



Abanico Boletín Técnico. Enero-Diciembre, 2024; 3:1-7.
Artículo Original. e2024-28.

Efecto del nopal fermentado en la concentración de metano *in vitro*

Effect of fermented nopal on *in vitro* methane concentration

Esperanza Herrera-Torres¹ , Gerardo Pámanes-Carrasco² , Esther Araiza-Rosales³ , Alberto Muro-Reyes⁴ , Daniel Sierra-Franco⁵

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, México. ²CONAHCYT-Instituto Silvicultura y la Madera-UJED, México. ³CONAHCYT-Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. ⁴CONAHCYT-Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico del Salto, México. ⁵Universidad Autónoma de Zacatecas-Facultad de Zootecnia, México. *Autor responsable: Esperanza Herrera Torres. *Autor por correspondencia Daniel Sierra Franco, Carretera Durango-Mezquital km 11.5 Durango, Durango, México. E-mail: heto99@yahoo.com.mx, gerardo.pamanes@gmail.com, e_araiza2020@hotmail.com, dan_1015@hotmail.com, amuro@uaz.edu.mx

Resumen

La fermentación en estado sólido se ha utilizado para incrementar la calidad nutricional del nopal forrajero para su uso integral en la alimentación de ganado bovino en agostadero o confinamiento. No obstante, la información de los efectos del uso de esta tecnología en la producción de metano ruminal es limitado. De esta manera, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la fermentación en estado sólido (SSF) de pencas de nopal con cultivos de levaduras en la producción de metano y parámetros de fermentación ruminal *in vitro*. Tres tratamientos experimentales fueron evaluados: nopal (N) como testigo; nopal pretratado con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (N+SC); y pencas de nopal pretratado con cepas de *Kluyveromyces marxianus* ITD00262 (N+KM). Los tratamientos fueron fermentados en líquido ruminal y se midieron los parámetros de la fermentación ruminal y la producción de metano. Los resultados obtenidos muestran que el N+KM incrementó la producción de propionato y disminuyó las producciones de metano y CO₂ ($p < 0.05$). Por lo que se concluye que el nopal pretratado con cultivos de *Kluyveromyces marxianus* contribuye a la reducción de la síntesis de metano ruminal *in vitro* en un 22%.

Palabras clave: Alimentación animal no convencional, cinéticas de producción de gas, cultivos de levaduras.

Abstract

Solid state fermentation has been used to increase the nutritional value of prickly pear cactus in order to be used as feedstuff in cattle feeding in both extensive or intensive feeding systems. Nevertheless, information of effects of these feedstuffs in ruminal methane production is limited. Therefore, this investigation aimed to evaluate the effect of solid state fermentation (SSF) of prickly pear cactus with yeast cultures on *in vitro* ruminal methane production and fermentation patterns. Three experimental treatments were evaluated: prickly pear cactus (N); prickly pear cactus pretreated with *Saccharomyces cerevisiae* cultures (N+SC); and prickly pear cactus pretreated with *Kluyveromyces marxianus* ITD00262 cultures (N+KM). All treatments were fermented in ruminal liquor and ruminal fermentation patterns and methane production were measured. Results show that N+KM increased propionate production and reduced methane and CO₂ productions ($p < 0.05$). Therefore, it is concluded that SSF of prickly pear cactus with *K. Marxianus* reduces *in vitro* methane production.

Keywords: Non-conventional feedstuffs, gas production kinetics, yeast cultures.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años, en el norte de México se ha presentado un aumento en la temporada de sequía debido a los efectos del cambio climático, el cual es ocasionado por la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. La actividad ganadera contribuye a las emisiones de GEI aportando casi el 30% del total de las emisiones antropogénicas de metano a la atmósfera, mientras que en México aporta el 50% (Hernández-Medrano, 2018). Algunos investigadores han propuesto diferentes alternativas que mitiguen la emisión de GEI, proponiendo diferentes fuentes alimenticias como lo hizo Herrera *et al.*, (2022). De aquí surge el nopal como una alternativa alimenticia durante la época de estiaje. Cabe mencionar que, el nopal es una fuente natural que puede ayudar a aliviar la falta de acceso al agua para el ganado y que es eficiente en el uso del agua en comparación con otros cultivos anuales. Además, contiene un alto contenido de carbohidratos y calcio, y puede convertir agua en materia seca y energía digestible, característica deseable por los ganaderos (Flores & Reveles, 2010). Sin embargo, su bajo contenido de proteínas (aproximadamente 4%, MS) limita el uso del nopal como fuente de nutrientes en la alimentación animal. Para solventar esta deficiencia se propone que a través de la fermentación en estado sólido (FES) se incremente el contenido de proteína. Esta biotecnología utiliza la proliferación de cultivos de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* (Herrera *et al.*, 2017). Por lo anterior, se propone evaluar dos tipos de levaduras; 1) *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en la FES de nopal a diferentes horas de incubación sobre los parámetros de fermentación y producción de metano *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fermentación es estado sólido (FES)

Las pencas de nopal fueron cortadas en pequeñas piezas utilizando un cuchillo de acero inoxidable, de las cuales se pesaron 250 g y colocadas en matraces erlenmeyer de 250 ml de plástico en donde fueron inoculadas con *Sacharomyces cerevisiae* al 1% m/m y con 1×10^9 células de *K. marxianus*. El proceso de fermentación fue llevado a cabo por 48 h y 144 h respectivamente a 28°C.

Producción de metano y parámetros de fermentación ruminal

Aproximadamente 1 g (MS) de cada tratamiento experimental se colocó en módulos de vidrio equipados con transductores electrónicos para medir la presión según los procedimientos del fabricante (ANKOM, EE. UU.) y se incubó por triplicado con soluciones tampón e inóculo ruminal en una proporción 2:1, según Theodorou *et al.* (1994) durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo, se abrió la válvula de liberación de presión de los módulos y se midieron las composiciones de metano y CO₂ del gas liberado según los procedimientos propuestos por González-Arreola *et al.* (2019)



utilizando el analizador de gases portátil GEM5000 (Landtec, EE. UU.). Posteriormente, los módulos de vidrio se abrieron completamente y se midió el pH inmediatamente; posteriormente, una alícuota de líquido ruminal de cada proceso de fermentación se utilizó para análisis posteriores de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno-amoniaco (N-NH_3) según los procedimientos propuestos por Galyean (2010).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con un diseño completamente al azar utilizando el procedimiento GLM del SAS (2009) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de rango múltiple de Tukey, declarando diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de fermentación ruminal, AGV, producción de metano y CO_2 después de 24 h de fermentación se presentan en la Tabla 1. Como se observó, no hubo cambios en el pH entre tratamientos ($p=0.6799$). Sin embargo, el nitrógeno amoniacal aumentó con nopal+SC y nopal+KM ($p=0.0441$). Las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico, así como de ácidos grasos volátiles totales (AGTV) son similares en nopal+KM en comparación con el nopal ($p>0.05$). Sin embargo, se observa una reducción en ácido acético y AGTV en nopal+SC en comparación con el nopal ($p=0.0001$). Además, los ácidos propiónico y butírico aumentaron con nopal+SC ($p<0.05$). Por su parte, la producción de metano y CO_2 disminuyó 23 y 29%, respectivamente con nopal+KM ($p=0.0001$). Por el contrario, nopal+SC presentó valores similares a los obtenidos con nopal ($p>0.05$). De lo contrario, la relación $\text{CO}_2:\text{CH}_4$ indica que nopal+KM quedan 8.3 mL por cada 1 mL de metano producido; mientras que el CO_2 remanente en nopal y nopal+SC es de 7.8 y 7.6 por mL de metano producido, respectivamente.

Asimismo, no hubo cambios en el pH por efecto de la presencia de cultivos de levadura en nopal+SC y nopal+KM. Sin embargo, de acuerdo con Hristov y Jouany (2005), los cambios observados en el nitrógeno amoniacal entre los tratamientos experimentales se atribuyen a una mayor proteólisis que está directamente relacionado con mayores contenidos de proteínas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Herrera *et al.* (2017). También, una reducción de nitrógeno-amoniaco en nopal+KM podría ser atribuible al consumo de amoniaco como fuente de nitrógeno en la producción de biomasa de *K. marxianus*, lo que no fue posible con *S. cerevisiae* (Löser *et al.*, 2015). Además, el pretratamiento con cultivos de *S. cerevisiae* en nopal+SC favorece un mejor aprovechamiento energético debido a una reducción de la concentración de ácido acético y una mayor producción de ácido propiónico. De hecho, una reducción en la relación A:P respalda esta teoría. Sin embargo, estos cambios se observaron en proporciones individuales; los AGVT se redujeron con nopal+SC, mientras que nopal+KM presentó una



producción en AGVT similar a la obtenida en el control (nopal). Este efecto sugiere que nopal+SC inhibe de alguna manera la producción de AGV.

Tabla 1. Parámetros de fermentación y producción de metano ruminal *in vitro* de los tratamientos experimentales

Parámetros	Nopal	Nopal+SC	Nopal+KM	EEM	p
pH	6.95±0.015	6.96±0.005	6.99±0.005	0.009	0.6799
N-NH ₃	4.56±0.556 ^b	6.71±0.574 ^a	5.41±0.272 ^{a,b}	0.487	0.0441
Ácido acético (%)	52.0±0.02 ^a	47.5±0.10 ^b	53.7±1.07 ^a	0.61	0.0001
Ácido propionico (%)	30.8±0.08 ^b	33.3±0.36 ^a	28.7±0.59 ^b	0.40	0.0110
Ácido butírico (%)	12.7±0.11 ^b	14.2±0.12 ^a	12.4±0.29 ^b	0.19	0.0182
AGVT (mM)	94.8±1.09 ^{a,b}	84.3±1.85 ^b	111.3±4.72 ^a	2.99	0.0148
A:P ratio	1.6±0.00 ^{a,b}	1.4±0.01 ^b	1.8±0.07 ^a	0.04	0.0001
Metano (mL/g)	19.2±0.5383 ^a	19.0±0.086 ^a	14.82±0.146 ^b	0.32	0.0001
CO ₂ (mL/g)	151.3±2.24 ^a	145.6±0.86 ^a	123.18±1.10 ^b	1.52	0.0001
CO ₂ :CH ₄ ratio	7.8±0.10 ^{a,b}	7.6±0.01 ^b	8.31±0.15 ^a	0.10	0.0009

^{abc} Medias con diferente literal entre líneas son diferentes (p<0.05). N-NH₃= nitrógeno amoniacal, AGVT=Ácidos grasos volátiles totales, EEM= error estándar entre la diferencia de medias.

Por otro lado, la reducción en la síntesis de metano en nopal+KM no debe relacionarse con una reducción en la producción total de gas ya que el nopal y nopal+KM presentaron valores similares. Además, existen estudios previos que afirman que los aumentos en la producción de propionato afectan directamente la síntesis de metano en la fermentación ruminal, ya que la síntesis de ambos compuestos son sumideros naturales de iones de hidrógeno (Ferraro *et al.*, 2009). Sin embargo, este efecto no se observa con nopal+KM. Por lo demás, la producción de ácido propiónico fue menor que la producida con nopal+SC que con el nopal fermentado con *K. marxianus*. De hecho, las células de *K. marxianus* presentan la capacidad de utilizar urea y amoníaco como fuentes de nitrógeno para su crecimiento. Sin embargo, se necesita un proceso de dos pasos en presencia de hidrógeno para metabolizar la urea (Löser *et al.*, 2015). Debido a esto último, los compuestos considerados como sumideros de hidrógeno en el rumen se verían afectados. De esta forma se reduciría el ácido propiónico y el metano ya que hay menos iones de hidrógeno disponibles para su síntesis debido a la metabolización de la urea.



Además, investigaciones anteriores han demostrado que la viabilidad de las células de *S. cerevisiae* se ve afectada por la presencia de CO₂; esta afección no se observa en las células de *K. marxianus* (Isenschmid *et al.*, 1995). Esta variable indica el volumen (mL) de CO₂ remanente por cada mL de metano producido; cuanto mayor sea el valor de esta variable, menor será la producción de metano a través de la vía de reducción de CO₂ (Murillo *et al.*, 2018). Por lo tanto, esto último es muy deseable cuando se prueban forrajes sostenibles alternativos como alimentos que puedan contribuir a la mitigación del cambio climático mediante la reducción de las emisiones de gases en el ganado.

CONCLUSIONES

El proceso de fermentación de nopal tanto con *S. cerevisiae* como con *K. marxianus* mejoraron sus características nutricionales como es un aumento en las concentraciones de nitrógeno amoniacal y ácido propiónico. No obstante, *K. Marxianus* reduce la producción de metano ruminal *in vitro* 22%, lo cual justifica continuar con estudios que permitan evaluar completamente su uso en la alimentación de ganado bovino.

LITERATURA CITADA

AOAC. Official Methods of Analysis. 1997. Association of Official Analytical Chemists International. 16th ed. Virginia, USA. Pp. 69-83.

<https://search.worldcat.org/es/title/Official-methods-of-analysis-of-AOAC-International/oclc/47401501>

Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutierrez CG. 2009. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Animal Feed Science and Technology*. 154 (1-2): 112-118.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840109002338>

Flores OM, Reveles HM. 2010. Producción de nopal forrajero de diferentes variedades y densidades de plantación. VIII Simposium Taller Nacional y 1er Internacional Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey, Nuevo León, México, Nov. 2010; RESPIN, Nuevo León, México. 5:198- 2010.

https://produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/Tuna/15-nopal_forrajero.pdf

Galyean ML. 2010. Laboratory Procedures for Animal Nutrition Research. 14th ed. Texas Tech University: Lubbock, Texas.

https://www.depts.ttu.edu/agriculturalsciences/vetSciences/mgalyean/lab_man.pdf



González-Arreola A, Murrilo-Ortiz M, Pámanes- Carrasco GA, Reveles-Saucedo F, Herrera-Torres E. 2019. Nutritive quality and gas production of corn silage with the addition of fresh and fermented prickly pear cladodes. *Journal of Animal & Plant Science*. 40:6544-6553.

https://www.researchgate.net/publication/338631918_Nutritive_quality_and_gas_production_of_corn_silage_with_the_addition_of_fresh_and_fermented_prickly_pear_cladodes

Hernández-Medrano JH. 2018. El metano y la ganadería bovina en México: ¿Parte de la solución y no del problema?. *Agroproductividad*. 11(2): 46-51

https://www.researchgate.net/profile/Juan-Hernandez-Medrano/publication/323946441_EL_METANO_Y_LA_GANADERIA_BOVINA_EN_MEXICO_PARTE_DE_LA_SOLUCION_Y_NO_DEL_PROBLEMA/links/5ab42768aca272171003cb7c/EL-METANO-Y-LA-GANADERIA-BOVINA-EN-MEXICO-PARTE-DE-LA-SOLUCION-Y-NO-DEL-PROBLEMA.pdf

Herrera TE, Murillo M, Berumen L, Páez JB, Villarreal G. 2014. Efecto de *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 1(1):33-40.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282014000100004

Herrera TE, Murillo M, Berumen L, Soto ON, Páez J. 2017. Protein enrichment of *Opuntia ficus-indica* using *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation. *Ciencia e Investigación Agraria*. 44(2): 113-1240.

https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-16202017000200113&script=sci_abstract

Isenschmid A, Marison IVW, von Stockar U. 1995. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells. *Journal of Biotechnology*. 39(3):229-237.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016816569500018L?via%3Dihub>

Löser CT, Urit E, Gruner T. 2015. Efficient growth of *Kluyveromyces marxianus* biomass used as a biocatalyst in the sustainable production of ethyl acetate. *Energy, Sustainable Society*. 5: 2-15.

<https://energysustainsoc.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13705-014-0028-2>



Murillo-Ortiz M, Herrera-Torres E, Corral-Luna A, Pámanes-Carrasco G. 2018. Effect of inclusion of graded level of water hyacinth on in vitro gas production kinetics and chemical composition of alfalfa hay based beef cattle diets. *Indian Journal of Animal Research*. 52(8):1298-1303.

<https://www.arccjournals.com/journal/indian-journal-of-animal-research/B-435>

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. 1994. A simple gas production method a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48:185-197.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0377840194901716>