

Capítulo 2

Producción de etanol y sus coproductos

Procesos de molienda en seco y húmeda

Introducción

Este capítulo describe los principios básicos de la producción de etanol para poder brindar un mejor conocimiento de las características nutricionales y valor alimenticio de los coproductos de maíz producidos por la industria del etanol.

Conversión de glucosa a etanol

En Estados Unidos, el maíz es la fuente predominante de almidón (glucosa) que se utiliza para producir etanol. Con la excepción de la caña de azúcar, el maíz proporciona el rendimiento de etanol más alto en comparación con otras materias primas (**cuadro 2**). Sin embargo, se están realizando investigaciones para desarrollar métodos que conviertan carbohidratos de materias primas celulósicas, como la madera blanda de coníferas (Arwa et al., 2005), polisacáridos no almidonosos (Arthur, 2006), así como de la remolacha (Savvides et al., 2000) a glucosa para usarse en la producción del etanol. La composición de nutrientes de las materias primas utilizadas para producir etanol determina el perfil de nutrientes de los coproductos de destilería que se producen.

Cuadro 2. Contenido de almidón y rendimiento de etanol de varias materias primas.

Materia prima	Humedad (%)	Almidón (%)	Rendimiento de etanol (L/TM)
Almidón	-	100.0	720
Caña de azúcar	-	-	654
Cebada	9.7	67.1	399
Maíz	13.8	71.8	408
Avena	10.9	44.7	262
Trigo	10.9	63.8	375

Fuente: Saskatchewan Agriculture and Food (1993).

La eficiencia energética de convertir glucosa a etanol es de alrededor del 51.4%, mientras que 48.6% se atribuye a la producción de dióxido de carbono. La eficiencia de la producción del etanol del almidón sin humedad es de alrededor del 56.7%.

Producción de etanol con molienda en seco

Reducción del tamaño de partícula de los granos

Como se muestra en la **figura 3**, el paso inicial en la producción de etanol con la tecnología de molienda en seco, es reducir el tamaño de partícula del maíz moliéndolo con un molino de martillos. Los molinos de martillos rompen el grano del maíz por medio de la rotación de las puntas del martillo a alta velocidad. La fineza del maíz molido está determinada principalmente por el volumen del rotor, la velocidad de la punta del martillo, el número de martillos y el tamaño de la abertura de la malla (Dupin et al., 1997). Las mallas que se usan en el molino de martillos normalmente están en un intervalo de 3 a 5 mm de diámetro. El tamaño de partícula del grano puede afectar el rendimiento de etanol (Kelsall y Lyons, 1999), por lo que los productores tienden a usar maíz molido muy fino para maximizar el rendimiento del etanol. Como se muestra en el **cuadro 3**, se puede producir un extra de 0.85 litros (0.20 galones) de etanol si el maíz se muele para que pase por una malla de 5 mm, en comparación con una de 8 mm.

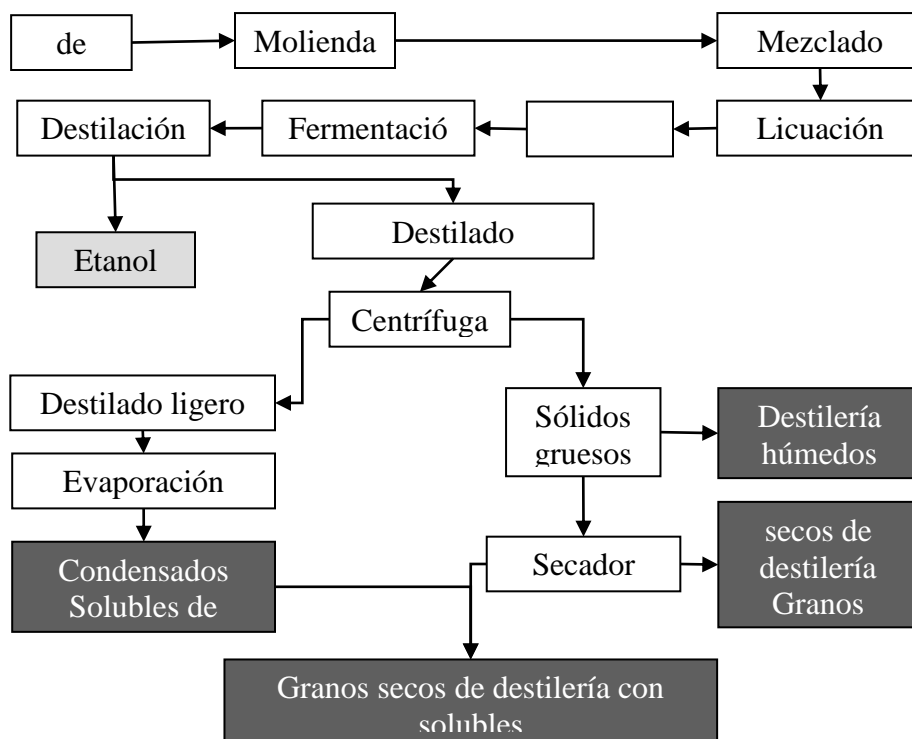


Figura 3. Procesos y subproductos de la producción del etanol con molienda en seco

Cuadro 3. Rendimiento de etanol del maíz molido con diferentes tamaños de partícula¹.

Tamaño de partícula	Rendimiento de etanol (galones/bushel)
Maíz molido fino, malla de 5 mm	2.65
Maíz molido grueso, malla de 8 mm	2.45

¹ Kelsall y Lyons, 1999.

Cocción y sacarificación

El agua y el destilado reciclado se añaden al maíz molido, los cuales actúan como acondicionadores para empezar la lixiviación de la proteína soluble, los azúcares y los lípidos ligados no almidonosos (Chen et al. 1999). La cocción se usa para hidrolizar el almidón a glucosa junto con la adición de enzimas amilolíticas, para que las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) conviertan la glucosa a etanol. Las temperaturas que típicamente se usan durante el proceso de cocción son de 40° - 60°C en el tanque de premezcla, 90° - 165°C para la cocción y 60°C para la licuación (Kelsall y Lyons, 1999). La gelatinización del almidón comienza entre los 50° y 70°C. Un paso crítico en la conversión del almidón a la glucosa implica la terminación de la gelatinización del almidón (Lin y Tanaka, 2006). Durante la gelatinización, se extrae casi toda la amilosa en los gránulos de almidón (Han y Hamaker, 2001), lo que incrementa la viscosidad debido a los gránulos que se hinchan y a las geles consistentes de amilosa solubilizada (Hermansson y Kidman, 1995).

La hidrólisis completa del polímero de almidón requiere de una combinación de enzimas. Las amilasas son las enzimas termoestables más ampliamente utilizadas en la industria del almidón (Sarıkaya et al., 2000). Éstas incluyen las α -amilasas o glucoamilasas (Poonam y Dalel, 1995). Las enzimas deben ser termoestables para que se dé la hidrólisis del almidón inmediatamente después de la gelatinización. El uso de enzimas representa del 10% al 20% del costo de producción del etanol (Gregg et al., 1998).

Algunas plantas de etanol utilizan sistemas de cocción por lote, mientras que otras utilizan sistemas de cocción continua (Kelsall y Lyons, 1999). En el sistema de cocción por lotes, se mezcla una cantidad conocida de harina de maíz con una cantidad conocida de agua y de destilado reciclado. En el proceso de cocción continua, la harina de maíz, el agua y el destilado reciclado se añaden continuamente en un tanque de premezcla. La temperatura del tanque de premezcla se mantiene justo por debajo de lo necesario para la gelatinización y la masa se bombea continuamente a través de un cocedor de inyección. La temperatura del cocedor se fija en 120°C. Del cocedor, la harina pasa a la parte superior de la columna vertical y se va moviendo hacia abajo en unos 20 minutos y luego pasa a la cámara instantánea para la licuación a 80 - 90°C. La amilasa tolerante a altas temperaturas se añade a 0.05 - 0.08% del peso del cereal para que se dé la licuación. El tiempo de retención en la cámara instantánea/de licuación es de alrededor de 30 minutos. El pH del sistema se controla entre 6.0 y 6.5. Los sistemas por lote usan menos enzimas en comparación con los continuos y son también más eficientes en energía. La principal desventaja de los sistemas por lote, es la menor productividad o utilización de materias primas por unidad de tiempo.

Fermentación

La fermentación es el proceso en el que la levadura convierte a los azúcares en alcohol. La levadura más comúnmente utilizada es la *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000) porque puede producir etanol a una concentración de hasta 18% en el caldo de fermentación. La *Saccharomyces* también está generalmente reconocida como inocua (GRAS, por sus siglas en inglés) como aditivo para alimentos de consumo humano (Lin y Tanaka, 2006). En la fermentación ideal, alrededor de 95% del azúcar se convierte a etanol y dióxido de carbono, 1% se convierte en materia celular de las levaduras y 4% en otros productos como el glicerol (Boulton et al., 1996). Las enzimas representan alrededor del 10% del costo de producción del etanol (Wingren et al., 2003).

La prefermentación se hace para lograr el número deseado de levaduras para la fermentación, proceso que implica la agitación durante 10 - 12 horas para alcanzar de 300 a 500 millones de levaduras/ml. La fermentación sucede a una temperatura de alrededor de 33°C (Thomas et al., 1996), a un pH de alrededor de 4.0 (Neish y Blackwood, 1951) y dura entre 48 y 72 horas (Ingledew, 1998). Además del etanol, se produce dióxido de carbono, que también se puede recolectar o simplemente liberar al aire.

El control del crecimiento normal de las levaduras es un factor clave en la producción eficiente del etanol. La actividad de las levaduras es altamente dependiente de la temperatura del sistema de fermentación. Torija et al. (2003) informaron que la temperatura óptima de reproducción y fermentación de la levadura es de 28° y 32°C, respectivamente. La eficiencia de la fermentación del *S. cerevisiae* a altas temperaturas (arriba de 35°C) es baja (Banat et al., 1998). Por lo tanto, se requiere de un sistema de enfriamiento en los sistemas de fermentación.

Un desafío al manejar fermentadores en una planta de etanol es prevenir la contaminación con otros microbios. La contaminación microbiana es causante de una reducción del rendimiento de etanol y de la productividad de la planta (Barbour y Priest, 1988). Los organismos más comúnmente relacionados con la contaminación microbiana son los lactobacilos y las levaduras silvestres. Estos microbios compiten por los nutrientes (minerales traza, vitaminas, glucosa y aminonitrógeno libre) con la *Saccharomyces cerevisiae*, lo que da como resultado productos finales inhibitorios tales como el ácido acético o el ácido láctico. Las levaduras silvestres *Dekkera/Brettanomyces* se han convertido en una preocupación en la producción del alcohol combustible (Abbott e Ingledew, 2005). Actualmente, se ha logrado la reducción en la contaminación de ácido láctico bacteriano con el uso de antibióticos en las plantas de producción de etanol (Narendranath y Power, 2005).

Destilación del etanol

Después de la fermentación, se recolecta el etanol por medio de columnas de destilación. El etanol recolectado de los fermentadores se contamina con agua y se purifica con un sistema de tamices moleculares para eliminar el agua y producir etanol puro.

Extracción de aceite de maíz

Se puede producir aceite crudo de maíz en las plantas de etanol de maíz mediante la extracción del aceite de la porción del destilado ligero del proceso de producción de DDGS (CEPA, 2011). La extracción del aceite de maíz del destilado ligero se da después de la fermentación y la destilación, y antes del secado para producir los DDGS. Se han añadido sistemas de extracción de aceite de maíz a las plantas existentes de etanol para aumentar la eficiencia de la energía de la planta, así como aumentar la cantidad total de combustible que se produce por tonelada métrica de maíz procesado. La instalación de equipo de extracción de aceite de maíz en una planta existente de etanol facilita la producción de las materias primas de biodiesel, sin afectar los volúmenes de producción de etanol. Existen comercialmente diferentes tecnologías de extracción de aceite de maíz para la industria del etanol.

La mayor parte de la industria del etanol utiliza un proceso de extracción "Paso 1" en el que el aceite de maíz se extrae del destilado ligero después de eliminarse del destilado completo mediante centrifugación (CEPA, 2011). El destilado ligero resultante parcialmente concentrado se calienta y el aceite de maíz se extrae mediante una segunda centrifuga. Los intercambiadores de calor utilizan valor para aumentar la temperatura del destilado ligero para facilitar la extracción, por lo que después de que se extrae el aceite de maíz, se recupera la energía térmica del destilado en los intercambiadores de calor para calentar el destilado que entra.

El destilado ligero contiene aproximadamente 30% del aceite disponible en el maíz, del cual la mayor parte se recupera mediante este proceso "Paso 1", lo que depende de las condiciones particulares de la planta de etanol (CEPA, 2011). En general, una planta de etanol típica utiliza maíz que contiene aproximadamente 4% de aceite (con base en el peso) que termina en los DDGS si no se extrae. Por ejemplo, una planta de etanol de molienda en seco con una capacidad de producción anual de 190 millones de litros puede recuperar 5.7 millones de litros de aceite de maíz al año.

Aún no se ha implementado el proceso "Paso 2" en la mayor parte de las plantas en Estados Unidos, pero es un proceso de extracción adicional que puede capturar un 30% más del aceite de maíz que está destinado al destilado completo antes de la separación por centrifuga de los granos húmedos y del destilado ligero (CEPA, 2011). Ya que más del 40% del aceite total en el maíz está atrapado dentro de la pasta húmeda, se "lava" esta pasta o torta para liberar el aceite para que se pueda extraer en el sistema "Paso 1". El aceite adicional que estuvo a disposición en el proceso de extracción "Paso 1" generalmente duplica la producción del aceite de maíz. Por lo tanto, con la combinación de usar tanto los procesos del "Paso 1" como del "Paso 2", se pueden extraer del 60 al 70% del aceite de maíz presente en los coproductos de destilería. Como resultado, estas tecnologías permiten la extracción de 23 a 27 litros de aceite de maíz por cada 380 litros de etanol producido.

Por cada 3.8 litros de etanol producido, se producen 2.4 kg de DDGS sin la extracción del aceite de maíz (CEPA, 2011). Sin embargo, con la extracción de este aceite de maíz, se

reduce el rendimiento DDGS en aproximadamente 0.06 kg por litro de etanol producido, lo que representa una reducción del 9.4% en el rendimiento de DDGS. La eliminación del aceite de maíz afecta el perfil nutricional de los DDGS, principalmente al reducir el contenido de grasa y energía, y al aumentar la concentración de proteína. Para algunas especies de animales de producción para consumo humano tales como los cerdos, las aves y los peces, es muy importante el alto contenido de grasa y energía de los DDGS, mientras que para el ganado lechero o de engorda se puede utilizar de manera más eficiente los DDGS reducidos en aceite. Refiérase entonces a los **Capítulos 15, 18, 20 y 22** para obtener más información sobre los efectos de alimentar los DDGS reducidos en aceite a ganado de engorda, ganado lechero, aves y cerdos, respectivamente.

Producción de coproductos

El agua y los sólidos que permanecen después de la destilación del etanol se les llaman el destilado entero o completo. El destilado completo está compuesto principalmente de agua, fibra, proteína y grasa. Esta mezcla se centrifuga para separar los sólidos gruesos del líquido. El líquido, que se le llama destilado ligero, pasa a través de un evaporador para eliminar la humedad adicional, lo que resulta en solubles de destilería condensados (jarabe), que contienen aproximadamente 30% de materia seca. Los solubles de destilados condensados se pueden vender localmente a los engordadores de ganado o combinarse con fracciones de sólido gruesos y secos para producir los granos de destilería secos con solubles. A los sólidos gruesos también se les llaman pasta húmeda, la cual contiene alrededor del 35% de materia seca. La pasta o torta húmeda se puede vender a los engordadores locales de ganado sin secar, secarse para producir los granos secos de destilería o mezclarse con solubles de destilería condensados y secados para producir los granos secos de destilería con solubles (88% de materia seca).

Molienda húmeda

A diferencia de las plantas de etanol de molienda en seco que fermentan el grano de maíz entero, los molinos húmedos separan el grano del maíz en varias fracciones, lo que permite la producción de múltiples productos para consumo humano y uso industrial, como el etanol. La industria de la molienda húmeda del maíz se desarrolló a principios del siglo XIX con el propósito de producir almidón para uso en alimentos para consumo humano y productos de lavandería (Kerr, 1950). En la década de 1920, los molinos húmedos empezaron a producir dextrosa cristalina (Newkirk, 1923) y después de la Segunda Guerra Mundial, empezaron a producir etanol. A principios de la década de 1990, los molinos húmedos empezaron a producir jarabe de maíz alto en fructuosa, además de otros productos. La mayoría de las plantas de molienda en húmedo se ha construido en las últimas décadas (Johnson y May, 2003). En la **figura 4** se muestra un panorama del proceso de molienda húmeda.

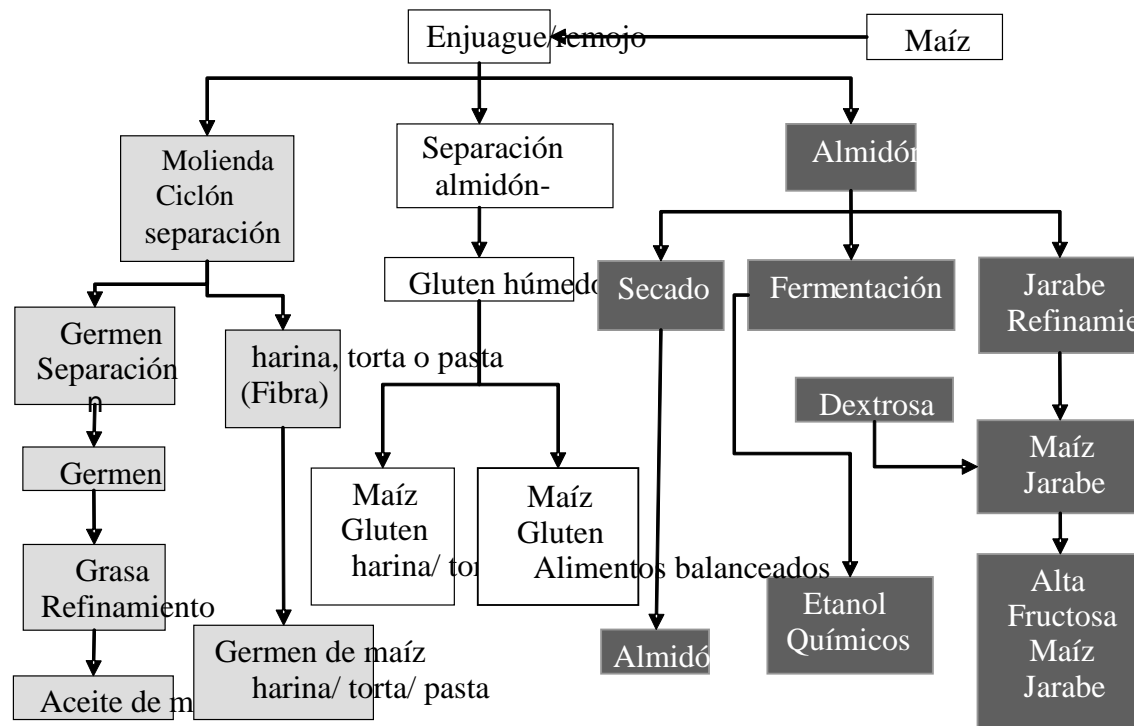


Figura 4. Procesos y subproductos de la molienda húmeda
(Erickson et al., 2005)

Limpeza del grano

Inicialmente, se limpia el maíz para eliminar los granos rotos, la basura o granzas, pedazos de olote (mazorca) y material extraño. Este proceso es importante porque los granos rotos de maíz pueden liberar almidón en el agua de remojo, que puede gelatinizarse y dar lugar a una viscosidad indeseada durante la evaporación del agua de remojo para producir el licor de remojo (May, 1987).

Enjuague/remojo

El remojo involucra enjuagar los granos de maíz bajo temperatura (48° - 50°C), tiempo (35 a 50 horas), concentración de SO₂ (0.1% a 0.2%) y ácido láctico controlados (Watson, 1984). El agua actúa como acondicionador para que se lleve a cabo la molienda bajo condiciones óptimas (Bass, 1988). El enjuague ayuda a suavizar el grano del maíz para la molienda, inhibe el crecimiento microbiano y mejora la recuperación del almidón puro (Bartling, 1940).

Molienda

Después del remojo, el germen del maíz se hace suave y chiclosa. Los hidrociclones con discos rotatorios encontrados y dedos que se entremezclan desbaratan los granos de maíz y separan el germen (May, 1987). Debido a que el germen es más ligero de peso en comparación con el resto del grano del maíz, es posible separarlo fácilmente mediante fuerza centrífuga. Una vez eliminado, el germen se purifica para separar el almidón y los extractos de

proteína por medio de lavado con agua. Después se extrae el aceite del germen para producir aceite de maíz.

La fibra se separa mediante bombeo de la lechada/pasta (almidón, gluten, fibra y fragmentos de grano) con fuerza considerable en una malla trapezoidal de alambre de 120°. Las partículas de fibra son grandes de forma y se separan para dejar el almidón y la proteína.

El gluten se separa por medio de centrifugas de alta velocidad debido a que la proteína es más ligera en peso, en comparación con el almidón (May, 1987). El gluten después se espesa en centrifugas, se elimina el agua a 42% de sólidos por medio de filtración al vacío, y se seca a 88% de sólidos para su venta como harina de gluten de maíz (Jackson y Shandera, 1995).

Procesamiento del almidón

Las impurezas, en forma de proteína, se eliminan mediante el lavado del almidón con agua dulce, con proceso contracorriente en las centrifugas. El almidón purificado contiene menos del 0.4% de proteína y menos del 0.01% de proteína libre (May, 1987). La proteína que se elimina consiste principalmente de complejos de almidón-proteína que se reciclan de regreso al paso de separación primario. Posteriormente, el almidón purificado se puede secar y fermentar para producir etanol, o refinar para producir jarabe de maíz. El procedimiento usado para la producción de etanol del almidón en los molinos húmedos es similar al que se describió previamente de las plantas de etanol de molienda en seco.

Producción de coproductos

El licor de remojo del maíz es un ingrediente líquido de alto contenido en energía para consumo animal. Contiene alrededor de 25% de proteína cruda con base en el 50% de materia seca. Este producto se combina a veces con la harina de gluten de maíz >20% de proteína o se vende por separado como fuente de proteína líquida para raciones de ganado de engorda o lechero. También se puede usar como un aglutinante de pélets, además de ser una fuente de vitaminas B y minerales.

La harina de germen de maíz contiene 20% de proteína, 2% de grasa y 9.5% de fibra. Tiene un equilibrio de aminoácidos que lo hace valioso para las dietas de aves y cerdos.

La harina de gluten de maíz >20% de proteína es un ingrediente de proteína mediana compuesto de las porciones de salvado y fibra del grano de maíz. Puede o no contener los extractos de maíz condensados. Este subproducto se puede vender como un ingrediente de alimentos balanceados húmedo o seco. El salvado y los extractos condensados (a veces llamado harina de germen) se combinan y se deshidratan en un secador rotatorio. La harina de gluten de maíz >20% de proteína seca se peletiza para facilitar su manejo. Por lo general, contiene alrededor del 21% de proteína, 2.5% de grasa y 8% de fibra. La harina de gluten de maíz >20% de proteína húmeda (45% de materia seca) es perecedera en 6 a 10 días, de tal forma que debe alimentarse dentro de ese periodo o almacenarse en un ambiente anaeróbico.

La harina de gluten de maíz >20% de proteína se usa principalmente en las raciones para ganado lechero y ganado de engorda.

La harina de gluten de maíz es un concentrado alto en proteína que típicamente contiene 60% de proteína, 2.5% de grasa y 1% de fibra. Es una fuente valiosa de metionina. La harina de gluten de maíz también tiene un nivel alto de xantofilas, lo que hace que sea un ingrediente atractivo en dietas para aves como fuente de pigmento amarillo.

Bibliografía

- Abbott, D.A., and W.M. Ingledew. 2005. The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 69:16-21.
- Arthur, J.R., C.K. Williams, B.H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C.A. Eckert, W.J. Frederick, Jr., J.P. Hallett, D.J. Leak, C.L. Liotta, J.R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, and T. Tschaplinski. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science.* 311:484-489.
- Arwa, K., A. Berlin, N. Gilkes, D. Kilburn, R. Bura, J. Robinson, A. Markov, A. Skomarovsky, A. Gusakov, O. Okunev, A. Sinitsyn, D. Gregg, D. Xie, and J. Saddler. 2005. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Firby novel and commercial fungal cellulases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Volume 121, Issue 1-3, pps. 219-230.
- Banat, I.M., P. Nigam, D. Singh, R. Merchant, and A.P. McHale. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: A review; Part-I Yeast In General. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:809-821.
- Barbour, E.A., and F.G. Priest. 1988. Some effects of *Lactobacillus* contamination in scotch whisky fermentations. *J. Inst. Brew.* 94:89-92.
- Bartling, F.W. 1940. Wet process corn milling. No. 5. The steep house. *Am. Miller.* 68:40-41.
- Bass, E.J. 1988. Wheat floor milling. Pages 1-68 In: *Wheat Chemistry and Technology*, Vol. 2. Y. Pomeranz. Ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN.
- Boulton, B., V.L. Singleton, L.F. Bisson, and R.E. Kunkee. 1996. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: *Principles and Practices of Winemaking*, Boulton B, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (eds). Chapman and Hall. New York, pp. 139-172.
- California Environmental Protection Agency. 2012. California-Modified GREET Pathway for the Production of Biodiesel from Corn Oil at Dry Mill Ethanol Plants. Stationary Source Division, Release Date: November 3, 2011, Version 2.0. 40 pp.
- Chen, J.J., S. Lu, and C.Y. Lii. 1999. Effect of milling on physicochemical characteristics of waxy rice in Taiwan. *Cereal Chemistry* 76:796-799.
- Dupin, I.V.S., B.M. McKinnon, C. Ryan, M. Boulay, A.J. Markides, P.J. Graham, P. Fang, I. Boloni, E. Haque, and C.K. Spillman. 1997. Comparison of energy efficiency between roller mill and a hammer mill. *Appl. Engineering in Agric.* 13:631-635.
- Erickson G.E., T.J. Klopfenstein, D.C. Adams, and R.J. Rasby. 2005. General overview of feeding corn milling co-products to beef cattle. In: *Corn Processing Co-Products Manual*. University of Nebraska. Lincoln, NE, USA.
- Gregg, D.J., A. Bousaid, and J.N. Saddler. 1998. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresour. Technol.* 63:7-12.
- Han, X.Z., and B.R. Hamaker. 2001. Amylopectin fine structure and rice starch paste breakdown. *J. Cereal Sci.* 34:279-284.

- Hermansson, A.M., and S. Kidman. 1995. Starch – A phase-separated biopolymer system. In: S.E. Harding, S.E. Hill and J.R. Mitchell, Editors, *Biopolymer Mixtures*, Nottingham University Press, UK. pp. 225-245.
- Ingledew, W.M. 1998. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast primer. Chapter 5 In: *The alcohol textbook*. 3rd ed. K.A. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall Ed. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Jackson, D.S., and D.L. Shandera, Jr. 1995. Corn wet milling: Separation chemistry and technology. *Adv. Food Nutr. Res.* 38:271-300.
- Johnson, L.A. and J.B. May. 2003. Wet milling: The basis for corn refineries. In: *Corn: Chemistry and Technology*. Ed. S.A Watson. pp. 449-495. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN.
- Kelsall, D.R., and T.P. Lyons. 1999. Grain dry milling and cooking for alcohol production: designing for 23% ethanol and maximum yield. Chapter 2. In: *The alcohol textbook*. 3rd ed. K.A. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall Ed. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Kerr, R.W. 1950. *Chemistry and industry of starch*. Academic Press, New York. p. 29.
- Lin, Y., and S. Tanaka. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 627-642.
- May, J.B. 1987. Wet milling: Process and products. In “*Corn: Chemistry and Technology*”. ed. S.A. Watson and P.E. Ramstad. Pp 377-397. Am. Assoc Cereal Chem., St. Paul, MN.
- Narendranath, N.V., and R. Power. 2005. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2239-2243.
- Neish, A.C., and A.C. Blackwood. 1951. Dissimilation of glucose by yeast at poised hydrogen ion concentrations. *Can. J. Technol.* 29:123-129.
- Newkirk, W.B. 1923. Method of making grape sugar. U.S. Patent 1:471,347.
- Poonam, N. and S. Dalel. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17:770-778.
- Pretorius, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675-729.
- Renewable Fuels Association. 2012. Annual Industry Outlook. <http://www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook>
- Sarikaya, E., T. Higassa, M. Adachi, and B. Mikami. 2000. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Proc. Biochem.* 35:711-715.
- Saskatchewan Agriculture and Food. 1993. *Establishing an Ethanol Business*.
- Savvides, A.L., A. Kallimanis, A. Varsaki, A.I. Koukkou, C. Drainas, M.A. Typas, and A.D. Karagouni. 2000. Simultaneous ethanol and bacterial ice nuclei production from sugar beet molasses by a *Zymomonas mobilis* CP4 mutant expressing the Z gene of *Pseudomonas syringae* in continuous culture. *J. Appl. Microbiol.* 89: 1002-1008.
- Thomas, K.C., S.H. Hynes, and W.M. Ingledew. 1996. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Proc. Biochem.* 31:321-331.
- Torija, M.J., N. Rozès, M. Poblet, J.M. Guillamón, and A. Mas. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International J. Food Microbiol.* 80: 47-53.
- Watson, S.A. 1984. Corn and sorghum starches: Production. In: *Starch: Chemistry and Technology*. Ed. R.L. Whistler, J.M. BeMiller, and E.F. Paschall. 417-467. Academic Press, Orlando, FL.
- Wingren, A.M., Galbe, and G. Zacchi. 2003. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 19:1109-1117.