

УДК 663.533

ГІДРОЛІЗ КРОХМАЛЮ ТА ЗБРОДЖУВАННЯ ЦУКРІВ АСОЦІАЦІЄЮ
МІКРОБНИХ КУЛЬТУР *ASPERGILLUS AWAMORI* ТА *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE У ВИРОБНИЦТВІ БІОЕТАНОЛУ

Хомічак Л. М., д.т.н, професор,
член-кореспондент НААН, директор,
<https://orcid.org/0000-0001-9003-0315>

Олійнічук О. С., аспірант,
<https://orcid.org/0009-0009-8014-1703>

Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2024-23-20>

Предмет. Особливості технології ферментації крохмалю в біоетанол з використанням асоціації мікробних культур *Aspergillus awamori* та *Saccharomyces cerevisiae*. **Мета.** На основі комплексних досліджень обґрунтувати теоретичні основи підготовки крохмалевмісної сировини до збродження шляхом розроблення ресурсозберігаючої технології одностадійного гідролізу крохмалю в умовах синергічних відносин плісеневого гриба *Aspergillus awamori* та дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. **Методи.** У дослідженнях використано методи та процеси підготовки крохмалевмісної сировини, що є загальноприйнятими у вітчизняному виробництві спирту етилового. **Результати.** Експериментально обґрунтовано технологічний режим одностадійного гідролізу крохмалю та збродження цукрів асоціацією культури міцеліального гриба *Aspergillus awamori* та дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* без внесення позаклітинних ферментів амілолітичного комплексу. Визначено, що для культивування гриба в умовах спиртового виробництва раціональним середовищем слід вважати суміш помелу сировини з водою з гідромодулем 1:3, збагаченої карбамідом в кількості 0,4 г/дм³, ортофосфорною кислотою в кількості 0,13 г/дм³ та кукурудзяним екстрактом в кількості 1 г/дм³. Встановлено, що у змішаній культурі процес оцукрювання і збродження відбувається в одну стадію і практично одночасно, при цьому дріжджі та міцеліальні гриби конкурують за джерело вуглецю. **Сфера застосування результатів.** Запропоновані технологічні рішення зумовляють формування іншого концептуального підходу до розвитку виробництва біоетанолу, підвищення його ефективності за рахунок зменшення витрат на придбання ферментних препаратів.

Ключові слова: крохмалевмісна сировина, ферменти, гідроліз, дріжджі, бродіння, біоетанол

STARCH HYDROLYSIS AND FERMENTATION OF SUGARS
BY THE ASSOCIATION OF *ASPERGILLUS AWAMORI* AND *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE MICROBIAL CULTURES IN BIOETHANOL PRODUCTION

Liubomyr Khomichak, Dr. Sc. (Technology), Professor,
Corresponding Member of NAAS, Director
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0001-9003-0315>

Oleksiy Oliynichuk, graduate student,
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
<https://orcid.org/0009-0009-8014-1703>

Subject. Features of starch fermentation technology into bioethanol using association of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae* microbial cultures. **Purpose.** On the basis of comprehensive research, to substantiate the theoretical foundations of starch-containing raw materials preparing for fermentation by developing a resource-saving technology of starch one-stage hydrolysis in the conditions of synergistic relations between the fungus *Aspergillus awamori* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods.** The methods and processes for the preparation of starch-containing raw materials, which are generally accepted in the domestic production of ethyl alcohol were used in research. **Results.** The technological mode of one-stage hydrolysis of starch and fermentation of sugars by the association of the culture of the mycelial fungus *Aspergillus awamori* and the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae without the introduction of extracellular enzymes of the amylolytic complex was experimentally substantiated. It was determined that a mixture of raw materials` ground with water with a hydromodule of 1:3, enriched with urea in the amount of 0.4 g/dm³, orthophosphoric acid in the amount of 0.13 g/dm³, and corn extract in amount of 1 g/dm³, should be considered as a rational conditions for fungi cultivation. It was established that in a mixed culture the process of saccharification and fermentation occurs in one stage and almost simultaneously, while yeast and mycelial fungi compete for the carbon source. **Scope of results.** The proposed technological solutions will lead to the formation of a different conceptual approach to the bioethanol production development, increasing its efficiency by reducing the cost of purchasing enzyme preparations.

Key words: starch-containing raw materials, enzymes, hydrolysis, yeast, fermentation, bioethanol

Постановка проблеми. В умовах постійно зростаючих потреб суспільства з виробництва біоетанолу, підвищення ефективності використання сільськогосподарської сировини лежить в площині створення ресурсозберігаючих технологій.

Одним з шляхів раціональної організації виробництва біоетанолу з крохмалевмісної сировини є зменшення витрат ферментних препаратів на стадії гідролізу крохмалю до зброджуваних цукрів.

Застосування ферментних препаратів мікробного походження на підприємствах з виробництва біоетанолу дало можливість зменшити витрати паливних ресурсів на підготовку крохмалевмісної сировини до зброджування та зменшити витрати зброджуваних вуглеводів. Разом з тим, така технологія не дає змоги суттєво зменшити собівартість біоетанолу внаслідок того, що ферментні препарати провідних фірм, які використовуються для гідролізу крохмалю, нарівні з їх ефективністю та вигодою, складають значну частку витрат у виробничому процесі. Тому дослідники вишукують нові шляхи зменшення цих витрат, наприклад, запровадження одноступеневої ферментації крохмалю без теплової обробки з використанням амілолітичних властивостей мікроорганізмів.

Одним з напрямків вирішення даної проблеми є селекція нових штамів дріжджів з амілолітичними та бродильними властивостями і розроблення способів безпосереднього зброджування ними крохмалю без водно-теплого оброблення і оцукрювання. Зокрема, одночасне оцукрювання та зброджування крохмалю здійснюється асоціацією культур дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та міцеліального гриба *Aspergillus awamori* без додаткового внесення препаратів амілазної дії.

Базові принципи способів зброджування крохмалю без попереднього воднотеплого оброблення та оцукрювання шляхом симбіотичного вирощування амілолітичних і бродильних мікроорганізмів розкриті у фундаментальних працях багатьох зарубіжних вчених, зокрема Abouzied M. M. та Reddy C. A. [1–3]. Автори порівнювали пряму ферментацію крохмалю в етанол сумісною культурою *Aspergillus niger* та *Saccharomyces cerevisiae*. Одночасним оцукрюванням і зброджуванням займались також Han I. Y. та Steinberg M. P. [4, 5], що досягли 92%-ої конверсії крохмалю. Спеціалістами Індії досліджено процес прямої конверсії (гідролізу) крохмалю в етанол з використанням амілоглюкозидази, внесеної з культурою *Aspergillus niger* та дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за температури 30°C і pH 5,0 з досягненням швидкості утворення етанолу на рівні 1,74 г/дм³ за годину [6].

Досліджували ферментацію негідролізованого крохмалю в спирт спільним культивуванням *Aspergillus* and *Saccharomyces cerevisiae*. За таких умов амілолітична активність, швидкість розчинення крохмалю та вихід спирту значно зростав у порівнянні з монокультурами і становив 96% від теоретично можливого [7].

Мета. Експериментальне обґрунтування підготовки крохмалевмісної сировини до зброджування в контексті підвищення ефективності виробництва біоетанолу шляхом розроблення нової енергозберігаючої одностадійного гідролізу крохмалю до зброджуваних цукрів в умовах синергічних відносин плісеневого гриба *Aspergillus*

awamori та дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для забезпечення необхідного і достатнього рівня синтезу амілолітичних ферментів та зброджування цукрів у виробництві біоетанолу.

Матеріали і методи досліджень. Експерименти проводили в лабораторних умовах за такою схемою: подрібнення зерна з одержанням помелу, 90–100% якого проходить через сито з діаметром отворів 1 мм; приготування суміші помел – вода у співвідношенні 1:3; оцукрення крохмалю та анаеробне зброджування цукрів асоціацією мікроорганізмів з одержанням дозрілої бражки; перегонка бражки та отримання спиртового дистиляту [8].

Кожна серія дослідів проведена не менше, ніж у триразовій повторності. У таблицях та на рисунках відображено середні значення параметрів визначених величин, визначені методами математичної статистики з використанням програми Statistica 7.0. Значення показників, що досліджувалися, використовували у вигляді середнього арифметичного значення M і похибки середнього m . Статистично вагомою вважали різницю значення $p > 0,05$ [9].

Об'єктами досліджень були культуральна рідина, виробничі дріжджі, дозріла бражка.

Як джерело оцукрювальних ферментів використовували культуральну рідину мікроскопічного гриба *Aspergillus awamori*, штам IMBF – 100017, депонованого в колекції промислових мікроорганізмів [10], як продуцент етилового спирту – термотолерантний штам дріжджів раси XII T [11].

Культивування гриба здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) за температури 30°C, рН 6,0–7,0 упродовж 24 годин на оцукреному суслі з кукурудзи, збагаченому азотом, фосфором та кукурудзяним екстрактом [12]. Дріжджі вирощували за режимом технологічного регламенту виробництва бражки із крохмалевмісної сировини [13].

Як сировину використовували зерно кукурудзи з наступними показниками: вміст крохмалю – 60,3%, вміст домішки – 2,0%, вміст води – 14,0%, сума моно- і дицукрів – 1,5%, вміст сухих речовин – 86,0%. Доброякісність сировини становила 70,1%.

З подрібненої кукурудзи з дисперсністю помелу не менше 90%проходу через сито з діаметром отворів 1 мм готували сусло з вмістом сухих речовин і крохмалю – 21,0 і 14,0 г/см³ відповідно.

Гідроліз крохмалю здійснювали асоціацією культур дріжджів і пліснявого гриба. Посівний матеріал гриба *Aspergillus awamori* для одночасного оцукрювання та зброджування крохмалю отримували через вегетативну культуру з наступними показниками: рН культуральної рідини – 3,8 – 4,0; кислотність – 0,5 – 0,4 град.; видимий вміст сухих речовин – 15 – 16; α -амілазна активність – 2,8 – 3,0 од./см³; глюкоамілазна активність – 6,0 – 6,2 од./см³; вміст цукрів – 5,0 – 6,0 г/100 см³. Одержані результати порівнювали з традиційним оцукрюванням комерційними ферментними препаратами з витратами α -амілази – 2 одиниці активності на 1 г крохмалю та глюкоамілази – 6 одиниць на г крохмалю, які використовуються в промислових умовах.

В дослідженнях використовували загальноприйняті методи технохімічного контролю спиртового виробництва: активність α -амілази визначали колориметричним методом за СОУ 15.9 – 37 – 241: 2005 [14], активність глюкоамілази – поляриметричним методом – за СОУ 15.9 – 37 – 241: 2005 [14], кількість виділеного діоксиду вуглецю визначали гравіметрично, загальну кислотність – титруванням, вміст незброджених вуглеводів та нерозчиненого крохмалю – фотоколориметричним методом з антроновим реактивом, вміст етилового спирту в дистиляті – ареометрично.

Результати досліджень. Технологічний процес виробництва біоетанолу з крохмалевмісної сировини базується на трьох окремих, але взаємопов'язаних стадіях: ферментативне розрідження крохмалю α -амілазою з руйнуванням 1,4 – глікозидних зв'язків, ферментативний гідроліз глюкоамілазою 1,6 – глікозидних зв'язків з утворенням зброджуваних вуглеводів та їх зброджування.

Ефективність біоконверсії крохмалю в етанол залежить від раціональних режимів на кожній технологічній стадії, але визначальною є стадія гідролізу крохмалю до зброджуваних вуглеводів з використанням позаклітинних ферментів. Цей процес гальмується як продуктами гідролізу, так і надлишком зброджуваних вуглеводів в середовищі.

Сучасні наукові надбання дають змогу змінити реалізацію класичних гідролітичних процесів крохмалю шляхом створення біотехнології трансформації полісахаридів безпосередньо мікробіологічними культурами-продуцентами ферментних систем.

На першому етапі досліджено взаємодію мікроорганізмів в асоціації, яка складається з двох штамів – продуцента ферментів амілолітичної дії *Aspergillus awamori* та дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, в умовах одночасного гідролізу крохмалю та зброджування вуглеводів в етиловий спирт. Для цього встановлено вплив складу живильного середовища та умов культивування гриба в процесі виробництва спирту на синтез ферментів (табл. 1).

Таблиця 1

**Вплив мінерального та органічного живлення на синтез ферментів грибом
*Aspergillus awamori***

Види живлення, що додаються в сусло	Показники ферментної активності, од./см ³	
	α -амілазна	Глюкоамілазна
Без джерел азоту та фосфору (контроль)	1,5	7,7
Кукурудзяний екстракт, 4 г/дм ³	3,7	8,2
Карбамід – 0,4 г/дм ³ Кислота ортофосфорна – 0,13 г/дм ³	3,7	10,9
Карбамід – 0,4 г/дм ³ Кислота ортофосфорна – 0,13 г/дм ³ Кукурудзяний екстракт – 1 г/дм ³	3,8	12,0

Як видно з даних таблиці 1, вирощування гриба на суміші кукурудзи з водою без внесення азоту та фосфору негативно впливає на активність ферментів в культуральній рідині. Внесення в середовище кукурудзяного екстракту, як органічного джерела поживних речовин сприяло зростанню амілолітичної активності, зокрема α -амілазної – на 146,7%, а глюкоамілазної – на 6,49%вище контрольних значень. Застосування неорганічних сполук як джерела азоту та фосфору сприяють зростанню показника α -амілазної активності на таку ж величину, як і у варіанті з органічним джерелом елементів живлення, накопичення ж глюкоамілази в цьому варіанті є вищим на 41,56%відносно контролю.

Згідно з результатами дослідів, оптимальним є застосування комбінованого (органічного та неорганічного) джерела живлення. За таких умов встановлено зростання α -амілазної активності на 153,33% та глюкоамілазної активності – на 55,84%відносно контрольних значень.

Таким чином, за даними проведеного етапу досліджень визначено, що для культивування гриба *Aspergillus awamori* штаму IMBF – 100017 в умовах спиртового виробництва на неощукреному середовищі його необхідно збагачувати карбамідом в кількості 0,4 г/дм³, кислота ортофосфорною в кількості 0,13 г/дм³ та кукурудзяним екстрактом в кількості 4 г/дм³. За таких умов досягається синтез амілолітичних ферментів при культивуванні *Aspergillus awamori* штаму IMBF – 100017, що забезпечує необхідний рівень гідролізу крохмалю та виходу етилового спирту.

Методом математичного планування експерименту з використанням ортогональних багаторівневих планів оптимізовано склад середовища для культивування гриба *Aspergillus awamori* штаму IMBF – 100017. Вхідними факторами були вибрані: крохмалевмісна сировина як джерело вуглецю з діапазоном виміру $170 \leq x_1 \leq 200$ г/дм³, ортофосфорна кислота як джерело фосфору з діапазоном виміру $0,05 \leq x_2 \leq 0,3$ г/дм³,

кукурудзяний екстракт як джерело ростових речовин з діапазоном виміру $0 \leq x_3 \leq 6$ г/дм³. Кількість внесеного в середовище карбаміду залишалась на одному рівні в усіх варіантах дослідів. Діапазон вимірів для джерел живлення добирали так, щоб рівні кожного з факторів знаходились в лімітуючій зоні. За критерії оптимізації було прийнято кількість синтезованої глюкоамілази на 24-у годину культивування.

Після реалізації дослідів, відповідно до матриці планування трьохфакторного експерименту, розрахунків коефіцієнтів пошукової моделі та оцінки їх значимості за Стюдентом отримано рівняння регресії, яке описує процес, що досліджується:

$$Y = 2,55 \cdot x_1 + 0,39 \cdot x_2 - 0,43 \cdot x_3 - 0,07 \cdot x_1^2 + 0,23 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,03 \cdot x_1 \cdot x_3 - 1,31 \cdot x_2^2 + 0,08 \cdot x_2 \cdot x_3 + 0,08 \cdot x_3^2 - 9,10$$

Всі змінні мають формалізовані значення, що дає змогу порівняти їх вплив у діапазоні розглядання. Максимальна активність глюкоамілази досягається за такого співвідношення компонентів середовища:

- вміст крохмалю – 175 г/дм³,
- кількість ортофосфорної кислоти – 0,13 г/дм³,
- кількість кукурудзяного екстракту - 4 г/дм³,
- кількість карбаміду – 0,4 г/дм³.

За вибраними режимами культивування дріжджів та посівного матеріалу гриба провели дослідження одночасного оцукрювання і зброджування крохмалевмісної сировини у порівнянні з технологічним режимом з використанням комерційних ферментних препаратів.

Технологічні показники спиртових бражок наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Технологічні показники спиртових бражок, одержаних за одночасного використання двох культур мікроорганізмів

Показник	Значення	
	Комерційні ферментні препарати (контроль)	Асоціація культур
рН середовища, од.	4,9	4,8
Кислотність, град.	0,37	0,39
Видимий вміст сухих речовин, %	-0,2	-0,6
Дійсний вміст сухих речовин, %	2,6	2,8
Вміст спирту, %об.	9,70	9,60
Кількість загальних незброджених цукрів, г/100 см ³	0,31	0,42
Кількість водорозчинних незброджених цукрів, г/100 см ³	0,25	0,40
Кількість нерозчиненого крохмалю, г/100 см ³	0,06	0,02
Вміст гліцерину, г/100 см ³	0,84	0,66
Вихід спирту, дал/ т крохмалю	66,6	66,8

При одночасному оцукрюванні та зброджуванні крохмалю асоціацією культур спостерігалось підвищення кількості незброджених цукрів у порівнянні з контролем. Так, вміст загальних цукрів у контрольному варіанті становив 0,31 г/100 см³, тоді як за зброджування асоціацією мікроорганізмів – 0,42 г/100 см³. Кількість нерозчиненого крохмалю ж за зброджування асоціацією є нижчою і складає 0,02 г/100 см³ проти 0,06 г/100 см³ в контрольному варіанті.

Втрати з незбродженими цукрами, у відсотках до введеного крохмалю, становлять 2,64% за використання комерційних ферментних препаратів та 2,76% в умовах змішаної культури, що є задовільним технологічним показником. Крім того, відзначено зниження вмісту гліцерину на 21,5% в зрілій бражці за застосування змішаної культури проти контрольного варіанту.

За таких умов вихід спирту не зменшується у порівнянні з аналогічним процесом, загальноприйнятим у вітчизняній спиртовій промисловості на даний момент. Можливо, це пов'язано з проявом синергізму фізіологічних функцій як дріжджів, так і гриба, за їх спільної життєдіяльності, які відсутні у цих мікроорганізмів за культивування в монокультурі. Зокрема, життєдіяльність *Aspergillus awamori* в умовах спиртового бродіння гальмується продуктами обміну дріжджів і сприяє утворенню грибного автолізу, який позитивно впливає на біохімічну активність та метаболічну спрямованість дріжджової культури.

Висновки. Однією з можливостей розвитку технології спирту з крохмалевмісної сировини є зменшення вартості ферментних препаратів, які застосовуються за підготовки сировини до зброджування.

Експериментально обґрунтовано спосіб оцукрювання крохмалевмісної сировини за підготовки її до зброджування шляхом культивування гриба *Aspergillus awamori* та суміщення синтезу ферментів зі зброджуванням з використанням *Saccharomyces cerevisiae* в одній стадії.

Визначено, що для культивування гриба в умовах спиртового виробництва раціональним середовищем для отримання гідролітичних ферментів слід вважати суміш помелу сировини з водою з гідромодулем 1:3, збагаченої карбамідом в кількості 0,4 г/дм³, ортофосфорною кислотою в кількості 0,13 г/дм³ та кукурудзяним екстрактом в кількості 1 г/дм³.

Встановлено, що у змішаній культурі процес оцукрювання і зброджування відбувається в одну стадію і практично одночасно, при цьому дріжджі та міцеліальні гриби конкурують за джерело вуглецю.

Бібліографія

1. Abouzied M. M., Reddy C. A. Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986. Vol. 52. P. 1055–1059.
2. Cripwell R. A., Rose S.H., Favaro L., Zyl W.H. Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch. *Biotechnology for Biofuels*. 2019. 12: 201 <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1541-5>.
3. Schaunitz R., Victor M. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnology and bioengineering*. 2015, 112 (9). <https://doi.org/10.1002/bit.25591>.
4. Sharma S., Pandey M., Saharan B. S. Fermentation of starch to ethanol by an amylolytic yeast *Saccharomyces diastaticus* SM-10. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2002, 40(3):325-8.
5. Cripwell R. Consolidated bioprocessing of raw starch with *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing fungal alpha-amylase and glucoamylase combinations. *FEMS Yeast Research*. 2018. 30(2), P. 225–232. <https://doi.org/10.1002/bit.260300212>.
6. Gronchi N., Favaro L., Cagnin L., Brojanigo S., Pizzocchero V., Basaglia M., Casella S. Novel Yeast Strains for the Efficient Saccharification and Fermentation of Starchy By-Products to Bioethanol. *Energies* 2019, 12(4), 714; <https://doi.org/10.3390/en12040714>.
7. Viktor M. J., Rose S. H., van Zyl W. H., Viljoen-Bloom M. Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1):167. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-167>.
8. Маринченко В. О., Домарецький В. А., Шиян П. Л., Швець В. М., Циганков П. С., Жолднер І. Д. Технологія спирту: навч. посіб. / за ред. проф. В. О. Маринченка. Вінниця: Поділля – 2000, 2003. 496 с.
9. Аністратенко В. О., Федоров В. Г. Математичне планування експериментів в АПК: навч. посібник / за ред. В. О. Аністратенко. Київ : Вища шк., 1993. 375 с.
10. Штам пліснявих грибів *Aspergillus awamori* IMBF 100017 – продуцент амілолітичних ферментів: пат. 47822А Україна. № 200196648; заявл. 28.09.2001; опубл. 15.07.2002, Бюл. № 7. 4 с.

11. Штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* хіі-т для мікробіологічного синтезу спирту з крохмалевмісної сировини МПК C12N 1/16, C12N 1/18, C12P 7/06, C12R 1/865: пат. 36477A Україна. №99127030; заявл. 23.12.1999; опубл. 16.04.2001, Бюл. № 3. 2с.

12. Промисловий регламент виробництва амілоглюкоаваморину Fx – 466. Київ:1972. С. 3.

13. Технологічний регламент виробництва етилового спирту з крохмалевмісної сировини: ТРУ 18.8049. 2000: затв. Держагропромом України 25.10.2000: Введено в дію з 01.12.2000. Київ: 2000. 143 с.

14. СОУ 15.9 – 37 – 241: 2005. Препарати ферментні для спиртового виробництва. Методи визначання амілолітичної активності. Вид. офіц. Київ: Міністерство аграрної політики України, 2006. 26 с.

References

1. Abouzied M. M., Reddy C. A. (1986). Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 52. P. 1055–1059.

2. Cripwell R. A., Rose S. H., Favaro L., Zyl W. H. (2019). Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch. *Biotechnology for Biofuels*, 12: 201. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1541-5>.

3. Schaunitz R., Victor M. (2015). Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnology and bioengineering*, 112 (9). <https://doi.org/10.1002/bit.25591>.

4. Sharma S., Pandey M., Saharan B. S. (2002). Fermentation of starch to ethanol by an amylolytic yeast *Saccharomyces diastaticus* SM-10. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(3):325-8.

5. Cripwell R. (2018). Consolidated bioprocessing of raw starch with *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing fungal alpha-amylase and glucoamylase combinations. *FEMS Yeast Research*, 30 (2), P. 225–232. <https://doi.org/10.1002/bit.260300212>.

6. Gronchi N., Favaro L., Cagnin L., Brojanigo S., Pizzocchero V., Basaglia M., Casella S. (2019). Novel Yeast Strains for the Efficient Saccharification and Fermentation of Starchy By-Products to Bioethanol. *Energies*, 12(4):714. <https://doi.org/10.3390/en12040714>.

7. Viktor M. J., Rose S. H., van Zyl W. H., Viljoen-Bloom M. (2013). Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1):167. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-167>.

8. Marynchenko V. O., Domaretskyi V. A., Shyian P. L., Shvets V.M., Tsyhankov P. S., Zholdner I. D. (2003). *Tekhnolohiia spyrtu [Alcohol technology]: navch. posib. / by ed. prof. V. O. Marynchenka. Vinnytsia: Podillia – 2000 [Podillia – 2000]. 496 p. [in Ukrainian]*.

9. Anistratenko V. O., Fedorov V. H. (1993)/ *Matematychnе planuvannia eksperymentiv v APK [Mathematical planning of experiments in agriculture]: navch. posibnyk / by ed. V. O. Anistratenko. Kyiv: Vyshcha shk. [Higher school] 375 p. [in Ukrainian]*.

10. Shtam plisniavykh hrybiv *Aspergillus awamori* IMBF 100017 – produtsent amilolitychnykh fermentiv [*Aspergillus awamori* strain IMBF 100017 – producer of amylolytic enzymes]: пат. 47822A Ukraina. № 200196648; zaiavl. 28.09.2001; opubl. 15.07.2002, Biul. № 7. 4 p. [in Ukrainian].

11. Shtam drizhdzhiv *Saccharomyces cerevisiae* хіі-т для мікробіологічного синтезу спирту з крохмалевмісної сировини МПК C12N 1/16, C12N 1/18, C12P 7/06, C12R 1/865 [Yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* hii-t for microbiological synthesis of alcohol from starch-containing raw materials IPC C12N 1/16, C12N 1/18, C12P 7/06, C12R 1/865]: пат. 36477A Ukraina. №99127030; zaiavl. 23.12.1999; opubl. 16.04.2001, Biul. № 3. 2 p. [in Ukrainian].

12. Promyslovyyi rehlement vyrobnytstva amilohliukoavamorynu Fx–466 (1972). [Industrial regulations for the production of amyloglucoavamorin Fx–466]. Kyiv. P. 3. [in Ukrainian].

13. Tekhnolohichni rehlement vyrobnytstva etylovoho spyrtu z krokhmalevmisnoi syrovyny (2000). [Technological regulations for the production of ethyl alcohol from starch-containing raw materials]: ТРУ 18.8049. 2000: Затв. Derzhahropromom Ukrainy 25.10.2000: Vvedeno v diiu z 01.12.2000. Kyiv. 143 p. [in Ukrainian].

14. SOU 15.9 – 37 – 241: 2005 (2006). Preparaty fermentni dla spyrtovoho vyrobnytstva. Metody vyznachannia amilolitychnoi aktyvnosti [Enzyme preparations for alcohol production. Methods of determining amylolytic activity]. Vyd. ofits. Ministerstvo ahrarnoi polityky Ukrainy [Ministry of Agrarian Policy of Ukraine]. Kyiv. 26 p. [in Ukrainian].