

Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*

Jeimmy Proaños¹ y Yineth Piñeros Castro^{1*}

¹ Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Departamento de Ingeniería. Grupo de Investigación en Ingeniería de Procesos y Sistemas Inteligentes, Carrera 4 N° 22-61 Bogotá D. C., Colombia. * Autor para correspondencia: yineth.pineros@utadeo.edu.co

Evaluation of the production of lactic acid from rice bran by *Lactobacillus delbrueckii*

Abstract

Actually, Colombia produces 2.000.000 of tons of rice and approx. 400.000 tons of rice husk. This is rice sub product with high polysaccharides composition and this is utilized for lactic acid production by fermentation, as valorization alternative. In this work, we studied the lactic acid production with rice husk without pretreatment and rice husk with alkaline pretreatment with NaOH 2 and 3% (m/v) (121 °C, 0,1 MPa, 1h) in a simultaneous saccharification and fermentation (HFS) process (40 °C, 100 rpm) for 48 h. The chemical pretreatment is used to increase the enzymatic hydrolysis yield by lignin and crystalline cellulose structure degradation. The glucose produced by enzymatic hydrolysis (with commercial enzymes), it can be fermented to lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii*. In a HFS process, we studied lactic acid production in a different rice husk concentration as substrate (10, 40 y 80 g/L). The maximum lactic acid concentration was $1,81 \pm 0,11$ g/L in a 12 h process with rice husk without pretreatment as substrate (80 g/L) and the maximum yield product/substrate Yps was 0,075 g of lactic acid/g rice husk with 20 g/L of rice husk with NaOH 3% pretreatment as substrate, in a 12 h HFS. The alkaline pretreatment is a viable process to produce lactic acid in a low substrate concentrations.

Keywords: Rice husk, simultaneous saccharification and fermentation (HFS), alkaline pretreatment, lactic acid, lignocellulosic biomass.

Editor: Hernández-Fernández, J.

Citation: Proaños, J. Piñeros, C. Y. (2014). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*. *Revista Mutis 4(1)*; pag. 33-39

Received: Abril 18, 2014; **accepted:** Junio 10, 2014; **Published on line:** Junio 30, 2014

Copyright: ©2014 Proaños & Piñeros. This is an open-access article, which permits unrestricted use, distributions and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Competing Interests: The authors have no conflict of interest.

Resumen

En Colombia se producen más de 2'000.000 de toneladas de arroz y por lo tanto aproximadamente 400.000

toneladas de cascarilla. Este es un subproducto con altos contenidos de polisacáridos que puede ser utilizado para la producción de azúcares fermentables y su posterior biotransformación en ácido láctico, como alternativa de valorización. En este trabajo se estudió la aplicación de pretratamiento alcalino (NaOH 2 y 3% (m/v), 121 °C, 0,1 MPa, 1h) para romper la estructura compleja de la cascarilla y favorecer la producción de ácido láctico mediante un proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas (HFS) (40 °C, 100 rpm, 48 h). En el proceso de HFS, se estudió la producción de ácido láctico a diferentes concentraciones de cascarilla de arroz (pretratada y sin tratamiento) como sustrato (10, 40 y 80 g/L), utilizando enzimas comerciales y *Lactobacillus delbrueckii*. La máxima concentración de ácido láctico obtenida fue de $1,81 \pm 0,11$ g/L a las



12 h de proceso utilizando cascarilla sin pretratar (80 g/L) y el máximo rendimiento Yps fue de 0,075 g de ácido láctico/g de cascarilla, utilizando 20 g/L como sustrato pretratado con NaOH al 3%. Aunque este pretratamiento favorece la producción de ácido láctico a bajas concentraciones de sustrato en el proceso HFS, es necesario explorar otras posibilidades para mejorar los rendimientos obtenidos.

Palabras clave: cascarilla de arroz, hidrólisis y fermentación simultánea (HFS), pretratamiento alcalino, ácido láctico, biomasa lignocelulósica.

Introducción

La industrialización del arroz es una actividad económica con un impacto relevante en la sociedad y economía colombianas. Según estadísticas de Fedearroz (Fedearroz, 2014) en los últimos años, el área destinada a la producción de arroz en Colombia es de aproximadamente 450.000 Ha, en la cual se generan alrededor de 2 millones de toneladas de arroz y cerca de 400.000 toneladas de cascarilla por año. Los residuos lignocelulósicos generados en el procesamiento del arroz como la cascarilla y el tamo (desecho abandonado en el sitio de recolección), son materiales considerados de poco valor y en algunos casos son un residuo. La cascarilla de arroz, compuesta por celulosa (35-40%), lignina (20-25%) y hemicelulosa (15-20%) (Saha *et al.*, 2005), no puede ser empleada en la alimentación de animales debido a su baja digestibilidad, la cual es causada por sus características abrasivas y su alto contenido de cenizas y de sílice (Saha y Cotta, 2008). La quema de este desecho suele ser la única estrategia que se sigue para su eliminación, con lo cual se genera un impacto ambiental negativo. El poco valor dado especialmente a la cascarilla, se debe especialmente a las pocas tecnologías implementadas en el país para su procesamiento y posterior valorización, ya que solo se utiliza como combustible sólido, material para abonos y como cama para animales.

La celulosa, presente en los materiales lignocelulósicos es una fuente importante de azúcares fermentables. Sin embargo presenta zonas cristalinas como consecuencia del alto grado de ordenamiento que siguen las glucopiranosas cuando se enlazan, lo cual muchas veces dificulta la conversión a glucosa (Badiu, 2006). Para lograr una hidrólisis enzimática eficiente es necesario un pretratamiento con el fin de

abrir la estructura compleja de estos materiales y lograr el acceso de las enzimas celulasas al sustrato. La lignina restringe el acceso enzimático y microbiológico a la celulosa y la cristalinidad restringe la velocidad de ataque sobre la celulosa (Grohmann *et al.*, 1985). Considerando que la lignina es soluble en compuestos alcalinos, los tratamientos con NaOH o KOH atacan la lignina y por lo tanto mejoran la digestibilidad enzimática de los polisacáridos.

En este contexto surge la necesidad de evaluar procesos que permitan el aprovechamiento de las fracciones de la cascarilla de arroz de manera que se permita la producción de compuestos de mayor valor agregado. Una de las alternativas es la producción de ácido láctico por rutas biotecnológicas, ya que es posible la obtención de ácido L(+) puro, materia prima para la síntesis de ácido poliláctico, un polímero biodegradable con alto potencial en el mercado como posible sustituto de plásticos derivados del petróleo (Illmen *et al.*, 2007); además, el ácido láctico es un compuesto requerido en la industria alimenticia, farmacéutica y de textiles (Huang *et al.*, 2005).

En este trabajo se evaluó el uso de la celulosa contenida en la cascarilla de arroz para la producción de ácido láctico mediante hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas usando *Lactobacillus delbrueckii*. Para esto se realizó pretratamiento químico sobre la cascarilla de arroz, con el fin de cambiar la estructura del material y favorecer los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación.

Materiales y métodos

Cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz utilizada en este proyecto fue suministrada por la planta de Arroz Diana ubicada en El Espinal (Tolima). Esta se mantuvo a temperatura de 18 °C y humedad relativa del 67%.

Microorganismo e inóculo

Se utilizó *Lactobacillus delbrueckii* conservado en glicerol a -20 °C, el cual se activó en caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe) cuya composición (en g/L) es la siguiente: peptona 10, extracto de carne 8, extracto de levadura 4, acetato de sodio 5, citrato de amonio 2, K₂HPO₄ 2, MgSO₄ x 7H₂O 0,2, MnSO₄ x H₂O 0,055, polisorbato

1,08, y glucosa 20, durante 12 horas a 40 °C bajo agitación orbital a 100 rpm. Posteriormente se colocaron 5 mL del cultivo en 50 mL de caldo MRS, y se dejó en incubación por 24 horas a 40 °C a 100 rpm. Este cultivo se utilizó como inóculo para el presente estudio.

Pretratamiento químico

Se realizó pretratamiento químico con NaOH al 2 y 3% (m/v), con relación 50 gramos de cascarilla por cada 550 mL de la solución. El tratamiento se realizó a 121 °C durante 1 h. Luego del tratamiento el material se lavó con abundante agua y se secó a 60 °C durante 6 horas. Se analizó la humedad usando un equipo Mettler Toledo HB43-S, para proceder con su caracterización (contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa) e hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas.

Hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas (HFS)

Las unidades experimentales estuvieron constituidas por Erlenmeyer de 250 mL, en los que se dispusieron 100 mL de medio de cultivo MRS sin glucosa y suplementado con 20 g/L, 40 g/L y 80 g/L de cascarilla con y sin pretratamiento. El medio de cultivo se preparó utilizando buffer de citratos 0.1 M pH 4.5 como base. Posteriormente se realizó el proceso de esterilización (15 min a 121 °C), se dejó enfriar y se adicionaron 250 µL de combinación de enzimas celulasas (Celluclast® y N510010 de Novozymes) y 3 mL de suspensión de células de *Lactobacillus delbrueckii* (10⁹ células/mL) provenientes de un cultivo de 24 horas.

Las unidades se mantuvieron en incubación y agitación orbital 125 rpm, a 40 °C± 1°C, durante 48 h. Se tomaron muestras de todas las unidades cada 12 h, las cuales se centrifugaron a 14600 rpm (Thermo Electron Corporation Espresso centrifuge 11210800) durante tres minutos. El sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.20 µm para su análisis de concentración de ácido láctico y glucosa por cromatografía líquida.

Cuantificación de lignina, polisacáridos y cenizas

Se cuantificó el contenido de lignina y polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) en la cascarilla original y pretratada usando la metodología descrita en los pro-

tolos de National Renewable Energy Laboratory NREL (Sluiter *et al.*, 2008a). Se realizó una hidrólisis con H₂SO₄ 72% (v/v) a 30 °C por 60 min seguida de una con H₂SO₄ 4% (v/v) a 121 °C por 1 h. Los sólidos insolubles corresponden a la lignina y la composición de azúcares monoméricos (determinada por HPLC) en el hidrolizado, se usó para calcular el contenido de celulosa y hemicelulosa. Las cenizas (minerales) se cuantificaron por gravimetría de acuerdo a los protocolos de la NREL (Sluiter *et al.*, 2008b).

Cuantificación de ácido láctico y glucosa

El contenido de glucosa y ácido láctico fue analizado por cromatografía líquida (HPLC) utilizando un detector de índice de refracción. Se utilizó la columna Aminex HPX-87H (Bio-RAD), a 60 °C, con H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (0,6 ml /min). El cálculo de las concentraciones finales obtenidas de ácido láctico y glucosa se realizó mediante el uso de una curva de calibración elaborada usando glucosa anhidra y lactato de sodio (SIGMA).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental factorial de 3² de medidas repetidas (durante 48 horas) con un total de 9 experimentos realizados por triplicado. Los factores fueron: tratamiento en tres niveles (sin pretratamiento, pretratamiento con NaOH al 2% (m/v), pretratamiento con NaOH al 3% (m/v) y concentración de cascarilla en tres niveles (20 g/L, 40 g/L, 80 g/L). Las variables de respuesta fueron concentración de ácido láctico (AL) en g/L y rendimiento producto-sustrato $Y_{AL/Ca}$ (gramos ácido láctico/gramos de cascarilla de arroz). Estas variables de respuesta se calcularon cada 12 horas durante 48 horas.

Las muestras se tomaron por triplicado y los resultados reportados son la media aritmética de los valores que se obtuvieron en los experimentos. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (Anova) con un nivel de confianza del 95 %. Así mismo, se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar las diferencias entre los pretratamientos, empleando para ello el paquete estadístico Statgraphics, versión 5.1.

Resultados y discusión

Producción de ácido láctico mediante sacarificación y fermentación simultánea (HFS) a partir de cascarilla no tratada y tratada con NaOH

Obtención de ácido láctico mediante sacarificación y fermentación simultánea en cascarilla de arroz sin pretratamiento.

En la figura 1 se muestra el perfil de producción de ácido láctico a partir de cascarilla sin pretratamiento, con concentraciones de cascarilla de 20, 40 y 80 g/L.

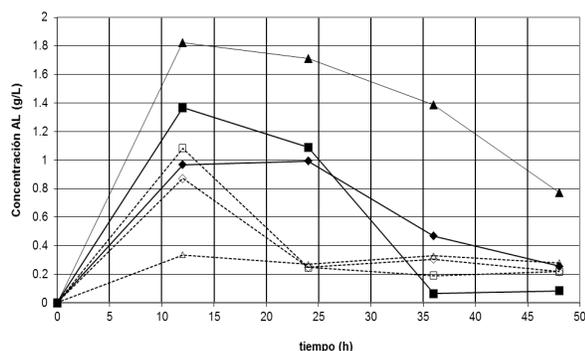


Figura 1. Variación en el tiempo de concentración de ácido láctico y glucosa (valores promedio) a partir de cascarilla de arroz sin pretratar y a diferentes concentraciones de sustrato. Ácido láctico (símbolo sólido); glucosa (línea punteada, símbolo sin relleno). (-○-) 20 g/L; (-□-) 40 g/L; (-△-) 80 g/L.

En esta figura se observa un aumento rápido de la concentración de glucosa y consumo de la misma para la producción de ácido láctico. Después de las 24 horas del proceso se encontró disminución de la concentración de glucosa a valores aproximadamente constantes durante el tiempo restante (0,3 g/L). Similar resultado reportó Quatravaux *et al.* (2006) en sus investigaciones realizadas con *L. plantarum*, el cual consumió el 56-89% de la glucosa inicial durante las primeras 8 h y la había consumido casi por completo a las 12 h.

La máxima concentración de ácido láctico obtenida fue de $1,81 \pm 0,11$ g/L, la cual se logró con una concentración de sustrato de 80 g/L en el proceso de HFS. El principal beneficio que se deriva de llevar a cabo el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea es la disminución en la inhibición que causa la acumulación de glucosa, de manera que este azúcar es transformado tan pronto se genera, incrementándose a su vez la productividad. Por otro lado y considerando el comportamiento tanto

de la producción de ácido láctico como del consumo de sustrato, se observó una limitación del sustrato, pues la hidrólisis de la cascarilla ocurrió principalmente durante las 12 primeras horas del proceso, lo que favoreció la producción de ácido láctico en ese período.

La disminución en la concentración del ácido láctico luego de las 12 horas puede atribuirse a la baja disponibilidad de glucosa que pudiera ser fermentada por *Lactobacillus delbrueckii*. Debido a lo anterior, las células de la bacteria consumieron la glucosa disponible en etapas tempranas de la fermentación y pronto se encontraron ante la ausencia de este sustrato. Algunos autores (Monteagudo *et al.*, 1997), han reportado que en las fermentaciones con *L. rhamnosus*, una vez se había consumido la totalidad de la glucosa, se inició una producción de ácido acético a partir del ácido láctico producido. Otros autores (Quatravaux *et al.*, 2006), reportaron que algo muy similar ocurre con *L. plantarum* una vez se han consumido todos los azúcares susceptibles de ser transformados. En ese trabajo se describe que el ambiente bajo el cual se propicia la generación de ácido acético a partir de ácido láctico es aerobio y que mediante oxidación se obtienen también H_2O_2 , CO_2 y ATP, resultados del estrés oxidativo. En este trabajo las condiciones de agitación se usaron para favorecer la hidrólisis enzimática pero pudieron favorecer también la conversión de ácido láctico en ácido acético. La conversión del ácido láctico está conformada por una serie de pasos, el primero de ellos, está constituido por la transformación de este ácido a piruvato gracias a la intermediación de la lactato deshidrogenasa; el piruvato es catabolizado a acetil-fosfato el cual finalmente da origen al acetato (Murphy *et al.*, 1985).

Cabe resaltar que los cultivos con los que estos investigadores trabajaron tuvieron durante toda la fermentación dos flujos de aire distintos y la cantidad de oxígeno disuelto se varió manipulando la agitación. Estos autores también afirman que luego de 12 h, todas los cultivos de *L. plantarum* sometidos a aireación iniciaron el consumo del ácido láctico que habían producido para transformarlo a ácido acético. Algo similar ocurrió en el presente trabajo.

Para el caso particular de *Lactobacillus delbrueckii*, otros autores (Teyssset-Marty *et al.*, 2000) observaron que la inhibición en el crecimiento celular es causada por la exposición a una aireación permanente, ya

que esta condición permitía la generación y acumulación de H_2O_2 en el medio. Esta inhibición inducida por la presencia de oxígeno es el resultado de lo que se conoce como estrés oxidativo y se encuentra además asociada a que las células bacterianas detengan la producción de ácido láctico. Sin importar que *L. delbrueckii* sea un microorganismo capaz de tolerar ciertas concentraciones de oxígeno disuelto, la presencia de este genera cambios en su metabolismo ocasionando el consumo del ácido láctico.

Obtención de ácido láctico mediante sacarificación y fermentación en cascarilla de arroz pretratada con NaOH al 2% y NaOH al 3%

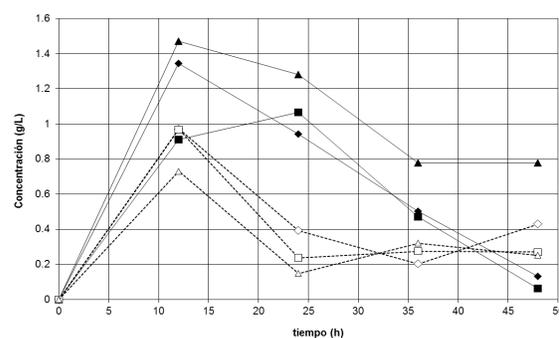
En la Figura 2 (A y B) se muestra el perfil de producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz pretratada con NaOH al 2 y 3%, respectivamente.

Cuando se aplica la evaluación estadística Anova del efecto del pretratamiento, se encuentra que este factor es estadísticamente significativo sobre las variables de respuesta. La prueba de comparación de medias (prueba de Tukey) muestra que, en cuanto a obtención de ácido láctico (g/L), existe diferencia estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95%, entre la cascarilla de arroz sin pretratamiento y aquella sometida a pretratamiento (con NaOH al 2 y 3%).

Cuando se aplica la prueba de comparación de medias entre las concentraciones de ácido láctico obtenidas bajo las dos condiciones de pretratamiento, se encuentra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas. De acuerdo a lo anterior, puede afirmarse que entre pretratamientos no se presentó una variación importante en cuanto a la producción de ácido láctico.

La mayor concentración de ácido láctico se obtiene con la mayor concentración de sustrato en el proceso (80 g/L). Se obtuvieron valores de $1,44 \pm 0,15$ g/L utilizando cascarilla de arroz pretratada con NaOH al 2% y de $1,64 \pm 0,08$ g/L con cascarilla pretratada con NaOH al 3%. Estos resultados se obtuvieron a las 12 h. Estos valores son similares a los obtenidos en material sin pretratamiento ($1,81 \pm 0,11$ g/L). Es posible que la alta concentración del sustrato afecte el acce-

so de las enzimas al sustrato, especialmente cuando el material es pretratado, ya que el comportamiento es diferente a 20 g/L de sustrato, con cascarilla pretratada con NaOH al 3% el valor obtenido es 1,43 g/L, con NaOH al 2% 1,32 g/L mientras que con material sin pretratar la concentración de ácido láctico apenas alcanzó 0,97 g/L. El efecto positivo del pretratamiento alcalino, es notable cuando el proceso de HFS se realiza con baja concentración de sustrato, lo que favorece la hidrólisis enzimática y la producción de AL.



A

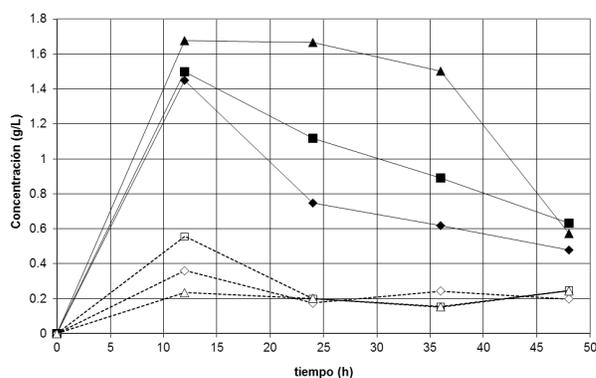


Figura 2. Variación en el tiempo de concentración de ácido láctico y glucosa (valores promedio) a partir de cascarilla de arroz pretratada con NaOH al 2% (A) y NaOH al 3% (B) a diferentes concentraciones de sustrato. Ácido láctico (símbolo sólido), glucosa (línea punteada, símbolo sin relleno). (—◇—) 20 g/L; (—□—) 40 g/L; (—△—) 80 g/L.

En la Tabla 1, se encuentran los datos obtenidos de la caracterización de los materiales sin pretratar y tratados. En cuanto al contenido de los polisacáridos se evidenció que el tratamiento con NaOH afecta las fracciones de lignina y sílice, ya que se encontró una mayor concentración de los polisacáridos. Aunque existen reportes de concentraciones de NaOH cercanas a 1M para extraer el sílice (Kalapathy *et al.*, 2000), bajo las condiciones evaluadas, se logra obtener sili-

cato de sodio, lo que se evidenció en la formación de geles durante la experimentación y al menor contenido de minerales en los materiales pretratados.

En el caso de la concentración de ácido láctico des-

pués de las 12 horas de HFS, esta tiende a disminuir de manera sostenida hasta el final del proceso, presentando un comportamiento similar al obtenido con cascarilla sin pretratamiento.

Tabla 1. Composición de la cascarilla de arroz (%)

	Sin pretratamiento	Pretratada NaOH 2%	Pretratada NaOH 3%
Lignina	24,45 ± 1,46	22,69 ± 1,20	21,49 ± 0,18
Celulosa y hemicelulosa	40,34 ± 1,26	75,64 ± 1,16	76,74 ± 1,06
Cenizas	15,89±0,04	1,70±0,03	1,76±0,05

Relacionado con los rendimientos, en la Figura 4 se encuentran los rendimientos obtenidos Y_{xs} (g AL/g Ca) a las

12 horas de proceso. En esta figura se comparan los resultados para materiales sin pretratar y pretratados.

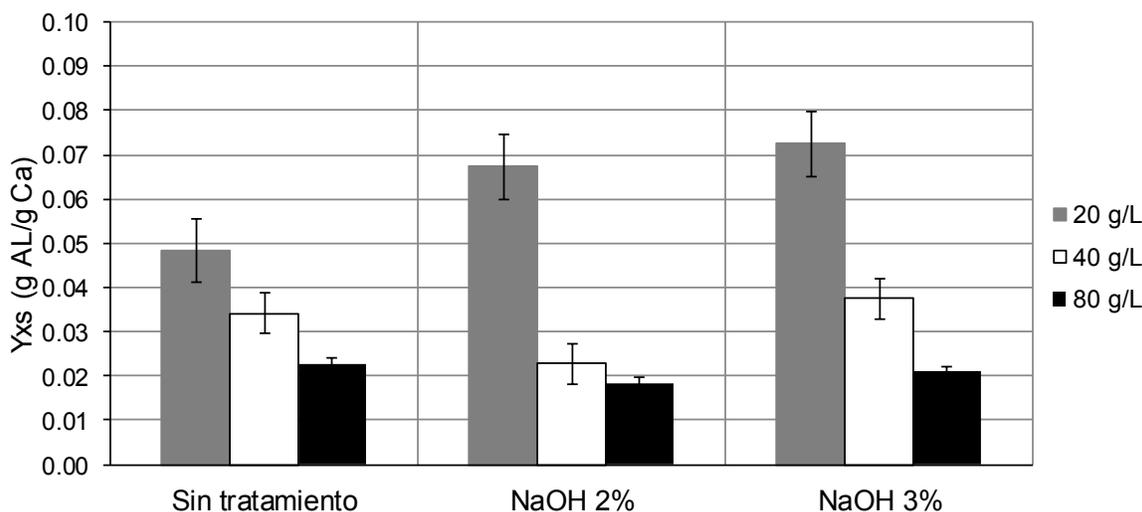


Figura 4. Rendimientos obtenidos Y_{xs} (g AL/g Ca) a las 12 horas proceso

Se encontró que con una concentración de 20 g/L de sustrato, los rendimientos mejoran con el pretratamiento alcalino, siendo el máximo valor obtenido (0,075 g AL/g Ca) con material pretratado con NaOH al 3%. Esta relación es inferior a la que reportan Sreenath *et al.* (2001), quienes obtuvieron 0.354 g de ácido láctico/g de fibra de alfalfa sin pretratamiento mediante sacarificación y fermentación simultánea y empleando *L. delbrueckii*. El menor rendimiento reportado en el presente estudio pudo ser causado principalmente por la complejidad de la estructura de la cascarilla de arroz debido al contenido de sílice que además de la lignina constituyen una barrera al aprovechamiento de la fracción de celulosa.

Conclusiones

Se logró producir ácido láctico mediante la hidrólisis enzimática y fermentación de cascarilla de arroz sin pretratamiento y con tratamiento alcalino (NaOH 2 y 3%) utilizando *Lactobacillus delbrueckii*. Se evaluó el efecto de la aplicación de un pretratamiento químico (NaOH al 2 y 3%) sobre el rendimiento de ácido a partir de la cascarilla, encontrándose valores de concentración de ácido láctico significativamente mayores que los obtenidos con material sin pretratar a bajas concentraciones de sustrato en el HFS (20 g/L). En este trabajo, se identificó que el pretratamiento afecta principalmente las fracciones de sílice y lignina, lo que favoreció la producción de ácido láctico.

El mayor valor de concentración de ácido láctico en este trabajo se presentó utilizando cascarilla sin pretratamiento (80 g/L), siendo este de $1,81 \pm 0,11$ g/L a las 12 horas de proceso. Utilizando cascarilla pretratada con NaOH al 2%, el mayor valor de concentración de ácido láctico obtenido fue de 1,44 g/L y tratada con NaOH al 3% se alcanzó un valor de 1,64 g/L. En cuanto al rendimiento Yps, el máximo valor se obtuvo en material pretratado con NaOH al 3% (0,075 g de ácido láctico/ g de cascarilla), utilizando una concentración de sustrato de 20 g/L a las 12 horas de proceso.

Un factor que tuvo un papel predominante en la producción del ácido láctico fue la agitación a la que se mantuvieron las unidades de fermentación, puesto que la aireación y limitación de sustrato ocasionó estrés oxidativo, convirtiendo el ácido láctico producido a ácido acético, factor que debe considerarse en la evaluación de este tipo de procesos. Estos resultados constituyen información valiosa, en la búsqueda de alternativas de valorización de la cascarilla de arroz.

Agradecimientos

Este trabajo hizo parte del proyecto “Aplicación de tecnologías para el aprovechamiento integral de las fracciones celulósica y hemicelulósica de la cascarilla de arroz”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y por la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

Referencias

- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. 4ª ed. México: Editorial Pearson Addison Wesley. pp 78, 79, 329.
- Fedearroz. “Series históricas”. Consultado en mayo 9, 2014, desde http://www.fedearroz.com.co/apr_public.php.
- Grohmann, K., Torget, R., & Himmel, M. (1986). Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. In *Biotechnology and Bioengineering Symposium* (Nº 15, pp. 59-80). Wiley.
- Huang, L. P., Jin, B., Lant, P., & Zhou, J. (2005). Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*, 23(3), 265-276.
- Ilmén, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., & Penttilä, M. (2007). Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 117-123.
- Kalapathy, U., Proctor, A., & Shultz, J. (2000). A simple method for production of pure silica from rice hull ash. *Bioresource Technology*, 73(3), 257-262.
- Marty-Teyssset, C., De La Torre, F., & Garel, J. R. (2000). Increased Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon Aeration: Involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 262-267.
- Murphy, M. G., & Condon, S. (1984). Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures. *Archives of Microbiology*, 138(1), 44-48.
- Monteagudo, J. M., Rodríguez, L., Rincón, J., & Fuertes, J. (1997). Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68(3), 271-276.
- Quatravaux, S., Remize, F., Bryckaert, E., Colavizza, D., & Guzzo, J. (2006). Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 903-912.
- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G., & Straub, R. J. (2001). Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(6), 518-523.
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., & Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Bio-technology Progress*, 21(3), 816-822.
- Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2008). Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 32(10), 971-977.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008a). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *National Renewable Energy Laboratory*, 1-5.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008b). Determination of ash in biomass. *National Renewable Energy Laboratory*, 1-5.