

## Fermentación *in vitro* de nopal forrajero con un inóculo de levadura *Kluyveromyces lactis* obtenida a partir de manzana de desecho - *In vitro* fermentation of forage prickly pear cactus with yeast inoculum of *Kluyveromyces lactis* from apple waste

D. Díaz-Plascencia\*<sup>1</sup>, C. Rodríguez-Muela<sup>1</sup>, P. Mancillas-Flores<sup>1</sup>, N. Ruíz-Holguín<sup>1</sup>, S. Mena-Mungía<sup>2</sup>, F. Salvador-Torres<sup>1</sup> y L. Duran-Melendez<sup>1</sup>.

Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México. Periférico Francisco R. Almada km 1. Chihuahua, México. Fax (614) 434-0303.

1. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, México. [danyboy2878@hotmail.com](mailto:danyboy2878@hotmail.com)

2. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de levadura *Kluyveromyces lactis*, obtenida a partir de manzana de desecho de la variedad *Golden Delicious* en la fermentación en estado sólido (FES) de nopal forrajero *Opuntia spp.* Durante el periodo de fermentación fueron tomadas 3 muestras por tratamiento en diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 h), a las cuales se determinó la temperatura, pH, nitrógeno amoniacal, ácido láctico, conteo de levaduras, azúcares solubles y proteína cruda. Los datos se evaluaron con el PROC MIXED del programa SAS, para un diseño al azar de 4 tratamientos con arreglo factorial 2x2. La temperatura se incrementó ( $P < 0.01$ ) de la h0 a la h12 en todos los tratamientos. El nitrógeno amoniacal incrementó ( $P < 0.01$ ) observándose diferencia entre la interacción inóculo por tiempo. El ácido láctico mostró diferencias ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos con la interacción calcio por inóculo y entre inóculo por tiempo. En el conteo de levaduras se observó un efecto de tratamiento ( $P < 0.01$ ) por la interacción inóculo tiempo, la concentración más alta de levaduras se observó a partir de la h0 incrementándose de  $8.3 \times 10^6 \pm 0.22$  a  $1.8 \times 10^7 \pm 0.22$  cel/mL a la h48 en el testigo, y de  $3.2 \times 10^7 \pm 0.22$  a la h0 a  $4.9 \times 10^7 \pm 0.22$  cel/mL a la h48 en el tratamiento con inóculo. En los azúcares solubles se observó efecto ( $P < 0.01$ ) por tiempo. En la proteína cruda (PC) se encontró efecto de tratamiento ( $P < 0.01$ ) en el uso del inóculo y por la interacción inóculo tiempo. Se concluye que el uso del inóculo de levaduras en el nopal forrajero incremento

significativamente su valor de proteína cruda de un 9.35 a 19.36 %PC en 12 horas de fermentación, siendo una excelente alternativa para ser usado en la alimentación animal.

**Palabras Clave:** Levaduras, Fermentación, Nopal.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of an inoculum of yeast *Kluyveromyces lactis*, from apple waste on the variety Golden Delicious in solid state fermentation (SSF) of forage prickly pear cactus *Opuntia spp.* During the fermentation period, 3 samples were taken per treatment at different times (0, 6, 12, 24 and 48 h), which was determined by temperature, pH, ammonia nitrogen, lactic acid, yeast count, soluble sugars and crude protein. The data were evaluated with the procedure Proc Mixed for a random design of 4 treatments with 2x2 factorial arrangements. The temperature was increased ( $P < 0.01$ ) of the h0 to h12 in all treatments. The ammonia nitrogen increased ( $P < 0.01$ ) differences between inoculums by time interaction. The lactic acid showed difference ( $P < 0.01$ ) between treatments with calcium interaction between inoculum inoculum by time. Yeast counts showed a treatment effect ( $P < 0.01$ ) by inoculum interaction time, the highest concentration of yeasts was observed from the increase of h0  $8.3 \times 10^6 \pm 0.22$  to  $1.8 \times 10^7 \pm 0.22$  cel/mL h48 t1 to the witness, and  $3.2 \times 10^7 \pm 0.22$  to  $4.9 \times 10^7 \pm 0.22$  h0 to h48 cel/mL treatment with inoculum. Soluble sugars in effect was observed ( $P < 0.01$ ) by time. Crude protein (CP) treatment effect was found ( $P < 0.01$ ) in the use of inoculum and inoculum interaction time. It can be conclude, that the use of yeast inoculum in the prickly pear cactus SSF subject to significantly increase crude protein value of 9.35 to 19.36% PC in 12 hours of fermentation, being an excellent alternative for use in animal feeding.

**Key words:** Yeast, Fermentation, Prickly pear.

## INTRODUCCIÓN

El nopal es una planta propia del paisaje mexicano y uno de los símbolos más importantes de la nacionalidad Mexicana. La importancia del nopal como forraje en el siglo XIX fue reflejo de la necesidad de alimentación del ganado en zonas áridas del país y en aquellas donde los periodos de sequía son muy prolongados, constituyendo un excelente alimento para el ganado (Flores y Aguirre, 1979; Vázquez y Gallegos, 1997; Aranda, 2006).

El nopal forrajero es útil no sólo porque sobrevive a las sequías, sino también porque es más eficiente que muchas gramíneas o pastos

forrajeros de hoja ancha. La importancia forrajera del nopal *Opuntia spp* aplica para el ganado, pero también ha sido usado como forraje para cerdos. Aún durante los períodos de sequía en el verano o el invierno, el nopal permanece verde, con buen nivel de vitamina A. Sin embargo, debe ser combinado con otros alimentos para complementar la dieta diaria, debido a que tiene bajo contenido de proteína, a pesar de ser rico en carbohidratos y calcio (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Diversos estudios se han enfocado a evaluar el proceso de fermentación en la búsqueda de su optimización (Becerra *et al.*, 2008; Díaz-Plascencia *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010), estos autores describieron la existencia de una variabilidad en la concentración y calidad nutritiva del producto, dependiendo en su mayor parte, por los niveles de concentración de carbohidratos estructurales del sustrato utilizado. El nopal ha surgido como una alternativa importante por su adaptabilidad, costo y características nutritivas. Sin embargo, existen pocos estudios que aporten información sistemática acerca del aprovechamiento real de los nutrientes contenidos en esta planta. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de levadura *Kluyveromyces lactis*, obtenida a partir de manzana de desecho de la variedad *Golden Delicious* en la fermentación en estado sólido de nopal forrajero *Opuntia spp*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tratamientos y diseño experimental.** El presente estudio se desarrolló en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México; la cual se localiza en el Kilómetro 1 del periférico Francisco R. Almada, a una altitud de 1595 msnm.

Se prepararon cuatro tratamientos (t) para evaluar la fermentación en estado sólido de nopal forrajero. t1) 10 kg de nopal forrajero. t2) 10 kg de nopal forrajero + 10 gr de calcio. t3) 10 kg de nopal forrajero + 100 mL de inóculo de levadura *K. lactis*. t4) 10 kg de nopal forrajero + 100 mL de inóculo de levadura *K. lactis* y 10 gr de calcio. Todos los tratamientos contaron con la adición de 20 gr de urea, 2 gr de sulfato de amonio, 5 gr de minerales traza. Sus combinaciones fueron evaluadas en un fermentador vertical, mecánico eléctrico de 15 kg cada tratamiento consto de 3 repeticiones. Durante el periodo de fermentación se puso a trabajar el fermentador por 30 minutos antes de cada muestreo, esto con la finalidad de proporcionar el oxígeno necesario en el fermentador para que se desarrollen los microorganismos aeróbicos y tener un producto más homogéneo de las muestras. Fueron tomadas 3 muestras por tratamiento en los diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 h). A lo que posteriormente se determinó: temperatura, pH, amoníaco, ácido láctico, conteo de levaduras, azúcares solubles y proteína cruda.

**Metodología del trabajo.** De la hora 0 a la 48 se tomó una muestra de cada repetición de 200 gr, en frascos de plástico y se congeló a  $-5^{\circ}\text{C}$ <sub>3</sub>

para detener el proceso de fermentación y posteriormente se descongelaron a temperatura de refrigeración 4°C.

**Temperatura (T).** Se midió directamente con la ayuda de un termómetro digital de una precisión de  $\pm 0.1$  unidades.

**pH.** Se midió directamente en los frascos de plástico, donde se recolectaron las muestras a la hora mencionada de cada muestreo, se determinó el pH midiéndolo con un potenciómetro digital de una precisión de  $\pm 0.1$  unidades.

**Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).** De las muestras líquidas obtenidas del h0 a la h48 se tomaron 30 mL de la solución, se colocaron en recipientes de plástico, se agregaron dos gotas de ácido ortofosfórico y se congelaron (-5°C) para su conservación hasta el momento de la determinación de N-NH<sub>3</sub> al momento de la determinación, las muestras se descongelaron a temperatura de refrigeración (4°C), la concentración de N-NH<sub>3</sub> de las muestras líquidas se determinó por colorimetría según el procedimiento de Broderick y Kang (1980) en un espectrofotómetro Coleman Junior® II modelo 6|20.

**Ácido Láctico (AcL).** De las muestras líquidas obtenidas de la h0 a la h48 para determinar pH, se tomaron 30 mL de la solución, se colocaron en recipientes de plástico, se agregaron tres gotas de ácido ortofosfórico y se congelaron (-5°C) para su conservación hasta el momento de la determinación de AcL. Al momento de la determinación, las muestras se descongelaron a temperatura de refrigeración, se centrifugaron a 1,500 rpm por 15 minutos y permanecieron en refrigeración (no más de 48 h) mientras se procedió con el análisis. La concentración de AcL de las muestras líquidas se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996) en un espectrofotómetro Coleman Junior® II modelo 6|20.

**Conteo de Levaduras (CL).** Para este análisis se tomó como base la metodología descrita por Díaz, (2006). El CL se realizó por microscopía; con una pipeta de volumen variable con un rango de 100 a 1000  $\mu$ L y puntas desechables, se tomó 1 mL de muestra líquida y se preparó una dilución serial utilizando agua destilada como diluyente; con una pipeta de volumen variable con un rango de 0.5 a 10  $\mu$ L y puntas desechables se tomaron 10  $\mu$ L de la dilución de cada muestra, y se colocaron en un hematocímetro (cámara de Neubauer) para el conteo.

**Azúcares Solubles (AS).** Se determino por medio de un Refractómetro digital HI 96811, utilizando 3 gotas de muestra de los diferentes tratamientos en las diferentes horas de muestreo para evaluar el contenido de azúcar y lo convierte en unidades Brix % de azúcar en la concentración. Las muestras de sustrato tomadas de la h0 a la h48 conservadas en congelación, fueron descongeladas a temperatura de refrigeración, después de haber utilizado una parte de estas para obtener las muestras líquidas, se tomo el resto de

cada muestra, se registró su peso y se deshidrataron a 60°C por 48 h, de este modo se calculó su contenido de humedad y posteriormente, con estos datos se calculó la proporción y el comportamiento de la MS de los diferentes tratamientos durante el proceso de la FES.

**Proteína Cruda (PC).** Se determinó utilizando 0.2 g de las muestras deshidratadas a 60 °C y molidas a 1mm obtenidas de cada uno de los diferentes tratamientos evaluados del proceso de fermentación únicamente, el análisis se hizo con el procedimiento Kjeldahl AOAC, (2000) el resultado se expresó en porcentaje de PC en base seca (BS).

**Análisis estadístico.** El diseño estadístico para este experimento se hizo con un arreglo completamente aleatorio, considerando efectos fijos el nivel de calcio y el nivel de inóculo; el efecto aleatorio del fermentador dentro de cada tratamiento (parcela), el efecto de tiempo, el efecto de las interacciones de calcio, inóculo y tiempo; los datos se evaluaron con el procedimiento PROC MIXED del programa SAS, (2004) para un diseño al azar de 4 tratamientos con arreglo factorial 2x2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Temperatura (T).** Esta variable tuvo un comportamiento ( $P < 0.01$ ) por el efecto de inóculo mas calcio y por el efecto de la interacción inóculo por tiempo, durante la FES. La T se incrementó ( $P < 0.01$ ) de la h0 a la h12 en los t, posteriormente disminuyó para mantenerse cerca de la hora de incubación a partir de la h24. Los valores estimados de las medias en la h0 de la FES fueron de  $22.45 \pm 0.19$  a  $24.11 \pm 0.19$ °C a la h12 en el testigo, y de  $20.65 \pm 0.19$  a  $24.58 \pm 0.19$ °C en el tratamiento con inóculo. El calor acumulado en los sustratos fermentados es el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos; la temperatura también puede ser afectada por la conductividad del material biológico fermentado (Ibarra *et al.*, 2002). En los procesos de obtención de sacharina y manzarina, la temperatura interna tiende a mantenerse constante a pesar de los cambios de temperatura ambiental; aun así, esta puede influenciar ligeramente la temperatura del sustrato (Ruiz *et al.*, 2002; Rodríguez, 2009).

**pH.** Esta variable mostró efecto ( $P < 0.04$ ) para la interacción inóculo por tiempo. Los valores estimados de las medias en la h0 de la FES descendió de  $4.89 \pm 0.02$  a  $4.61 \pm 0.02$  a la h48 en el testigo y se incrementó de la h0  $4.80 \pm 0.02$  a  $4.82 \pm 0.02$  a la h6 y posteriormente descendió a  $4.40 \pm 0.02$  h48 en el tratamiento con inóculo. El incremento de pH en el tratamiento con inóculo puede estar relacionado directamente con la producción de  $\text{NH}_3$  y con una menor producción de ácidos orgánicos, así lo mencionan (Elías *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2001). También está relacionado con el incremento del contenido total de aminoácidos y productos alcalinizantes, Díaz-Plascencia *et al.*, (2010) en el desarrollo de un inóculo para raciones utilizando manzana molida y melaza como sustratos en un medio líquido, observaron que el

pH incrementó después de las 24h de fermentación con valores de 4.00 a 5.50 y posteriormente bajo a pH de 4.45. Sin embargo no se encontró efecto para el nivel de calcio, debido a que el nopal contiene grandes cantidades de ceniza y minerales, lo que impidió el efecto del calcio por usar una concentración menor a la que el nopal tiene.

**Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).** Esta variable incrementó ( $P < 0.01$ ), observando diferencia entre la interacción calcio por inóculo y entre inóculo por tiempo. Los valores estimados de las medias de la h0 se incrementaron de  $0.31 \pm 0.01$  a  $0.44 \pm 0.01$  Mm/mL a la h48 en el testigo y de  $0.29 \pm 0.01$  a la h0 a  $0.38 \pm 0.01$  Mm/mL a la h48 en el tratamiento con inóculo. Este efecto es dado por la urea añadida a los sustratos en los procesos de fermentación, ya que es transformada a NH<sub>3</sub> por efecto de especies microbianas ureolíticas así lo han reportado diversos autores en diferentes trabajos en la producción de manjarina y sacharina principalmente, mostrando efectos similares a este (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005; Rodríguez, 2009) si el sustrato tiene un aporte energético bajo, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para su crecimiento o lo hacen en una proporción baja. Cuando se tiene un pH bajo el NH<sub>3</sub> producido es retenido en el sustrato, Díaz-Plascencia *et al.*, (2010). El NH<sub>3</sub> también puede producirse por actividad desaminativa y de esta manera el NH<sub>3</sub> puede ser utilizado por ciertos microorganismos que no hidrolizan la urea agregada al medio de fermentación y como resultado de esto, la cantidad de algunos microorganismos presentes en los sustratos fermentados se puede incrementar e incluso pueden desaparecer, haciendo que se incrementen o bajen los niveles de NH<sub>3</sub> y se modifique el medio de fermentación.

**Ácido Láctico (AcL).** Esta variable mostró efecto ( $P < 0.01$ ), observando diferencia entre tratamientos con la interacción calcio por inóculo y entre inóculo por tiempo. Los valores estimados de las medias de la h0 se incrementaron de  $2.30 \pm 0.05$  a  $2.63 \pm 0.05$  Mm/mL a la h48 en el testigo y bajo de  $1.55 \pm 0.05$  a la h0 bajo a  $0.91 \pm 0.05$  Mm/mL a la h48 en el tratamiento con inóculo. El incremento de AcL en las fermentaciones inhibe el crecimiento microbiano e induce a la muerte celular de la levadura o de los microorganismos presentes (Madrid *et al.*, 1999; Luvodico *et al.*, 2001). Es conocido que la toxicidad del AcL depende del pH en el sistema. Aún pH bajo, el AcL presente se encuentra principalmente en forma no disociada y puede entrar a la célula microbiana por difusión pasiva (Geros *et al.*, 2000) en el citoplasma se disocia debido al pH más neutro y se liberan los protones, bajando el pH del citoplasma, lo cual interfiere con algunos senderos metabólicos (Schüller *et al.*, 2004), así como en el transporte de nutrientes e iones, cambio en la estructura de la membrana, en los ácidos grasos y composición de los fosfolípidos, así como en la síntesis de proteína (Madrid *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2006). El AcL es producido por el catabolismo de los carbohidratos y es el mejor indicador de la correcta fermentación de los forrajes en condiciones anaerobias, sin embargo la levadura *k. lactis* tiene un efecto muy marcado en la utilización del

AcL al utilizarlo como fuente de energía para seguir sobreviviendo por periodos prolongados (Gráfica 1).

**Conteo de Levaduras (CL).** Se observó un efecto ( $P < 0.01$ ) por la interacción inóculo tiempo, esto indica que hubo diferencias en la cantidad de levaduras con un comportamiento fluctuante en los distintos tratamientos en función al tiempo de FES. La concentración más alta de levaduras se observó a partir de la h0 incrementándose de  $8.3 \times 10^6 \pm 0.22$  a  $1.8 \times 10^7 \pm 0.22$  cel/mL a la h48 en el testigo y de  $3.2 \times 10^7 \pm 0.22$  a la h0 a  $4.9 \times 10^7 \pm 0.22$  cel/mL a la h48 en el tratamiento con inóculo. El crecimiento de algunos microorganismos que se encuentran presentes de manera natural en diferentes tipos de sustratos, se ve potencializado por la presencia de carbohidratos fermentables, iniciando el proceso de FES, cuando hay condiciones de presencia de oxígeno y otros nutrientes como el nitrógeno no proteico (NNP), las levaduras son las más favorecidas; en este caso el NNP se agregó con la adición de urea y sulfato de amonio (Elías *et al.*, 1990; Becerra *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010), (Gráfica 2).

**Azúcares Solubles (AS).** Se observó efecto ( $P < 0.01$ ) por efecto del tiempo, de manera que la disminución de los azúcares en los diferentes tratamientos fue avanzando durante la fermentación, este comportamiento es normal debido a que conforme avanza el tiempo, se incrementa el número de células lo cual provoca la disminución de los azúcares presentes en el medio (Díaz-Plascencia *et al.*, 2010), (Gráfica 3).

**Proteína Cruda (PC).** Se encontró un efecto ( $P < 0.01$ ) en el uso del inóculo y por la interacción inóculo tiempo, incrementando a partir de la h0 incrementándose de  $9.35 \pm 0.11$  a  $12.24 \pm 0.11\%$ PC a la h48 como máximo en el testigo y de  $14.90 \pm 0.11$  a la h0 a  $19.36 \pm 0.11\%$ PC a la h12 como máximo en el tratamiento con inóculo. El incremento de la PC concuerda con lo informado por varios autores, pues en los procesos de fermentación en estado sólido la proteína cruda del sustrato se incrementa con la adición de NNP y por la adición de levaduras en el medio de fermentación, actuando como un activador y como un acelerador en las fermentaciones, haciendo más eficientes el medio de fermentación (Ibarra *et al.*, 2002, Becerra *et al.* 2008; Rodríguez *et al.*, 2010).

La disminución de la PC en el tratamiento testigo, es debido a una pérdida de  $\text{NH}_3$  por volatilización esto pudo haber sucedido en este experimento, ya que la disminución en la concentración de PC, en el tratamiento con inóculo coincide con la disminución del AcL, lo que representa para las levaduras *K. lactis* una fuente importante de energía, para seguir creciendo; aunque también al no haber más cantidad de carbohidratos disponibles que transformar, comienzan a degradarse las mismas levaduras entre sí (Gráfica 4).

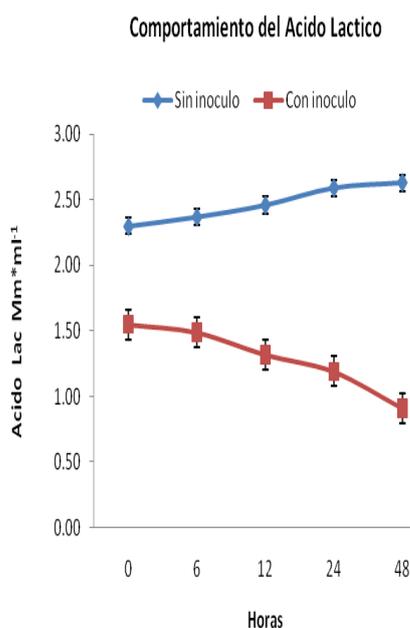
## CONCLUSIONES

Se concluye que el uso del inóculo de levaduras incrementó significativamente su valor de proteína cruda de 9.35 a 19.36 % de PC en 12 horas de fermentación.

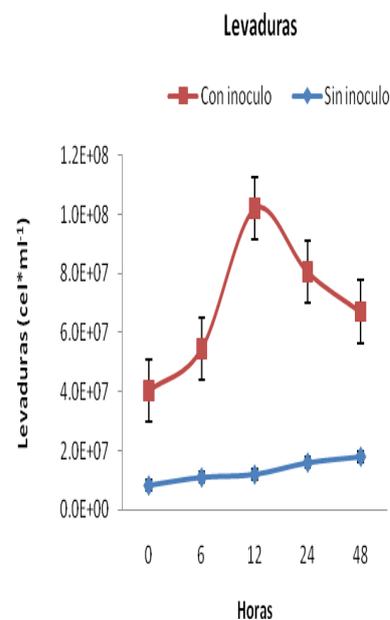
El uso del inóculo de levaduras *Kluyveromyces lactis* favoreció la reducción del ácido láctico durante el proceso de fermentación.

Con estos resultados se pretende contribuir en uno de los problemas fundamentales que impiden el desarrollo de la industria ganadera nacional, por lo que el nopal forrajero sometido a un proceso de fermentación puede ser la solución para producir carne y leche a un costo menor y reducir los consumos de agua en las zonas áridas de nuestro país.

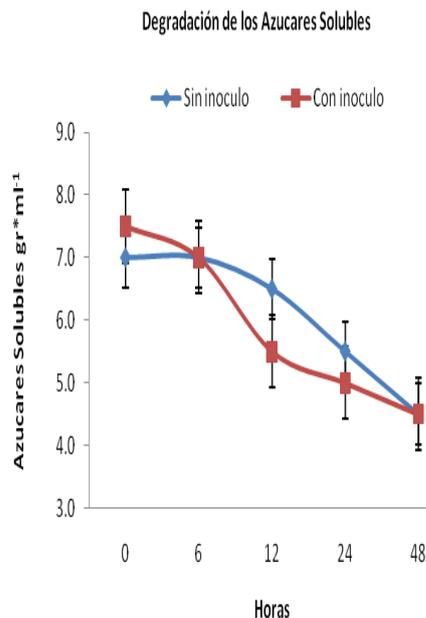
Comparación entre tratamientos en la fermentación *in vitro* de nopal forrajero utilizando un inóculo de levadura de manzana *Kluyveromyces lactis*



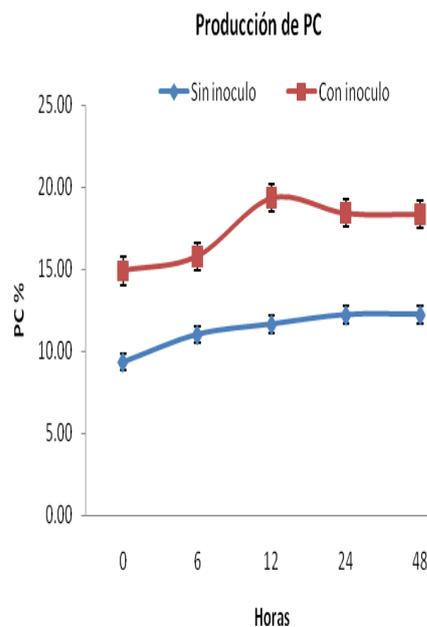
Gráfica 1



Gráfica 2



Gráfica 3



Gráfica 4

## LITERATURA CITADA

- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. Ass. Off. Anal. Chem. Washington, D.C.
- Aranda, O. G. 2006. Enriquecimiento del nopal para el ganado. V Simposium-Taller Sobre Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México. Marín, N. L, México.
- Becerra, A., Rodríguez, C., Jiménez, J., Ruiz, O., Elías A y Ramírez, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. Tecno Ciencia Chihuahua 2: 7-14.
- Broderick, G. A., and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J. Dairy. Sci. 63:64-75.
- Calderón, A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivie N. 2005. Dinámica de la fermentación en estado sólido de las camas de cascarilla de café en Inicio de ponedoras inoculadas con vitafert. Rev. Elect. Vet. 5:1-7.
- Díaz P., D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Díaz-Plascencia, D., C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, O. Ruiz, H. O. Rubio, S, Mena y A. Elías. 2010. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos

- mediante fermentación sólida sumergida. Rev. Elect. Vet.10:1-10
- Elías, A., O. Lezcano, P. Lezcano, J. Cordero y L. Quintana. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (Saccharina). Rev. Cub. Cienc. Agríc. 24:3-12.
  - Flores, V., y J. R. Aguirre R. 1979. El nopal como forraje. Universidad Autónoma Chapingo, México. P. 91.
  - Geros, H., Cassio, F. y Leao, C. 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. J. Food. Prot. 63: 96-101.
  - Gutiérrez, E., A. Elías, H. Bernal y H. Morales. 2007. Usos alternativos del nopal forrajero. Página 1 en Memorias del VI Simposio Taller Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noroeste de México. Marín, N. L., México.
  - Ibarra, A., Y. García, E. Valiño, J. Dustet, N. Albelo y T. Carrasco. 2002. Influence of aeration on the bioconversion of sugarcane bagasse by *Trichoderma viride* M5-2 in a static bioreactor of solid fermentation. Cub. J. Agri. Sci. 36:152-158.
  - Ludovico, P., João, S.M., Silva, M.T., Leão, C. y Côrte-Real. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to programmed Cell death process in response to acetic acid. Microbiol. Rev. 147: 2409-2415.
  - Madrid, J., A. Martínez-Teruel, F. Hernández y M. D. Megías. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. J. Sci. Food. Agri. 79:1722-1726.
  - Ramos, J.A., Elías, A. y Herrera, F. 2006. Processes for production of energy-protein feed for animals. Effect of four energy sources on solid state fermentation of sugarcane. Cuban Journal of Agricultural Science. 40: 47-53.
  - Rodríguez, R., H. E. 2009. Producción y evaluación de alimentos fermentados a partir de bagazo y desecho de manzana y su efecto sobre el desarrollo ruminal y parámetros sanguíneos. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
  - Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Núñez. 2001. Efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata* Lam). Rev. Cub. Cienc. Agrí. 35:29-36.
  - Rodríguez-Muela, C., D. Díaz, F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y

- pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de la manzana (*Malus domestica*). *Rev. Cubana de Cien. Agríc*, 44 - 1, Pág. 23-26.
- Ruíz, C. J., M. Ruíz, G. Ruíz y V. Torres. 2002. Effect of Inclusion of ammonium Sulfate on the elaboration of rustic saccharina. *J. Cub. Sci. Agri.* 36:147-152.
  - SAS. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.
  - Schüller, C., Mamnun, Y.M., Mollapour, M., Krapf, G., Shuster, M., Bauer, B.E., Piper, P.W. y Kuchler, K. 2004. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBC Online.* 15:706-720.
  - Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 56: 49-58.
  - Valiño, E., A. Elias, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the microbial contenton fresh sugar cane bagasse as substrate for animal feeding by solid state fermentation. *J. Cub. Sci. Agri.* 36:359-364.
  - Vázquez, A., y C. Gallegos V. 1997. Banco de Germoplasma de Nopal para las condiciones ambientales del estado de Nuevo León. VII Congreso Nacional y V Congreso Internacional sobre el Conocimiento y Uso del Nopal (Memorias). Marín, N.L. México