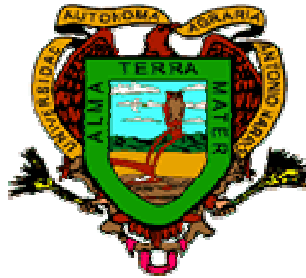


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL**



**Degradación *in vitro* de nopal (*Opuntia ficus indica* y *Opuntia rastrera*) mediante el empleo de polisacaridasas obtenidas de microorganismos del rumen bovino**

Por:

**CYNTHIA MARISOL HERRERA PALACIOS**

**Tesis**

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

**INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

**Degradación *in vitro* de nopal (*O. ficus indica* y *O. rastrera*) mediante el empleo de polisacaridasas obtenidas de microorganismo del rumen bovino.**

Presentado por:

CYNTHIA MARISOL HERRERA PALACIOS

TESIS

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

**INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA**

El presente trabajo se ha dirigido por el presente comité:

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez.  
**Presidente**

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez.  
**Sinodal**

L.C.N. Laura Maricela Lara López  
**Sinodal**

M.C. Alberto Guerrero Rodríguez.  
**Sinodal**

Dr. Ramiro López Trujillo  
**COORDINADOR DE CIENCIA ANIMAL**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.

Junio de 2011.



## AGRADECIMIENTOS

A mi “**Alma Terra Mater**” por haberme abierto sus enormes puertas en un momento inesperado de mi vida, porque a lo largo de este tiempo fue muy generosa conmigo y me formo profesionalmente de una manera en la que solo la Antonio Narro lo sabe hacer. Además aquí conocí a los verdaderos amigos y una diversidad cultural única.

A la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez** por su paciencia, tiempo y dedicación para la realización de este trabajo.

A la **L.C.N. Laura Maricela Lara López** por sus consejos, su enorme apoyo incondicional, su paciencia, amistad y sobre todo por la gran motivación que me dio en los momentos más desesperantes.

Al **Dr. Jesús Fuentes Rodríguez** por su apoyo, asesoría y sugerencias para la realización de este proyecto.

Al **M.C. Alberto Guerrero Rodríguez** por haberme brindado su amistad, por su apoyo, sugerencias y asesoría.

A **T.L.Q. Calos Arévalo Sanmiguel**, por el apoyo y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

A mis amigas: Maricela Bermúdez, Linda Suarez, Berenice Esquivel, Malú Sena, Lucy de la Rosa, Cecy Balderas, Carmen Piñeyro, Teresa, Tonantzi de León, Fer Jasso, por su sincera amistad, por haberme apoyado en momentos muy difíciles, porque con ustedes pase momentos únicos y memorables, me hicieron ver las cosas de una manera más relajada, GRACIAS.

A mis amigos: Valente Fuentes, que por azares del destino llegaste a ser más que un amigo, mi casi hermano porque me apoyaste en las buenas y en las malas, por tus cuidados, me hiciste ver mis errores de una manera en la que solo tú lo sabes hacer, tus palabras de aliento, te voy a extrañar. Sergio Ruiz, porque en ti encontré un verdadero amigo, gracias por confiar en mí y porque hiciste que mis clases fueran más divertidas y llevaderas, Omar Martínez, gracias por tu enorme apoyo tanto a lo largo de mi carrera como en la realización de esta tesis, gracias por comprenderme y escucharme, Juan Carlos López, porque me trataste muy bien, estuviste al pendiente de mí en todo momento, porque me entendiste y escuchaste cuando lo necesitaba y por tu apoyo incondicional, Francisco Román, Jaime Espinoza, Alfredo Gines, Rolando Nieves, Rodrigo Hernández, Luis Hernández, Raúl Calderón, Gilberto Romero, Rosalino Sanabria, Ariday Salinas, Lalo Carnevalli, Christian, Orlando, Manuel Alarcón, Cesar Calvillo, Gabriel y Roberto Gaytan, Enrique Flores, José Palacios Quiñones y al Ing. José Luis Figueroa a este último de una manera muy especial. GRACIAS muchachos por ser como son, porque me cuidaron, me apoyaron de muchas maneras, por su comprensión, por los momentos agradables que vivimos y sobre todo me enseñaron que los buitres no son tan malos como dicen.

Al Ing. Antonio de la Cruz, al Sr. José Palacios y su hijo Beto Palacios por hacerme sentir en casa, por tratarme como alguien de su familia, por sus cuidados, sus enseñanzas y su confianza, gracias.

## DEDICATORIAS

A Dios por haberme puesto en el camino menos pensado, por estar a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida y darme fuerzas para salir adelante a pesar de las adversidades.

A mi padre el Sr. Victorio Herrera Mata, porque tú me heredaste el amor y la dedicación al trabajo en el campo, por tus sabios y atinados consejos, gracias papa por ser mi mejor maestro, gracias por tu apoyo incondicional y porque a pesar de las adversidades se sale adelante y con más fuerza.

A mi mama la Sra. Josefina Palacios García, gracias por ser mí mejor amiga, por saber escucharme, por entenderme, por apoyarme en todo momento y sobre todo que siempre me motivas, a tu manera, para salir adelante.

A mis abuelos maternos Eulogio Palacios y María García Aldape, por haber apoyado de muchas maneras a mi familia y a mí, por sus sabios consejos y porque a pesar de que ya no están conmigo se quede alguna manera estarán orgullosos de mi. A mi abuelo paterno Regino Herrera Ortiz, gracias.

A mis hermanos Christopher Jared, Víctor Antonio, Juan Manuel Orlando y Denzell Donaldo Herrera Palacios, por su apoyo, por llegar a mi vida para llenarla de alegría, aunque a veces tengamos diferencias y sé que en donde estén, van a estar al pendiente de su hermanita.

A mis padrinos Ing. Pedro Alvarado y su esposa, la Sra. Patricia Valdez, por su apoyo incondicional.

A las familias: Palacios Mora, Valdez Palacios, Segura Palacios, Palacios Ortiz y Herrera de la Peña.

# INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	2
1.3 Hipótesis	2
1.4 Objetivo general	3
1.4.1 Objetivo específico	3
<b>2. REVISION DE LITERATURA</b>	4
2.1 Generalidades del nopal	4
2.1.1 Origen	5
2.1.2 Botánica	5
2.1.3 Taxonomía	5
2.1.4 Clasificación taxonómica	6
2.1.5 Características ecológicas	7
2.1.6 Características morfológicas	7
2.1.6.1 Raíz	8
2.1.6.2 Tallo	8
2.1.6.3 Hoja	9
2.1.6.4 Flor	9
2.1.6.5 Fruto	9
2.1.7 Características fisiológicas	10
2.1.8 Ecología del nopal	11
2.1.9 Métodos de propagación del nopal	12
2.1.10 Distribución en el mundo	13
2.1.11 Distribución geográfica de las nopaleras en México	14

2.1.12 Condiciones agroecológicas para el cultivo del nopal	15
2.1.12.1 Suelos y fertilidad	15
2.1.12.2 Salinidad	15
2.1.12.3 Altitud y latitud	16
2.1.12.4 Clima	16
2.1.12.5 Temperatura	16
2.1.12.6 Precipitación	17
2.1.13 Importancia forrajera del nopal	17
2.1.13.1 Contenido nutricional	20
2.2 Celulosa	21
2.2.1 Enzimas implicadas en la degradación de la celulosa	23
2.2.2 Mecanismos de hidrólisis enzimática	23
2.2.3 Degradación de celulosa por microorganismos aerobios y anaerobios	24
2.2.4 Factores ambientales que determinan la degradabilidad microbiológica de celulosa	25
2.2.5 Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas	26
2.3 Pectina	27
2.3.1 Propiedades de las pectinas	28
2.3.2 Cinética enzimática	28
2.3.3 Acción y clasificación de las pectinasas	29
2.3.4 Producción industrial de las pectinasas	30
2.3.5 Aplicación de las pectinasas	31
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>32</b>
3.1 Localización del área de estudio	32
3.2 Material orgánico de evaluación	32
3.2.1 Determinación de materia seca parcial	33
3.2.2 Determinación de materia seca total	34

3.2.3	Determinación de ceniza	35
3.2.4	Determinación de proteína cruda (método microkjeldhal)	36
3.2.5	Determinación de extracto etéreo o grasa	37
3.2.6	Determinación de fibra cruda	39
3.2.7	Determinación de fibra detergente acida	40
3.2.8	Determinación de fibra detergente neutra	41
3.3	Material biológico	42
3.3.1	Preparación de medio solido	42
3.3.2	Siembras en medio solido	42
3.3.4	Tinción Gram	43
3.4	Fermentación para la producción del extracto enzimático	44
3.4.1	Preparación del medio liquido especial para producir celulasa	44
3.4.2	Producción de celulosas	44
3.4.2	Preparación de medio liquido especifico para producir pectinasas	45
3.4.3	Producción de pectinasas	45
3.4.4	Preparación de solución madre	46
3.4.5	Cinética enzimática	46
3.4.6	Determinación de azucares reductores	47
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>49</b>
4.1	Evaluación nutrimental de las dos variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas	49
4.2	Crecimiento de la cepa VML-2 en medio solido	51
4.3	Evaluación microscópica	52
4.4	Cinética enzimática (Somogy-Nelson)	52
4.5	Cinética enzimática en nopal <i>Opuntia ficus indica</i>	52
4.6	Cinética enzimática en nopal <i>Opuntia rastrera</i>	54



<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>6. LITERATURA CITADA</b>	<b>57</b>

## INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal	6
Cuadro 2. Análisis bromatológico de diferentes especies de nopal (% en base a materia seca	18
Cuadro 3. Contenido nutricional de algunas variedades de Opuntia	21
Cuadro 4. Composición del medio líquido especial para la producción de celulasas	44
Cuadro 5. Composición del medio líquido especial para la producción de pectinasas	45
Cuadro 6. Contenido nutricional de las dos variedades de Opuntia utilizadas.	50

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la celulosa	22
Figura 2. Estructura química de la pectinasa	27
Figura 3. Opuntia ficus indica	32
Figura 4. Opuntia rastrera	32
Figura 5. Mufla marca Thermolyne modelo 1500	35
Figura 6. Microkjeldahl	37
Figura 7. Sifón Soxleth	38
Figura 8. Método de siembra por estría cruzada en medio solido	42
Figura 9. Solución madre (sustrato) al 1 y 5%	46
Figura 10. Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys	48
Figura 11. Composición grafica del contenido nutricional entre las dos variedades de Opuntia utilizadas	51
Figura 12. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio solido	51
Figura 13. Observación macroscópica (100 X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2	52
Figura 14. Degradación enzimática de celulosa 1 y 5% <i>O. ficus indica</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	53
Figura 15. Degradación enzimática de pectina 1% <i>O. ficus indica</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	53
Figura 16. Degradación enzimática de celulosa 1 y 5% <i>O. rastrera</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	54
Figura 17. Degradación enzimática de pectina 1 y 5% <i>O. rastrera</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	55

## RESUMEN

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en las células es catalizada por una enzima en particular, por lo tanto en las células se encuentran un gran número de enzimas. Estas funcionan como catalizadores de las reacciones químicas vitales y por lo tanto, son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. En la actualidad se utilizan enzimas para cualquier proceso industrial.

Los productores agropecuarios buscan maneras de cómo aumentar su producción por lo que se buscan alternativas, una de ellas es la utilización de enzimas como la celulasa y la pectinasa obtenidas de cepas aisladas del rumen bovino por sus características de degradación de compuestos ricos en fibras, dando muy buenos resultados en dichos procesos, además de ser una fuente alternativa de producción de enzimas.

En el presente trabajo se evaluaron nutricionalmente dos variedades de nopal. La primera variedad fue el *Opuntia ficus indica*, esta variedad fue recolectada en el Ejido 18 de Marzo, Municipio de Arteaga, Coahuila. La segunda variedad fue el *Opuntia rastrera*, esta variedad fue tomada en Buenavista, Saltillo, Coahuila. Los resultados obtenidos de la evaluación nutricional indican que las dos especies presentan valores semejantes en el contenido de extracto etéreo (en base a materia seca total) mientras que en el contenido de materia seca parcial, ceniza, humedad, proteína cruda (tal como se ofrece), proteína cruda (en base a materia seca total), FC, FAD y FND se puede observar diferencias mayores.

Además se realizó una fermentación a 72 horas para la producción de las enzimas celulasa y pectinasa mediante el empleo de la cepa VML-2 aislada de rumen bovino e identificada por Valdez-Sepúlveda (2010), se realizó una cinética enzimática a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 1440 (24horas), 2880 (48horas), 4320 (72horas), minutos. Se realizó una curva de degradación de celulosa en dos variedades de *Opuntia* (nopál) empleando el extracto enzimático producido, en la cual se observaron diferencias significativas ya que, la variedad *O. ficus indica* por su alto contenido de fibra presentó mayor actividad enzimática.

Mientras que para la determinación de azúcares reductores la utilización de celulasa produjo mayor degradación los primeros 60 minutos para *O. ficus indica* y en la *O. rastrera* esta actividad se presentó las primeras 24 horas.

En la utilización de pectinasa tanto para *O. ficus indica* y *O. rastrera* los resultados no fueron los esperados ya que es posible que la técnica no sea sensible a los azúcares reductores

**Palabras clave:** *O. ficus indica*, *O. rastrera*, celulosa, pectina, degradación enzimática.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Antecedentes

*Opuntia*, llamada nopal tunero en México o solamente tuna como usualmente se conoce en el comercio, es una planta típica dentro del paisaje mexicano, y un importante símbolo de identidad para los mexicanos junto con el maíz y el agave.

En años recientes, se han intensificado las plantaciones para fruta o producción de forraje, así como para vegetales o nopalitos y cochinilla, en muchos países de África, América, Asia y Europa, hay un creciente interés por *Opuntia*, con énfasis en *O. ficus-indica*, y en el importante papel que desempeñan y seguramente seguirán proponiendo para el éxito de sistemas agrícolas sustentables en zonas áridas y semiáridas, donde agricultores y ganaderos deben encontrarse en aquellas especies que puedan no solo sobrevivir si no producir económicamente. Así *Opuntia*, se ha convertido en un recurso inagotable de productos y usos, inicialmente como planta silvestre, y después, como cultivo de subsistencia comercial; contribuyendo a la seguridad alimenticia de poblaciones en áreas agrícolas marginadas.

Las zonas áridas y semiáridas de México ocupan más de dos terceras partes del territorio Nacional, en donde las condiciones agroclimáticas son adversas para la producción agrícola convencional, haciéndose prácticamente imposible la agricultura de temporal de granos básicos, y en las tareas de riego, explotar exitosamente cultivos intensivos de alta rentabilidad (Borrego y Burgos, 1986). También la producción pecuaria es cara y difícil, sobre todo en invierno, en donde el forraje de calidad escasea, haciéndose necesario mayor inversión para sostener una explotación pecuaria, sea de leche o carne (Murillo *et al.*, 1994). Ante la gran cantidad de ganado que se encuentra en el Norte de México es indispensable encontrar alternativas rentables de sustentación alimenticia del ganado para estas regiones.

El género *Opuntia* está representado por 104 especies, 60 Por ciento localizadas en el desierto Chihuahuense. Las especies más importantes de uso forrajero son: *Opuntia leucotricha*, *O. streptacantha*, *O. robusta*, *O. cantabrigensis*, *O. rastrera*, *O. lindheimeri* y *O. pheacantha*. (Bravo, 1978; Elizondo et al., 1987).

## **1.2 Justificación**

La población del Norte de México utiliza el nopal desde hace muchas décadas y, hoy en día, gran parte de la industria pecuaria de las zonas áridas del norte y del centro del país tiene en el nopal un recurso forrajero de primer orden. Sin embargo el nopal tiene una fuente importante de fibras compuestas, entre ellas la celulosa y pectina, pero su utilización se ve afectada por los altos costos y dificultad para degradar estos compuestos, una alternativa para resolver este problema es la utilización de enzimas puras producidas por microorganismos del rumen bovino, ya que estos, presentan facilidad de aislamiento y reproducción así como bajos costos de producción.

La realización de este trabajo permite conocer la aplicación de estas enzimas con el fin de mejorar y en consecuencia obtener mayores beneficios en su utilización, principalmente en la industria ganadera, para obtener mayor conversión alimenticia y por lo tanto se traduce en ganancias para el productor.

## **1.3 Hipótesis**

Es posible la degradación enzimática del nopal mediante las enzimas producidas por la cepa VML-2 aislada de rumen bovino.

Es posible la hidrólisis enzimática del nopal utilizando la cepa VML-2 aislada del rumen bovino.

## **1.4 Objetivo General**

Realizar una hidrólisis enzimática en nopal mediante el empleo de una cepa VML-2 aislada del rumen bovino productora de celulasa.

### **1.4.1 Objetivos Específicos**

1. Efectuar la caracterización bromatológica de dos variedades de nopal existentes en la región Norte de México.

2. Realizar una fermentación para la producción de extracto enzimático utilizando la cepa VML-2.

3. Realizar cinéticas enzimáticas para obtener la hidrólisis del nopal, utilizando el extracto enzimático que se llegó a producir.



## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades del nopal

El nopal (*Opuntia spp.*), es reconocido generalmente como un cultivo frutícola en regiones subtropicales, semiáridas alrededor del mundo. A pesar de que se cultiva para dicho propósito solamente en 5 países: Chile, Italia, México, Sudáfrica y Estados Unidos. En realidad, su mayor importancia radica en la producción de forraje, si se considera la superficie total cultivada y las áreas silvestres en países donde se considera nativa, ha si como en lugares en donde se ha naturalizado. Las estadísticas mundiales muestran un rango desde poco menos de 687 000 ha (Nobel, 1994) hasta 2,3 millones ha. Este último dato incluye poblaciones de baja densidad repartidas a lo largo del Norte de México. Y se ha estimado que el 92 por ciento de estos recursos son potencialmente útiles como alimento.

La actividad pecuaria a escala limitada es una estrategia de supervivencia común en tierras semiáridas. En muchos países, los animales domésticos también representan un mayor estatus social, ya que son bienes listos para utilizarse en cualquier momento. Las sociedades pastorales están presentes en todas las regiones subdesarrolladas áridas y semiáridas del mundo, haciendo un uso intensivo de pastizales nativos. Como resultado, la disminución de pastizales es un problema mundial a lo largo de la franja semiárida, contribuyendo así, a la desertificación (De la Cruz, 1994).

Por lo que existe una búsqueda permanente de plantas que puedan tolerar limitantes climáticas y ayuden a contrarrestar el deterioro de la tierra. En este contexto, *Opuntia* tiene un potencial interesante, como ya se ha demostrado en los centros de origen o de mayor diversidad y en muchas otras áreas del mundo, que por razones históricas, se han beneficiado de la introducción y la dispersión de *Opuntia*.

### **2.1.1 Origen**

El nopal es originario de América tropical y subtropical y hoy día se encuentran en una gran variedad de condiciones agroclimáticas, en forma silvestre o cultivada, en todo el continente americano. Además, se han difundido a África, Asia, Europa y Oceanía donde también se cultivan o se encuentran en forma silvestre (Sáenz, 2006).

### **2.1.2 Botánica**

Existen casi 300 especies del género *Opuntia* (Scheinvar, 1995). Solamente en México, Bravo (1978) registro 104 especies y variedades.

De acuerdo con Scheinvar (1995), el nombre de 2 *Opuntia* viene de un antiguo pueblo griego en la región de Leocrid, Beocia: *Opus*, u *Opuntia* en donde Tournerford encontró una planta con espinas que le recordó a la *Opuntia americana*, que incluye 11 subgéneros: *Opuntia*, *Consolea*, *Austrocyllindropuntia*, *Brasilopuntia*, *Corynopuntia*, *Cilindropuntia*, *Grusonia*, *Marenopuntia*, *Nopalea*, *Stenopuntia*, y *Tephrocactus*.

### **2.1.3 Taxonomía**

La taxonomía es complicada por diferentes razones: sus fenotipos, que varían en gran medida de acuerdo a las condiciones ecológicas y la poliploidia, con un gran número de poblaciones que se reproducen vegetativa y sexualmente; así como la existencia de numerosos híbridos interéspecíficos. Ya que casi todas las especies florecen durante el mismo periodo del año y no hay barreras biológicas que las separen.

Sin embargo, actualmente se cuenta con técnicas analíticas de precisión, como la electroforesis, que permiten la identificación de una planta, mediante la obtención de secuencias de moléculas químicas de determinados órganos vegetales.

Este tipo de estudios a nivel molecular no sustituyen del todo el estudio de las características anatómicas visibles, si no que se complementan entre sí, al igual que las características deseables de rendimiento y calidad para cultivares de interés comercial.

Todo ello es examinado mediante el uso de herramientas estadísticas de análisis multivariado, que se han convertidos en aliados de los investigadores para deducir el grado de parentesco o distancia genética existente entre ecotipos y, de esta manera, orientar de forma precisa la decisión sobre la clasificación taxonómica y el registro de especies, sub-especies y variedades (García, 2003).

#### 2.1.4 Clasificación taxonómica

El cuadro 1 muestra la clasificación taxonómica del nopal (*Opuntia* spp) presentada por Bravo (1978).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Subreino</b>	<i>Hembriophyta</i>
<b>División</b>	<i>Hembriophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Caryophyllidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Opuntiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Cactáceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Opuntiae</i>
<b>Genero</b>	<i>Opuntia</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Opuntia</i> (antes <i>Platyopuntia</i> )
<b>Especie</b>	<i>Spp.</i>

Fuente: Bravo, (1978).

### **2.1.5 Características ecológicas**

El nopal se encuentra distribuido mayormente en las regiones áridas y semiáridas como los desiertos. El éxito que tiene las opuntias para adaptarse mejor a estos lugares se debe a las características ecológicas que poseen al igual que toda la familia de las cactáceas al que pertenecen y han desarrollado a través de los años.

Las condiciones para la vida en un desierto deben obedecer a adaptaciones para climas con temperaturas extremas, alta radiación solar, fuertes vientos, poca humedad en el ambiente y suelo, suelos salinos y generalmente arenosos.

Aunado a ello, deben enfrentarse a precipitaciones erráticas o nulas en largos periodos de tiempo. Por lo que el agua se convierte en el factor limitante para su vida. Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del nopal han permitido su permanencia en estas regiones gracias a que juntas se combinan para lograr una economía del agua. La fisiología de los nopales al igual que la gran mayoría de las plantas de las zonas áridas o semiáridas debe evitar al máximo la pérdida de agua a procesos de transpiración que enfrentan. (Nobel, 1999).

### **2.1.6 Características morfológicas**

La succulencia es la principal característica morfológica de los nopales. Esta puede considerarse como el sello distintivo de su parte aérea (tallo, flores y frutos) y resulta de la producción masiva de células de ciertos tejidos parenquimatosos, asociado a un aumento en el tamaño de las vacuolas y una disminución de los espacios intracelulares. Este fenómeno permite a los órganos de esta planta acumular grandes cantidades de agua en forma muy rápida durante los breves periodos de humedad y por otra parte, las formas esféricas o suculentas representan los cuerpos más eficientes para evitar la evotranspiración (Kramer, 1989).

### **2.1.6.1 Raíz**

Aunque son semejantes a cualquier planta, la diferencia de la generalidad es que sus raíces desarrollan pelos radiculares cuando se encuentran en suelo húmedo y pueden desaparecer en suelos ecos. Es una característica que permite a la planta absorber de manera rápida toda el agua posible mientras este presente. La raíz deriva de una raíz principal y en algunos casos puede derivarse del tallo. Son gruesas y su tamaño es proporcional al tamaño de la parte aérea. El tiempo de vida de la raíz es permanente (Nobel, 1999; Aguilar 1998; Monroy 1989).

### **2.1.6.2 Tallo**

El tallo se caracteriza por tener una cutícula gruesa y cubierta por una cera de una sustancia grasosa llamada cutina, suave al tacto. Esta primera capa del tallo llama dermis tiene algunas funciones principales:

- Evita la pérdida de grandes cantidades de agua por el proceso de transpiración.
- Regula el movimiento de la entrada de dióxido de carbono y salida de oxígeno por la planta.
- Retiene agua dentro del cuerpo.
- Protege a la planta del ataque de hongos, esporas, insectos y luminosidad intensa (Sudzuki, 1999; Granados y Castañeda, 1996).  
El tallo multiarticulado. Se compone de un tronco cilíndrico y de ramas aplanadas y discordes llamados cladodio o pencas. Estos cladodios son aplanados en forma de raqueta, son suculentos y almacenan gran cantidad de agua, su principal función es fotosintética (Monroy, 1989).

### **2.1.6.3 Hoja**

En el nopal solamente existen los renuevos de pencas, (cladodios) cuando están bien tiernas. Son hojitas cilíndricas y caducas, en forma de cuernitos; herbáceas, en cuyas axilas se hallan las areolas de las cuales brotan las espinas. Las hojas desaparecen completamente al alcanzar la penca cierto grado de desarrollo, es decir, en unos cuantos días, en cuyo lugar quedan las espinas (Monroy, 1989).

### **2.1.6.4 Flor**

La flor de la planta se produce en las areolas, localizadas en la parte superior de las pencas. Cada areola produce por lo general una flor, aunque no en una misma época de floración, ya que algunas pueden brotar el primer año y en otras en el segundo o al tercero. Sus pétalos poseen colores vivos: amarillo, anaranjado, rojo, rosa, salmón, etc., según la especie del nopal. Por lo general las flores son grandes; el ovario es inferior, unilocular, con muchos óvulos y lóbulos del estigma (cinco a diez); el androceo posee gran cantidad de estambres.

Son hermafroditas anatómicas; algunas, sin embargo, son unisexuales (*Opuntia robusta*). La floración tiene lugar en primavera, durante los meses de marzo, abril, mayo, aunque hay entidades en las que se realiza en otras épocas del año. (Monroy, 1989).

### **2.1.6.5 Fruto**

El fruto del nopal (tuna) es carnoso, de forma ovoide a esférica; sus dimensiones y coloraciones pueden variar según la especie, encontrándose frutos de 4 a 12 cm. O más de longitud de color amarillo canario, amarillo limón, anaranjado, rojo, guinda, rojo-morado, verde tierno, blanco verdoso, etc. Semillas lenticulares, con testa clara y arillo ancho. Las características morfológicas de las *Opuntias* pueden variar tanto como lugares en donde se distribuyen. Menciona que a su gran polimorfismo la investigación de las opuntias se hace difícil; sin embargo, esto vuelve a reforzar el gran poder de adaptación que tienen las plantas para colonizar los diferentes ambientes. (Monroy, 1989; Espinoza *et al.*, 1990).

### 2.1.7 Características fisiológicas

La evolución de los miembros de los subgéneros de *Opuntia* en ambientes semiáridos ha conducido al desarrollo de diversas características de adaptación anatómica, morfológica y fisiológica; y estructuras particulares de plantas, como fueron descritas por Sudzuki Hills (1995).

Las especies del genero *Opuntia* spp. han desarrollado adaptaciones estructurales, fonológicas y fisiológicas favorables para su desarrollo en ambientes áridos, en donde el agua es la principal limitante en la mayoría de los vegetales. Su adaptación más notable es su reproducción asincrónica, y su Metabolismo del Acido Crasuláceo (MAC), el cual combinado con adaptaciones estructurales, tales como las succulencia, le permiten sobrevivir largos periodos de sequía, y alcanzar niveles de producción aceptables inclusive en años de sequía realmente severas.

*Opuntia* es particularmente atractiva como alimento por su eficiencia al convertir el agua en materia seca, y por tanto, en energía digestible

Este caso es útil no solo porque sobrevive a las sequías, sino también por su conversión es más eficiente que la de pastizales  $C_3$  y las plantas  $C_4$  de hoja ancha. La generación de biomasa por unida de agua es en promedio tres veces más alta que en plantas  $C_4$ , y cinco veces más que en plantas  $C_3$ . Bajo condiciones óptimas, los diferentes tipos de plantas pueden producir cantidades similares de materia seca por área de superficie, pero bajo condiciones áridas y semiáridas, las plantas MAC son superiores a las  $C_3$  y  $C_4$ . (Nobel, 1995).

Otro aspecto importante en la fisiología de las *Opuntias* son los potenciales hídricos que mantiene. El potencial hídrico define la energía que necesita la planta para conservar y proveerse de agua. Su valor generalmente esta dado en Mega pascales (MPa) y siempre es negativo debido a que el agua que se mueve por las plantas no está libre de solutos y su movimiento obedece a un gradiente negativo. El potencial hídrico de las opuntias (-0.3 a -0.6 MPa) es significativamente mayor a la de cualquier planta con la que pueda co-habitar aun de especies tolerantes a la sequía -1.0 a -3.0 MPa (Turner y Jones, 1980).

Lo anterior significa que mientras más negativo es el valor de potencial hídrico de la planta, es mayor la energía requerida para tomar agua del suelo, por lo que las opuntias cuentan con una gran ventaja al presentar potenciales hídricos más positivos, es decir un menor gasto de energía para adquirir y conservar el agua dentro de ellas.

Los cactus, y específicamente *Opuntia* spp., han constituido una fuente de forraje extremadamente útil en tiempos de sequía, primordialmente porque proveen de energía digerible, agua y vitaminas no solo para el ganado, pues también ha sido usada como forraje para cerdos, sin embargo, debe ser combinado con otros alimentos para complementar la dieta diaria, debido a que *Opuntia* tiene bajos contenidos de proteína, a pesar de ser rica en carbohidratos y calcio. Ya que crece en tierras severamente degradadas, su uso es importante por su abundancia en áreas donde muy poco cultivos logran desarrollarse y producir. Se estima que, alrededor del mundo, se cultivan 900 000 hectáreas de *Opuntia* para producción de forraje.

Mientras las variedades sin espinas necesitan protegerse contra los herbívoros, las variedades más tolerantes al frío con espinas no requieren de tanta protección. Sin embargo, es necesario quemar las espinas antes de poder utilizarlo como forraje para el ganado. (Elizondo, 1987)

Felker (1995) señaló la falta de investigación y desarrollo serios, y sugirió áreas prioritarias para realizar investigaciones sobre el uso de *Opuntia* como forraje.

### **2.1.8 Ecología del nopal**

El conocimiento de la ecología del nopal incluye el estudio de sus interacciones con el medio biótico o abiótico. Se entiende por medio biótico todo aquello que está vivo, animales y plantas, y por medio abiótico lo que no tiene vida como el clima, la parte mineral del suelo y química del agua. Por lo tanto la ecología del nopal se refiere a la relación con todo tipo de factor que le rodea tanto vivo como no vivo (Theron y Vallin, 1987).



El nopal al igual que cualquier otra planta co-habita con otras plantas y animales. A diferencia que otras plantas con requerimientos específicos, el nopal al igual que las plantas que pertenecen a la familia de las cactáceas tienen propiedades que les permiten establecerse en lugares cuyas características pueden diferir de manera extrema frío-calor; árido-húmedo, sin embargo su hábitat predilecto es el árido y semiárido. La importancia ecológica del nopal radica en ese poder de adaptación que le permite distribuirse en tan diferentes ambientes. Su adaptación ha llevado al género a cambiar sus aspectos morfológicos dependiendo de las exigencias del sitio donde se desarrolla. De esta manera conocer su ecología, es decir, como es el lugar donde nacen, crecen, se desarrollan, permite entender sus estrategias de vida. En un sentido aplicado, la información generada acerca de su ecología puede ser utilizada por el hombre para su cultivo. Dicha información permite conocer los requerimientos naturales para su desarrollo, lo cual permite a su vez manejar de manera más efectiva dichos requerimientos, con el fin de lograr mejores producciones. Esto conlleva a una explotación racional de las *Opuntias* con el cuidado de no exterminarlas. (Kiesling, 1999).

### **2.1.9 Métodos de propagación del nopal**

El nopal se puede propagar mediante dos métodos: multiplicación asexual (pencas y fracciones de pencas) y multiplicación sexual (semillas).

La multiplicación asexual es la más recomendable debido a que la propagación es más sencilla y se logra mantener las características de la variedad escogida como madre.

La propagación de nopal por medio de semilla es poco conocida y más compleja que la propagación vegetativa. En forma resumida, los pasos principales del proceso son: germinación de las semillas, establecimiento de plántulas y crecimiento de las plantas hasta alcanzar el tamaño y madurez deseados. (Flores y Gallegos, 1993).

### 2.1.10 Distribución en el mundo

El poder de adaptación que poseen las *Opuntias* les permite colonizar casi cualquier medio, su amplio intervalo para modificar su morfología al paso del tiempo, ha permitido que este género se adapte a una gran diversidad de hábitats. Gracias a sus características se ha registrado la presencia de opuntias en gran parte del mundo en países como: Chile, Perú, Brasil, México, Bolivia, Argentina y Colombia, Estados Unidos, Italia, España, Sudáfrica, África del Norte, Oriente Medio, poseen algunas especies de este género.

No obstante su amplia distribución, en la mayoría de los casos el establecimiento de las opuntias obedece a sitios con características de zonas áridas y semiáridas. Tal es el caso de la parte desértica del Sur de Estados Unidos, la Altiplanicie Mexicana y parte Norte de África.

Una de las explicaciones de tal distribución podría ser el centro de origen del género. Granados y Castañeda (1996) señalan tres teorías al respecto: una de ellas menciona que el género opuntia es originario de América debido a la gran variedad de especies que presenta; la segunda teoría toma como base las similitudes morfológicas con las portulacáceas, se piensa que las cactáceas derivó de las portulacáceas y su origen podría estar en México, puesto que en este país existe el mayor número de género e individuos. La tercera teoría considera que probablemente fueron dos los centros de diversificación, uno en el Norte y otro en el Sur del continente, ambas zonas están separadas por el Istmo de Panamá, cuyo clima impide la producción de los taxos de un lugar a otro. La teoría más aceptada es que el centro primitivo de diferenciación de las cactáceas fue el sistema del Golfo de México y del Caribe, desde donde emigraron para constituir las dos zonas categorías actuales una en América del Norte y otra en América del Sur.

### 2.1.11 Distribución geográfica de las nopaleras en México

Marroquín et al., (1964) reconocieron tres grandes regiones cubiertas con opuntias en el Norte de México y se basa en la abundancia de nopal y su incidencia natural. Las tres zonas son las siguientes:

a) Zona nopalera principal: comprende a Zacatecas e incluye parte de Aguascalientes, Jalisco, Durango y Guanajuato.

b) Zona nopalera del noroeste: Norte de Tamaulipas y Noroeste de Nuevo León.

c) Zona nopalera difusa: incluye solo las partes cálidas de San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León, Coahuila y partes áridas de Durango y Chihuahua.

Un enfoque más amplio, considerando todo el país, fue propuesta por López y Elizondo (1990), quienes reconocieron cuatro regiones ocupadas por nopaleras explotadas para forraje o fruta o ambas.

A. Zona centro-sur. Que incluye partes de los estados de Puebla, Querétaro, y Oaxaca, se caracteriza por tres tipos de nopaleras cultivadas para cladodios tiernos (nopalitos), frutas (tunas) y forraje. Las especies principales son *Opuntia ficus-indica* (nopal de castilla), *O. amychlaea* (nopal Alfajayucan), con algunas variedades cultivadas (Barrientos, 1972), *O. megacantha* (tuna amarilla) y *O. tomentosa*.

B. Zona del altiplano. Que se ubica principalmente en los estados de Zacatecas y San Luis Potosí, pero que también comprende partes de Aguascalientes, Durango, Guanajuato y Jalisco. Incluye vegetación arbórea de *O. leucotricha* (nopal duraznillo), *O. streptacantha* (nopal cardon), así como plantas arbustivas de *O. robusta* (nopal tapón), *O. cantabrigiensis* (nopal cuijo), *O. rastrera* (nopal rastrero), *O. lindheimeri* (nopal cacapano) y *O. leptocaulis* (nopal tasajillo).

C. Zona Norte. Ubicada en el desierto Chihuahuense, es la región de mayor tamaño e incluye los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas y Coahuila. Está representada por vegetación arbustiva de *O. cantabrigiensis*, *O. phaeacanta* (nopal rastrero) *O. rastrera* y *O. lindheimeri*.

D. Zona costera del Golfo de México. Cubre parte de los estados de Coahuila, norte de Nuevo León y Tamaulipas. Plantas arbustivas de *O. lindheimeri* asociadas con otras especies forrajeras.

## **2.1.12 Condiciones agroecológicas para el cultivo del nopal**

### 2.1.12.1 Suelos y fertilidad

En México, el nopal prospera en una amplia gama de suelos; desde ácidos hasta alcalinos, se desarrolla mejor en suelos sueltos y poco profundos (40 a 70 cm) y con un buen drenaje. Las exigencias de nutrimentos del nopal, no son una limitante ya que los niveles de elementos nutritivos son relativamente fáciles de recuperar mediante la aplicación de estiércoles o fertilizantes químicos (Sáenz, 2006).

### 2.1.12.2 Salinidad

La mayoría de las especies de *Opuntia* son sensibles a la salinidad. El crecimiento de sus raíces es inhibido de manera drástica a concentraciones de sodio de un quinto de la encontrada en el agua de mar. La alta sensibilidad del nopal a la salinidad tiene muchas consecuencias; por esto cuando se riega por goteo los cactus usados para la producción de fruta, se debe tener cuidado de evitar la acumulación de sodio en la zona de enraizamiento; esta restricción puede eliminarse mediante la selección de tipos tolerantes y por esfuerzos de mejoramiento genético, los cuales están claramente garantizados por la gran productividad potencial y la importancia comercial del nopal (Sáenz, 2006).

#### 2.1.12.3 Altitud y latitud

El nopal, se ubica en mayor abundancia en zonas con una altitud entre los 800 y 2500 metros sobre el nivel del mar (msnm), aun y cuando se le puede encontrar a nivel del mar, de esta forma se justifica que algunas especies de nopal se desarrollan muy cerca del nivel del mar como *Opuntia stricta* y otras como *O. streptacantha* crecen sin dificultad en altitudes de hasta 2700 msnm (Sáenz, 2006).

#### 2.1.12.4 Clima

Las poblaciones silvestres de nopal se encuentran distribuidas principalmente en zonas con una precipitación media anual de 150 mm. O más, en climas semisecos o esteparios, con lluvias en verano, con lluvias escasas en todas las estaciones del año y en climas desérticos con lluvias en verano, en cualquier época del año y en invierno. Las raíces del nopal tienden a ubicarse a profundidades someras en suelos porosos y arenosos. Así las raíces someras están idealmente situadas para responder de manera rápida a lluvias ligeras. Lo anterior, adicionalmente a las propiedades de conservación de agua por parte de los tallos y pencas del nopal, ayuda a mantener un alto contenido hídrico en la planta (Sáenz, 2006).

#### 2.1.12.5 Temperatura

Los nopales pueden tolerar altas temperaturas, entre 50 o 55 °C cuando están aclimatados adecuadamente. El nopal y otras cactáceas se encuentran en lugares donde las temperaturas medias anuales se aproximan a los 23 °C. Las principales zonas nopaleras se ubican en aquellas zonas con temperaturas medias anuales que oscilan entre 16 y 20°C. Sin embargo, debido a su amplia adaptación, las especies del género *Opuntia*, pueden soportar temperaturas extremas de 10 a 50 °C, mínima y máxima, respectivamente. En cuanto a bajas temperaturas, se tiene que las especies cultivadas para obtener tunas y forraje pueden sufrir daños con heladas de -5 a -10°C sobre todo en plantas jóvenes durante los dos primeros años de desarrollo. Con relación a las bajas temperaturas, los nopales pueden tolerar niveles bajos, siempre y cuando la temperatura del aire disminuya gradualmente en un período de días o semanas, lo que generalmente ocurre durante el otoño (Sáenz, 2006).

#### 2.1.12.6 Precipitación

Respecto a la precipitación, el nopal es poco exigente y presenta amplios márgenes de tolerancia, debido a su fisiología y a la facultad de almacenar agua en sus tejidos. La gran mayoría de las zonas productoras de nopal tunero, en nuestro país, se encuentran ubicadas, en regiones con una precipitación que oscila entre los 300 y 700 mm de lluvia anual. (Sáenz, 2006).

#### 2.1.13 Importancia forrajera del nopal

Los cactus, y específicamente *Opuntia* spp., han constituido una fuente de forraje extremadamente útil en tiempos de sequía, primordialmente porque proveen de energía digerible, agua y vitaminas no solo para el ganado, pues también ha sido usada como forraje para cerdos, sin embargo, debe ser combinado con otros alimentos para complementar la dieta diaria, debido a que *Opuntia* tiene bajos contenidos de proteína, a pesar de ser rica en carbohidratos y calcio. Ya que crece en tierras severamente degradadas, su uso es importante por su abundancia en áreas donde muy poco cultivos logran desarrollarse y producir. Se estima que, alrededor del mundo, se cultivan 900 000 hectáreas de *Opuntia* para producción de forraje.

La causa principal de baja productividad del ganado de México se debe a la alimentación deficiente del mismo, principalmente en las zonas áridas y en las semiáridas donde la producción de forraje es pobre e irregular durante el año y variable en cada año, por lo que la utilización de nopal para el consumo de los animales constituye el recurso valioso en estas zonas. Este valor se determino por las condiciones de vida del nopal así como su valor nutritivo. De Alba (1971).

Al respecto Flores (1977) hace el análisis bromatológico de diferentes especies de nopal (cuadro 2); Flores también, compara la producción de *Opuntia* con otras especies forrajeras, maíz forrajero y remolachas, y encuentra que el nopal tiene mayor producción de nutrientes a un costo menor en condiciones de riego y temporal.

Cuadro 2. Análisis bromatológico de diferentes especies de nopal (porcentajes con base en materia seca).

<b>Genotipo</b>	<b>Materia Seca</b>	<b>Materia Orgánica</b>	<b>Proteína Cruda</b>	<b>EE</b>	<b>Fibra</b>	<b>Ceniza</b>	<b>ELN</b>
<i>Nopalea spp.</i>	10.69	73.79	8.92	1.50	17.21	26.21	50.70
<i>O.chrysacantha</i>	15.52	73.45	3.54	1.10	4.32	26.55	64.43
<i>O. tenuispinta</i>	12.45	70.20	4.42	1.04	5.14	29.80	59.52
<i>O.megacantha</i>	10.12	74.52	7.71	1.38	3.75	25.49	68.87
<i>O. rastrea</i>	14.41	59.89	2.78	0.76	6.18	40.11	43.23
<i>O.azurea</i>	12.55	68.88	4.54	1.35	3.98	30.12	69.84
<i>O.cantabrigensis</i>	11.89	68.46	4.79	1.09	3.70	31.54	58.87
<i>O.engelmanii</i>	15.07	68.41	3.32	1.19	3.58	31.59	60.32
<i>O.lucens</i>	17.45	69.59	3.67	0.57	2.58	30.43	62.75
<i>O.lindehimeri</i>	11.57	74.50	4.15	1.03	3.02	25.50	66.25
<i>O.robusta</i>	10.38	81.41	4.43	1.73	17.63	18.59	57.61
<i>O.streptacantha</i>	16.10	79.38	3.17	1.99	18.88	20.62	55.34
<i>O.leucotricha</i>	4.50	74.00	7,56	2.66	14.00	26.00	49.78
<i>O.imbricata</i>	17.71	84.25	7.11	1.75	11.51	15.75	63.86
<i>O.cacanapo</i>	16.95	72.51	5.19	2.06	11.20	27.49	54.04
<i>O.stenopetala</i>	13.24	77.87	8.84	1.74	9.14	22.13	58.16
<i>O.duranguensis</i>	10.34	82.94	4.51	1.29	8.23	17.06	68.91
<i>O.ficus-indca</i>	11.29	86.93	3.80	1.38	7.62	13.07	74.13

Fuente: Flores, 1977.

**EE:** Extracto Etéreo. **ELN:** Extracto libre de Nitrógeno.

El nopal se puede emplear no solo durante la sequía, también como parte integral de la alimentación de los rebaños con los que se obtiene provecho y se producen efectos benéficos en los animales que han estado sujetos a una dieta a base de forrajes secos. Se estima que el ganado vacuno puede consumir de 15 a 40 Kg. de cladodios frescos/día/cabeza, pero bajo condiciones de sequía extrema el consumo puede alcanzar hasta 90 Kg. diarios, si hay abundancia de cladodios, mientras que en las ovejas y cabras consumen entre 3 y 9 Kg. /día. Durante las estaciones lluviosas, el consumo puede decrecer si existe pasto u otros forrajes.

Para ganado estabulado y ovejas, el consumo de nopal varía ampliamente (de 15 a 95 Kg. /día) dependiendo de la disponibilidad de otros forrajes. Los forrajes más comunes usados como complemento del nopal son: alfalfa (fresca o henificada), rastrojo de sorgo, harina de maíz o frijol, trigo o avena, que poseen bajo valor nutricional comparada con opuntia. La demanda de nopal se incrementa día a día, particularmente durante periodos de sequía. (Ríos, 1954, Rojas *et al.*, 1966).

En este caso, conviene tomar en cuenta la digestibilidad del nopal. La digestibilidad del nopal en comparación con los forrajes es buena, ya que algunos aspectos superan a la alfalfa, como es el caso de materia seca, grasa cruda, fibra, extracto libre de nitrógeno y materia orgánica.

Flores (1977) considera que el nopal es un forraje pobre en nutrientes con una digestibilidad regular; también considera que es un forraje con gran cantidad de agua y pobre en materia seca, tosco con base en el nivel de energía que se metaboliza por kilogramo de materia seca, y que su energía digestible debe considerarse en el nivel de los forrajes toscos de la época de escasez como pajas, rastrojos y silos (1.83 Kg. de calorías, 1 Kg de materia seca).



Aunque también la utilización del nopal en la producción pecuaria presenta algunas desventajas como las siguientes:

1. Se necesita gran cantidad de materia verde para cubrir los requerimientos nutritivos diarios del animal.
2. El nopal debe complementarse con alimento proteico.
3. El ganado a veces continua comiendo nopal sin chamuscar (enviciamiento), lo que causa daños internos y externos que pueden facilitar la penetración del gusano tornillo que es costoso de combatir.
4. Se reduce la producción total de pastura pues el nopal extrae humedad y nutrientes del suelo que pueden servir para forrajes más adecuados.
5. El ganado es más difícil de manejar en praderas que tienen nopal.
6. Hay un incremento de roedores dañinos que se refugian en nopaleras.

#### **2.1.13.1 Contenido nutricional**

El contenido nutricional de nopal puede variar incluso en una misma región, el cuadro 3 muestra al contenido nutricional de algunas variedades más comunes en la región de Saltillo, Coahuila.

Cuadro 3. Contenido nutricional de algunas variedades de *Opuntia*.

Concepto % en base seca	<i>Opuntia ficus Indica</i>	<i>Opuntia imbricata</i>	<i>Opuntia lindheimeri</i>		<i>Opuntia canta brigiensis</i>
			Var. <i>Sumatra</i>	Var. <i>Tricolor</i>	
<b>MST</b>	93.93	93.49	93.45	93.78	93.89
<b>Cenizas</b>	31.15	23.91	24.0	24.15	25.07
<b>Proteína Cruda</b>	6.89	7.21	4.22	5.67	5.4
<b>Extracto Etéreo</b>	2.1	1.82	1.15	1.74	1.86
<b>Fibra Cruda</b>	17.89	15.48	14.28	18.65	17.3
<b>MO</b>	92.28	69.59	68.45	69.63	68.79

Fuente: Gopar, (2001).

**MST:** Materia seca total

**MO:** Materia orgánica

## 2.2 Celulosa

La celulosa es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. La pared de una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa; la madera un 50 %, mientras que el ejemplo más puro de celulosa es el algodón con un porcentaje mayor al 90%.

A pesar de que está formada por glucosas, los animales no pueden utilizar la celulosa como fuente de energía, ya que no cuentan con la enzima necesaria para romper los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, es decir, no es digerible por los animales.

Pero además, la configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, la cuales no se presentan aisladas si no unidas mediante enlaces de hidrogeno intermolecular formado por una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chacón y Waliszewski, 2005).

En el aparato digestivo de los rumiantes (pre-estómagos), de otros herbívoros y de termitas, existen microorganismos, muchos metanógenos, que poseen una enzima llamada celulasa que rompe el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico y al hidrolizarse la molécula de celulosa quedan disponibles las glucosas como fuente de energía.

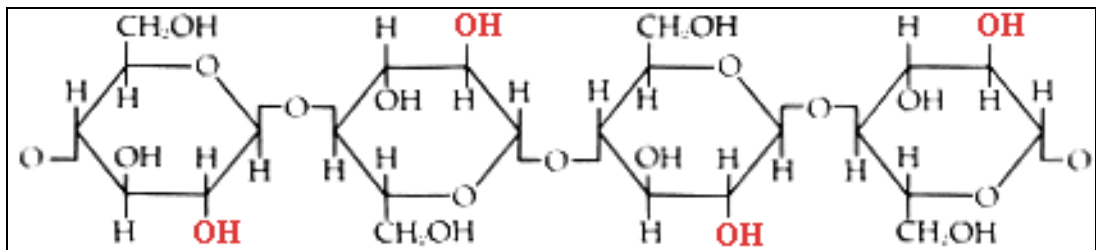


Figura 1. Estructura química de la celulosa.

Fuente: Goppar (2006).

La celulosa existe en las plantas superiores, en las algas, en muchos tipos de hongos y en los quistes de algunos protozoarios. El polisacárido está localizado en la pared celular donde se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada conocidas como micelas. A su vez, estas micelas se arreglan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales están suficientemente empaquetadas para prevenir la penetración no solo de enzimas si no de pequeñas moléculas semejantes al agua (Chacón y Waliszewski, 2005).

La extracción de enzimas de interés es la aplicación de enzimas celulasas o preparados con actividad enzimática múltiple (celulasa, hemicelulasa y pectinasa) debido a su efecto, por el potencial que tienen sobre la hidrólisis de los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales (Chacón y Waliszewski, 2005).

### **2.2.1 Enzimas implicadas en la degradación de celulosas**

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinergista de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (1,4- $\beta$ -D-glucano glucanohidrolasa, la exo- $\beta$ -1,4-celobiohidrolasa y la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (Gaitán y Pérez, 2005).

### **2.2.2 Mecanismo de hidrólisis enzimática**

La endo  $\beta$ -1,4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces  $\beta$ - 1,4 glucosídicos intramoleculares accesibles de cadenas de celulosa para producir oligosacridos de varias longitudes. La exo  $\beta$ -1,4 celobiohidrolasa rompe los extremos no reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa y por último la  $\beta$ -1,4 glucosidas, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacaridos (Gaitán y Pérez, 2005).

Otro mecanismo propuesto por la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas; primero la endo  $\beta$ -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman las moléculas de celulosa y las convierte en cadenas largas de oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de la estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las miofibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de C1.

En la segunda etapa actúa exo  $\beta$ -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4  $\beta$ -D glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa.

Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de hidrólisis en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4-glucosidasa, porque las glucanasas son inhibidas por celobiosa (Chacón y Waliszewski, 2005).

### **2.2.3 Degradación de celulosa por microorganismos aerobios y anaerobios**

La degradación de la celulosa por microorganismos depende de la naturaleza de los organismos colonizadores y de las condiciones de descomposición. Entre los factores ambientales que influyen en la naturaleza de los microorganismos involucrados, los más importantes son humedad, temperatura, aireación, y suficiente suministro de nitrógeno y otros nutrientes (Fogar *et al.*, 2003).

Para la degradación de celulosa han sido estudiados muchos géneros de hongos por sus enzimas capaces de degradar celulosa y entre las bacterias, los actinomicetos se destacan por su capacidad degradadora de este sustrato (Castellanos *et al.*, 2009).

Existe una diferencia fundamental en el mecanismo de hidrólisis de la celulosa entre bacterias y hongos aerobios y anaerobios los hongos y bacterias aeróbicas característicamente cuentan con un sistema de celulasas no complejo, lo cual lleva a la secreción de enzimas hidrolíticas de celulosa en el medio de cultivo. Sin embargo, bacterias anaeróbicas especialmente *Clostridium spp.* y hongos del género *Neocallimastix*, *Piromonas* y *Sphaeromonas* contienen un sistema de celulasas que forman un complejo donde las enzimas que degradan la celulosa están contenidas en una membrana llamada celulosoma.

Esta fundamental diferencia tiene implicaciones en el uso biotecnológico de estos microorganismos, pues las basadas en bacterias y hongos anaerobios pueden tener ventajas sobre los sistemas aerobios en términos de eficiencia hidrolítica. El sistema de celulasas dispuestas en un complejo permite un alto grado de coordinación entre las enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa que permite evitar la pérdida de intermediarios durante la degradación por los cambios en las condiciones ambientales (Castellanos *et al* 2009).

#### **2.2.4 Factores ambientales que determinan la degradación microbiológica de celulosa**

La degradación de la celulosa está dada por varios factores del medio ambiente, los principales son temperatura, aireación, pH, presencia de otros carbohidratos y proporción de otros vegetales (Carrillo, 2003).

**Temperatura:** La utilización biológica de la celulosa puede llevarse a cabo desde temperaturas cercanas a la congelación hasta alrededor de los 65°C. Cada una de las variedades de organismos celulotícos es afectada en forma diferente por la temperatura. Los mesófilos dominan en temperaturas moderadas mientras que la microflora termofílica puede degradar celulosa arriba de 45°C.

Debido a los cambios de la composición de la flora inducidos por la temperatura, el calor aumenta la velocidad de transformación del sustrato a causa del efecto directo de esta sobre la acción enzimática (Carrillo, 2003).

**Aireación:** También rige la composición de la flora activa, a causa del proceso anaeróbico, el metabolismo de la celulosa es reducido significativamente en medios deficientes de oxígeno en comparación con hábitats aireados (Carrillo, 2003).

**pH:** En medios con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacárido; bajo condiciones ácidas la desaparición de la celulosa se debe principalmente a los hongos filamentosos. Aunque el proceso es rápido a pH menor de 5 y ocasionalmente por debajo de 4 (Carrillo, 2003).

## 2.2.5 Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas

Son diversos los factores asociados con la naturaleza del sistema enzimático de las celulasas ha sido sugerido por influenciar el proceso hidrolítico. Estos incluyen inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo e irreversible adsorción de las enzimas, teniendo estos últimos la mayor influencia en la degradación del polisacárido (Alexander, 1980).

**Sinergismo:** Ocurre cuando la acción combinada de dos o más enzimas aumenta la tasa de acción sobre el sustrato respecto a la acción individual, se han hecho estudios en los que se ha observado una actividad cooperada de las celulasas de *Trichoderma seseei* en las que las endoglucanasas actúan al azar a lo largo de las cadenas de celulosa generando sitios donde actúan las exoglucanasas las cuales liberan la celobiosa como producto principal, una tercera enzima, la  $\beta$ -glucosidasa es necesaria para hidrolizar la celobiosa previniendo de esta manera la inhibición de las exoglucanasas por acumulación de producto y por tanto generando un aumento en la tasa hidrolítica (Alexander, 1980).

**Adsorción:** La hidrólisis de la celulosa difiere de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es insoluble y requiere una previa adsorción de la enzima al sustrato. La adsorción de las celulasas es facilitada por la presencia de dominios en el sustrato los cuales son susceptibles al clivaje proteolítico mediante uniones por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrogeno. Además dichos dominios cuentan con aminoácidos aromáticos que confieren una especificidad adicional y estabilidad al complejo enzima – sustrato (Alexander, 1980).

### 2.3. Pectina

Las pectinas son polisacáridos que sirven como cemento en las paredes celulares de todos los tejidos de las plantas. La parte blanca de las cáscaras de limón o naranja contienen aproximadamente 30% de pectina. La pectina es un éster metilado del ácido poligalacturónico, y consiste de cadenas de 300 a 1000 unidades de ácido galacturónico conectadas por enlaces  $1\alpha \rightarrow 4$ . El grado de esterificación (GE) afecta las propiedades gelificantes de la pectina. La estructura ilustrada (figura 2.) aquí tiene tres metil ésteres ( $-\text{COOCH}_3$ ) por cada dos grupos carboxilos ( $-\text{COOH}$ ). Esto corresponde a un 60% de esterificación o una pectina GE-60. La pectina es un ingrediente importante para conservas de frutas, jaleas, y mermeladas.

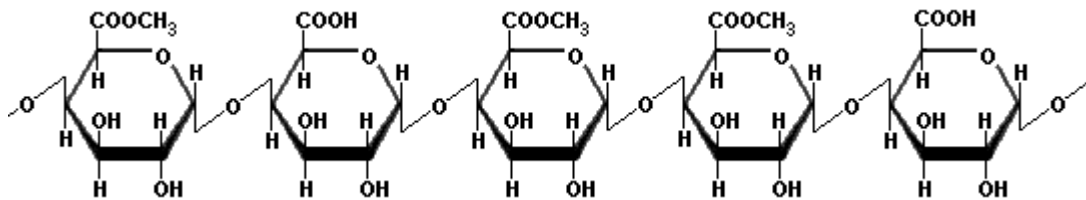


Figura 2. Estructura química de la pectina.

Fuente:(Gibbons, 2002).

Esta estructura puede presentar modificaciones importantes. Quizá la más importante sea la esterificación de los grupos carboxilo en el carbono seis de la galacturonato, que frecuentemente presentan unido un grupo metoxilo. Esta característica estructural ha servido como base para clasificar a las sustancias pépticas en tres grandes grupos (Charley, 1987).

En primer lugar tenemos aquellas moléculas cuyos grupos carboxilo se encuentran libres, sin esterificar; estos son los llamados ácidos pecticos, que son solubles en agua y capaces de formar sales con iones como el Calcio o el Magnesio.

Enseguida tenemos a las pectinas propiamente dichas, que presentan un porcentaje variable de metoxilación: desde menos del 50% para las pectinas de bajo metoxilo. Las pectinas son poco menos solubles que los correspondientes ácidos.



Finalmente, tenemos aquellas moléculas en las cuales prácticamente todos los residuos de galacturonato se encuentran metoxilados y que son llamados protopectinas, estas son prácticamente insolubles en agua.

Otra modificación importante sobre la estructura básica es la presencia de residuos de otros azúcares además del galacturonato, como son las ramnosas, la xilosa y la arabinosa (Badui, 1988).

### **2.3.2 Propiedades de las pectinas**

La primera consiste en que, siendo moléculas muy largas, las soluciones que forman son extremadamente viscosas. Esta propiedad se ha aprovechado utilizando a las pectinas como espesantes de algunos alimentos y fármacos. La otra propiedad importante radica en la capacidad que tienen las pectinas a cierta concentración de formar geles en pH ácido en presencia de azúcares; esta propiedad se ha aprovechado para la fabricación de alimentos tan tradicionales como las mermeladas y ates. No obstante, la forma exacta de cómo está constituida esta malla molecular aun es motivo de estudio (Charley, 1987).

### **2.3.3 Cinética enzimática**

La cinética enzimática es el análisis cuantitativo de cada uno de los factores que intervienen en la tasa de reacción. Esto se ha estudiado desde finales del siglo pasado, sin embargo, en aquel entonces no se disponía de enzimas en forma pura, los métodos de medición eran primitivos y el uso de amortiguadores para controlar el pH no se había introducido.

Las enzimas son responsables de catalizar la síntesis de gran cantidad de compuestos dentro de la célula, lo cual se lleva a cabo a temperatura y presión ambiente. Un catalizador aumenta la velocidad de una reacción química, sin afectar el equilibrio de esta. Las concentraciones al equilibrio pueden ser calculados usando solo las propiedades termodinámicas de reactivos y productos, ya que los catalizadores solo disminuyen la energía de activación.

Existe una gran similitud entre las reacciones catalíticas químicas y las enzimáticas bioquímicas. Sin embargo, existen algunas diferencias entre las enzimas y los catalizadores químicos.

Las enzimas catalizan reacciones bajo condiciones suaves, temperatura menor a 100°C, presión atmosférica y pH casi neutro, mientras que los catalizadores químicos requieren, en la mayoría de los casos, temperatura y presión elevadas y pH por ser extremos, para ser eficaces. Mientras que en las reacciones donde se utilizan catalizadores químicos, se obtienen comúnmente productos colaterales, las enzimas generalmente presentan un grado de especificidad elevado, tanto por los sustratos que se utilizan, como por los productos obtenidos, siendo raro que proporcionen productos colaterales.

### **2.3.4 Acción y clasificación de las pectinasas**

El término pectinasas, es un término genérico que comprende al menos unas doce actividades enzimática distintas, por lo que las pectinasas se han clasificado en grupos, de acuerdo al tipo de sustrato que se tienen y como lo atacan (Ward, 1985).

Tenemos así, una primera clasificación en dos grandes grupos: las pectinesterasa, que son aquellas que atacan el enlace éster entre el metoxilo y el carbono seis de cada ácido galacturónico de la cadena de pectina, y las depolimerasas, que rompen el enlace glucosídico  $\alpha$  1-4 entre dos residuos de ácido galacturónico adyacentes, ya sea por  $\beta$ -eliminación (liasas) o por hidrólisis (hidrolasas) (Rambouts y Pilnik, 1980).

Dentro de las depolimerasas encontramos, a su vez, las esopectinasas y las endopectinasas, de acuerdo a si atacan a la pectina solo a partir de los extremos, o bien, si la atacan en cualquier punto al azar a lo largo de toda la cadena. (Ward, 1985).

En una clasificación más fina encontramos tipos más precisos de enzimas, capaces de degradar moléculas más específicas y liberar diferentes productos:

Las pectinesterasas, son formadas por plantas superiores, hongos, levadura y algunas bacterias (Ward, 1985; Barnby y col., 1990). Estas enzimas presentan una alta especificidad hacia el enlace éster del ácido pectico. Usualmente el uso de estas enzimas es medida en ensayo de laboratorio por medio de la titulación continua de los grupos carboxilo liberados por su acción sobre la pectina (Kilara y Benchura, 1990).

Las liasas, también llamadas transeliminadas, al atacar a sus sustratos por  $\beta$  eliminación producen un doble enlace entre los carbonos cuatro y cinco del extremo reductor recién formado (Richardson y Hyslop, 1985).

Las exopectatoliasas. Este tipo de enzimas pectinolíticas es sintetizada por varios géneros bacterianos y fúngicos.

### **2.3.5 Producción industrial de pectinasas**

Las pectinasas son manufacturadas comercialmente por varias compañías en Europa, Estados Unidos y Japón (Raimbault, 1981; Oriol, 1987).

Estas compañías enfrentan ahora el problema de hacer más eficiente su producción, obteniendo preparaciones enzimáticas más puras, más concentradas y de mayor calidad a bajo costo. Se trata de hacer más eficiente los procesos de producción y se buscan sustratos más baratos para el crecimiento de microorganismos generadores de las enzimas de interés, ya que la pectina resultaría incosteable como sustrato. En el presente, la síntesis microbiana de enzimas a nivel industrial requiere de microorganismos altamente productivos para reducir los costos de producción (Solís y col., 1990).

Aunque existen, bacterias productoras de pectinasas, como por ejemplo, *Bacillus subtilis*, las enzimas de origen bacteriano son vistas con cierta desconfianza y no son producidas comercialmente, aunque representan aun una fuente potencial interesante si se considera que en algunos casos son producidas en forma constitutiva (Tsuyumu, 1977; Tsuyumu, 1979).

Las pectinasas fúngicas que se producen comercialmente consisten en mezclas de pectinesterasas, pectinliasas y poligalocturanasas y en ocasiones algunas otras actividades enzimáticas en diversas proporciones (Kotzekidou, 1991).

### **2.3.6 Aplicación de las pectinasas**

Además de la relevancia que tienen las pectinasas en la naturaleza, estas enzimas presentan una importancia económica considerable debido a que se les utiliza ampliamente en ciertos procesos industriales, sobre todo en el área de procesamiento de alimentos (Ghildyal y col., 1981; Solís, 1988; Larios y col., 1990; Solís, 1990). Entre las aplicaciones más importantes de las pectinasas dentro de la rama alimentaria están: clarificación de jugos de frutas y vinos, extracción de néctares y frutas tropicales, aumento del rendimiento en la extracción de jugos de cítricos, valorización de desechos agroindustriales y obtención de subproductos. Fuera de la rama alimentaria también se ha encontrado uso a las pectinasas, que son utilizadas en la industria papelera y en la textil (Ghildyal y col., 1981).

Las pectinasas han sido usadas en la industria durante 50 años; su aplicación en estas y otras ramas seguramente continuara expandiéndose, pues constituyen una herramienta indispensable para el desarrollo de ciertas tecnologías (Rambouts y Pilnik, 1980).

Las últimas tendencias en los estudios y desarrollos sobre las pectinasas se enfocan en su aspecto de su biología molecular, que es compleja, tratando, por un lado de encontrar pectinasas que trabajen en condiciones extremas, y por el otro clonando y expresando heterológicamente diversas combinaciones de genes de estas y otras enzimas para obtener, por así decirlo, extractos enzimáticos hechos a la medida.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización del área de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, específicamente en el laboratorio de Nutrición Animal y en el laboratorio de Microbiología perteneciente al Departamento de producción Animal. Este trabajo se dividió en 2 etapas, las cuales se describen a continuación.

#### Etapa I. Caracterización bromatológica del nopal

#### 3.2 Material orgánico de evaluación

Se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos por la AOAC, para MS, Proteína, grasa y fibra cruda. En el caso de FDN FDA se utilizó la metodología descrita por Van Soest, las pruebas se realizaron en los periodos comprendidos del 10 de Marzo al 10 de Abril de 2011.

Se evaluaron nutricionalmente dos especies de nopal las cuales fueron recolectadas en diferentes partes del Estado de Coahuila.

La primera variedad fue el *Opuntia ficus indica* (figura 3), esta variedad fue recolectada en el Ejido 18 de Marzo, con cabecera Municipal en San Antonio de las Alazanas, Municipio de Arteaga, Coahuila. La segunda variedad fue el *Opuntia rastrera* (figura 4), esta variedad fue tomada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

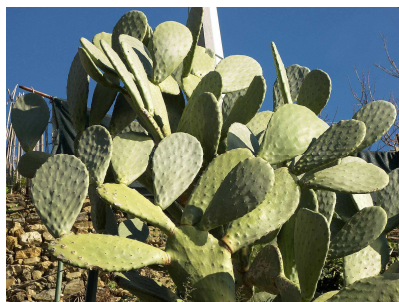


Figura 3. *Opuntia ficus indica*



Figura 4. *Opuntia rastrera*

### 3.2.1 Determinación de materia seca parcial

Todos los alimentos contienen cantidades de agua que varían de 10-90% porque también varía la concentración de sus nutrientes, es de gran importancia conocer la cantidad de agua de un alimento o insumo, ya que este es un factor importante en su conservación. Se considera humedad al agua contenida o impregnada en los alimentos en el componente más simple de analizar ya que se determina por desecación mediante evaporación sometiendo la muestra a 65-70° C durante 24 horas, la planta en crecimiento puede contener un 70-80 % de agua; a este tipo de muestras se les determina materia seca parcial.

La materia seca parcial es el método más utilizado, que consiste en la eliminación de agua libre por medio de calor de circulación, seguida por la determinación del peso del residuo, esta técnica se basa en someter a los insumos o alimentos a altas temperatura entre 69-65° C la temperatura se regula para efectuar un secado máximo y para evitar un mínimo de pérdidas de sustancias volátiles y otras que se descomponen.

Se encendió la estufa de secado marca Robert Shaw a una temperatura aproximada de 60-65° C, después se pusieron las muestras frescas previamente cortadas en trozos pequeños y delgados en charolas grandes, se introdujeron las charolas con la muestra de nopal en la estufa durante 12-14 horas. Se sacaron las muestras de la estufa, enfriándose a temperatura ambiente, para después pesar las muestras totalmente secas.

Para obtener el porcentaje de materia seca parcial se utiliza la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ MSP} = \frac{\text{Peso de Muestra seca}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

### 3.2.2 Determinación de materia seca total

La materia seca, no es más que la muestra a la que se le ha extraído el agua por acción del calor. Está constituida por una porción susceptible de quemarse ya que está constituida por sustancias que contiene carbono o materia orgánica y que constituye a dar energía al alimento, la otra porción incombustible se encuentra formada por sustancias que no pueden quemarse y que los residuos que forman son ceniza cuando se someten a calcinación.

La materia seca total se obtiene mediante la evaporación total de la humedad a una temperatura que varía entre 100-105°C. Este método determina el agua contenida en los alimentos.

Primeramente a las muestras recolectadas se les quitaron las espinas y fueron cortadas en trozos pequeños y puestas en charolas grandes para después meterlas a la estufa de secado marca Robert Shaw la cual estaba a una temperatura de entre 65-75°C las muestras estuvieron en la estufa hasta que las variedades de nopal estaban totalmente secas, una manera de saberlo era que el nopal se quebraba fácilmente y mantenía un peso constante.

Después la muestra totalmente seca se molió en el molino Wiley, colocando la muestra en un frasco limpio y seco. Prosiguiendo a su etiquetado.

Se colocaron los crisoles en la estufa a 80-110°C durante 24 horas para que estén a peso constante. Después los crisoles fueron sacados con pinzas y puestos en el desecador, dejándolos enfriar por un periodo aproximado de 10 minutos y se procedió a pesar.

Se pesaron 2 gramos de muestra y se colocaron en los crisoles, se colocaron en la estufa toda una noche y nuevamente se sacaron los crisoles con pinzas, para después colocarlos en el desecador, para después enfriar y pesar.

Para la determinación de materia seca total se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MST} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{Muestra seca} - \text{peso del crisol vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

### 3.2.3 Determinación de ceniza

El término de ceniza se refiere a la que queda de la combustión total de una muestra de alimento. Las cenizas no contienen Carbono y están formadas por diversas sustancias minerales. La porción incombustible (cenizas) se determina quemando la porción de combustible mediante una elevada temperatura (calcinación) que puede ser de 500-600° C.

Para continuar con nuestro análisis bromatológico se realizó la determinación de ceniza que consistió en la preincineración de las muestras en parrillas hasta que se dejó de ver humo en cada una de ellas, después se colocaron en la mufla durante 2-3 horas. Las muestras se sacaron de la mufla marca Thermolyne modelo 1500 (figura 5) cuidadosamente con las pinzas para crisol y fueron colocadas en el desecador para después dejarlas enfriar durante 15 minutos y efectuar el respectivo pesaje.

Para la determinación de ceniza se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% C = \frac{\text{Peso del crisol + Cenizas} - \text{Peso del crisol vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Materia Orgánica} = \% \text{ Materia seca total} - \% \text{ Ceniza}$$

Para ajustar sus datos en base a Materia Seca Total dividir su % Cenizas entre su porcentaje MST y Multiplicar por 100.



Figura 5. Mufla marca Thermolyne modelo 1500



### 3.2.4 Determinación de proteína cruda o bruta (Método Microkjeldhal)

El termino o adjetivo de bruto o cruda, es para indicar que no son determinaciones de entidades químicas puras, sino que además se obtienen de otros compuestos que no son estrictamente proteínas. Las proteínas son compuestos nitrogenados que están integrados por cadenas de aminoácidos que son necesarios para realizar las funciones fisiológicas del animal. El principio básico de este método se basa en la conversión de nitrógeno de las sustancias nitrogenadas de amonio.

Para la determinación de proteína cruda, primero se peso .05 gramos de muestra de nopal previamente molida previamente envuelta en papel, a continuación se coloco tal muestra en el matraz Kjeldahl con 4 perlas de vidrio con la finalidad de mantener constante la ebullición, se agregaron 4 ml. de mezcla digestora. Se coloco el matraz en el digestor, (figura 6) encendiéndose la parrilla entre 4-5, se encendió el motor aspirador de gases, hasta que la muestra cambie de color café oscuro a verde claro. Se dejo enfriar el matraz, se coloco en la llave del agua con cuidado, agregando 100 ml. de agua destilada, después se vació el resultado de la digestión en la copa del equipo de destilación, se enjuagó lo que quedo en el matraz con agua destilada, a esto se le agrego lentamente por las paredes de la copa del equipo de destilación 100 ml. de hidróxido de sodio al 45%, recibiendo 70 ml. del destilado en vasos de precipitado que contenían 5 ml. de acido bórico al 2.2 y 5 gota de indicador mixto, por último se titulo con acido sulfúrico al 0.1 N de color azul a rojo.

Para la determinación de proteína cruda se utilizo la siguiente ecuación matemática:

$$\% N = \frac{(\text{ml. de acido sulfúrico gastados en la muestra} - \text{ml. de acido sulfúrico gastados en el blanco}) \times .014 \times \text{Normalidad del acido}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

N = Normalidad del ácido sulfúrico

1.014 = mini equivalente de nitrógeno

1 eq. de nitrógeno pesa 14g/eq = 14/100 = mini equivalente

% PC = % N x 6.25

El 6.25 resulta de dividir 100 entre 16 que es el porcentaje de nitrógeno que tienen algunos alimentos.



Figura 6. Microkjeldahl

### 3.2.5 Determinación de extracto etéreo o grasa

La grasa cruda es otro de los componentes químicos que representa la grasa y que algunas veces se le denomina extracto etéreo. La grasa cruda está formada principalmente por lípidos y por otras sustancias que no lo son, pero que son solubles en ciertos solventes de las grasas.

Al realizar el análisis del extracto etéreo, no solamente se encuentran en este la grasa y aceites, si no otros compuestos como las vitaminas liposolubles, pigmentos, fosfolípidos, glicolípidos, ceras, parafinas y xantofilias. El compuesto que más se emplea en la extracción de extracto etéreo es el hexano que mediante el calor extrae los compuestos solubles hasta que la muestra se seca.

Se colocaron los matraces bola de fondo plano, previamente con 3 perlas de vidrio en la estufa durante 12 horas para que estén a peso constante.

A la par en un papel filtro se pesaron 5 gramos de muestra del nopal molido, poniendo la muestra pesada en un dedal de asbesto doblando con cuidado el papel que contiene la muestra.

Después con las pinzas se sacan con cuidado los matraces bola de fondo plano, se colocaron en el desecador durante unos 15-20 minutos aproximadamente dejando que se enfriaran para después llevar los matraces a pesar.

Posteriormente se agrego al matraz 250 ml. de hexano. Se coloco el dedal en el sifón Soxleth (figura 7), junto con el matraz bola el refrigerante, se encendió la parrilla y se abrió la llave del agua, dejando aproximadamente 12 horas sifoneando. Con cuidado se retiro el dedal con pinzas, recuperando el solvente (hexano), se coloco el matraz en la estufa, se dejo 12 horas, se saco, enfrió para después pesarse.

Para la determinación de extracto etéreo grasa total se utilizo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ E E } = \frac{\text{Peso del matraz + Grasa} - \text{Peso del matraz vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar su % EE en base a materia seca total se divide entre % MST y se multiplica por 100.



Figura 7. Sifón Soxleth

### 3.2.6 Determinación de fibra cruda (FC)

Químicamente la fibra cruda corresponde a la lignina y a la celulosa, es decir a los glúcidos insolubles en el agua que resisten a la acción hidrolítica de los ácidos y álcalis, con esto se trata de imitar la digestión acida del estomago y la digestión alcalina del intestino. Esta fracción está determinada o integrada por celulosa y otros hidratos de carbono insolubles o que no se disuelven fácilmente.

Para llevar a cabo la obtención de fibra cruda se utilizaron las bolsas de Nylon, identificadas, exclusiva para filtrar, las cuales fueron puestas por 24 horas en la estufa para obtener peso constante de cada una de ellas, después se pesaron 0.5 gramos de muestra seca molida de nopal, tales muestras fueron puestas dentro de bolsas de Nylon, para después ser selladas una por una.

Se introdujeron las bolsas al equipo analizador de fibra Ankom 200, se le agrego la solución FC y se activó la temperatura (100 °C) con su respectiva 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, para después obtener los resultados de fibra cruda.

Para la determinación de fibra cruda se utilizo la siguiente fórmula:

$$\%FC = \frac{(\text{Peso final de las bolsas + Muestra} - (\text{Peso de la bolsa vacía} \times \text{FC blanco}))}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

**FC blanco** = Factor de Corrección .1546

### 3.2.7 Determinación de fibra detergente acida (FDA)

El procedimiento para determinar fibra detergente acido permite la obtención rápida de la cantidad de celulosa y lignina en vegetales. La diferencia entre el valor de las paredes celulares y la fibra detergente acido da una estimación del valor de hemicelulosa ya que esta diferencia también incluye una fracción de proteína adherida a las paredes celulares. Este método se emplea también como procedimiento preliminar en la determinación de lignina.

La fibra detergente acido es separada en dos fracciones: la primera, ácidos detergentes solubles que son el contenido de hemicelulosa rápidamente digerible y la segunda, la fibra detergente acido es la porción menos digerible 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 llevar a cabo la obtención de fibra detergente acida, se utilizaron las bolsas de Nylon, identificadas, exclusiva para filtrar, las cuales fueron puestas por 24 horas en la estufa para obtener peso constante de cada una de ellas, después se pesaron 0.5 gramos de muestra seca molida de nopal, tales muestras fueron puestas dentro de bolsas de Nylon, para después ser selladas una por una. Se introdujeron las bolsas al equipo analizador de fibra Ankom 200, se le agrego la solución FDA y se activó la temperatura (100 °C) con su respectiva 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, para después obtener los resultados de FDA.

Para la determinación de fibra detergente neutra se utilizo la siguiente fórmula:

$$\%FDA = \frac{(\text{Peso final de las bolsas} + \text{Muestra} - (\text{Peso de la bolsa vacía} \times \text{FC blanco}))}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

**FC blanco** = Factor de Corrección .1546

### 3.2.8 Determinación de fibra detergente neutra (FDN)

El procedimiento para determinación de fibra detergente neutro se utiliza para conocer los componentes de pared celular que no son solubles como lignina, celulosa y hemicelulosa, el cual es un método rápido para determinar fibra total en vegetales, ya que estos componentes se digieren lentamente y en diferentes porcentajes. Aparentemente divide la materia seca al punto que separa los constituyentes nutricionales solubles de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación microbiológica para su aprovechamiento este método no puede aplicarse en alimentos con alto contenido de proteína y bajo contenido de fibra.

Para llevar a cabo la obtención de fibra detergente neutra, se utilizaron las bolsas de Nylon, identificadas, exclusiva para filtrar, las cuales fueron puestas por 24 horas en la estufa para obtener peso constante de cada una de ellas, después se pesaron 0.5 gramos de muestra seca molida de nopal, tales muestras fueron puestas dentro de bolsas de Nylon, para después ser selladas una por una.

Se introdujeron las bolsas al equipo analizador de fibra Ankom 200, se le agregó la solución FDN y se activó la temperatura (100 °C) con su respectiva 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, para después obtener los resultados de FDN.

Para la determinación de fibra detergente neutra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%FDN = \frac{(\text{Peso final de las bolsas} + \text{Muestra} - (\text{Peso de la bolsa vacía} \times \text{FC blanco}))}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

**FC blanco** = Factor de Corrección .1546

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

### **3.3 Material Biológico**

Se utilizaron cepas de los microorganismos VML-2 (vaca alimentada con masilla y levadura), tomadas de cultivos puros aislados e identificados por Valdez (2010) pertenecientes al cepario del Departamento de Producción Animal.

#### **3.3.1 Preparación de Medio Sólido**

Para la realización del medio sólido se diluyeron 8.38 gr. De agar Schaedler (BD BBLTM), en 200 ml. de agua destilada, solubilizando para posteriormente esterilizar en la autoclave a una temperatura de 121° C a 15 lb. de presión por 15 minutos. Se vaciaron de 15-20 ml. del agar Schaedler en las cajas Petri.

#### **3.3.2 Siembras en Medio Sólido**

Se realizaron siembras en cajas Petri estériles, por el método de estría abierta cruzada sobre el agar Schaedler (figura 2), para después incubar a 37°C por 24 horas bajo condiciones de anaerobiosis, hasta observar crecimiento sobre el medio. Para la creación del ambiente en condiciones anaeróbicas y favorecer el crecimiento del microorganismo, se utilizaron botes de plástico con tapa de rosca, dentro del cual se colocaron las cajas Petri ya sembradas, se colocó una vela prendida y se cerró el bote, colocando cinta alrededor de la tapa, cuando la vela se apaga indica la ausencia de oxígeno dentro del bote, obteniendo así las condiciones para el crecimiento de las enzimas.

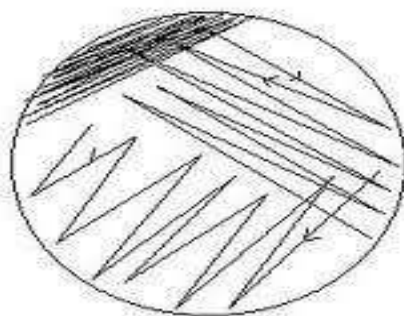


Figura 8. Método de siembra por estría abierta cruzada en medio sólido.

### **3.3.3 Tinción de Gram**

Una de las coloraciones más importantes es la de Gram, siendo de las más usadas por los bacteriólogos, por ello las bacterias se clasifican en gram negativas y positivas. El método fue descubierto por Christian Gram (1884) cuando trabajaban con cortes histológicos de bacterias. Observo cuando las secciones eran coloreadas con violeta de genciana anilizada y después tratada con una solución acuosa de yodo, el colorante podría ser movido fácilmente del tejido por medio del alcohol, pero no las bacterias que contenían este.

Más tarde trabajando con las bacterias observo que algunas retenían el violeta de genciana y otras decoloradas por el alcohol, las primeras las denomino gram positivo (azules) y las segundas gram negativas; o estas quedan sin color, por lo que se usa un colorante de contraste como safranina y fucsina (rojo) o como el verde de malaquita y el ácido pícrico que dan un color amarillo.

Se realizó un frotis de la cepa del microorganismo VML-2 (vaca alimentada con masilla y levadura), dejando secar al aire. Después se fijó el frotis al calor cubriéndose con cristal violeta, se dejó actuar durante 1 minuto, se escurrió el colorante para después lavarlo con un chorrillo de agua destilada. A continuación se cubrió el frotis con lugol y se dejó actuar durante 1 minuto, se escurrió el colorante y se lavo con agua. Posteriormente se decoloro con alcohol aproximadamente por 5 segundos siguiendo las instrucciones, se cubrió el frotis con safranina dejando actuar por 1 minuto, se deja escurrir para después lavarse con agua corriente, se secan al aire libre, para finalizar se observa la preparación en el microscopio a 100 X utilizando aceite inmersión.



### 3.4 Fermentación para la producción del extracto enzimático

#### 3.4.1 Preparación del medio líquido específico para producir celulasa

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

Cuadro 4. Composición del medio líquido específico para producción de celulasas.

Componente	Cantidad (%)
NaCl	1.5
NaNO <sub>3</sub>	0.09
KCL	1.5
Fuente de C (celulosa) Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
MgSO <sub>4</sub>	0.03

#### 3.4.2 Producción de celulasas

En un matraz Erlenmeyer de 250 con 70 ml de agua destilada se agregaron minerales (cuadro 6), se disolvieron y posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15min. La fuente de carbono (celulosa) se disolvió en 30 ml de agua destilada y fue adicionada en el medio a temperatura ambiente. Se agregaron 7 ml del medio en la caja Petri con cultivo puro, se realizó barrido por medio de Micropipeta con puntillas de 1 ml para obtener las enzimas, se depositaron en el medio líquido para inducir a la producción de celulasas, se incubaron durante 96 horas a una temperatura de 40°C, en condiciones de anaerobiosis, se centrifugo el medio en tubos de ensaye a 5000 revoluciones durante diez minutos, con la finalidad de separar el extracto enzimático de la biomasa.

### 3.4.3 Preparación del medio líquido específico para producir pectinasa

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

Cuadro 5. Composición del medio líquido específico para producción de pectinasa.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (%)</b>
<b>NaCl</b>	1.5
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	0.09
<b>KCl</b>	1.5
<b>Fuente de C (pectina) Carboximietil pectinasa</b>	1
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.6
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.03

### 3.4.4 Producción de pectinasas

En un matraz Erlenmeyer de 250 con 70 ml de agua destilada se agregaron minerales (cuadro 6), se disolvieron y posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15min. La fuente de carbono (pectinasa) se disolvió en 30 ml de agua destilada y fue adicionada en el medio a temperatura ambiente.

Se agregaron 7 ml del medio en la caja Petri con cultivo puro, se realizó barrido por medio de micropipeta con puntillas de 1 ml para obtener las enzimas, se depositaron en el medio líquido para inducir a la producción de pectinasa, se incubaron durante 96 horas a una temperatura de 40°C, en condiciones de anaerobiosis, se centrifugo el medio en tubos de ensaye a 5000 revoluciones durante diez minutos, con la finalidad de separar el extracto enzimático de la biomasa.

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

#### **3.4.5 Preparación de la solución madre**

Se preparó una solución madre (sustrato) al 5 % agregando 100 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizado, posteriormente se agregaron 5g muestra de nopal utilizando dos variedades (*O. Ficus indica*, *O. Rastrera*) (Figura 3).



Figura 9. Solución madre (sustrato) al 1 y 5%.

#### **3.4.6 Cinética enzimática**

La cinética enzimática se realizó en tubos de ensaye, lavados y esterilizados, agregando por medio de micro pipetas y puntillas estériles 200µl de sustrato y 50 µl de extracto enzimático, dejando actuar en baño maría a 37°C a tiempos en minutos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 480 (8 horas), 720 (12 horas), 1440 (24horas), 2880 (48horas), 4320 (72horas).

### 3.4.7 Determinación de azúcares reductores

Se llevó a cabo mediante la técnica de (Somogy-Nelson). Para lo cual se prepararon los siguientes reactivos.

Preparación del reactivo 1 (Somogyi):

Para la preparación del reactivo de Somogy se prepararon las siguientes soluciones. Solución A: 2.5 g de carbonato de sodio anhídrido ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 2.5 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ( $\text{KNa}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 2 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y 20 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) se disolvieron en agua destilada y se aforó a 100 ml. Solución B: en 50 ml de agua destilada se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) disolver 7.5 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). El reactivo 1 se preparó mezclando 4 ml de solución en 100 ml de solución A.

Preparación del reactivo 2 (Nelson):

Para la preparación del reactivo de Nelson se prepararon las siguientes soluciones. Solución A: en 225 ml de agua destilada se disolvió 10.5 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y 12.5 g de molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Solución B: 1.5 g de arsenito de sodio heptahidratado ( $\text{NaHASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) se disolvieron en 12.5 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  $55^\circ\text{C}$  durante 30 min.

Se preparó un blanco para ajustar a cero el espectrofotómetro colocando 250  $\mu\text{l}$  de agua destilada en un tubo de ensaye y 250  $\mu\text{l}$  de reactivo de Somogy, e incubando a baño de agua hirviendo por 10 minutos para después agregar 250  $\mu\text{l}$  de reactivo de Nelson y 4 ml de agua destilada, se agitó vigorosamente y se calibró el espectrofotómetro.

La metodología empleada para la determinación de azúcares reductores fue la siguiente: después de dejar actuar el extracto enzimático sobre sustrato a los diferentes tiempos se agregaron 250  $\mu$ l del reactivo de Somogy para detener la actividad enzimática, posteriormente se incubó en baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 250  $\mu$ l de reactivo de Nelson y se agitó vigorosamente, después se agregaron 4 ml de agua destilada y de nuevo se agitó, por último se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. después de haber ajustado el espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys (figura 10) con el blanco.



Figura 10. Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Etapa I. Caracterización bromatológica del nopal**

#### **4.1 Evaluación nutricional de las dos variedades de *Opuntia* utilizadas.**

El cuadro 6 muestra los resultados obtenidos del contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* utilizadas. Realizando una comparación con el estudio de (Mata *et al.*), quien evaluó nutricionalmente 2 variedades de nopal (*Opuntia spp.*) forrajero, reporto los siguientes resultados: proteína entre 1.2-2.65%, extracto etéreo 1.42-1.85%, fibra cruda entre 9.23-10.54%, ceniza entre 12.05-16.23%, MST de 90.14-92.51%. Encontrando que MST, extracto etéreo y fibra cruda si se encuentran dentro de este rango, mientras que proteína y ceniza presentan resultados muy por debajo de los rangos citados y semejantes a los obtenidos por (Flores, 1977), quienes en su estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia rastrera*) para uso forrajero, atribuyen sus resultados a la edad de los cladodios utilizados, los cuales se encuentran en un rango de edad de 1 mes a una año. Mientas que para FAD y FND de las dos especies utilizadas se obtienen valores semejantes a los citados por (Medina *et al.*, 2006), quien menciona que el contenido de FAD se encuentra alrededor de 16% y el contenido de FND entre 30 y 45% aproximadamente.

Cuadro 6. Contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* utilizadas.

<b>Componente (%)</b>	<i>Opuntia ficus indica</i>	<i>Opuntia rastrera</i>
<b>Materia seca parcial</b>	8.5659	10.4497
<b>Materia seca total</b>	97.425	95.35
<b>Humedad</b>	2.575	4.645
<b>Ceniza</b>	23.4316	52.315
<b>Proteína cruda (tal como se ofrece)</b>	1.75	2.916
<b>Proteína Cruda (en base a materia seca total)</b>	1.799	8.914
<b>Extracto etéreo (tal como se ofrece)</b>	1.3825	1.595
<b>Extracto etéreo ( en base a materia seca total)</b>	1.42	1.67
<b>Fibra cruda</b>	94.26	75.8
<b>Fibra ácido detergente</b>	29.14	34.62
<b>Fibra neutro detergente</b>	76.94	82.7

La figura 11 Representa una comparación gráfica del contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* utilizadas, en la que se puede apreciar que las dos especies presentan valores semejantes en el contenido de extracto etéreo (en base a materia seca total) mientras que en el contenido de materia seca parcial, ceniza, humedad, proteína cruda (tal como se ofrece), proteína cruda (en base a materia seca total), FC, FAD y FND se puede observar diferencias mayores.

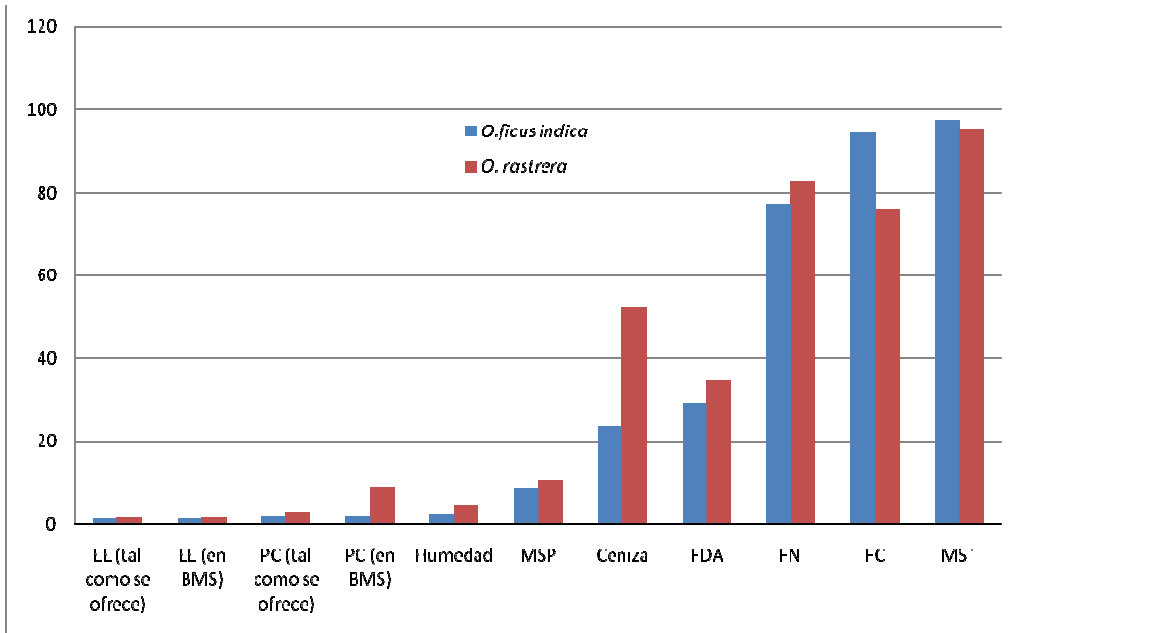


Figura 11. Comparación gráfica del contenido nutricional entre las dos variedades de *Opuntia* utilizadas.

## **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**

Las características macroscópicas de la cepa VML-2, da como resultado una colonia de color blanco, forma irregular, elevación convexa, aspecto húmedo y consistencia suave (Figura 11). Dicha descripción concuerda con la mencionada por Valdez-Sepúlveda (2010). Esta cepa fue seleccionada por Valdés-Sepúlveda (2010) como un microorganismo altamente productora de la enzima celulasa, por lo que fue empleada en posteriormente para la degradación enzimática del nopal.



Figura 12. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio sólido.



### 4.3 Evaluación microscópica

Las características microscópicas de las células puras teñidas mediante la técnica de Gram fueron: bacilos cortos Gram negativos, no agrupados (Figura 12). Dicha descripción concuerda con la mencionada por Valdez-Sepúlveda (2010).



Figura 13. 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 Cinética enzimática (Somogy-Nelson)**

##### **4.4.1 Cinética enzimática en nopal *Opuntia ficus indica***

En la figura numero 13 podemos observar que la enzima celulasa producidas por la cepa VML-2 tienen gran actividad de celulasas en los primeros 60 minutos y que la enzima no tardó en adaptarse a los nutrientes del medio, por lo que no se observó fase de adaptación, en estos primeros 60 minutos se presentó la mayor cantidad de azúcares reductores, lo que significa la ruptura de celulasas y su conversión en azúcares más simples por ejemplo glucosa, se muestra un rápido descenso en la degradación de celulosa en el rango de 60 a 90 minutos con una actividad enzimática de 1430U. descendiendo constantemente hasta 4320 minutos (72horas), mientras que en la enzima pectinasa (figura 14) tuvo menor degradación enzimática, por lo que a mayor cantidad de fibra cruda mayor es la actividad enzimática, pero en pectina no se presentó la degradación de azúcar esperada, por lo que es posible que la técnica no sea sensible a la determinación de azúcares reductores.

Así en el eje de las x se determinaron los siguientes valores equivalentes 0=0 minutos, 1= 5 minutos, 2 = 10 minutos, 3= 15 minutos, 4= 30 minutos, 5= 45 minutos, 6 = 60 minutos, 7= 120 minutos(2 horas), 8= 240 minutos (4 horas), 9= 480 minutos (8 horas), 10 = 1440 (24 horas), 11= 2880 (48 horas), 12 = 4320 (72 horas).

Figura 14. Degradación enzimática de celulosa al 1 y 5% (*O. ficus indica*). Utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

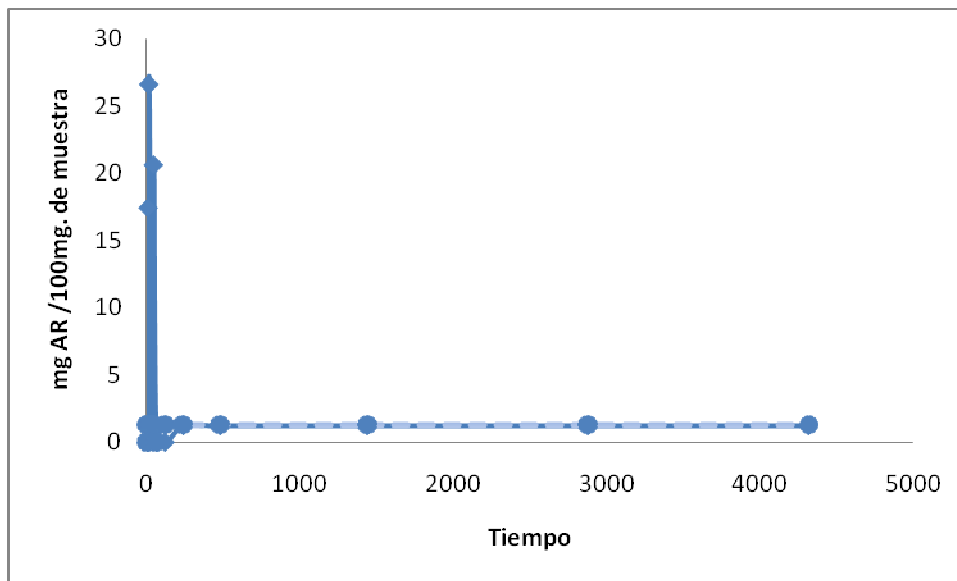
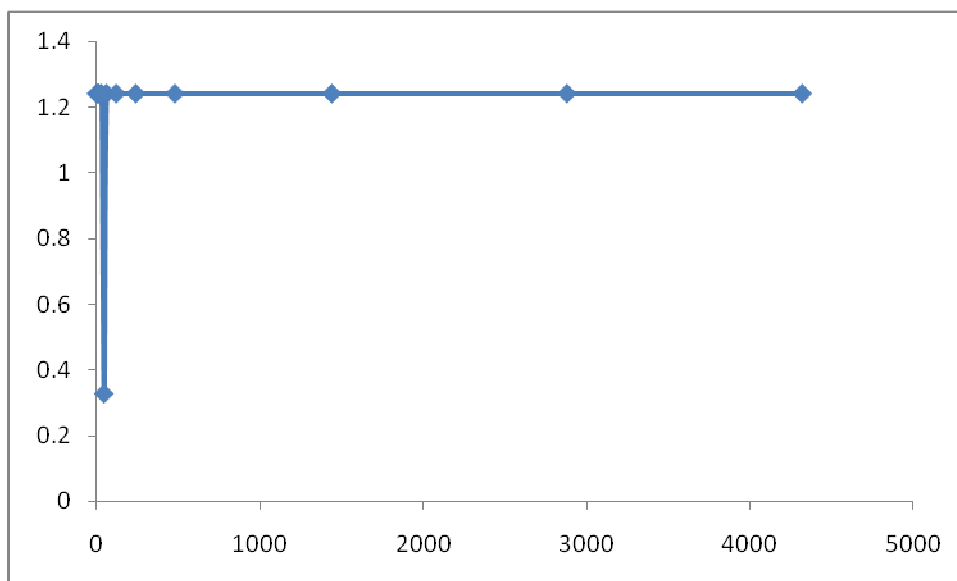


Figura 15. Degradación enzimática de pectina 1% (*O. ficus indica*). Utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.



#### 4.4.2 Cinética enzimática en nopal *Opuntia rastrera*

En la figura 15 es posible observar que la degradación de azúcares reductores es más rápida los primeros 60 minutos enzimática de celulosa al 1 y 5% y va reduciendo su cantidad al llegar a las 24 horas, mientras que en la pectina (figura 16), la determinación de azúcares reductores es posible determinar que la técnica no sea sensible a tales compuestos.

Así en el eje de las x se determinaron los siguientes valores equivalentes 0=0 minutos, 1= 5 minutos, 2 = 10 minutos, 3= 15 minutos, 4= 30 minutos, 5= 45 minutos, 6 = 60 minutos, 7= 120 minutos(2 horas), 8= 240 minutos (4 horas), 9= 480 minutos (8 horas), 10 = 1440 (24 horas), 11= 2880 (48 horas), 12 = 4320 (72 horas).

Figura 16. Degradación enzimática de celulosa 1 y 5% (*O. rastrera*). Utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

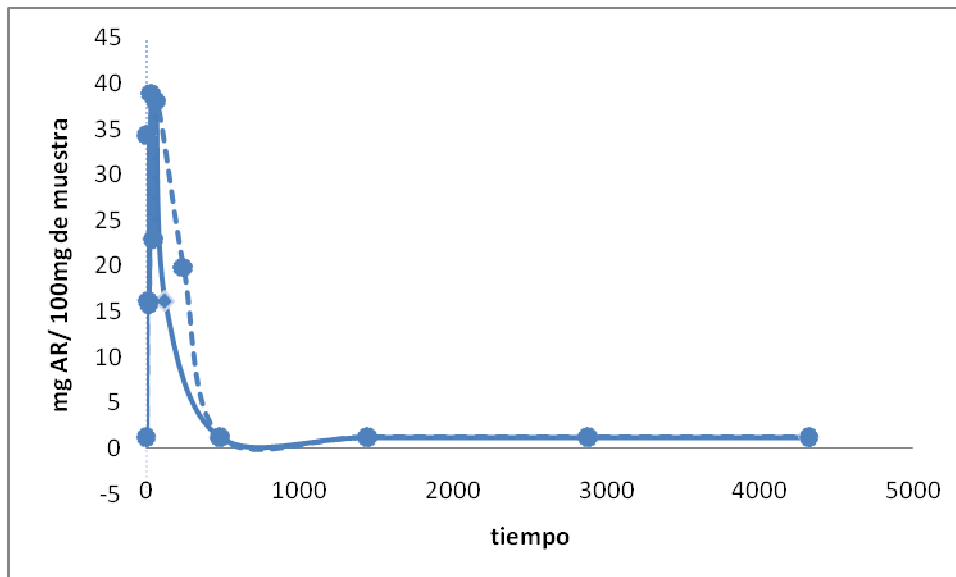
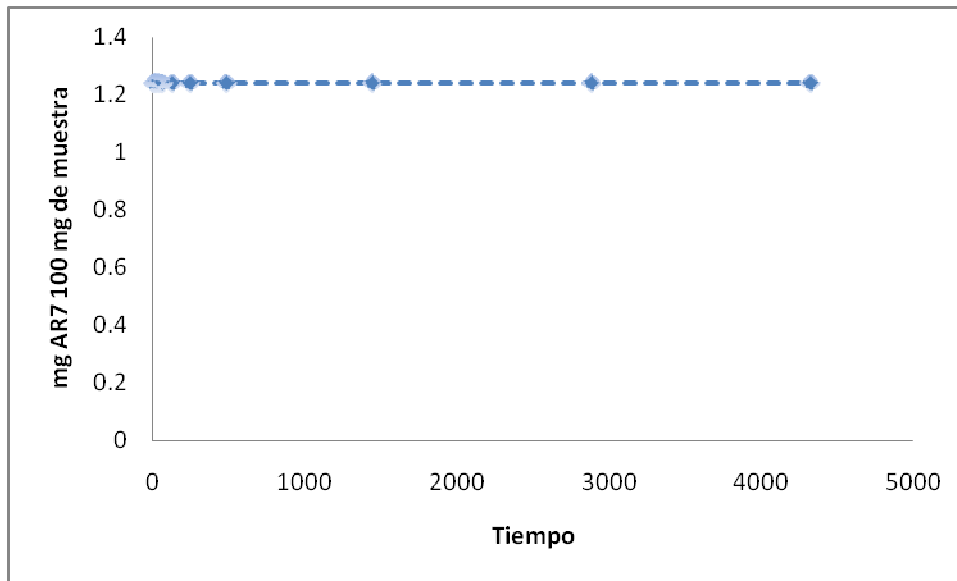


Figura 17. Degradación enzimática de pectina 1 y 5% (*O. rastrea*). Utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.



Se puede determinar que las dos variedades de nopal utilizadas tienen mayor degradación de azúcares reductores cuando se utiliza la pectinasa, mientras que en la utilización de la pectinasa la técnica no se mostró sensible. Además se observó que a mayor cantidad de fibra favorece para que la enzima se desarrolle y actúe. En este caso la variedad fue la *Opuntia ficus indica*.

## 5. CONCLUSIONES

Se logró evaluar nutricionalmente las dos variedades de nopal utilizadas (*Opuntia ficus indica* y *Opuntia rastrera*), presentando diferencias importantes en el contenido de ceniza, grasa, fibra y fibra detergente neutro y materia seca total, obteniendo mayores valores la variedad *Opuntia ficus indica* en contenido de fibra.

La cepa VML-2 aislada del rumen bovino es capaz de producir enzimas celulasas capaces de hidrolizar la celulosa pero no la pectinasa ya que esta muestra sensible a la técnica de azúcares reductores.

La variedad *Opuntia ficus indica* por su alto contenido de fibra presenta mayor actividad enzimática que en la variedad *Opuntia rastrera*

La utilización de enzimas celulasas producidas por cepas aisladas del rumen bovino representa una alternativa económica y de fácil acceso para procesos de síntesis de compuestos ricos en celulosas, pero no así en pectina.

## 6. LITERATURA CITADA

- Alexander.1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, S.A. México. Pp. 162-167.
- Bravo H., H. y Scheinvar, L. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. CONACYT. Fondo de cultura económica. México, D.F.
- Carrillo, L. 2003. Microbiología Agrícola. Capítulo 3. Actividad Microbiana. Pp.1-8.
- Castellanos, S.D., Cruz, C.N., Argüello, A.H. 2009. Degradation of cellulose and xylan by mycroorganisms isolated in two different compost from agricultural wuastes in the Bogota Plateau. Revista colombiana de ciencias hortícolas. Vol.3. No. 2. Pp. 237-249.
- Chacón, S.L.O., y Waliszewsky, K.N., 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Vol. 21. Num.042. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Pp. 113-122.
- Charley, H. 1987. Tecnología de alimentos. Ed. Limusa, México, pp. 643-645, 728-737.
- Felker, P. 1995. Forages and fodder production and utilization. Pág. 144-154, in: G. Barbera, P. Inglese & E. Pimienta-Barrios (eds.) Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO. Plant production and protection paper. Rome, Italy.
- Flores V. C., El nopal como forraje, tesis profesional. Escuela nacional de agricultura, Chapingo, México, 1977.
- Fogarty, W. M., y C. T. Kelly. 1983. Pectic enzymes. En: Microbial enzymes and biotechnology (Fogarty, W. M., Ed.). Applied Science publishers, pp 131-182.

- Gaitán, B. D., y Pérez, P.L. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Granados, S. y D. Castañeda P., 1997. El nopal, historia, fisiología, genética e importancia frutícola, Trillas, México, D.F.
- Murillo, A., M., E., T., Diéguez, H. García. El nopal: alternativa para la agricultura en zonas áridas en el siglo XXI. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste 1ª. Ed. 2003. La Paz, Baja California Sur, México.
- Rambouts, F. M., y W. Pilink. 1980. Pectin enzymes. En Rose A. H. (ed.). Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversions. Acad Press Inc., London-New York. Pp. 227-282.
- Ríos. A. El nopal y la oveja: una esperanza para la zona desértica mexicana, Secretaria de Recursos hidráulicos (memorándum técnico núm. 96). México, 1954.
- Scheinvar, L. 1995. Taxonomy of utilized *Opuntias* in: G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta. Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO, Plant Production paper, Rome, Italy.
- Valdez, S.L. 2010. Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masillas y levadura). Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Ward, O. P., 1985. Hydrolitic enzymes. En Blanch, H. W., Drew, S y Wang, D. I. (Eds.) Comprehensive Biotechnology. Pergamon Press, New-York; 3:819-835.

- Prado, B. B., O. S. Huerta, S. G. Rodriguez. 1999. Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. 1ª.Ed. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.
- Sudzuki Hills, F. 1995. Anatomy and morphology. P. 28-35, en: G. Barbera, P. Inglese & E. Pimienta B. (eds.) Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO. Plant production and protection Paper, p. 132. Rome, Italy.
- Barrientos, P. F., 1972. Rendimiento del nopal *Ficus indica* var. COPENAF-1 a diversas densidades. Rama de genética. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Elizondo, E. J., J. López y G. J. Dueñez A. 1987. El género *Opuntia* (Thurnerfort) Miller y su distribución en el estado de Coahuila. 2ª. Reunión Nacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal. Instituto de biología. UNAM. México, D. F.
- Badui D. S. 1988. Diccionario de la tecnología de alimentos. Alhambra Mexicana. Pp. 192.
- De la Cruz, C. J. A. 1994. Prickly pear cactus for forage in Mexico. In 5° Annual Prickly pear council, Kingsville, Texas.
- Nobel, P. S., 1994. Remarkable agaves and cactus. New York: Oxford University.
- Fuentes, R. J. M. 1996. El nopal forrajero en el Norte de México. Taller internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal y mezquite. CINESTAV- Irapuato, Guanajuato, México.
- Murillo, S., M., 2001. Evaluación bioquímica, degradación, pruebas de alimentación y costos de biomasa de nopal (*Opuntia spp.*) como forraje, tratada con diferentes aditivos, tesis de doctorado en ciencias agrícolas. Área de producción agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.



Fogar, M.N., Cracogna, M.F., Iglesias, M. 2003. Capacidad de degradación de celulosa en dos sistemas de labranza en chaco semiárido. Facultad de ciencias Agrarias. UNNE. Corrientes, Argentina.

Mata, C., A., 2011. Degradación *in vitro* de 2 variedades de *Opuntia* mediante enzimas producidas por la cepa ruminal VML-2. Tesis de Licenciatura. Departamento de Producción Animal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.