



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas

**ANÁLISIS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA PARA
INCREMENTAR EL CONTENIDO DE PROTEÍNA DEL NOPAL
(*Opuntia spp.*) COMO FORRAJE**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES
Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
SECRETARÍA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

KARLA YESSICA ORTEGA REYES

Abril, 2014

Bermejillo, Durango, México

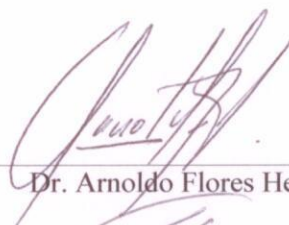


**ANÁLISIS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA PARA
INCREMENTAR EL CONTENIDO DE PROTEÍNA DEL NOPAL
(*Opuntia spp*) COMO FORRAJE**

Tesis realizada por **Karla Yéssica Ortega Reyes** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES
Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS**

DIRECTOR:



Dr. Arnoldo Flores Hernández

CO-DIRECTORA:



Dra. Cecilia B. Peña Valdivia

ASESOR:



Dr. Gabriel García Herrera

ASESOR:



Dr. Sigifredo Armendáriz Erives

ASESOR:



MSP. José Luis Ortega Sánchez

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por la oportunidad de vivir esta experiencia. A mi esposo José Manuel y compañero de vida por su apoyo incondicional; a mis padres, a mis hermanos, mi tía Irma y amigos, gracias.

A la Universidad Autónoma Chapingo-Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas,

Al Dr. Arnoldo Flores Hernández, por haberme dado la oportunidad de colaborar y participar en su proyecto, por su apoyo para concluir esta etapa tan importante en mi formación profesional y por compartir conmigo su experiencia y sus conocimientos, gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para la realización de mis estudios, gracias.

Al Dr. Gabriel García Herrera, por el apoyo brindado y por la motivación en mi formación profesional, gracias.

Gracias, Dr. Ricardo Trejo Calzada, Dr. Aurelio Pedroza Sandoval, M.C. Ramón Hernández Salgado, Dr. Sigifredo Armendáriz Erives, MSP. José Luis Ortega Sánchez por compartir conmigo sus conocimientos.

A Nidia y Bety personal del laboratorio por su valiosa participación en la realización del presente trabajo, gracias.

A mis compañeros y amigos de generación por su apoyo y paciencia, Gracias.

Al Sr. Borjas por su ayuda en el trabajo de campo, gracias.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi corazón, amor y mi gratitud a Dios por ponerme en el camino la oportunidad de ingresar al Posgrado y nunca dejarme de la mano y cuidar de mí en todo momento.

A mi esposo y amigo José Manuel, por todo su amor, paciencia, comprensión y apoyo incondicional, siempre a mi lado ayudándome en todo lo que necesito, gracias mi vida sin ti esto hubiera sido muy difícil.

A mis princesas Natalia y Azul, quienes son lo más importante en mi vida y el motivo de mi superación constante, por siempre recibirme con la mejor sonrisa y abrazo.

A mis padres: Rubén y Martha, quienes son y han sido mis mejores maestros en la vida y mis consejeros en momentos difíciles, ha ellos que me han dado la vida, su ejemplo y su amor, gracias.

A mis hermanos: Mayela, Rubén y Hortencia por todo su cariño y apoyo, gracias.

A mis tíos Irma y Luis: por cuidar de mis pequeñas en mi ausencia y darles el mejor de los cuidados y amor, mil gracias.

A mis primos: Alejandro, Jonathan y Alehidi, que siempre están ahí para mí y mis princesas, por su ayuda, gracias.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA	iv
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
I. CAPITULO I.....	1
1.1 INTRODUCCION GENERAL.....	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.3 HIPÓTESIS.....	3
1.4 REVISION DE LITERATURA.....	4
1.4.1 Importancia del nopal en México.....	4
1.4.2 El nopal como forraje en México y otros países.	4
1.4.3 Análisis químico del nopal como forraje	6
1.4.4 Fermentación semisólida como medio para incrementar el contenido de proteína en el nopal.....	9
1.4.5 Proceso de fermentación	10
1.4.6 Características del equipo NOPAFER	12
1.4.7 Características del crecimiento de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.5 LITERATURA CITADA.....	15
II. CAPITULO II	20
2.1 INTRODUCCION	22
2.2 MATERIALES Y METODOS	23

2.2.0	Ubicación del experimento.....	23
2.2.1	Conducción del experimento.....	23
2.2.2	Inoculación y recuento de levaduras	24
2.2.3	Variables de estudio	25
2.2.4	Análisis Estadístico	25
2.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
2.3.1	Variables químicas	26
2.3.2	Variables físicas	34
2.3.3	Conteo de levaduras en el medio de cultivo.....	35
2.3.4	Análisis de la interacción población de levaduras vs porcentaje de proteínas en la fermentación semisólida de nopal.....	36
2.4	CONCLUSIONES	39
2.5	LITERATURA CITADA.....	40
III.	CAPITULO III	43
3.1	INTRODUCCION	45
3.2	MATERIALES Y METODOS	46
3.2.1	Ubicación del experimento.....	46
3.2.2	Conducción del experimento.....	46
3.2.3	Inoculación y recuento de levaduras	47
3.2.4	Variables de estudio	48
3.2.5	Análisis Estadístico	48
3.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	49
3.3.1	Variables químicas	49
3.3.2	Variables físicas	56
3.3.3	Conteo de levaduras en el medio de cultivo.....	58

3.3.4	Análisis de la interacción población de levaduras vs porcentaje de proteínas en la fermentación semisólida de nopal.....	59
3.4	CONCLUSIONES	62
3.5	LITERATURA CITADA.....	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 . Porcentaje de digestibilidad de nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) por diferentes especies de animales.....	7
Cuadro 2. Digestibilidad de cinco raciones alimenticias*.	7
Cuadro 3. Clasificación de la calidad de los forrajes según el porcentaje de proteína cruda, fibra detergente ácido y fibra detergente neutro*.	8
Cuadro 4. Ingredientes nutrimentales utilizados en la fermentación semisólida de nopal, Alagoas, Brasil*.	11
Cuadro 5. Tratamientos utilizados en fermentación en estado sólido de nopal forrajero*.	12
Cuadro 6. Tratamientos utilizados en el proceso de fermentación semisólida para incremento del contenido proteico del nopal.	23
Cuadro 7. Tratamientos utilizados en el proceso de fermentación semisólida para incremento del contenido proteico del nopal.	46

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Contenido	Pág.
1	Porcentaje de proteína cruda, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	26
2	Porcentaje de fibra detergente ácido, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	27
3	Porcentaje de fibra detergente neutro, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).	28
4	Porcentaje de carbohidratos, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	29
5	Porcentaje de nutrientes digeribles totales, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	30
6	Porcentaje de energía metabolizable, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio.....	31
7	Porcentaje de nitrógeno amoniacal, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	32
8	Porcentaje de azufre, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	33
9	Porcentaje de materia seca, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA)	33

10	Porcentaje de humedad, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).	34
11	Valores de pH, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	35
12	Valores de temperatura, con base en peso seco, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	36
13	Crecimiento de numero de colonias de levadura, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA).....	36
14	Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero, fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i>	37
15	Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero, fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> complementado con sulfato de amonio (SA).	37
16	Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero, fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> complementado con sulfato de amonio (SA)	38
17	Porcentaje de proteína cruda, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	50
18	Porcentaje de fibra detergente acido, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	51

19	Porcentaje de fibra detergente neutro, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	52
20	Porcentaje de carbohidratos, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	52
21	Porcentaje de nutrientes digeribles totales, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	53
22	Porcentaje de energía metabolizable, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	54
23	Porcentaje de nitrógeno amoniacal, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	55
24	Porcentaje de materia seca, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	56
25	Porcentaje de humedad, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	57

26	Valor de pH, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	57
27	Valor de temperatura, con base en peso seco en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	58
28	Crecimiento de numero de colonias de levadura, en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)	58
29	Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero, fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	59
30	Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero, fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	60
31	Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (<i>Opuntia</i> spp.) forrajero, fermentado con <i>Sacharomyces cereviceae</i> y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).....	61

I. CAPITULO I

1.1 INTRODUCCION GENERAL

En la actualidad hay evidencias científicas de que el cambio climático, tiene un gran impacto en la agricultura ya que es especialmente vulnerable a este por el efecto sobre las variables de: temperatura, la precipitación, la concentración de dióxido de carbono y la humedad del suelo (Ocampo, 2011).

El estado de Durango es altamente vulnerable a cambios climáticos debido a su localización geográfica en una zona semidesértica, su ambiente natural y a diferentes variables socioeconómicas. La implementación de estrategias de adaptación y mitigación adecuadas ayudará considerablemente a minimizar el impacto debido al cambio climático y por lo tanto a reducir la vulnerabilidad (Anaya Nevarez *et al.*, 2010). El nopal como forraje es una alternativa por su resistencia a temperaturas altas, y amplia distribución en zonas áridas.

El nopal (*Opuntia* spp.) es un recurso vegetal utilizado ampliamente para la alimentación de rumiantes, no obstante su contenido proteico bajo, ya que se adapta excelentemente al clima semiárido, en el que su productividad es elevada, requiere poco manejo cultural, acumula reserva de agua (70 a 90 %) y su contenido de carbohidratos y fibra es alto (Bravo, 1981; CODAGEM, 1979; Gentry, 1972; Granados, 1993). El nopal en las regiones semiáridas se utiliza frecuentemente para salvar ciertas situaciones de emergencia, cuando otros forrajes no están presentes (Flores, 1989; Fuentes, 2002; Macedo, 1950).

Lo anterior justifica enriquecer este tipo de forrajes con proteína de origen microbial, formada sobre sustrato vegetal rico en carbohidratos y fibra (Ariosvaldo *et al.*, 2004). La elaboración de alimentos forrajeros enriquecidos, tipo suplemento, se da por el proceso de fermentación sólida sobre pencas de nopal con la adición de una mezcla de minerales para el proceso (Tabosa *et al.*, 2003)

En un proyecto que antecedió al presente (Gómez A., 2011) se comprobó que el proceso de fermentación semisólida de nopal mediante el equipo (Nopafer) permite el incremento de proteína cruda del 4 al 30 %. Sin embargo se obtuvo una cantidad muy alta de nitrógeno amoniacal (30 %) del total de proteína cruda. Como lo indica Hiriart (1998) el nitrógeno amoniacal igual que el pH, pueden ser utilizados como indicadores de calidad de la fermentación. Un ensilaje de buena calidad puede tener 10 % de nitrógeno amoniacal con relación al nitrógeno total. Si la cantidad del nitrógeno amoniacal es mayor al 20 %, el ensilaje será de mala calidad. Así se planteó el desarrollo de la presente investigación en dos etapas, con la finalidad de disminuir el contenido de nitrógeno amoniacal y obtener un alimento de buena calidad para ganado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el proceso físico-químico de fermentación semisólida del nopal para incrementar la proteína cruda.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Registrar el crecimiento de la población de levadura (*Sacharomyces cereviceae*) en intervalos periódicos de tiempo durante el proceso de fermentación de nopal.
- Establecer la relación entre el incremento de proteína y crecimiento de la población de levadura durante la fermentación de nopal.

1.3 HIPÓTESIS

En la fermentación semisólida del nopal existe una relación entre el crecimiento de la población de levadura y el porcentaje de proteína cruda, o se presenta algún compuesto químico que impide la recomendación de este producto como forraje.

En la fermentación semisólida del nopal el nitrógeno de tipo amoniacal generado en el proceso puede ser reducido a niveles que permitan la recomendación de este producto como forraje.

1.4 REVISION DE LITERATURA

1.4.1 Importancia del nopal en México

El nopal es una planta propia del paisaje mexicano y uno de los símbolos más importantes de la nacionalidad. Se produce en 27 entidades federativas del país, de las que destaca el Distrito Federal, Estado de México, Morelos, San Luis Potosí, Jalisco, Aguascalientes, Hidalgo y Puebla, que aportan casi el 95 % de la producción nacional (Gaceta parlamentaria, 2007).

Los registros sobre la utilización del nopal como forraje durante la Colonia y el México independiente, son escasos pero permiten afirmar que el nopal se utilizó para la alimentación del ganado, sobre todo en las zonas áridas y semiáridas del norte del país. Seguramente su explotación se inició a finales del siglo XVI, cuando por la abundancia del ganado los pastos empezaron a escasear en el territorio de la Nueva España, situación que obligó a los ganaderos a cortar y chamuscar nopal para alimentar al ganado suelto en los potreros, sobre todo en épocas de sequía.

En la segunda mitad del siglo XX el gobierno mexicano e instituciones educativas empezaron a dar importancia al cultivo del nopal y en particular al forrajero, coincidió con el momento en que el Colegio de Postgraduados (CP) empezó a liberar variedades. La información obtenida señala que esta política se llevó a cabo para contrarrestar la tala irracional de que eran objeto las nopaleras para usarse como alimento del ganado o como complemento en dietas alimenticias. Además de esto, también se promovió su plantación para industrializar el nopal y para reforestar amplias áreas sin vegetación, buscando con ello controlar la erosión de los suelos (Anaya-Pérez *et al.*, 2008).

1.4.2 El nopal como forraje en México y otros países.

En el norte de México se localizan dos regiones extensas consideradas como las más áridas, conocidas como Desierto Chihuahuense y Desierto Sonorense, que ocupan aproximadamente 50 % del territorio nacional (Andrade, 1974).

Las actividades principales de estas regiones son la cría de ganado bovino, caprino, ovino, equino y de fauna silvestre en forma incipiente, además la cosecha de algunas plantas y

algunos productos que se extraen de ellas. Estas zonas se caracterizan por tener condiciones climáticas extremas: temperaturas altas en primavera y verano, y bajas en invierno (Bravo, 1978). Las precipitaciones son pocas, erráticas y generalmente ocurren en forma torrencial, lo que hace casi imposible los cultivos de temporal. Las áreas agrícolas son escasas y muy localizadas, las cuales se dedican a la producción de granos, hortalizas y forrajes, y ocupan menos del 10 % del total de la superficie del norte de México (Marroquín *et al.*, 1964).

Las condiciones ambientales que caracterizan estas regiones, generalmente son extremosas, y junto con sus características fisiográficas variables han propiciado la formación de hábitats diversos, ocupados por especies adaptadas a estos ecosistemas. Con estas características destacan las del género *Opuntia*, que tienen amplia distribución y abundancia asociadas a los diferentes tipos de vegetación (Bravo, 1978).

De las 258 especies reconocidas del género *Opuntia*, en México existen aproximadamente 104 de las cuales se han reportado más de 45 taxonomías en el noroeste de México, comprendidas por 31 especies y 14 variedades. Las especies más comunes en la mayor parte de esta región son: *O. lindheimeri* y sus variedades son las dominantes en la gran planicie costera del Golfo con precipitaciones mayores a los 600 mm por año (Elizondo *et al.*, 1987). En la región árida que comprende gran parte del desierto Chihuahuense dominan las variedades de *O. phaeacantha*, *O. rastrera*, *O. microdasys*, *O. rufida*, *O. imbricata*, y otras. En la altiplanicie (arriba de los 1500 msnm) se localizan especies como *O. rastrera*, *O. robusta*, *O. lindheimeri*, *O. cantabrigiensis*, *O. streptacantha*, *O. leucotricha*, *O. stenopetala* entre otras. (López., 1977)

En Brasil, hay predominancia de tres variedades, dos son *O. ficus-indica* Gigante y Redonda y una de *N. -cochenillifera*, Miúda. Estas dos especies son inermes (sin espinas). Las variedades de *O. ficus indica* son cultivadas en regiones que presentan índices menores de precipitación (abajo de 700 mm) y toleran periodos más largos de estiaje. Miúda es ampliamente cultivada en regiones con precipitación de 700 mm (Torres, 2010).

En la actualidad el nopal es la base de los sistemas de producción de leche en bovinos y caprinos de la región semiárida brasileña. Además es una fuente importante de alimento

para los animales destinados a la producción de carne, manejados en sistema de pastoreo en la *Caatinga* (Torres. 2010).

Debe señalarse que para obtener los consumos máximos de forrajes deficientes en proteína cruda (como es el nopal) es indispensable suplementarlos para evitar así deficiencias de nitrógeno en los microorganismos del rumen. Una deficiencia de proteína en el rumen imposibilitaría a los microorganismos su función en la digestión normal de la fibra (Hernández, 1995) y puede resultar costosa para los ganaderos.

Por lo anterior, este estudio se plantea con la finalidad de dar una opción para obtener nopal con contenido alto de proteína, además de los nutrientes propios del nopal.

1.4.3 Análisis químico del nopal como forraje

El análisis químico se ha utilizado desde hace tiempo como un método para conocer o predecir el valor nutritivo de los forrajes (Reid, 1964). La composición química del nopal es muy variada entre las especies y las condiciones en que se desarrolla. Uno de los componentes que cambia ampliamente es el contenido de humedad, que está fuertemente ligado a la humedad que la planta tenía disponible antes de cortarse. Cottier (1934) menciona que el nopal se usa cuando hay sequia y no existe otro forraje verde para proporcionarse al ganado, por lo que se aprovecha, cuando tiene menor porcentaje de agua.

1.4.3.1 Digestibilidad del nopal

La digestibilidad es un concepto que indica la cantidad o porcentaje de un alimento que un animal aprovecha, mientras que la digestibilidad aparente es la forma de medirle la cantidad de nutrientes que aparece en las heces respecto a la cantidad de nutrientes (Aranda *et al.*, 2009; Flores y Aguirre, 1979; Urista y Aréchiga, 2006). Conocer la digestibilidad de un forraje es importante porque no es proporcional al contenido de nutrientes y en consecuencia, no se puede predecir con análisis químico. Maymone y Malossini (1960) presentan porcentajes de digestibilidad para nopal (*O. ficus-indica*) obtenidos por diversos autores y con diferentes especies animales (Cuadro 1). De igual forma se comparan con otros alimentos (Urista y Aréchiga, 2006) como se indica en el cuadro 2.

Cuadro 1 . Porcentaje de digestibilidad de nopal (*Opuntia ficus-indica*) por diferentes especies de animales.

Especie	Materia orgánica	Proteína cruda	Grasa cruda	Fibra	E.L.N.
Bovinos*	69.00	12.00	71.00	37.00	80.00
Bovinos**	71.00	55.00	70.00	46.00	78.00
Ovinos*	64.00	56.00	74.00	13.00	76.00
Ovinos**	68.60	68.00	31.00	53.20	73.80

* Maymone y Malossini (1960) y **Urista y Aréchiga (2006).

Cuadro 2. Digestibilidad de cinco raciones alimenticias*.

Alimento	Materia seca	Ceniza	Proteína cruda	Grasa cruda	Fibra	E.L.N.	Materia orgánica
Nopal solo	64.91	35.69	45.56	68.46	47.66	80.77	72.76
Alfalfa sola	55.88	39.29	65.56	37.96	40.35	69.84	57.75
Harinolina sola	73.70	23.70	88.40	93.30	55.50	60.60	76.10
Nopal y alfalfa	68.41	80.59	60.65	52.28	37.37	78.65	64.38
Nopal y harinolina	74.86	57.32	73.70	103.70	35.55	68.77	76.19

* Urista y Aréchiga (2006). (E.N.L. Energía libre de nitrógeno.)

Los factores ambientales (precipitación, temperatura, duración del día, etc.) determinan el crecimiento y desarrollo de las plantas a través del año; Esto es lo que realmente afecta el valor nutritivo y origina la variación de la calidad del forraje Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación de la calidad de los forrajes según el porcentaje de proteína cruda, fibra detergente ácido y fibra detergente neutro*.

Clasificación	Proteína cruda (%MS)	Fibra detergente ácido (%MS)	Fibra detergente neutro (%MS)
Excelente	>19	<31	<40
Bueno	17-19	31-35	40-46
Regular	14-16	36-40	47-53
Malo	11-13	41-42	54-60
Pésimo	8-10	43-45	61-65

*González, 1995.

1.4.3.2 Energía

El nopal no es un alimento balanceado y debería ser considerado como una fuente barata de energía. Los cladodios tienen contenido bajo de proteína cruda y deben ser suplementados con otras fuentes de proteínas. También son bajos en fósforo y sodio (FAO, 2003).

El contenido bruto de energía de la mayoría de los nopales varía de 3500 a 4000 kcal/kg de MS. La energía digestible es aproximadamente 2000 kcal, la cual es comparable a los pastos de mediana calidad (Ben, 1987). Por lo que el nivel de energía hace al nopal un componente valioso para incluirse en las dietas para el ganado. Esta energía proviene principalmente de las concentraciones altas de carbohidratos de los cladodios.

1.4.3.3 Proteína cruda

La proteína cruda en el nopal es del 4 % en promedio del tejido seco (FAO, 2003). Así, algunos autores consideran al nopal como una fuente con contenido moderado de proteína cruda. Aunque, la diferencia en el contenido de proteína puede deberse a las condiciones del cultivo y a la edad de los cladodios y la planta (De la Roza y Santana, 1998).

1.4.3.4 Fibra

La fibra cruda es usualmente tomada como el índice negativo de la calidad del forraje (Van, 1982). Sin embargo en los cactus de diferentes edades, no se encontraron diferencias significativas (De la Rosa *et al.*, 1998).

1.4.4 Fermentación semisólida como medio para incrementar el contenido de proteína en el nopal.

Hesseltine (1972) empleó el término fermentación en estado sólido para todas las fermentaciones en las que el sustrato no es líquido, luego planteó que el término FES (Fermentación en Estado Sólido) debe usarse para designar el crecimiento de los microorganismos en materiales sólidos no sumergidos en una fase líquida. Destaca que este tipo de fermentación es posiblemente la forma más antigua en la que el hombre ha puesto a funcionar los microorganismos en su beneficio, pues se tienen noticias de su uso desde hace más de 2, 500 años.

Kondo (1976) y Zadrazil *et al.* (1996) definieron la Fermentación en Medios Sólidos (FMS) como un proceso natural, mediante el cual se da continuidad a ciclos vitales, entre los que destacan los de descomposición de la materia orgánica mediante los hongos y levaduras que tienen una gran habilidad para asimilar residuos lignocelulósicos. Gutiérrez *et al.*, (2007) utilizaron este tipo de procesos para producir un fermentado del bagazo de manzana con el objetivo de incrementar su calidad con el del contenido de proteínas.

Lo anterior se logra con las levaduras y los carbohidratos que posee el bagazo, elementos fundamentales para llevar a cabo el proceso de fermentación aerobia. El proceso es sencillo y económico, además del bagazo solo se necesita una superficie plana forrada de concreto, urea (en una proporción del 1.5 %), sulfato de amonio (0.4 %) y sales minerales (0.5 %) (Díaz, 2006).

1.4.5 Proceso de fermentación

Los procesos de fermentación líquida (vino) como en los de fermentación sólida o semisólida, se practican desde hace miles de años. El propósito fundamental de la fermentación sólida ha sido aumentar el contenido proteico de los alimentos, y mejorar las posibilidades de conservación, cambiar las características físicas, como el color, el olor o el sabor. Ejemplos de estos productos lo constituyen el Koji, que se obtiene por el cultivo del hongo de *Aspergillus oryzae* sobre cereales cocidos, el Shoyu, el Miso y el Ontjom (Hesseltine, 1972). En alimentos para consumo animal (forrajes), interesa la producción de proteínas de origen microbial, formadas a partir de la fermentación o crecimiento de microorganismos útiles sobre sustratos ricos en carbohidratos y fibra (Ariosvaldo *et al.*, 2004).

La elaboración de alimentos forrajeros enriquecidos, tipo suplemento, se da por el proceso de fermentación semisólida sobre pencas de nopal con la adición de una mezcla de minerales en el proceso (Tabosa *et al.*, 2003). Este proceso fue adoptado de la tecnología “sacarina” de la caña de azúcar en Cuba (Elías y Lescano, 1993) y ha sido recomendada para el aumento del contenido proteico del forraje (IPA, 1992; Elías *et al.*, 1990; Lira *et al.*, 1989).

Los forrajes así enriquecidos pueden ser analizados para determinar la cantidad adicional de proteína microbial y ser suministrados a ganado originando aumento en producción de leche y carne (Tabosa, 2003).

Los avances en esta técnica son notables en otros países como Brasil, la técnica consiste en hacer una biofermentación aeróbica con *Saccharomyces cerevisiae*, por un periodo de 12 h. Según Araújo *et al.* (2000) la utilización de 2 % de levadura proporciona 100 % de aumento en los niveles de proteína cruda, con rentabilidad económica de un 30 % en la explotación de borregos. Esta técnica se realiza en la región de Alagoas, de manera semi-mecanizada en el corte y manual en el mezclado y secado al sol (no se separan jugo y bagazo). Tampoco se utiliza un microorganismo específico para inducir la fermentación (se supone que los microorganismos naturales del nopal realizan el proceso) y, finalmente, se

tienen cinco ingredientes nutrimentales que representan mayor costo y en cierta forma complican la medición (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ingredientes nutrimentales utilizados en la fermentación semisólida de nopal, Alagoas, Brasil*.

Componentes de la mezcla	kg de componentes/t de penca verde
Urea	8
Fuente de micronutrientes + fosforo	3
Sulfato de magnesio	1.5
Cloruro de sodio (sal de cocina)	1.5
MAP (fertilizante)	8

*Gomes Da Silva, *et al.* (2007)

En México se cuenta con algunos modelos de biodigestores que realizan el proceso de fermentación semisólida de nopal para la región centro (Miranda *et al.*, 2009) y norte (Aranda, 2006). Los biodigestores que se han visto son verticales, fijos, con una base anclada en el suelo y el corte lo realizan con maquinaria específica independiente, de modo que se tiene que elevar el producto con banda al tanque fermentador, el cual mezcla (homogeniza) a través de gusano sinfín interior, dando como producto una mezcla, llamada sopa de nopal (no hay separación de jugo-bagazo). Según Gutiérrez Ó. *et al.* (2008), se considera una tecnología laboriosa y de alto costo, ya que se requiere deshidratar y triturar el nopal antes de la fermentación, situación que compromete su aplicación para pequeños y medianos productores.

Según Díaz (2011) en la fermentación del nopal, usando los tratamientos mencionados en el Cuadro 5, se obtiene un aumento de proteína cruda con un máximo de 17.33 % en el tratamiento 3.

Cuadro 5. Tratamientos utilizados en fermentación en estado sólido de nopal forrajero*.

Ingredientes	T1	T2	T3	T4
Nopal	10kg	10kg	10kg	10kg
Inoculo de levadura <i>Kluyveromyces Lactis</i>	0	0	100ml	100ml
Urea	20g	20g	20g	20g
Calcio	0g	10g	0g	10g
Minerales	5g	5g	5g	5g
Sulfato de amonio	2g	2g	2g	2g

* Díaz, 2011

1.4.6 Características del equipo NOPAFER

Este estudio contó con el equipo NOPAFER que realiza las funciones de seccionado, mezclado (homogenizado-aireado fermentado) y separado de manera secuenciada y mecanizada. Lo que permite el manejo de mayor volumen en menor tiempo.

Es móvil, ya que se puede transportar a diferentes lugares.

Su diseño es horizontal, lo que permite el flujo por gravedad para la separación, y una posible conexión de motores.

Se obtienen dos productos: jugo y bagazo ricos en proteína (jugo mayor cantidad) que pueden almacenarse de manera temporal.

1.4.7 Características del crecimiento de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Investigaciones realizadas con *S. cerevisiae* en la nutrición de los rumiantes en México durante los últimos años, plantean que no todas las cepas de levadura tienen el mismo modo de acción en los diversos sistemas de producción animal; las diferencias en la respuesta con cepas de *S. cerevisiae* y la interacción que se produce con la dieta que se ofrece a los animales, presentan nuevas oportunidades así como nuevos problemas para definir la modificación que causan al metabolismo ruminal, por efecto de las diferentes cepas de cultivos y la diferente cantidad suministrada (Ángeles *et al.* 1995; Chaucheyras-Durand and Fonty 2001; Dawson 1993; Lee *et al.* 2000; Miller-Webster *et al.* 2002).

Hubert (1987), Jones y Thomas (1987) mencionaron, que los cultivos de levaduras *S. cerevisiae* presentan varias características importantes: 1) No son patógenos, ni tóxicos. 2) No se absorben en el tracto digestivo. 3) No dejan residuos en los tejidos animales. 4) Se utilizan en pequeñas cantidades. 5) Proliferan *in vivo* e *in vitro*. 6) Promueven el crecimiento de bacterias celulolíticas. 7) Son estables a temperaturas elevadas y 8) no causan mutación.

Las levaduras requieren para su óptimo crecimiento un ambiente acuoso, pH con rango de 3.5 a 5.0, posiblemente debido a que la actividad de las proteínas plasmáticas de las levaduras en los límites de su membrana se da en estos valores de pH (Rose, 1987a). En estas condiciones de pH requerido para el crecimiento de la levadura, la actividad bacteriana a nivel ruminal tendría consecuencias detrimentales para los microorganismos y para los rumiantes, aunque las levaduras mantienen su actividad metabólica y resisten el estrés físico asociado con el secado, calentamiento y exposición al pH ácido en condiciones anaeróbicas (Dawson, 1993).

La temperatura óptima para el crecimiento de las levaduras es de 28 a 30 °C, con sobrevivencia a 37 °C por medio de la formación de ascosporas (Dengis *et al.*, 1995), aunque a 39 °C que es la temperatura del ambiente ruminal se ve afectado su crecimiento y disminución de la viabilidad de la levadura a 48 h de incubación.

El crecimiento de poblaciones se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente seco de células (Carpenter, 1969; Hawker, *et al.* 1964; Madigan, 2004). Existen varios métodos para contar el número de células o de determinar la masa celular, adecuados para diferentes organismos o diferentes situaciones.

En el crecimiento macroscópico directo se cuenta tanto células vivas como muertas. En muchos casos interesa contar solo las células vivas, y con este fin se han desarrollado métodos de recuento de células viables. Una célula viable se define como aquella que es capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia. El método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre el medio solido adecuado. Por esta razón, el recuento de células viables también se llama recuento en placa o recuento de colonias.

En este procedimiento se supone que cada célula viable puede formar una colonia (Madigan *et al.*, 2004).

Hay dos maneras de realizar un recuento en placa para unidades viables: el método de extensión en placa y el método de vertido en placa. En el método de extensión en placa un cierto volumen de cultivo diluido, que no suele ser superior a 0.1 ml, se extiende sobre la superficie de una placa con medio solido utilizando un asa estéril de extensión. La placa se incuba después hasta que aparecen las colonias y se contabilizan. Es importante que la superficie del medio este seca de modo que el líquido de la muestra se absorba. No se suelen usar volúmenes mayores de 0.1ml porque el exceso de líquido no se absorbe, y origina problemas en el recuento al favorecer la extensión y mezcla de las colonias.

En el método del vertido en placa se pipetea un volumen (normalmente 0.1 a 1.0 ml) de cultivo en una placa petri estéril sobre la que se añade el medio con agar fundido y se mezcla todo bien con suaves movimientos de la placa sobre la superficie de la mesa antes de dejar que se solidifique. Como la muestra se mezcla con el medio fundido se puede usar volúmenes de inóculo mayores que en el método de recuento por extensión. Sin embargo, con este método el organismo que cuenta debe ser capaz de resistir la temperatura del agar fundido a 45 °C.

1.5 LITERATURA CITADA

- Anaya Nevarez E. 2010.** Programa para Mejorar la Calidad del Aire en la Región de la Comarca Lagunera 2010-2015. 25-31 pp.
- Anaya-Pérez M., Bautista-Zane R. 2008.** El nopal forrajero en México: Del siglo XVI al siglo XX. Programa Universitario de Ciencias Sociales y Humanidades. Universidad Autónoma Chapingo.
- Andrade, A. 1974.** El Desierto Mexicano. Fondo de Cultura Económica. Distrito federal. México. 62 p.
- Ángeles, C.S., Corona, G.L., Castrejón, P.F., Mendoza, M.G.D., Cobos, P.M. 1995.** Cambios en la población de protozoarios y en el metabolismo ruminal utilizando dos cultivos de levaduras. Memorias. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Vol. 26. Supl 2. pp.275.
- Aranda, O. G. 2006.** Enriquecimiento del nopal para el ganado. V Symposium- Taller sobre Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México. Marín Nuevo León, México.
- Araújo F., J.A; Crispin. 2000.** Pastoreio combinado de bovinos, caprinos e ovinos em áreas de caatinga no nordeste do Brasil. In: I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte. 1, .2002, Campo Grande – MS. Anais... Campo Grande – MS: EMBRAPA. Vol. 1 pp.1-7.
- Ariosvaldo, N. M.; A. Goncalves, P. S; Furtado, D. D; Flores, V. C; Alan, P. C; De Melo, O. M. 2004.** Enriquecimiento proteico de palma forrajera (*Opuntia ficus indica* Mill.) Por procesos biotecnológicos probados en Ovinos Santa Inés. 41ª. Reunión anual de la Soc. Brasileira de Zootécnica. C. Grande, Brasil.
- Bravo H., H. 1978.** Las Cactáceas de México. 2a. de. U.N.A.M. Vol. 1. México. 743 p.

- Carpenter P. L. 1969.** Microbiología. Segunda edición. Editorial Interamericana, S. A. México. 421pp.
- Chaucheryras-Dyrand, F; Fonty, G. 2001.** Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Sacharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development*, 41 (1):57-68.
- Dawson, K. A. 1993.** Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last six years. In *Biotechnology in the feed industry*. E. Lyons Ed. Nicholasville, Kentucky. 269-291.
- Dengis, P. D., Nelissen, L. R., Rouxhet P.G. 1995.** Mechanisms of yeast flocculation comparison of top and bottom fermenting strains. *Appl. Env. Microbiol.* 61:718-728.
- Díaz P. D. 2006.** Producción de proteína microbial a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- 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, Chih., México.
- Elias, A.; Orquídea, L.P.; Cordeiro, J. y Quintana, L. 1990.** Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico en la caña de azúcar-fermentación en estado sólido (Saccharina). *Rev. Cubana de Cienc. Agric.*, 24:1-12p.
- Elias, A. y Lezcano, O. 1993.** Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento de población de levaduras que se establece en la Producción de Saccharina. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 27:227.

- Elizondo E., J. L.; J. J. López G.; J. Dueñez A. 1987.** El Género *Opuntia* (Tournefort) Miller y su Distribución en el Estado de Coahuila. 2a. Reunión Nacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Jardín Botánico del Instituto de Biología. U.N.A.M. México. 35 p.
- Gaceta Parlamentaria. 2007.** Cámara de Diputados, número 2215-I.
- Gámez, A. 2011.** Fermentación semisólida de Nopal Forrajero (*Opuntia spp.*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo-Unidad Regional de Zonas Áridas.
- González, A. 1995.** Determinación de la calidad de los forrajes. Ciclo Internacional de Conferencias sobre Nutrición y Manejo .La importancia de los forrajes en la optimización económica. Envases Especializados de La Laguna. S.A. de C.V. Gómez Palacio, Dgo. Pág. 69-73.
- Gutiérrez, F., C. Rodríguez, H. García, A. García, O. Ruiz y J. Jiménez. 2007.** Alimento producto de la FES de subproductos de manzana en dietas para vacas Holstein en producción. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Gutiérrez O. E.; Arabel E.; Bernal, H. y Morales, H. 2008.** Usos alternativos del Nopal Forrajero. VI Simposium Taller Producción y aprovechamiento del Nopal Forrajero en el Noroeste de México. Facultad de Agronomía UANL. Revista Salud Pública y Nutrición Edición Especial No. 14-23p.
- Hawker L.E., Linton A.H., Folkes B.F. y Carlile M.J. 1964.** Elementos de Microbiología general. Ed. Acribia. Zaragoza España. 498pp. Investigaciones sobre pasturas. *En:* Paladines, O. (Ed.) Empleo de animales en la investigación sobre pasturas. IICA. Zona Sur.
- Hesseltine C.W. 1972.** Solid state fermentations. *Biotechnol. And Bioeng.* 14:517-532.
- Hubert, J.T. 1987.** Fungal Additives For Lactating Cows. Department of Animal Sci. University of Arizona, USA.

- IPA 1992.** Empresa pernambucana de pesquisa agropecuaria (Recife P.E. Enriquecimiento proteico do sorgo sacarino x cana-de-acucar atraves de fermentacao na alimentacao animal. Recife. IPA. Comunicado técnico 48: 8-16p.
- Jones, C. y Thomas, C. 1987.** Maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing. Página en. Biotechnology in the Feed Industry. T.P. Lyons eds. Alltech's. Biotechnology Center. Nicholasville, Kentucky. USA.
- Kondo, R. 1976.** Investigation on Mechanism of Biological Delignification by Solid Sate Fermentation. J. of Scientific & Ind. Research, 55. 394-399 p.
- Lee, S.S., Ha, J.K., Cheng, K.J. 2000.** Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. Animal Feed Science and Technology, 88 (3-4):201-212.
- López G. J. J. 1977.** Descripción y transformación del Ecosistema *Opuntia estreptacantha* Lemaire. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.
- Madigan M. T., Martinko J. M. y Parker J. 2004.** Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Pearson educación, s.a., Madrid España. 1011pp.
- Marroquín J., S.; G. Boruja L.; R. Velázquez C.; J. A. de la Cruz C. 1964.** Estudio Dasonómico de las Zonas Áridas del Norte de México. Inst. Nac. Invest. For Publicación Especial. 2. México. 116 p.
- Miller-Webster, T; Hoover, Wh; Holt, M; Nocek, Je. 2002.** Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. Journal Of Dairy Science, 85 (8):2009-2014
- Miranda-Osorio, G; Flores-Valdez C.A; Miranda-Romero L.A; Cruz- Miranda M. 2009.** El Nopal como forraje. Rev. Extensión al Campo. UACH. Vol.2 (10-11): 23-27

- Ocampo O. 2011.** El cambio climático y su impacto en el agro. Universidad Autónoma de Manizales. Manizales, Colombia.
- Rose, A. H. 1987a.** Yeast culture a microorganism for all species a theoretical look at its mode of action. Proceedings. Alltech's third annual symposium. Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, Kentucky. U.S.A.
- Tabosa, J.B.; Sim Tavares F; Dias F. M.; Farias, J.; Dos santos M.S. Araujo; Da silva F.D. y Monteiro M.C.D. 2003.** Enriched Forage Cactus Meal To Feed Ruminants. IPA- Agricultural and Livestock Research Enterprise, State of Pernambuco-Brazil.
- Torres S. A. 2010.** Sistemas de producción de nopal forrajero en Brasil. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial No. 5-2010 (ISSN 1870-0160).
- Zadrazil, F.; Isikhuemhem, O. S. 1996.** Cultivation of White Rot Fungi in SSF, *Scientific & Industrial Research*, 55, Mayo -Junio 1996, 333-342p.

II. CAPITULO II

ANÁLISIS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE PROTEÍNA DEL NOPAL (*Opuntia spp.*) COMO FORRAJE

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue analizar el proceso físico-químico de fermentación semisólida del nopal, determinar el incremento de proteína cruda al final de la fermentación y establecer la relación con el crecimiento de levadura (*Sacharomyces cerevisae*). Se evaluaron tres tratamientos: 1- Levadura (1 %), 2- Levadura (1 %) + sulfato de amonio (1 %) y 3- Levadura (1 %) + sulfato de amonio (2 %), todos ellos con un movimiento y aireación de 0.5 h y 2.5 h de reposo. Se cuantificó el contenido de proteína cruda, amonio, fibra detergente ácido, fibra detergente neutro, nutrientes digestibles totales, azufre, humedad, materia seca y energía metabolizable, también se determinó el PH y la temperatura, y se contabilizaron las colonias de levadura. En el tratamiento con levadura y 2 % de sulfato de amonio el porcentaje de proteína aumentó casi tres veces con respecto al que contenía solo levadura (de 11.9 a 38.95 %). Mientras que en el tratamiento con levadura (1%) y de sulfato de amonio (1%) tuvo un contenido similar (42 %), al tratamiento de levadura (12%) y sulfato de amonio (2%) de 38.9 %. Los valores de PH y Temperatura se incrementaron significativamente en los tratamientos con sulfato de amonio. En los tratamientos con levadura (1%) y con levadura (1%) + sulfato de amonio 2 %, el crecimiento de levadura fue con una distribución normal hasta las 18h a partir del cual se registró un crecimiento exponencial hasta las 24 h de la fermentación ($1,500 \times 10^5$). Aunque en el tratamiento con levadura + sulfato de amonio 1% hubo un incremento ligero a partir de las 18 h, en éste se obtuvo el crecimiento menor de los tres tratamientos (142×10^5). Este crecimiento de las levaduras no está relacionado con el aumento del porcentaje de proteína cruda en el período de fermentación en los diferentes tratamientos.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the physical - chemical process of semisolid fermentation of nopal, determine the increase in crude protein at the end of fermentation and establish the relationship with the growth of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Three treatments was studied: 1- Yeast (1 %), 2- Yeast (1 %) + Ammonium sulfate (1 %) and 3- Yeast (1 %) + Ammonium sulfate (2 %), all of them with a movement of aeration of 0.5 h and 2.5 h evaluated rest. The content of crude protein , ammonia, acid detergent fiber , neutral detergent fiber, total digestible nutrients , sulfur, moisture and dry matter and metabolizable energy was quantified, is also determined pH, temperature, and yeast colonies were counted . In the treatment with yeast (1 %) and ammonium sulfate (2 %) was almost tripled compared to the protein containing only yeast (11.9 % to 38.95 %). The treating yeast (1 %) and ammonium sulfate (1 %) had similar protein content (42%) that the yeast (1 %) and ammonium sulfate (2 %) of the 38.9%. The values of PH and Temperature increase significatly in the treatments with ammonium sulfate. On treatments of yeast and ammonium sulfate + 2 % yeast growth was following a normal distribution before the 18h the growth was exponential, obtained its maximum at 24 h of fermentation ($1,500 \times 10^5$) . Although treatment with yeast (1 %) + ammonium sulfate (1 %) there was a slight increase from 18h , in this lower growth in the three treatments (142×10^5) was obtained. This yeast growth is not related to the increasing percentage of crude protein in the fermentation period in the different treatments.

2.1 INTRODUCCION

El desarrollo de productos mediante la fermentación semisólida ha mantenido un interés creciente en los últimos años. Esto se debe entre otros factores al aumento en los costos de los ingredientes convencionales como los suplementos utilizados en la alimentación del ganado. Un ejemplo son los cultivos de levaduras empleados en una forma dinámica en las últimas décadas buscando mejorar la respuesta productiva de los animales a un costo menor. Está documentado que los aditivos alimenticios con levaduras, compuestos usualmente por *Saccharomyces cerevisiae* mejoran la salud y la productividad de los rumiantes (Miller *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004).

Gutiérrez *et al.*, (2007) utilizó la fermentación semisólida para producir un fermentado del bagazo de manzana y obtener un producto con mayor cantidad y calidad de las proteínas. Lo anterior se logra a través de las levaduras y los carbohidratos que posee el bagazo, elementos fundamentales para llevar a cabo el proceso de fermentación aerobia. El proceso es sencillo y económico ya que solo se necesita del bagazo, una superficie plana forrada de concreto, urea en una proporción del 1.5 %, sulfato de amonio en 0.4 % y sales minerales en 0.5 % (Díaz, 2006).

En este estudio se analizó el proceso de fermentación del nopal para forraje, como una alternativa para los productores cuando hay escases de forrajes, con más nutrientes y proteína cruda que el forraje convencional. Sin embargo se requiere que posea nivel bajo de azufre y de amoníaco para cumplir con los estándares requeridos para una buena calidad de forraje.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.0 Ubicación del experimento

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas- UACH, Bermejillo Durango, ubicada en la Comarca Lagunera, en los límites del Desierto Chihuahuense. La localidad se ubica a 1,117 msnm, posee clima muy seco, semicálido con invierno fresco con temperatura media anual entre 18 y 22 °C, régimen de lluvias en verano con una precipitación de 220 mm anuales y humedad relativa media anual de 45 % (García, 1973).

El proceso de fermentación se llevo a cabo en una bodega adaptada para este proceso donde se contó con el equipo NOPAFER registrado como modelo de utilidad con título de registro Núm. 2641 con la fecha 26 de noviembre del 2010 en el Instituto Mexicano de Propiedad Intelectual (IMPI) según la ley de propiedad industrial.

2.2.1 Conducción del experimento

Para llevar a cabo la fermentación se utilizaron pencas de nopal forrajero *Opuntia spp.*, variedad clave 69, recolectadas en el área experimental en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Las pencas recolectadas fueron en promedio 150 para cada tratamiento, equivalentes a 100 kg. Las pencas se colocaron en el equipo NOPAFER para el corte y su posterior mezcla y fermentación de acuerdo a los siguientes tratamientos.

Cuadro 6. Tratamientos utilizados en el proceso de fermentación semisólida para incremento del contenido proteico del nopal.

Tratamiento	Adiciones	Movimiento
Testigo	Solo nopal	Movimiento (0.5 h) - reposo (2.5 h)
Levadura 1 %	1 kg de levadura**	Movimiento (0.5 h) - reposo (2.5 h)
Levadura 1 % + SA* 1 %	1 kg de levadura** + 1 kg de sulfato de amonio	Movimiento (0.5 h) - reposo (2.5 h)

Levadura 1 % + 1 kg de levadura** + 2 kg de	Movimiento (0.5 h) -
SA* 2 % sulfato de amonio	reposo (2.5 h)

*SA. Sulfato de amonio. ** Levadura *Sacharomyces cerevisiae*

El equipo NOPAFER se programo con un Timer, con el cual funcionaba 0.5 hora de movimiento y 2.5 horas de reposo durante 24 h continuas.

Durante este tiempo se tomó una muestra cada 6 h de jugo, se midió su pH y temperatura, y se inocularon en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) específico para *S.cereviceae*.

Otra muestra de jugo se usó para cuantificar proteína cruda, fibra detergente ácido y neutro, carbohidratos, nutrientes digeribles totales, energía metabolizable, cenizas, amonio y azufre. Estos análisis se realizaron en un laboratorio de servicio certificado externo.

2.2.2 Inoculación y recuento de levaduras

La cantidad de levaduras se determinó mediante la inoculación de muestras de los seis tratamientos cada 6 h. Para esto se realizaron seis diluciones seriadas, la primera de ellas consistió de 1 ml de muestra + 9 ml de agua destilada (dilución 1:10), después de mezclarla a 1 ml se le adicionaron 9 ml de agua destilada (dilución 1:100) y (así sucesivamente 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 hasta obtener la dilución 1:1000000).

Las inoculaciones de las muestras se realizaron en cajas petri estériles, mediante la técnica de siembra en placa en un área estéril; que consistió en poner 1 ml de muestra (proveniente de las diluciones seriadas) en la caja petri y añadirle entre 10 y 20 ml de medio de cultivo PDA. De cada inoculación se realizaron dos repeticiones cada 6 h. Después de 24 h de inoculación se contabilizaron las colonias de las diluciones que presentaran entre 30 y 300 colonias por caja, de acuerdo con criterio de Madigan (2004).

2.2.3 Variables de estudio

Para describir la composición química parcial de los fermentos semisólidos en jugo de nopal se empleó el método de Weende para análisis de alimentos (Henneberg *et al.*, 1867). Las variables químicas evaluadas fueron humedad, materia seca, proteína cruda (% de nitrógeno total x 6.25), fibra detergente ácido, fibra detergente neutro, carbohidratos, azufre, nitrógeno amoniacal y energía. Además mediante cálculo con el análisis de Weende se obtuvieron los nutrientes digeribles totales. Las variables físicas de PH y Temperatura se determinaron con pH metro y termómetro respectivamente.

En el conteo total de microorganismos fue empleada la variable conteo de colonias de levadura en una dilución 10^5 .

2.2.4 Análisis Estadístico

Inicialmente fue realizado para todas las variables un análisis de normalidad de errores mediante la prueba de Shapiro Wilkis, donde la variable conteo total de colonias de levadura no mostró distribución normal de errores. La variable fue transformada con raíz cuadrada para su análisis paramétrico.

Para las variables de composición química parcial y las colonias de levadura se selecciono un diseño de bloques al azar, donde el control local fue el factor tiempo de medición, la comparación de efectos medios fue realizada mediante la Prueba de Tukey. Todos los análisis fueron conducidos con el paquete estadístico SAS Versión 9.0.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

2.3.1 Variables químicas

2.3.1.1 Proteína cruda

Se detectó un incremento significativo ($P < 0.05$) de proteína cruda en los tratamientos que contenían 1 % y 2 % de sulfato de amonio, respecto al tratamiento que contenía solo levadura y al testigo. Además, el tratamiento de levadura al 1 % la proteína incremento significativamente (11.9 %), respecto al testigo (4 %) (Figura 1).

La fermentación con la adición de levadura (1%) y sulfato de amonio (2%), la proteína cruda aumento casi tres veces respecto al de solo levadura (1%) de 11.9 a 38.95 %. El tratamiento con levadura (1%) y sulfato de amonio (1%) se logro un resultado estadísticamente similar al tratamiento donde se incremento el sulfato de amonio al 2% (Figura 1) por lo que no es necesario agregar más nutriente (Sulfato de amonio) al medio de nopal en fermentación.

Según González (1995) en la clasificación de la calidad de los forrajes por el contenido de proteína cruda los valores registrados en el tratamiento con levadura al 1 % son de mala calidad, mientras que los tratamientos con levadura al 1 % más 1 y 2 % de sulfato de amonio resultan de excelente calidad (Figura 1).

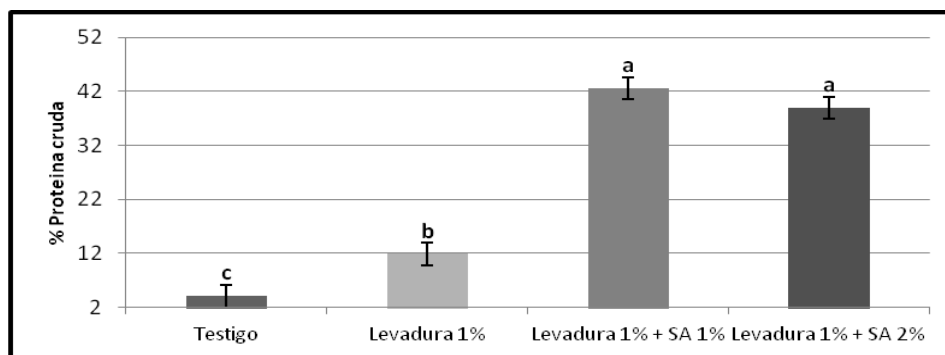


Figura 1. Porcentaje de proteína cruda con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.2 Fibra detergente ácido (FDA)

El nopal testigo obtuvo valores menores que 5.5 % (Figura 2), por lo que el nopal puede ser considerado como forraje de excelente calidad. En el contenido de FDA destacó significativamente el tratamiento con levadura 1 % y sulfato de amonio 1 % con un valor menor que el resto de los tratamientos. La FDA es un factor importante en forrajes ya que esta correlacionada negativa con la digestibilidad del forraje (González, 1995) y el forraje con valores altos de FDA es menos digerible.

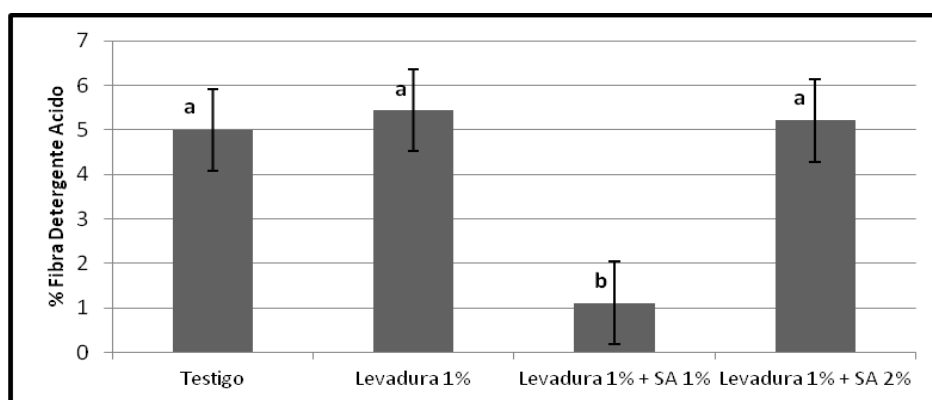


Figura 2. Porcentaje de fibra detergente ácido con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.3 Fibra detergente neutro (FDN)

Los valores de fibra detergente neutro (Figura 3), fueron en general superiores a los de FDA (Figura 2) y muestran que el nopal se encuentra debajo de los límites de referencia señalados por González (1995). Esto indica que es un forraje con excelente calidad. Los tratamientos con solo levadura y el de levadura (1%) + sulfato de amonio (2%) resultaron mayores (8.78 %) al igual que el testigo, siendo estadísticamente iguales. Según González (1995) cuando la FDN aumenta en el forraje los animales consumirán menos cantidades. El contenido de FDN permite predecir el consumo de forraje y por lo tanto la formulación de las raciones.

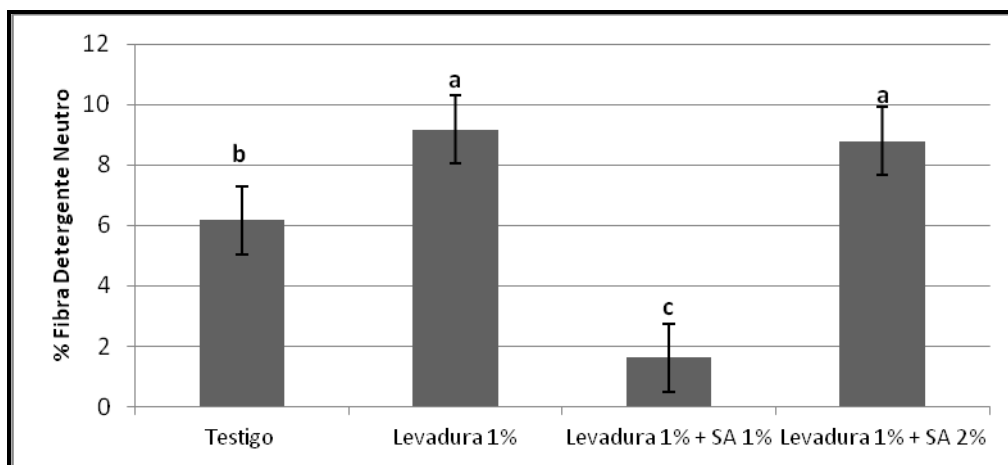


Figura 3. Porcentaje de fibra detergente neutro con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.4 Carbohidratos no fibrosos (CNF)

Los carbohidratos son necesarios para la fermentación. Se observó que en el tratamiento testigo y el que tenía solo levadura presentaron los valores mayores de carbohidratos (superiores al 50 %). La fermentación con levaduras y sulfato de amonio al 1 %, existe una reducción de este componente por efecto del crecimiento de las levaduras (Figura 4). Es conveniente destacar que el tratamiento con levaduras más 2 % de sulfato de amonio, el contenido de carbohidratos fue significativamente menor que en los otros tratamientos; por lo que además de la fermentación puede suceder algún otro proceso que propicie la formación de compuestos nuevos a partir de nutrientes y carbohidratos o algún desvío de la fermentación con bacterias u otros microorganismos.

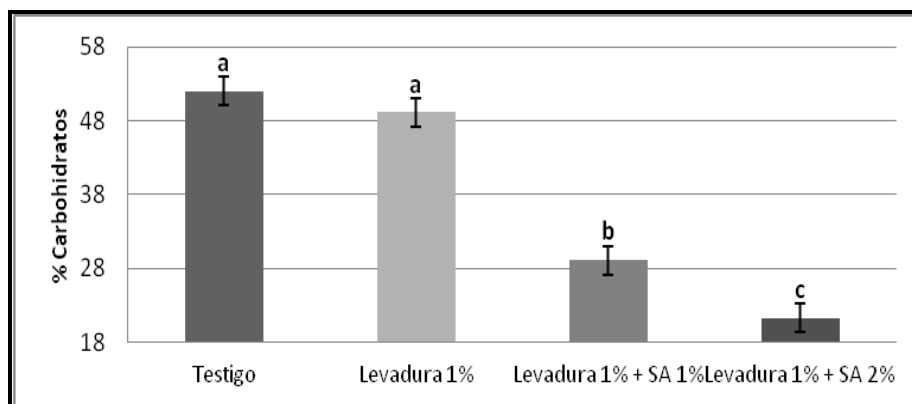


Figura 4. Porcentaje de carbohidratos con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.5 Nutrientes digeribles Totales (NDT)

Otro de los componentes importantes en la formulación de las dietas se refiere a los nutrientes digeribles totales (Figura 5). Todos los tratamientos presentaron contenido alto de esos nutrientes (56 a 63 %). No existió diferencia significativa entre los tratamientos por lo que los nutrientes en todos ellos no parecen aumentar o disminuir por efecto de la fermentación.

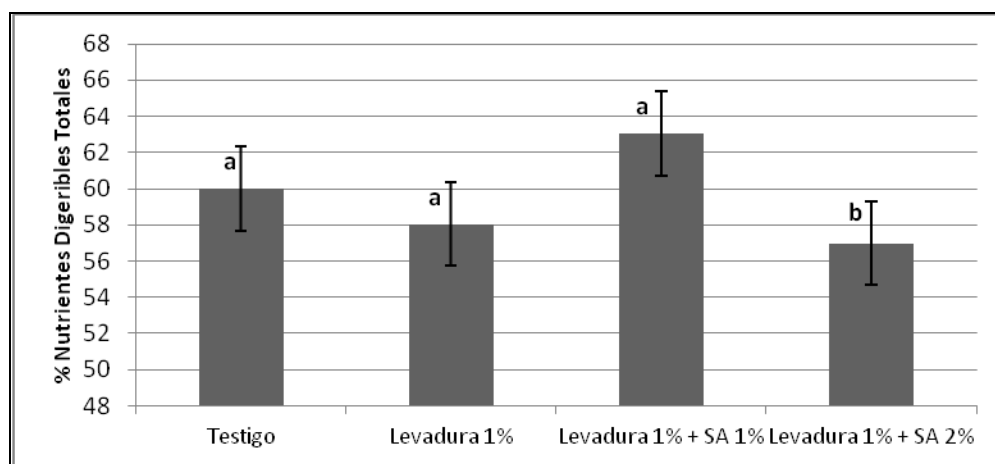


Figura 5. Porcentaje de nutrientes digeribles totales con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.6 Energía metabolizable (EM)

El alimento es la fuente de energía tanto para el hombre como para los animales. Los carbohidratos, grasas y proteínas que provee el alimento al organismo pueden ser usados como energía para regular la temperatura corporal y mantener las funciones vitales del crecimiento, actividad, producción y reproducción (Maynard *et al.*, 1979), eliminando la energía que se pierde en el proceso de digestión y desechos fecales, se obtiene la energía metabolizable, que es la que el organismo puede transformar directamente, en este estudio se encontró que el mejor tratamiento respecto al testigo, es cuando se combina la levadura con 1 % de sulfato de amonio, ya que se obtienen 2.69 %, sin embargo cuando se aplican levadura (1%) mas sulfato de amonio (2%) los valores de EM son ligeramente menores (2.45 %) (Figura 6).

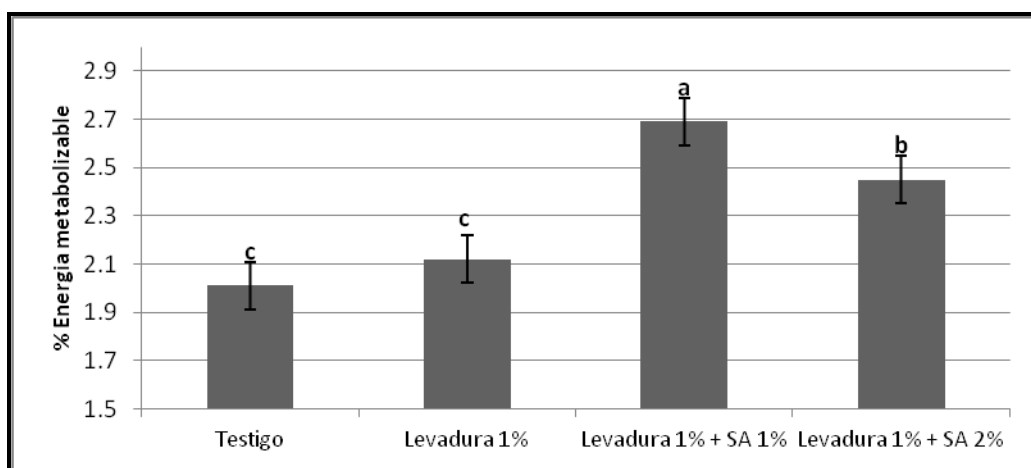


Figura 6. Porcentaje de energía metabolizable con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (S.A.).

2.3.1.7 Nitrógeno amoniacal

El nitrógeno amoniacal es una medida de la degradación de la proteína que al estar escaso es un indicador de una correcta fermentación. (De la Roza, 2005)

La producción de nitrógeno amoniacal es un indicador de la degradación de las proteínas por microorganismos que participan en el proceso de fermentación del ensilaje. El nitrógeno amoniacal al igual que el pH, pueden ser utilizados como indicadores de calidad de la fermentación. Un ensilaje de buena calidad puede tener un 10 % de nitrógeno

amoniacal con relación al nitrógeno total. Si la cantidad del nitrógeno amoniacal es mayor del 20 %, será de mala calidad el ensilaje (Hiriart, 1998).

En este estudio se observó que el tratamiento testigo tuvo una cantidad mínima de nitrógeno amoniacal, formado naturalmente por la fermentación; sin embargo, en el tratamiento con levadura al 1 % y sulfato de amonio al 1 % fue el más alto (30%), lo que es un indicador de un problema de contaminación o bien queda como residuo del sulfato de amonio agregado como nutriente o ambos casos.

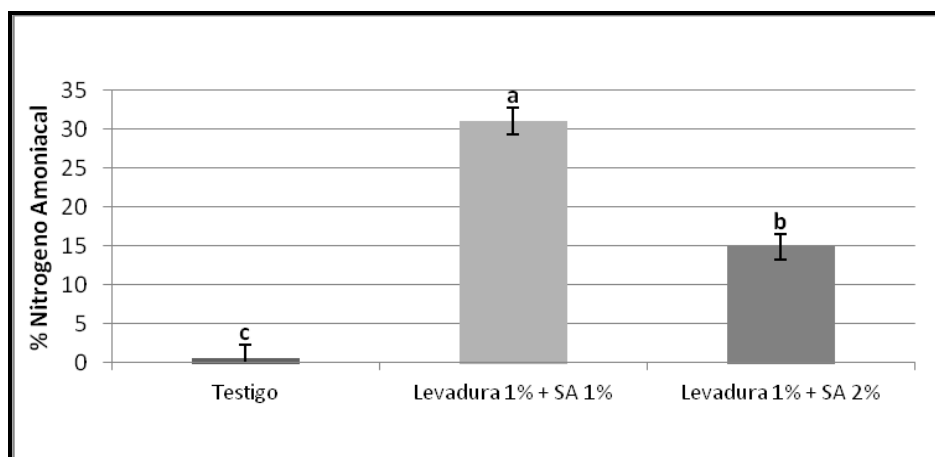


Figura 7. Porcentaje de nitrógeno amoniacal con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.), fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.8 Azufre

Es un mineral esencial para animales ya que participa en procesos biológicos diversos. Sin embargo, cuando el S está en exceso en las dietas de los rumiantes, puede generar problemas neurológicos. Cuando el alimento y el agua contienen niveles altos de S (más de 0.40 %, con base en la materia seca) se puede dar una condición llamada Poli Encéfalo Malacia (PEM). La PEM es ocasionada por necrosis de la región cerebro cortical del ganado, borregos, y cabras (Boyles, 2007).

En el presente estudio los análisis indicaron que el tratamiento con 1 % de levadura y 1 % de sulfato de amonio, el contenido de S fue significativamente mayor que en los otros

(9.018 %) Ver figura 8. El resultado indica que el tratamiento con 1 % de sulfato de amonio es inadecuado como forraje para los animales.

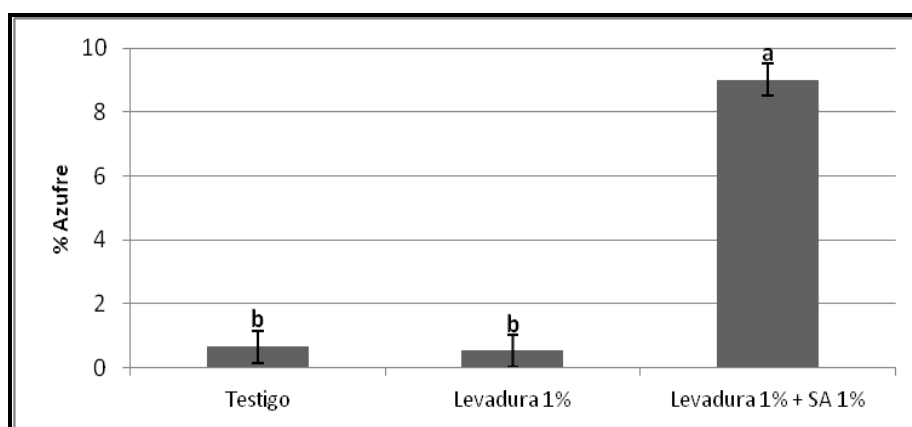


Figura 8. Porcentaje de azufre con base en peso seco en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.9 Materia Seca

La concentración de MS, puede indicar en la fermentación la cantidad del producto fermentado con posibilidad de almacenarse. Al llevar a cabo una fermentación de nopal a gran escala, el proceso debe ser detenido por deshidratación para poder almacenar el producto; el momento ideal para detener el proceso, puede ser determinado en función a la concentración de Proteína cruda o Proteína verdadera, ya que este es uno de los mejores indicadores de la síntesis microbiana de proteína (Rodríguez *et al.*, 2001), los resultados de esta variable (MS) para el nopal fue de 11.13% para el tratamiento levadura 1 % + 2 % de sulfato de amonio, resultando altamente significativo. Ver Figura 9.

Es conocido que los sustratos pierden MS durante la fermentación (Hang *et al.*, 1981; Joshi y Sandhu, 1996; Peñaloza *et al.*, 1985; Rolz *et al.*, 1986; Rodríguez *et al.*, 2001b; Ruíz *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005) provocando un incremento en la concentración relativa en base seca de algunos componentes, como por ejemplo la fibra, proteína cruda (Rodríguez *et al.*, 2001b) y la concentración de cenizas (Joshi y Sandhu, 1996; Peñaloza *et al.*, 1985).

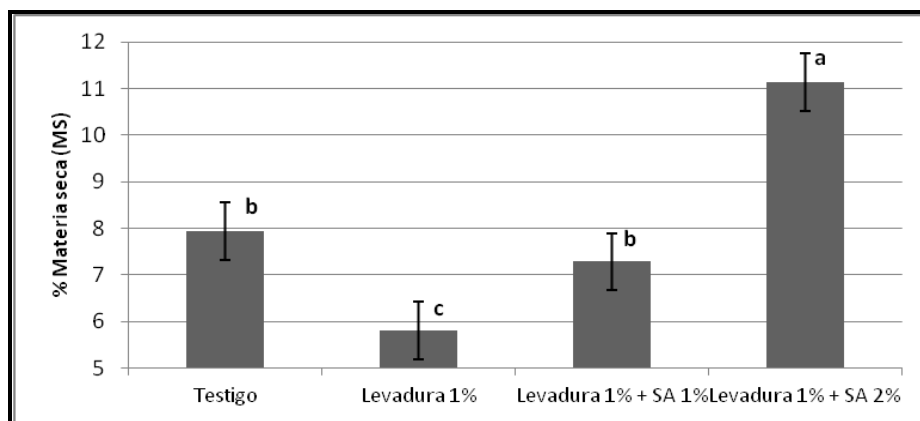


Figura 9. Porcentaje de materia seca en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.1.10 Humedad

En cuanto a la variable humedad, resulta lo contrario al peso seco, es decir los porcentajes de mayor humedad son los que resultaron de menor peso seco. Los tratamientos de levadura al 1 % y levadura 1 % mas sulfato de amonio al 1 %, y el testigo obteniendo un porcentaje de humedad de más de 90 %, sin embargo el tratamiento con levadura al 1 %+ sulfato de amonio al 2 % se obtuvo la humedad más bajo y por lo tanto el mayor peso seco aunque en ello influye la condición de las pencas durante su corte, lo cual afecta cuando tiene menor contenido de humedad. Por lo cual se recomienda utilizar nopal fresco (92-94%) para la fermentación.

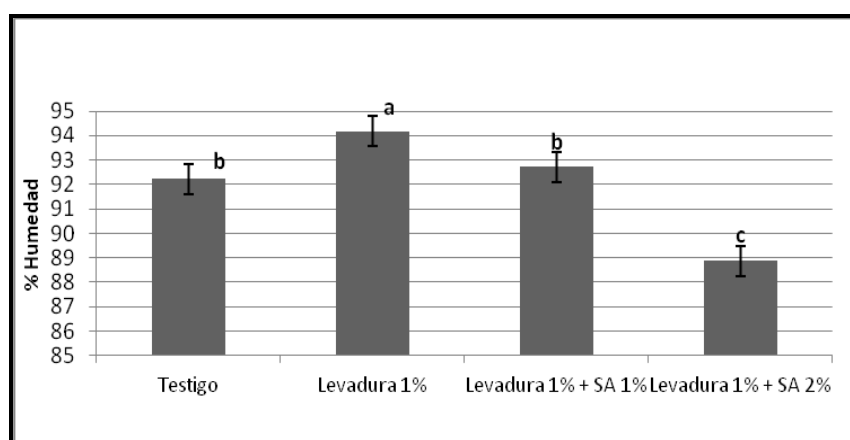


Figura 10. Porcentaje de humedad en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.2 Variables físicas

2.3.2.1 PH y Temperatura

Durante la fermentación semisólida de nopal forrajero se registró la variación de pH (Figura 11), el que aumento significativamente entre los tratamientos, solo los que contenían sulfato de amonio tendieron a un pH más al punto neutro y que se acerca a lo indicado por Rose (1987a) de que esta levadura requieren para su óptimo crecimiento un pH con rango de 3.5 a 5.0, por lo que la adición del sulfato de amonio favorece el crecimiento de la levadura ya que al adicionarse más sulfato de amonio es de suponerse que tendería a acidificarse el medio de fermentación del nopal, lo que no sucede en este caso. El tratamiento más ácido (2.8) fue el testigo (no existe actividad de la levadura). Por otra parte se debe mencionar que la hora de corte de la penca influye mucho en el contenido de acidez, por lo que en futuros experimentos se debe cortar a una hora determinada, requiriéndose un muestreo previo para seleccionar el tiempo de corte con un pH de 4.0

La temperatura vario en los tratamientos, el tratamiento de levadura 1 % y sulfato de amonio 2 % tuvo temperaturas más altas (21.36 °C) y el tratamiento testigo la menor (11.5 °C). El tratamiento con 2 % de sulfato de amonio tuvo temperatura mayor debido a la fermentación más activa (Figura 12).

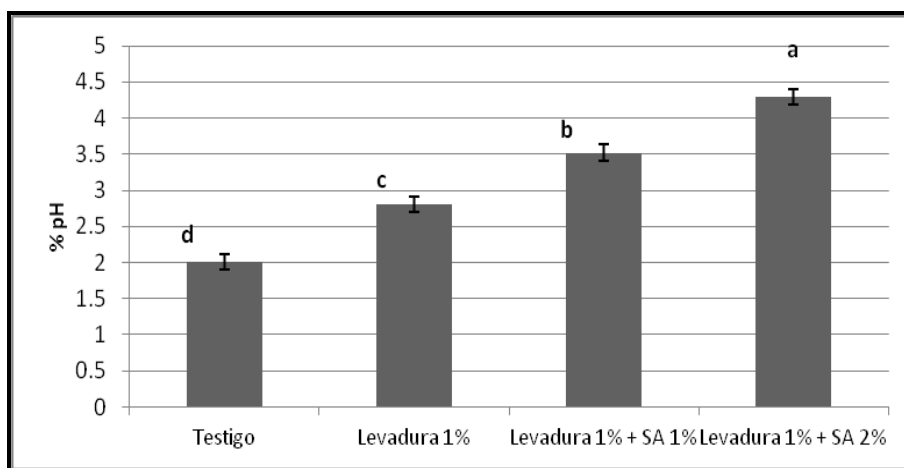


Figura 11. Valores de pH en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

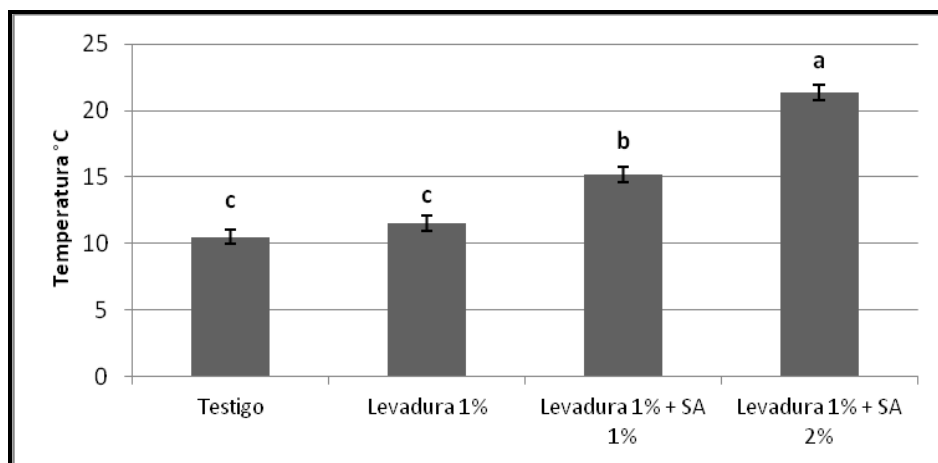


Figura 12. Valores de temperatura en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.3 Conteo de levaduras en el medio de cultivo

La raíz cuadrada del número de colonias desde el inicio y hasta las 24 h de fermentación indicó que en las muestras de nopal del tratamiento con levadura al 1 % y levadura 1 %+ sulfato de amonio 2 %, el crecimiento de la población de levadura fue exponencial a partir de las 12 h, y alcanzó su valor mayor a las 24 h de iniciada la fermentación ($1,500 \times 10^5$) por ml de muestra. En el tratamiento con levadura al 1 %+ sulfato de amonio al 1 % hubo un incremento ligero y a partir de las 24 h, presentó el crecimiento menor entre los tratamientos (142×10^5). Este comportamiento es atribuible a que la condición para la fermentación no fue óptima, ya que el nopal de ese ensayo estaba parcialmente deshidratado, inclusive el sulfato de amonio se agregó con 4 litros de agua destilada. Así, la mezcla pudo ser insuficiente para la multiplicación de la levadura (Figura 13).

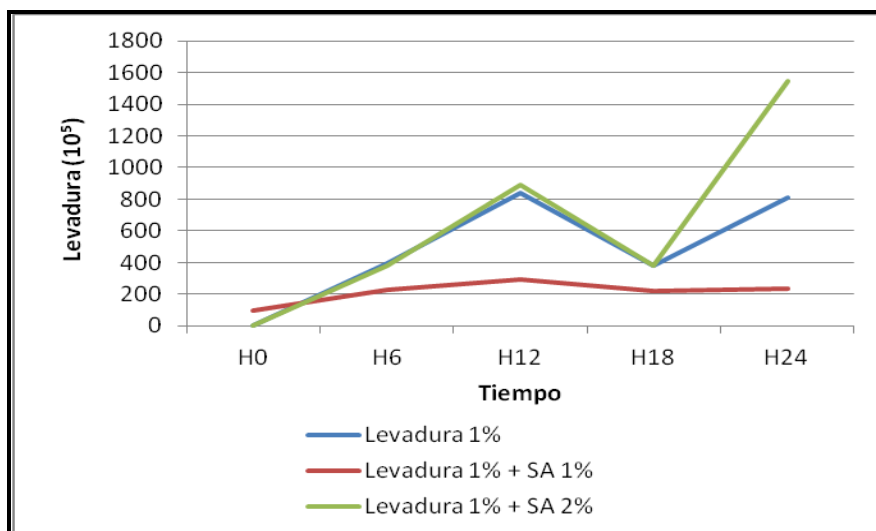


Figura 13. Crecimiento de numero de colonias de levadura por ml en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA).

2.3.4 Análisis de la interacción población de levaduras vs porcentaje de proteínas en la fermentación semisólida de nopal

Tratamiento levadura 1%

En el tratamiento de levadura 1% se obtuvo la interacción entre las colonias de levadura y la proteína, observándose que en el tiempo 0 se obtienen el nivel más bajo de crecimiento de levadura y porcentaje de proteína. Sin embargo, estos factores no coinciden en el punto más alto del crecimiento de la levadura (H12) y presentan una tendencia opuesta después de este tiempo o sea que la proteína está en su mayor proporción cuando cae el crecimiento de la levadura.

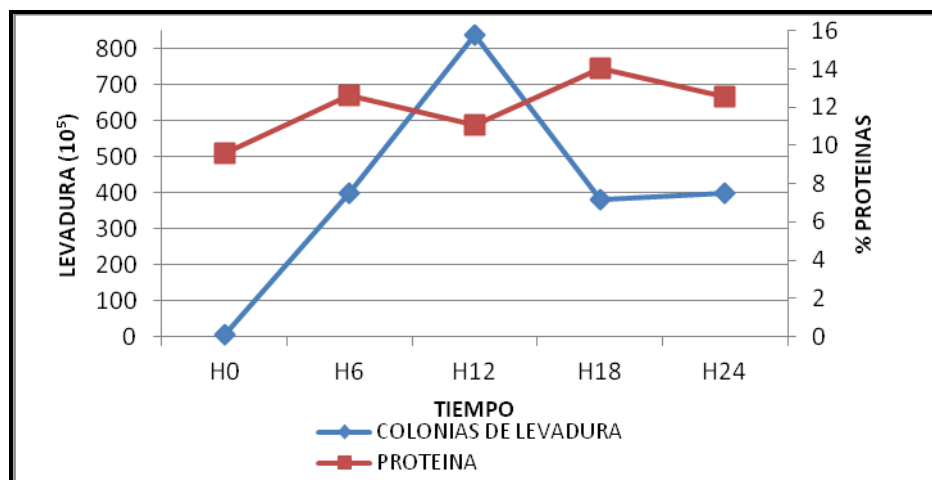


Figura 14. Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae*.

Tratamiento levadura 1% + sulfato de amonio 1%

En este tratamiento la curva de crecimiento de la levadura obtiene su nivel más alto a las 12 horas y disminuye a las 18 horas, sin embargo no tiene una interacción completa con la proteína, ya que esta obtiene su nivel más alto a las 6 horas y continúa disminuyendo en las horas siguientes.

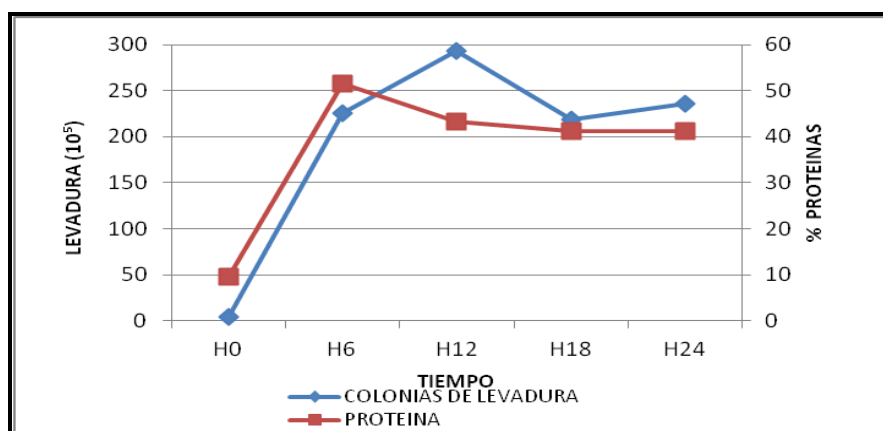


Figura 15. Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* complementado con sulfato de amonio (SA).

Tratamiento levadura 1% + sulfato de amonio 2%

En el tratamiento con sulfato de amonio al 2% hay una interacción más estrecha entre el contenido de proteína cruda y el crecimiento de la levadura, ambos inician en niveles bajos y aumentan a las 12 horas, disminuyen a las 18 horas y suben marcadamente a las 24 horas. No obstante el mayor contenido de proteína se presentó entre 6 y 12 horas.

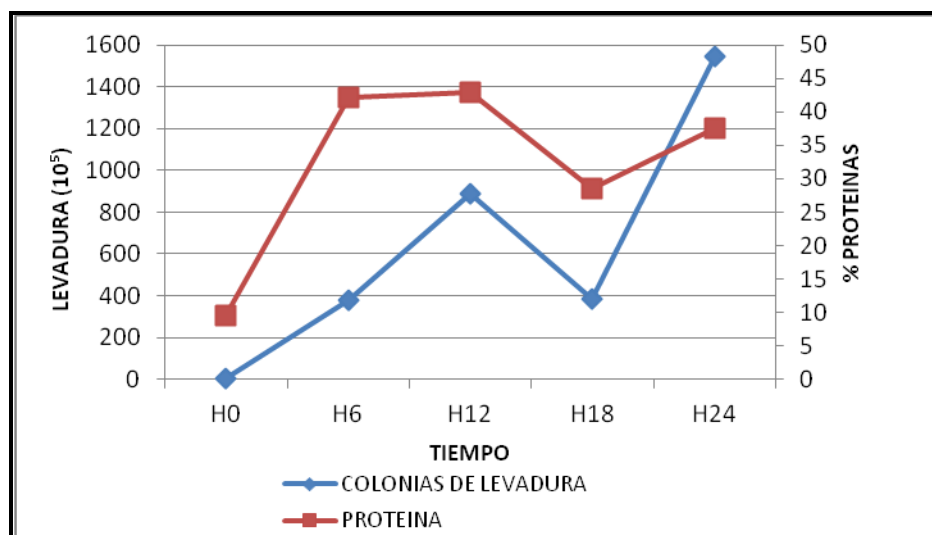


Figura 16. Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* complementado con sulfato de amonio (SA).

2.4 CONCLUSIONES

Se comprobó que la fermentación semi sólida de nopal es una alternativa para modificar su composición química y usar como forraje en cualquier época del año, ya que la proteína incrementa significativamente (de 4% al 42%) así como el porcentaje de energía metabolizable en el tratamiento levadura (1%) + sulfato de amonio (1%).

Los altos porcentajes de nitrógeno amoniacal y azufre detectados en el tratamiento de levadura (1%) + sulfato de amonio (1%) impiden la recomendación en el uso de nopal fermentado como forraje, sugiriéndose el cambio por otra fuente nitrogenada.

El mayor crecimiento de la población de levaduras se detectó a las 12 horas de con un súbito aumento a las 24 horas (termino del proceso de fermentación) pero ello no coincide con el porcentaje de proteína cruda calculado en esos tiempos en los diferentes tratamientos. Es probable que se pueda acortar el proceso de fermentación a 12 horas para aumentar proteína.

2.5 LITERATURA CITADA

- Calderón A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivie N. 2005.** Dinámica de la Fermentación en Estado Sólido de las camas de Cascarilla de Café en Inicio de Ponedoras Inoculadas con Vitafert. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 6(5). Disponible <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505/050521.pdf>. Accesado el 01/Nov/2013.
- De la Roza, B. 2005.** El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín (Pontevedra), p. 1-20.
- 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, Chih., México.
- González, A. 1995.** Determinación de la calidad de los forrajes. Ciclo Internacional de Conferencias sobre Nutrición y Manejo .La importancia de los forrajes en la optimización económica. Envases Especializados de La Laguna. S.A. de C.V. Gómez Palacio, Dgo. Pág. 69-73.
- Gutiérrez, F., C. Rodríguez, H. García, A. García, O. Ruiz y J. Jiménez. 2007.** Alimento producto de la FES de subproductos de manzana en dietas para vacas Holstein en producción. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Hang, Y. D., C. Y. Lee, E. E. Woodams y H. J. Cooley. 1981.** Production of Alcohol from Apple Pomace. Applied and Environmental Microbiology. 42(6):1128-1129.
- Henneberg; Stohmann.1867.** Método de Weende. Alemania.
- Hiriart Le-Bert Mauricio. 1998.** Ensilados procedimientos y calidad. Ed Trillas. S.A de C.V. México DF. pp. 5-95

- Joshi, V. K. y D. K. Sandhu. 1996.** Preparation and Evaluation of an Animal Feed Byproduct Produced by Solid-State Fermentation of Apple Pomace. *Bioresource Technology*. 56:251-255.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S y Itabashi, H. 2004.** Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Maynard L. A., Loosli J., Hintz H. y Warner R. 1981.** *Nutrición Animal*. 4a Edición, Libros McGraw-Hill de México, S. A. de C. V. México DF. 640pp.
- Miller-Webster, T; Hoover, Wh; Holt, M; Nocek, Je. 2002.** Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *Journal Of Dairy Science*, 85 (8):2009-2014
- Peñaloza, W., M. R. Molina, R. Gómez-Brenes y R. Bressani. 1985.** Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(2):388-393.
- Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Núñez. 2001.** Efectos de los Niveles de Nitrógeno Ureico en la Síntesis Proteica Durante la Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata Lam.*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 35(1):29-36.
- Rodríguez, Z., R. Bocourt, A. Elías y M. Madera. 2001b.** Dinámica de Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 35(2):147-151.
- Rolz, C., R. de León, M. C. de Arriola y S. de Cabrera. 1986.** Biodelignification of Lemon Grass and Citronella Bagasse by White-Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(4):607-611.

Ruíz, C. J., M. Ruíz, G. Ruíz y V. Torres. 2002. Effect of Inclusion of Ammonium Sulfate on the Elaboration of Rustic Saccharina. Cuban Journal of Agricultural Science. 36(2):147-152.

III. CAPITULO III

EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE UREA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN SEMISOLIDA PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE PROTEÍNA DEL NOPAL (*Opuntia spp.*) COMO FORRAJE

RESUMEN

Se evaluó la fermentación semisólida de nopal (*Opuntia spp.*) en cuatro tratamientos: 1- Testigo (Nopal sin nutriente ni levadura), 2- Levadura (1 %) , 3- Levadura (1 %) + sulfato de amonio (0.1 %) + urea (1 %), estos tres tratamientos con movimiento y aireación (1h) y reposo (1h) y 4- Levadura (1 %) + sulfato de amonio (0.1 %) + urea (1 %) con movimiento y aireación (0.5h) y reposo (2.5h). Se cuantificaron la proteína cruda, el amonio, la fibra detergente ácido y neutro, nutrientes digeribles totales, energía metabolizable, humedad, materia seca, pH y temperatura. Durante el proceso de fermentación a cada 6 h se contabilizaron las colonias de levadura. El tratamiento con levadura (1 %) + sulfato de amonio (0.1 %) + urea (1 %) con el tiempo de 1 h de movimiento y 1 h de reposo obtuvo 49.19 % de proteína cruda, el tratamiento con la misma concentración de nutrientes pero con el movimiento de 0.5 h de movimiento y 2.5 h de reposo obtuvo 42.54 % de proteína, cantidades diez veces más altas que el testigo (4 %). Las cantidades de N amoniacal fueron muy bajas (2.76 %) respecto a valores anteriores (44%). Lo cual es un resultado excelente ya que el bajar la cantidad de sulfato de amonio de 1 % a 0.1 % se induce dicha reducción y permite su recomendación como forraje. El crecimiento de la población de levadura mostró una distribución normal en todos los tratamientos con un punto máximo de crecimiento a las 12 h del proceso de fermentación y una disminución evidente a las 24 h, destacando el tratamiento con levadura (1%), urea (1%) y sulfato de amonio (0.1%) en tiempo de ½ h de movimiento y aireación, y 2 ½ h de reposo. En dicho crecimiento poblacional no se encontró relación con el porcentaje de proteína cruda obtenido en los mismos tiempos del proceso de fermentación.

ABSTRACT

The semisolid fermentation of prickly pear (*Opuntia spp*) Was evaluated in four treatments: 1-Witness (Prickly pear without nutrient or yeast), 2- Yeast (1%), 3- Yeast (1%) + Ammonium sulfate (0.1 %) + Urea (1%), all of them with a movement and air (1h) and rest (1 hr), and 4- Yeast (1%) + Ammonium sulfate (0.1 %) + Urea (1 %) with a movement and air of 0.5h and rest of 2.5 h. Crude protein, ammonia, acid detergent fiber and neutral, total digestible nutrients, metabolizable energy, moisture , dry matter, pH and temperature were quantified . During the fermentation process each 6 h were counted yeast colonies. Treatment with yeast (1%) + Ammonium sulfate (0.1%) + Urea (1%), with the time of movement and air of 1h and rest of 1 h was obtained 49.19 % of Crude protein, treatment with the same concentration of nutrients but movement and motion 0.5h 2.5 h rest scored 42.54 % protein, ten times higher than the control (4%) amounts. The amounts of ammonia N were very low (2.76 %) compared to previous values (44%). Which is an excellent result associated with the reduction of the amount of ammonium sulfate from 1% to 0.1 %, this allowed its recommendation as fodder. The growth of the yeast population showed a normal distribution in all treatments with peak growth at 12 h of fermentation and an obvious decrease at 24h. highlighting treatment with yeast (1%), urea (1%) and ammonium sulphate (0.1%) in time ½ h of movement and aeration and 2 ½ h rest. The population growth of yeast is not related to the percentage of crude protein obtained at the same times of the fermentation process.

3.1 INTRODUCCION

El uso del nopal (*Opuntia spp.*) para la alimentación de rumiantes ha sido últimamente incrementado fuertemente como una alternativa durante la época seca en los sistemas ganaderos de doble propósito del país, suministrándose tanto fresco como conservado mediante la técnica del ensilaje.

El nopal forrajero es una planta atractiva como alimento para el ganado, particularmente por su alta eficiencia en el uso de la humedad en la producción de biomasa y por su contenido de energía metabolizable. La importancia forrajera del nopal aplica para el ganado, ya que aún durante los períodos de sequía en el verano o cuando el invierno no es extremadamente frío, el nopal permanece verde con buen nivel de B-carotenos que son los precursores de la vitamina A. Sin embargo, el nopal debe ser combinado con otros ingredientes para complementar la dieta diaria, esto debido a que tiene bajo contenido de proteína y fósforo a pesar de ser rico en carbohidratos y calcio (Gutiérrez O, 2008).

Por esta razón, la búsqueda de información sobre las tecnologías para elaborar un forraje de nopal que cumpla con los propósitos de alimentación, aportación de nutrientes y favorecer el desempeño productivo del animal justifica la investigación respectiva a estas alternativas.

En la fermentación semisólida es necesario incluir una fuente de nitrógeno. La urea, sulfato de amonio, péptidos y aminoácidos a través de una harina proteica como la soya o harinolina, son una opción, así como agregar alguna mezcla de vitaminas y minerales.

La adición de estos nutrientes es en cantidades que no afecten al sustrato de fermentación, ya que las cantidades altas de nitrógeno amoniacal resultan altamente toxico para los rumiantes.

Con base en lo anterior el objetivo de este estudio fue bajar las cantidades de nitrógeno amoniacal en el nopal para lograr un forraje apto para el ganado.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Ubicación del experimento

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas- UACH, Bermejillo Durango, ubicada en la Comarca Lagunera en los límites del Desierto Chihuahuense. La localidad se ubica a 1,117 msnm, posee clima muy seco, semicálido con invierno fresco con temperatura media anual entre 18 y 22 °C, régimen de lluvias en verano con una precipitación de 220 mm anuales y humedad relativa media anual de 45 % (García, 1973).

El proceso de fermentación se llevo a cabo en una bodega adaptada para este proceso donde se contó con el equipo NOPAFER registrado como modelo de utilidad con título de registro Núm. 2641 con la fecha 26 de noviembre del 2010 en el Instituto Mexicano de Propiedad Intelectual (IMPI) según la ley de propiedad industrial.

3.2.2 Conducción del experimento

Para llevar a cabo la fermentación se utilizaron pencas de nopal forrajero *Opuntia* spp., variedad clave 69, recolectadas en el área experimental en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Las pencas recolectadas fueron en promedio 150 para cada tratamiento, equivalentes a 100kg. Las pencas se colocaron en el equipo NOPAFER para cortar, mezclarlas y fermentarlas.

Se usaron los tratamientos mostrados en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados en el proceso de fermentación semisólida para incremento del contenido proteico del nopal.

Tratamiento	Adiciones	Movimiento
Testigo	Solo nopal	Movimiento (1h) – reposo (1h)
Levadura** 1 %	1 kg de levadura **	Movimiento (1h) – reposo (1h)
Levadura** 1 % +	1 kg de levadura ** + 100 g de SA*	Movimiento (1h) – reposo

SA* 0.1 % + Urea 1	+ 1 kg de Urea	(1h)
%		
Levadura** 1 % + 1 kg de levadura** + 100 g de SA*	Movimiento 0.5h – reposo	
SA* 0.1 %+ Urea 1	+ 1 kg de Urea	(2.5h)
%		

*SA. Sulfato de amonio. ** Levadura *Sacharomyces cereviceae*

Al iniciar la fermentación se adicionó los nutrientes y al transcurrir 10 minutos de la mezcla se agregó la levadura, una vez transcurrida la ½ h. de movimiento se tomo la primer lectura.

El equipo se programó con un Timer, el cual funcionaba de acuerdo al movimiento elegido en cada tratamiento.

Durante este tiempo se tomó una muestra cada 6 h de jugo y gabazo se midió su pH y temperatura, y se inocularon en cajas petri, con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) específico para *S.cereviceae*.

La muestra de gabazo se usó para cuantificar proteína cruda, fibra detergente acido y neutro, carbohidratos, nutrientes digeribles totales, energía metabolizable, cenizas y amonio. Estas evaluaciones se realizaron en un laboratorio de servicio certificado externo.

3.2.3 Inoculación y recuento de levaduras

La cantidad de levaduras, se evaluó mediante la inoculación de muestras de jugo de los tres tratamientos cada 6 h. Para esto se realizaron seis diluciones seriadas, la primera de ellas consistió de 1ml de muestra + 9 ml de agua destilada (dilución 1:10), después de mezclarla a 1ml se le adicionaron 9 ml de agua destilada (dilución 1:100) y (así sucesivamente 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 hasta obtener la dilución 1:1000000).

Las inoculaciones de las muestras (tratamientos con levaduras) se realizaron en cajas petri estériles, mediante la técnica de siembra en placa en un área estéril; que consistió en poner 1 ml de muestra (proveniente de las diluciones seriadas) en la caja petri y añadirle entre 10 y 20 ml de medio de cultivo PDA. De cada inoculación se realizaron dos repeticiones cada 6 h. Después de 24 h de fermentación y se contabilizaron las colonias de las diluciones que presentaran entre 30 y 300 colonias por caja, de acuerdo con criterio de Madigan (2004).

3.2.4 Variables de estudio

Para describir la composición química parcial de los fermentos semisólidos en bagazo se empleó el método de Weende para análisis de alimentos (Henneberg *et al.*, 1867). Las variables evaluadas fueron humedad, materia seca, proteína cruda (% de nitrógeno total x 6.25), fibra detergente ácido, fibra detergente neutro, carbohidratos, nitrógeno amoniacal y energía. Además mediante cálculo con el análisis de Weende se obtuvieron los nutrientes digeribles totales. Las variables de pH y temperatura se determinaron con phmetro y termómetro respectivamente.

En el conteo total de colonias de levadura microorganismos fue empleada la dilución 10^5 , que dio la mejor definición para el conteo.

3.2.5 Análisis Estadístico

Inicialmente fue realizado para todas las variables un análisis de normalidad de errores mediante la prueba de Shapiro Wilkis, donde la variable conteo total de colonias de levadura no mostró distribución normal de errores. La variable fue transformada con raíz cuadrada para su análisis paramétrico.

Para las variables de composición química parcial y las colonias de levadura se selecciono un diseño de bloques al azar, donde el control local fue el factor tiempo de medición. La comparación de efectos medios fue realizada mediante la Prueba de Tukey. Todos los análisis fueron conducidos con el paquete estadístico SAS Versión 9.0.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1 Variables químicas

3.3.1.1 Proteína cruda

Se encontró un incremento significativo ($P<0.05$) de porcentaje de proteína cruda en el tratamiento con levadura (1%), S.A. (0.1%) y urea (1 %), obteniéndose en el tratamiento con movimiento de 1h y 1h de reposo (49 %) respecto al tratamiento con solo levadura (12 %), al testigo (4 %) e incluso al mismo tratamiento bajando el tiempo de movimiento (1.5 h) y aumentando el tiempo de reposo (2.5 h). El aumento en proteína cruda puede ser atribuido a la aireación que se tuvo durante la fermentación lo que probablemente favoreció el aumento de los microorganismos y con ello la producción de proteína.

Según González (1995) en la clasificación de la calidad de los forrajes el contenido de proteína cruda es un indicador importante de dicha calidad. Considerando este factor (Figura 14), los valores registrados en el tratamiento con levadura al 1 % y en el testigo es de mala calidad mientras que los tratamientos con levadura al 1 % mas 0.1 % de sulfato de amonio y 1 % de urea en los dos tiempo evaluados de movimiento y reposo resultan de excelente calidad.

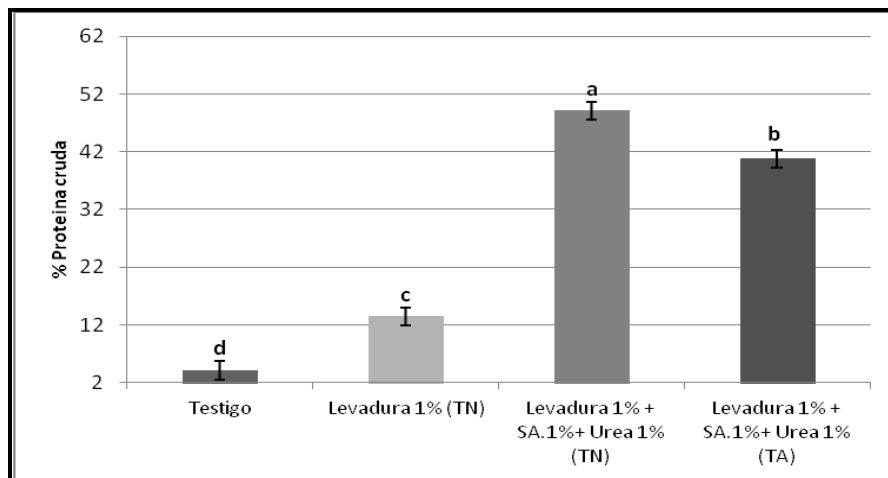


Figura 17. Porcentaje de proteína cruda en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).

3.3.1.2 Fibra detergente ácido (FDA)

El nopal fermentado en general obtuvo valores menores que 17 % de FDA (Figura 15). Por esto el nopal puede ser considerado como forraje de excelente calidad. En el contenido de FDA destaco el tratamiento testigo con un valor menor que el resto de los tratamientos. La FDA es un factor importante en forrajes ya que esta correlacionada negativamente con su digestibilidad (González, 1995) forraje con valores altos de FDA es menos digerible.

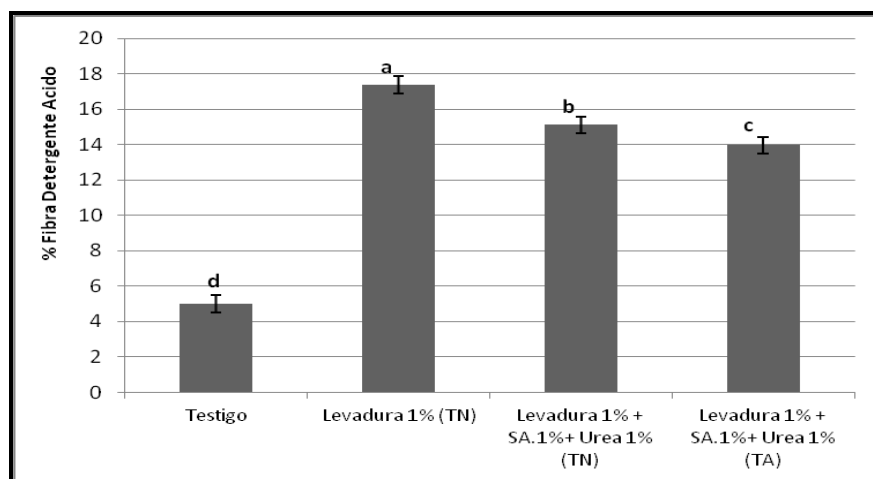


Figura 18. Porcentaje de fibra detergente acido en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.1.3 Fibra detergente neutro (FDN)

Los valores de fibra detergente neutro en nopal fermentado (Figura 19), resultaron superiores al FDA (Figura 18), lo que muestra que el nopal se encuentra debajo de los límites de referencia e indica que es un forraje de excelente calidad resultando el tratamiento con solo levadura (21%) el más alto estadísticamente.

Según González (1995) cuando la FDN aumenta en el forraje los animales consumirán menor cantidad. La FDN aumenta con el avance de la madurez de los forrajes. Utilizando la FDN se puede lograr una mejor predicción del consumo de forraje y por lo tanto raciones mejor formuladas.

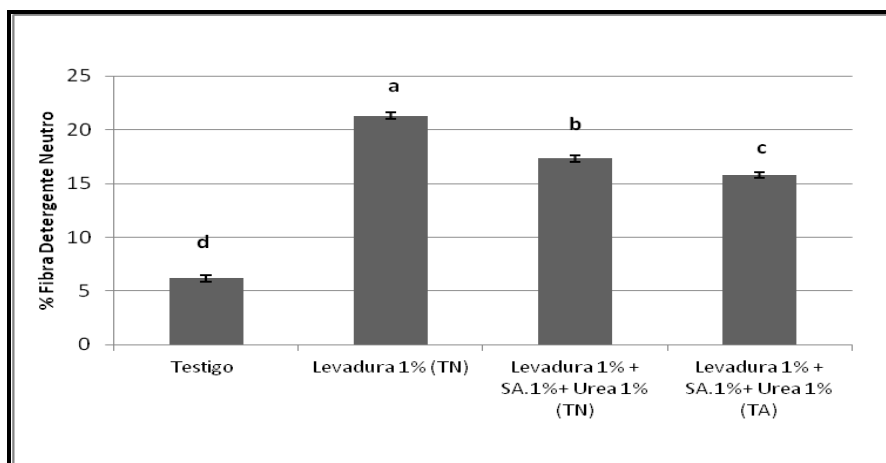


Figura 19 . Porcentaje de fibra detergente neutro en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.1.4 Carbohidratos no fibrosos (CNF)

Los carbohidratos son necesarios para la fermentación. Se observó en el tratamiento testigo los valores mayores de carbohidratos (superiores al 50%). En la fermentación con levadura 1% + sulfato de amonio al 0.1 % + urea al 1 %, existe una reducción de este componente por efecto del crecimiento de las levaduras (Figura 20). Es conveniente destacar que el tratamiento con urea al 1 % con movimiento de 1 h y 2.5 h de reposo, el contenido de carbohidratos fue significativamente menor que en los otros tratamientos; por lo que la fermentación pudo ser más eficiente al aumentar el movimiento y consumir casi la totalidad de carbohidratos.

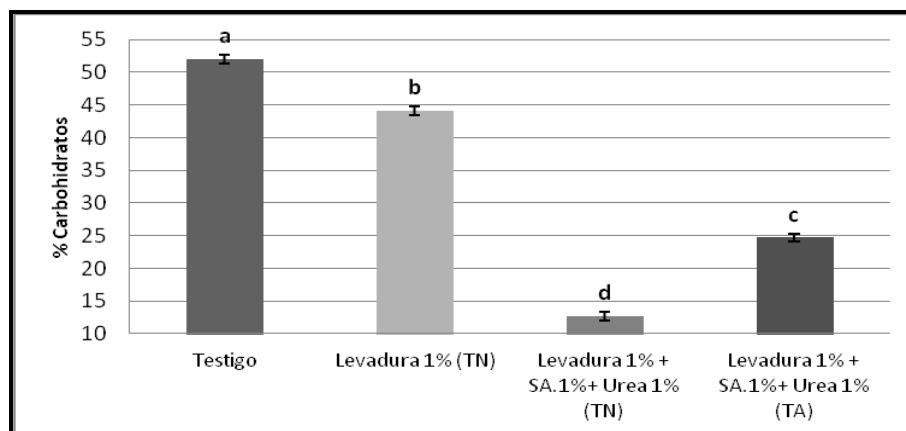


Figura 20. Porcentaje de carbohidratos en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.1.5 Nutrientes digeribles totales (NDT)

Otro de los componentes importantes en la formulación de las dietas se refiere a los nutrientes digeribles totales (Figura 21). Todos los tratamientos de nopal presentaron alto contenido de estos nutrientes (50 a 67 %), destacando el tratamiento con levadura 1% + SA 0.1% u urea 1% en tiempo de movimiento 0.5 h y reposo 2.5 h.

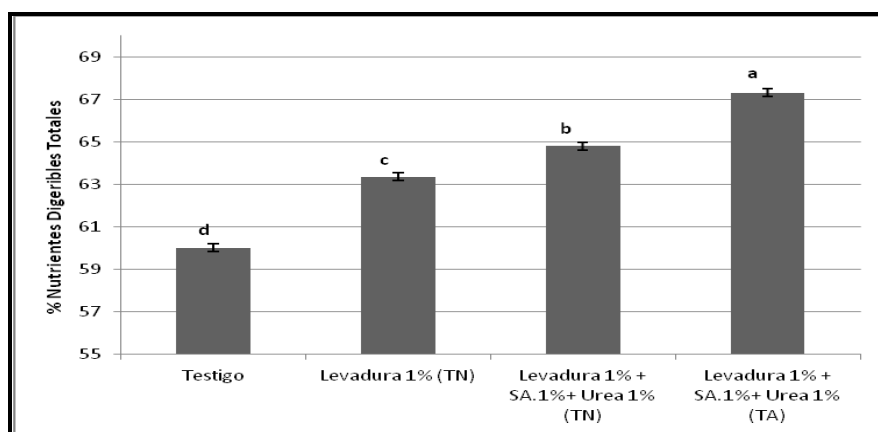


Figura 21. Porcentaje de nutrientes digeribles totales en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.1.6 Energía metabolizable (EM)

El alimento es la fuente de energía tanto para el hombre como para los animales. Los carbohidratos, grasas y proteínas que provee el alimento al organismo pueden ser usados como energía para regular la temperatura corporal y mantener las funciones vitales del crecimiento, actividad, producción y reproducción (Maynard *et al.*, 1979), eliminando la energía que se pierde en el proceso de digestión y desechos fecales se obtiene la energía metabolizable, que es la que el organismo puede transformar directamente. En este estudio se encontró que el mejor tratamiento es cuando se combina la levadura con 0.1 % de sulfato de amonio + 1 % de urea con 1h de movimiento y 1 h de reposo, ya que se obtienen 2.82 %, cuando se aplica 0.5 h de movimiento y 2.5 h de reposo los valores de EM son ligeramente menores (2.77 %) (Figura 22).

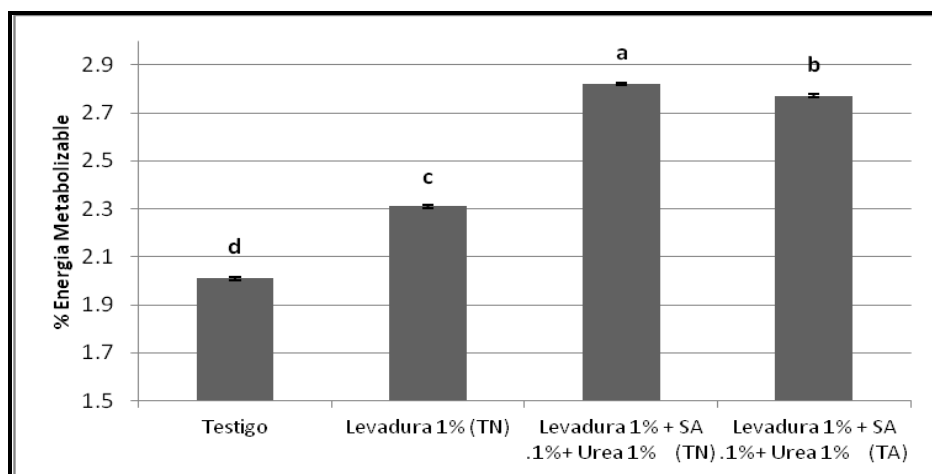


Figura 22. Porcentaje de energía metabolizable en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.1.7 Nitrógeno Amoniacal

El nitrógeno amoniacal es una medida de la degradación de la proteína que al estar escaso es un indicador de una correcta fermentación. (Dela Roza, 2005)

La producción de nitrógeno amoniacal es un indicador de la degradación de las proteínas por microorganismos que participan en el proceso de fermentación del ensilaje. El nitrógeno amoniacal al igual que el pH, pueden ser utilizados como indicadores de calidad

de la fermentación. Un ensilaje de buena calidad puede tener un 10 % de nitrógeno amoniacal con relación al nitrógeno total. Si la cantidad del nitrógeno amoniacal es mayor del 20 %, será de mala calidad el ensilaje (Hiriart, 1998).

En este estudio se observó que los tratamientos testigo al igual que la fermentación con levadura (1%) tuvieron una cantidad mínima de nitrógeno amoniacal, formado naturalmente por la fermentación. Sin embargo, en el tratamiento con levadura al 1 % + sulfato de amonio al 0.1 % + urea al 1 % con tiempo anterior y tiempo nuevo obtuvieron bajos niveles (1.97- 2.76 % respectivamente). Los cuales acumularon la cantidad mayor de proteína.

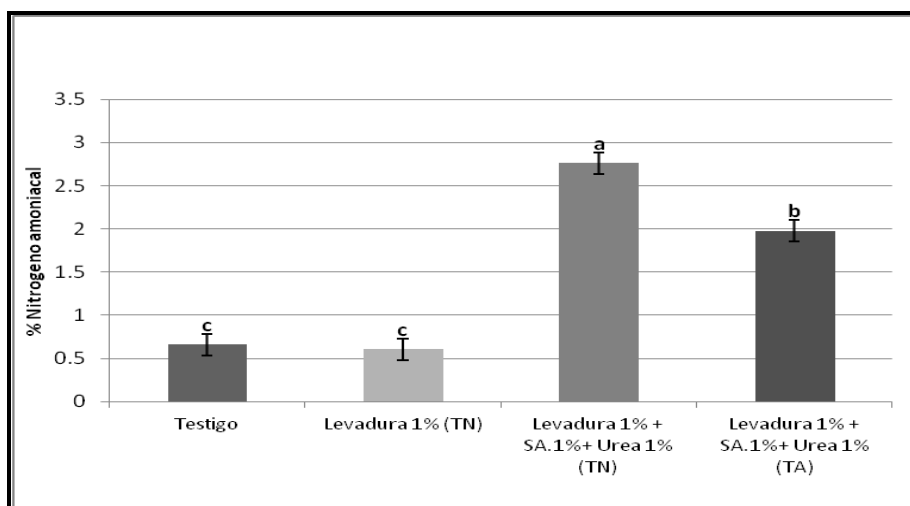


Figura 23. Porcentaje de nitrógeno amoniacal en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo).

Al obtenerse cantidades considerablemente bajas de nitrógeno amoniacal en nopal fermentado, que era lo que impedía recomendarse como forraje, por lo que ahora se puede recomendar sin esta limitante. El tratamiento con el tiempo nuevo (1 hora de movimiento y 1 hora de reposo) fue a la vez el más alto en contenido de proteína.

3.3.1.8 Materia Seca

La concentración de materia seca, puede indicar en la fermentación la cantidad del producto fermentado con posibilidad de almacenarse. Al llevar a cabo una fermentación de nopal a gran escala el proceso puede ser detenido por deshidratación para poder almacenar el producto: El momento ideal para detener el proceso puede ser determinado en función a la concentración de Proteína cruda o Proteína verdadera ya que este es uno de los mejores indicadores de la síntesis microbiana de proteína (Rodríguez *et al.*, 2001). Los resultados altamente significativos en materia seca fueron obtenidos en el tratamiento de urea 1 % con el tiempo anterior de 0.5h de movimiento y 2.5h de reposo (14.65 %) (Figura 24).

Es conocido que los sustratos pierden materia seca durante la fermentación (Calderón *et al.*, 2005; Joshi y Sandhu, 1996; Hang *et al.*, 1981; Peñaloza *et al.*, 1985; Rolz *et al.*, 1986; Rodríguez *et al.*, 2001b; Ruíz *et al.*, 2002) provocando un incremento en la concentración relativa en base seca de algunos componentes, como por ejemplo la fibra, proteína cruda (Rodríguez *et al.*, 2001b) y la concentración de cenizas (Joshi y Sandhu, 1996; Peñaloza *et al.*, 1985;).

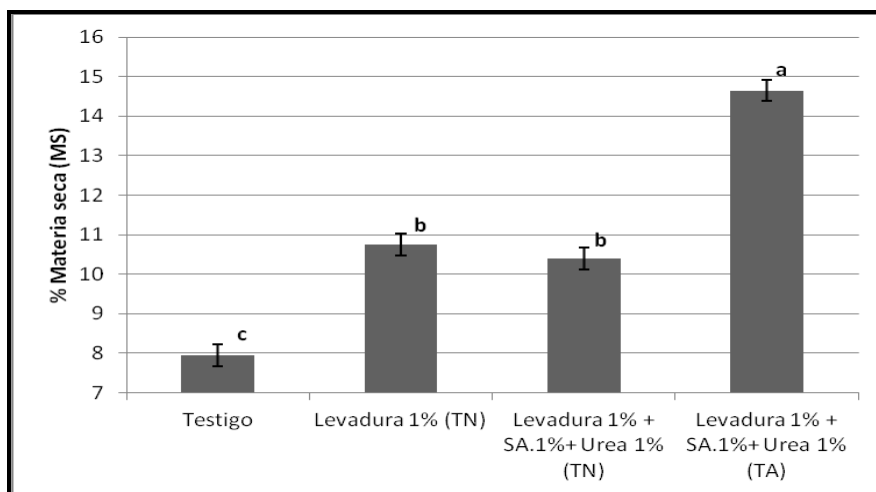


Figura 24. Porcentaje de materia seca en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.1.9 Humedad

Resultan estadísticamente iguales los tratamientos testigo, con levadura al 1 % y con urea al 1 % (TN), el tratamiento con humedad más baja fue el de tiempo anterior con un 85 %. Lo anterior coincide con los valores de materia seca. A mayor humedad menor materia seca y viceversa.

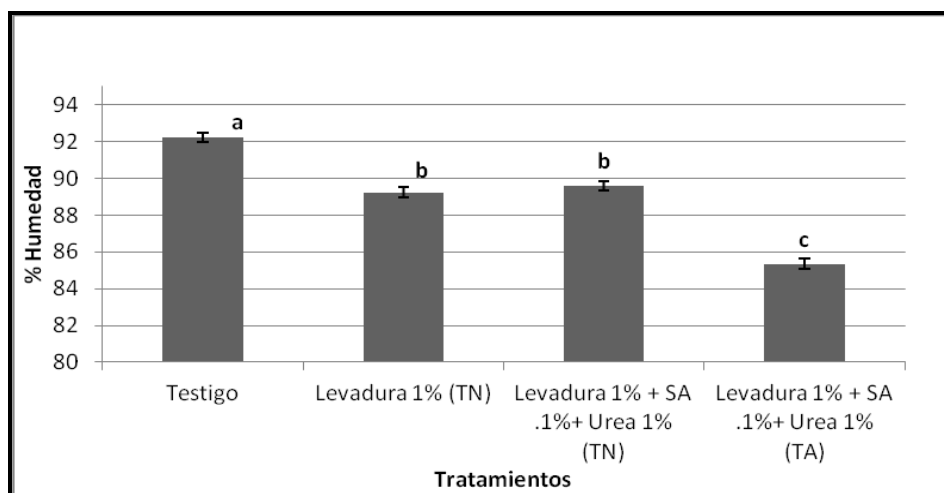


Figura 25. Porcentaje de humedad, en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.2 Variables físicas

3.3.2.1 PH y Temperatura

Durante la fermentación semisólida de nopal forrajero se registró la variación de pH (Figura 26), donde solo el tratamiento testigo fue el más ácido (2.0 %), los demás tratamientos registraron un pH recomendable para la multiplicación de levadura de 3.5 a 5.0 (Rose, 1987a), aún y cuando se suministró en los dos últimos el sulfato de amonio (1 y 2%) que pudieran bajar el grado de acidez. Lo anterior indica que la levadura, el sulfato de amonio y urea modifican el pH del medio de fermentación y se registró ácido con tendencia a neutro. La temperatura (Figura 27), también presento variación significativa en los tratamientos con la adición de algún nutriente (de 15 a 18) y el tratamiento testigo obtuvo la menor (11.0 °C). Debe indicarse que este factor depende de la temperatura ambiental y como los tratamientos se llevaron a cabo en diferentes fechas (aunque próximas) se deben

correlacionar con la temperatura ambiental y detectar que tanto influye la temperatura de fermentación (tanque) con la temperatura del ambiente durante el proceso.

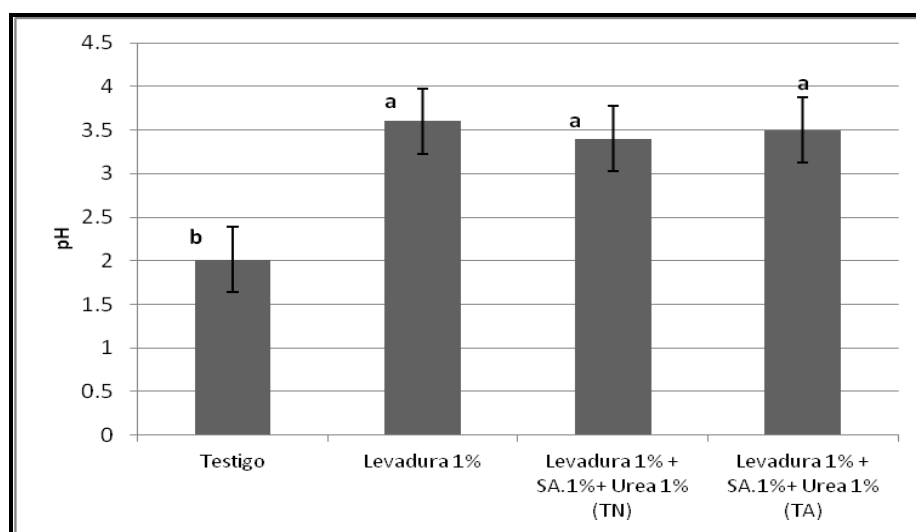


Figura 26. Valores de pH en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

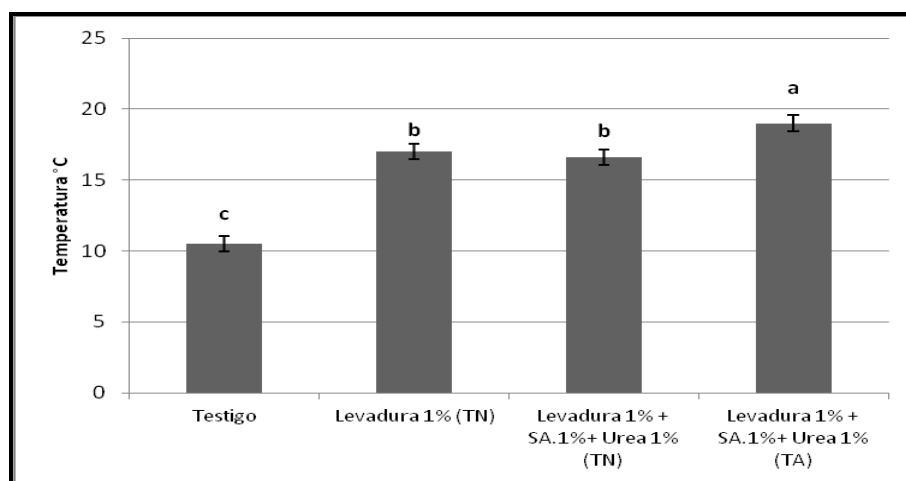


Figura 27. Valores de temperatura en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.3 Conteo de levaduras en el medio de cultivo

La raíz cuadrada del número de colonias desde el inicio hasta las 24h de fermentación indicó que el crecimiento de la población de levaduras siguió una distribución normal con un punto máximo a las 12 h del proceso a partir del cual se registró una disminución progresiva de dicho crecimiento (Figura 28). Las muestras de nopal de los tratamientos con levadura (1%), urea al 1 % y sulfato de amonio (0.1%) en tiempo de ½ h de movimiento y aireación, y 2 ½ h de reposo, presentaron los mayores valores en el punto de máximo crecimiento de la población (12 h) con un valor de $1,300 \times 10^5$ por ml de muestra.

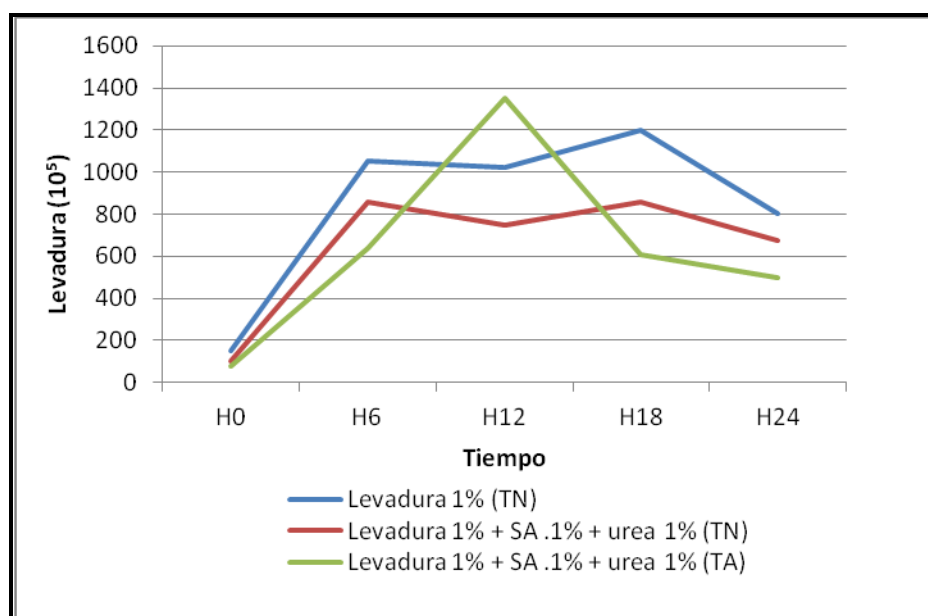


Figura 28. Crecimiento de numero de colonias de levadura por ml en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.3.4 Análisis de la interacción población de levaduras vs porcentaje de proteínas en la fermentación semisólida de nopal

Tratamiento levadura 1% (TN)

La relación entre el porcentaje de proteína y el crecimiento de la levadura no es congruente principalmente en el tiempo inicial (H0) y en menor proporción en el tiempo final (H24), existe una coincidencia entre el mayor porcentaje de proteína con el mayor crecimiento de levadura a las 18 horas del proceso pero ello no es indicador de la relación estrecha entre ambos factores.

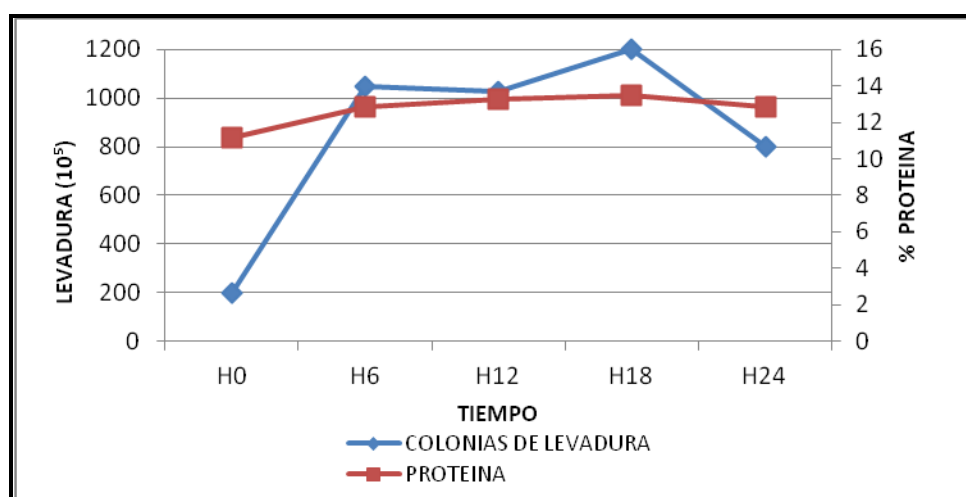


Figura 29. Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* y complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

Tratamiento levadura 1% + sulfato de amonio .1% + urea 1% (TN)

En el tratamiento con levadura 1% + SA .1% y urea al 1% con el tiempo de 1 hora de movimiento y 1 hora de reposo, el porcentaje de proteína y el crecimiento de levadura aumentan considerablemente en un inicio manteniéndose con mínima variación después de las 6 horas. El crecimiento de la levadura presenta mayor variación durante el proceso con una caída pronunciada a las 18 h en relación al porcentaje de proteína. Los

altos valores obtenidos pueden atribuirse a la presencia de más movimiento y aireación (1h de movimiento y 1 h de reposo) ya que este mismo tratamiento con menor movimiento y aireación (1/2 h de movimiento y 21/2 h de reposo) presento valores cercanos al 40% de proteína cruda. Aunque el crecimiento de la levadura fue mucho menor en el primer tratamiento (TN) que en el segundo (TA).

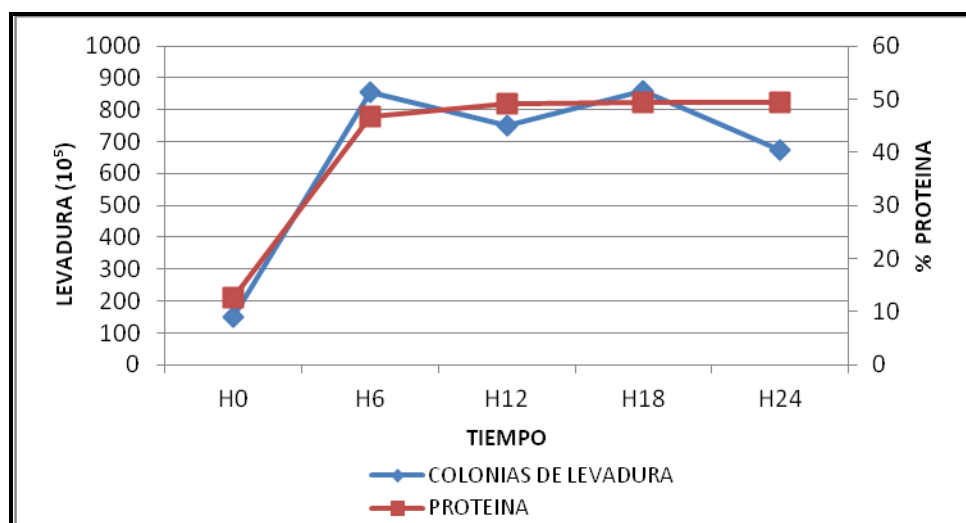


Figura 30. Interacción de crecimiento de numero de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* complementado con sulfato de amonio (SA) y urea en el tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

Tratamiento levadura 1% + sulfato de amonio .1% + urea 1% (TA)

La relación entre el crecimiento de la levadura y el porcentaje de proteína cruda se mantiene como en los otros tratamientos hasta 6 horas, después de la cual las tendencias son muy diferentes, en este tratamiento en particular el crecimiento de la levadura manifiesta una distribución normal mientras que el contenido de proteína no indica descenso en sus valores incluso aumenta ligeramente hasta las 24h. Los valores de este tratamiento como ya se indico son menores en contenido de proteína al tratamiento anterior aunque el crecimiento de levaduras sea significativamente mayor.

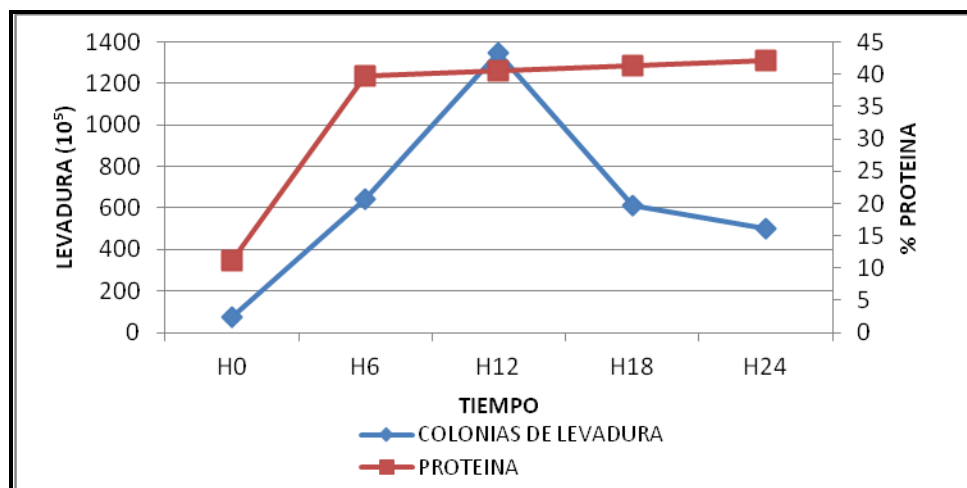


Figura 31. Interacción de crecimiento de número de colonias de levadura por ml vs porcentaje de proteína en muestras de nopal (*Opuntia* spp.) forrajero, fermentado con *Sacharomyces cereviceae* complementado con sulfato de amonio (SA) y urea. TA: tiempo anterior (0.5h movimiento y 2.5h de reposo), TN: tiempo nuevo (1h movimiento y 1h de reposo)

3.4 CONCLUSIONES

El Porcentaje de nitrógeno amoniacal que ocasionaba la mala calidad del nopal como forraje fue reducido a niveles seguros del 2.76 % y mayor contenido de proteína cruda (49%) y energía metabolizable (2.82%) en el tratamiento de levaduras 1% + SA 0.1% + urea 1% con 1 h de movimiento y 1 h de reposo.

El crecimiento de la población de levaduras durante la fermentación siguió una distribución normal con un punto máximo a las 12 h. En este punto el tratamiento con levadura (1%), urea al 1 % y sulfato de amonio (0.1%) en tiempo de ½ h de movimiento y aireación, y 2 ½ h de reposo presentó el mayor crecimiento de la población, aunque ello no corresponde con el mayor porcentaje de proteína cruda.

Existe una relación muy estrecha entre el crecimiento en número de colonias de levaduras y el aumento en porcentaje de proteína cruda solo en las primeras 6 h del proceso de fermentación a partir del cual existen tendencias diferentes entre ambos factores. Se debe entender que la proteína una vez producida no tiene que descender en contenido como es el caso del crecimiento de la levadura.

3.5 LITERATURA CITADA

- De la Roza, B. 2005.** El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín (Pontevedra), p. 1-20.
- 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, Chih., México.
- González, A. 1995.** Determinación de la calidad de los forrajes. Ciclo Internacional de Conferencias sobre Nutrición y Manejo .La importancia de los forrajes en la optimización económica. Envases Especializados de La Laguna. S.A. de C.V. Gómez Palacio, Dgo. Pág. 69-73.
- Gutiérrez O. E.; Arabel E.; Bernal, H. y Morales, H. 2008.** Usos alternativos del Nopal Forrajero. VI Simposium Taller Producción y aprovechamiento del Nopal Forrajero en el Noroeste de México. Facultad de Agronomía UANL. Revista Salud Pública y Nutrición Edición Especial No. 14-23p.
- Henneberg; Stohmann.1867.** Método de Weende. Alemania.
- Hiriart Le-Bert Mauricio. 1998.** Ensilados procedimientos y calidad. Ed Trillas. S.A de C.V. México DF. pp. 5-95
- Jones, C. y Thomas, C. 1987.** Maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing. Página en. Biotechnology in the Feed Industry. T.P. Lyons eds. Alltech's. Biotechnology Center. Nicholasville, Kentucky. USA.
- Joshi, V. K. y D. K. Sandhu. 1996.** Preparation and Evaluation of an Animal Feed Byproduct Produced by Solid-State Fermentation of Apple Pomace. Bioresource Technology. 56:251-255.

- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S y Itabashi, H. 2004.** Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. J. Anim. Sci. 82:1847-1854.
- Madigan M. T., Martinko J. M. y Parker J. 2004.** Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Pearson educación, s.a., Madrid España. 1011pp.
- Maynard L. A., Loosli J., Hintz H. y Warner R. 1981.** Nutrición Animal. 4a Edición, Libros McGraw-Hill de México, S. A. de C. V. México DF. 640pp.
- Peñaloza, W., Molina M. R., Gómez-Brenes R. y Bressani R. 1985.** Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. Applied and Environmental Microbiology. 49(2):388-393.
- Rodríguez, Z., Elías, R. B. y Núñez O. 2001.** Efectos de los Niveles de Nitrógeno Ureico en la Síntesis Proteica Durante la Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata Lam.*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 35(1):29-36.
- Rodríguez, Z., Bocourt R., Elías A. y Madera M. 2001b.** Dinámica de Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 35(2):147-151.
- Rolz, C., de León R, de Arriola M. C. y de Cabrera S. 1986.** Biodelignification of Lemon Grass and Citronella Bagasse by White-Rot Fungi. Applied and Environmental Microbiology. 52(4):607-611.
- Ruíz, C. J., Ruíz M., Ruíz G. y Torres V.. 2002.** Effect of Inclusion of Ammonium Sulfate on the Elaboration of Rustic Saccharina. Cuban Journal of Agricultural Science. 36(2):147-152.