . Die theoretisch vorhandenen Kohlenhydrate beider Silagevarianten konnten nach der Dampfdruckbehandlung ebenso nahezu vollständig enzymatisch hydrolysiert werden. Versuche zum Einfluss einer Ligninextraktion der Maissirohsilage und die Bewertung der Qualität der gewonnenen Lignine wäre dabei als zukünftige Fragestellung sinnvoll. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass sich der Dampfdruckaufschluss gut für silierte Biomasse eignet. Die Silierung bietet den Vorteil einer guten Zugänglichkeit, verbunden mit einer ganzjährig möglichen Biomasseversorgung einer Bioraffinerie, da die langfristige Lagerung der Biomasse ermöglicht wird. Dieser Aspekt kann für die Nutzung von Agrarreststoffen wichtige Impulse liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

- AARUM, I., H. DEVLE, D. EKEBERG, S. J. HORN und Y. STENSTRØM (2018): Characterization of Pseudo-Lignin from Steam Exploded Birch. *ACS omega* 3, 4924–4931.
- ABATZOGLOU, N., E. CHORNET, K. BELKACEMI und R. P. OVEREND (1992): Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science* 47, 1109–1122.
- ADEN, A., M. RUTH, K. IBSEN, J. JECHURA, K. NEEVES, J. SHEEHAN, B. WALLACE, L. MONTAGUE, A. SLAYTON und J. LUKAS (2002): Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, Golden.
- AICHINGER, H., B. HÜSING und S. WYDRA (2016): Weiße Biotechnologie: Stand und Perspektiven der industriellen Biotechnologie: Verfahren, Anwendungen, ökonomische Perspektiven. Innovationsanalyse Teil I. BÜRO FÜR TECHNIKFOLGEN-ABSCHÄTZUNG BEIM DEUTSCHEN BUNDESTAG, Berlin.
- ANDERSON, E. M., R. KATAHIRA, M. REED, M. G. RESCH, E. M. KARP, G. T. BECKHAM und Y. ROMÁN-LESHKOV (2016): Reductive Catalytic Fractionation of Corn Stover Lignin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4, 6940–6950.
- ANDO, S., I. ARAI, K. KIYOTO und S. HANAI (1986): Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation Technology* 64, 567–570.
- ANDREAE, M. O. (1991): Biomass burning: Its History, Use, and Distribution and Its Impact on Environmental Quality and Global Climate. *In*: Levine, J. S. (Hrsg.), *Global biomass burning: Atmospheric, climatic, and biospheric implications*, MIT Press, Cambridge, Mass, 3–21.
- ANDREAE, M. O. und P. MERLET (2001): Emission of trace gases and aerosols from biomass burning. *Global Biogeochemical Cycles* 15, 955–966.
- BABCOCK, L. W. (1932): Method of producing fermentable sugars and alcohol from wood.
- BAUER, J. (2004): Mikrobiologie der Silierung. 20. Hülsenberger Gespräche, Lübeck, 9.-11.06.2004.
- BAUMBACH, G., H. HARTMANN, I. HÖFER, H. HOFBAUER, T. HÜLSMANN, M. KALTSCHMITT, V. LENZ, U. NEULING, T. NUSSBAUMER, I.

- OBERNBERGER, A.-L. SCHULZE, V. WILK und F. WINTER (2016): Grundlagen der thermo-chemischen Umwandlung biogener Festbrennstoffe. *In*: Kaltschmitt, M., H. Hartmann und H. Hofbauer (Hrsg.), *Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren*, 3. Aufl., Springer Vieweg, Berlin, Heidelberg, 579–814.
- BEHR, A. und T. SEIDENSTICKER (2018): *Einführung in die Chemie nachwachsender Rohstoffe: Vorkommen, Konversion, Verwendung*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- BEN OMAR, N. und F. AMPE (2000): Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and environmental microbiology* 66, 3664–3673.
- BENDER, R. (1979): Method of treating lignocellulose materials to produce ruminant feed.
- BENDLER, M. (2018): *Dampfdruck-Refiner-Aufschluss und enzymatische Hydrolyse von Maisstroh*. Bachelorarbeit. Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Hamburg.
- BERCHEM, T., O. ROISEUX, C. VANDERGHEM, A. BOISDENGHIEN, G. FOUCART und A. RICHEL (2017): Corn stover as feedstock for the production of ethanol: chemical composition of different anatomical fractions and varieties. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 11, 430–440.
- BERLIN, A., V. MAXIMENKO, N. GILKES und J. N. SADDLER (2007): Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 287–296.
- BIOÖKONOMIERAT (2022): *Bioökonomie: Gemeinsam eine nachhaltige Zukunft gestalten: 1. Arbeitspapier des III. Bioökonomierats*.
- BMBF und BMEL (2020): *Nationale Bioökonomiestrategie*.
- BMBF und BMEL (2022): *Bioökonomie in Deutschland: Chancen für eine biobasierte und nachhaltige Zukunft*.
- BOERJAN, W., J. RALPH und M. BAUCHER (2003): Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology* 54, 519–546.
- BOTHAST, R. J., G. A. BENNETT, J. E. VANCAUWENBERGE und J. L. RICHARD (1992): Fate of Fumonisin B(1) in Naturally Contaminated Corn during Ethanol Fermentation. *Applied and environmental microbiology* 58, 233–236.
- BOURGUIGNON, D. (2015): *EU biofuels policy: Dealing with indirect land use change*. European Parliamentary Research Service.

- BRADY, S. K., S. SREELATHA, Y. FENG, S. P. S. CHUNDAWAT und M. J. LANG (2015): Cellobiohydrolase 1 from *Trichoderma reesei* degrades cellulose in single cellobiose steps. *Nature communications* 6, 10149.
- BRASCH, D. J. und K. W. FREE (1965): Prehydrolysis-Kraft pulping of *Pinus radiata* grown in New Zealand. *TAPPI* 48, 245–248.
- BROWNELL, H. H., E. K. YU und J. N. SADDLER (1986): Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering* 28, 792–801.
- BURA, R. (2004): Bioconversion of corn fibre to ethanol. Dissertation. University of British Columbia, Vancouver.
- BURNS, D. S., H. OOSHIMA und A. O. CONVERSE (1989): Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology* 20-21, 79–94.
- CANTARELLA, M., L. CANTARELLA, A. GALLIFUOCO, A. SPERA und F. ALFANI (2004a): Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry* 39, 1533–1542.
- CANTARELLA, M., L. CANTARELLA, A. GALLIFUOCO, A. SPERA und F. ALFANI (2004b): Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnology progress* 20, 200–206.
- CAULFIELD, D. E. und W. E. MOORE (1974): Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Wood Sci*, 375–379.
- CHANDRA, R. P., R. BURA, W. E. MABEE, A. BERLIN, X. PAN und J. N. SADDLER (2007): Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 108, 67–93.
- CHANG, J., W. CHENG, Q. YIN, R. ZUO, A. SONG, Q. ZHENG, P. WANG, X. WANG und J. LIU (2012): Effect of steam explosion and microbial fermentation on cellulose and lignin degradation of corn stover. *Bioresource Technology* 104, 587–592.
- CHANG, V. S. und M. T. HOLTZAPPLE (2000): Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. *Applied biochemistry and biotechnology* 84-86, 5–38.
- CHAVES-LÓPEZ, C., C. ROSSI, F. MAGGIO, A. PAPARELLA und A. SERIO (2020): Changes Occurring in Spontaneous Maize Fermentation: An Overview. *Fermentation* 6, 36.

- CHEN, H. (2015): Lignocellulose biorefinery engineering: Principles and applications, Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
- CHEN, H.-Z. und Z.-H. LIU (2015): Steam explosion and its combinatorial pretreatment refining technology of plant biomass to bio-based products. *Biotechnology journal* 10, 866–885.
- CHEN, Q., M. N. MARSHALL, S. M. GEIB, M. TIEN und T. L. RICHARD (2012): Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresource Technology* 117, 186–192.
- CHEN, S., X. ZHANG, D. SINGH, H. YU und X. YANG (2010): Biological pretreatment of lignocellulosics: potential, progress and challenges. *Biofuels* 1, 177–199.
- CHEN, S.-F., R. A. MOWERY, C. K. CHAMBLISS und G. P. VAN WALSUM (2007): Pseudo reaction kinetics of organic degradation products in dilute-acid-catalyzed corn stover pretreatment hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering* 98, 1135–1145.
- CHEN, Y., M. A. STEVENS, Y. ZHU, J. HOLMES und H. XU (2013): Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels* 6, 8.
- CHERUBINI, F. und A. H. STRØMMAN (2011): Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 5, 548–561.
- CHINNAPPAN, A., C. BASKAR und H. KIM (2016): Biomass into chemicals: green chemical conversion of carbohydrates into 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquids. *RSC Advances* 6, 63991–64002.
- CHORNET, E. und R. P. OVEREND (2017): How the Severity Factor in Biomass Hydrolysis Came About. *In*: Ruiz, H. A., M. Hedegaard Thomsen und H. L. Trajano (Hrsg.), *Hydrothermal Processing in Biorefineries*, Springer International Publishing, Cham, 1–3.
- CHUM, H. L., D. K. JOHNSON, S. K. BLACK und R. P. OVEREND (1990): Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied biochemistry and biotechnology* 24-25, 1–14.
- CUBAS-CANO, E., C. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, I. BALLESTEROS und E. TOMÁS-PEJÓ (2020): Efficient utilization of hydrolysates from steam-exploded gardening residues for lactic acid production by optimization of enzyme addition and pH control. *Waste management (New York, N.Y.)* 107, 235–243.
- CUBAS-CANO, E., C. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M. BALLESTEROS und E. TOMÁS-PEJÓ (2018): Biotechnological advances in lactic acid production by lactic

- acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 12, 290–303.
- CÜRTEN, C. und A. C. SPIEB (2018): Enzyme zum Abbau von Biomasse. *In: Jaeger, K.-E., A. Liese und C. Syldatk (Hrsg.), Einführung in die Enzymtechnologie, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 265–282.*
- DAVIES, G. und B. HENRISSAT (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859.
- DEKKER, R. F. und A. F. WALLIS (1983): Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion. *Biotechnology and Bioengineering* 25, 3027–3048.
- DEL G. RÍO, P., P. GULLÓN, F. R. REBELO, A. ROMANÍ, G. GARROTE und B. GULLÓN (2020): A Whole-Slurry Fermentation Approach to High-Solid Loading for Bioethanol Production from Corn Stover. *Agronomy* 10, 1790.
- DEUTSCHLE, A. (2015): Charakterisierung und Anwendung von kationischen Arabinoxylanen. Dissertation. Universität Hamburg, Hamburg.
- DIECKMANN, C., H. HARTMANN, M. KALTSCHMITT und J. B. RESSEL (2016): Transport, Trocknung, Konservierung und Lagerung. *In: Kaltschmitt, M., H. Hartmann und H. Hofbauer (Hrsg.), Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren, 3. Aufl., Springer Vieweg, Berlin, Heidelberg, 493–578.*
- DOEBLEY, J. F., B. S. GAUT und B. D. SMITH (2006): The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127, 1309–1321.
- DOI, S., M. KAWAMURA, K. OYAMA, T. AKAMATSU, M. MIZOBUCHI, Y. OYAMA, T. MASUDA und N. KAMEMURA (2020): Bioactivity of alginetin, a caramelization product of pectin: Cytometric analysis of rat thymic lymphocytes using fluorescent probes. *PLoS one* 15, e0241290.
- DONALDSON, L. A., K. K. Y. WONG und K. L. MACKIE (1988): Ultrastructure of steam-exploded wood. *Wood Science and Technology* 22, 103–114.
- DUNLOP, A. P. (1948): Furfural Formation and Behavior. *Industrial & Engineering Chemistry* 40, 204–209.
- EBRINGEROVÁ, A. und T. HEINZE (2000): Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21, 542–556.
- EBRINGEROVÁ, A., Z. HROMÁDKOVÁ und T. HEINZE (2005): Hemicellulose. *In: Heinze, T. (Hrsg.), Polysaccharides I, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1–67.*



- EISENHUBER, K., A. JÄGER, J. WIMBERGER und H. KAHR (2013): Comparison of different pretreatment methods for straw for lignocellulosic bioethanol production. *Agronomy Research* 11, 173–182.
- ERNSTING, A. und R. SMOLKER (2018): Biofuelwatch report: Dead End Road: The False Promise of Cellulosic Biofuels. BIOFUELWATCH.
- EXCOFFIER, G., A. PEGUY, M. RINAUDO und M. R. VIGNON (1991): Evolution of lignocellulosic components during Steam Explosion.: Potential Applications. *In*: Focher, B., A. Marzetti und V. Crescenzi (Hrsg.), *Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications*, Gordon and Breach Science Publishers, 83–95.
- FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E. V. (2020): *Anbau und Verwendung nachwachsender Rohstoffe in Deutschland*. Gülzow.
- FANG, H., C. ZHAO und X.-Y. SONG (2010): Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresource Technology* 101, 4111–4119.
- FENG, Y., X. QI, H. JIAN, R.-C. SUN und J. JIANG (2012): Effect of inhibitors on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification fermentation for lactic acid production from steam explosion pretreated lespedeza stalks. *BioResources* 7, 3755–3766.
- FERRARA, M., M. HAIDUKOWSKI, M. D'IMPERIO, A. PARENTE, E. de ANGELIS, L. MONACI, A. F. LOGRIECO und G. MULÈ (2021): New insight into microbial degradation of mycotoxins during anaerobic digestion. *Waste management (New York, N.Y.)* 119, 215–225.
- FIDDLER, W., W. E. PARKER, A. E. WASSERMAN und R. C. DOERR (1967): Thermal decomposition of ferulic acid. *Journal of agricultural and food chemistry* 15, 757–761.
- FLESCHHUT, M. und J. EDER (2016): Körnermaisstroh – ein Substrat mit überraschendem Potential: Erträge und Methanausbeuten, *Grub*, Okt. 20, 2016.
- FLESCHHUT, M. und M. STROBL (2017): Körnermaisstroh – ein Substrat, das Hoffnungen weckt. *Biogas Journal*, 26–33.
- FLESCHHUT, M., S. THURNER, J. OSTERTAG und J. EDER (2017): Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben: Verwertung von Körnermaisstroh für die Biogasproduktion (N/14/07).

- GALBE, M. und G. ZACCHI (2002): A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618–628.
- GARLOCK, R. J., S. P. S. CHUNDAWAT, V. BALAN und B. E. DALE (2009): Optimizing harvest of corn stover fractions based on overall sugar yields following ammonia fiber expansion pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels* 2.
- GARROTE, G., H. DOMÍNGUEZ und J. C. PARAJÓ (1999): Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh- und Werkstoff* 57, 191–202.
- GARROTE, G., H. DOMÍNGUEZ und J. C. PARAJÓ (2001): Generation of xylose solutions from *Eucalyptus globulus* wood by autohydrolysis–posthydrolysis processes: posthydrolysis kinetics. *Bioresource Technology* 79, 155–164.
- GIULIANO, A., M. POLETTO und D. BARLETTA (2016): Process optimization of a multi-product biorefinery: The effect of biomass seasonality. *Chemical Engineering Research and Design* 107, 236–252.
- GLASSNER, D. A., J. R. HETTENHAUS und T. M. SCHECHINGER (1998): Corn stover collection project. *BioEnergy '98: Expanding BioEnergy Partnerships*, 1100–1110.
- GLASSNER, D. A., J. R. HETTENHAUS und T. M. SCHECHINGER (1999): *Corn Stover Potential: Recasting the Corn Sweetener Industry*, Phoenix, 1998.
- GOLECHA, R. und J. GAN (2016): Effects of corn stover year-to-year supply variability and market structure on biomass utilization and cost. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 57, 34–44.
- GONG, L., L. HUANG und Y. ZHANG (2012): Effect of steam explosion treatment on barley bran phenolic compounds and antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 7177–7184.
- GRETHLEIN, H. E. (1985): The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *Bio/Technology* 3, 155–160.
- GRISSE, R. D., D. MCCULLOUGH, J. S. CUNDIFF und J. D. JUDD (2013): Harvest schedule to fill storage for year-round delivery of grasses to biorefinery. *Biomass & Bioenergy* 55, 331–338.
- GROUS, W. R., A. O. CONVERSE und H. E. GRETHLEIN (1986): Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme and Microbial Technology* 8, 274–280.
- HAGEL, S. und B. SAAKE (2020): Fractionation of Waste MDF by Steam Refining. *Molecules* 25.

- HASSAN, S. S., G. A. WILLIAMS und A. K. JAISWAL (2019): Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. *Trends in biotechnology* 37, 231–234.
- HEITZ, M., E. CAPEK-MÉNARD, P. G. KOEBERLE, J. GAGNÉ, E. CHORNET, R. P. OVEREND, J. D. TAYLOR und E. YU (1991): Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource Technology* 35, 23–32.
- HENDRIKS, A. T. und G. ZEEMAN (2009): Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18.
- HENRIKSSON, G. und H. LENNHOLM (2009): Cellulose and Carbohydrate Chemistry. *In: Ek, M., G. Gellerstedt und G. Henriksson (Hrsg.), Wood Chemistry and Wood Biotechnology, De Gruyter, Berlin, 71–99.*
- HIMMEL, M. E., W. S. ADNEY, J. O. BAKER, R. A. NIEVES und S. R. THOMAS (1996): Cellulases: Structure, Function, and Applications. *In: Wyman, C. E. (Hrsg.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Routledge, Boca Raton, 143–161.*
- HIMMEL, M. E., S.-Y. DING, D. K. JOHNSON, W. S. ADNEY, M. R. NIMLOS, J. W. BRADY und T. D. FOUST (2007): Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807.
- HSU, T.-A. (1996): Pretreatment of biomass. *In: Wyman, C. E. (Hrsg.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Routledge, Boca Raton, 179–212.*
- HU, F., S. JUNG und A. J. RAGAUSKAS (2012): Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 117, 7–12.
- HU, F. und A. J. RAGAUSKAS (2012): Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *BioEnergy Research* 5, 1043–1066.
- IDRIS, A. B., S. M. YUSOFF und A. SHARIF (2000): Sweet corn stover silage production, 1. September - 15. Dezember 1999.
- IGARASHI, K., T. UCHIHASHI, A. KOIVULA, M. WADA, S. KIMURA, T. OKAMOTO, M. PENTTILÄ, T. ANDO und M. SAMEJIMA (2011): Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science* 333, 1279–1282.
- ILANIDIS, D., S. STAGGE, L. J. JÖNSSON und C. MARTÍN (2021): Hydrothermal Pretreatment of Wheat Straw: Effects of Temperature and Acidity on Byproduct Formation and Inhibition of Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation. *Agronomy* 11.

- IOELOVICH, M. und E. MORAG (2011): Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis. *BioResources* 6, 2818–2835.
- ISHIZAWA, C. I., T. JEOH, W. S. ADNEY, M. E. HIMMEL, D. K. JOHNSON und M. F. DAVIS (2009): Can delignification decrease cellulose digestibility in acid pretreated corn stover? *Cellulose* 16, 677–686.
- ISIKGOR, F. H. und C. R. BECER (2015): Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* 6, 4497–4559.
- JACQUET, N., N. QUIÉVY, C. VANDERGHEM, S. JANAS, C. BLECKER, B. WATHELET, J. DEVAUX und M. PAQUOT (2011): Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polymer Degradation and Stability* 96, 1582–1588.
- JAEGER, K.-E., V. THIEMAN und G. ANTRANIKIAN (2006): *Biokatalyse, Angewandte Mikrobiologie*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 135–160.
- JANZON, R., F. SCHÜTT, S. OLDENBURG, E. FISCHER, I. KÖRNER und B. SAAKE (2014): Steam pretreatment of spruce forest residues: optimal conditions for biogas production and enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate polymers* 100, 202–210.
- JÖNSSON, L. J., B. ALRIKSSON und N.-O. NILVEBRANT (2013): Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6.
- JÖNSSON, L. J. und C. MARTÍN (2016): Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199, 103–112.
- JOSE, J. und T. F. MEYER (2007): The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 600–619.
- KAAR, W. (2000): Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass & Bioenergy* 18, 189–199.
- KAMIDE, K. (2005): *Cellulose and cellulose derivatives: Molecular characterization and its applications*, Boston, Amsterdam.
- KATŌ, K. und H. KOMORITA (1968): Pyrolysis of Cellulose. *Agricultural and Biological Chemistry* 32, 21–26.
- KEMPPAINEN, K., J. INKINEN, J. UUSITALO, T. NAKARI-SETÄLÄ und M. SIIKA-AHO (2012): Hot water extraction and steam explosion as pretreatments for ethanol production from spruce bark. *Bioresource Technology* 117, 131–139.

- KHATUN, M., L. WANG, J. ZHAO und H. CHEN (2019): Tissue fractionation of corn stover through steam explosion-assisted mechanical carding: Its effect on enzymatic hydrolysis and pulping. *Biomass & Bioenergy* 122, 109–116.
- KIM, S. und M. T. HOLTZAPPLE (2006): Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. *Bioresource Technology* 97, 778–785.
- KIM, T. H., J. S. KIM, C. SUNWOO und Y. LEE (2003): Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology* 90, 39–47.
- KIM, T. H. und Y. Y. LEE (2005): Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresource Technology* 96, 2007–2013.
- KIM, Y., T. KREKE, N. S. MOSIER und M. R. LADISCH (2014): Severity factor coefficients for subcritical liquid hot water pretreatment of hardwood chips. *Biotechnology and Bioengineering* 111, 254–263.
- KLEMM, D., B. HEUBLEIN, H.-P. FINK und A. BOHN (2005a): Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44, 3358–3393.
- KLEMM, D., H.-P. SCHMAUDER und T. HEINZE (2005b): Cellulose. *In: Vandamme, E. J., S. de Baets und A. Steinbüchel (Hrsg.), Biopolymers Online, Wiley.*
- KLINKE, H. B., A. B. THOMSEN und B. K. AHRING (2004): Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 10–26.
- KLUPSCH, R. (2000): Untersuchungen zur Herstellung von Chemiezellstoff aus Aspen- und Buchenholz nach dem Dampfdruck-Extraktionsverfahren. Dissertation. Universität Hamburg, Hamburg.
- KLUPSCH, R., O. KORDSACHIA, J. PULS und T. KARSTENS (2001): Herstellung von Chemiezellstoffen nach dem Dampfdruck-Extraktionsverfahren. *Das Papier*, 32–38.
- KOUHI, M. und K. SHAMS (2019): Bulk features of catalytic co-pyrolysis of sugarcane bagasse and a hydrogen-rich waste: The case of waste heavy paraffin. *Renewable Energy* 140, 970–982.
- KOVAČIĆ, Đ., D. KRALIK, S. RUPČIĆ, D. JOVIČIĆ, R. SPAJIĆ und M. TIŠMA (2017): Soybean Straw, Corn Stover and Sunflower Stalk as Possible Substrates for Biogas Production in Croatia: A Review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 31, 187–198.

- KRAFFT, M. J., M. BENDLER, A. SCHREIBER und B. SAAKE (2020a): Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover. *Agronomy* 10, 811.
- KRAFFT, M. J., J. BERGER und B. SAAKE (2021): Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases Obtained After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage. *Frontiers in Chemistry* 9, 760657.
- KRAFFT, M. J., O. FREY, K. U. SCHWARZ und B. SAAKE (2020b): Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates. *Molecules* 25, 6022.
- KRAFFT, M. J. und B. SAAKE (2020): 2. PANDA-Zwischenbericht. UNIVERSITÄT HAMBURG, Hamburg.
- KRÄSSIG, H. A. (1993): *Cellulose: Structure, Accessibility and Reactivity*. 2. Aufl., Gordon and Breach, Amsterdam.
- KRISTENSEN, J. B., L. G. THYGESEN, C. FELBY, H. JØRGENSEN und T. ELDER (2008): Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels* 1.
- KROTSCHECK, C., R. NIEVOLL und S. KROMUS (2003): Gewinnung von adsorptiven Produkten aus Maisreststoffen. BUNDESMINISTERIUM FÜR VERKEHR, INNOVATION UND TECHNOLOGIE, Wien.
- KUMAR, B., N. BHARDWAJ, K. AGRAWAL, V. CHATURVEDI und P. VERMA (2020): Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology* 199, 106244.
- KUMAR, R. und C. E. WYMAN (2009): Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 457–467.
- KUMAR, R. und C. E. WYMAN (2014): Strong cellulase inhibition by Mannan polysaccharides in cellulose conversion to sugars. *Biotechnology and Bioengineering* 111, 1341–1353.
- KUMAR SARANGI, P., S. SUBUDHI, L. BHATIA, K. SAHA, D. MUDGIL, K. PRASAD SHADANGI, R. K. SRIVASTAVA, B. PATTNAIK und R. K. ARYA (2023): Utilization of agricultural waste biomass and recycling toward circular bioeconomy. *Environmental Science and Pollution Research* 30, 8526–8539.
- LAMPTEY, J., C. W. ROBINSON und M. MOO-YOUNG (1985): Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass pretreated by low-pressure steam autohydrolysis. *Biotechnology letters* 7, 531–536.

- LAPIERRE, C. (1993): Application of New Methods for the Investigation of Lignin Structure. *In*: Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield und J. Ralph (Hrsg.), Forage Cell Wall Structure and Digestibility, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, 133–166.
- LEE, D., A. H. YU und J. N. SADDLER (1995): Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 45, 328–336.
- LI, J., G. GELLERSTEDT und K. TOVEN (2009): Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresource Technology* 100, 2556–2561.
- LI, J., G. HENRIKSSON und G. GELLERSTEDT (2005): Carbohydrate Reactions During High-Temperature Steam Treatment of Aspen Wood. *Applied biochemistry and biotechnology* 125, 175–188.
- LI, J., G. HENRIKSSON und G. GELLERSTEDT (2007a): Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology* 98, 3061–3068.
- LI, X., S. WANG, L. DUAN, J. HAO, C. LI, Y. CHEN und L. YANG (2007b): Particulate and Trace Gas Emissions from Open Burning of Wheat Straw and Corn Stover in China. *Environmental Science & Technology* 41, 6052–6058.
- LI, Z., H. ZHAI, Y. ZHANG und L. YU (2012): Cell morphology and chemical characteristics of corn stover fractions. *Industrial Crops and Products* 37, 130–136.
- LIU, S., X. LI, S. WU, J. HE, C. PANG, Y. DENG und R. DONG (2014): Fungal pretreatment by *Phanerochaete chrysosporium* for enhancement of biogas production from corn stover silage. *Applied biochemistry and biotechnology* 174, 1907–1918.
- LIU, Z.-H., L. QIN, M.-J. JIN, F. PANG, B.-Z. LI, Y. KANG, B. E. DALE und Y.-J. YUAN (2013): Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresource Technology* 132, 5–15.
- LU, F. und J. RALPH (1999): Detection and determination of p-coumaroylated units in lignins. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 1988–1992.
- MACHADO, G., S. LEON, F. SANTOS, R. LOUREGA, J. DULLIUS, M. E. MOLLMANN und P. EICHLER (2016): Literature Review on Furfural Production from Lignocellulosic Biomass. *Natural Resources* 07, 115–129.

- MAMMAN, A. S., J.-M. LEE, Y.-C. KIM, I. T. HWANG, N.-J. PARK, Y. K. HWANG, J.-S. CHANG und J.-S. HWANG (2008): Furfural: Hemicellulose/xyloosederived biochemical. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2, 438–454.
- MARASAS, W. F. O., R. T. RILEY, K. A. HENDRICKS, V. L. STEVENS, T. W. SADLER, J. GELINEAU-VAN WAES, S. A. MISSMER, J. CABRERA, O. TORRES, W. C. A. GELDERBLUM, J. ALLEGOOD, C. MARTÍNEZ, J. MADDOX, J. D. MILLER, L. STARR, M. C. SULLARDS, A. V. ROMAN, K. A. VOSS, E. WANG und A. H. MERRILL (2004): Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *The Journal of Nutrition* 134, 711–716.
- MARCHESSAULT, R. H. (1991): Steam Explosion: A Refining Process for Lignocellulosics. *In: Focher, B., A. Marzetti und V. Crescenzi (Hrsg.), Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications*, Gordon and Breach Science Publishers, 1–19.
- MASON, W. H. (1927): Pulp and Board from Steam Exploded Wood. *Pap. Trade. J.* 55, 131–136.
- MASON, W. H. (1928): Apparatus for and Process of Explosion Fibration of Lignocellulose Material.
- MERGNER, R. und R. JANSSEN (2013): Demonstration projects. *In: Chiaramonti, D., A. Giovannini, R. Janssen und R. Mergner (Hrsg.), Lignocellulosic Ethanol Process and Demonstration: A Handbook - Part I, WIP Renewable Energies*, München, 100–110.
- MERRILL, E. D. (1930): The improbability of pre-Columbian Eurasian-American contacts in the light of the origin and distribution of cultivated plants. *J. N. Y. Bot. Gard.* 31, 209–312.
- MIAO, Z., Y. SHASTRI, T. E. GRIFT, A. C. HANSEN und K. C. TING (2012): Lignocellulosic biomass feedstock transportation alternatives, logistics, equipment configurations, and modeling. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6, 351–362.
- MICHALAK, L., S. H. KNUTSEN, I. AARUM und B. WESTERENG (2018): Effects of pH on steam explosion extraction of acetylated galactoglucomannan from Norway spruce. *Biotechnology for Biofuels* 11, 311.
- MICHALOWICZ, G., B. TOUSSAINT und M. R. VIGNON (1991): Ultrastructural Changes in Poplar Cell Wall during Steam Explosion Treatment. *Holzforschung* 45, 175–179.



- MIKKONEN, K. S., S. KIRJORANTA, C. XU, J. HEMMING, A. PRANOVICH, M. BHATTARAI, L. PELTONEN, P. KILPELÄINEN, N. MAINA, M. TENKANEN, M. LEHTONEN und S. WILLFÖR (2019): Environmentally-compatible alkyd paints stabilized by wood hemicelluloses. *Industrial Crops and Products* 133, 212–220.
- MIKKONEN, K. S., M. TENKANEN, P. COOKE, C. XU, H. RITA, S. WILLFÖR, B. HOLMBOM, K. B. HICKS und M. P. YADAV (2009): Mannans as stabilizers of oil-in-water beverage emulsions. *LWT - Food Science and Technology* 42, 849–855.
- MISTHILGER, B., M. SCHNEIDER, K. HARMS, T. BURGER und S. THURNER (2019): Silierung von Körnermaisstroh, Grub, Mrz. 14, 2019.
- MONTANÉ, D., X. FARRIOL, J. SALVADÓ, P. JOLLEZ und E. CHORNET (1998): Fractionation of Wheat Straw by Steam-Explosion Pretreatment and Alkali Delignification. *Cellulose Pulp and Byproducts from Hemicellulose and Lignin. Journal of Wood Chemistry and Technology* 18, 171–191.
- MUNKVOLD, G. P. und A. E. DESJARDINS (1997): Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence? *Plant disease* 81, 556–565.
- NARAN, R., S. BLACK, S. R. DECKER und P. AZADI (2009): Extraction and characterization of native heteroxylans from delignified corn stover and aspen. *Cellulose* 16, 661–675.
- NIE, D., L. YAO, X. XU, Z. ZHANG und Y. LI (2021): Promoting corn stover degradation via sequential processing of steam explosion and cellulase/lactic acid bacteria-assisted ensilage. *Bioresource Technology* 337, 125392.
- NIE, Y. und X. T. BI (2018): Techno-economic assessment of transportation biofuels from hydrothermal liquefaction of forest residues in British Columbia. *Energy* 153, 464–475.
- NOOR HASYIERAH, M. S., M. D. M. ZULKALI und K. I. KU SYAHIDAH (2008): Ferulic acid from lignocellulosic biomass: Review. *Malaysian Technical Universities Conference on Engineering and Technology, Putra Brasmana, 08.-10.03.2008*.
- ÖHGREN, K., R. BURA, J. N. SADDLER und G. ZACCHI (2007): Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 98, 2503–2510.
- OLESKOWICZ-POPIEL, P., P. LISIECKI, J. B. HOLM-NIELSEN, A. B. THOMSEN und M. H. THOMSEN (2008): Ethanol production from maize silage as lignocellulosic biomass in anaerobically digested and wet-oxidized manure. *Bioresource Technology* 99, 5327–5334.

- OLESKOWICZ-POPIEL, P., A. B. THOMSEN und J. E. SCHMIDT (2011): Ensiling – Wet-storage method for lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biomass & Bioenergy* 35, 2087–2092.
- OLIVA, J. M., F. SÁEZ, I. BALLESTEROS, A. GONZÁLEZ, M. J. NEGRO, P. MANZANARES und M. BALLESTEROS (2003): Effect of Lignocellulosic Degradation Compounds from Steam Explosion Pretreatment on Ethanol Fermentation by Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *In*: Davison, B. H., J. W. Lee, M. Finkelstein und J. D. McMillan (Hrsg.), *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Humana Press, Totowa, NJ, 141–153.
- OLIVA-TARAVILLA, A., E. TOMÁS-PEJÓ, M. DEMUEZ, C. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ und M. BALLESTEROS (2016): Phenols and lignin: Key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase. *Journal of Biotechnology* 218, 94–101.
- OLIVEIRA, D. M. de, A. FINGER-TEIXEIRA, T. R. MOTA, V. H. SALVADOR, F. C. MOREIRA-VILAR, H. B. C. MOLINARI, R. A. C. MITCHELL, R. MARCHIOSI, O. FERRARESE-FILHO und W. D. DOS SANTOS (2015): Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant biotechnology journal* 13, 1224–1232.
- OSTERTAG, J. und M. FLESCHHUT (2016): Untersuchungen zum Einfluss von Sorte, Erntetermin und Ernteverfahren auf den Ertrag und die Eignung von Maisstrohsilage als Substrat für die Biomethanerzeugung, Grub, 5-6. April 2016.
- OUDIA, A., E. MÉSZÁROS, R. SIMÕES, J. QUEIROZ und E. JAKAB (2007): Pyrolysis-GC/MS and TG/MS study of mediated laccase biodelignification of *Eucalyptus globulus* kraft pulp. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 78, 233–242.
- OVEREND, R. P., E. CHORNET und J. A. GASCOIGNE (1987): Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 321, 523–536.
- PALM, M. und G. ZACCHI (2004): Separation of hemicellulosic oligomers from steam-treated spruce wood using gel filtration. *Separation and Purification Technology* 36, 191–201.
- PALMQVIST, E. und B. HAHN-HÄGERDAL (2000): Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25–33.

- PALMQVIST, E., B. HAHN-HÄGERDAL, Z. SZENGYEL, G. ZACCHI und K. RÈCZEY (1997): Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology* 20, 286–293.
- PANG, H., M. ZHANG, G. QIN, Z. TAN, Z. LI, Y. WANG und Y. CAI (2011): Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* 82, 642–653.
- PARAGINSKI, R. T., N. L. VANIER, K. MOOMAND, M. de OLIVEIRA, E. R. DA ZAVAREZE, R. MARQUES E SILVA, C. D. FERREIRA und M. C. ELIAS (2014): Characteristics of starch isolated from maize as a function of grain storage temperature. *Carbohydrate polymers* 102, 88–94.
- PAREEK, N., T. GILLGREN und L. J. JÖNSSON (2013): Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresource Technology* 148, 70–77.
- PATEL, A. K., A. PANDEY und R. R. SINGHANIA (2019): Production of Cellulolytic Enzymes for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *In: Pandey, A., C. Larroche, C.-G. Dussap, E. Gnansounou, S. K. Khanal und S. Ricke (Hrsg.), Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels, 2. Aufl., Elsevier, 401–426.*
- PAYNE, C. M., B. C. KNOTT, H. B. MAYES, H. HANSSON, M. E. HIMMEL, M. SANDGREN, J. STÅHLBERG und G. T. BECKHAM (2015): Fungal cellulases. *Chemical reviews* 115, 1308–1448.
- PEDERSEN, M. und A. S. MEYER (2010): Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. *New biotechnology* 27, 739–750.
- PERLACK, R. und A. TURHOLLOW (2003): Feedstock cost analysis of corn stover residues for further processing. *Energy* 28, 1395–1403.
- PULS, J., K. POUTANEN, H.-U. KÖRNER und L. VIKARI (1985): Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22, 416–423.
- PURANEN, T., M. ALAPURANEN und J. VEHEMAANPERÄ (2014): Trichoderma Enzymes for Textile Industries. *In: Gupta, V. K., M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina und M. G. Tuohy (Hrsg.), Biotechnology and Biology of Trichoderma, Elsevier, Waltham, Oxford, Amsterdam, 351–362.*

- QIAO, X., C. ZHAO, Q. SHAO und M. HASSAN (2018): Structural Characterization of Corn Stover Lignin after Hydrogen Peroxide Presoaking Prior to Ammonia Fiber Expansion Pretreatment. *Energy & Fuels* 32, 6022–6030.
- QING, Q., B. YANG und C. E. WYMAN (2010): Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology* 101, 9624–9630.
- QURESHI, N., B. C. SAHA, R. E. HECTOR, B. DIEN, S. HUGHES, S. LIU, L. ITEN, M. J. BOWMAN, G. SARATH und M. A. COTTA (2010): Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II – Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass & Bioenergy* 34, 566–571.
- RAGAUSKAS, A. J., G. T. BECKHAM, M. J. BIDDY, R. P. CHANDRA, F. CHEN, M. F. DAVIS, B. H. DAVISON, R. A. DIXON, P. GILNA, M. KELLER, P. LANGAN, A. K. NASKAR, J. N. SADDLER, T. J. TSCHAPLINSKI, G. A. TUSKAN und C. E. WYMAN (2014): Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science* 344, 1246843.
- RALPH, J., R. D. HATFIELD, J. H. GRABBER, H.-J. G. JUNG, S. QUIDEAU und R. F. HELM (1998): Cell Wall Cross-Linking in Grasses by Ferulates and Diferulates. *In: Lewis, N. G. und S. Sarkanen (Hrsg.), Lignin and Lignan Biosynthesis, American Chemical Society, Washington, DC, 209–236.*
- RALPH, J., R. D. HATFIELD, S. QUIDEAU, R. F. HELM, J. H. GRABBER und H.-J. G. JUNG (1994): Pathway of p-Coumaric Acid Incorporation into Maize Lignin As Revealed by NMR. *Journal of the American Chemical Society* 116, 9448–9456.
- RAMOS, L. P., C. BREUIL und J. N. SADDLER (1992): Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology* 34, 37–48.
- RANUM, P., J. P. PEÑA-ROSAS und M. N. GARCIA-CASAL (2014): Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312, 105–112.
- RASMUSSEN, H., H. R. SØRENSEN und A. S. MEYER (2014): Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydrate Research* 385, 45–57.
- REN, J.-L. und R.-C. SUN (2010): Hemicelluloses, Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels, Elsevier, 73–130.
- RICHEY, C. B., J. B. LILJEDAHL und V. L. LECHTENBERG (1982): Corn Stover Harvest for Energy Production. *Transactions of the ASAE* 25, 834–839.

- RIPA, M., L. J. DI FELICE und M. GIAMPIETRO (2021): The energy metabolism of post-industrial economies. A framework to account for externalization across scales. *Energy* 214, 118943.
- RODRIGUES, A. C., M. Ø. HAVEN, J. LINDEDAM, C. FELBY und M. GAMA (2015): Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme and Microbial Technology* 79, 70–77.
- ROSENAU, T. (2018): Advances in biorefinery research. *Holzforschung* 73, 1–2.
- RUIZ, E., C. CARA, P. MANZANARES, M. BALLESTEROS und E. CASTRO (2008): Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 160–166.
- RUIZ, H. A., M. GALBE, G. GARROTE, D. M. RAMIREZ-GUTIERREZ, E. XIMENES, S.-N. SUN, D. LACHOS-PEREZ, R. M. RODRÍGUEZ-JASSO, R.-C. SUN, B. YANG und M. R. LADISCH (2021): Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept. *Bioresource Technology* 342, 125961.
- RUSSELL, J. R. (1986): Influence of harvest date on the nutritive value and ensiling characteristics of maize stover. *Animal Feed Science and Technology* 14, 11–27.
- SAHA, B. C., T. YOSHIDA, M. A. COTTA und K. SONOMOTO (2013): Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Industrial Crops and Products* 44, 367–372.
- SANNIGRAHI, P., D. H. KIM, S. JUNG und A. J. RAGAUSKAS (2011): Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy Environ. Sci.* 4, 1306–1310.
- SANNIGRAHI, P. und A. J. RAGAUSKAS (2011): Characterization of Fermentation Residues from the Production of Bio-Ethanol from Lignocellulosic Feedstocks. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 5, 514–519.
- SHELLER, H. V. und P. ULVSKOV (2010): Hemicelluloses. *Annual review of plant biology* 61, 263–289.
- SCHERZINGER, K. und H. DEGENHART (2023): Folgekonzepte für den Weiterbetrieb von landwirtschaftlichen Biogasanlagen: Eine Betrachtung aus Betreiber- und Bankenperspektive, Berlin.
- SCHOBER, C. M. (2008): Untersuchungen zum Einsatz technischer und mikrobiell hergestellter Enzymsysteme zur Hydrolyse der Lignocellulose in Maissilage.

- Dissertation. Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Hohenheim.
- SCHÜTT, F. (2012): Dampfdruckaufschluss und enzymatische Hydrolyse von Pappelholz. Dissertation. Universität Hamburg, Hamburg.
- SCHÜTT, F., N. P. HAAS, L. DEHNE, G. KOCH, R. JANZON und B. SAAKE (2013): Steam pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar wood: comparison of optimal conditions with and without SO<sub>2</sub> impregnation. *Holzforschung* 67, 9–17.
- SCHÜTT, F., J. PULS und B. SAAKE (2011): Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood. *Holzforschung* 65, 453–459.
- SCHÜTT, F., B. WESTERENG, S. J. HORN, J. PULS und B. SAAKE (2012): Steam refining as an alternative to steam explosion. *Bioresource Technology* 111, 476–481.
- SELIG, M. J., S. VIAMAJALA, S. R. DECKER, M. P. TUCKER, M. E. HIMMEL und T. B. VINZANT (2007): Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology progress* 23, 1333–1339.
- SHEVCHENKO, S., K. CHANG, J. ROBINSON und J. SADDLER (2000): Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicellulose component after steam explosion of softwood chips. *Bioresource Technology* 72, 207–211.
- SHEVCHENKO, S. M., R. P. BEATSON und J. N. SADDLER (1999): The Nature of Lignin from Steam Explosion/Enzymatic Hydrolysis of Softwood. *In*: Davison, B. H. und M. Finkelstein (Hrsg.), Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Humana Press, Totowa, NJ, 867–876.
- SHINDE, S. D., X. MENG, R. KUMAR und A. J. RAGAUSKAS (2018): Recent advances in understanding the pseudo-lignin formation in a lignocellulosic biorefinery. *Green Chemistry* 20, 2192–2205.
- SHINNERS, K., B. BINVERSIE, R. MUCK und P. WEIMER (2007): Comparison of wet and dry corn stover harvest and storage. *Biomass & Bioenergy* 31, 211–221.
- SIGOILLOT, J.-C. und C. FAULDS (2016): Second Generation Bioethanol. *In*: Soccol, C. R., S. K. Brar, C. Faulds und L. P. Ramos (Hrsg.), *Green Fuels Technology*, Springer International Publishing, Cham, 213–239.
- SINGH SANDHU, K., N. SINGH und S.-T. LIM (2007): A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT - Food Science and Technology* 40, 1527–1536.

- SMITH, B. G. und P. J. HARRIS (1999): The polysaccharide composition of Poales cell walls. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 33–53.
- SPÖRL, J. M., F. HERMANUTZ und M. R. BUCHMEISER (2018): Single-component composites made from pure cellulose. *Lightweight Design worldwide* 11, 12–17.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2020): Anbaufläche ausgewählter Anbaukulturen im Zeitvergleich. URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Feldfruechte-Gruenland/Tabellen/gtz-zeitreihe-anbauflaeche-augewaehlter-anbaukulturen.html>.
- STEPHEN, A. M. (1983): Other Plant Polysaccharides, *The Polysaccharides*, Elsevier, 97–193.
- SULTANA, A., A. KUMAR und D. HARFIELD (2010): Development of agri-pellet production cost and optimum size. *Bioresource Technology* 101, 5609–5621.
- SUN, Y. und J. CHENG (2002): Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1–11.
- SUN, Y., X. GONG, Z. WANG, C. HUANG, X. MA und M. WANG (2019): Two-Step Pretreatment of Corn Stover Silage Using Non-ionic Surfactant and Ferric Nitrate for Enhancing Sugar Recovery and Enzymatic Digestibility of Cellulose. *Applied biochemistry and biotechnology* 189, 65–75.
- SUN, Y., X. LU, R. ZHANG, X. WANG und S. ZHANG (2011a): Pretreatment of corn stover silage with  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  for fermentable sugar production. *Applied biochemistry and biotechnology* 164, 918–928.
- SUN, Y., X. LU, S. ZHANG, R. ZHANG und X. WANG (2011b): Kinetic study for  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  catalyzed hemicellulose hydrolysis of different corn stover silages. *Bioresource Technology* 102, 2936–2942.
- TAKADA, M., R. P. CHANDRA und J. N. SADDLER (2019): The influence of lignin migration and relocation during steam pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood and corn stover biomass substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 116, 2864–2873.
- TANJORE, D., T. L. RICHARD und M. N. MARSHALL (2012): Experimental methods for laboratory-scale ensilage of lignocellulosic biomass. *Biomass & Bioenergy* 47, 125–133.
- TEERI, T. und G. HENRIKSSON (2009): Enzymes Degrading Wood Components. *In*: Ek, M., G. Gellerstedt und G. Henriksson (Hrsg.), *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, De Gruyter, Berlin, 245-271.

- TELEMAN, A. (2009): Hemicelluloses and Pectins. *In*: Ek, M., G. Gellerstedt und G. Henriksson (Hrsg.), Wood Chemistry and Wood Biotechnology, De Gruyter, Berlin, 101-120.
- TENGBORG, C., M. GALBE und G. ZACCHI (2001): Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 835–844.
- TEUGJAS, H. und P. VÄLJAMÄE (2013): Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels* 6, 104.
- THOMSEN, M. H., J. B. HOLM-NIELSEN, P. OLESKOWICZ-POPIEL und A. B. THOMSEN (2008): Pretreatment of Whole-Crop Harvested, Ensiled Maize for Ethanol Production. *Applied biochemistry and biotechnology* 148, 23–33.
- THORESEN, M., S. MALGAS und B. I. PLETSCHKE (2022): Enzyme adsorption-desorption and evaluation of various cellulase recycling strategies for steam pretreated Eucalyptus enzymatic degradation. *Biomass Conversion and Biorefinery* 12, 265–274.
- THRÄN, D., O. ARENDT, H. ADWIRAAH und M. KALTSCHMITT (2016): Nebenprodukte, Rückstände und Abfälle. *In*: Kaltschmitt, M., H. Hartmann und H. Hofbauer (Hrsg.), Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren, 3. Aufl., Springer Vieweg, Berlin, Heidelberg, 273–323.
- THURNER, S., M. FLESCHHUT und J. EDER (2017): Verfahrenstechnik zum Einsatz von Körnermaisstroh in der Biogaserzeugung, Deggendorf, Nov. 21, 2017.
- TOLAN, J. S. (2002): Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Technologies and Environmental Policy* 3, 339–345.
- TOSZEGI, P. und R. SORGE (1984): Neue Konservierungsmethoden für Körnermais in der Ungarischen VR. *agrartechnik - Landtechnische Zeitschrift der DDR* 34, 104–106.
- TOZAKIDIS, I. E. P. (2016): Autodisplay von Cellulasen auf *Pseudomonas putida*, *Zymobacter palmae* und *Zymomonas mobilis* - ein Ganzzell-Ansatz zur vereinfachten Hydrolyse von Cellulose. Dissertation. Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Münster.
- TOZAKIDIS, I. E. P., P. QUEHL, J. SCHÜÜRMAN und J. JOSE (2015): Let's do it outside: neue Biokatalysatoren mittels surface display. *BIOSpektrum* 21, 668–671.
- U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, R. D. PERLACK, L. M. EATON, A. F. TURHOLLOW, JR., M. H. LANGHOLTZ, C. C. BRANDT, M. E. DOWNING, R. L. GRAHAM, L. L. WRIGHT, J. M. KAVKEWITZ, A. M. SHAMEY, R. G.



- NELSON, B. J. STOKES, W. L. ROONEY, D. J. MUTH, JR., J. R. HESS, J. M. ABODEELY, C. HELLWINCKEL, DE LA TORRE UGARTE, DANIAL, D. C. YODER, J. P. LYON, T. G. RIALS, T. A. VOLK, T. S. BUCHHOLZ, L. P. ABRAHAMSON, R. P. ANEX, T. B. VOIGT, W. BERGUSON, D. E. RIEMENSCHNEIDER, D. L. KARLEN, J. M. F. JOHNSON, R. B. MITCHELL, K. P. VOGEL, E. P. RICHARD, JR., J. TATARKO, L. E. WAGNER, K. E. SKOG, P. K. LEBOW, D. P. DYKSTRA, M. A. BUFORD, P. D. MILES, D. A. SCOTT, J. H. PERDUE, R. B. RUMMER, J. BARBOUR, J. A. STANTURF, D. B. MCKEEVER, R. S. ZALESNY, JR., E. A. GEE, P. D. CASSIDY und D. T. LIGHTLE (2011): U.S. Billion-ton Update: Biomass Supply for a Bioenergy and Bioproducts Industry.
- ULBRICHT, R. J., S. J. NORTHUP und J. A. THOMAS (1984): A Review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Parenteral Solutions. *Toxicological Sciences* 4, 843–853.
- VALMET OYJ (2018): Valmet to deliver the world's first BioTrac™ Steam Explosion System for black pellet production in France.
- VALMET OYJ (2021): Valmet's new pilot facility is now in operation at its Fiber Technology Center in Sundsvall, Sweden.
- VANHOLME, R., K. MORREEL, J. RALPH und W. BOERJAN (2008): Lignin engineering. *Current opinion in plant biology* 11, 278–285.
- VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE E.V. (2016): Klassifikation und Gütekriterien von Bioraffinerien (VDI 6310 Blatt 1).
- VIGNON, M. R., C. GARCIA-JALDON und D. DUPEYRE (1995): Steam explosion of woody hemp chènevotte. *International Journal of Biological Macromolecules* 17, 395–404.
- VIQUEZ, O. M., M. E. CASTELL-PEREZ und R. A. SHELBY (1996): Occurrence of Fumonisin B 1 in Maize Grown in Costa Rica. *Journal of agricultural and food chemistry* 44, 2789–2791.
- VIVEKANAND, V., E. F. OLSEN, V. G. H. EIJSINK und S. J. HORN (2013): Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresource Technology* 127, 343–349.
- VROOM, K. E. (1957): The "H" factor : a means of expressing cooking times and temperatures as a single variable. *Pulp Paper Mag Can.* 58, 228–231.
- WAGEMANN, K., T. BENZIG, T. BÖHLAND, U. R. FRITSCHKE, M. FRÖHLING, A. GRÖNGRÖFT, A. GUENTHER, J. GÜNTHER, M. HEMPEL, A. HILTERMANN, T. HIRTH, N. HOLST, B. HORBACH, R. JOSSEK, B. KAMM, A.

- KOLTERMANN, D. MAGA, F. MÜLLER-LANGER, D. PETERS, J. PULS, J. ROTHERMEL, K. STERNBERG, H. STICHNOTHE, R. STRAUCH, R. ULBER, A. VETTER, K. VORLOP, W. WACH und M. WOLPERDINGER (2014): Roadmap Bioraffinerien: Im Rahmen der Aktionspläne der Bundesregierung zur stofflichen und energetischen Nutzung nachwachsender Rohstoffe. Bundesregierung.
- WANG, Y., Y. BI und C. GAO (2010): The Assessment and Utilization of Straw Resources in China. *Agricultural Sciences in China* 9, 1807–1815.
- WEIß, J., W. PABST und G. BELLOF (Hrsg.) (2011): Tierproduktion: 243 Tabellen. 14. Aufl., Enke, Stuttgart.
- WENDT, L. M., J. A. MURPHY, W. A. SMITH, T. ROBB, D. W. REED, A. E. RAY, L. LIANG, Q. HE, N. SUN, A. N. HOOVER und Q. A. NGUYEN (2018): Compatibility of High-Moisture Storage for Biochemical Conversion of Corn Stover: Storage Performance at Laboratory and Field Scales. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 6, 30.
- WOOLEY, R., M. RUTH, D. GLASSNER und J. SHEEHAN (1999a): Process Design and Costing of Bioethanol Technology: A Tool for Determining the Status and Direction of Research and Development. *Biotechnology progress* 15, 794–803.
- WOOLEY, R., M. RUTH, J. SHEEHAN, K. IBSEN, H. MAJDESKI und A. GALVEZ (1999b): Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis Current and Futuristic Scenarios.
- WYDRA, S. und B. HÜSING (2018): Von einer fossil basierten zu einer biobasierten Wirtschaft. *Ökologisches Wirtschaften - Fachzeitschrift* 33.
- WYMAN, C. E. (1999): BIOMASS ETHANOL : Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. *Annual Review of Energy and the Environment* 24, 189–226.
- WYMAN, C. E., C. M. CAI und R. KUMAR (2017): Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *In: Meyers, R. A. (Hrsg.), Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, Springer New York, New York, NY, 1–27.
- WYMAN, C. E., S. R. DECKER, M. E. HIMMEL, J. BRADY, C. SKOPEC und L. VIIKARI (2005): Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. *In: Dumitriu, S. (Hrsg.), Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*, 2. Aufl., Dekker, New York.
- WYSS, U. (2005): Beurteilung von Silagen: Merkblatt für die Praxis. *ALP aktuell*, 1–4.

- XIAO, B., X. SUN und R. SUN (2001): Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability* 74, 307–319.
- XIMENES, E., Y. KIM, N. S. MOSIER, B. DIEN und M. R. LADISCH (2011): Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 54–60.
- XU, J., M. H. THOMSEN und A. B. THOMSEN (2010): Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology* 162, 33–42.
- XU, Z., H. HE, S. ZHANG und J. KONG (2017): Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Scientific reports* 7, 13614.
- YAN, K., G. WU, T. LAFLEUR und C. JARVIS (2014): Production, properties and catalytic hydrogenation of furfural to fuel additives and value-added chemicals. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 38, 663–676.
- YANG, B. und C. E. WYMAN (2008): Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2, 26–40.
- YONG, K. J., T. Y. WU, C. B. T. L. LEE, Z. J. LEE, Q. LIU, J. M. JAHIM, Q. ZHOU und L. ZHANG (2022): Furfural production from biomass residues: Current technologies, challenges and future prospects. *Biomass & Bioenergy* 161, 106458.
- YOU, T.-T., L.-M. ZHANG, S.-K. ZHOU und F. XU (2015): Structural elucidation of lignin–carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from *Arundo donax* Linn. *Industrial Crops and Products* 71, 65–74.
- YU, Y., J. WU, X. REN, A. LAU, H. REZAEI, M. TAKADA, X. BI und S. SOKHANSANJ (2022): Steam explosion of lignocellulosic biomass for multiple advanced bioenergy processes: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 154, 111871.
- ZHAI, R., J. HU und J. N. SADDLER (2018): Minimizing cellulase inhibition of whole slurry biomass hydrolysis through the addition of carbocation scavengers during acid-catalyzed pretreatment. *Bioresource Technology* 258, 12–17.
- ZHANG, M., C. ZHAO, Q. SHAO, Z. YANG, X. ZHANG, X. XU und M. HASSAN (2019): Determination of water content in corn stover silage using near-infrared spectroscopy. *Int J Agric & Biol Eng* 12, 143–148.

- ZHANG, Y., L. WANG und H. CHEN (2013): Formation kinetics of potential fermentation inhibitors in a steam explosion process of corn straw. *Applied biochemistry and biotechnology* 169, 359–367.
- ZHANG, Y.-H. P., S.-Y. DING, J. R. MIELENZ, J.-B. CUI, R. T. ELANDER, M. LASER, M. E. HIMMEL, J. R. MCMILLAN und L. R. LYND (2007): Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 214–223.
- ZHANG, Y.-H. P. und L. R. LYND (2004): Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 797–824.
- ZHAO, S., G. LI, N. ZHENG, J. WANG und Z. YU (2018): Steam explosion enhances digestibility and fermentation of corn stover by facilitating ruminal microbial colonization. *Bioresource Technology* 253, 244–251.
- ZHU, Z., N. SATHITSUKSANO, T. VINZANT, D. J. SCHELL, J. D. MCMILLAN und Y.-H. P. ZHANG (2009): Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fractionation: Enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 715–724.

## **7 Beigefügte Publikationen**

- I **Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover**
  
- II **Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates**
  
- III **Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases Obtained After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage**

Publikation I



**Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover**

Malte Jörn Krafft, Marie Bendler, Andreas Schreiber, Bodo Saake

*Agronomy* **2020**, *10*(6), 811

Article

# Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover

Malte Jörn Krafft <sup>1,†</sup> , Marie Bendler <sup>2,†</sup>, Andreas Schreiber <sup>1</sup> and Bodo Saake <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Chemical Wood Technology, University of Hamburg, Haidkrugsweg 1, 22885 Barsbüttel, Germany; malte.krafft@uni-hamburg.de (M.J.K.); andreas.schreiber@uni-hamburg.de (A.S.)

<sup>2</sup> Thünen Institute of Wood Research, Haidkrugsweg 1, 22885 Barsbüttel, Germany; marie.bendler@thuenen.de

\* Correspondence: bodo.saake@uni-hamburg.de; Tel.: +49-40-822-459-206

† Authors of equal contribution.

Received: 7 April 2020; Accepted: 4 June 2020; Published: 8 June 2020



**Abstract:** Agricultural residues are promising and abundant feedstocks for the production of monomeric carbohydrates, which can be gained after pretreatment and enzymatic hydrolysis. These monomeric carbohydrates can be fermented to platform chemicals, like ethanol or succinic acid. Due to its high availability, corn stover is a feedstock of special interest in such considerations. The natural recalcitrance of lignocellulosic material against degradation necessitates a pretreatment before the enzymatic hydrolysis. In the present study, a novel combination of steam refining and alkaline lignin extraction was tested as a pretreatment process for corn stover. This combination combines the enhancement of the enzymatic hydrolysis and steam refining lignin can be gained for further utilization. Afterward, the obtained yields after enzymatic hydrolysis were compared with those after steam refining without alkaline extraction. After steam refining at temperatures between 160 °C and 210 °C and subsequent enzymatic hydrolysis with Cellic® CTec2, it was possible to enhance the digestibility of corn stover and to achieve 65.4% of the available carbohydrates at the lowest up to 89% at the highest conditions as monomers after enzymatic hydrolysis. Furthermore, the enzymatic degradation could be optimized with a subsequent alkaline lignin extraction, especially at low severities under three. After this combined pretreatment, it was possible to enhance the enzymatic digestibility and to achieve up to 106.4% of the available carbohydrates at the lowest conditions and up to 102.2% at the highest temperature as monomers after following enzymatic hydrolysis, compared to analytical acid hydrolysis. Regarding the utilization of the arising lignin after extraction, the lignin was characterized with regard to the molar mass and carbohydrate impurities. In this context, it was found that higher amounts and higher purities of lignin can be attained after pretreatment at severities higher than four.

**Keywords:** corn stover; pretreatment; steam refining; enzymatic hydrolysis; alkaline extraction; lignin

## 1. Introduction

Corn stover is a well-studied agricultural residue of the corn kernel production [1]. It is highly available and a significant amount of the produced straw is undervalued and until now not harvested [2]. Reasons, therefore, are the prevention of soil erosion or the maintaining of soil organic carbon [2,3]. Nonetheless, corn stover is one of the most promising feedstock candidates for large-scale lignocellulose biorefineries [4].

Because of the chemical composition of lignocelluloses, containing high amounts of cellulose and hemicelluloses, the enzymatic hydrolysis (EH) with cellulases is a suitable way to obtain monomeric

carbohydrates for fermentation from the mentioned polysaccharides [3]. The hydrolysis of the glucoside linkage with cellulases (mostly from *T. reesei*) is highly specific to the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic bonds of the cellulose chain, resulting in high yields with nearly no undesired by-products formed in the EH. However, inhibitors are normally formed during pretreatment prior to EH.

The chemical composition of corn stover as a lignocellulosic feedstock involves also disadvantages, like the natural recalcitrance of the complex cellulose-hemicellulose-lignin-structure against microbial degradation and EH [5]. One important way to conquer this recalcitrance is the pretreatment of the raw material [6]. Over the years, different methods and applications have been invented and common classifications distinguish between biological, chemical, physical and (hydro)-thermal processes [6].

One additionally described category is the physicochemical pretreatment [7]. Well-described physicochemical pretreatments are steam pretreatments with and without (an acid) catalyst. They are reported as the most often investigated pretreatment methods and they combine the advantages of a simple process, low energy costs and no necessary recycling of process chemicals [7,8].

An alternative physicochemical pretreatment to the generally used steam explosion technique is steam refining [9–14]. Whereas the defibration of the fibers in steam explosion processes is achieved by pressure relief, some studies revealed that the explosion part of the steam explosion is nearly unnecessary for the enhancement of EH yields [15]. Therefore, the defibration can also be achieved by a refining step at the end of the steaming, then called the steam refining process by, e.g., Schütt et al. [12]. Nonetheless, in contrast to the defibration, the dimension of the used biomass particles has shown a much bigger impact on the results of the subsequent EH [12,15]. For steam-refined poplar wood, EH yields increase up to a severity of around four, which represents temperatures around 200 °C and holding times between 10 and 15 min. At severities higher than four the yields decline due to secondary carbohydrate degradation reactions [11]. Unfortunately, degradation of the pentoses to furfural and degradation of the hexoses to 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) occur in processes with increased temperature, like in steam processes. These components have an inhibitory effect on enzymes and it is essential to get knowledge on the best process conditions [16]. However, 5-HMF and furfural are platform chemicals by themselves and can be converted into several value-added products [17,18].

Today, industrial applications of cellulose systems are available at the commercial market for different purposes [19] and the use of nonfood raw material is of high interest. Further, the use of fermentation sugars and the production of platform chemicals from renewable resources are also highlighted in the literature, especially when the applied biorefinery approach is not subject to the food and fuel debate [20–22]. From this point of view, it is favorable to use undervalued agricultural residues, like corn stover, for the renewable production of highly valuable products.

Several authors describe the effect of the lignin content of the used raw material on the performance of the EH. It can be stated that lignin has a negative impact on the yields after EH [23]. Further, the formation of unproductive bindings between lignin and enzymes are described [24]. On the other hand, it was also reported that a nearly complete delignification below 5% lignin content of corn stover with acidified sodium chlorite results in a significant yield loss during the EH, whereas a softer dilute acid pretreatment improves the EH yields [25]. Suggested reasons are the aggregation of the cellulosic microfibrils after the near removal of lignin and xylan and a resulting decreased accessibility. Stücker et al. [13] report further about the utilization of alkaline-extracted poplar lignins in lignin–phenol–formaldehyde resins after a steam refining process. Due to the reported improvement of the enzymatic hydrolysis and the reported possibility of utilization, the influence of an alkaline lignin extraction should be tested for steam-refined corn stover, although alkaline treatment is reported as a preliminary treatment by itself [26].

The aim of the present study was to investigate the effect of different steaming severities on the EH of corn stover. The steamed fibers were subjected to EH with and without alkaline lignin extraction in order to differentiate the effect of lignin on the overall process balance. The degradation products of the carbohydrates were detected to get an overview of inhibitory compounds in the liquid fraction



after the process. Furthermore, characterization of the extracted lignins was performed correlating steaming severities and lignin characteristics.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Raw Material

The used corn stover was harvested in 2018 in Fulda, Hesse (Germany). The material was separated into leaves, stalks, corn cobs and further impurities and was air-dried. After conditioning by air-drying to a stable dry matter content of 90.7%, the material was chopped with a garden chipper into segments with a length between 6 and 8 cm. For steam refining experiments, only leaves and stalks were used.

For raw material analysis, the ash content was measured according to TAPPI standard T 211 om-16. Extractives were determined by Accelerated Solvent Extraction (ASE) of milled ( $\leq 1$  mm) material with an ASE 350 (Thermo Scientific™ Dionex™, Waltham, MA, USA). Three extraction steps for 10 min at 10 MPa with solvents of different polarities (petrol ether (70 °C); acetone/water 9:1 (70 °C); water (90 °C)) were conducted.

Two-step acid hydrolysis was performed subsequently for the determination of monomeric carbohydrates. Two hundred milligrams of dry material were prehydrolyzed for 60 min with 2 mL of 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The reaction was stopped by the addition of 6 mL deionized water and the sample was transferred with 50 mL deionized water into a 100 mL volumetric flask. The second step of hydrolysis was conducted for 40 min at 120 °C and 0.12 MPa overpressure [27].

Afterward, the samples were cooled to room temperature and then filtered through a sintered glass frit (G4). The undiluted filtrate was used for further analysis, described in detail in Section 2.6. The acid-insoluble residue was washed, dried at 105 °C and gravimetrically weighed [12,27].

### 2.2. Steam Refining

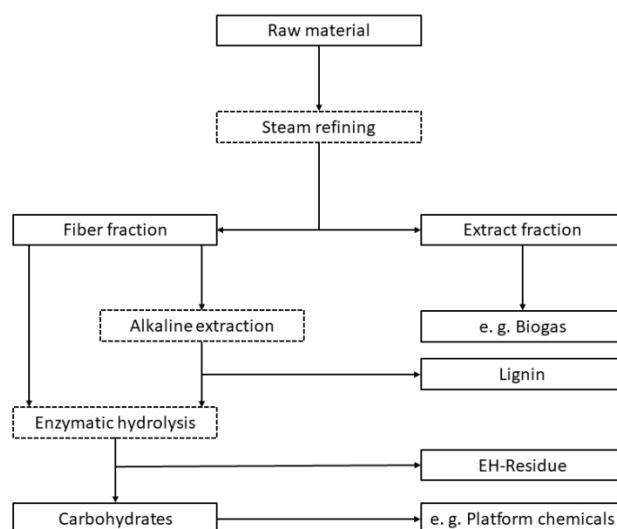
The process of steam refining was conducted in a 10 L defibrator (Martin Busch & Sohn GmbH, Schermbeck, Germany). The input of raw material was 200 g dry material. The four blade-refiner-system (illustrated in [28]) in the reactor was rotated only in the final 30 s of steam treatment. The severity factor was calculated with Equation (1) according to Overend and Chornet [29]:

$$\log R_0 = \log \left( t \times e^{\frac{(T-100)}{14.75}} \right) \quad (1)$$

with time in minutes ( $t$ ); temperature in °C ( $T$ ).

For the further understanding of the used process, the different steps of the process are illustrated as a sequential process schematic in Figure 1.

After steaming and refining the raw material, the fiber fraction was washed and the yields were calculated after measuring the solid content. The liquid extract fraction including the wash water was separated and the amount of the combined aqueous extract fraction was gravimetrically measured for further calculations. For calculating the extract yield, the dilution and solid content of the combined extract were gravimetrically measured after freeze-drying. Further process steps will be explained in the following chapters. According to Equation (1), a trial design from 160 °C up to 210 °C was performed with different time steps as outlined in Table 1.



**Figure 1.** Sequential schematic of the used process. Dotted squares representing process steps, solid lines represent products.

**Table 1.** Reaction conditions and corresponding severity factors.

	Temperature (°C)	Time (min)	Severity Factor (log $R_0$ )
1	160	10	2.77
2	170	10	3.06
3	180	10	3.36
4	180	15	3.53
5	190	10	3.65
6	190	15	3.83
7	190	20	3.95
8	200	10	3.94
9	200	15	4.12
10	200	20	4.25
11	210	10	4.24
12	210	15	4.41
13	210	20	4.54

### 2.3. Acid Hydrolysis of the Extract and Fibers

The acid hydrolysis of the freeze-dried extracts was conducted as a one-step hydrolysis. One hundred milligrams of dry extractive material were suspended with ultrasound in 10 mL deionized water. Then, 1.8 mL 2N  $H_2SO_4$  were added and the suspension was hydrolyzed for 40 min at 120 °C and 0.12 MPa.

For carbohydrate analysis of fibers after steam refining, a two-step hydrolysis (see Section 2.1.) was performed on air-dried and fine milled samples.

### 2.4. Alkaline Lignin Extraction

The lignin extraction was performed according to Klupsch [9] and Schütt et al. [11]. Twenty grams of dry material was treated with 1.6 g (8% of dry raw material) sodium hydroxide and filled up with water to a consistency of 10% solid content. The treatment was carried out at 90 °C for 60 min. The filtered extract was acidified with 6 mL glacial acetic acid to a pH below 4. The precipitated lignin was separated by centrifugation at 18,000×  $g$  for 10 min.

The fiber residue was washed with hot deionized water and the solid content was determined for yield calculations. The lignin fraction was vacuum dried for 24 h and, afterward, the yields were determined gravimetrically.

### 2.5. Enzymatic Hydrolysis (EH)

The EH of the never-dried fibers was performed with 300  $\mu\text{L}$  cellulases (Cellic<sup>®</sup> CTec2, Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark) and 50  $\mu\text{L}$   $\beta$ -glucosidases (Novozyme 188, Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark) per gram dry material for 72 h at 45 °C and a dry matter content of 4%. The dry matter content was adjusted with a pH 5 phosphate citrate (McIlvaine) buffer. Afterward, the hydrolysate and the fibers were transferred into a 250 mL volumetric flask and were filled up with deionized water. The suspension was filtrated through a sintered glass frit (G4) and the undiluted filtrate was used for carbohydrate analysis.

### 2.6. Analytical Methods

Monomeric carbohydrates in the hydrolysates were determined by borate–anion exchange chromatography (borate–AEC) with a Dionex<sup>™</sup> UltiMate<sup>™</sup> 3000 (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA) and MCI GEL<sup>®</sup> CA08F (Mitsubishi Chemical, Tokio, Japan) as anion exchange resin. Two potassium tetraborate/boric acid-buffers (pH 8.6 and pH 9.5) were used in different concentrations as mobile phase after post-column derivation at 65 °C. Carbohydrates were detected at 560 nm via UV/VIS-spectroscopy. More detailed information about the used borate–AEC was reported by Lorenz et al. [27].

For detection of furfural and 5-hydroxymethylfurfural, reversed phase-high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) separation was performed with an AQUASIL<sup>™</sup> C<sub>18</sub> (250  $\times$  4.6 mm; Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA) column for 80 min with 10  $\mu\text{L}$  extract at 25 °C. As a mobile phase, weak acidic water (A; 1 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and acetonitrile (B; C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) were used as eluents in different concentrations and a flow rate of 1 mL/min like shown in Table 2. The detection was conducted at 280 nm.

**Table 2.** Concentrations of the two eluents over time during RP-HPLC.

Time (min)	c (Eluent A) %	c (Eluent B) %
0	97.5	2.5
20	85	15
50	68	32
56	62	38
60	59	41
63	58	42
70	58	42
80	0	100

Size exclusion chromatography (SEC) was performed according to Podschun et al. [30] with a mixture of DMSO and 0.1% LiBr as eluent. One guard PolarGel-M column (50  $\times$  7.5 mm; Agilent, Santa Clara, CA, USA) and two PolarGel-M columns (300  $\times$  7.5 mm; Agilent, Santa Clara, CA, USA) were used with a flow rate of 0.5 mL/min<sup>-1</sup> at 60 °C. Glucose and polyethylene glycol were used as standards with a refractive index detector (RI-501, Shodex<sup>™</sup>, Munich, Germany). The dissolved samples ( $c = 1 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) were shaken for 24 h at room temperature into the eluent. The sample detection was made with a UV-2077 detector (JASCO, Pfungstadt, Germany) at 280 nm and phenol red as detector matching.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Raw Material Characterization

A comprehensive analysis of the raw material is needed to monitor the effect of steam refining. In the first step, the delivered corn stover was fractionated into its different components and existing impurities. The biggest fractions were leaves (44.4%) and stalks (38.6%). In nearly equal

amounts, impurities (8.8%), mainly sand and corncobs (7.2%), occur. Further, minor amounts of corn silks (0.5%) and corn kernels (0.4%) were contained. In contrast to the determined corn stover composition, other studies report varying results. For example, Pordesimo et al. [31] show for corn stover from Tennessee, USA, a composition of 50.9% stalks, 21% leaves, 15.2% corn cobs and 12.9% husks after excluding the grain fraction. Further, they report good accordance with previous studies. However, corn stover is a natural product and its composition depends on the used variety of maize, the environmental conditions, the harvest time of the raw material and the harvesting technology applied [32].

As described before, the main components of corn stover (leaves, stalks and corncobs) represent around 90% of the delivered material. Not surprising, there is only a small amount of corn kernels left after harvesting the corn with a combine harvester. Nevertheless, a significant amount of sand is included as an impurity. For further investigations, the fractions were separated and the steam refining was performed with the leave and stalk fraction.

Hereafter, the chemical compositions of the used raw material and of pure leaves and stalks were analyzed. The results for the carbohydrate distribution, expressed as monomers, the lignin content, ash and the amounts of extracts, are listed in Table 3.

**Table 3.** Chemical composition of the used raw material in % based on raw material.

		Raw Material
Extractives	Petrol ether	0.8
	Acetone/Water (9:1)	8.1
	Water	7.3
	Σ	16.2
Carbohydrates	Glucose	35.6
	Xylose	19.5
	Arabinose	2.9
	Galactose	0.9
	Mannose	0.3
	Rhamnose	0.1
	Σ	59.3
Lignin	acid-insoluble <sup>1</sup>	17.1 <sup>2</sup>
	acid-soluble	2.2
	Σ	19.3 <sup>2</sup>
Ash		6.4

<sup>1</sup> Mainly analogs to Klason-Lignin [33,34]. <sup>2</sup> Proteins, e.g., from leaves can partly be detected as well in the acid-insoluble residue after hydrolysis.

As mentioned, the main characteristics of the original raw material mix were analyzed by ASE, two-step acidic hydrolysis with the following borate-AEC and determination of the ash content (Table 3). Nonetheless, due to the measuring method, proteins from the leaves may partly be detected in the acid-insoluble hydrolysis residue. Therefore, they are overestimating the detected acid-insoluble lignin content. The insoluble amounts of the raw material might be as well indicating slightly high lignin contents.

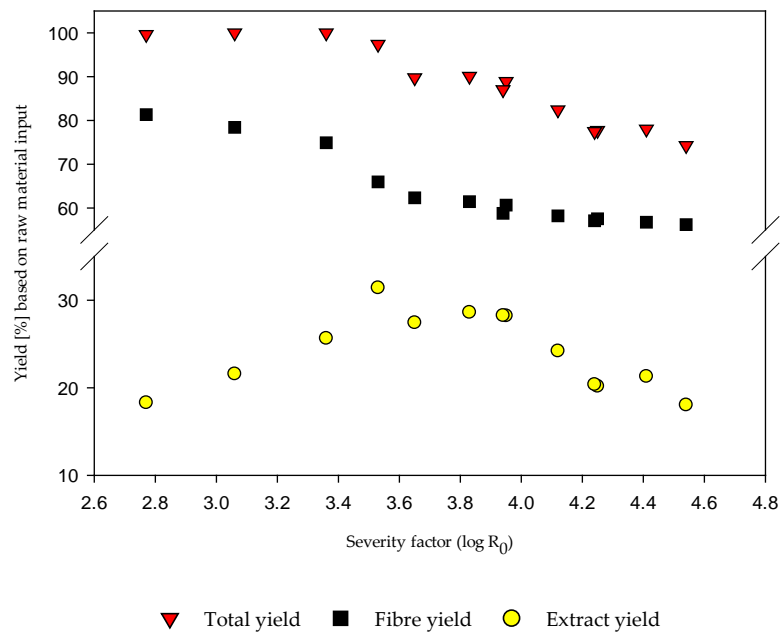
However, the found chemical composition is in good accordance with reference values for the different chemical fractions presented in the literature [35–37].

### 3.2. Fractions after Steam Refining and Characterization

#### 3.2.1. Fiber and Extract Yields

Steam refining was conducted in a temperature range from 160 °C to 210 °C with severities from 2.77 to 4.54 (Table 1). To check the statistical scattering, a triplicate at the same severity was tested before. From this previous experiment is known that the standard deviation for the fiber and extract

yields is below  $\pm 1\%$ . After steaming, the solid fiber fraction and the liquid extract fraction were separated, and the yields were calculated after measuring the moisture content of the fiber fraction and the solid content of the extract fraction (Figure 2).



**Figure 2.** Fiber, extract and total yields after steam refining at different severities.

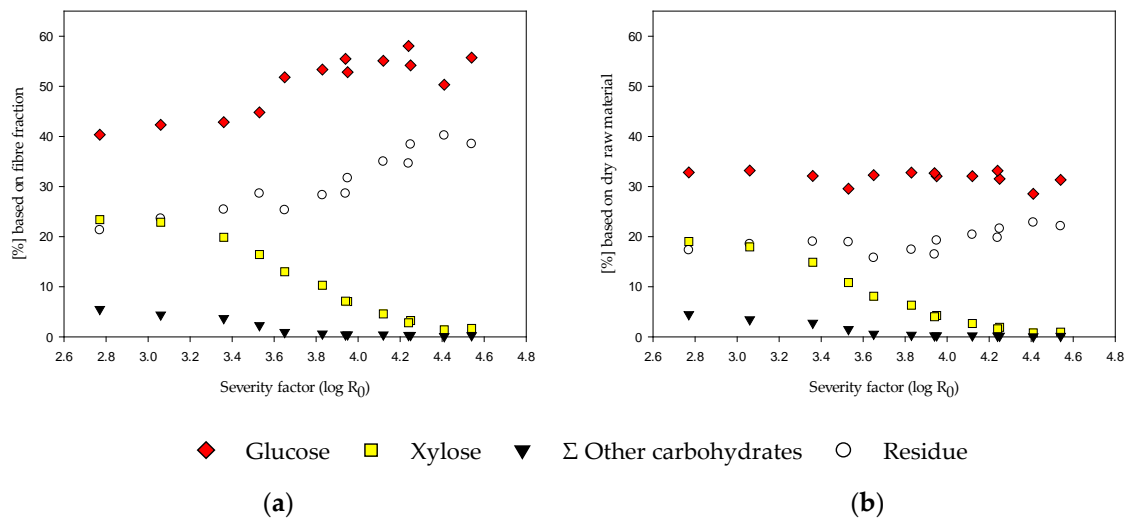
As illustrated in Figure 2 there is a clear tendency for the fiber, extract and total yield with increasing severity of the steam refining. While the fiber fraction yield decreases steadily with enhanced severity, the extract fraction yield shows a maximum at a severity around four. After that point, the extract yield decreases due to degradation reactions of the carbohydrates at severities higher than four. The total yield decreases continuously and at a severity of 4.54, it falls below 75% based on raw material input. The reduced recovery with increasing severity can be attributed to the formation of volatile components, which were not accounted for in the mass balance.

As stated for the fiber yield, extract yields and total yield, there is a decreasing tendency with increasing severity. For mild severity corn stover steam treatments for 10 min at 140 °C ( $\log R_0 = 2.18$ ) and 160 °C ( $\log R_0 = 2.77$ ), Takada et al. [38] report about slight decreasing yields, as shown in Figure 2. In the present study, only the extracts show a maximum yield at severities around 3.6. Schütt et al. [11] made similar findings for steam refining of poplar wood. In comparison, the fiber, extract and total yields are very similar; however, the described extract maximum occurs at higher severity.

### 3.2.2. Composition of Fibers and Extracts

The carbohydrate and lignin contents in the fiber after steam refining are important process characteristics and figured out in Figure 3. Therefore, the main carbohydrates glucose and xylose, the further hemicellulose monomers (arabinose, galactose, mannose, rhamnose) and as well the acid-insoluble hydrolysis residues were analyzed. The composition was calculated based on the fiber fraction (Figure 3a) and based on the original raw material (Figure 3b).

Regarding the fiber fraction (Figure 3a), it can be stated that with increasing severity the proportion of glucose in the fibers increases. In contrast to that, a strong decreasing tendency is visible for xylose, which is degraded or can be found in the extract fraction due to the preferential solubilization of hemicelluloses. This impact can also be seen for the hydrolysis residue, which is increasing in the fiber fraction due to the loss of xylose and the accumulation of lignin.



**Figure 3.** Comparison of carbohydrate and residue content of the steam-refined corn stover fiber fraction. The composition of fibers is referred to as fiber fraction (a) and raw material input (b).

If the obtained fiber yield is considered, the components can be calculated based on the dry material input. With this view, it can be seen that in contrast to the fiber-based view, the amounts of detected glucose and of the hydrolysis residue are nearly stable. Regarding the xylan content, the xylan is heavily degraded or dissolved (Figure 3b) and is thus decreasing.

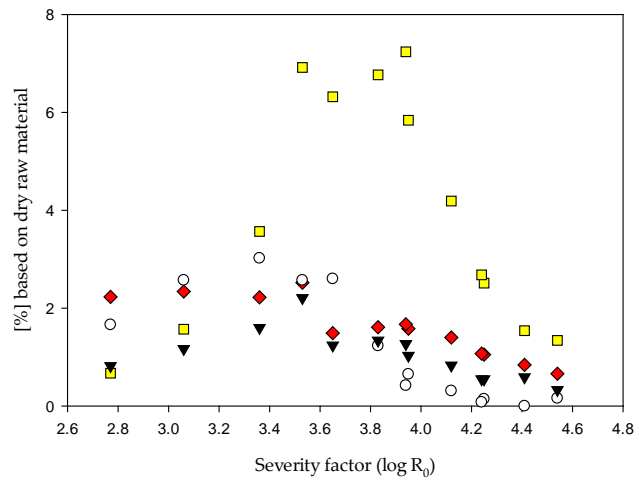
The described tendencies for the carbohydrates in the fiber fraction, with nearly stable glucose contents and decreasing xylose amounts with increasing severity, are also described in the literature for steam refining of poplar at similar severity factors by Schütt [39]. For the mild steam explosion of corn stover, similar values of lignin, cellulose and hemicellulose are reported recently [38].

Referring to this, Bura et al. [40] described similar findings for steam treatment of corn stover with addition of SO<sub>2</sub> at low (log R<sub>0</sub> = 3), medium (log R<sub>0</sub> = 3.4) and high (log R<sub>0</sub> = 4.2) severities. They report increasing glucose yields, decreasing xylose yields and increasing lignin residue for the fiber fraction. Nevertheless, based on raw material the amounts of glucose are in comparison lower, whereas the amounts of xylose in the fiber fraction are much higher for corn stover experiments in contrast to poplar wood results [39].

The extract fraction was analyzed as well regarding the carbohydrate and residue content and is illustrated in Figure 4.

The composition of the extract is referred to as raw material input. When the yield data of the extract are referred to the raw material input (Figure 4), the maximum of xylose obtained between severities between 3.5 and 4 is, of course, less pronounced. This kind of presentation illustrated clearly that rather small quantities of the raw material components can be retrieved in the extract fraction, especially at severities higher than four. However, it is interesting to see that there is a gap between the raw material-based xylose yields from the fibers (Figure 3b) and the extract xylose yields in Figure 4, especially at severities higher than 3.5. This loss of hemicellulose can be explained with the formation of degradation products, like 5-HMF and furfural in the next chapter. Schütt [39] described the extract fraction of steam-refined poplar wood increasing xylose contents up to severities around 4. Subsequently, the xylose degradation occurred due to more intense pretreatment conditions. These findings are quite similar to the findings for the xylose content of the corn stover extracts after steam refining in the present study. Bura et al. [40] report slightly increasing glucose yields and increasing xylose yields in the extract fraction after steam pretreatment of corn stover at low (log R<sub>0</sub> = 3), medium (log R<sub>0</sub> = 3.4) and high (log R<sub>0</sub> = 4.2) pretreatment conditions. They did also report a slight increase of the xylose in the extract fraction from a severity of 3.4 to 4.2. It must be remarked that the authors used SO<sub>2</sub> as acid catalysts for the dataset. Additionally, the medium pretreatment condition was used without an acid catalyst. Higher yields of xylose in the extract fraction at medium conditions

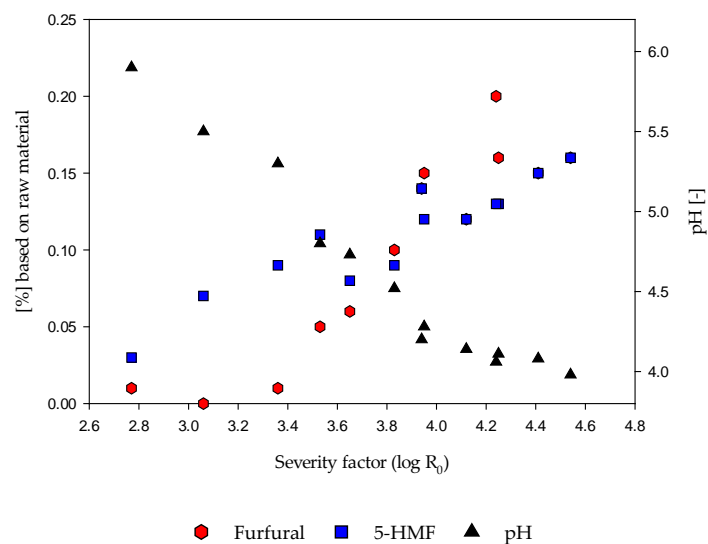
are clearly visible for the experiments with  $\text{SO}_2$ , but by calculating the total xylose mass balance there is a higher xylose loss visible compared with the results without a catalyst. However, the results without an acid catalyst are comparable with the results presented in this study.



**Figure 4.** Comparison of carbohydrate and residue content of the steam-refined corn stover extract fraction.

### 3.2.3. Detection of 5-HMF, Furfural and pH Value

The negative influence of 5-HMF and furfural as main carbohydrate degradation products on enzymatic hydrolysis and subsequent fermentation is well described [41–44]. Therefore, 5-HMF and furfural were analyzed. As these compounds are unstable, the detection was performed directly in the extract obtained after the steam refining of the corn stover. The results are shown in Figure 5.



**Figure 5.** Effect of steaming at different severities on pH and the amounts of 5-HMF and furfural in the extract fraction.

Figure 5 shows that both, the content of furfural and 5-HMF in the extract fraction, increased steadily with increasing severity factors. This has particular importance for the approach to saccharify the fibers and the extract simultaneously. However, it is also important for subsequent processes such as EH of the fibers to fermentable carbohydrates or the production of biogas from the extract. The degradation of hexoses and pentoses to 5-HMF and furfural and the lowering of the pH value during steam explosion and steam refining is also well-described in the literature [11,45–49].

Ruiz et al. [49] report almost similar results for 5-HMF and furfural after steam explosion of sunflower stalks in comparison with the presented results for corn stover. Therefore, it can be assumed that the lower furan contents are typical for agricultural residues. Jacquet et al. [47] report results for really high severities up to 5.56 at extreme temperatures around 260 °C. For severities below severities of 4.5, they report similar data to the present data, although they used microcrystalline cellulose. For further results, a strong increase of 5-HMF, but not for furfural, is reported. In this context Um and van Walsum [50] report about the formation of furfural with increasing severity by a simultaneous decrease of the xylose contents in a corn stover dilute acid pretreatment. However, for severities above 4.43, they report a decrease and degradation of furfural contents and an increase of formate. In contrast to the present data, they received high severities by time, not by temperature.

However, the measured values for 5-HMF and furfural after steam refining of corn stover are much lower than the measured values for the furans after steam refining of poplar wood [11].

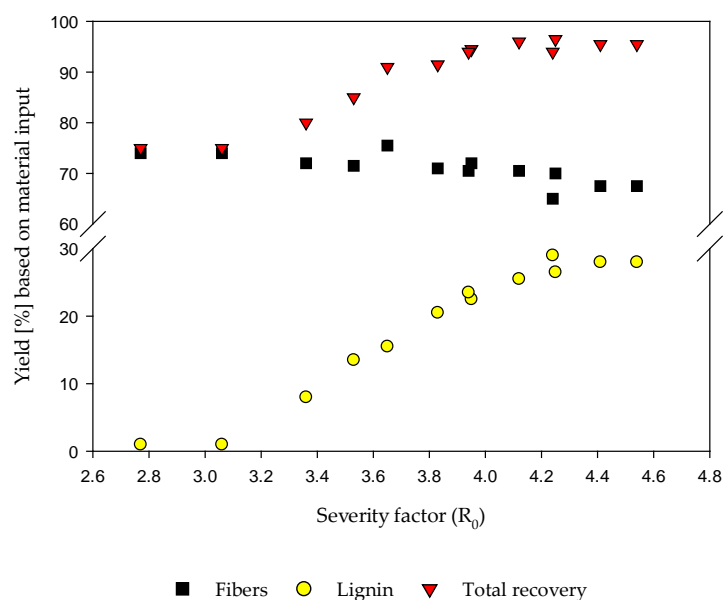
Figure 5 depicts as well the pH value in the extracts, which decreases with increasing severity. This is due to the formation of formic and acetic acid. Formic acid concentrations ranging from 0.61% at a severity factor of 3.65% up to 1.53% at a severity factor of 4.54%, all values based on raw material. The corresponding data for acetic are 2.02% and 2.89%, based on raw material.

Due to the formation of these organic acids, mainly caused by hemicellulose degradation, the pH value is reduced and autohydrolysis is intensified.

### 3.3. Alkaline Lignin Extraction

#### 3.3.1. Fiber and Lignin Yields

The extraction of lignin with 8% NaOH (based on raw material input) was conducted for the fiber fraction of all severity grades. The loading of 8% NaOH is reported as the optimum for alkaline extractions after steam refining [9,11] and represents at a consistency of 10% a thin 0.8% *w/w* NaOH solution. The total recovery rate was calculated with the lignin and fiber recovery after extraction and is illustrated in Figure 6.



**Figure 6.** Illustration of the fiber and lignin yield and the total recovery rate, containing both mentioned fractions, after alkaline lignin extraction.

The fiber yield is slightly, but continuously decreasing with increasing severity (Figure 6). Simultaneously the lignin yield increases with the severity. Surprisingly, the reduction of fiber yield is significantly lower compared to the increase of lignin yield. This might be due to the condensation



reactions of the lignin at high temperatures. The lignin with higher molar masses can be precipitated easier or more efficiently resulting in higher yields. However, when there is no covalent binding to the lignin, the precipitation is not sufficiently possible, resulting in lower yields.

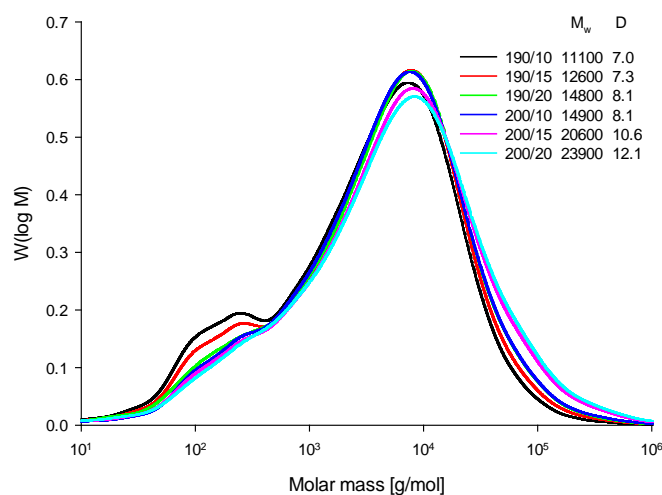
As further illustrated, the combined recovery of lignin and fibers after extraction is strongly increasing with increasing severity of the pretreatment (Figure 6) from 75% up to 95% of the original raw material input. The increase in the total recovery rate can mainly be attributed to the higher lignin precipitation at severities above 4.

### 3.3.2. Analysis of the Lignins

The effect of steaming severity on the molar mass of the precipitated lignins is illustrated in Figure 7. It becomes evident that the molar mass of the lignins increased gradually with intensifying the steam refining conditions. Furthermore, the main peak of the molar mass distribution is visible between 6800 and 7700 g/mol (Figure 7).

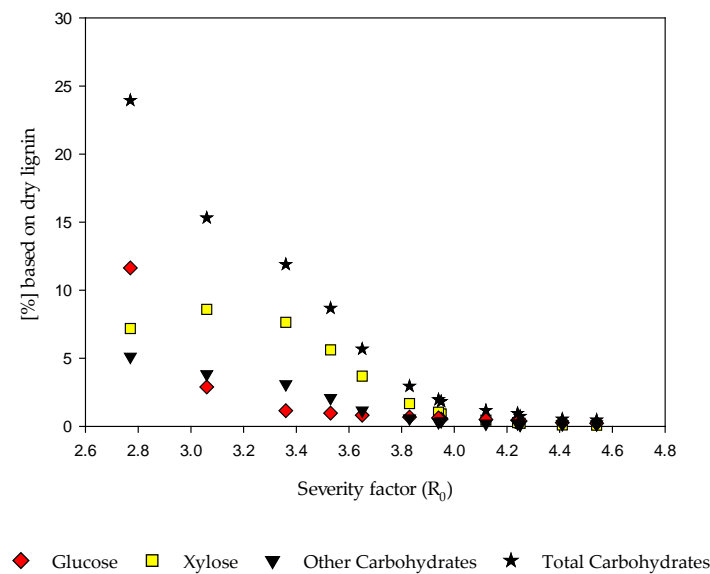
At a severity of 3.65 (190 °C/10 min), components with low molar masses (100–250 g/mol) are visible in the distribution curves. They are significantly reduced at severities above four. The increasing shoulder at high molar masses is a clear indication for condensation reactions at higher severities. Thus, the SEC results confirm the assumption that lignin condensation occurs to a higher extent under harsh steaming conditions.

For considerations on the utilization potential of the extracted lignins, knowledge of the lignin characteristics and purity is essential. Therefore, their carbohydrate contents were determined after acid hydrolysis (Figure 8). With increasing severity, the carbohydrate impurities of lignin decrease. Nevertheless, after pretreatment at lower severities than 3.95, more carbohydrate impurities can occur in the alkaline extract. At severities above four, the carbohydrate content of lignins is negligible. For this finding, Schütt et al. [11] and Schütt [39] also report decreasing carbohydrate impurities with increasing severity for extracted lignins of steam-refined poplar wood.



**Figure 7.** Molar mass distribution, molecular weight ( $M_w$ ) and dispersity (D) of alkaline-extracted lignin.

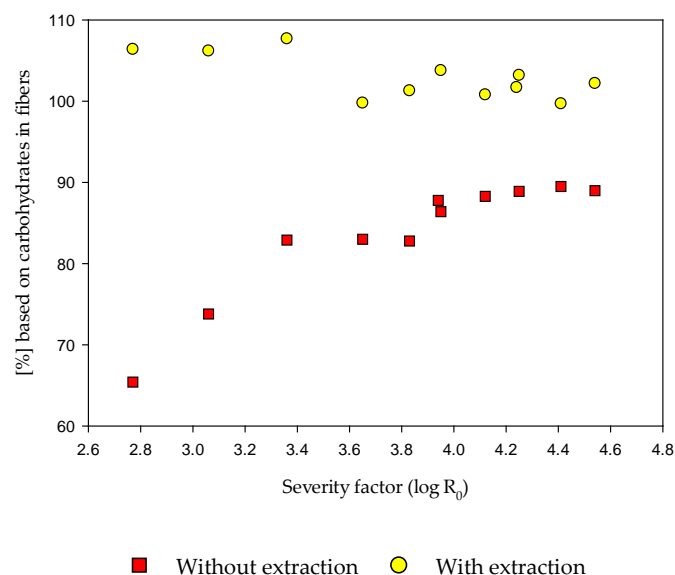
Several authors discussed the alkaline extraction of steam-treated fibers and following the influence of lignin removal on EH. For the process of lignin extraction, Schütt et al. [11] and Schütt [39] reported higher molar masses and a higher dispersity of the extracted lignin with increasing severity. The influence of one or two steam explosion steps on the extraction behavior of the lignin and the influence of  $SO_2$  as a catalyst were also investigated by Li et al. [51]. However, the reported findings are in good accordance with the illustrated results in the present study (Figures 7 and 8).



**Figure 8.** Effect of steaming severity on the carbohydrate content of alkaline-extracted lignins.

#### 3.4. EH of the Fiber Fraction with and without Alkaline Extraction

The enzymatic hydrolysis of steam-refined fibers was compared with and without alkaline extraction. To enable a detailed comparison all carbohydrate yields were calculated on the theoretically available carbohydrates in the used fibers, detected after two-stage acidic hydrolysis (Figure 9). Therefore, the detected monomeric carbohydrates were concerned as a percentage based on the carbohydrate content in the fibers after an EH with Cellic<sup>®</sup> CTec2.



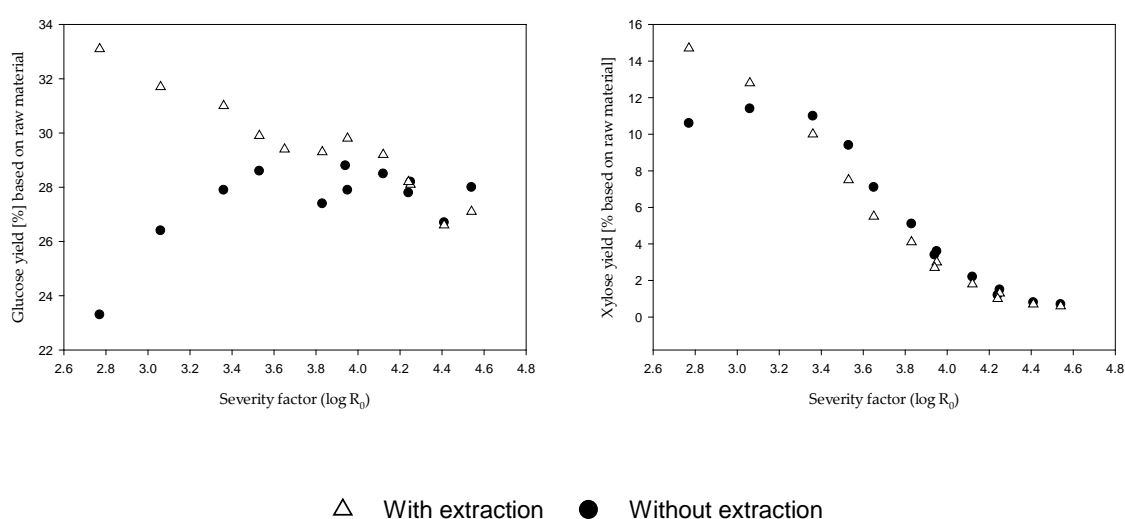
**Figure 9.** Effect of severity and alkaline extraction on the enzymatic hydrolysis (EH) of the fibers with Cellic<sup>®</sup> CTec2. The EH yields are calculated based on the theoretically available carbohydrates in the used fibers.

It is obvious that without extraction of the lignin, the yields after EH increases strongly with increasing steaming severity. After alkaline lignin extraction, there is no more positive effect of severity. There are slightly higher yields at severities lower than 3.5 and yields surpass constant 100%. This is because available carbohydrates in the fiber fraction were determined with a two-step acid hydrolysis. In this process, the carbohydrate content can be underestimated due to the secondary degradation of

carbohydrates in the analytical method. This degradation will be more pronounced at severities below 4 because more hemicelluloses and amorphous cellulose are present in the fiber. Hydrolysis with enzymes is more selective to carbohydrates and results in fewer degradation products. Therefore, higher yields are explainable by the high efficiency of EH. It can be concluded that after steam refining and alkaline extraction, all carbohydrates are available for the EH.

The described improvement of the EH yields by steam refining is an undisputed fact and pretreatments are often regarded as indispensable prerequisites for the economic implementation of such processes [6]. There are several parameters influencing the EH. Important characteristics for the impact on the EH are, e.g., the ratio of amorphous and crystalline regions, the degree of polymerization (DP) of the sample, the moisture content, available surface areas, the lignin content or the pore size of the samples [52]. Higher yields after EH are reported for wet substrate in contrast to dried biomass [53], as also found in this study (data not shown here). However, the effect of lignin removal is controversially discussed in the literature. Some authors complained about studies on wood having a reduced enzymatic digestibility after lignin extraction due to collapsing pores [54–56]. Schwab et al. [57] reported no influence of the alkali extraction, whereas Excoffier et al. [58] and Schütt et al. [11] presented higher yields of the EH after lignin removal. Ishizawa et al. [25] report that a nearly complete delignification with acidified sodium chlorite below 5% lignin content decreases the yields after EH strongly. The authors report further that the influence of partial lignin and xylan extraction improves the EH. However, the xylan removal is suggested to be more significant for the improvement of the EH yields than lignin removal [25].

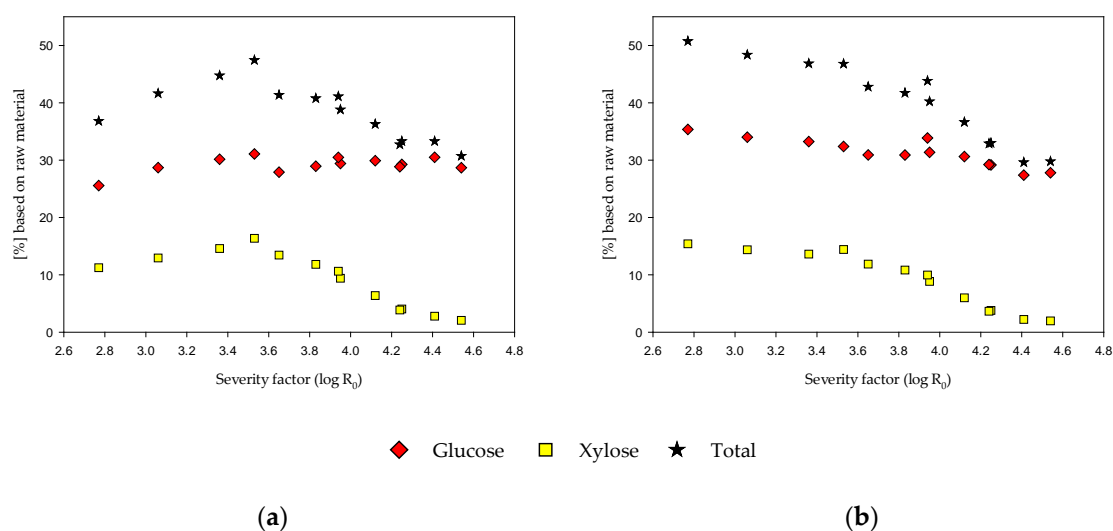
Regarding the discussions in the literature, a positive influence of the partial lignin removal on the EH results could also be stated in the present study for corn stover. Furthermore, the higher impact at severities below 4 and the fading influence at severities above 4 (Figure 10a,b) could be confirmed in accordance with Schütt et al. [11]. For more findings of the overall process efficiency, the glucose (Figure 10a) and xylose yield (Figure 10b) based on raw material were calculated for the process variants with and without lignin extraction prior to EH. Taking the yields after steam refining into account a strong influence of the extraction is apparent at severities below 4. This effect is disappearing at severities  $>4$ . After that point, no significant difference can be determined for the two process variants. Similar findings were reported for the steam refining of poplar by Schütt et al. [11]. The described influence at severities lower than 4 is also visible for the xylan yields. However, the influence is not that strong as for the glucose yields.



**Figure 10.** Glucose yields (a) and xylose yields (b) after EH based on raw material for the process variants with and without alkaline extraction prior to EH.

### 3.5. Overall Process Balances

Finally, the glucose and xylose yields after EH of the fiber fraction and glucose and xylose yields after one-step acidic hydrolysis of the extract fraction were compared and calculated based on raw material. This consideration was made in order to evaluate the effect of alkaline extraction of the overall process balance and to monitor the carbohydrate losses during the whole process (Figure 11). Schütt [39] reports a consideration that a severity of around 4.5 is needed for gaining sufficient glucose rates after steam refining of poplar wood and enzymatic hydrolysis with Celluclast®.



**Figure 11.** Summed glucose and xylose yields after EH of the fiber fraction and after one-step acidic hydrolysis of the extracts—without (a) and with (b) alkaline extraction; all based on raw material input.

A different behavior was found for the steam refining of corn stover and enzymatic hydrolysis with Cellic® CTec2 in this study. It must be remarked that the following comparisons and differences are mainly due to the used enzymes. From previous experiments (data not shown here) it is clearly known that Cellic® CTec2 shows a much higher activity to the used biomass than Celluclast®, used in previous days. However, not shown comparison experiments with Celluclast® and steam-treated corn stover also show the highest glucose yields at severities around 4.5.

As shown in Figure 11a the glucose is also available at severities below 3.5 and there is no need for steam refining in higher regions. There is a slight increase in the glucose yield with increasing severity with no significant optimum. In contrast to those findings, there is a clear optimum for the xylose yields at a severity of 3.2. Regarding Schütt [39], the findings for the xylose yields are nearly equal and the optimum is also in severity regions below 3.5. Figure 11b represents the overall process balance after alkaline extraction of the fibers and following EH. In contrast to the prior findings, the optimum of all yields is now located at a severity of 2.77. Due to these findings, the optimal steaming conditions for steam-refined and steam-extracted samples are clearly visible at severities below 3.5, mainly due to the higher reactivity of the used enzymes.

## 4. Conclusions

Due to the findings in the present study, several conclusions can be made. For steam refining experiments without subsequent alkaline extraction, the optimum of EH yields is located at a severity around 3.95. However, the optimum of total carbohydrate recovery from EH of the fibers and acidic hydrolysis of the extract fraction is at a severity around 3.4 with around 47.5% based on raw material.

For steam refining with subsequent alkaline extraction, different findings were made. For the EH yields around 100% of the theoretically available carbohydrates were found, even at severities below 3.5. However, also the total carbohydrate recovery shows the highest yields at these severities

and it is known that low contents of carbohydrate degradation products are beneficial for further process steps. Nonetheless, for lignin utilization severities around 3.95 might be optimal due to fewer carbohydrate contaminations.

Due to these findings, it can be concluded that steam refining pretreatment especially at severities below 3.5 seems to be interesting for corn stover. It could further be stated that steam refining at different severities and alkaline lignin removal is enhancing the enzymatic digestibility for the supply of monomeric carbohydrates significantly. Higher fiber yields and good digestibility after alkaline extraction giving high yields of fermentable carbohydrates for further value-added products, like ethanol or dicarboxylic acids. Therefore, further undervalued agricultural residues should be tested in the future at severities below 3.5 and with alkaline extraction. Afterward, the results can be compared with the results for corn stover presented in this study.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.S.; funding acquisition, B.S.; investigation, M.J.K., M.B. and A.S.; supervision, B.S.; visualization, M.J.K.; writing—original draft, M.J.K.; writing—review and editing, M.J.K., M.B., A.S. and B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) via Project Management Jülich (Ptj) in the PANDA project, grant number 031B0505B.

**Acknowledgments:** The Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and Project Management Jülich (Ptj) are gratefully acknowledged for their financial support. The authors wish to thank Othar Kordsachia, who assisted in the proofreading of the manuscript. Martin Bellof, Autodisplay Biotech GmbH, is thanked for the raw material acquisition. Anna Knöpfle, Nicole Erasmay and Sascha Lebioda are also gratefully acknowledged for their technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Zhao, Y.; Damgaard, A.; Christensen, T.H. Bioethanol from corn stover—A review and technical assessment of alternative biotechnologies. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2018**, *67*, 275–291. [[CrossRef](#)]
2. U.S. Department of Energy. *U.S. Billion-Ton Update: Biomass Supply for a Bioenergy and Bioproducts Industry*; U.S. Department of Energy: Washington, DC, USA, 2011.
3. Garlock, R.J.; Chundawat, S.P.S.; Balan, V.; Dale, B. Optimizing harvest of corn stover fractions based on overall sugar yields following ammonia fiber expansion pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels* **2009**, *2*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kadam, K.L.; McMillan, J.D. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **2003**, *88*, 17–25. [[CrossRef](#)]
5. Himmel, M.E.; Ding, S.-Y.; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimlos, M.R.; Brady, J.W.; Foust, T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* **2007**, *315*, 804–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yang, B.; Wyman, C.E. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2008**, *2*, 26–40. [[CrossRef](#)]
7. Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 1–11. [[CrossRef](#)]
8. Galbe, M.; Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 618–628. [[CrossRef](#)]
9. Klupsch, R. Untersuchungen zur Herstellung von Chemiezellstoff aus Aspen-und Buchenholz nach dem Dampfdruck-Extraktionsverfahren. Dissertation Thesis, University of Hamburg: Hamburg, Germany, 2000.
10. Klupsch, R.; Kordsachia, O.; Puls, J.; Karstens, T. Herstellung von Chemiezellstoffen nach dem Dampfdruck-Extraktionsverfahren. *Ipw Int. Pap. Das Pap.* **2001**, *55*, 73–79.
11. Schütt, F.; Puls, J.; Saake, B. Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood. *Holzforchung* **2011**, *65*, 453–459. [[CrossRef](#)]
12. Schütt, F.; Westereng, B.; Horn, S.J.; Puls, J.; Saake, B. Steam refining as an alternative to steam explosion. *Bioresour. Technol.* **2012**, *111*, 476–481. [[CrossRef](#)]

13. Stücker, A.; Schütt, F.; Saake, B.; Lehnen, R. Lignins from enzymatic hydrolysis and alkaline extraction of steam refined poplar wood: Utilization in lignin-phenol-formaldehyde resins. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *85*, 300–308. [[CrossRef](#)]
14. Poutanen, K.; Viikari, L. Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *22*, 416–423. [[CrossRef](#)]
15. Brownell, H.H.; Yu, E.K.C.; Saddler, J.N. Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 792–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kim, Y.; Ximenes, E.; Mosier, N.S.; Ladisch, M. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzym. Microb. Technol.* **2011**, *48*, 408–415. [[CrossRef](#)]
17. Chinnappan, A.; Baskar, C.; Kim, H. Biomass into chemicals: Green chemical conversion of carbohydrates into 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquids. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 63991–64002. [[CrossRef](#)]
18. Mamman, A.S.; Lee, J.-M.; Kim, Y.-C.; Hwang, I.T.; Park, N.-J.; Hwang, Y.K.; Chang, J.-S.; Hwang, J.-S. Furfural: Hemicellulose/xyloxyderived biochemical. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2008**, *2*, 438–454. [[CrossRef](#)]
19. Himmel, M.E.; Adney, W.S.; Baker, J.O.; Nieves, R.A.; Thomas, S.R. Cellulases: Structure, Function, and Applications. In *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*; Wyman, C.E., Ed.; Routledge: Boca Raton, FL, USA, 1996; pp. 143–161, ISBN 1-56032-553-4.
20. Becker, J.; Lange, A.; Fabarius, J.; Wittmann, C. Top value platform chemicals: Bio-based production of organic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *36*, 168–175. [[CrossRef](#)]
21. Choi, S.; Song, C.W.; Shin, J.; Lee, S.Y. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab. Eng.* **2015**, *28*, 223–239. [[CrossRef](#)]
22. Rosenau, T. Advances in biorefinery research. *Holzforschung* **2018**, *73*, 1–2. [[CrossRef](#)]
23. Chang, V.S.; Holtzapple, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *84*, 5–37. [[CrossRef](#)]
24. Pareek, N.; Gillgren, T.; Jönsson, L.J. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ishizawa, C.I.; Jeoh, T.; Adney, W.S.; Himmel, M.; Johnson, D.K.; Davis, M. Can delignification decrease cellulose digestibility in acid pretreated corn stover? *Cellulose* **2009**, *16*, 677–686. [[CrossRef](#)]
26. Chen, Y.; Stevens, M.A.; Zhu, Y.; Holmes, J.; Xu, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lorenz, D.; Erasmy, N.; Akil, Y.; Saake, B. A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *140*, 181–187. [[CrossRef](#)]
28. Bendler, M. Dampfdruck-Refiner-Aufschluss und Enzymatische Hydrolyse von Maisstroh. Bachelor's Thesis, Hamburg University of Applied Sciences, Hamburg, Germany, 2018.
29. Overend, R.P.; Chornet, E.; Gascoigne, J.A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A Math. Phys. Sci.* **1987**, *321*, 523–536. [[CrossRef](#)]
30. Podschun, J.; Saake, B.; Lehnen, R. Reactivity enhancement of organosolv lignin by phenolation for improved bio-based thermosets. *Eur. Polym. J.* **2015**, *67*, 1–11. [[CrossRef](#)]
31. Pordesimo, L.O.; Edens, W.C.; Sokhansanj, S. Distribution of Above Ground Biomass in Corn Stover. In Proceedings of the 2002 ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Chicago, IL, USA, 28–31 July 2002; American Society of Agricultural and Biological Engineers: St. Joseph, MI, USA, 2002.
32. Templeton, D.; Sluiter, A.D.; Hayward, T.K.; Hames, B.R.; Thomas, S.R. Assessing corn stover composition and sources of variability via NIRS. *Cellulose* **2009**, *16*, 621–639. [[CrossRef](#)]
33. Deutschle, A. Charakterisierung und Anwendung von Kationischen Arabinoxylanen. Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany, 2015.
34. Baar, J.; Paschová, Z.; Hofmann, T.; Kolář, T.; Koch, G.; Saake, B.; Rademacher, P. Natural durability of subfossil oak: Wood chemical composition changes through the ages. *Holzforschung* **2019**, *74*, 47–59. [[CrossRef](#)]
35. Kovačić, Đ.; Soybean, S. Corn Stover and Sunflower Stalk as Possible Substrates for Biogas Production in Croatia: A Review. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2017**, *31*, 187–198. [[CrossRef](#)]

36. Zhang, Y.-H.P.J.; Ding, S.-Y.; Mielenz, J.R.; Cui, J.-B.; Elander, R.T.; Laser, M.; Himmel, M.E.; McMillan, J.R.; Lynd, L.R. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 214–223. [[CrossRef](#)]
37. Saha, B.C.; Yoshida, T.; Cotta, M.; Sonomoto, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *44*, 367–372. [[CrossRef](#)]
38. Takada, M.; Chandra, R.P.; Saddler, J.N. The influence of lignin migration and relocation during steam pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood and corn stover biomass substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 2864–2873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Schütt, F. Dampfdruckaufschluss und Enzymatische Hydrolyse von Pappelholz. Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany, 2012.
40. Bura, R.; Chandra, R.; Saddler, J.N. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 315–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Zacchi, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzym. Microb. Technol.* **1996**, *19*, 470–476. [[CrossRef](#)]
42. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 25–33. [[CrossRef](#)]
43. Martín, C.; Galbe, M.; Nilvebrant, N.-O.; Jönsson, L.J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *98*, 699–716. [[CrossRef](#)]
44. Gurram, R.N.; Datta, S.; Lin, Y.J.; Snyder, S.; Menkhaus, T.J. Removal of enzymatic and fermentation inhibitory compounds from biomass slurries for enhanced biorefinery process efficiencies. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 7850–7859. [[CrossRef](#)]
45. Kaar, W.; Gutierrez, C.; Kinoshita, C. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass Bioenergy* **1998**, *14*, 277–287. [[CrossRef](#)]
46. Li, H.; Chen, H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process. Biochem.* **2008**, *43*, 1447–1451. [[CrossRef](#)]
47. Jacquet, N.; Quiévy, N.; Vanderghem, C.; Janas, S.; Blecker, C.; Wathelet, B.; Devaux, J.; Paquot, M. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*, 1582–1588. [[CrossRef](#)]
48. Han, G.; Deng, J.; Zhang, S.; Bicho, P.; Wu, Q. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. *Ind. Crop. Prod.* **2010**, *31*, 28–33. [[CrossRef](#)]
49. Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E.; Castro, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzym. Microb. Technol.* **2008**, *42*, 160–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Um, B.-H.; Van Walsum, G.P. Effect of Pretreatment Severity on Accumulation of Major Degradation Products from Dilute Acid Pretreated Corn Stover and Subsequent Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 406–420. [[CrossRef](#)]
51. Li, J.; Gellerstedt, G.; Toven, K. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2556–2561. [[CrossRef](#)]
52. Hendriks, A.; Zeeman, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 10–18. [[CrossRef](#)]
53. Liu, Z.-H.; Qin, L.; Jin, M.; Pang, F.; Li, B.-Z.; Kang, Y.; Dale, B.; Yuan, Y.-J. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2013**, *132*, 5–15. [[CrossRef](#)]
54. Donaldson, L.A.; Wong, K.K.Y.; Mackie, K.L. Ultrastructure of steam-exploded wood. *Wood Sci. Technol.* **1988**, *22*, 103–114. [[CrossRef](#)]
55. Ramos, L.P.; Breuil, C.; Saddler, J.N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, *34*, 37–48. [[CrossRef](#)]
56. Schell, D.; Nguyen, Q.; Tucker, M.; Boynton, B. Pretreatment of softwood by acid-catalyzed steam explosion followed by alkali extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1998**, *70*, 17–24. [[CrossRef](#)]

57. Schwald, W.; Breuil, C.; Brownell, H.H.; Chan, M.; Saddler, J.M. Assessment of pretreatment conditions to obtain fast complete hydrolysis on high substrate concentrations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989**, *20*, 29–44. [[CrossRef](#)]
58. Toussaint, B.; Vignon, M.R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 1308–1317. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Publikation II

**Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic  
Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates**

Malte Jörn Krafft, Olga Frey, Bodo Saake

*Molecules* **2020**, *25*(24), 6022

Article

# Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates

Malte Jörn Krafft <sup>†</sup>, Olga Frey <sup>†</sup>, Katrin U. Schwarz and Bodo Saake <sup>\*</sup>

Department of Chemical Wood Technology, University of Hamburg, Haidkrugsweg 1, 22885 Barsbüttel, Germany; malte.krafft@uni-hamburg.de (M.J.K.); olga.frey@uni-hamburg.de (O.F.); katrin.schwarz@uni-hamburg.de (K.U.S.)

\* Correspondence: bodo.saake@uni-hamburg.de; Tel.: +49-40-822-459-206

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Rafał Łukasik

Received: 25 November 2020; Accepted: 17 December 2020; Published: 19 December 2020



**Abstract:** Maize, also called corn, is one of the most available feedstocks worldwide for lignocellulosic biorefineries. However, a permanent biomass supply over the year is essential for industrial biorefinery application. In that context, ensiling is a well-known agricultural application to produce durable animal feed for the whole year. In this study, ensiled maize was used for steam refining experiments with subsequent enzymatic hydrolysis using the Cellic<sup>®</sup> CTec2 to test the application possibilities of an ensiled material for the biorefinery purpose of fermentable carbohydrate production. Steam refining was conducted from mild ( $\log R_0 = 1.59$ ) to severe conditions ( $\log R_0 = 4.12$ ). The yields were determined, and the resulting fractions were characterized. Hereafter, enzymatic hydrolysis of the solid fiber fraction was conducted, and the carbohydrate recovery was calculated. A conversion to monomers of around 50% was found for the mildest pretreatment ( $\log R_0 = 1.59$ ). After pretreatment at the highest severity of 4.12, it was possible to achieve a conversion of 100% of the theoretical available carbohydrates. From these results, it is clear that a sufficient pretreatment is necessary to achieve sufficient recovery rates. Thus, it can be concluded that ensiled maize pretreated by steam refining is a suitable and highly available feedstock for lignocellulosic biorefineries. Ultimately, it can be assumed that ensiling is a promising storage method to pave the way for a full-year biomass supply for lignocellulosic biorefinery concepts.

**Keywords:** maize silage; ensiled maize; pretreatment; steam refining; enzymatic hydrolysis; carbon balance; biorefinery

## 1. Introduction

Biorefinery concepts focusing on the sustainable production of energy or platform chemicals are highly discussed in academic circles of green and sustainable chemistry [1–3]. The main drivers are the enhancement of energy security, the support of rural landscapes by value-added technology and jobs, the slowdown of greenhouse gas emission, and the prevention of toxic compounds released in the environment [4]. The general framework condition and challenge for such concepts is the replacement of fossil-based resources [5]. Another main aspect is the dealing with social debates about food production, agricultural land consumption, and the usage of biomass for fuels or other chemistry processes, which is also known as “dinner plate or fuel tank” discussion [6]. Due to these requirements, the focus of research efforts in this field of work has been laid on new developments with lignocellulosic biomass (LCB) and the biomass supply [7–9].

Under the umbrella term LCB, it is possible to differentiate terms that are more practical. Therefore, LCB can be divided into wooden biomass and lignified biomass from monocotyledons, such as bamboo, bagasse, or straw and energy crops [10]. While the usage of wooden, virgin fibers for biorefinery competes with other wood-based products, the utilization of non-wood biomass, such as agricultural residues or natural non-wood plant fibers, is reported as beneficial due to the high availability, the open structure of the raw material, and its low price level [6].

One of the most worldwide available grains is maize, which is also called corn (*Zea mays* L.) [11]. Recent estimates of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) show a corn production of 1,147,621,938 tons worldwide in 2018 [12]. In this context, some authors discuss prediction equations for the amount of corn straw, also called corn stover, based on the corn kernel to straw ratio of 1:0.88 [13], 1:1 [14,15], or 1:1.3 [16]. Using these proportions, a worldwide production of whole maize plant biomass, without roots, of around 2.15–2.64 billion tons can be estimated for 2018, which shows the high availability and relevance of this raw material.

Although many processes for the production of monomeric carbohydrates from LCB are based on enzymatic methods, LCB is known as naturally recalcitrant against microbial or enzymatic degradation due to its stable matrix, containing cellulose, hemicellulose, and lignin [17,18]. Thus, it is reported that a pretreatment step is necessary for processing LCB in biorefineries [19–21]. The main pretreatment objectives are to overcome the lignin barrier, to disrupt the crystalline structure of the cellulose chain, and thus, to further increase the porosity and to enhance the enzymatic accessibility of LCB [20,22]. All of the described aims are important for the following enzymatic hydrolysis (EH) and the sufficient production of monomeric carbohydrates by reducing the limiting factors of EH [23]. Nonetheless, EH is known as specific to cellulose and hemicelluloses, which are representing the main carbohydrates in LCB, with almost no formation of (inhibitory) by-products [24,25]. Therefore, the produced fermentable monomers are important building blocks for sustainable platform chemicals [3,26,27]. The most promising platform chemicals were firstly defined by Werpy et al. [28], also known as “DOE Top 10” [29], and they were updated and honed by several authors [2,29,30].

With respect to the pretreatment methods, it is possible to categorize the different processes into biological, chemical, physical, and thermal pretreatments [19]. In addition, physicochemical processes are described in the literature, such as steam explosion, ammonia fiber explosion, or CO<sub>2</sub> explosion [22]. Steam explosion and a physical pretreatment of ensiled maize is described by Schober [31]. Further hydrothermal pretreatments [32,33] are described in the literature. Regarding plant engineering, all of these methods show as connecting elements nearly no necessary recovery, low or no chemical input, low process costs and common technology steps [22,34,35]. However, also methods without a separation of the solid and liquid fraction are described in the literature to reduce operational costs [36].

An additional or alternative physicochemical process is described as steam refining, which is characterized by a steaming step with a subsequent refining process [37]. This process is described by different authors for the production of chemical pulp [38], for the pretreatment of LCB, such as poplar wood [39,40], corn stover [41], spruce wood [42], and spruce forest residues [43]. Furthermore, possibilities for the utilization of alkaline-extracted steam-refining lignin in phenol-formaldehyde resins [44] and fractionation approaches for the recycling of waste medium-density fiberboards (MDF) by steam refining are reported [42]. The steam-refining process was also compared with the steam explosion processes by Schütt et al. [45].

Despite all the described pros and cons of LCB and its performance in different conversion processes, one of the primary challenges for LCB biorefineries is still the constant biomass supply during the year [46–48]. Due to these limitations, some biorefinery concepts utilizing more than one substrate [47] and concepts for a full year of delivery [49] are reported. Furthermore, the role of storage possibilities and the full-year delivery of the biomass is discussed in the literature [50]. A well-known method for full-year storage and delivery is ensiling of the substrate [51–53], especially for maize [54], corn stover [55], or LCB [56].

In a previous study, steam refining as pretreatment for corn stover was investigated [41]. The aim of the present study was to study an ensiled maize product due to the beneficial storage properties for further research. Due to the resulting high storage stability, ensiling of the raw material can be important for various industrial biorefinery applications with full-year biomass supply. Yields of the solid fiber and the liquid extract fraction after steam refining were determined. The achieved fibers were subjected to EH, and the extract fraction was characterized. Finally, process and mass balances were calculated based on the prior experiments and achieved results.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Raw Material Characterization

In order to give detailed information about the raw material, the anatomical composition was determined gravimetrically after sorting (Table 1). As the raw material was already shredded, husks were determined together with the leaves. Fines  $\leq 4$  mm were determined by sieving.

**Table 1.** Fractions of the used raw material.

	Raw Material % (w/w)
Stalks	15.8
Kernels	17.7
Cobs	14.0
Leaves and Husks	23.8
Fines ( $\leq 4$ mm)	28.7

For harvested maize at the late dough-ripe stage, 61% cobs with kernels, 20.3% stalks, 17.3% leaves, and 1.5% husks are reported [57]. Daccord et al. [58] report about 58% cobs including kernels and husks, 25% stalks, and 17% leaves. Therefore, it can be shown that the amount of husks and leaves in the used material corresponds well to the aforementioned publications.

A regular chopping size of 5 mm is reported [59]. Therefore, the limit for fines was set at less than or equal to 4 mm. As shown in Table 1, a not classifiable, fine fraction occurs after manual sieving. Bruni et al. [60] show also a significant fine fraction for maize silage. Reasons for the fine parts can be a smaller chopping size of the chopper or other technical aspects during harvest. With view to the data, it is clearly visible that the values for stalks and cobs including kernels are lower than stated in the literature. Therefore, it can be assumed that the fine fractions contain, beside small leaf fragments, mainly fragments of the brittle parts of the plant, such as kernels, stalks, and cobs, and these values are underestimated due to the occurring fine fraction.

For further understanding and characterization of the raw material, the extractives and carbohydrates were determined (see Table 2).

For the detection of carbohydrate losses in the ASE, the carbohydrate analysis was performed with and without extraction. The carbohydrate content of the non-extracted material was determined by two-step acidic hydrolysis. In that context, Thomsen et al. [32] report contents of about 51.7% glucose, 19.5% hemicelluloses, and 16.6% lignin for non-extracted maize silage after acidic hydrolysis. This is in good accordance with the measured data. Cellulose, xylan, and Klason lignin are reported by Xu et al. [61] in nearly similar values. The determined ash content is also in good accordance with the present Weende analysis. It must be remarked that without extraction, glucose from starch and cellulose is detected together due to the analytical method. However, some degradation of the starch can be expected due to the strong acidic hydrolysis. In addition, the present animal feed analysis for the used raw material reports about an acidic detergent lignin (ADL) value of 1.6%. With respect to the reported values, the measured acidic insoluble residues, which are reported to be mainly analogous to Klason lignin [62,63], seem to be overestimated due to present proteins in the maize silage. Notwithstanding, an extraction step is regularly used before raw material analysis and is reported as important due to

the possible precipitation of extracts or a limited access to the substrate resulting in incorrect lignin contents or too low carbohydrate yields [64]. Therefore, the raw material was extracted, and the raw material composition was additionally tested for the extracted material.

**Table 2.** Chemical characterization of the raw material before and after extraction, and after enzymatic starch degradation prior to the two-step acidic hydrolysis. All values are calculated as percentage (*w/w*) based on non-extracted raw material.

		Non-Extracted	Extracted	Starch Determination
		% ( <i>w/w</i> )		
Extraction	Petrol ether		2.5	
	Acetone/Water (9:1)		6.6	
	Hot water	n.d.	15.6	n.d.
	Σ		24.7	
Starch	n.d.	n.d.	38.6	
Carbohydrates	Glucose	51.9	43.8	18.3
	Xylose	12.3	13.7	11.0
	Arabinose	2.2	2.5	2.0
	Galactose	0.8	0.8	0.6
	Mannose	0.2	0.3	0.1
	Rhamnose	0.1	0.1	0.1
	Σ	66.0	61.2	70.7
Lignin	acid-insoluble	11.1	9.3	11.7
	acid-soluble	3.2	2.6	1.5
	Σ	14.3	11.9	13.2
Ash		3.49	3.52	n.d.
Organic acids *	Lactic acid	4.9	n.d.	n.d.
	Acetic acid	0.9		
Elements	C		46.8	
	H	n.d.	6.1	n.d.
	S **		0.6	

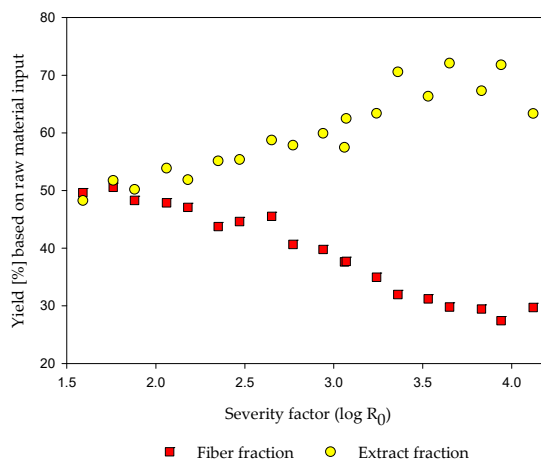
\* Determined by Eurofins Agro. \*\* Value for sulfur is close to the detection limit and therefore only approximately correct.

After extraction, a loss of glucose is visible in comparison with the non-extracted material. It can be assumed that the high values for the water extracts are a possible reason for that observation and that hot water-soluble polymers, such as starch, are detected partly in the water extract. This suggestion can be supported by the observation of starch paste in the water extract.

Due to the reported high starch contents and the possible degradation during the two-step acidic hydrolysis, an enzymatic degradation of the starch prior to an acidic hydrolysis was tested (Table 2). Afterwards, a starch content of 38.6% could be determined by enzymatic starch degradation. This result is in good accordance with literature values for starch and total carbohydrates given by Schober [31] and with results of the Weende analysis with a reported starch content of 37.8%. Furthermore, also the values for cellulose and the hemicelluloses show more similarities [31]. It can be concluded that the hot water extraction solved a part, but not all, of the starch. Therefore, an enzymatic treatment with subsequent acidic hydrolysis is the best method in order to characterize the raw material and differentiate carbohydrates from starch and other polysaccharides. The conventional determination applied for LCB with an extraction prior to the acidic hydrolysis is not suitable for this raw material.

## 2.2. Fiber and Extract Yields after Steam Refining

After steam refining, yields of the solid fiber fraction and the liquid extract fraction were determined. Steam refining was conducted with severities of 1.59 up to 4.12 (Table 5). The determined fiber and extract yields are illustrated in Figure 1.



**Figure 1.** Fiber and extract yields after steam refining of ensiled maize.

As illustrated in Figure 1, the fiber fraction shows a strong decreasing tendency with increasing severity. Starting with a fiber yield of around 50%, the yield decreases up to a minimum value around 30%. In contrast, the extract fraction increases continuously from 50% up to 72% at a severity of 3.65. A reduction to 63% occurs at the highest applied severity of 4.12. The total yield loss of around 7% can briefly be explained with degradation reactions (see Section 2.4).

Several authors discuss the yield development of fibers and extracts for different raw materials. Krafft et al. [41] also show a decrease of steam refined corn stover fiber yields above  $\log R_0 = 4$ . As obtained in the present data, the maximum extract yield is changing at severities higher than  $\log R_0 = 3.5$  to a scattering or slight decreasing tendency. This might be an indication for increased degradation reactions. A decrease of the extract yields is also reported by Krafft et al. [41] for corn stover but at higher severities.

Xu et al. [61] report also fiber yields of around 46% for hydrothermal pretreated ensiled maize at a severity of 2.98 and decreasing yields with increasing severity. For steam-refined corn stover, fiber yields above 80% and extract yields below 20% at a severity of 2.77 are reported [41]. The high extract yields and the relatively low fiber yields, especially at low severities, show a completely different behavior of ensiled maize during steam refining in comparison with other substrates. A possible explanation may be the date of harvest or the degradation of the biomass during the acidic-based ensiling process with pH values below 4. Furthermore, hemicelluloses and starch may become water-soluble under steaming conditions. Even after steaming and refining at comparatively low conditions, around 50% of the maize components is either soluble or degraded to fines, which pass the sieve, and is therefore detected in the extract. Due to the preceding ensiling process, an attenuation of the pretreatment conditions seems possible. It is known from the literature that the step of pretreatment is the most expensive one within the whole process, including also enzyme production and EH [19,20,65]. In that context, the optimization and lowering of the heat and energy consumption for biorefineries are addressed in several publications [66,67].

### 2.3. Chemical Characterization of Fibers and Extracts

To gain detailed information about carbohydrates in the fiber and extract fraction and occurring degradation reactions, the carbohydrate composition of both fractions was determined (Table 3). Furthermore, 5-HMF, furfural (Figure 2), and organic acids were analyzed in the extract fraction to evaluate the concentration of inhibitors and degradation products.

**Table 3.** Carbohydrate and residue content for the fiber and extract fraction based on raw material input.

log R <sub>0</sub>	Fiber Fraction					Extract Fraction				
	Gluc	Xyl	Arab	Others *	Residue **	Gluc	Xyl	Arab	Others *	Residue
	[% w/w]					[% w/w]				
1.59	21.4	9.7	1.5	0.7	12.4	28.6	0.7	0.3	0.2	1.5
1.76	22.7	11.3	1.8	0.7	12.3	30.0	0.7	0.3	0.2	2.3
1.88	20.2	10.5	1.7	0.7	12.2	30.2	0.7	0.3	0.2	1.6
2.06	20.1	10.6	1.6	0.6	12.4	31.0	0.8	0.5	0.3	3.3
2.18	19.4	9.5	1.4	0.6	12.4	30.9	0.8	0.5	0.3	1.5
2.35	17.6	8.8	1.2	0.6	12.1	33.9	0.9	0.6	0.2	1.7
2.47	19.3	10.1	1.3	0.6	11.4	32.9	1.3	0.9	0.3	1.3
2.65	19.6	10.5	1.2	0.5	11.4	34.2	1.3	0.8	0.4	2.5
2.77	19.5	9.8	1.0	0.5	12.0	34.2	1.9	1.1	0.3	1.3
2.94	17.1	7.7	0.7	0.4	11.2	34.7	2.4	1.0	0.4	2.5
3.07	17.4	7.5	0.6	0.3	10.9	35.7	3.4	1.2	0.6	0.6
3.06	17.3	7.0	0.5	0.3	11.0	32.0	3.7	1.2	0.4	1.8
3.24	17.0	6.2	0.4	0.3	9.8	35.1	4.7	1.2	0.8	3.2
3.36	16.9	4.8	0.2	0.2	9.3	36.4	6.7	1.5	0.8	3.9
3.53	16.4	3.7	0.2	0.2	9.8	34.0	6.6	1.1	0.9	2.8
3.65	16.7	3.3	0.2	0.1	9.4	37.8	7.0	1.3	0.8	4.2
3.83	16.4	2.4	0.1	0.1	9.9	34.1	6.9	1.0	1.0	2.9
3.94	16.0	1.8	0.1	0.1	9.3	33.9	6.4	1.0	0.8	5.2
4.12	16.7	1.6	0.1	0.1	11.5	30.6	5.1	0.7	0.8	0.9

\*: containing rhamnose, galactose, and mannose. \*\*: containing the acid-soluble lignin and the acid-insoluble residue.

Different tendencies can be shown for the raw material-based composition of the fiber fraction. With increasing severity, the glucose yield is slightly decreasing. The xylose content is stable up to a severity of 2.77. Afterwards, a decrease of xylose is visible for the fiber fraction. Arabinose and other carbohydrates are constantly decreasing, whereas the hydrolysis residue, analogous to Klason lignin, is lower compared to corn stover and nearly stable.

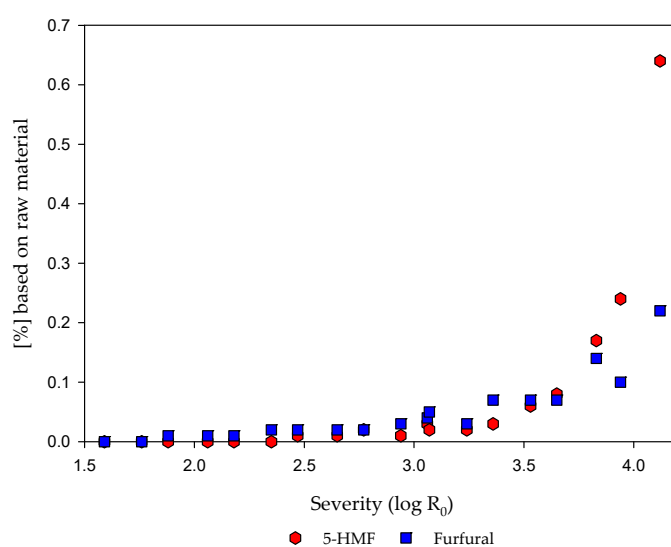
For a hydrothermal pretreatment of ensiled maize between severities of 2.98 and 3.68, Xu et al. [61] report fiber-based values for the solid fraction. By recalculating the values with the fiber yield to a raw material-based view, they report similar cellulose contents between 15.6% (log R<sub>0</sub> = 2.98) and 14.4% (log R<sub>0</sub> = 3.68). Furthermore, xylan contents between 9.5% (log R<sub>0</sub> = 2.98) and 5.1% (log R<sub>0</sub> = 3.68) are reported by recalculation. It is most likely that the solubility of the available starch at higher severities contribute to the high value of detected glucose, which is reported by Xu et al. for the extract fraction [61]. They report more than 70% of the theoretical available starch in the extract fraction. Only around 10% of the theoretical available starch remains in the fiber fraction [61]. The decreasing tendency for the hemicelluloses is known and is caused by degradation reactions and/or the preferential solubilization of hemicelluloses [41]. In that context, Krafft et al. [41] show glucose yields around 30% for the solid fraction of corn stover. Higher values are also reported for the xylose yield but also with the described decreasing trend with increasing severity. The stated composition of the fiber fraction is important for the knowledge about the theoretically available carbohydrates. These values will be compared in Section 2.5 with the carbohydrate contents after EH to gain information about the conversion ratio to monomers.

For the glucose content of the extract fraction, an increase was determined. The xylose content increases with severities from log R<sub>0</sub> = 2.77 to 3.65. Hereafter, a turnaround to a decrease is shown. Other hemicelluloses are detectable in traces, following the xylose trend. Residues are scattering at comparable low values. Therefore, the development of the xylose content is in good accordance with the previous findings and the literature. At a severity higher than 2.77, xylose is dissolved and will be found in the extract fraction. At higher severities, the dissolved hemicelluloses will be degraded. Similar findings are reported in the literature [41,68]. However, due to the deviation of steam-refining extracts from other substrates, the comparable high glucose contents are of great interest. For steam-refining extracts of corn stover, lower glucose values are reported [41]. With that view, the high glucose contents in the extract fraction are remarkable. Reasons might be solubilized starch

during the steaming reactions or degraded, fine biomass in the extract, which is passing through the used sieve, which had a mesh size of 50  $\mu\text{m}$ . The determined carbohydrate composition of the extract fraction is important for further determinations of mass balances and the calculation of the optimal total carbohydrate recovery point. Therefore, these values will be used for further considerations in Section 2.5.

#### 2.4. Degradation Products, Organic Acids, and pH Value

As reported in the aforementioned findings, degradation reactions of the carbohydrates during steaming at high severities are well known. Therefore, degradation products, which are partly known as inhibitors in later fermentation process steps [69–72], were determined. In that context, 5-HMF, furfural, lactic acid, acetic acid, formic acid, and the pH value were determined. The values for 5-HMF and furfural are illustrated in Figure 2.



**Figure 2.** Measured 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and furfural contents in the extract fraction based on raw material.

As illustrated, the contents of 5-HMF and furfural in the extract increase with increasing severity. The increase of the furan content is described in the literature as a result of the degradation of hexoses and pentoses under severe conditions [40,73–77]. For 5-HMF and furfural, an increase is visible at a severity around 2.94. At higher severities, close to a severity of 4.0, the increase of the 5-HMF content is much stronger than for the furfural content. For ensiled maize experiments, comparable results of 0.17–0.27% furfural and 0.04–0.1% 5-HMF content are reported at a severity of 3.5, although the heating time was much longer [33]. Nevertheless, a negative effect due to inhibitory effects is reported for the methane production of hydrothermal pretreated maize silage, although the inhibitor values are low [33].

In comparison with corn stover, steam-refined maize silage show higher furan contents [41]. Nonetheless, the loss of carbohydrates illustrated in Table 3 can be partly explained by degradation reactions and the increasing furan contents.

It is also known that 5-HMF and furfural can be degraded under severe conditions to formic acid. 5-HMF can further be degraded to levulinic acid. In addition, the liberation of acetic acid caused by hemicellulose degradation is described and is also reported in the term of autohydrolysis [78]. Furthermore, the natural occurrence of lactic acid in ensiled products is known. Due to these effects, a lowering of the pH is often observed [70].

Therefore, the lactic acid content is nearly stable from 5.87% at the lowest ( $\log R_0 = 1.59$ ) up to 4.79% at the highest severity ( $\log R_0 = 4.12$ ). Acetic acid is also nearly stable between 1.54% and

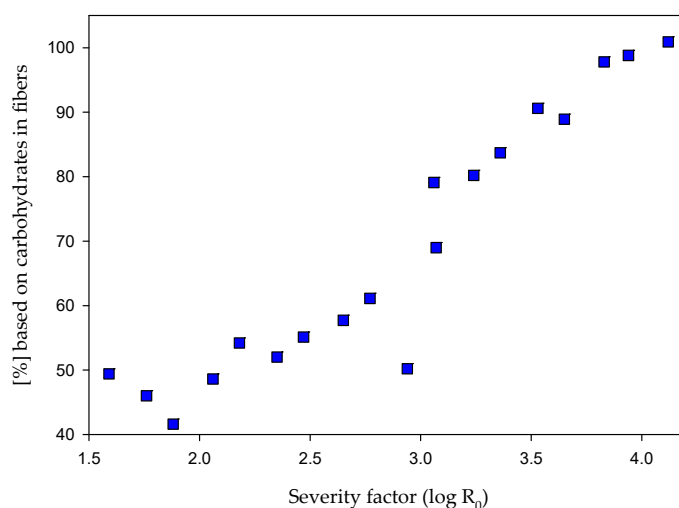


1.82%. The pH value show only a slight reduction from 4.2 to 3.9. However, formic acid shows a slight increase from 0.06% to 0.28%.

As described, the values for lactic acid are nearly stable. It is known from the Weende analysis prior to steaming that the raw material contains 4.9% lactic acid from the ensiling process. Therefore, it can be assumed that the lactic acid in the extract fraction originates from the raw material. During steaming, the lactic acid was dissolved completely without any forming or degradation reactions. With view to the acetic acid, slightly higher values are reported for corn stover steam-refining extracts [41]. For the formation of formic acid, an increasing trend is visible in the present data. A degradation of the furans at severe conditions is a possible explanation for these phenomena. The measured pH values are in contrast to reported pH values of corn stover extracts [41] after steam refining. However, the knowledge of acetic acid liberation and the occurring acetic acid contents is important for conclusions about autohydrolysis. Schütt [79] reports on high contents of acetyl groups for hardwood xylan and therefore, an occurring autohydrolysis during steaming. In the case of softwood, only limited autohydrolysis takes place due to low acetyl group contents. Therefore, the usage of acidic catalysts, such as  $\text{SO}_2$ , is indicated for softwood. For poplar wood, acetic acid values of 1% to 3% are presented [45], whereas values below 1% are described for analogous experiments with softwood without catalysts [42]. Therefore, with values higher than 1%, an occurring autohydrolysis can be suggested for ensiled maize, and the usage of acidic catalysts is not needed, which is also beneficial in terms of cost considerations.

### 2.5. EH of Pretreated Fiber Fraction

After steam refining pretreatment, EH was conducted on the fiber fraction to find further details for the influence of the severity on the enzymatic saccharification. The results, expressed as the recovery of the theoretical available glucose and xylose after EH, are illustrated in Figure 3. Furthermore, enzymatic hydrolysis without steam refining was conducted as blind value for the raw material. In this case, a carbohydrate recovery of 55.1% was achieved, which represents 30.1% glucose and 1.6% xylose in absolute values based on raw material.



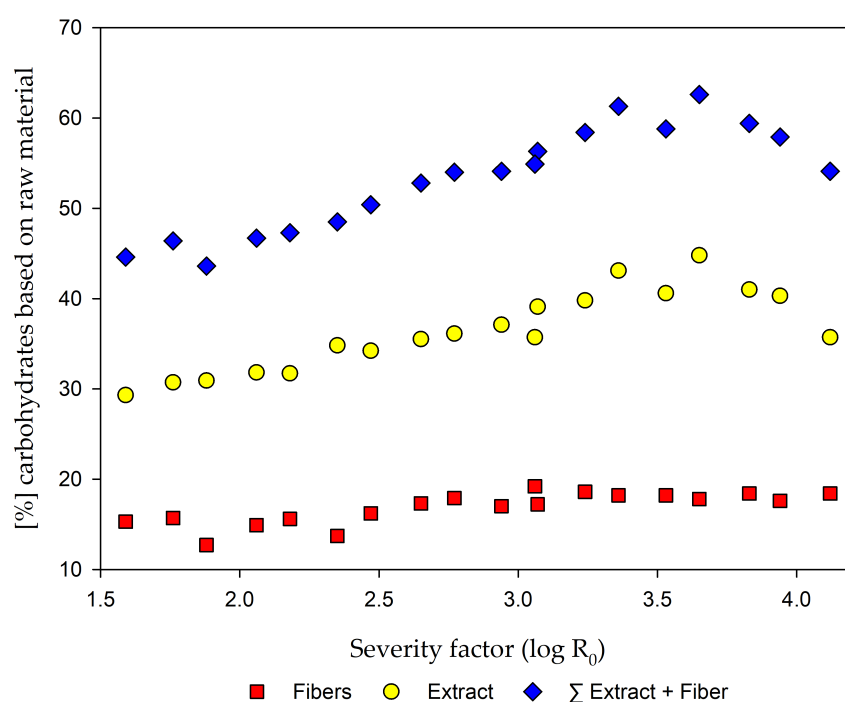
**Figure 3.** Results after enzymatic hydrolysis (EH) of the pretreated fiber fraction expressed as carbohydrate recovery compared to the theoretical available carbohydrates before EH.

As illustrated in Figure 3, the EH yield of the fiber fraction is increasing steadily with increasing severity. Values of around 50% carbohydrate recovery were obtained at the lowest severity of 1.59, and a recovery of 100.9% was determined after the pretreatment under the most severe conditions ( $\log R_0 = 4.12$ ). Results higher than 100% are reported by other authors, too [41,61]. One possible explanation is the determination of the theoretical carbohydrates by acidic hydrolysis, which results into some carbohydrate degradation. Compared to that, EH is more selective without carbohydrate

degradation reactions. Therefore, an efficient enzymatic hydrolysis can result in higher values than after acidic hydrolysis.

Comparable enzymatic hydrolysis experiments using Cellic<sup>®</sup> CTec2 with steam-treated corn stover showed similar developments. At the found optimal severity for corn stover ( $\log R_0 = 3.95$ ), an EH carbohydrate recovery of 86.4% was described [41]. However, also at the highest severity, they did not reach 100% recovery. The presented data show that it is possible with ensiled maize to reach 100% of the theoretical carbohydrates in the fiber fraction as monomers after pretreatment, but a pretreatment step is necessary to reach that goal.

To find the optimal pretreatment condition, Figure 4 show the comparison of the carbohydrate yields after EH of the fibers and from the extract fraction. It can be seen that the highest amount of carbohydrates can be achieved after pretreatment at a severity of 3.65. After that point, the decreasing carbohydrate yield of the extract fraction influence the total yield. This is in good accordance with e.g., values for corn stover, where the optimum is reported at a severity of 3.95 [41].



**Figure 4.** Comparison of carbohydrates after EH of the fibers, carbohydrates from the extracts, and the sum of both, all based on raw material.

The present finding for ensiled material shows that a lowering of heat and temperature is possible, which can be a benefit for further economic considerations aiming at the reduction of operational costs. Due to the possibility of ensiling in bunker silos, no further buildings for storage are necessary, which also reduces the operational costs in case of costs for building constructions. However, ensiling enables also a safe storage for a long time and allows a full year of biomass supply, which is reported by several authors [80,81].

With view to the whole process time consumption, it can be stated that ensiling does not extend the process. Rather, it is a beneficial storage method for the biomass supply. While ensiling, non-ensiled or partly ensiled biomass is available for the process. It is known that steam refining or explosion is also working with fresh material, such as non-ensiled corn stover [41] or other biomass [82]. However, the present data show an appropriate way for storage with further beneficial influence on the enzymatic hydrolysis yields.

## 2.6. Mass and Carbon Balance

To get an overview of the process, a mass balance was made for the found optimal severity. In Table 4, the carbohydrates, hydrolysis residues, organic acids, and furans are listed for the extract and fiber fraction. For comparisons, the raw material analysis is provided as well. The carbohydrates determined in the extract and fiber fraction are up to 95% of the carbohydrates in the raw material, which is a very high recovery and conversion rate. All compounds identified in the extract and fiber fraction amount to 87.1% based on raw material. The analytical material analysis results into 89.7% of identified compounds. The deficit in the raw material analysis is due to several reasons, such as inorganic material, analytical losses, and unidentified components, such as extractives, which are unidentified in the characterization method. To further evaluate the efficiency of the process, a carbon balancing was performed, since the carbon efficiency is a fundamental principle of green chemistry [83–87]. Therefore, approaches for carbon balances in biorefineries are described in the literature [88].

**Table 4.** Mass balance of carbohydrates (CH), residue, organic acids, furans, and the carbon balancing as gram carbon (gC) after steaming at the optimal point of 3.65.

	$\Sigma$ CH	Residue	$\Sigma$ Organic Acids	$\Sigma$ Furans	$\Sigma$ Carbon
	[%] Based on Raw Material				gC/100 g
Extract	46.9	4.2	6.17	0.15	32.0
Fiber	20.3	9.4	-	-	14.6
$\Sigma$	67.2	13.6	6.17	0.15	46.6
Raw Material	70.7	13.2	5.8	-	46.8

As illustrated in Table 4, the highest amounts of carbon were determined in the extract fraction. Combining the extract and fiber fraction, 46.6 g of carbon in 100 g of material was found compared to 46.8 gC/100 g in the raw material. This represents a recovery rate of 99.6%. Around 0.2 gC (0.4%) of the theoretical available carbon can be most likely attributed to losses in the vapor phase. The high carbon yields in the extract can be explained by the high reported carbohydrate yields in this fraction. Furthermore, the components, which might not be detected in the previous analysis, will be mostly contained in the extract. With respect to the literature, Beltrame et al. [89] show a conversion of up to 30% to volatile compounds for steam explosion of wheat straw at a severity of 4.24. Kaar et al. [75] report about a volatile loss of up to 22% for the steam explosion of sugarcane bagasse. In contrast, Turn et al. [90] report for a dataset of 77 steam explosion conditions between severities of 3.7 and 4.3 only small amounts of around 2% of gas phase carbon at the highest and around 0.5% at the lowest severity of 3.7. Candidates for compounds in the volatile fraction are reported as furfural, formic acid, or acetic acid for steam refining of corn stover, whereas no 5-HMF was found [91]. Furthermore, methane, ethane, propane and, as the main carbon-containing compound in the vapor phase, carbon dioxide, are reported in the literature for the gas phase after steam explosion of banagrass, which is a variety of elephant grass (*Pennisetum purpureum* SCHUMACH.) [90]. Therefore, the found small amounts of carbon loss are in accordance with the results presented by Turn et al. [90]. It is a positive outcome that the found optimal condition has a low severity, which is limiting the losses of volatile organic compounds.

## 3. Materials and Methods

### 3.1. Raw Material

The raw material was harvested as full plant (without roots) with a commercial maize chopper in 2018 near Brietlingen, Lower Saxony, Germany (4 m above NHN). It was harvested at the dough-ripe stage, which represents the optimal time to harvest with view to the nutritive value and the ensiling

properties [92]. After harvesting, the biomass was compacted and covered airtight for ensiling. After three months, ensiling of the biomass was completed. The sampling was conducted in airtight barrels directly on the dairy farm. The dry matter content of the material was 37.9%. The barrels were stored frozen ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) to stop further biomass conversion. For steam refining, the samples were defrosted prior to the experiment, and the moisture content was determined for each batch in triplicate at  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  according to TAPPI T 264 cm-07.

The ash content of the raw material was determined for comprehensive raw material analysis according to TAPPI T 211 om-16/ISO 1762:2019 at  $525\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The determination of the extractive compounds was conducted by three Accelerated Solvent Extraction (ASE) steps at  $\leq 1\text{ mm}$  milled material. The first two extractions were performed for 10 min at 10 MPa with an ASE 350 (Thermo Scientific® Dionex®, Waltham, MA, USA) with petrol ether and acetone/water (9:1), both at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Due to the occurring starch paste at higher temperatures, the hot water extraction was performed in two steps. About 3 g of the pre-extracted residue was extracted in a first step for 45 min in 700 mL demineralized water. Afterwards, an extraction thimble was filled with the sample, and the extraction was continued with a Soxhlet apparatus for 3 h with 600 mL demineralized water. For all extraction steps, 10 mL of the extract was removed, dried, and the extract content was determined gravimetrically. The extractive-free raw material was air-dried for further carbohydrate determination by acid hydrolysis.

For the determination of the starch content, 300 mg of theoretical dry raw material was treated with an enzymatic solution containing 0.05% amyloglucosidase and 0.05% amylase in a pH 4.7 ammonium acetate buffer. The raw material was treated for 24 h at  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Afterwards, the reaction was stopped, and the samples were filtered through a G4 sintered glass frit. The filtrate was further used for glucose detection via borate–anion exchange chromatography (AEC).

For carbohydrate detection, a two-step sulfuric acid hydrolysis according to Lorenz et al. [93] was performed. After the second hydrolysis, the flasks were cooled down to room temperature, filled up with demineralized water, and filtered to a G4 sintered glass frit. For further analysis of the carbohydrates (see Section 3.4), the undiluted filtrates were collected. The residues in the frit were washed, dried overnight at  $105 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and weighted gravimetrically to determine the amount of acid-insoluble residue, which is comparable with Klason lignin [62]. For raw material characterization, the acid soluble lignin was measured additionally at 205 nm using 2.3% sulfuric acid. Additionally, a commercial animal feed analysis, also called Weende analysis, was done by Eurofins Agro, Wageningen, Netherlands, for comparative aspects.

### 3.2. Pretreatment Process

Steam refining was conducted with moist raw material with a dry matter content of around 35%. A value equivalent to 200 g of dry material was inserted into the steaming reactor ( $22 \times 25\text{ cm}$ , Martin Busch & Sohn GmbH, Schermbeck, Germany) to make the process comparable. The severity factor ( $R_0$ ) was calculated according to Overend and Chornet [94] as the more common  $\log R_0$  using Equation (1):

$$\log R_0 = \log \left( t \times e^{\frac{(T-100)}{14.75}} \right). \quad (1)$$

The severity factor combines the time of pretreatment ( $t$ ) in minutes with the pretreatment temperature in  $^{\circ}\text{C}$  ( $T$ ). With this factor, it is possible to generate a comparability for pretreatments with different durations and temperatures in the same dataset.

The steaming reactor was equipped with a four-blade refiner system, which was started in the last 30 s of pretreatment with 1455 rpm. Afterwards, the refining was stopped, and the pressure was released. According to Table 5, twenty experiments, including one blind value, were carried out at temperatures between 120 and  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  with different pretreatment durations. Furthermore, the data point at  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 20 min ( $\log R_0 = 3.07$ ) was included to get an overview over the different

influences of severity, temperature, and time in comparison with the data point at 170 °C and 10 min ( $\log R_0 = 3.06$ ).

**Table 5.** Experimental plan, including temperature, reaction time, and the severity factor.

Run #	Temperature °C	Time min	Severity Factor $\log R_0$	Run #	Temperature °C	Time min	Severity Factor $\log R_0$
1	0	0	0.00	11	160	15	2.94
2	120	10	1.59	12	160	20	3.07
3	120	15	1.76	13	170	10	3.06
4	130	10	1.88	14	170	15	3.24
5	130	15	2.06	15	180	10	3.36
6	140	10	2.18	16	180	15	3.53
7	140	15	2.35	17	190	10	3.65
8	150	10	2.47	18	190	15	3.83
9	150	15	2.65	19	200	10	3.94
10	160	10	2.77	20	200	15	4.12

The liquid extract fraction and the solid fiber fraction were separated after steaming using a 50  $\mu\text{m}$  sieve. The fiber fraction was dried for 10 min at 2800 rpm in a spin-dryer (Thomas Centri 776 SEK, Robert Thomas Metall- und Elektrowerke GmbH & Co. KG, Neunkirchen, Germany), homogenized for 10 min in a 20 L rotary stirrer (Hobart A20, Hobart GmbH, Offenburg, Germany), and finally, the weight was determined gravimetrically.

The extract fraction was also collected, weighted, and the pH value was determined. The dry matter contents of both fractions were determined for yield calculations. The dry matter content of the extract was determined by freeze-drying (Alpha 2–4 LSC; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany), the dry matter content of the fibers was determined according to TAPPI T 264 cm-07 at  $105 \pm 3$  °C. All samples were stored frozen afterwards to prevent degradation of the samples. A scheme of this process is illustrated in previous work [41].

### 3.3. Acid Extract and Fiber Fraction Hydrolysis

For carbohydrate determination of the fiber fraction, the above-mentioned two-step acidic hydrolysis (see Section 3.1) was conducted. The dried extract lyophilisates were hydrolyzed with a one-step dilute sulfuric acidic hydrolysis procedure, which was modified according to Lorenz et al. [93]. First, 100 mg of the lyophilisate was mixed with 10 mL of demineralized water in an ultrasonic water bath. After dilution of the extract, 1.8 mL of 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was added. The suspension was hydrolyzed for 40 min at 120 °C and 0.12 MPa. Hereafter, the hydrolyzed samples were filled up and filtered through a G4 sintered glass frit. The undiluted filtrate was collected for further analysis. The residue in the frit was collected and determined as reported before.

### 3.4. Chromatographic Methods

Borate–anion exchange chromatography (borate–AEC) was used for monomeric carbohydrate detection after acidic hydrolysis and enzymatic hydrolysis. A Dionex™ UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) was used with an anion exchange resin (MCI GEL® CA08F, Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan). Two buffers with pH 8.6 and 9.5 based on potassium tetraborate/boric acid were used in different concentrations over the time after a post-column derivatization working at 65 °C. Carbohydrate determination was conducted via UV/VIS-spectroscopy at 560 nm. A more detailed explanation of this method is reported by Lorenz et al. [58].

Organic acids, such as lactic-, acetic-, and formic acid were detected by ion chromatography. The extracts were filtered, and 5  $\mu\text{L}$  were separated with an IonPac™ AS11-HC (2  $\times$  250 mm) anion exchange column (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), using a Dionex™ ICS 2000 with a Dionex ASRS 300–2 mm suppressor. A flow rate of 0.38 mL/min<sup>−1</sup> was adjusted, and a temperature of 35 °C was

set. As eluent, potassium hydroxide (KOH) was used with concentrations between 1 and 70 mM over the time.

Furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) were detected by RP-HPLC. Therefore, 20  $\mu\text{L}$  of fresh extract was separated at 25 °C for 80 min using an AQUASIL<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column (250  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ ; Thermo Fischer Scientific<sup>TM</sup>, Waltham, MA, USA). A flow rate of 1 mL/min<sup>-1</sup> was set, and two eluents (A: weak acidic water, 1 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; B: acetonitrile, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) were used in different concentrations over the time, starting with 97.5% A and 2.5% B and ending with 100% B. For detailed information about the concentration steps over the time, see Krafft et al. [41]. The wavelength for detection was set at 280 nm.

For carbon detection in the raw material and fiber fraction, a vario EL cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Germany) was used. Carbon in the extract fraction was detected via total organic carbon (TOC) according to DIN EN 1484:1997-08 by Eurofins Umwelt West GmbH. Carbon in the vapor phase was calculated as  $\Delta\text{gC}$  between the raw material and fiber/extract values.

### 3.5. Enzymatic Hydrolysis (EH)

The EH of the pretreated fibers was conducted at a dry matter content of 4% with 300  $\mu\text{L}$  cellulases (Cellic<sup>®</sup> CTec2, 91 FPU/mL, Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark) and 50  $\mu\text{L}$  glucosidases (Novozyme 188, Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark), with an  $\beta$ -glucosidase activity of 227 U/mL. For that purpose, one gram of dry material content of the pretreated substrate was hydrolyzed for 72 h at 45 °C. A pH value of 5.0 was adjusted using a phosphate citrate buffer. After hydrolysis, the samples were filled up to 250 mL in a volumetric flask with demineralized water and filtered through a G4 sintered glass frit. The undiluted filtrate was collected for carbohydrate determination using borate–AEC.

## 4. Conclusions

The present study and the results are open to several conclusions. It was found that the steam refining of ensiled maize leads to high extract yields due to a good enzymatic accessibility. Furthermore, high amounts of starch and low amounts of lignin were determined in comparison with corn stover.

However, it was found that a pretreatment step is necessary for a sufficient enzymatic hydrolysis of the fiber fraction. In comparison with untreated maize silage, it was possible to achieve nearly a doubling of the EH yields.

The optimum steam refining condition for the production of monomeric carbohydrates was set at a severity of 3.65. At this point, the optimum between carbohydrates from EH and the carbohydrates determined in the extract fraction was found with a total recovery of 62.6% of carbohydrates, which is based on raw material input, with low carbon losses in the gaseous phase.

Furthermore, ensiled maize was confirmed as a potential LCB for the production of monomeric carbohydrates after pretreatment. In addition to the benefit of a high availability and a full year of biomass supply due to the ensiling, the ensiling process seems to be beneficial for the further processes in comparison with other steam refined, non-ensiled substrates. Therefore, a recovery of around 100% of the theoretical available carbohydrates was reached for the fiber fraction after pretreatment.

Due to the knowledge that ensiling is not affecting the chemical composition of the substrates [95] and due to the results from the present study, ensiling seems to be a promising storage method for LCB biorefineries to achieve a full year of biomass supply by storage.

It seems to be promising for future work to test more LCB substrates, such as agricultural residues or rural wastes, on their ensiling potential and the carbohydrate recoveries after pretreatment and EH. A promising future candidate for further experiments might be ensiled corn stover, which represents an undervalued agricultural residue with synchronous good ensiling properties [96].

**Author Contributions:** Conceptualization, M.J.K. and B.S.; Data curation, M.J.K. and O.F.; Formal analysis, M.J.K. and O.F.; Funding acquisition, B.S.; Investigation, M.J.K. and O.F.; Methodology, M.J.K.; Project administration, B.S.; Resources, M.J.K.; Supervision, K.U.S. and B.S.; Visualization, M.J.K.; Writing—original draft, M.J.K.; Writing—review and editing, M.J.K., O.F., K.U.S. and B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) via Project Management Jülich (PtJ) in the PANDA project, grant number 031B0505B.

**Acknowledgments:** The Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and Project Management Jülich (PtJ) are gratefully acknowledged for their financial support. The authors thank Othar Kordsachia, Friedrich Steffen, Sebastian Hagel and Neha Yadav for proofreading. Johannes Meyn (Meyn Milchhof GbR) is also gratefully acknowledged for the biomass supply. Jens Berger, Birte Buske, Nicole Erasmay, Anna Knöpfle and Andreas Schreiber are also gratefully acknowledged for their technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Jäger, G.; Büchs, J. Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 1122–1136. [[CrossRef](#)]
2. Becker, J.; Lange, A.; Fabarius, J.; Wittmann, C. Top value platform chemicals: Bio-based production of organic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *36*, 168–175. [[CrossRef](#)]
3. Menon, V.; Rao, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2012**, *38*, 522–550. [[CrossRef](#)]
4. Valdivia, M.; Galan, J.L.; Laffarga, J.; Ramos, J.-L. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microb. Biotechnol.* **2016**, *9*, 585–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lucia, L.A. Lignocellulosic Biomass: A Potential Feedstock to Replace Petroleum. *BioResources* **2008**, *3*, 981–982.
6. Tye, Y.Y.; Lee, K.T.; Wan Abdullah, W.N.; Leh, C.P. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2016**, *60*, 155–172. [[CrossRef](#)]
7. U.S. Department of Energy. *2016 Billion-Ton Report: Advancing Domestic Resources for a Thriving Bioeconomy. Volume 1: Economic Availability of Feedstocks*; U.S. Department of Energy: Washington, DC, USA, 2016.
8. U.S. Department of Energy. *U.S. Billion-Ton Update: Biomass Supply for a Bioenergy and Bioproducts Industry*; U.S. Department of Energy: Washington, DC, USA, 2011.
9. U.S. Department of Energy. *Biomass as a Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply*; U.S. Department of Energy: Washington, DC, USA, 2005.
10. Yousuf, A.; Pirozzi, D.; Sannino, F. Fundamentals of lignocellulosic biomass. In *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*; Elsevier: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 1–15, ISBN 9780128159361.
11. Ranum, P.; Peña-Rosas, J.P.; Garcia-Casal, M.N. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2014**, *1312*, 105–112. [[CrossRef](#)]
12. FAOSTAT. World Production Item Maize. 2018. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 18 December 2020).
13. Thurner, S.; Fleschhut, M.; Eder, J. Verfahrenstechnik zum Einsatz von Körnermaisstroh in der Biogaserzeugung. In *Ackerbau—Technische Lösungen für die Zukunft. Landtechnische Jahrestagung*; Wendl, G., Ed.; Bavarian State Research Center for Agriculture: Freising, Germany, 2017; pp. 51–65.
14. Glassner, D.; Hettenhaus, J.; Schechinger, T. Corn Stover Potential: Recasting the Corn Sweetener Industry. In *Perspectives on new crops and new uses*. In Proceedings of the Fourth National Symposium New Crops and New Uses, Biodiversity and Agricultural Sustainability, Phoenix, AZ, USA, 8–11 November 1998; Janick, J., Ed.; ASHS Press: Alexandria, VA, USA, 1999; pp. 74–82, ISBN 0-9615027-0-3.
15. Eisenhuber, K.; Jäger, A.; Wimberger, J.; Kahr, H. Comparison of different pretreatment methods for straw for lignocellulosic bioethanol production. *Agron. Res.* **2013**, *11*, 173–182.
16. Thrän, D.; Arendt, O.; Adwiraah, H.; Kaltschmitt, M. Nebenprodukte, Rückstände und Abfälle. In *Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren*, 3rd ed.; Kaltschmitt, M., Hartmann, H., Hofbauer, H., Eds.; Springer Vieweg: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; pp. 273–323, ISBN 978-3-662-47437-2.

17. Himmel, M.E.; Ding, S.-Y.; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimlos, M.R.; Brady, J.W.; Foust, T.D. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* **2007**, *315*, 804–807. [[CrossRef](#)]
18. Zhao, X.; Zhang, L.; Liu, D. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2012**, *6*, 465–482. [[CrossRef](#)]
19. Yang, B.; Wyman, C.E. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2008**, *2*, 26–40. [[CrossRef](#)]
20. Mosier, N.; Wyman, C.E.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 673–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zhao, X.; Zhang, L.; Liu, D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2012**, *6*, 561–579. [[CrossRef](#)]
22. Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 1–11. [[CrossRef](#)]
23. Hendriks, A.T.W.M.; Zeeman, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 10–18. [[CrossRef](#)]
24. Yang, B.; Dai, Z.; Ding, S.-Y.; Wyman, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* **2011**, *2*, 421–449. [[CrossRef](#)]
25. Maitan-Alfenas, G.P.; Visser, E.M.; Guimarães, V.M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *1*, 44–49. [[CrossRef](#)]
26. Cok, B.; Tsiropoulos, I.; Roes, A.L.; Patel, M.K. Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2014**, *8*, 16–29. [[CrossRef](#)]
27. Takkellapati, S.; Li, T.; Gonzalez, M.A. An Overview of Biorefinery Derived Platform Chemicals from a Cellulose and Hemicellulose Biorefinery. *Clean Technol. Environ. Policy* **2018**, *20*, 1615–1630. [[CrossRef](#)]
28. Werpy, T.; Petersen, G.R.; Aden, A.; Bozell, J.J.; Holladay, J.; White, J.; Manheim, A.; Eliot, D.; Lasure, L.; Jones, S.; et al. *Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*; US Department of Energy: Washington, DC, USA, 2004.
29. Bozell, J.J.; Petersen, G.R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem.* **2010**, *12*, 539–554. [[CrossRef](#)]
30. Choi, S.; Song, C.W.; Shin, J.H.; Lee, S.Y. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab. Eng.* **2015**, *28*, 223–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Schober, C.M. Untersuchungen Zum Einsatz Technischer und Mikrobiell Hergestellter Enzymsysteme zur Hydrolyse der Lignocellulose in Maissilage. Ph.D. Thesis, Universität Hohenheim, Hohenheim, Stuttgart, Germany, 2008.
32. Thomsen, M.H.; Holm-Nielsen, J.B.; Oleskowicz-Popiel, P.; Thomsen, A.B. Pretreatment of whole-crop harvested, ensiled maize for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotech.* **2008**, *148*, 23–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Koponen, H. Biogas Production from Ensiled Maize with and without Hydrothermal Pretreatment. Master’s Thesis, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland, 2010.
34. Galbe, M.; Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2002**, *59*, 618–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Capolupo, L.; Faraco, V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2016**, *100*, 9451–9467. [[CrossRef](#)]
36. del Río, P.G.; Gullón, P.; Rebelo, F.R.; Romaní, A.; Garrote, G.; Gullón, B. A Whole-Slurry Fermentation Approach to High-Solid Loading for Bioethanol Production from Corn Stover. *Agronomy* **2020**, *10*, 1790. [[CrossRef](#)]
37. Klupsch, R. Untersuchungen zur Herstellung von Chemiezellsto aus Aspen-und Buchenholz nach dem Dampfdruck-Extraktionsverfahren. Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany, 2000.
38. Klupsch, R.; Kordsachia, O.; Puls, J.; Karstens, T. Herstellung von Chemiezellstoffen nach dem Dampfdruck-Extraktionsverfahren. *Ipw Int. Pap. Das Pap.* **2001**, *55*, 73–79.
39. Schütt, F.; Haas, N.P.; Dehne, L.; Koch, G.; Janzon, R.; Saake, B. Steam pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar wood: Comparison of optimal conditions with and without SO<sub>2</sub> impregnation. *Holzforschung* **2013**, *67*, 9–17. [[CrossRef](#)]



40. Schütt, F.; Puls, J.; Saake, B. Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood. *Holzforschung* **2011**, *65*, 453–459. [[CrossRef](#)]
41. Krafft, M.J.; Bendler, M.; Schreiber, A.; Saake, B. Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover. *Agronomy* **2020**, *10*, 811. [[CrossRef](#)]
42. Hagel, S.; Saake, B. Fractionation of Waste MDF by Steam Refining. *Molecules* **2020**, *25*, 2165. [[CrossRef](#)]
43. Janzon, R.; Schütt, F.; Oldenburg, S.; Fischer, E.; Körner, I.; Saake, B. Steam pretreatment of spruce forest residues: Optimal conditions for biogas production and enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *100*, 202–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Stücker, A.; Schütt, F.; Saake, B.; Lehnen, R. Lignins from enzymatic hydrolysis and alkaline extraction of steam refined poplar wood: Utilization in lignin-phenol-formaldehyde resins. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *85*, 300–308. [[CrossRef](#)]
45. Schütt, F.; Westereng, B.; Horn, S.J.; Puls, J.; Saake, B. Steam refining as an alternative to steam explosion. *Bioresour. Technol.* **2012**, *111*, 476–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cherubini, F.; Strømman, A.H. Chemicals from lignocellulosic biomass: Opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2011**, *5*, 548–561. [[CrossRef](#)]
47. Giuliano, A.; Poletto, M.; Barletta, D. Process optimization of a multi-product biorefinery: The effect of biomass seasonality. *Chem. Eng. Res. Des.* **2016**, *107*, 236–252. [[CrossRef](#)]
48. Miao, Z.; Shastri, Y.; Grift, T.E.; Hansen, A.C.; Ting, K.C. Lignocellulosic biomass feedstock transportation alternatives, logistics, equipment configurations, and modeling. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2012**, *6*, 351–362. [[CrossRef](#)]
49. Grisso, R.D.; McCullough, D.; Cundiff, J.S.; Judd, J.D. Harvest schedule to fill storage for year-round delivery of grasses to biorefinery. *Biomass Bioenerg.* **2013**, *55*, 331–338. [[CrossRef](#)]
50. Sahoo, K.; Mani, S. Techno-economic assessment of biomass bales storage systems for a large-scale biorefinery. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2017**, *11*, 417–429. [[CrossRef](#)]
51. Tanjore, D.; Richard, T.L.; Marshall, M.N. Experimental methods for laboratory-scale ensilage of lignocellulosic biomass. *Biomass Bioenerg.* **2012**, *47*, 125–133. [[CrossRef](#)]
52. Haag, N.L.; Grumaz, C.; Wiese, F.; Kirstahler, P.; Merkle, W.; Nägele, H.-J.; Sohn, K.; Jungbluth, T.; Oechsner, H. Advanced green biorefining: Effects of ensiling treatments on lactic acid production, microbial activity and supplementary methane formation of grass and rye. *Biomass Conv. Biorefin.* **2016**, *6*, 197–208. [[CrossRef](#)]
53. Haag, N.L.; Nägele, H.-J.; Fritz, T.; Oechsner, H. Effects of ensiling treatments on lactic acid production and supplementary methane formation of maize and amaranth—an advanced green biorefining approach. *Bioresour. Technol.* **2015**, *178*, 217–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Vervaeren, H.; Hostyn, K.; Ghekiere, G.; Willems, B. Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production. *Renew. Energ.* **2010**, *35*, 2089–2093. [[CrossRef](#)]
55. Russell, J.R. Influence of harvest date on the nutritive value and ensiling characteristics of maize stover. *Anim. Feed Sci. Tech.* **1986**, *14*, 11–27. [[CrossRef](#)]
56. Oleskowicz-Popiel, P.; Thomsen, A.B.; Schmidt, J.E. Ensiling—Wet-storage method for lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biomass Bioenerg.* **2011**, *35*, 2087–2092. [[CrossRef](#)]
57. Arrigo, Y. Silomais anreichern: Mehr Energie aber Verschwendung von Biomasse: Merkblatt für die Praxis. *ALP aktuell* **2012**, *45*, 1–4.
58. Daccord, R.; Arrigo, Y.; Vogel, R. Nährwert von Maissilage. *Agrarforschung* **1995**, *2*, 397–400.
59. Arrigo, Y.; Stoll, P. Schätzung des Nährwerts von Maissilage. *Agrar. Schweiz* **2012**, *3*, 442–449.
60. Bruni, E.; Jensen, A.P.; Pedersen, E.S.; Angelidaki, I. Anaerobic digestion of maize focusing on variety, harvest time and pretreatment. *Appl. Energ.* **2010**, *87*, 2212–2217. [[CrossRef](#)]
61. Xu, J.; Thomsen, M.H.; Thomsen, A.B. Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotech.* **2010**, *162*, 33–42. [[CrossRef](#)]
62. Deutsche, A.L. Charakterisierung und Anwendung von Kationischen Arabinoxylanen. Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany, 2015.
63. Baar, J.; Paschová, Z.; Hofmann, T.; Kolář, T.; Koch, G.; Saake, B.; Rademacher, P. Natural durability of subfossil oak: Wood chemical composition changes through the ages. *Holzforschung* **2019**, *74*, 47–59. [[CrossRef](#)]

64. Hames, B.R. Biomass compositional analysis for energy applications. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *581*, 145–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Yamakawa, C.K.; Qin, F.; Mussatto, S.I. Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy. *Biomass Bioenerg.* **2018**, *119*, 54–60. [[CrossRef](#)]
66. Mosier, N.S.; Hendrickson, R.; Brewer, M.; Ho, N.; Sedlak, M.; Dreshel, R.; Welch, G.; Dien, B.S.; Aden, A.; Ladisch, M.R. Industrial Scale-Up of pH-Controlled Liquid Hot Water Pretreatment of Corn Fiber for Fuel Ethanol Production. *Appl. Biochem. Biotech.* **2005**, *125*, 77–98. [[CrossRef](#)]
67. Lynd, L.R.; Elander, R.T.; Wyman, C.E. Likely Features and Costs of Mature Biomass Ethanol Technology. In *Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*; Wyman, C.E., Davison, B.H., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1996; pp. 741–761, ISBN 978-1-4612-6669-3.
68. Frey, O. Analytik und Bilanzierung von Mais-Hydrolysaten. Master's Thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany, 2020.
69. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Zacchi, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* **1996**, *19*, 470–476. [[CrossRef](#)]
70. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 25–33. [[CrossRef](#)]
71. Gurrām, R.N.; Datta, S.; Lin, Y.J.; Snyder, S.W.; Menkhaus, T.J. Removal of enzymatic and fermentation inhibitory compounds from biomass slurries for enhanced biorefinery process efficiencies. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 7850–7859. [[CrossRef](#)]
72. Martín, C.; Galbe, M.; Nilvebrant, N.-O.; Jönsson, L.J. Comparison of the Fermentability of Enzymatic Hydrolyzates of Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion Using Different Impregnating Agents. *Appl. Biochem. Biotech.* **2002**, *98–100*, 699–716. [[CrossRef](#)]
73. Han, G.; Deng, J.; Zhang, S.; Bicho, P.; Wu, Q. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **2010**, *31*, 28–33. [[CrossRef](#)]
74. Jacquet, N.; Quiévy, N.; Vanderghem, C.; Janas, S.; Blecker, C.; Wathelet, B.; Devaux, J.; Paquot, M. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polym. Degrad. Stabil.* **2011**, *96*, 1582–1588. [[CrossRef](#)]
75. Kaar, W.E.; Gutierrez, C.V.; Kinoshita, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass Bioenerg.* **1998**, *14*, 277–287. [[CrossRef](#)]
76. Li, H.; Chen, H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process. Biochem.* **2008**, *43*, 1447–1451. [[CrossRef](#)]
77. Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Tech.* **2008**, *42*, 160–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Garrote, G.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. Manufacture of Xylose-Based Fermentation Media from Corncobs by Posthydrolysis of Autohydrolysis Liquors. *Appl. Biochem. Biotech.* **2001**, *95*, 195–208. [[CrossRef](#)]
79. Schütt, F. Dampfdruckaufschluss und enzymatische Hydrolyse von Pappelholz. Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany, 2012.
80. Zubr, J. Methanogenic fermentation of fresh and ensiled plant materials. *Biomass* **1986**, *11*, 159–171. [[CrossRef](#)]
81. Sørensen, J.L.; Nielsen, K.F.; Rasmussen, P.H.; Thrane, U. Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10439–10443. [[CrossRef](#)]
82. Stelte, W. *Steam Explosion for Biomass Pre-Treatment*; Resultat Kontrakt (RK) Report; Danish Technological Institute: Taastrup, Denmark, 2013.
83. Anastas, P.T.; Eghbali, N. Green chemistry: Principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312. [[CrossRef](#)]
84. Anastas, P.T.; Kirchoff, M.M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686–694. [[CrossRef](#)]
85. Tang, S.L.Y.; Smith, R.L.; Poliakoff, M. Principles of green chemistry: PRODUCTIVELY. *Green Chem.* **2005**, *7*, 761. [[CrossRef](#)]
86. Tang, S.L.Y.; Bourne, R.A.; Smith, R.L.; Poliakoff, M. The 24 Principles of Green Engineering and Green Chemistry: “IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY”. *Green Chem.* **2008**, *10*, 268. [[CrossRef](#)]

87. Anastas, P.T.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1998.
88. He, M.; Sun, Y.; Han, B. Green carbon science: Scientific basis for integrating carbon resource processing, utilization, and recycling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9620–9633. [[CrossRef](#)]
89. Beltrame, P.L.; Carniti, P.; Visciglio, A.; Focher, B.; Marzetti, A. Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* **1992**, *39*, 165–171. [[CrossRef](#)]
90. Turn, S.Q.; Kinoshita, C.M.; Kaar, W.E.; Ishimura, D.M. Measurements of gas phase carbon in steam explosion of biomass. *Bioresour. Technol.* **1998**, *64*, 71–75. [[CrossRef](#)]
91. Bendler, M. Dampfdruck-Refiner-Aufschluss und enzymatische Hydrolyse von Maisstroh. Bachelor's Thesis, Hamburg University of Applied Sciences, Hamburg, Germany, 2018.
92. Grimm, K. Techniques of whole crop harvesting and whole crop silage in cattle farming. *Landtechnik* **1983**, *38*, 138–140.
93. Lorenz, D.; Erasmy, N.; Akil, Y.; Saake, B. A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *140*, 181–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Overend, R.P.; Chornet, E.; Gascoigne, J.A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. A* **1987**, *321*, 523–536. [[CrossRef](#)]
95. Herrmann, C.; Heiermann, M.; Idler, C. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 5153–5161. [[CrossRef](#)]
96. Misthilger, B.; Schneider, M.; Harms, K.; Burger, T.; Thurner, S. Silierung von Körnermaisstroh. In *Körnermaisstroh als Biogassubstrat*; Bavarian State Research Center for Agriculture: Poing/Freising, Germany, 2019.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publikation III

**Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases Obtained  
After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage**

Malte Jörn Krafft, Jens Berger, Bodo Saake

*Frontiers in Chemistry*, **2021**, 9:760657



# Analytical Characterization and Inhibitor Detection in Liquid Phases Obtained After Steam Refining of Corn Stover and Maize Silage

Malte Jörn Krafft, Jens Berger and Bodo Saake\*

Chemical Wood Technology, University of Hamburg, Barsbüttel, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Alankar Vaidya,  
Forest Research Institute of  
New Zealand (Trading as Scion),  
New Zealand

### Reviewed by:

Zhuohua Sun,  
Beijing Forestry University, China  
Gabriel Paes,  
Institut National de recherche pour  
l'agriculture, l'alimentation et  
l'environnement (INRAE), France

### \*Correspondence:

Bodo Saake  
bodo.saake@uni-hamburg.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Green and Sustainable Chemistry,  
a section of the journal  
Frontiers in Chemistry

Received: 18 August 2021

Accepted: 29 September 2021

Published: 14 October 2021

### Citation:

Krafft MJ, Berger J and Saake B (2021)  
Analytical Characterization and  
Inhibitor Detection in Liquid Phases  
Obtained After Steam Refining of Corn  
Stover and Maize Silage.  
Front. Chem. 9:760657.  
doi: 10.3389/fchem.2021.760657

The utilization of agricultural products and residues for the production of value-added and biobased products is a highly relevant topic in present research. Due to the natural recalcitrance of lignocellulosic biomass against enzymatic degradation, pretreatments are important requirement for further processes. For the raw material in this study, corn stover (CS) as highly available agricultural residue and maize silage (MS) as model substrate for an ensiled agricultural product were pretreated by steam refining. However, after processing a liquid fraction and fibers are present. Subsequent to steaming the fiber fraction is well characterized. Nonetheless, in depth characterizations of the filtrates are also important for their subsequent utilization. Decreasing molar masses from 7,900 g/mol to 1,100 g/mol for CS filtrates and 100,000–12,900 g/mol for MS filtrates were determined with increasing severity. Due to their proven inhibitory effect on microorganisms weak acids, furans and phenolic compounds within the liquid phased were analyzed. Especially formic acid increases with increasing severity from 0.27 to 1.20% based on raw material for CS and from 0.07 to 0.23% based on raw material for MS. Further GC/MS measurements indicate, that up to 8.25% (CS filtrate) and 5.23% (MS filtrates) of the total peak area is related to inhibitory phenols. Considering the data, detoxification strategies are of non-negligible importance for filtrates after steam refining and should be considered for further research and process or parameter optimizations. An alternative may be the application of milder process conditions in order to prevent the formation of inhibitory degradation products or the dilution of the gained filtrates.

**Keywords:** corn stover, maize silage, steam refining, carbohydrates, inhibitors, by-products

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most abundant crops in the world. Beside the utilization as food and the usage for industrial materials it furth is a well-known model organism for several fields of research (Strable and Scanlon, 2009). The high availability of maize and its products are displayed in estimates for the worldwide corn production. Based on data of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and literature values for the straw/kernel-ratio, Krafft et al. (2020b) calculated an estimated annual maize production of 2.15–2.64 billion tons for 2018. Updated FAO data for 2019 show quite similar values (FAOSTAT, 2020).

However, the usage of lignocelluloses and lignocellulosic residues in biorefinery contexts is highly discussed and due to the aforementioned high availability, maize is focused on research. Therefore,

two types of utilization based on maize can be distinguished: the usage of the whole plant and the usage of components, like kernels, straw or cob waste. Therefore, the usage of the whole plant, mostly after ensiling to extend the storage stability for the production of biogas is described. Further, the usage of the kernels is reported to produce e.g., bioethanol (Lebuhn et al., 2008; Schwietzke et al., 2009). However, the usage of these two parts is associated with debates about land use (Graebig et al., 2010) and the production of coarse grains for energy instead of primary food grains (Srinivasan, 2009).

Due to these debates, the usage of agricultural post-harvest residues is beneficial, although there are debates about sustainable collection with consideration of soil erosion and water conservation (Cruse and Herndl, 2009). With that in mind, corn stover (CS) is characterized as an undervalued harvest residue after grain threshing, which remains mainly on the field and decomposes (Glassner et al., 1998). Nonetheless, lignocellulosic biomass is recalcitrant against natural biodegradation. Therefore, a pretreatment of the used CS is necessary to reduce this known recalcitrance (Himmel et al., 2007).

Seasonal availability and the storage of lignocellulosic biomass is a key factor for a full-year biomass supply of a biorefinery plant. These aspects were discussed in previous studies (Cherubini and Strømman, 2011; Miao et al., 2012; Giuliano et al., 2016). In that context ensiling was mentioned in literature as a suitable storage method for biomass in biorefineries (Oleskowicz-Popiel et al., 2011). Moreover, maize silage (MS) has a lower grade of recalcitrance against enzymatic degradation, mainly due to lower lignin contents, but a pretreatment is also necessary to receive sufficient results after enzymatic hydrolysis (EH) (Krafft et al., 2020b). In the last years steam refining was conducted for pretreatments of wood (Schütt et al., 2011; Schütt et al., 2012), forest residues (Janzon et al., 2014), CS (Krafft et al., 2020a), MS (Krafft et al., 2020b) or waste medium density fiberboards (MDF) (Hagel and Saake, 2020). Most studies were conducted to enhance the enzymatic digestibility for the production of monomeric carbohydrates, but attempts for MDF fiber recycling after steam refining are reported as well (Hagel et al., 2021).

Like mentioned before, a biomass or raw material pretreatment is a necessity for a lignocellulose biorefinery. Beside different pretreatment methods, the most widely described pretreatment is steam explosion, working as a physicochemical process. Due to the knowledge, that the explosion step is unnecessary for the enhancement of EH (Brownell et al., 1986), several authors are currently discussing an alternative steam pretreatment where the defibration is conducted by a refining step. Therefore, this variant is also called steam refining (Schütt et al., 2011; Schütt et al., 2012; Janzon et al., 2014). The process results in two fractions, one being a solid fiber fraction, the other being a hydrolysate. However, in literature on steam pretreatment different terms are used for the liquid: extract phase or fraction, liquid phase or fraction, solubilized or (water)-soluble phase or fraction or (pre)-hydrolysate and filtrate. All of the above equally paraphrase the identical fraction, a clear nomenclature is yet no present. Therefore the term “filtrate” will consequently be used

throughout this publication. While the usage of the cellulose-rich fiber fraction is often addressed in literature, the utilization of the hydrolysate has been less frequently investigated (Cubas-Cano et al., 2020). A plausible explanation would be the challenging fermentation of C5 sugars with wild-type microorganisms and the abundance of inhibitors in the hydrolysates (Cubas-Cano et al., 2018; Cubas-Cano et al., 2020).

The formation and liberation of degradation products from carbohydrates and lignin and their inhibitory effect on enzymes and bacteria is well documented (Cantarella et al., 2004). Cantarella et al. (2004) differs three groups of toxic compounds: low molecular weight acids, carbohydrate degradation products and lignin degradation products. In this context Zhang et al. (2013) compared eleven potential inhibitors based on previous studies of Palmqvist and Hahn-Hägerdal (2000) and Klinke et al. (2004). From early studies of Ando et al. (1986) it is known that most of the degradation products are soluble within the water-phase and only a few aromatic monomers are detectable within the solid phase after steaming. Nonetheless, Tengborg et al. (2001) report on the inhibiting effect on EH and fermentation. Different amounts of prehydrolysates were added to the solid phase followed by EH. Adding prehydrolysates lowered the cellulose conversion rate continuously. Further, the authors investigated the influence of washing the solid fraction and came to the conclusion, that washing is beneficial for fermentation processes (Tengborg et al., 2001). Qureshi et al. (2010) investigated the fermentation of CS hydrolysates to acetone butanol ethanol (ABE) after pretreatment. No microbial growth or fermentation products were measured in the undiluted and untreated liquid phase. Fermentation started 40 h after dilution and addition of sterile glucose. Further treatments, like dilution with other hydrolysates and overliming with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  were necessary for sufficient fermentation. The authors suggest the investigation of processes without inhibitory by-product formation or the development of inhibitor resistant cultures for fermentation. In the past, several studies accounting the inhibitory content of the hydrolysates were conducted for gardening residues (Cubas-Cano et al., 2020), trimming vine shoots (Bustos et al., 2005), softwood (Shi et al., 2015), wheat straw (Aulitto et al., 2017), sugarcane bagasse (van der Pol et al., 2016) or oil palm empty fruit bunches (Ye et al., 2014). Inhibitors' influences on the hydrolysate after steaming is to be considered proven due to these studies. It furthermore is significant to include this issue in contemplations of pretreatment conditions.

Former studies depict yields, characterization and utilization of the fiber fraction after steam refining (Krafft et al., 2020a; Krafft et al., 2020b). In this study, a detailed analytical characterization of filtrates obtained after steam refining of CS (Krafft et al., 2020a) and MS (Krafft et al., 2020b) will be described to complete a full overview about the obtained fractions. Therefore, results from carbohydrate analysis and molar mass distribution, as well as results on organic acids and furans will be presented. Additionally, information on inhibitory compounds obtained by GC-MS are going to be given. All data is evaluated under consideration of the used severity factor while steaming. All in all, the goal was to gain a more detailed overview over the received

**TABLE 1** | List of pretreatment conditions and corresponding severity factors.

Temperature [°C]	Time [min]	Severity factor
160	10	2.77
170	10	3.06
180	10	3.36
190	10	3.65
200	10	3.94

filtrates after steam refining for further processes, like whole-slurry processes or simultaneous EH and fermentation to value-added products.

## MATERIALS AND METHODS

### Raw Material

The filtrates were collected from previous steam refining studies with 200 g raw material input based on CS and MS (Bendler, 2018; Krafft et al., 2020a; Krafft et al., 2020b; Frey, 2020). Briefly, steam refining is content-wise related to steam explosion with the difference, that the defibration is conducted by a mechanical defibration instead of a pressure relief. All results are recalculated to weight percent based on the CS and MS raw material and are denoted as % RM.

Steam refining was conducted from 160°C up to 200°C for 10 min, respectively. For a better comparability with available literature the severity factor according to Overend and Chornet (1987), expressed as  $\log = R_0$ , was calculated based on Eq. 1. A list of temperatures, duration of exposure and corresponding severity can be gathered from Table 1.

$$\log R_0 = \log \left( t \times e^{\frac{(T-100)}{14.75}} \right) \quad (1)$$

The hydrolysate was collected by filtration through a sieve and was afterwards freeze-dried (Alpha 2-4 LSC; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). A detailed description of the process is given in the aforementioned studies. For reasons of completeness, the carbohydrate and lignin composition of the used lyophilizates will be shown in Table 2.

### Acidic Hydrolysis

The hydrolysis of the freeze-dried steam refining filtrates was conducted as one-step acidic hydrolysis according to Lorenz et al. (2016). Therefore, 100 mg of the lyophilizate were added to 10 ml demineralized water and were homogenized in an ultra-sonic water bath. Afterwards, 1.8 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added and the samples were hydrolyzed in an autoclave for 40 min at 120°C and 0.12 MPa. After autoclaving the samples were cooled down to room temperature, filtered through G4 sintered glass frits and were collected for borate-HPAEC carbohydrate analysis. The residue was collected in the sintered glass frit and was determined gravimetrically after drying at 105°C ± 3°C over night.

**TABLE 2** | Composition of the used lyophilizates in % based on the filtrate fraction.

	Log R <sub>0</sub>	Gluc	Xyl	Arab	Others <sup>a</sup>	Residue
CS	2.77	12.2	3.7	2.7	3.7	9.1
	3.06	10.9	7.3	3.6	3.5	11.9
	3.36	8.7	13.9	4.7	3.5	11.8
	3.65	5.4	23.1	3.0	3.0	9.5
	3.94	5.2	24.2	2.4	3.0	1.5
MS	2.77	59.1	3.3	2.0	0.5	2.2
	3.06	55.7	6.4	2.2	0.7	3.1
	3.36	51.5	9.6	2.2	1.2	5.5
	3.65	52.5	9.6	1.8	1.1	5.8
	3.94	47.3	8.9	1.4	1.1	7.2

<sup>a</sup>Containing Rhamnose, Galactose, and Mannose.

### Chromatographic Methods

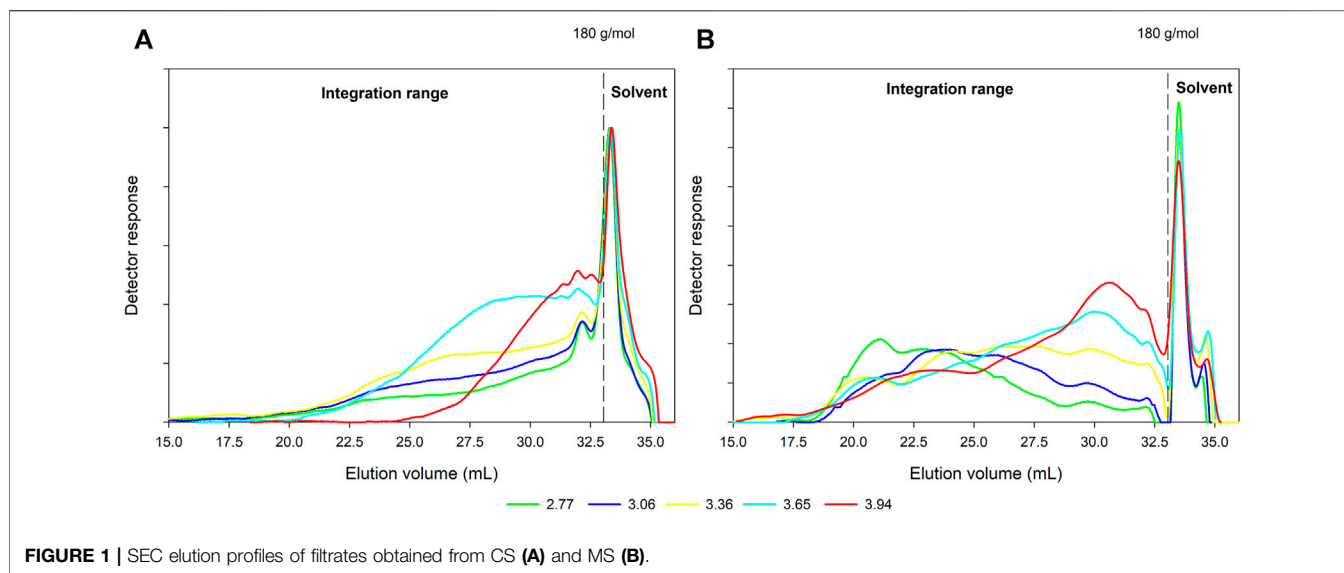
For the detection of carbohydrates borate-HPAEC (Dionex™ UltiMate™ 3,000, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, United States) was used with an anion exchange resin (MCI GEL® CA08F, Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) according to an in-house protocol. Two potassium tetraborate/boric acid buffers (pH 8.6 and 9.5) were used in different concentrations. Post-column derivatization was conducted at 65°C and carbohydrate detection was performed at a wavelength of 560 nm. For more details of this method see also Lorenz et al. (2016). Oligomers were detected as difference between total free carbohydrates in the filtrates and total carbohydrate content after two-step acidic hydrolysis.

Furans, here 5-HMF and furfural, were determined by RP-HPLC directly after steaming in order to avoid secondary degradation reactions. Therefore, 20 µL of post steaming hydrolysate was separated at 25°C for 80 min using an AQUASIL™ C<sub>18</sub> column (250 × 4.6 mm × 5 µm; Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, United States). Weak acidic water and acetonitrile were used as eluents in different concentrations with a flow rate of 1 ml/min<sup>-1</sup>. For a more detailed description of the used method see Krafft et al. (2020a).

Ion chromatography for organic acid detection was performed using a Dionex™ ICS 2000 with an IonPac™ AS11-HC (2 × 250 mm) anion exchange column (Dionex, Sunnyvale, CA, United States). Potassium hydroxide (KOH) reaching from 1 to 70 mM was used as eluent with a flow rate of 0.38 ml/min<sup>-1</sup> at 35°C.

Size exclusion chromatography was performed according to a reported method for xylans by Saake et al. (2001). 3 GRAM columns (8 × 300 mm, Polymer Standards Service) with 30, 1,000 and 3,000 Å pore size were used with a mixture of DMSO and Water (9:1) and 0.05 mol Lithium bromide. Measurements were conducted at 60°C and a flow rate of 0.4 ml/min<sup>-1</sup> using a refractive index detector (RI-71, Shodex). For molar mass calibration pullulan standards (Polymer Standards Service) were used.

Sample preparation for GC/MS analysis was conducted as thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) according to Becerra and Odermatt (2013). Therefore, 120 µg of the sample



**TABLE 3 |** Average molar mass ( $M_w$ ) in g/mol and dispersity ( $\mathcal{D}$ ) measured by SEC for CS and MS filtrates.

Log $R_0$	CS					MS				
	2.77	3.06	3.36	3.65	3.94	2.77	3.06	3.36	3.65	3.94
$M_w$	7,900	7,500	6,850	4,900	1,100	100.000	60.400	59.600	44.000	12.900
$\mathcal{D}$	13.4	10.3	8.5	5.6	2.1	20.1	20.5	28.1	30.6	13.4

were prepared with 10  $\mu$ L TMAH (10% in water) and was dried for 12 h above  $P_2O_5$ .

THM-GC/MS was performed using a Frontier Lab Micro furnace Multi-shot pyrolyzer (EGA/Py-3030iD) combined with an autosampler (AS-1020 E). The pyrolysis system was interfaced to a GC/MS (6,890/5973N Agilent Technologies, United States). The temperature for thermochemolysis was set at 350°C, interface temperature at 330°C, the inlet and the GC/MS interface temperature were kept at 320°C. A low polarity ZB-5HT column (30 m  $\times$  0.25 mm i. d., 0.25  $\mu$ m film thickness) was used with helium as carrier gas. The split ratio was set to 30:1. A flow rate of 1 ml/min was set for gas chromatographic separation. Oven program starts with 4 min at 45°C, changes to 5°C/min up to 340°C and kept 15 min at 340°C. Mass spectra was determined by a 5973 N agilent inert MS with 70 eV electron impact ionization energy. Scan range was 15–550 m/z. Evaluation was performed using an in-house and NIST 20 database. Therefore, substances were detected as methyl derivatives.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Size Exclusion Chromatography (SEC)

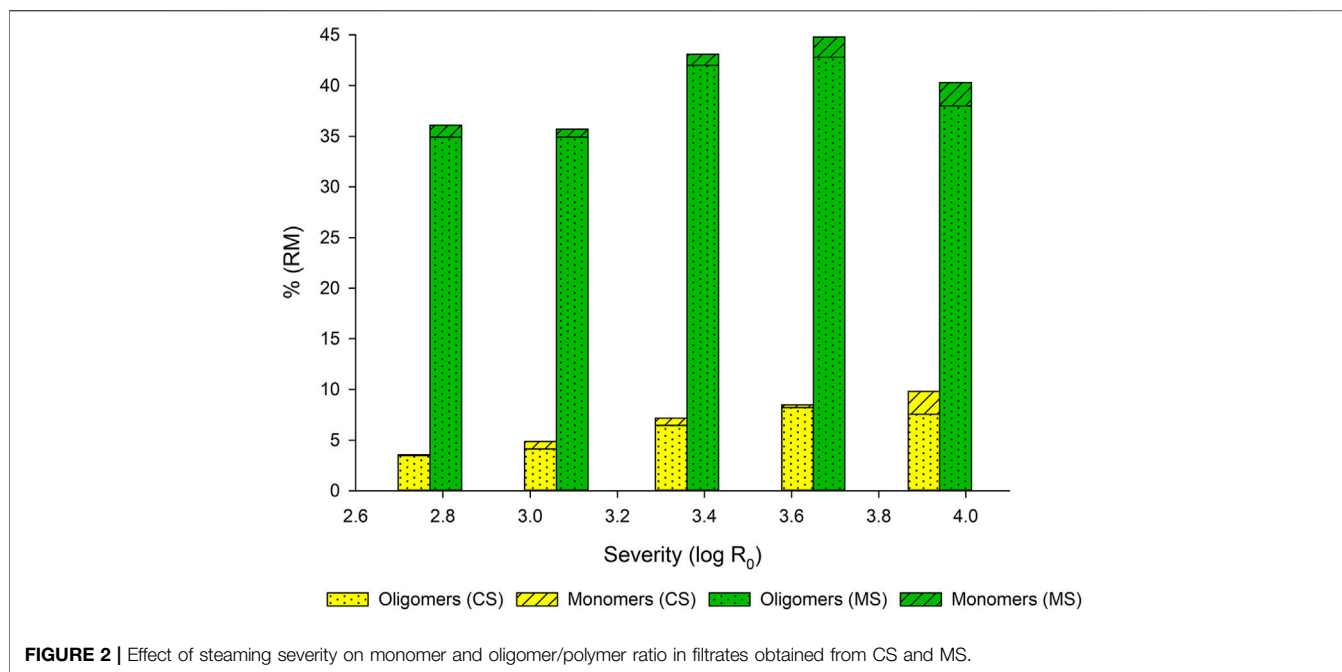
SEC was applied in order to investigate the influence of increasing steaming severity on the molar mass and molar mass distribution of components dissolved in the filtrate of CS and MS. In that context, **Figure 1** and **Table 3** depict the molar mass distribution of CS and MS filtrates.

The intensity and shape of the molar mass distributions for the CS filtrate (**Figure 1A**) indicated, that an increase of severity from  $\log R_0 = 2.77$  to 3.65 result into a continuous increase of the peak area correlating with an increased amount of dissolved components. The weight average molar mass ( $M_w$ ) is continuously reduced from 7,900 g/mol to 4,900 g/mol (**Table 3**). The molar mass distribution curves are very broad with a dispersity of 13.4 for the lowest severity (**Figure 1A**, **Table 3**). The dispersity decreases with increasing severity parallel to the  $M_w$  reduction. At the highest severity of  $\log R_0$  3.94 an increased degradation of extracted components is apparent. The high molar mass shoulder in the elution profiles disappears while low molar mass components are more prominent. This shift results in a low molar mass of 1,100 g/mol and a low dispersity of 2.1.

A more complex picture emerges for the molar mass distribution of MS filtrates (**Figure 1B**). At the lowest severity of  $\log R_0 = 2.77$ , a pronounced high molar mass peak is visible around 21 ml. Krafft et al. (2020b) reported a starch content of 38.6% for the used raw material. It can be assumed, that due to the solubility of starch, high amounts of starch or rather big starch fragments are present in the hydrolysate. This high molar mass fraction in the rather broad distribution curve results in a high  $M_w$  of 100.000 g/mol and show a high dispersity of 20.1 (**Tab. 3**) as well. This starch is degrading successively with increasing severity and the peak is shifting to higher elution volumes.

Again, with higher severity an increased peak area is indicating a higher proportion of dissolved components. At highest severity,





the highest proportion is attributed to low molar mass components eluting between 30–32.5 ml again. However, in contrast to CS, MS filtrates still contain high molar mass components, even at the highest severity. Therefore, even at  $\log R_0 = 3.94$  the  $M_w$  and the dispersity remain high with 12.900 g/mol and 13.4, respectively (**Tab. 3**).

In earlier works, Puls et al. (1985) investigated the influence of an increasing severity on the so called “hemicellulose fraction” of birch. The authors also report a shift to lower molar masses with an increase of the severity. Similar results were reported e.g. by Montané et al. (1998) after steam explosion of wheat straw. The authors performed SEC for washing water, which is similar to the filtrate in this study. They also report a strong decrease of the molar mass with severity, starting with an  $M_w$  of around 11.000 at a severity of  $\log R_0 = 3.39$  and resulting in an  $M_w$  of 400 at  $\log R_0 = 4.13$ . Montané et al. (1998) describe the molar mass decrease with depolymerization reactions of compounds with higher molar mass to oligomers and monomers. The hydrolytic cleavage of the glycosidic bonds of cellulose and hemicelluloses during steaming to monomers and the further degradation to e. g., 5-HMF and furfural is therefore described in the literature (Li et al., 2005). As main reaction of the lignin, also  $\beta$ -O-4' structures are depolymerized during steaming and the solubilized lignin occurs in the filtrate (Montané et al., 1998; Li et al., 2007).

In summary, a decrease of  $M_w$  with increasing severity is visible for both samples. Nonetheless, filtrates from MS consistently show much higher molar masses compared to CS. The primary driver for that finding is most likely starch from the kernels in the silage fraction.

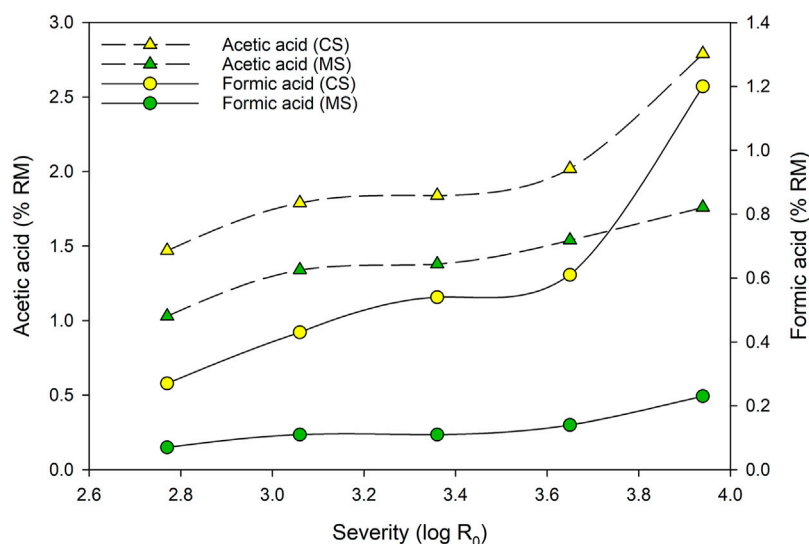
## Monomer and Oligomer/Polymer Detection

The detection of free monomeric carbohydrates in the filtrates after steaming was performed to calculate the oligomer/polymer

fraction. Therefore, the known carbohydrate content after acidic hydrolysis was compared with the detected monomers prior to hydrolysis. The difference between these two values represents the oligomeric/polymeric carbohydrate fraction. Oligomers, especially xylooligomers, are also reported as inhibitory compounds for cellulases (Kumar and Wyman, 2009). For this reason, oligomers are mentioned in this section (**Figure 2**).

Different developments are described in **Figure 2**. High carbohydrate contents, as mentioned before originating from soluble starch, were determined in the MS filtrate. The relative oligomer/polymer proportion varies between 97.8% ( $\log R_0 = 3.06$ ) and 94.3% ( $\log R_0 = 3.94$ ). The highest absolute monosaccharide content of 2.3% was detected in filtrates treated at the highest severity. However, at this severity, also the total carbohydrates in the filtrate are reduced, indicating intensified degradation reactions at high pretreatment conditions. In contrast, CS filtrates show much lower total carbohydrate contents. Low monomer values are detected up to a severity of  $\log R_0 = 3.65$ , with a relative oligomer/polymer proportion approximately at 90%. At the highest severity ( $\log R_0 = 3.94$ ), the absolute monomer content is equal to reported for MS filtrates. At this severity, the oligomer/polymer proportion is around 77% of the total carbohydrates.

Several authors mention the changes of mono- and oligomer ratios during steaming. Known mechanisms for polymer degradation to oligomers/monomers are hydrolytic processes, leading to a cleavage of the glycosidic bonds of the polymers, e. g. cellulose and hemicelluloses (Li et al., 2005). Romero-García et al. (2016) investigated olive leaves pretreated between 180 and 220°C. The authors reported the highest carbohydrate recovery for pretreatment conditions of 180°C for 10 min. At this point, 64% of the released carbohydrates originated in the oligomeric form. The authors found oligomer contents above 60% for all



**FIGURE 3** | Effect of steaming severity on the acetic and formic acid content of CS and MS filtrates.

examined conditions. Sharma et al. (2015) compared the influence of sulfuric acid impregnation on the oligomer release from rice straw. After a pretreatment at 200°C for 10 min ( $\log R_0 = 3.94$ ), they found 60% of the pentoses as oligomers and 75% of the hexoses, respectively. After impregnation with sulfuric acid and pretreatment at 180°C for 10 min, much lower values of oligomers (20.5% pentoses, 40.4% hexoses) were determined. The authors concluded that catalyzed steaming conditions are beneficial in order to avoid inhibition by oligomers for subsequent processes. Nunes and Pourquie (1996) compared steam explosion of *Eucalyptus globulus* (LABILL.) wood chips with and without acid catalysts. They concluded that higher severities are needed under non-acidic conditions for the same carbohydrate release from the substrate and efficient following EH. Furthermore, they reported, that an efficient oligomer hydrolysis was not detected under non-acidic conditions. For steam explosion experiments of sunflower stalks without acid catalysts Ruiz et al. (2008) report an average of 90% oligomers in the filtrates. These data is quite similar to the present study. The authors postulate for such high oligomer contents the necessity of a so-called “posthydrolysis” to make the oligomers accessible for fermentation approaches. These considerations for filtrates with high oligomer/polymer values can be adopted for the filtrates investigated in the present study.

## Detection of Inhibitors

### Weak Organic Acids

Organic acids and furans are often mentioned as the main inhibitor fractions with amounts of 82–96% of all inhibitors (Zhang et al., 2013). However, acetic and formic acid were identified as the main organic acids in the process. Acetic acid originates therefore from hemicellulose-related acetyl groups. Due to autoionization of water between 150 and 230°C, hydronium ions are formed. These ions work as catalysts and conduct a cleavage of the hemicellulose bonded acetyl groups.

Further, hydronium ions originating from acetic acid also act as catalysts for the degradation of polysaccharides. Formic acid is formed by degradation of furfural and 5-HMF, originating from pentose and hexose degradation (Pedersen and Meyer, 2010; Rasmussen et al., 2014). Since the dilution of the hydrolysate differs after the steaming, all results were calculated as % RM. Figure 3 shows acetic and formic acid calculations for both, MS and CS filtrates.

An increase of formic and acetic acid, as main aliphatic carboxylic acids, appears with increasing severity. Acetic acid, originating from acetyl groups of xylan hemicelluloses in the used CS, is increasing from 1.47% RM up to 2.79% RM. For MS, the liberated acetic acid concentration is lower and increases from 1.03% RM up to 1.76% RM. Similar developments occur for formic acid, although at lower levels between 0.27–1.20% RM for CS and 0.07–0.23% RM for MS. The increase of organic acids with an increase of the applied severity is also reported on in the area of expertise’s literature. Hagel and Saake (2020) report similar trends for steam refining between  $\log R_0 = 2.47$  and  $\log R_0 = 3.95$  of poplar and spruce wood chips. They report acetic acid contents of 0.18–1.83% RM for poplar and 0.04–0.7% RM for spruce, respectively. Further they report formic acid contents between 0.02–0.37% RM (poplar) and 0.02%–0.26 (spruce). Whereas the trends are similar, the acid contents are lower compared to the present study. Steam explosion experiments with sunflower stalks between  $\log R_0 = 3.05$  and 4.53, reported by Ruiz et al. (2008), show strong increases, mainly between severities of  $\log R_0 = 3.64$  and 4.23. However, whereas the acetic acid are in an equal range, the formic acid concentrations of Ruiz et al. (2008) are significantly higher compare to this study. Summarizing, the trends found in this study and in available literature, an increased formation of weak acids for higher severities is generally reported. However, the absolute amount of weak acids formed depends on the used substrate.

Regarding the inhibitory effect of the organic acids on enzymatic hydrolysis and subsequent fermentation to ethanol, Cantarella et al. (2004) report, that acetic acid concentrations of 2 g/L did not affect the activity of enzymes. Feng et al. (2012) also found no inactivation using an acetic acid concentration of 2 g/L and Oliva et al. (2003) tested 10 g/L without reduction of the ethanol production. Captured in **Figure 3**, more than 2.5% RM (CS) and more than 1.5% RM (MS) acetic acid were found at the highest severity and a dilution of the obtained filtrates may be necessary. However, formic acid shows a strong influence for a lactic acid fermentation at concentrations of 0.1 g/L using bush clovers (*Lespedeza crytobotrya* MIQ.) stalks (Feng et al., 2012). In the present data, around 1.2% RM (CS) formic acid were detected. However, less containing formic acid were determined for the MS samples. A dilution or detoxification of the filtrates, mainly from CS, is therefore needed prior to fermentation.

Due to the known mechanism of hydronium ion formation, process conditions below 150°C may be beneficial to prevent autoionization and acetic acid formation in steam refining processes. Nonetheless, Krafft et al. (2020b) tested steam refining below 150°C for MS and found nearly stable values for acetic acid. Therefore, free lactic acid in the ensiled sample may be responsible for degradation reactions and the cleavage of hemicellulose-bonded acetyl groups. Therefore, lactic acid is usually not formed during steaming. Nonetheless, it is known as inhibitor formed during fermentation processes (Cubas-Cano et al., 2020). It is important to know that the filtrates obtained from MS contain relevant amounts of lactic acid originating from the raw material. Krafft et al. (2020b) point out lactic acid contents for the used filtrates between 5.87% RM ( $\log R_0 = 1.59$ ) and 4.79% RM ( $\log R_0 = 4.12$ ) with a slight decrease for higher severities. Due to the knowledge of lactic acid naturally occurring in MS, lowering organic acid fractions in the process conditions being beneficial to the CS process, but superfluous towards the MS process, seems like a plausible hypothesis.

### Furan Derivatives

Further degradation products of the carbohydrates are the furan derivatives 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and furfural. 5-HMF is known as one of the most important molecules obtained from biomass and is reported to be formed under acidic conditions from the dehydration of mainly monosaccharides. Further reactions, like the formation to levulinic and formic acid or the polymerization of 5-HMF and intermediates to humins are reported (Souza et al., 2012). Further, Danon et al. (2014) report mechanisms and kinetics of furfural formation from pentoses by dehydration. However, the authors show multiple options for the formation of furfural deriving from pentose.

Values for furan contents in the filtrates after steam refining of CS and MS were reported by Krafft et al. (2020a) and Krafft et al. (2020b). Due to the known instability, furans were detected directly after steaming in the filtrates. Further a recalculation to the biomass input was performed for better comparability. Furfural and 5-HMF are known inhibitors. From experiments with the filtrate of poplar, steam exploded at 210°C for 4 min, Oliva et al. (2003) report, that furfural is twice as toxic than 5-HMF. However, experiments indicate the relevance of these

products. They will therefore be briefly compared and discussed for the sake of completeness.

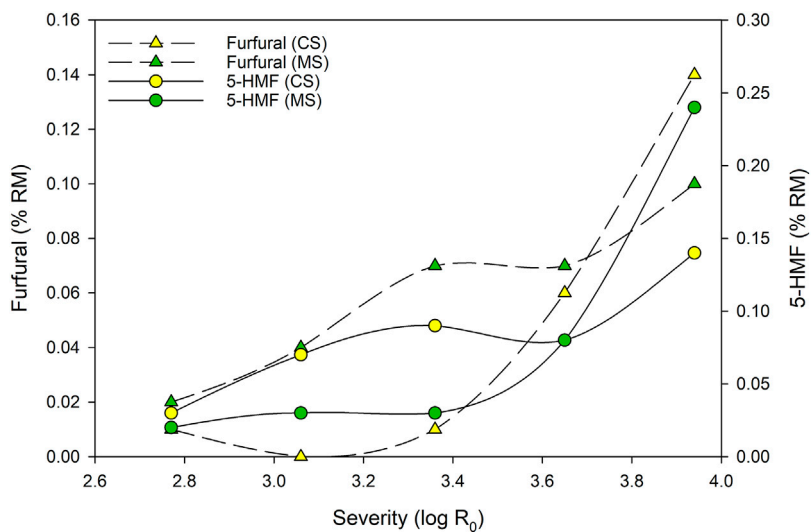
As illustrated in **Figure 4**, increasing numerical values for 5-HMF and furfural are detected. Hagel and Saake (2020) show similar developments for the mentioned furan derivatives after steam refining at different severities of poplar and spruce. Therefore, furfural contents are quite similar and at the highest severity ( $\log R_0 = 3.94$ ) around 0.15% RM furfural is reported for both, poplar and spruce. Much lower values for 5-HMF are reported by the same authors, resulting in approximately 0.05% RM 5-HMF at a severity of  $\log R_0 = 3.94$ .

From the known mechanism of 5-HMF and furfural formation under acidic conditions, steaming under neutral process conditions may be a suitable way for furan derivative reduction. Hagel and Saake (2020) report steam refining of waste MDF between pH 7 to 8 with nearly no measured furfural and 5-HMF production. Due to known degradation reactions provoked by low or high pH values, neutral conditions may be a way for process optimization to prevent both, furan derivative formation and cellulose/hemicellulose degradation.

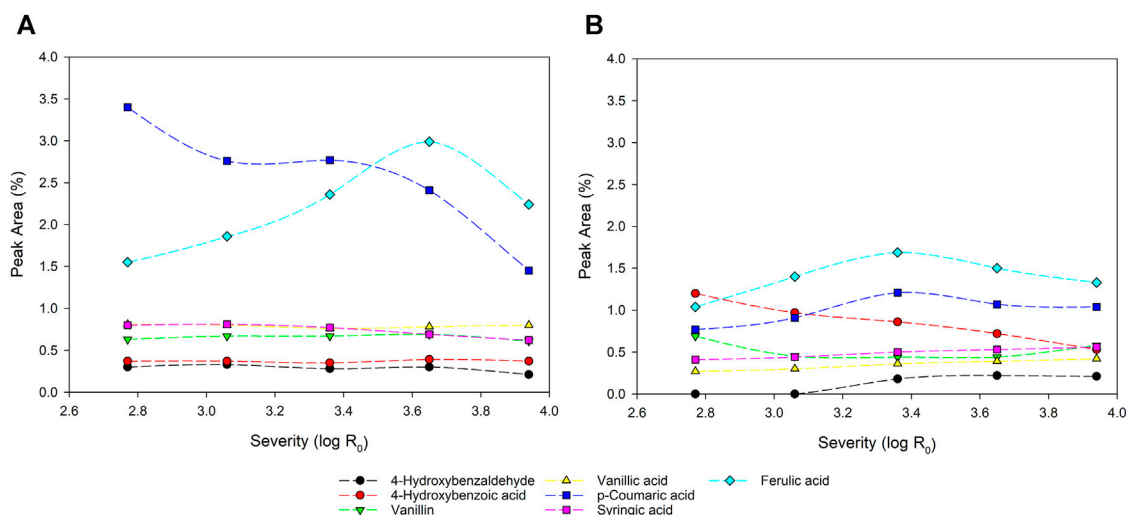
### Phenolic Compounds

As mentioned before, phenolic degradation products and fragments are determined in the filtrates originating from the plant lignin. In **Figures 5A,B** the relative peak areas of the relevant inhibitory phenolics in GC/MS data after TMAH derivatization are depicted.

Origins and formation mechanisms of the measured compounds are commonly reported on in various publications. Nonetheless, in regards to lignified biomass and maize silage, containing kernels, multiple origins especially for ferulic acid are possible. For lignified substrate, ferulic acid is linked covalent to lignin and originates from the oxidative attack of coniferyl alcohol (Mathew and Abraham, 2006). Ferulate esters are reported as major linkages in grasses with the formation of “lignin-ferulate-polysaccharide”-complexes (LFP) (Ralph et al., 1995). Ferulic acid occurs also in maize kernels and therefore, the kernels in the maize silage are a further origin of ferulic acid (Sen et al., 1991). The conversion of ferulic acid to vanillin is reported with six different pathways for conversion (Mathew and Abraham, 2006). Vanillin is further reported as depolymerization product of lignin, obtained e.g., by oxidation, alkaline processes or severe temperature/pressure conditions. However, a confirmed reaction mechanism is reported controversial since many parameters influence the reaction sequence (Fache et al., 2016). Also, the cleavage of  $\beta$ -O-4' bonds is reported to be a mechanism for the depolymerization of lignin to vanillin and vanillic acid (Rinesch et al., 2017). *p*-coumaric acid is reported to be a naturally present hydroxycinnamic acid in the cell walls of wood like ferulic acid as well (Lam et al., 2001). The formation of 4-Hydroxybenzoic acid is reported by Rasmussen et al. (2016). The authors show a cleavage of lignin side chains and the formation of 4-Hydroxybenzoic acid after hydrothermal treatment. It is to be mentioned, that follow-up sequences between other degradation products are possible. (Rasmussen et al., 2016). Closing, 4-Hydroxybenzaldehyde is described as



**FIGURE 4** | Effect of steaming severity on the concentration of furan derivatives (furfural and 5-HMF) in the filtrates obtained from CS and MS.

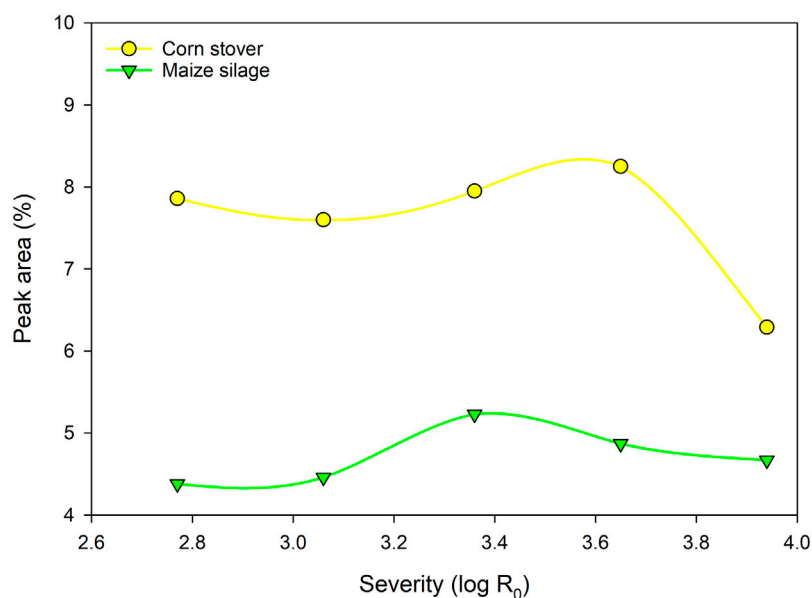


**FIGURE 5** | Peak area % in GC/MS of the main phenolic compounds for CS (A) and MS (B). The peak area is calculated as percentage based on the area of the whole chromatogram.

aldehyde monomer of lignin (Hu et al., 2018) and syringic acid is reported as small phenolic degradation fragments from S and G-type lignins (Longe et al., 2020).

As stated, ferulic acid and *p*-coumaric acid represent the main phenolic molecules detectable in the filtrate. These fractions show the most significant change in concentrations with increasing severity. For CS, a high proportion of *p*-coumaric acid is found at low severity which decreases constantly at harsher reaction conditions. This indicates that *p*-coumaric acid is easily released from the lignin but undergoes secondary reactions, like degradation or reactions with other degradation products, at harsher conditions. Ilanidis et al. (2021) investigated hydrothermal

pretreatment of wheat straw and found a reduction of *p*-coumaric acid at temperatures higher than 190°C. In the present study, ferulic acid is also increasing up to a severity of  $\log R_0 = 3.65$  and is then decreasing at the point of the highest severity. For MS both compounds show an increase up to  $\log R_0 = 3.36$  followed by a reduction at the highest severity. However, in general these compounds were detected in much lower levels compared to corn stover filtrates. In that context Gong et al. (2012) also report degradation and polymerization of phenolic compounds at higher severities. Early works of Fiddler et al. (1967) report 4-methylguaiacol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol and vanillin as thermal degradation products of ferulic acid.



**FIGURE 6** | Summarized peak area % of the main phenolic compounds detected by GC/MS for CS and MS filtrates. The peak area is calculated as percentage based on the area of the whole chromatogram.

Further lignin degradation products, like 4-hydroxybenzaldehyd, 4-hydroxybenzoic acid, vanillin, vanillic and syringic acid are nearly stable for CS independent regarding the severity. These compounds were found in low amounts below 1% peak area. For the MS filtrates after steam refining, a more complex picture was obtained. A constant decrease with severity increase is visible for 4-hydroxybenzoic acid indicating secondary reactions. Syringic and vanillic acid are slightly increasing with the increasing severity. A noticeable increase of 4-hydroxybenzaldehyde is also reported by Ilanidis et al. (2021) for hydrothermal pretreatment of wheat straw. The authors suggest that phenolic degradation products with only one carbon side chain are not as sensitive for further degradation as compounds with longer side chains.

Zhang et al. (2013) also describe the influence of temperature and time on the behavior of the mentioned inhibitors. With increasing severity, they report increasing amounts of syringic acid and 4-hydroxybenzaldehyde, while stable figures were found for vanillin. Furthermore, a strong decrease with higher severities was reported for *p*-coumaric acid. Vanillic and 4-hydroxybenzoic acid were not found by Zhang et al. (2013).

Comparing both substrates, much lower amounts of phenolic degradation products occur in MS filtrates (Figure 6). This is in accordance with the different lignin content of the two raw materials. Krafft et al. (2020a) report 19.3% lignin for the used CS, whereas 11.9% lignin are reported for the MS (Krafft et al., 2020b). With that in mind, higher proportion of phenolic degradation products could be expected for CS filtrates and it can be assumed, that the usage of substrates with low lignin contents is beneficial for the process. However, also a delignification of the substrate before steam refining is

conceivable and is further known to enhance the enzymatic accessibility (Krafft et al., 2020a).

### Further Compounds Detected by GC

Beside the aforementioned inhibitors, further noteworthy compounds were detected. Propane-1,2,3-tricarboxylic acid was detected in MS samples most likely as breakdown product of a water soluble fumonisin. Fumonisin are known mycotoxins in maize, originating from a contamination with the mold fungus *Fusarium verticillioides* (SACC.) NIRENBERG (formerly *Fusarium moniliforme*), which is a common fungal pathogen in corn (Viquez et al., 1996; Munkvold and Desjardins, 1997; Marasas et al., 2004). Whereas the influence of such toxins is investigated for human beings or livestock, consuming contaminated maize, the possible influence for microorganism in biorefinery contexts is subject of recent research (Salati et al., 2014; De Gelder et al., 2018; Giorni et al., 2018) and up to now, depending on the fumonisin concentration, no or less negative influence of mycotoxins was found for biogas (Ferrara et al., 2021) and ethanol fermentation processes (Bothast et al., 1992).

Further compounds which also show an increase with increasing severity are e.g. 3,4-dihydrocoumarin-6-ol or alginetin. 3,4-dihydrocoumarin-6-ol is also reported by Oudia et al. (2007) in a Pyrolysis-GC/MS study of eucalyptus kraft pulps and by Kouhi and Shams (2019) after co-pyrolysis of bagasse and waste heavy paraffin. Alginetin is therefore reported as “caramelization product”, originating from pentoses and hexuronic acids after thermal treatments (Doi et al., 2020). However, both compounds are not mentioned in the context of inhibitory effects in the literature.

## CONCLUSION

Concluding this studies data, several inferences can be highlighted. Firstly, the obtained SEC data show a decrease of the molar mass of both samples with increasing severity. High molar masses around 100.000 g/mol were determined at the mildest condition for MS filtrates, with a reduction to 12.900 g/mol at the highest severity of  $\log R_0 = 4.12$ . Values for CS filtrates are much lower but a decrease of the determined molar mass with an increase of the severity is observed as well. The reason for the significant difference between MS and CS filtrates can be most likely attributed to starch from the kernels in the MS sample. The decrease in the molar mass is provoked by degradation reactions due to increasing severity and the resulting pH reduction induced by liberated organic acids in the filtrate.

The analysis of the ratio of monomers vs. oligomers/polymers in the obtained filtrates revealed that only for corn stover, treated at the highest severity, a significant amount (23% of the available carbohydrates) is obtained as monomers. All other conducted pretreatments lead to an oligomer/polymer content higher than 90%. Most of the carbohydrates are therefore not accessible for microorganisms. An EH prior to fermentation is a mandatory requirement for the obtained filtrates. However, processes like biogas production can be considered for the utilization of the filtrates, too.

Several observations were made for inhibitors in the filtrates. For the weak, organic acids mainly acetic and formic acid are in the focus for causing inhibitory effects. From the literature it is known that already concentrations of 0.1 g/L formic acid cause inhibitory reactions and a reduction of microbial activity. In the present study, relevant formic acid amounts were detected in the filtrates. Therefore, for the highest concentration (CS,  $\log R_0 = 3.94$ ) a dilution is required to prevent effects, caused by the formic acid. Moreover, a detoxification or dilution of the obtained filtrates is necessary for further process steps in the context of a biorefinery concept. Considering the found furan derivatives and phenolic compounds, relevant amounts of both were found in the analyzed filtrates. Furfural increased up to 0.14% RM (CS) and 0.10% RM (MS). 5-HMF show an increase up to 0.14% RM (CS) and 0.24% RM (MS). Both compounds result from the degradation of pentoses and hexoses. A total amount of approximately 8% peak area can be put down to inhibitory, phenolic compounds for CS and 4–5% for MS, respectively. MS was proven to contain less phenolic compounds, mainly due to lower lignin contents in the raw material. However, the inhibitory activity on model organisms is subject to further research where steam refining filtrates must be tested in the context of EH and fermentation. Nonetheless, a direct fermentation is reported as insufficient, and a detoxification of similar filtrates was reported as a necessity within the literature.

Comparing both substrates, MS is beneficial with view to inhibitory degradation products in the filtrates. Formic acid

concentrations are much lower and fewer contaminations with phenolic compounds were obtained as degradation products from lignin. Besides of fewer inhibitors the MS filtrates have higher carbohydrate fractions. Indicating them to be more attractive compared to the CS filtrates. For further research, a comparison of MS and CS with CS silage is a topic of interest. CS silage might combine the benefits of both substrates investigated in this study, precisely a high accessibility of the substrate, the declaration as agricultural residue and the possibility of storage and full-year biomass supply.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: MK; Data curation: MK and JB; Formal analysis: MK and JB; Funding acquisition: BS; Investigation: MK and JB; Methodology: MK; Project administration: BS; Resources: MK; Supervision: BS; Validation: MK and JB; Visualization: MK; Writing—original draft: MK; Writing - review and editing: MK, JB and BS. All authors (MK, JB, BS) have agreed to the submission and that the article is not currently being considered for publication by another paper-based or electronic journal.

## FUNDING

This research was funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) *via* Project Management Jülich (PtJ) in the PANDA project, grant number 031B0505B.

## ACKNOWLEDGMENTS

The Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and Project Management Jülich (PtJ) are gratefully acknowledged for their financial support. The authors are also grateful to Marie Bendler and Olga Frey for their previous work. Further, the authors thank Johannes Meyn (Meyn Milchhof GbR) and Martin Bellof (Autodisplay Biotech GmbH) for the primary biomass supply. A special thank is addressed to Birte Buske (University of Hamburg/Johann Heinrich von Thünen Institute) for her kind technical and scientific support. Nicole Erasmy (Johann Heinrich von Thünen Institute), Anna Knöpfle and Andreas Schreiber (both University of Hamburg) are also gratefully acknowledged for their technical support. Ramona Bahmann and Sven Groth are finally acknowledged for final proof-reading.

## REFERENCES

- Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., and Hanai, S. (1986). Identification of Aromatic Monomers in Steam-Exploded poplar and Their Influences on Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Tech.* 64, 567–570. doi:10.1016/0385-6380(86)90084-1
- Aulitto, M., Fusco, S., Bartolucci, S., Franzén, C. J., and Contursi, P. (2017). *Bacillus Coagulans* MA-13: a Promising Thermophilic and Cellulolytic Strain for the Production of Lactic Acid from Lignocellulosic Hydrolysate. *Biotechnol. Biofuels* 10, 210. doi:10.1186/s13068-017-0896-8
- Becerra, V., and Odermatt, J. (2013). Interferences in the Direct Quantification of Bisphenol S in Paper by Means of Thermochemolysis. *J. Chromatogr. A* 1275, 70–77. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.034
- Bendler, M. (2018). Dampfdruck-Refiner-Aufschluss und enzymatische Hydrolyse von Maisstroh. Bachelor thesis. Hamburg: Hamburg University of Applied Sciences.
- Bothast, R. J., Bennett, G. A., Vancauwenberge, J. E., and Richard, J. L. (1992). Fate of Fumonisin B 1 in Naturally Contaminated Corn during Ethanol Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 233–236. doi:10.1128/AEM.58.1.233-236.1992
- Brownell, H. H., Yu, E. K. C., and Saddler, J. N. (1986). Steam-explosion Pretreatment of wood: Effect of Chip Size, Acid, Moisture Content and Pressure Drop. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 792–801. doi:10.1002/bit.260280604
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., and Domínguez, J. M. (2005). Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus Pentosus*. *Biotechnol. Prog.* 21, 793–798. doi:10.1021/bp049603v
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., and Alfani, F. (2004). Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of poplar wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. *Biotechnol. Prog.* 20, 200–206. doi:10.1021/bp0257978
- Cherubini, F., and Strömman, A. H. (2011). Chemicals from Lignocellulosic Biomass: Opportunities, Perspectives, and Potential of Biorefinery Systems. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 5, 548–561. doi:10.1002/bbb.297
- Cruse, R. M., and Herndl, C. G. (2009). Balancing Corn stover Harvest for Biofuels with Soil and Water Conservation. *J. Soil Water Conservation* 64, 286–291. doi:10.2489/jswc.64.4.286
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, I., and Tomás-Pejó, E. (2020). Efficient Utilization of Hydrolysates from Steam-Exploded Gardening Residues for Lactic Acid Production by Optimization of Enzyme Addition and pH Control. *Waste Manage.* 107, 235–243. doi:10.1016/j.wasman.2020.04.003
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., and Tomás-Pejó, E. (2018). Biotechnological Advances in Lactic Acid Production by Lactic Acid Bacteria: Lignocellulose as Novel Substrate. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 12, 290–303. doi:10.1002/bbb.1852
- Danon, B., Marcotullio, G., and de Jong, W. (2014). Mechanistic and Kinetic Aspects of Pentose Dehydration towards Furfural in Aqueous media Employing Homogeneous Catalysis. *Green. Chem.* 16, 39–54. doi:10.1039/C3GC41351A
- De Gelder, L., Audenaert, K., Willems, B., Schelfhout, K., De Saeger, S., and De Boevre, M. (2018). Processing of Mycotoxin Contaminated Waste Streams through Anaerobic Digestion. *Waste Manage.* 71, 122–128. doi:10.1016/j.wasman.2017.09.039
- de Souza, R. L., Yu, H., Rataboul, F., and Essayem, N. (2012). 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) Production from Hexoses: Limits of Heterogeneous Catalysis in Hydrothermal Conditions and Potential of Concentrated Aqueous Organic Acids as Reactive Solvent System. *Challenges* 3, 212–232. doi:10.3390/challe3020212
- Doi, S., Kawamura, M., Oyama, K., Akamatsu, T., Mizobuchi, M., Oyama, Y., et al. (2020). Bioactivity of Alginetin, a Caramelization Product of Pectin: Cytometric Analysis of Rat Thymic Lymphocytes Using Fluorescent Probes. *PLoS One* 15, e0241290. doi:10.1371/journal.pone.0241290
- Fache, M., Boutevin, B., and Caillol, S. (2016). Vanillin Production from Lignin and its Use as a Renewable Chemical. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 35–46. doi:10.1021/acsschemeng.5b01344
- Faostat (2020). World Production Item Maize 2019. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed May 26, 2021).
- Feng, Y., Qi, X., Jian, H., Sun, R., and Jiang, J. (2012). Effect of Inhibitors on Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Saccharification Fermentation for Lactic Acid Production from Steam Explosion Pretreated Lespedeza Stalks. *BioResources* 7, 3755–3766. doi:10.15376/biores.7.3.3755-3766
- Ferrara, M., Haidukowski, M., D'Imperio, M., Parente, A., De Angelis, E., Monaci, L., et al. (2021). New Insight into Microbial Degradation of Mycotoxins during Anaerobic Digestion. *Waste Manage.* 119, 215–225. doi:10.1016/j.wasman.2020.09.048
- Fiddler, W., Parker, W. E., Wasserman, A. E., and Doerr, R. C. (1967). Thermal Decomposition of Ferulic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 15, 757–761. doi:10.1021/jf60153a003
- Frey, O. (2020). Analytik und Bilanzierung von Mais-Hydrolysaten. Master thesis. Hamburg: University of Hamburg.
- Giorni, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Soldano, M., Piccinini, S., Rossi, L., et al. (2018). Fate of Mycotoxins and Related Fungi in the Anaerobic Digestion Process. *Bioresour. Tech.* 265, 554–557. doi:10.1016/j.biortech.2018.05.077
- Giuliano, A., Poletto, M., and Barletta, D. (2016). Process Optimization of a Multi-Product Biorefinery: The Effect of Biomass Seasonality. *Chem. Eng. Res. Des.* 107, 236–252. doi:10.1016/j.cherd.2015.12.011
- Glassner, D. A., Hettenhaus, J. R., and Schechinger, T. M. (1998). Corn stover Collection Project. *BioEnergy '98: Expanding BioEnergy Partnerships* 2, 1100–1110.
- Gong, L., Huang, L., and Zhang, Y. (2012). Effect of Steam Explosion Treatment on Barley Bran Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7177–7184. doi:10.1021/jf301599a
- Graebig, M., Bringezu, S., and Fenner, R. (2010). Comparative Analysis of Environmental Impacts of maize-biogas and Photovoltaics on a Land Use Basis. *Solar Energy* 84, 1255–1263. doi:10.1016/j.solener.2010.04.002
- Hagel, S., Joy, J., Cicala, G., and Saake, B. (2021). Recycling of Waste MDF by Steam Refining: Evaluation of Fiber and Paper Strength Properties. *Waste Biomass Valor.* 12, 5701–5713. doi:10.1007/s12649-021-01391-4
- Hagel, S., and Saake, B. (2020). Fractionation of Waste MDF by Steam Refining. *Molecules* 25, 2165. doi:10.3390/molecules25092165
- Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., et al. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807. doi:10.1126/science.1137016
- Hu, M., Wang, J., Gao, Q., and Bao, J. (2018). Converting Lignin Derived Phenolic Aldehydes into Microbial Lipid by *Trichosporon Cutaneum*. *J. Biotechnol.* 281, 81–86. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.06.341
- Ilanidis, D., Stagge, S., Jönsson, L. J., and Martín, C. (2021). Hydrothermal Pretreatment of Wheat Straw: Effects of Temperature and Acidity on Byproduct Formation and Inhibition of Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation. *Agronomy* 11, 487. doi:10.3390/agronomy11030487
- Janzon, R., Schütt, F., Oldenburg, S., Fischer, E., Körner, I., and Saake, B. (2014). Steam Pretreatment of spruce forest Residues: Optimal Conditions for Biogas Production and Enzymatic Hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* 100, 202–210. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.093
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., and Ahring, B. K. (2004). Inhibition of Ethanol-Producing Yeast and Bacteria by Degradation Products Produced during Pretreatment of Biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10–26. doi:10.1007/s00253-004-1642-2
- Kouhi, M., and Shams, K. (2019). Bulk Features of Catalytic Co-pyrolysis of Sugarcane Bagasse and a Hydrogen-Rich Waste: The Case of Waste Heavy Paraffin. *Renew. Energ.* 140, 970–982. doi:10.1016/j.renene.2019.03.115
- Krafft, M. J., Bendler, M., Schreiber, A., and Saake, B. (2020a). Steam Refining with Subsequent Alkaline Lignin Extraction as an Alternative Pretreatment Method to Enhance the Enzymatic Digestibility of Corn Stover. *Agronomy* 10, 811. doi:10.3390/agronomy10060811
- Krafft, M. J., Frey, O., Schwarz, K. U., and Saake, B. (2020b). Maize Silage Pretreatment via Steam Refining and Subsequent Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Carbohydrates. *Molecules* 25, 6022. doi:10.3390/molecules25246022
- Kumar, R., and Wyman, C. E. (2009). Effect of Enzyme Supplementation at Moderate Cellulase Loadings on Initial Glucose and Xylose Release from Corn stover Solids Pretreated by Leading Technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 457–467. doi:10.1002/bit.22068

- Lam, T. B. T., Kadoya, K., and Iiyama, K. (2001). Bonding of Hydroxycinnamic Acids to Lignin: Ferulic and P-Coumaric Acids Are Predominantly Linked at the Benzyl Position of Lignin, Not the  $\beta$ -position, in Grass Cell walls. *Phytochemistry* 57, 987–992. doi:10.1016/S0031-9422(01)00052-8
- Lebuhn, M., Liu, F., Heuwinkel, H., and Gronauer, A. (2008). Biogas Production from Mono-Digestion of maize Silage-Long-Term Process Stability and Requirements. *Water Sci. Technol.* 58, 1645–1651. doi:10.2166/wst.2008.495
- Li, J., Henriksson, G., and Gellerstedt, G. (2005). Carbohydrate Reactions during High-Temperature Steam Treatment of Aspen Wood. *ABAB* 125, 175–188. doi:10.1385/ABAB:125:3:175
- Li, J., Henriksson, G., and Gellerstedt, G. (2007). Lignin Depolymerization/repolymerization and its Critical Role for Delignification of aspen wood by Steam Explosion. *Bioresour. Tech.* 98, 3061–3068. doi:10.1016/j.biortech.2006.10.018
- Longe, L., Garnier, G., and Saito, K. (2020). Linear Bio-Based Water Soluble Aromatic Polymers from Syringic Acid, S Type Degradation Fragment from Lignin. *J. Polym. Sci.* 58, 540–547. doi:10.1002/pol.20190070
- Lorenz, D., Erasmy, N., Akil, Y., and Saake, B. (2016). A New Method for the Quantification of Monosaccharides, Uronic Acids and Oligosaccharides in Partially Hydrolyzed Xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydr. Polym.* 140, 181–187. doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.027
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-van Waes, J., et al. (2004). Fumonisin Disrupts Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and *In Vivo*: a Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects Among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated maize. *J. Nutr.* 134, 711–716. doi:10.1093/jn/134.4.711
- Mathew, S., and Abraham, T. E. (2006). Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. *Crit. Rev. Microbiol.* 32, 115–125. doi:10.1080/10408410600709628
- Miao, Z., Shastri, Y., Grift, T. E., Hansen, A. C., and Ting, K. C. (2012). Lignocellulosic Biomass Feedstock Transportation Alternatives, Logistics, Equipment Configurations, and Modeling. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6, 351–362. doi:10.1002/bbb.1322
- Montané, D., Farriol, X., Salvadó, J., Jollez, P., and Chornet, E. (1998). Fractionation of Wheat Straw by Steam-Explosion Pretreatment and Alkali Delignification. Cellulose Pulp and Byproducts from Hemicellulose and Lignin. *J. Wood Chem. Tech.* 18, 171–191. doi:10.1080/02773819809349575
- Munkvold, G. P., and Desjardins, A. E. (1997). Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence? *Plant Dis.* 81, 556–565. doi:10.1094/PDIS.1997.81.6.556
- Nunes, A., and Pourquie, J. (1996). Steam Explosion Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of eucalyptus wood. *Bioresour. Tech.* 57, 107–110. doi:10.1016/0960-8524(96)00019-3
- Oleskowicz-Popiel, P., Thomsen, A. B., and Schmidt, J. E. (2011). Ensiling - Wet-Storage Method for Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biomass. Bioenergy* 35, 2087–2092. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.003
- Oliva, J. M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M. J., Manzanares, P., et al. (2003). "Effect of Lignocellulosic Degradation Compounds from Steam Explosion Pretreatment on Ethanol Fermentation by Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus*," in *Biotechnology For Fuels And Chemicals*. Editors B. H. Davison, J. W. Lee, M. Finkelstein, and J. D. McMillan (Totowa, NJ: Humana Press), 141–153. doi:10.1007/978-1-4612-0057-4\_11
- Oudia, A., Mészáros, E., Simões, R., Queiroz, J., and Jakab, E. (2007). Pyrolysis-GC/MS and TG/MS Study of Mediated Laccase Biodelignification of Eucalyptus Globulus Kraft Pulp. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 78, 233–242. doi:10.1016/j.jaap.2006.07.003
- Overend, R. P., and Chornet, E. (1987). Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 321, 523–536. doi:10.1098/rsta.1987.0029
- Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition. *Bioresour. Tech.* 74, 25–33. doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3
- Pedersen, M., and Meyer, A. S. (2010). Lignocellulose Pretreatment Severity - Relating pH to Biomatrix Opening. *New Biotechnol.* 27, 739–750. doi:10.1016/j.nbt.2010.05.003
- Puls, J. R., Poutanen, K., Körner, H.-U., and Viikari, L. (1985). Biotechnical Utilization of wood Carbohydrates after Steaming Pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 416. doi:10.1007/BF00252783
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., et al. (2010). Production of Butanol (A Biofuel) from Agricultural Residues: Part II - Use of Corn stover and Switchgrass Hydrolysates. *Biomass. Bioenergy* 34, 566–571. doi:10.1016/j.biombioe.2009.12.023
- Ralph, J., Grabber, J. H., and Hatfield, R. D. (1995). Lignin-ferulate Cross-Links in Grasses: Active Incorporation of Ferulate Polysaccharide Esters into Ryegrass Lignins. *Carbohydr. Res.* 275, 167–178. doi:10.1016/0008-6215(95)00237-N
- Rasmussen, H., Mogensen, K. H., Jeppesen, M. D., Sørensen, H. R., and Meyer, A. S. (2016). 4-Hydroxybenzoic Acid from Hydrothermal Pretreatment of Oil palm Empty Fruit Bunches - its Origin and Influence on Biomass Conversion. *Biomass. Bioenergy* 93, 209–216. doi:10.1016/j.biombioe.2016.07.024
- Rasmussen, H., Sørensen, H. R., and Meyer, A. S. (2014). Formation of Degradation Compounds from Lignocellulosic Biomass in the Biorefinery: Sugar Reaction Mechanisms. *Carbohydr. Res.* 385, 45–57. doi:10.1016/j.carres.2013.08.029
- Rinesch, T., Mottweiler, J., Puche, M., Concepción, P., Corma, A., and Bolm, C. (2017). Mechanistic Investigation of the Catalyzed Cleavage for the Lignin  $\beta$ -O-4 Linkage: Implications for Vanillin and Vanillic Acid Formation. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 9818–9825. doi:10.1021/acsschemeng.7b01725
- Romero-García, J. M., Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Moya, M., Ruiz, E., Fernández-Bolaños, J., et al. (2016). Obtaining Sugars and Natural Antioxidants from Olive Leaves by Steam-Explosion. *Food Chem.* 210, 457–465. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.003
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., and Castro, E. (2008). Evaluation of Steam Explosion Pre-treatment for Enzymatic Hydrolysis of sunflower Stalks. *Enzyme Microb. Tech.* 42, 160–166. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.002
- Saake, B., Kruse, T., and Puls, J. (2001). Investigation on Molar Mass, Solubility and Enzymatic Fragmentation of Xylans by Multi-Detected SEC Chromatography. *Bioresour. Tech.* 80, 195–204. doi:10.1016/S0960-8524(01)00089-X
- Salati, S., D'Imporzano, G., Panseri, S., Pasquale, E., and Adani, F. (2014). Degradation of Aflatoxin B1 during Anaerobic Digestion and its Effect on Process Stability. *Int. Biodeterioration Biodegradation* 94, 19–23. doi:10.1016/j.ibiod.2014.06.011
- Schütt, F., Puls, J., and Saake, B. (2011). Optimization of Steam Pretreatment Conditions for Enzymatic Hydrolysis of poplar wood. *Holzforschung* 65. doi:10.1515/hf.2011.066
- Schütt, F., Westereng, B., Horn, S. J., Puls, J., and Saake, B. (2012). Steam Refining as an Alternative to Steam Explosion. *Bioresour. Tech.* 111, 476–481. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.011
- Schwietzke, S., Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N., and Ladisch, M. (2009). "Ethanol Production from Maize," in *Molecular Genetic Approaches To Maize Improvement*. Editors A. L. Kriz and B. A. Larkins (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 347–364.
- Sen, A., Miller, S. S., Arnason, J. T., and Fulcher, R. G. (1991). Quantitative Determination by High Performance Liquid Chromatography and Microspectro-Fluorimetry of Phenolic Acids in maize Grain. *Phytochem. Anal.* 2, 225–229. doi:10.1002/pca.2800020509
- Sharma, S., Kumar, R., Gaur, R., Agrawal, R., Gupta, R. P., Tuli, D. K., et al. (2015). Pilot Scale Study on Steam Explosion and Mass Balance for Higher Sugar Recovery from rice Straw. *Bioresour. Tech.* 175, 350–357. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.112
- Shi, S., Kang, L., and Lee, Y. Y. (2015). Production of Lactic Acid from the Mixture of Softwood Pre-hydrolysate and Paper Mill Sludge by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 2741–2754. doi:10.1007/s12010-014-1451-8
- Srinivasan, S. (2009). The Food V. Fuel Debate: A Nuanced View of Incentive Structures. *Renew. Energ.* 34, 950–954. doi:10.1016/j.renene.2008.08.015
- Strable, J., and Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Cold Spring Harbor Protoc.* 2009, emo132. doi:10.1101/pdb.emo132
- Tengborg, C., Galbe, M., and Zacchi, G. (2001). Reduced Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Softwood. *Enzyme Microb. Tech.* 28, 835–844. doi:10.1016/S0141-0229(01)00342-8



- van der Pol, E. C., Vaessen, E., Weusthuis, R. A., and Eggink, G. (2016). Identifying Inhibitory Effects of Lignocellulosic By-Products on Growth of Lactic Acid Producing Micro-organisms Using a Rapid Small-Scale Screening Method. *Bioresour. Tech.* 209, 297–304. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.037
- Viquez, O. M., Castell-Perez, M. E., and Shelby, R. A. (1996). Occurrence of Fumonisin B1 in Maize Grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2789–2791. doi:10.1021/jf9505638
- Ye, L., Hudari, M. S. B., Li, Z., and Wu, J. C. (2014). Simultaneous Detoxification, Saccharification and Co-fermentation of Oil palm Empty Fruit bunch Hydrolysate for L-Lactic Acid Production by *Bacillus Coagulans* J112. *Biochem. Eng. J.* 83, 16–21. doi:10.1016/j.bej.2013.12.005
- Zhang, Y., Wang, L., and Chen, H. (2013). Formation Kinetics of Potential Fermentation Inhibitors in a Steam Explosion Process of Corn Straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 359–367. doi:10.1007/s12010-012-9961-8

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Krafft, Berger and Saake. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.