

VALORACIÓN IN VITRO DE LA VINAZA TRATADA CON *Pleurotus ostreatus* EN ANIMALES RUMIANTES

In vitro assessment of treated sugarcane vinasse with *Pleurotus ostreatus* for use in ruminant animals

William Armando Tapie-Canacuan^{1*} y Hugo Sánchez-Guerrero²

¹Docente de la Universidad Católica de Oriente. Facultad de Ciencias Agropecuarias, grupo de investigación GIAZ. Zootecnista Universidad Nacional de Colombia, Magíster en Ciencias Agrarias.

²Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias.



Recibido 15 de enero de 2015.
Aceptado 3 de marzo de 2015.

Autor para Correspondencia*:
wtapie@uco.edu.co

Como citar:

TAPIE-CANACUAN, William A. y SÁNCHEZ-GUERRERO, Hugo. Valoración in vitro de la vinaza tratada con *Pleurotus ostreatus* en animales rumiantes. Revista Facultad Ciencias Agropecuarias – FAGROPEC. Universidad de la Amazonia, Florencia – Caquetá. 8(2). Pp. 79-83

Resumen

La vinaza de caña es un residuo de la industria azucarera, se considera como un efluente complejo debido a la presencia de sustancias fenólicas de naturaleza recalcitrante, los cuales son los responsables del color marrón de la vinaza; dada a la similitud estructural de estas sustancias y la lignina (LDA), se cree que el aprovechamiento se disminuye al ser usada en la alimentación animal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso del hongo *Pleurotus ostreatus* para biodegradar la vinaza e incorporarla en dietas para rumiantes. La degradación de la vinaza se evaluó en un reactor discontinuo de lecho fijo, mediante espectrofotometría y la valoración de la vinaza se realizó bajo la técnica in vitro de desprendimiento de gases. Se observó que el sistema de tratamiento propuesto removió el 83% de la absorbancia de la muestra de vinaza después de siete días. El proceso también permitió que las dietas que contuvieron vinaza tratada, la producción de gases y proteína cruda (PC) fuese mayor ($P < 0,01$) con respecto a las dietas con vinaza sin tratar; aunque la fibra detergente neutro (FDN) y LDA no difirieron. De este modo el tratamiento de la vinaza con *P. ostreatus* se constituye en una opción técnicamente viable para ser usada en producción animal, debido a la simplicidad del proceso y a la alta y creciente disponibilidad de vinaza en nuestro medio.

Palabras clave: Absorbancia, gases, hongo, melanoidinas.

Abstract

Cane vinasse is a byproduct from the sugar industry, is considered as a complex effluent due to the presence of phenolic substances of recalcitrant nature, which are responsible for the brown color of the vinasse; Given the structural similarity of these substances among lignin (LDA), it is believed that the use is diminished when used in animal feed. The objective of this work was to evaluate the use of the *Pleurotus ostreatus* fungus to biodegrade the vinasse and to incorporate it into diets for ruminants. The degradation of vinasse was evaluated in a fixed-bed discontinuous reactor by spectrophotometry and the evaluation of the vinasse was carried out under the in vitro technique of gas evolution. It was observed that the proposed treatment system removed 83% of the absorbance from the vinasse sample after seven days. The in vitro gas production process allowed diets with treated vinasse and crude protein (CP) to be higher ($P < 0.01$) with respect to diets with untreated vinasse; although neutral detergent fiber (NDF) and LDA did not differ. Thus, treatment of vinasse with *P. ostreatus* constitutes a technically viable option to be used in animal production, due to the simplicity of the process and the high and increasing availability of vinasse in our environment.

Key words: Absorbance, fungus, gases, melanoidins.

Introducción

En producción animal los costos de alimentación se encuentran alrededor del 70% del total de los costos de producción, por lo que cualquier alimento alternativo que pueda reducir el costo es de interés para el productor, pues esto aumenta su beneficio (De Oliveira, *et al.* 2013). Considerando la cantidad de vinaza de caña generada a partir del proceso de producción de etanol (Santos, *et al.* 2014), de 10 a 8 litros de vinaza por litro de etanol producido (Ferreira, *et al.* 2011) y a sus características físicas y químicas, esta muestra potencialidades para ser usada en la alimentación animal (Scull, *et al.* 2012) y como aditivo (Hidalgo, Lezcano y Hernández, 2012). La composición de las vinazas depende de la variedad y el grado de maduración de la caña, del sustrato empleado, del tipo y la eficiencia del proceso de fermentación y de las características del proceso de destilación aplicado (Arimi, *et al.* 2015; Waliszewski, *et al.* 1997). 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).

La vinaza se caracteriza el alto contenido de sólidos y materia orgánica, bajo pH (3.5 a 4.0) y color marrón oscuro (Retes, *et al.* 2014). Dicha coloración es atribuida a la presencia de compuestos de alto peso molecular, principalmente a melanoidinas y caramelos que se forman por la reacción de Maillard y compuestos fenoles que son a menudo sustancias tóxicas, y que estructuralmente son semejantes a la lignina (Naik, Jagadeesh y Alagawadi, 2008), que además en el caso particular de las melanoidinas tienen un efecto antimicrobiano (Arimi, *et al.* 2014). Por lo que se considera que su uso estaría limitado para la alimentación de rumiantes.

En ganado lechero de la raza Holstein de alta producción, se ha demostrado que la inclusión de vinaza reduce el consumo de materia seca, atribuyendo estos resultados a posibles efectos tóxicos por compuestos similares a la

lignina contenidos en la vinaza, producto de la reacción de Maillard sobre los microorganismos del rumen y altos niveles de potasio (Fernández, Noguera y Posada, 2013).

Con el fin de transformar la vinaza en un subproducto potencialmente útil, varios estudios han demostrado que el hongo *Pleurotus* sp. puede degradar residuos agroindustriales a través de enzimas lignocelulolíticas (lacasa, peroxidasa y manganeso-peroxidasa) y que además poseen una capacidad para sintetizar proteínas, ácidos orgánicos y para adaptarse a condiciones ambientales severas (Fuess y Garcia, 2014; Ferreira, et al. 2011). La similitud molecular entre las melanoidinas, ácidos húmicos y la lignina, y la inespecificidad de las enzimas hacia los sustratos, sugieren que *P. ostreatus* tiene la capacidad de degradar los compuestos fenólicos y las melanoidinas presentes en las vinazas de caña (Majeau, Brar y Tyagi, 2010; Ferreira, et al. 2011; Arimi, et al. 2014) y de este modo mejorar las características nutricionales de este subproducto. El objetivo de este estudio fue, realizar un tratamiento aeróbico a la vinaza con el hongo *P. ostreatus* y evaluarla en dietas para rumiantes con la técnica de producción de gas *in vitro*.

Metodología

Se seleccionó una cepa del hongo *P. ostreatus* proveniente del laboratorio de insumos biológicos FUNGICOL S.A.S. Palmira Valle del Cauca-Colombia. La multiplicación del hongo se realizó en un medio de Potato Dextrose Agar (PDA), de acuerdo a la metodología propuesta por Ferreira, et al. (2011). En 1 litro de agua se adicionó 30 g de extracto de malta, 3 g de peptona de harina de soja y 15 g de agar, se llevó al autoclave a 121°C por 15 minutos, se pasó a cajas de Petri con 10 ml del medio y se incubó por 7 días a 30±2°C. Luego para su almacenamiento y posterior uso, se inoculó 3 cajas de Petri en bolsas de polipropileno con 500 g de trigo previamente humedecido (65±5%) y esterilizado. Para el cultivo en sustrato sólido se utilizó tamo de arroz esterilizado (15 lb, 121°C/1h), con una humedad del 65±5%, seguidamente se inoculó el tamo con el hongo dispuesto en el trigo de 250 g en 5 kg de tamo de arroz y se dejó que este colonice el sustrato por un período de 20 días; transcurrido este tiempo se adicionó la vinaza (tabla 1) esterilizada al tamo de arroz, a razón de 1:2 (peso/volumen) y pH 6.5; La vinaza fue obtenida de la planta de destilación de alcohol del Ingenio Providencia (Palmira Valle del Cauca-Colombia).

El porcentaje de la decoloración de la vinaza (PD%)

(Ecuación 1) se evaluó cada siete días, por el transcurso de 30 días mediante el cálculo de la decoloración, a partir de medidas de absorbancia a una longitud de onda de 475 nm (Itoh, 2005); el análisis estadístico se realizó bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones usando el paquete estadístico Statistical Analysis System SAS® versión 9.13.

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

Evaluación in vitro de la vinaza en dietas para vacas lecheras

Las dietas fueron elaboradas con torta de soya, maíz molido, tamo de arroz y cuatro niveles de vinaza (3, 6, 9 y 12%) tratada con el hongo *P. ostreatus* (VT) y sin tratar (VST) en el total de la dieta, conservando el mismo porcentaje para los demás ingredientes, más un testigo sin vinaza (Tabla 2); esto se realizó con la ayuda del software Basic Balancer Program de la Universidad de Georgia versión 2013, para vacas lactantes con un peso promedio de 550kg, con 60% de Nutrientes Digestibles Totales (TDN), 12% PC, 0,17% de fosforo y 0,25% de Calcio.

Tabla 2. Dietas para vacas de leche usando diferentes niveles de vinaza

	Paja de arroz (%)	Maíz-molido (%)	T. Soya (%)	Vinaza (%)	total
testigo	47	40	13	0	100
VT	45	39	13	3	100
VT	44	37	13	6	100
VT	43	35	14	9	100
VT	41	33	14	12	100
VST	45	39	13	3	100
VST	44	37	13	6	100
VST	43	35	14	9	100
VST	41	33	14	12	100

VT= vinaza tratada con *P. ostreatus*; VST= vinaza pura

Seguidamente a las dietas se les realizó el estudio del contenido de: MS, Cenizas, PC, FDN y LDA y producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass, 1988). Esto se realizó con cuatro repeticiones.

Fermentación en Jeringas

El estudio de la cinética de degradación de las dietas a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo en un tiempo *t*, se realizó de acuerdo a la metodología de Menke y Steingass (1988). Los animales donantes del líquido ruminal fueron dos machos cebuinos

Tabla 1. Promedios de la composición química de la vinaza de caña de azúcar

Brix	pH	MO %	N%	P ₂ O ₅ %	CaO %	MgO %	K ₂ O %	NaO %	S ppm	Fe ppm	Zn ppm
16	4	7,70	0,40	0,05	0,88	0,33	0,89	0,04	0,39	222	44,9

Fuente. Laboratorio Químico del Ingenio Providencia

con un peso promedio de 900 kg, en pastoreo con pasto estrella (*Cynodon plectostachium*), suplementados con torta de soya y sal mineralizada. Para estudiar la dinámica de producción de gas se utilizó el modelo propuesto por France *et al.* (1993) (ecuación 2), con cuatro repeticiones.

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

Y= Volumen de gas en el tiempo (ml)

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

b= Tasa constante de producción de gas (h^{-1})

t= Tiempo de incubación (h)

c= tasa constante de producción de gases del material potencialmente degradable ($h^{-1/2}$)

L= tiempo de retraso Lag (h)

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

Resultados y discusión

Decoloración de la vinaza

El hongo *P. ostreatus*, removió la coloración de la vinaza y en consecuencia los compuestos estructuralmente similares a la lignina (melanoidinas, caramelos y compuestos fenoles). Atribuyendo este efecto a la acción del complejo enzimático del hongo, ya que la decoloración de la vinaza, está directamente relacionada con el aumento de la actividad enzimática (lacasa y peroxidasa) que es un indicador de la participación de estas enzimas, cuando ocurre la reacción de despolimerización de los compuestos fenólicos (Ferreira, *et al.* 2011; Naik, Jagadeesh y Alagawadi, 2008).

La decoloración alcanza su mayor valor en los primeros siete días de tratamiento (74%), en adelante hasta el día 30 aumentó hasta un 83% en promedio (Figura 1). La actividad enzimática se reduce paulatinamente, posiblemente debido a la acumulación de subproductos que la inhiben generados en los diferentes procesos metabólicos del hongo (Rodríguez, *et al.* 2003).

Ferreira *et al.* (2011) con *Pleurotus sajor-caju* encontraron un promedio de decoloración alrededor del 99%, el cual está por encima a lo encontrado en este estudio, por lo que *P. sajor-caju* es probablemente más eficiente que *P. ostreatus* removiendo estos compuestos.

Resultados similares son reportados en un tratamiento combinado (anaerobio-aerobio), con *Pleurotus* sp encontraron que se remueve el color de la vinaza más del 80% (Pérez, *et al.* 2005). Del mismo modo Rodríguez *et al.* (2003) con *Pleurotus* sp. hallaron que la mayor

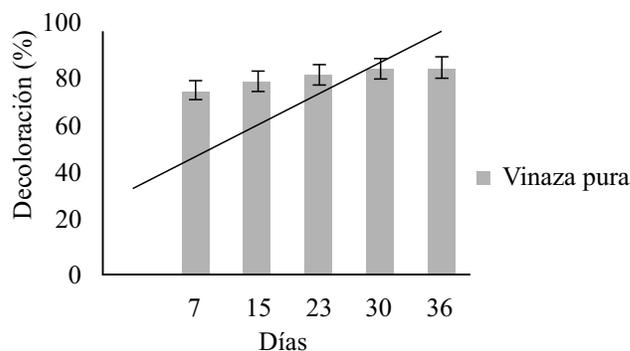


Figura 1. Promedios de decoloración de la vinaza tratada con *P. ostreatus*.

decoloración ocurre en los primeros 10 días coincidiendo con el período de mayor actividad la casa, aunque luego continúa la decoloración en menor proporción hasta los 20 días. Tapie, García, y Sánchez, (2016) a dos niveles de concentración (vinaza pura y diluida al 70%) de vinaza con *P. ostreatus*, encontraron resultados similares.

Producción de gas *in vitro* de las dietas con vinaza tratada y sin tratar

En la figura 2, se presenta la producción de gases de acuerdo al modelo propuesto por Franc, *et al.* (1993). Todas las dietas que contienen vinaza tratada con *P. ostreatus* se encuentran por encima del promedio, mientras que las que contienen vinaza sin tratar por debajo. Por consiguiente la vinaza sin tratar tiene un efecto negativo en la producción de gas y por lo tanto en la digestibilidad del animal. Ya que la producción de gases de un alimento incubado con líquido ruminal está directamente relacionada con la digestibilidad del mismo (Menke y Steingass, 1988).

Con la adición de VT al 9% se consiguió una mayor producción de gas (48,4 ml) junto con el testigo (42,4 ml), mientras que la menor producción de gas (17,1 ml) se presentó al nivel del 12% de VST; a medida que se adiciona VST de manera creciente, la producción de gas disminuye. El color marrón oscuro de la vinaza es atribuido a la presencia de polímeros de alto peso molecular llamadas melanoidinas consideradas sustancias tóxicas para los microorganismos y semejantes estructuralmente 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 el análisis de contrastes ortogonales para las comparaciones previamente definidas, indicaron que la producción de gas acumulado a las 72 h (A) entre niveles de vinaza tratada con *P. ostreatus* versus sin tratar (tabla 3), presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), por lo que el tratamiento con el hongo contribuyó de

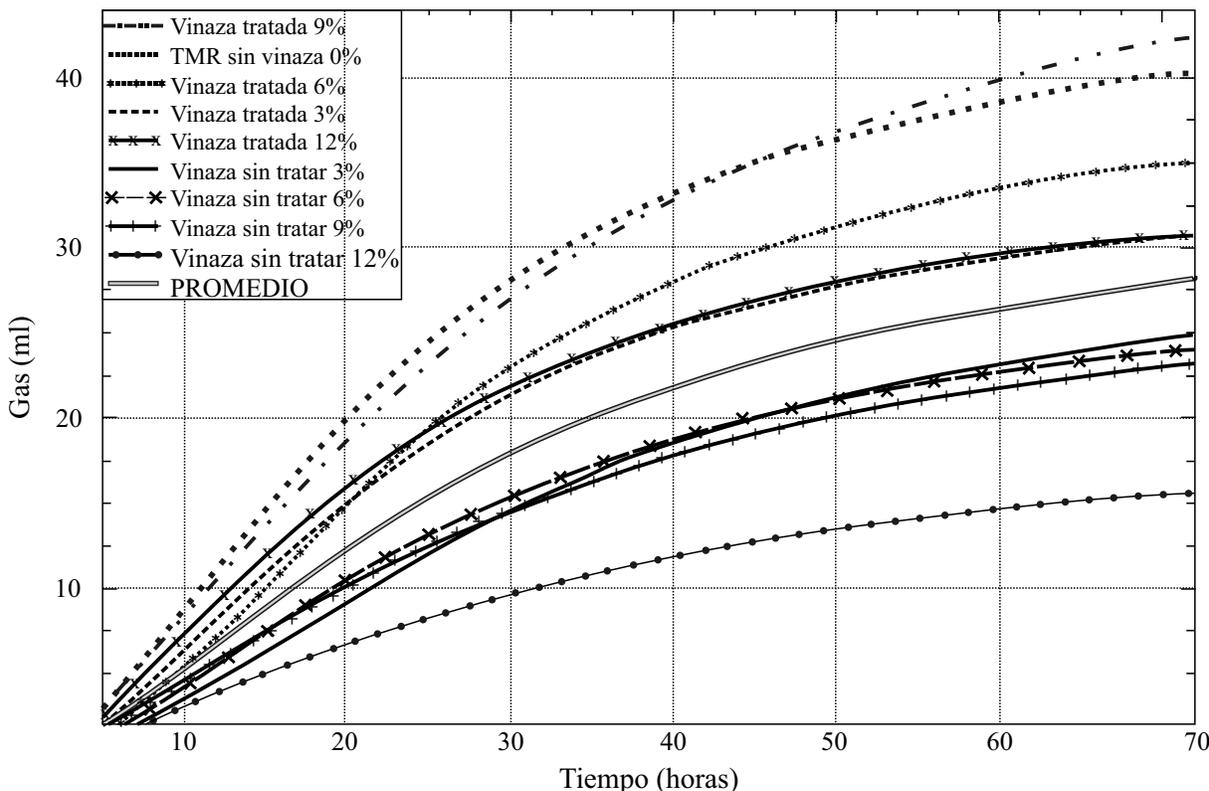


Figura 2. Producción de gases de dietas con vinaza tratada con *P. ostreatus* y sin tratar.

manera positiva sobre este parámetro así como en el contenido de PC, esta última atribuido al aporte proteico por residuos de la biomasa del hongo en la vinaza, para este mismo contraste el contenido de la FDN y LDA no presentaron diferencias. Se dedujo que la diferencia en la producción de gases, no se debe precisamente al contenido de LDA y/o FDN, sino a los compuestos fenoles presentes en la vinaza (Arimi, *et al.* 2014). La inclusión de vinaza tratada con *P. ostreatus* mejora la producción de gas y por lo tanto es de esperarse que también la digestibilidad del alimento y por su alta disponibilidad sería factible su utilización en la alimentación de bovinos o en otras especies de interés zootécnico. La diferencia encontrada entre la dieta testigo y las dietas con vinaza en el contenido de FND y LDA es debido a que la dieta testigo contiene mayor cantidad de material lignificado (tamo de arroz).

Tabla 3: Contrastes ortogonales para los promedios de la producción de gases y composición química de las dietas con VT y VST.

	Tratada _v s sin tratar	Tratada _v s testigo	Sin tratar _v s testigo
A _(ml)	38 _{vs} 24**	38 _{vs} 42 ^{ns}	24 _{vs} 42**
MS (%)	67 _{vs} 67 ^{ns}	67 _{vs} 90**	67 _{vs} 90**
Cenizas (%)	9.1 _{vs} 11**	9.1 _{vs} 8.3 ^{ns}	11 _{vs} 8.3**
PC (%)	22 _{vs} 17**	22 _{vs} 14**	17 _{vs} 14**
FDN (%)	42 _{vs} 44 ^{ns}	42 _{vs} 53**	44 _{vs} 53**
LDA (%)	7.5 _{vs} 7.9 ^{ns}	7.5 _{vs} 12**	7.9 _{vs} 12**

ns = no significativo; ** significancia p<0.01; vs = comparación entre promedios

Los estudios realizados del uso de vinazas en alimentación de rumiantes en nuestro entorno son escasos. Sin embargo en aves y cerdos, se ha avanzado un poco más (Gallo, Ospina y Santos 1986; Waliszewski, Romero y Pardo 1997), en la mayoría de estos trabajos, se ha encontrado que el uso de la vinaza está contraindicado, debido a diferentes razones. Algunos le atribuyen el efecto negativo al alto contenido de potasio, y otros al bajo pH, característico de la vinaza. Sin embargo no se menciona, que esto puede ser debido a otros factores como las melanoidinas presentes en la vinaza, reportado en la literatura científica en otras áreas del conocimiento.

Finalmente, la hipótesis de que las melanoidinas presentes en la vinaza por su similitud con la lignina y su carácter recalcitrante, interfieren en el desarrollo de microorganismos ruminales y en la fermentación del alimento, esto respaldado en la literatura científica consultada y en resultados obtenidos en este trabajo inicial de laboratorio (*in vitro*).

Conclusiones

El hongo *P. ostreatus* es capaz de actuar como degradante biológico de los compuestos responsables del color marrón de la vinaza, que indirectamente se constituye en una ventaja para la alimentación animal pues se obtiene un producto de mayor valor nutricional, y además el tratamiento poseen menos sensibilidad a pH, temperatura, nutrientes y aireación.

La inclusión de vinaza tratada en dietas para rumiantes mejora la producción de gases y se esperaría que la digestibilidad del alimento también. Sin embargo, es una primera aproximación de lo que se podría encontrar en estudios *in vivo*, deberán ser realizados posteriormente.

Literatura citada

- ARIMI, M. *et al.* Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87: 34–43. Febrero, 2014.
- DE OLIVEIRA, M. *et al.* Effect of including liquid vinasse in the diet of rabbits on growth performance. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(4): 259-263. Abril, 2013.
- FERNÁNDEZ, R., NOGUERA, R. Y POSADA, S. Inclusión de vinaza de caña en dietas para vacas lecheras. *Livestock Research for Rural Development*, 25(164). Septiembre, 2013
- FERREIRA, L. F. *et al.* Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(1): 132-137. Enero, 2011
- FRANCE, J. *et al.* Model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *Journal Theoretical Biol*, 163 (1): 99-111. Julio, 1993.
- FUESS, L. T. y GARCÍA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*. 145: 210–229. Diciembre, 2014
- GALLO, J. D.; OSPINA, H. y SANTOS, E. Evaluación preliminar de la vinaza, un desecho de destilería, como posible fuente de nutrientes en la alimentación de Aves. *Acta Agronómica*, 36(2): 207-220. 1986
- HIDALGO, K.; LEZCANO, P. y HERNÁNDEZ, L. E. Evaluación de la vinaza de destilería como aditivo en crías porcinas. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 19(2): 104-107. 2012
- ITOH, K. Decolorization and degradation of methylene blue by *Arthrobacter globiformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75 (6): 1131–1136. Diciembre, 2005.
- MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K. y TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101 (7): 2331–2350. Abril, 2010.
- MENKE, K. H. y STEINGASS, H. 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. 1998.
- NAIK, N. M.; JAGADEESH, K. S. y ALAGAWADI, A. R. Microbial decolorization of spentwash: a review. *Indian Journal of Microbiology*, 48 (1): 41-48. Marzo, 2008.
- PÉREZ, S. R. *et al.* Tratamiento combinado (anaerobio-aerobio) para la decoloración de la vinaza de destilería. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36. 2015.
- RETES, J. L. *et al.* High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. *Environmental Technology*, 35 (14): 1773-1784. Abril, 2014.
- RODRÍGUEZ, S. *et al.* Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 164-169. 2003
- SANTOS, S. C. *et al.* Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (18): 9599-9610. Junio, 2014.
- SCULL, I. *et al.* Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46 (4): 385-389. 2012.
- TAPIE, W. A.; GARCÍA, D. P. y SANCHEZ, H. Biodegradación de vinazas de caña de azúcar mediante el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* en un reactor de lecho empacado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19(2): 145-150. 2016.
- WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A. y PARDIO, V. T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 67 (2-3): 253-258. Julio, 1997