

УДК 663.5, 662.7

АНАЛІЗ СПОСОБІВ ЗБРОДЖУВАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОЕТАНОЛУ (ОГЛЯД)

Хомічак В. Л., с.н.с відділу технологій продуктів бродіння,
<https://orcid.org/0009-0002-0593-9757>

Кузнєцова І. В., с.н.с., д.с.-г.н.,
завідувачка відділу технології цукру, цукропродуктів та інгредієнтів,
<https://orcid.org/0000-0001-8530-2099>

Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2025-24-20>

Предмет. Зерно кукурудзи. Дослідження способів збродження зернової сировини для виробництва біоетанолу. **Мета.** Аналіз способів збродження для виробництва біоетанолу. **Методи.** Аналітичний. **Результати.** Ринок виробництва біоетанолу стрімко зростає з переробкою цукро-, крохмале- та лігніновмісної сировини, а також вторинних продуктів виробництва харчових продуктів і напоїв. Застосування нових гібридів кукурудзи технологічно впливає на корегування режиму отримання біоетанолу, знижуючи ресурсовитрати та підвищуючи вихід біоетанолу. Це сприяє розробці економічно ефективних технологій виробництва біоетанолу, що є пріоритетним напрямом розвитку енергетичного сектору країни. Нині для виробництва біоетанолу шляхом збродження вуглеводів вільними дріжджовими клітинами застосовуються способи: періодичний, безперервний, періодичний з підживленням. При застосуванні періодичного способу збродження виникає ряд технологічних питань, таких як використання вільних клітин для збродження, інгібування субстрату та продукту, недосконалість процесів підготовки інокуляту та очищення реактора між партіями, що призводить до збільшення тривалості процесу. Таким чином, зусилля досліджень зосереджені на покращенні умов проведення процесу збродження для підвищення виробництва біоетанолу та ефективності реакторів в напрямі застосування безпервності процесу. За безпервного способу збродження субстрат додається з відносно постійною швидкістю або через часті проміжки часу, тоді як еквівалентні обсяги ферменту видаляються, підтримуючи постійний об'єм. При цьому ферментатори безпервної дії можуть працювати без перерви протягом тижнів або місяців, що прийнятно для промислового виробництва. Застосування безпервності збродження також сприяє збільшенню вмісту сухих речовин сусла. **Сфера застосування результатів.** Спиртова галузь.

Ключові слова: біоетанол, зерно кукурудзи, ферментативний гідроліз, збродження, сусло

ANALYSIS OF FERMENTATION METHODS FOR BIOETHANOL PRODUCTION (REVIEW)

Volodymyr Khomichak, Senior Researcher
of Department of Technologies of Fermentation Products
<https://orcid.org/0009-0002-0593-9757>

Inha Kuznietsova, D-r of Sciences, Senior Researcher,
Head Department of Sugar Technology, Sugar Products and Ingredients
<https://orcid.org/0000-0001-8530-2099>
Institute of Food Resources NAAN, Kyiv, Ukraine

Subject. Corn grain. Research into methods of fermenting grain raw materials for bioethanol production. **Purpose.** Analysis of fermentation methods for bioethanol production. **Methods.** Analytical. **Results.** The bioethanol production market is growing rapidly with the processing of sugar-, starch- and lignin-containing raw materials, as well as secondary products of food and beverage production. The use of new corn hybrids technologically affects the adjustment of the bioethanol production regime, reducing resource consumption and increasing the yield of bioethanol. This contributes to the development of cost-effective technologies for bioethanol production, which is a priority area for the development of the country's energy sector. Currently, the following methods used for the production of bioethanol by fermenting carbohydrates with free yeast cells: batch, continuous, batch with feeding. When using the batch fermentation method, a number of technological issues arise, such as the use of free cells for fermentation, inhibition of the substrate and product, imperfection of the inoculum preparation processes and cleaning of the reactor between batches, which leads to an increase in the duration of the process. Therefore, research efforts focused on improving the fermentation conditions to increase bioethanol production and reactor efficiency in the direction of using batch fermentation. In batch fermentation, the substrate added at a relatively constant rate or at frequent intervals, while equivalent amounts of enzyme removed, maintaining a constant volume. In this case, continuous fermenters can operate without interruption for weeks or months, which is acceptable for industrial production. The use of batch

*fermentation also contributes to an increased dry matter content of the wort. **Scope of results.** Alcoholic industry.*

Key words: bioethanol, corn grain, enzymatic hydrolysis, fermentation, wort

Постановка проблеми. Світове виробництво біоетанолу (2016 р) становило 100,2 мільярдів літрів [1]. Щорічне його виробництво постійно зростає і в 2024 р становило близько 134,5 мільярдів літрів [2], при чому дві третини припадатимуть на Бразилію. Нині, США та Бразилія є двома основними виробниками, після них країни Європейського Союзу та Китай [2]. Близько 40% світового виробництва біоетанолу виробляється з цукрової тростини та цукрового буряка, і майже 60% – з крохмалевмісної сировини [3].

У країнах Європи відновлюваною сировиною для виробництва біоетанолу є зернові культури (переважно пшениця) та цукровий буряк [4]. У Франції його також виробляють з надлишків вина [5]. Ціни на сировину мають значний вплив на собівартість виробництва та можуть становити 40–75% від загальних витрат залежно від типу сировини [6]. Собівартість виробництва з цукрової тростини в Бразилії коливається в діапазоні 0,20–0,30 дол. США/л. У США та країнах Європейського Союзу собівартість біоетанолу, виробленого з цукрового буряка та кукурудзи, становить 0,30 та 0,53 дол. США/л, відповідно. Витрати на виробництво в Китаї (з пшениці, цукрового сорго або касави) становлять 0,28–0,46 дол. США/л залежно від вартості сировини. Вартість виробництва біоетанолу з цукровмісної сировини в Індії становить близько 0,44 дол. США/л, тоді як з лігноцелюлозомісної сировини – 0,80–1,20 дол. США/л [7, 8]. Вартість виробництва біоетанолу може бути частково компенсована завдяки скороченню викидів парникових газів, забезпеченню безпеки енергопостачання та стимулюванню сільськогосподарської діяльності в сільських регіонах [7, 9].

Різні види біомаси мають певний вуглеводний хімічний склад [10], тобто джерела вуглеводів, які поділяють на групи:

- цукровмісна сировина: цукровий буряк, цукрова тростина, меляса, цукрове сорго;
- крохмалевмісна сировина: зернові (кукурудза, пшениця, тощо) і коренеплоди культури (картопля, батат, тощо);
- лігноцелюлозна біомаса: солома, сільськогосподарські відходи, рослинні та деревні залишки.

Зернові культури (наприклад, кукурудза, ячмінь, пшениця або зернове сорго) та коренеплоди/трубчасті культури (наприклад, маніок, картопля, батат, топінамбур, кактус або маранта) містять велику кількість крохмалю [11]. Вихід біоетанолу з різних видів сировини становить [12, 13], л/тонни: цукрова тростина – 70, цукровий буряк – 110, висококрохмалиста картопля – 125, картопля – 110, маніока – 180, кукурудза – 360, рис – 430, ячмінь – 250, пшениця – 340, цукрове сорго – 60, багаса та інша целюлозна біомаса – 280. Однією з основних проблем виробництва біоетанолу є доступність сировини, яка залежить від сезонності та географічного походження. Ціна на сировину суттєво впливає на собівартість виробництва біоетанолу, оскільки вона зазвичай становить понад третину виробничих витрат. Вторинний продукт, що утворюється під час виокремлення крохмалю містить білки та клітковину, що застосовується у виробництві харчових продуктів та кормів [14]. Найбільше виробництво кукурудзяного крохмалю здійснюється в США, і становить понад 80% світового ринку [11, 15, 16].

Дослідницька програма, що фінансується в країнах ЄС (програма LAMNET), досліджувала можливість поєднання відходів кількох сільськогосподарських культур для використання у виробництві біоетанолу. У результаті досліджень показано, що цукрове сорго є дуже корисною рослиною, оскільки всю рослину можна використовувати без залишення відходів. Крім того, біоетанол, вироблений з цукрової тростини, є привабливою пропозицією [17]. Порівняння виходу біоетанолу, отриманого з різних енергетичних культур, представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Вихід біоетанолу з різних культур

№ з/п	Сировина	Вихід цукру або крохмалю, %	Вихід біоетанолу, %	Вихід біоетанолу, кг/га/рік
1	Цукрова тростина	12,5	70	4900
2	Маніока	25	150	6000
3	Цукрове сорго	14	80	2800
4	Кукурудза	69	410	2050
5	Пшениця	66	390	1560

Джерело [17]

У США кукурудза є джерелом понад 95% виробництва біоетанолу, а решта виробляється з ячменю, пшениці, сироватки та залишків напоїв [18]. Регіони вирощування зернового сорго в США виявляють зацікавлення до виробництва біоетанолу з цієї культури. Крім того, також досліджувалася економічна доцільність виробництва біоетанолу з маніоки в Таїланді [15]. Бульби каваї містять майже 80% крохмалю за масою та менше 1,5% білків за масою. Попередня обробка бульб каваї для виробництва біоетанолу включає такі операції: очищення, лущення, подрібнення та сушіння. Після цього висушена стружка каваї використовується для виробництва біоетанолу [15]. Крохмаль являє собою суміш лінійних (амілоза) та розгалужених (амілопектин) поліглюканів. Ключовим ферментом для гідролізу крохмалю є α -амілаза, активна на α -1,4-але не на α -1,6- зв'язки в амیلлопектині [19]. Для виробництва біоетанолу з крохмалевмісної сировини необхідно провести гідроліз крохмалю (α -амілазою та глюкоамілазою) і зброжування вуглеводів на етанол дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* [20]. В анаеробних умовах дріжджі *S. cerevisiae* метаболізують глюкозу в етанол. Максимальна ефективність перетворення глюкози в етанол становить 51% за масою. Однак дріжджі також використовують глюкозу для росту клітин та синтезу інших продуктів метаболізму, що знижує максимальну ефективність перетворення. На практиці від 40 до 48% за масою глюкози фактично перетворюється на етанол [21]. На відміну від переробки крохмале- та лігніновмісної сировини на біоетанол, краще проходить зброжування вуглеводів цукровмісної сировини [22], оскільки попередній гідроліз сировини не потрібен, а сам дисахарид може бути розщеплений дріжджовими клітинами. Крім того, кондиціонування соку цукрової тростини або меляси сприяє гідролізу сахарози [23].

Таким чином, розробка економічно ефективних технологій виробництва паливного етанолу є пріоритетним напрямом розвитку енергетичного сектору країни, що забезпечить енергонезалежність конкурентоспроможною паливною продукцією вітчизняного ринку.

Об'єкт досліджень: дослідження способів зброжування зернової сировини для виробництва біоетанолу.

Предмет досліджень: зерно кукурудзи.

Метою роботи є аналіз способів зброжування для виробництва біоетанолу.

Результати та обговорення. У виробництві біоетанолу шляхом зброжування вуглеводів вільними дріжджовими клітинами застосовуються періодичні, багаторазові, періодичні з підживленням та безперервні процеси [24–26]. Однак недоліками використання вільних клітин для етанольної ферментації є інгібування субстрату та продукту [27], недосконалість процесів підготовки інокуляту та очищення реактора між партіями, що призводить до збільшення тривалості процесу. Для промислового виробництва окремих продуктів метаболізму, синтезованих переважно протягом певної фази росту колонії, ідеально підходить безперервне зброжування. За безперервного зброжування субстрат додається з відносно постійною швидкістю або через часті проміжки часу, тоді як еквівалентні обсяги ферменту видаляються, підтримуючи постійний об'єм. Ферментатори безперервної дії можуть працювати без перерви протягом

тижнів або місяців. За таких умов підтримується колонія на фазі, де синтез бажаного продукту метаболізму знаходиться на оптимальному рівні, а результатом є вища економічна ефективність. Такі мови прийнятні для зброджування зернового сусла, особливо для виробництва біоетанолу.

Проектування та розробка систем безперервного зброджування дозволили впровадити більш економічно ефективні процеси. Безперервні процеси мають ряд переваг порівняно з традиційними періодичними процесами, головним чином завдяки зниженим витратам на будівництво біореакторів, меншим вимогам до обслуговування та експлуатації, кращому контролю процесу та вищій продуктивності. Саме з цих причин 30% виробничих потужностей біоетанолу в Бразилії використовують процеси безперервної ферментації [28]. Більшість цих переваг зумовлені високою концентрацією клітин, що спостерігається в цих процесах.

Сучасні зусилля зосереджені на покращенні умов проведення процесу зброджування для підвищення виробництва біоетанолу та ефективності реакторів. Конверсія біоетанолу може відбуватися за режимами: одночасне оцукрювання та зброджування (SSF), окреме оцукрювання та зброджування (SHF), одночасне оцукрювання та коферментація (SSCF) та консолідована біообробка (CBP). Режими роботи можна порівняти, а основу для вибору SSF оцінюють відповідно до економічності процесу та отриманих результатів щодо якості біоетанолу, його виходу та продуктивності. SSF має експлуатаційний потенціал, а інтеграція в процес дозволяє знизити виробничі витрати за рахунок скорочення часу ферментації, наприклад, до 4 години (SHF) з меншим споживанням енергії оскільки процеси відбуваються лише в одному біореакторі. Однак проблемним питанням даного процесу є одночасне додавання ферментів та дріжджів, які діють за різних значень pH та температур [29, 30]. Процес одночасного оцукрювання та ферментації (SSF) був визначений як економічно вигідний для перетворення цих субстратів на продукти ферментації [31].

Необхідно відмітити, що дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* не можуть використовувати крохмалисті матеріали, необхідно додавати велику кількість амілолітичних ферментів. Крім того, крохмалевмісну сировину потрібно термічно обробляти за високої температури (37–77°C) для отримання високого виходу біоетанолу [32]. Дослідження двостадійного ферментативного гідролізу кукурудзяного борошна [33] за допомогою α -амілази і глюкоамілази та подальшого зброджування отриманих гідролізатів дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* показали, що за таких умов досягається вихід біоетанолу понад 80% після 4 годин реакції за нижчої температури.

За останні кілька десятиліть було досліджено процес зброджування крохмалевмісної сировини, а впровадження результатів сприяло підвищенню виходу етанолу та прибутковості процесу сухого подрібнення, включаючи модифікації виробничого процесу [34], отримання побічних продуктів [35, 36], використання сучасних ферментних препаратів [36, 37] та використання високоврожайних сортів кукурудзи [38]. Нові гібриди кукурудзи, селекційовані за трансгенною технологією – амілазна кукурудза, виробляє ендогенну α -амілазу в ендоспермі, яка активується за високої температури та вологості [39, 40]. Завдяки високому рівню експресії ферментів, потрібно невелику кількість кукурудзи змішувати зі звичайною зубоподібною кукурудзою. Використання амілазної суміші кукурудзи під час процесу сухого подрібнення може усунути необхідність зовнішнього додавання екзогенної α -амілази. Так само, нові штучно створені дріжджі, які називають «вищекласними дріжджами», є вдосконалим штамом *Saccharomyces cerevisiae*, який експресує ендогенні глюкоамілази та забезпечує нові метаболічні шляхи для отримання високого виходу етанолу шляхом зменшення виробництва гліцерину. Використання цих дріжджів може усунути або зменшити додавання дорогих ферментів глюкоамілази під час процесу SSF, потенційно підвищуючи ефективність процесу та знижуючи загальну вартість виробництва етанолу.

Дослідження [41] щодо зброджування амілазної кукурудзи з використанням звичайних дріжджів без додавання екзогенної α -амілази призвело до концентрації етанолу на 4,1% вищої порівняно з зброджуванням зерна звичайної кукурудзи з використанням екзогенної α -амілази. Звичайна кукурудза, оброблена екзогенною α -амілазою та вищими дріжджами (що продукують глюкоамілазу) без додавання екзогенної глюкоамілази, призвело до концентрації етанолу, подібної до звичайно кукурудзи за умов застосування звичайних дріжджів з додаванням екзогенної глюкоамілази. Комбінація амілазною кукурудзи та вищих дріжджів вимагала лише 25% рекомендованої дози глюкоамілази для завершення ферментації та досягнення концентрації етанолу і виходу. Використання вищих дріжджів з додаванням 50% ГА призвело до подібного збільшення виходу етанолу для звичайної або амілазної кукурудзи приблизно на 7%. Поєднання амілази кукурудзи, високоякісних дріжджів та видалення етанолу сприяло інтенсифікації процесу зброджування суслу з сухими речовинами 40% і лише 50% потреби в екзогенних ферментах ГА та на 64,6% вищим виходом етанолу порівняно з традиційним процесом. Отже, використання амілазної кукурудзи та високоякісних дріжджів у промисловості на переробці сухого помелу може зменшити загальне використання зовнішніх ферментів більш ніж на 80%, а поєднання їх використання з видаленням етанолу під час ферментації забезпечує ефективне зброджування з високим вмістом сухих речовин.

Зростання масової частки сухих речовин під час процесу сухого подрібнення може бути ще одним підходом до зниження собівартості біоетанолу. Використання суспензій з високим вмістом сухих речовин у процесі сухого подрібнення може зменшити споживання енергії та вартість процесу, зменшуючи навантаження на подальшу обробку етанолу та відновлення побічних продуктів, а також зменшуючи кількість задіяного технологічного обладнання. Однак, збільшення сухих речовин під час процесу виробництва етанолу обмежене до 30–32% мас./мас. через високу в'язкість та стрес дріжджів на високу концентрацію глюкози та етанолу [42–44]. Високі сухі речовини можуть призвести до вищої концентрації етанолу; але водночас, спостерігається низький вихід етанолу через сильне інгібування етанолом [45]. Видалення етанолу під вакуумом під час процесу SSF є одним із потенційних підходів до зменшення інгібування та досягнення високого вмісту сухих речовин [46]. Завдяки застосуванню вакууму, етанол можна випаровувати за нормальної температури ферментації, не впливаючи на активність дріжджів. Існує припущення, що ефективність зброджування можна значно покращити, застосовуючи лише кілька циклів вакууму [42, 43, 46].

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, завдяки власній стійкості (низький pH та високій толерантності до етанолу), найчастіше використовуються в промисловому зброджуванні, незважаючи на те, що бактерія *Zyotomonas mobilis* має кращу питому продуктивність по етанолу.

Біоетанол виробляють з кукурудзяної сировини способом сухого (67%) або мокрого помелу (33%). Обидва способи ґрунтуються на використанні дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Schizosaccharomyces pombe* та *Kluyveromyces sp.*), які здатні метаболізувати гідролізати крохмалю сировини [15]. Близько 38% (137,1 мільйона тонн) загального обсягу виробництва кукурудзи у Сполучених Штатах використовують для отримання біоетанолу способом сухого подрібнення. Очищену кукурудзу подрібнюють для зменшення розміру частинок та змішують з технологічною водою для утворення затору із заданим вмістом сухих речовин [15]. Затор варять у струменевому варильному апараті при температурі 80–90°C впродовж 15–20 хвилин. Додають α -амілазу (відносно невелику кількість) для підтримки розрідження. Додаткову α -амілазу додають під час вторинного розрідження, яке відбувається впродовж 90 хвилин при 95°C. Після цього затор охолоджують до 60°C та додають глюкоамілазу для гідролізу крохмалю на цукри, які можуть бути далі метаболізовані до етанолу дріжджами. Оцукрювання та ферментація часто відбуваються одночасно (SSF), таким чином

знижуючи рівень ферментів та пригнічення дріжджових клітин етанолом або субстратами до мінімуму. Біопроцес зазвичай відбувається при $\text{pH}=4,8\text{--}5,0$ та 30°C впродовж 48 годин [14]. Потім ферментований затор переганяють для отримання етанолу 95% за об'ємом. Дегідратація етанолу 95% за об'ємом вимагає молекулярних сит, щоб отримати етанол 99,5% за об'ємом. Центрифугування залишків ферментації (цільної барди) дає вологий осад, який необхідно висушити для отримання висушеної барди (DDG). Барда – це рідка частина центрифугування, яку необхідно випарувати для отримання сиропу. Потім сироп змішують з DDG для утворення висушеної барди з розчинними речовинами (DDGS). Залишкову частину розрідженої барди часто переробляють як технологічну воду [15].

Було введено кілька модифікацій процесу сухого подрібнення, щоб вилучити зародки кукурудзи [48]. Процес мокрого подрібнення дає побічні продукти з доданою вартістю (наприклад, клітковину, зародок, крохмаль та глютен), що підвищує економічну та енергетичну ефективність [49]. Процес мокрого подрібнення потребує чистої, замоченої та знежиреної кукурудзи для отримання зародків для екстракції кукурудзяної олії. Після цього кукурудзу дефібрують для отримання волокон, а також відокремлюють глютен та крохмаль. Наступні етапи виробництва біоетанолу такі, як і в процесі сухого подрібнення: оцукрювання, зброджування, дистиляція та дегідратація етанолу [48]. Вихід етанолу на 1 кг кукурудзи в процесі сухого подрібнення становить 0,3235, а в процесі мокрого подрібнення – 0,2919 [50]. Серед процесів SSF та SHF (розділені гідроліз та зброджування), які зазвичай використовуються для виробництва біоетанолу, з крохмалевмісної сировини. Також застосовується технологія, яка включає розмноження дріжджів (з активних сухих дріжджів) у біореакторі під час початкового зброджування. Ця технологія називається одночасним гідролізом та зброджуванням із розмноженням дріжджів (SSYPF) [51, 52].

Отже, для повного і швидкого ферментативного гідролізу крохмалю до зброджування цукрів необхідно створити певні умови, які полягають у визначенні основних теоретичних положень та технологічних режимів гідролізу полісахаридів зерна кукурудзи, спрямованих на скорочення терміну та досягнення максимальної повноти оцукрювання, а також на інтенсифікацію культивування дріжджів і зброджування. Це дасть змогу збільшити коефіцієнт використання виробничої потужності підприємства і сприятиме енергоощадності та підвищенню рентабельності виробництва.

Висновки. Ринок виробництва біоетанолу стрімко зростає з переробкою цукро-, крохмале- та лігніновмісної сировини, а також вторинних продуктів виробництва харчових продуктів і напоїв. Застосування нових гібридів кукурудзи технологічно впливає на корегування режиму отримання біоетанолу, знижуючи ресурсовитрати та підвищуючи вихід біоетанолу. Це сприяє розробці економічно ефективних технологій виробництва біоетанолу, що є пріоритетним напрямом розвитку енергетичного сектору країни.

На основі аналізу відомих способів зброджування крохмалевмісної сировини показано, що визначальним є встановлення раціональних режимів ферментативного гідролізу крохмалю і некрохмальних полісахаридів зерна кукурудзи до зброджування цукрів, а також основних факторів впливу на безперервне зброджування крохмалевмісної сировини у виробництві біоетанолу. Таким чином, основними напрямками подальших досліджень є:

- дослідження впливу концентрації суслу на біосинтетичну і ферментативну активність дріжджів;
- встановлення впливу співвідношення кількості виробничих дріжджів та основного суслу на інтенсивність перебігу бродіння і вихід спирту;
- дослідження впливу тривалості оцукрювання на повноту гідролізу крохмалю та утворення зброджуваних цукрів;
- визначення вуглеводного складу гідролізату крохмалю для використання ферментних препаратів з амілолітичною, протеолітичною та целюлолітичною активністю;

- визначення впливу активної кислотності середовища на гідроліз крохмалю та біосинтетичну активність дріжджів.

Бібліографія / References

1. World Bioenergy Association. WBA Global Bioenergy Statistics; 2017. Available from: www.worldbioenergy.org/global-bioenergy-statistics.
2. OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. OECD-FAO Agricultural Outlook 2015. Paris, France: OECD Publishing; 2015. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en
3. European Biofuels Technology Platform. Strategic research agenda 2010 update: Innovation driving sustainable biofuels. 2010. Available from: https://www.biofuelstp.eu/srasdd/SRA_2010_update_web.pdf.
4. van Thuijl E, Deurwaarder EP. European biofuels policies in retrospect. Petten, the Netherlands: Energy Research Centre of the Netherlands (ECN). 2006. Available from: <https://www.ecn.nl/publications/PdfTetch.aspx?nr=ECN-C-06-016>.
5. Prieur-Vernat A, His S. (2007). Biofuels worldwide. Panorama 2007. Rueil-Malmaison, France: IFP-Innovation Energy Environment. Available from: https://www.firp.ula.ve/archivos/material_web_4xx/07_IFP_Biofuels.pdf.
6. Li K, Liu S, Liu X. (2014). An overview of algae bioethanol production. Int. J. Energ Res.; Vol. 38 (8):965–77. <https://doi.org/10.1002/er.3164>.
7. Festel G, Würmseher M, Rammer C, Boles E, Bellof M. (2013)/ Modelling production cost scenarios for biofuels and fossil fuels in Europe. Discussion paper №13–075. Mannheim, Germany: ZEW – Centre for European Economic Research. Available from: <https://ftp.zew.de/pub/zew-docs/dp/dp13075.pdf>.
8. Zhao L, Zhang X, Xu J, Ou X, Chang S, Wu M. (2015). Techno-economic analysis of bioethanol production from lignocellulosic biomass in China: Dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. Energies. Vol. 8 (5):4096–117. <https://doi.org/10.3390/en8054096>.
9. Balat M, Balat H. (2009)/ Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Appl Energy.; Vol. 86 (11):2273–82. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>.
10. Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, et al. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnol Adv., Vol. 28 (6):817–30. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>.
11. Jobling S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. Curr Opin Plant Biol. Vol.7(2):210–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.001>.
12. Linoj Kumar N.V., Dhavala P., Goswami A., Maithel S. (2006). Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. Asian Biotechnol Develop Rev. Vol. 8. P. 31–49.
13. Kumar P. N., Kansine L., Sai M. V., Kumar K. P., Parichat N., Toan L. T., Natthiya B. (2025). Augmented ethanol production from alkali-assisted hydrothermal pretreated cassava peel waste. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects. Vol. 47 (1), P. 8243–8253. DOI:10.1080/15567036.2021.1928338.
14. Biorefineries Roadmap, German Federal Government action plans for the material and energetic utilisation of renewable raw materials. 2012. Available from: https://www.bmbf.de/pub/Roadmap_Biorefineries_eng.pdf.
15. Khanal S.K. (2008). Anaerobic biotechnology for bioenergy production: Principles and applications. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell; <https://doi.org/10.1002/9780813804545>.
16. Gunasekaran P. M., Banu, J. R. (2023). Indexing energy and cost of the pretreatment for economically efficient bioenergy generation. Frontiers in Energy. Vol. 10. DOI:10.3389/fenrg.2022.1060599.
17. Dutch Sustainable Development Group (DSD). Feasibility study on an effective and sustainable bio-ethanol production program by Least Developed Countries as alternative to cane sugar export, DSD group; study report on bio-ethanol production in LDC⁰s, the Netherlands, May 20, 2005. [cited; available from: www.swilion.nl/documenten/DSD%20RapportS].
18. Solomon B. D., Barnes J. R., Halvorsen K. E. (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. Biomass Bioenergy. Vol. 31 (6):416–25. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.01.023>.
19. Mousdale D. M. (2008). Biofuels: Biotechnology, chemistry and sustainable development. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
20. Soccol C. R., Faraco V., Karp S., Vandenberghe L. P. S., Thomaz-Soccol V., Woiciechowski A., Pandey A. (2011). Lignocellulosic bioethanol: Current status and future perspectives. In: Pandey A, Larroche C., Ricke S. C., Dussap C. G., Gnansounou E., editors. Biofuels – Alternative feedstocks and conversion processes. Oxford, UK: Academic Press. P. 101–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00005-X>.
21. Lee S, Speight J. G., Loyalka S. K., editors. Handbook of alternative fuel technologies. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2007. <https://doi.org/10.1201/9781420014518>.

22. Schubert C. (2006). Can biofuels finally take center stage? *Nat Biotechnol.* Vol. 24:777–84. <https://doi.org/10.1038/nbt0706-777>.
23. Cardona C.A., Sanchez O.J. (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technol.* Vol. 98:2415–57.
24. Yue-Qin Tang, Ming-Zhe An, Ya-Ling Zhong, Morimura Shigeru, Xiao-Lei Wu, Kenji Kida (2010). Continuous ethanol fermentation from non-sulfuric acid-washed molasses using traditional stirred tank reactor and the flocculating yeast strain KF7. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol. 109, Issue 1, P. 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.07.002>.
25. Jianliang Yu, Xu Zhang, Tianwei Tan (2007). An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology.* Vol. 129, Issue 3, P. 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.039>.
26. Anuchit Rattanapan, Savitree Limtong, Muenduen Phisalaphong (2011). Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Applied Energy.* Vol. 88, Issue 12, P. 4400–4404. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.05.020>.
27. Muenduen Phisalaphong, Nuttapan Srirattana, Wiwut Tanthapanichakoon (2006). Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* Vol. 28, Issue 1, P. 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.039>.
28. Óscar J. Sánchez, Carlos A. Cardona (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *J Bioresource Technology.* Vol. 99, Issue 13, P. 5270–5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>.
29. García-Aparicio M. P., Oliva J. M., Manzanares P., Ballesteros M., Ballesteros I., González A., Negro M. J. (2011). Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel.* Vol. 90, Issue 4, P. 1624–1630. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.10.052>.
30. Gabriel S. Aruwajoye, Y. Sewsynker-Sukai, E. B. Gueguim Kana (2020). Valorisation of cassava peels through simultaneous saccharification and ethanol production: Effect of prehydrolysis time, kinetic assessment and preliminary scale up. *Fuel.* Vol. 278, P. 118351. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118351>.
31. Cao, N. J., Krishnan, M. S., Du J. X., Gong, C. S., Ho, N. W. Y. et al., (1996). Ethanol production from corn cob pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. *Biotechnol. Lett.*, 118: 1013–1018. [10.1007/BF00129723](https://doi.org/10.1007/BF00129723).
32. Shigechi H, Koh J, Fujita Y, Matsumoto T, Bito Y, Ueda M, et al. (2004). Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 70: 5037–40.
33. Mojovic L, Nikolic S, Rakin M, Vukasinovic M. (2006). Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel.* Vol. 85:1750–5.
34. Singh V., Johnston D.B., Naidu K., Rausch K. D., Belyea R. L., Tumbleson M. (2005). Comparison of modified dry-grind corn processes for fermentation characteristics and DDGS composition. *Cereal Chem.* Vol. 82 (2):187–90.
35. Somavat P, Li Q, de Mejia EG, Liu W, Singh V. (2016). Coproduct yield comparisons of purple, blue and yellow dent corn for various milling processes. *Ind Crops Prod.* Vol. 87:266–72.
36. Rausch K. D., Belyea R. L. (2006). The future of coproducts from corn processing. *Appl Biochem Biotechnol.* Vol.128(1):47–86.
37. Uthumporn U., Zaidul I.S., Karim A. (2010). Hydrolysis of granular starch at subgelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food Bioprod Process.* Vol. 88 (1):47–54.
38. Wang P, Singh V, Xu L, Johnston DB, Rausch KD, Tumbleson M. (2005). Comparison of enzymatic (E-Mill) and conventional dry-grind corn processes using a granular starch hydrolyzing enzyme. *Cereal Chem.* Vol. 82 (6):734–8.
39. Singh V, Batie C. J., Aux G. W., Rausch K. D., Miller C. (2006). Dry-grind processing of corn with endogenous liquefaction enzymes. *Cereal Chem.* Vol. 83 (4):317–20.
40. Urbanchuk J. M., Kowalski D. J., Dale B., Kim S. (2009). Corn amylase: improving the efficiency and environmental footprint of corn to ethanol through plant biotechnology. *AgBioForum.* Vol. 12:149–54.
41. Kumar D. Singh V. (2016). Dry-grind processing using amylase corn and superior yeast to reduce the exogenous enzyme requirements in bioethanol production. *Biotechnol Biofuels* Vol. 9:228. DOI: [10.1186/s13068-016-0648-1](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0648-1).
42. Shihadeh J, Huang H, Rausch K, Tumbleson M, Singh V. (2013). Design of a vacuum flashing system for high-solids fermentation of corn. *Trans ASABE.* Vol. 56 (6):1441–7.
43. Shihadeh J. K., Huang H., Rausch K. D., Tumbleson M. E., Singh V. (2014). Vacuum stripping of ethanol during high solids fermentation of corn. *Appl Biochem Biotechnol.* Vol.173(2):486–500.
44. Taylor F, Kurantz M. J., Goldberg N., McAloon A. J., Craig J. C. (2010). Dry-grind process for fuel ethanol by continuous fermentation and stripping. *Biotechnol Prog.* Vol. 16(4):541–7.

45. Wang S, Ingledew W, Thomas K, Sosulski K, Sosulski F. (1999). Optimization of fermentation temperature and mash specific gravity for fuel alcohol production. *Cereal Chem.* Vol. 76 (1):82–6.
46. Ramalingham A, Finn R. (1977). The vacuform process: a new approach to fermentation alcohol. *Biotechnol Bioeng.* Vol. 19 (4):583–9.
47. Huang H, Qureshi N, Chen MH, Liu W, Singh V. (2015). Ethanol production from food waste at high solids content with vacuum recovery technology. *J Agric Food Chem.* Vol. 63(10):2760–6.
48. Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., Mohan R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.* Vol. 31(Pt 2):135–52.
49. Shigechi H, Koh J, Fujita Y, Matsumoto T, Bito Y, Ueda M, et al. (2004). Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 70(8):5037–40. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.5037-5040.2004>.
50. Huang H. J., Ramaswamy S., Tschirner U. W., Ramarao B. V. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep Purif Technol.* Vol. 62 (1):1–21. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011>.
51. Bothast R. J., Schlicher M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 67 (1):19–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1819-8>.
52. Cardona C. A., Sánchez Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol.* Vol. 98 (12):2415–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>.