



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Recursos Bióticos

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA UTILIZANDO NOPAL
(OPUNTIA SPP.) COMO SUSTRATO EN FERMENTADORES EN ESTADO
SÓLIDO PARA LA ALIMENTACIÓN ANIMAL**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Recursos Bióticos

Presenta:

Héctor Francisco Cabrera Baeza

Dirigido por:

Dra. Araceli Aguilera Barreyro

Dra. Araceli Aguilera Barreyro
Presidente

Firma

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza
Secretario

Firma

Dra. María Guadalupe Bernal Santos
Vocal

Firma

M. en C. Konisgmar Escobar García
Suplente

Firma

M. en C. José Guadalupe Gómez Soto
Suplente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García
Gasca
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Agosto de 2015

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de producir una alternativa de alimento enriquecido con proteína microbiana a base de nopal para las zonas áridas y semiáridas del país. El objetivo del trabajo fue obtener un forraje enriquecido en proteína microbiana con el uso de *Saccharomyces cerevisiae* o *Lactobacillus* y/o *urea* para su uso como alimento para rumiantes. Al final de varias evaluaciones de FES de nopal variando concentraciones de levadura, urea y tiempo se realizó una FES empleando nopal (*O. ficus indica*) y levadura (*S. cerevisiae*) en diferentes tratamientos (TTM): 1) 0% levadura y 0% urea; 2) 0.75% levadura y 0% Urea; 3) 0% levadura y 1% urea; y 4) 0.75% levadura y 1% urea. Los TTM se realizaron en cubetas adicionando 9 kg de nopal picado, se tomaron muestras homogéneas a las 0, 6, 12, 18, 24 h de FES establecidas después de algunas pruebas, para realizar las siguientes determinaciones: proteína cruda (PC), materia seca (MS), fracciones de fibra, pH, temperatura interna, amonio, carbohidratos solubles, unidades formadoras de colonias (UFC) y variedad de microorganismos presentes. El pH y el contenido de MS promedio de los 4 tratamientos en todos los tiempos de FES fue de 5 y 7.3%, respectivamente. Se observó interacción ($P < 0.05$) TTM x tiempo sobre el contenido de amonio, PC y carbohidratos solubles. El número de UFC y el contenido de PC en el nopal fermentado se incrementó ($P < 0.05$) con la adición de levadura y urea (TTM 4), seguida de la adición de urea (TTM 3), principalmente de las 0 a las 3 h de FES. Debido al alto crecimiento de la levadura tanto inoculada como asociada al nopal se observó un acelerado consumo de carbohidratos solubles y una mayor producción de amonio de las 0 a las 3 h, permaneciendo constantes a lo largo de la FES. En cuanto a diversidad microbiana en los tratamientos con la adición de urea como de levadura se favoreció la dominancia de las levaduras en todo el proceso de FES. La FES del nopal adicionado con 0.75% de levadura y 1% de urea con un tiempo de fermentación de 3 a 24 horas da como producto un alimento enriquecido en su contenido de proteína microbiana para ser utilizado en la alimentación de rumiantes.

(Palabras clave: Nopal, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentación en estado sólido)

SUMMARY

The purpose of this work was to produce an alternative type of food enriched with microbial protein based in prickly pear (*Opuntia ficus indica*) for arid and semi-arid areas of the country. The objective was to obtain an enriched microbial protein using *Saccharomyces cerevisiae* or *Lactobacillus* and/or urea to use as feed for ruminants. After several tests of Solid state fermentation (SSF) of prickly pear with varying concentrations of yeast, lactobacillus and/ or urea, an SSF was performed using prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and yeast (*S. cerevisiae*) in the following treatments (TTM): 1) 0% yeast 0 % urea; 2) 0.75% and 0% Urea yeast; 3) 0% 1% yeast and urea; and 4) 0.75% yeast and 1% urea. Treatments were carried in buckets by adding 9 kg of chopped prickly pear. Homogeneous samples were taken at 0, 6, 12, 18, 24 h of SSF established after some testing, to perform the following determinations: crude protein (PC), dry matter (MS), fiber fractions, pH, internal temperature, ammonium, soluble carbohydrates, colony forming units (CFU) and a variety of microorganisms. The pH and content of MS of 4 treatments at all times SSF was 5 and 7.3% on average, respectively. Interaction ($P < 0.05$) TTM x Time on the content of ammonium, PC and soluble carbohydrates, was observed. The number of CFU and PC content in the fermented prickly pear increased ($P < 0.05$) with the addition of yeast and urea (TTM 4), followed by the addition of urea (TTM 3), mainly from 0 to 3 SSF h. Due to the high growth of yeast inoculated as well as associated to the prickly pear, accelerated consumption of soluble carbohydrates and increased production of ammonium of 0 to 3 h was observed, having remained constant throughout the SSF. Regarding microbial diversity in treatments with the addition of urea as yeast, the dominance of yeasts was superior in the SSF process. The prickly pear SSF with an added 0.75% yeast and 1% urea and a fermentation time from 3 to 24 hours gives as a product enriched in content of microbial protein for use in feeding ruminants.

(Key words: Prickly pear, *Saccharomyces cerevisiae*, Solid state fermentation)

DEDICATORIAS

A mis padres por todo el apoyo, la motivación, los consejos y la ayuda durante toda mi vida que sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

A mi hermana por ayudarme, apoyarme y acompañarme todo el tiempo.

A mis familiares por apoyarme, por su disposición para ayudarme y estar a mi lado cuando los necesito.

A mis amigos y compañeros por motivarme a seguir estudiando.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, la Facultad de Ciencias Naturales y a la Maestría en Recursos Bióticos por permitirme continuar con mis estudios y poder llevar a cabo un proyecto completamente de mi interés.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante el transcurso de la maestría.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2014 en colaboración con la Facultad de Ingeniería agradezco el apoyo económico otorgado para la fabricación del molino empleado en este trabajo de tesis.

A la Dra. Araceli aguilera Barreyro por el apoyo que me dio desde la finalización de mi tesis de licenciatura y la motivación a estudiar un posgrado, por su asesoramiento durante el curso de la maestría y por su confianza en el presente proyecto siendo mi directora de tesis.

Al M. en C. Konisgmar Escobar García por ayudarme para finalizar mi tesis de licenciatura en las pruebas de laboratorio y por las sugerencias y asesoría para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Guadalupe Bernal Santos, a la Dra. Tércia Cesária Reis de Souza y al M. en C. José Guadalupe Gómez soto por sus sugerencias y observaciones tanto en tutoriales como para la realización y redacción de la presente investigación.

A mis compañeros del posgrado, en especial a Samantha y Jackeline y a los compañeros y técnicos del laboratorio por su compañía y ayuda durante la maestría y durante la experimentación.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1 <i>OPUNTIA</i>	13
2.2 EL NOPAL EN MÉXICO.....	17
2.3 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	19
2.4 TIPOS DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.....	20
2.5 VARIABLES A CONSIDERAR EN FERMENTADORES EN ESTADO SÓLIDO.	21
<i>Microorganismos:</i>	21
<i>Cantidad de inóculo:</i>	22
<i>Temperatura</i>	23
<i>pH:</i>	23
<i>Aireación y agitación:</i>	24
<i>Forma y tamaño de las partículas:</i>	24
2.6 LEVADURAS Y SU EMPLEO EN ALIMENTACIÓN ANIMAL.....	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGÍA	29
4.1 MATERIAL VEGETATIVO	29
4.2 INÓCULOS Y FUENTE DE NITRÓGENO.....	30
4.3 TRATAMIENTOS Y ANÁLISIS	31
4.3.1 <i>Fase 1. Inoculación con levadura y cinco tiempos de FES</i>	
<i>aerobia</i>	31

4.3.2	<i>Fase 2. Inoculación con cuatro niveles de levadura y siete tiempos de FES aerobia.</i>	31
4.3.3	<i>Fase 3. Inoculación con cuatro niveles de lactobacilos y siete tiempos de FES aerobia.</i>	31
4.3.4	<i>Fase 4. Inoculación con levadura, cuatro niveles de urea y cinco tiempos de FES aerobia.</i>	31
4.3.5	<i>Fase 5. Inoculación con dos niveles de levadura, dos niveles de urea y cinco tiempos de FES aerobia a escala piloto.</i>	33
5.	RESULTADOS	37
5.1	FASE 1	37
5.2	FASE 2	38
5.3	FASE 3	40
5.4	FASE 4	41
5.5	FASE 5	44
6.	DISCUSIÓN	56
7.	CONCLUSION	59
8.	IMPLICACIÓN	59
9.	REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro número		Página
1. Clasificación taxonómica de opuntia	13
2. Análisis químico proximal del nopal	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura número	Página
1. Raqueta de <i>Opuntia ficus indica</i>	16
2. Fermentación anaeróbica	26
3. Fermentación aeróbica	27
4. Localización del sitio de colecta de <i>Opuntia ficus indica</i>	29
5. Tipo de pencas utilizadas en el experimento	29
6. Plantación de <i>Opuntia ficus indica</i>	30
7. Levadura de panificación	30
8. Yogurt natural	30
9. Urea agrícola	30
10. Microfermentadores en estado sólido de nopal	32
11. Molino para corte de nopal	34
12. Fermentación en estado sólido de nopal a escala piloto	34
13. Contenido de proteína cruda del nopal fermentado con respecto al nivel de levadura (Fase 1)	37
14. Comportamiento del pH del nopal fermentado con respecto al tiempo de FES (Fase 1).....	38
15. Interacción del contenido de proteína cruda del nopal fermentado por el nivel de levadura y el tiempo de FES (Fase 2)	39
16. Contenido de materia seca del nopal fermentado con respecto al nivel de levadura (Fase 2)	39
17. Comportamiento del pH del nopal fermentado con respecto al tiempo de FES (Fase 2)	40
18. Comportamiento del pH del nopal fermentado con respecto al tiempo de la FES (Fase 3)	41
19. Contenido de proteína cruda del nopal fermentado con respecto al nivel de inclusión de urea (Fase 4)	42
20. Contenido de proteína cruda del nopal fermentado en relación al tiempo de FES	42

21. Contenido de materia seca en el nopal fermentado con respecto al nivel de inclusión de urea (Fase 4)	43
22. Contenido de materia seca del nopal fermentado con respecto al tiempo de FES (Fase 4)..	43
23. Interacción del valor de pH del nopal fermentado por el nivel de urea y el tiempo de FES (Fase 4).	44
24. Temperatura del nopal fermentado con respecto al tiempo de FES (Fase 5)	45
25. pH del nopal fermentado con respecto al tratamiento y al tiempo de FES (Fase 5)	46
26. Interacción del contenido de proteína cruda del nopal fermentado con respecto al tratamiento y al tiempo de FES (Fase 5)	47
27. Contenido de materia seca del nopal fermentado con respecto al tratamiento (Fase 5)..	47
28. Contenido de FDN del nopal fermentado con respecto al tratamiento (Fase 5)	48
29. Contenido de FDN del nopal fermentado con respecto al tiempo de FES (Fase 5).	49
30. Contenido de FDA del nopal fermentado con respecto al tratamiento (Fase 5)	49
31. Contenido de FDA del nopal fermentado con respecto al tiempo de FES (Fase 5)	50
32. Interacción del contenido de amoniaco en el nopal fermentado con respecto al tratamiento y al tiempo de FES (Fase 5)	51
33. Interacción del contenido de carbohidratos solubles en el nopal fermentado con respecto al tratamiento y al tiempo de FES (Fase 5)	51
34. Interacción del crecimiento microbiano (UFC/g) en el nopal fermentado con respecto al tratamiento y al tiempo de FES (Fase 5).	52
35. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias	53
36. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0% de levadura y 0% de urea (tratamiento 1) (Fase 5)	54
37. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0.75% de levadura y 0% de urea (tratamiento 2) (Fase 5)	54
38. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0% de levadura y 1% de urea (tratamiento 3) (Fase 5)	55
39. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0.75% de levadura y 1% de urea (tratamiento 4) (Fase 5)	55

1. INTRODUCCIÓN

En las regiones áridas y semiáridas de México existen pocas alternativas de producción de forrajes en condiciones de temporal por la escasez de agua, deterioro de suelos, erosión y altos costos de producción por el precio del combustible, de la semilla y del fertilizante entre otros (Aguilera, 2001; Flores, 1995). En estas zonas, el nopal (*Opuntia ficus indica*) es una opción para su inclusión en dietas para rumiantes. En el presente estudio se pretende producir una alternativa de alimento utilizando nopal como base de la alimentación de rumiantes, ya que tiene una amplia distribución en el país, además de presentar características importantes como son la resistencia a las condiciones climatológicas extremas con un rango de temperatura de 0 a 35° C, resistencia a la escases de lluvia durante periodos prolongados pudiendo vivir con precipitaciones de 150 a 800 mm, en cuanto a altitudes se puede cultivar de 800 a 2600 msnm y puede desarrollarse en suelos con pH de 6.5 a 8.5. Éstas características lo hacen muy prometedor para suelos pobres y con poca disponibilidad de agua para riego (Silva y Acevedo, 1985). La mayoría de las especies forrajeras mexicanas poseen espinas para protegerse de los herbívoros, lo que es el principal obstáculo en su uso como alimento de ganado. Existen algunas especies de *Opuntia ficus indica* que no tienen espinas, y son fácilmente consumidas por el ganado (Martínez, 2009), tiene mayor eficiencia productiva que muchas gramíneas o pastos forrajeros de hoja ancha, precocidad de crecimiento y alta producción, resistencia a plagas y enfermedades y buena aceptación por el ganado (CONAZA, 1994; Rodríguez, 2012). Su contenido de proteína es bajo, estando en el rango 3 - 4% (BS), por lo que ésta se convierte en la principal limitante para llenar los requisitos de los animales cuando se alimentan con nopal, por lo cual es primordial incrementar este nutrimento (Aguilera *et al.*, 2001; Flores y Suassuna, 2006). El nopal es extensivamente utilizado por el ganado como un alimento de emergencia para el ganada durante épocas de extrema sequía, en áreas áridas y semiáridas del mundo (Martínez, 2009).

Para incrementar el contenido de la proteína en el nopal se puede utilizar levaduras, hongos y bacterias en el proceso de fermentación aeróbica (Flores y Suassuna,

2006). En la bibliografía se reporta el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en harina de maíz precocida logrando el incremento en la cantidad de proteína desde un 7 a 41% (Gualtieri y Sánchez, 2003). El uso de *Saccharomyces cerevisiae* como suplemento en dietas fibrosas produce modificaciones en los patrones de fermentación en el rumen mejorando la utilización de la fibra y la disponibilidad de los nutrientes aumentando el número de bacterias celulolíticas y disminuyendo la concentración de ácido láctico (Rodríguez, 2012). Con base en lo anterior se pretende determinar el nivel de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae* o *Lactobacillus*), de fuente de nitrógeno y el tiempo en que este inóculo llega a su máxima reproducción, también se pretende determinar distintas variables para considerarlo como una opción de alimentación.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Opuntia*

El género *Opuntia* es el más diverso y ampliamente distribuido en América con entre 191-215 variedades. Según Reyes Agüero (2005), en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Zacatecas y parte de los estados de Jalisco, Michoacán y Querétaro, se encuentra la mayor riqueza de variantes silvestres (35% del total de *Opuntia*) y cultivadas de *Opuntia* (144 variedades) (Anaya y Bautista, 2008; Scheinvar *et al.*, 2011). Su clasificación taxonómica se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Opuntia*.

Reino	Plantae
Subreino	Embryophyta
División	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Dialipetalas
Orden	Opuntiales
Familia	Cactaceae
Tribu	Opuntiae
Subfamilia	Opuntioideae
Genero	<i>Opuntia</i>
Subgénero	Platyopuntia

(CONAZA, 1994; Espinosa, 2010)

Existe una gran variación entre las especies del género *Opuntia*, la cual puede deberse a cambios genéticos y a las diferencias en las condiciones ambientales afectando la talla, coloración de la flor, presencia y longitud de espinas, diferenciación morfológica y fisiológica, crecimiento alométrico de los órganos usados, cambio de color y textura, pérdida de sustancias tóxicas y/o amargas, pérdida de los medios naturales de dispersión y de la germinación por estratos, obtención de maduración simultánea, cambios en la duración del ciclo de vida y mayor rendimiento del producto (Scheinvar *et al.*, 2011).

El nopal presenta metabolismo ácido de las crasuláceas, se caracteriza porque los estomas se mantienen abiertos durante la noche para absorber CO₂, en tanto que durante el día, los estomas permanecen cerrados para evitar la pérdida de humedad, es un mecanismo de adaptación de las plantas de zonas áridas para facilitar la fotosíntesis y ahorrar agua. Las ventajas de la *Opuntia* incluyen alta producción de biomasa, buena palatabilidad y valor nutritivo, perennifolios, resistencia a sequía y adaptación al suelo. *Opuntia* tiene alto contenido de ceniza (26 g/kg MS) y agua (926 g/kg Base húmeda), pero bajo contenido de proteína cruda (58 g/kg MS) y fibra detergente neutra (185 g FDN por kg MS) (Martínez, 2009).

Los atributos poco deseables de *Opuntia* son aquellos representados por su bajo nivel de proteína, alto contenido de minerales, especialmente calcio; y su alto contenido de humedad que frecuentemente los convierten en forrajes inviables para ser transportados o incluso manejados en la propia unidad de producción (Gutiérrez, 2010).

La Conaza (1994) y Ríos y Quintana (2004) describen las siguientes características generales de *Opuntia*:

- Raíz: el sistema radicular es perenne, extenso y superficial. Las raicillas secundarias están provistas de pelos absorbentes, caducas, ya que se limitan a la época de lluvias, lo que le permiten aprovechar el agua durante los breves periodos de lluvias.
- Tallo: es cilíndrico con partes planas denominadas cladodios que cuando están tiernos son muy suculentos y poco lignificados.
- Flor: las flores son diurnas, solitarias, sentadas, nacen en la base de las aureolas que funcionan indistintamente como yemas florales o vegetativas. La aparición de la flor tarda en promedio 55 días después de la aparición de las yemas florales, permaneciendo abierta durante 24 horas.
- Fruto: el fruto es una baya ovoide carnosa, cilíndrica, de diversos colores y de tamaño de 5 a 6cm.

- Características del medio ambiente: El rango óptimo de temperatura es entre 15 y 28 °C, soportando una temperatura máxima de 35 °C y a temperaturas menores de 5 °C los retoños más tiernos empiezan a sufrir daños causados por frío incluso a temperaturas bajo 0 °C puede morir la planta en su totalidad. El rango óptimo de precipitaciones bajo las que se puede desarrollar el nopal oscilan entre 150 y 1800 mm distribuidos durante todo el año. Crece en suelos con pH de 6.5 a 8.5. y se presenta desde el nivel del mar hasta los 2,600 m sobre el nivel del mar.

En algunos casos el contenido de agua del nopal puede ser una ventaja en épocas de sequía, ya que los ovinos pueden estar consumiendo nopal por meses sin tomar agua. Los ovinos pueden consumir de 6.5 a 11 kg/animal/día de nopal fresco, lo que equivale a un consumo de materia seca de 0.85 a 1.4 kg/animal/día (Díaz *et al.*, 2011).

Dentro del género *Opuntia*, se encuentra la especie *Opuntia ficus indica*, la que a continuación se describe.

Opuntia ficus indica

Opuntia ficus indica casi no tiene espinas, es un vegetal arborescente de 3 a 5 m de alto, su tronco es leñoso y mide de entre 20 a 50 cm de diámetro. Forma pencas o cladodios de 30 a 60 cm de largo x 20 a 40 cm. de ancho y de 2 a 3 cm de espesor (Figura 1). Sus ramas están formadas por pencas de color verde opaco con areolas que contienen espinas más o menos numerosas, amarillas y produce flores de 7 a 10 cm de largo, su fruto es oval de 5 a 10 cm de largo x 4 a 8 cm de diámetro y su color puede ser amarillo, anaranjado, rojo o purpúreo con abundante pulpa carnosa y dulce.

Se localiza principalmente en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, México, Tlaxcala, Puebla, Querétaro y Oaxaca (Scheinvar *et al.*, 2011; Anaya y Bautista, 2008).



Figura 1. Raqueta de *Opuntia ficus indica*

El nopal que se utiliza para consumo humano comúnmente conocido como nopal verdulero o nopalito, es la penca tierna que se cosecha comercialmente cuando alcanza una longitud de 15 a 20 centímetros (Espinosa, 2005).

La longevidad promedio de las plantaciones de nopal es de 5 a 7 años, alcanzando algunas veces hasta 10 años con buenos rendimientos; en terrenos apropiados con pH neutro y con prácticas constantes de cultivo, sin problema de plagas, el nopal puede llegar a vivir hasta 80 años alcanzando de 80 a 90 ton/ha/año en base húmeda. Las plantaciones comerciales de explotaciones intensivas, pueden durar 3 años (Ríos y Quintana, 2004).

En el sistema de cultivo tradicional los índices de productividad oscilan entre 30 a 50 ton de materia seca por ha por año y en el sistema intensivo puede llegar a producir de 200 a 620 ton de cladodios en buen estado (Base húmeda), mientras que de maíz forrajero bajo condiciones de riego produce 49 ton, y en temporal 25 ton/ha en base seca (Santos *et al.*, 2010; Valdez *et al.*, 2010).

2.2 El Nopal en México

En alrededor del 70% del territorio del centro y norte de la República Mexicana las condiciones climatológicas son extremosas y no llueve en períodos prolongados, por lo que el nopal es aprovechado para alimentar en épocas de estiaje y/o de invierno para ganado caprino, bovino y ovino. El nopal tiene importancia en la conservación del suelo, pues protege la capa fértil contra la erosión debido al tipo de sistema radical que posee, asimismo, los cladodios retienen partículas orgánicas que mueve el aire, las cuales resbalan por su superficie hasta el suelo, o bien, quedan en las ramificaciones, donde el agua de lluvia las arrastra para depositarlas al pie de las plantas para formar así una capa de materia orgánica que aumenta constantemente el espesor y mejora la calidad del suelo (Aguilera *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2010).

La mayoría de las variedades de nopal distribuidas en la República Mexicana son silvestres y reportándose aproximadamente 3 millones de hectáreas, en los estados de Zacatecas, Aguascalientes, San Luís Potosí, Jalisco, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Chihuahua (Flores *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2011).

Es también importante señalar que a pesar de la relevancia actual que tiene el nopal forrajero, la producción se mantiene estancada desde hace 10 años. Es posible que los 3 millones de hectáreas con nopales silvestres existentes en el país, sean el motivo por el cual a muchos de los ganaderos no les interesa producir o comprar nopal forrajero, pues lo tienen de manera silvestre. Por ello, no existe una cultura de producción del nopal forrajero (Anaya y Bautista, 2008).

Para optimizar la duración de la plantación, así como la producción de nopal para su uso como forraje es necesario conocer las formas de cosecha de las raquetas de nopal.

En cuanto a las formas de cosechar el nopal es necesario definir la tasa de extracción (proporción de la planta que se corta), la cual según Aguilera *et al.* (2001)

encontraron que la mayor cantidad de brotes jóvenes se produce cuando la tasa de extracción está entre el 25 y 50%.

Aguilera *et al.* (2001) describen los métodos de uso del nopal en la alimentación animal:

1. Pastoreo sin asistencia donde se introducen los animales a consumir el alimento sin ningún proceso, reduciendo el costo, sin embargo, se desperdicia entre el 15 y 35% del forraje.
2. Chamuscado para pastoreo que consiste en quemar las espinas utilizando un lanzallamas que utiliza como combustible gas butano, diésel o petróleo, el desperdicio es alrededor del 5 al 7%, en este paso los costos se incrementan por el uso de combustible.
3. Chamuscado, corte y picado en pesebre. Donde se queman las espinas antes de realizar el corte para la cosecha, se transporta y se pica o tritura y después se ofrece al animal, con esta técnica se controla la tasa de extracción, la cual es la cantidad de individuos extraídos entre los existentes y se disminuye o nulifica el desperdicio. Este es el paso más costoso por la mano de obra y uso de combustible

Una de las ventajas del nopal es su almacenaje, ya que conserva sus características organolépticas y nutritivas teniendo hasta un 96% de pencas viables a los 14 días postcosecha en otoño, invierno y primavera y de 11 días en verano si se almacena bajo sombra (Aguilera *et al.*, 2001). Fortiz y Rodríguez (2012) reportan que la vida de anaquel del nopal se prolonga sin ninguna alteración hasta por 7 días a 5 °C.

El nopal para ser utilizado como alimento para ganado debe ser combinado con otros alimentos para complementar los requerimientos de los animales, ya que presenta bajo contenido de proteína, a pesar de ser rico en vitaminas, minerales, carbohidratos solubles y fibra, su composición es variable según la etapa de

cosecha y la variedad utilizada (Aguilera *et al.*, 2001; Mejía *et al.*, 2010). En el Cuadro 2 se resume su composición:

Cuadro 2. Análisis Químico Proximal del nopal molido (% en Base Seca)

Nutrimento	Composición (%)
Materia seca	10 – 14
Cenizas	19
Materia orgánica	59 – 86
Proteína cruda	1.7 – 4
Extracto etéreo	0.3 - 2.4
Fibra cruda	3 – 17.6
Extracto libre de nitrógeno	43 – 74

(Aguilera *et al.*, 2001; Espinosa, 2005; Flores y Suassuna, 2006; Díaz, 2011; Gamez *et al.*, 2012)

Para incrementar el contenido de PC del nopal se recomienda emplear una biotecnología llamada FES, donde al utilizar hongos, levaduras o bacterias se pueden transformar productos o ingredientes de baja calidad en alimentos fortificados que aumentan su contenido de proteína cruda y proteína verdadera, así como promueven una mayor digestibilidad y consumo en los animales para mejorar la producción animal (Gutiérrez *et al.*, 2008; Subramaniyam y Vimala, 2012).

2.3 Fermentación en estado sólido

Existen diversas definiciones en cuanto a qué significa la fermentación en estado sólido (FES). Una de ellas dice que las fermentaciones en estado sólido son aquellas en donde se promueve el crecimiento microbiano sobre un sustrato sólido con ausencia de un líquido libre, variando el nivel de humedad del 30 a 80% y la formación de productos sobre o dentro de una matriz sólida (Bhargav, 2007; Ruíz *et al.*, 2007). El agua es un componente necesario, pero se encuentra en forma absorbida dentro de la matriz sólida (Nandakumar *et al.*, 1994). La FES es la transformación de materia sólida por medio de la acción microbiana de forma

aerobia (Raimbault, 1998). La aireación se da de 0.5 a 5 veces el volumen del recipiente por hora (Bashir *et al.*, 2011).

Además de mejorar la calidad de los ingredientes, como el nopal; el proceso debe de ser sencillo y económico, de tal manera que sea una opción real para que los productores puedan mejorar la eficiencia de producción. Los dos elementos fundamentales para la realización de la FES son el uso de pequeñas cantidades de ingredientes que coadyuven a la fermentación del material y al desarrollo de los microorganismos como carbohidratos (melaza), fuentes nitrogenadas (urea, sulfato de amonio), vitaminas y minerales; así como la adición de microorganismos. Los microorganismos se pueden reproducir al inocular el substrato con una mezcla de microorganismos a base de bacterias (*Lactobacilos* spp.) y levaduras (*S. cerevisiae*), así como con una fuente de energía altamente disponible y de fácil fermentación, como la melaza, jugo de caña, suero de leche, efluentes de destilería, azúcar de caña y otros, cuya inclusión en la mezcla puede fluctuar entre 5 y 15% (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Las fuentes de carbohidratos del nopal pueden ser vehículo adecuado para mejorar el contenido proteico en la alimentación, mediante la conversión a proteína por medio de procesos de FES (Álvarez, 1990).

La FES se realiza en biorreactores que son los contenedores donde se efectúa el proceso de cultivo, 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. Los más utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación así como de sistemas para el control de la temperatura y pH (Ruíz *et al.*, 2007).

2.4 Tipos de fermentación en estado sólido

La FES se divide en dos grupos (Pandey, 1991):

1. Fermentación sólida estática sin agitación:

Los materiales inoculados permanecen en reposo durante la fermentación y se ha empleado para el enriquecimiento proteico de materiales con alto contenido de carbohidratos (almidón).

2. Fermentación sólida con agitación continua u ocasional:

Este grupo a su vez se subdivide en:

- Fermentación con agitación ocasional sin aireación.
- Fermentación con agitación lenta continua sin aireación.
- Fermentación con agitación ocasional con aireación.
- Fermentación con agitación continua y con aireación.

En este grupo se incluye cualquier sistema con remoción o movimiento de los materiales durante la fermentación, usualmente con el fin de mejorar el intercambio gaseoso y el control de la temperatura.

La práctica de la FES no necesita de equipos complejos y por eso puede ser aplicada como una biotecnología de bajo costo. Así se pueden ahorrar en el costo de producción de alimentos ricos en proteínas (González *et al.*, 1984, González, 1987).

2.5 Variables a considerar en fermentadores en estado sólido.

Las variables con mayor importancia en FES son: tipo de microorganismos, contenido de humedad, concentración de inóculo, temperatura, pH, agitación, aireación, forma y tamaño de partículas.

Microorganismos:

Basado en el tipo de microorganismos presentes en la FES se dividen los microorganismos en dos grupos principales:

- Natural (silvestre o nativo), cuyo ejemplo es el ensilaje y la composta que utilizan microflora natural proveniente del mismo material a fermentar.

- Puro (individual o mezclado), son generalmente empleados a nivel industrial que requiere de un control y la utilización de un sustrato seleccionado (Pandey, 1992).

En las fermentaciones sólidas, la selección de un microorganismo adecuado es importante para su desarrollo. Diversos grupos de microorganismos pueden crecer en sustrato sólido, sin embargo, el bajo contenido de agua libre en este tipo de fermentaciones, favorecen para el desarrollo de los hongos. Los hongos crecen en el medio sólido produciendo proteína a partir del consumo del sustrato, adicionado con fuentes inorgánicas de nitrógeno y otros minerales (Pandey, 1992).

Algunos de los microorganismos utilizados en los fermentadores en estado sólido están las bacterias (*Clostridium Spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, etc.) para ensilados, compostaje y alimentos; hongos (*Alternaria spp.*, *Penicilium notatum*, *Aspergillus niger*, etc.) para compostaje, penicilina, queso y enzimas; y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces Castelli*, *Endomycopsis burtonii*, etc.) para producción de alimento y etanol entre otros (Bashir, 2011).

Humedad:

Cuando el contenido de agua es muy alto los espacios vacíos entre las partículas se llenan de agua desalojando al aire y provocando disminución del oxígeno en la masa, y además podría estimular la contaminación bacteriana. La importancia del agua en el sistema es debido al hecho que la mayoría de las células viables se caracterizan por su contenido de humedad que va del 70 al 80 %. En este sentido se ha establecido que en caso de utilizar bacterias, la humedad en el material deberá tener más del 70%. En caso de utilizar levaduras el rango puede ser más amplio entre 60 y 70 %, y para los hongos, un rango aún más amplio de 20 al 70 % de humedad (Cabrero, 1987; Álvarez, 1990; Pandey, 1992).

Cantidad de inóculo:

Para asegurar un rápido crecimiento microbiano, se requiere una alta concentración de microorganismos en la inoculación, así como para reducir la competencia con

otros microorganismos por el sustrato. La cantidad óptima de inoculación varía de 10^5 a 10^7 UFC/g de material seca (Peñaloza, 1981).

Se recomienda del 1 al 20% de inóculo de hongos y bacterias en los procesos típicos de fermentación en estado sólido (Bashir, 2011), sin embargo, es importante considerar la viabilidad económica.

Temperatura

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C (Samaniego y Sosa, 2000).

La temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras está comprendida entre 5 y 37°C, siendo su valor óptimo entre 28 y 30°C, las levaduras pueden soportar temperaturas que van desde los 5 hasta los 55°C (Uribe, 2007; Pandey, 1992). Se ha visto que temperaturas mayores de 30-34°C la producción de levadura se deprime (Postmus *et al.*, 2011).

Los hongos pueden crecer en un amplio rango de temperatura entre los 20 y 45°C (Peñaloza, 1981; Cabrero, 1987).

pH:

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 4.5 - 6.4 y con uno óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores de 4 y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos (Samaniego y Sosa, 2000).

El pH óptimo para el crecimiento de levaduras varía de 4.5 a 6.5 aunque muchas especies toleran variaciones de 2 – 8 (Uribe, 2007).

Los hongos crecen a pH ácidos entre 3 y 4.5. Durante la fermentación el pH tiende a variar dependiendo de la cantidad de urea y sales de amonio que intervengan en la FES (Peñaloza, 1981).

Aireación y agitación:

Son parámetros claves de la transferencia de masa dentro de las partículas. La transferencia de oxígeno entre las partículas depende de los espacios libres, de la aireación y la agitación o mezclado (Peñaloza, 1981; González *et al*, 1989).

Estos dos factores tienen una influencia determinante en la FES debido a dos aspectos fundamentales: demanda de Oxígeno en el proceso aeróbico; y la homogeneidad en el calor y la masa en un sistema heterogéneo. Una posible solución para resolver el problema de heterogeneidad es la agitación continua o intermitente con excelentes resultados. En el caso de bacterias o levaduras, la agitación podrá favorecer la degradación de la biomasa relacionado al flujo de aire principalmente cuando las células no están bastante ajustadas a la superficie del sustrato (Pandey, 1992).

Forma y tamaño de las partículas:

En las reacciones bioquímicas de las FES el oxígeno es esencial, y para ello el oxígeno debe de difundirse en la capa acuosa que rodea a la partícula sólida o penetrar en los poros del sustrato. En consecuencia, el tamaño y la forma de las partículas determinan el grado de porosidad. El tamaño de partícula más óptimo varía dependiendo del sustrato, del microorganismo a utilizar, de la cantidad de oxígeno presente en el medio y del tamaño del fermentador. Las partículas pequeñas tienen la ventaja de poseer una mayor relación de superficie a volumen. Esta relación tiene una gran influencia sobre la transferencia de masa inter e intrapartícula (González *et al.*, 1989).

La reducción en el tamaño de partícula por medio del molido es uno de varios procesos que incrementan el aumento en la superficie de contacto para el crecimiento microbiano. Las partículas muy pequeñas pueden producir contracción

o compactación en las matrices del sustrato que promueven problemas en el incremento de masa y transferencia de calor (Pandey, 1992).

En cuanto al tamaño de partícula es importante señalar que éste depende del tamaño del reactor, ya que en algunos casos a pequeña escala es necesario tener menor tamaño, ya que no permite el movimiento de forma mecánica, ni la transferencia de calor ni aireación.

2.6 Levaduras y su empleo en alimentación animal

Las levaduras son microorganismos unicelulares de crecimiento vegetativo que, dependiendo de la especie, pueden utilizar diversos compuestos como las pentosas, alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos y polisacáridos y casi todas las especies, con raras excepciones, utilizan iones de amonio para la síntesis de proteína (Becerra, 2006).

El crecimiento de algunos microorganismos como las levaduras se ve potencializado por la presencia de carbohidratos fermentables (celulosa, almidón y azúcares) como fuente de energía, oxígeno y otros nutrientes como el nitrógeno no proteico (Losane *et al.*, 1992; Raimbault, 1998; Díaz, 2009, 2012; Rodríguez, 2012).

Las levaduras son microorganismos que presentan un rápido crecimiento en diferentes medios con carbón (carbohidratos) y nitrógeno (proteína y nitrógeno no proteico). Pueden crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, por lo que presentan metabolismo respiro-fermentativo según las condiciones a la que se sometan. Las levaduras en cultivos batch aeróbicos producen mayores rendimientos de biomasa que en cultivos anaeróbicos (Figura 2). Ya que bajo condiciones anaeróbicas (limitación o ausencia de oxígeno) los carbohidratos fermentables son consumidos en la formación de etanol y dióxido de carbono, lo cual resulta en bajos rendimientos de levadura (Van Dijken *et al.*, 2000).

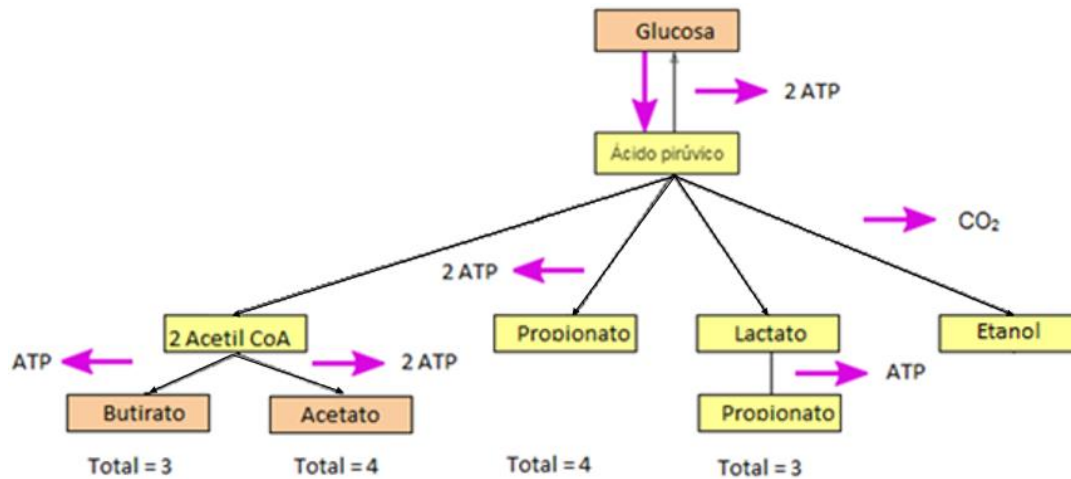


Figura 2. Fermentación anaeróbica (Champe *et al.*, 2008)

Durante el metabolismo de carbohidratos, éstos son transformados en piruvato y de ahí, bajo condiciones aeróbicas se convierte en acetil-CoA, la cual produce NADH en la mitocondria vía el Ciclo de Krebs. Subsecuentemente estos NADH son oxidados por la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial, el resultado final es la producción de ATP y calor (Figura 3). Por lo tanto, la eficiencia respiratoria está en función de la disponibilidad de oxígeno (Postmus *et al.*, 2011). Esta producción de energía es mucho más eficiente que la que se produce bajo condiciones anaeróbicas, lo que explica que al haber más energía, habrá mayor capacidad de síntesis microbiana (Van Hoek *et al.*, 2000).

Dentro de los microorganismos que han sido autorizados para su empleo en la alimentación animal podemos distinguir diferentes grupos de bacterias probióticas (*Bacillus cereus*, *Bacillus cereus toyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus facíminis*, *Pediococcus acidilactici*) y entre las levaduras probióticas el género más común es el *Saccharomyces*, especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces cerevisiae* variedad *Boulardii* (Van der Aa Kühle *et al.*, 2005). Todas estas cepas han demostrado efectos positivos en diferentes especies tales como rumiantes, aves, porcinos, peces y conejos (Breul, 1998).

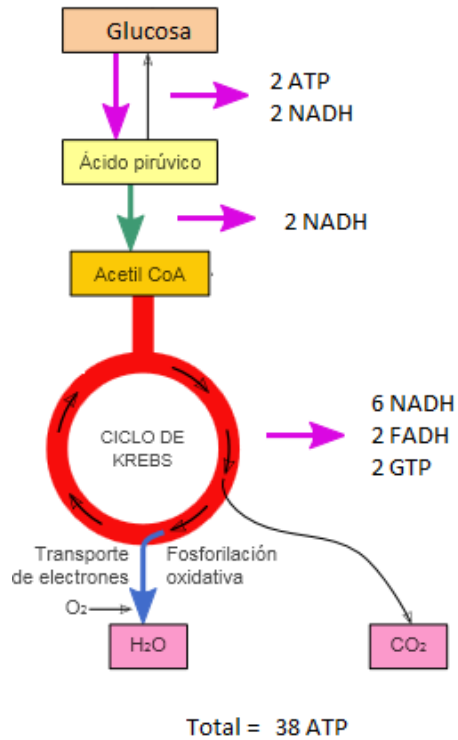


Figura 3. Fermentación aeróbica. (Champe *et al.*, 2008)

Los cultivos de levaduras vivas promueven un ambiente al rumen más saludable, reduciendo los niveles de oxígeno y estimulando el crecimiento de bacterias, principalmente las que degradan las fibras y las que consumen ácido láctico. De esa forma, dietas a base de pasto, caña de azúcar y ensilaje, que son ricas en fibras, son mejor degradadas, resultando en un mejor aprovechamiento de los alimentos (Valinote, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Obtener un forraje enriquecido en proteína microbiana con el uso de *Saccharomyces cerevisiae* o *Lactobacillus* y/o urea para su uso como alimento para rumiantes.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar efecto del nivel de inclusión de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre el contenido de proteína cruda, pH y material seca del nopal fermentado en estado sólido a diferentes tiempos según la fase.
2. Evaluar el efecto del nivel de inclusión de lactobacilos (*Lactobacillus* spp) sobre el contenido de proteína cruda, pH y material seca del nopal fermentado en estado sólido a diferentes tiempos.
3. Evaluar el efecto del nivel de inclusión de urea sobre el contenido de proteína cruda, pH y material seca del nopal fermentado en estado sólido con levadura a diferentes tiempos.
4. Evaluar el efecto del tiempo de fermentación y la presencia o no de levadura y urea sobre la calidad nutritiva (pH, MS, amoníaco, carbohidratos solubles, FDN) y la cantidad y tipo de microorganismos presentes en el producto obtenido de la fermentación en estado sólido de nopal forrajero.

4. METODOLOGÍA

El experimento y los análisis químicos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales campus Juriquilla de la Universidad Autónoma de Querétaro.

4.1 Material vegetativo

Las pencas de nopal (*Opuntia ficus indica*) provinieron de la localidad de El Capulín situado en el Municipio de San José Iturbide, Guanajuato, el cual se encuentra a 2130 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 17.8 °C y con una precipitación promedio de 400 – 700mm (Figura 4). El tamaño de las pencas empleadas fue de aproximadamente 30 cm de largo por 20 cm de ancho y 3 cm de espesor, con un peso aproximado de 1.2 - 1.5 kg y de 1 año de edad (Figura 5), de una plantación de 500 plantas de aproximadamente tres años de vida (Figura 6). Para los experimentos se cortó la raqueta un día antes de su utilización por la tarde, se encostalaron y se llevaron al laboratorio para su posterior utilización.



Figura 4. Localización del sitio de colecta de *Opuntia ficus indica*



Figura 5. Tipo de pencas utilizadas en los experimentos



Figura 6. Plantación de *Opuntia ficus indica*

4.2 Inóculos y fuente de nitrógeno

Se utilizaron dos inóculos de productos comerciales, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para elaboración de pan (Figura 7), lactobacilos (*Lactobacillus* spp) de un yogurt natural (Figura 8); y como fuente de nitrógeno se empleó urea de uso agrícola (Figura 9).



Figura 7. Levadura de panificación



Figura 8. Yogurt natural



Figura 9. Urea agrícola

4.3 Tratamientos y análisis

El presente trabajo estuvo conformado por cinco fases descritas a continuación:

4.3.1 **Fase 1. Inoculación con levadura y cinco tiempos de FES aerobia.**

Se adicionó el inóculo de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) a un nivel de inclusión de 0.25% y 0.5% en base a materia húmeda, permaneciendo bajo estas condiciones hasta 144 horas. Los muestreos de la fermentación en estado sólido se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 144 horas de FES aerobia.

4.3.2 **Fase 2. Inoculación con cuatro niveles de levadura y siete tiempos de FES aerobia.**

Con base a los resultados obtenidos en la fase 1, se adicionó el inóculo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a un nivel de inclusión viable económicamente de 0, 0.25, 0.5 y 1% en base a materia húmeda, permaneciendo bajo estas condiciones durante 36 horas, realizando muestreos a las 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas de FES aerobia.

4.3.3 **Fase 3. Inoculación con cuatro niveles de lactobacilos y siete tiempos de FES aerobia.**

Evaluación de la inclusión de lactobacilos (*Lactobacillus spp.*) a un nivel de inclusión económicamente viable de 0, 0.25, 0.5 y 0.75% en base a materia húmeda. Permaneciendo bajo estas condiciones durante 36 horas, realizando muestreos a las 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas de FES aerobia.

4.3.4 **Fase 4. Inoculación con levadura, cuatro niveles de urea y cinco tiempos de FES aerobia.**

Con base a los resultados obtenidos en la fase 2, se evaluó un nivel de inclusión de levadura del 0.75% (*Saccharomyces cerevisiae*) y diferentes niveles de inclusión

de urea a 0, 0.5, 1 y 1.5% en base húmeda. Se realizaron muestreos a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de FES aerobia. La urea se adicionó para mejorar la duplicación celular de las levaduras como fuente de nitrógeno no proteico (Gutiérrez *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2011; Gamez *et al.*, 2012).

En éstas primeras cuatro fases el nopal se cortó en pedazos de aproximadamente 1 cm² y se molió en una licuadora para obtener partículas de aproximadamente 2.5 mm. El nopal se depositó en recipientes de PVC con capacidad de 1.5 kg. Posteriormente, se adicionó el inóculo en la concentración correspondiente a cada fase y urea según el caso. Los FES aerobios se taparon con gasa y se colocaron en condiciones de temperatura ambiente permaneciendo bajo estas condiciones durante el tiempo establecido (Figura 10). Cada fase se hizo por triplicado. En cada hora de muestreo el producto fermentado se agitó durante 5 segundos, se tomaron aproximadamente 100 g del material fermentado, e inmediatamente se midió su pH por potenciometría. A la muestra colectada se le determinó el contenido de materia seca (MS) en estufa de aire forzado a 95° y proteína cruda (PC) por el método de Kjeldahl en fresco (AOAC, 2000).

Los resultados se analizaron aplicando un diseño de medidas repetidas en el tiempo mediante el análisis de ANOVA aplicando el paquete estadístico SAS (2008). La comparación entre medias se realizará con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



Figura 10. Microfermentadores en estado sólido de nopal.

4.3.5 Fase 5. Inoculación con dos niveles de levadura, dos niveles de urea y cinco tiempos de FES aerobia a escala piloto.

De las fases anteriores se determinó incrementar el tamaño de partícula ya que en una producción intensiva el tamaño previamente utilizado es difícil de obtener, el porcentaje de inóculo de levadura observando que al valor de 0.75 seguía existiendo un incremento de proteína, el tiempo de FES y el nivel de urea conociendo que no era nocivo para la levadura observando que con este nivel seguía habiendo un incremento constante. Con base en los resultados de la fase 4, se utilizaron dos niveles de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) de 0 y 0.75% en base húmeda y dos niveles de urea de 0 y 1% en base húmeda como fuente nitrogenada, teniendo 4 tratamientos: 1) 0% levadura, 0% urea, 2) 0.75% levadura, 0% urea, 3) 0% levadura, 1% urea, 4) 0.75% levadura, 1% urea.

En esta última fase, el nopal se cortó en rebanadas de 1 cm de grosor en un molino con cuchillas con capacidad de 500 kg/h aproximadamente. El molino cuenta con una apertura en la parte superior por donde se introduce el nopal, penca por penca, posteriormente por el giro y la gravedad las pencas son cortadas mediante 4 cuchillas soldadas en una placa de acero que gira gracias a un motor con potencia de 1 HP, de 110 V y 450 r.p.m. (Figura 11).

El nopal picado se depositó en recipientes de polietileno con capacidad de 18 litros. Posteriormente se adicionó el inóculo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y urea correspondiente al tratamiento, revolviéndose cuidadosamente hasta homogeneizar. Los fermentadores en estado sólido aerobios se taparon con gasa y se colocaron a temperatura ambiente permaneciendo bajo estas condiciones durante 24 horas (Figura 12). Cada tratamiento se hizo por triplicado.



Figura 11. Molino para corte de nopal



Figura 12. Fermentación en estado sólido de nopal a escala piloto

Los muestreos de nopal fermentado de cada tratamiento se realizaron a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de fermentación en estado sólido de forma aerobia. A cada hora de muestreo se registró la temperatura interna del fermentador y se agitó durante 5 segundos el producto fermentado para homogeneizar. Aproximadamente 300 g se licuaron para reducir el tamaño de la partícula, de los cuales se tomaron 100 g del material fermentado, e inmediatamente se tomó el pH por potenciometría. Una porción en fresco de 40 g se empleó para determinar el contenido de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000) y de amoníaco por destilación (Kiek, 1950), y otra de 20 g se secó en una estufa de aire forzado a 55° C para obtener el contenido de materia seca (AOAC, 2000).

En otra porción de 10 g en fresco se evaluó el crecimiento y la diversidad de microorganismos presentes en el nopal forrajero fermentado en estado sólido).

El resto de la muestra se liofilizó y se molió a través de una malla de 0.5 mm para posteriormente realizar la determinación de carbohidratos solubles por el método de antrona (Fairbairn, 1953), y fibra detergente neutro y ácido (Van Soest *et al.*, 1991) en un analizador de fibra ANKOM200 (Ankom Technology Corporation, NY).

Para evaluar el crecimiento y la diversidad de microorganismos en las muestras de nopal fermentado en estado sólido, éstas se mezclaron en un homogeneizador para laboratorio Stomacher® y se realizó su siembra por extensión de superficie en un medio de cultivo selectivo para mohos y levaduras compuesto de dextrosa y papa, y se incubaron a $30^{\circ} \pm 2$ C durante 96 horas. De cada tratamiento y hora de la FES se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) (NOM 092, 1994; NOM 110, 1994) y se realizó una tinción de Gram (Camacho *et al.*, 2009) para observar la morfología de las células e identificar la diversidad de microorganismos presente en el nopal fermentado (Aquihuatl y Pérez, 2004).

En la levadura empleada para inocular el nopal para su FES en las diferentes fases se realizó la determinación de las UFC/g.

Los reactivos de desecho de las determinaciones químicas se eliminaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana Nom-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos (Diario Oficial de la Federación, 2005).

Los resultados se analizaron aplicando un diseño de medidas repetidas en el tiempo mediante el análisis de ANOVA aplicando el paquete estadístico SAS (2008). La comparación entre medias se realizó empleando LSmeans ($P < 0.05$).

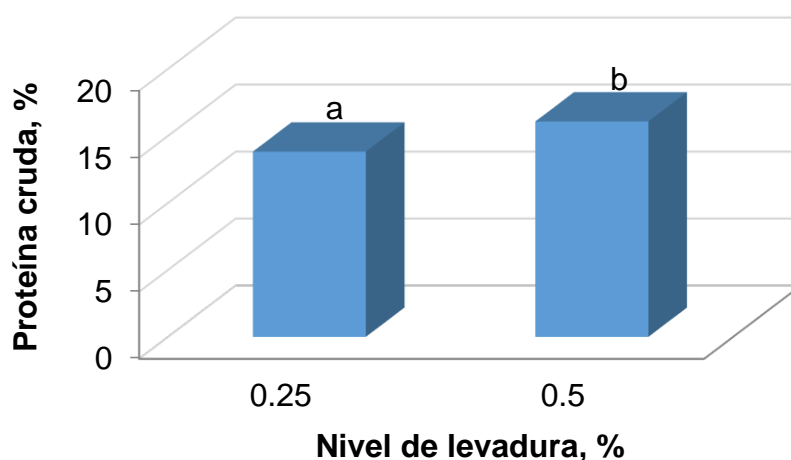
5. RESULTADOS

5.1 Fase 1

La finalidad de esta primera fase fue la de observar el comportamiento del inóculo (*Saccharomyces cerevisiae*), para determinar el tamaño de partícula y el tiempo de fermentación.

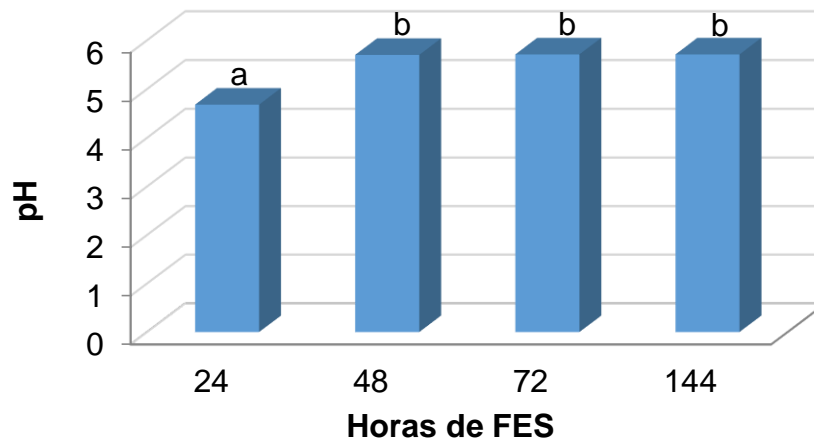
La concentración de la levadura empleada como inóculo presentó 34.5×10^6 UFC/g.

El nivel de inclusión de levadura incrementó ($P < 0.05$) el contenido de proteína cruda (Figura 13) del producto de la FES; mientras que no modificó ($P > 0.05$) el valor de pH y el contenido de materia seca, presentando un valor promedio de 5.54 y 6.6%, respectivamente. El tiempo de FES del nopal no provocó cambios ($P > 0.5$) en el contenido de materia seca y de proteína cruda, presentando un promedio de 6.6 y 14.9%, respectivamente. Sin embargo, en el pH existió diferencia ($P < 0.05$) con respecto al tiempo de FES entre las 24 y 48 horas, permaneciendo constante hasta las 144 horas (Figura 14).



^{a,b} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 13. Contenido de proteína cruda del nopal fermentado con respecto al nivel de levadura (Fase 1)



^{a,b} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 14. Comportamiento del pH del nopal fermentado con levadura con respecto al tiempo de FES (Fase 1)

5.2 Fase 2

En esta fase se decidió incluir cuatro niveles de levadura y utilizar menor tiempo de FES aeróbica para un proceso más corto, ya que posterior a las 24 horas de muestreo no se presentaron diferencias estadísticas.

El contenido de proteína cruda del producto de la FES mostró una interacción ($P < 0.05$) entre el nivel de inclusión de levadura y el tiempo de FES (Figura 15), observándose que a las 6 horas de FES el contenido de proteína cruda se incrementó proporcionalmente al nivel de levadura, mientras que el tratamiento sin levadura en ninguna hora aumentó su contenido de proteína cruda. Al 1% de levadura se produjo un incremento drástico ($P < 0.05$) a las 6 horas de FES para posteriormente disminuir ($P < 0.05$) paulatinamente hasta las 36 horas. Con 0.5 y 0.25% de levadura se incrementa sin ser tan drástico a las 6 horas, pero se mantiene constante hasta las 36 horas de FES.

El contenido materia seca mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) por el nivel de levadura (Figura 16); sin embargo, en el análisis realizado por tiempo de FES no existió diferencia ($P > 0.05$) teniendo un promedio de 6.4 %

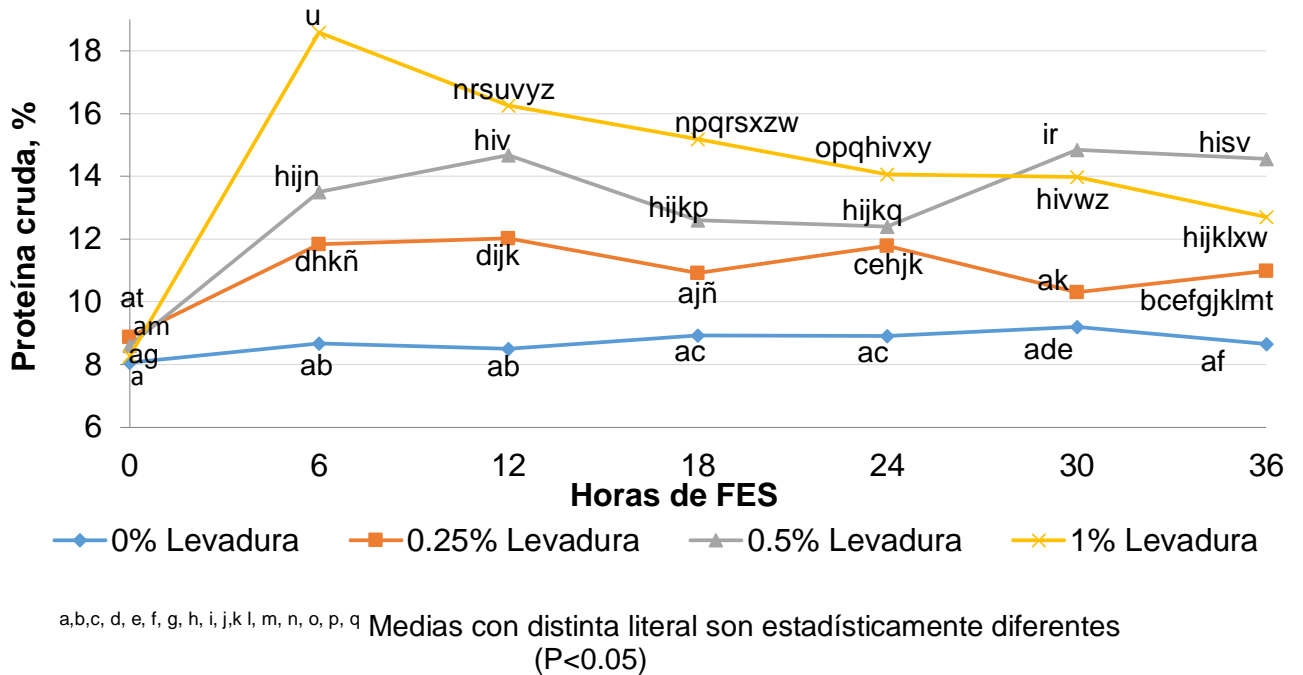
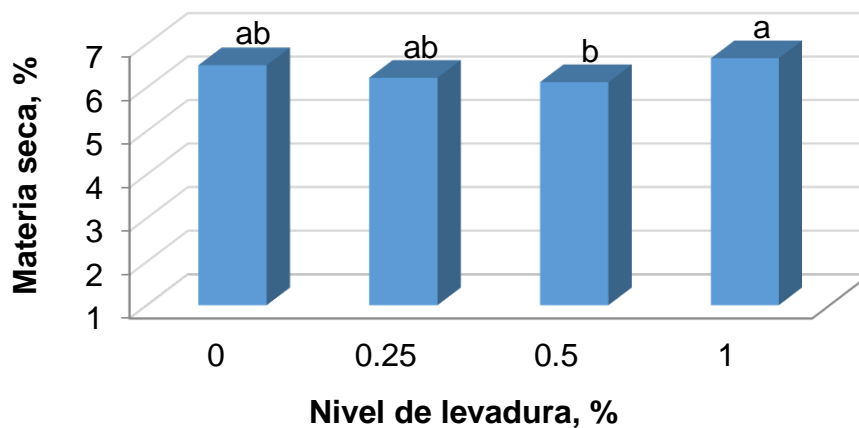


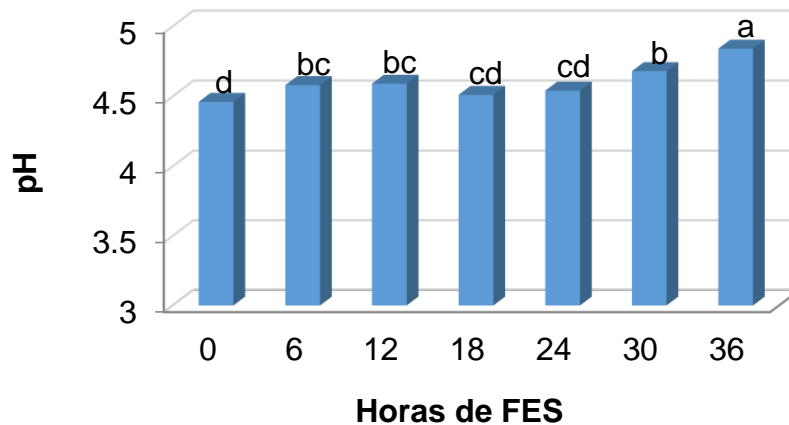
Figura 15. Efecto del contenido de proteína cruda del nopal fermentado por el nivel de levadura y el tiempo de FES (Fase 2)



a,b Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Figura 16. Contenido de materia seca del nopal fermentado con respecto al nivel de levadura (Fase 2)

El pH del nopal fermentado no se vio afectado (P>0.05) por el nivel de levadura teniendo un valor promedio de 4.59, sin embargo, con respecto al tiempo de FES el pH se incrementó (P<0.05) de las 0 a las 36 horas (Figura 17).



a,b,c,d Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

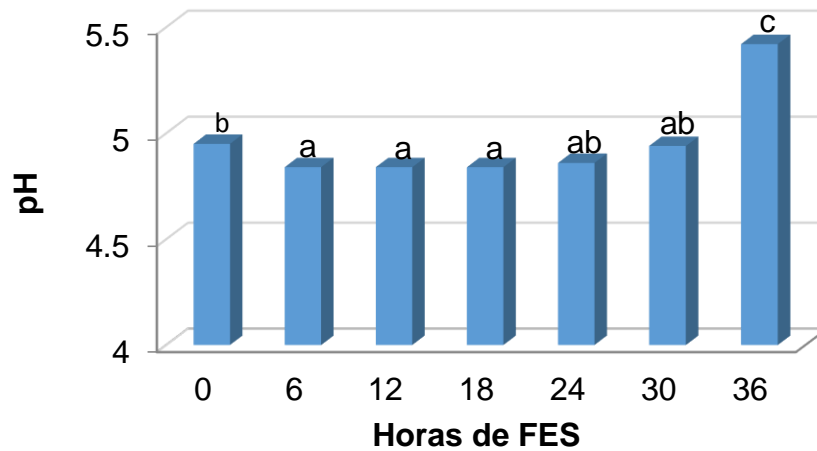
Figura 17. Comportamiento del pH del nopal fermentado con levadura con respecto al tiempo de FES (Fase 2)

5.3 Fase 3

En esta fase se utilizaron lactobacilos para conocer su comportamiento en la FES del nopal.

El producto de la FES del nopal inoculado con diferentes niveles de lactobacilos y a diferentes tiempos de FES no mostró diferencias ($P > 0.05$) en el contenido de proteína cruda y material seca, teniendo un promedio de 10.2 y 5.7% respectivamente.

El pH del nopal fermentado no se vio afectado ($P > 0.05$) por el nivel de lactobacilos teniendo un valor promedio de 4.96, sin embargo, con respecto al tiempo de FES el pH decreció ($P < 0.05$) a las 6 horas permaneciendo constante hasta las 24 horas, teniendo posteriormente un incremento a las 36 horas (Figura 18).



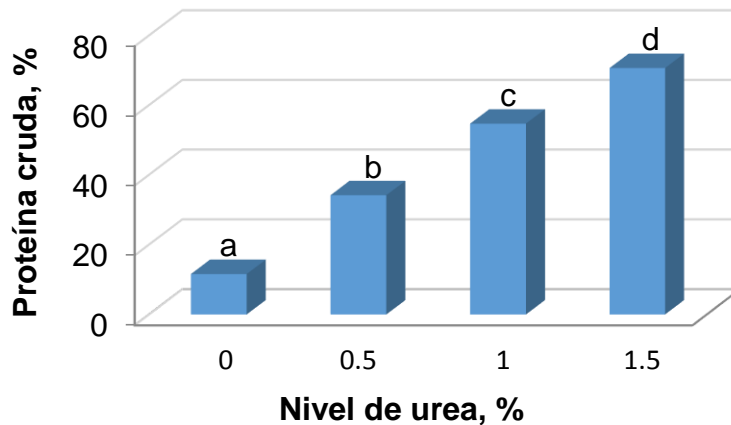
^{a,b,c} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 18. Comportamiento del pH del nopal fermentado con lactobacilos con respecto al tiempo de la FES (Fase 3)

5.4 Fase 4

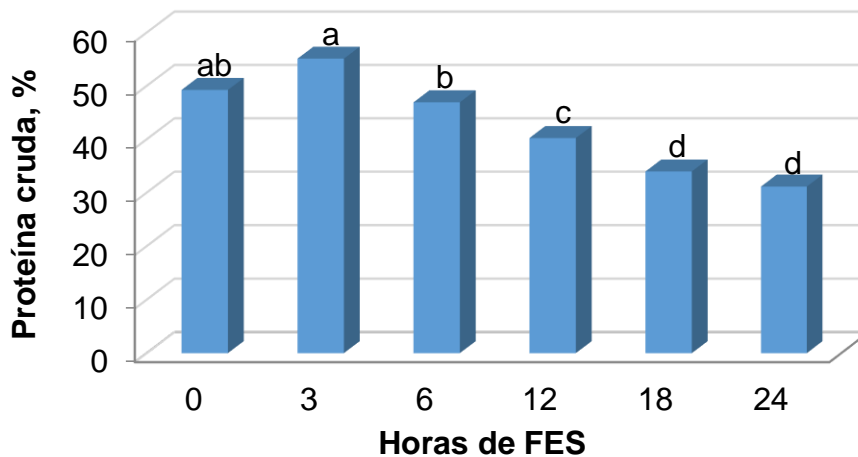
En esta fase se evaluó la inclusión de 0.75% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y diferentes niveles de inclusión de urea, como fuente de nitrógeno, permaneciendo bajo estas condiciones durante 24 horas de FES.

El contenido de proteína cruda del nopal fermentado mostró diferencias ($P < 0.05$) con respecto al nivel de inclusión de urea siendo directamente proporcional al nivel de urea utilizado (Figura 19). Con respecto al tiempo de FES se observaron diferencias ($P < 0.05$) en cuanto al contenido de proteína cruda, mostrando una máxima concentración a las 3 horas y decreciendo hasta las 24 horas (Figura 20).



a,b,c,d Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

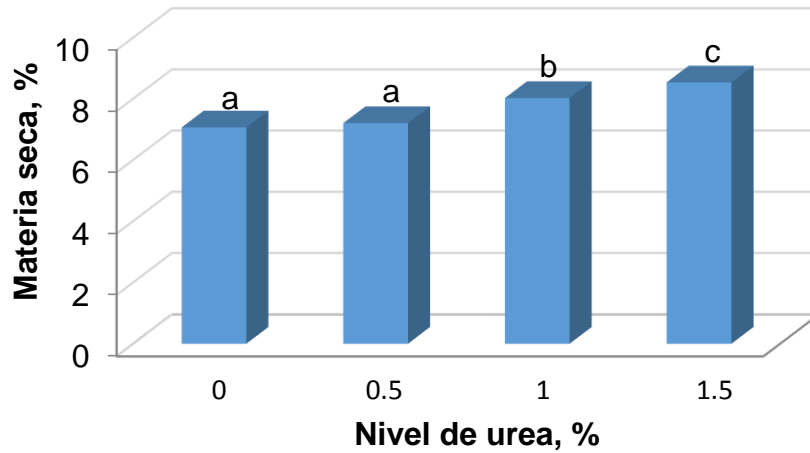
Figura 19. Contenido de proteína cruda del nopal fermentado con levadura con respecto al nivel de inclusión de urea (Fase 4)



a,b,c,d Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

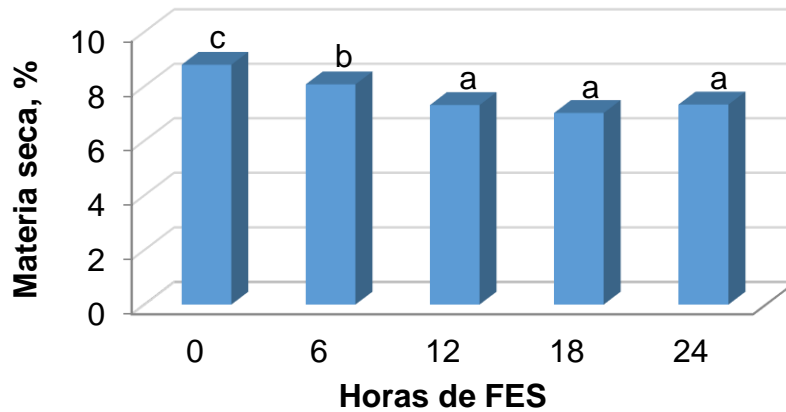
Figura 20. Contenido de proteína cruda del nopal fermentado con levadura y urea en relación al tiempo de FES (Fase 4)

El contenido de material seca del nopal fermentado mostró diferencias ($P < 0.05$) con respecto al nivel de inclusión de urea siendo directamente proporcional al nivel de urea (Figura 21). En el tiempo de FES se observaron diferencias ($P < 0.05$) en cuanto al contenido de material seca, mostrando una disminución de las 0 a las 12 horas, para posteriormente permanecer constante hasta las 24 horas (Figura 22).



a,b,c Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Figura 21. Contenido de materia seca en el nopal fermentado con levadura con respecto al nivel de inclusión de urea (Fase 4)



a,b,c Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Figura 22. Contenido de materia seca del nopal fermentado con levadura y urea con respecto al tiempo de FES (Fase 4)

El pH del producto de la FES mostró interacción (P<0.05) entre el nivel de inclusión de urea y el tiempo de FES (Figura 23), observándose que con la inclusión de urea en el nopal fermentado el valor de pH se incrementó directamente proporcional (P<0.05) con el tiempo de FES, mientras que el tratamiento sin urea en ninguna hora se incrementó su valor. En todos los tratamientos con urea el valor de pH fue mayor que el tratamiento que no la contenía.

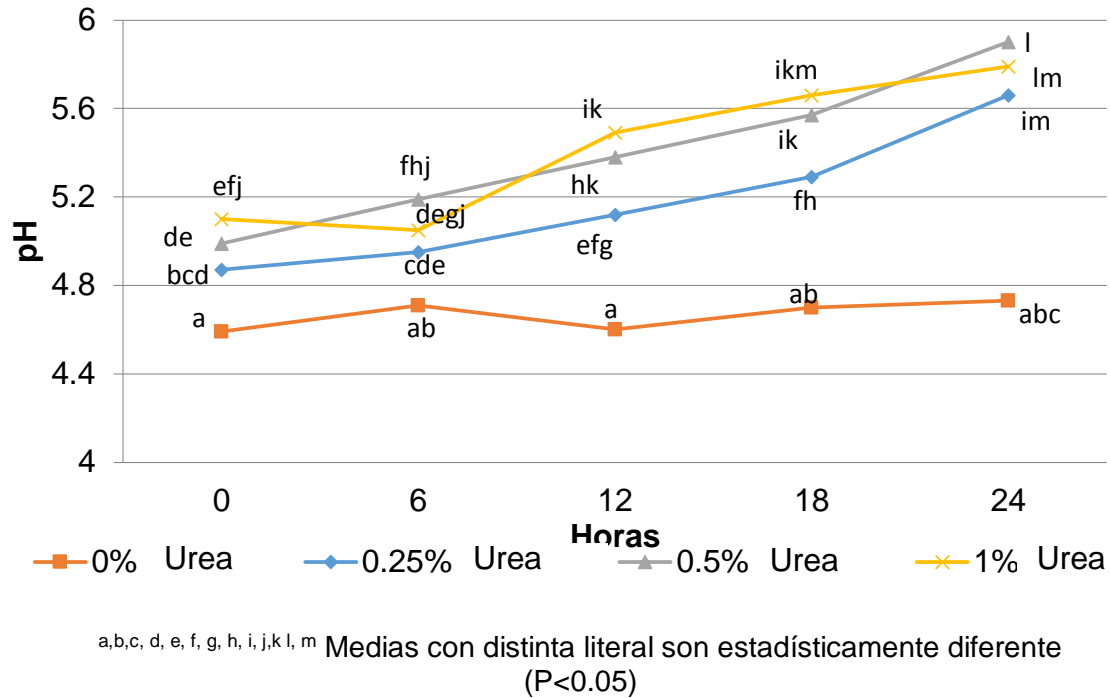
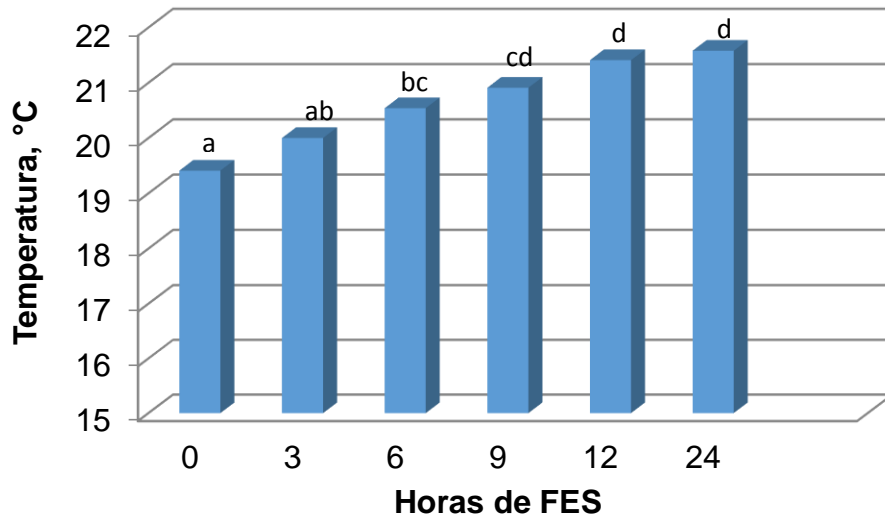


Figura 23. Efecto del valor de pH del nopal fermentado con levadura por el nivel de urea y el tiempo de FES (Fase 4)

5.5 Fase 5

En esta fase existieron variaciones en el tamaño del recipiente para la fermentación ya que en las fases anteriores se realizaron en cilindros de PVC de 1.5 kg y en este en recipientes de 18 litros debido a que se buscaron resultados más reales a la hora de aplicarlo a un nivel productivo a escala piloto. Se evaluó la inclusión de dos niveles de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y dos niveles de urea, como fuente de nitrógeno, permaneciendo bajo estas condiciones durante 24 horas de FES.

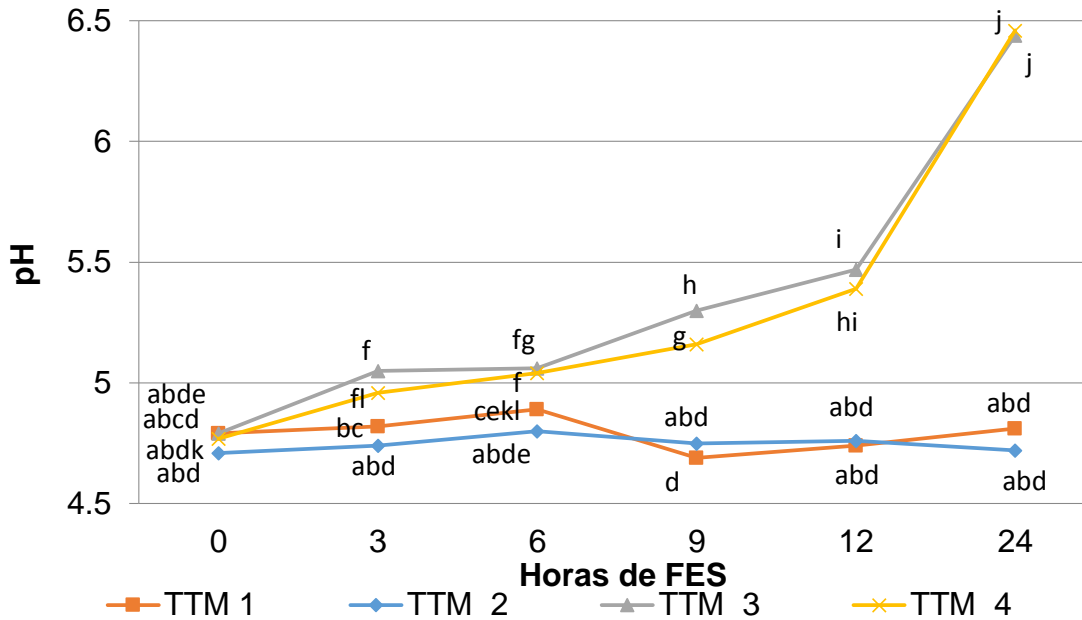
La temperatura interna del nopal fermentado no mostró diferencias ($P > 0.05$) con respecto al nivel de inclusión de levadura y/o urea, mostrando un promedio de 20.6°C . En el tiempo de FES se observaron diferencias ($P < 0.05$) en cuanto a la temperatura interna, incrementando proporcionalmente al tiempo de FES (Figura 24).



a,b,c,d Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 24. Temperatura del nopal fermentado con levadura y urea con respecto al tiempo de FES (Fase 5)

El valor de pH del nopal fermentado mostró interacción ($P < 0.05$) entre el nivel de inclusión de levadura y/o urea y el tiempo de FES (Figura 25), observándose que con la inclusión urea (tratamiento 3 y 4) en el nopal fermentado el valor de pH se incrementaba directamente proporcional ($P < 0.05$) con el tiempo de FES, mientras que los tratamientos sin urea en ninguna hora se incrementó su valor. En todos los tratamientos con urea (3 y 4) el valor de pH fue mayor que el tratamiento que no la contenía.

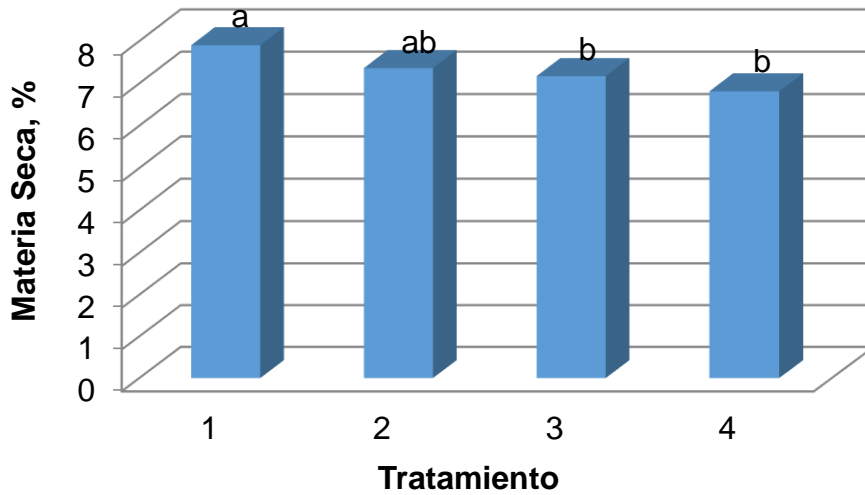


a,b,c, d, e, f, g, h, i, j, k Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 25. Efecto del pH del nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) y al tiempo de FES (Fase 5)

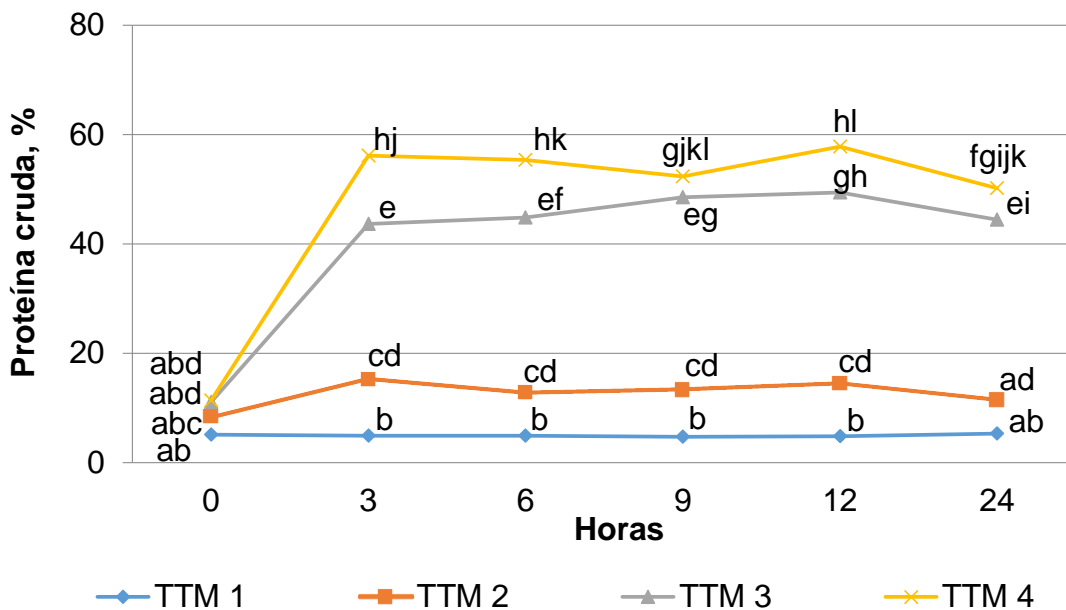
El contenido de materia seca del nopal fermentado mostró diferencias ($P > 0.05$) con respecto al nivel de inclusión de levadura y/o urea (tratamiento), mostrando un menor contenido en los tratamientos con urea (3 y 4) (Figura 26). Sin embargo, en el tiempo de FES no se observaron diferencias ($P < 0.05$), teniendo un promedio de 7.3% de materia seca.

El contenido de proteína cruda del nopal fermentado mostró interacción ($P < 0.05$) entre el tratamiento y el tiempo de FES (Figura 27), observándose que a las 3 horas de FES el contenido de proteína cruda se incrementaba en los tratamientos con urea (2 y 3) permaneciendo constante hasta las 24 horas, teniendo contenidos mayores los del tratamiento 4 con urea y levadura, que el tratamiento 3 solo con urea. Sin embargo, en los tratamientos sin urea (1 y 2) en ninguna hora se incrementó su contenido de proteína, permaneciendo constante hasta las 24 horas.



^{a,b} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 26. Contenido de materia seca del nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) (Fase 5)

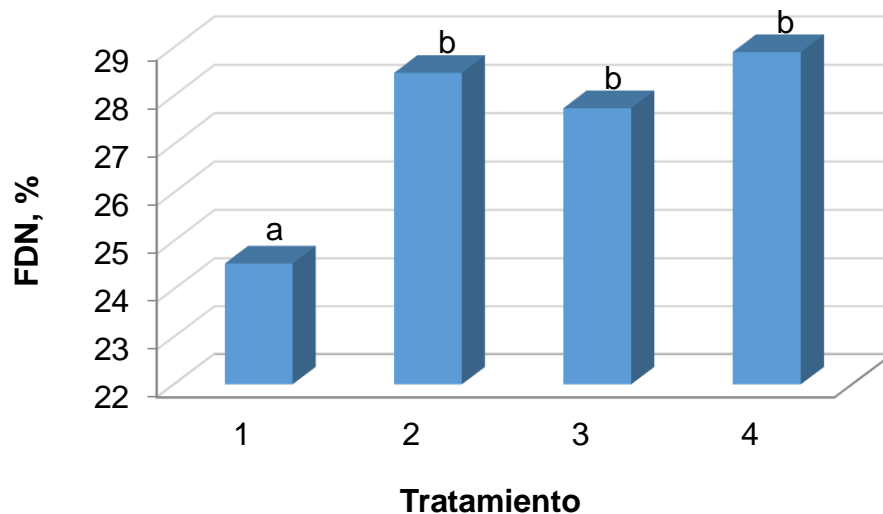


^{a,b,c, d, e, f} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 27. Efecto del contenido de proteína cruda del nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) y al tiempo de FES (Fase 5)

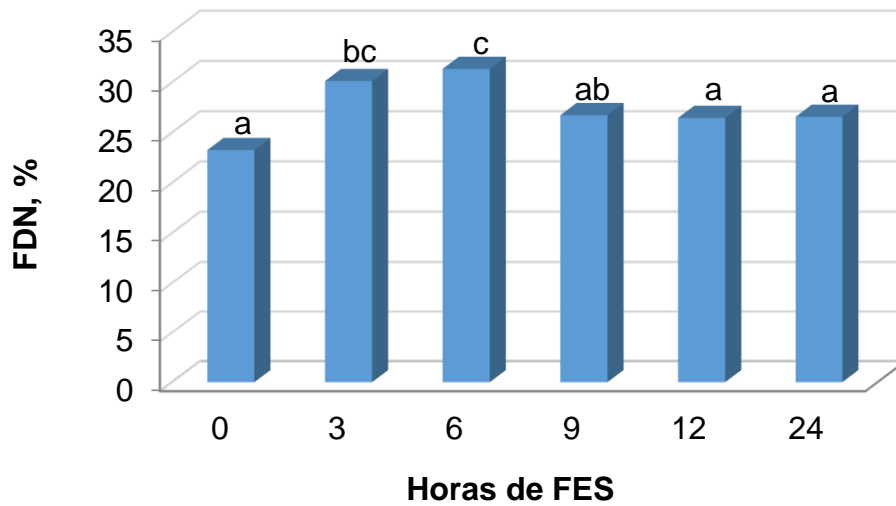
El contenido de FDN del nopal fermentado mostró diferencias ($P>0.05$) con respecto al tratamiento, incrementando su contenido en los tratamientos con inclusión de levadura y/o urea ($P<0.05$) con respecto al que no contó con levadura ni urea (Figura 28). En el tiempo de FES se observaron diferencias ($P<0.05$), incrementándose su valor de 0 a 3 y 6 horas, para posteriormente disminuir su contenido comparable al del tiempo 0 (Figura 29).

El contenido de FDA del nopal fermentado mostró diferencias ($P>0.05$) con respecto al tratamiento, mostrando un menor contenido en los tratamientos con levadura (2) y con urea (3) con respecto al tratamiento sin levadura y urea (1) y al tratamiento con levadura y urea (Figura 30). En el tiempo de FES se observaron diferencias ($P<0.05$), incrementándose su valor a las 3 y 6 horas, para posteriormente disminuir su contenido comparable al del tiempo 0 (Figura 31).



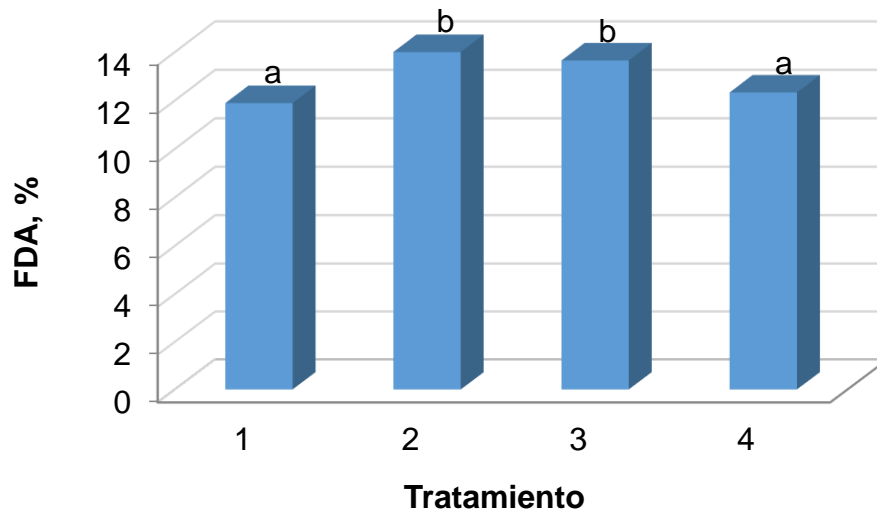
^{a,b} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P<0.05$)

Figura 28. Contenido de FDN del nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) (Fase 5)



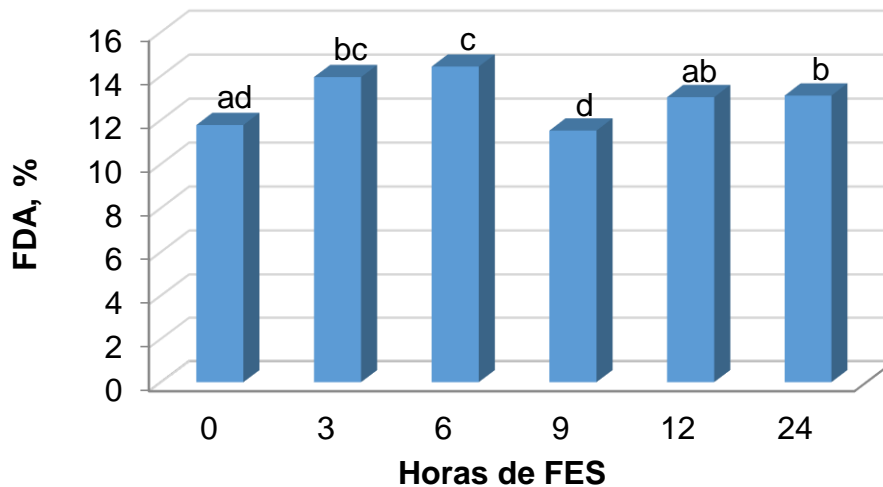
^{a,b,c} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 29. Contenido de FDN del nopal fermentado con levadura y urea con respecto al tiempo de FES (Fase 5)



^{a,b} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 30. Contenido de FDA del nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) (Fase 5)

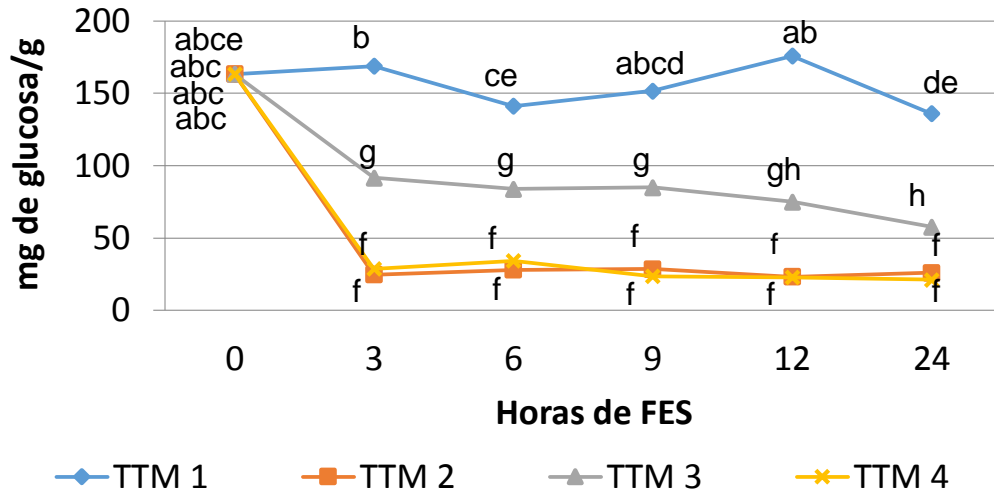


^{a,b} Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 31. Contenido de FDA del nopal fermentado con levadura y urea con respecto al tiempo de FES (Fase 5)

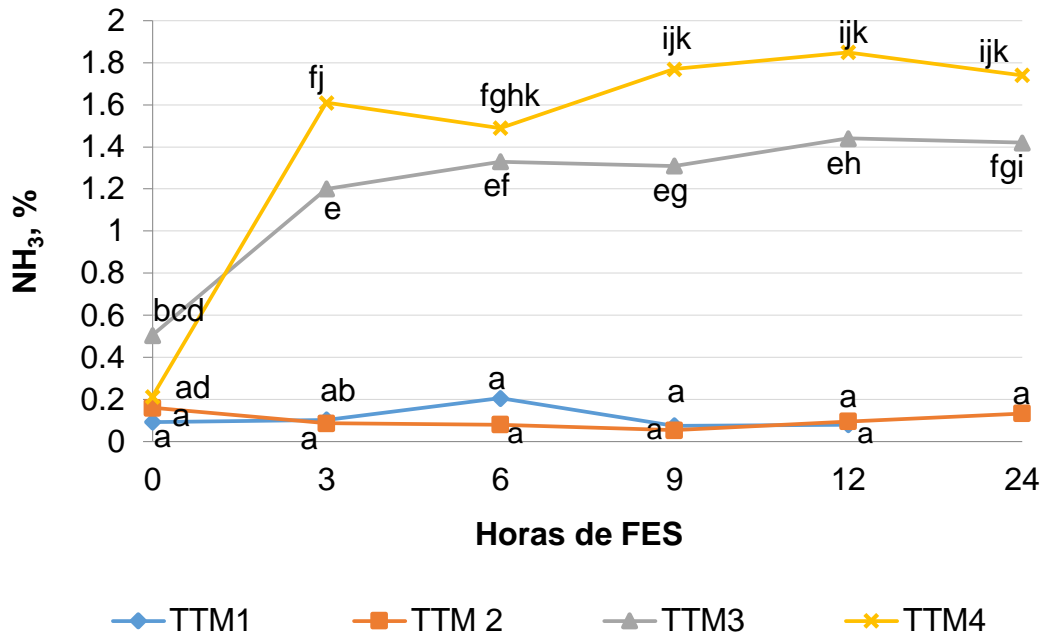
El contenido de carbohidratos solubles del nopal fermentado mostró interacción ($P < 0.05$) entre el tratamiento y el tiempo de FES (Figura 32), observándose que a las 3 horas de FES su concentración disminuía considerablemente en los tratamientos con urea y/o levadura (2, 3 y 4) permaneciendo constante hasta las 24 horas, teniendo contenidos mayores los del tratamiento 3 con urea, que los tratamientos 2 con levadura y 4 con levadura y urea. Sin embargo, el tratamiento 1 sin levadura y urea en ninguna hora decreció su contenido de carbohidratos solubles, permaneciendo constante hasta las 24 horas.

El contenido de amoníaco del nopal fermentado mostró interacción ($P < 0.05$) entre el tratamiento y el tiempo de FES (Figura 33), observándose que a las 3 horas de FES la concentración de amoníaco se incrementaba en los tratamientos conteniendo urea (2 y 3) permaneciendo constante hasta las 24 horas, teniendo contenidos mayores los del tratamiento 4 con urea y levadura, que el tratamiento 3 solo con urea. Sin embargo, los tratamientos sin urea (1 y 2) en ninguna hora se incrementaron su contenido de amoníaco, permaneciendo constante hasta las 24 horas.



a,b,c, d, e Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes (P<0.05)

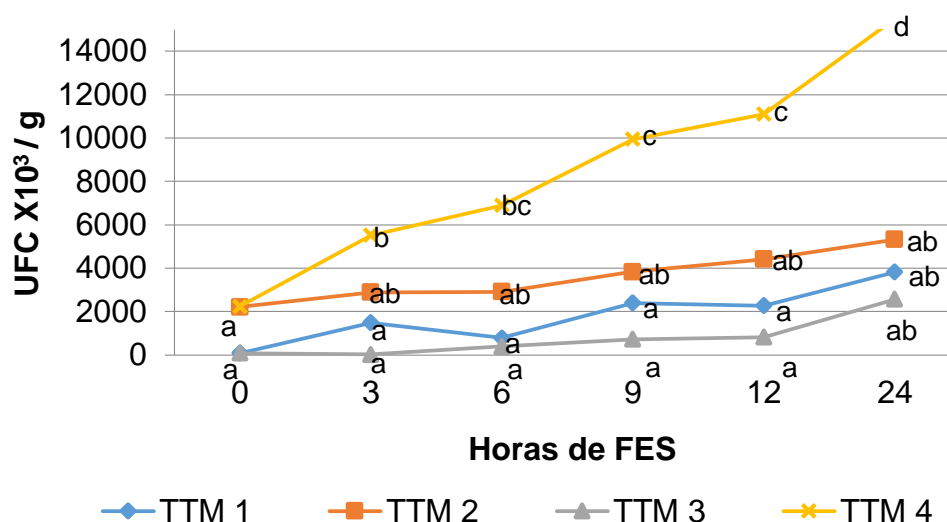
Figura 32. Efecto del contenido de carbohidratos solubles en el nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) y al tiempo de FES (Fase 5)



a,b,c, d, e, f Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Figura 33. Efecto del contenido de amoniaco en el nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) y al tiempo de FES (Fase 5)

El crecimiento microbiano representado por las UFC del nopal fermentado mostró interacción ($P < 0.05$) entre el tratamiento y el tiempo de FES (Figura 34), observándose en el tratamiento 4 con levadura y urea un crecimiento directamente proporcional ($P < 0.05$) con las horas de FES hasta las 24 horas (a esta hora fue tan alto el crecimiento que no se pudo realizar su conteo debido a su alto número de colonias). Sin embargo, los demás tratamiento (1, 2 y 3) en ninguna hora se incrementó significativamente ($P > 0.05$) el crecimiento microbiano.



a,b,c,d Medias con distinta literal con estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Figura 34. Efecto del crecimiento microbiano (UFC/g) en el nopal fermentado con respecto al tratamiento (nivel de levadura y urea) y al tiempo de FES (Fase 5)

En los tratamientos 2 con levadura y 4 con levadura y urea, independientemente del tiempo de fermentación, en promedio, presentaron una dominancia de levaduras; mientras que en el tratamiento 1 sin levadura-urea y 3 con urea hubo mayor diversidad de microorganismos (cocos, bacilos, levaduras y mohos). El número de colonias fue directamente proporcional al tiempo de fermentación, el tratamiento 4 con levadura y urea presentó el mayor número, seguido del tratamiento 2 con levadura. Caso contrario en el tratamiento 3, donde la urea provocó un decremento en el número de colonias con respecto al tratamiento 1 sin

urea. El crecimiento microbiano durante la FES de nopal se vio favorecido con la inclusión de levaduras y urea como fuente de nitrógeno (Figura 35).

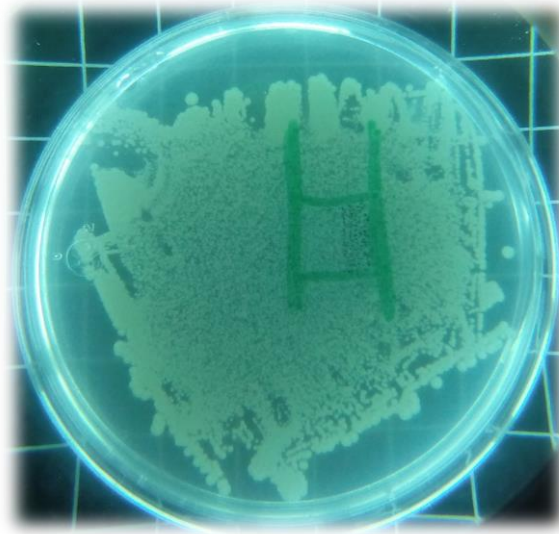


Figura 35. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

De los resultados de diversidad microbiana con la tinción de Gram de cada caja Petri de todos los tiempos, se observó en promedio que en el tratamiento 1 sin levadura y urea predominaron los bacilos (59%) seguidos de las levaduras (32%) (Figura 36). Los tratamientos 2 y 4 (Figura 37 y 38) propiciaron las condiciones para que las levaduras fueran el principal microorganismo presente con 76 y 93%, respectivamente, posiblemente la presencia de urea inhibió el crecimiento de cocos. En el tratamiento 3 con urea (Figura 39) se distinguió por una mayor diversificación de microorganismos, sin embargo, las levaduras dominaron (61%) a los cocos (22%) y a los bacilos (13%).

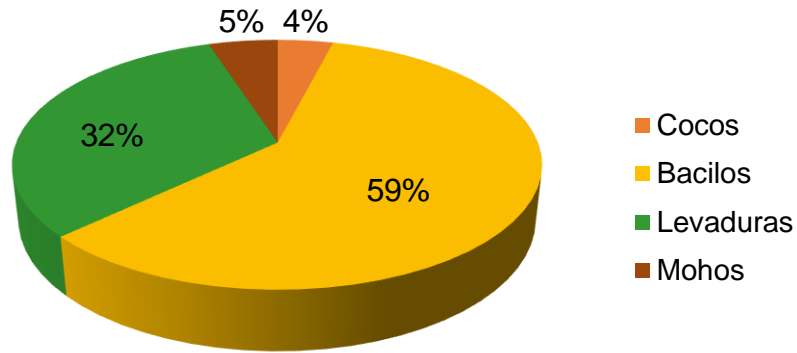


Figura 36. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0% de levadura y 0% de urea (tratamiento 1) (Fase 5)

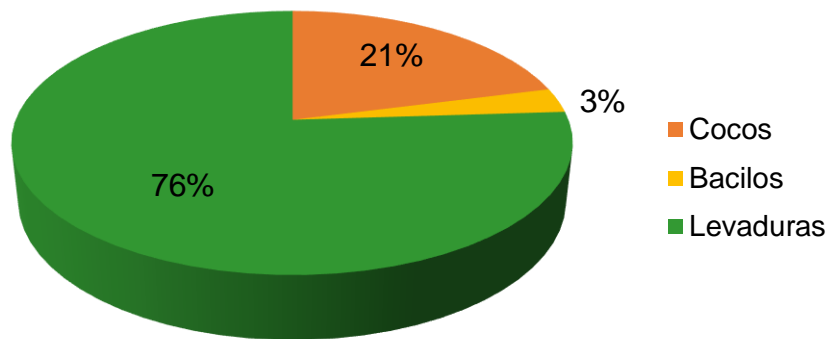


Figura 37. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0.75% de levadura y 0% de urea (tratamiento 2) (Fase 5)

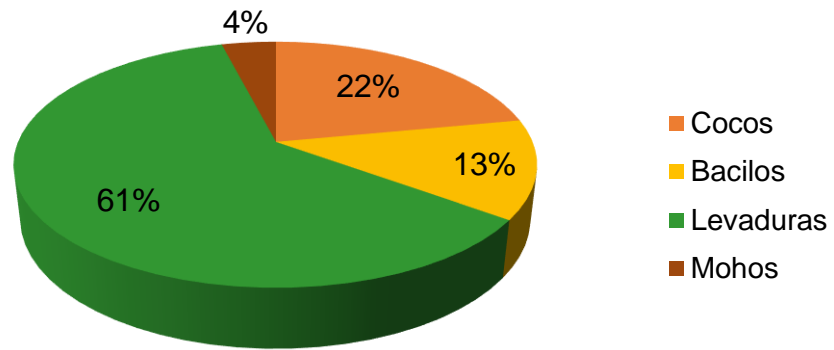


Figura 38. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0% de levadura y 1% de urea (tratamiento 3) (Fase 5)

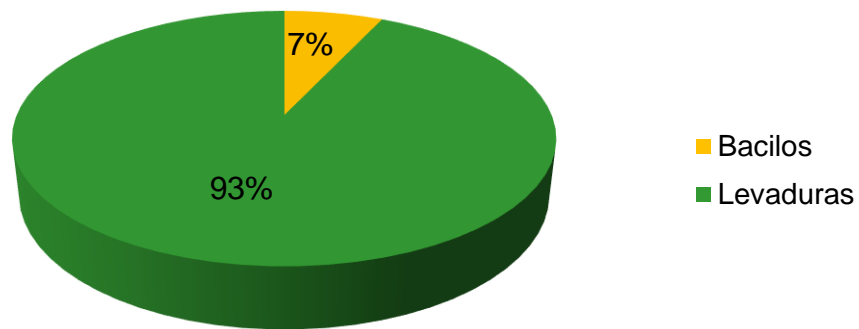


Figura 39. Diversidad microbiana en el nopal fermentado con 0.75% de levadura y 1% de urea (tratamiento 4) (Fase 5)

6. DISCUSIÓN

En la presente investigación de la FES del nopal bajo condiciones aeróbicas se produjo un gran crecimiento y por ende de proteína, lo que nos indica que el suministro de oxígeno (por agitación), de carbohidratos y de la fuente de nitrógeno debió ser suficiente y no limitante para el crecimiento de las levaduras (Van Hoek et al 2000; Postmus et al, 2011).

En el presente trabajo, se observó un incremento de la temperatura con respecto al tiempo de FES de 2°C, lo que se explica por ser un proceso exotérmico derivado de la respiración lo cual implica incrementos de temperatura. (Postmus *et al.*, 2011). El calor acumulado en sustratos fermentados es el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos, la temperatura interna tiende a mantenerse constante a pesar de los cambios de temperatura ambiental; aun así, esta puede influenciar ligeramente la temperatura del sustrato (Raimbault, 1998; Ruiz *et al.*, 2002; Rodríguez, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Sosa *et al.*, 2012; Gamez, 2012). En otras investigaciones se han observado incrementos de la temperatura en FES de 1 a 4°C empleando desperdicio de manzana, extracto de malta, melaza de caña, nopal forrajero entre otros (Raimbault, 1998; Gamez, 2012; Sosa *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se observó un aumento del pH con la inclusión de urea. En una fermentación en estado sólido aeróbica el pH está relacionado directamente con la producción de NH₃, con una menor producción de ácidos orgánicos, por el incremento del contenido total de aminoácidos y productos como la urea alcalinizantes (Becerra, 2006), y por la hidrólisis de la urea (Raimbault, 1998). Díaz *et al.* (2011) y Pastrana (1996) mencionan que FES de diferentes sustratos presentan incrementos ligeros en pH con respecto al tiempo. Estos valores son variables en función del pH inicial del sustrato empleado en la fermentación. Cabe mencionar que el nopal tiene cierta capacidad amortiguadora por lo que tiende a neutralizar la acidez (Gulias *et al.*, 1989).

El contenido de materia seca se afectó por la inclusión de urea, la cual al ser higroscópica incrementó el contenido de humedad y disminuyó la materia seca. Araujo (2008) obtuvo 7.44 % de materia seca con 1% de inóculo a las 24 horas, Herrera *et al.* (2014) reportaron una disminución de materia seca de 8.7 a 6.4% de las 0 a las 24 horas, y Gamez *et al.* (2012) de 6 a 8% a las 24 horas.

El contenido de proteína cruda obtenido en el presente trabajo con 0.75% de levadura y 1% de urea fue de 56% en base seca, en comparación con Herrera *et al.* (2014) donde realizando una FES sobre nopal forrajero con *S. cerevisiae* obtuvieron incrementos en el contenido de proteína de 6.71 al inicio a 14.04 % a las 48 horas de fermentación. Díaz *et al.* (2012) fermentando en estado sólido nopal forrajero observaron aumentos en contenidos de proteína de 9.35% a 19.36% a las 12 horas de fermentación con *K. lactis* como inóculo. Gamez *et al.*, (2012) empleando nopal fermentado en estado sólido con *Saccharomyces cerevisiae* y ciertos nutrientes reportaron contenidos de proteína de 4.6% iniciales a 32.1% finales a las 24 horas.

Existe poca información sobre el contenido de fibra detergente neutra y fibra detergente ácida en nopal fermentado, sin embargo, Pinos *et al.* (2010) registraron un contenido de 28.8 y 15.4 % de FDN y FDA, respectivamente en pencas de *Opuntia ficus indica* de 30 días de edad sin fermentar, lo cual es aproximado a los valores obtenidos para las pencas de 1 año utilizadas en el presente trabajo en el tiempo 0 con 24.53% y 11.89% de FDN y FDA. Los valores obtenidos en la FES incluyendo levadura y/o urea incrementaron de 23.25% a 31.33% de FDN y de 11.77% a 14.43% de FDA a las 6 horas de FES en comparación con Herrera *et al.* (2014) obtuvieron un incremento de FDN de 32.9% a 41.1% a las 24 horas y de 13.7% a 17.1% de FDA en el mismo tiempo, Las diferencias en el contenido de FDN y FDA entre la literatura y los valores obtenidos en esta investigación pueden deberse a la variedad y etapa de maduración del nopal (Contreras *et al.*, 2012). El contenido de FDN y FDA se incrementaron de las 3 a las 6 horas de FES por efecto de dilución ya que a ese tiempo la concentración de carbohidratos solubles disminuyó considerablemente.

La concentración de carbohidratos solubles en el nopal inoculado con levaduras y/o urea disminuyó a partir de las 3 horas de fermentación aeróbica, ya que las levaduras los emplean rápidamente como fuente de energía y para su duplicación celular (Díaz *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012).

Albers *et al.* (1996) probaron varias fuentes de nitrógeno en el crecimiento de levaduras en una fermentación aeróbica y observaron que el amonio lo empleaban más fácilmente para sintetizar aminoácidos y a su vez para la producción de proteína microbiana, que una mezcla de aminoácidos o ácido glutámico. De esto podemos decir que en el presente trabajo, la urea suministrada al nopal en su FES, al estar en un medio acuoso se pudo hidrolizar en 2 moléculas de amonio empleadas para sintetizar aminoácidos y proteína microbiana proveniente de levadura, con concentraciones de amoniaco en el medio de 0.2 hasta 1.61% de las 0 a las 3 horas. Díaz *et al.* (2011) reportaron incrementos de amoniaco en FES de diferentes sustratos (malta, manzana, melaza y suero de leche) a las 128 horas. La urea adicionada a los sustratos en procesos de FES es transformada a NH_3 por efecto de especies microbianas ureolíticas, si el sustrato tiene un aporte energético bajo, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para su crecimiento o lo hacen en una proporción baja. Cuando se tiene un pH bajo, el NH_3 producido es retenido en el sustrato (Díaz *et al.*, 2010). El NH_3 como compuesto puede ser utilizado por ciertos microorganismos que no hidrolizan la urea agregada, como resultado de esto, la cantidad de algunos microorganismos presentes en los sustratos fermentados se puede incrementar (Díaz *et al.*, 2011).

El crecimiento microbiano en el nopal fermentado está directamente relacionado con el tiempo de fermentación aeróbica en estado sólido y de la adición de levadura y/o urea. El nopal lleva consigo una diversidad de microorganismos como en el tratamiento 3 donde no se adicionó ningún inóculo pero sí una fuente nitrogenada, produciéndose una duplicación celular durante la FES; no siendo en la misma magnitud cuando se adicionó además inóculo de levadura (tratamiento 4) donde el crecimiento se aceleró de manera exponencial. La urea favoreció la diversificación

de bacilos, cocos y predominantemente de levaduras. La adición de inóculo de *S. cerevisiae* al nopal para su fermentación en estado sólido con o sin urea propicia un ambiente óptimo para su crecimiento. Becerra (2006) y Díaz *et al.* (2011) mencionan que el crecimiento de las levaduras se ve favorecido por la presencia de nitrógeno no proteico como la urea.

7. CONCLUSION

La fermentación en estado sólido aeróbica empleando como inóculo *Saccharomyces cerevisiae* al 0.75% y urea al 1% de 3 a 24 horas es un proceso efectivo para la producción de microorganismos (biomasa), dando como producto un alimento enriquecido con proteína microbiana derivado de las levaduras apto e inocuo para la alimentación de rumiantes, sobre todo en zonas áridas o semiáridas de México.

8. IMPLICACIÓN

La búsqueda y evaluación de nuevas fuentes proteicas de uso no convencional es fundamental para la apertura de nuevos horizontes en la lucha contra la deficiencia proteica en la alimentación animal, sobre todo para pequeños productores de rumiantes ubicados en zonas áridas y semiáridas del país, como lo es el estado de Querétaro, donde escasean los forrajes, principalmente en la época de sequía.

Mediante la fermentación en estado sólido del nopal forrajero se obtiene un producto con una mayor cantidad de proteína proveniente de microorganismos, que podrá emplearse en la alimentación de rumiantes. Como se trata de un procedimiento aerobio bajo condiciones ambientales y que no necesita de agua adicional, se requiere de una menor inversión y de un fácil manejo. Será un proceso tan sencillo que el mismo productor, tanto de nopal como de ganado rumiante, podrá llevar a cabo él mismo en poco tiempo. La elaboración y empleo del producto fermentado en estado sólido del nopal por parte de los pequeños productores impactará en la reducción de sus gastos de alimentación por compra de alimentos proteicos y en el

gasto de consumo de agua, y mejorará la productividad de sus animales, impactando en su poder adquisitivo y mejora en su calidad de vida.

9. REFERENCIAS

- Aguilera S.J.I., Ramírez L.R.G., Méndez L.F. 2001. Utilización de nopal como alimento animal. In FAO (ed.). *Opuntia* as Forage. p. 45-52.
- Albers E., Larsson C., Liden G., Niklasson C., Gustafsson L. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microb.* 62:3187–3195.
- Álvarez LMT. 1990. Estudio de la fermentación sólida de sorgo y soya descascarados utilizando *Rhizopus oligosporus*. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México.
- Anaya P.M.A., Bautista Z.R., 2008, El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX, *Agricultura Sociedad y Desarrollo.* 5:167-183.
- AOAC. 2002. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Aquiahuatl R.M.A., Pérez C.M.L. 2004. *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General.* Universidad Autónoma Metropolitana, 1a ed., México.
- Araujo L.F., Silva F.L.H., Oliveira J.S., Santos E.S. 2008. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60:401-407.
- Bashir S.M., Idi A., Umar A. 2011. Microbiological features of solid state fermentation and its applications - An overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2:21-26.
- Becerra B.A. 2006. Aprovechamiento de subproductos de manzana mediante la producción de proteína microbiana con fermentación en estado sólido para la alimentación animal. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Bhargav S., Panda B.P., Ali M., Javed S. 2008. Solid state fermentation: an overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22:49-70.

- Breul S. 1998. Les probiotiques en alimentation animale. Med. Chir. Dig. 27: 89-91
- Cabrero M.M.A. 1987. Obtención de biomasa fungal en estado sólido utilizando como sustratos desechos de tuna Cardona. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México.
- Camacho A., Giles M., Ortega A., Palao M., Serrano B., Velázquez O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2da ed. Facultad de Química. UNAM, México.
- Champe P.C., Harvey R.A., Ferrier D.R. 2008. Bioquímica. 4ta edición, ed. Wolters Kluwer Health España, S.A. Pág. 645.
- CONAZA. 1994. Nopal verdura, *opuntia* spp., cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México. Comisión Nacional de Zonas Áridas, Instituto Nacional de Ecología, México.
- Contreras P.M., Gutiérrez C.E., Valderrama B.M.C., Rojas M.I., Espinosa A.D.G., Suárez V.R., Rodríguez G.M.E. 2012. Effects of drying process on the physicochemical properties of nopal cladodes at different maturity stages. Plant Food Hum. Nutr. 67:44-49.
- Diario Oficial de la Federación. 2005. NORMA Oficial Mexicana NOM—052-SEMARNAT-2005- Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Obtenido de:
<http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/PPD02/DO2282.pdf>. Consultado [01/12/14].
- Díaz P.D., Rodríguez M.C., Salvador F., Jiménez J. Rubio H.O, Mena S., Elías A. 2010. Development of a diet inoculate whit two substrates by submerged solid fermentation. J Anim. Sci. 93:438.
- Díaz P.D., Rodríguez M.C., Mancillas F.P., Ruíz H.N., Mena M.S., Salvador T.F., Duran M.L. 2012. Fermentación *in vitro* de nopal forrajero con un inóculo de levadura *Kluyveromyces lactis* obtenida a partir de manzana de desecho. REDVET. 13:1-11.

- Díaz P.D. 2011. Fermentación *in vitro* de nopal forrajero (*Opuntia* spp) genotipo an-tv6 con un inóculo de levadura *Kluyveromyces Lactis*. Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua., México 1:1-58.
- Espinosa H.Y. 2005. El nopal: recurso natural cien por ciento aprovechable. inFÁRMate, 3:1-17. . Obtenido de: <http://infarmate.blogspot.mx/2014/09/el-nopal-recurso-natural-cien-por.html>. Consultado [01/12/14].
- Fairbairn N.J. 1953. A modified anthrone reagent. Chem. Ind. 4:86.
- Flores V.C.A., de Luna E.J.M., Ramírez M.P.P. 1995. Mercado mundial del nopalito. ASERCA, UACH y CIESTAAM. 1-176.
- Flores V.C., Suassuna A. 2006. Experiencias en el enriquecimiento proteico del nopal en Brasil y México. experiencias en el enriquecimiento proteico del nopal en Brasil y México. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Chapingo, México.
- Fortiz H.J., Rodríguez F.A. 2012. Efecto del envasado en películas plásticas en la calidad de nopal verdura mínimamente procesado. Rev. Iberoam. Technol. Postcosecha 11:180-190.
- Gamez A.M.M., Flores H.A., Mata E.M.Á., Hernández I.G., Rodríguez S.G. 2012. Fermentación semisólida de nopal forrajero (*Opuntia* spp.). RESPYN 04:145 - 152.
- González H.E., Revah S., Alvarez N. 1984. Mejoramiento de la calidad de la proteína del sorgo (*sorghum bicolor* L. Moenh) mediante un proceso de fermentación sólida. Ciencia e Tecnología de Alimentos 19:22:28.
- González H.E. 1987. Utilización de desechos agroindustriales para la producción de alimentos mediante procesos de fermentación en estado sólido. Avances en Ingeniera Química 1: 344-353.
- González H.E., Revah S., Alvarez N. 1989. Mejoramiento de la calidad de la proteína del sorgo mediante un proceso de fermentación sólida. Ciencia e Tecnología de Alimentos 19:22-28.

- Gualtieri M., Sánchez C.J.A. 2003. Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz precocida (*Zea mays*). Revista de la Facultad de Farmacia 45:17-22.
- Gullías H.A., Galván G.E., Robles D.G., Ramírez M.M. 1989. El nopal como amortiguador de la acidez. Rev. Inv. Clin. 41:387-388.
- Gutiérrez O.E., Elías A., Santos HA., Facundo A., Morales T.H., Bernal B.H., 2008. Uso del nopal nativo y cultivado en la alimentación de rumiantes. Universidad Autónoma de Nuevo León, México 2:66-74.
- Gutiérrez O.E. 2010. Uso integral de nopal y maguey en ranchos ganaderos, Universidad Autónoma de Nuevo León, México 2:191-197.
- Herrera T.E., Murillo M., Berumen L., Páez J., Villarreal G. 2014. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero. Ecosistemas Rec. Agrop. 1:33-40.
- Kiek P.L. 1950. Kjeldahl method for total nitrogen. Anal. Chem. 22: 354-358.
- Losane B.K., Saucedo C.G., Raimbault M., Roussos S., Viniegra G.G., Ghildyal N.P., Ramakrishna M., Krishnaiah M.M. 1992. Scale up strategies for solid state fermentation systems. Process Biochem. 27:259-273.
- Martínez L.J.R. 2009. Estimación de las características biológicas y químicas en el volumen radical de nopal (*Opuntia* spp.) y maguey (*Agave* spp.), y evaluaciones forrajeras. Tesis de Doctorado, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Mejía H.J., Delgado H.J.L., Mejía H.I., Guajardo H.I., Valencia P.M. 2010. Efectos de la suplementación con bloques multinutricionales a base de nopal fermentado sobre la ganancia de peso de ovinos en crecimiento. Acta Universitaria. 2:11-16.
- Nandakumar M.P., Thakur M.S., Raghavarao K.S.M.S., Ghildyal N.P. 1994. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochem. 29:545-551.

- Norma Oficial Mexicana 092, Bienes y Servicios. 1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>. Consultado [12/04/2015].
- Norma Oficial Mexicana 110. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. 1994. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>. Consultado [12/04/2015].
- Pandey A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 27:109-117.
- Pastrana L. 1996. Fundamento de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Soc. Mex. Nutr. Technol. Alimentos* 1:4-12
- Peñaloza W. 1981. Fermentación sólida de la pulpa de café. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Instituto de Nutrición Centroamericana y Panamá. Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Pinos R.J.M., Velázquez J.C., González S.S., Aguirre J.R., García J.C., Álvarez G., Jasso Y. 2010. Effects of cladode age on biomass yield and nutritional value of intensively produced spineless cactus for ruminants. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40: 245-250.
- Postmus J., Tuzun I., Bekker M., Muller E., Teixeira de Mattos M.J., Brul S., Smits G.J. 2011. Dynamic regulation of mitochondrial respiratory chain efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 157:3500–3511.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechn.* 1:1-15
- Reyes-Agüero J., Aguirre A.J. Flores J. 2005. Morphological variation of *Opuntia* (Cactaceae) related to domestication in the Mexican Southern Uplands. *Interciencia* 30:476-484.

- Ríos R.J., Quintana M.V. 2004. Manejo general del cultivo del nopal. Colegio de Posgraduados, México, 1:1-81. Ubicado en: http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAAahUKEwixxYPH18nHAhUGEpIKHUzwBUM&url=http%3A%2F%2Fwww.elquiglobalenergy.com%2Fenglish%2Fdatas%2FManejo_general_cultivo_Nopal.pdf&ei=7DrfVbGfNYakyATM4JeYBA&usg=AFQjCNFxyeJiyPDVnKVkxXsLt7bAodcdfg. Consultado [12/04/2015].
- Rodríguez C.E. 2010. Establecimiento de una plantación de nopal verdura y algunas pruebas de deshidratación de nopalito. RESPYN 5:230-242.
- Rodríguez M.C. 2012. Tecnologías para la suplementación del ganado en épocas críticas. UACH, Expogan 2012, UGRCH.
- Ruíz H., Rodríguez R., Rodríguez R., Contreras J., Aguilar C. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. Rev. Méx. Ing. Quím. 6:33-40.
- Samaniego F.L.M., Sosa C.M. 2000. *Lactobacillus* spp. importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria, La Habana, Cuba. 1:1-21. Ubicado en <http://biblioteca.unicafam.edu.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=47499>. Consultado [20 /07/2015].
- Santos H.A., Ortiz L.R., Vázquez A. R.E., Martínez L.J.R., Fimbres D.H., Moreno D.G., Escotto I.S., Cortés H.D.E., Ojeda Z.M.C., Picon R.F.J., Gutiérrez O.E., Estrada M.S., Rojas M.A., Luna A.C.M., Salinas S.M.A., Ancer R.J., de la Mora M.L.C., Gosalvez T.G., Pérez M.J.R. 2010. Propuesta de caracterización genómica y morfoanatómica de diferentes cultivares de nopal forrajero y su aportación nutricional en caprinos y ovinos. Memorias del VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional de Producción y Aprovechamiento del Nopal. Campus de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, N.L., México. 211-229.
- SAS Institute. 2008. *SAS/ETS® 9.2 user's guide*. Cary, NC: SAS Institute, Inc.

- Scheinvar L., Gallegos V.C., Olalde P.G., Sánchez C.V., Linaje M. 2005. Estado del conocimiento de las especies del nopal (*Opuntia* spp.) productoras de xoconostles silvestres y cultivadas. UNAM-CONABIO, México, p.1-60.
- Silva H., Acevedo E. 1985. Introducción y adaptación de *Opuntia* spp. en el secano mediterráneo árido de la IV región. Informe Final. Proyecto 0065. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 136 pp.
- Sosa D., Boucourt R., Dustet J.C. 2012. Uso de la modelación matemática en los procesos de fermentación en estado sólido de sustratos fibrosos destinados a la alimentación animal. Rev. Cuba. Cienc. Agric. 46:119-126.
- Subramaniyam R., Vimala R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study, international J. Oral Sci. 3:480-486.
- Uribe G.L.A. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Tesis individual, Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.
- Valinote A.C, 2011, uso de cultivos de levadura en la nutrición de rumiantes, sitio argentino de producción animal, 1:2, ubicado en: www.produccion-animal.com.ar/informacion.../43-levadura.pdf
- Valdez C.R.D., Blanco M.F., Magallanes Q.R., Vázquez A.R.E., Reveles H.M. 2010. Avances en la Nutrición del Nopal en México. RESPYN 5:1-14.
- Van der Aa Kühle A, Skovgaard K, Jespersen L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains, Int. J. Food Microbiol. 101:29–39.
- Van Dijken J.P., Bauer J., Brambilla L., Duboc P., Francois J.M., Gancedo G., Giuseppin M.L.F., Heijnen J.J., Hoare M., Lange H.C., Madden E.A., Niederberger P., Nielsen J., Parrou J.L., Petit T., Porro D., Reuss M., van Riel N., Rizzi M., Steensmaa Y., Verrips C.T., Vindeløv J., Pronk J.T. 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four

Saccharomyces cerevisiae strains. Enzyme and Microbial Technology. 26:706–714.

- Van Hoek P., van Dijken J.P., Pronk J.T. 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb.Tech. 26:724–736.
- Van Soest P.J., Robertson J., Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583-3597.