

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**  
**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



Degradación *in vitro* de dos variedades de *Opuntia*  
mediante enzimas producidas por la cepa ruminal VML-2

Por:

ANTONIO MATA CRUZ

**TESIS**

Presentada como Requisito Parcial para obtener Título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Febrero de 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Degradación *in vitro* de dos variedades de *Opuntia*  
mediante enzimas producidas por la cepa ruminal VML-2

Presentado por:

ANTONIO MATA CRUZ

**TESIS**

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

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

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez  
**Presidente**

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez  
**Sinodal**

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara  
**Sinodal**

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

Dr. Ramiro López Frujillo  
**Coordinador de la División de Ciencia Animal**

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Febrero de 2011

Universidad Autónoma Agraria  
**ANTONIO NARRO**



COORDINACIÓN DE  
CIENCIA ANIMAL

## **AGRADECIMIENTOS:**

*A mi “ALMA MATER” por darme la oportunidad de formarme profesionalmente, por abrigarme con su enseñanza y encaminarme en el trayecto de la vida.*

*A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez todos mis agradecimiento por su apoyo, confianza, enseñanzas y paciencia para la realización de este proyecto.*

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

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

*A mis Amigos y Compañeros: Ignacio, Benjamín, Octavio Moreno, Octavio Regalado, Isaac, por su amistad, diversión, consejos, recuerdos, por compartir toda esta etapa conmigo y hacerla muy especial.*

*A mis Amigas y Compañeras: Elvia, Dalía, Diana Ivón, Ana Lilia V, Candy, Yaribeth, Valentina, Martha, Elena, Karina, Cinthia, Tania, Claudia, Lucia por su valiosa amistad desinteresada, cariño, consejos, momentos inolvidables que pasamos juntos y por hacer esta etapa inolvidable.*

*A los profesores de la carrera de ICTA: MC. Oscar Noé Reboloso, MC. Xóchitl Ruelas, Dra. Ma. De Lourdes Morales, MC. María Hernández, Dr. Antonio Aguilera por sus enseñanzas y conocimientos transmitidos a lo largo de estos 4 años y medio.*

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

*A los profesores MC. Gerardo Sánchez, Dr. Jesús Valenzuela por su valiosa amistad, apoyo y confianza depositada en mí durante toda esta etapa de mi vida.*

*A José Modesto Castillo por haberme brindado su amistad incondicional siempre, por estar cuando más lo necesitaba sin esperar nada a cambio.*

**“GRACIAS”**

## DEDICATORIAS:

*A Dios por iluminarme en a lo largo de la vida permitirme terminar esta etapa tan importante en mi formación profesional y como persona.*

*A mis Padres Roberto Mata y Francisca Cruz por su confianza y apoyo para para lograr terminar esta carrera.*

*A mis Hermanos Cesar, Asucena y Daniel por sus consejos y apoyo durante toda la vida.*

*A Luz Fuentes por haber compartido tantos momentos conmigo, por su amor incondicional, confianza, apoyo y consejos.*

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
1.1 Antecedentes	2
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	3
1.4 Objetivo general	3
1.5 Objetivos específicos	
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
2.1 Generalidades del nopal	4
2.1.1 Origen	5
2.1.2 Clasificación taxonómica	5
2.1.3 Contenido nutricional	6
2.1.4 Características generales de la planta	7
2.1.5 Cultivo del nopal	8
2.1.6 Métodos de propagación y reproducción del nopal	8
2.1.7 Principales especies	8
2.1.8 Distribución del nopal	9
2.1.9 Condiciones agroecológicas para el cultivo del nopal	11
2.1.9.1 Suelos y fertilidad	11
2.1.9.2 Salinidad	11
2.1.9.3 Altitud y latitud	11
2.1.9.4 Clima	11
2.1.9.5 Temperatura	12
2.1.9.6 Precipitación	12
2.1.10 Importancia en la industria alimentaria	13
2.2 Celulosa	14
2.2.1 Enzimas implicadas en la degradación de celulosa	15
2.2.2 Mecanismo de hidrólisis enzimática	15

2.2.3	Microorganismos productores de celulasa	16
2.2.4	Degradación de celulosa por microorganismos aerobios y anaerobios	18
2.2.5	Factores ambientales que determinan la degradación microbiológica de celulosa	19
2.2.6	Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas	20
2.2.7	Productos de degradación de celulosa y su importancia en la industria	21
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1	Material orgánico de evaluación	22
3.1.1	Determinación de materia seca total	22
3.1.2	Determinación de ceniza	23
3.1.3	Determinación de grasa total	23
3.1.4	Determinación de fibra cruda	23
3.1.5	Determinación de proteína	24
3.1.6	Determinación de fibra detergente neutro	25
3.1.7	Determinación de fibra detergente acido	25
3.2	Material biológico	26
3.2.1	Preparación del medio solido	26
3.2.2	Siembras en medio solido	27
3.2.3	Tinción de Gram	28
3.3	Fermentación para la producción de extracto enzimático	28
3.3.1	Preparación del medio liquido específico para producir celulasa	28
3.3.2	Producción de celulasas	29
3.3.3	Determinación de proteína extracelular y celular	29
3.3.4	Preparación de la solución madre	30
3.3.5	Cinética enzimática	30
3.3.6	Determinación de azúcares reductores	31

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
4.1 Evaluación nutricional de las dos variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas	33
4.2 Crecimiento de la cepa VML-2 en medio sólido	35
4.3 Evaluación microscópica	35
4.4 Determinación y cuantificación de proteína celular y extracelular por el método de (Biuret)	36
4.5 Cinética enzimática (Somogy-Nelson)	37
4.5.1 Cinética enzimática en nopal <i>Opuntia lindheimeri</i>	37
4.5.2 Cinética enzimática en nopal <i>Opuntia robusta</i>	38
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>6. LITERATURA CITADA</b>	<b>41</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal	5
Cuadro 2. Contenido nutricional de algunas variedades de <i>Opuntia</i>	6
Cuadro 3. Variedades de <i>Opuntia</i> usadas como nopal verdura	13
Cuadro 4. Bacterias con alta actividad específica de celulasas	17
Cuadro 5. Hongos con alta actividad específica de celulasas	18
Cuadro 6. Composición del medio líquido específico para producción de celulasa	28
Cuadro 7. Contenido nutricional de las dos variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas	33
Cuadro 8. Contenido de proteína celular y extracelular	36



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la celulosa	14
Figura 2. Método de siembra por estría abierta cruzada en medio sólido	27
Figura 3. Solución madre (sustrato) al 5%	30
Figura 4. Comparación gráfica del contenido nutricional entre las dos variedades de <i>Opuntia</i> utilizadas	34
Figura 5. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio sólido	35
Figura 6. Observación microscópica (100X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2	35
Figura 7. Degradación enzimática de celulosa en nopal <i>Opuntia lindheimeri</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	37
Figura 8. Degradación enzimática de celulosa en nopal <i>Opuntia robusta</i> utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2	38

## RESUMEN

En la actualidad el uso de enzimas de interés ha aumentado significativamente, ya que resultan de gran beneficio en procesos de síntesis y degradación de componentes para mejora de procesos industriales, es importante la producción de celulasas 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.

El presente trabajo evaluó nutricionalmente dos variedades de (*Opuntia*) obtenidas de dos localidades del país, la primera (*Opuntia lindheimeri*) en el ejido San Rafael, Galeana, NL, ubicado en el km 157, carretera 57 tramo Matehuala-Saltillo y la segunda (*Opuntia robusta*) de la comunidad Los Escobedos, Apaseo el Grande, Guanajuato, obteniendo valores semejantes en el contenido de proteína, extracto etéreo y FAD, mientras que en el contenido de ceniza, fibra, FND y materia seca total se puede observar diferencias mayores en las variedades utilizadas.

Se realizó una fermentación a 96 horas para la producción de la enzima celulasa 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), 5760 (96horas) minutos. Se realizó una curva de degradación de celulosa en dos variedades de *Opuntia* (nopal) empleando el extracto enzimático producido, en la cual se observaron diferencias significativas ya que *Opuntia lindheimeri* presentó su máxima actividad de 1430 U en un tiempo de 60 minutos; mientras que para la variedad de *Opuntia robusta* su máxima actividad se observó a los 120 minutos con valores máximos de 1557 U. La variedad *Opuntia robusta* por su alto contenido de fibra presenta mayor actividad enzimática que en la variedad *Opuntia lindheimeri*.

*Palabras clave: Opuntia ficus indica, celulosa, celulasa, cinética enzimática.*

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

El interés del ser humano por el nopal data de miles de años. Su origen e historia están íntimamente relacionados con las antiguas civilizaciones mesoamericanas, en particular con la cultura azteca. Existen evidencias arqueológicas que permiten afirmar que fueron las poblaciones indígenas asentadas en las zonas áridas de Mesoamérica las que iniciaron el cultivo del nopal de manera formal (Pimienta, 1990). Es muy probable que en los muestrarios llevados a Europa por Cristóbal Colón se incluyeran nopales y otras cactáceas como muestra de la exótica flora del nuevo mundo. Cuando Hernán Cortes llegó al valle de México en 1519, no pudo menos que asombrarse ante los *nopalli* (termino *náhuatl* que significa nopal) (Sáenz, 2006).

Sin duda los nopales influyeron en el asentamiento de las tribus errantes que concurrían en la época de fructificación a las zonas habitadas por estas plantas y acababan por fijar ahí su residencia. Los nopales están ligados en forma particular con México y Mesoamérica, su centro de origen genético; por ejemplo, en el escudo de México figura un águila posada sobre un nopal, un símbolo que ha llegado hasta nuestros días del jeroglífico de la gran Tenochtitlan y significa *sitio del nopal que crece sobre una piedra*. La evidencia del conocimiento y uso del nopal por los primeros pobladores mexicanos se encuentra en las excavaciones de Tamaulipas, Tehuacán y Puebla donde se encontraron fosilizadas semillas y cáscaras de tuna, así como fibras de pencas de nopal de una antigüedad de 7000 años. Aun en la actualidad el nopal esconde numerosos atractivos, valiosos compuestos y un valor excepcional para la protección y desarrollo de las zonas áridas y semiáridas de nuestro país y que están ligadas con la marginalidad y la pobreza de sus habitantes. Es por ello que su utilización es una importante alternativa para dichas áreas y sus habitantes, así como para toda la humanidad (Sáenz, 2006).

## 1.2 Justificación

El nopal es en la actualidad una fuente importante de fibras compuestas principalmente por celulosa, 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 de bovinos los cuales no han sido explotados ya que por su naturaleza reúnen las características para cumplir esta función, además presentan facilidad de aislamiento y reproducción así como costos económicos de producción. Por tal motivo 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 elaboración de alimentos calóricos, salsas para ensaladas, postres, helados, entre otros.

## 1.3 Hipótesis

Es posible la degradación enzimática del nopal mediante la cepa VML-2 aislada de 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.

## 1.5 Objetivos específicos

1. Caracterizar bromatológicamente dos variedades de nopal.
2. Realizar una fermentación para la producción del extracto enzimático empleando la cepa VML-2.
3. Realizar cinéticas enzimáticas para la hidrólisis del nopal empleando el extracto enzimático producido.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades del nopal

El nopal es, entre las cactáceas, la especie de mayor importancia agronómica, debido a que sus propiedades le permiten su inclusión en dietas alimenticias, siendo útil no solamente en la alimentación humana, sino que además representa una fuente de forraje en la alimentación animal.

“El nopal” es el nombre común que reciben las cactáceas del género *Opuntia*, este género y su familia son originarias de América; se piensa que su origen se podría localizar en México, puesto que en este país existe el mayor número de géneros e individuos (Granados, 1991).

Nopal es un término mexicano derivado del Náhuatl "*nopalli*" con el que se designa a varias especies del género *Opuntia* (Anaya y Bautista, 2008).

Los brotes tiernos del nopal no son hojas verdaderas sino más bien tallos aplanados con alta actividad metabólica y rápido crecimiento. Al cosecharlos se vuelven productos altamente perecederos y presentan un periodo acelerado de merma de calidad que culmina con la muerte de estos (Sánchez, 2006).

Se estima que en México existen alrededor de 3'000,000 hectáreas de nopaleras silvestres con suficiente densidad como para ser aprovechadas económicamente, localizadas principalmente en los estados de Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Sonora. Los productores utilizan las nopaleras silvestres para recolectar forraje, tuna y nopalito (Flores *et al.*, 1995).

### 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).

La taxonomía del nopal es sumamente compleja debido a múltiples razones, entre otras porque sus fenotipos presentan gran variabilidad según las condiciones ambientales, se encuentran frecuentemente casos de poliploide, se reproducen en forma sexual o asexual y existen numerosos híbridos inter específicos (Sáenz, 2006).

### 2.1.2 Clasificación taxonómica

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

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal.

<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>Cactaceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Opuntiae</i>
<b>Genero</b>	<i>Opuntia</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Opuntia (antes Platyopuntia)</i>
<b>Especie</b>	<i>Spp</i>

Fuente: Bravo, (1978).

### 2.1.3 Contenido nutricional

El contenido nutricional de nopal puede variar incluso en una misma región, el cuadro 2 muestra al contenido nutricional de algunas variedades más comunes en la región de Saltillo, Coahuila.

Cuadro 2. 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

#### 2.1.4 Características generales de la planta

El nopal es una planta arbustiva, rastrera o erecta que pueden alcanzar 3,5 a 5 m de altura, el sistema radical es muy extenso, densamente ramificado, rico en raíces finas absorbentes y superficiales en zonas áridas de lluvias escasas, la longitud de las raíces está en relación con las condiciones hídricas y con el manejo cultural, especialmente el riego y la fertilización (Sáenz, 2006).

Los tallos suculentos y articulados o cladodios, comúnmente llamados pencas presentan forma de raqueta ovoide o alongada alcanzando hasta 60-70 cm de longitud, dependiendo del agua y de los nutrientes disponibles. Cuando miden 10-12 cm son tiernos y se pueden consumir como verdura. El aumento del área del cladodio dura alrededor de 90 días. Sobre ambas caras del cladodio se presentan las yemas, llamadas areolas, que tienen la capacidad de desarrollar nuevos cladodios, flores y raíces aéreas según las condiciones ambientales (Sáenz, 2006).

Las areolas (yemas) presentan en su cavidad espinas, que generalmente son de dos tipos: algunas pequeñas, agrupadas en gran número (gloquidios) y las grandes que son, según algunos botánicos, hojas modificadas. Cuando el hombre entra en contacto con la planta las espinas se pueden desprender y penetrar en la piel, constituyendo un serio inconveniente tanto para la cosecha de los frutos como para el procesamiento y consumo de los mismos (Sáenz, 2006).

Los tallos se lignifican con el tiempo y pueden llegar a transformarse en verdaderos tallos leñosos, agrietados, de color ocre blancuzco a grisáceo. Las flores son hermafroditas y solitarias, se desarrollan normalmente en el borde superior de las pencas (Sáenz, 2006). Las plantas de nopal presentan características carnosas, engrosadas y espinosas (Basurto *et al.*, 2006).



### 2.1.5 Cultivo del nopal

La distribución de las especies más importantes es, *Opuntia streptacantha*, la cual forma nopaleras silvestres en San Luis Potosí, principalmente en los municipios de Moctezuma, Santa María del Río, San Martín, Villa de Arriaga. En Zacatecas, en Noria de Ángeles, Ojo caliente, Trancoso y Guadalupe (Corrales y Flores, 2003).

Se estima que en México existen alrededor de 3'000,000 hectáreas de nopaleras silvestres con suficiente densidad como para ser aprovechadas económicamente, localizadas principalmente en los estados de Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Sonora (Corrales y Flores, 2003).

En México, las nopaleras cultivadas ocupan poco más de 210 mil hectáreas., de las cuales 150,000 hectáreas se destinan al forraje, 50,000 hectáreas para tuna; 10,000 hectáreas para producir nopalitos y aproximadamente 100 hectáreas para producir grana cochinilla (Corrales y Flores, 2003).

### 2.1.6 Métodos de propagación y reproducción de nopal

El nopal puede ser propagado sexual o asexualmente. Con la propagación sexual (a partir de semillas) las plantas tardan más tiempo en iniciar la productividad y resultan heterogéneas en diversas características morfológicas y fenológicas debido a que se generan mediante polinización cruzada.

Por otro lado la propagación asexual (vegetativa), puede realizarse a partir de pencas completas o fragmentos (Flores y Gallegos, 1993).

### 2.1.7 Principales especies

Algunas especies utilizadas para producción de fruta como *Opuntia ficus-indica*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* y *O. streptacantha* (Sáenz, 2006).

Otras especies son más aptas para la producción de nopalitos, como *O. robusta* y, *O. streptacanta* además de *O. ficus indica*, algunas otras se utilizan para producir forraje, entre ellas, *O. robusta* y *O. leucotricha*, además de *O. ficus indica* y otras para producción de cochinilla (Sáenz, 2006).

### 2.1.8 Distribución del nopal

En México se pueden distinguir cuatro grandes zonas nopaleras, considerando su abundancia, sus características fisiológicas y las condiciones climáticas y edáficas donde crecen (López y Elizondo 1988 citado por Gopar 2001).

- a. Zona Centro-Sur, comprende los Estados de México, Puebla, Querétaro y Oaxaca; se encuentran nopaleras de porte alto, productoras de verdura, fruta y forraje, la mayoría son especies cultivadas en pequeñas huertas. Se explota *Opuntia ficus indica*, *O. megacantha*, *O. amyclaea* y *O. tomentosa*.
- b. Zona del Altiplano, ocupa en mayor extensión los estados de Zacatecas y San Luis Potosí y en menor proporción Aguascalientes, Durango, Guanajuato y Jalisco. Abundan *O. streptacantha* (nopal cardón), *O. leucotricha* (nopal duraznillo); en menor cantidad se le asocian *O. robusta* (nopal tapón) y otras *Opuntias* de tipo rastro.
- c. Zona Norte (Desierto Chihuahuense), es la región más extensa; comprende parte de los Estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas y Coahuila; área donde el nopal crece en forma natural y su porte es arbustivo; se encuentran nopales de uso forrajero como *O. cantabrigiensis* (nopal cuijo) y *O. pheacantha* (nopal rastro).
- d. Zona de la Planicie Costera del Golfo, es la parte noreste de México, abarca la zona noreste de Coahuila, el área norte de Nuevo León y Tamaulipas. Las plantas de nopal son de tipo

arbustivo como la *O. lindheimeri* y sus variedades, existen otras de importancia forrajera.

Por su parte Marroquín (*et al.*, 1964), distinguen tres zonas nopaleras en las regiones centro y norte de la República Mexicana que son:

- a. Zona nopalera Potosina-Zacatecana. Además de San Luis Potosí y Zacatecas incluye partes de Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Jalisco y Durango. Las temperaturas oscilan entre 12 y 20 °C, el suelo formado por rocas en el que predominan matorrales en los que se puede encontrar *Opuntia streptacantha*, *Opuntia leucotricha*, *Opuntia robusta*, *Opuntia imbricata*.
- b. Zona nopalera del noroeste de México. Comprende el norte de Tamaulipas y oriente de Nuevo León. Es una zona de colinas y llanuras de poca elevación donde abunda el mezquite, con temperaturas medias de 11 y 30 °C en meses calurosos. Las especies que se pueden encontrar son *Opuntia lindheimeri* y *Opuntia engelmannii*.
- c. Zona nopalera difusa. Esta zona incluye sólo las partes calizas de San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León, Coahuila y partes áridas de Durango y Chihuahua. Es una zona de planicies y sierras calizas con matorrales desérticos, en estas zonas se pueden encontrar *Opuntia cantabrigiensis*, *Opuntia rastreara*, *Opuntia microdasys* y *Opuntia macocentra*.

## 2.1.9 Condiciones agroecológicas para el cultivo del nopal

### 2.1.9.1 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).

### 2.1.9.2 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).

### 2.1.9.3 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).

### 2.1.9.4 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).

#### 2.1.9.5 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° 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).

#### 2.1.9.6 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. También es necesario aclarar, que los excesos de humedad pueden provocar una mayor incidencia de enfermedades y daños por insectos (Sáenz, 2006).

### 2.1.10 Importancia en la industria alimentaria

Los cladodios, por su parte tienen interés desde el punto de vista industrial ya que cuando los brotes son tiernos (10-15 cm) se usan para consumo como verdura, y cuando están parcialmente maduros (cladodios de 2-3 años), para la producción de harinas y otros productos (Nerd 1999, citado por Jiménez, 2004).

La harina de nopal se obtiene por deshidratación y molienda de los cladodios, los que pueden ser de distintas edades; esto influirá en sus características. Esta harina tiene aplicación reciente en la industria panificadora en la preparación de galletas, pastas, cremas y postres o bien en la de fibras dietéticas (Medina *et al.*, 2006).

En la industria panificadora resulta importante, en virtud de que el consumo de fibras de tipo soluble, representa una mejoría significativa de los procesos digestivos con problemas de estreñimiento y el nopal es una fuente importante de este tipo de fibras, el cuadro 3 muestra algunas variedades más utilizadas como verdura y de esta manera como fuente de fibra (Corrales *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Variedades de *Opuntia* usadas como nopal verdura.

<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>
<b><i>Opuntia robusta</i></b>	Tapón
<b><i>Opuntia streptocantha</i></b>	Cardón
<b><i>Opuntia ficus-indica</i></b>	Pelón

Fuente: Carranza, (2001).

## 2.2 Celulosa

La celulosa es un importante constituyente de las plantas superiores y probablemente el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza. Debido a que gran parte de la vegetación que pasa a formar parte del suelo es celulósica, la descomposición de este carbohidrato tiene una importancia muy especial en el ciclo biológico del carbono, consecuentemente los microorganismos del suelo que catalizan la hidrólisis de la materia vegetal (40-60% de residuos de las plantas) influyen en el flujo de energía de este hasta la formación de CO<sub>2</sub> y su liberación a la atmósfera. Como las bacterias y hongos del suelo son los microorganismos mayormente involucrados en el ciclaje de la materia vegetal, cambios en el número de ellos pueden indicar modificaciones en el contenido de materia orgánica del suelo (Alexander, 1980).

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

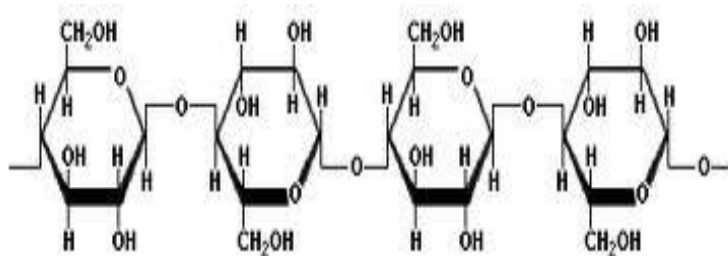


Figura 1. Estructura química de la celulosa.

Fuente: Zabala, (2005).

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 celulosa funciona en la mayoría de la materia prima vegetal como secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de componentes del sabor o de interés para la industria alimentaria. La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces  $\beta$ -1-4 glucosídicos. Pero además, la configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas mediante enlaces de hidrógeno intermolecular formado por una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (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 sinérgica 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 oligosacáridos 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 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos (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 microfibrillas, 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 Microorganismos productores de celulasas

Las enzimas celulasas producidas por una variedad de bacterias y hongos aerobios o anaerobios, mesófilos o termófilos. Sin embargo, solo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa y pueden ocupar una gran variedad de hábitats. Entre los hongos celulolíticos destacan: *Trichoderma reesei*, *Phanerochate chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrix* spp, *Altenaria* spp, *Geotrichum* spp, *Rhizoctonia* spp, *Trametes* spp, *Paecilomyces* spp, *Mucor* spp, *Cladosporium* spp, *Bulgaria* spp, *Chaetomium* spp, *Helotium* spp, *Aspergillus* spp. Las bacterias degradadores de celulosa más abundantes y conocidas son las aerobias entre las

cuales se pueden citar: *Cellulomonas* spp, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora* spp, *Cytopaga* spp, *Corynebacterium* spp, *Vibrio* spp, *Bcillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Cytophaga* spp, *Corynebacterium* spp, *Vibrio* spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Thermobifida* spp, admeas de algunos anaerobios como : *Acetiviro Cellulolyticus*, *Butivibrio* spp, *Bacteroides Cellulosolvens*, *Bacteriodes succinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium Thermocellum*, *Ruminococus albus*, *Ruminococos flavefaciens* (Gaitán y Pérez, 2005).

Entre los *Actinomycetes* destacan *Streptomyces drozdowiczii*, *Streptomyces cellulotycus*, *Thermomonospora curivata*, *Thermomonospora alba* y *Thermomobifida fusca* (Ramirez y Cocha, 2003).

El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual incluye condiciones acidas y alcalinas (cuadro 4).

Cuadro 4. Bacterias con alta actividad específica de celulasas y su pH óptimo.

<b>Microorganismo</b>	<b>Actividad específica (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>pH óptimo</b>
<b><i>Bcillus subtilis</i></b>	514	5-7
<b><i>Clostridium thermocellum</i></b>	428	7
<b><i>Streptomyces murinus</i></b>	6.7	6
<b><i>Bacilus macerans</i></b>	5030	6
<b><i>Bacillus sp</i></b>	369.6	9

Fuente: Gaitán y Pérez, (2005).

El cuadro 5 muestra la actividad específica de celulasas producida por hongos y el pH óptimo para su crecimiento.

Cuadro 5. Hongos con alta actividad específica de celulasas.

<b>Microorganismo</b>	<b>Actividad específica (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>pH óptimo</b>
<i>Sclerotium rolfsii</i>	475	3.3
<i>Aspergillus niger</i>	194	5
<i>Achalya bisexualis</i>	7840	6
<i>Orpinomyces sp</i>	3659	5.8
<i>Rhizopus chinensis</i>	4800	—
<i>Penicillium brefeldianum</i>	405	4.2

Fuente: Gaitán y Pérez, (2005).

#### 2.2.4 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).

### 2.2.5 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 celuloticos es afectada en forma diferente por la temperatura. Los mesofilos dominan en temperaturas moderadas mientras que la micro flora 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 e 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 acidas 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).

## 2.2.6 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 hidrógeno. Además dichos dominios cuentan con aminoácidos aromáticos que confieren una especificidad adicional y estabilidad al complejo enzima – sustrato (Alexander, 1980).

### 2.2.7 Productos de degradación de celulosa y su importancia en la industria

Las bacterias aerobias generalmente convierten la celulosa en dos productos principales: CO<sub>2</sub> y biomasa. La celulosa es empleada a nivel industrial en la manufactura de papel y cartón, telas, diluyentes, jabones, aromas y alimentos (Aguilar, 2001).

La celulosa se utiliza en algunos productos alimenticios calóricos, salsas para ensaladas, postres, helados. La hidratabilidad y dispersabilidad de la celulosa mejora sensiblemente por la adición de pequeñas cantidades de carboximetilcelulosa (Valdez, 2010).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental del presente trabajo fue realizado dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el laboratorio de microbiología del Departamento de Producción Animal y en el laboratorio de Nutrición Animal.

#### Etapa I. Caracterización bromatológica del nopal

##### 3.1 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 octubre de 2010.

Se evaluaron nutricionalmente dos especies de nopal (*Opuntia ficus indica*), las cuales fueron recolectadas, la primera (*Opuntia lindheimeri*) en el ejido San Rafael, Galeana, NL, ubicado en el km 157, carretera 57 tramo Matehuala-Saltillo y la segunda (*Opuntia robusta*) de la comunidad Los Escobedos, Apaseo el Grande, Guanajuato.

##### 3.1.1 Determinación de materia seca total

Se realizó una prueba para conocer la cantidad de materia seca total o sólidos, se obtiene mediante la evaporación total de la humedad a una temperatura por encima de los 100 °C. En la fabricación de alimentos se pueden utilizar procedimientos rápidos para determinar humedad usando lámparas desecadoras que trabajan a temperaturas altas. Para realizar la determinación de materia seca total se seleccionó un crisol de porcelana de la estufa, utilizando unas pinzas con la finalidad de que se encuentre a peso constante, después se enfrió en un desecador para enfriarlo por un tiempo de 15 a 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo se pesó en una balanza analítica, por separado se pesaron 2 gramos de muestra seca sobre un papel limpio y tarando el peso del papel, después se colocó la muestra pesada en el crisol y se metió en la estufa durante 24 horas, transcurrido el tiempo se

sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar por 15 a 20 minutos en un desecador, por último se pesó y se registró el peso.

### 3.1.2 Determinación de ceniza

La determinación de cantidad de ceniza se realizó por el procedimiento o método seco, para esto se realizaron los siguientes pasos: después de haber determinado la cantidad de materia seca total y haberse pesado, se pre incineró en parrillas hasta dejar de sacar humos, después se pasó a la mufla por un periodo de 2 a 3 horas a una temperatura de 600 °C, transcurrido el tiempo se sacó la muestra de la mufla y se dejó enfriar en un desecador por 15 minutos, por último se pesó.

### 3.1.3 Determinación de grasa total

Se realizó una prueba para determinación de grasa total por medio del método de Soxleth. Para ello se pesaron 5 gramos de muestra sobre un papel filtro previamente tarado, después se depositó en un cartucho poroso de celulosa y se cubrió con algodón, una vez realizado el paso anterior se coloca el cartucho en el sifón, después se sacó un matraz redondo fondo plano, boca esmerilada de la estufa con la finalidad de que se encuentre a peso constante y se dejó enfriar por 15 minutos y se pesó en una balanza, después en el matraz se agregó hexano hasta la mitad y se acoplo al refrigerante del dispositivo de Soxleth, se dejó extraer por un periodo de 10 horas contando a partir de que comience a hervir, al finalizar la extracción se evaporó el solvente en un rotavapor, después el matraz bola fondo plano se colocó en la estufa a 100 °C por alrededor de 12 horas, finalmente se sacó el matraz, se enfrió en un desecador por 15 minutos y se pesó.

### 3.1.4 Determinación de fibra cruda

Se determinó la cantidad de fibra después de haber desengrasado la muestra por medio de los siguientes pasos: se pesaron 2 gramos de muestra desengrasada y se colocó en un vaso de Bercelius, se agregaron 100 ml de solución de ácido sulfúrico 0.225 N, después se conectó al aparato de reflujo por un



periodo de 30 minutos contados después de hervir, cuando esto sucede se bajó la temperatura para mantener la ebullición, una vez transcurrido el tiempo se sacó y filtró a través de tela de lino, se lavó la muestra con 3 porciones de 100 ml de agua caliente y se realizó la prueba de papel tornasol para verificar presencia de ácido, se pasó la fibra restante (residuos en la tela de lino) a un vaso de Berzelius con 100 ml de solución de hidróxido de sodio al 0.313 N y se conectó nuevamente al aparato de reflujo por 30 minutos, transcurrido el tiempo se sacó la muestra y se filtró en un tela de lino y se lavó con 3 porciones de agua destilada caliente para después realizar la prueba de papel tornasol para verificar la presencia de reacción alcalina, se escurrió el exceso de agua, se retiró la fibra de la tela de lino con una espátula y se depositó en un crisol de porcelana (previamente identificado y a peso constante), se colocó la muestra en la estufa de 100 a 103 °C por un tiempo de 12 horas, transcurrido el tiempo se retiró la muestra de la estufa, se enfrió y se pesó, por último la muestra se pre incineró en una parrilla y se colocó en la mufla a 600 °C por tres horas, se sacó, se enfrió y se pesó.

### 3.1.5 Determinación de proteína por método de Microkjeldhal

La determinación de proteína se realizó por medio del método de microkjeldhal, para esto se realizaron los siguientes pasos: se pesaron 0.050 gramos de muestra envuelta en papel, después de colocó en un matraz pequeño, se agregaron 2 perlas de vidrio con la finalidad de mantener constante la ebullición, se agregaron 4 ml de mezcla digestora, se conectó al aparato Kjeldhal y se dejó digerir hasta que la muestra tomo color cristalino, se enjuago con 100 ml de agua destilada el resultado de la digestión y se vació en la copa del equipo de destilación, se enjuago con un poco de agua, después se adiciono NaOH al 45 % hasta la mitad de la copa, después se recibieron 70 ml del destilado en un vaso con 5 ml de ácido bórico al 2.2 y 5 gotas de indicador mixto, por último se tituló con ácido sulfúrico al 0.1 N de color azula a rojo.

### 3.1.6 Determinación de fibra detergente neutro (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 nos son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación microbológica para su aprovechamiento este método no puede aplicarse en alimentos con alto contenido de proteína y bajo contenido de fibra. Para llevarlo a cabo se pesó 0.5 gramos de muestra dentro de una bolsa de Nylon exclusiva para filtrar y uso de esta técnica, se introdujo al equipo ANALIZADOR DE FIBRA ANKOM 200, se le agrego la solución FDN y se activó la temperatura (100 °C) y la agitación con duración de 1 hora, transcurrido el tiempo, se dreno la solución y en seguida se realizaron dos enjuagues en un periodo de tiempo de 5 minutos a 90 °C cada uno, se volvió a drenar el agua, se sacó la bolsa del equipo para ser sumergida en acetona y secada en la estufa a 110°C de 2 a 4 horas, por último se pesó en una balanza analítica

### 3.1.7 Determinación de fibra detergente acido (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 digestible en alimentos, la FDA es el indicador de la digestibilidad de los vegetales por su alta concentración de lignina que es la parte digerible de la fibra, mientras más bajo sea el valor de la FDA, mas alimento se puede digerir. Para llevarlo a cabo se pesó 0.5 gramos de muestra

dentro de una bolsa de Nylon exclusiva para filtrar y uso de esta técnica, se introdujo al equipo ANALIZADOR DE FIBRA ANKOM 200, se le agrego la solución FDA y se activó la temperatura (100 °C) y la agitación con duración de 1 hora, transcurrido el tiempo, se dreno la solución y en seguida se realizaron dos enjuagues en un periodo de tiempo de 5 minutos a 90 °C cada uno, se volvió a drenar el agua, se sacó la bolsa del equipo para ser sumergida en acetona y secada en la estufa a 110°C de 2 a 4 horas, por último se pesó en una balanza analítica.

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

### 3.2 Material biológico

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

#### 3.2.1 Preparación de medio sólido

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

### 3.2.2 Siembras en medio sólido

Se realizaron siembras en cajas Petri estériles, por el método de estría abierta cruzada sobre el agar Schaedler (figura 2), después se incubo 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.

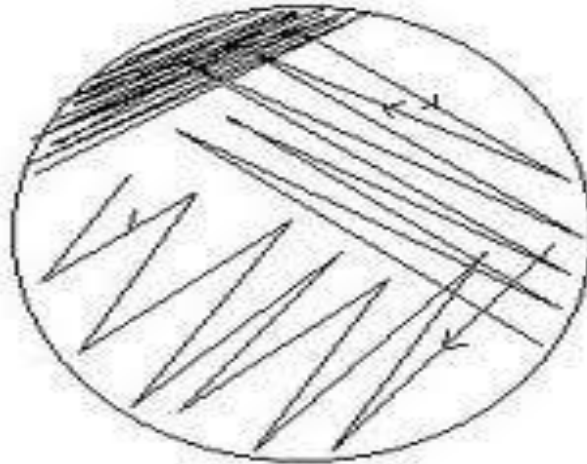


Figura 2. Método de siembra por estría abierta cruzada en medio sólido.

### 3.2.3 Tinción de Gram

Se realizó la técnica de tinción de Gram para observar las características morfológicas de los microorganismos empleados. Para ello se tomó con el asa una muestra del cultivo puro y se disolvió en un portaobjetos con una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias, posteriormente se fijó la muestra con calor en el mechero. Una vez fijada la muestra se cubrió con cristal violeta dejándolo reaccionar por 60 segundos y se enjuagó suavemente al chorro del agua; se cubrió de nuevo la superficie con una solución de yodo (lugol) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con una solución de alcohol-acetona por unos segundos y después enjuagarse. Finalmente se cubrió la superficie con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para después enjuagarse con agua destilada. Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos empleando un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión.

## 3.3 Fermentación para la producción del extracto enzimático

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

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

Cuadro 6. Composición del medio líquido específico para producción de celulasas.

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

### 3.3.2 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. El extracto enzimático se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml para determinar proteína extracelular, y proteína celular en biomasa.

### 3.3.3 Determinación de proteína extracelular y celular

- Se determinó proteína extracelular colocando en un tubo de ensaye 10µl de extracto enzimático, se agregó 500 µl de reactivo de Biuret, las pruebas se realizaron por duplicado.
- Se determinó proteína celular colocando en un tubo de ensaye 10µl de biomasa, se agregó 500 µl de reactivo de Biuret, las pruebas se realizaron por duplicado.
- Se preparó un blanco en un tubo de ensaye con 10 µl de agua destilada, se agregó 500 µl de reactivo de Biuret.

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

### 3.3.4 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 5 g muestra de nopal utilizando dos variedades (Figura 3).



Figura 3. Solución madre (sustrato) al 5%.

### 3.3.5 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, 1440(24horas), 2880(48horas), 4320(72horas), 5760(96horas).

### 3.3.6 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: 25 g de carbonato de sodio anhidrido ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ( $\text{KNa}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 20 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y 200 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) se disolvieron en agua destilada y se aforó a 1 litro. Solución B: en 200 ml de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). El reactivo 1 se preparó mezclando 1 mL de solución en 25 mL de solución A.

Preparación del reactivo 2 (Nelson):

Para la preparación del reactivo de Nelson se prepararon las siguientes soluciones. Solución A: en 450 ml de agua destilada se disolvió 21 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y 25 g de molibdato de amonio ( $(\text{CNH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Solución B: 3 g de arsenito de sodio heptahidratado ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) se disolvieron en 25 mL de agua destilada. El reactivo 2 se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforaron a 500 mL. Posteriormente se calentó a  $55^\circ\text{C}$  durante 30 min.

Se preparó un blanco para ajustar a cero el espectrofotómetro colocando 250  $\mu$  de agua destilada en un tubo de ensaye y 250  $\mu$  de reactivo de Somogy, e incubando a baño de agua hirviendo por 10 minutos para después agregar 250  $\mu$  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 incubo en baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 250 µl de reactivo de Nelson y se agito vigorosamente, después se agregaron 4 ml de agua destilada y de nuevo se agito, por último se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a un longitud de onda de 620 nm después de haber ajustado el espectrofotómetro con el blanco.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etapa I. Caracterización bromatológica del nopal

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

El cuadro 7 muestra los resultados obtenidos del contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* utilizadas. Realizando una comparación con el estudio de (Fuentes *et al.*, 2004), quienes evaluaron nutricional de cuatro variedades de nopal (*Opuntia spp*) forrajero, reportaron los siguientes resultados: proteína entre 5-12%, extracto etéreo entre 0.45-1.89%, fibra cruda entre 10.7-11.4%, ceniza entre 18-35%, MST entre un rango de 88-96%. 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 (Guzmán y Chávez, 2007), quienes en su estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus indica*) para el consumo humano, 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 7. Contenido nutricional de las dos variedades de *Opuntia* utilizadas.

<b>Componente (%)</b>	<i>Opuntia lindheimeri</i>	<i>Opuntia robusta</i>
<b>Materia seca total</b>	90.14	92.51
<b>Proteína</b>	2.65	1.2
<b>E. etéreo</b>	1.42	1.85
<b>Ceniza</b>	16.23	12.05
<b>Fibra cruda</b>	10.54	9.23
<b>Fibra acido detergente</b>	14.43	16.7
<b>Fibra neutro detergente</b>	32.28	36.41

La figura 4 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 proteína, grasa y FAD, mientras que en el contenido de ceniza, fibra, FND y materia seca total se puede observar diferencias mayores (ver anexo estadístico).

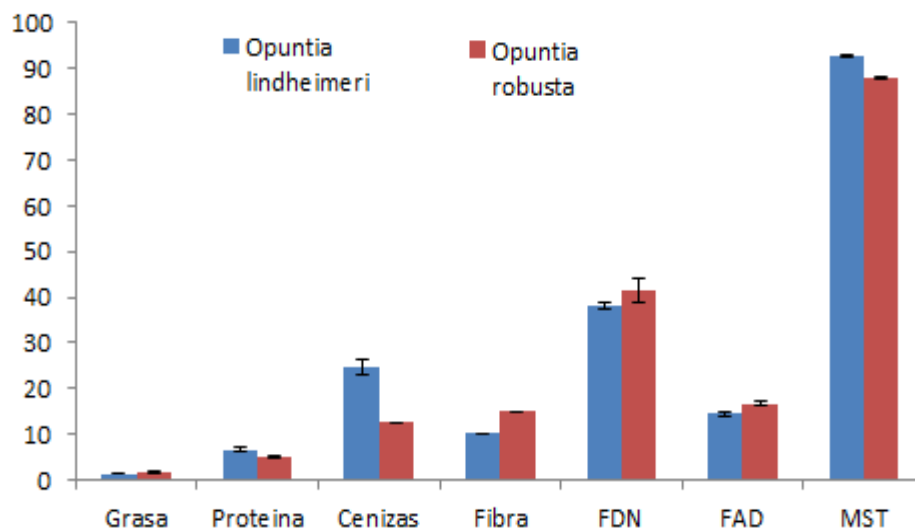


Figura 4. Comparación gráfica del contenido nutricional entre las dos variedades de *Opuntia* utilizadas.

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 5). 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.

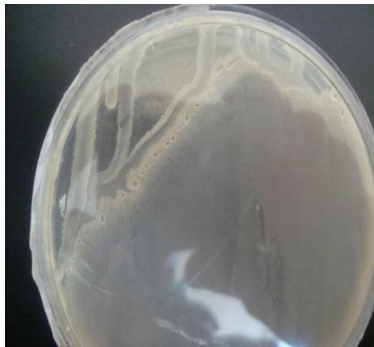


Figura 5. Características macroscópicas de la cepa VML-2 en medio solido.

#### 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 6). Dicha descripción concuerda con la mencionada por Valdez-Sepúlveda (2010).



Figura 6. Observación microscópica (100X) de microorganismos producidos por la cepa VML-2.

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

#### 4.4 Determinación y cuantificación de proteína celular y extracelular por el método de Biuret (cuadro 8).

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

<b>Muestra</b>	<b>Proteína celular</b>	<b>Proteína extracelular</b>
<b>Biomasa</b>	0.00095 mg	_____
<b>Extracto enzimático</b>	_____	0.00095 mg

En el cuadro 7 representa la cantidad de proteína celular y extracelular a las 96 horas de fermentación, obteniendo valores de 0.95 mg/ml para proteína celular y extracelular, estos valores son muy elevados ya que Valdez-Sepúlveda (2010) utilizando enzimas degradadoras de celulosa producidas por la cepa VML-2, menciona que a un tiempo de fermentación de de 24 horas se obtiene la mayor cantidad de proteína extracelular dando como resultado 0.65 mg/ml, afirmando que la cantidad de proteína extracelular disminuye conforme aumenta el tiempo de fermentación, también menciona que a un tiempo de 96 horas de fermentación aumenta la concentración de proteína, la cual puede ser debido a que los microorganismos en condiciones de estrés (medio de cultivo) producen proteasas que son liberadas al medio de cultivo provocando diferentes grados de proteólisis.

## 4.5 Cinética enzimática (Somogy-Nelson)

### 4.5.1 Cinética enzimática en nopal *Opuntia lindheimeri*

En la figura numero 7 podemos observar que las enzimas celulasas 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 5760 minutos (96horas), donde en el eje de las x se determinaron los siguientes valores equivalentes 0=0 minutos, 1= 5 minutos, 2 = 15 minutos, 3= 60 minutos, 4= 90 minutos, 5= 120 minutos, 6 = 1440 minutos (24h), 7= 2880 minutos(48 horas), 8= 4320 minutos (72 horas), 9= 5760 minutos (96 horas).

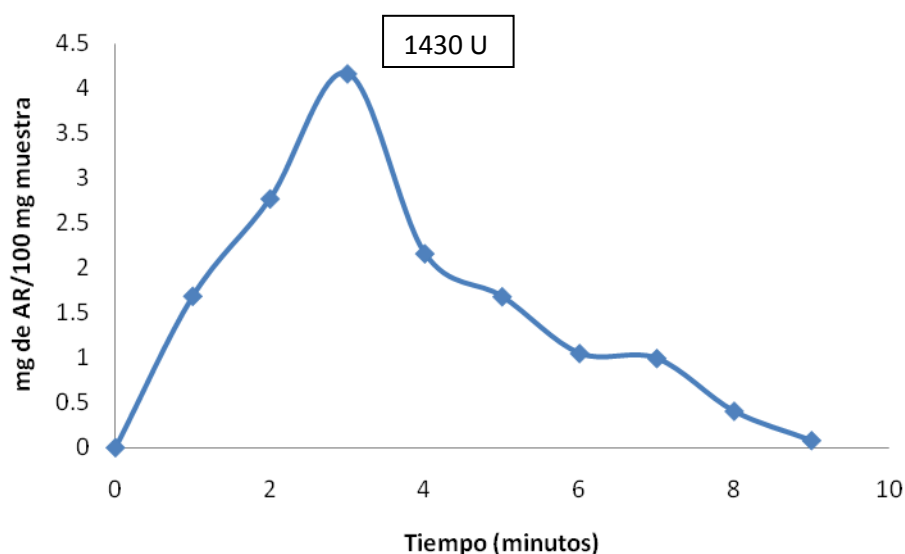


Figura 7. Degradación enzimática de celulosa en nopal *Opuntia lindheimeri* utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

#### 4.5.2 Cinética enzimática en nopal *Opuntia robusta*

La figura 8 representa la tasa de degradación de celulosa en nopal *Opuntia robusta*, en la que podemos observar que durante los primeros 5 minutos la enzima presenta actividad adaptativa y poca actividad celulasa, después de los 5 minutos y hasta los 120, presentando una actividad enzimática de 1557 U, lo que se contrapone con lo mencionado por Valdez-Sepúlveda (2010) quien menciona que la micro flora ruminal no se adapta rápidamente a la utilización de celulosa, por lo que la producción de celulasa se ve limitada. Después de este tiempo la enzima disminuye la actividad celulasa debida a la competencia por nutrientes y acumulación de desechos tóxicos que ocasionan la disminución de la población microbiana y muerte de estas, donde en el eje de las x se determinaron los siguientes valores equivalentes 0=0 minutos, 1= 5 minutos, 2 = 10 minutos, 3= 120 minutos, 4= 1440(24horas), 5= 2880 minutos (48horas), 6= 5760 minutos (92horas).

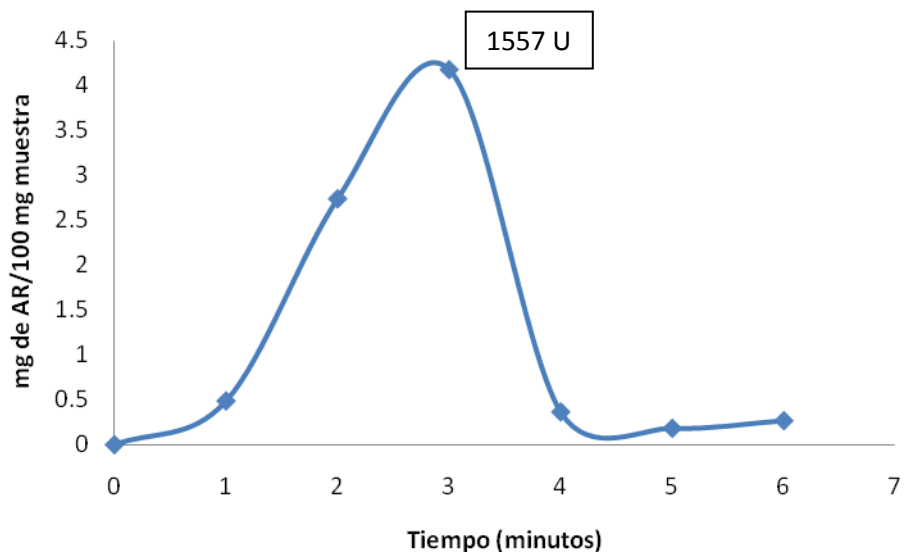


Figura 8. Degradación enzimática de celulosa en nopal *Opuntia robusta* utilizando celulasas producidas por la cepa VML-2.

En la degradación de las dos variedades de nopal utilizadas se obtienen valores de actividad para *Opuntia robusta* de 1557 U y para *Opuntia lindheimeri* 1430 U, mientras que Valdez-Sepulveda (2010) utilizando carboximetilcelulosa como fuente de carbono y energía obtiene la máxima actividad enzimática a las 24 horas de fermentación con un valor de 858 U, estas diferencias pueden ser debidas a que la celulosa amorfa presente en nopal es más difícil de degradar, haciendo que esta condición favorezca el crecimiento de las enzimas y por consecuencia su actividad. Comparando las dos variedades de nopal se obtiene mayor actividad enzimática en la variedad *Opuntia robusta* con un valor de 1557 U, esto se debe a que esta variedad presenta mayor cantidad de fibra y esto favorece las condiciones para que la enzima se desarrolle y actúe.



## 5. CONCLUSIONES

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

La cepa VML-2 aislada del rumen bovino es capaz de producir enzimas celulasas capaces de hidrolizar la celulosa.

La variedad *Opuntia robusta* por su alto contenido de fibra presenta mayor actividad enzimática que en la variedad *Opuntia lindheimeri*.

La utilización de enzimas celulasas producidas por cepas aisladas del rumen bovino representan una alternativa económica y de fácil acceso para procesos de síntesis de compuestos ricos en celulosas.

## 6. LITERATURA CITADA

- Aguilar, C.L. 2001. Biodegradation of the cellulose from sugarcane bagasse by fungal cellulase. *Ciencia y tecnología alimentaria*. Vol. 3. No.2. Pp. 117-121.
- Alexander.1980. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editor, S.A. México. Pp. 162-167.
- Anaya, P.M., Bautista, Z. R. 2008. Fodder nopal in México: from the 16th to the 20th century. Programa Universitario de Ciencias Sociales y Humanidades. Universidad Autónoma Chapingo. Pp. 1.
- Basurto, S.D., Lorenzana, J.M., Magos, G.G.A. 2006. Utilidad del nopal para el control de diabetes mellitus tipo 2. Monografía. Escuela de Medicina Tominaga Nakamoto.
- Bravo, H.H.1978. *Las cactáceas de México*. Instituto de biología de la UNAM. México.
- Carranza, S.J.A. 2001. Caracterización morfológica de cladodios de *Opuntia* spp. del campo experimental de la unidad regional universitaria de zonas áridas, Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- 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.

- Corrales, J y Flores. C.A. 2003. Tendencias actuales y futuras en el procesamiento del nopal y tuna. Pp. 167-215. In: Flores V.C.A., ed. Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. 1 edición. Universidad Autónoma Chapingo.
- Flores, V.C.A., De Luna, E.J.M., Ramírez, M.P.P. 1995. Mercado Mundial del Nopalito. Universidad Autónoma Chapingo, México. Pp. 2-3.
- Flores, V.C.A., y C. Gallegos.1993. Situación y perspectivas de producción de tunas en la región centro-norte de México. CIESTAAM. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, 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.
- Fuentes, R.M., Jiménez, C.L., Suarez, G.L., Torres, H.M., Murillo, S.M.E., López, G.J.J., Ortiz, R.B. 2004. Evaluación nutricional de cuatro especies de nopal (*Opuntia spp*) forrajero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- 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.
- Gopar, E.E.A. 2001. Tasa e degradación *in vitro* de algunas especies de *opuntia* cosechadas en primavera. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Granados, S.D., y P.A.D. Castañeda. 1991. Historia, Fisiología, Genética e Importancia Frutícola. Pp. 11-15.

- Guzmán, G.L., y Chávez, J. 1007. Estudio bromatológico del cladodio del nopal(*Opuntia ficus indica*) para el consumo humano. Rev. Química de Perú. 2007, 73, N° 1. Pp.41-45.
- Jiménez, C.L. 2004. Digestibilidad *in situ* de 4 especies de nopal del género *Opuntia* ssp. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Marroquín, J.S. 1964. Estudio Ecológico y Dasonómico de las Zonas Áridas del Norte de México. INIF. Publicación especial. México. Pp. 166.
- Medina, R. M., Tirado, E.G., Mejía, H.I., Camarillo, S.I., Cruz, V.C. 2006. In situ digestibility in dehydrated ground prickly pear diets containing a fibrolitic enzymes product.No.7. V.41.Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, México.
- Pérez, D. Á. L. A. 2009. Estudio del efecto bactericida y/o bacteriostático de oligosacáridos de quitosán sobre *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Pimienta, E. 1990. El nopal tunero. Universidad de Guadalajara, México.
- Ramírez, P., y Choa, J. 2003. Degradación Enzimática de Celulosa por Actinomicetos Termófilos: Aislamiento, Caracterización y determinación de la actividad celulítica. Rev. Perú. Biol. Pp. 67-77.
- Sáenz, C. 2006. Utilización Agroindustrial del nopal, Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO No. 162. Pp. 1-35.
- Sánchez, C., y García, M. 2006. Utilización de tuna (*Opuntia* sp.) enriquecida con urea, bajo explotaciones tradicionales de zonas semiáridas del estado Lara, Venezuela. Pp. 457-466.

- 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.
- Zabala, C.J. 2005. Material de Estudio para la Asignatura Química II. Biblioteca Virtual. Colegio de Bachilleres del estado de Michoacán. Pp. 7.

## 7. ANEXOS

08/02 12:58:40

Bienvenido a Minitab, presione F1 para obtener ayuda.

**IC y Prueba T pareada:** Opuntia lindheimeri, Opuntia robusta

T pareada para Opuntia lindheimeri, Opuntia robusta

	N	Media	Desv.Est.	media
Opuntia lindheimeri	7	26.9	31.6	11.9
Opuntia robusta	7	25.8	30.3	11.4
Diferencia	7	1.11	5.76	2.18

IC de 95% para la diferencia media:: (-4.22, 6.43)

Prueba t de diferencia media = 0 (vs. no = 0): Valor T = 0.51 Valor P = 0.629