

1988 - B

Reg. No. 081343071

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

“MEJORAMIENTO DE LA DIGESTIBILIDAD *in situ* DE BAGAZO
DE CAÑA MEDIANTE TRATAMIENTO POR FERMENTACION
SEMISOLIDA CON Phanerochaete chrysosporium”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

ANGELICA MARIA HAGELSIEB CABALLERO

GUADALAJARA, JAL JULIO DE 1991



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección

Expediente

Número 1539/90

C. ANGELICA MARIA HAGELSTEB CABALLERO
P R E S E N T E.

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "MEJORAMIENTO DE LA DIGESTIBILIDAD in situ DE BAGAZO DE CAÑA MEDIANTE TRATAMIENTO POR FERMENTACION SEMISOLIDA CON Phanerochaete --- chrysosporium" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al M. en C. Arturo Camacho López.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., 24 de Octubre de 1990.

EL DIRECTOR



[Firma manuscrita]
M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE.

EL SECRETARIO

[Firma manuscrita]

FACULTAD DE CIENCIAS

M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA.



Biblioteca de la Facultad de Ciencias.

c.c.p.- El M. en C. Arturo Camacho López.- Pte.
c.c.p.- El expediente del alumno.

vsg

Al contestar este oficio c/tesc fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

INSTITUTO DE MADERA, CELULOSA Y PAPEL
"ING. KARL AUGUSTIN GRELLMANN"

Sección

Expediente

Número

Guadalajara Jal. a 9 de Julio de 1991

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE
DIRECTOR
FAC. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

Por medio de la presente, nos dirigimos atentamente a UD. para notificarle, que hemos revisado con atención el trabajo de tesis de licenciatura de la C. ANGELICA MARIA HAGELSIEB CABALLERO que lleva como título " MEJORAMIENTO DE LA DIGESTIBILIDAD *in situ* DE BAGAJO DE CAÑA MEDIANTE TRATAMIENTO POR FERMENTACION SEMI-SOLIDA CON *Phanerochaete chrysosporium* ", y que concedemos nuestra autorización para que se proceda a la impresión de la misma.

No habiendo otro asunto por tratar, agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente nos despedimos saludandolo y poniendonos a sus ordenes.

ATENTAMENTE
" PIENSA Y TRABAJA "
AÑO LIC. JOSE GUADALUPE ZUNO HERNANDEZ

M. en C. ARTURO CAMACHO LOPEZ
PROF-INVESTIGADOR
DIRECTOR DE TESIS

M. en C. VIRGILIO ZÚÑIGA PARTIDA
PROF-INVESTIGADOR
ASESOR DE TESIS

c.c.p. M. en C. Arturo Camacho L.
c.c.p. M. en C. Virgilio Zúñiga P.
c.c.p. Interesado

Al contestar este oficio cítese fecha y número

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE MADERA, CELULOSA Y PAPEL

"ING. KARL AUGUSTIN GRELLMANN"

**MEJORAMIENTO DE LA DIGESTIBILIDAD *in situ*
DE BAGAZO DE CAÑA MEDIANTE TRATAMIENTO
POR FERMENTACION SEMI-SOLIDA
con *Phanerochaete chrysosporium***

Durante el transcurso de este estudio se contó con la colaboración del personal e instalaciones del Instituto de Madera, Celulosa y Papel, en el departamento de Bioingeniería y Anatomía de la madera, bajo de dirección del M. en C. Arturo Camacho López y asesoría del M. en C. Virgilio Zúñiga Partida.

Tesis Realizada que para obtener
el grado en
LICENCIADO EN BIOLOGIA
presenta

ANGELICA MA. HAGELSIEB CABALLERO

AGRADECIMIENTO

A todo el personal del Instituto de Madera Celulosa y Papel a todos y cada uno de ellos contribuyeron para lograr este trabajo.

Al Ing. Camacho por su valiosa y constante asesoría y que en ocasiones necesito tenerme mucha paciencia y confianza para poder lograr el presente trabajo.

Al Ing. Zúñiga por su valiosa y constante asesoría y proporcionarme los medios adecuados para realizar el presente estudio.

A la IX Generación de Biología " Doctor Ruy Pérez Tamayo " por brindarme su compañerismo y compañía.

A mis compañeros de grupo a todos los que de alguna forma convivieron conmigo.

A mis maestros que gracias a ellos fué posible mi formación académica.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de ésta meta.

DEDICATORIA

A DIOS que aunque no lo merezco me ha dado la oportunidad de estudiar y sobre todo me ha enseñado lo hermosa que es esta vida , te doy gracias por haberme dado una familia como ninguna que aunque lejos siempre esta a mi lado.

A mis padres que siempre con su ejemplo y dedicación me enseñaron el camino a seguir y a quienes debo lo que soy ahora.

A mis hermanos Marcela y Fernando que me han brindado el cariño y comprensión que siempre he necesitado.

A ti Hilda por tenerme confianza en mis locuras y apoyarme cuando en realidad lo necesitaba.

A mis amigos José , Jaime y Salvador a cada uno de ellos que siempre han estado a mi lado y cada uno de ellos saben lo que son para mi.

Y muy especialmente a ti

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ASPECTOS TEORICOS	6
MATERIALES Y METODOS	20
RESULTADOS Y DISCUSION	23
CONCLUSIONES	27
TABLAS	28
GRAFICAS	33
BIBLIOGRAFIA	46

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de fermentación en estado sólido del bagazo de caña integral con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* con el fin de incrementar su digestibilidad. Las variables sujetas a estudio fueron: tiempo de fermentación, pH, y humedad. La variable dependiente fue la digestibilidad " *in situ* " la cual se determinó mediante la técnica de la bolsa de nylon.

Fue suficiente tan sólo un tiempo de fermentación de 15 días para lograr un buen incremento en la digestibilidad. El pH y la humedad afectan notablemente el proceso de fermentación. El mejor valor de digestibilidad, el cual fue de 68.85%, se obtuvo bajo las siguientes condiciones de fermentación: Temperatura, 25-28°C; pH, 4; Humedad, 80%; tiempo, 15 días.

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas a nivel mundial y que tiende a agudizarse en el futuro es el abastecimiento de alimento para la población (Brin, 1976), motivo que nos obliga a buscar y desarrollar nuevas fuentes de alimentos, o darle alguna utilidad a lo que actualmente consideramos un desecho o contaminante.

El bagazo de caña es un material lignocelulósico con un alto contenido de celulosa y hemicelulosas, que pueden ser metabolizados por los animales rumiantes principalmente.

En la zafra realizada durante el período 1986-1987 la cantidad de caña procesada fue de 40'131,857 toneladas, generándose 14'131,200 de ton. de bagazo, las cuales fueron utilizadas de la siguiente manera: por la industria papelera 227,201 ton., como combustible en las calderas de los ingenios 12'223,480 ton. y en la fabricación de aglomerados 113,049 ton. Quedando un excedente de 1'567,469.4 ton. sin ninguna utilización (CNICP 1989).

Es necesario mencionar algunas de las características importantes del bagazo de caña que lo hacen atractivo como materia prima para la elaboración de forrajes:

- 1) Su alto contenido en carbohidratos estructurales.
- 2) Este proviene de una fuente anualmente renovable
- 3) Se genera en grandes cantidades en forma concentrada en los ingenios, lo que significa un ahorro considerable en recolección en relación a otros esquilmos agrícolas.

El exceso de bagazo de caña mencionado anteriormente, el cual no tiene ninguna utilización se tira en el campo, convirtiéndose en un contaminante tanto para la tierra como para la atmósfera.

En el caso del bagazo de caña, solo una fracción de los carbohidratos es accesible a la acción de las enzimas hidrolíticas presentes en el rumen. Por lo cual para lograr un aprovechamiento óptimo de este material es necesario aplicar algún tratamiento químico, físico, microbiológico o combinación de éstos.

El bagazo de caña se ha utilizado en la alimentación animal tanto picado en verde como seco, aunque no con buenos resultados debido a su baja digestibilidad (Leal 1985).

Con el propósito de incrementar la digestibilidad del bagazo, se han reportado estudios aplicándole diferentes tratamientos, como: físico-mecánicos (Cabello 1988), con vapor saturado (Zúñiga, 1987); físico-químicos, al cual se le aplicaron diferentes compuestos químicos como peróxido de hidrógeno (Zúñiga, 1988), ácido sulfúrico (El-Nawawy 1970), hidróxido de sodio (Hsie 1978), etc. logrando una digestibilidad promedio de 40% (Zúñiga 1988), teniendo como inconveniente la eliminación y recuperación de los reactivos utilizados.

Otros investigadores han aplicado tratamientos microbiológicos a diferentes materiales lignocelulósicos, como: paja de avena (Levonen-Munos y Col. 1985), álamo, abeto, paja de arroz (Leal 1986), paja de algodón (Shefet y Col. 1982) etc., utilizando diferentes microorganismos entre los que podemos mencionar a los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Chrysosporium lignorum* (De la Torre, 1985). Además de microorganismos aislados del líquido ruminal (Shefet y Col. 1982).

En base a las características que presenta el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, las cuales van a ser enumeradas posteriormente, se han llevado a cabo estudios de aplicación para diferentes propósitos: degradador de la lignina de la madera (Eriksson y Col 1980), para la obtención de pulpa en la fabricación de papel (Eriksson y Col. 1983), (Leisola 1982) (Wu Leq y Col. 1979) (Eriksson and Kirk 1985) (Leatham y Col. 1990) (Gutiérrez y Col. 1987); en el tratamiento de efluentes de fábricas de celulosa (Mats y Col. 1980) (Trotter P. 1990 part. 2), en este caso la biomasa generada se usó como alimento para animales monogástricos con buenos resultados (Thomke y Col. 1980).

El hongo *P. chrysosporium* (Triana y Col. 1990) ha sido objeto de estudio a nivel genético para la obtención de mutantes con una mayor selectividad por la lignina con el fin de mejorar el proceso de bio-pulpeo de madera o bagazo de caña (Gálvez 1986), (Gutiérrez y Col. 1987).

Desde un punto de vista técnico el tratamiento microbiológico tiene algunas ventajas (Yang y Col. 1980) con respecto a los químicos y físicos, por ejemplo:

- a) Alta especificidad en la degradación de la lignina.
- b) Generación mínima de desperdicios y subproductos.
- c) Bajos requerimientos de energía.
- d) No requiere de eliminación y recuperación de reactivos (Pelayo 1990).

La utilización de residuos como el bagazo de caña en la alimentación animal, en gran proporción en la dieta, solo será posible si se le practica algún tratamiento para incrementar su digestibilidad. La disponibilidad de grandes volúmenes de bagazo aunado a un proceso técnico-económicamente factible coadyuvaría a incrementar notablemente la producción pecuaria, además de resolver el problema de contaminación que genera el bagazo no utilizado.

En base a lo anteriormente expuesto consideramos que el hongo *P. chrysosporium* y otros con características similares tienen un gran potencial en el desarrollo de procesos para incrementar la digestibilidad de residuos agroindustriales.

El propósito de la presente investigación fue evaluar la fermentación semi-sólida de bagazo de caña con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, y la influencia de los parámetros de fermentación : tiempo, humedad y pH. Con la finalidad de convertir el bagazo en un alimento para rumiantes .

ASPECTOS TEORICOS

CAÑA DE AZUCAR

Desde el punto de vista físico, como lo muestra la Figura 1, el tallo de la caña de azúcar esta constituido (Humbert 1974), (Triana O. y Col. 1990), (Gálvez 1986) por:

- a) Epidermis.
- b) Corteza.
- c) Tejidos suaves interiores que están formados por células donde se almacena el jugo azucarado.
- d) Fibras que se encuentran dispersadas a lo largo del tallo.

La epidermis se encuentra formada principalmente por células alargadas, rectangulares y cortas de una manera alterna, lugar donde abundan gran cantidad de componentes como ceras, taninos, etc. cuyo fin principal es impermeabilizar la planta del medio ambiente.

La corteza esta compuesta de células muy lignificadas, cuyas características principales son su ancho de la pared celular, longitud y rigidez, cuya función principal es la de proteger al tallo de los efectos mecánicos externos, además de servir de sostén a la planta.

En el interior del tallo se puede observar al tejido suave (parenquimatoso), cuya función principal es de almacenamiento del jugo azucarado, se encuentra compuesto por células de paredes delgadas separadas por pequeños espacios intercelulares; el tamaño de estas células aumenta gradualmente hacia el centro del entrenudo, llegando a medir hasta 40 μm .

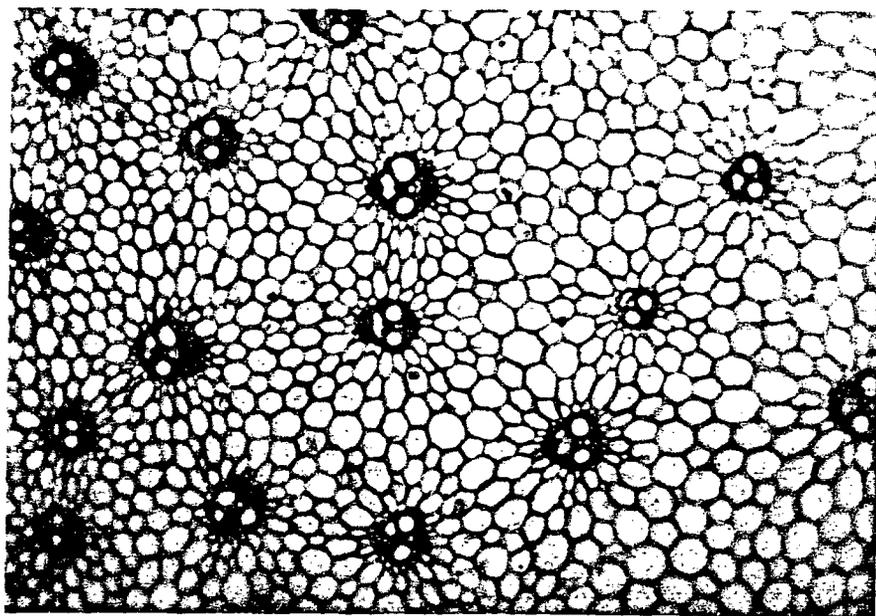
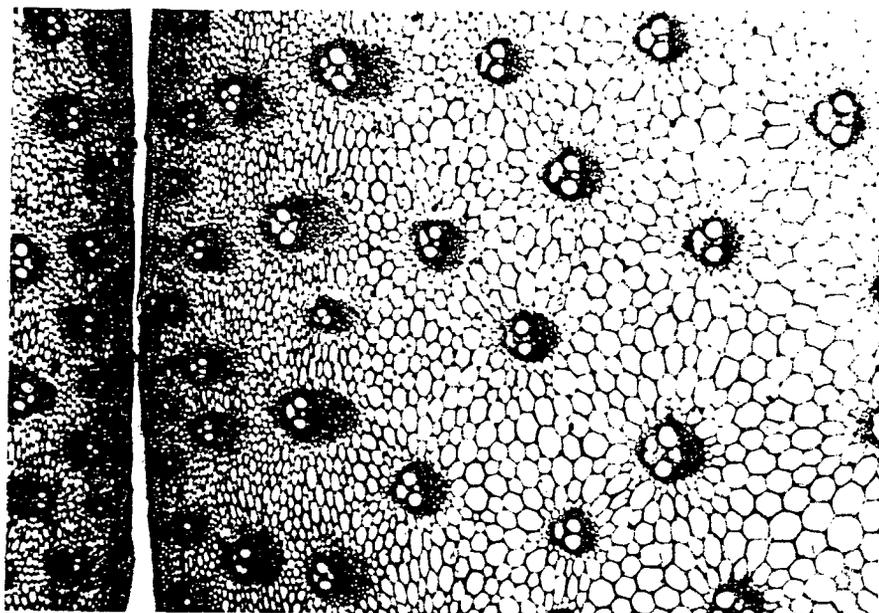


Fig. 1 Corte transversal del tallo en caña de azúcar

Dentro del tejido suave se encuentran los haces fibrovasculares, que se distribuyen espaciadamente; incrementando su número del interior a la periferia y disminuyendo su tamaño, donde están tan unidos que forman un anillo sólido.

El haz tiene la forma de una vaina esclerenquimatosa que encierra al xilema y al floema. La vaina se encuentra vigorosamente desarrollada en el interior y exterior del haz, formando de esta manera dos capas: la parte inmediata al floema por células de paredes más gruesas, mientras que en la parte inmediata al xilema con células de paredes más delgadas.

El xilema se encuentra formado por el protoxilema con una cavidad adyacente (tubo de aire), y dos grandes vasos, rodeados por células parenquimatosas achatadas. El protoxilema se compone de elementos anulares y espirales; entre los dos grandes vasos se encuentran el parénquima y unos vasos estrechos. El floema está formado por los vasos cribosos y las células acompañantes.

La figura 2, muestra el corte transversal de la pared celular de una fibra (Triana O. y Col. 1990), (Fernández y Col. 1988), la cual está constituida por la lamela media, que se encuentra íntimamente unida a la pared primaria y a la pared secundaria. Esta última formada por dos capas, S_1 y S_2 donde la capa S_2 ocupa el 80% del volumen de la pared.

Los carbohidratos (Triana y Col. 1990) del bagazo de caña los componen la celulosa y las hemicelulosas. La celulosa es un polímero formado por unidades de D-glucosa Figura 3, cuyo enlace es del tipo β -1-4; las cadenas son lineales y de un alto grado de polimerización, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces secundarios; así también, la celulosa constituye el principal componente de la pared celular de todas las plantas.



Sección transversal de la pared celular del bagazo

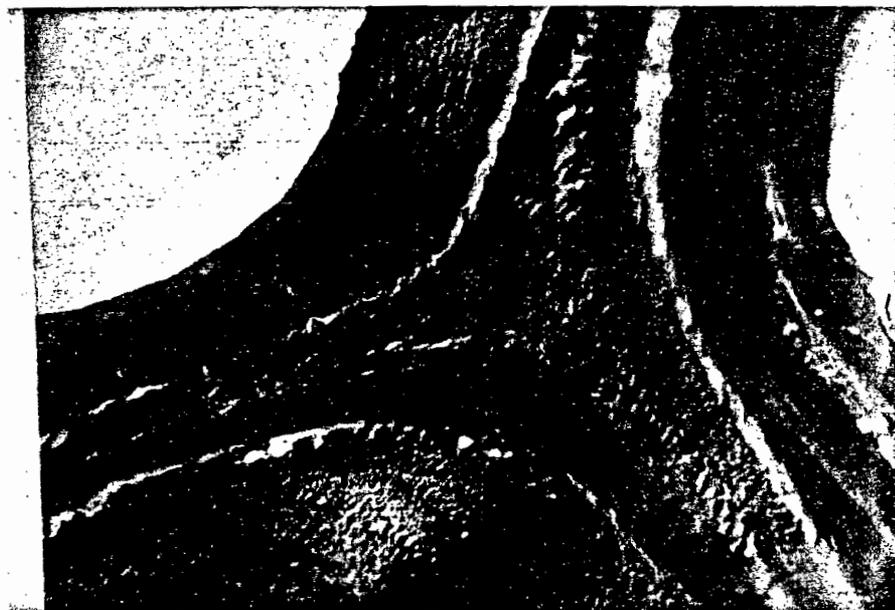


Fig. 2 Región del triángulo celular (M.E.T. 61,000x)

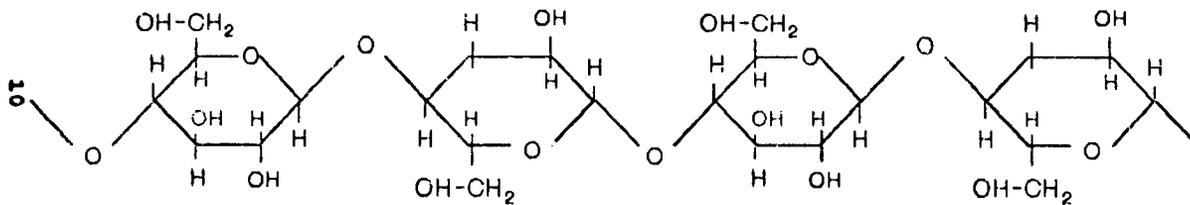


Fig. 3 *Molécula de Celulosa*

Las hemicelulosas (Triana y Col. 1990) que más abundan en el bagazo de caña son del tipo D-xilanas Figura 4, formadas principalmente por unidades de D-xilosa en la cadena principal, sustituidas por grupos acetilo y ácidos urónicos metilados; las cadenas poliméricas son relativamente cortas. Cuantitativamente, se encuentran en el bagazo en una proporción del 25-27%.

La lignina (Triana y Col. 1990) es el tercero y último de los componentes de mayor importancia cuantitativa del bagazo de caña, formado principalmente por unidades de fenil-propano, mencionadas en la Figura 5, las cuales conforman una molécula semejante a la señalada en la Figura 6.

Al ser molida la caña de azúcar durante su procesamiento industrial este ordenamiento anatómico se pierde, quedando reducido a una mezcla física de los elementos descritos; caracterizándose por su elevada heterogeneidad morfológica, y compuesta de un 55-60% de fibras y de un 35-40% de médula o meollo.

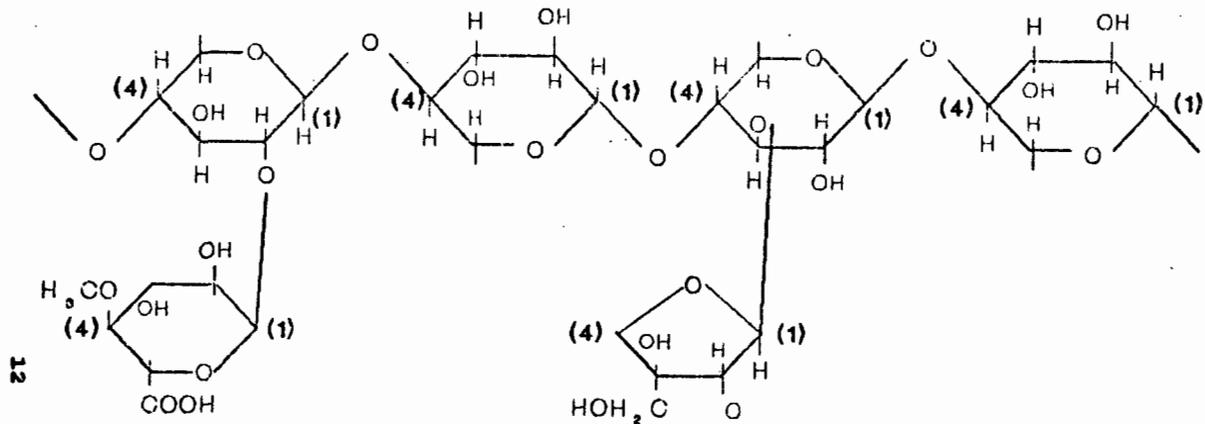
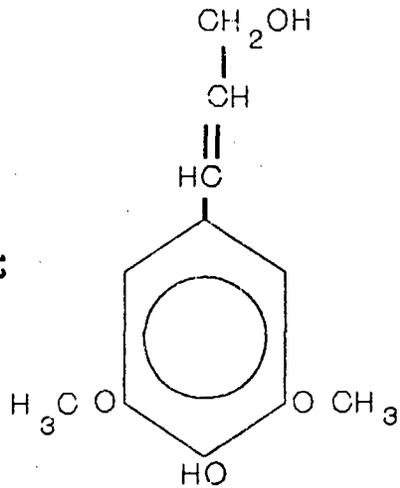
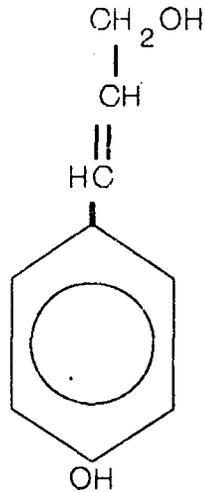


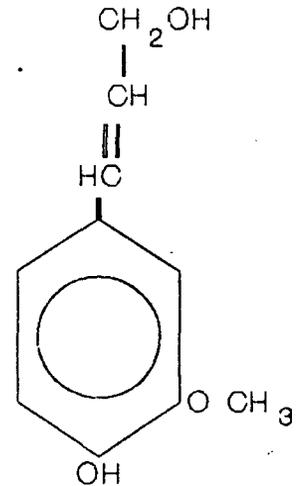
Fig. 4 *Hemicelulosa (D-Xilana)*



**Alcohol
Trans-Sinaptilico**



**Alcohol
Trans-P-Cumarilico**



**Alcohol
Trans-Coniferilico**

Fig. 5 Monomeros fundamentales de la lignina

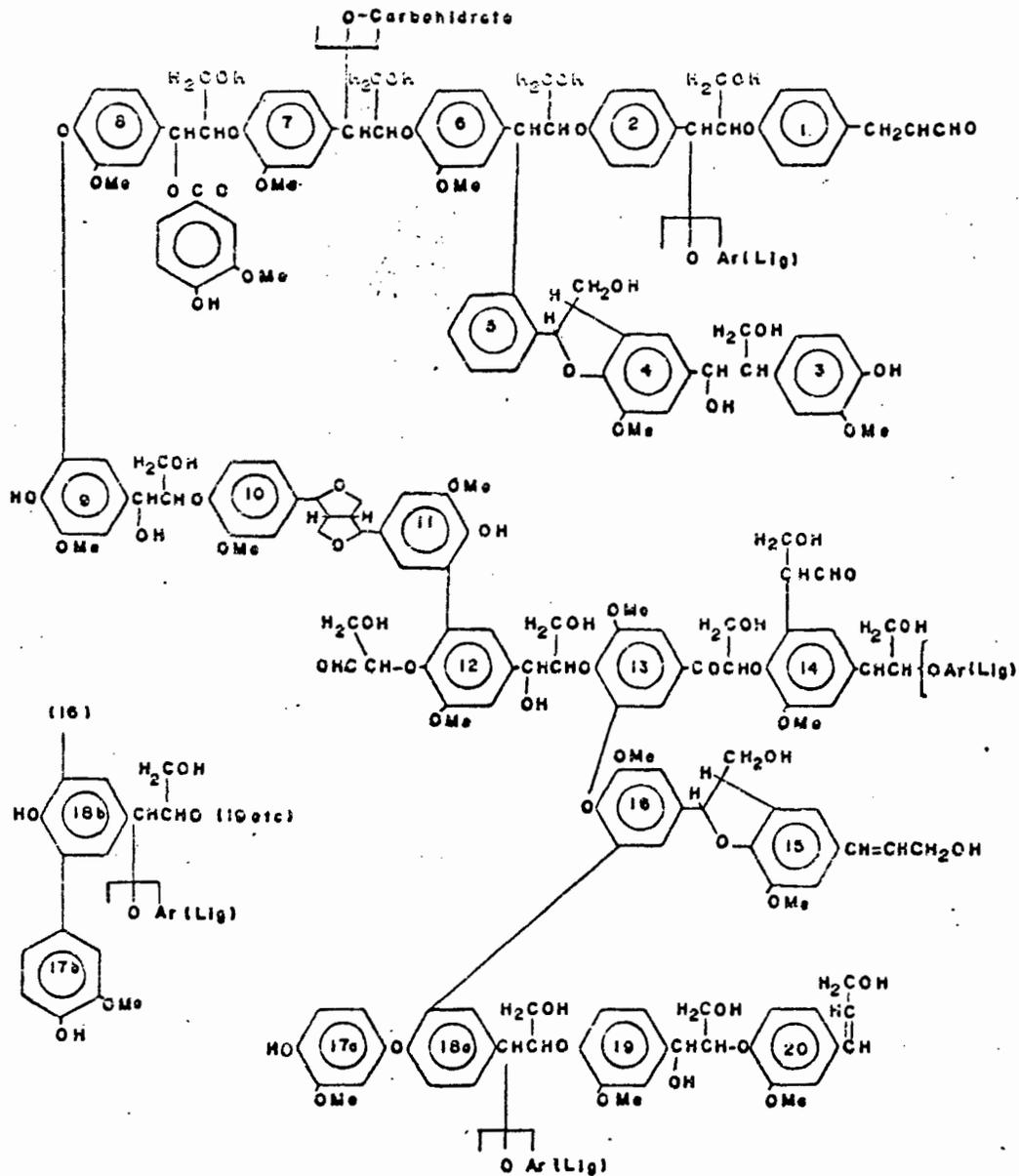


Fig. 6 *Molécula hipotética de lignina*

MICROORGANISMO

La degradación microbiana y transformación de la lignina (Eriksson (a) 1985), (Wu Leo y Col. 1979) muestra que mientras muchos organismos en varios grupos pueden causar alteraciones menores a las moléculas de lignina o desarrollarse en los productos de degradación de ésta (Leatham y Col. 1990), (De la Torre 1985), sólo un grupo de organismos parece ser capaz de descomponer o asimilar la lignina completamente (Eriksson y Col. 1980). El grupo de hongos basidiomicetos son los que realizan la pudrición blanca y descomposición sobre el suelo de restos de plantas (Kirk 1985), (Triana y Col. 1990). Se han encontrado enzimas fenol-oxidasas extracelulares durante el crecimiento de estos hongos (Kirkpatrick y Col. 1987), (Leisola y Col. 1982), (Roch y Col. 1989), aunque es posible que un poco de las enzimas que depolimerizan la lignina permanezcan unidas a las hifas de éstos (Levonen-Munoz y Col. 1985), (Kantelinen y Col. 1988) .

Es de interés hacer notar que la mayor parte de los enlaces de la lignina no son fáciles de romper, ya que ésta difiere de la mayor parte de los polímeros biológicos (Eriksson y Col. 1983), en que la depolimerización no es hidrolítica y puede requerir de coenzimas para ello (Kirkpatrick y Col. 1989) (Leisola y Col. 1982), (Aster y Col. 1988), (Trotter P. 1990 part. 2). Kirk ha demostrado que la lignina no puede ser degradada o servir como sustrato de crecimiento en ausencia de otros sustratos como celulosa y glucosa ya que para degradar 5 mg de lignina por el hongo *Phanerochate chrysosporium* requiere la energía proporcionada por 100 mg de glucosa (Wiseman y Col. 1980), (Kirk 1885), (Yang y Col. 1980).

Los requerimientos fisiológicos para la degradación de la lignina han sido estudiados detalladamente por Eriksson (Eriksson y Kirk 1985), utilizando el hongo *P. chrysosporium*, el cual posee la cualidad de degradar la lignina utilizando enzimas extracelulares (fenol-oxidasas); la producción de estas ha sido observada en las siguientes condiciones:

- Pueden ser producidas en ausencia de lignina.
- Sólo son expresadas a través del metabolismo secundario del hongo.
- Son inducidas cuando en el medio de cultivo se limita en carbono, azufre o nitrógeno.
- Son fuertemente reprimidas por la presencia de glutamato y la de otros aminoácidos.
- Es bastante sensible al suministro de metales traza.
- Posee un pH óptimo relativamente estrecho (4-5). y
- Son marcadamente afectadas por la concentración de O_2 .

El *P. chrysosporium*, además de pertenecer a los hongos de pudrición blanca, posee algunas cualidades que favorecen su aplicación en el tratamiento de residuos lignocelulósicos, (Kent kirk 1985) (Eriksson y col. 1980) debido a su:

- Rápido crecimiento
- Rápida degradación de la lignina
- Abundante formación de esporas en forma asexual
- Ciclo sexual fácilmente completado
- Tiene una temperatura óptima relativamente alta (38-39°C).

Los hongos de pudrición blanca son utilizados de una manera efectiva, para la deslignificación de algunos esquilmos agrícolas, lográndose un incremento en su digestibilidad de la fracción de celulosa, por parte de los microorganismos del rumen. Se considera que el hongo *P. chrysosporium* (Eriksson (b) 1985) , posee un gran potencial en el tratamiento de residuos agrícolas con el fin de producir alimentos para rumiantes ricos en energía.

FERMENTACION

La definición moderna de fermentación es alguna acción microbiana controlada por el hombre originando subproductos que le sean útiles (Kirk-Othmer 1978).

Durante la realización de una fermentación se puede distinguir: un desarrollo o aumento en la cantidad de biomasa; una asimilación o transformación de sustrato a sustancias asimilables por los microorganismos; además se realiza una biosíntesis o formación de compuestos que el microorganismo necesita para el sostenimiento de las actividades normales de su vida; y una desasimilación o expulsión de los desechos provenientes de la transformación de compuestos de alta energía en otros de baja energía.

Al efectuar una fermentación siempre se tiende a la elaboración de la mayor cantidad de producto, en el menor tiempo posible. Para lograr esto, es necesario mantener ciertas condiciones como la temperatura, pH, agitación, la alimentación de aire, la ausencia de otros microorganismos, etc., lo que nos representa las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo. Como consecuencia el fermentador debe estar equipado con los medidores y controladores necesarios.

Cuando el sustrato es un material insoluble la fermentación se puede efectuar en un sistema sumergido en donde se encuentra éste en suspensión acuosa. Sin embargo, para el caso de sustratos insolubles es posible efectuar la fermentación en un sistema en donde la humedad se ajusta en valores que permiten que el sistema sustrato-microorganismo se manejen como un sólido. A este tipo de fermentación se le ha denominado fermentación semisólida.

Fermentación semisólida.

Las principales diferencias entre fermentación sumergida y semisólida se señalan en la tabla siguiente:

	Fermentación	
	Sumergida	Semisólida
Tipo de medio de cultivo.	Líquido	Sólido
Accesibilidad del microorganismo.	Alta	Baja
Energía necesaria.	Mayor	Menor
Tiempo de fermentación.	Menor	Mayor
Costo por fermentación.	Mayor	Menor
Volumen requerido.	Mayor	Menor
Transferencia de oxígeno.	No eficiente	Eficiente
Recuperación del producto.	Difícil	Fácil
Medición y control de parámetros.	Fácil	Difícil

Como se observa en la tabla anterior la fermentación semisólida posee características técnicas importantes en relación al sistema sumergido, cuando el producto que se pretende desarrollar es de bajo costo, como es el caso de los forrajes, por estas razones se optó por emplear el sistema semisólido en este estudio.

En el caso de la fermentación de un sustrato sólido, para minimizar el tiempo del procesos se deben atender los siguientes aspectos: primero los concernientes a la morfología del mismo, como es la forma física, relación masa-volumen (densidad), naturaleza cristalina o amorfa, difusividad, porosidad, transferencia de masa desde y hacia la superficie del sólido, etc. El segundo es el asociado con las macromoléculas que van a ser parcialmente hidrolizadas fuera de la célula a subunidades para que puedan pasar a través de la membrana celular.

También es muy conveniente atender los aspectos relacionados con el tipo de microorganismo utilizado, ya que entre sí, en estos difiere grandemente su comportamiento tanto enzimático como constitutivo.

MATERIALES Y METODOS

Se adquirió Bagazo de caña de azúcar del ingenio Melchor Ocampo (Autlán, Jal.), durante la zafra 1988-1989. El cual se secó a temperatura ambiente y se guardó.

El hongo utilizado para la realización de las fermentaciones semisólidas fue el *Phanerochaste chrysosporium*, que se encuentra en la colección del Instituto de Madera, Celulosa y Papel.

PROPAGACION DEL MICROORGANISMO

La propagación del microorganismo se realizó en matraces erlenmeyer de 500 ml, con un volumen de medio de 100 ml, los cuales se colocaron en un agitador de matraces LAB-LINE Mod. 3527, a 200 RPM, durante 48 horas y a temperatura de 28° C.

El medio de cultivo utilizado para la propagación fue el siguiente: glucosa 10 g/l; extracto de levadura 1.5 g/l; fosfato de potasio monobásico 2 g/l; sulfato de amonio 2 g/l; cloruro de sodio 2 g/l; sulfato de magnesio 3 g/l; cloruro de calcio 3 g/l; y una solución de metales traza (Co, Fe, Zn, Mn) 10^{-4} M. Todo se ajustó a un pH 5.

Se esterilizó y se inculó con una suspensión de esporas, proveniente de un tubo inclinado de resiembra reciente.

El micelio obtenido se filtró y se lavó con agua; se fraccionó en una licuadora durante un minuto, acompañado por el líquido necesario para ajustar: la humedad (65, 70 y 80%) y el pH (3, 4, 4.5 y 5). Lo que sirvió de inóculo para el bagazo de caña. Todo lo anterior se realizó en condiciones asépticas.

Se colocaron 21.6 gr base seca (BS) de bagazo de caña integral en matraces erlenmeyer de 1,000 ml, se esterilizaron a 121°C por 15 minutos y se inocularon con 0.6 gr BS de micelio; procurando que bagazo y microorganismo quedaran bien mezclados. Los cuales se incubaron a 26°C durante 10, 15 y 30 días.

Al terminar el tiempo de incubación se secó el contenido del matraz a temperatura ambiente, se homogenizó y se tomaron muestras para su análisis.

TECNICAS DE ANALISIS

Análisis químico de los materiales.

Los análisis practicados al bagazo de caña de azúcar y productos de la fermentación fueron: extraíbles en agua caliente (TAPPI 1975); cenizas (TAPPI 1985) por quemado de la materia orgánica a 600°C; concentración de nitrógeno, por el método micro-Kjeldahl (A.O.A.C., (1980).

La determinación de la digestibilidad del material lignocelulósico se realizó utilizando un método modificado de la bolsa de nylon (Mehrez, y Col. 1977). Dentro de una bolsa se colocaron 0.3 g. de muestra molida, y se introdujo al estómago de una vaca fistulada durante 72 horas. Una vez transcurrido este período, se sacó la bolsa se lavó con agua corriente para eliminar el exceso adherido en el exterior de ésta, y se secó a 90 °C hasta peso constante. La digestibilidad se determinó por pérdida de peso. Las bolsas de nylon (5.5 x 9 cm) fueron elaboradas con tela con porosidad de 25 μm . El tamaño de las partículas de la muestra pasaron la malla 20 y se retuvo en la 30.

Quince días antes de iniciar las pruebas de digestibilidad, la vaca se ajustó a la siguiente dieta: dos kilos de alimento concentrado para engorda y silo de maíz la cantidad que quisiera consumir por día. Todo esto nos aseguró una fauna ruminal constante y abundante en degradadores de materiales lignocelulósicos.

La determinación de carbohidratos de materia prima como del material fermentado se efectuó de la siguiente manera: Primeramente se hidrolizó el material de acuerdo a la técnica de Seaman (1954) la cual consistió en colocar 0.3 g de material previamente molido en un tubo de ensaye con 3 ml de ácido sulfúrico al 72%, se incubó la muestra durante una hora a 30°C ; posteriormente se transfirió el material y se agregaron 84 ml de agua para ajustar la concentración del ácido sulfúrico a un valor de 4% , se continuó la hidrólisis en autoclave a 120 °C durante una hora. El análisis cuantitativo de los carbohidratos se realizó por cromatografía líquida de intercambio iónico de complejos de boratos (Sinner, 1975), utilizando ácido bicínónico para su detección (Sinner, 1978).

El contenido de lignina se determinó cuantificando el residuo insoluble obtenido después de la hidrólisis de los carbohidratos y corregido con cenizas.

La determinación del consumo de materia original del material lignocelulósico se realizó por diferencia de peso de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis de los componentes fundamentales del bagazo de caña de azúcar y la determinación cuantitativa de los monosacáridos obtenidos por la hidrólisis de los polisacáridos; donde se pueden apreciar que los componentes más abundantes son: la lignina 19.6% y los carbohidratos 59%, de los cuales sólo son degradables el 47.52%.

Las tablas 2,3 y 4 muestran los resultados de los análisis practicados al bagazo de caña después de haber sido tratado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*.

En las Gráficas 1,2 y 3 se puede observar la tendencia de la digestibilidad respecto al tiempo de incubación, a diferentes valores de pH y humedad. En la primera gráfica se observa sólo un incremento de la digestibilidad durante sus primeros 10 días de tratamiento para luego mantenerse casi constante, mientras que en la tercera gráfica se aprecia que la mayor digestibilidad se alcanza a los 15 días de tratamiento, seguido de un decremento de ésta.

El incremento de la digestibilidad nos indica que una vez que son consumidos los carbohidratos remanentes, se activa el metabolismo secundario del hongo (Kirk, 1985), lo que inicia la degradación de la lignina mediante la producción de las enzimas fenol-oxidasas (Jeffries y col. 1981); iniciando así el incremento de los espacios intercelulares accesibles a las enzimas extracelulares de los microorganismos ruminales.

En las Gráficas 4,5,6 y 7 podemos observar claramente una marcada influencia de la humedad con respecto a la digestibilidad obtenida; ya que en casi todos los pH, la mayor digestibilidad se obtiene a los 15 días de tratamiento con un 80% de humedad; a excepción de pH 3, donde esta es baja; debido principalmente a que el pH óptimo del desarrollo del hongo *Phanerochaete chrysosporium* es entre 4 y 5 (Erikson (b) 1985).

La mayor digestibilidad obtenida fue de 68.85%, con los siguientes parámetros: pH 4, con 15 días de tratamiento y 80% de humedad, por lo que estamos hablando de un incremento de digestibilidad de 21.3%, con respecto a la del material original, reportado en la Tabla 1.

Con el propósito de ahorrar tiempo en la parte experimental de este trabajo, sólo a los ensayos que mostraron mayor digestibilidad se les determinaron carbohidratos y lignina; así como también, de cenizas y pérdida de materia seca a las muestras tratadas a pH 4, por ser el parámetro con el que se obtuvieron los mayores incrementos de digestibilidad.

Las Gráficas 8 y 9, nos muestran la tendencia que sigue la cantidad de sustancias extraíbles en agua caliente presentes en el material después del tratamiento, con respecto al tiempo de incubación del bagazo de caña. Donde podemos observar que a los primeros días de tratamiento hay un decremento de éstos (primeros 15 días), seguido de un incremento de los mismos (últimos 15 días), llegando a ser mayor que los reportados para el bagazo antes de dicho tratamiento. Así también podemos ver, que conforme se aumenta el pH y la humedad, también se incrementa la cantidad de extraíbles.

Lo anterior se debe principalmente a que al inicio del tratamiento, el hongo utiliza la sacarosa remanente para realizar su crecimiento primario (Jeffries y Col. 1981), razón por la que baja la cantidad de extraíbles; y el aumento de estos mismos, es debido a la generación de moléculas pequeñas (carbohidratos y lignina) causadas por el ataque del hongo a las sustancias estructurales del bagazo (Kirk, 1985) (Erikson (b) 1985) (Jeffries y Col. 1981).

La Gráfica 10, nos indica la variación del consumo de materia original en función del tiempo de incubación; donde podemos observar una tendencia general a incrementarse conforme aumenta el tiempo de tratamiento; aunque la menor pérdida de materia se observa con una humedad del 80%, siendo también el parámetro con el que se obtiene la mayor digestibilidad.

Corroborando lo mencionado en los párrafos anteriores con los datos correspondientes al consumo de materia original (Gráfica 10), podemos señalar que durante los primeros días de tratamiento, se aprecia una elevada pérdida de este material, fenómeno que se atribuye principalmente, al consumo de la sacarosa remanente en el bagazo, apreciándose un rápido desarrollo del hongo. Enseguida se activa el metabolismo secundario para degradar la lignina y poder tener disponibilidad de carbohidratos de la celulosa presente (Kirk 1987).

La degradación de los carbohidratos estructurales del bagazo de caña tratado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* es bajo, como lo muestra la Gráfica 11, ya que el total de glucosa y xilosa consumidos por éste, a los 30 días de tratamiento fue de 8.2 y 5.2%, respectivamente; el leve incremento que se aprecia en el contenido de la lignina, se debe simplemente a que al bajar la concentración de carbohidratos se eleva proporcionalmente la de ésta.

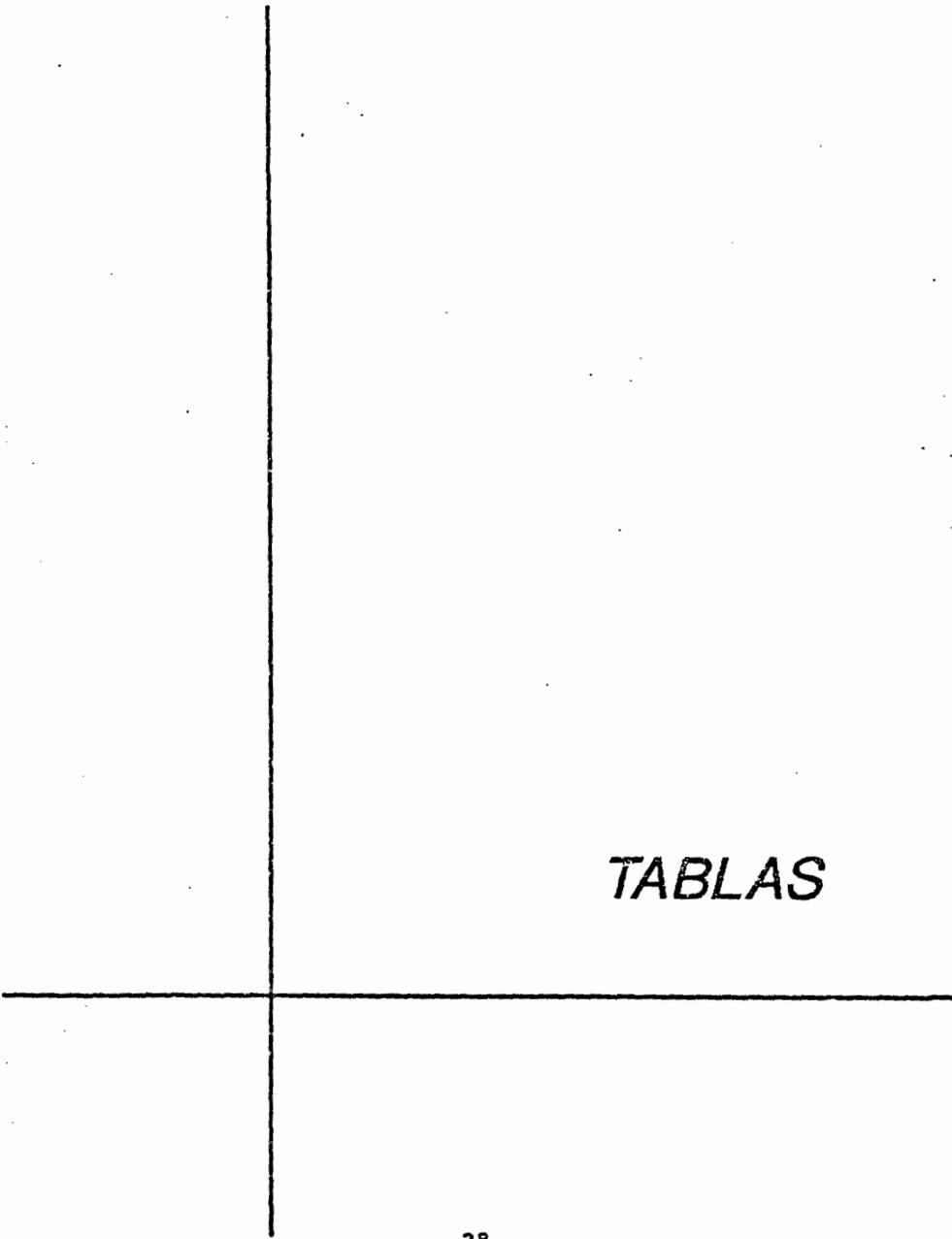
Como se señaló en la sección de métodos y materiales, al bagazo de caña no se le adicionó ningún nutrimento en el momento de iniciar el tratamiento con el hongo; esto en base a lo concluido por varios investigadores (Jeffries 1981)(Eriksson and Kirk 1985) (Kirk 1985) (Eriksson (a) 1985), ya que reportan que este hongo activa su mecanismo secundario cuando experimenta agotamiento de nitrógeno y carbohidratos principalmente. Podemos apreciar en la Gráfica 12 y en las tablas 2,3, y 4 que la cantidad de nitrógeno durante el tratamiento no cambia de manera considerable.

Reuniendo la información plasmada en las Gráficas 10, se puede apreciar que el agotamiento de carbohidratos remanentes (sacarosa), se presenta durante los primeros 10 días de tratamiento del bagazo por el hongo; lo que significa que en este momento se activó el mecanismo secundario del hongo para iniciar la degradación de la lignina presente.

Resumiendo: las condiciones de tratamiento a las cuales se obtuvo la mayor digestibilidad del bagazo fueron: humedad de 80%, pH 4 y un tiempo de fermentación de 15 días. La mayor digestibilidad que se obtuvo a esas condiciones mediante el tratamiento biológico realizado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, fue del 68.85%, obteniendo un incremento real del 21.3%, con respecto al bagazo sin tratar.

CONCLUSIONES

- La ruptura del micelio del hongo antes de inocular el bagazo, reduce el tiempo de fermentación; o sea cada pequeño trozo de micelio separado se convierte en un nuevo individuo, por lo que se incrementa notablemente la cantidad de organismos que están en condiciones de desarrollarse sobre el sustrato y colonizarlo y degradarlo más rápidamente.
- No es conveniente fermentar el bagazo de caña un período mayor de 15 días, ya que no se logra ningún incremento en la digestibilidad y no menor al tiempo necesario para que se active el metabolismo secundario del hongo y se liberen las enzimas lignolíticas.
- Al no haber una selectividad sobre el consumo de lignina en relación a carbohidratos, el costo de la materia prima debe jugar un papel importante en la economía del proceso.



TABLAS

Tabla 1 Resultados del análisis del Bagazo de Caña Integral

Análisis	(%)
Glucosa	42.4
Xilosa	16.6
Lignina	19.6
Extraíbles en agua caliente	12.83
Cenizas	9.45
Nitrógeno	0.353
Digestibilidad	47.52

Tabla 2 Resultados del análisis de Bagazo de Caña fermentado con *Phanerochaete chrysosporium* a 65 % humedad y diferentes valores de pH y tiempo

Tiempo de tratamiento	pH	Digestibilidad %	Nitrógeno %	Consumo de Materia Original %
10	3	53.61	.656	18.23
10	4	59.33	.650	14.37
10	4.5	54.87	.657	15.89
10	5	52.61	.736	15.17
15	3	55.61	.683	21.31
15	4	58.63	.651	20.39
15	4.5	54.52	.583	18.71
15	5	54.65	.640	36.41
30	3	54.88	.584	34.34
30	4	56.52	.854	33.70
30	4.5	53.20	.858	33.81
30	5	54.78	.796	36.41

Tabla 3 Resultados del análisis del Bagazo de Caña fermentado con *Phanerochaete chrysosporium* a 70 % de humedad a diferentes valores de pH y tiempo

Tiempo de tratamiento	pH	Digestibilidad %	Nitrogeno %	Extraíbles %	Cenizas %	C.M.O %
10	3	56.19	.647	10.33		
10	4	56.80	.636	12.52	9.356	17.4
10	4.5	58.96	.752	13.88		
10	5	53.22	.691	12.03		
15	3	55.86	.500	12.57		
15	4	59.03	.624	10.90	9.394	20.9
15	4.5	59.01	.633	10.67		
15	5	59.80	.644	11.09		
30	3	57.12	.598	13.59		
30	4	59.98	.711	14.34	9.895	38.1
30	4.5	59.44	.649	13.09		
30	5	60.15	.710	15.10		

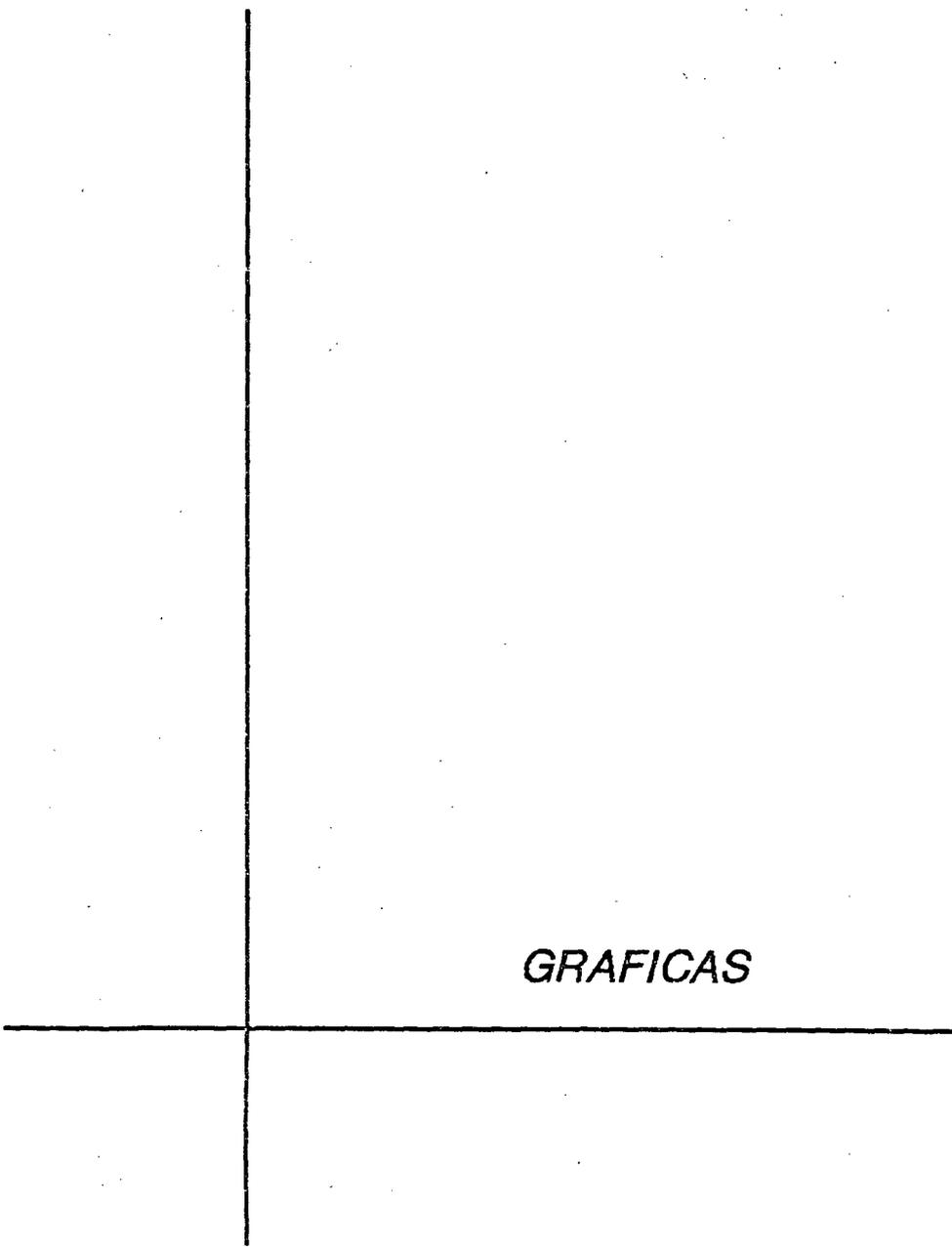
• C.M.O.- Consumo de materia Original

Tabla 4 Resultados del análisis de Bagazo de Caña fermentado con *Phanerochaete chrysosporium* a 80 % de humedad a diferentes valores de pH y tiempo

Tiempo de tratamiento	pH	Digestibilidad %	Nitrógeno %	Glucosa %	Xilosa %	Extr. %	Lignina %	Cenizas %	C.M.O %
10	3	56.77	.638			12.71			
10	4	58.60	.698	40.5	14.6	13.47	22.00	9.310	12.97
10	4.5	59.55	.606			10.91			
10	5	59.37	.637			11.59			
15	3	57.03	.611			13.91			
15	4	68.85	.628	41.4	14.7	16.07	20.80	9.245	23.91
15	4.5	63.88	.686			12.76			
15	5	65.62	.671			14.38			
30	3	57.63	.628			12.60			
30	4	57.03	.786	34.2	11.4	21.25	22.10	9.245	29.01
30	4.5	57.19	.669			16.27			
30	5	58.76	.693			29.17			

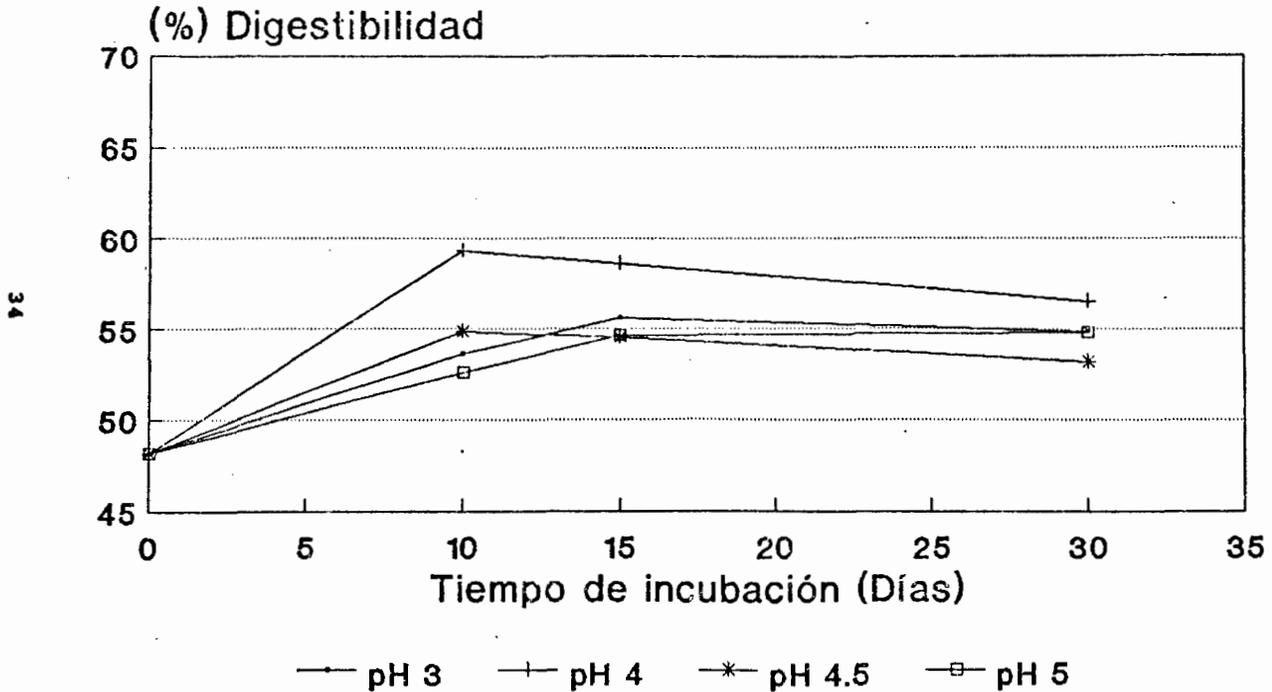
32

- C.M.O.- Consumo de materia Original
- Ext.- Extraíbles

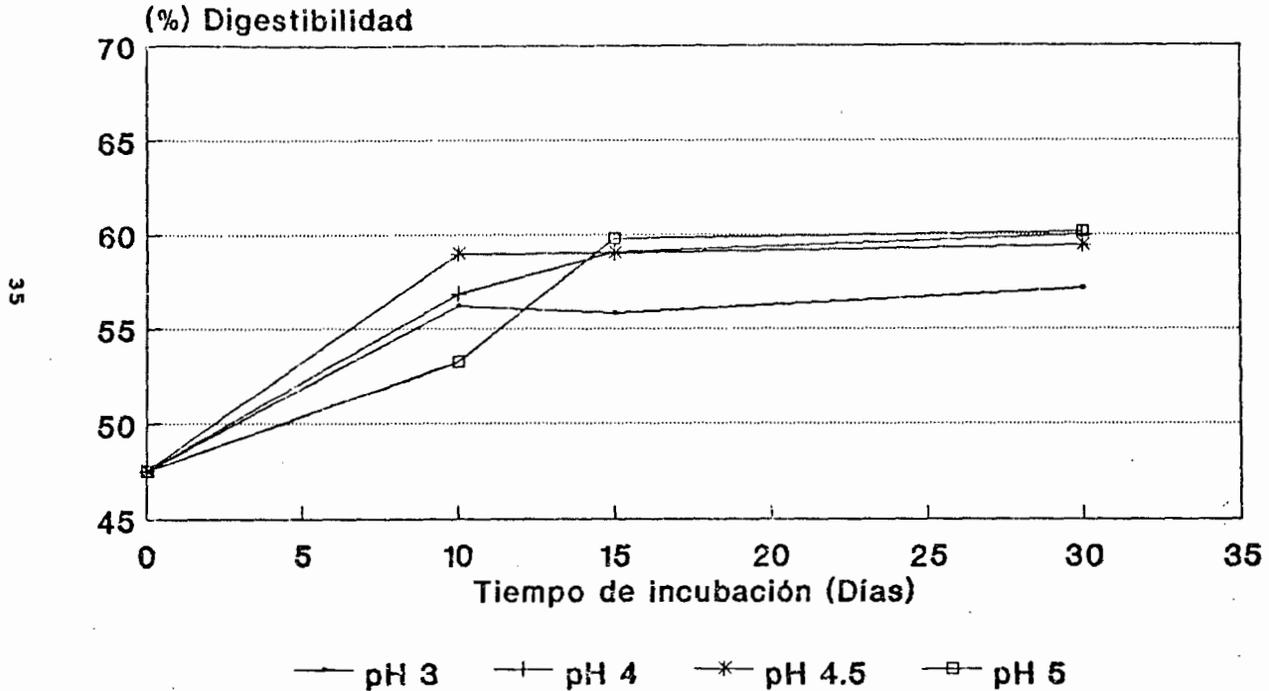


GRAFICAS

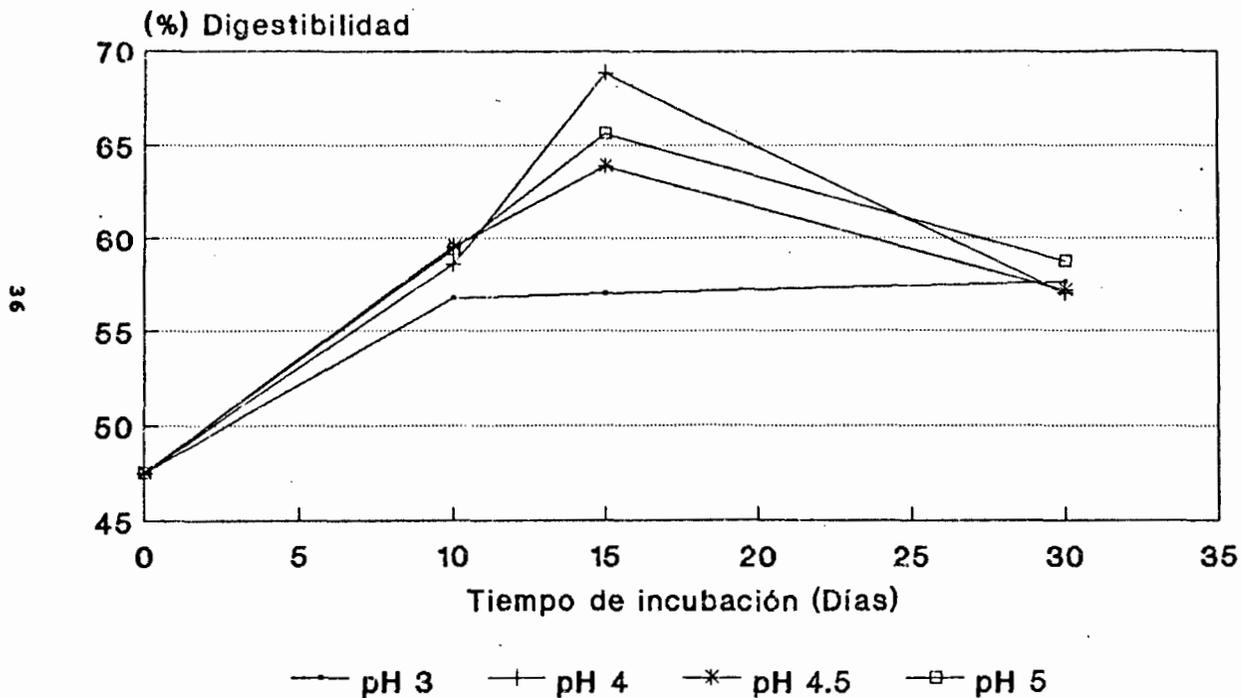
Graf 1 Efecto del tiempo de fermentación y pH sobre la digestibilidad "in situ" de Bagazo de caña a 65 % de humedad



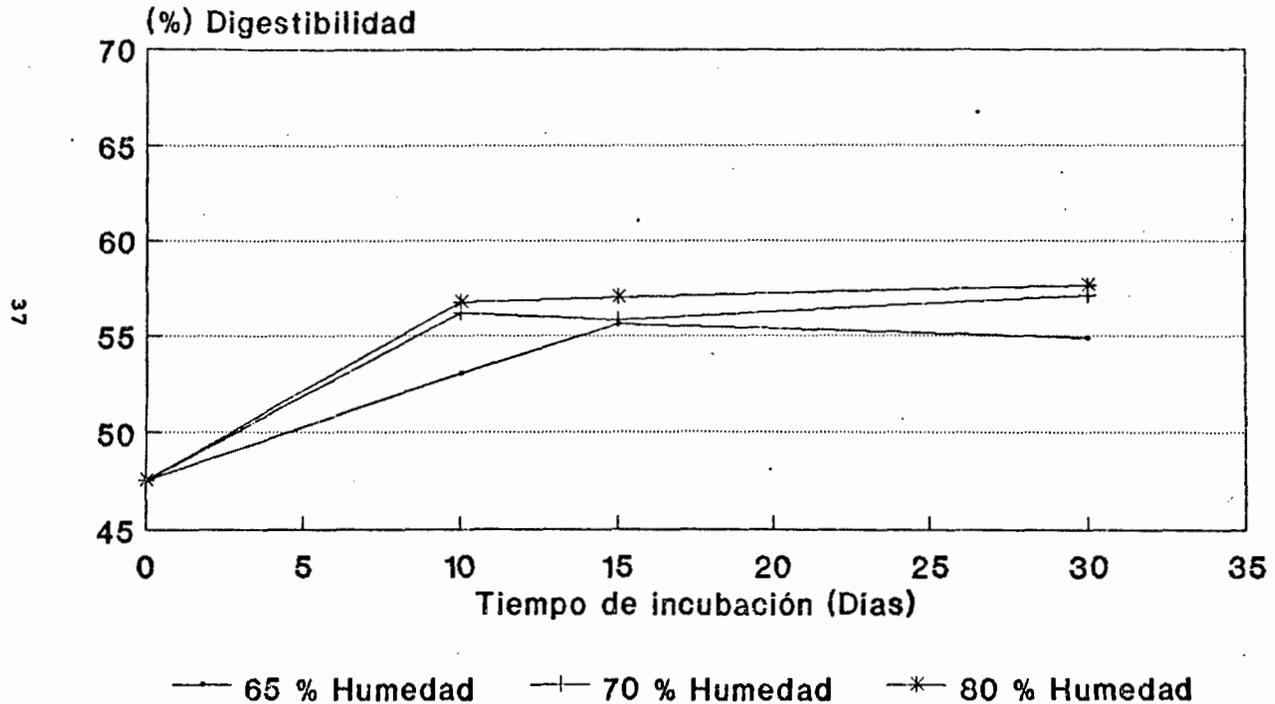
Graf 2 Efecto del tiempo de fermentación y el pH sobre la digestibilidad "in situ" de Bagazo de caña a 70 % de humedad



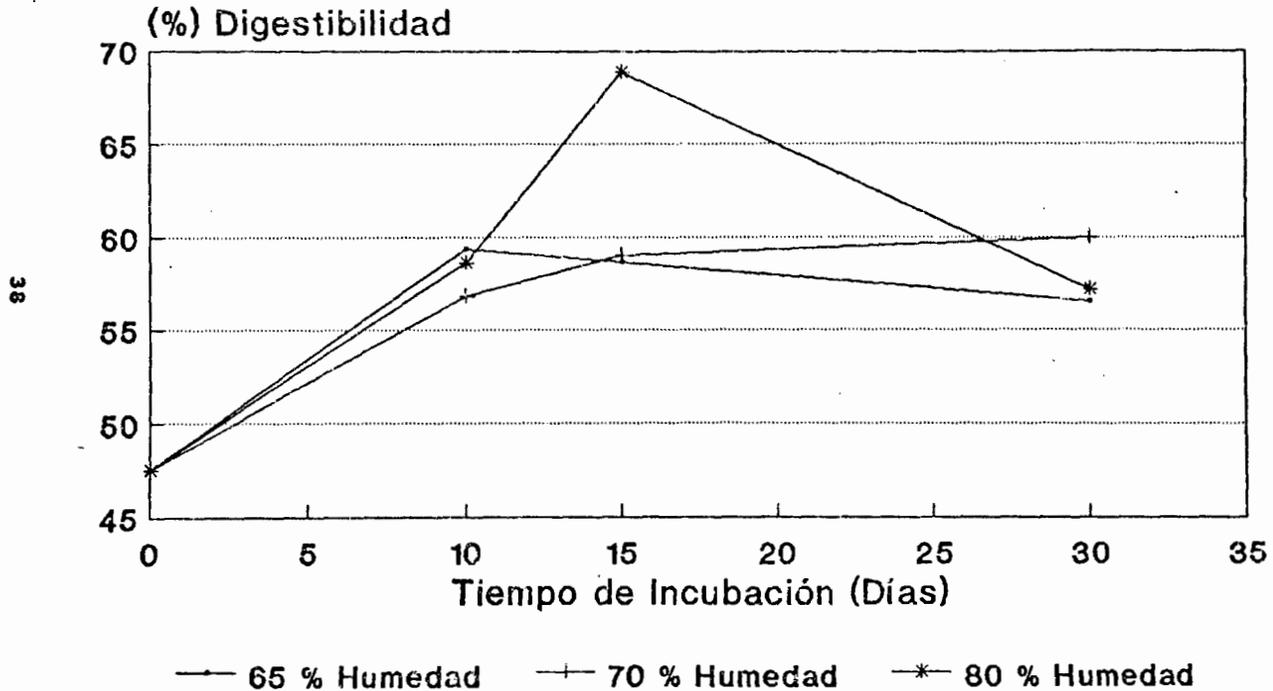
Graf 3 Efecto del tiempo de fermentación
y el pH sobre la digestibilidad "in situ"
de Bagazo de caña a 80 % de humedad



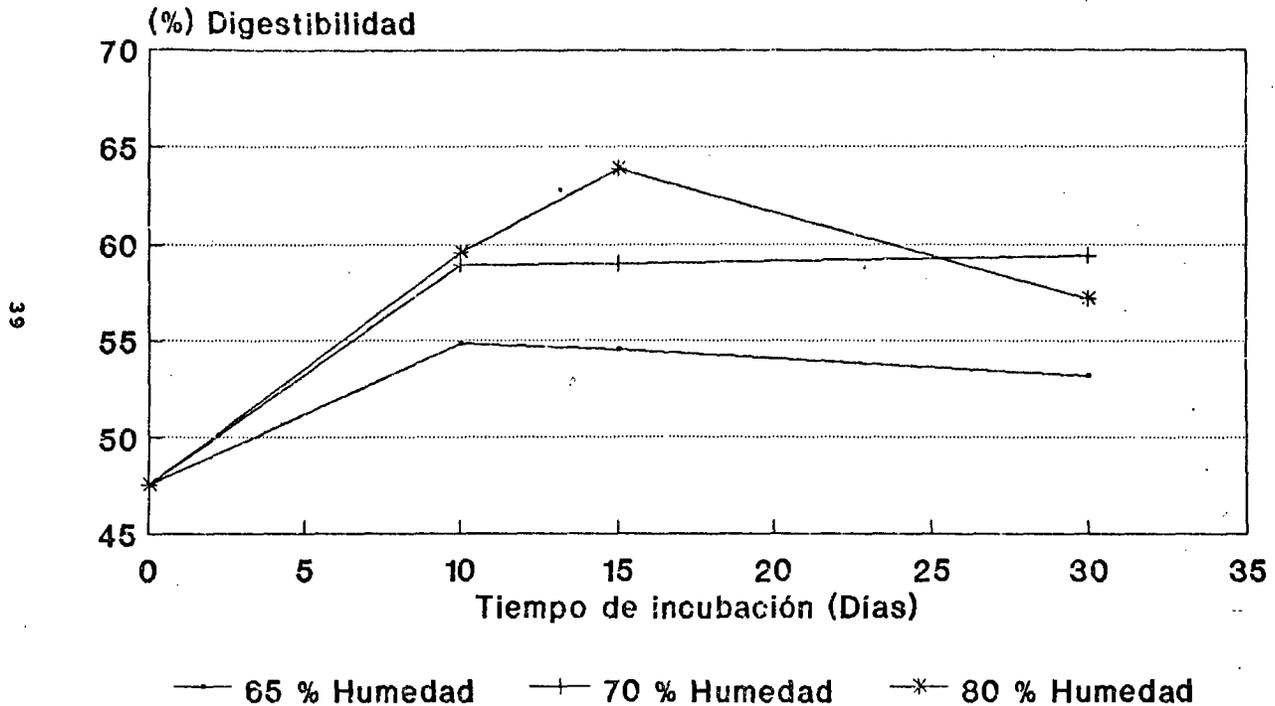
Graf 4 Efecto de tiempo de fermentación
y la humedad sobre la digestibilidad
"in situ" de Bagazo de caña a pH 3



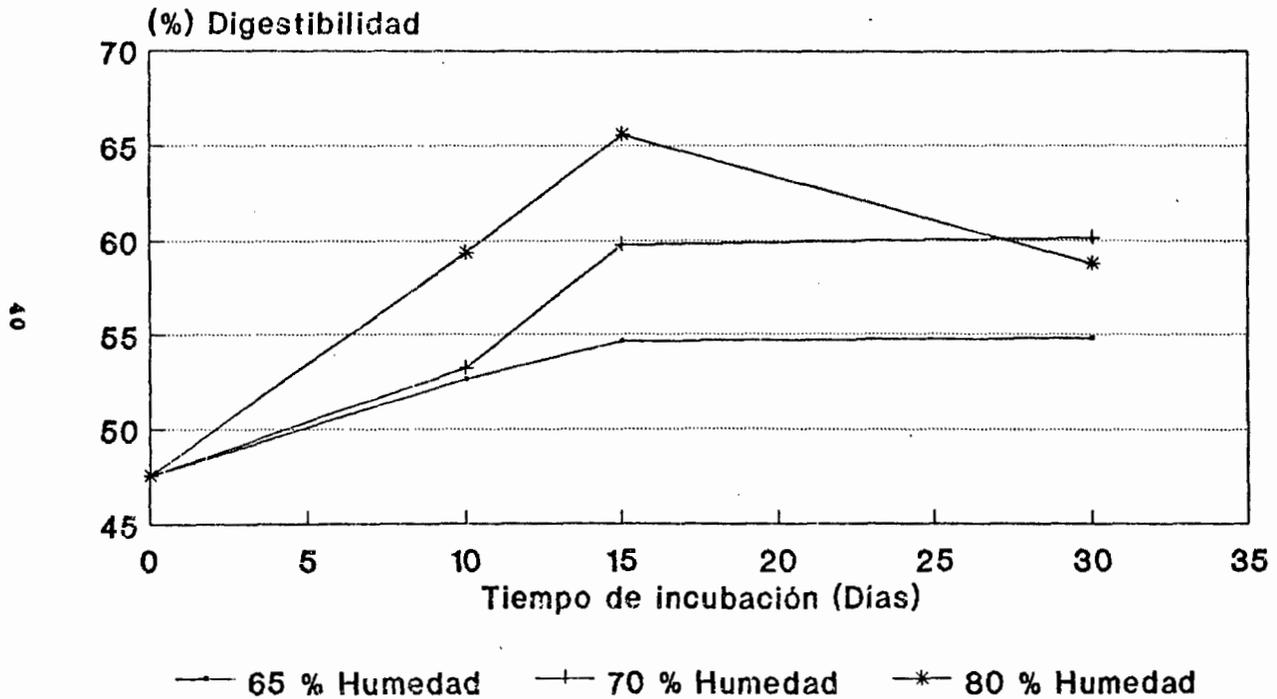
Graf 5 Efecto del tiempo de fermentación y humedad sobre la digestibilidad "in situ" de Bagazo de caña a pH 4



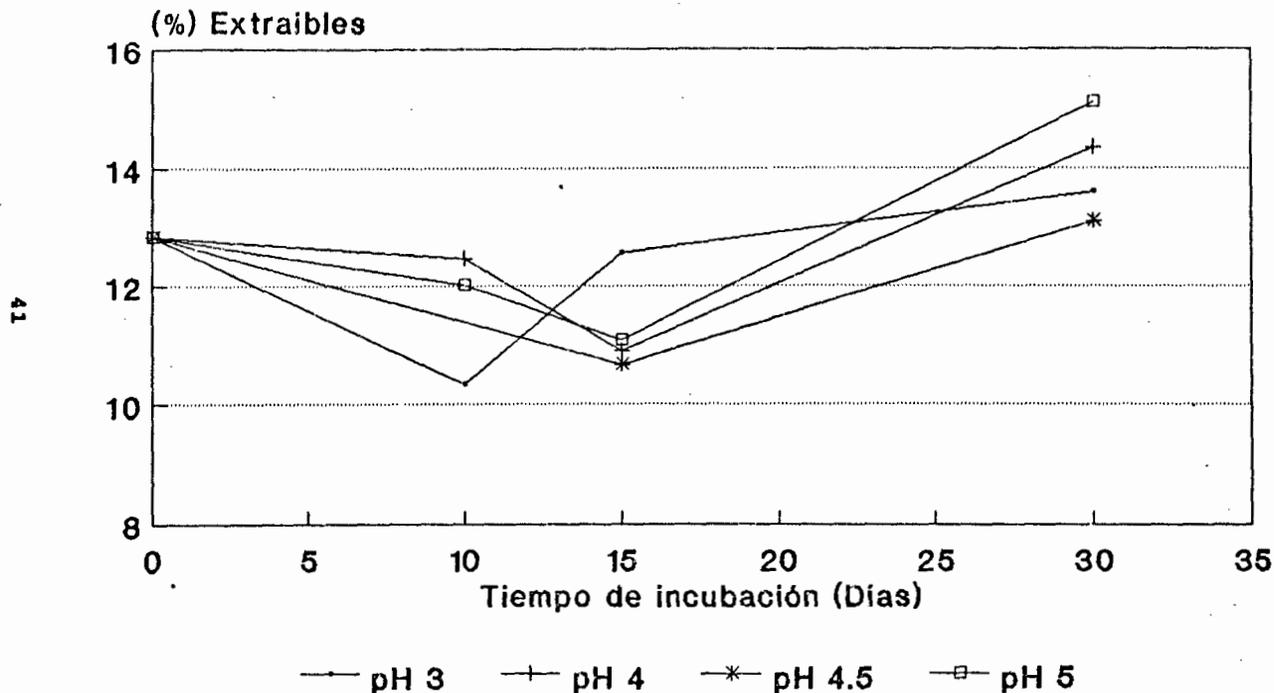
Graf 6 Efecto del tiempo de fermentación
y la humedad sobre la digestibilidad
"in situ" de Bagazo de caña a pH 4.5



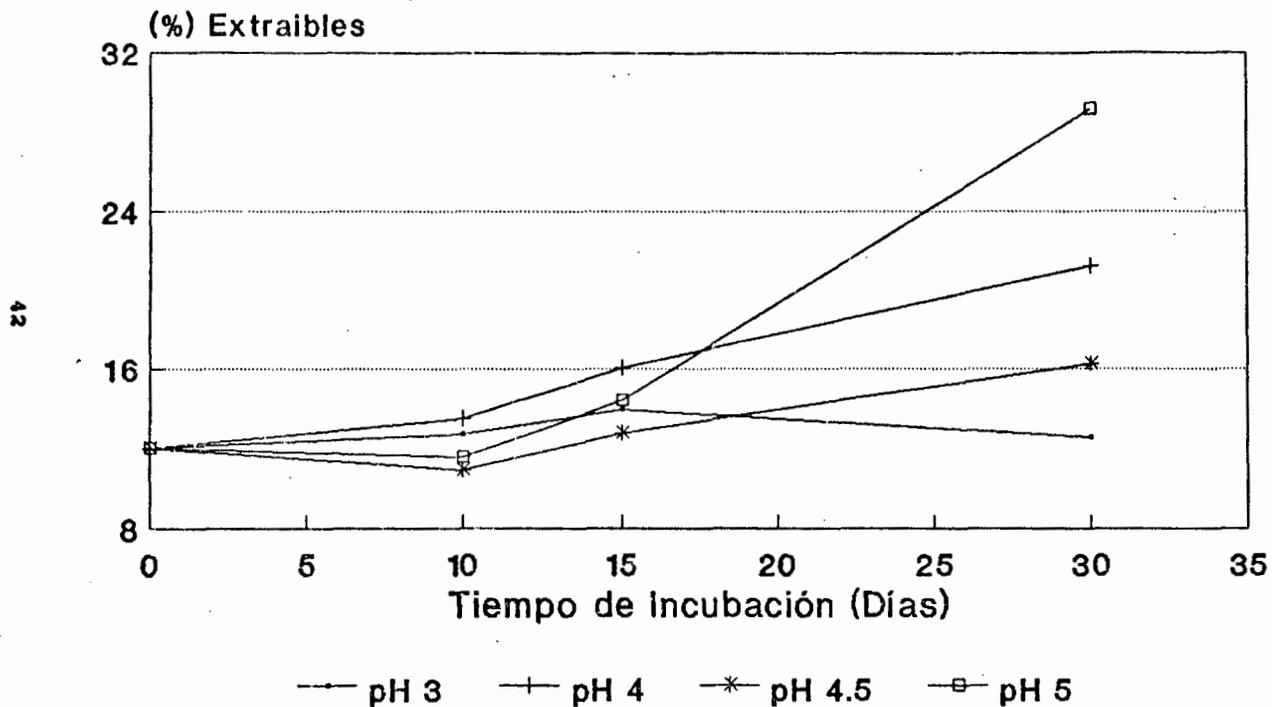
Graf 7 Efecto del tiempo de fermentación
y la humedad sobre la digestibilidad
"in situ" de Bagazo de caña a pH 5



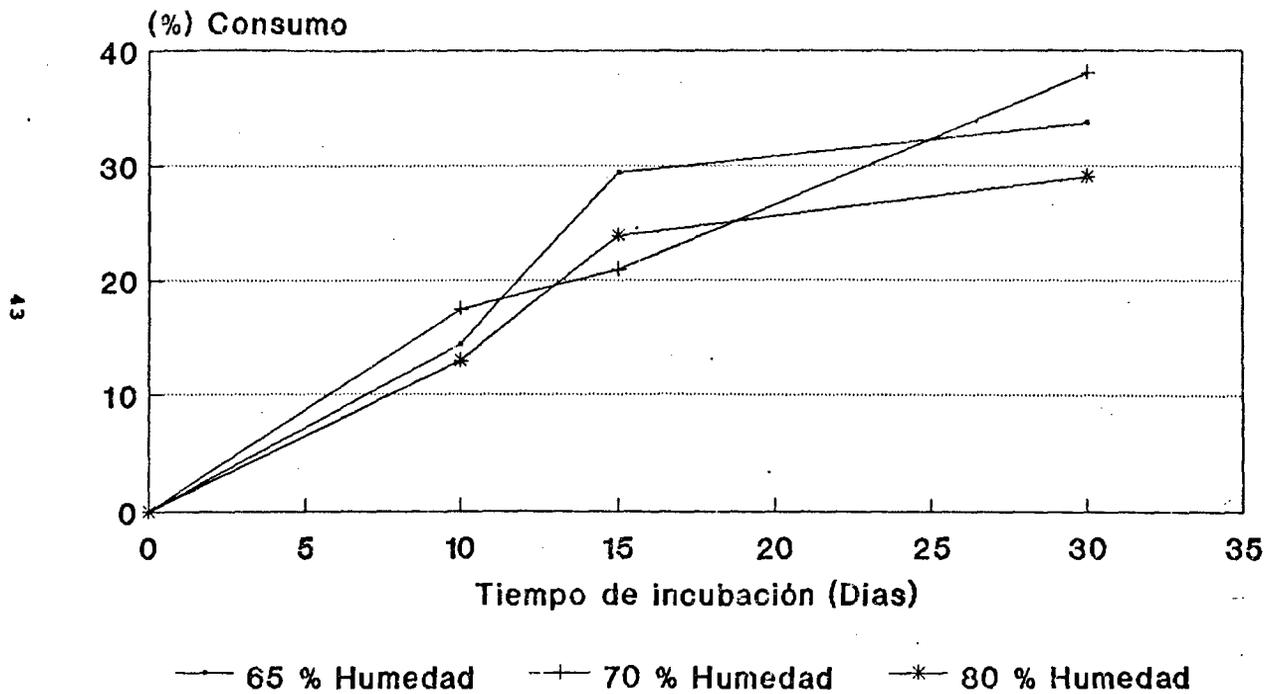
Graf 8 Variación de los extraíbles en agua de Bagazo de caña con respecto al tiempo de fermentación y el pH inicial



Graf 9 Variación de los extraíbles en agua de Bagazo de caña con respecto al tiempo de fermentación y el pH inicial

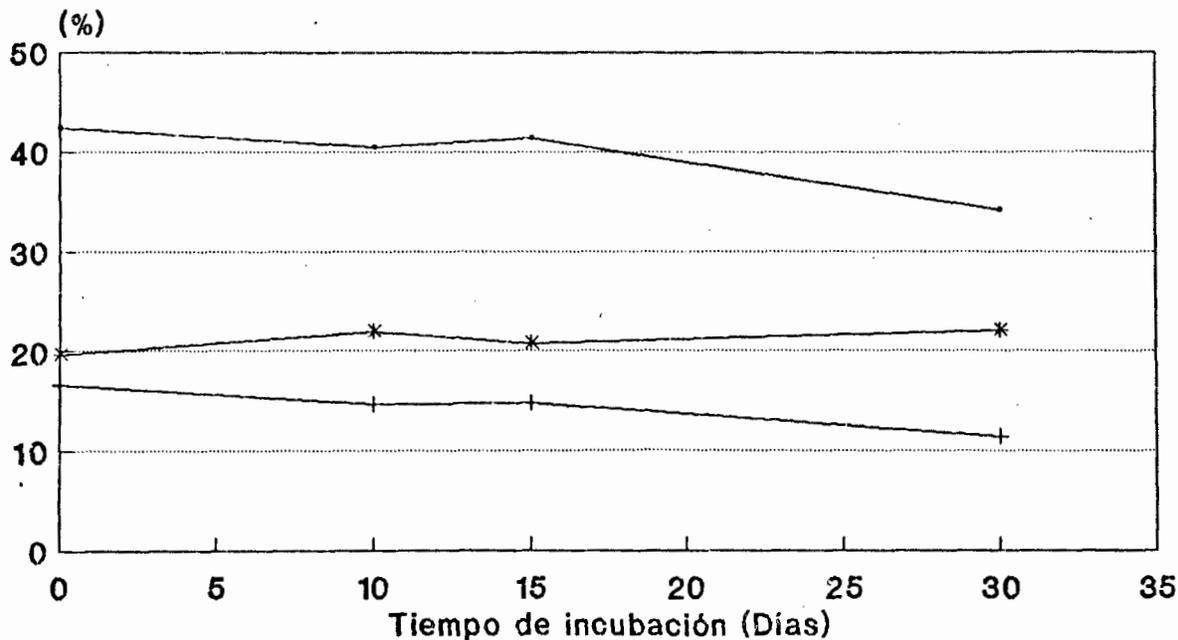


Graf 10 Consumo de Materia original a diferentes tiempos de fermentación y humedad, a pH 4



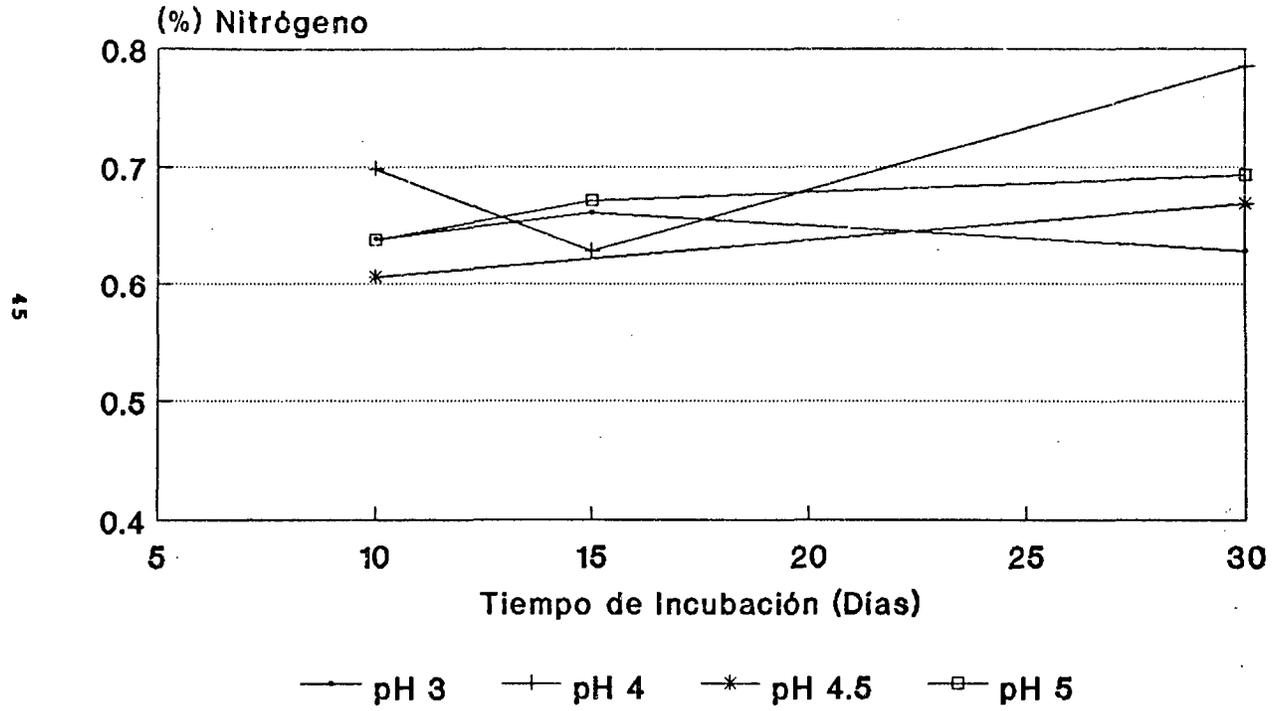
43

Graf 11 Variación del contenido de
Carbohidratos y lignina en función del
tiempo de fermentación a 80 % de humedad
y pH 4



— Glucosa + Xilosa * lignina

Graf 12 Variación del contenido de Nitrógeno en función del tiempo de fermentación a 80 % humedad



BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C., (1980)
Methods of analysis of the association of official
Analytical chemists,
p. 858.

- Asther M., Lesage L., Drapron R., Corrieu G. and Odier E.
(1988)
Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete*
chrysosporium Ina-12 in relation to ligninase production
Applied Microbiology Biotechnology
Vol. 27
p. 393-398.

- Brin, M., (1976)
Nutrient intervention to improve nutritional status, in
food science and technology, part B,
Altschul, A.M. Academic press, U.S.A.
p. 222-238.

- Cabello A. (1988)
Hacia una estrategia del uso de la caña para alimentación
animal
En: Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe
Exportadores de Azúcar (GEPLACEA).
Subproductos y derivados de la agroindustria azucarera
Colección GEPLACEA Serie diversificación
p. 291-303.

- C.N.I.C.P., (1989)
memoria estadística de la Cámara Nacional de la Industria de
la Celulosa y el Papel.

- Core H.A., Côte W.A. and Day A.C. (1979)
Wood Structure and Identification, Second edition,
University Stantion
Syracuse, New York.
p. 25-35.

- De la Torre L.M. (1985)
Aprovechamiento de esquilmos agrícolas y residuos
agroindustriales
En: Quintero R.R.
Prospectiva de la biotecnología en México
Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología
p. 219-234.

- Leal L.H., (1985)
La utilización microbiológica de desperdicios lignocelulósicos, potencialidades y perspectivas.
En: Quintero R.R.
Prospectiva de la biotecnología en México
Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología
p. 93-114.

- Eiko M., e Koga T (1988)
Materias-primas fibrosas; Celulose e Papel Tecnología de Fabricacao da Pasta Celulósica
Vol. I 2a edicao.
Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de Sao Paulo
S.A. Editorial Escola SENAI "Theobaldo de Nigris"
Sao Paulo, Brasil.
p. 15-40.

- El-Nawawy, A.S. (1970)
Utilization of bagasse pith for production of fodder yeast,
Agr. Res. Rev.
Vol.48

- Eriksson K.E., Grünewald A., Vallander L. (1980)
Studies of growth conditions in wood for three white-rot fungi and their cellulaseless mutants.
Biotechnology and Bioengineering
Vol. XXII
p. 363-376.

- Eriksson K.E. (1985) (a)
Potential use of microorganisms in wood bioconversion
In: The Marcus Wallenberg foundation Simposia Proceedings: 2.
New Horizons for biotechnological utilization of the forest resource
Lectures given at the 1985 Marcus Wallenderg symposium in Falun, Sweden, on September 12, 1985.
p. 9-26.

- Eriksson K.E., Johnsrud C.S., Vallander L. (1983)
Degradation of lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*
Archives of Microbiology
Vol. 135
p. 161-168

- Eriksson K.E. (1985) (b, c)
Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry.
TAPPI Journal July 1985
p. 46-55.

- Eriksson K.E. and T.K. Kirk (1985)
Biopulping biobleaching and treatment of kraft bleaching effluents with white-rot fungi
Biopulping Biobleaching Treatment of effluents No. 15
p. 271-294.

- Fernández N., Gutierrez I., López P., Triana O. y Leonard M. (1988)
Biodegradabilidad del bagazo por hongos blancos.
En: Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar (GEPLACEA).
Subproductos y derivados de la agroindustria azucarera
Colección GEPLACEA Serie diversificación
p. 79-100.

- Gálvez, G. (1986)
La industria de los derivados de la caña de azúcar.
Editorial Científico Técnico (La Habana Cuba).
p. 91-130.

- Gutierrez I., Fernández N., López P. (1987)
Avances en la aplicación de la biotecnología en el pulpeo biomecánico del bagazo
Asociación Mexicana de técnicos de las industrias de la celulosa y papel.
p. 27-30.

- Hsie, M.C. (1978)
Microbial protein produced from bagasse pith (3)
Production of single-cell protein on a pilot plant scale,
T'aiwan T'ang Yeh Yen Chiu So Yen Chiu Hui Pao
Repr. Taiwan Sugar Res. Inst.
p. 82

- Humbert P.R. (1974)
El cultivo de la caña de azúcar
Edit. C.E.C.S.A.
p. 46-51.

- Jeffries T.W., Choi S. and Kirk T.K. (1981)
Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*.
Applied and Environmental Microbiology Aug. 1981
p. 290-296.

- Kantelinen A., Waldner R., Marja-Leena Niku-Paavola and Leisola Matti. (1988)
Comparison of two lignin-degrading fungi: *Phlebia radiata* and *Phanerochaete chrysosporium*.
Applied Microbiology and Technology
Vol. 28
p. 193-198
- Kirk E. (1961)
Enciclopedia de Tecnología Química
Union tipográfica editorial Hispano-América México
p. 877-936
- Kirk T.K. (1985)
The discovery and promise of lignin-degrading enzymes
In: The Marcus Wallenberg foundation Simposia Proceedings: 2.
New Horizons for biotechnological utilization of the forest resource
Lectures given at the 1985 Marcus Wallenberg symposium in Falun, Sweden, on September 12, 1985.
p. 27-42.
- Kirk T.K. (1987)
Lignin-degrading enzymes
Phil. Trans. R. Soc. Lond. A. 321
Great Britain
p. 461-474
- Kirk R.E. (1962)
Enciclopedia de tecnología química
Tomo VII, segunda edición en español.
Edit. Hispano America
p. 877-936.
- Kirkpatrick N. and Palmer M. (1987)
Semi-continuous ligninase production using foam-immobilised *Phanerochaete chrysosporium*, active at low pH and inactivated by divalent metal ions.
Applied Microbiology Biotechnology
Vol. 27
p. 27-129.
- Kirkpatrick N. and Palmer M. (1989)
A natural inhibitor of lignin peroxidase activity from *Phanerochaete chrysosporium*, active at low pH and inactivated by divalent metal ions
Applied Microbiology Biotechnology
Vol. 30
p. 305-311.

- Leatham G.F., Myers G.C. y Wegner H.T. (1990)
Biomechanical pulping of aspen chips; energy saving
resulting from different fungal treatments.
TAPPI Journal May 1990
p. 197-200.
- Leisola M., Brown C., Laurilla D., and Fiechter A. (1982)
Polysaccharide synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* during
degradation of kraft lignin
Applied Microbiology and Biotechnology
Vol. 15
p. 180-184.
- Levonen-Munoz E., and Bone D.H. (1985),
Effect of different gas environments on bench-scale
fermentation of oat straw by white-rot fungi.
Biotechnology and Bioengineering
Vol. XXVII
p. 382-387.
- Mats Ek. and Eriksson K.E. (1980)
Utilization of the white-rot fungus *Sporotrichum*
pulverulentum for water purification and protein production
on mixed lignocellulosic wastewaters
Biotechnology and Bioengineering
Vol. XXII
p. 2273-2284
- Menhrez A.Z. et. al (1977)
Journal Agri. Sci.
Vol. 88
p. 645.
- Meylan B.A. and Butterfield B.G. (1971)
Three-dimensional Structure of Wood.
University Station
Syracuse, New York
p. 7-11.
- Pelayo O.C. (1990)
Estimación de parámetros del proceso de hidrólisis
enzimática-fermentación simultáneas de celulosa.
Tesis de Maestría
Escuela de graduados, Universidad de Guadalajara
p. 21-15.

- Roch P., Buswell J., Cain R. and Odier E. (1989):
Lignin peroxidase production by strains of *Phanerochaete chysosporium* grow on glycerol
Applied Microbiology Biotechnology
Vol. 31
p. 587-591.
- Seaman J.F., Mitchell L.R. and Millet M.A. (1954)
The techniques for the determination of pulp constituents by
cuantitative paper chromatography.
TAPPI 37
p. 336
- Shefet G. and Ben-Ghedalia (1982)
Effect of ozone and sodium hydroxide treatments on the
degradability of cotton traw monosaccharides by rumen
microorganisms.
Applied Microbiology and Biotechnology
Vol. 15
p. 47-51.
- Sinner M., Simatupang M.H. and Dietrichs H.H. (1985)
Automated quantitative analisis of wood carbohydrates by
borate complex ion exchange chromatography.
Wood Science and Technology
Vol. 9
p. 307-322.
- Sinner, M. y J. Pulps (1978)
A noncorrosive dye reagent for detection of reducing sugars in
borate complex ion exchange chromatography.
J. Chromatography
Vol. 156
p. 197-204
- TAPPI T 211 om-85
Determinación de Cenizas
- TAPPI T-207 os 75
Sustancias solubles en agua de la madera y la pulpa.
- Thomke S. and Rundgren M. and Eriksson K.E. (1980)
Nutricional evaluation of the white-rot fungus *Sporotrichum
pulverulentum* as a feedstuff to rats, ping and sheep.
Biotechnology and Bioengineering
Vol. XXII
p. 2285-2303.

- Triana O., Leonard M., Saavedra F., Fernández N., Gálvez G. y Peña E. (1990)
Atlas del bagazo de caña de azucar.
Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar (GEPLACEA)
p. 37-39.
 - Triana O., Saavedra F, Leonard M., Peña E. Gonzalez A, y Monzon J; (1988)
Estudio por microscopía electrónica de transmisión de los cambios ultraestructurales de la pared celular del bagazo por remoción secuencial de hemicelulosas y lignina.
En: Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar (GEPLACEA).
Subproductos y derivados de la agroindustria azucarera
Colección GEPLACEA Serie diversificación
p. 63-77.
 - Trotter P.C., (1990)
Biotechnology in the pulp and paper industry: a review.
Part 1: Tree improvement, pulping and bleaching, and dissolving pulp applications
TAPPI Journal april 1990.
p. 198-204
 - Trotter P.C., (1990)
Biotechnology in the pulp and paper industry: a review.
Part 2: Upgrading pulp properties, papermaking, effluent treatment and converting biomass to fuels and chemicals
TAPPI Journal May 1990.
p. 201-205.
 - Wagenführ, R. (1966)
Anatomie des Holzes
Editorial Fachbuchverlag
Leipzig, Germany 1966
p. 35-40
 - Yang H.H., Effland M.J. and Kirk T.K. (1980)
Factor influencing fungal degradation of lignin a representative lignocellulosic thermomechanical pulp.
Biotechnology and Bioengineering
Vol. XXII
p. 65-70.
- Wiseman Alan (1980)
Topic in enzyme and fermentation biotechnology
Vol. 4
Department of Biochemistry
University of Surrey, Guildford
New York
p.85-128

- Wu Leo C.F. (1979)
Utility of oxidative determination methods for biodegraded
lignocellulosic substrates
Biotechnology and Bioengineering
Vol. XXI
p. 1679-1683.

- Zuñiga P.V. (1987)
Hidrólisis enzimática de bagazo de caña tratado con vapor
Avances de Ingeniería Química AMIDIQ
p. 381-408.

- Zúñiga P.V., Barajas G.G., Mendez C.M., Hernández R.L., Gamboa
S.C. (1988).
Efecto del tratamiento de bagazo de caña con peróxido
alcalino sobre su digestibilidad "in situ".
Memorias de la Convención Nacional de la Asociación de
Técnicos Azucareros de México A.C.
Cordoba, Veracruz