



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO  
EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN  
AERÓBICA DEL NOPAL PARA SU USO EN LA ALIMENTACIÓN  
ANIMAL

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

**ELBA MARTHA MARTÍNEZ MÉNDEZ**



Bajo la supervisión de: GILBERTO ARANDA OSORIO

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
OFICINA DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, mayo de 2019

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN AERÓBICA DEL  
NOPAL PARA SU USO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Tesis realizada por **ELBA MARTHA MARTÍNEZ MÉNDEZ** bajo la supervisión del  
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito  
parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA**

DIRECTOR:



---

Ph.D. GILBERTO ARANDA OSORIO

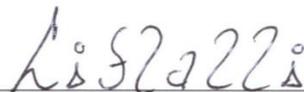
ASESOR:



---

DR. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

ASESOR:



---

DRA. CITLALLI CELESTE GONZÁLEZ ARICEAGA

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE APÉNDICES .....	vii
DEDICATORIAS .....	viii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Fermentación.....	3
2.1.1 Fermentación sólida.....	4
2.1.2 Fermentación líquida .....	4
2.2 Uso de microorganismos en la alimentación animal.....	5
2.2.1 <i>Aspergillus oryzae</i> .....	6
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
2.2.3 Bacterias ácido lácticas.....	9
2.3 Nopal .....	10
2.4 Literatura citada.....	12
3 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN AERÓBICA DEL NOPAL	18
3.1 Resumen .....	18

3.2	Abstract .....	19
3.3	Introducción .....	20
3.4	Materiales y métodos .....	21
3.4.1	Localización .....	21
3.4.2	Inóculos microbianos .....	21
3.4.3	Fermentación aeróbica del nopal.....	22
3.4.4	Toma de muestras .....	22
3.4.5	Determinación de la población microbiológica .....	23
3.4.6	Determinaciones nutricionales .....	24
3.4.7	Análisis complementario de nitrógeno .....	24
3.4.8	Análisis estadístico .....	24
3.5	Resultados y discusión.....	25
3.5.1	pH y temperaturas .....	25
3.5.2	Dinámica poblacional de los microorganismos .....	27
3.5.3	Análisis químico proximal y fracciones de fibras.....	29
3.5.4	Comportamiento del nitrógeno y su relación con los microorganismos.....	31
3.6	Conclusiones .....	33
3.7	Recomendaciones.....	34
3.8	Agradecimientos.....	34
3.9	Literatura citada.....	34
4	APÉNDICES.....	39

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de la toma de muestras para un ciclo de fermentación de 72 horas <sup>1</sup> .....	23
Cuadro 2. Comportamientos del pH (pH-M) y las temperaturas de la muestra (TM), y temperatura ambiental (TA) durante la fermentación aeróbica del nopal. ....	25
Cuadro 3. Promedios (%) obtenidos del análisis químico proximal y fracciones de fibras en base seca <sup>2</sup> de la fermentación aeróbica del nopal.....	29

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Dinámica poblacional de las bacterias lácticas, levadura y hongo durante la fermentación aeróbica del nopal. ....	28
Figura 2. Variaciones del nitrógeno total (N total), ureico (N ureico) y amoniacal (N amoniacal) durante la fermentación del nopal.....	32

## LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. <i>Aspergillus oryzae</i> en Agar Papa Dextrosa después de 5 días de incubación.....	39
Apéndice 2. Licuadora industrial utilizada durante el experimento. ....	40
Apéndice 3. Biodigestor vertical.....	41
Apéndice 4. Crecimiento de los microorganismos durante la fermentación aeróbica del nopal ( $\text{Log}_{10}$ UFC $\text{mL}^{-1}$ ). ....	42
Apéndice 5. Cuadro completo de los resultados obtenidos del análisis químico proximal y fracciones de fibras expresados en porcentaje (%). ....	43
Apéndice 6. Promedios (%) de las concentraciones de nitrógeno total, ureico y amoniacal durante la fermentación del nopal. ....	44

## **DEDICATORIAS**

A Dios que siempre me acompaña en mis PADRES, HERMANOS y AMIGOS...

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la Universidad Autónoma Chapingo a través del Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia y el Posgrado en Producción Animal por la formación.

Al Comité Asesor por su valiosa dirección, dedicación, apoyo, confianza y, por compartir sus conocimientos y amistad durante mi estancia como estudiante.

A cada uno de los profesores que conforman el Posgrado, por contribuir en mi formación.

A la M.C. Hilda Flores Brito y al Ing. Benito Olivera, por su tiempo, paciencia, dedicación y conocimientos para la realización de esta tesis.

Al profesor Macario Cruz por su tiempo, apoyo y conocimientos durante la fase de campo.

A los laboratoristas: Laura, Carmen, Eva, Emilio y Aldo, por su ayuda, amistad y por hacer más amena mi estancia en los laboratorios.

## DATOS BIOGRÁFICOS



### Datos personales

Nombre: Elba Martha Martínez Méndez  
Fecha de nacimiento: 6 de septiembre de 1990  
Lugar de nacimiento: San Francisco Cajonos, Oaxaca  
CURP: MXME900906MOCRNL07  
Profesión: Médico Veterinario Zootecnista  
Cédula profesional: 10101529

### Desarrollo académico

Maestría en Ciencias: Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo  
2017-2018  
Licenciatura: Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco  
2011-2015

# 1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos han sido utilizados en la producción de alimentos para humanos y animales, siendo en estos últimos usados como aditivos o suplementos. Los microorganismos más utilizados para la alimentación animal son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Aspergillus oryzae* (Chiquette, 1995); además, estos forman parte del grupo de microorganismos considerados como probióticos y fuente de proteína (Caja, González, Flores, Carro, & Albanell, 2003; Cortés-Sánchez, Guadarrama, & Díaz-Ramírez, 2014).

El cultivo de los microorganismos en condiciones fermentativas, utilizando como sustrato forrajes de buena o mala calidad, suele ser fuente de alimento animal (Cortés-Sánchez et al., 2014), ya que la fermentación mejora la digestibilidad y concentra proteínas en el sustrato (Day & Morawicki, 2018); lo resultante de este proceso dependerá del sustrato y microorganismo utilizado.

Por otra parte, el nopal es una planta que pertenece a la familia *Cactaceae*, puede crecer en zonas áridas y semiáridas (Andrade-Montemayor, Cordova-Torres, García-Gasca, & Kawas, 2011; El-Mostafa et al., 2014); dentro de las más de 300 especies, de 10 a 12 se han aprovechado por el hombre para su alimentación, forraje para rumiantes e industrialización (obtención de alcohol, colorantes, jabón, pectinas y aceites) (Torres-Ponce, Morales-Corral, Ballitas-Casarrubias, & Nevárez-Moorillón, 2015).

Las principales especies de nopal usadas como forraje incluyen *Opuntia ficus-indica* Mill., y *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck (Dubeux, Salem, & Nefzaoui, 2018; Flores-Hernández, Acosta-Rodríguez, Murillo-Amador, Trejo-Calzada, & Arreola-Avila, 2006); en México, de acuerdo con algunos autores (Anaya-Pérez, 2002; Anaya-Pérez & Bautista-Zane, 2008; López-García, Fuentes-Rodríguez, & Rodríguez-Gámez, 2002), se tiene registro de su uso durante las sequías en zonas semiáridas y con pastizales disminuidos, ya sea en pastoreo, chamuscado *in situ*, o la recolección de cladodios para ganado estabulado.

Por las características nutricionales del nopal, alto contenido de carbohidratos solubles, bajos contenidos de fibra y proteína cruda (PC) (Torres-Ponce et al., 2015), se han buscado alternativas para su uso en la alimentación animal; por ejemplo, procesos de fermentación que permitan su comparación con otros forrajes de alto valor proteico con resultados similares en ganancia de peso (Nunes-Medeiros et al., 2004), o la fertilización basada en la aplicación de compuestos nitrogenados que puedan aumentar el contenido de PC (Gonzalez, 1989).

Villas Boas y Esposito (2000, citado por Araújo, Nunes-Medeiros, Perazzo-Neto, Conrado-Oliveira, & Honorato da Silva, 2005) especularon que, si se utiliza al nopal como sustrato para el cultivo de hongos, y se le adicionan sales de fosfato, potasio y calcio, se puede aumentar el contenido de proteína microbiana, incrementando el valor nutricional del nopal, además de contener algunas vitaminas del complejo B. Algunos autores han reportado incrementos de 12 hasta 26% de PC al fermentar el nopal con hongos (Oliveira, 2001) o levaduras (Araújo et al., 2005; Araújo, Silva, Brito, Oliveira, & Santos, 2008).

En este contexto, en la Universidad Autónoma Chapingo se ha buscado desarrollar un paquete tecnológico dirigido a pequeños productores, basado en una técnica desarrollada en Brasil, en la cual se fermenta aeróbicamente nopal adicionando microorganismos para aumentar el contenido proteico del nopal. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue caracterizar el enriquecimiento proteico del producto de la fermentación aeróbica del nopal, para usarse en la alimentación animal.

En el Capítulo 2 se encuentra la revisión de literatura sobre temas que definen a la fermentación y sus usos, las características de las bacterias lácticas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Aspergillus oryzae* utilizados en esta Tesis y las características del nopal.

En el Capítulo 3 se presenta el artículo científico derivado del trabajo de Tesis, que muestra los resultados obtenidos en esta investigación.

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Fermentación

Desde tiempos antiguos, los seres humanos han utilizado la fermentación, ya sean en estado sólido o líquido, independientemente del estado de la fermentación puede ser aeróbica o anaeróbica. Estas han sido utilizadas para la producción de alimentos para humanos y animales, combustibles, enzimas, así como otros usos industriales (Biesebeke et al., 2002; Robinson, Singh, & Nigam, 2002).

De acuerdo con la definición del Diccionario de la Lengua Española (RAE, 2017) y la Enciclopedia Británica (Encyclopædia Britannica, 2017), la fermentación es el proceso químico mediante el cual las moléculas de la glucosa se degradan por acción enzimática. Por otra parte, Day y Morawicki (2018) mencionan que la fermentación es un método de procesamiento que mejora la digestibilidad y al mismo tiempo concentra proteínas en un sustrato; estos autores sugieren que el incremento de la proteína puede ser por la acumulación de biomasa microbiana o por la concentración de proteína que ya se encuentra en el sustrato a medida que se consumen los carbohidratos. En los productos derivados de la fermentación se encuentran, además, altas concentraciones de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, que son los productos finales del proceso catabólico desarrollado por microorganismos como los *Lactobacillus* (van Wisen et al., 2001).

El mecanismo de la fermentación depende del sustrato y el microorganismo utilizado (Day & Morawicki, 2018), por lo cual, Sandhya, Sumantha, Szakacs y Pandey (2005) recomiendan que la composición del medio de fermentación debe mantener un equilibrio entre los componentes del mismo, minimizando así la cantidad sustrato no utilizado en la fermentación. Los factores críticos para el crecimiento microbiano y la actividad de un sustrato son el tamaño de partícula y el nivel de humedad, particularmente la actividad del agua (Pandey, Soccol, &

Mitchell, 2000; Rodríguez-Couto & Sanromán, 2006; Singhania, Patel, Soccol, & Pandey, 2009).

### **2.1.1 Fermentación sólida**

La fermentación sólida se define como cualquier proceso de fermentación que ocurre en ausencia o cercano a la ausencia de agua libre (Pandey et al., 2000); sin embargo, el sustrato debe contener suficiente humedad para apoyar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo (Pandey, 2003), esta es una buena opción para utilizar desechos sólidos ricos en nutrientes como sustrato.

En este tipo de fermentación, de acuerdo con Torres-Ponce et al. (2015), el principio se basa en el metabolismo de la glucosa por acción de las levaduras; por consiguiente, es necesario que la glucosa sea liberada y, una de las estrategias más utilizadas para tal efecto es la hidrólisis ácida. La levadura procesa los azúcares reductores que son directamente metabolizados para producir etanol, furfural, y compuestos fenólicos, entre otros.

La fermentación sólida tiene gran importancia en la alimentación animal, ya que por sus características se pueden utilizar eficientemente residuos agroindustriales y subproductos, los usos más comunes de este tipo de fermentación son los ensilajes.

### **2.1.2 Fermentación líquida**

La fermentación líquida se ha definido como aquella que ocurre en presencia de exceso de agua (Singhania, Sukumaran, Patel, Larroche, & Pandey, 2010). Se ha utilizado principalmente en la producción de enzimas a gran escala, debido a que se tiene un mejor control de procesos, facilidad de manejo y recuperación fácil de enzimas extracelulares, micelios o esporas (Sandhya et al., 2005; Singhania et al., 2010).

Los hongos desempeñan un papel clave en la fermentación sólida, ya que el desarrollo de hifas les permite colonizar y penetrar eficazmente el sustrato sólido (Pandey et al., 2000). Sin embargo, el agua es frecuentemente un factor limitante

para el crecimiento de hongos y la eliminación de calor es uno de los principales problemas de la fermentación sólida a gran escala (Biesebeke et al., 2002). Esto no ocurre en la fermentación líquida, ya que permite más control en parámetros como pH, calentamiento, condiciones nutricionales, etc. (Robinson et al., 2002).

La principal ventaja de los procesos de fermentación líquida es que cuentan con una base tecnológica bien establecida para escalar los procesos de fermentación a nivel industrial (Hansen, Lübeck, Frisvad, Lübeck, & Andersen, 2015). Una medida precautoria para el buen funcionamiento de esta fermentación es garantizar la esterilidad previa y durante el proceso (Pandey et al., 2000). Los biorreactores utilizados más comúnmente para la fermentación líquida son tanques agitados, que se pueden usar continuamente para reducir la intensidad de trabajo y donde la transferencia de oxígeno es controlable (Hansen et al., 2015).

La importancia este tipo de fermentación radica en que esquilmos, bagazos, residuos agroindustriales y forrajes con contenido nutricional pobre pueden ser aprovechados y transformados en alimentos o complementos para la nutrición animal.

## **2.2 Uso de microorganismos en la alimentación animal**

Diferentes bacterias del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterias*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, así como levaduras y hongos, entre los cuales figuran *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* son considerados como probióticos y fuente de proteína unicelular para rumiantes y aves (Caja et al., 2003; Cortés-Sánchez et al., 2014).

García et al. (2008) reportaron que en la producción animal intensiva se utilizan actualmente los probióticos como promotores del crecimiento. Los probióticos son cultivos simples o mezclas de microorganismos vivos que, aplicados a los animales o al hombre, benefician al hospedador mejorando las propiedades de la microflora intestinal original (Zielińska & Kolożyn-Krajewska, 2018). Rodríguez,

Elías, Boucourt, y Núñez (2001) indican que la acción microbiana provoca una reducción de la materia seca, producto de la utilización de los carbohidratos en sus procesos metabólicos que generan agua, CO<sub>2</sub> y compuestos volátiles como los ácidos grasos volátiles (AGV).

De acuerdo con algunos autores (Pandey, 2003; Vandenberghe, Soccol, Pandey, & Lebeault, 2000) los microorganismos que constituyen los probióticos son principalmente bacterias capaces de producir ácido láctico, pero también se incluyen bacterias no lácticas, como levaduras y hongos. La mayoría de las cepas microbianas utilizadas como probióticos provienen del contenido gastrointestinal de diferentes especies animales y de sus heces (Martins et al., 2006; Mikkelsen, Bendixen, Jakobsen, & Jensen, 2003; Oyetayo, 2004).

De acuerdo con Chiquette (1995), los dos microorganismos de alimentación directa más utilizados en la nutrición animal son cepas específicas de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y hongos (*Aspergillus oryzae*). Este autor menciona que su adición en las dietas para rumiantes incrementa el consumo de alimento, mejora el número de bacterias celulolíticas y bacterias viables totales, aumenta la concentración ruminal de AGV; así mismo disminuye la concentración de ácido láctico e incrementa la digestión ruminal y total del alimento, lo que causa un incremento de la producción de leche.

Por lo tanto, la producción de biomasa o proteína unicelular a partir de diversos microorganismos como algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas adecuadas y con sustratos baratos, compuestos o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo, parecen ser una alternativa inmediata de fuentes alimentarias para la nutrición animal (Cortés-Sánchez et al., 2014).

### **2.2.1 *Aspergillus oryzae***

Los hongos filamentosos de interés industrial incluyen varias especies de *Aspergillus* spp., ya que son capaces de la adaptación al sustrato y producen varios metabolitos con altas actividades biológicas (Novelli, Barros, & Fleuri,

2016). *Aspergillus oryzae* es un hongo filamentoso catalogado como un organismo “Reconocido Generalmente como Seguro” (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (de Castro & Sato, 2014).

Es un hongo comúnmente usado en la industria de fermentación tradicional japonesa, incluso en la producción de salsa de soya, “sake”, condimento de crema de frijol y vinagre. De acuerdo con Machida, Yamada y Gomi (2008), este hongo tiene potencial prominente para la secreción de varias enzimas, que a pesar de ser muy cercano genéticamente a *A. flavus*, conocido por producir aflatoxinas, no tiene registros de producir aflatoxinas o algún otro metabolito carcinogénico.

*Aspergillus* contiene un amplio espectro de enzimas para la degradación de polisacáridos, proteínas y lípidos (Vries & Visser, 2001), particularmente, *A. oryzae* ha sido reportada con actividad celulasa, la cual es una enzima requerida para el catabolismo de la celulosa, esta enzima exhibe su pico alta actividad en un rango de pH de 4.0 a 6.0 (Begum & Absar, 2009; Saksombat, Homkaow, & Meepprom, 2018); la mayoría de estas enzimas que degradan la pared celular de las plantas, producidas por *Aspergillus*, son proteínas altamente glicosiladas, es decir, son proteínas unidas a uno o más carbohidratos (Vries & Visser, 2001).

### **2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae***

Las levaduras son hongos unicelulares que normalmente no desarrollan un micelio, sino que permanecen en estado unicelular durante todo el ciclo de crecimiento; normalmente prosperan en hábitats con abundante azúcar, tales como frutas, flores e incluso la corteza de los árboles, *Saccharomyces cerevisiae* se deriva de una levadura silvestre usada en la antigüedad para fabricar vino y cervezas, las células de esta levadura se utilizan también en la fabricación de pan (Madigan, Martinko, & Parker, 1999).

*S. cerevisiae* es muy tolerante al entorno ácido y su temperatura óptima suele ser 37 °C. Hu et al. (2018) encontraron que algunas cepas de *S. cerevisiae*

sobreviven a pH de 3.0-4.0, y reportan que algunas cepas pueden sobrevivir hasta los 42 °C. Esta levadura es uno de los microorganismos de alimentación directa comúnmente utilizados como suplemento en vacas lecheras (Throne, Bach, Ruiz-Moreno, Stern, & Linn, 2009).

La adicción a la dieta de un producto de fermentación de *S. cerevisiae* ha demostrado mejorar la presencia de *Bacteroides* y *Lactobacillus*, aumentando la altura de las vellosidades en el intestino delgado y desarrollando inmunidad sistémica en lechones destetados temprano (Preece et al., 2010). También en un tratamiento con esta levadura y lactobacilos mostró un menor riesgo de mortalidad post-destete en lechones, disminuyendo la concentración de citoquinas intestinales (proteínas que coordinan la respuesta del sistema inmunológico) y manteniendo un pH neutral en el íleon, lo cual inhibió el crecimiento de enterobacterias patógenas en el tracto intestinal, y se observó un mejor consumo (Méndez-Palacios, Méndez-Mendoza, Vásquez-Flores, Castro-Colombre, & Ramírez-Bribiesca, 2018).

En un estudio realizado en ovejas, Obeidat et al. (2018) hallaron un aumento mínimo en el consumo de materia seca y digestibilidad al suplementar con *S. cerevisiae*. Mientras que, Boonnop, Wanapat, Nontaso y Wanapat (2009) encontraron que al fermentar esta levadura con trozos de yuca se incrementó el contenido de PC y lisina, que al ser utilizada como suplemento en vacas (Khampa, Chaowarat, Singhalert y Wanapat, 2009) mejoró la eficiencia de la fermentación ruminal, la digestibilidad de nutrientes, y aumentó la producción de propionato y la población de bacterias ruminales.

Se ha observado un efecto positivo en la ganancia de peso al incluir la levadura en dietas para pollos durante el crecimiento, y puede ser una alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (Pouraziz, Aghdam, & Chekani-Azar, 2013). En esta misma especie, Mendieta et al. (2018) reportaron un incremento en la respuesta humoral local y en la respuesta inmune celular cuando se adicionaron células de la pared de *S. cerevisiae* a dietas.

### 2.2.3 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son Gram positivas, normalmente inmóviles y no esporuladas, el ácido láctico es el principal o único producto de su metabolismo fermentativo; la mayoría son anaerobios aerotolerantes, por lo que pueden crecer en presencia o ausencia del O<sub>2</sub> (Madigan et al., 1999; Martins et al., 2006). De acuerdo con Madigan et al. (1999), sus principales requisitos nutrimentales son aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas; y obtienen su energía principalmente del metabolismo de los azúcares.

Las BAL son los microorganismos comúnmente empleados como probióticos en animales (Brashears, Jaroni, & Trimble, 2003), de acuerdo con Cholis, Suthama y Sukanto (2018) al incluir *Lactobacillus* sp. en dietas con micropartículas de proteínas para pollos, se aumentó la población de BAL, la ganancia diaria de peso y la tasa de pasaje; así mismo, algunas cepas de bacterias probióticas muestran un efecto antagónico hacia bacterias resistentes a antibióticos (Arias et al., 2013).

Dinev et al. (2018) mencionan que *L. plantarum* es una especie importante dentro de las BAL por su excelente actividad antimicrobiana, algunos autores (Ng, Koon, Padam, & Chye, 2015) lo atribuyen a su tolerancia al estrés ambiental, como temperaturas elevadas y ambientes con mayor concentración de sal, y a su habilidad de mantener su pH intracelular en 4.5, aun cuando el pH extracelular se reduce a 3.0, podría ser utilizado como cultivo adjunto o incorporarse en un proceso industrial.

Las BAL no son únicamente microorganismos de alimentación directa, también se pueden utilizar en procesos fermentativos; Lokapirnasari et al. (2018) al fermentar paja de trigo con una cepa aislada de *Lactobacillus*, obtuvieron un aumento en el contenido PC y una disminución en fibra cruda; por otra parte, Galina et al. (2008) encontró que el ensilaje de maíz enriquecido con probióticos lácticos puede sustituir las bacterias ruminales por bacterias lácticas, provocando

un aumento en la tasa de pasaje del forraje, el consumo y la ganancia de peso en ovinos.

### **2.3 Nopal**

El nopal es una planta que pertenece a las cactáceas, es idónea para desarrollarse en zonas áridas y semiáridas, crece en medios con temperaturas extremas y presencia de lluvias erráticas (Torres-Ponce et al., 2015). Durante los periodos de sequía, el arbusto con y sin espinas de *Opuntia ficus-indica* juega un papel importante en el suministro de nutrientes para la cría de animales bovinos, ovinos, caprinos y fauna silvestre (Feugang, Konarski, Zou, Stintzing, & Zou, 2006).

La composición de los cladodios va a depender de diferentes factores como el sitio de cultivo, la estación del año, la edad de la planta, entre otros (Stintzing & Carle, 2005). Estos autores mencionan que los cladodios jóvenes muestran alto contenido de carbohidratos, proteínas y agua, por otra parte, otros autores (de Kock, 2002; Mejía-Haro, Delgado-Hernández, Mejía-Haro, Guajardo-Hernández y Valencia-Posadas, 2011) mencionan que los cladodios frescos sin espinas contienen aproximadamente 90% de humedad, bajo contenido de PC, no son un alimento balanceado sino una fuente de energía buena y barata; son turgentes, ricos en azúcares, provitamina A y vitamina C (Feugang et al., 2006). Pero debido al efecto laxante del nopal, atribuido a su alto contenido de ácido oxálico, algunos autores (Stintzing & Carle, 2005) recomiendan combinarlo con paja, aun cuando su bajo contenido de taninos y compuestos fenólicos facilite su digestión.

López-García et al. (2002) encontraron que, dependiendo de la especie de *Opuntia*, los valores de PC (en base seca) y materia seca, oscilan de 2 a 8% y 7 a 17%, respectivamente; del mismo modo, Santos, Santos, Farias, Dias y Andrade-Lira (2001) reportan 5.9 a 6.3% de PC y 11% de materia seca, en diferentes variedades de nopal. En general, el contenido de proteínas va disminuyendo con la edad (Stintzing & Carle, 2005).

Por lo anterior, se han buscado alternativas para hacer al nopal atractivo para la alimentación animal. Existen varias técnicas para aumentar el contenido de proteína del forraje del nopal; una medida es adicionando fertilizantes, N y P principalmente. De acuerdo con Stintzing y Carle (2005) una fertilización con N provoca un incremento de PC; otra opción es seleccionando genéticamente la variedad que contenga mayor porcentaje de proteína (Felker, 2002).

Al ensilar nopal con leguminosas forrajeras mejoró el contenido de materia seca y de N del producto (Gusha, Halimani, Ngongoni, & Ncube, 2015). En un estudio realizado por Flores-Hernández, Araújo-Filho, da Silva, Ramírez-Ordoñez y Murillo-Amador (2017), se reportan valores de 20.5% de PC en nopal enriquecido con *S. cerevisiae* y sulfato de amonio; estos mismos autores registraron mayor ganancia de peso al incluir el nopal enriquecido en una dieta (40:60, nopal enriquecido:heno de sorgo) para cabras criollas en estabulación.

Flores-Hernández et al. (2006) reportan que la elaboración de harina forrajera enriquecida de nopal, resultado de la adición de mezclas de minerales en un proceso de fermentación en estado sólido, permite la formación de proteína microbiana; así mismo, Mejía-Haro et al. (2011) concluyen que el uso de nopal fermentado para elaborar bloques multinutricionales es factible y mejora la calidad de los ingredientes, el proceso de elaboración es sencillo, económico para los productores y lo más importante, es consumido adecuadamente por los animales.

Así mismo, en otros estudios donde se fermentó nopal: con *A. niger* se reportan aumentos de 12% de PC (Oliveira, 2001), y con *S. cerevisiae* se obtienen incrementos de 10% (Araújo et al., 2008) y concentraciones 26% de PC (Araújo et al., 2005), lo cual muestra que la fermentación para el enriquecimiento proteico del nopal es factible.

## 2.4 Literatura citada

- Anaya-Pérez, M. A. (2002). History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. In Mondragón-Jacobo, C., & Pérez-González, S. (Eds.), *Cactus (Opuntia spp.) as forage* (pp. 5-12). Rome: FAO.
- Anaya-Pérez, M. A., & Bautista-Zane, R. (2008). El nopal forrajero en México: Del siglo XVI al Siglo XX. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 5, 167-183.
- Andrade-Montemayor, H. M., Cordova-Torres, A. V., García-Gasca, T., & Kawas, J. R. (2011). Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research*, 98, 83-92.
- Araújo, L. F., Nunes-Medeiros, A., Perazzo-Neto, A., Conrado-Oliveira, L. S., & Honorato da Silva, F. L. (2005). Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in Solid-State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 161-168.
- Araújo, L. F., Silva, F. L. H., Brito, E. A., Oliveira-Júnior, S., & Santos, E. S. (2008). Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 401-407.
- Arias O., B. A., Reyes M., M. L., Navarro V., M. L., Solis C., B. Y., Márquez G., M., Sanchez S., G., ... & Zuñiga R., R. (2013). Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* O157:H7 resistant to antibiotics. *e-Gnosis*, 11, 1-16.
- Begum, M. F., & Absar, N. (2009). Purification and characterization of intracellular cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. *Mycobiology*, 37(2), 121-127.
- Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, ... & Put, P. J. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*, 2, 245-248.
- Boonnop, K., Wanapat, M., Nontaso, N., & Wanapat, S. (2009). Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. *Scientia Agricola*, 66(5), 629-633.
- Brashears, M. M., Jaroni, D., & Trimble, J. (2003). Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Journal of Food Protection*, 66(3), 355-363.
- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M. D., & Albanell, E. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de especialización FEDNA. Madrid, España.

- Cortés-Sánchez, A. J., Guadarrama, L. M., & Díaz-Ramírez, M. (2014). Producción de biomasa a partir de *Aspergillus oryzae* en cultivo sumergido. *Biotecnia*, 16, 11-16.
- Chiquette, J. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 75, 405-415.
- Cholis, M. A., Suthama, N., & Sukanto, B. (2018). Feeding microparticle protein diet combined with *Lactobacillus* sp. on existence of intestinal bacteria and growth of broiler chickens. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 43(3), 265-271.
- Day, C. N., & Morawicki, R. O. (2018). Effects of fermentation by yeast and amylolytic lactic acid bacteria on grain sorghum protein content and digestibility. *Journal of Food Quality*, 1-8, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3964392>.
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 20-25.
- de Kock, G. C. (2002). The use of *Opuntia* as fodder Source in arid areas of Southern Africa. In Mondragón-Jacobo, C., & Pérez-González, S. (Eds.), *Cactus (Opuntia spp.) as forage* (pp. 101-105). Rome: FAO.
- Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A. (2018). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: A review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3), 253-268.
- Dubeux, J. C. B., Salem, H. B., & Nefzaoui, A. (2018). Producción y utilización de nopal forrajero en la alimentación animal. En Inglese, P., Mondragón-Jacobo, C., Nefzaoui, A., & Sáenz, C. (Eds.), *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal* (pp. 77-95). Roma: FAO.
- El-Mostafa, K., Kharrassi, Y. E., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., Kebbaj, M. S., ... & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19, 14879-14901.
- Felker, P. (2002). Utilization of *Opuntia* for forage in the United States of America. In Mondragón-Jacobo, C., & Pérez-González, S. (Eds.), *Cactus (Opuntia spp.) as forage* (pp. 51-56). Rome: FAO.
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C., & Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2574-2589.
- Flores-Hernández, A., Acosta-Rodríguez, G. F., Murillo-Amador, B., Trejo-Calzada, R., & Arreola-Ávila, J. G. (2006). Evaluación preliminar de la reserva de nopal (*Opuntia* spp) en la región Laguna-Chihuahua. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 5, 191-196.

- Flores-Hernández, A., Araújo-Filho, J. T., da Silva G., F., Ramírez-Ordoñez, S., & Murillo-Amador, B. (2017). Dietas a base de forraje tradicional y nopal (*Opuntia* spp.) enriquecido con proteínas para alimentar cabras. *Nova Scientia*, 9(18), 149-166.
- Galina, M. A., Ortiz-Rubio, M. A., Guerrero, M., Mondragón, D. F., Franco, N. J., & Elías, A. (2008). Efecto de un ensilado de maíz solo o inoculado con un probiótico láctico y adicionado con un suplemento nitrogenado de lento consumo en ovinos. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 12(2), 23-34.
- García, Y., Elías, A., Albelo N., Herrera, F. R., Núñez, O., & Dieppa, O. (2008). Growth of acid-lactic bacteria and yeasts during the liquid fermentation of broilers feces for the obtainment of probiotics. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 42(2), 189-191.
- Gonzalez, C. L. (1989). Potential of fertilization to improve nutritive value of prickly pear cactus (*Opuntia lindheimeri* Engelm.). *Journal of Arid Environments*, 16, 87-94.
- Gusha, J., Halimani, T. E., Ngongoni, N. T., & Ncube, S. (2015). Effect of feeding cactus-legume silage on nitrogen retention, digestibility and microbial protein synthesis in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 206, 1-7.
- Hansen, G., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50, 1327-1341.
- Hu, W. Q., Liu, Q., Hu, J. P., Zhou, J. J., Zhang, X., Peng, S. Y., ... & Wang, D. (2018). Identification and characterization of probiotic yeast isolated from digestive tract of ducks. *Poultry Science*, 97, 2902-2908.
- Khampa, S., Chaowarat, P., Singhalert, R., & Wanapat, M. (2009). Supplementation of yeast fermented cassava chip as a replacement concentrate on rumen fermentation efficiency and digestibility of nutrients in cattle. *Asian Journal of Animal Sciences*, 3, 18-24.
- Lokapirnasari, W. P., Sahidu, A. M., Soepranianondo, K., Supriyanto, A., Yulianto, A. B., & Al Arif, A. (2018). Potency of lactic acid bacteria isolated from Balinese bovine (*Bos sondaicus*) intestinal waste from slaughterhouse to improve nutrient content of wheat pollard as animal feedstuff by fermentation process. *Veterinary World*, 11(8), 1127-1134.
- López-García, J. J., Fuentes-Rodríguez, J. M., & Rodríguez-Gámez, A. (2002). Production and use *Opuntia* as forage in northern Mexico. In Mondragón-Jacobo, C., & Pérez-González, S. (Eds.), *Cactus (Opuntia spp.) as forage* (pp. 29-36). Rome: FAO.
- Machida, M., Yamada, O., & Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and exploration of its future. *DNA Research*, 15, 173-183.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1999). *Brock Biología de los microorganismos* (8ª ed.). Madrid: Prentice-Hall.

- Martins, A. D. de O., Santos-Mendonça, R. C., Silva, D. L., Silva-Ramos, M., Martins, M. C., Lopes-Donzele, J., & de Andrade, N. J. (2006). Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciência Agroveterinárias, Lages*, 5, 53-59.
- Méndez-Palacios, N., Méndez-Mendoza, M., Vázquez-Flores, F., Castro-Colombres, J. G., & Ramírez-Bribiesca, J. E. (2018). Productive and economic parameters of pigs supplemented from weaning to finishing with prebiotic and probiotic feed additives. *Animal Science Journal*, DOI: 10.1111/asj.13008.
- Mendieta R., C., Gómez V., G., del Río G., J. C., Cortes C., A., Arce, J. M., & Ávila G., E. (2018). Effect of the addition of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls to diets with mycotoxins on the performance and immune responses of broilers. *Japan Poultry Science Association*, 55, 38-46.
- Mejía-Haro, J., Delgado-Hernández, J. L., Mejía-Haro, I., Guajardo-Hernández, I., & Valencia-Posadas, M. (2011). Efectos de la suplementación con bloques multinutricionales a base de nopal fermentado sobre la ganancia de peso en ovinos en crecimiento. *Acta Universitaria*, 21(1), 11-16.
- Mikkelsen, L. L., Bendixen, C., Jakobsen, M., & Jensen, B. B. (2003). Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 654-658.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., & Chye, F. Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented *Bambangan (Mangifera pajang)*. *CyTA-Journal of Food*, 13, 563-572.
- Novelli, P. K., Barros, M. M., & Fleuri, L. F. (2016). Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, 198, 119-124.
- Nunes-Medeiros, A., Tiago, A. S., Araújo, G. P., Furtado, D. A., Flores-Valdez, C., Pereira, C. A., & de Melo Oliveira, F. J. (2004). Enriquecimiento proteico de palma forrajera (*Opuntia Ficus Indica* Mill) por procesos biotecnológicos en desempeño de ovinos Santa Inés. 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 19 de Julio a 22 de Julio de 2004. Campo grande, MS. Brasil.
- Obeidat, B. S., Mahmoud, K. Z., Obeidat, M. D., Ata, M., Kridli, R. T., Haddad, S. G., Titi, H. H., ...& Affan, R. A. (2018). The effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on intake, nutrient digestibility, and rumen fluid pH in Awassi female lambs. *Veterinary World*, 11(7), 1015-1020.
- Oliveira, M. A. (2001). Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. *Química Nova*, 24, 307-310.
- Oyetayo, V. O. (2004). Phenotypic characterization and assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources. *African Journal of Biotechnology*, 3, 355-357.

- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.
- Pouraziz, S., Aghdam S., H., & Chekani-Azar, S. (2013). Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and butyric acid glycerides on performance and serum lipid level of broiler chickens. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 19(5), 903–907.
- Priece, K. L., Totty, H. R., Lee, H. B., Utt, M. D., Fitzner, G. E., Yoon, I., ... & Escobar, J. (2010). Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. *Journal of Animal Science*, 88, 3896-3908.
- RAE. (2017). Diccionario de la lengua española, Consultada en <http://dle.rae.es/?id=HmGWTc5>.
- Rodríguez, Z., Elías, A., Boucourt, R., & 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-Couto, S., & Sanromán, Ma. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.
- Robinson, T., Singh, D., & Nigam, P. (2002). Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae*, 9(2), 27-36.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2689-2694.
- Santos, D. C., Santos F., M. V., Farias, I., Dias, F. M., & Andrade-Lira, M. (2001). Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(1), 12-17.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13-18.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 541-549.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 175-194.

- Suksombat, W., Homkaow, J., & Meeprom, C. (2018). Effects of ensiled *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* cassava pulp as replacement for concentrate on ruminal fermentation in rumen fistulated cows. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 40(4), 896-903.
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2017). Fermentation. Consultada en <https://www.britannica.com/science/fermentation>.
- Throne, M., Bach, A., Ruiz-Moreno, M., Stern, M. D., & Linn, J. G. (2009). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livestock Science*, 124, 261-265.
- Torres-Ponce, R. L., Morales-Corral, D., Ballinas-Casarrubias, M. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 1129-1142.
- Vandenbergh, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (2000). Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 74, 175-178.
- Vries, R. P., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497-522.
- van Winsen, R. L., Urlings, B. A. P., Lipman, L. J. A., Snijders, J. M. A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J. H. M., & Knapen, F. (2001). Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3071-3076.
- Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: Review. *BioMed Research International*, 2018, 1–15, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5063185>

## 3 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN AERÓBICA DEL NOPAL

### 3.1 Resumen

El objetivo fue caracterizar el proceso de enriquecimiento proteico del nopal (*Opuntia* spp.) a través de una fermentación líquida aeróbica. Para ello, los cladodios fueron licuados, agregándoseles inóculos biológicos (levadura, bacterias lácticas y hongo) y fertilizantes (urea, super fosfato simple de calcio y sulfato de amonio). Las variables independientes fueron tiempo en fermentación (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h) y estados de preparación del nopal (N1, nopal licuado y N2, nopal licuado más fertilizantes); las variables de respuesta fueron 14, de ellas cinco fueron las de mayor relevancia. El crecimiento de microorganismos fue mayor a las 48 h para la levadura y las bacterias lácticas, mientras que el crecimiento del hongo ocurrió desde las 0 hasta las 35 h. El pH se mantuvo en un rango ácido (4.9-5.5) durante la fermentación. En N1 se presentó el menor porcentaje de PC (8.6%) y a las 12 h el mayor (28.4%). El nitrógeno ureico no cambió ( $p>0.05$ ) desde N2 y el nitrógeno amoniacal fue disminuyendo a partir de N2. La fermentación líquida aeróbica del nopal incrementó el contenido de proteína en aproximadamente 3.3 veces, con lo que se obtiene un producto de mayor calidad para la alimentación animal.

**Palabras claves:** *Opuntia* spp., *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Tesis de Maestría en Ciencia en Innovación Ganadera, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Elba Martha Martínez Méndez

Director de Tesis: Dr. Gilberto Aranda Osorio

# CHARACTERIZATION OF THE CACTUS PEAR AEROBIC FERMENTATION

## 3.2 Abstract

The objective was to characterize the cactus pear (*Opuntia* spp.) protein enrichment process through the aerobic liquid fermentation. For it, the cladodes were liquefied and biological inoculants (yeast, lactic acid bacteria and fungus) and fertilizers (urea, simple calcium super phosphate and ammonium sulfate) were added. The independent variables were fermentation time (0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h) and cactus pear preparation stages (N1, liquefied cladodes and N2, liquefied cladodes plus fertilizers); the response variables were 14, but five of them were those of greater relevance. The growth of microorganisms was higher at 48 h for yeast and lactic acid bacteria, while the growth of the fungus occurred from 0 to 35 h. The pH remained acidic range (4.9-5.5) during fermentation. N1 presented the lowest percentage of PC (8.6%) and the highest (28.4%) at 12 h of fermentation. Urea nitrogen did not change ( $p>0.05$ ) from N2 and ammoniacal nitrogen decreased from N2. The liquid aerobic fermentation did increase the cactus pear protein content in approximately 3.3 times, which produces a better ingredient quality for animal feeding.

**Key words:** *Opuntia* spp., *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup>Master of Science in Livestock Innovation Thesis, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Elba Martha Martínez Méndez

Advisor: Gilberto Aranda Osorio, Ph.D.

### 3.3 Introducción

Los microorganismos son utilizados en la producción de alimentos para humanos y animales, y como aditivos o suplementos alimenticios. La fermentación microbiana de sustratos alimenticios mejora su digestibilidad y concentración de proteínas; la calidad del producto fermentado dependerá del sustrato y los microorganismos utilizados (Day & Morawicki, 2018).

En México, el nopal es comúnmente utilizado como verdura, pero en zonas semiáridas o con pastizales disminuidos, algunos autores (Anaya-Pérez, 2002; Anaya-Pérez & Bautista-Zane, 2008; López-García, Fuentes-Rodríguez, & Rodríguez-Gámez, 2002) han registrado su uso como forraje durante las sequías, ya sea en pastoreo abierto, chamuscado *in situ* o como cladodios para ganado estabulado. Las principales especies utilizadas para este fin incluyen *Opuntia ficus-indica* Mill., y *Nopalea cochellinifera* Salm-Dyck (Dubeux, Salem, & Nefzaoui, 2018; Flores-Hernández, Acosta-Rodríguez, Murillo-Amador, Trejo-Calzada, & Arreola-Avila, 2006).

Debido a las características nutricionales del nopal, alto contenido de carbohidratos solubles, bajo contenido en fibra y proteína cruda (PC) (Torres-Ponce et al., 2015), se han buscado alternativas, como procesos de fermentación para aumentar el valor proteico, debido al contenido de proteína microbiana (Gonzalez, 1989; Nunes-Medeiros et al., 2004). Algunos autores han reportado incrementos de 12 hasta 26% de PC, al fermentar el nopal con hongos (Oliveira, 2001) o levaduras (Araújo et al. 2005; Araújo, Silva, Brito, Oliveira, & Santos, 2008).

En la Universidad Autónoma Chapingo se ha investigado sobre el enriquecimiento proteico del nopal (Aranda-Osorio, Miranda-Romero, Cruz, & Flores-Valdez, 2012; Flores-Hernández, Araújo-Filho, da Silva, Ramírez-Ordoñez, & Murillo-Amador, 2017); esto es una adaptación del proceso descrito por Araújo et al. (2008) y Campos (2008) en el cual el nopal es fermentado aeróbicamente por microorganismos y minerales adicionados. Por lo tanto, el

objetivo fue caracterizar el enriquecimiento proteico del producto de la fermentación aeróbica del nopal, para su uso como alimento en animales de interés zootécnico y generar un banco de información al respecto de la fermentación como proceso para la mejora del nopal.

### **3.4 Materiales y métodos**

#### **3.4.1 Localización**

El proceso de fermentación se llevó a cabo en la Nopalera del Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, México, ubicada en las coordenadas 19° 29' de latitud norte y 98° 87' de longitud oeste, a 2,263 msnm, con 15.6 °C de temperatura y 503 mm de precipitación media anual (SMN, 2018); el clima se considera templado subhúmedo (Cw<sub>0</sub>) (García, 1988).

Los análisis bromatológicos y microbiológicos se realizaron en los laboratorios de Nutrición Animal y de Microbiología Pecuaria, del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

#### **3.4.2 Inóculos microbianos**

Tres inóculos microbianos fueron utilizados en la fermentación aeróbica del nopal: una levadura, bacterias lácticas y un hongo. La fuente de levadura fue el producto comercial Procreatin 7<sup>®</sup> (Argentina), compuesto de *Saccharomyces cerevisiae* (1x10<sup>10</sup> UFC). La fuente de bacterias lácticas fue el producto comercial Biosile<sup>®</sup> (synBios<sup>®</sup>, México), compuesto de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* (no menos de 20 000 millones de UFC g<sup>-1</sup>).

El hongo fue *Aspergillus oryzae*, se encontraba conservado en Agar Papa Dextrosa Sabouraud y refrigerado, para su propagación fue resuspendido en 4 mL de solución salina estéril y sembrado sobre arroz (115 g) húmedo (250 mL de agua destilada) y esterilizado en autoclave (121 °C por 15 minutos), contenido en frascos de vidrio de 500 mL de capacidad. Los frascos inoculados fueron tapados con gasa y se incubaron a 28 °C por 5 días, durante los cuales se debía

monitorear el crecimiento del hongo (Apéndice 1). Posteriormente los frascos fueron colocados en refrigeración hasta su uso.

### **3.4.3 Fermentación aeróbica del nopal**

De la plantación de nopales del Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, se cosecharon alrededor de 100 kg de cladodios de nopal *Opuntia* variedad Copena F1, se licuaron en una licuadora industrial (motor de 3HP y alimentación trifásica, Apéndice 2), adicionando 20 L de agua, el material licuado se vació a un biodigestor vertical de 120 L de capacidad con agitación constante (Apéndice 3), además se agregaron 600 g de urea, 600 g de superfosfato simple de calcio, 80 g de sulfato de amonio, 100 g del producto comercial Biosile®, 100 g del producto comercial Procreatin 7® y 380 g de arroz inoculado con *Aspergillus oryzae*. El proceso fermentativo del nopal se realizó a temperatura ambiente por 72 h y se llevó a cabo en cuatro ocasiones (repeticiones).

### **3.4.4 Toma de muestras**

Se extrajo muestras del fermentado a través de la llave dispensadora (Apéndice 3), el cual fue recibido en una cubeta de 19 L de capacidad, con el fin de obtener una muestra homogénea, la muestra se regresó al biodigestor y se repitió la maniobra. Al segundo llenado de la cubeta se le midió el pH y temperatura (TM) con un potenciómetro portátil (HI988127-HI98128, Waterproof pH Tester, HANNA® Instruments, Estados Unidos de América).

Del segundo llenado se tomó una muestra en frascos de plástico de 250 mL de capacidad, la cual a su vez se dividió en dos submuestras de 125 mL; una se utilizó inmediatamente para las determinaciones microbiológicas y la segunda se mantuvo a -20 °C hasta su uso en el análisis químico proximal, fracciones de fibras y análisis complementario de nitrógeno. Al finalizar la toma de muestras, en la bitácora se registró la temperatura ambiental (TA). El muestreo se hizo a tiempos prefijados; en el Cuadro 1 se especifican tiempos y condiciones de las muestras tomadas.

Cuadro 1. Descripción de la toma de muestras para un ciclo de fermentación de 72 horas<sup>1</sup>.

	Tiempos de muestreo	Descripción	Observaciones
Estados de preparación del nopal	N1	Nopal licuado	La muestra se tomó inmediatamente después de llenar el biodigestor.
	N2	Nopal licuado con fertilizantes	La muestra se tomó entre 15 y 30 minutos después de adicionar los fertilizantes.
Tiempo en fermentación	F0	Nopal licuado con fertilizantes y microorganismos	La muestra se tomó entre 15 y 30 minutos después de adicionar los microorganismos.
	F12	Fermentado durante 12 h.	La muestra se tomó a las 12 h de fermentación.
	F24	Fermentado durante 24 h	La muestra se tomó a las 24 h de fermentación.
	F36	Fermentado durante 36 h	La muestra se tomó a las 36 h de fermentación.
	F48	Fermentado durante 48 h	La muestra se tomó a las 48 h de fermentación.
	F60	Fermentado durante 60 h	La muestra se tomó a las 60 h de fermentación.
	F72	Fermentado durante 72 h	La muestra se tomó a las 72 h de fermentación.

<sup>1</sup>El biodigestor se mantuvo funcionando constantemente durante las 72 h de fermentación.

### 3.4.5 Determinación de la población microbiológica

La población de los inóculos biológicos se determinó para cada momento de muestreo, se cuantificó las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias lácticas (BAL), levadura y hongo, por mililitro de nopal fermentado, con los métodos de diluciones seriadas (Tortora, Funke, & Case, 2007), siembra de vaciado en placa y conteo en placa, utilizándose el medio de Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Merck) para bacterias lácticas y el Agar Dextrosa y Papa (ADP, MCD-LAB) para la levadura y el hongo (Dávila-Fernández & Hernández-

García, 2006). Las cajas con medio MRS se incubaron a 37 °C durante 48 h y las cajas con ADP se incubaron a 28 °C durante 72 h.

#### **3.4.6 Determinaciones nutricionales**

Se determinó el contenido de humedad (H), PC, cenizas (Cen), extracto etéreo (EE) y carbohidratos solubles (CS) ajustados por fibra detergente neutro (FDN) (AOAC, 2000).

Para la determinación de FDN y fibra detergente ácido (FDA) se utilizó una muestra secada a 60 °C en estufa de aire forzado y se realizó mediante la técnica de Van Soest (1963).

#### **3.4.7 Análisis complementario de nitrógeno**

Para la estimación del contenido del nitrógeno ureico y amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), se centrifugaron aproximadamente 5 mL de cada submuestra a 3,000 rpm por 5 minutos (centrífuga de mesa Presvac DCS-16RTV, Argentina), se tomó el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración hasta su uso. La determinación de nitrógeno ureico se realizó con la técnica de reactivos separados para el kit Urea UVI *cinética* AA (línea líquida, Wiener-Lab®, Argentina) y para la determinación de N-NH<sub>3</sub> se utilizó la técnica colorimétrica de McCollough (1967).

#### **3.4.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Las UFC se convirtieron a la escala log<sub>10</sub> antes de su análisis. Se utilizó un modelo completamente al azar, con cuatro repeticiones para cada tiempo de muestreo. Las variables de respuesta para el análisis de varianza fueron la población de cada inóculo microbiano y los componentes del análisis químico proximal, análisis de fracciones de la fibra, nitrógeno amoniacal y ureico. Las variables independientes fueron los tiempos de muestreo (tiempo en fermentación: 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h y, estados de preparación del nopal: N1, nopal licuado y N2, nopal licuado más fertilizantes). La comparación de medias del tiempo de muestreo se ejecutó mediante Tukey, con un  $\alpha=0.05$ .

### 3.5 Resultados y discusión

#### 3.5.1 pH y temperaturas

El pH del fermentado de nopal fue ácido, sin diferir ( $p>0.99$ ) entre tiempo de muestreo (Cuadro 2). La temperatura de las muestras disminuyó ( $p<0.05$ ) a las 12, 36 y 60 h de incubación, respecto a los otros tiempos de muestreo (0, 24, 48, 72). Esto podría estar relacionado con la temperatura ambiental, debido a que en los mismos tiempos también se registraron las TA más bajas, entre 11 y 12 °C, aun cuando la fermentación tiende a incrementar la temperatura del producto fermentado.

Cuadro 2. Comportamientos del pH (pH-M) y las temperaturas de la muestra (TM), y temperatura ambiental (TA) durante la fermentación aeróbica del nopal.

Tiempo de muestreo <sup>1</sup>	pH-M	TM (°C)	TA (°C)
N1	5.1 a <sup>2</sup>	26.7 a	24.5 a
N2	4.9 a	26.2 a	24.5 a
F0	5.0 a	26.6 a	24.5 a
F12	5.0 a	21.6 b	12.7 b
F24	5.2 a	28.2 a	24.5 a
F36	5.5 a	20.1 b	12.2 b
F48	5.4 a	27.2 a	25.0 a
F60	5.5 a	20.1 b	11.5 b
F72	5.4 a	26.7 a	25.7 a

<sup>1</sup>N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación.

<sup>2</sup>Medias seguidas con la misma letra, dentro de columna, no son diferentes ( $p<0.05$ ).

El pH ideal para el crecimiento de las BAL oscila entre 4 y 4.5 (Ramírez-Ramírez, Rosas-Ulloa, Velázquez-González, Ulloa, & Arce-Romero, 2011). En ensilados, el uso de BAL o una combinación en sus tratamientos reduce el pH del forraje a

valores menores de 4.5, considerado ideal para evitar el crecimiento de bacterias indeseables (Abdul-Rahman et al., 2017). Por otro lado, se considera que el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras es de 4.17 a 4.6 (Angulo-Montoya et al, 2013; Nannyonga, Tchuenbou-Magaia, Goode, Fryer, & Robbins, 2018); sin embargo, en la presente investigación el pH fue mayor ( $\text{pH} \geq 5$ ). Lo anterior indica que las bacterias prebióticas no produjeron ácidos orgánicos, característica atribuida a estas bacterias (Haryati, 2011), en cantidad suficiente como para disminuir el pH a un nivel apropiado para el crecimiento de las levaduras y de las propias BAL, 4.6 a 4.7 (Zhang, Yu, Wang, & Tian, 2018).

Begum y Absar (2009), y de Castro y Sato (2014) encontraron que las enzimas de *A. oryzae* son estables a pH de 4.5 a 6.0 y, manifiestan mayor actividad de proteasa y celulasa a pH moderadamente ácido (5.0-5.5), lo cual indica que los valores de pH encontrados en el presente trabajo pudieron ser adecuados para la actividad de estas enzimas.

Respecto a la temperatura óptima de crecimiento de *A. oryzae*, Biesebeke et al. (2002) y Cortés-Sánchez et al. (2014) encontraron que esta se sitúa entre los 30 y 35 °C, aunado a una agitación alta de por lo menos 180 rpm (Cortés-Sánchez et al., 2014). Nannyonga et al. (2018) reportan que *S. cerevisiae* tuvo mejor crecimiento a 22 °C, aunque también mencionan que puede sostenerse una población alta a los 28 °C, para lo cual es necesario contar con agitación constante para liberar el calor producido por la fermentación. De igual forma, las temperaturas entre los 20 y 30 °C pueden mejorar el desempeño de *L. plantarum* (Zhang et al., 2018). De acuerdo con estas investigaciones, las temperaturas en el fermentado de nopal son apropiadas para el crecimiento de las BAL y *S. cerevisiae*, pero no para *A. oryzae*.

La celulasa producida por *A. oryzae* muestra actividad alta entre los 35 y 55 °C, y pierde actividad a los 25 °C (Begum & Absar, 2009); mientras que la producción de proteasas por *A. oryzae* es a 23 °C durante 72 h, la temperatura óptima para su actividad es 55-60 °C y se muestra estable entre 35 y 45 °C (de Castro & Sato, 2014). Lo anterior indica que probablemente las enzimas de *A. oryzae* no se

produjeron y, si llegaron a hacerlo, no manifestaron su máxima actividad por las condiciones de temperatura en el presente estudio (menores que 30 °C).

### **3.5.2 Dinámica poblacional de los microorganismos**

En la Figura 1 se muestra el crecimiento de los microorganismos utilizados en la fermentación aeróbica del nopal. El mayor crecimiento de la levadura y BAL se observó a las 48 h de muestreo con 7.34 y 7.68 Log<sub>10</sub> UFC, respectivamente; por el contrario, el crecimiento del hongo se manifestó únicamente desde su inoculación (F0) hasta las 36 h. Cabe destacar que se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) en las BAL, entre los tiempos previos (N1 y N2) y los posteriores a la inoculación (F0 a F72); en la levadura, las diferencias fueron antes de la inoculación (N1 y N2), al momento de la inoculación (F0), y a partir del máximo crecimiento hasta la finalización de la fermentación (F48, F60 y F72) (Apéndice 4).

De acuerdo con Abdul-Rahman et al. (2017), las BAL después de las 72 h presentan la fase de declinación o muerte, es decir, la población tiende a disminuir; estos datos que no llegan a mostrarse en la presente investigación. Durante la fase estacionaria, a las 48 h, *Lactobacillus* manifiesta su máxima actividad antifúngica (Magnusson & Schnürer, 2001), lo cual probablemente inhibió el crecimiento del hongo.

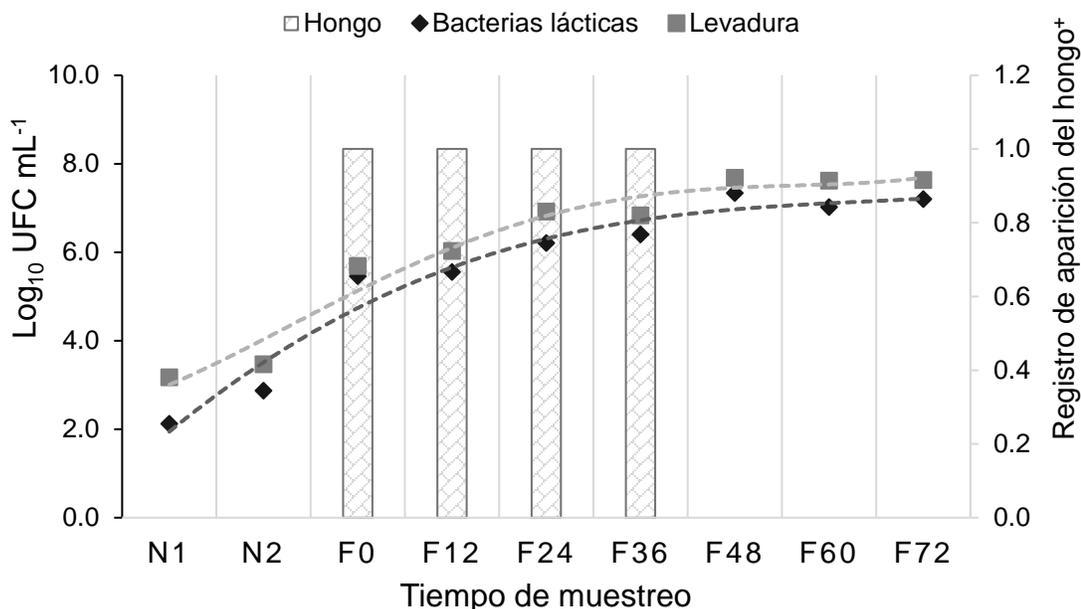


Figura 1. Dinámica poblacional de las bacterias lácticas, levadura y hongo durante la fermentación del nopal (N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación).

\*1 = sí hubo crecimiento del hongo; 0 = no se registra crecimiento del hongo.

Las levaduras tuvieron un crecimiento similar a lo reportado para la levadura *Candida norvegensis*, quien presentó su crecimiento a partir de las 12 h, alargando esta fase hasta las 48 h (Angulo-Montoya et al., 2013), causado probablemente por la baja cantidad de inóculo empleado. Sin embargo, Herrera-Torres, Murillo, Berumen, Páez y Villareal (2014) mencionan que *S. cerevisiae* requiere 25 h para alcanzar la fase estacionaria, pero utiliza los carbohidratos del nopal de manera más eficiente, lo que se traduce en una mayor concentración de PC en menor tiempo.

La combinación de BAL con levaduras forma una relación de beneficio mutuo, porque las levaduras producen aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento requerido por las BAL, mientras que los ácidos producidos por las BAL inhiben el crecimiento de microorganismos antagónicos a las levaduras (León et al., 2006). Paradójicamente, algunos autores han mostrado que los ácidos orgánicos, considerados los principales compuestos de las BAL, tienen

efectos antifúngicos (Russo et al., 2017); particularmente, *L. plantarum* tiene la capacidad de inhibir hongos como *S. cerevisiae* debido a su capacidad de sintetizar bacteriocinas (Jiang, Li, & Gu, 2016).

### 3.5.3 Análisis químico proximal y fracciones de fibras

Los resultados obtenidos en el análisis químico proximal y fracciones de fibras se observan en el Cuadro 3 (el cuadro con los resultados completos se puede ver en el Apéndice 5). El menor porcentaje de MS se mostró en N1, y el mayor al momento de la inoculación (F0), a partir de este momento los valores fueron constantes en la fermentación; así mismo, a las 72 h se observaron los porcentajes más altos de ceniza (minerales totales o material inorgánico).

Cuadro 3. Promedios (%) obtenidos del análisis químico proximal y fracciones de fibras en base seca<sup>2</sup> de la fermentación aeróbica del nopal.

Tiempo de muestreo <sup>1</sup>	MS	MO	PC	Cen	CS	FDN	FDA
N1	5.8 b <sup>z</sup>	87.4 a	8.6 b	12.6 d	55.5 a	22.3 a	21.7 a
N2	6.2 ab	86.6 ab	26.9 a	13.3 cd	37.7 b	20.9 ab	19.4 a
F0	6.5 a	86.0 abc	25.6 a	13.9 cd	39.9 b	19.2 ab	19.2 a
F12	6.5 a	82.9 bcd	28.4 a	17.1 abc	33.2 b	20.1 ab	18.1 a
F24	6.4 ab	82.3 bcd	24.2 a	17.6 abc	36.3 b	20.9 ab	19.9 a
F36	6.5 ab	81.7 cd	24.8 a	18.3 ab	36.4 b	19.2 ab	19.3 a
F48	6.3 ab	80.9 d	23.9 a	19.0 a	37.1 b	18.8 ab	18.6 a
F60	6.4 ab	81.3 d	26.6 a	18.7 a	37.2 b	17.2 b	19.8 a
F72	6.3 ab	80.9 d	26.9 a	19.0 a	33.7 b	18.9 ab	20.5 a

<sup>1</sup>N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación.<sup>2</sup> MS, materia seca; Cen, ceniza; MO, materia orgánica; PC, proteína cruda; EE, extracto etéreo; CS, carbohidratos solubles ajustados por FDN; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido.

<sup>z</sup>Medias seguidas con la misma letra, dentro de columna, no son diferentes ( $p < 0.05$ ).

En N1 se manifestaron los valores más altos para las variables materia orgánica, CS (ajustado por FDN), FDN y FDA, aunque en esta última no se observan diferencias ( $p>0.05$ ) en los tiempos de muestreo (N1, N2 y, de F0 a F72). La concentración de PC para N1 fue la más baja y, diferente al resto de los otros tiempos de muestreo. Aunque no se detectaron diferencias ( $p>0.05$ ) entre los tiempos N2 a F72, la concentración de PC exhibió el porcentaje más alto (28.4%) a las 12 h de la fermentación.

El valor encontrado de FDN para N1, es más bajo que lo reportado por Andrade-Montemayor et al. (2011) para diferentes variedades de *Opuntia*, los cuales se encuentran en rangos entre los 46 y 54%. Mientras que Araújo et al. (2008) reportaron valores más altos para MS (8%) con respecto a lo encontrado en la presente investigación durante todos los tiempos de muestreo; así mismo, estos autores señalan hasta 15% de Cen, valor intermedio en los tiempos de muestreo de la presente investigación. La reducción de la MS se atribuye a la acción microbiana, producto de la utilización de los carbohidratos en sus procesos metabólicos que generan agua, CO<sub>2</sub> y compuestos volátiles como AGV durante la fermentación (Oboh & Akindahunsi, 2003; Rodríguez, Elías, Boucourt, & Núñez, 2001).

Los valores de PC para N1 son más altos a los obtenidos por Santos, Santos, Farias, Dias y Lira (2001) para tres variedades de nopal (valores entre 5.9 y 6.3%); así mismo, Araújo et al. (2005) mostraron que la energía bruta no se vio alterada a pesar de la utilización de carbohidratos para el crecimiento de las levaduras. En el presente trabajo no se presentan datos de energía bruta, pero sí se observa que los datos de materia orgánica van disminuyendo a través del tiempo de fermentación microbiana, lo que podría ser indicativo que la energía, producto de la fermentación, disminuye con el tiempo.

El contenido de FDN y FDA tienden a disminuir en N2 aunque no se detectan diferencias ( $p>0.05$ ) entre tiempos de muestreo; esto puede ser atribuido a la dilución sufrida por la adición de los inóculos microbianos y fertilizantes, y la tendencia de FDN a disminuir más, se puede deber a la acción específica de los

microorganismos sobre algún componente de FDN. En general, los valores de la FDN y la FDA encontrados durante la presente investigación son bajos con respecto a lo reportado para heno de sorgo (69.4 y 48.6 %), o a la alfalfa seca (45.7 y 37.3%), y parecidos a lo encontrado para nopal natural y enriquecido (21.3 y 19.7% y, 18.3 y 16.6%, respectivamente) por Flores-Hernández et al. (2017). Así mismo, Herrera-Torres et al. (2014) reporta una marcada disminución en el contenido de FDN y FDA durante la fermentación. Por lo cual algunos autores (Araújo et al., 2008; Flores-Hernández et al. 2017) manifiestan que el nopal fermentado debe ser ofrecido a los animales en asociación con otros alimentos ricos en fibras.

#### **3.5.4 Comportamiento del nitrógeno y su relación con los microorganismos**

El contenido de nitrógeno fue una de las variables de importancia, ya que a partir de él se puede determinar el contenido de proteína; así mismo, la volatilización de amoníaco ( $N-NH_3$ ) es una importante vía de pérdida de N, esta pérdida es afectada por factores como humedad, temperatura, pH, capacidad buffer, materia orgánica, fuente y dosis de N (Barbieri, Echeverria, Saínez-Rozas, & Maringolo, 2010). El porcentaje de nitrógeno ureico no mostró variación ( $p>0.05$ ) una vez que fue adicionado con fertilizantes ( $N_2$ ) o microorganismos (F0 a F72); similares resultados se observaron para la concentración de nitrógeno amoniacal, aunque esta tendió a disminuir con la inclusión de microorganismos (Figura 2; los detalles del análisis complementario de nitrógeno se pueden ver en el Apéndice 6).

De acuerdo con algunos autores (Rodríguez et al., 2001; Suksombat, Homkaow, & Meeprom, 2018), al adicionarse fuentes de nitrógeno no proteico, como la urea, se esperaría que el incremento de la PC se debiera a la degradación de la urea para la síntesis de proteína microbiana, o a la secreción de algunas enzimas extracelulares por los microorganismos fermentadores. Rodríguez et al. (2001) mencionan que, al aumentar los niveles de urea, y si los microorganismos no cuentan con una fuente suficiente de carbono para su crecimiento (Suksombat et

al., 2018), se reduce la utilización del N, esto podría justificar por qué no se observaron cambios significativos en la concentración del nitrógeno ureico.

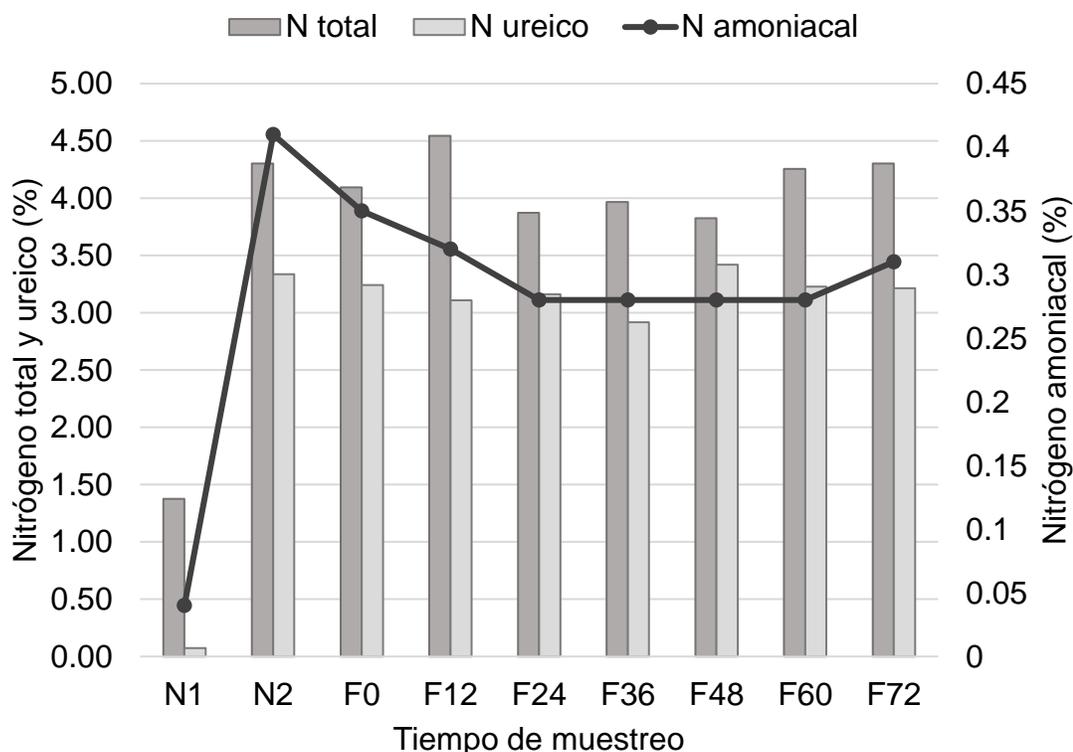


Figura 2. Variaciones del nitrógeno total (N total), ureico (N ureico) y amoniacal (N amoniacal) durante la fermentación del nopal (N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación).

Araújo et al. (2005) y Herrera-Torres et al. (2014) al fermentar nopal con *S. cerevisiae*, sin adicionar alguna fuente de nitrógeno, encontraron que el mayor incremento de la proteína por la fermentación fue a las 48 h, pasado este tiempo los valores fueron disminuyendo, debido a la probable desnaturalización celular de las proteínas. Araújo et al. (2005) mencionan que se puede producir una disminución en el peso del sustrato por la volatilización de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O durante la fermentación, lo que justificaría el aumento y concentración de la proteína cruda durante el proceso.

Así mismo, la levadura ha demostrado mayor habilidad para el enriquecimiento de los productos que el hongo (Suksombat et al., 2018); por lo tanto, el crecimiento de *S. cerevisiae* podría justificar que el porcentaje de N-NH<sub>3</sub> disminuyera en el tiempo, indicando que las levaduras consumieron los azúcares del medio (Angulo-Montoya et al., 2013).

Los valores de PC, producto de la fermentación, fueron similares a los encontrados por Boonnop, Wanapat, Nontaso y Wanapat (2009); así mismo, Day y Morawicki (2018) incrementaron la PC de 9 a 27% en muestras fermentadas con levaduras de panadería y tratadas con amiloglucosidasas. Para algunos autores (Boonnop et al., 2009), el alto contenido de proteína puede ser atribuido a la habilidad que tiene *S. cerevisiae* para secretar enzimas extracelulares como amilasas, linamarasas y celulasas; sin embargo, para otros (Oboh, 2006; Suksombat et al., 2018) este aumento se debió al incremento del crecimiento y la proliferación del complejo hongos/bacterias en la forma de proteínas unicelulares.

### **3.6 Conclusiones**

El crecimiento de los microorganismos utilizados durante la fermentación aeróbica del nopal no fue el esperado, ya que el hongo se suprimió a las 48 h de fermentación debido probablemente a las condiciones del sustrato y del medio ambiente.

El contenido de fibras, materia orgánica y carbohidratos solubles disminuyó, mientras que la proteína cruda aumentó debido a la acción de los microorganismos.

Durante la fermentación, las concentraciones de N total y ureico mostraron un comportamiento diferente al del N amoniacal, lo que indica patrones distintos del uso del nitrógeno por parte de los microorganismos durante la fermentación.

En general, por sus características, el producto de la fermentación aeróbica del nopal, de las 12 a 36 h se constituye en una opción viable para la alimentación animal por su aporte en proteína, fundamentalmente.

### 3.7 Recomendaciones

Se recomienda hacer pruebas, en condiciones controladas, sobre la sinergia entre el hongo y la levadura; así mismo, sobre dosis de inclusión. También se recomienda hacer pruebas con diferentes niveles de fertilizantes y determinar la osmolaridad de la mezcla.

### 3.8 Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) de la Universidad Autónoma Chapingo para la realización de esta investigación.

### 3.9 Literatura citada

- Abdul-Rahman, N., Halim A., M. R., Mahawi, N., Hasnudin, H., Al-Obaidi, J. R., & Abdullah, N. (2017). Determination of the use of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii* application on fermentation profile and chemical composition of corn silage. *BioMed Research International*, 1-8, DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/2038062>.
- Anaya-Pérez, M. A. (2002). History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. In Mondragón-Jacobo, C., & Pérez-González, S. (Eds.), *Cactus (Opuntia spp.) as forage* (pp. 5-12). Rome: FAO.
- Anaya-Pérez, M. A., & Bautista-Zane, R. (2008). El nopal forrajero en México: Del siglo XVI al Siglo XX. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 5, 167-183.
- Andrade-Montemayor, H. M., Cordova-Torres, A. V., García-Gasca, T., & Kawas, J. R. (2011). Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research*, 98, 83-92.
- Angulo-Montoya, C., Ruiz-Barrera, O., Castillo, Y., Marrero, Y., Elías, A., Arzola, C., Mancillas, P. F., & Díaz, D. (2013). Dinámica de crecimiento y metabolitos producidos en la fermentación de la levadura *Candida norvegensis*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 47, 179-182.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis (17th ed.). The association of official analytical chemists, Gaithersburg, MD, USA.

- Aranda-Osorio, G., Miranda-Romero, L. A., Cruz M., F. M., Flores-Valdez, C. A. (2012). Avances en la utilización de nopal en la alimentación animal. En: Blanco-Macías, F., Vázquez-Alvarado R. E., Valdez-Cepeda R. D., Santos-Haliscak J. A. (Eds.), Memoria del XI Simposium Taller Nacional y IV Internacional Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey. Campus Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nuevo León. Escobedo, N.L., México. pp. 5-13.
- Araújo, L. F., Nunes-Medeiros, A., Perazzo-Neto, A., Conrado-Oliveira, L. S., & Honorato da Silva, F. L. (2005). Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in Solid-State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 161-168.
- Araújo, L. F., Silva, F. L. H., Brito, E. A., Oliveira-Júnior, S., & Santos, E. S. (2008). Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 401-407.
- Barbieri, P. A., Echeverría, H. E., Saínez-Rozas, H. R., & Maringolo, M. (2010). Fertilización de maíz con urea de liberación lenta: pérdida por volatilización y eficiencia de uso de nitrógeno. *Ciencia del suelo*, 28(1), 57-66.
- Begum, M. F., & Absar, N. (2009). Purification and characterization of intracellular cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. *Mycobiology*, 37(2), 121-127.
- Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, ... & Put, P. J. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*, 2, 245-248.
- Boonnop, K., Wanapat, M., Nontaso, N., & Wanapat, S. (2009). Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. *Scientia Agricola*, 66(5), 629-633.
- Campos, A. R. N. (2008) Enriquecimento nutricional da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill): Estudo experimental de ampliação de escala. (Tesis doctoral, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil).
- Cortés-Sánchez, A. J., Guadarrama, L. M., & Díaz-Ramírez, M. (2014). Producción de biomasa a partir de *Aspergillus oryzae* en cultivo sumergido. *Biotechnia*, 16, 11-16.
- Dávila-Fernández, N., & Hernández-García, J. E. (2006). Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 3(7), 1-18. Consultado en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070706/070603.pdf>.
- Day, C. N., & Morawicki, R. O. (2018). Effects of fermentation by yeast and amylolytic lactic acid bacteria on grain sorghum protein content and digestibility. *Journal of Food Quality*, 1-8, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3964392>.

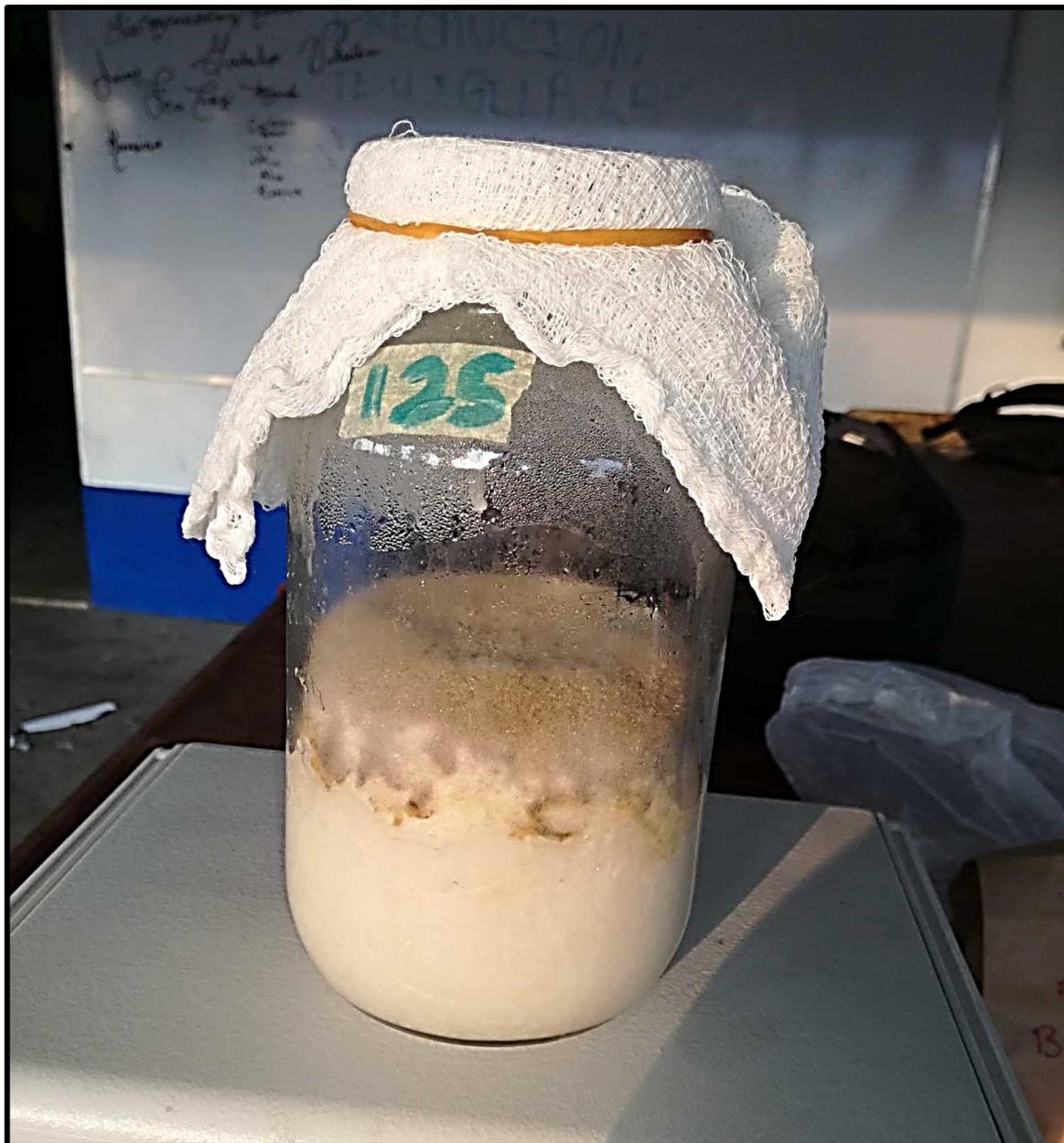
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 20-25.
- Dubeux, J. C. B., Salem, H. B., & Nefzaoui, A. (2018). Producción y utilización de nopal forrajero en la alimentación animal. En Inglese, P., Mondragón-Jacobo, C., Nefzaoui, A., & Sáenz, C. (Eds.), *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal* (pp. 77-95). Rome: FAO.
- Flores-Hernández, A., Acosta-Rodríguez, G. F., Murillo-Amador, B., Trejo-Calzada, R., & Arreola-Ávila, J. G. (2006). Evaluación preliminar de la reserva de nopal (*Opuntia* spp.) en la región Laguna-Chihuahua. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 5, 191-196.
- Flores-Hernández, A., Araújo-Filho, J. T., da Silva G., F., Ramírez-Ordoñez, S., & Murillo-Amador, B. (2017). Dietas a base de forraje tradicional y nopal (*Opuntia* spp.) enriquecido con proteínas para alimentar cabras. *Nova Scientia*, 9(18), 149-166.
- Gonzalez, C. L. (1989). Potential of fertilization to improve nutritive value of prickly pear cactus (*Opuntia lindheimeri* Engelm.). *Journal of Arid Environments*, 16, 87-94.
- González-Pineda, M. A., & Ruiz-Molina, A. (2016). *Características físicas y fermentativas de bloques multinutricionales con diferente nivel de nopal*. (Tesis profesional, Universidad Autónoma Chapingo, México).
- Haryati, T. (2011). Probiotik dan prebiotik sebagai pakan imbuhan nonruminansia. *Wartazoa*, 21(3), 125-132.
- Herrera-Torres, E., Murillo, M., Berumen, L., Páez, J., & Villarreal, G. (2014). Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1, 33-40.
- Jiang, H., Li, P., & Gu, Q. (2016). Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Protein Expression and Purification*, 127, 28-34.
- León P., A. M., Montoya, O. I., Motato, K. E., Granda, D. E., Caro, C. A., Restrepo, J. M., ... & Quinchía, L. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae*, 13, 26-35.
- López-García, J. J., Fuentes-Rodríguez, J. M., & Rodríguez-Gámez, A. (2002). Production and use *Opuntia* as forage in northern Mexico. In Mondragón-Jacobo, C., & Pérez-González, S. (Eds), *Cactus (Opuntia spp.) as forage* (pp. 29-36). Rome: FAO.
- Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal

- compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1-5. DOI: 10.1128/AEM.67.1.1-5.2001.
- McCollough, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinic Chimica Acta*, 17(2), 297-304.
- Nannyonga, S., Tchienbou-Magaia, F., Goode, K., Fryer, P., & Robbins, P. (2018). Growth kinetics and modelling of *S. cerevisiae* (NCYC 431) during de-lignified waste banana fermentation and chemical characterization. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 255-261.
- Nunes-Medeiros, A., Tiago, A. S., Araújo, G. P., Furtado, D. A., Flores-Valdez, C., Pereira, C. A., & de Melo Oliveira, F. J. (2004). Enriquecimiento proteico de palma forrajera (*Opuntia Ficus Indica* Mill) por procesos biotecnológicos en desempeño de ovinos Santa Inés. 41ª Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 19 de Julio a 22 de Julio de 2004. Campo Grande, MS. Brasil.
- Oboh, G. (2006). Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* solid media fermentation techniques. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 46-50.
- Oboh, G., & Akindahunsi, A. A. (2003). Biochemical changes in cassava products (flour & gari) subjected to *Saccharomyces cerevisiae* solid media fermentation. *Food Chemistry*, 82, 599-602.
- Oliveira, M. A. (2001). Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. *Química Nova*, 24, 307-310.
- Ramírez-Ramírez, J.C., Rosas-Ulloa, P., Velázquez-González, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce-Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7, 1-16.
- Rodríguez, Z., Elías, A., Boucourt, R., & 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.
- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48-54.
- Santos, D. C., Santos F., M. V., Farias, I., Dias, F. M., & Andrade-Lira, M. (2001). Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(1), 12-17.
- SMN. (2018). Normales climatológicas. Sistema meteorológico nacional. Consultado en: <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=mex>.

- Suksombat, W., Homkaow, J., & Meeprom, C. (2018). Effects of ensiled *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* cassava pulp as replacement for concentrate on ruminal fermentation in rumen fistulated cows. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 40(4), 896-903.
- Torres-Ponce, R. L., Morales-Corral, D., Ballinas-Casarrubias, M. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 1129-1142.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9ª ed.). México: Médica Panamericana.
- Van Soest, P. J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 46, 829-835.
- Zhang, Q., Yu, Z., Wang, X., & Tian, J. (2018). Effects of inoculants and environmental temperature on fermentation quality and bacterial diversity of alfalfa silage. *Animal Science Journal*, 89, 1085-1092.

## 4 APÉNDICES

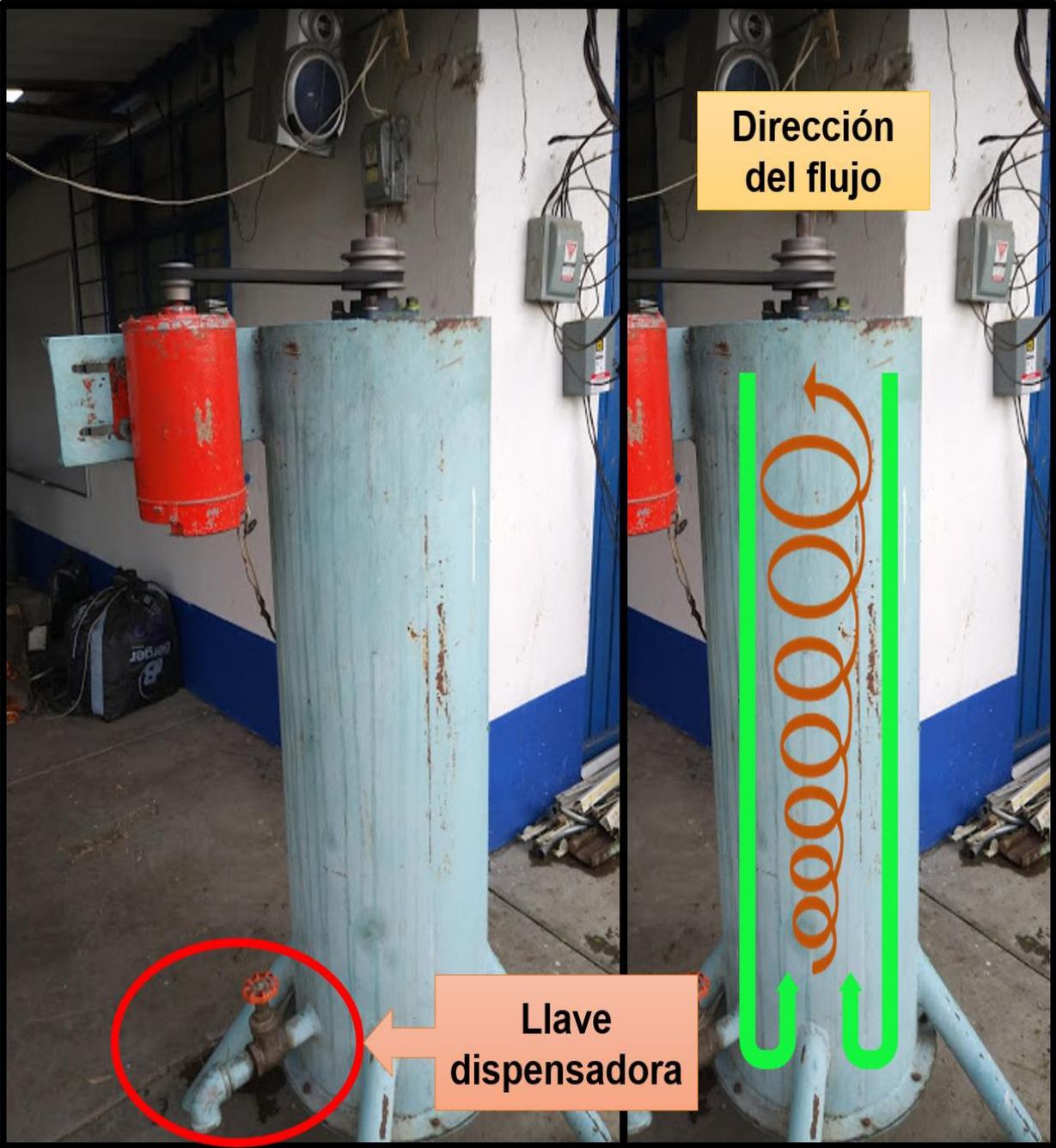
Apéndice 1. *Aspergillus oryzae* en Agar Papa Dextrosa después de 5 días de incubación.



Apéndice 2. Licuadora industrial utilizada durante el experimento.



Apéndice 3. Biodigestor vertical.



Apéndice 4. Crecimiento de los microorganismos durante la fermentación aeróbica del nopal ( $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ).

Tiempo de muestreo <sup>1</sup>	Bacterias lácticas	Levaduras	Hongo
N1	2.1 b <sup>z</sup>	3.2 c	No
N2	2.9 b	3.5 c	No
F0	5.5 a	5.7 b	Si
F12	5.6 a	6.0 ab	Si
F24	6.2 a	6.9 ab	Si
F36	6.4 a	6.8 ab	Si
F48	7.3 a	7.7 a	No
F60	7.0 a	7.6 a	No
F72	7.2 a	7.6 a	No

<sup>1</sup> N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación.

<sup>z</sup>Medias seguidas con la misma letra, dentro de columnas, no son diferentes ( $p < 0.05$ ).

Apéndice 5. Cuadro completo de los resultados obtenidos del análisis químico proximal y fracciones de fibras expresados en porcentaje (%).

Tiempo de muestreo <sup>1</sup>	H	MS	Cen	MO	PC	EE	CS	FDN	FDA	Cel	Lig
N1	94.2 a <sup>2</sup>	5.8 b	12.6 d	87.4 a	8.6 b	1.1 a	55.5 a	22.3 a	21.7 a	18.1 a	4.1 a
N2	93.7 ab	6.2 ab	13.3 cd	86.6 ab	26.9 a	1.0 a	37.7 b	20.9 ab	19.4 a	16.4 a	3.4 a
F0	93.5 b	6.5 a	13.9 cd	86.0 abc	25.6 a	1.1 a	39.9 b	19.2 ab	19.2 a	16.2 a	3.5 a
F12	93.5 b	6.5 a	17.1 abc	82.9 bcd	28.4 a	1.2 a	33.2 b	20.1 ab	18.1 a	15.6 a	3.1 a
F24	93.6 ab	6.4 ab	17.6 abc	82.3 bcd	24.2 a	0.9 a	36.3 b	20.9 ab	19.9 a	17.1 a	3.5 a
F36	93.7 ab	6.5 ab	18.3 ab	81.7 cd	24.8 a	1.3 a	36.4 b	19.2 ab	19.3 a	16.5 a	3.4 a
F48	93.7 ab	6.3 ab	19.0 a	80.9 d	23.9 a	1.1 a	37.1 b	18.8 ab	18.6 a	16.1 a	3.2 a
F60	93.6 ab	6.4 ab	18.7 a	81.3 d	26.6 a	0.9 a	37.2 b	17.2 b	19.8 a	16.8 a	3.4 a
F72	93.7 ab	6.3 ab	19.0 a	80.9 d	26.9 a	1.4 a	33.7 b	18.9 ab	20.5 a	17.1 a	3.9 a

<sup>1</sup>N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación. <sup>2</sup>H, humedad; MS, materia seca; Cen, ceniza; MO, materia orgánica; PC, proteína cruda; EE, extracto etéreo; CS, carbohidratos solubles ajustados por FDN; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido; Cel, celulosa; Lig, lignina.

<sup>2</sup>Medias seguidas con la misma letra, dentro de columnas, no son diferentes (p<0.05).

Apéndice 6. Promedios (%) de las concentraciones de nitrógeno total, ureico y amoniacal durante la fermentación del nopal.

Tiempo de muestreo <sup>1</sup>	Nitrógeno total	Nitrógeno ureico	Nitrógeno amoniacal
N1	1.38 b <sup>z</sup>	0.07 b	0.04 c
N2	4.30 a	3.34 a	0.41 a
F0	4.10 a	3.24 a	0.35 ab
F12	4.54 a	3.11 a	0.32 ab
F24	3.87 a	3.16 a	0.28 b
F36	3.97 a	2.92 a	0.28 b
F48	3.82 a	3.42 a	0.28 b
F60	4.26 a	3.23 a	0.28 b
F72	4.30 a	3.22 a	0.31 b

<sup>1</sup>N1, nopal licuado; N2, 15-30 min después de colocarle los fertilizantes a N1; F0, 15-30 min después de inocular a N2 con los microorganismos; F12, F24, F36, F48, F60, F72: muestra completa tomada a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de fermentación.

<sup>z</sup>Medias seguidas por letras diferentes, dentro de columnas, son diferentes ( $p < 0.05$ ).