



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Evaluación *in vitro* del tratamiento de la vinaza de caña de azúcar con *Pleurotus ostreatus* en producción animal**

**William Armando Tapie Canacuan**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal  
Palmira, Colombia  
2015



# **Evaluación *in vitro* del tratamiento de la vinaza de caña de azúcar con *Pleurotus ostreatus* en producción animal**

**William Armando Tapie Canacuan**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias**

Director:

Zootecnista, MSc., Hugo Sánchez Guerrero

Línea de Investigación:

Producción Animal Tropical

Grupo de Investigación:

Conservación, Mejoramiento y Utilización del Ganado Criollo Hartón del Valle y  
Otros Recursos Genéticos Animales en el Suroccidente Colombiano

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal

Palmira, Colombia

2015

*Alabanza por los Hechos de Dios*

*<sup>16</sup> Venid, oíd todos los que teméis a Dios,  
Y contaré lo que ha hecho a mi alma.*

*<sup>17</sup> A él clamé con mi boca,  
Y fue exaltado con mi lengua.*

*<sup>18</sup> Si en mi corazón hubiese yo mirado a la iniquidad,  
El Señor no me habría escuchado.*

*<sup>19</sup> Mas ciertamente me escuchó Dios;  
Atendió a la voz de mi súplica.*

*<sup>20</sup> Bendito sea Dios,  
Que no echó de sí mi oración, ni de mí su misericordia.*

*Salmo 66*

# Agradecimientos

## **El autor expresa sus más sinceros agradecimientos:**

A Dios por todas las bendiciones recibidas día a día

Al Profesor Hugo Sánchez Guerrero, por la dirección del trabajo de tesis, por su compromiso, profesionalismo y dedicación

Al Ing. Agrónomo MSc. Carlos Aníbal Montoya, por su asesoría y colaboración

Al laboratorio de insumos biológicos FUNGICOL Palmira y su directora Johanna Gutiérrez, por brindar la asesoría profesional y espacios para realizar este trabajo.

Al Ing. Agrónomo MSc. Cesar Gasca, por su colaboración y entusiasmo necesario para trabajo

Al MVZ Miguel Garcés del Ingenio Providencia, por su colaboración y apoyo logístico para la realización del trabajo

A los profesores María Elena Pineda y Carlos A Huertas, por poner a disposición sus conocimientos y asesoría en cultivos de hongos

A mi esposa María Gladis Rosero y a mis hijos David, Sofía Daniela por apoyarme

A mis padres María y Fernando, por el apoyo incondicional durante toda mi formación profesional

A la Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira por la formación académica recibida y el apoyo financiero ofrecido.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron para la realización de este trabajo.

## Resumen

La vinaza de la agroindustria alcoholera presenta alta variabilidad en su composición, pH bajo y color marrón oscuro asociado a compuestos tales como melanoidinas, caramelos y compuestos fenoles. A estos compuestos se les han atribuido recientemente la causa de los reiterados fracasos en los intentos por usar en alimentación animal. Por tanto se planteó como objetivo degradarlos mediante el complejo exoenzimático del hongo *P. ostreatus* y evaluar la inclusión de la vinaza tratada en dietas para rumiantes mediante la técnica de desprendimiento de gases. Para el cultivo del hongo se utilizó un biodigestor experimental sustrato sólido de tamo de arroz y vinaza a razón de 1:2 (P/V), con 16 brix y pH 6,5. La decoloración se midió por absorbancia a 475nm, alcanzando hasta el 83% de decoloración y disminución de la demanda química (DQO) y bioquímica (DBO) de oxígeno del 87,1 y 92,3% respectivamente, así como reducción en el contenido de sólidos totales ( $\text{gL}^{-1}$ ) de 33,8 a 5,6 y sólidos volátiles ( $\text{gL}^{-1}$ ) de 15,1 a 4,3. Con la vinaza tratada (VT) y sin tratar (VST) se elaboraron dietas para rumiantes con 4 niveles de inclusión (3, 6, 9, 12%), más un testigo (sin vinaza), se determinó la producción de gas in vitro, así como el contenido de MS, FDN, LDA, PC y cenizas. La dieta con VT al 9% fue la que mayor gas produjo (48,4ml), quien no difirió del testigo ( $p < 0,05$ ). Al comparar VT con VST, la tasa de degradación, MS, FDN, LDA y tiempo de colonización no difieren ( $P < 0,01$ ), pero hay diferencias en producción de gas, PC y cenizas ( $P < 0,01$ ).

**Palabras claves.** Vinaza, melanoidinas, rumiantes, *Pleurotus ostreatus*

## Abstract

Vinasse o slops is a byproduct of the Alcoholer agroindustry which shows high variability in composition, pH low and dark brown color, this associated to compounds as melanoidins, candies and phenols. This compounds have recently been attributed to them the cause of repeated failures in attempts to use in animal feed. Therefore this study had as goal to degrade these compounds by exo-enzyme complex of the fungus *P. ostreatus* and to evaluate the inclusion of treated vinasse in diets for ruminants by gassing technique. For the mushroom growing an experimental digester was used, with solid rice chaff and vinasse substrate ratio of 1:2 (W/V), with 16 Brix and pH 6,5. Discoloration was measured by absorbance at 475nm, reaching to 83% of discoloration, decrease in chemical demand (COD) and biochemical (BOD) oxygen of 87,1 and 92,3% respectively, as well as reduction in the content of total solids (gL<sup>-1</sup>) of 33,8 to 5,6 and volatile solids (gL<sup>-1</sup>) of 15,1 to 4,3. With treated vinasse (TV) and untreated vinasse (UTV) diets for ruminants with 4 levels of inclusion (3, 6, 9, 12%), and a control (without vinasse) were prepared; the gas production was determined *in vitro*, as well as the content of DM, NDF, LDA, PC and ash. The diet 9% VT was produced more gas (48,4ml), which did not differ from control (p <0,05). Comparing VT with VST, the degradation rate, DM, NDF, LDA and colonization time did not differ (P < 0,01), but there are differences in gas production, PC and ash (P <0,01).

**Key Words:** Vinasse, melanoidins, ruminants, *Pleurotus ostreatus*

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de graficas.....</b>	<b>12</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>14</b>
<b>1. Objetivo general.....</b>	<b>17</b>
1.2. Objetivos específicos.....	17
<b>2. Estado del arte.....</b>	<b>18</b>
2.1. Vinaza.....	18
2.1.1. Melanoidinas en vinaza.....	20
2.1.2. Metales pesados presentes en la vinaza.....	21
2.2. Usos de la vinaza.....	22
2.2.1. Vinazas en producción animal.....	22
2.2.2. Vinaza en suelos.....	24
2.3. Procesos biotecnológicos.....	26
2.4. Hongos basidiomicetos.....	26
2.4.1. Enzimas ligninolíticas.....	27
2.5. Ubicación taxonómica del género <i>Pleurotus</i> spp.....	28
2.5.1. Cinética de crecimiento micelial de los hongos.....	29
2.5.2. Crecimiento micelial.....	29
2.5.3. Métodos de cultivo de hongos lignocelulíticos.....	30
2.6. Residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes.....	31
2.6.1. Paja de arroz.....	31
2.7. Evaluación nutricional de los alimentos mediante la técnica de producción de gas <i>in vitro</i> .....	33
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>35</b>
3.1. Materiales.....	35
3.2. Métodos.....	36
3.2.1. Ensayos preliminares.....	36

3.2.2. Preparación y multiplicación del hongo.....	37
3.2.3. Preparación y adecuación del sustrato (tamo de arroz y vinaza) .....	38
3.2.4. Procedimiento para el cultivo del hongo en vinaza .....	39
3.2.5. Biodegradación de la vinaza .....	41
3.2.6. Formulación y análisis químico de las dietas .....	42
3.2.7. Fermentación en jeringas .....	42
3.2.8. Estudio del tambo de arroz .....	46
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>48</b>
4.1. Estandarización del método de cultivo.....	48
Ensayo “a”. Acondicionamiento del pH: .....	48
4.2. Análisis de la biodegradación de la vinaza .....	51
4.3. Análisis nutricionales de las dietas con vinaza tratada y sin tratar.....	55
4.4. Análisis del tambo de arroz antes y después del proceso de degradación por <i>P. ostreatus</i> .....	60
<b>5. Conclusión.....</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>66</b>

## Lista de tablas

	Pàg.
<b>Tabla 3-2.</b> Composición química de la vinaza.....	35
<b>Tabla 3-3.</b> Dietas para vacas de leche con diferentes niveles de VT y VST (base seca)	42
<b>Tabla 4-4.</b> Parámetros de la cinética de producción de gas estimados por el modelo de France y composición química de las dietas con vinaza tratada (VT) y sin tratar (VST)..	57
<b>Tabla 4-5.</b> Contrastes ortogonales para parámetros de la cinética de producción de gas y composición química de las dietas con VT y VST .....	58
<b>Tabla 4-6.</b> Composición química del tamo de arroz tratado con <i>P.ostreatus</i> y sin tratar (n=3). .....	60

## Lista de figuras

	Pàg
<b>Figura 2-1.</b> Estructura básica de la melanoidina. ....	21
<b>Figura 3-2.</b> Esquema de preparación y adecuación del inóculo. ....	38
<b>Figura 3-3.</b> Esquema de la metodología para el cultivo del hongo con vinaza. ....	40
<b>Figura 3-4.</b> Esquema de metodología usada para análisis de dietas y tamo de arroz... 45	
<b>Figura 4-5.</b> <i>P.ostreatus</i> en vinaza corregido el pH 6,5 usando $\text{CaCO}_3$ , $\text{NaOH}$ y $\text{NaHCO}_3$ .....	49
<b>Figura 4-6.</b> Incubación de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido. ....	50
<b>Figura 4-7.</b> Bioreactor con recirculación de vinaza. ....	51
<b>Figura 4-8.</b> Vinaza: A, tratada; B. sin tratar. ....	52
<b>Figura 4-9.</b> Microscopía electrónica de barrido, del tamo de arroz antes y después del tratamiento con <i>P.ostreatus</i> . A. Nervaduras de la hoja; B. Nervaduras de la hoja tratada C. Tricomias; D. Colonización del micelio en la hoja .....	63

# Lista de graficas

Pàg

<b>Grafica 4-1.</b> Prueba de Duncan para remoción del color de la vinaza por <i>P. ostreatus</i> . .	52
<b>Grafica 4-2.</b> Características de la vinaza antes y después del tratamiento por <i>P.ostreatus</i> .....	53
<b>Grafica 4-3.</b> Cinética de producción de gas de acuerdo. ....	56
<b>Grafica 4-4.</b> Cinética de producción de gas de tamo de arroz. ....	62

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>VT</i>	Vinaza tratada con <i>P.ostreatus</i>
<i>VST</i>	Vinaza sin tratar
<i>FDN</i>	Fibra detergente neutral
<i>PC</i>	Proteína cruda
<i>LDA</i>	Lignina
<i>MS</i>	Materia seca
<i>TDN</i>	Nutrientes digestibles totales
<i>PDA</i>	Papa destroza agar
<i>DQO</i>	Demanda química de oxígeno
<i>DBO</i>	Demanda bioquímica de oxígeno
<i>ST</i>	Sólidos totales
<i>STV</i>	Sólidos totales volátiles
<i>RPM</i>	Revoluciones por minuto
<i>COT</i>	Carbono orgánico total

# Introducción

La vinaza es un efluente en la industria alcoholera, resulta al separar el alcohol del jugo de caña de azúcar fermentado por medio de vapor a baja presión (Pereira *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 2005). Se caracteriza por su alto contenido de sólidos, altos valores de DBO y DQO, bajo pH (3,5 a 4,0) y color marrón intenso (Retes-Pruneda, 2014). La composición varía de acuerdo con las condiciones del proceso de fermentación y destilación y según la materia prima que se utilice (Scull *et al.*, 2012), como también de la variedad y la maduración de la caña de azúcar (García y Rojas, 2006). De este proceso se obtiene de 10 - 18 litros de vinaza por 1 litro de etanol producido (Wadt, 2008; Ferreira, 2009; Becerra, 2009). En Colombia se producen cerca de un millón de litros de bioetanol por día, lo cual representa aproximadamente 10 millones de litros de vinaza diluida compuesta en un 90% por agua y un 10% por materia orgánica y sales (Hernández, 2009).

Uno de los problemas que enfrentan las industrias de la caña de azúcar es el gran volumen de residuos generados, la vinaza en particular tiene un alto potencial de contaminación en comparación con otros residuos orgánicos producidos, por su alta carga orgánica, y presencia de compuestos con estructuras químicas complejas y resistentes a la degradación como las melanoidinas, que le confieren un intenso color marrón (Gonzales *et al.*, 2006; Wadt, 2008). Para disminuir los impactos ambientales de la vinaza, en las destilerías de alcohol de nuestra región se retorna al proceso cerca del 70 % de la vinaza diluida y el resto se concentra por medio de evaporación alcanzando una concentración en sólidos de hasta el 35% para luego utilizarla en la producción de abono orgánico a través del compostaje con cachaza. En otros casos, se concentra hasta el 55% para utilizarla como fertilizante líquido (Hernández, 2009).

Considerando la cantidad elevada de vinaza de caña de azúcar generada a partir de la producción de etanol (Santos *et al.*, 2014), y en búsqueda de un alimento alternativo que pueda reducir el costo de la alimentación animal, el cual se encuentran alrededor del 70%

del total de los costos de producción (De Oliveira *et al.*, 2013) y las características físico-químico; la vinaza muestran potencialidades para ser usado en la alimentación animal (Scull *et al.*, 2012), y como aditivo (Hidalgo, 2012). Su uso ha sido reportado en varios países tropicales y en Europa como un suplemento aditivo o alimento para rumiantes y monogástricos (De Oliveira *et al.*, 2013). En la mayoría de los casos no se han reportado resultados favorables para dicho uso.

Gallo *et al.*, (1986) encontraron en aves, que la ganancia de peso y el consumo disminuyen a medida que se incrementan los niveles de vinaza. Igualmente Mora y Castro (2005), recomiendan utilizar no más del 3,75% de la ración para engorde de pollos. En ganado lechero la inclusión de vinaza al 7% en el suplemento, afectan los parámetros productivos y recomienda utilizarla al 5% en el suplemento, para no afectar el estado metabólico y productivo del animal (Fernández *et al.*, 2013). En cerdos, también se recomienda usar niveles bajos de vinaza en las dietas, para no afectar el comportamiento productivo del animal (García *et al.*, 1991).

Ante estos resultados, cabe entonces preguntarse cuál es la causa real del problema de la utilización de vinaza en mayores cantidades. La respuesta a este interrogante, podría encontrarse basándose en estudios adelantados por Naik *et al.*, (2008) los cuales afirman que la vinaza es una sustancia que se caracteriza por tener un color marrón oscuro debido a la presencia de polímeros de alto peso molecular llamadas melanoidinas, que se forman por la reacción de Maillard y fenoles (ácido tánico y húmico) compuestos que son similares a la lignina y que son sustancias recalcitrantes. Que además en el caso particular de las melanoidinas tienen un efecto antimicrobiano (Arimi *et al.*, 2014), por lo que su uso estaría limitado en la alimentación animal. No obstante, Ferreira (2009), estudio el hongo *Pleurotus sajor-caju*, el cual puede actuar como degradante biológico de estos compuestos a través de enzimas lignocelulolíticas (Lacasa, Peroxidasa y Manganeso-peroxidasa) capaces de decolorar la vinaza, causante de la toxicidad en alimentación animal; si estos compuestos son degradados por *Pleurotus*, se podría incluir la vinaza a niveles crecientes en alimentos para rumiantes. La similitud estructural entre las melanoidinas y los ácidos húmicos y entre éstos últimos y la lignina; y por otra la inespecificidad de sustrato de algunas enzimas ligninolíticas, sugieren que los hongos de podredumbre blanca deben tener la capacidad de degradar los ácidos húmicos y por lo tanto las melanoidinas presentes en las vinazas (González *et al.*, 2006)

Se plantea entonces, tratar la vinaza con *Pleurotus ostreatus* usando como sustrato solido  
tamo de arroz e, indirectamente mejorar las características nutricionales de este y así  
potencializar el uso de estos subproductos en la alimentación animal.

# 1. Objetivo general

- Tratar la vinaza con *Pleurotus ostreatus*, usando como sustrato solido tamo de arroz y evaluarla *in vitro* en dietas, para la alimentación de rumiantes.

## 1.2. Objetivos específicos

- Establecer un método de cultivo para *P. ostreatus* usando vinaza de la industria alcoholera.
- Estudiar y evaluar a *P. ostreatus* como degradante biológico de los compuestos tóxicos (melanoidinas) de la vinaza, mediante la reducción de la decoloración, DQO y DBO.
- Evaluar la vinaza biodegradada a diferentes niveles en dietas para rumiantes mediante la producción de gas *in vitro*.
- Determinar los cambios en las propiedades físicas y químicas del tamo de arroz, al ser utilizado como sustrato para *P. ostreatus*.

## 2. Estado del arte

### 2.1. Vinaza

La vinaza es un material líquido que resulta de la producción de etanol, ya sea por destilación de la melaza fermentada o de la fermentación directa de los jugos de la caña de azúcar. Está compuesta por materiales orgánicos y nutrientes minerales que hacen parte de compuestos y constituyentes vegetales (García y Rojas, 2006).

La Vinaza es el residuo de la industria alcoholera. Resulta al separar el alcohol del mosto fermentado por medio de vapor a baja presión y su composición es muy variable con relación a las destilerías, incluso dentro de la misma fuente (Pereira *et al.*, 1992; Sarria y Serrano, 2008).

Contiene alrededor del 93% de agua, la cual por evaporación se lleva la vinaza diluida de un 6% de sólidos hasta una concentración del 60%. Es muy rica en potasio y cantidades apreciables de otros elementos esenciales para la nutrición de las plantas, como: Ca, Mg, SO<sub>4</sub>, Tabla 1 (Pereira *et al.*, 1992; Mora y Castro, 2005). Su poder contaminante es alrededor de un centenar de veces más grande que las aguas residuales domésticas, esto debido a su riqueza en materia orgánica, pH bajo (4,0 a 4,8), alta corrosividad, colores oscuros, niveles altos de DBO que varía de 42.000 a 100.000 mg L<sup>-1</sup> y DQO que van desde 10.000 a 210.000 mg L<sup>-1</sup> y emiten un olor fuerte y característico a alta temperatura en la salida del destilador (Freire y Cortez, 2000; Retes-Pruneda, 2014).

**Tabla 2-1.** Composición química de la vinaza.

<b>Parámetros</b>	<b>Vinaza 100%</b>
pH a 20°C	3,95
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	42000
DBO (mg L <sup>-1</sup> )	11310
Sólidos Totales Suspendidos (mg L <sup>-1</sup> )	5969
Conductividad (µS/cm)	8630
Sólidos Totales Disueltos (ppm)	152126
Azúcares reductores (mg L <sup>-1</sup> )	962
Nitrógeno Total Kjeldahl (mg/L)	70
Potasio (mg L <sup>-1</sup> )	2272
Fosfato (como P) (mg L <sup>-1</sup> )	200
Magnesio (mg L <sup>-1</sup> )	290
Sodio (mg L <sup>-1</sup> )	<50
Calcio (mg L <sup>-1</sup> )	460
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	1320
Índice de fenoles (mg L <sup>-1</sup> )	1,1

Fuente. (Ferreira, 2009)

La coloración oscura de la vinaza es atribuido a la presencia de compuestos de alto peso molecular, principalmente las melanoidinas y caramelos (Figura 1) que se forman por la reacción de Maillard y compuestos fenoles (ácido tánico y húmico) que son a menudo sustancias tóxicas, lo que hace que su uso sea limitado, además que generan serios problemas de contaminación ambiental (Pérez *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2008).

El color se considera una forma de contaminación, por el daño que causa y puede estar asociada con la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos, o polímeros de alto peso molecular, tales como la lignina (Rodríguez *et al.*, 2003). Durante el tratamiento de los residuos, se debe prestar atención a la reducción o eliminación de color, contribuyendo así a reducir el impacto en los ecosistemas donde se liberan (Rodríguez *et al.*, 2003). Ya que al verter la vinazas en cuerpos de agua (si fuese el caso) se reduce la penetración de la luz, afectando a los organismos fotosintéticos disminuyendo así los niveles de oxígeno disuelto (Ortega, 2013). Alterando los ecosistemas acuáticos reflejándose en la mortandad de la fauna y flora (Gad y El Sayaad, 2010).

### 2.1.1. Melanoidinas en vinaza

Las vinazas de destilería son los efluentes más agresivos para el medio ambiente de todos los producidos por las industrias de alcohol. Se generan en grandes volúmenes y tienen un alto potencial de contaminación, no sólo por su alta carga orgánica, sino por el color oscuro que la caracteriza. El principal problema para el tratamiento de estos efluentes es la presencia de compuestos de estructura química compleja y resistente a la degradación, las melanoidinas, que les confieren un intenso color marrón (González *et al.*, 2006).

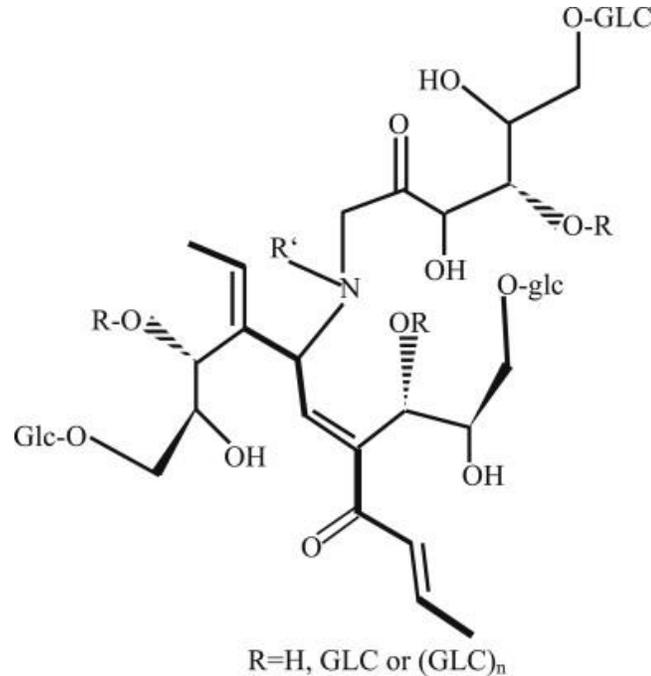
Las melanoidinas, son polímeros de alto peso molecular formados al reaccionar en condiciones alcalinas, azúcares y aminoácidos (reacción de Maillard), por la reacción entre los grupos amino y carboxilo de las sustancias orgánicas (Reynolds, 1968). Estos compuestos se generan en las últimas etapas de esta reacción, durante el procesamiento y conservación de algunos alimentos (Wang *et al.*, 2011).

En ésta reacción interactúan un azúcar reductor y una amina (aminoácido, polipéptido, proteína) que se puede simplificar a dos etapas. En la primera, se forman productos del reordenamiento Amadori, los cuales son compuestos de bajo peso molecular y en la segunda dichos productos interactúan mediante reacciones de oxidación, deshidratación y condensación formando productos como las melanoidinas responsables de la coloración y compuestos volátiles responsables de olores (Nagai *et al.*, 2012; Ortega, 2013). El oscurecimiento es debido en gran parte a las melanoidinas de alto peso molecular, el tiempo y la temperatura influyen en el peso molecular, mientras que el pH influye en la estructura de las melanoidinas (Wang *et al.*, 2011).

Las melanoidinas, pueden absorber la luz a longitudes de onda de hasta 420 nm y son predominantemente responsable del color marrón característico de los alimentos, tales como café, cacao, pan, malta y vinaza. Las melanoidinas de los alimentos han sido reportadas como compuestos anicónicos coloreados; la actividad antioxidante y otros efectos biológicos de las melanoidinas de los alimentos han sido estudiados, a pesar de esto, muy pocas estructuras de las melanoidinas han sido descritas (Wang *et al.*, 2011).

Las melanoidinas tienen capacidad quelante que pueden formar complejos con metales (Cämmerer *et al.*, 2012)

**Figura 2-1.** Estructura básica de la melanoidina.



Fuente. (Naik *et al.*, 2008; Cämmerer *et al.*, 2012)

### 2.1.2. Metales pesados presentes en la vinaza

La vinaza está compuesta por elementos pesados como el Hierro (Fe), Cobre (Cu), Manganeso (Mn) y Zinc (Zn), que al ser aportados al suelo en grandes cantidades pueden llegar ser fuentes de contaminación del suelo y el agua (Gnecco, 2007).

Se consideran como metales pesados aquellos elementos cuya densidad es igual o superior a 5 gr/m<sup>3</sup> cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos (Girón, 2008).

Girón, (2008) evaluó los usos de la vinaza, como fuente de fertilizante y de enmienda en los suelos salinos y su posible efecto en la contaminación del suelo y fuentes de agua subterránea por el aporte de elementos pesados, encontró que, en este tipo de suelos y aguas subterráneas, no se ve afectado por problemas de contaminación por la aplicación

de vinazas al 10%; todos los elementos pesados se incrementaron en el suelo con respecto a su valor inicial, pero no llegaron a los valores medios críticos para considerar que exista contaminación de los suelos.

## **2.2. Usos de la vinaza**

Gonzales *et al.*, (2004) señala opciones como: reutilización en el mismo proceso de fermentación, abono en cultivos agrícolas que provee la materia prima, fermentarla en condiciones anaeróbicas para la producción de CH<sub>4</sub> usado como combustible en la destilación, recuperar la proteína unicelular obtenida por el tratamiento aeróbico de la vinaza para alimentación animal, venta de la vinaza purificada y concentrada para el uso directo en producción pecuaria, previos estudios nutricionales y producción de cenizas potásicas para el mercado de los fertilizantes (Gonzales *et al.*, 2004; Sarria y serrano, 2008).

### **2.2.1. Vinazas en producción animal**

De los trabajos realizados en nutrición animal con vinaza, el estudio realizado por Fernández, (2012) se puede considerar uno de los más completos encontrados en nuestro medio en nutrición de rumiantes, al tomar en cuenta la mayoría de las variables que se pueden ver afectadas por el tipo de dieta en el animal. Este autor estudió, la vinaza de la industria alcoholera a diferentes niveles (3, 5 y 7%), como ingrediente en la formulación de suplementos concentrados para ganado de leche especializado y determino el efecto en el estatus metabólico del animal y la producción y composición de la leche. No encontró diferencias ( $p < 0.05$ ) en el perfil metabólico de los animales, pero si en la leche corregida por grasa al 4% con inclusión del 7% de vinaza en el suplemento. Concluyendo, que la vinaza se puede utilizar en ganado lechero de alta producción en un nivel del 5% en el suplemento (35% del total del alimento, base seca) sin interferir en el estado metabólico y productivo del animal.

García *et al.*, (1991) realizó un experimento en cerdos para medir el comportamiento productivo en etapas de crecimiento y finalización, utilizando 3 niveles de harina de vinaza

(5, 10 y 15%), en reemplazo de grano de sorgo y torta de soya, encontrando como resultados que la vinaza puede usarse a niveles bajos sin afectar el comportamiento productivo.

En rumiantes Molina *et al.*, (1994) utilizaron la vinaza como reemplazo de la melaza en la fabricación de bloques multinutricionales reporta un consumo de 260 g/an/día de bloque y una ganancia de peso de 582 y 561g/an/día, sin (melaza 50%, urea 20%) y con vinaza (vinaza 50%, urea 20%) respectivamente. Destacándose la disminución en consumo de la dieta base de caña integral (14 vs 13 kg/an/día), la ganancia de peso y la buena estructura física del bloque; esta pequeña cantidad de vinaza (130 g/an/día) tiene un gran efecto negativo, encontrado en forma reiterada en los trabajos realizados.

Gallo *et al.*, (1986) evaluaron la inclusión de vinaza en agua de bebida en pollo de engorde donde encontraron, que para las variables ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia, existe un efecto adverso a medida que se incrementó la concentración de vinaza en el agua de bebida, haciéndose más evidente en concentraciones de 75 y 100%. Sin embargo, los pollos que consumieron concentraciones de vinaza hasta el 50%, mostraron un comportamiento aceptable con respecto a los que no consumieron vinaza.

Mora y Castro, (2005) utilizaron vinaza deshidratada (92,7%) y evaluaron el efecto a diferentes niveles de inclusión, donde para la fase de cría (1 a 21 días) con niveles de 7,5 y 15%, por problemas de humedad excesiva de la cama, atribuibles al uso de vinaza, desencadenaron problemas de alta mortalidad. No obstante, estos mismos autores encontraron que los pollos, que recibieron niveles de 2,5 a 5% de vinaza en los 28 a 42 días presentaron biológicamente un rendimiento productivo ligeramente inferior, al tratamiento control (sin vinaza), con un consumo similar, lo que indicaría que se podría incluir hasta un 3,75% de vinaza como máximo para esta etapa. Finalmente concluyen que el principal limitante para el uso de vinaza estaría en la alta humedad que se genera en las camas que lo atribuyen al alto contenido de potasio en la vinaza.

Por su parte Waliszewski *et al.*, (1997) reporta una gran variabilidad en la composición de la vinaza y postulan que el uso de vinaza es limitado en la alimentación animal, debido al pH (3,4 a 4,0) ácido que es característico de todas las vinazas. Pues al evaluar la vinaza en la alimentación de pollos de engorde, después de neutralizar el pH (5,5 a 6,0) a niveles

de 2, 4 y 6% de vinaza en la dieta, encontraron que el consumo de alimento y la ganancia de peso aumento, con respecto al testigo (sin vinaza); aunque a partir del 2% se presentaron excretas acuosa y consideran que se puede utilizar hasta un 4% de vinaza en la dieta.

Xu *et al.*, (2008) plantean que la lignina libre podría inhibir la hidrólisis enzimática; La enzima celulasa reacciona con la lignina formando un complejo irreversible (proteína-lignina) inactivo y por tanto afecta negativamente la hidrólisis enzimática, que bien pudiera explicar la disminución de la digestibilidad y consumo que se encuentran en la mayoría de los trabajos realizados con vinaza (melanoidinas) en la alimentación de rumiantes.

Desde otro enfoque novedoso Hidalgo, (2012) plantea que la vinaza es un residuo que presenta un alto contenido de ácidos orgánicos y otros compuestos, los que hacen que al emplearse como aditivo, esta pueda mejorar el comportamiento productivo, sanitario y económico de aves ponedoras; trazó como objetivo evaluar la productividad y la salud de pollitas de reemplazo y gallinas ponedoras usando vinaza como aditivo. Atribuye a la presencia de ácidos orgánicos, fenoles, levaduras y lactobacilo en la vinaza, las potencialidades para ser utilizado como aditivo en la producción avícola; encontró que a niveles de 0;1; 1,5 y 2 %, no produjo cambios en el comportamiento productivo, en la morfometría de los órganos inmunológicos ni en la mayoría de los segmentos del TGI, así como un desarrollo significativo de los segmentos del aparato reproductor y un mayor número de folículos a medida que se aumentó el nivel de vinaza. Observo cambios en la coloración del hígado y mayor distensión del ciego a medida que se incrementó el nivel en la dieta; Con la inclusión del 1% de vinaza concentrada en la dieta de gallinas ponedoras se produjo una mejora en la producción de huevos desde la semana 20 a las 60 y una mayor persistencia de la curva de postura; así como una factibilidad económica.

### **2.2.2. Vinaza en suelos**

Cuando se aplica al suelo, la vinaza puede promover la mejora de su fertilidad, beneficiando de alguna manera la producción de los cultivos. Sin embargo, la cantidad no debe exceder su capacidad para retener iones, es decir, la dosis dependerá de acuerdo con las características del suelo. Cuando se utiliza en proporciones desequilibradas,

resultar en la lixiviación de diferentes iones, especialmente el nitrato y potasio (Silva *et al.*, 2007).

El procedimiento de ferti-irrigación utilizando la vinaza de caña de azúcar se ha utilizado como enmiendas del suelo como sustituto de fósforo, potasio y fertilizantes inorgánicos, sin embargo se requiere recomendaciones específicas para cada condición edafoclimática y así evitar daños al medio ambiente (Mello *et al.*, 2013).

Además, el pH bajo, conductividad eléctrica, y los elementos químicos presentes en la vinaza de caña de azúcar pueden causar cambios en las propiedades químicas y físicas de los suelos, con descargas frecuentes durante un largo período de tiempo y también tener efectos adversos en la biota en general (Christofolletti *et al.*, 2013).

Lotero, (2006) encontró que la aplicación de las vinazas al suelo genera cambios en algunas de sus características físicas, químicas y biológicas, como son: pH, disponibilidad de nutrientes principalmente K, cambios en la materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, conductividad eléctrica y la actividad biológica

Becerra, (2009) encuentra que la velocidad de transporte de solutos en el suelo es lenta. La aplicación de vinaza pura en todas las texturas que se estudiaron, disminuyó la capacidad de intercambio catiónico; A mayor concentración de vinaza mayor es el tiempo que se requiere para la prueba de desplazamiento miscible haciendo uso de menor volumen de poros desplazados.

Gasca, (2010) demostró que la aplicación de vinaza contribuyo a mejoras, como es la reducción de los niveles de porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y relación de adsorción de sodio (RAS) en el suelo, aunque estadísticamente no fueron significativos. Concluye que, la aplicación de vinaza influyó favorablemente en algunas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Lotero, (2012) en la aplicación de vinaza al suelo; en lo que corresponde a la biota del suelo, encontró que en general los efectos de la aplicación de la vinaza con las diferentes dosis produjeron cambios en algunas poblaciones microbiales, aumentando o disminuyendo las diferentes poblaciones en el suelo, siendo más notorio, el efecto negativo ya que la gran mayoría de estas poblaciones disminuyeron.

## 2.3. Procesos biotecnológicos

Los procesos biotecnológicos han sido considerados como una alternativa a la generación de bienes y servicios debido a la forma de transformar los residuos en productos útiles, a menudo la industria que produce residuos ha sido pionera en el uso del potencial de los bioprocesos (Ferreira, 2009). Dentro de este contexto, los hongos juegan un papel importante en el proceso de bioconservación ya que pueden reducir la cantidad de desechos y minimizar la contaminación por reducción de DQO y DBO, formando productos de interés para la industria de alimentos, papel, fármacos, enzimas de interés ambiental (Ferreira, 2009), fertilizantes (Quintero, 2003) y alimentación animal (Barros, 2009).

## 2.4. Hongos basidiomicetos

Son hongos que producen esporas (basidiosporas) de origen sexual en una estructura especializada llamada basidio. En la fase vegetativa los basidiomicetos se denominan micelio, que comprende a su vez muchos filamentos reptados llamados hifas (Moreira, 2006).

Este tipo de hongos presentan un papel clave en el ciclo de los nutrientes y el mantenimiento de los ecosistemas, ya que actúa sobre la degradación de la materia orgánica, puesto que estos presentan un sistema de enzima extracelular capaz de romper una gran cantidad de enlaces químicos diferentes (Eggen, 2000).

El género *Pleurotus* ssp, se encuentra de forma natural en materiales lignocelulósicos (Obodai *et al.*, 2003). Son conocidos como productores de enzimas extracelulares tales como manganeso-peroxidasa, peroxidasa y lacasa, formando un complejo enzimático degradante de lignina y diversos contaminantes orgánicos (Cohen, 2002).

### 2.4.1. Enzimas ligninolíticas

**Lacasa:** Es una enzima que pertenece a la familia de las multicobre-oxidasas, que oxida principalmente los compuestos fenólicos, que actúa sobre las cadenas laterales y la ruptura de anillos aromáticos (Duran y Esposito, 1997). Estas enzimas son producidas por la mayoría de los basidiomicetos y su peso molecular varía de 45 a 100 kDa (Moreira, 2006), dependiendo de la especie y de la isoforma; las enzimas lacasas son fenoloxidasas, producidas por hongos y plantas y no dependen de  $H_2O_2$  para su actividad (Azevedo, 2004).

Las lacasas son secretadas al medio extracelular por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos, siendo los basidiomicetos de podredumbre blanca de la madera los que más lacasa producen (Gianfreda y Bollag, 1994). Su capacidad para catalizar la oxidación de fenoles y otros compuestos aromáticos permite que las lacasas se utilicen en muchas aplicaciones industriales como deslignificación, en la producción de etanol, la modificación de las fibras de madera, blanqueo de colorantes en procesos de textiles, síntesis de productos químicos/medicinal y recuperación de suelos y aguas contaminadas (Moreira, 2006).

Estas enzimas son generalmente extracelulares que están ligadas a la membrana celular (Szklarz *et al.*, 1989). La producción de lacasas se puede ver afectada por varios factores durante el desarrollo del hongo, como la composición del medio de cultivo, pH, temperatura y aireación (Kahraman y Gurdal, 2002).

**Peroxidasa:** Son un grupo de enzimas oxi-reductasas que catalizan la reducción del peróxido y la oxidación de una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Ikehata *et al.*, 2004). Su acción enzimática viene de la reducción cíclica de un átomo de hierro en el grupo hematina en presencia de  $H_2O_2$ , la enzima combinada con esta molécula, forma un complejo que puede oxidar una variedad de donantes de electrones (Dellamatrice, 2005).

Estas exoenzimas son dependientes de  $H_2O_2$  para actuar sobre la lignina, jugando un papel importante durante la degradación del sustrato (Pompeu, 2010). La peroxidasa es conocida por su capacidad para eliminar grupos fenólicos y aminas aromáticas a partir de

soluciones acuosas y también decoloración de los efluentes de la industria textil. Estas enzimas se producen en más de una forma molecular en la misma especie en el mismo tejido, o incluso en la misma célula (Gillikin y Graham, 1991).

**Manganeso-Peroxidasa:** La manganeso peroxidasa (MnP) es una enzima extracelular, glicosilada, con peso molecular de 45-47 kDa y es dependiente del hidrógeno y del ion  $Mn^{+2}$  para cerrar su sitio activo (Azevedo, 2004) y es el  $Mn^{3+}$  quelado el que actúa como agente difusible oxidando las unidades fenólicas (Kuwahara *et al.*, 1984). Este ion oxida ciertas estructuras aromáticas no fenólicas de la lignina, resultando en la formación de radicales libres que reducen  $Fe^{+3}$  e iniciar reacciones con la participación de radicales hidroxilo. Durante la oxidación de la lignina,  $Mn^{+3}$  se estabiliza por quelato y ácidos orgánicos, actuando así como mediador de bajo peso molecular. Este sistema MnP es lo suficientemente fuerte para enlaces entre carbonos y degradan las estructuras no-fenólicas de la lignina, restando hidrógeno del anillo aromático (Higuchi, 2004).

## 2.5. Ubicación taxonómica del género *Pleurotus* spp

El género *Pleurotus*. Spp, pertenece a la clase basidiomicetos que comprende a los hongos superiores, cuya principal característica es la presencia de basidios o protuberancias sobre los cuales se producen las basidiosporas. La familia *Tricolomatacea* está constituida por especies que producen esporas y que presentan coloración entre hialino a rosa (Kirk *et al.*, 2001). Ubicación taxonómica del género *Pleurotus* (Kirk *et al.*, 2001):

Reino	<i>Fungí</i>
Phylum	<i>Basidiomicete</i>
Clase	<i>Homobasidiomicete</i>
Orden	<i>Agaricales</i>
Género	<i>Pleurotus</i>
Familia	<i>Tricholomataceae</i>
Especie	spp

La taxonomía del género es muy compleja debido a un alto grado de variabilidad morfológica de los basidiocarpos o cuerpos fructíferos, la cual es atribuida principalmente

a factores ambientales, debido a esto, una misma especie puede ser identificada bajo diferentes nombres. Otros factores que hacen compleja la taxonomía del género son la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética; se han hecho enormes esfuerzos para clasificar las especies del género *Pleurotus* por medio de criterios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos (May y Royse, 1988; Zervakis *et al.*, 1994; Iraçabal *et al.*, 1995).

### **2.5.1. Cinética de crecimiento micelial de los hongos**

Los estudios sobre cinética del crecimiento de microorganismos se han realizado fundamentalmente con bacterias y levaduras, las cuales difieren enormemente con los hongos filamentosos. El crecimiento de una colonia de organismos unicelulares se lleva a cabo por el incremento de individuos dentro de dicha colonia, mientras que en los hongos se efectúa por la elongación y ramificación de las hifas. Se sabe que la síntesis de componentes celulares, la absorción de agua por la hifa y la presión de turgencia juegan un papel importante en la elongación del ápice; sin embargo, poco se sabe sobre el fenómeno de ramificación (Aguilar, 2007).

El crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una espora o de una fracción viable de la hifa. Dicho crecimiento se da en forma apical porque la elongación de la superficie se presenta en un punto y no en toda la célula; esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, la hifa, delimitada por una pared que se extienden de manera ramificada para formar un sistema hifal conocido como micelio (Sánchez y Royse, 2001).

### **2.5.2. Crecimiento micelial**

El crecimiento del micelio, varía según el medio de cultivo, ya sea medio líquido o sólido. En el primero crece sólo sobre la superficie cuando el líquido está en reposo; pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. Según las

condiciones, el hongo puede o no formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets”. En medio líquido, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al de otros organismos y que consta de las siguientes fases: de adaptación o Lag, exponencial o Log, estacionaria, declinación y muerte.

### **2.5.3. Métodos de cultivo de hongos lignocelulíticos**

Los cultivos de hongos para producción de enzimas y alimentos se realizan fundamentalmente mediante los métodos de fermentación superficial o sumergida siendo este último el más utilizado.

Sumergidos: Este método consiste en sumergir el organismo (hongo) en una solución acuosa que contiene los nutrientes necesarios para su reproducción; La efectividad de este proceso se logra a través del control y el ajuste de: velocidad de agitación, pH, oxígeno y temperatura del medio. Esto con fin de lograr la máxima tasa de crecimiento del organismo, o para conseguir rendimientos máximos del producto. Para esto el biorreactor de fermentación sumergida deben ser previamente esterilizado y el proceso se debe lleva a cabo asépticamente (Nokes, 1999)

Superficial: Este proceso es conocido como en estado sólido o cultivo de superficie, este método consiste en el crecimiento del organismo en materiales sólidos sin la presencia de líquido libre (Cannel y Moo-Young, 1980).

En esta técnica, el agua está unida al sustrato de donde los microorganismos toman los nutrientes y el agua para su desarrollo; debido a que no hay líquido libre, es decir que el sustrato no está sumergido en el agua, los microorganismos pueden tomar más fácilmente el oxígeno que en un sistema de fermentación sumergido (Nokes, 1999)

El equipo donde se lleva a cabo la fermentación es llamado “biorreactor” el cual proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el organismo produzca el compuesto bioactivo deseado (Ruiz *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 1992). Los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido, su diseño debe ser tal que asegure

homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruiz *et al.*, 2007).

## **2.6. Residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes**

La ganadería desempeña un papel importante como recursos de subsistencia de la población que vive en los países en desarrollo, sin embargo, la mayoría de estos se enfrentan al problema de escasez de recursos alimenticios; Los pastizales están degradados y mal administrados y el área bajo cultivos de forraje verde se está reduciendo debido al aumento de la población humana y la urbanización. Como resultado la mayor parte del alimento para rumiantes disponible son los residuos de cosecha que son de baja digestibilidad, bajo valor nutritivo, fibrosos y voluminosos; además estos recursos forrajeros tampoco se administran de la mejor manera, especialmente cuando se trata en abundancia (FAO, 2012).

La disponibilidad de residuos de cultivos varía con la estación y el lugar, en algunas zonas hay deficiencia en ciertas épocas del año, en otros una deficiencia permanente, mientras que en otras zonas en determinados períodos del año se encuentran disponibles en abundancia, pero se pierden en gran medida, es así como pajas por valor de millones de dólares se queman en los campos en estos lugares después de las cosechas, aparte del despilfarro de un alimento potencialmente útil, la quema provoca la contaminación ambiental y la degradación de la fertilidad de los suelos (FAO, 2012). Sin embargo, su utilización está limitada principalmente por su bajo contenido de proteína y elevados niveles de lignina (Peláez, 2010; Akin *et al.*, 1993).

### **2.6.1. Paja de arroz**

Durante la cosecha de arroz, una de las prácticas más frecuente realizada por los agricultores es la de eliminar la paja, la cual es quemada en el campo debido a la dificultad y elevado costo de su retirada, nulo aprovechamiento (Abril *et al.*, 2009) y baja digestibilidad (Álvarez y Combellas, 2005) este último a causa de su composición

nutricional con valores de 82% FDN (Van Soest, 2006), MS 90%, TDN 44%, PC 4,3%, Ca 0,2% y P 0,08% (Drake, 2002)

Según el DANE, en el primer semestre de 2014 el área sembrada de arroz a nivel nacional fue 240.588 ha, con un rendimiento promedio de 5,3t/ha aproximadamente, a su vez este tiene una relación de grano/paja de 1/1,2. Lo cual se constituye en un residuo de cosecha disponible en altas cantidades, que de ser aprovechado de la mejor manera, sería una alternativa de alimentación para el ganado bovino, especialmente en situaciones de déficit forrajero.

En algunas zonas de manera circunstancial, esta paja es utilizada en la alimentación de ruminantes, debido a la capacidad de estos para nutrirse de alimentos con altos contenidos de fibra; sin embargo el alto contenido de lignina y bajo contenido de proteína de estos residuos minimiza su aprovechamiento al reducir significativamente su digestibilidad (Hungate, 1988; Peláez, 2010; Akin *et al.*, 1993; Abdel-Hamid *et al.*, 2013). Frente a esto, se han utilizado diferentes métodos para producir la deslignificación o ruptura del complejo carbohidrato lignina y favorecer así el acceso de los microorganismos ruminales a los carbohidratos estructurales, mejorando su digestibilidad (Montañez *et al.*, 2007).

Los tratamientos biológicos con hongos lignocelulolíticos como *Pleurotus* spp, se pueden utilizar como un medio para mejorar la digestibilidad de estos subproductos, ya que estos hongos tienen la capacidad de disminuir los componentes de la pared celular debido a su capacidad para sintetizar enzimas fibrolíticas y así aumentar la digestibilidad de los subproductos agrícolas fibrosos, como la paja de arroz (Peláez, 2010; Akin *et al.*, 1993).

Se encuentran reacciones químicas que ayudan a mejorar el proceso de digestibilidad. Se ha demostrado que la mayoría de los tratamientos con amoníaco y urea han contribuido a un cierto aumento de la digestibilidad y la ingesta de este subproducto (Van Soest, 2006). El tratamiento con urea o amonificación tiene como objetivo degradar la estructura de la fibra y aportar nitrógeno. El uso de urea tiene la gran ventaja de que es fácil y seguro de usar, y proporciona una fuente de proteína cruda (Kategile *et al.*, 1981; Emtenan *te al.*, 2012). Se ha demostrado que la digestibilidad in vitro de la MS mejora de un 45 a un 62% (Emtenan *te al.*, 2012); la desventaja del amoníaco y la urea es que son bases más débiles que el hidróxido de sodio (Van Soest, 2006), el cual ha sido ampliamente por estudiado por Jackson, (1977). El método de Beckmann como es conocido al tratamiento alcalino,

consiste en remojar la paja en soluciones alcalinas diluidas durante 24 horas y luego se lava con agua; esto conlleva a un incremento de la digestibilidad entre un 40 a 70% aproximadamente. Si bien este proceso ha sido conocido hace más de 50 años, no ha sido de gran aplicación, debido a los altos costos del tratamiento. Se ha demostrado que el tratamiento de alcalinización con NaOH aumenta significativamente la digestibilidad y el aumento del paso de la fibra (Klopfenstein, 1978). Sin embargo, se ha encontrado que este tipo de tratamiento incurre con una considerable pérdida de la materia seca incluyendo valiosa materia orgánica soluble (Sundstøl y Owen, 1984) así también este tratamiento puede ser una causa de contaminación ambiental, por el alto contenido de sodio (Sundstøl y Coxworth, 1984).

## **2.7. Evaluación nutricional de los alimentos mediante la técnica de producción de gas *in vitro***

Una de las mayores limitaciones, de la producción ganadera es la escasez, calidad y fluctuación del suministro de alimento durante todo el año. Es así como proporcionar una alimentación adecuada y de buena calidad al ganado, elevar y/o mantener su productividad es y será un gran desafío (FAO, 2012).

El ganado se alimenta de los residuos de la agroindustrial y de subproductos agrícolas como paja de cereales, cogollo de caña de azúcar, que por lo general contienen alta proporción de lignina y son pobres en proteína, energía, minerales y vitaminas (FAO, 2012). Por lo tanto, el uso de una simple, pero robusta técnicas para la evaluación de la calidad nutricional de estos alimentos, contribuirán a una utilización más eficiente de los mismos (Tedeschi *et al.*, 2008).

Existen varias técnicas para determinar el patrón de fermentación de alimentos a través de incubación en fluido ruminal (Tilley y Terry, 1963; Menke *et al.*, 1979; Theodorou *et al.*; 1994; Mehrez y Orskov, 1977). Sin embargo algunas de estas técnicas, son muy laboriosas y costosas, con gran variación de los resultados y difícil de estandarizar (Huntington y Givens, 1995). Las técnicas que utilizan incubación *in vitro* con fluido ruminal se han descrito y utilizado para determinar el patrón de fermentación de los alimentos (Tilley y Terry, 1963) principalmente debido a su facilidad de uso y bajo costo.

La fermentación ruminal *in vitro*, ha sido utilizada para la evaluación nutricional de la calidad de los forrajeros. Esta técnica proporciona bases para el desarrollo de estrategias de alimentación, evitando pérdidas y reduciendo la producción de metano de los rumiantes. También permite evaluar los forrajes puesto que produce resultados con precisión y repetitividad (Getachew *et al.*, 1998). Ya que según Menke y Steingass, (1988) la producción de gas de un alimento incubado con líquido ruminal, está directamente relacionada con su digestibilidad.

La producción de gas *in vitro*, se ha utilizado para evaluaciones nutricionales de los alimentos para animales, basado en su patrón de gas acumulado, cuando se incuban con fluido ruminal en condiciones anaeróbicas. Fue propuesta inicialmente por Menke *et al.*, (1979) para evaluar la digestibilidad y energía metabolizable de los alimentos usados por los rumiantes.

Han sido propuestos y estandarizados diferentes ajustes al método original, por distintos autores (Menke y Steingass, 1988; Blummel *et al.*, 1997; Theodorou *et al.*, 1994; Cone *et al.*, 1996; Beaubien *et al.*, 1988; Pell y Schofield, 1993), lo que ha originado avances, así como controversias entre los mismos. También se han propuesto distintos modelos matemáticos, para ajustar los datos de producción de gas *in vitro* en funciones no lineales, transformaciones logarítmicas, regresión múltiple, mínimos cuadrados (López *et al.*, 1999; Tedeschi *et al.*, 2008).

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Materiales

Se utilizó una cepa de *Pleurotus ostreatus* del laboratorio de insumos biológicos FUNGICOL S.A.S. (Palmira Valle).

Vinaza, proveniente de la planta de destilación de alcohol del Ingenio Providencia (Palmira Valle), con una composición promedio como se presenta en la Tabla 2

**Tabla 3-1.** *Composición química de la vinaza*

Componente	Promedio	SD
Brix	16,1	1
pH	4,2	0,1
M.O %	7,7	3
N-Total %	0,45	0,2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> %	0,05	0,01
CaO %	0,88	0,6
MgO %	0,33	0,05
K <sub>2</sub> O %	0,89	0,3
NaO %	0,04	0,01
S (ppm)	0,39	0,2
B (ppm)	20,1	11
Cu (ppm)	17,1	25
Fe (ppm)	222,9	100
Mn (ppm)	135,2	271
Zn (ppm)	44,9	36

*Fuente Laboratorio Química de Suelos Ingenio Providencia SA, 2014*

Para el cultivo del hongo en sustrato sólido, se utilizó tamo de arroz proveniente del departamento del Tolima, suministrado por la granja Mario González Aranda de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Ensayos preliminares

Con el propósito de estandarizar el método de cultivo de *P. ostreatus* en vinaza, se realizaron ensayos previos de la siguiente manera:

**Ensayo “a”** acondicionamiento del pH: Se llevó el pH de la vinaza de 4,2 a 6,5 con la adición de: carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), obteniendo 3 soluciones distintas; posteriormente con cada una de éstas, se cultivó el hongo en caja de Petri a diferentes concentraciones de vinaza, en un medio de PDA (Potato Dextrose Agar), según la metodología propuesta por Ferreira, (2009): en 1l de agua, se adiciona 30g de extracto de malta, 3g de peptona de harina de soya y 15g de agar; se llevó al autoclave a 15lb 121°C /15minutos y se dejó incubar por un periodo de 6 a 7 días a 30°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), la evaluación se realizó de observando el radio de crecimiento del hongo de forma cualitativa.

Se evaluaron 12 tratamientos con 3 repeticiones de la siguiente manera:

- |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>CaCO<sub>3</sub></b>  | <input type="checkbox"/> | PDA (50%) + vinaza (50%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | PDA (25%) + vinaza (75%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | PDA (75%) + vinaza (25%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | Agar (3%) + vinaza (97%) |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> | <input type="checkbox"/> | PDA (50%) + vinaza (50%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | PDA (25%) + vinaza (75%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | PDA (75%) + vinaza (25%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | Agar (3%) + vinaza (97%) |
| <b>NaOH</b>              | <input type="checkbox"/> | PDA (50%) + vinaza (50%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | PDA (25%) + vinaza (75%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | PDA (75%) + vinaza (25%) |
|                          | <input type="checkbox"/> | Agar (3%) + vinaza (97%) |

**Ensayo “b”:** cultivo en sustrato líquido (vinaza): Para el cultivo en sustrato líquido, se utilizó vinaza con dos diluciones (70% y sin diluir) a pH de 6,5; esto se realizó en recipiente con 100ml de vinaza esterilizada a 15lb,121°C/15 minutos; después que esta alcanzo una temperatura ambiente, se inoculo adicionando tres discos del hongo, provenientes del cultivo de la caja de Petri y se colocaron en un agitador durante 15 días a 180 RPM a 28±2°C bajo condiciones de oscuridad, midiendo la absorbancia a 475nm cada 7 días, de acuerdo a la metodología propuesta por Ferreira, (2009).

**Ensayo “c”:** Bioreactor con recirculación de la vinaza: El hongo se inoculo en paja de arroz previamente esterilizada (15lb,121°C/1h), en un biorreactor artesanal, diseñado de tal manera que la vinaza impulsada por una bomba, pueda recircular por el sustrato solido que contiene el hongo, esto con el fin de poder aprovechar las exoenzimas y así decolorar la vinaza la cual se midió por absorbancia a 475nm cada.

### **3.2.2. Preparación y multiplicación del hongo**

El hongo se cultivó en un medio de PDA, según la metodología propuesta por Ferreira, (2009) descrita anteriormente, seguidamente se pasó a cajas de Petri con 10 ml de medio y se inoculó con el hongo; esto se incubó por un periodo de 6 a 7 días a 30°C (±1).

Para el almacenamiento, se colocó en bolsas de polipropileno con 500g de trigo previamente humedecido (60 a 70%) y se esterilizado (15 lb, 121°C/1h). En seguida se inoculó 3 cajas de Petri en el trigo (Figura 3); el cual se puede almacenar hasta por 2 meses. Todo esto se realizó en cámara de flujo laminar en condiciones estériles para evitar la contaminación.

**Figura 3-2.** Esquema de preparación y adecuación del inocular.



### 3.2.3. Preparación y adecuación del sustrato (tamo de arroz y vinaza)

El tamo de arroz, fue picado en tamaño de  $2\pm 1$  cm y remojado hasta alcanzar una humedad entre el 60 a 70% y posteriormente se llevó al autoclave a 15 lb,  $121^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ .

La vinaza que inicialmente tiene un pH de 4,2, se llevó a 6,5 con la adición de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), esto basado en los ensayos preliminares de estandarización; luego una parte de esta se llevó a una dilución del 70%, adicionándole agua, quedando como resultado dos niveles de vinaza (diluida 70% y sin diluir) y se esterilizó (15 lb,  $121^{\circ}\text{C}/1\text{hora}$ ).

### **3.2.4. Procedimiento para el cultivo del hongo en vinaza**

Una vez que los materiales fueron previamente adecuados (hongo, vinaza y tamo de arroz), se inoculó el hongo en el tamo de arroz, a una proporción de 5kg de tamo por 250g del inóculo dispuesto en el trigo de acuerdo a la metodología propuesta por CENICAFE, (2004) adaptado por FUNGICOL, (2014); esto se hizo en recipientes con capacidad de 20 litros cada uno.

Basados en los estudios preliminares de estandarización y teniendo en cuenta que al reemplazar totalmente la fuente de carbono de la que se alimenta el hongo, se puede generar un estrés en la etapa inicial de adaptación y se puede limitar o inhibir el crecimiento de este, y por lo tanto la producción de enzimas (Rangel, 2012), fue necesario dejar que el hongo colonice el tamo por un periodo de 20 días, para luego adicionar la vinaza.

Trascurrido este tiempo (20días), se adiciono a los biorreactores la vinaza a razón de 1:2 peso volumen (P/V), procurando que tuviese poca disponibilidad de aire, para impedir que el hongo fructifique, puesto que solamente interesa el crecimiento vegetativo de este (micelio) y en consecuencia la actividad enzimática del mismo. Los biorreactores se mantuvieron a una temperatura y humedad relativa de 28°C ( $\pm 2$ ) y 60% ( $\pm 10$ ) respectivamente, todo esto bajo condiciones de oscuridad.

**Figura 3-3.** Esquema de la metodología para el cultivo del hongo con vinaza.



### 3.2.5. Biodegradación de la vinaza

La biodegradación de la vinaza se evaluó cada 7 días por el transcurso de 36 días, mediante el cálculo del porcentaje de decoloración (PD%), a partir de medidas de absorbancia a una longitud de onda 475 nm, de acuerdo a la ecuación 1, propuesta por Itoh, (2005) y Sirianuntapiboon *et al.*, (1995). Ya que la decoloración está directamente relacionada con la actividad enzimática lacasa y peroxidasa, indicador de la participación de estas enzimas en la despolimerización de los compuestos fenólicos y pigmentos de melanoidinas (Ferreira, 2009).

(1)

$$PD(\%) = \frac{(\text{Absorbancia Inicial} - \text{Absorbancia final})}{\text{Absorbancia inicial}} * 100$$

Conjuntamente a la vinaza antes y después del tratamiento con el hongo, se le realizaron análisis de la DQO y DBO, carbono orgánico total, de acuerdo a la metodología APHA, (2005) así como de sólidos volátiles y totales, por incineración de acuerdo a la metodología establecida por el laboratorio de química ambiental de la Universidad Nacional de Colombia (Cortés, 2013).

Análisis estadístico: se realizó un análisis de varianza con un diseño completamente al azar (DCA) con 4 repeticiones y dos niveles (dilución 70% y sin diluir), todo esto se realizó con vinaza de un mismo lote.

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + V_i + E_{ij}$$

$Y_{ij}$  = % decoloración

$\mu$  = Promedio

$V_i$  = nivel de vinaza (i=1,2)

$E_{ij}$  = Error experimental

### 3.2.6. Formulación y análisis químico de las dietas

Una vez obtenida la vinaza tratada con *P. ostreatus*, se elaboró las dietas compuesta de torta de soya, maíz molido, tamo de arroz con 4 niveles (3, 6, 9 y 12%) de vinaza tratada con el hongo(VT) y sin tratar(VST) más un testigo sin vinaza (Tabla 3), para un total de nueve dietas, con la ayuda del software Basic Balancer Program (Universidad de Georgia, 2013), para vacas lactantes en el pico de lactancia con un peso promedio de 550kg, con 60% de Nutrientes Digestibles Totales (TDN), 12% de proteína cruda (PC), 0,17% de P y 0,25% de Ca.

**Tabla 3-2.** Dietas para vacas de leche con diferentes niveles de VT y VST (base seca)

Ingrediente en base seca (%)	testigo	Dietas con niveles de vinaza tratada y sin tratar			
		3	6	9	12
Vinaza(VT y VST)	0	3	6	9	12
Paja-arroz	47	45	44	43	41
Maíz-molido	40	39	37	35	33
T. Soya	13	13	13	14	14
<b>Total</b>	100	100	100	100	100

A las diferentes dietas elaboradas con VT y VST, se determinó el contenido de materia seca (MS), proteína (PC), Fibra detergente neutra (FDN), lignina (LDA) y cenizas.

Metodología de análisis: MS: AOAC, 1990; PC: Kjeldahl, 1983; FDN y LDA; ANKOM; Cenizas: Gravimétrico (Mineralización 600°C durante 8h). AOAC, 1990.

### 3.2.7. Fermentación en jeringas

El estudio de la cinética de degradación de las dietas a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo a diferentes tiempos, se realizó de acuerdo a la metodología estandarizada bajo el protocolo del laboratorio de nutrición animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Menke y Steingass, (1988) adaptado por Leterme y Estrada, (2012).

Adecuación de materiales: A cada una de las jeringas se adiciona 200 mg de las diferentes raciones preparadas previamente, y se llevan a la estufa a 39°C hasta la inoculación con el líquido ruminal.

Colección del inóculo ruminal: los animales donantes del líquido ruminal fueron dos machos cebuinos con un peso promedio de 450 kg, fistulados al rumen de CIAT Palmira (Valle), en pastoreo con pasto estrella, suplementados con torta de soya y sal mineralizada. El líquido ruminal fue tomado en un termo con temperatura de 39°C y sellado herméticamente para su traslado; luego el contenido ruminal fue filtrado en un tamiz de 250 micras y mezclado con la solución tampón (Anexo A), manteniéndose en baño maría a 39°C y saturado con CO<sub>2</sub>.

La inoculación de las muestras se hizo por triplicado, a cada jeringa dispuesta con anterioridad con 200 mg de la muestra, se le adiciono 30 ml de la solución tampón mezclada con el líquido ruminal; se realizó la primera lectura de volumen (0h) y se llevó al baño maría a 39°C. Las lecturas posteriores del volumen de las jeringas se realizaron a las 2h, 5h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 48h y 72horas

Simultáneamente se colocaron 3 blancos que contenían la solución tampón mezclada con el líquido ruminal sin el sustrato; Al igual que los blancos, fueron corrido 3 estándares (control interno con una producción de gas conocida).

Para representar la dinámica de producción de gas en el tiempo de incubación, se utilizó el modelo propuesto por France *et al.*, (1993) ecuación (2).

(2)

$$Y = A \left[ 1 - e^{(-b(t-L)) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L})} \right]$$

Y= Volumen de gas en el tiempo

A= Volumen de gas acumulado proveniente de la fermentación total del sustrato (asíntota)

b= Tasa constante de producción de gas (ml/h)

t= Tiempo de incubación (h)

c= tasa constante de producción de gases del material potencialmente degradable

L= tiempo de retraso Lag/h

Análisis estadístico: se utilizó un análisis de varianza con un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones, para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan.

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

$Y_{ij}$  = FDN, lignina, MS, PC y cenizas

$\mu$  = Promedio

$T_i$  = dietas con niveles de vinaza (VT y VST) y testigo

$E_{ij}$  = Error experimental

Para las comparaciones específicas de mayor interés entre las dietas con niveles vinaza, se realizó contrastes ortogonales así: tratada vs sin tratar, tratada vs control y sin tratar vs control.

**Figura 3-4.** Esquema de metodología usada para análisis de dietas y tamo de arroz.



### 3.2.8. Estudio del tamo de arroz

Transcurrido 36 días, el tamo de arroz usado como sustrato para el cultivo de *P. ostreatus*, se determinó el contenido de MS, PC, FDN, LDA, cenizas y producción de gas, comparado con el tamo control y con la misma metodologías usadas para el análisis de las dietas para vacas lactantes. Para representar la dinámica de producción de gas, se utilizó el modelo propuesto por France *et al.*, (1993) descrito anteriormente. El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza en un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones, para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan.

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

$Y_{ij}$  = FDN, lignina, MS, PC y cenizas (%)

$\mu$  = Promedio

$T_i$  = (i=1,2)

$E_{ij}$  = Error experimental

El grado de deslignificación, se estimó de acuerdo a la ecuación (3). El término lignina inicial y final se refiere a la concentración (%) antes y después del proceso de degradación del tamo de arroz por parte del hongo (Rangel, 2012).

(3)

$$\text{Grado de deslignificación (\%)} = \frac{(\text{lignina inicial\%} - \text{lignina final\%})}{\text{lignina inicial\%}} * 100$$

**Microscopia Electrónica de Barrido (SEM):** Se observaron las características morfológicas de la pared celular del tamo de arroz antes y después de 36 días de ser sometido al proceso de degradación por *P. ostreatus*.

Equipo: Microscopio Electrónico de Barrido, Marca: FEI, Modelo: Quanta 200 – Metalizador.  
Realizado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, de la Universidad Nacional, sede Bogotá.

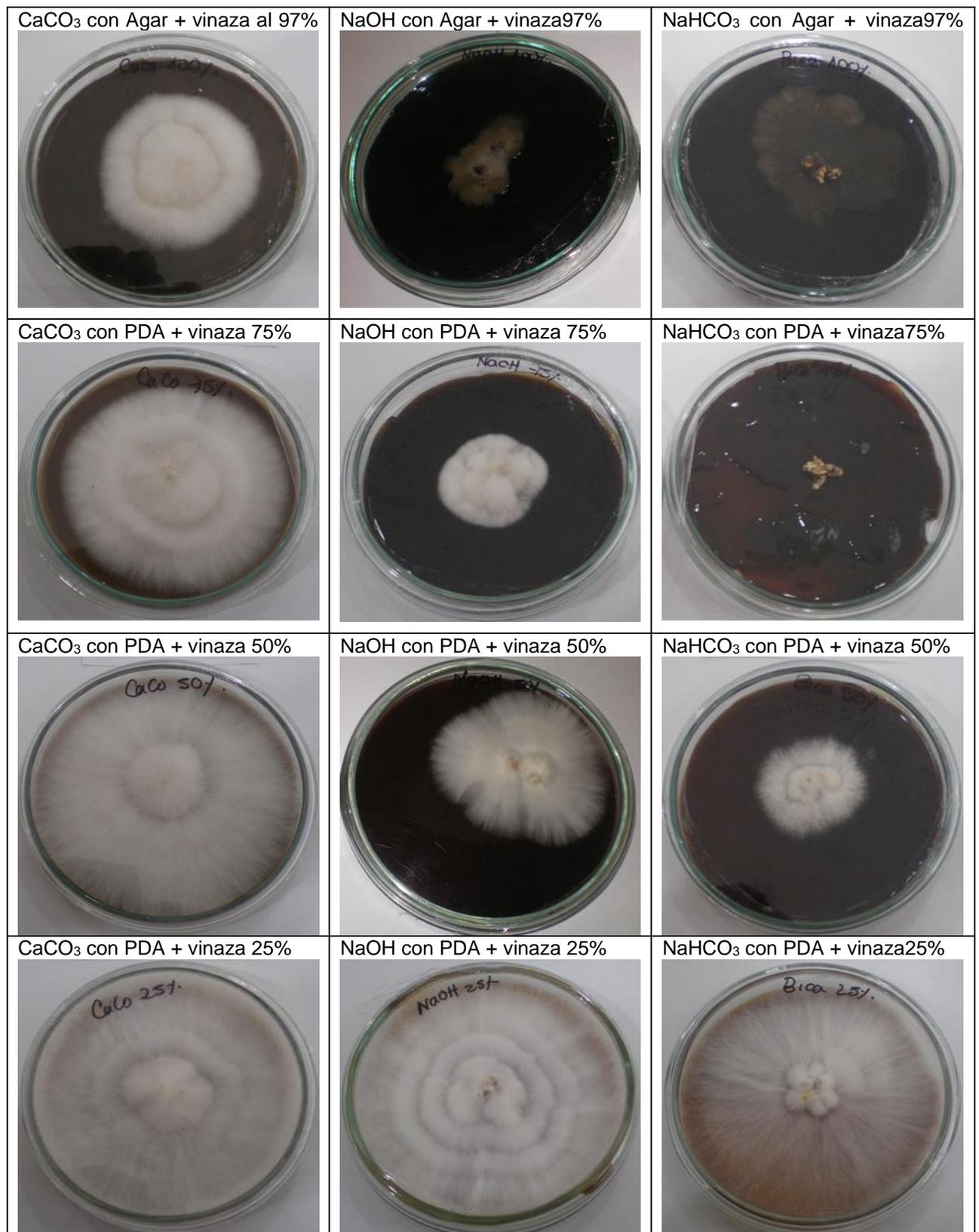
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Estandarización del método de cultivo

**Ensayo “a”.** Acondicionamiento del pH:

Se encontró que al utilizar  $\text{NaHCO}_3$  con una concentración de 75 y 97% de vinaza y  $\text{NaOH}$  con 97% de vinaza, no se presentó crecimiento micelial; contrario a esto cuando se usó  $\text{CaCO}_3$  en todas las concentraciones estudiadas se presentó crecimiento, aunque a medida que se aumenta la concentración de vinaza, este disminuye ligeramente (figura 5). Por esta razón, para llevar el pH inicial de la vinaza de 4,2 a 6,5 se utilizó carbonato de calcio.

**Figura 4-5.** *P.ostreatus* en vinaza corregido el pH 6,5 usando  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaOH}$  y  $\text{NaHCO}_3$



**Ensayo “b”.** Cultivo en sustrato líquido (vinaza):

No se observó crecimiento del hongo en ninguna de las dos diluciones, el cual se esperaba que fuese en forma de pellets, pues según Ferreira, (2009) este es un crecimiento característico de este tipo de hongos cuando se cultiva en sustrato líquido. Ciertos hongos pueden ser cultivados en medio líquido, sin embargo este debe ser suplementado con glucosa o celobiosa; de no ser suplementado por estos azúcares, el crecimiento de estos hongos puede ser muy bajo, e incluso nulo (Singh y Pandey, 2009). Así mismo la mayoría de los estudios realizados con *Pleurotus* en medio líquido, han sido suplementados para garantizar el crecimiento (Liu *et al.*, 2009; Papaspyridi *et al.*, 2010; Rangel, 2012).

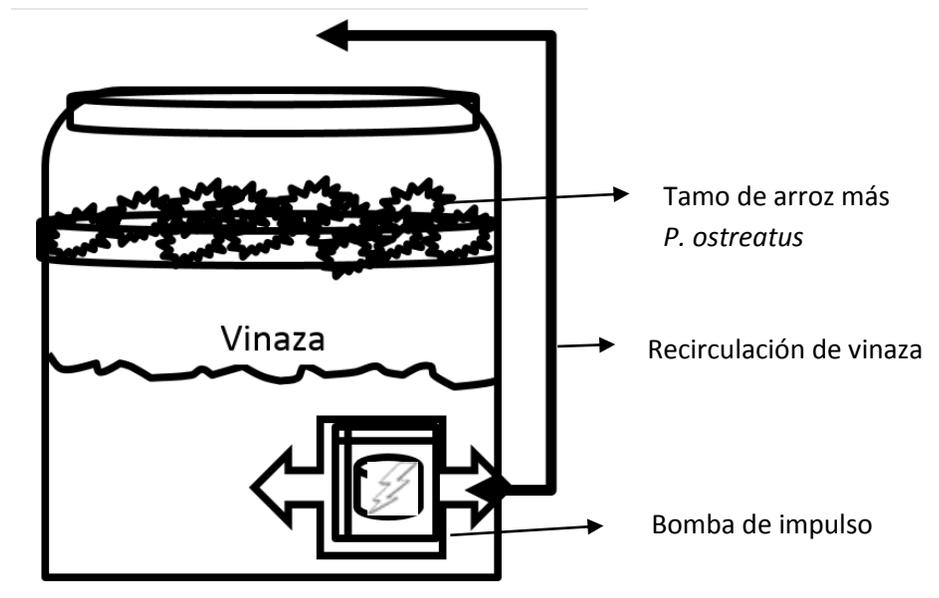
**Figura 4-6.** Incubación de *P. ostreatus* en medio líquido.



**Ensayo “c”.** Bioreactor con recirculación de la vinaza:

En este modelo, no fue posible cultivar el hongo, pese a que el lugar fue desinfectado y los materiales previamente esterilizados, el hongo se contaminó fácilmente debido a que se encontraba al aire libre; el porcentaje de decoloración alcanzado fue alrededor del 11%. Debido a que la producción de lacasas se pudo ver afectada por varios factores durante el desarrollo del hongo, como la composición del medio de cultivo, pH, temperatura y aireación (Kahraman y Gurdal, 2002).

**Figura 4-7.** Bioreactor con recirculación de vinaza.



## 4.2. Análisis de la biodegradación de la vinaza

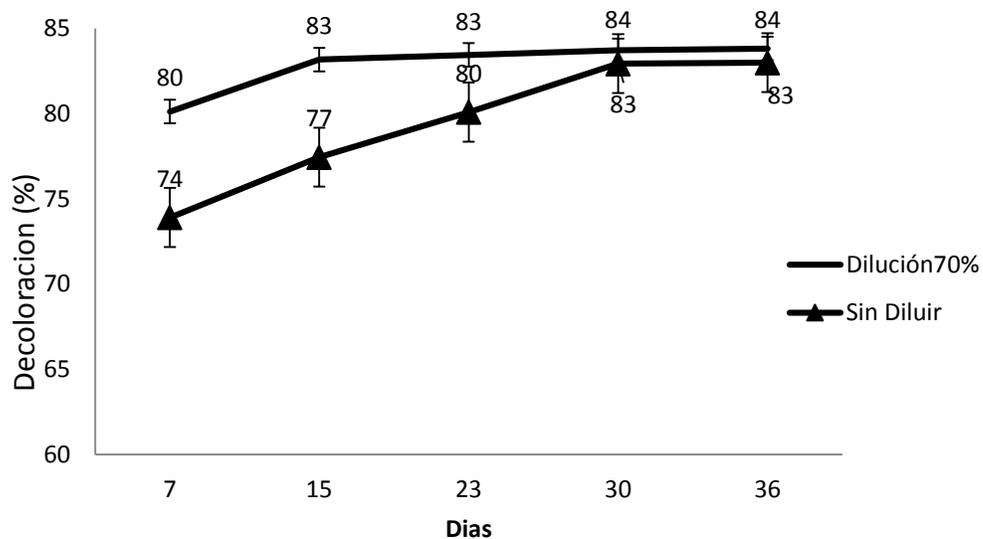
Se encontró que *P. ostreatus*, es capaz de remover la coloración de la vinaza (figura 8) por medio de su actividad enzimática y por ende los compuestos de alto peso molecular, melanoidinas, caramelos y compuestos fenoles, ya que según Ferreira, (2009) la decoloración está directamente relacionada con el aumento de la actividad enzimática, lacasa y peroxidasa, que es un indicador de la participación de estas enzimas en la despolimerización de los compuestos fenólicos y pigmentos de melanoidinas.

**Figura 4-8.** Vinaza: A, tratada; B, sin tratar.



En el nivel de dilución no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), obteniendo promedios iguales al final del tratamiento de  $83 \pm 4$  y  $83 \pm 1\%$  para vinaza diluida y sin diluir respectivamente (grafica 1).

**Grafica 4-1.** Prueba de Duncan para remoción del color de la vinaza por *P. ostreatus*.

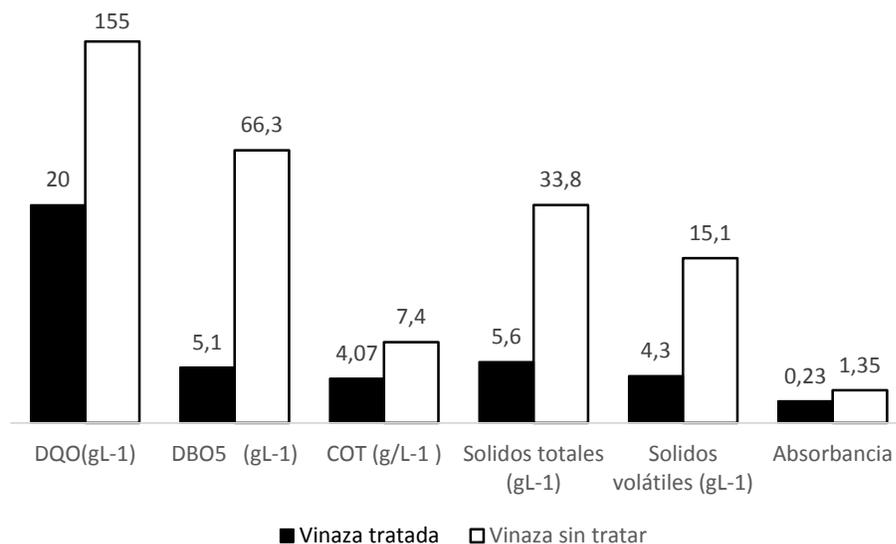


Así mismo se encontró que la mayor eficiencia de decoloración se presentó durante los primeros 7 días, alcanzando promedios del 80 y 74% para vinaza diluida y sin diluir respectivamente (grafica 1), sin encontrar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), de aquí en adelante hasta el día 36 la decoloración fue mínima, de 3 y 9 puntos porcentuales para vinaza diluida y sin diluir respectivamente, ya que al final del tiempo de fermentación la actividad enzimática se reduce, posiblemente atribuida a la acumulación de subproductos que la inhiben, producidos durante el metabolismo del hongo (Rodríguez *et al.*, 2003).

Esto concuerda con lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2003) los cuales con *Pleurotus* sp encontraron que la mayor parte del color desaparece en los primeros 10 días coincidiendo con el período de mayor actividad lacasa, aunque luego continúa la decoloración en menor proporción hasta los 20 días; de igual modo Dahiya *et al.*, (2001) con *Phanerochaete chrysosporium* consiguieron remover hasta en un 80% el color de efluentes de la industria azucarera con alto contenido de melanoidinas, en los primeros 7 días de tratamiento.

Los resultados de decoloración obtenidos son relevantes, ya que por una parte, según Rodríguez *et al.*, (2003) el color rara vez se considera una forma de contaminación a pesar del daño que causa, el cual está asociada con la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular, que a menudo son sustancias recalcitrantes y con elevados valores de DQO y DBO, como se demuestra en la gráfica 2.

**Grafica 4-2.** Características de la vinaza antes y después del tratamiento por *P.ostreatus*



Al ser reducida la absorbancia y por ende el color de la vinaza, se encontró que la DQO y DBO se reduce en un 87,1 y 92,3% respectivamente (grafica 2). Retes-Pruneda, (2014) con *P.ostreatus* logro reducir en un 88,7 y 89,7% la DQO y DBO de la vinaza de tequila respectivamente.

Ferreira, (2009) y Ferreira *et al.*, (2011) con *Pleurotus sajor-caju* encontraron un promedio de decoloración alrededor del 99% y una reducción del 82% en la DQO y 75% en la DBO, sin encontrar diferencia en el nivel de dilución; esto demuestra que *P. sajor-caju* es probablemente más eficiente que *P.ostreatus* en cuanto a la reducción del color, aunque los valores de DQO son similares a los obtenidos.

Por su parte Pérez *et al.*, (2005) en un tratamiento combinado (anaerobio-aerobio) para la decoloración de la vinaza, utilizando tratamiento anaerobio metanogénico, empleando un lodo granular y posterior tratamiento aerobio con *Pleurotus* sp, encontraron que se puede remover el color más del 80% y una disminución de la DQO mayor al 70%.

En el contenido de carbono orgánico total se presentó una reducción equivalente al 45% (grafica 2). Isaza *et al.*, (2011) en el tratamiento de vinazas mediante fotocátalisis solar homogénea en un reactor de película descendente alcanzaron disminuciones de COT de 12,53%. Giratá *et al.*, (2011) usando la misma técnica logro reducir el contenido de COT hasta un 12,33%. Lo que indica que el tratamiento biológico con *P.ostreatus* es más eficiente que el químico; la importancia de esto radica en que se reduce el impacto por la descomposición de la materia orgánica, que puede formar compuestos que dan lugar a olores desagradables en el ambiente.

Al mismo tiempo se encontró que al ser tratada la vinaza, se presenta una reducción del contenido de solidos totales ( $\text{gL}^{-1}$ ) de 33,8 a 5,6 y solidos volátiles ( $\text{gL}^{-1}$ ) de 15,1 a 4,2. La reducción o eliminación de estos resulta de gran importancia ya que estos son en parte los que dan lugar al aumento de turbidez en las aguas donde se deposita la vinaza; del mismo modo, se minimiza posibles efectos negativos que pudiese causar la vinaza, sobre medios acuáticos como el caso de la disminución de la penetración de la luz solar por aumento del color, solubilidad del oxígeno y depósitos sobre el fondo del cauce favoreciendo la aparición de condiciones anaerobias.

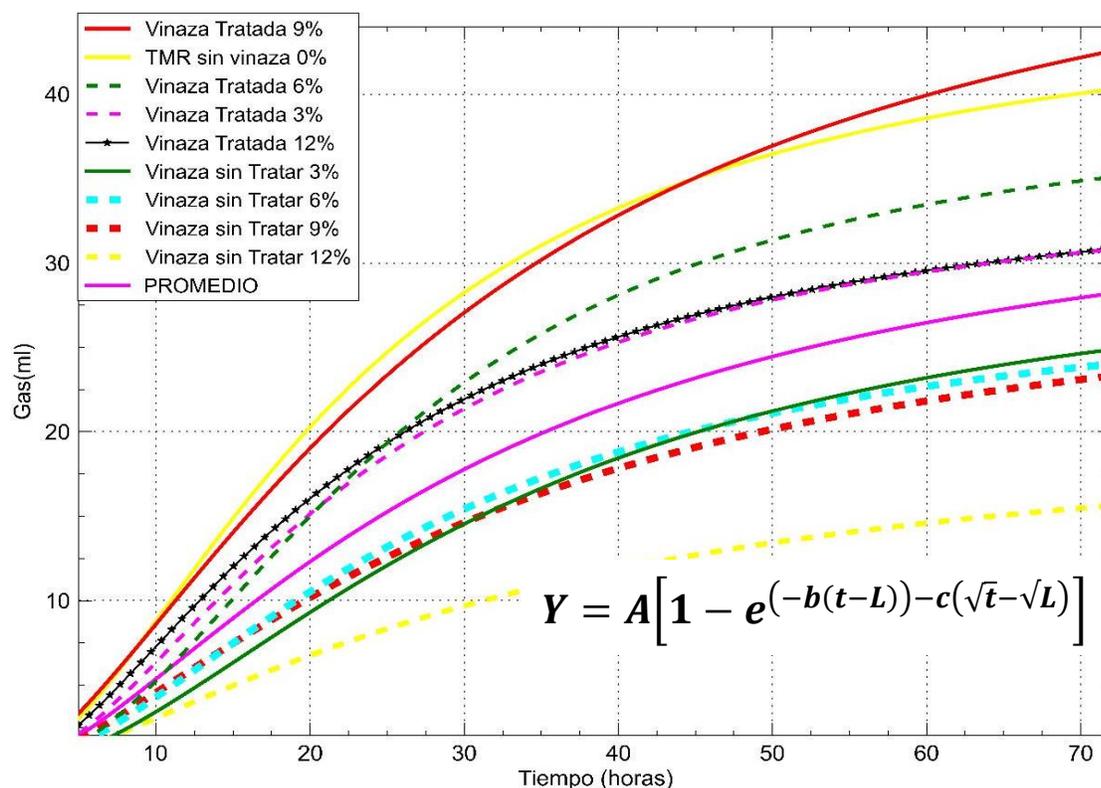
En el caso particular de la vinaza de la industria alcoholera considerada como un efluente agresivo para el medio ambiente por su alto potencial de contaminación, no sólo por el

elevado contenido de materia orgánica, sino por el color oscuro que la caracteriza debido a la presencia de melanoidinas, donde el principal problema para el tratamiento de la vinaza lo constituye la presencia de estos compuestos de estructura química compleja y resistente a la biodegradación. El tratamiento con *P. ostreatus*, se convierte en una alternativa viable para la reducción o eliminación del color y por ende los compuestos recalcitrantes como las melanoidinas y de este modo mitigar el impacto ambiental en los ecosistemas donde se libere la vinaza.

### **4.3. Análisis nutricionales de las dietas con vinaza tratada y sin tratar**

En la gráfica 3, se presenta la cinética de producción de gas de acuerdo al modelo propuesto por France *et al.*, (1993) en la cual se aprecia que todas las raciones con VT se encuentran por encima del promedio, mientras que las que contienen VST por debajo; por consiguiente la vinaza sin tratar, tiene un efecto negativo en la producción de gas y por lo tanto en la digestibilidad de la materia seca, pues según Menke y Steingass, (1988) la producción de gas de un alimento incubado con líquido ruminal está directamente relacionada con la digestibilidad del mismo.

**Grafica 4-3.** Cinética de producción de gas de acuerdo.



En la tabla 5, se muestran los resultados de los parámetros de la cinética de producción de gas y la composición química de las diferentes dietas; se encontró que para el parámetro (A) volumen de gas acumulado, con la adición de VT al 9% fue la que mayor gas produjo junto con el testigo; que a su vez no difiere de las demás dietas con todos los niveles de VT ( $p < 0,05$ ).

La tasa de producción de gas (ml/h), no se vio afectada por la inclusión de vinaza en las dietas, pues la variabilidad fue mínima, destacándose las dietas con mayor tasa de degradación con VT al 6, 12, 3%, testigo y VST al 3%, lo que indica que la inclusión de vinaza entre estos niveles no alteró de manera significativa el proceso fermentativo.

El tiempo de colonización (L) conocido como el intervalo de tiempo, en el cual los microorganismos se encuentran en fase de adaptación, en tanto colonizan el sustrato e inicia la actividad enzimática; la mayoría de los tratamientos fueron iguales, salvo por el

que contiene VT al 6% que fue mayor, quien a su vez no difiere significativamente ( $p < 0,05$ ) de VT al 3%, testigo y VST 3 y 12%. En este periodo la producción de gas presenta un periodo de latencia en su primera parte en la cual no hay producción de gas y es aquí donde se da la capacidad de digestión del alimento gracias a los microorganismos presentes en el inoculo (Álvarez, 2009). El tiempo de colonización varía en función del sustrato degradado y la presencia de carbohidratos solubles. A medida que las concentraciones de carbohidratos solubles aumentan en la dieta, se reduce el tiempo de colonización y se incrementa la eficiencia en la síntesis de proteína microbiana (Noguera *et al.*, 2006).

**Tabla 4-3.** Parámetros de la cinética de producción de gas estimados por el modelo de France y composición química de las dietas con vinaza tratada (VT) y sin tratar (VST).

	3%		6%		9%		12%		Testigo
	VT	VST	VT	VST	VT	VST	VT	VST	0%
A	31,1 <sup>bcd</sup>	28,3 <sup>cde</sup>	37,0 <sup>bc</sup>	27,5 <sup>cde</sup>	48,4 <sup>a</sup>	24,6 <sup>de</sup>	33,3 <sup>bcd</sup>	17,1 <sup>e</sup>	42,4 <sup>ab</sup>
b	0,06 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,06 <sup>ab</sup>
L	1,86 <sup>ab</sup>	2,65 <sup>ab</sup>	3,03 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	1,18 <sup>b</sup>	0,99 <sup>b</sup>	1,68 <sup>ab</sup>	1,50 <sup>ab</sup>
R	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97
MS	79,8 <sup>b</sup>	76,8 <sup>b</sup>	70,5 <sup>c</sup>	66,1 <sup>cd</sup>	62,8 <sup>d</sup>	63,9 <sup>d</sup>	56,0 <sup>e</sup>	61,5 <sup>d</sup>	90,5 <sup>a</sup>
Cenizas	8,7 <sup>d</sup>	11,5 <sup>a</sup>	8,3 <sup>d</sup>	9,9 <sup>bc</sup>	9,1 <sup>cd</sup>	10,5 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>bc</sup>	10,6 <sup>ab</sup>	8,3 <sup>d</sup>
Proteína	17,7 <sup>bc</sup>	16,0 <sup>c</sup>	21,9 <sup>a</sup>	16,7 <sup>c</sup>	21,9 <sup>a</sup>	17,7 <sup>bc</sup>	22,7 <sup>a</sup>	18,9 <sup>b</sup>	13,7 <sup>d</sup>
FDN	42,6 <sup>c</sup>	49,1 <sup>b</sup>	42,7 <sup>c</sup>	49,3 <sup>b</sup>	43,5 <sup>c</sup>	41,7 <sup>cd</sup>	40,0 <sup>d</sup>	37,3 <sup>e</sup>	73,8 <sup>a</sup>
Lignina	6,0 <sup>f</sup>	8,5 <sup>bc</sup>	7,7 <sup>cd</sup>	8,8 <sup>b</sup>	8,4 <sup>bc</sup>	7,3 <sup>de</sup>	6,5 <sup>ef</sup>	6,9 <sup>def</sup>	12,7 <sup>a</sup>

A = volumen de gas acumulado (ml); b= tasa constante de producción de gas (ml/h); L = tiempo de colonización (h); R = coeficiente de determinación. Valores con distinta letra difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ).

El tratamiento con VT al 9% presento menor contenido de lignina y FDN, que el testigo, sin embargo la producción de gas acumulado(ml), la tasa de degradación(ml/h) y el tiempo de colonización(h) no difirieron significativamente ( $p < 0,05$ ).

Al utilizar vinaza tratada al 9% se encontró un volumen máximo de producción de gas (48,4ml), el cual disminuye con un 12% de esta misma (VT) encontrando diferencias significativas entre estos ( $p < 0,05$ ), no obstante este último no difiere significativamente del testigo; por tanto de ser utilizada la vinaza tratada con *P. ostreatus* para la alimentación de rumiantes, se obtendrá una mayor efectividad al 9% con VT, aunque se puede utilizar hasta un 12% de VT.

A medida que se adiciona VST, de manera creciente, la producción de gas disminuye. La mayor producción de gas (28,3ml) ocurre al nivel del 3% con VST, aunque hasta el nivel del 9% con VST no difieren estadísticamente, todos estos niveles son diferentes a la dieta testigo ( $P < 0,05$ ). En cuanto al contenido de PC, se encontró un aumento a medida que se

incrementa los niveles de VT en la dieta, esto debido probablemente al aporte de proteína por parte del hongo.

El color marrón oscuro de la vinaza es atribuido a la presencia de polímeros de alto peso molecular llamadas melanoidinas, a menudo son sustancias tóxicas, y semejantes a la lignina. Lo que explicaría el efecto adverso encontrado al utilizar VST. Al ser degradados estos compuestos por la acción del complejo enzimático de *P.ostreatus*, la producción de gas aumenta reflejando un ambiente más favorable para los microorganismos del rumen

En vacas lecheras de alta producción Fernández *et al.*, (2013) recomiendan utilizar la vinaza a un nivel máximo del 5% en el suplemento, para no afectar negativamente el estado metabólico y productivo del animal. Atribuyen estos resultados a posibles efectos tóxicos por compuestos similares a la lignina contenidos en la vinaza, producto de la reacción de Maillar sobre los microorganismos del rumen y, a los altos niveles de potasio frecuentemente reportado como limitante también en melaza, para cerdos y aves. Battimelli, (2010) reporta toxicidad de las melanoidinas de la vinaza para los microorganismos, reforzando así los resultados encontrados en este trabajo.

La hipótesis de que las melanoidinas presentes en la vinaza por su similitud con la lignina y su carácter recalcitrante, interfieren en desarrollo de los microorganismos ruminales y en consecuencia en la digestión del alimento, tiene suficiente respaldo en la literatura científica consultada y en los resultados obtenidos en este trabajo de laboratorio *in vitro*

**Tabla 4-4.** Contrastes ortogonales para parámetros de la cinética de producción de gas y composición química de las dietas con VT y VST

<b>Contraste</b>	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>L</b>	<b>MS</b>	<b>Cenizas</b>	<b>PC</b>	<b>FDN</b>	<b>Lignina</b>
Tratada vs sin tratar	***	ns	ns	ns	***	***	ns	ns
Tratada vs testigo	ns	ns	ns	***	ns	***	***	***
Sin tratar vs testigo	***	ns	ns	***	***	***	***	***

ns = no significativo; \*\*\* significancia  $p < 0,01$

En el análisis de contrastes ortogonales para las comparaciones previamente definidas, indicaron que la producción de gas acumulado a las 72h (A) entre niveles de vinaza tratada con *P. ostreatus* versus sin tratar (tabla 6), presentaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), por lo que el tratamiento con el hongo contribuyo de manera positiva sobre este parámetro; en cuanto al contenido de FDN y lignina para este mismo contraste, no se

presentaron diferencias ( $p < 0,01$ ). Se deduce que la diferencia en la producción de gas, no es debido precisamente al contenido de lignina y/o FDN, sino a los compuestos fenoles considerados tóxicos, presentes en la vinaza (melanoidinas), y por su similitud con la lignina y carácter recalcitrante tiene un efecto antimicrobiano (Arimi *et al.*, 2014). La inclusión de vinaza tratada con *P.ostreatus* mejora la producción de gas y por lo tanto la digestibilidad del alimento y por su alta disponibilidad sería factible su utilización en la alimentación de rumiantes o incluso en otras especies de interés zootécnico.

El tratamiento de la vinaza, no afectó ninguno de los parámetros de la cinética de producción de gas, puesto que no se presentaron diferencias entre tratada vs testigo, sin embargo los resultados de composición química excepto la lignina, se vieron afectados, destacándose el mayor contenido de lignina y FDN en la dieta testigo.

Para el contraste vinaza sin tratar vs testigo, se encontró una diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ), en la mayoría de los datos analizados, a diferencia de los parámetros tasa de producción de gas (b) y tiempo de colonización (L), que al igual que las demás comparaciones previamente definidas, no presentaron diferencias.

El efecto encontrado en los niveles de VST, puede atribuirse al carácter tóxico, debido a la presencia de compuestos recalcitrantes e inhibidores del crecimiento o a derivados premelanoidinos de intensa coloración (Rodríguez *et al.*, 2003) que pueden estar interfiriendo en el desarrollo de la población bacteriana del rumen; ya que las melanoidinas son tóxicas para los microorganismos (Figaro *et al.*, 2009; Arimi *et al.*, 2014), e incluso Kunding, (2004) y Kunding *et al.*, (2008) plantea que las melanoidinas tienen un marcado efecto sobre *Salmonella* induciendo cepas virulentas, especialmente si están involucrados los amino ácidos arginina e histidina (que es el caso de vinaza), lo que posiblemente sea la explicación en el caso de aves diarreicas, encontrado en el trabajo de Mora y Castro, (2005) además del alto contenido de potasio que los autores plantean.

Estudios de investigación en alimentación de rumiantes con el uso de vinaza, en nuestro entorno son limitados; sin embargo, en otras especies de interés zootécnico se ha avanzado un poco más, en la mayoría de estos se ha encontrado que el uso de la vinaza está muy delimitado, debido a diferentes razones, cada una expuesta por los autores correspondientes a su trabajo; así por ejemplo en aves comerciales. Gallo *et al.*, (1986) Mora y Castro, (2005) Waliszewski *et al.*, (1997); en cerdos. García *et al.*, (1991) todos estos, coinciden que la vinaza se puede usar a bajos niveles no mayor a un 5% en el total

de la dieta; algunos de estos argumentando que esto puede ser debido al alto contenido de potasio, otros por su parte que se debe al bajo pH, que es característico de la vinaza, sin embargo ninguno menciona, que esto puede ser debido a compuestos fenólicos (melanoidinas) presentes en la vinaza. Una de las ventajas de emplear *P.ostreatus* para la biodegradación de la vinaza es la obtención de un producto de mayor valor nutricional, y poseen menos sensibilidad a pH, temperatura, nutrientes y aireación (Anjaneyulu *et al.*, 2005).

#### 4.4. Análisis del tamo de arroz antes y después del proceso de degradación por *P. ostreatus*

El tamo de arroz, con un promedio de 13±0,8% de lignina (tabla 6) al ser tratado con *P. ostreatus* por 36 días, se reduce a 6 ±1,1% en promedio (p<0.01); ya que según Peláez, (2010) estos hongos tienen la capacidad de disminuir los componentes de la pared celular debido a su capacidad para sintetizar enzimas fibrolíticas.

**Tabla 4-5.** Composición química del tamo de arroz tratado con *P.ostreatus* y sin tratar (n=3).

Componente (%)	Tamo de arroz sin tratamiento	Tamo de arroz tratado
MS	92±0,3 <sup>a</sup>	92±0,2 <sup>a</sup>
Cenizas	13±0,2 <sup>b</sup>	15±0,1 <sup>a</sup>
PC	7±0,5 <sup>b</sup>	11±0,3 <sup>a</sup>
FDN	78±0,5 <sup>a</sup>	57±1,1 <sup>b</sup>
LDA	13±0,8 <sup>a</sup>	6±1,1 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> valores con distinta letra en la fila difieren estadísticamente (p<0.01)

El tratamiento con el hongo demostró tener una eficiencia de deslignificación del 54% (ecuación 4). En estudios relacionados. Rangel, (2012) evaluó el efecto del complejo enzimático sobre la degradación de *P. maximum* y obtuvo un grado de deslignificación del 25,5%. Así mismo Taniguchi *et al.*, (2005) en pre tratamiento de cascarilla de arroz con *Pleurotus ostreatus*, encontraron un grado de deslignificación del 41%.

(4)

$$\text{Grado de deslignificación} = \frac{(12,9 - 5,9)}{12,9} * 100 = 54,4\%$$

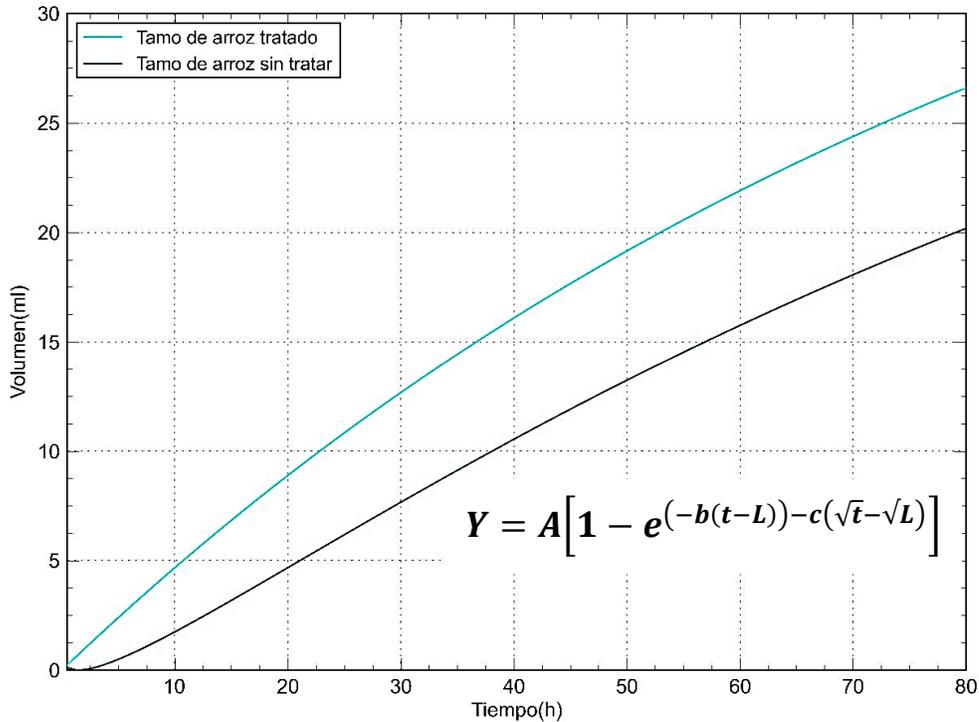
Todos los componentes estudiados exceptuado la MS presentaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), resultados similares son reportados por Montañez *et al.*, (2007) al evaluar el efecto de la paja de trigo tratada con *Pleurotus florida*, encontrando que el contenido de MS en la paja tratada y sin tratar fue similar, a diferencia de los contenidos de FDN, PC, cenizas, LDA.

La FDN, determinante en la alimentación de rumiantes, disminuyó en el tamo tratado (tabla 7) por lo que el hongo pudo haber utilizado parte de estos componentes (celulosa hemicelulosa, lignina) para su crecimiento; esto lo convierte en una ventaja ya que la FDN está directamente relacionada con la digestibilidad de la materia seca, la cual para ganado de leche debe encontrarse en los forrajes entre 35% - 45% (DairyNZ, 2008).

El contenido de PC aumentó del 7% al 11% en el tamo tratado, la biomasa de *P.ostreatus* a partir del tamo de arroz explica este importante hallazgo, lo que explicaría también el aumento de cenizas (CENICAFE, 2004).

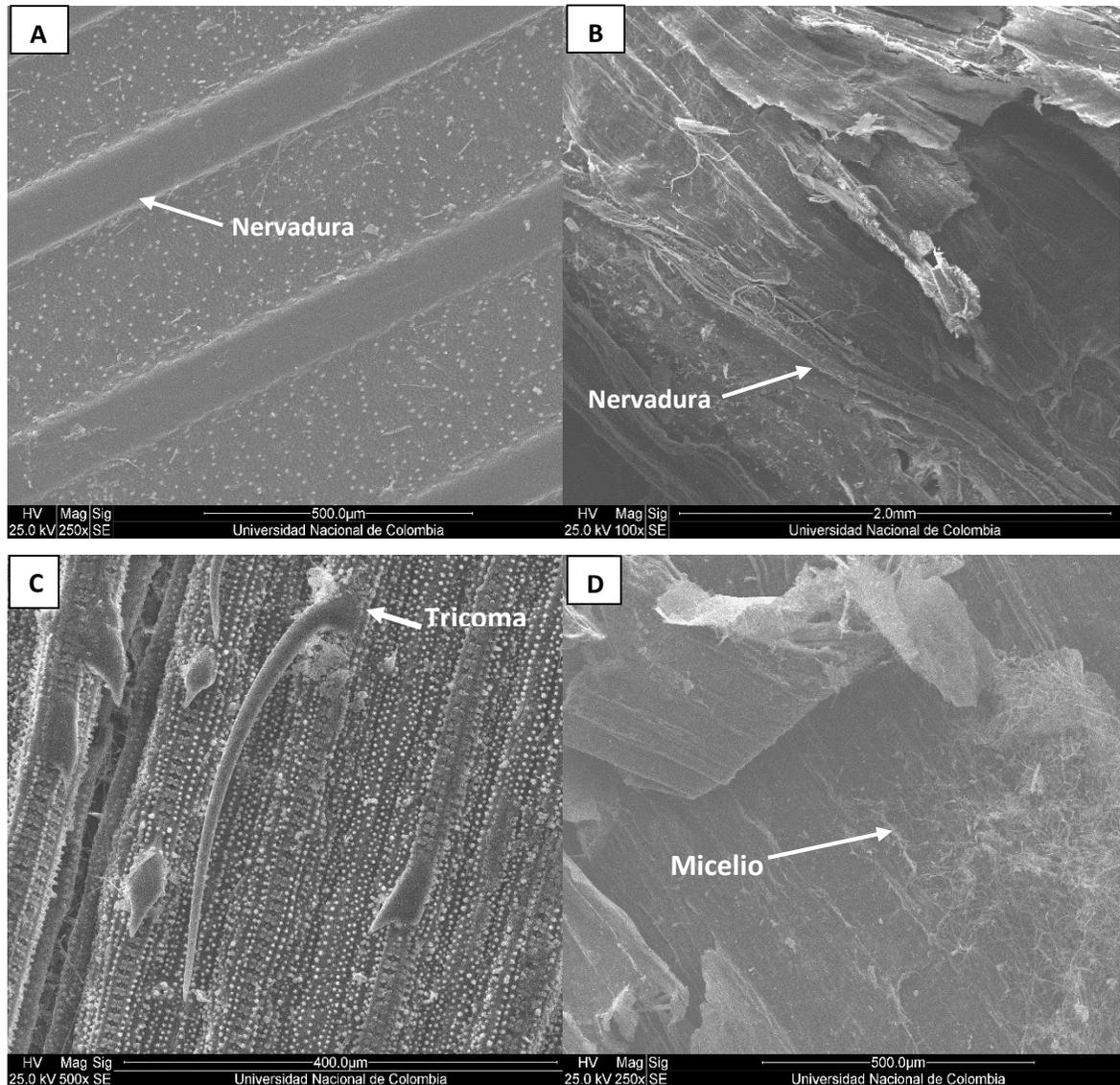
La producción de gas acumulado fue de 46,3 y 28,1 ml y una de tasa de 0,010 y 0,043 ml/h así como un tiempo de colonización (Lag) de 0,0003 y 2,03(h), para el tamo tratado y sin tratar respectivamente (gráfica 4). Esto debido a que el contenido de lignina y FDN en el tamo tratado fue menor (tabla 7). Ya que la despolimerización de los hidratos de carbono en la biomasa lignocelulósica se ve obstaculizada por la lignina, que es resistente a la degradación química y biológica (Abdel-Hamid *et al.*, 2013).

**Grafica 4-4.** Cinética de producción de gas de tamo de arroz.



Akin *et al.*, (1993) y Kaur *et al.*, (2012) demostraron que el tratamiento con las enzimas ligninolíticas de *Pleurotus* aumenta la producción neta de gas y la digestibilidad de la FDN de las pajas de los residuos agrícolas. El tratamiento con *P. ostreatus* ayuda a la disminución de LDA, y contribuye a mejorar la producción de gas y en consecuencia la digestibilidad de este material lignificado, debido al mayor y mejor el acceso a la celulosa por parte de los microorganismos ruminales.

**Figura 4-9.** Microscopía electrónica de barrido, del tamo de arroz antes y después del tratamiento con *P.ostreatus*. A. Nervaduras de la hoja; B. Nervaduras de la hoja tratada C. Tricomas; D. Colonización del micelio en la hoja



De acuerdo con la evidencia cualitativa de la degradación del tamo de arroz por parte del hongo, de forma general se observa la biomasa modificada después de la colonización del hongo, durante un tiempo de tratamiento de 36 días; en la figura “A” se puede apreciar las nervaduras paralelas de la hoja, quienes sufrieron una degradación por parte del hongo “B”; así mismo en la figura “C” se observar los tricomas de la superficie de la hoja cuyas características de estos es que, presentan paredes celulósicas, recubiertas de cutícula, o

paredes secundarias lignificadas<sup>1</sup>, la cual pudo ser degradada por el complejo enzimático de *P. ostreatus* "D". Por último el cambio de las características morfológicas después del tratamiento es evidente, con lo que se puede soportar el porcentaje de deslignificación tan eficiente conseguido (54,4%). No se encontraron estructuras del hongo o material residual, la resolución del microscopio electrónica posiblemente no es el adecuado.

---

<sup>1</sup>Botánica Morfológica.2013. Morfología de Plantas Vasculares, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina; <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema13/13-7tricomas.htm>

## 5. Conclusión

- El hongo *Pleurotus ostreatus* por medio de su sistema enzimático es capaz de actuar como degradante biológico de los compuestos responsables del color marrón (melanoidinas) de la vinaza hasta en un 83%
- Con la reducción de la DQO y DBO en la vinaza, se hace un aporte importante al medio ambiente donde se libere este residuo.
- La mayor degradación de los compuestos responsables del color de la vinaza sucede durante los primeros 7 días, después continúa el proceso hasta los 30, sin embargo esto es mínimo.
- La mayor eficiencia en la producción de gas *in vitro*, se logra con la inclusión de vinaza tratada con *P. ostreatus* al 9%.
- Hay un importante efecto indirecto sobre la calidad nutricional del tamo de arroz, usado como sustrato para el cultivo de *P. ostreatus* en vinaza, reflejada en el aumento de PC y producción de gas, así como en la reducción del contenido de lignina y FDN
- Se abren interesantes áreas de investigación relacionada con el uso de enzimas para mejorar de la calidad nutricional de dos subproductos de importancia regional y nacional, y en la descontaminación de vinazas y aguas residuales.

# Bibliografía

Abdel-Hamid, A.M.; Solbiati, J.O.; Cann, I.K.O. 2013. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*. 82:1-28.

Abril, D.; Navarro, E.; Abril, A. 2009. La Paja de Arroz. Consecuencias de su Manejo y Alternativas de Aprovechamiento. *Agron*. 17(2): 69 – 79.

Aguilar, L. D. 2007. Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México, D. F. 50p.

Akin, D.E.; Sethuraman, A.; Morrison, W.H.; Martin, S.A.; Eriksson, K. E. 1993. Microbial delignification with White rot fungi improves forage digestibility. *Appl. Environ. Microbiol*. 59: 4272 -4282.

Álvarez, R.; Combellas, J. 2005. Evaluation of poultry litter on sorghum straw intake and dry matter disappearance using dry cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 34(2): 584-588.

Álvarez, D.M. 2009. Eficiencia de la Fermentación In Vitro de los Tractos Gastrointestinales del Monogástrico y del Rumiante. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Palmira, Valle, Colombia.140p.

Anjaneyulu, Y.; Shreedhara, N.; Samuel, D. 2005. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies. *Environ Sci Technol*. 4, 245-273.

AOAC.1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, Virginia, USA. Metodo. 942.05.

APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Edition. New York, 2-55 a 2-60, método 2540 E.

Arimi, M.M.; Zhanga, Y.; Götz, G.; Kiriamiti, K.; Geißen, S. 2014. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 87:34–43.

Azevedo, J. L. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnológica. Ed: EDUCS. 510p.

Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal Dairy Science*. 88: 1.

Barros, P.V. 2009. Evaluación de un subproducto de destilería de alcohol (vinaza) como aditivo en la alimentación de pollos de engorde. Tesis de pregrado. Riobamba Ecuador.138p.

- Battimelli, A.; Loisel, D.; Garcia-Bernet, D.; Carrere, H.; Delgenes, J. 2010. Combined ozone pretreatment and biological processes for removal of colored and biorefractory compounds in wastewater from molasses fermentation industries. *J Chem Technol Biotechnol.* 85: 968-975.
- Becerra, G.C. 2009. Estudio Preliminar del Transporte de la Vinaza en un Suelo Representativo del Valle del Cauca. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Palmira, Valle, Colombia. 151p.
- Beaubien, A.; Jolicoeur, C.; Alary, J.F. 1988. Automated high sensitivity gas metering system for biological processes. *Biotechnology and Bioengineering.* 32:105-109.
- Blümmel, M.; Makkar, H.; Becker, K. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 77:24-34.
- Cämmerer, B.; Chodakowski, K.; Gienapp, C.; Wohak, L.; Hartwig, A.; Kroh, L. 2012. Pro-oxidative effects of melanoidin-copper complexes on isolated and cellular DNA. *Eur. Food Res Technol.* 234: 663-670.
- Cannell, E.; Moo-Young, M. 1980. Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry.* p. 2-7.
- Christofoletti, C.A.; Escher, J.P.; Correia, J.E.; Marinho, J.F.U.; Fontanetti, C.S. 2013. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Manag.* 33: 2752-2761
- CENICAFE. 2004. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cultivo de Hongos Comestibles del Género *Pleurotus* Sobre Residuos Agrícolas de la Zona Cafetera. Chinchiná, Caldas, Colombia. 61p.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 58: 582-594.
- Cone, J. W.; Van Gerder, A.H.; Visscher, G.J.; Oudshoorn, L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology.* 61:113-128.
- Cortés, L.E. 2013. Manual de guías de laboratorio de química ambiental. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Facultad de Ingeniería y Administración. p 133.
- DairyNZ, 2008. Pastures and Supplements for Grazing Animals NZSAP Occasional Publication No. 14: Milk Production from Pasture Holmes, C.W. et al 2002
- Dahiya, J.; Singh, D.; Nigam, P. 2001. Decolonization of synthetic and spent wash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Biores Technol.* 78: 95-98.
- De Oliveira, M.C.; Da Silva, D.M.; Carvalho, C.A.F.R.; Alves, M.F.; Dias, D.M.B.; Martins, P.C.; Bonifácio, N.P.; de Souza Júnior, M.A.P. 2013. Effect of including liquid vinasse in the diet of rabbits on growth performance. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 42 (4): 259-263.

Dellamatrice, P.M. 2005. Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana. Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura. Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 137 p.

Dewhurst, R.J.; Davies, D.R.; Merry, R.J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science Technology*. 85:1.

Drake, D.J.; Nader, G.; Forero, L. 2002. Feeding Rice Straw to Cattle. University of California.

Durán, N y Esposito, E. 1997. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. *Microbiologia ambiental*, Jaguariúna: CNPM/ EMBRAPA. 269-292.

Eggen, T. 2000. Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. Doctor Theses. Jordforsk, Norway. Agricultural University of Norway. 119p.

Emtenan, M.; Hanafi, H.H.; El Khadrawy, W.M.; Ahmed.; Zaabal, M.M. 2012. Some Observations on Rice Straw with Emphasis on Updates of its Management. *World Applied Sciences Journal*. 16 (3): 354-361.

FAO. 2012. Crop residue based densified total mixed ration. A user-friendly approach to utilise food crop by-products for ruminant production. T.K. Walli, T.K; Garg, M.R y Makkar, H. Animal Production and Health Paper. Roma, Italia. No. 172.

Ferreira, L. R. 2009. Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos. Tese Doutor. Área de concentração. Microbiologia Agrícola. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 107 p.

Fernández, R. D. 2012. Evaluación de vinaza de la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia como suplemento en la alimentación de vacas de leche. Trabajo de tesis de Maestría. Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Exactas, Antioquia, Medellín, Colombia. 26 p.

Fernández, R.; Noguera, R. R.; Posada, S. L. 2013. Inclusión de vinaza de caña en dietas para vacas lecheras. *Livestock Research for Rural Development*. 25(9): 164.

Figaro, S.; Avril, J. P.; Brouers, F.; Ouensanga, A.; Gaspard, S. 2009. Adsorption studies of molasses wastewater on activated carbon: Modelling with a new fractal kinetic equation and evaluation of kinetic models. *J Hazard Mater*. 161: 649-656.

France, J.; Dhanoa, M.S.; Theodorou, M.K.; Lister, S.J.; Davies, D.R.; Issac, D. A. 1993. Model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. *J Theoretical Biol*. 163:99-111.

Freire, W.J.; Cortez, L. A. 2000. Vinhaça de cana de açúcar. Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuária, Série Engenharia Agrícola.

Gad, A.S.; El Sayaad, H. 2010. Biosorption of Molasses Pigments by Sludge Agriculture Residues and Fungal. *J Appl Sci Res*. 6: 1966-1974.

Gallo, J.D.; Ospina, H.; Santos, E. 1986. Evaluación Preliminar de la Vinaza, un Desecho de Destilería, Como Posible Fuente de Nutrientes en la Alimentación de Aves. *Acta Agronomica*. 36(2): 207-220.

García, A.; Duarte, F.; Magaña, A. 1991. Crecimiento y finalización de cerdos con diferentes niveles de vinaza. *Livestock Research for Rural Development*. 3 (1).

García, A y Rojas, C. 2006. Posibilidad de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. Nota técnica, TECNICAÑA. Colombia. 13p.

Gasca, C.A. 2010. Cambio en el PSI y la RAS de un Suelo y su Influencia en la Actividad Biológica y la Biomasa Microbiana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Palmira, Valle, Colombia. 54 p.

Getachew, G. *at al.* 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 72: 261–281.

Gnecco, M. J. 2007. Composición de la Vinaza. Seminario Sobre el Potasio y su importancia en el manejo de la caña de azúcar. Asocaña. Valle del Cauca. Colombia.

Gianfreda, L.; Bollag, J.M. 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 58: 1672-1681.

Gillikin, J. W.; Graham, J.S. 1991. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of glycine max. *Plant physiol*. 96(1): 214-220.

Girata, L.M.; Guevara, J.E.; Machuca, F. 2011. Exploring study on the vinasse treatment by solar photocatalysis with titanium dioxide in a falling film reactor. *Revista ION*, 24(1): 35-41.

Girón, M.A. 2008. Evaluación de la posible contaminación del suelo y agua subterránea con elementos pesados por el uso de vinazas en el cultivo de la caña de azúcar. Trabajo de Especialización en Consultoría Ambiental. Universidad Politécnica de Cataluña España. 67 p.

González, T.; Yagüe, S.; Terrón, M.; Carbajo, J.M.; Arana, A.; Téllez, A.; González A.E. 2006. Enzimas fúngicas: ¿una alternativa para la decoloración de los efluentes de destilería? ICIDCA. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 40(1):3-12.

Gonzales, S.E.; De La Cruz, R.; López, G.L.; Martin, P.J. 2004. Evaluación económica de alternativas para la solución de los residuales de una planta de alcohol integrada a una fábrica de azúcar de caña. *Universidad Eafit*. 40(135): 60-72

Hernández, L.S. 2009. Patentan método para el tratamiento electroquímico de la vinaza. AUPEC. Agencia Universitaria de Periodismo Científico. Oficina de Comunicaciones. Universidad del Valle. Cali. Colombia. Disponible en: <http://aupec.univalle.edu.co/informes/2009/junio/vinaza.html> 2014-08-11.

Higuchi, T. 2004. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proceedings of the Japan Academy*. 80: 204-214.

Hidalgo, K.; Lezcano, P.; Hernández, L.E. 2012. Evaluación de la vinaza de destilería como aditivo en crías porcinas. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 19(2): 104-107.

Hungate, R.E. 1988. Introduction: The ruminant and the rumen. In: Hobson, P.N. editor. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science. London and New York. 19p.

Huntington, J. A.; Givens, D.I. 1995. The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Reviews*. 65(2):63-93.

Ikehata, K.; Buchanan, I.D y Smith, D.W. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental of Engineering and Science*. 3:1-19.

Iraçabal, B.; Zervakis, G.; Labarère, J. 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology*. 141: 1479-1490.

Itoh, K. 2005. Decolorization and degradation of methylene blue by *Arthrobacter globiformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75:1131–1136.

Isaza, L.V.; Rodríguez, D.C.; Machuca-Martinez, F. 2011. Exploring study on the treatment of vinasse by solar homogeneous photocatalysis in a falling film reactor. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 9(2): 48-54.

James, B.; Russell. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. Chapter 10 Ruminant Protozoa and Fungi, N.Y. Ithaca. 24-27.

Jami, E.; Mizrahi, I. 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. Université, Paris Sud, France. *Journal*. 7.

Jackson, M.G.; 1977. Review article: the alkali treatment of straws. *Anim Feed Sci Technol*. 2. 105-130.

Kahraman, S.S.; Gurdal, I.H. 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*. 82: 215-217.

Klopfenstein, T.J. 1978. Chemical treatment of crop residues. *J. Anim. Sci.* 46, 841–848.

Kategile, J.A.; Said, A.N.; Sundstøl, F. 1981. Utilization of low quality roughages in Africa. Proceedings of a Workshop, Arusha, Tanzania. January 18–22, 1981. Agricultural Development Report no. 1. Agricultural University of Norway, Aas, Norway.

Kaur, K.; Wadhwa, M.; Bakshi, M.P.S.; Kapoor, S. 2012. Nutritional evaluation of *Pleurotus florida* and *Pleurotus sajor-caju* harvested spent wheat-rice straw as livestock feed. *Indian Journal of Animal Sciences*. 82 (9):1033-1037

Kocherginskaya, S.A.; Aminov, R.I.; White, B.A. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*. 7: 119–134.

- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; David, J. C.; Stalpers, J. A. 2001. Dictionary of the Fungi. CABI. New York. 655p.
- Kundinger, M. K. 2004. Growth And Virulence Response of Salmonella Typhimurium To Soluble Maillard Reaction Products. Tesis de Maestría. Texas A & M University, EE UU.116p.
- Kundinger, M. K.; Zabala-Díaz, I.B.; Chalova, V.I.; Ricke, S.C. 2008. Effects of Maillard Reaction Products on hil A Expression in Salmonella Typhimurium. *Journal of Food Science*. 73(1):32-35.
- Leterme, P y Estrada F. 2012. Análisis de los alimentos y forrajes. Protocolo de Laboratorio. Laboratorio de Nutrición animal. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.57p.
- Liu, L.; Lin, Z.; Zheng, T.; Lin, L.; Zheng, C.; Lin, Z.; Wang, S.; Wang, Z. 2009. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*. 44: 426-433.
- Lotero, L. 2006. Efecto de la aplicación de vinaza y bovinaza sobre algunas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, en el establecimiento y producción inicial de forraje de Maralfalfa *Pennisetum sp* en suelos del municipio de Popayán, Cauca. Tesis de Maestría Ciencias Agropecuarias-Suelos. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.150p.
- Lotero, M.L. 2012. Transformaciones del Carbono Orgánico Presente en la Vinaza Aplicada a un Suelo Vertic Haplustoll de Valle del Rio Cauca. Tesis de Doctorado Ciencias Agrarias-Suelos Universidad Nacional de Colombia. Palmira.138p.
- Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*. 169:247-250.
- May, B.; Royse, D.1988. Interspecific allozyme variation within the fungal genus *Pleurotus*. *Trans. British Mycol. Soc*. 90: 29-36.
- Menke, K. H.; Raab, L.; Salenski, A.; Steingass, H.; Fritz, D.; Schneider, W. 1979. The estimation of digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J Agric Sci*. 193:217-222.
- Menke, K. H.; Steingass,H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28:7-55.
- Mello, R.; Caione, G.; Campos, C.N.S. 2013. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Appl Environ Soil Sci*. 1-8
- Mehrez, A.Z.; Orskov, E.R. 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J Agric Sci*. 88:645-650.
- Mitchell, D.; Lonsane, B.; Durand, R.; Renaud, S.; Maratray, J.; Desgranges, C.; Croke, P.; Hong, K.; Tanner, R y Malaney, G. 1992. General principles of reactor design and

operation for solid substrate cultivation. In Rolz (Ed.), Solid substrate cultivation. Elsevier Applied Science. Amsterdam. 115-139 p.

Molina, C.H.; Molina, E.J y Molina, J.P. 1994. Evaluaciones sobre bloques multi nutricionales realizadas en la granja-El Hatico-. Valle del Cauca Colombia. 1ª International Conference. Multinutritional Blocks. Venezuela.

Montañez, O.D.; Ortega, M.E.; Cobos, M.A.; Larqué, A.; García, J.E. 2007. Efecto de la alimentación con paja de trigo tratada con *Pleurotus florida* en la flora ruminal de ovinos. Universidad. Autónoma Agraria Antonio Narro. México. (disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ovinos/articulos/efecto-alimentacion-con-paja-t1838/141-p0.htm23/082014>)

Mora, L. J.; Castro, P.A. 2005. Evaluación del efecto de diferentes niveles de vinaza deshidratada en remplazo del maíz en la dieta para pollos de engorde tipo casero (28 a 56 días de edad). Trabajo Grado Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 45p.

Moreira, S.L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybecastanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. Brasil. 124 p.

Min, B.R.; Barry, T.N.; Attwood, G.T.; McNabb, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science Technology*.106 (1): 3-19.

Nagai, R.; Jinno, M.; Ichihashi, M.; Koyama, H.; Yamamoto, Y.; Yonei, Y. 2012. Advanced glycation end products and their receptors as risk factors for aging. *Anti-aging Medicine*. 4: 108-113.

Naik, N. M.; Jagadeesh, K.S y Alagawadi, A.R. 2008. Microbial decolorization of spentwash: a review. *Indian Journal of Microbiology, Nova Delhi*. 48: 41-48.

Noguera, R.R.; Ramírez, I.C.; Bolívar, D.M. 2006. Efecto de la inclusión de papa (*Solanum tuberosum*) en la cinética de fermentación *in vitro* del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*).*Livestock Res Rural Develop*. 18:64.

Nokes, S.E. 1999. Enzyme production using surface culture Fermentation en: Proceedings of Alltech 15<sup>th</sup> annual symposium. Biotechnology for the feed industry. Editor L.F. Lyons and K.A. Jaques.451-460p.

Nolan, J.V, y Dobos, R.C. 2005. Nitrogen Transactions in Ruminants. En: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. 2nd Ed. CAB International. Wallingford, UK. 137p.

Obodai, M.; Cleland, J.; Vowotor, K.A. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotusostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-productcs. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Heidelberg*. 30: 46-149.

Ortega, J.S. 2013. Remoción de Color en Vinazas Pretratadas en un Digestor Anaerobio Usando *Pistiastratiotes*. Tesis Pregrado. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 54p.

- Papaspyridi, L.M.; Katapodis, P.; Gonou-Zagou, Z.; Kapsanaki-Gotsi, E.; Christakopoulos, P. 2010. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal*. 50(3): 131-138.
- Pereira, J.P.; Alvarenga, E.M.; Tostes, J.R.P.; Fontes, L.E.F. 1992. Efeito da adição de diferentes dosagens de vinhaça a um latos solovermelho-amarelo distrófico na germinação e vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*. 14 (2):147-150.
- Peláez, A. A. 2010. Producción de enzimas lacasas e isoformas del género *Pleurotus* spp sobre bagazo de caña de azúcar por cultivo sólido. Tesis Doctoral. Colegia de postgraduados. Institución de enseñanza e Investigación en ciencias agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 90p.
- Pell, A.N.; Schofield. P.1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J Dairy Sci*. 76:1063-1073.
- Pérez, S.R.; Savón, R.C.; Diaz, M.S.; Kourouma, A. 2006. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología, México*. 23: 9-15.
- Pérez, S.R.; Bermúdez, R.C.; Giardina, P.; Fernández, M.B. 2005. Tratamiento Combinado (anaerobio-aerobio) para la Decoloración de la Vinaza de Destilería. *CENIC Ciencias Biológicas*. 36.
- Pompeu, G.B. 2010. Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana de açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol. Tese, Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 79 p.
- Quintero, R.D. 2003. Resultados preliminares y proyecciones acerca del uso de la vinaza en Colombia. Memorias. VI Congreso Colombiano de la asociación de técnicos de la caña de azúcar. Volumen 1: Campo-Media Ambiente.
- Rangel, S. X. 2012. Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Trabajo de tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Bogotá Facultad de Ingeniería. 147p.
- Retes-Pruneda, J.L.; Davila-Vazquez, G.; Medina-Ramírez, I.; Chavez-Vela, N.A.; Lozano-Alvarez, J.A.; Alatraste-Mondragon, F.; Jauregui-Rincon, J. 2014. High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. *Environmental Technology*. 35 (14): 1773-1784.
- Reynolds, T.M. 1968. Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines. *Advan. Food Res*. 12: 1-52.
- Rodríguez, S.; Bermúdez, R.C.; Giardina, P.; Fernández, M. 2005. Tratamiento Combinado (anaerobio-aerobio) para la Decoloración de la Vinaza de Destilería. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 36: especial.

Rodríguez, S.; Fernández, M.; Bermúdez, R. C.; Morris, H. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología, México*. 20:164-168.

Rodríguez, S.; Fernández, M.; Bermúdez, R.C.; Morris, H. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Iber Micol*. 20: 164-169.

Ruíz, H. A.; Rodríguez, R. M.; Rodríguez, R.; Contreras, J. C.; Aguilar, C. N. 2007. Diseño de Biorreactores Para Fermentación en Medio Sólido Bio-Reactors Desing For Solid State Fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.6 (1): 33-40.

Russell, J.B, y Wallace, R.J, 1997. Energy-yielding and energy consuming reactions. Eds. Hobson, P.N. & Stewart, C.S. The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd Ed. Blackie Academic and Professional. London, UK. 246p

Sánchez, J. E.; Royse, D. J. 2001. Crecimiento y fructificación: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Ecosur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.

Santos, S.C.; Rosa, P.R.F.; Sakamoto, I.K.; Amâncio Varesche, M.B.; Silva, E.L. 2014. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39 (18): 9599-9610.

Sarria, P.I.; Serrano, C.V. 2008. Valor nutricional de la vinaza generada en la producción de alcohol carburante de caña de azúcar. Proyecto de investigación. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 16 p.

Schofield, P. 2000. Gas Production Methods. En: Farm Animal Metabolism and Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 450 p.

Silva, V. L.; Gomes, W. C.; Alsina, O. L. 2007. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos, Campina Grande*.2: 27-32.

Singh, P.; Pandey, A. 2009. Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. En Singh, P.; Pandey, A. Eds. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. 206p.

Sirianuntapiboon, S.; Sihanonth, P.; Somchai, P.; Atthasampunna, P.; Hayashida, S. 1995. An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 59: 1185 –1189.

Skillman, L.C.; Toovey, A.F.; Williams, A.J.; Wright, A.D. 2006. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between Entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. *Environ Microbiol* 72: 200–206.

Scull, I.; Savón, L.; Gutiérrez, O.; Valiño, E.; Orta, I.; Mora, P.O.; Orta, H.; Ramos, Y.; Molineda, A.; Coto, G.; Noda, A. 2012. Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 46 (4): 385-389.

- Sundstol, F y Coxwoth, E.M. 1984. Ammonia treatment In: F. Sunstol and E. Owen (Ed). Straw and other fibrous by product as fed. Elsevier, New York: 196-247p.
- Szklarz, G.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L.; Linkins, A.E. 1989. Production of phenoloxidasas and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, New York. 81: 234-240.
- Taniguchi, M.; Suzuki, H.; Watanabe, D.; Sakai, K.; Hoshino, K.; Tanaka, T. 2005. Evaluation of Pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(6): 637-643.
- Tedeschi, L.O.; Schofield, P.; Pell, A.N. 2008. Determining feed quality for ruminants using in vitro gas production technique. 2. Evaluating different models to assess gas production measurements. En, The 4th Workshop on Modeling in Ruminant Nutrition: Application of the Gas Production Technique, Juiz de Fora, MG. Brazil. EMBRAPA. 15 p.
- Tilley, J. M.; Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*. 18:104-111.
- Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; Mcallan, A.B.; France. J.A. 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185-197.
- Van Soest. P.J. 2006. Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. *Animal Feed Science and Technology*.130. 137–171.
- Wadt, L. C. 2008. Cultivo de *Pleurotus* spp. Em vinhaça visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos. Dissertação. Mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 72p.
- Waliszewski, K.N.; Romero, A.; Pardo, V.T. 1997. Use of Cane Condensed Molasses Solubles in Feeding Broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 253-258.
- Wang, H.Y.; Qian, H.; Yao, W.R. 2011. Melanoidins produced by Maillard Reaction: Structure and biological activity. *Food Chem*. 128: 573-584.
- Welkie, D.G.; Stevenson, D.M.; Weimer, P.J. 2009. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*. 16:94-100.
- Yang, W.Z.; Beauchemin, K.A. 2005. Effects of physically effective fiber on digestion and milk production by dairy cows fed diets based on corn silage. *Journal Dairy Science*. 88:1090.
- Zervakis, G.; Balis, C. 1995. Incompatibility alleles and mating behaviour between and within *Pleurotus* species. *Mush Sc*. 14: 53-62.

## Anexos

### Anexo A: Solución tampón de Meke.

Soluciones	Elemento	Concentración
<b>A. (Micro minerales)</b>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O.	13,2mg/100ml
	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O.	10g
	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O.	1g
	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O.	8g
<b>B. (Micro Tampón)</b>	NaHCO <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> .	(35g + 4g)/l
<b>C. (Macro Minerales)</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .	5,7g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	6,2g
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.	0,6g
<b>D. (Indicador de óxido reducción)</b>	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> Na (Rérsarzurina)	100mg/100ml
<b>E. (solución reductora)</b>	NaOH 1N.	2ml
	Na <sub>2</sub> .9H <sub>2</sub> O.	285mg

La solución tampón se prepara mezclando las soluciones A, B, C y D, la mezcla se coloca en baño maría a 39°C con saturación de CO<sub>2</sub> y se adiciona la solución E.

### Anexo B: promedios de absorbancia y porcentaje de decoloración

Días	Variable	Vinaza diluida (70%)	Vinaza Sin diluir
0	Absorbancia inicial	1,010	1,352
7	Absorbancia	0,200±0,05 <sup>a</sup>	0,352±0,09 <sup>a</sup>
	Decoloración (%)	80±5 <sup>a</sup>	74±7 <sup>a</sup>
15	Absorbancia	0,170±0,04 <sup>a</sup>	0,305±0,11 <sup>a</sup>
	Decoloración (%)	83±4 <sup>a</sup>	77±8 <sup>a</sup>
23	Absorbancia	0,167±0,04 <sup>a</sup>	0,269±0,07 <sup>a</sup>
	Decoloración (%)	83±4 <sup>a</sup>	80±5 <sup>a</sup>
30	Absorbancia	0,164±0,04 <sup>b</sup>	0,230±0,01 <sup>a</sup>
	Decoloración (%)	83±4 <sup>a</sup>	83±1 <sup>a</sup>
36	Absorbancia	0,163±0,04 <sup>a</sup>	0,230±0,01 <sup>a</sup>
	Decoloración (%)	83±4 <sup>a</sup>	83±1 <sup>a</sup>