

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Degradación de *Opuntia ficus indica* var. ANV1 y *Opuntia phaeacantha*
mediante una celulasa aislada del rumen bovino

Por:

ANA LILIA VELÁZQUEZ LUNA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para obtener Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Marzo de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Degradación de *Opuntia ficus indica* var. ANV1 y *Opuntia phaeacantha*
mediante una celulasa aislada del rumen bovino

Presentado por:

ANA LILIA VELÁZQUEZ LUNA

TESIS

Que somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para
obtener título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Presidente

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez
Sinodal

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Sinodal

M.C. Alberto Guerrero Rodríguez
Sinodal

Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Marzo de 2011



El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas del proyecto **“Proyección y Cuantificación de actividades enzimáticas de interés industrial a partir de microorganismos aislados del rumen Bovino”** con clave 02-03-0404-0219. El proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo la convocatoria de proyectos especiales de investigación.

Los colaboradores de esta investigación fueron:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

M.C. Alberto guerrero Rodríguez

LCN. Laura Maricela Lara López

*Ponerse en movimiento es importante,
pero lo más importante es mantener el entusiasmo inicial,
persistir y no rendirse a pesar de las dificultades.
Porque vamos a tener tropiezos. La clave no está en no caerse
sino en saber levantarse y continuar.*

Paulo Coelho

Agradecimientos

Primeramente a Dios por haberme dado la vida y la gran familia que tengo, por darme la fuerza que necesitaba para enfrentar todos los obstáculos que se me presentaron en la vida, gracias dios mio por no haberme dejado sola nunca, por llevarme siempre de tu mano y no soltarme nunca.

A mi “ALMA MATER” por darme la oportunidad de formarme como profesionista, por brindarme la oportunidad de crecer con experiencias y entre personas inigualables que nunca olvidaré, Por ser mi casa durante todo este tiempo. Allí aprendí que no hace falta ser reconocida para sentirse orgullosa de una misma. Que se es grande tan solo por dejarse ser y mantenerse como tal a pesar de cuantos jalones te dé la vida.

A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez por la confianza que deposito en mí para la realización de este proyecto, por sus consejos, paciencia, disposición, apoyo y conocimientos que me brindo.

Al Dr. Jesús Fuentes Rodríguez por la atención brindada, por sus consejos y asesorías para la terminación de este proyecto.

A la Lic. Laura Olivia Fuentes Lara por su apoyo y asesoría para la realización de este proyecto.

Al M.C. Alberto Guerrero Rodríguez por su paciencia, dedicación, consejos y asesorías para la realización de este proyecto.

A mis maestros del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (M.C. Xochitl Ruelas Chacon, M.C. Oscar Noe Reboloso

Padilla, M.C. María Hernández González, M. C. Ed. María de Lourdes Morales Caballero, Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó, Dr. Heliodoro de la Garza Toledo) gracias por haber compartido todos sus conocimientos, enseñanzas y por los consejos que me brindaron.

A los TLQ: Carlos Arévalo Sanmiguel y Laura Maricela Lara López, por su paciencia, amistad, consejos y apoyo durante la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de la generación 2006-2010 de ICTA, gracias por estar siempre unidos a pesar de los obstáculos que se nos presentaron, fueron los mejores compañeros, sinceramente deseo de todo corazón que les vaya bien ahora y siempre y que triunfen en la vida.

A mis mejores amigos de la universidad (Claudia, Elvia, Isaac, Ana Lilia, Cristal, Antonio, Alfredo, Benjamín, Juan Octavio, candi, Valentina, Lufú, Bere, Irmin, Nacho) por la amistad que me brindaron sin pedir nada a cambio, por escucharme siempre, por dejarme compartir con ustedes los mejores momentos de mi vida como los bailes, congresos, paseos y fiestas. Los quiero mucho y siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón, yo se que triunfaran en la vida, échenle ganas y suerte en todo.

A Gaby y Diana por estar siempre conmigo compartiendo además de un hogar alegrías, tristezas, enojos, por sus consejos y escucharme cada vez que lo necesité.

A Emílio O. R. porque gracias a el estoy aquí, por haber estado conmigo cuando mas lo necesite, cuando estaba sola, por el apoyo, consejos y cariño que siempre me brindo, por ser una de las personas de las que mas e recibí apoyo en esta etapa.

A mis tíos (Juan y Juana, Nicolás y Guadalupe, Fubentino y candida, Isidora y Alfredo, Abel, Martín y Angelica, Juan y Sílvia, Eliazar y Patricia, Ines y Juana, Rafael y Guadalupe, Antonio, Lourdes, Pedro) gracias por todo su apoyo y el animo que me dieron, porque nunca me dejaron sola.

A mis padrinos Francisco Ramírez y Ma. Luisa Naranjo por ser para mí como unos padres, porque siempre me apoyaron cuanto pudieron, por sus consejos y bendiciones, por estar siempre cerca de mí.

A mis primas Diana y María José por ser además de primas amigas, por los momentos que hemos compartido juntas, las locuras, travesuras y parrandas, por estar siempre sonriendo a la vida. Las quiero mucho "feas".

A mis profesores de la primaria Gilberto carrillo, su esposa Adriana Román y G. Alonso Carrillo. Prof. Miguel Angel Carrillo porque a pesar de los años que han pasado nunca se olvidaron de mí, siempre estuvieron ahí dándome ánimos, cariño y consejos, Alonso gracias por tu amistad.

"GRACIAS"

DEDICATORIAS

A mis padres Apolonio Velázquez y Ana María Luna por darme la vida, por ser las personas que más amo en la vida, Mamá eres el ser mas maravilloso del mundo, estuviste siempre conmigo, en momentos de tristezas y alegrías, en mis triunfos y fracasos, aconsejándome, regañándome. Papá gracias por darme todo cuanto pudiste, por el gran esfuerzo que hiciste para que yo terminara mis estudios, mereces una gran admiración de mi parte. A los dos gracias por la confianza que depositaron en mí jamás terminare de agradecer el gran sacrificio que hicieron por mí, esto es dedicado a ustedes porque fue la mejor herencia que pudieron dejarme. Los amo.

A mi hermana Elizabeth Velázquez Luna por ser la mejor hermana del mundo, por tus consejos, apoyo, que a pesar de estar lejos siempre te sentí cerca de mí.

A mi hermano Leandro Velázquez Luna por el ejemplo que me diste, eso me motivo a conseguir las metas que me propuse, tu apoyo y consejos fueron parte fundamental para alcanzar este objetivo, sinceramente muchas gracias “hermano”.

A mi hermano José Luis Velázquez Luna por el gran cariño y apoyo que me brindaste todo este tiempo a pesar de tu carácter tan fuerte que tienes te quiero “carnalito”.

A mi hermano Fco. Javier Velázquez Luna por demostrarme siempre cariño, por tus consejos, compañía, apoyo, comprensión y travesuras, mil gracias “hermanito”.

A mis abuelitos Ma. Carmen cárdenas y Leonardo Velázquez, Antonía Guerrero (†), Pedro Luna (†). Porque siempre me dieron amor y cariño, espero que donde quiera que estén se sientan orgullosos de mí.

A mis sobrinos Luis Ángel, Christian y Javier por ser mi fuente de inspiración para este trabajo, porque a pesar de estar lejos me llenan de alegría con sus palabras, los quiero y se que pronto estaré con ustedes mis pequeños.

A mi cuñada Adriana Sánchez por ser como una hermana para mí, por su apoyo, consejos y buenos deseos.

A mi novio Miguel Ángel por estar conmigo apoyándome, dándome ánimos, siendo paciente, aconsejándome, por los momentos tan hermosos que me has regalado durante estos últimos años, gracias por tu amor, cariño y comprensión, te quiero.

“GRACIAS FAMILIA”

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	1
1.INTRODUCCIÓN	
1.1Antecedentes.....	2
1.2Justificación.....	3
1.3Hipótesis.....	3
1.4Objetivo general.....	3
1.5Objetivos específicos.....	4
2.REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1Generalidades del nopal.....	5
2.1.1Origen.....	6
2.1.2Clasificación taxonómica.....	7
2.1.3Cultivo de nopal.....	9
2.1.4Principales especies de nopal.....	11
2.1.5Valor nutrimental del nopal.....	12
2.1.6Aplicaciones.....	13
2.1.7Importancia en la industria alimentaria.....	15
2.2Celulosa.....	17
2.2.1Celulosa bacteriana.....	19
2.2.2Enzimas que degradan la celulosa.....	19
2.2.3Celulasas.....	21
2.2.4Modo de acción de las celulasas.....	21
2.2.5Microorganismos productores de celulasas.....	21
2.2.6Usos y aplicaciones en alimentos.....	22
3.MATERIALES Y METODOS	
3.1Material orgánico de evaluación.....	23
3.1.1Determinación de materia seca total.....	24
3.1.2Determinación de humedad.....	24
3.1.3Determinación de proteína (método de microkjeldahl).....	25

3.1.4	Determinación de cenizas totales (minerales).....	26
3.1.5	Determinación de extracto etéreo o grasa.....	26
3.1.6	Determinación de fibra cruda.....	27
3.1.7	Determinación de fibra detergente neutro (FDN).....	28
3.1.8	Determinación de fibra detergente ácido (FDA).....	28
3.2	Material biológico.....	30
3.2.1	Preparación del medio sólido.....	30
3.2.2	Siembras en medio sólido.....	31
3.2.3	Tinción de Gram.....	31
3.3	Fermentación para la producción de extracto enzimático.....	32
3.3.1	Preparación del medio líquido específico para producir celulasa.....	32
3.3.2	Producción de celulasas.....	32
3.3.3	Cuantificación de proteína extracelular y celular.....	33
3.3.4	Determinación de azúcares reductores (Somogy-Nelson).....	34
3.3.5	Preparación de la solución madre.....	35
3.3.6	Cinética enzimática.....	36
3.3.7	Cuantificación de azúcares reductores (Somogy-Nelson).....	36
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	Evaluación nutricional de las dos especies de <i>Opuntia</i> utilizadas.....	37
4.2	Crecimiento de la cepa VML-2 en medio sólido.....	40
4.3	Evaluación microscópica.....	41
4.4	Determinación y cuantificación de proteína celular y extracelular por el método de (Biuret).....	42
4.5	Cinética enzimática (Somogy-Nelson).....	43
4.5.1	Cinética enzimática en nopal <i>Opuntia ficus indica</i> var. ANV1.....	43
4.5.2	Cinética enzimática en nopal <i>Opuntia phaeacantha</i>	44
5.CONCLUSIONES		
6.LITERATURA CITADA		
7.ANEXOS		
		51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal.....	7
Cuadro 2. Principales variedades cultivadas de nopal verdura.....	10
Cuadro 3. Principales especies de <i>Opuntia</i> utilizadas como forraje en las praderas del Norte de México.....	11
Cuadro 4. Valor nutrimental del nopal.....	12
Cuadro 5. Composición del medio líquido específico para producción de celulasa.....	32
Cuadro 6. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret.....	34
Cuadro 7. Contenido nutricional de dos variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas.....	38
Cuadro 8. Contenido de proteína celular y extracelular a las 96 horas de fermentación.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la celulosa.....	18
Figura 2. Variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas.....	24
Figura 3. Fotografía de las cepas aisladas conservadas en tubos de cultivo con AS.....	31
Figura 4. Solución madre (sustrato) al 5%.....	35
Figura 5. Comparación gráfica del contenido nutricional entre las dos variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas.....	39
Figura 6. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio solido.....	40
Figura 7. Observación microscópica (100X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2.....	41
Figura 8. Degradación enzimática de celulosa en nopal <i>Opuntia ficus indica</i> var. ANV1 utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.....	43
Figura 9. Degradación enzimática de celulosa en nopal nopal <i>Opuntia phaeacantha</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.....	44

RESUMEN

El nopal es una verdura con un alto contenido de fibras las cuales están compuestas principalmente de celulosa esta es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas, la enzima que se encarga de la degradación de la celulosa es la celulasa.

El presente trabajo evaluó nutricionalmente dos variedades de (*Opuntia*) las cuales fueron obtenidas de dos localidades del país, la primera (*Opuntia ficus indica* var. ANV1) en la UAAAN, ubicado en Buenavista Saltillo Coahuila el cual es utilizado como verdura y la segunda (*Opuntia phaeacantha*) de la comunidad Los Escobedos, Apaseo el Grande, Guanajuato que es utilizado como fruta, obteniendo valores semejantes en sus componentes en las dos variedades.

Se realizó una fermentación con un tiempo de 96 horas para producir la enzima celulasa que es capaz de hidrolizar la celulosa empleando la cepa VML-2 aislada de rumen bovino e identificada por Valdez (2010), se realizó una cinética enzimática a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos, así como 24, 48, 72 y 96 horas. Se realizó una curva de degradación de celulosa en dos variedades de *Opuntia* (nopal) empleando el extracto enzimático producido, en la cual se observaron diferencias significativas ya que *Opuntia phaeacantha* presentó una máxima actividad de 3751 U en un tiempo de 90 minutos; mientras que para la variedad de *Opuntia ficus indica* var. ANV1 su máxima actividad se observó a los 120 minutos con valores máximos de 2970 U. La variedad *Opuntia phaeacantha* por su alto contenido de fibra presenta mayor actividad enzimática que en la variedad *Opuntia indica* var. ANV1.

Palabras clave: *Opuntia, celulosa, celulasa, actividad enzimática*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El nopal, es uno de los símbolos más importantes de identidad mexicana. También es un elemento fundamental en la mitología histórica de la fundación de la gran Tenochtitlán que significa “nopal sobre la piedra”. Los aztecas llamaban al nopal nochtli o nopalli. Se sabe que desde tiempos prehispánicos las culturas mesoamericanas encontraron en el nopal cualidades alimenticias y medicinales en las cuales basaban muchas de sus costumbres (Jiménez, 2004).

Existen evidencias de su uso desde hace más de 9 000 años, pertenece a la familia Cactaceae, subgéneros *Opuntia* y *Nopalea*. Junto con el maíz (*Zea mays*, L.), el frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) y el maguey (*Agave americana*), fue alimento fundamental, y responsable en buena medida de asentamientos humanos y del desarrollo cultural de grupos Chichimecas del centro y norte del país. También trasciende su utilización como bebida, medicina, tinte, en prácticas mágico-religiosas y otros usos (Anaya y Bautista, 2008).

Las propiedades medicinales del nopal también se hicieron notar desde un principio, atribuyéndose al mismo cualidades diversas como anti-inflamatorio, diurético y antiespasmódico, entre otras; actualmente, en este ámbito, se llevan a cabo variadas e interesantes investigaciones. Los nopales están ligados en forma particular con México y Mesoamérica, su centro de origen genético; por ejemplo, en el escudo de México figura un águila posada sobre un nopal, un símbolo que ha llegado hasta nuestros días del jeroglífico de la gran Tenochtitlán y significa *sitio del nopal que crece sobre una piedra* (Sáenz, 2006).

El uso del nopal en México se inició con las antiguas civilizaciones Mesoamericanas a través de la recolección de tallos, frutos y flores de *Opuntia*, los

cuales fueron utilizados por diversas tribus del norte, centro y sur de México, como uno de los alimentos básicos de su dieta (Saéñz, 2006).

1.2 Justificación

Una de las verduras con un elevado porcentaje de fibras es el nopal, estas fibras están compuestas principalmente por celulosa la cual no es muy utilizada por el humano debido a la complejidad de degradación de sus componentes y sus elevados costos, para la resolución de este problema es posible la utilización de enzimas producidas por microorganismos del rumen bovino los cuales hasta el momento no han sido utilizados. El motivo de la realización de este trabajo ayudará a abrir una ventana de oportunidades dentro de la industria alimentaria conociendo la aplicación de estas enzimas con el fin de mejorar y en consecuencia obtener beneficios en su utilización principalmente en la elaboración de productos como lo son nopalitas en salmuera, en escabeche y la mermelada de nopal etc. Además que los productos tendrían gran demanda debido a los beneficios que tiene el nopal, un ejemplo de ello es el control de la diabetes ya que logra una estabilidad satisfactoria del azúcar en sangre lo cual evita llegar a niveles no deseados.

1.3 Hipótesis

La cepa VML-2 aislada del rumen bovino favorece la degradación enzimática de *Opuntia phaeacantha* y *Opuntia ficus indica* var. ANV1.

1.4 Objetivo general

Emplear la cepa VML-2 aislada del rumen bovino productora de celulasa para realizar una hidrólisis enzimática en nopal.

1.5 Objetivos específicos

1. Caracterizar dos variedades de nopal mediante análisis bromatológico

2. Obtener un extracto enzimático mediante la utilización de la cepa VML-2 extraída del rumen bovino llevando a cabo una fermentación para la obtención de la misma.

3. Realizar cinéticas de degradación de nopal en el menor tiempo posible empleando el extracto enzimático ya obtenido anteriormente y realizando cinética enzimática.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del nopal

En América el nopal ha desempeñado desde tiempos muy remotos un papel importante en el desarrollo de las culturas del centro de México. La explotación de los recursos renovables ha constituido por mucho tiempo la base de la economía de la vida del hombre del campo sobre todo en la región árida del norte de México, y los sistemas de manejo y explotación actuales, que se han desarrollado en forma empírica pasando de generación en generación, siendo de carácter destructivo en detrimento de los recursos nativos en algunos casos como el nopal. Sin embargo el manejo que se le ha dado a través del tiempo, ha permitido que un recurso natural, símbolo de nobleza y riqueza, hoy en día paradójicamente se le asocie con la miseria, ignorancia y marginación (Bravo, 1978).

El nopal (*Opuntia* spp.) es un producto que tiene una gran importancia económica, por el uso de su fruta o como verdura en la alimentación del ser humano, pero también como forraje para ganado, otros usos de esta planta están en la conservación de suelos, y en la industria farmacéutica y cosmética, además para la producción de la “grana cochinilla” como fuente de colorante natural. Adicionalmente, el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) constituye una fuente de ingreso en las comunidades rurales en zonas áridas y semiáridas de México (Flores y Olvera, 1995).

El nopal también es un cultivo con importantes propiedades para la conservación de los suelos, especialmente aquellos poco fértiles y con pendientes pronunciadas cuya utilización con cultivos básicos ha propiciado erosión y degradación de flora y fauna silvestre (Flores y Ramírez, 1995).

La producción de nopal para consumo humano se concentra en las localidades de la parte central del país: al sur de la ciudad de México en Milpa Alta, Distrito Federal,

con 4,337 ha y Tlalnepantla en Morelos, con 2,737 hectáreas. Ambas localidades aportan el 80% de la producción nacional (Flores y Olvera, 1995).

Las características del género *Opuntia* son variables, y se destaca principalmente en la forma de los cladodios y el tamaño y color de los frutos; siendo los brotes tiernos (nopals) de *Opuntia ficus-indica* los que primordialmente, por lo menos en México, se utilizan en la producción de nopal verdura, y que con este fin ocupan un aproximado de 10,500 Ha. En territorio mexicano (Flores, 2003).

2.1.1 Origen

El nopal es originario del continente americano; se le encuentra distribuido desde Canadá hasta Argentina y preferentemente en todas las zonas áridas y semiáridas. Dadas las características morfológicas y fisiológicas que presenta esta planta, le permite soportar condiciones ambientales desde escasa precipitación hasta altas y bajas temperaturas. Los cladodios, tallos del nopal, también conocidos como palas o pencas, son articulados aplanados y con tejidos carnosos; en el centro de la penca se encuentra una red bilateral del tejido celulósico que con el transcurso del tiempo se endurece, dándole a ésta una constitución rígida; la forma y el grosor de las pencas es variable, así como su color, el mismo que varía del verde claro hasta el gris o ceniza, según la edad de la planta. Se sabe que esta planta no necesita mayores cuidados en su cultivo; los tunales pertenecen al núcleo de cultivos del futuro que han comenzado a despertar de su desértico letargo (Guzmán y Chávez, 2007).

La familia *Cactaceae* es endémica del continente Americano, lo que significa que antes que el hombre distribuyera plantas de esta familia, no existían en Europa, África, Asia ni en Australia. Las cactáceas prosperan sobre todo en las regiones áridas y semiáridas. En México, con el término nopales se reconoce a las plantas de la familia *Cactaceae* de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*; debido a la presencia de gran cantidad de especies. México es considerado como uno de los centros de origen (Flores y Ramírez, 1995).

2.1.2 Clasificación taxonómica

Para Bravo (1978) la clasificación taxonómica de la familia de las cactáceas (cuadro 1), se encuentra sujeta a cambios en su clasificación en base a conceptos científicos a lo largo del tiempo.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal (Flores y Ramírez, 1995).

Reino	Vegetal
Subreino	Embryophíta
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledonea
Subclase	Dialipétalas
Orden	Opuntiales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Tribu	Opuntiae
Géneros	<i>Opuntia</i> y <i>Nopalea</i>

El género *Opuntia* en México presenta cinco subgéneros, diecisiete series y 104 especies. El género *Nopalea* presenta 10 especies de las cuáles la “*Nopalea Cochenillifera*” se utiliza como Nopal Verdura (Bravo, 1978) dentro de las cuales destacan:

Subgénero *Cylindropuntia* presenta ocho series y 29 especies de las cuales sólo 3 se utilizan como forraje; *O. fulgida*, *O. cholla*, *O. imbricata*.

- Subgénero *Gmsonia* que presenta una sola especie.
- Subgénero *Corinopmtia* que presenta ocho especies.
- Subgénero *Opuntia* que presenta 17 series y 63 especies de las cuales se utilizan como forraje. *O. decumbes*, *O. microdasys*, *O. rastrera*, *O. azurea*, *O. lindheimeri*, *O. cantabrigiensis*, *O. duranguensis*, *O. leucotricha*, *O. robusta*, *O. stenopetala*, *O. rufida*, *O. violacea*, *O. phaeacantha*, *O. neochrysacantha*, y *O. pailana*. Se utilizan como tuna seis especies: *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha*, *O. megacantha.*, *O. xoconostle* y *O. ficus-indica* y *O. robusta*.
- Subgénero *Stenopuntia* con tres especies de las cuales, dos se utilizan como forraje: *O. stenopetala* y *O. grandis*.

El género *Nopalea* en México presenta 10 especies, de las cuales probablemente sólo *N. cochellinifera* se utiliza como nopal verdura.

En suma, de las 104 especies de *Opuntia* y las 10 de *Nopalea*, se utilizan como forraje 15 especies, como tuna seis especies y como verdura tres especies (dos de *Opuntia* y una de *Nopalea*).

Se considera que esta clasificación es útil para los nopales silvestres y por lo tanto, para las especies utilizadas como forraje; sin embargo, resulta poco útil para las variedades cultivadas para producir tuna y verdura (Bravo, 1978).

2.1.3 Cultivo de nopal

En México, se cultivan 10,500 hectáreas de plantaciones para producir nopalito con una producción de 54.82 ton/ ha sin contar con los huertos familiares utilizados para este mismo propósito (Flores, 1997). Se consideran la ciudad de México y su área conurbana el primer centro de consumo en el país. Además, se reportan tres millones de nopaleras silvestres donde se recolectan entre tres y cuatro mil toneladas de nopalito por temporada y se distribuye fundamentalmente en salmuera y escabeche (Zuñiga *et al.*, 2003).

En México se tienen alrededor de 150 mil hectáreas cultivadas de nopales para forraje, 60 mil hectáreas para la producción de tuna, 11 mil hectáreas para nopal verdura y 100 hectáreas para producción de grana cochinilla (Pacheco, 2010).

El nopal, como la mayoría de los cultivos, manifiesta su producción en la parte aérea, de la cual el hombre se beneficia en forma directa; por ello, al referirse a los aspectos nutricionales del nopal se han realizado diversos ensayos de fertilización con productos químicos y orgánicos limitándose a evaluar su efecto sobre la fenología, el rendimiento y la calidad de su producto. Sin embargo, existe la necesidad de encontrar las bases técnicas de la producción relacionadas con la capacidad de extracción y selectividad realizada por parte de las raíces de las plantas (cuadro 2).

Las variedades de nopal cultivadas para producir verdura se desarrollaron durante miles de años en los agostaderos y los huertos familiares, por lo que son variedades obtenidas mediante selección por el hombre (Pérez, 2005).

Cuadro 2. Principales variedades cultivadas de nopal verdura (Pérez, 2005)

Variedad	Entidad de producción	Especie
Milpa Alta	Distrito Federal, Morelos	<i>O. ficus indica</i>
Atlixco	Puebla, Estado de México	
Copena VI	Estado de México, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Hidalgo	
Copena F1	Estado de México, Sonora, Baja California	
Moradilla	Estado de México	
Blanco	Michoacán	
Negro	Michoacán, Guanajuato	
Blanco con espinas	Guanajuato	
Polotitlan	Estado de México	
Tamazunchale	San Luis Potosí, Hidalgo	<i>Nopalea cochellinifera</i>
*Tapón	San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Durango, Aguas Calientes, Jalisco, Querétaro	<i>O. Robusta</i>

*Nopal silvestre y plantado como cerco en huertos familiares y parcelas agrícolas, objeto de recolección.

Fuente: "Mercado mundial del nopalito" ACERCA, UAM, CIESTAM, México 1995.

2.1.4 Principales especies de nopal

De acuerdo con Sáenz (2006) las principales especies de *Opuntia* se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Principales especies de *Opuntia* utilizadas como forraje en las praderas del Norte de México

Nombre científico	Nombre común
<i>O. streptacantha</i>	Cardón
<i>O. leucotricha</i>	Duraznillo
<i>O. robusta</i>	Tapón
<i>O. cantabrigiensis</i>	Cuijo
<i>O. rastrera</i>	Rastrero
<i>O. microdasys</i>	Cegador
<i>O. lindheimeri</i>	Cacanapo
<i>O. engelmannis</i>	Rastrero
<i>O. azurea</i>	Coyotiyo
<i>O. stenopetala</i>	Serrano
<i>O. imbricata</i>	Cardenche
<i>O. fulgida</i>	Choya
<i>O. choya</i>	Choya
<i>O. macrocentra</i>	Chivero
<i>O. chrysacantha</i>	Espina amarilla
<i>O. lucens</i>	Penca redonda
<i>O. duranguensis</i>	
<i>O. tenuispina</i>	

2.1.5 Valor nutrimental del nopal

Existen variadas opiniones en cuanto a su composición química, los autores difieren entre los gramos que corresponden a cada componente, más no en la existencia e importancias de estos. El Plan Rector Sistema Producto Nacional Nopal presenta datos en los que destaca la fibra dietética con 3.6 gramos cuando el nopal alcanza un peso de 100 gramos (Valencia, 2010).

Cuadro 4. Valor nutrimental del nopal

Componente	Nopalitos 100g	Minerales	Nopalitos 100g	Vitaminas	Nopalitos 100g
Calorías	40	Calcio (miligramos)	56	Vitamina C (miligramos)	14
Grasa (gramos)	0.5	Hierro (miligramos)	0.3	Tiamina (miligramos)	0.01
Colesterol (miligramos)	0	Magnesio (miligramos)	85	Riboflavina (miligramos)	0.06
Carbohidratos (gramos)	9.6	Fósforo (miligramos)	24	Niacina (miligramos)	0.05
Fibra dietética (gramos)	3.6	Potasio (miligramos)	220	Vitamina B6 (miligramos)	0.06
Proteína (gramos)	0.7	Sodio (miligramos)	5	Folato (microgramos)	6
		Cobre (miligramos)	0.08	Vitamina B12 (microgramos)	0
		Selenio (miligramos)	0.6	Vitamina A (I.U.)	51
		Zinc (miligramos)	0.12	Vitamina E (A.T.E)	0.01

Fuente: Valencia (2010)

2.1.6 Aplicaciones

A lo largo de la historia en que los mexicanos han utilizado el nopal, han desarrollado un gran número de usos y aplicaciones de esta planta:

a) Como fruta: La tuna es una fruta muy aceptada en el mercado nacional, además de que se está exportando, principalmente a los E.U.A.; en cantidades menores se exporta a Canadá y a algunos países europeos y a Japón (Flores y Ramírez, 1995).

b) Como verdura: El nopalito está ligado a la comida mexicana del centro del país y su oferta es abundante durante casi todo el año. Su demanda es menor en los estados del norte y casi nulo en las costas del país, donde lo consumen en épocas específicas y restringidas como son la Cuaresma y Navidad. Como la tuna, el nopalito también se exporta a los E.U.A (Flores y Ramírez, 1995).

c) Como forraje: En México la utilización del nopal como forraje es el uso más importante por su volumen (Flores y Ramírez, 1995).

d) Como cerco: La utilización de variedades espinosas para formar cercos en los huertos familiares y en los predios ganaderos es común y muy antigua en México (Flores y Ramírez, 1995).

e) Como substrato para la producción de grana de cochinilla: La obtención de colorante carmín, producto de la cochinilla que parasita el nopal, está volviendo a tener importancia en los estados de Oaxaca y Chiapas. La producción de grana fue en la época de la colonia, la segunda fuente de divisas, después de la plata en la Nueva España. El mercado de grana decayó con el desarrollo de las anilinas artificiales, pero recientemente al considerarse algunas de estas como cancerígenas se reabrió el mercado para la grana, siendo demandado por la industria de embutidos cárnicos y cosméticos. Sobre todo en el ramo de jarabes (Flores y Ramírez, 1995).

f) Como planta medicinal: El consumo de nopalitos y de tuna ácida (el xoconostle) ha probado que abate en la sangre los niveles de azúcar y colesterol, por lo que la gente los consume cocinados, así como en cápsulas y comprimidos (Flores y Ramírez, 1995).

g) Como materia prima en la producción de cosméticos: En México se fabrican jabones, cremas, champús y enjuagues, que contienen extractos de nopal (Flores y Ramírez, 1995).

h) Como materia prima industrial: En México se procesa el nopalito como alimento (en salmuera y escabeche), principalmente para el mercado de exportación; de la tuna se ha propuesto la obtención de mermelada, jugos, néctares, colorantes, pectinas y fructosa (Flores y Ramírez, 1995).

i) En la conservación del suelo: El nopal se utiliza para proteger el suelo y frenar la desertificación, es una planta que puede formar “setos” en curvas de nivel que ayudan a controlar la erosión del suelo, además de que soporta los ambientes desfavorables del desierto, caracterizados por una precipitación pobre y errática y alta oscilación térmica diaria y anual (Flores y Ramírez, 1995).

j) Para abatir la contaminación atmosférica: El nopal, como planta de tipo CAM, consume CO₂ por la noche en grandes cantidades, por lo que es recomendable su uso masivo en los camellones de las ciudades con problemas de contaminación y aún como plantas de ornato en el interior de las casas habitación (Flores y Ramírez, 1995).

2.2.7 Importancia en la industria alimentaria

Dentro de los productos de nopal y tuna en la industria alimentaria tecnificada destacan los nopalitos en salmuera, en escabeche y la mermelada de nopal.

Nopal verdura o “nopalitos”.

El nopalito se caracteriza por su alto contenido de humedad, que lo hace ser muy succulento pero susceptible a la deshidratación, oxidación y al ataque de microorganismos, lo cual dificulta su conservación en fresco. Otros componentes a considerar son las gomas y mucílagos (conocidos como la baba del nopal) cuya presencia causa problemas de conservación y de aceptación del producto por parte del consumidor (Flores y Ramírez, 1995).

Actualmente existen diversas empresas que procesan nopalitos, principalmente con fines de exportación, dado que la demanda nacional en buena medida lo prefiere en fresco. Los principales productos que se obtienen son los nopalitos en salmuera y en escabeche, salsa de nopal, mermelada de nopal y nopales confitados. Por los volúmenes manejados, los productos más importantes son los nopalitos en salmuera y en escabeche (Flores y Ramírez, 1995).

Para cualquiera de estos productos, los primeros pasos de su procesamiento son la recepción y el acondicionamiento de la materia prima, que de preferencia deben ser nopalitos de la mejor calidad y ya desespinaados por los productores.

El acondicionamiento consiste básicamente en escaldar y lavar el producto, con el propósito de inactivar enzimas, destruir microorganismos, ablandar el producto y eliminar parcialmente el mucilago o baba. Los principales factores a considerar en este proceso son el tiempo y la temperatura del escalde, así como la adición de ciertos compuestos que ayudan a tener mejores resultados. Estos factores se deben ajustar al tipo de materia prima (especie y variedad) de que se disponga. Luego del escalde, se

hace el lavado con agua fría, lo que implica un choque térmico, elimina pectinas y mucílago adherido, además fija el color verde característico del producto.

El nopalito resultante de esta fase de acondicionamiento es la materia prima que se puede destinar a cualquiera de los diferentes procesos: salmuera, escabeche, mermelada o confitado (Flores y Ramírez, 1995).

2.2 Celulosa

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado “celulosama”, como en los clostridios y en las bacterias del rumen (Lind *et al.*, 2002).

Estructuralmente la celulosa es un carbohidrato compuesto de unidades de glucosa unidas en una cadena larga lineal por enlaces β en los átomos de carbono 1-4 de la molécula de azúcar (Alexander, 1980).

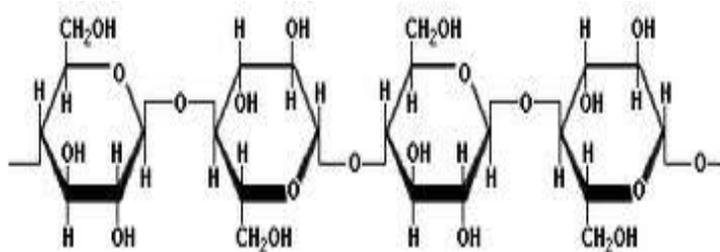


Figura 1. Estructura de la celulosa
(Zabala, 2005).

La celulosa, al igual que el almidón, es un homopolisacárido formado por las moléculas de la glucosa, y es el carbohidrato más abundante de la naturaleza, ya que forma parte integral de todas las paredes de los tejidos de las fibras vegetales. La celulosa es un poco soluble en la mayoría de los disolventes, con excepción de los ácidos minerales concentrados que causan rápidamente su despolimerización; es higroscópica, ya que absorbe agua y se hincha, pero no se disuelve (Badui, 1981).

Se puede considerar como la molécula orgánica más abundante en la naturaleza. Es un polímero lineal de varios miles de glucosas unidas por enlaces ($1\beta\rightarrow4$). Tiene una estructura lineal o fibrosa, en el cual se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas, haciéndolas impenetrables al agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Badui, 1993).

La celulosa es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. A pesar de que está formada por glucosas, los animales no pueden utilizar a la celulosa como fuente de energía, ya que no cuentan con la enzima necesaria para romper los enlaces β -1,4- glucosídicos.

Pero además la configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces hidrógeno intramolecular, formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou et al., 1981).

La celulosa es rápidamente hidrolizada en la naturaleza por organismos aeróbicos del suelo, particularmente por los hongos que degradan la madera. Los organismos anaeróbicos del rumen y del intestino son responsables de la digestibilidad de la celulosa en los animales rumiantes y en los herbívoros (Carrera, 2002).

En relación a su estructura la celulosa está constituida por microfibrillas cristalinas, lineares y de alto peso molecular, formando polímeros de moléculas de D-Glucosa, cuya digestibilidad puede ser muy alta (cerca del 90 %) dependiendo de su grado de lignificación. La disponibilidad de la celulosa para los organismos celulolíticos varía de acuerdo al nivel de lignificación y el ambiente ruminal generado por la dieta, siendo el rumen el principal sitio de digestión con un 80-85% de la cantidad degradada en todo el tracto. La celulosa digestible que puede ser fermentada en el ciego y colon varía de un mínimo de un 5 % a un máximo de un 29 % dependiendo del tipo de forraje, procesamiento, nivel de consumo, y tipo y nivel de suplementación. La

fermentación de este compuesto químico lleva a la formación de ácidos grasos volátiles (Dehority, 1973).

2.2.1 Celulosa bacteriana

La celulosa no sólo se encuentra como componente principal de la madera. Este polímero natural puede ser sintetizado por la bacteria *Glucanacetobacter xylinus*. La celulosa bacteriana tiene numerosas aplicaciones en cosméticos como estabilizantes y emulsificantes. Además de que han desarrollado materiales altamente absorbentes en textiles artificiales, ropa deportiva y materiales de campismo. Otras aplicaciones son en el tratamiento de basura, ultrafiltración del agua, en la producción de piel artificial temporal para la terapia de quemados y úlceras (Badui, 1981).

2.2.2 Enzimas que degradan la celulosa

Las enzimas que actúan sobre la celulosa y sobre los intermediarios de su degradación pueden dividirse en cuatro grupos.

1. Las endoglucanasas [1,4(1,3; 1,4)- β -D-glucán 4-glucanohidrolasas, EC.3.2.1.4] son relativamente inactivas frente a las regiones cristalinas del algodón y del Avicel, pero hidrolizan las regiones amorfas de estos sustratos, incluyendo al papel de filtro, y los sustratos solubles, como la carboximetilcelulosa y la hidroximetilcelulosa. La actividad endoglucanasa se caracteriza por una hidrólisis al azar de enlaces β -glucosídicos, que provoca una rápida disminución de la viscosidad relativa con relación a la velocidad de incremento de grupos reductores. Los productos, especialmente al final de la secuencia de reacciones, incluyen la glucosa, la celobiosa y las celodextrinas de varios tamaños.

2. El segundo grupo de celulasas es el de las celobiohidrolasas (1,4 β -D-glucán celobiohidrolasas, EC.3.2.1.91) que son enzimas del tipo *exo*. Degradan la celulosa amorfa por eliminación cuantitativa de celobiosa de los extremos no reductores de la

celulosa. Cuando son puros, son usualmente poco activos sobre el algodón pero pueden hidrolizar cerca del 40% de los enlaces hidrolizables del Avicel, una celulosa microcristalina. La velocidad de disminución de la viscosidad con relación al aumento en grupos reductores es mucho menor que en las endoglucanasas y las celobiohidrolasas muestran sinergismo en la hidrólisis de la celulosa cristalina, por razones no claramente comprendidas.

3.El tercer grupo de celulasas es el de exoglucosidasas (1,4 β -D-glucán glucobiohidrolasas, EC.3.2.1.74), que hidroliza consecutivamente unidades de glucosa del extremo no reductor de las celodextrinas. La velocidad de hidrólisis disminuye a medida que disminuye la longitud de la cadena de sustrato.

4.El cuarto grupo de enzimas lo constituyen las β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasas, EC. 3.2.1.21) que encienden la celobiosa hasta glucosa y eliminan la glucosa del extremo no reductor de celodextrinas pequeñas. A diferencia de las exoglucosidasas, la velocidad de hidrólisis de la β -glucosidasa aumenta a medida que el tamaño del sustrato disminuye, siendo la celobiosa el sustrato que mas rápidamente se hidroliza. Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo solo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular, capaz de hidrolizar la celulosa (Eriksson, 1985).

2.2.3 Celulasas

Las celulasas son un sistema complejo de enzimas que hidrolizan las uniones β -(1-4) de los glucanos y se encuentran en la naturaleza en microorganismos que atacan a las plantas, así como en el sistema digestivo de animales herbívoros. Las preparaciones comerciales provienen principalmente de *Trichoderma reesei* y de *A. niger* (Badui, 2006).

La celulasa es una enzima compleja que se encarga de la degradación de la celulosa y consta de dos unidades importantes como mínimo: C-1, que rompe los enlaces de hidrogeno, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, y C-X, que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa. Las celulasas parecen diferir en su capacidad para absorber el factor hidrolítico (Beauchemin y Rode, 1996).

2.2.4 Modo de acción de las celulasas

Las celulasas son proteínas derivadas de procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad, una enzima de celulosa es una mezcla de diferentes componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa. Este complejo enzimático esta formado por tres tipos de enzimas: endoglucanasas (EGs) o endocelulasas (β -1,4-D-glucan 4-glucanohidrolasa), celobiohidrolasas (CBHs) o exocelulasas (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa) y β -glucosidasa (BGs) o celobiasa (β -D-glucósido glucohidrolasa) (Enari, 1987).

2.2.5 Microorganismos productores de celulasas

De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, los rendimientos que se obtienen utilizando hongos son superiores a los conseguidos con bacterias, por

lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos (Valdez, 2010).

Otros microorganismos productores de celulasas incluyen las bacterias aeróbicas mesófilas y termófilas (*Cellulomonas sp*, *Cellvibrio sp*, *Microbispora* y *Thermomonospora sp*) y las bacterias anaeróbica mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*).

Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas hasta de 90° C.

2.2.6 Uso y aplicaciones en alimentos

Las celulasas comerciales provienen de *Aspergillus niger* y *Trichodema viride* y atacan a la celulosa produciendo celulodextrina y glucosa; se han utilizado en la industria alimentaria para ablandar vegetales y frutas de tejidos celulósicos, al igual que en diferentes productos para facilitar su rehidratación. En general, el uso de celulasas a nivel industrial ha sido muy reducido debido a la baja actividad de las enzimas comerciales (Badui, 1981).

3.MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Producción Animal (laboratorio de microbiología y el de Nutrición Animal) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Este trabajo se dividió en tres etapas, las cuales se describen a continuación.

Etapa I. Caracterización bromatológica del nopal La cual se llevo a cabo por medio de las técnicas del A.O.A.C. (1990).

3.1 Material orgánico de evaluación

Se evaluaron nutricionalmente dos especies de nopal (*Opuntia ssp*), las cuales fueron obtenidas, la primera en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y la segunda en Los Escobedos del municipio de Apaseo el Grande, Guanajuato (ver figura 2).



Figura 2. Variedades de *Opuntia* utilizadas

Fuente: imágenes tomadas por la autora

3.1.1 Determinación de materia seca total

Para determinar el contenido de humedad del nopal se realizó una prueba que consistió en la evaporación del agua aplicando una temperatura por encima de los 100°C. En la fabricación de alimentos se pueden utilizar procedimientos rápidos para determinar humedad usando estufas desecadoras especiales que trabajan a temperaturas altas. Otras estufas tienen lámparas secadoras de radiación infrarroja y tienen además una balanza de lectura directa. Los hornos de microondas pueden utilizarse para la determinación de humedad en el laboratorio en forma rápida. Para esta determinación se seleccionó un crisol de porcelana de la estufa, utilizando unas pinzas con la finalidad de que se encuentre a peso constante identificándolo con el número que se encuentra en este, se puso en un desecador para enfriarlo por un tiempo de 15-20 minutos, transcurrido el tiempo se pesó en una balanza analítica, por separado se pesaron 2 gramos de muestra seca y molida sobre un papel limpio y destarando el peso del papel, se colocó la muestra en el crisol y se metió en la estufa durante 24 horas, transcurrido el tiempo se sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar por 15 a 20 minutos en un desecador, por último se pesó, se registró el peso y se hicieron los cálculos.

3.1.2 Determinación de humedad

Hay muchos métodos para la determinación del contenido de humedad de los alimentos, variando en su complicación de acuerdo a los tres tipos de agua y a menudo hay una correlación pobre entre los resultados obtenidos. Para esta determinación se utilizó el valor obtenido en materia seca total restando a 100 dicho valor.

3.1.3 Determinación de proteína (método de microkjeldahl)

Se obtiene por la destrucción de materia orgánica, ya sea de un concentrado, forraje o cualquier compuesto nitrogenado, por acción del ácido sulfúrico concentrado o en caliente obteniéndose como resultado sulfato de amonio, el cual después es destilado a amoniaco. El procedimiento se realizo en 3 fases: digestión, destilación y titulación. Digestión: de la muestra por ebullición con H_2SO_4 concentrado y en presencia de catalizadores, la materia orgánica se oxida a CO_2 y H_2O mientras que una parte del ácido se reduce a SO_2 . El nitrógeno transformado en NH_3 se combina con la parte restante del ácido sulfúrico para formar sulfato de amonio. Destilación: mediante esta operación el nitrógeno que está en forma de sulfato de amonio, se ataca con un álcali fuerte que es la soda cáustica (NaOH) para liberar el amoniaco. El vapor de agua arrastra el amoniaco y después de la condensación lograda con la ayuda del refrigerante, el hidrato de amonio se recibe en el Erlenmeyer. El Erlenmeyer contiene ácido bórico, con los siguientes indicadores, rojo de metilo y verde de bromo cresol, formándose borato de amonio. Titulación: se hace con ácido clorhídrico de normalidad conocida. El HCl reacciona con el borato de amonio. En el punto final ya no hay borato de amonio y un pequeño exceso de HCl provocara un cambio del pH y el consiguiente viraje de la mezcla. Para esta determinación se pesaron 0.3gr de muestra, luego se agregaron 0.5gr de catalizador de oxidación, para acelerar la reacción, se agregar 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado y se colocó el balón en la parte de digestión, este termina cuando el contenido del balón es completamente cristalino o verde clarito. Se Coloco la muestra digerida en el aparato de destilación, se agregaron de 7 a 10mL de NaOH e inmediatamente se conecto el vapor para que produjera la destilación. Se Conectó el refrigerante y se recibió el destilado en un Erlenmeyer conteniendo 15mL de solución de indicadora; la destilación termino cuando ya no paso más amoniaco y hubo viraje del indicador, luego se procedió a la titulación con H_2SO_4 0.225N, y por ultimo se anoto el gasto para realizar los cálculos.

3.1.4 Determinación de cenizas totales (minerales)

La muestra se incinera a 600°C para quemar todo el material orgánico. El material inorgánico, que no se destruye a esta temperatura se llama ceniza. A todos los componentes inorgánicos de los alimentos se les llama colectivamente ceniza, aunque algunos de ellos se volatilizan al quemar los alimentos. Esta ceniza contiene los minerales esenciales para el mantenimiento de la vida, siendo los más importantes: calcio, cloro, yodo, hierro, fósforo, potasio, sodio y azufre. Esta se realizó mediante el método seco en la cual se utilizó la determinación de materia seca total, después de haberla pesado se pre-incineró en parrillas eléctricas a bajas temperaturas para evitar salpicaduras retirándola cuando deje de sacar humos, esta se pasó a la mufla dejándola por un periodo de 2-3 horas, transcurrido el tiempo se sacó de la mufla para dejar enfriar 15 minutos en un desecador para posteriormente pesar y realizar los cálculos.

3.1.5 Determinación de extracto etéreo o grasa

Se realizó una prueba para determinar la cantidad de grasa en una muestra de nopal mediante el método Soxhlet en la cual se emplean diferentes solventes. Para esto se pesaron 5 gramos de muestra seca sobre un papel filtro, esta se depositó en un cartucho poroso de celulosa y se cubrió con algodón, lo anterior fue depositado en un sifón. Se sacó un matraz redondo fondo plano, boca esmerilada de la estufa que este a peso constante y se dejó enfriar por 15 minutos para posteriormente pesarlo. Al matraz redondo se adicionó hexano hasta la mitad del matraz, este se acopló al refrigerante del dispositivo Soxhlet, se dejó extraer por un periodo de 10 horas, contando el tiempo a partir de cuando comenzó a hervir, cuando finalizó la extracción se evaporó el solvente en un rota vapor, se puso a peso constante nuevamente el matraz bola fondo plano en la estufa a 100-103°C por un espacio de 12 horas y transcurrido este tiempo se sacó, enfrió y peso para finalmente realizar los cálculos.

3.1.6 Determinación de fibra cruda

Fibra cruda es la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en condiciones específicas. Para determinar la fibra cruda se utilizó la muestra ya desengrasada de la cual se pesaron 2 gramos que se depositaron en un vaso de Bercelius, ahí se agregaron 100 ml de solución de ácido sulfúrico 0.225 N, se conectó al aparato de reflujo por un periodo de 30 minutos contados a partir de cuando comenzó a hervir, al hervir se bajó la temperatura para mantenerse en ebullición suave, transcurrido ese tiempo se sacó y filtró a través de una tela de lino y lavó con 3 porciones de 100 ml de agua destilada caliente y realizó la prueba de papel tornasol para verificar presencia de ácido, la fibra (residuo que quedó en la tela de lino) se pasó al vaso de Bercelius con 100 ml de solución de hidróxido de sodio 0.313 N y se conectó nuevamente al aparato de reflujo por 30 minutos, transcurrido el tiempo se puso a peso constante en la estufa, se sacó y se filtró la muestra en una tela de lino, se lavó con 3 porciones de agua destilada caliente para después realizar la prueba de papel tornasol para verificar la presencia de reacción alcalina, se escurrió el exceso de agua presionando la tela de lino, se retiró la tela del embudo, se extendió y retiró la fibra con una espátula y depositó en un crisol de porcelana previamente identificado, se colocó la muestra en la estufa de 100 a 103 °C por un tiempo de 12 horas, transcurrido el tiempo se retiró de la estufa, se enfrió y pesó, por último la muestra se preincineró en una parrilla y se introdujo en la mufla a 600 °C por tres horas, se sacó, se enfrió y se pesó para realizar cálculos.

3.1.7 Determinación de fibra detergente neutro (FDN)

Es la porción de la muestra de alimento que es insoluble en un detergente neutro (método de los detergentes de Van Soest). Está básicamente compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice, y se le denomina pared celular. Este método es útil para la determinación de fibras vegetales en alimentos. Aparentemente tiene la capacidad de separar los componentes nutricionales solubles de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación biológica para su aprovechamiento. El método tiene limitaciones en su precisión cuando los valores de proteína son muy altos y los valores de fibra son bajos. Para llevarlo a cabo se pesó 0.5 gramos de muestra dentro de una bolsa de Nylon exclusiva para filtrar y uso de esta técnica, se introdujo al equipo ANALIZADOR DE FIBRA ANKOM 200, se agregó la solución FDN y se activó la temperatura (100 °C) y la agitación con duración de 1 hora, transcurrido el tiempo, se drenó la solución y en seguida se realizaron dos enjuagues en un periodo de tiempo de 5 minutos a 90 °C cada uno, se volvió a drenar el agua, se sacó la bolsa del equipo para ser sumergida en acetona y secada en la estufa a 110°C de 2 a 4 horas, por último se pesó en una balanza analítica

3.1.8 Determinación de fibra detergente ácido (FDA)

Este método permite tener una aproximación del grado de digestibilidad de las fibras en el alimento. La muestra es digerida por medio de cetil-trimetil-amonio en ácido sulfúrico y el residuo es considerado como la fibra no digerible. Es la porción de la muestra de alimento que es insoluble en un detergente ácido (método de los detergentes de Van Soest). Está básicamente compuesta por celulosa, lignina y sílice. La importancia de la misma radica en que está inversamente correlacionada con la digestibilidad del forraje. La fibra detergente ácido es separada en dos fracciones: la primera, ácidos detergentes solubles que son el contenido de hemicelulosa rápidamente digerible y la segunda, la fibra detergente ácido es la porción menos

digestible en alimentos, la FDA es el indicador de la digestibilidad de los vegetales por su alta concentración de lignina que es la parte digerible de la fibra, mientras más bajo sea el valor de la FDA, mas alimento se puede digerir. Para llevarlo a cabo se pesó 0.5 gramos de muestra dentro de una bolsa de Nylon exclusiva para filtrar y uso de esta técnica, se introdujo al equipo ANALIZADOR DE FIBRA ANKOM 200, se le agrego la solución FDA y se activó la temperatura (100 °C) y la agitación con duración de 1 hora, transcurrido el tiempo, se dreño la solución y en seguida se realizaron dos enjuagues en un periodo de tiempo de 5 minutos a 90 °C cada uno, se volvió a drenar el agua, se sacó la bolsa del equipo para ser sumergida en acetona y secada en la estufa a 110°C de 2 a 4 horas, por último se pesó en una balanza analítica.

Etapa II. Fermentación para la producción del extracto enzimático a partir de un microorganismo aislado del rumen bovino

3.2 Material biológico

Las cepas de los microorganismos VML-2 (vaca alimentada con masilla y levadura) que fueron utilizadas para esta investigación fueron tomadas de cultivos puros aislados e identificados por Valdez (2010) pertenecientes al cepario del Departamento de Producción Animal.

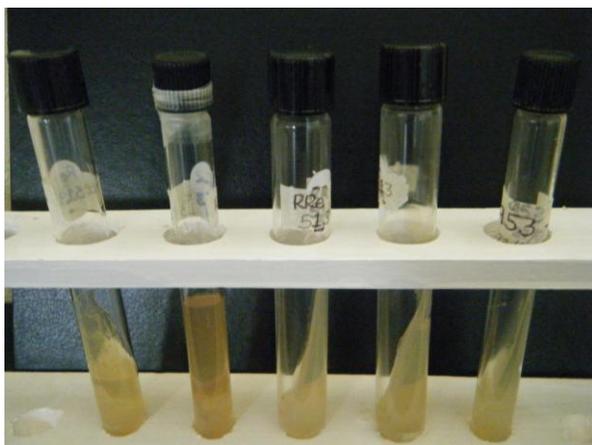


Figura 3. Fotografía de las cepas aisladas conservadas en tubos de cultivo con AS Valdez (2010)

3.2.1 Preparación de medio sólido

Se prepararon varias cajas Petri con agar Schaedler (BD BBLTM), agregando 6.28g por cada 150ml de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 250ml, esto se disolvió con flama de un mechero hasta que el líquido presentara una coloración cristalina, posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15min.

3.2.2 Siembras en medio sólido

Para llevar a cabo la siembra se utilizó el medio sólido, transcurrido el tiempo de esterilización del medio se retiró del autoclave para posteriormente realizar el vaciado del medio en las cajas petri las cuales estaban previamente estériles, se realizaron siembras en las cajas, por el método de estría abierta cruzada sobre el agar Schaedler, después se incubó a 37°C por 24 horas bajo condiciones de anaerobiosis, hasta observar crecimiento sobre el medio. Para la creación del ambiente en condiciones anaerobias y favorecer el crecimiento del microorganismo, para llevar a cabo la anaerobiosis se utilizaron botes de plástico con tapa de rosca, dentro del cual se colocaron las cajas Petri ya sembradas, se colocó una vela prendida en el centro del bote y se cerró, colocando cinta alrededor de la tapa para que no hubiese presencia de oxígeno que pudiera interrumpir la anaerobiosis, cuando la vela se apaga indica la ausencia de oxígeno dentro del bote, obteniendo así las condiciones para el crecimiento de las enzimas.

3.2.3 Tinción de Gram

Se realizó la técnica de tinción de Gram para observar las características morfológicas de los microorganismos empleados. Para ello se utilizó un asa la cual fue esterilizada llevándola al fuego del mechero para que no hubiese contaminación a la hora de tomar la muestra, cuando esta se retiró del fuego se dejó enfriar en una de las extremidades del medio para enfriarla, se tomó la muestra del cultivo puro y se disolvió en un portaobjetos a este se agregó una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias, posteriormente se fijó la muestra con calor en el mechero. Una vez fijada la muestra se cubrió con cristal violeta dejándolo reaccionar por 60 segundos y se enjuagó suavemente al chorro del agua; se cubrió de nuevo la superficie con una solución de yodo (lugol) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró utilizando una solución de alcohol-acetona por unos segundos, después

enjuagarse finalmente se cubrió la superficie con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para después enjuagarse con agua destilada. Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos empleando un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión.

3.3 Fermentación para la producción del extracto enzimático

3.3.1 Preparación del medio líquido específico para producir celulasa

Se preparó un medio líquido específico para la degradación de celulosa con la siguiente composición.

Cuadro 5: Composición del medio líquido específico para producción de celulasa.

Componente	Cantidad (%)
NaCl	0.5 %
NaNO ₃	0.3%
KCL	0.5 %
Fuente de C (celulosa)	1 %
Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	
KH ₂ PO ₄	0.2 %
MgSO ₄	0.01 %

3.3.2 Producción de celulasas

Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a la producción de celulasa. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 70 mL de agua destilada y se disolvieron NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15min. La fuente de carbono (celulosa), previamente esterilizada en lámpara V fue disuelta en 30 mL de agua destilada, fue adicionada a los matraces donde fueron

disueltos los minerales una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente esto se realizo por duplicado y teniendo un control. Posteriormente se hizo una suspensión celular, de cada uno de los matraces se tomo 1 ml y del control se agregaron 6 ml estas fueron tomadas con una micropipeta y utilizando puntillas de 1 ml para agregarlos al cultivo puro haciendo un barrido con la misma puntilla que se tomaron las muestras, realizando la suspensión se tomo 0.5 ml para cada matraz excluyendo el control, se incubaron a 40° C y se realizó anaerobiosis esto se realizo por un tiempo de 96 horas. Los experimentos se realizaron por duplicado, se centrifugo el medio en tubos de ensaye a 5000 revoluciones por un tiempo de diez minutos, con la finalidad de separar el extracto enzimático de la biomasa. El extracto enzimático se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml para determinar proteína extracelular por el método de Biuret.

3.3.3 Cuantificación de proteína extracelular y celular

Para la cuantificación de proteína celular y extracelular se tomaron varios tubos de ensaye estériles para agregar cada una de las muestras a analizar, se realizo mediante la técnica de proteínas totales. La técnica consiste en agregar 10 µL de las muestras que se muestran en el siguiente cuadro y 500 µL de reactivo Biuret a cada tubo y leer la absorvancia en un espectrofotómetro a 540 nm. Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima se prepararon una muestra patrón y una muestra blanco.

Cuadro 6: Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	10 µl	-----	-----
Biomasa	-----	-----	10 µl
Extracto enzimático	-----	-----	10 µl
Reactivo Biuret	500 µl	500 µl	500 µl
TP	-----	10 µl	-----

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Tot.} = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patron}} \times \text{conc. Patron}$$

A= absorvancia

Etapa III. Cinéticas enzimáticas del nopal empleando el extracto enzimático producido por la cepa VML-2

3.3.4 Determinación de Azúcares Reductores (Somogy-Nelson):

La técnica de La técnica de azúcares reductores se siguió mediante el método propuesto por Somogyi 1952, Nelson1944.

*Reactivo 1 (Somogyi):

Solución A: 25 g de carbonato de sodio anhídrido (Na₂CO₃), 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (KNa₄H₄O₆·4H₂O), 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y 200 g de sulfato de sodio (Na₂SO₄) se disolvieron en agua destilada y se aforó a 1 litro.

Solución B: en 200 ml de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·H₂O).

El reactivo 1 se preparó mezclando 1 mL de solución en 25 mL de solución A.

*Reactivo 2 (Nelson):

Solución A: en 450 ml de agua destilada se disolvió 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(CNH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$).

Solución B: 3 g de arsenito de sodio heptahidratado ($NaHASO_4 \cdot 7H_2O$) se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

El reactivo 2 se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforaron a 500 mL. Posteriormente se calentó a $55^\circ C$ durante 30 min.

3.3.5 Preparación de la solución madre

Se preparó una solución madre (sustrato) al 5 %. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizado se agregó 100 ml de agua destilada para posteriormente agregar 5 g muestra de nopal utilizando dos variedades.



Figura 4. Solución madre (sustrato) al 5%.

3.3.6 Cinética enzimática

En tubos de ensaye estériles (duplicado) con micropipetas y puntillas se agregaron 200 μ L de la solución madre y 50 μ L de extracto enzimático obtenidos en la fermentación, se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 37° C, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos así como 24, 48,72 y 96 horas.

3.3.7 Cuantificación de azúcares reductores (Somogy-Nelson)

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantifico mediante la técnica de azúcares reductores. La metodología empleada para la medición de azúcares reductores fue la siguiente: se preparo un blanco, este se preparo de la siguiente manera: en un tubo de ensaye esterilizado se agrego 250 μ l de agua destilada y 250 μ de reactivo de Somogy. A cada tubo se que se retiraba en los diferentes tiempos se adiciono 250 μ L del reactivo 1 Somogy esto para detener la actividad enzimática. Terminado el monitoreo a las 96 horas se incubó en baño de agua hirviendo a 90° C durante 10 minutos. Se retiró del agua hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente, se agregaron 250 μ L de reactivo 2 Nelson y se agitó vigorosamente. Se agregaron 4 mL de agua destilada y se agito, para el blanco se realizo la misma técnica, este nos ayudo a ajustar a cero el espectrofotómetro. Finalmente se midió la absorvancia en el espectrómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Una unidad de actividad celulosa se define como:

U= Cantidad de azúcares reductores liberados en mg/ml por cada ml de proteína en 1 hora, empleando celulosa al 1%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I. Análisis bromatológico del nopal

4.1 Evaluación nutricional de las dos especies de *Opuntia* utilizadas.

El cuadro 7 muestra los resultados obtenidos del contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* analizadas, el cual muestra que el contenido de fibra cruda es diferente. Sáenz (2006), indica en su investigación que el nivel de proteína es mayor en cladodios jóvenes, siendo la fibra cruda la que aumenta con el paso del tiempo, llegando a 17.1 por ciento en los tallos suberificados en comparación de los nuevos con 8.0 por ciento; esta tendencia se pierde en cuanto al porcentaje de cenizas, debido a las propiedades que componen a esta misma y su alta relación con la composición química de los suelos. Por su parte, Rodríguez Félix y Cantwell (1988), citados por Sáenz (2006), indican que la composición química de los nopales frescos es principalmente agua (91%) y 1.5% de proteínas, 0.2% de lípidos; 4.5% de hidratos de carbono totales, 1.3% de cenizas, de la cual 90 % es calcio, además, contiene 11 mg/100 g de vitamina C y 30 mg/100 g de carotenoides; y un contenido de fibra (del 1.1%). Fuentes *et al.*, (2004), quienes evaluaron contenido nutricional cuatro variedades de nopal (*Opuntia spp*) forrajero, reportaron los siguientes resultados: proteína entre 5-12%, extracto etéreo entre 0.45-1.89%, fibra cruda entre 10.7-11.4%, ceniza entre 18-35%, MST entre un rango de 88-96%. Mientas que para FAD y FND de las dos especies utilizadas se obtienen valores semejantes comparando con los citados por Mata, (2011), quien menciona es su evaluación de dos variedades de *Opuntia* que el contenido de FAD se encuentra alrededor de 15 y 16% y el contenido de FND entre 32 y 37% aproximadamente.

Cuadro 7. Contenido nutricional de dos variedades de *Opuntia* utilizadas

Componente (%)	<i>Opuntia ficus indica</i> var. ANV1	<i>Opuntia phaeacantha</i>
MST	91.38	89.17
Humedad	8.62	10.82
Proteína cruda	7.78	7.87
Cenizas	21.63	22.60
Materia orgánica	69.76	66.52
Grasa	1.80	1.53
Fibra cruda	9.36	11.48
FDN	36.80	39.53
FDA	14.95	13.50

La figura 5 presenta una comparación del contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* analizadas, en la que se puede apreciar que los valores nutrimentales son muy semejantes en las dos variedades no observándose diferencias significativas entre ellos (ver anexo estadístico).

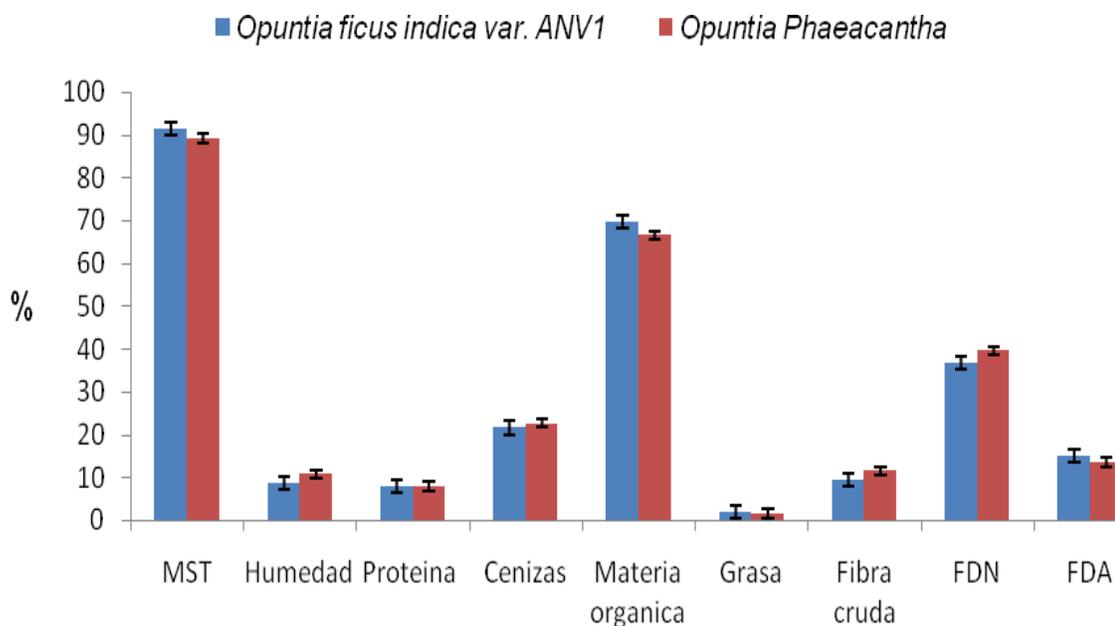


Figura 5. Comparación del contenido nutricional entre las dos variedades de *Opuntia* utilizadas.

Etapa II. Fermentación para la producción del extracto enzimático a partir de un microorganismo aislado del rumen bovino

4.2 Crecimiento de la cepa VML-2 en medio sólido

La cepa VML-2 en el estudio sobre las características macroscópicas, presenta una coloración blanca, elevación convexa, forma irregular, aspecto húmedo y consistencia suave (Figura 6). Mata (2011) y Valdez (2010) presentan resultados muy similares en relación a estas características. Valdez (2010) seleccionó esta cepa como un microorganismo altamente productora de la enzima celulasa, por lo que posteriormente se empleó para la degradación enzimática del nopal.



Figura 6. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio sólido.

4.3 Evaluación microscópica

La evaluación microscópica de las células puras que fueron teñidas mediante la técnica de Gram presentaron las siguientes características: bacilos cortos Gram negativos, no agrupados (Figura 7). Estas características concuerdan con las descritas por Valdez (2010) y Mata (2011).



Figura 7. Observación microscópica (100X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2.

Etapa III. Cinéticas enzimáticas del nopal empleando el extracto enzimático producido por la cepa VML-2

4.4 Determinación y cuantificación de proteína celular y extracelular por el método de Biuret.

En el cuadro 8 representa la cantidad de proteína extracelular y celular a las 96 horas de fermentación, obteniendo valores de 0.95 mg/ml para proteína extracelular y celular, estos valores son similares a los obtenidos por Mata (2011) dónde presenta que a las 96 horas de fermentación obtiene 0.95 mg/ml para los dos tipos de proteína. Estos valores son un poco elevados en comparación con lo mencionado por Valdez (2010). En dicho estudio utilizando enzimas degradadoras de celulosa producidas por la cepa VML-2, en un tiempo de fermentación de 24 horas obtuvo una mayor cantidad de proteína extracelular (0.65 mg/ml), afirmando que la cantidad de proteína extracelular disminuye conforme aumenta el tiempo de fermentación, también señala que a un tiempo de 96 horas de fermentación aumenta la concentración de proteína, la cual puede ser debido a que los microorganismos en condiciones de estrés (medio de cultivo) producen proteasas que son liberadas al medio de cultivo provocando diferentes grados de proteólisis.

Cuadro 8. Contenido de proteína celular y extracelular a las 96 horas de fermentación.

Muestra	Proteína extracelular	Proteína celular
Extracto enzimático	0.00095 mg	-----
Biomasa	-----	0.00095 mg

4.5 Cinética enzimática (Somogy-Nelson)

4.5.1 Cinética enzimática en nopal *Opuntia ficus indica* var. ANV1

En la figura 8 se observa que las enzimas celulasas producidas por la cepa VML-2 tienen gran actividad en los primeros 45 minutos, a partir de ahí se observa una fase de estabilidad en un rango de 45 a 90 minutos para posteriormente continuar con su máxima actividad que se presentó a los 120 minutos ya que de ahí presentó un descenso drástico hasta las 96 horas lo que significa agotamiento de sustrato, con una máxima actividad de 2970 U. Mata (2011) utilizando *Opuntia lindheimeri* menciona que las enzimas celulasas producidas por la cepa VML-2 presentaron su mayor actividad de enzimática en los primeros 60 minutos, lo que significa que en el transcurso de ese tiempo presentó la mayor cantidad de azúcares reductores que significa la ruptura de la celulosa y su conversión en azúcares más simples, un ejemplo de ello es la glucosa. Estas enzimas mostraron un rápido descenso en un rango de 60 a 90 minutos, presentando una actividad enzimática de 1430 U, a partir de este tiempo su descenso se presentó más lentamente.

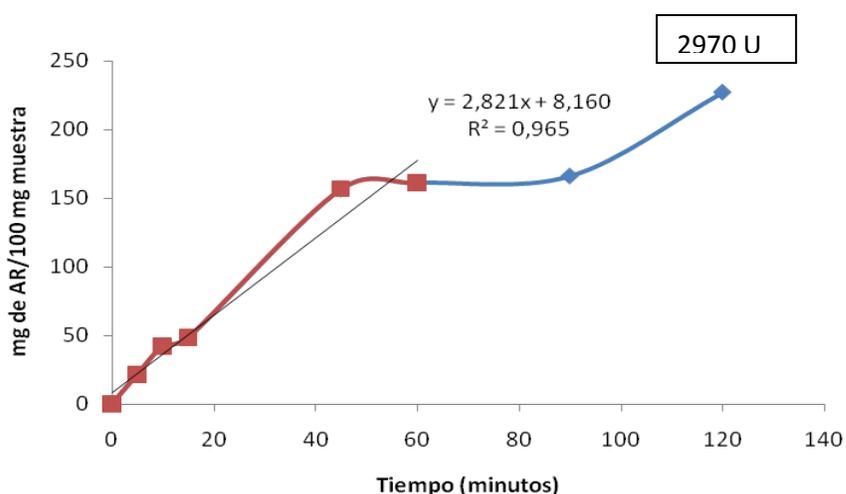


Figura 8. Degradación enzimática de celulosa en nopal *Opuntia ficus indica* var. ANV1 utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

4.5.2 Cinética enzimática en nopal *Opuntia phaeacantha*

La figura 9 representa la tasa de degradación de celulosa en nopal *Opuntia phaeacantha*, en la que se puede observar que durante los primeros 5 minutos la enzima celulasa presenta gran actividad, después de los 5 minutos y hasta los 15 minutos presenta poco incremento en la actividad, de los 15 minutos a los 30 minutos vuelve a presentar gran actividad celulasa hasta los 90 minutos que fue la mayor actividad presentada con valores de 3751 U, posteriormente comienza la disminución de actividad. Mata (2011) utilizando *Opuntia robusta* menciona que durante los primeros 5 minutos presenta una fase de adaptación, a partir de los 5 a los 120 minutos presenta gran actividad de celulasas, no presentando fase de adaptación y disminuyendo drásticamente hasta las 24 horas su mayor actividad empleando esta variedad fue de 1557 U.

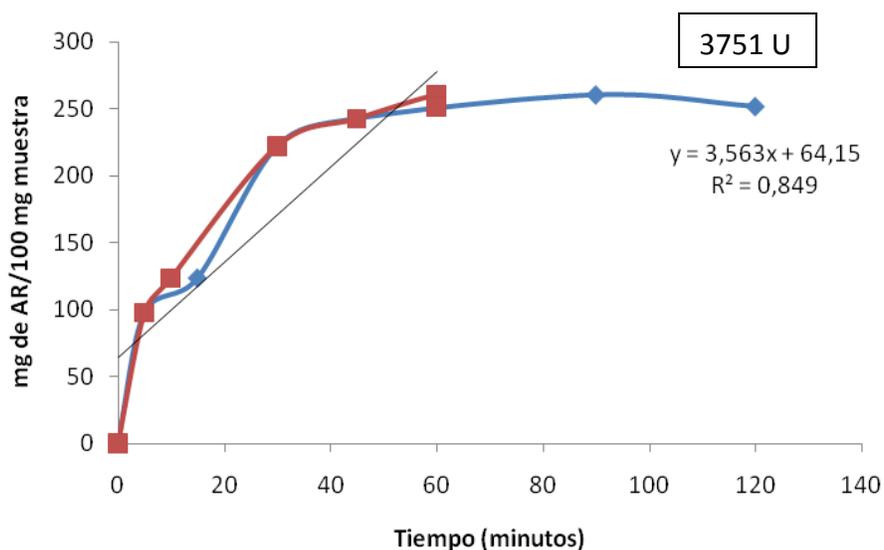


Figura 9. Degradación enzimática de celulosa en nopal nopal *Opuntia phaeacantha* utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

En la degradación de las dos variedades de nopal se obtienen valores de actividad para *Opuntia phaeacantha* de 3751U y para *Opuntia ficus indica* var. ANV1 de 2970 U mientras que Mata (2011) utilizando *Opuntia robusta* obtuvo valores de actividad de 1557 U y *Opuntia lindheimeri* es de 1430 U. Estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones de la planta (clima) además de su ubicación. En el norte predomina un clima muy seco, semi-cálido a templado en comparación con el centro el clima es sub-húmedo. Comparando las dos variedades de nopal se obtiene mayor cantidad de actividad enzimática en la variedad *Opuntia phaeacanthac* con un valor de 3751 U, esto se debe a que esta variedad presenta mayor cantidad de fibra y esto favorece las condiciones para que la enzima se desarrolle y actúe.

5. CONCLUSIONES

Se evaluó nutricionalmente las dos variedades de nopal utilizadas (*Opuntia Opuntia ficus indica* var. ANV1 y *Opuntia Opunta phaeacantha*), expone valores semejantes para todos los componentes, obteniéndose mayor cantidad de fibra en *Opunta phaeacantha*.

La variedad *Opunta phaeacantha* presenta mayor actividad enzimática que en la variedad *Opuntia ficus indica* var. ANV1 lo cual se atribuye a su alto contenido de fibra.

Se logró producir el extracto enzimático mediante la fermentación empleando la cepa VML-2 ayudando a realizar cinéticas enzimáticas para la hidrólisis del nopal. De igual forma, el empleo de la cepa VML-2 aislada del rumen bovino produjo enzimas celulasas que son capaces de hidrolizar la celulosa.

Una alternativa económica para los procesos de síntesis de compuestos ricos en celulosas es la utilización de enzimas celulasas producidas por microorganismos del rumen bovino.

6.LITERATURA CITADA

- **Alexander.1980.** Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, S.A. México. Pp. 162-167.
- **Anaya, Marco A., B, Refugio. 2008.** El nopal forrajero en México: del siglo XVI AL SIGLO XX. Programa universitario de Ciencias Sociales y Humanidades. Universidad Autónoma de Chapingo.
- **Badui, salvador. 1981.** Química de los Alimentos. Editorial Alhambra. México, D.F.
- **Badui, Salvador. 1993.** Química de los Alimentos. México, D.F: Pearson.
- **Badui, Salvador. 2006.** Química de los Alimentos. Cuarta Edición. México.
- **Beauchemin, K.A., and Rode, L.M. 1996.** Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: Animal Science Research Development. Meeting Future Challenges. Proceedings of the Canadian Society Meeting. Ed. L.M. Rode. Lethbridge, Alberta, pp. 110-130.
- **Bravo, H. H. 1978.** Las Cactáceas de México. Tomo I. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México. D.F. Pp. 67-71.
- **Carrera, J. 2002.** Módulos de Biotecnología, “Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal” Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca.
- **Chou TYC, Chang MM, Tsao GT. 1981.** Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. Advances in Biochemical Engineering 20: 16-42
- **Dehority, B. A. 1973.** Hemicellulose degradation by rumen bacteria. Federation Proc. 32:1819.

- **Enari T, Niku-Paavola M. 1987.** *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, CRC Press, Vol. 5,3,P67.
- **Eriksson K. E., Wood T. M. 1985.** Biodegradation of cellulose: biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi T (ed). Academic Press, New York. 469-503
- **Flores, Claudio., Aranda, Gilberto.** Opuntia-based Ruminant Feeding Systems in México. The Nopal Program. CIESTAAM. University of Chapingo, México.
- **Flores, Claudio., Ramírez, Pedro 1995.** Mercado mundial del nopalito. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. UACH. México.
- **Flores, V Claudio A. 2003.** Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. 1. Ed. Centro de Investigaciones a Económicas, sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- **Flores, V., C.A. y J. Olvera. 1995.** La producción de nopal verdura en México. Memorias del VI Congreso Nacional y IV Congreso Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- **Flores V., C.A., J.M. de Luna E. y P.P. Ramírez. 1996.** Mercado mundial de nopalito. ASERCA-CIESTAM-Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- **Fuentes, R.J.M., C.L., Suarez, G.L., Torres, H.M., Murillo, S.M.E., López, G.J.J., Ortiz, R.B. 2004.** Evaluación nutricional de cuatro especies de nopal (*Opuntia spp*) forrajero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

- **Guzmán, Deysi., y Chávez, Jorge. 2007.** Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Rev Soc Quím Perú*.
- **Jiménez, Leobardo. 2004.** Digestibilidad in situ de Cuatro Especies de Nopal (*Opuntia* spp). Tesis de licenciatura. UAAAN. Coahuila, México.
- **Lynd, L.R.;P.J Weimer,W.H. van Zyl y I.S. Pretorius. 2002.** Microbial Cellulase Utilization: fundamentals and biotechnology. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 66: 506-577.
- **Mata, Antonio. 2011.** Degradación *in vitro* de dos variedades de *Opuntia* mediante enzimas producidas por la cepa ruminal VML-2. Tesis de licenciatura. UAAAN. Coahuila, México.
- **Méndez, S.J., y García, J. 2006.** La tuna: producción y diversidad. CONABIO. *Biodiversistas* 68: 1-5.
- **Pacheco, Iliana. 2010.** Biología de *sympherobius barberi* Banks (Neuroptera: Hemerobiidae) criado con *Dactylopius Opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae). Tesis de Maestría en ciencias. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- **Pérez, E.H. 2005.** El nopal verdura *Opuntia* spp. Su descripción, manejo, usos, comercialización e industrialización. Monografía de licenciatura. UAAAN. Coahuila, México.
- **Saézn H Carmen. 2006.** Utilización Agroindustrial del Nopal. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST) con la Colaboración de la Red Internacional de Cooperación Técnica del Nopal (FAO-CACTUSNET). Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO. Boletín No. 162. Italia.

- **Valdez, L. 2010.** Estudio microbiológico del líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura). Tesis de licenciatura. UAAAN. Coahuila, México.
- **Valencia, K. 2010.** Evaluación del nopal verdura como alimento funcional mediante opciones reales. Tesis de Maestría en Ciencias. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- **Zúñiga, R., Cueto, J. A., Olivares, E., y Salazar, E. 2003.** Crecimiento Radical de Nopal con diferentes dosis de Nitrógeno en Hidroponía. Terra Latinoamericana. Universidad Autónoma Chapingo México.

7. ANEXOS

01/03 11:41:58

Bienvenido a Minitab, presione F1 para obtener ayuda.

IC y Prueba T pareada: C1, C2

T pareada para C1 - C2

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C1	9	29.1	31.3	10.4
C2	9	29.2	30.1	10.0
Diferencia	9	-0.110	2.099	0.700

IC de 95% para la diferencia media:: (-1.723, 1.504)

Prueba t de diferencia media = 0 (vs. no = 0): Valor T = -0.16 Valor P = 0.879