Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS DE *Jatropha curcas* CON NOPAL (*Opuntia* spp.) FERMENTADAS CON *Saccharomyces cerevisiae*

Por:

Dulce Patricia Medina Rodelo

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

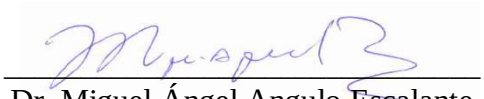
Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa. Enero 2021

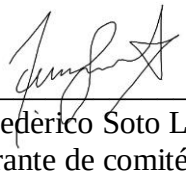
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Dulce Patricia Medina Rodelo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

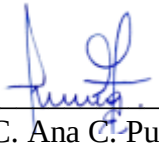


Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante
Director de Tesis

Dr. José Basilio Heredia
Integrante de comité de tesis



Dr. Federico Soto Landeros
Integrante de comité de tesis



M. en C. Ana C. Puello Cruz.
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Caracterización de las Harinas de *Jatropha curcas* con Nopal (*Opuntia* spp.) Fermentadas con *Saccharomyces cerevisiae*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Dulce Patricia Medina Rodelo, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico que me otorgó durante el posgrado, así pude lograr las metas que me había establecido.

Agradezco a CIAD, en especial a la Unidad Culiacán, por darme la oportunidad de usar sus instalaciones para realizar mi investigación y a su vez por la formación que me otorgaron.

Agradezco al proyecto de Clúster Bioturbosina por haberme incluido en este proyecto y además por el apoyo económico que se necesitó durante este proyecto.

Doy gracias especial al Dr. Miguel Angel Angulo Escalante por tener confianza en mí para realizar este proyecto, ya que su apoyo fue fundamental, él estuvo en cada momento que me surgía alguna duda.

Agradezco al Dr. Federico Soto Landeros, ya que él fue de gran ayuda durante el proyecto debido a que siempre estuvo al pendiente y así como a su experiencia en campo y sus consejos de vida.

Aprecio la ayuda al Dr. José Basilio Heredia y a la M.C. Ana C. Puello Cruz por su apoyo incondicional en el proyecto, ya que ellos siempre estuvieron atentos durante todo el proceso y siempre respondían a todo lo que les preguntara, además de la confianza y enseñanza que me brindaron en cada momento.

Agradezco al Dr. Eber Addi Quintana Obregón por su gran ayuda en el proyecto, debido a que nos colaboró en una parte esencial del proyecto, así como su apoyo moral durante el tiempo que estuvo presente.

Agradezco al M.C. Eduardo Sánchez Valdez por su ayuda, ya que siempre que lo solicitaba estaba dispuesto a colaborarme, como también a todos los integrantes del laboratorio de Nutrición de Alimentos.

Aprecio a todos los demás técnicos de CIAD Culiacán, ya que ellos son un gran soporte a la institución y están atentos a colaborar con los estudiantes.

Además, valoro a todos mis compañeros de laboratorio, en especial a la M.C. Edith Salazar Villa por su ayuda y su amistad que recibí desde el inicio de mi trayecto en la maestría, también al Q.F.B. Alexander Casian que siempre estuvo atento a todas mis dudas.

Aprecio la ayuda de mi amigo el M.C. Mario Alejandro Leyva Acuña, por su paciencia y ayuda durante el trabajo de laboratorio.

Valoro el esfuerzo realizado por Jocelyn Díaz Quintero, estudiante de servicio social, la cual me ayudó en una parte experimental, además que es una persona muy cálida y muy trabajadora.

Doy gracias a mis compañeros de generación, los cuales siempre nos estamos apoyando en cada momento que se necesite.

Agradezco a las amistades que formé durante mi transcurso de maestría, así como el apoyo que siempre me brindaron, en especial a Estefanía Espinoza, que fue de las primeras personas con las que conviví en CIAD y siempre he tenido su apoyo, así como Dominique Moreno, la cual siempre me ha ayudado en lo personal y académico cuando lo he necesitado, también valoro la amistad de Ana Maria López, ella ha sido una persona que me ha apoyado en cada momento que lo necesite.

Doy gran aprecio a mis amistades de muchos años que siempre han estado presentes en cada momento: Bianka G., Mónica L., Militza O., Manuel V., Gnagnareli C. Johana T., Dra. Perla M., en especial agradezco a Nathalí Millán, ya que es una persona que me ha apoyado por muchos años, con sus consejos o simplemente escuchándome cuando me quejaba o estaba estresada.

Finalmente doy gracias a mi familia: principalmente mi madre María Aurora Rodelo Bueno por siempre apoyarme en cada decisión que tomó, también a mis hermanos Jesús Ángel Medina Rodelo y Lucía M. Medina Rodelo, los cuales siempre han estado presentes cuando los he necesitado.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada en especial a mi mamá, la Sra. Ma. Aurora Rodelo Bueno, ella es una persona muy importante para mi, ya que ha sido mi gran motor para seguir adelante, sobre todo al principio de este viaje de maestría, nunca me ha abandonado y ha estado presente en cada logró que he tenido, además gracias por enseñarme a trabajar duro, así como ella que es una GUERRERA que nos sacó adelante a mí y a mis hermanos, por eso… GRACIAS MAMÁ. También dedico esta tesis a mis hermanos, Ángel y Lucía, ellos son mi inspiración de ser mejor y superarme, además ellos me enseñaron a siempre luchar por lo que realmente soy capaz de hacer y conseguir lo que quiero, GRACIAS ANGEL y LUCÍA.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE CUADROS 11
RESUMEN 12
ABSTRACT 13
1. INTRODUCCIÓN 14
2. ANTECEDENTES 16
2.1. Género *Jatropha* 16
2.1.1. *Jatropha curcas* 16
2.1.2. Ésteres de Forbol 17
2.1.3. Usos de *J. curcas* 18
2.2. Fermentación en Estado Sólido 19
2.2.1. Nopal (*Opuntia* spp.) como Sustrato 22
2.2.2. Proteína Unicelular 23
3. HIPÓTESIS 25
4. OBJETIVO 26
4.1. Objetivo General 26
4.2. Objetivos Específicos 26
5. MATERIALES Y MÉTODOS 27
5.1. Obtención de las Harinas de *J. curcas* y Nopal 27
5.2. Diseño Experimental para las Mezclas de Harinas 29
5.3. Fermentación en Estado Sólido 31
5.4. Análisis Nutrimentales 32
5.4.1. Humedad 32
5.4.2. Cenizas 33
5.4.3. Grasa 33
5.4.4. Fibra Cruda 34
5.4.5. Proteína Cruda 34
5.4.6. Carbohidratos 35
5.5. Contenido de Calorías 36
5.6. Cuantificación de Ésteres de Forbol (EF) 37
5.6.1. Preparación de Extracto 37

CONTENIDO (continuación)

5.6.2. Análisis Cromatográfico 38
5.7. Análisis de Compuestos Antinutricionales 39
5.7.1. Determinación de Ácido Fítico 39
5.7.2. Determinación de Saponinas 40
5.7.3. Análisis Estadístico 41

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42
6.1. Análisis Nutrimental 42
6.1.1. Harina de *J. curcas* y Harina de Nopal 42
6.1.2. Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas 43
6.1.3. Contenido Energético 49
6.2. Cuantificación de Ésteres de Forbol 50
6.2.1. Harina de *J. curcas* 50
6.2.2. Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas 52
6.3. Análisis de Compuestos Antinutrimentales 60
6.3.1. Ácido Fítico en Harina de *J. curcas* y Harina de Nopal 60
6.3.2. Ácido Fítico en Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas 60
6.3.3. Saponinas en Harina de *J. curcas* y Harina de Nopal 62
6.3.4. Saponinas en Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas 63

7. CONCLUSIONES 66

8. RECOMENDACIONES 67

9. REFERENCIAS **68**

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Árbol de *Jatropha curcas*……	17
2	Estructura básica de ésteres de forbol que están presentes en *J. curcas*. (Leyva, 2018)……..	18
3	Proceso de obtención de HJC. a) Descascarillado de semillas de *J. curcas*, b) Germen de *J. curcas*, c) Prensado en frío del germen de *J. curcas*, d) Planta de extracción de aceite y e) Harina de *J. curcas*…….	28
4	Proceso de obtención de HN. a) Lavado y desinfección de los nopales, b) Partición de nopales, c) Nopales picados, f) Secado de nopales, f) Molienda de nopal seco y g) Harina de nopal seco…….	29
5	Gráfica de diseño simplex de cantidades de las mezclas……	30
6	Fermentación en estado sólido de las mezclas……	31
7	Calorimetric Thermometer Parr® 6772 y Semimicro Calorimetric Parr® 6725…….	37
8	Proceso de extracción de EF. a) Trituración de muestra, b) Pesaje de muestra, c) Sonicación de muestra, d) Filtración de muestra, e) Rotoevaporador con muestra, f) Sonicación de extracto de muestra, g) Filtración de la muestra con acrodisco y h) Extractos de muestras……..	38
9	Proceso de análisis cromatográfico. a) Aplicación de la muestra, b) Fase móvil de la placa, c) Detección por luz UV, d) Lectura del cromatograma……	39
10	Proceso de determinación de ácido fítico. a) Agitación de muestras, b) Curva de calibración, c) Muestras y d) Espectrofotómetro – UV……..	40
11	a) Muestras, b) Lecturas en el espectrofotómetro - UV y c) Curva de calibración……...	42
12	Gráficas de interacciones de la composición nutrimental de las mezclas (M1, M2 y M3) durante la fermentación (0, 24 72 y 144 h), a) Tiempo de fermentación (h) vs % Humedad y b) Tiempo de fermentación (h) vs % Cenizas……	47
13	Gráficas de interacciones de la composición nutrimental de las mezclas (M1, M2 y M3) durante la fermentación (0, 24 72 y 144 h), a) Tiempo de fermentación (h) vs % Proteína cruda, b) Tiempo de fermentación (h) vs % Lípidos……	48

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14	Gráficas de interacciones de la composición nutrimental de las mezclas (M1, M2 y M3) durante la fermentación (0, 24 72 y 144 h), a) Tiempo de fermentación (h) vs % Fibra cruda y b) Tiempo de fermentación (h) vs % Carbohidratos……..	49
15	Gráfica de interacciones del contenido de Energía bruta ($kJ.g^{-1}$) de las tres mezclas vs Tiempo de fermentación (h)……..	51
16	Cromatograma de EF a) PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) y los b) y c) son las muestras de HJC…….	52
17	Gráfico de interacciones de ésteres de forbol ($mg.g^{-1}$) vs tiempo de fermentación (h)……..	53
18	Cromatogramas de M1 antes y después de la fermentación, a) 0 h de fermentación, b) 24 h de fermentación, c) 72 h de fermentación y d) 144 h de fermentación……	62
19	Cromatogramas de M2 antes y después de la fermentación, a) 0 h de fermentación, b) 24 h de fermentación, c) 72 h de fermentación y d) 144 h de fermentación……	63
20	Cromatogramas de M3 antes y después de la fermentación, a) 0 h de fermentación, b) 24 h de fermentación, c) 72 h de fermentación y d) 144 h de fermentación……	64
21	Gráfico de interacciones del contenido de ácido fítico ($mg.g^{-1}$) vs Tiempo de fermentación (h)……..	66
22	Gráfico de interacciones del contenido de saponinas ($mg.g^{-1}$) vs Tiempo de fermentación (h)……..	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cantidades en gramos de cada harina para cada mezcla……..	30
2	Contenido nutrimental (%) de la harina de HJC y HN…….	44
3	Contenido nutrimental (%) de la M1……...	45
4	Contenido nutrimental (%) de la M2……...	46
5	Contenido nutrimental (%) de la M3……...	46
6	Contenido Energético ($kJ.g^{-1}$) de cada mezcla…….	50
7	Contenido de ésteres de forbol ($mg.g^{-1}$) en HJC……..	53
8	Contenido de ésteres de forbol ($mg.g^{-1}$) en cada mezcla en los diferentes tiempos de fermentación (h)……	60
9	Contenido de ácido fítico ($mg.g^{-1}$)……...	65
10	Contenido de ácido fítico ($mg.g^{-1}$) en mezclas…….	66
11	Contenido de saponinas ($mg.g^{-1}$)…….	68
12	Contenido de saponinas ($mg.g^{-1}$) en mezclas……...	69

RESUMEN

Debido al crecimiento de la actividad acuícola, la producción de alimento balanceado para tilapia del Nilo ha aumentado. La harina de pescado es uno de sus ingredientes principales por su alta digestibilidad y perfil de aminoácidos. Sin embargo, es un recurso sobreexplotado, ocasionando que represente entre un 30-70% de costo en la producción del alimento. Es por eso que se han buscado nuevas alternativas para la sustitución de esta harina, sobresaliendo fuentes de proteínas de origen vegetal; como lo es *Jatropha curcas,* sin embargo, ésta contiene ésteres de forbol y compuestos antinutricionales, es por eso que se necesita un proceso biotecnológico para la reducción de estos compuestos tóxicos, utilizando la fermentación en estado sólido con ayuda de un microrganismo y de un sustrato, donde éste debe ser rico en carbohidratos como lo es el nopal forraje. El objetivo de este estudio fue caracterizar las harinas de *J. curcas* con diferentes inclusiones de harina de nopal (M1, M2 y M3) fermentadas con *Saccharomyces cerevisiae* durante 0, 24, 72 y 144 h. Para esto en cada tiempo de fermentación se realizó a cada mezcla un análisis proximal, determinación de fitatos y saponinas por el método de espectrometría, así como una cuantificación de ésteres de forbol por el método de HPTLC. Después de 144 h de fermentación, los resultados de proteína cruda muestran que la mezcla 1 (M1) elaborada con 18.18 g de *J. curcas* y 18.18 g de nopal presentó un aumento significativo del 10.73% con referente al tiempo 0; la mezcla 2 (M2) (31 g de *J. curcas* y 5.35 g de nopal) mostró un aumento del 17.12% y, por último, la mezcla 3 (M3) con 25.25 g de *J. curcas* y 11.11 g de nopal tuvo un incremento del 3.52%. El contenido de lípidos, cenizas y fibra cruda en las mezclas no mostraron diferencia significativa después de la fermentación. Además, a las 144 h de fermentación se redujo la presencia de ésteres de forbol a niveles no detectables y los compuestos antinutricionales fueron disminuyendo conforme aumentó el tiempo de fermentación. Los resultados sugieren que la mezcla 2 es la que mejor cumple con las necesidades nutrimentales para ser evaluadas en modelos animales, como la tilapia del Nilo para su crecimiento adecuado.

Palabras claves: Harina de *Jatropha curcas,* harina de nopal, fermentación en estado sólido, *Saccharomyces cerevisiae*, ésteres de forbol

ABSTRACT

Due to the growth of aquaculture activity, the production of feed for Nile tilapia has increased. Fishmeal is one of its main ingredients due to its high digestibility and amino acid profile. However, it is an overexploited resource, causing it to represent between 30-70% of the cost of food production. Therefore, new alternatives have been sought to replace this flour, standing out protein sources of vegetable origin; As is *Jatropha curcas*, however, it contains phorbol esters and antinutritional compounds, that is why a biotechnological process is needed to reduce these toxic compounds, using solid state fermentation with the help of a microorganism and a substrate, where it must be rich in carbohydrates such as nopal forage. The objective of this study was to characterize *J. curcas* flours with different nopal flour inclusions (M1, M2 and M3) fermented with *Saccharomyces cerevisiae* for 0, 24, 72 and 144 h. For this, at each fermentation time, a proximal analysis, determination of phytates and saponins by the spectrometry method, as well as a quantification of phorbol esters by the HPTLC method, was performed on each mixture. After 144 h of fermentation, the crude protein results show that mixture 1 (M1) made with 18.18 g of *J. curcas* and 18.18 g of nopal presented a significant increase of 10.73% with reference to time 0; mixture 2 (M2) (31 g of *J. curcas* and 5.35 g of nopal) showed an increase of 17.12% and, finally, mixture 3 (M3) with 25.25 g of *J. curcas* and 11.11 g of nopal had a 3.52% increase. The content of lipids, ash and crude fiber in the mixtures did not show significant difference after fermentation. In addition, after 144 h of fermentation, the presence of phorbol esters was reduced to undetectable levels and the antinutritional compounds decreased as the fermentation time increased. The results suggest that mixture 2 is the one that best treatment that meets the nutritional needs to be evaluated in animal models, such as the Nile tilapia for its adequate growth.

Key words: *Jatropha curcas* meal, nopal meal, solid state fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, phorbol esters.

1. INTRODUCCIÓN

Con el paso del tiempo se han buscado nuevas alternativas de sustitución de harina de pescado en el alimento acuícola. Esto principalmente para las especies de tilapia del Nilo, debido a que esta materia prima ha llegado a representar un costo del más del 50% para la acuicultura, porque se considera como fuente principal de proteína por su alta digestibilidad, perfil de aminoácidos, donde se destacan metionina y cisteína, los cuales son esenciales para el desarrollo de estas especies, así como su perfil de ácidos grasos (Amaya *et al*., 2007). Sin embargo, existen diferentes factores que se deben tener en cuenta para reducir el uso de esta materia prima, como puede ser: 1) disminución del uso mundial de los pescados que se utilizan para la producción de esta harina, 2) aumento de precio y 3) presión sobre los fabricantes de alimentos para la sustitución de la dieta con el fin se seguir siendo rentable (Tacon y Metian, 2008). Debido a esta situación, es necesario buscar nuevas alternativas para sustituir parcialmente o por completo la harina de pescado en el alimento acuícola. Las opciones que existen son las de origen vegetal para las especies acuícolas herbívoras y omnívoras por sus semejanzas nutricionales, entre las que destaca la harina obtenida de *Jatropha curcas,* planta nativa de México y América continental (Wouter *et al.*, 2010). Esta puede ser localizada en climas tropicales y semitropicales, es resistente a altas temperaturas y soporta sequía (Makkar y Becker, 2009; Da Schio, 2010). Además, diversos estudios se han enfocado en sus propiedades nutrimentales donde destaca su gran contenido de proteína cruda, útil para la elaboración de alimentos balanceados. No obstante, en México existen variedades tóxicas y no tóxicas (Jongschaap *et al.,* 2007), donde su principal constituyente tóxico son los ésteres de forbol y así como otros compuestos antinutricionales como las lectinas, inhibidores de tripsina, saponinas y fitatos. Es por esto, que se han desarrollado métodos para la desintoxicación, uno de ellos es la fermentación en estado sólido, donde se puede emplear la *Saccharomyces cerevisiae* (Van Markis *et al*., 2006), un microorganismo muy utilizado debido a su producción de biomasa microbiana. Para realizar el proceso de fermentación es necesario seleccionar el microorganismo y el sustrato adecuado, el cual debe cumplir ciertas características, como es tener un alto contenido de carbohidratos y una estructura granular. El nopal es un forraje complementario o de emergencia utilizado como alternativa en la alimentación de ganado especialmente en tiempos de sequía, a pesar de que su contenido de proteína es bajo, sin embargo,

su alto contenido de carbohidratos lo hacen un sustrato ideal para la fermentación en estado sólido, lo que ayuda a obtener un concentrado rico en proteína utilizando algún tipo de microorganismos (Elías *et al*., 1990). Este proceso biotecnológico puede promover a cumplir con las características de un sustrato para una fermentación en estado sólido. Es por eso que esta investigación tiene como objetivo evaluar diferentes mezclas de harinas de *J. curcas* y nopal (*Opuntia* spp.) fermentada en estado sólido con *Saccharomyces cerevisiae*, para un futuro uso en un alimento para tilapia del Nilo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Género *Jatropha*

El género *Jatropha* pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y su nombre se deriva de las palabras griegas "iatros", que significa médico y "trophé" alimentos (Heller, 1996), indicando su potencial sobre el uso de hierba medicinal en la antigüedad (Sunil *et al.*, 2013). Este género contiene aproximadamente 170 a 175 especies conocidas (Heller, 1996; Dehgan y Webster, 1979), entre ellas se encuentra la especie *J. curcas.*

2.1.1. *Jatropha curcas*

J. curcas (Figura 1) se considera como la especie más primitiva del género (McVaugh 1945; Wilbur 1954). Es un arbusto que puede alcanzar una altura entre 5 a 8 metros dependiendo de las condiciones de cultivo, además es resistente a la sequía, (Brittaine y Lutaladio, 2010). Las plantas son monoicas, es decir, tienen flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia (Chang-wei *et al.*, 2007), sus tallos crecen con una discontinuidad morfológica en cada incremento, además de que son cilíndricos verde, robustos, que produce ramas con savia láctea o rojiza viscosa. Normalmente se forman cinco raíces en las plántulas, una central y cuatro periféricas. Las hojas son lobuladas, alternas, con una longitud y anchura de 6 a 15 cm y las flores están ubicadas en inflorescencias que se forman en las axilas de las hojas (Heller, 1996). Además, está planta tiene una capacidad para adaptarse a diferentes condiciones de cultivo, debido a que se puede cultivar en una amplia variedad de suelos, es decir, degradados, arenosos, pedregoso, salinos, incluso los de bajo contenido de nutrientes. El intervalo óptimo de crecimiento es de 25 a 35 °C, pero en ocasiones puede resistir hasta 40 °C (Makkar y Becker, 2009; Da Schio, 2010). Su origen ha sido un tema muy debatido; sin embargo, se dice que es nativa de México y América continental (Wouter *et al.*, 2010), y se localiza en climas tropicales y semitropicales, en las cuales existen

variedades tóxicas y no tóxicas, en México se han encontrado genotipos tóxicos (Jongschaap *et al.*, 2007), como son los ésteres de forbol y compuestos antinutrientes.

Figura 1. Árbol de *Jatropha curcas*

2.1.2. Ésteres de Forbol

Los ésteres de forbol (EF) son compuestos tóxicos presentes en semillas y aceite de *J. curcas* (Makkar *et al.*, 2008). Estos compuestos son diterpenoides tetracíclicos (Figura 2), pueden

ocasionar un efecto mimético del diacilglicerol como su activador de varias isoformas de proteína quinasa C (PKC) y esto afecta a la síntesis de proteína, ADN, expresión genética (Goel *et al*., 2007). Por lo tanto, se considera como un promotor en la producción de tumores, a su vez provocando diarreas, mareos y reacciones en la piel. En México están presentes variedades que contienen baja cantidad de EF (Makkar *et al*., 2008). Las semillas de *J. curcas* de la variedad toxica contienen 2.70 a 2.17 $mg \cdot g^{-1}$ de EF, mientras que en las variedades que se consideran como no tóxicas contienen 0.11 $mg \cdot g^{-1}$ o simplemente no son detectados, y también están presentes otros compuestos antinutricionales (inhibidores de tripsina, lectinas y fitatos) (Makkar *et al*., 1997).

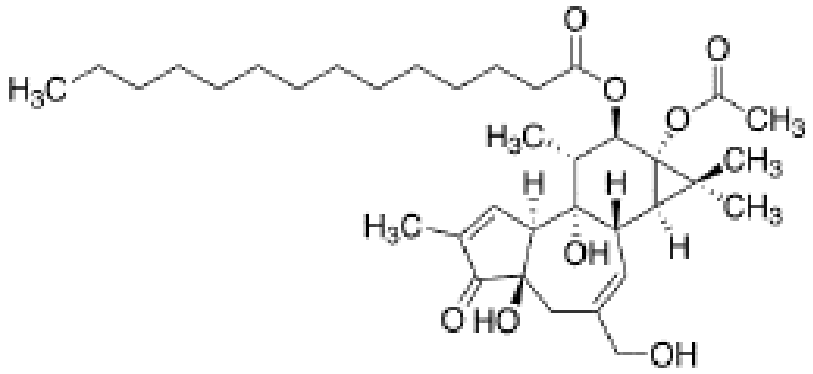


Figura 2. Estructura básica de ésteres de forbol que están presentes en *J. curcas.* (Leyva, 2018)

2.1.3. Usos de *J. curcas*

Una vez que estos compuestos tóxicos, como los EF, son retirados de la harina y aceite de *J. curcas* pueden llegar a tener diferentes usos. Se han utilizado para el control de plagas, debido a que a partir de diferentes partes de la planta se puede llegar a remplazar plaguicidas sintéticos por sustancias vegetales para el control eficiente de algunos hongos, parásitos y otros tipos de organismos; sin embargo, es necesario utilizar la misma precaución que los plaguicidas químicos (Gubitz *et al*., 1999; Liu *et al*., 1997; Rug y Ruppel, 2000). También los extractos obtenidos de la semilla, hojas corteza y aceite de *J. curcas* han tenido un uso medicinal, como purgante natural (Gubitz *et al*., 1999; Abdel *et al*., 2003). La actividad antiinflamatoria y la utilización como tratamiento del reumatismo ha sido evidenciado mediante la utilización de las hojas de la planta

sobre la región afectada; en cambio los tallos de *J. curcas* se han utilizado para elaborar cepillos de dientes con el fin de fortalecer las encías, reducir y evitar la presencia de abscesos (Upadhya *et al*., 2010).

Desde hace aproximadamente dos décadas, *J. curcas* ha sido considerada como una alternativa potencial para la producción de biocombustibles (Pramanik, 2003). Las semillas de *J. curcas* contienen entre 35 y 60% de aceite, a partir del cual es posible producir biodiesel (Makkar *et al*., 1997; Brittaine y Lutaladio, 2010). Del proceso de producción de biodiesel se generan diferentes subproductos. Uno de ellos es la pasta obtenida después de la extracción del aceite, esta tiene potencial para ser utilizado como alimento para diferentes especies animales como son: aves rumiantes, camarón y tilapia, esto debido a su alto valor proteico que va de un 50 a 60% de proteína cruda (Escoto *et al*., 2013). Sin embargo, la harina de *J. curcas* contiene compuestos antinutricionales y EF, es por eso que con el paso del tiempo se han ido desarrollando diferentes métodos químicos y físicos para la eliminación de estos compuestos. Alguno de estos consta de una separación o desodorización a 260 °C con una presión de 3 bar y una inyección de vapor al 1%, esto ha sido reportado por Makkar *et al*. (2009). Además, un estudio realizado por Faria-Machado *et al*. (2019), donde evaluó el uso de los solventes metanol y diclorometano en el equipo de Soxhlet para la extracción de EF, mostró que el metanol tuvo mejores resultados para la remoción de EF, mostrando una desviación estándar relativa que variaba de un 3 al 5%. Asimismo, existe un proceso biotecnológico que se le ha aplicado a diferentes tipos de biomasas como de legumbres o cereales para mejorar su nutrición y valores nutracéuticos, esto es por medio de la fermentación es estado sólido o semisólido, el cual representa una alternativa tecnológica (Angulo-Bejarano *et al*., 2008).

2.2. Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso que se caracteriza por llevarse a cabo en un soporte sólido, en el cual se tiene un bajo contenido de humedad (límite inferior = 12%) y a su vez puede llegar a ocurrir en estado no aséptico y de forma natural (Nigam y Singh, 1994). Debido a que este proceso se puede llevar a cabo en residuos agrícolas, como pueden ser paja de trigo o

cascarilla de arroz, es considerado como una tecnología capaz de producir metabolitos secundarios, donde la morfología del micelio de los microorganismos que se utilizan son de gran ayuda para la producción de metabolitos secundarios en soportes sólidos, ya que permiten una mejor circulación de oxígeno (Elibol y Mavituna, 1997). A pesar de la ausencia de agua libre, se pueden llegar a manejar fermentadores pequeños para la FES, por lo tanto, se necesita menos esfuerzo para los procesos de separación (Barrios-González *et al*., 1993). Asimismo, la FES se considera como un proceso para preparar diversas dietas para animales, entre los que destacan las especies acuáticas, debido a que se producen una alta calidad, una mejor digestibilidad y valor biológico de las proteínas (Cuevas-Rodríguez *et al*., 2004; Guzmán-Uriarte *et al*., 2013).

Por otro lado, este proceso también ha sido adaptable para realizar una desintoxicación de compuestos tóxicos y antinutricionales de algunas biomasas (Joshi *et. al*., 2014), donde se debe utilizar microorganismos y sustratos adecuados; el microorganismo debe ser capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de nutrientes, y a su vez tener una baja tendencia a la esporulación y un alto crecimiento vegetativo (Pastrana, 1996). Es por eso que a lo largo de los años la desintoxicación biológica de residuos agroindustriales ha sido un enfoque para la FES para eliminar compuestos como pueden ser las saponinas en soya entera utilizando *Rhizopus oligosporus* como microrganismo (Fenwick y Oakenfull, 1983). Además, el género *Rhizopus* es importante en la producción de proteínas, con alta digestibilidad, evitando formación de sustancias tóxicas y así poder ser usadas las biomasas para alimentos (Bourdichon *et al*., 2012). Además, se ha utilizado *Aspergillus níger* para la eliminación de ácido fítico en harina de colza (El-Batal y Karem, 2001); asimismo se ha logrado una degradación de EF con el uso de *Pseudomonas aeruginosa* en la FES, donde se aplicó en harina de *J. curcas* (Joshi *et al*., 2011) eliminando hasta 75% de presencia de EF. Así como los diferentes cultivos de hongos utilizados por Sharath *et al.* (2013), los cuales provenían de diferentes géneros, como lo son *Aspergillus*, *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium miczynskii*, *Rhizopus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*, mostraron una degradación del 75% de EF en harina de *J. curcas*. Veerabhadrappa *et al*. (2014), ellos trabajaron con *Aspergillus versicolor* como microrganismo para la FES, teniendo como inicio una concentración de 0.832 $mg.g^{-1}$ y después de 6 días de fermentación se redujo su concentración hasta 0.158 $mg.g^{-1}$, teniendo como resultado una degradación del 81.1% en los niveles de EF. En condiciones optimizadas de un cultivo en estado sólido, Zhang *et al.* (2016), utilizaron basilios Gram negativos, *Morganella morganii*, con el cual se aislaron en semillas de *J. curcas*, obteniendo

una reducción de EF del 92.78% después de haber sido incubada por 4 días. Sin embargo, la *S. cerevisiae* es una levadura que produce diferentes metabolitos como enzimas, aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos y vitaminas entre otros (Peppler, 1982). Asimismo, la *S. cerevisiae* es considerada como uno de los microorganismos más conocidos gracias a su eficacia de sus componentes funcionales como los β-glucanos y ácidos nucleicos (Dawood y Koshio, 2020; Ortuño *et al*., 2002; Peppler, 1982).

Además, un estudio realizado por Dawood *et al*. (2020), donde realizaron una FES utilizando como biomasa una harina de semilla de palma y como microorganismo se empleó a la *S. cerevisiae,* ayudó a una secreción de enzimas extracelulares para una mejor digestibilidad de los nutrientes presentes en la biomasa utilizada, lo que llevó a un mejor rendimiento de crecimiento y alimentación en la especie de tilapias del Nilo (Dawood *et al*., 2020). También este comportamiento ha sido similar en otras especies de peces, donde han utilizado dietas a base en probióticos como lo es la *S. cerevisiae* (Ahmadifar *et al*., 2019; Van Doan *et al*., 2020). Es por eso que los microorganismos abren una oportunidad de producir una amplia variedad de productos de valor agregado, los cuales pueden ser utilizados en alimentación tanto para animales como para humanos (Vandamme y Revuelta, 2016). Por otra parte, se debe de tener en cuenta que para que se lleve a cabo una FES no solamente se debe de contar con un microorganismo adecuado, sino que también necesita un sustrato con características que beneficien al proceso, es decir, necesita que cuente con lo siguiente (Pastrana, 1996):

1. Debe ser insoluble en agua, para poder asegurar que durante la incubación sea en un cultivo de estado sólido.
2. Un contenido alto en carbohidratos y/o proteínas, debido a que esto permite uso de altas concentraciones de sustrato.
3. Cuente con una estructura granular el cual permita la adhesión y penetración del microorganismo.
4. Que permitan la fermentación por un solo microorganismo, para una máxima conversión de compuestos o bien para un pretratamiento de diferentes compuestos (agentes oxidantes).
5. Una baja propensa a formar aglomeraciones con el micelio y formación de masas compactas durante la incubación.

2.2.1. Nopal (*Opuntia* spp.) como Sustrato

El nopal forrajero (*Opuntia* spp.), el cual es de origen americano, representa una opción de sustrato que se puede utilizar con la harina de *J. curcas* para llevar a cabo una FES. Los nopales se distribuyen desde Canadá hasta Argentina, los cuales se encuentran en zonas áridas y semiáridas. Debido a las características morfológicas y fisiológicas que tiene la planta, le permite soportar condiciones ambientales desde altas y bajas temperaturas; así como, escases de agua (Tobías, 1990). Además, el género *Opuntia* spp. cuenta con más de 300 especies, donde se puede encontrar más de 100 en hábitats salvajes en México (Anaya-Pérez, 2001). Por otro lado, el nopal está conformado por una raíz, una parte vegetativa las cuales se conocen como almohadillas, articulaciones o cladodios y estos son tallos modificados y remplazan a las hojas para realizar la fotosíntesis, otras partes del nopal son el fruto y la flor, además de que estas plantas se consideran como suculentas, también contienen órganos en forma de ovoide con una longitud de 18 – 25 cm, mientras que su parte interna está compuesta por el parénquima medular que es blanco y este funciona como almacén de agua (Cantwell *et al*., 1992; Cantwell, 1995; Nerd *et al*., 1997).

Desde hace décadas y aun en la actualidad, esta planta sirve como fuente de frutas y verduras, medicinal, cosmético, fuentes de colores naturales y como forraje. A pesar de esto, su uso es restringido pero debido a la disminución de varios recursos hídricos, el nopal ha ganado territorio importante en la producción de alimentos donde se ha llegado a incluir a los cladodios y frutos del cultivo vegetativo de la planta para alimento animal (Cruse, 1973; Mohamed-Yasseen *et al*., 1996; Vigueras y Portillo, 2001). Es por eso que el uso del nopal forraje para alimentar ganado vacuno, ovino y caprino es común que suceda en zonas áridas y semiáridas del norte de México y a su vez se ha propagado al resto de las regiones del mundo (Flores y Aguirre, 1979). Sin embargo, la composición nutrimental de los cladodios y del fruto del nopal son variables dependiendo de las condiciones del sitio de cultivo, clima y variedad de especie. En general, los cladodios son ricos en pectina, mucilago y minerales, y en el caso de las frutas contienen alto contenido de vitaminas, aminoácidos y betalaínas (Feugang *et al*., 2006).

Debido a que la calidad nutrimental del nopal puede ser variable y baja, que a su vez depende de diferentes factores: tipo de genotipo, edad y condiciones de cultivo (Flores y Aguirre, 1979; Nobel, 1983). A pesar de que los cladodios son una materia prima que contiene minerales, agua y

carbohidratos, no posee un alto contenido de proteína (Mendez-Llorente *et al.*, 2008; Vasta *et al.*, 2008) que se requiera para la elaboración de alimento animal. No obstante, una forma de enriquecer de proteínas a las especies *Opuntia*, es por medio de la FES, utilizando *S. cerevisae* como levadura. Sin embargo, la proteína celular del microorganismo puede lograr ser una fuente de alta calidad para la biomasa que se fermenta, debido a que algunos hongos, bacterias y levaduras poseen un elevado crecimiento en metabolitos benéficos para animales como el ganado (Saritha *et al.*, 2012). Los estudios realizados por Flores-Hernández *et al*. (2017), donde aplicaron una FES a nopal forraje, y lograron sustituir hasta un 40% de harina de nopal fermentada al alimento para cabras, donde obtuvieron resultados positivos debido a que los animales se desarrollaron de igual manera que cuando consumen su alimento tradicional, es decir, alcanzaron un peso adecuado y no tuvieron problemas biológicos. Una razón por la que se estimula la producción de proteína microbiana como una fuente de alimento, es el sector acuícola. Debido a que esta actividad ha llegado a representar más del 73% de consumo mundial de harina de pescado, donde la captura de peces silvestres es incapaz de suministrar suficiente alimento de alta calidad a un sector que está en rápido crecimiento (The World Bank, 2013). Además, el uso de microorganismo heterótrofos (levadura, bacterias y hongos) permite que el carbono orgánico de la biomasa con la que se está trabajando, se convierta en proteína microbiana (Anupama y Ravindra, 2000).

2.2.2. Proteína Unicelular

La proteína unicelular, también conocida como proteína microbiana, se define como una masa de células secas (biomasa) y es producida por medio de algas, levaduras, bacterias y hongos (Saeed *et al*., 2016). No obstante, estos microbios pueden llegar a utilizarse como suplementos o ingredientes ricos en proteínas para dietas de humanos y animales (Ritala *et al*., 2017).

En los últimos años se ha hecho más común el uso de distintas fuentes orgánicas, como desechos industriales y de la agricultura, para la producción de proteínas unicelular (Gervasi *et al*., 2018). Además, de que la biomasa lignocelulosa tiene potencial para la producción de proteína unicelular, debido a que es rica en azucares fermentables y alto en contenido de fibra, pero bajo contenido en proteínas (Gabriel *et al*., 2014), es por eso que el nopal siendo una fuente natural con alto contenido

de fibra, compuesta de una red bilateral de residuos lignocelulósicos, las cuales con forme pasa el tiempo esta endurece y proporciona una constitución rígida (Aquino *et al*., 2012). Existen un estudio realizado por Gabriel *et al*. (2014), ellos utilizaron cladodios de *Opuntia ficus-indica* para producir proteína unicelular por métodos químicos y biológicos.

3. HIPÓTESIS

El uso de la fermentación en estado sólido con *Saccharomyces cerevisiae* en las harinas de *Jatropha curcas* y nopal (*Opuntia* spp.) contribuirá para una reducción entre un 75 a 90% de compuestos antinutricionales y tóxicos en harina *J. curcas*, además que mejorará la cantidad y calidad de proteína en las mezclas *Jatropha curcas* + nopal, debido a que durante el proceso de fermentación se forman proteínas de origen microbiano.

.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de fermentación en estado sólido con *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes tiempos sobre la composición nutrimental, los compuestos antinutricionales y tóxicos presentes en las diferentes mezclas de harinas de *Jatropha curcas* y nopal (*Opuntia* spp.).

4.2. Objetivos Específicos

- Elaborar y caracterizar proximalmente lotes de harina de *Jatropha curcas* y de harina de nopal (*Opuntia* spp.)
- Realizar un diseño de mezclas con las harinas de *J. curcas* y de nopal.
- Determinar el contenido nutrimental en las harinas de *J. curcas* y nopal antes y después de ser fermentadas por 0, 24, 72 y 144 h.
- Realizar un análisis de contenido calórico en las mezclas antes y después de ser fermentadas por 0, 24, 72 y 144 h.
- Determinar el grado de inactivación de los compuestos antinutricionales (ésteres de forbol, ácido fítico y saponinas) debido a la fermentación en estado sólido utilizando *Saccharomyces cerevisiae* en los diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 72 y 144 h) para cada mezcla de harina de *J. curcas* y nopal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de *J. curcas* se recolectaron de una huerta que ubicada en el Ejido La Campana en Culiacán, Sinaloa, con las coordenadas N 24°51´23"; O 107°12´56", y en el caso del nopal forraje se obtuvo de una parcela que se encuentra en el poblado Imala.

5.1. Obtención de las Harinas de *J. curcas* y Nopal

Siguiendo el protocolo que utiliza el laboratorio de Toxicología de CIAD Unidad Culiacán. Se inició con el descascarillado del fruto y se obtuvo un total de 20 kg de semilla aproximadamente. Posteriormente se le retiró la testa a la semilla para obtener el germen intacto, esto se realizó con una descascarilladora, la cual tiene una capacidad de 50 kg/h con un consumo energético de 1500 W. El proceso consistió en introducir las semillas en el recipiente que está en un cono giratorio que tiene caucho ayudando a que se obtenga el germen completo. La segunda etapa es la expulsión de la cáscara por medio de un ventilador, estos son elementos más livianos y fáciles de salir, el germen se recuperó en un compartimiento secundario. Una vez obtenido el germen de las semillas de *J. curcas* estos fueron sometidos a una extracción de su aceite con una prensa en frio (KOMET DD 85G). La torta, parcialmente desgrasada, fue colocada en una planta extractora de aceite por solvente que tiene una capacidad de 200 Kg, cuenta con una caldera de agua y vapor de 200 L con un consumo energético de 21,000 W; además de tener un chiller de 3 t con un consumo de 5000 W y con un compresor de 90 L con un consumo energético de 4000 W. El funcionamiento de este equipo se basa en el principio del ciclo de hexano, el cual permitió el arrastre del aceite sobrante de la torta, ayudando a separar el aceite del solvente, este proceso duró alrededor de 16 h. Finalmente se obtuvo una harina de *J. curcas* (HJC), con un peso de 12 Kg aproximadamente, la cual fue llevada a la estufa (TERLAB) a 50 °C para evaporar el solvente que haya quedado, posteriormente fue almacenada a 5 °C hasta su respectivo uso (Figura 3).

Figura 3. Proceso de obtención de HJC. a) Descascarillado de semillas de *J. curcas*, b) Germen de *J. curcas*, c) Prensado en frío del germen de *J. curcas*, d) Planta de extracción de aceite y e) Harina de *J. curcas*

Para la obtención de la harina de nopal (HN) se siguieron los protocolos de limpieza del laboratorio de Toxicología de CIAD Unidad Culiacán. Se realizó un lavado de cada penca de nopal, para esto se utilizó jabón líquido comercial, posteriormente se dejó remojar en agua con una solución de cloro al 1% por 10 min. Una vez limpias las pencas, se colocaron en una mesa de manera separada para su secado. Posteriormente se cortaron en pequeños trozos y se deshidrataron en una estufa (TERLAB) por 24 h a 80 °C. Finalmente, una vez que el nopal fue deshidratado, se pulverizó con ayuda de una licuadora casera (Osterizer), después se pasó por un tamiz del número 30, al final se obtuvo 6 Kg de harina de nopal (Figura 4).

Figura 4. Proceso de obtención de HN. a) Lavado y desinfección de los nopales, b) Partición de nopales, c) Nopales picados, f) Secado de nopales, f) Molienda de nopal seco y g) Harina de nopal seco

5.2. Diseño Experimental para las Mezclas de Harinas

Los diseños de mezclas se utilizan para diferentes actividades de diseño y desarrollo de productos en situaciones industriales que implican fórmulas o mezclas. En estas situaciones, las respuestas dependen de las diferentes proporciones de cada ingrediente que incluya la mezcla, es por eso que se utilizó este diseño experimental en nuestro trabajo, utilizando un software Minitab[18]. En la Figura 5, se observa el gráfico del diseño simplex con los puntos seleccionados de las mezclas que se realizaron, el criterio que se tomó para la elección fue observar que mezcla contenía mayor cantidad de HJC, debido que es nuestra biomasa principal. En la Cuadro 1, se observa las diferentes concentraciones de los tres niveles (harina de *J*, *curcas*, harina de nopal y levadura) que se tomaron en cuenta para la formulación de la mezcla, es decir, para la M1 su concentración fue de 18.18 g

de HJC, 18.18 g de HN y 0.03 g de levadura, mientras que en la M2 esta formulada con 31 g de HJC, 5.35 g de HN y 0.05 g de levadura, por último, en la M3 contenía 25.25 g de HJC, 11.11 g de HN y 0.04 g de levadura. Además, también se muestra la concentración de los datos fijos, en el caso del H_2O fue de 60 ml y de sacarosa fue de 3.6 g. No obstante, las variables de respuesta fueron la cuantificación de presencia de EF, contenido de compuestos antinutricionales y nutricionales en cada mezcla en los diferentes tiempos de fermentación.

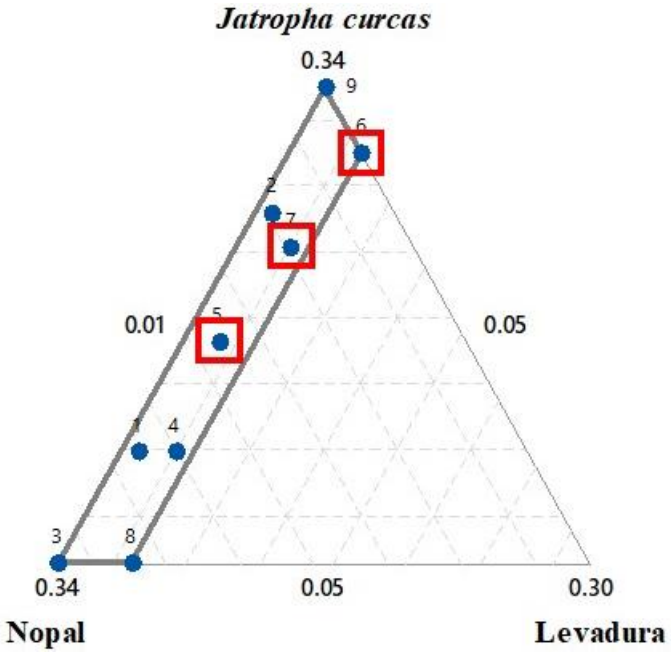


Figura 5. Gráfica de diseño simplex de cantidades de las mezclas

Cuadro 1. Cantidades en gramos de cada harina para cada mezcla

Mezclas de harinas	**Niveles**			**Datos fijos**		
	Harina de *J. curcas*	Harina de Nopal (*Opuntia* spp)	Levadura (*S. cervisiae*)	H_2O (mL)	Sacarosa	**Total**
M1	18.18	18.18	0.03	60	3.6	100
M2	31.00	5.35	0.05	60	3.6	100
M3	25.25	11.11	0.04	60	3.6	100

M1; Mezcla 1, M2; Mezcla 2 y M3; Mezcla 3

5.3. Fermentación en Estado Sólido

Las FES se realizaron en las diferentes mezclas que se determinaron con el diseño experimental de mezclas que se mencionó anteriormente (Cuadro 1). Siguiendo la metodología modificada de Sharawy *et al*. (2016), cada mezcla, con sus tres réplicas, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 150 mL. Posteriormente, estos matraces se colocaron en una autoclave a 121 °C por 20 min, y se dejaron enfriar. Se agregó a cada matraz la levadura de *S. cerevisiae* y el azúcar (5 g), se homogenizó y se adicionó 55 mL de agua destilada estéril, se cubrió cada matraz con un tapón y un airlock, el cual permitió el paso de gases en su entorno reduciendo así el cambio de presión en el recipiente y su pérdida de aire. Finalmente, los matraces se llevaron a incubar a 37 °C en una cámara de aireación (Thermo Fisher Scientific) (Figura 6), en diferentes tiempos (0, 24, 72 y 144 h).

Figura 6. Fermentación en estado sólido de las mezclas

Una vez cumplido el tiempo, se colocaron en un desecador para que se enfriaran a temperatura ambiente. Posteriormente cada mezcla se colocó en charolas de aluminio y se llevaron a una estufa (TERLAB) a 80 °C por 24 h para detener el crecimiento microbiano. Una vez que las mezclas se deshidrataron, se pulverizaron con una licuadora (Osterizer) para obtener una harina fina de cada mezcla y se almacenaron a 5 °C hasta sus respectivos análisis.

5.4. Análisis Nutrimentales

Siguiendo los métodos establecidos por la AOAC (1999), se realizaron análisis proximales a las mezclas de las harinas (HJC + HN) antes y después de la fermentación.

5.4.1. Humedad

La humedad se determinó con el método 10.184 de la AOAC (1999), donde se pesó 2 g de muestra en crisoles a peso constante, se colocaron en un horno (TERLAB) a 80 ºC durante 16 h hasta obtener un peso constante realizar los respectivos cálculos.

(1)

$$\% \text{ Humedad} = \frac{Pi - Pf}{Pi} X\ 100$$

En donde:
Pi= Peso inicial
Pf= Peso final

5.4.2. Cenizas

El contenido de cenizas se determinó de acuerdo al método 923.03 de la AOAC (1999). Se pesó 1 g de muestra, la cual se colocó en un crisol de porcelana de peso constante para llevarlo a incinerar en una mufla aproximadamente a 550 °C por 12 h. Pasado el tiempo se enfriaron en un desecador y se pesaron hasta que alcanzaron la temperatura ambiente.

$$(\mathbf{2}) \qquad \%\ \text{Cenizas} = \frac{\text{Pi} - \text{Pf}}{100 - (\text{gramos de muestra X } 100)}$$

En donde:

Pi= Peso inicial

Pf= Peso final

5.4.3. Grasa

Se determinó el contenido de grasa cruda de acuerdo al método 920.39 de la AOAC (1999). Las extracciones se realizaron usando 2 g de muestra. Posteriormente se utilizó el equipo Soxhlet, el cual consiste en que la muestra se coloca en un dedal y se pone dentro de la unidad de extracción, se conectó al matraz de peso constante con éter de petróleo, se llevó a ebullición a una temperatura de 300 °C por 4 h. Se retiró el solvente por la unidad de extracción y se dejó el matraz con grasa a peso constante en una estufa a 80 °C por 12 h, para después pesar los matraces y hacer los cálculos correspondientes.

$$(\mathbf{3}) \qquad \%\ \text{Extracto etéreo} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

5.4.4. Fibra Cruda

La determinación de fibra cruda se realizó por el método 988.05 de la AOAC (1998), se llevó a cabo mediante la pérdida de peso, por la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio diluidos. Se utilizó el residuo (muestra seca y desgrasada) de la muestra que proviene de la determinación del extracto etéreo, se colocó en un matraz erlenmeyer y se le agregó 50 mL de la solución de ácido sulfúrico 1.25%, se hirvió por 30 min en un equipo de fibra cruda, después se enfrió y se le realizaron lavados. El residuo insoluble se pasó a un matraz Erlenmeyer y se le agregó 200 mL de hidróxido de sodio al 1.25%, posteriormente se volvió a hervir por 30 min, se enfrió y se filtró con un papel filtro (Whatman núm. 40). Después se realizaron lavados con ácido sulfúrico, agua caliente y alcohol etílico. Por último, se colocaron las muestras en papel filtro dentro de un crisol a peso constante y se dejaron por una hora a 100 °C en una mufla, posteriormente se enfriaron en un desecador y se registró peso para sus respectivos análisis.

$$(\mathbf{4}) \quad \%\ \text{Fibra Cruda (base seca)} = \frac{(\text{Peso del residuo insoluble} - \text{Peso de cenizas})}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$(\mathbf{5}) \qquad \%\ \text{FibraCruda (base humeda)} = \frac{\text{A} \times (100 - \text{B})}{100}$$

Donde:

A = % Fibra Cruda (en base seca)

B = %Humedad de la muestra

5.4.5. Proteína Cruda

Se usó el método 46.12 de la AOAC (1999), para la determinación de nitrógeno en un sistema de

micro Kjeldahl. Se digirió 0.2 g de muestra, con 5 mL de ácido sulfúrico y mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una temperatura de 200 °C. En la destilación de la muestra, previamente se diluyo con 10 mL de agua, y se emplearon disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% como indicador para recibir el destilado. La titulación se llevó a cabo con una disolución valorada de HCl 0.1 N. Posteriormente, la proteína cruda se calculó por multiplicación del contenido de nitrógeno total por el factor 6.25.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{\text{H} \times \text{N} \times 0.01401 \times 100}{\text{gramos de muestra}} \quad (6)$$

Donde:

H = mililitros gastados de HCl

N = Normalidad de HCl

Fc = Factor de corrección dependiendo de la muestra que se esté analizando.

5.4.6. Carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos que están formados por carbono, hidrógeno y oxígeno en proporciones de 6:12:6. Estos se dividen en tres grupos; monosacáridos (ejemplo: glucosa, fructosa, galactosa), disacáridos (ejemplo: sacarosa, lactosa, maltosa) y polisacáridos (ejemplo: almidón, glicógeno, celulosa). Estos compuestos durante el metabolismo se utilizan para poder producir energía, y se libera dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) (Latham, 2002). Siguiendo lo propuesto por Sniffen *et al.* (1992) modificada se determinó por diferencia el contenido total de carbohidratos de cada muestra, como se observa en la fórmula siguiente;

$$\text{Contenido total de carbohidratos} = 100 - (\text{PC} + \text{C} + \text{G} + \text{FC}) \quad (7)$$

Donde:

PC = %Proteína Cruda

C = %Cenizas

G = %Grasa

FC = %Fibra Cruda

5.5. Contenido de Calorías

Siguiendo la metodología realizada por Tirado *et al.* (2015). Se pulverizaron las muestras hasta obtener una harina muy fina. Se prensaron pastillas de 0.2 ± 0.01 mg de cada muestra y se colocaron en la capsula de combustión tras saturarla de oxígeno en el calorimet (Calorimetric Thermometer Parr® 6772 y Semimicro Calorimetric Parr® 6725) (Figura 7). El contenido energético se expresa en calorías o Joule y es lo que permite a los organismos realizar todas sus funciones esenciales para vivir. Es la medida más precisa del contenido nutricional de los alimentos.

Figura 7. Calorimetric Thermometer Parr® 6772 y Semimicro Calorimetric Parr® 6725

5.6. Cuantificación de Ésteres de Forbol (EF)

5.6.1. Preparación de Extracto

Siguiendo las metodologías modificadas de Makkar *et al.* (2007) y Devappa *et al.* (2013), se prepararon los extractos de las mezclas. Se pesó un 1 g de cada muestra en una balanza analítica (Quintix Sartorius) y se colocaron en tubos de ensayo de 10 mL, al cual se le agregaron 10 mL de metanol para HPLC, grado de pureza de 99.9% (Sigma-Aldrich), se sonicaron en un agitador ultrasónico (Modelo 2800 Branson) a 240 W por 25 min en condiciones frías (15 °C). Posteriormente el sobrenadante se filtró con papel filtro (Whatman núm. 40) en un matraz bola de 250 mL y se colocaron en un rotoevaporador (Mod R-215 Buchi), después se le agregó 500 µL de metanol para HPLC, grado de pureza de 99.9% (Sigma-Aldrich) y se agitaron en el ultrasónico por 2 min. Por último, se volvió a filtrar el sobrenadante con un acrodisco (Millex) de 0.45 µm y se recolectó en un vial ámbar para ser almacenado a -15 °C hasta su respectivo análisis (Figura 8).

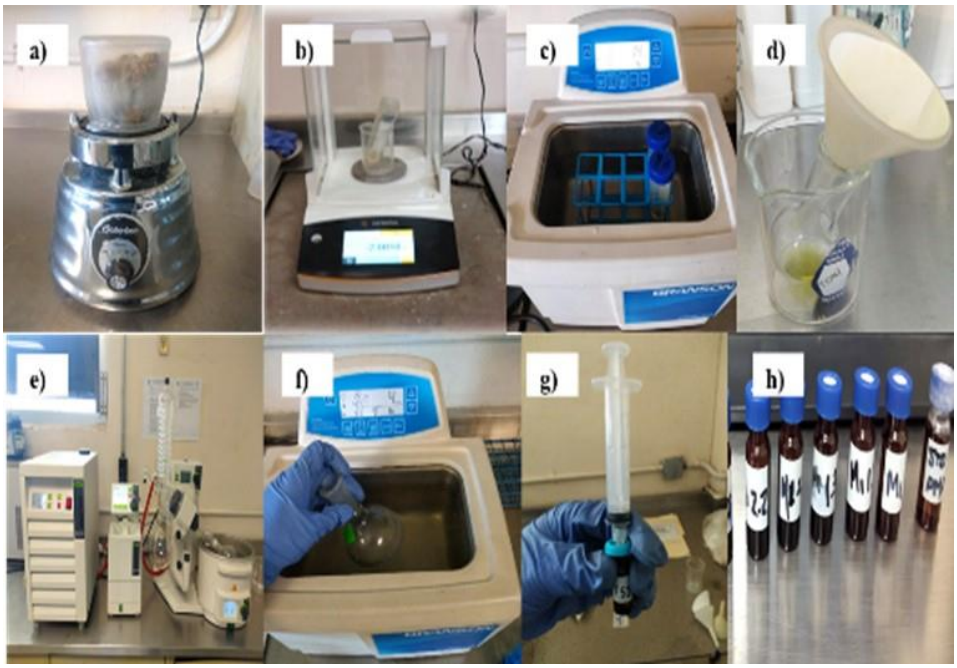


Figura 8. Proceso de extracción de EF. a) Trituración de muestra, b) Pesaje de muestra, c) Sonicación de muestra, d) Filtración de muestra, e) Rotoevaporador con muestra, f) Sonicación de extracto de muestra, g) Filtración de la muestra con acrodisco y h) Extractos de muestras.

5.6.2. Análisis Cromatográfico

Con un aplicador semi-automático (Limonat 5, CAMAG) (Figura 9), se aplicaron 6 µL de cada muestra en bandas de 8 mm de longitud sobre placas de aluminio TLC Silica Gel 60 F254 de 20 x10 cm. Las placas fueron desarrolladas en una cámara cromatográfica (CAMAG), previamente saturada por 20 min, con una mezcla de acetona-éter de petróleo 4:6 (v/v) como fase móvil. Una vez alcanzado el frente de solvente (85 mm), las placas se dejaron secar con aire frío por 5 min. Las placas se visualizaron en una cámara de luz UV (Cabinet 4, CAMAG) a 254 y 366 nm. Posteriormente se realizó el escaneo densitométrico empleando un escáner (TLC Scanner 4, CAMAG) con una absorbancia de una longitud de onda de 280 nm con lámpara de deuterio y tungsteno (Figura 9). Esto permitió la evaluación de los cromatogramas y Rf generados para cada muestra. Se compararon los espectros de absorción UV (200 a 400 nm) tanto la aplicación de la muestra como el escaneo fueron controlados por el software visionCATS, versión 2.4 (CAMAG, Suiza).

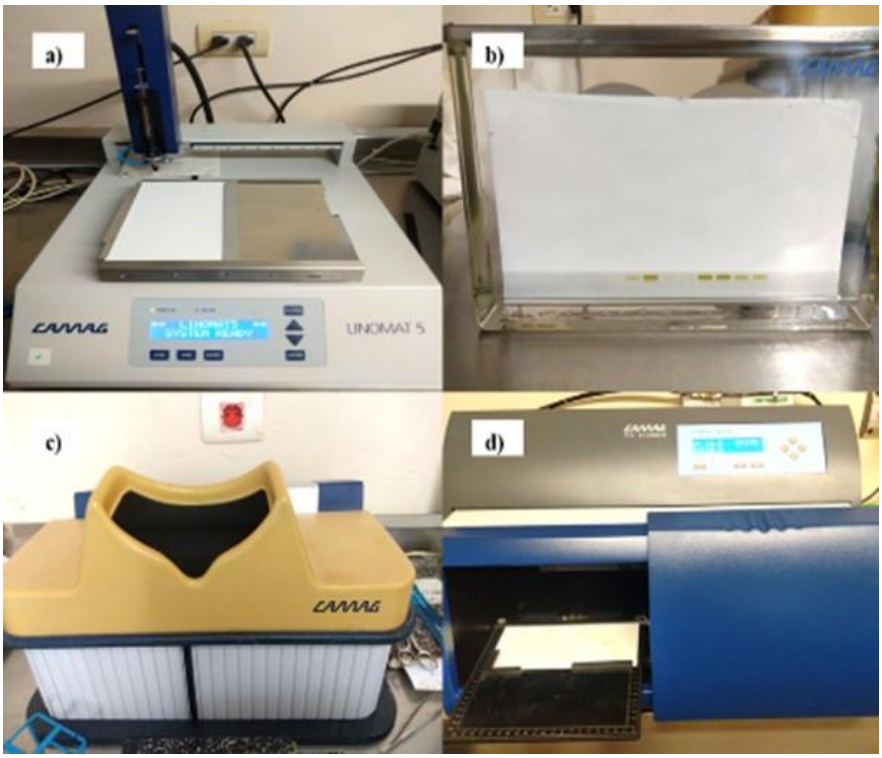


Figura 9. Proceso de análisis cromatográfico. a) Aplicación de la muestra, b) Fase móvil de la placa, c) Detección por luz UV, d) Lectura del cromatograma

Para determinar las concentraciones de EF en las mezclas antes y después de ser fermentadas, se utilizó la ecuación 8 y 9, que previamente se obtuvieron de una curva de calibración del compuesto estándar Forbol 12 Miristato 13 acetato (PMA):

$$Y\ 0\ 0.0105X\ +\ 0.00007 \qquad (\mathbf{8})$$

Despejando X, donde Y es el área obtenida de los picos detectados como EF de las muestras;

$$X = ((Y - 0.000079)\ /0.0105 \qquad (\mathbf{9})$$

5.7. Análisis de Compuestos Antinutricionales

5.7.1. Determinación de Ácido Fítico

Se realizó mediante el método de Vaintraub y Latpeva, (1988) con modificaciones (Figura 10). Se pesó 0.5 g de cada muestra, se le añadió 10 mL de HCI al 3.5%, después se llevó a agitación por 1 h. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min y se utilizó el sobrenadante. En un tubo de ensayo de 10 mL se agregó 200 µL de muestra y 1800 µL de agua y se añadió 1 mL de reactivo de Wade (30 mg de $FeCl_3.6H_2O$ y 300 mg de ácido sulfosalicílico y se aforó a 100 mL con agua destilada), con la ayuda de un vortex (Vortex-2 Genie) se agitaron los tubos por 1 minuto. Posteriormente, se leyó en un espectrofotómetro a 500 nm, usando agua como blanco. La curva de calibración se realizó a partir de una solución patrón de fitato de sodio (SIGMA) 4.8 $mg.g^{-1}$; de la cual se tomaron diferentes volúmenes con intervalo de 0 a 1 mL y se añadió agua destilada para tener un volumen de 2 mL, posteriormente se añadió 1 mL de reactivo de Wade y se agitaron por 1 minuto en el vortex. Los resultados se reportaron en mg de ácido fítico. g de muestra $seca^{-1}$.

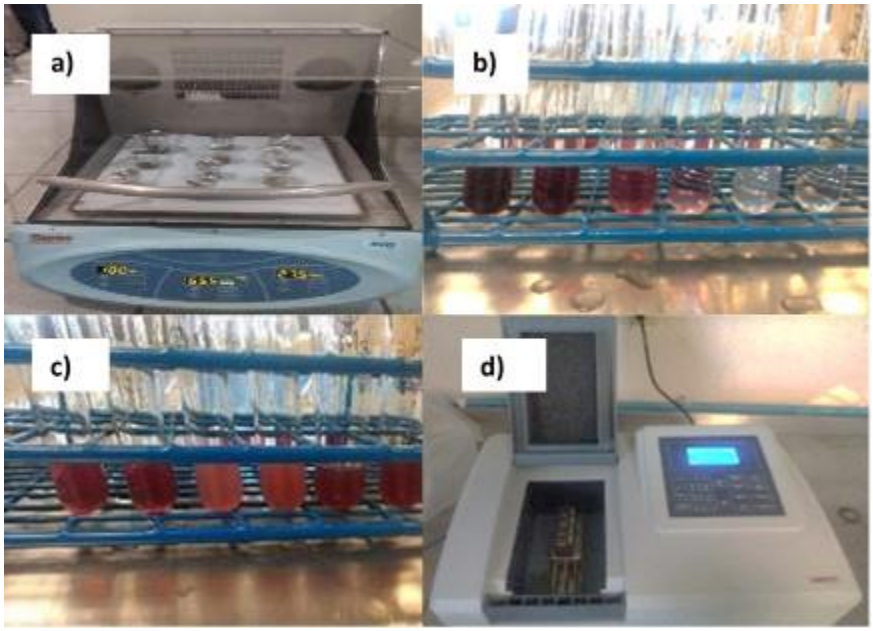


Figura 10. Proceso de determinación de ácido fítico. a) Agitación de muestras, b) Curva de calibración, c) Muestras y d) Espectrofotómetro – UV

5.7.2. Determinación de Saponinas

La determinación de saponinas se realizó siguiendo la metodología de Hiai *et al.* (1976) con modificaciones. Se tomaron 0.5 g de muestra, se le añadió 10 mL de metanol acuoso al 80% en un tubo Corning de 50 mL, después se agitó por 12 h una placa de agitación. Posteriormente se llevó a centrifugación por 10 min a 10000 rpm y se recolectó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 mL de metanol al 80% y se volvió a centrifugar, este proceso se repitió 3 veces más. Se obtuvieron 25 mL de sobrenadante y se tomaron 0.2 mL en un tubo de ensayo para agregarle 50 µL de metanol al 80% y 0.125 mL de reactivo de vanillina al 8% (802.8 mg de vanillina en 10 mL de metanol absoluto). Se colocó en un baño de hielo, donde se le agregó lentamente por las paredes del tubo 2.5 mL de H_2SO_4 al 72% (72 mL de ácido sulfúrico en 28 mL de agua destilada). Una vez adicionado el ácido, la muestra se retiró del baño de hielo y se agitó en un vortex por 3 min. Las muestras (Figura 11a) se calentaron en una tina con agua al 60 °C por 10 min y después se enfrío en un baño de hielo. Por último, las muestras se colocaron en celdas para medirles la absorbancia inmediatamente a 544 nm en un espectrofotómetro (Figura 11b), usando un reactivo blanco y con una curva de calibración de diosgenina.

La curva de calibración (Figura 11c) se realizó a partir de una solución patrón de diosgenina 0.5 $mg.g^{-1}$ (10 mg de diosgenina de la marca SIGMA y se disolvió en 20 mL de metanol), en base a esta solución se tomaron diferentes volúmenes con intervalos de 0 a 0.250 mL en tubos de ensayo de 10 mL, después se agregó metanol al 80% para tener un volumen final de 0.250 mL y se realizaron los mismos pasos que en las muestras. Los resultados que se obtuvieron se reportaron en mg equivalentes de diosgenina. g de muestra $seca^{-1}$.

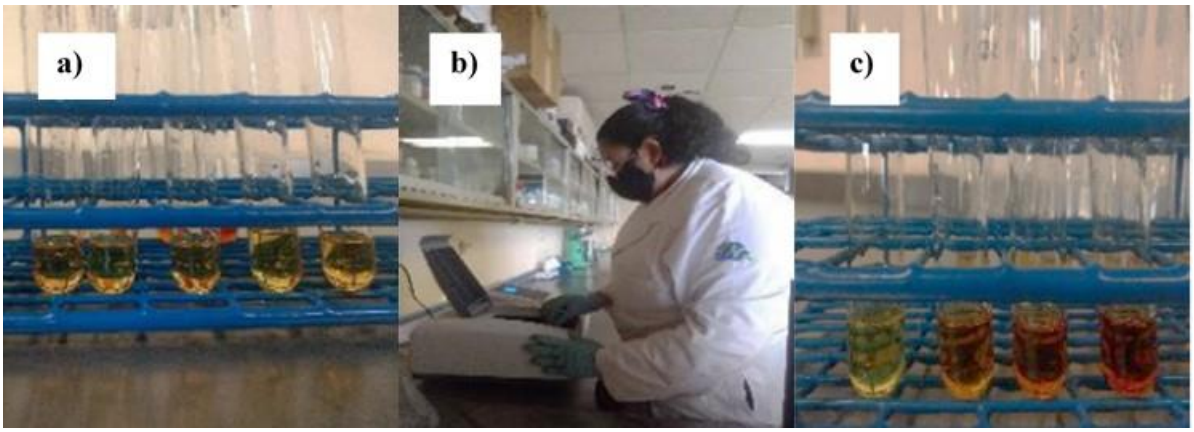


Figura 11. a) Muestras, b) Lecturas en el espectrofotómetro - UV y c) Curva de calibración

5.8. Análisis Estadístico

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de modelo lineal (ANOVA), y la significancia de las diferencias entre las medias se probaron utilizando una prueba de Dunnet ($P<0.05$), el software que se uso fue Minitab[18]. Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis Nutrimental

6.1.1. Harina de *J. curcas* y Harina de Nopal

En la Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos después del análisis proximal de la harina de *J. curcas* (HJC) y harina de nopal (HN). El contenido de proteína cruda de la HJC fue de 50.41% valor alto comparado a lo reportado por Martínez *et al.,* (2010), con valores que van desde 24 a 33%, en cambio en la HN fue de 5.80% resultado que es similar a los parámetros reportados por Stintzing y Carle (2005), a pesar de que ellos realizaron el análisis en cladodio fue de 0.5 – 1 %, sin embargo, también analizaron materia seca de cladodios y como resultado fue entre un 6 a 19%. En el caso de la HJC su contenido de humedad fue de 9.18%, este resultado fue menor a lo reportado por Escoto *et al.* (2013), debido a que ellos obtuvieron 4.02% de humedad; mientras que en la HN fue de 3.83%, resultados convenientes para las dos harinas, las cuales se pueden incluir en alimentos para consumo animal en específico a las tilapias del Nilo como lo demuestran estudios realizados por Tirado *et al.* (2015), donde ellos trabajaron con una humedad entre 11 a 15%, utilizando harina de *J. curcas* desgrasada en dietas para tilapias del Nilo. El contenido de grasa de la HJC fue de 1.51%, más bajo que el que reporta Escoto *et al.* (2013) de un 13.1%, esto debido a que el proceso de extracción de la grasa establecido en este estudio fue más eficiente. Para la HN el contenido de gas fue de 1.43% parámetro que entra con los valores reportados por Stintzing y Carle (2005). El contenido de ceniza y fibra cruda en el caso de la HJC fue de 9.92% y 6.65% respectivamente, mientras que en la HN fue de 20.37% de ceniza y 9.31% de fibra, valores altos comparados con los reportados por Abdessemed *et al.* (2014) el cual fue de 1.9% en ceniza y en fibra cruda fue 1.10%. El contenido de cenizas y fibra cruda son importantes refiriéndose en términos de suficiencia para las harinas de estas materias debido a que pueden ser compuestos esenciales en la elaboración de alimentos para animales.

Cuadro 2. Contenido nutrimental (%) de la harina de *J. curcas* (HJC) y harina de nopal (HN)

Muestras	Humedad	Lípidos	Proteínas Cruda	Cenizas	Fibra cruda	Carbohidratos (por diferencia)
HJC	9.18 ± 0.09	1.51 ± 0.35	50.41 ± 2.14	9.92 ± 0.25	6.65 ± 1.81	22.28
HN	3.83 ± 0.23	1.43 ± 0.16	5.80 ± 0.41	20.37 ± 0.12	9.31 ± 0.70	59.2397

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
HJC; Harina de *J. curcas* y HN; Harina de nopal

6.1.2. Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas

El efecto del proceso de fermentación en la composición proximal para la mezcla 1 (M1) en los tres tiempos de fermentación se puede observar en la Cuadro 3. El contenido de proteína cruda pasó de 26.28% a un 37.01%, obteniendo un aumento 10.73% después de 144 h de fermentación. Este resultado es mayor al reportado por Saha y Ghosh (2013), ellos fermentaron solamente harina de *J. curcas* desgrasada y tuvieron un aumento del 5% de proteína cruda, este incremento de proteína puede atribuirse a la adicción de proteína celular de la *S. cerevisiae* (Sharawy *et al.*, 2016). Además, la M1 contiene HN lo cual, contribuyó al aumento de proteína cruda debido a que estudios realizados por Araujo *et al.* (2005) muestran un aumento del 26% de proteína en especies de *Opuntia.* El contenido de lípidos tuvo una reducción no significativa del casi 1%, esto es ocasionado cuando los microorganismos de la fermentación buscan otra fuente de energía cuando los azúcares empiezan a escasear (Eka, 1980). En el caso del contenido de cenizas en las primeras horas de fermentación tuvo un aumento entre 1 a 2%. Sin embargo, conforme aumentó el tiempo de fermentación, disminuyó el contenido de cenizas. Esto se puede deber a una separación en la estructura de los minerales en el agua durante la fermentación (Seena *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). En el contenido de fibra cruda no hubo una diferencia significativa entre los tiempos de fermentación y la mezcla de harinas.

Cuadro 3. Contenido nutrimental (%) de la mezcla 1 (M1) a diferentes tiempos de fermentación

	M1 Fermentación a:			
Muestra	0 h	24 h	72 h	144 h
Humedad	4.73 ± 0.0008	0.67 ± 0.06	0.66 ± 0.04	2.55 ± 0.04
Cenizas	16.99 ± 0.79	19.51 ± 0.02	18.09 ± 0.15	16.73 ± 0.45
Proteína cruda	26.28 ± 0.26	37.63 ± 0.64	31.75 ± 0.31	37.01 ± 0.32
Lípidos	2.50 ± 0.61	2.18 ± 0.04	1.81 ± 0.27	1.60 ± 0.12
Fibra Cruda	6.44 ± 0.61	6.76 ± 0.02	7.49 ± 0.01	6.26 ± 0.29
Carbohidratos	43.06	33.25	40.2	35.85

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
M1; Mezcla 1

Los resultados de la mezcla 2 (M2) se muestran en la Cuadro 4. El contenido de proteína cruda al tiempo 0 h fue de 39.10%, a las 24 h de fermentación aumentó a 56.54%, aunque, a las 72 h tuvo una disminución de 48.98%. Esto podría deberse a que hubo una degradación de proteína por parte de los microrganismos (Eze y Ibe, 2005) debido a que se pueden llegar a transformarse en energía para que las células microbianas puedan seguir funcionando (Oladele y Oshodi, 2008). Sin embargo, a las 144 h de fermentación se incrementó el contenido de proteína nuevamente a 56.22%, dando como resultado un aumento del 17.12% desde el inicio hasta el último tiempo de fermentación, resultados que son mayores a los reportados por Hassaan *et al.* (2017). Ellos utilizaron *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus* en pasta de *J. curcas*, el tiempo de fermentación que utilizaron fue de 9 días, con ambos microorganismos obtuvieron un incremento de aproximadamente 10% en el contenido de proteína cruda. Otro estudio realizado por Herrera *et al.* (2017), donde fermentaron solamente a *Opuntia ficus-indica* usando *Kluyveromyces marxianus* por 5 días, dio como resultado un aumento del 7.82 al 16.31% en contenido de proteína cruda.

La presencia de cenizas a las 24 h de fermentación registró un ligero aumento, pero este disminuyó a las siguientes horas de fermentación, esto podría ser por la separación de la estructura de los minerales en el agua que pudo estar presente durante la fermentación (Seena *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). En el contenido de fibra cruda no hubo una diferencia significativa. En cambio, a las 24 h de fermentación el contenido de lípidos pasó de 1.44 a 3.51%, no obstante, para las siguientes fermentaciones fue disminuyendo 1% aproximadamente, debido a que la *S. cerevisiae* para continuar funcionando necesita fuentes de energía cuando comienza a escasear los azucares (Oladele y Oshodi, 2008).

Cuadro 4. Contenido nutrimental (%) de la mezcla 2 (M2) a diferentes tiempos de fermentación

M2 Fermentación a:				
Muestra	0 h	24 h	72 h	144 h
Humedad	6.8 ± 0.08	1.18 ± 0.02	1.03 ± 0.07	2.46 ± 0.15
Cenizas	12.10 ± 0.58	13.94 ± 0.25	12.06 ± 0.16	12.72 ± 0.05
Proteína cruda	39.10 ± 0.63	56.54 ± 1.58	48.98 ± 0.15	56.22 ± 0.88
Lípidos	1.44 ± 0.08	3.51 ± 0.21	2.69 ± 0.45	1.87 ± 0.07
Fibra Cruda	5.34 ± 0.01	5.23 ± 0.09	5.35 ± 0.29	4.29 ± 0.04
Carbohidratos	35.22	19.6	29.89	22.44

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
M2; Mezcla 2

Por último, en la Cuadro 5 se pueden apreciar los resultados de la mezcla 3 (M3). El contenido de proteína cruda a las 0 h fue de 39.12% y tuvo un aumento de 2 a 4% en el caso de las fermentaciones a las 24 y 144 h. Sin embargo, a las 72 h tuvo un incremento del 8%. Estas diferencias en el contenido de proteína pueden estar causado por la necesidad de *S. cerevisiae* por nuevas fuentes de energía cuando existe escases de azúcar (Oladele y Oshodi, 2008), no obstante, estos resultados son mayores a los reportados por Phulia *et al.* (2017) donde se tuvo un incremento del 2% aproximadamente en pasta de *J. curcas* fermentada con *Aspergillus niger*. Por otro lado, Flores-Hernández *et al.* (2011) publicaron los resultados obtenidos después de una fermentación en *Opuntia* spp, observaron un incremento de proteína cruda que fue de 7.08 a 33.52%; sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo ellos utilizaron una fuente de nitrógeno, sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), ocasionando que el aumento de proteína cruda fuera mayor. En el contenido de cenizas, fibra cruda y lípidos no hubo diferencia significativa durante toda la fermentación.

Cuadro 5. Contenido nutrimental (%) de la mezcla 3 (M3) a diferentes tiempos de fermentación

M3 Fermentación a:				
Muestra	0h	24 h	72 h	144 h
Humedad	5.96 ± 0.22	1.61 ± 0.05	1.99 ± 0.06	2.77 ± 0.11
Cenizas	15.06 ± 0.37	15.65 ± 0.12	16.73 ± 0.15	15.57 ± 0.25
Proteína cruda	39.12 ± 0.65	41.62 ± 1.00	47.58 ± 0.97	42.65 ± 0.30
Lípidos	2.59 ± 0.02	2.14 ± 0.14	2.08 ± 0.17	1.77 ± 0.20
Fibra Cruda	6.06 ± 0.25	6.34 ± 0.15	6.53 ± 0.17	6.35 ± 0.13
Carbohidratos	31.21	32.64	25.19	30.89

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
M3; Mezcla 3

En la Figura 12, se muestran las interacciones de cada variable en las tres mezclas. En el a) se observa el comportamiento del contenido de humedad, donde se puede apreciar que tienen un comportamiento similar entre ellas, sin embargo, existe una interacción entre M2 y M3 a las 24 h y hay otra interacción entre la M1 y M2 a las 144 h, por lo tanto, hay una diferencia significativa en los tiempos de las 24 h y las 144 h. En cambio, en el b) se observa el comportamiento del contenido de cenizas, en el cual no existe ninguna interacción entre las tres mezclas y no hay diferencia significativa.

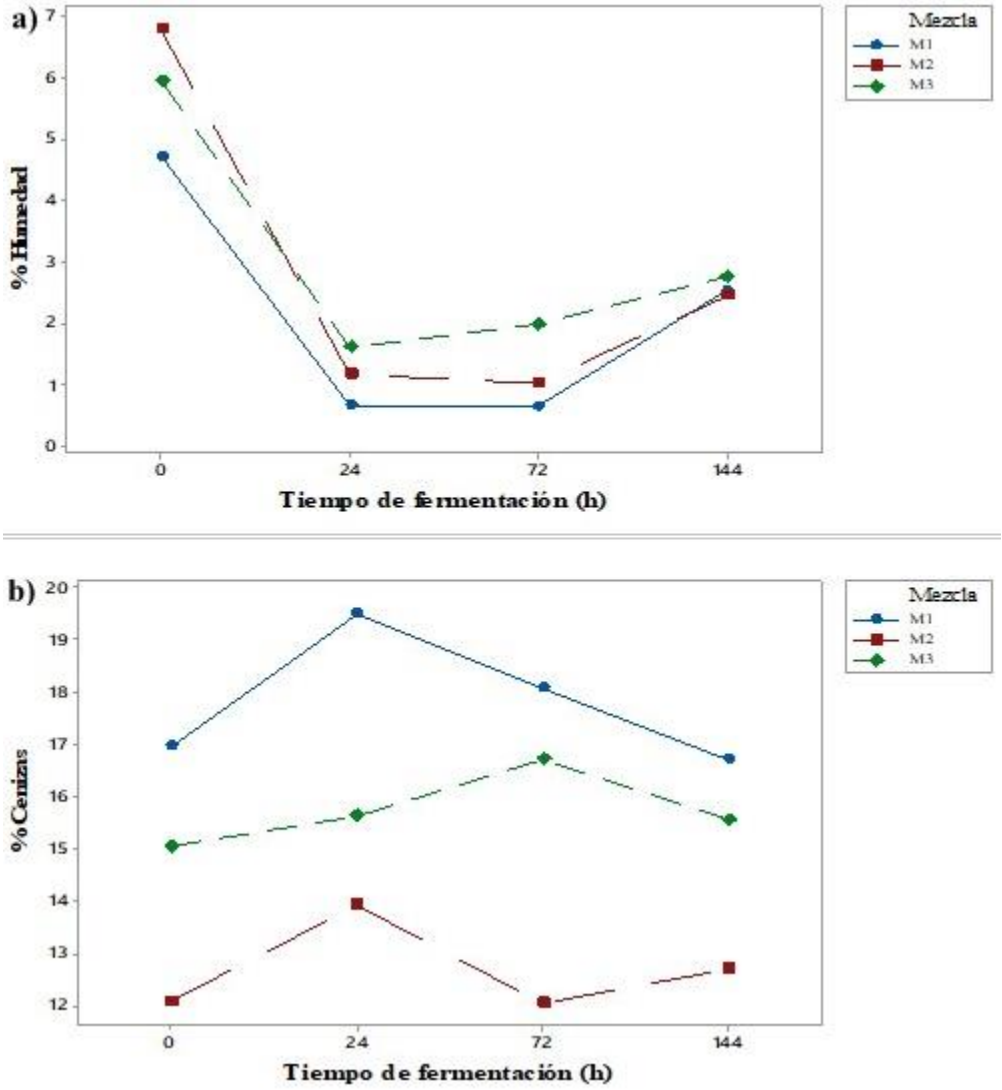


Figura 12. Gráficas de interacciones de la composición nutrimental de las mezclas (M1, M2 y M3) durante la fermentación (0, 24 72 y 144 h), a) Tiempo de fermentación (h) vs % Humedad y b) Tiempo de fermentación (h) vs % Cenizas

En la Figura 13, se observa que en el a) señala el comportamiento del contenido de proteína cruda en las mezclas y solamente se aprecia una interacción entre M2 y M3 a las 0 h de fermentación, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre los tiempos de fermentación y las mezclas. Por otro lado, en el b) se muestran las interacciones del contenido de lípidos entre las mezclas, se puede observar que cerca de las 24 h de fermentación existe una interacción de la M2 con la M1 y M3, en cuanto llega a las 24 h se presenta otra interacción entre la M1 y M3, después ya no hay más interacciones, por lo tanto, hay diferencia significativa a las 24 h de fermentación.

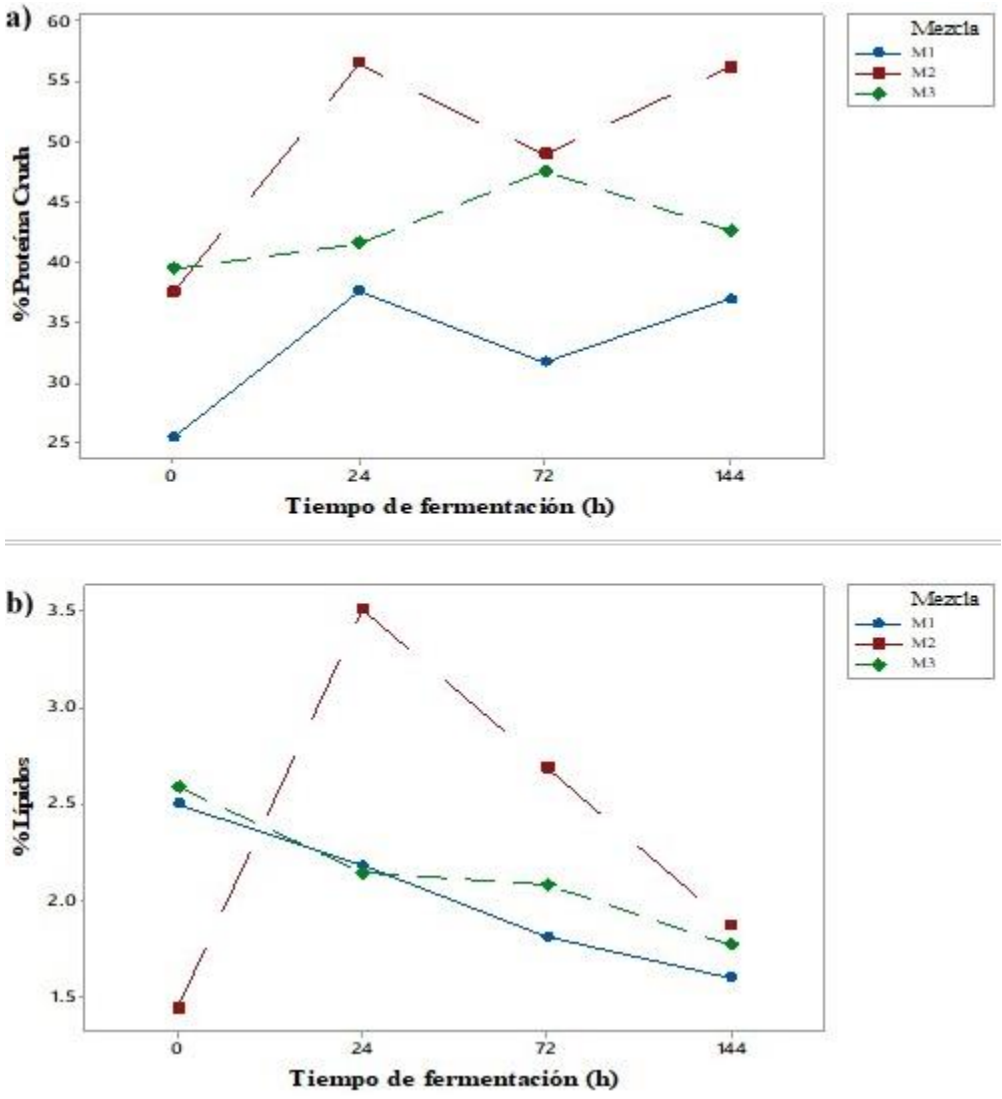


Figura 13. Gráficas de interacciones de la composición nutrimental de las mezclas (M1, M2 y M3) durante la fermentación (0, 24 72 y 144 h), a) Tiempo de fermentación (h) vs % Proteína cruda, b) Tiempo de fermentación (h) vs % Lípidos

En la Figura 14, se muestra en el a) el comportamiento del contenido de fibra curda, a las 0 h hasta las 72 h no hay presencia de alguna interacción, sin embargo, a las 144 h la M1 y M3 se observa que existe una interacción entre sí, por consiguiente, solo hay diferencia significativa en dos mezclas a las 144 h de fermentación. Por último, en el b) se observa las interacciones del contenido de carbohidratos, antes de las 24 h se observa una interacción entre la M2 y M3, posteriormente no es hasta las 72 h que existe de nueva una interacción de la M2 y M3, en cambio la M1 no tuvo ninguna diferencia significativa en comparación de la M2 y M3 que si la tuvieron en los tiempos de 24 h y 72 h de fermentación. En general, los distintos resultados que se obtuvieron, se le puede atribuir a las diferentes proporciones de HJC y HN que contiene cada mezcla.

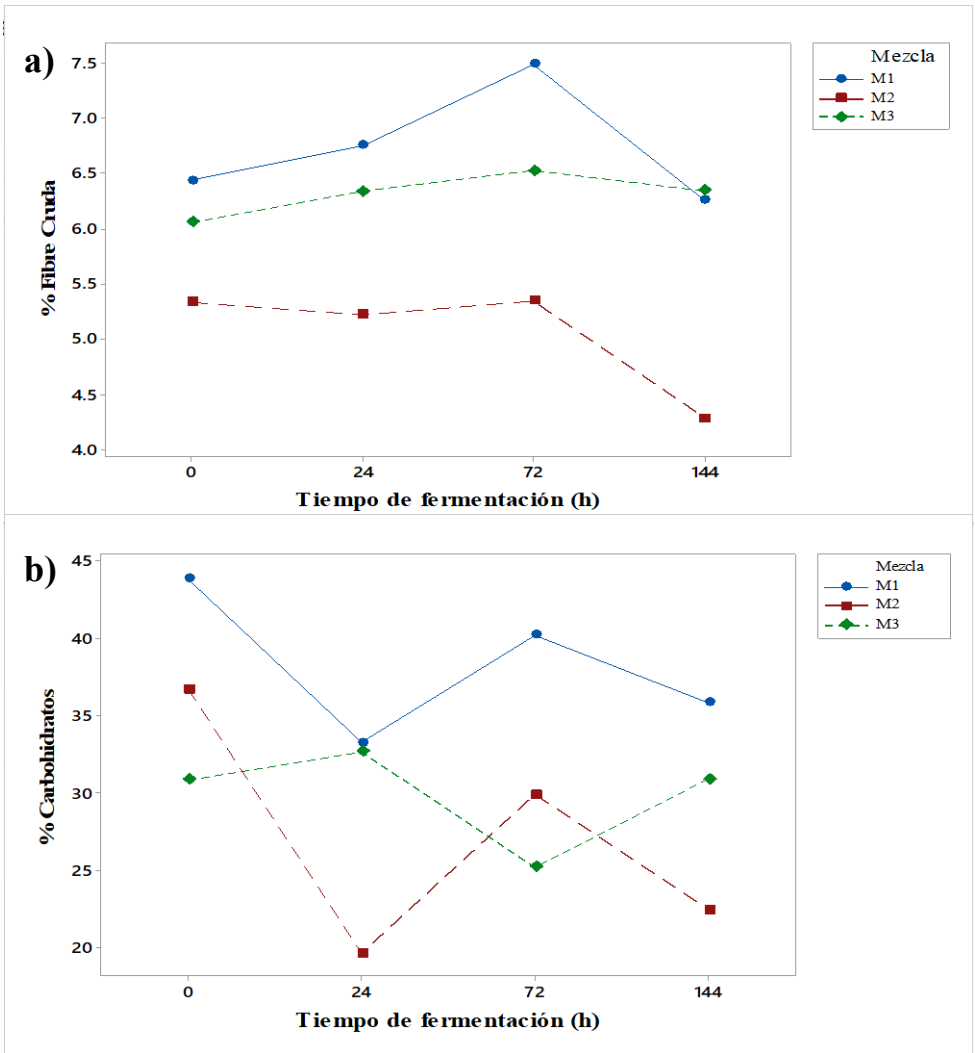


Figura 14. Gráficas de interacciones de la composición nutrimental de las mezclas (M1, M2 y M3) durante la fermentación (0, 24 72 y 144 h), a) Tiempo de fermentación (h) vs % Fibra cruda y b) Tiempo de fermentación (h) vs % Carbohidratos

6.1.3. Contenido Energético

El contenido energético calórico debe ser la principal consideración nutricional pues los organismos comen para satisfacer sus necesidades y requerimientos energéticos. La energía es la propiedad de los nutrientes que se libera durante el metabolismo oxidativo de las proteínas, carbohidratos y lípidos. Si se incrementa la energía digestible, el consumo disminuye sin afectar el consumo de nutrientes, En resumen, el contenido energético es necesario para que el organismo pueda realizar sus funciones correctamente. En la Cuadro 6 puede observar el contenido energético que presentaron cada mezcla en cada tiempo de fermentación, en la M1 se obtuvieron valores que van desde 13.32 a 14.36 kJ. g^{-1}, donde solamente tuvo un incremento de 1.04 kJ. g^{-1}, mientras que en la M2 su contenido energético al inicio fue de 15.95 kJ. g^{-1}, conforme fue avanzando el tiempo de fermentación tuvo un incremento bajo. Sin embargo, a las 144 h su valor energético fue de 16.63 kJ. g^{-1}, resultados similares a lo recomendado por Furaya (2010) que fue de 16.78 kJ. g^{-1} para juveniles de tilapia con un peso que varió desde 0.1 a 10 g. Por último, en la M3 los valores obtenidos van desde 14.57 a 15.13 kJ. g^{-1}, por lo tanto, se tiene un incremento de 0.56 kJ. g^{-1} que abarca desde las 0 h hasta las 144 h de fermentación. Debido a que la tilapia no tiene necesidad de regular su temperatura corporal, es por eso que sus requerimientos de energía son relativamente bajos. Los valores obtenidos en comparación de las tres mezclas van desde 13.32 hasta 16.63 kJ. g^{-1}. Estos resultados son ligeramente menores a los que se obtuvo por Kumar *et al.* (2011) con un valor de 21.2 (kJ. g^{-1}) al alimentar a las tilapias con una pasta desgrasada de *J. curcas* mostrando un buen desarrollo en el crecimiento de la especie.

Cuadro 6. Contenido Energético (kJ. g^{-1}) de cada mezcla de harina de *J. curcas* (HJC) y harina de nopal (HN) a diferentes tiempos de fermentación

	Fermentación a:			
Muestra	0h	24 h	72 h	144 h
M1	13.32 ± 0.01	13.84 ± 0.05	13.54 ± 0.07	14.36 ± 0.09
M2	15.95 ± 0.03	16.07 ± 0.07	16.49 ± 0.10	16.63 ± 0.06
M3	14.57 ± 0.02	14.78 ± 0.18	15.02 ± 0.02	15.13 ± 0.01

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
M1; Mezcla 1, M2; Mezcla 2 y M3; Mezcla 3

En la Figura 15 se muestra el comportamiento del contenido de energía bruta (kJ. g^{-1}) a todos diferentes tiempos de fermentación, en el cual no se presentó ninguna interacción entre ellas y los diferentes tiempos de fermentación, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre las mezclas y su contenido energético.

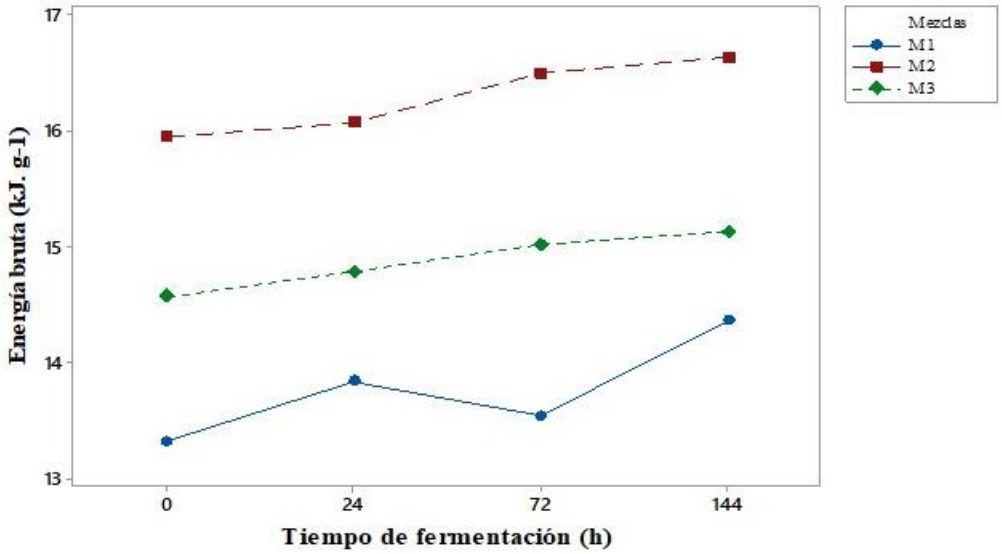


Figura 15. Gráfica de interacciones del contenido de Energía bruta (kJ. g^{-1}) de las tres mezclas vs Tiempo de fermentación (h)

6.2. Cuantificación de Ésteres de Forbol

6.2.1. Harina de *J. curcas*

Dado que los EF solo se presentan en especies del género *Jatropha*, se realizó el análisis en la harina de *J. curcas* y en las mezclas. En la Figura 16 se puede apreciar los cromatogramas del estándar de referencia PMA (Forbol 12 Miristato 13 acetato) (Figura 16a), mientras que el de las muestras de HJC (Figura 16b y 16c), se puede observar el pico característico de los EF a un tiempo de referencia (Rf) de 0.5, coincidiendo con lo reportado por Demissue y Lele (2010), que identificaron EF en cultivos de tejido de *J. curcas* a Rf de 0.36 a 0.5. De igual manera, en la Cuadro

7 se puede observar los Rf que representan los picos detectados, que van desde 0.492 a 0.519, el cual nos indica la presencia de EF en la HJC, los resultados son similares a los reportados por Beutler *et al.* (1989) y Soto-León *et al.* (2014).

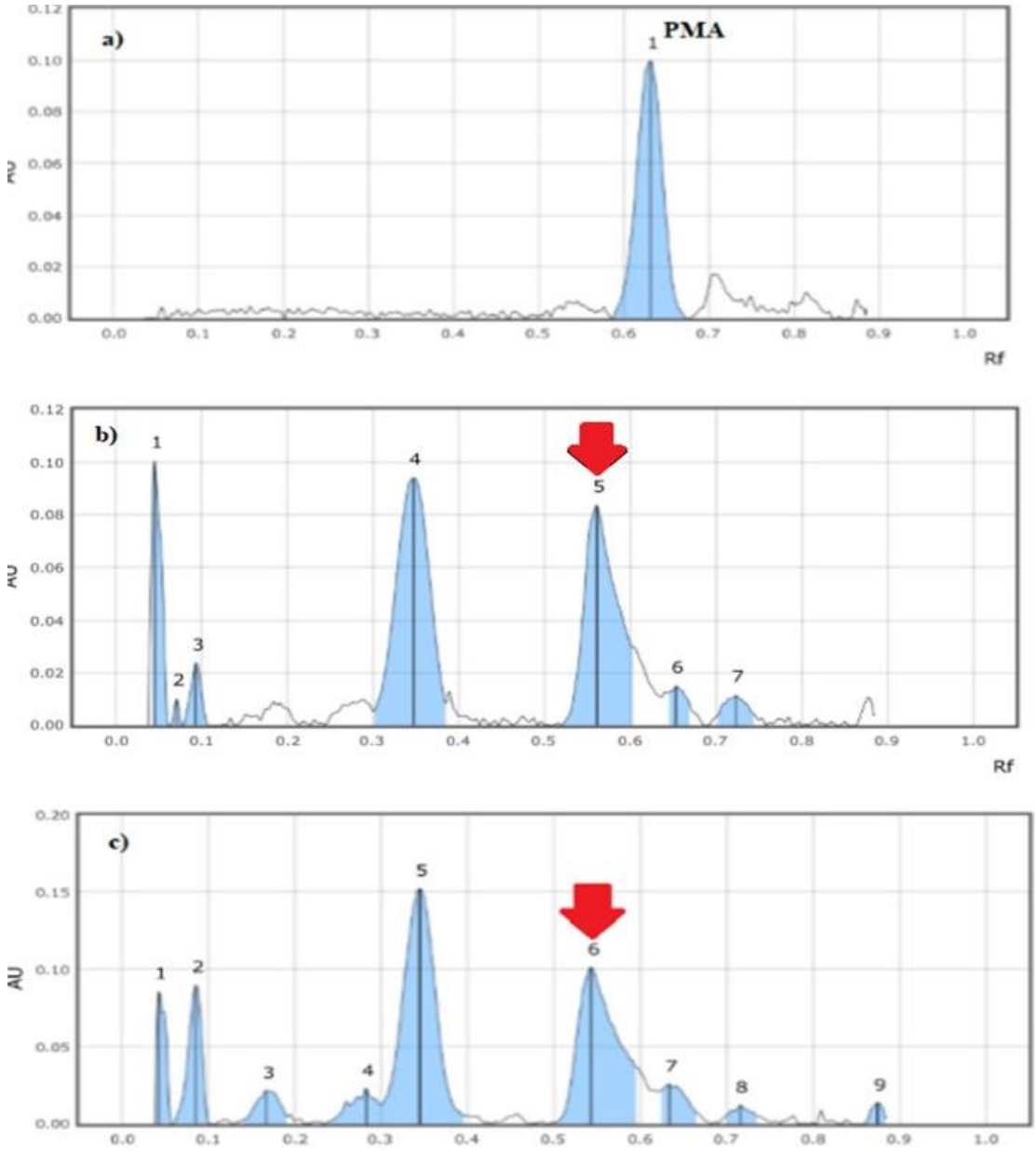


Figura 16. Cromatograma de EF a) PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) y los b) y c) son las muestras de HJC

Cuadro 7. Contenido de ésteres de forbol (mg.g^{-1}) en harina de *J. curcas* (HJC)

Figura 16	Picos	Muestra	Rf	Cuantificación (mg.g^{-1})
a)	Pico 1	PMA	0.484	1.03
b)	Pico 5	HJC 1	0.519	0.34 ± 0.05
c)	Pico 6	HJC2	0.492	0.49 ± 0.05

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
HJC; Harina de *J. curcas*

6.2.2. Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas

La cuantificación de EF se realizó a las mezclas antes y después de ser fermentadas. En la Figura 17 se puede apreciar la disminución de la concentración de EF que presentaron las tres mezclas en cada tiempo de fermentación. En la M2 y M3 tienen un comportamiento similar pero no se presenta interacción, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre ellas, sin embargo, la M1 tiene interacción con las otras mezclas a las 24 h de fermentación y para las 144 h solamente interactúa la M1 con la M2, ocasionando que a las 24 y 144 h exista una diferencia significativa.

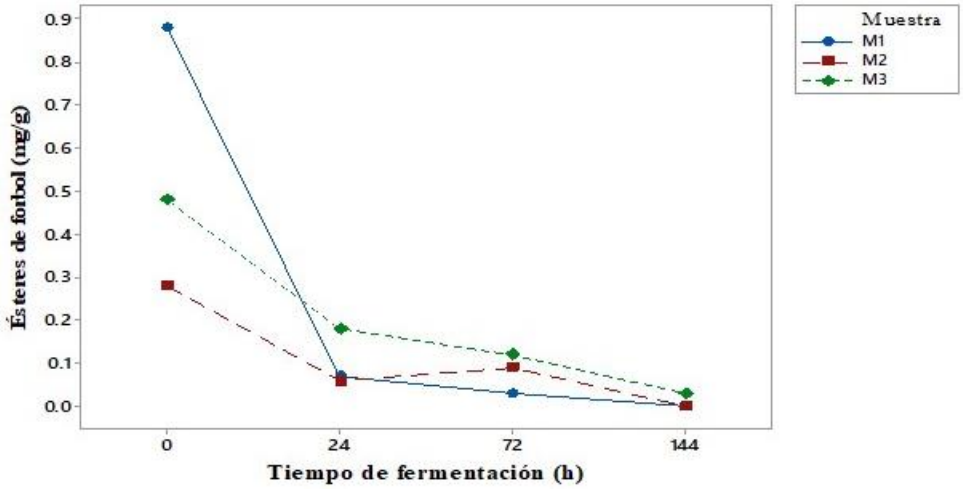


Figura 17. Gráfico de interacciones de Ésteres de forbol (mg.g^{-1}) vs Tiempo de fermentación (h)

En la Cuadro 8 se observan los resultados obtenidos de la presencia de EF en las mezclas en cada tiempo de fermentación. Los Rf detectados en la M1, el rango que se obtuvo fue de 0.42 a 0.55,

estos datos son similares a los publicados por Makkar *et al.* (1997), que reportan un rango de 0.433 a 0.521, con esto se obtuvo un área de cada pico que se muestran en los cromatogramas (Figura 18) y utilizando la ecuación 9 se logró determinar la cuantificación de la presencia de EF. Se observa que la M1 tuvo una concentración de 0.88 $mg.g^{-1}$ de EF antes de ser fermentada, después de las 24 h de fermentación la concentración de los EF se redujeron a 0.07 $mg.g^{-1}$, en las 72 h la detección de EF fue de 0.03 $mg.g^{-1}$, por lo tanto los rangos de detección de EF fueron de 0.88 a 0.03 $mg.g^{-1}$ que va desde las 0 h hasta las 72 h; mientras que a las 144 h los EF ya no fueron detectables. La degradación de los EF se llega a lograr por medio del cultivo microbiano y secreción de enzimas, además una completa caracterización de genes, enzimas y vías metabólicas responsables de la degradación de EF, además de que las esterasas, lipasas y enzimas oxidativas han llegado a participar en la degradación directa de diterpenos vegetales, como también enzimas adicionales que se involucran en la degradación de estos compuestos tóxicos en procariotas u eucariotas (Gomes *et al.*, 2018). No obstante, estos resultados son menores a los reportados por Belewu y Sam (2010), los cuales tuvieron un rango de detección que va desde 0.011 a 0.003 $mg.g^{-1}$ en 7 días de fermentación. Sin embargo, ellos utilizaron diferentes microrganismos (*Rhizopus oligosporus, Rhizopus nigericans, Aspergillus niger, Trichoderma longibrachiatum* y *Penicillium chrysogenum*) para realizar la fermentación. Debido a el uso de químicos en la pasta de *J. curcas* para su desintoxicación puede ocasionar un efecto residual al momento de ser utilizado como alimento animal, mientras que en el proceso de FES no sucede este tipo de residuales, y es una técnica que se puede llegar a adoptarse fácilmente. Además, en el cuadro 8 también muestra los porcentajes de disminución de los EF con respecto al tiempo de fermentación. Después de 24 h de fermentación se observa una disminución del 92.05%; mientras que a las 144 h se observa una degradación del 100%. Nuestros resultados superan a lo reportado por Joshi *et al.* (2011), quienes utilizaron la FES para la degradación de EF con ayuda de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo una completa degradación de EF a los 9 días de fermentación, mientras que nuestro estudio mostró un 100% de eliminación de EF a los 6 días de fermentación.

Los resultados de la M2 (Cuadro 8) muestran que el contenido de EF a las 0 h fue de 0.28 mg. g^{-1}, y este fue disminuyendo conforme aumentó el tiempo de fermentación. Se puede observar que a las 24 h se detectó solamente 0.06 mg. g^{-1} de EF. En cambio, a las 72 h su concentración fue de 0.09 $mg.g^{-1}$, no obstante, a las 144 h de fermentación no se detectó presencia de EF en la M2. Estos resultados son similares a los reportados por Veerabhadrappa *et al*. (2014), en su trabajo utilizaron

el microorganismo *Aspergillus versicolor* para llevar a cabo la FES en una pasta de *J. curcas*, donde la concentración inicial fue de 0.832 $mg.g^{-1}$ y después de 6 días de fermentación se redujo a 0.158 $mg.g^{-1}$, teniendo como resultado una degradación del 81.1% en los niveles de EF. Otro estudio realizado por Phulia *et al.* (2017), ellos después de realizar la fermentación de la pasta de *J. curcas* con *Aspergillus niger*, obtuvieron una completa degradación de EF después de 21 días de fermentación. Además, los Rf que se detectaron se encuentran en un rango desde 0.43 a 0.51, coincidiendo con estudios reportados por Demissue y Lele (2010), los cuales identificaron EF en tejidos de *J. curcas* a Rf de 0.36 a 0.5. Esto confirma que la FES es una técnica muy adaptable para llevar a cabo una detoxificación de compuestos tóxicos y antinutricionales que pueden estar presentes en algún tipo de biomasa (Joshi *et al.*, 2014). No obstante, el porcentaje de disminución de EF para la M2, a las 24 h de fermentación hubo una disminución de 78.57%; mientras que a las 72 h presentó una disminución del 67.86% de presencia de EF. A pesar de que la inhibición de los EF fue menor que a las 24 h, este resultado es favorable a comparación de otros autores donde han llevado a cabo una FES a una pasta de *J. curcas*, por un tiempo más prolongado en comparación a nuestro estudio. Por último, después de 144 h de fermentación se obtuvo una eliminación del 100% de presencia de EF.

Por último, tenemos los resultados de la M3 (Cuadro 8). Los Rf obtenidos van desde 0.42 a 0.56, entrando en los rangos reportados por Demissue y Lele (2010), ellos identificaron EF en cultivos de tejido de *J. curcas* a Rf de 0.36 a 0.5. Se observa un decrecimiento de la concentración de EF con forme va pasando el tiempo de fermentación. El contenido de EF a las 0 h fue de 0.48 $mg.g^{-1}$, a las 24 h fue de 0.18 $mg.g^{-1}$, a las 72 h su contenido fue de 0.12 $mg.g^{-1}$ y por último, a las 144 h se logró detectar 0.03 $mg.g^{-1}$ de EF, estos resultaron muestran que la fermentación con *S. cerevisiae* contribuye a la degradación microbiana de EF. Estudios realizados por Sharath *et al*. (2013) obtuvieron resultados similares a nuestro trabajo, sin embargo, ellos utilizaron 8 cepas diferentes, entre ellas *S. cerevisiae*, en el proceso de FES, obteniendo como resultado una degradación del 75% de EF a los 12 días de fermentación. Además, si se tienen las condiciones optimizadas de un cultivo en estado sólido, como lo realizaron Zhang *et al.* (2016), utilizando basilios Gram negativos, *Morganella morganii*, el cual se aislaron en semillas de *J. curcas*, obteniendo una reducción de EF del 92.78% después de haber sido incubada por 4 días. Asimismo el estudio publicado por Makkar y Becker (2009), en el cual ellos estimaron un rango de detección para una especie tóxica de *J. curcas*, estos valores van desde 0.86 a 1.48 $mg.g^{-1}$ de EF. Por lo tanto, la M3

no se considera como tóxica su biomasa, a pesar de la detección de trazas de EF encontradas a las 144 h de fermentación. El porcentaje de disminución de EF de la M3, muestran que después de las 24 h se observó una disminución del 62.5% de EF; Sin embargo, en el caso de las 72 h el porcentaje de disminución fue ligeramente menor al anterior, con una eliminación del 57.14% de presencia de EF. Finalmente, la reducción más significativa fue a las 144 h, con un 89.92% de reducción. Estos resultados, si los comparamos a los estudios realizados por Phengnuam y Suntornsuk (2013), son mayores los valores obtenidos en nuestro trabajo, debido a ellos obtuvieron una eliminación del 62% de EF en una pasta de *J. curcas* al finalizar la FES con un microorganismo del género *Bacillus*.

Cuadro 8. Contenido de ésteres de forbol ($mg.g^{-1}$) en cada mezcla en los diferentes tiempos de fermentación (h)

Figura	Picos	Muestra	Tiempo de fermentación (h)	Rf	Cuantificación de EF ($mg.g^{-1}$)	% de Disminución de EF
18a)	Pico 4	M1	0	0.513-0.549	0.88 ± 0.01	0
18b)	Picos 7-9		24	0.423-0.554	0.07 ± 0.004	92.05
18c)	Pico 4		72	0.47-0.475	0.03 ± 0.001	96.59
18d)	ND		144	ND	ND	100
19a)	Pico 7	M2	0	0.436-0.512	0.28 ± 0.01	0
19b)	Pico 5		24	0.455-0.478	0.06 ± 0.02	78.57
19c)	Pico 5		72	0.434-0.458	0.09 ± 0.003	67.86
19d)	ND		144	ND	ND	100
20a)	Pico 11	M3	0	0.547-0.569	0.48 ± 0.03	0
20b)	Pico 4		24	0.422-0.448	0.18 ± 0.008	62.50
20c)	Pico 4		72	0.536-0.549	0.12 ± 0.005	57.14
20d)	Pico 9		144	0.435-0.547	0.03 ± 0.001	89.29

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
ND = No Detectado
M1; Mezcla 1, M2; Mezcla 2 y M3; Mezcla 3

En la Figura 18, se muestran los cromatogramas de la M1. Se observa que en la Figura 18a el pico 6 representa a los compuestos de EF, mientras que en el siguiente cromatograma (Figura 18b) se

observa como disminuyó el área entre los tres picos (7, 8 y 9) que representan los EF, lo cual nos indica existe una menor concentración de este compuesto, en la Figura18c solamente se observa un pico (4) pequeño, en cambio en el último cromatograma (Figura 18d) ya no se detectó ningún pico que represente la presencia de los EF.

En la Figura 19, se observan los cromatogramas de la M2; el pico 7 (Figura19a) muestra una similitud al PMA de la Figura 16a, en cambio en la Figura19b, el pico 5 es menos alto con referencia a los otros picos, no obstante, se encuentra en la posición del pico del PMA. En la Figura19c, el pico 5 nos indica la presencia de EF, sin embargo, este tiene menor altura que el cromatograma anterior, estos resultados son similares a lo reportado por Makkar *et al.* (1997). Por último, en la Figura19d no muestra ningún pico que represente la presencia de algún EF en la M2. Por lo tanto, estos resultados muestran que una FES a las 144 h logra a una desintoxicación completa de EF.

En la Figura 20 se observa los cromatogramas de las lecturas que se realizaron de la M3. En la Figura 20a, se aprecia como el pico 11 se encuentra posicionado de manera similar al estándar del PMA; además, se puede observar que tiene el mismo comportamiento de la M1 y M2, ya que conforme va aumentando el tiempo de fermentación, el área de los picos de EF va disminuyendo.

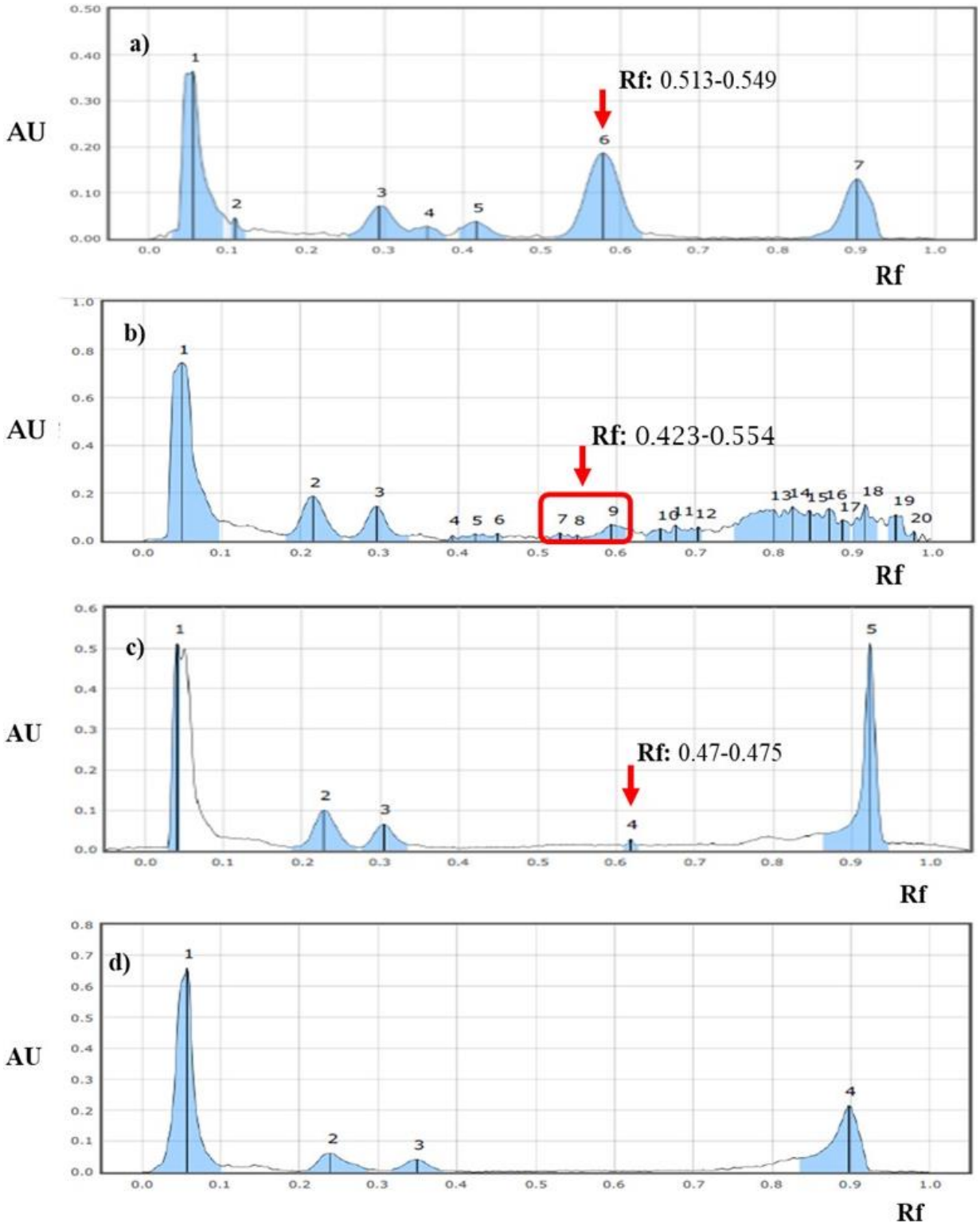


Figura 18. Cromatogramas de M1 antes y después de la fermentación, a) 0 h de fermentación, b) 24 h de fermentación, c) 72 h de fermentación y d) 144 h de fermentación

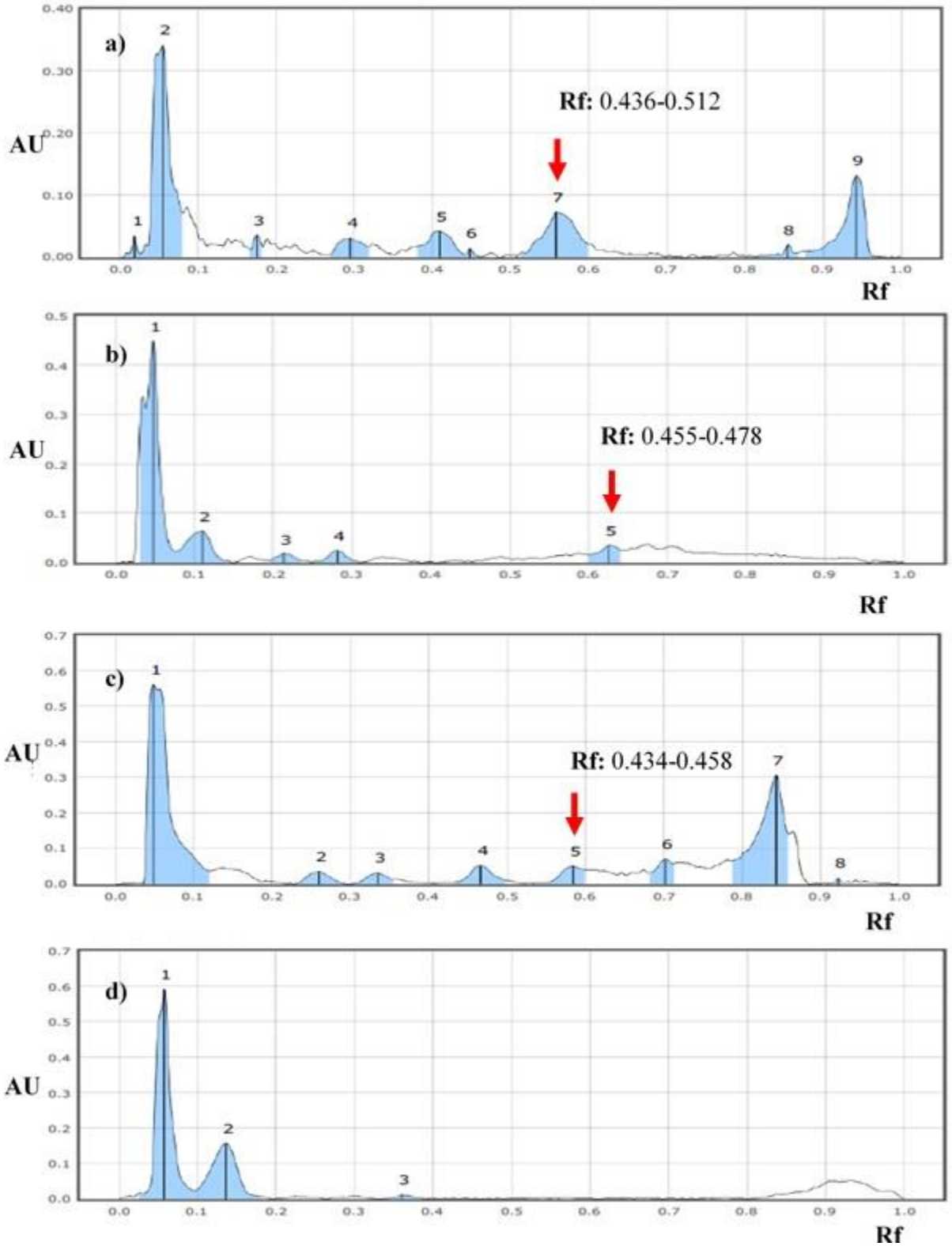


Figura 19. Cromatogramas de M2 antes y después de la fermentación, a) 0 h de fermentación, b) 24 h de fermentación, c) 72 h de fermentación y d) 144 h de fermentación.

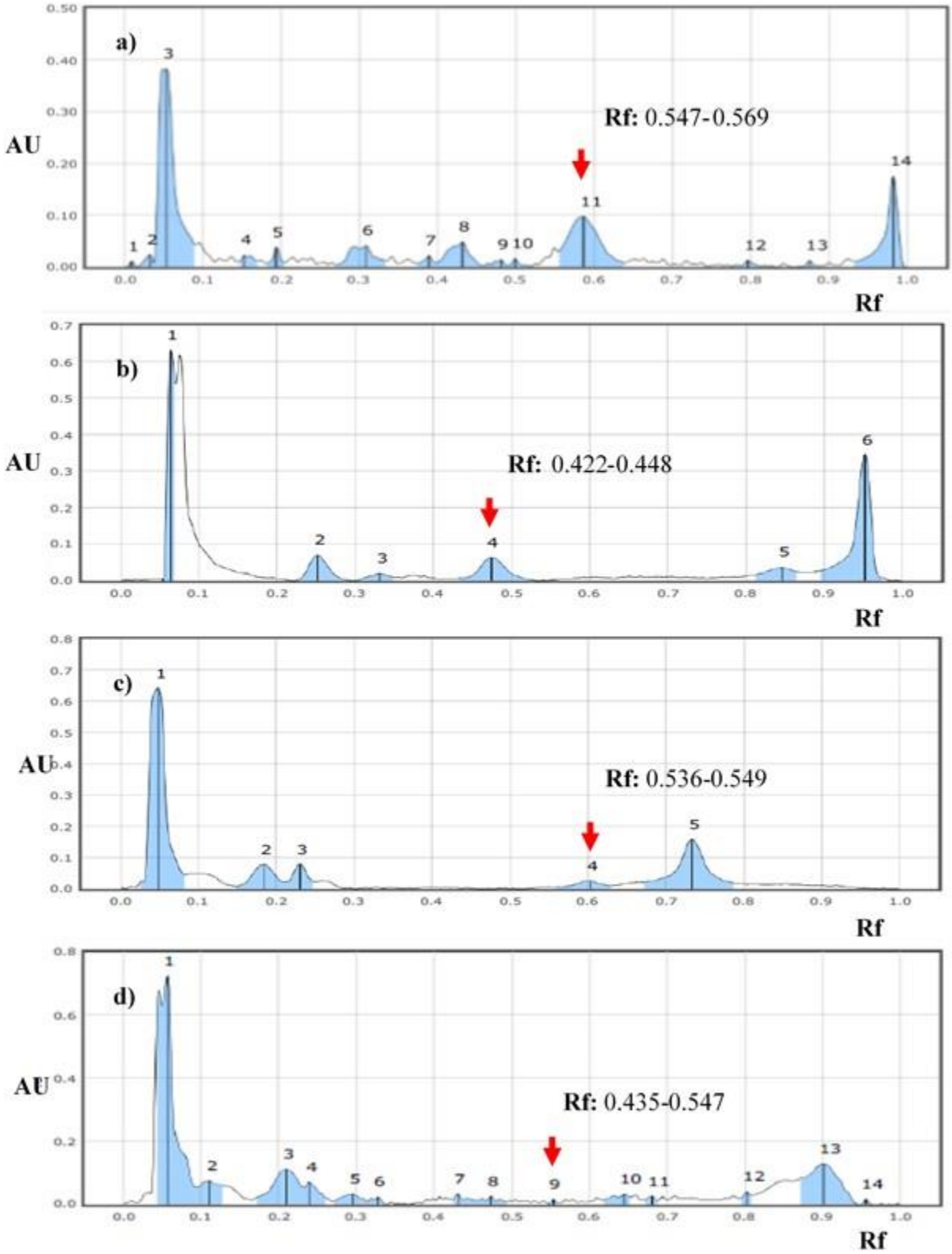


Figura 20. Cromatogramas de M3 antes y después de la fermentación, a) 0 h de fermentación, b) 24 h de fermentación, c) 72 h de fermentación y d) 144 h de fermentación.

6.3. Análisis de Compuestos Antinutrimentales

6.3.1. Ácido Fítico en Harina de *J. curcas* y Harina de Nopal

El contenido de ácido fítico en la HJC y HN se muestra en la Cuadro 9. En el caso de la HJC se observa que su concentración fue de 1.38 $mg.g^{-1}$, este resultado es menor a los estudios realizados por Martínez *et al.* (2006) en pasta de *J. curcas*, ya que ellos obtuvieron valores entre 85.4 a 92.7 $mg.g^{-1}$. En cambio, los resultados obtenidos por Azza y Ferial (2010) fue de 0.34 $mg.g^{-1}$ en pasta de *J. curcas* sin aplicación de algún tratamiento para desintoxicar, demostrando que son menores sus valores a los obtenidos en nuestro trabajo.

Cuadro 9. Contenido de ácido fítico ($mg.g^{-1}$)

Muestra	Fitatos (mg/g)
HJC	1.38 ± 0.69
HN	0.27 ± 0.13

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
Los valores se informaron en mg de ácido fítico/g de muestra seca
HJC; Harina de *J. curcas* y HN; Harina de nopal

En cambio, en la HN se obtuvo un valor de 0.27 $mg.g^{-1}$, este resultado es menor a lo que reportó Reda (2019), con un valor de 2.59 $mg.g^{-1}$; Sin embargo, ellos realizaron el análisis en una especie de nopal diferente, que es la *Opuntia ficus-indica*, por lo tanto, la diferencia entre los valores reportados y los obtenidos en nuestro trabajo se puede deber a que son diferentes especies y están cultivadas en condiciones distintas.

6.3.2. Ácido Fítico en Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas

En el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las tres mezclas y el tiempo de fermentación (Figura 21).

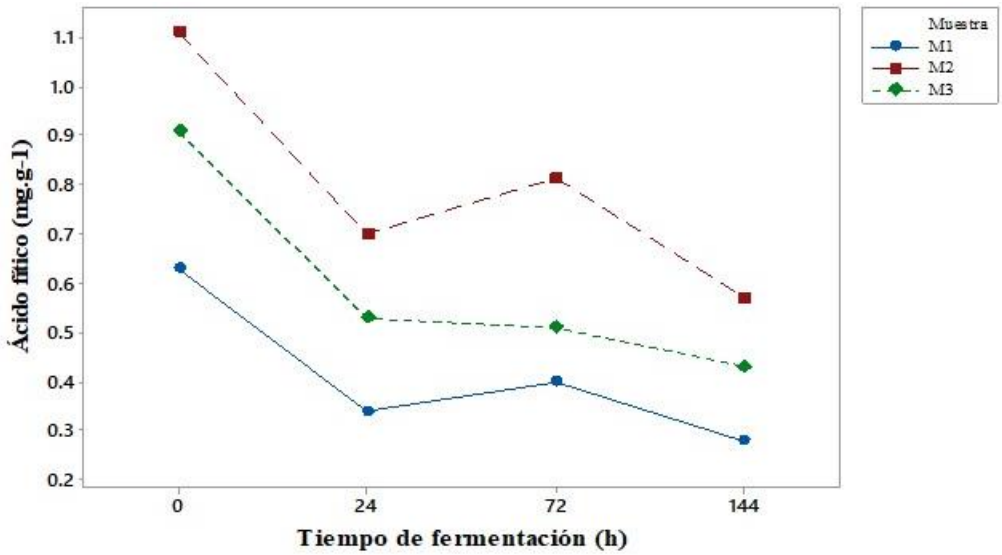


Figura 21. Gráfico de interacciones del contenido de ácido fítico ($mg.g^{-1}$) vs Tiempo de fermentación (h)

En la Cuadro 10 se muestran las concentraciones de ácidos fítico que se obtuvieron en las mezclas y su efecto con el tiempo de fermentación. En la M1, se observa que en el tiempo de 0 h su concentración fue de 0.63 $mg.g^{-1}$ de ácido fítico, una vez transcurridas las 24 h de fermentación se obtuvo un valor de 0.34 $mg.g^{-1}$. Después de 72 h su concentración fue de 0.4 $mg.g^{-1}$. Por último, a las 144 h el contenido de ácido fítico fue de 0.28 $mg.g^{-1}$, por lo que se presentó un máximo de reducción de ácido fítico del 56%, similares a los obtenidos por Sharath *et al.* (2013), debido a que ellos realizaron una FES con microorganismos los cuales provenían de diferentes géneros, como lo son *Aspergillus*, *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium miczynskii*, *Rhizopus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*, logrando degradar este compuesto hasta un 53% en pasta de *J. curcas.*

Cuadro 10. Contenido de ácido fítico ($mg.g^{-1}$) en mezclas

Muestra	Tiempo de fermentación (h)	Ácido fítico ($mg.g^{-1}$)
M1	0	0.63 ± 0.03
	24	0.34 ± 0.005
	72	0.40 ± 0.002
	144	0.28 ± 0.005
M2	0	1.11 ± 0.03
	24	0.70 ± 0.004
	72	0.81 ± 0.007

	144	0.57 ± 0.003
M3	0	0.91 ± 0.002
	24	0.53 ± 0.009
	72	0.51 ± 0.004
	144	0.43 ± 0.005

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
Los valores se reportaron en mg de ácido fítico/g de muestra seca
M1; Mezcla 1, M2; Mezcla 2 y M3; Mezcla 3

En la M2, la concentración de ácido fítico a las 0 h fue de 1.11 $mg.g^{-1}$, se presentó un efecto similar a la M1, debido que a las 24 h de fermentación la concentración disminuyó a 0.70 $mg.g^{-1}$, no obstante a las 72 h su concentración de ácido fítico fue de 0.81 $mg.g^{-1}$; esto es debido a que el proceso que se realizó es discontinuo, ya que se utilizaron diferentes matraces para las réplicas. Es por eso que se sugiere que, la FES se realice en un reactor, debido a que es más factible que se logré tomar muestras a las distintas horas del proceso continuo de fermentación, con el cual se obtendría una curva decreciente a medida que va aumentando el tiempo de fermentación. En cambio a las 144 h disminuyó hasta 0.57 $mg.g^{-1}$; por lo tanto en la M2 su degradación fue desde un 28 a 49%. Una de las causas de la degradación de este compuesto, es debido a la actividad de algunas enzimas (fitasa y oxidasas) que son producidas durante la fermentación (Maga, 1982). Sin embargo, existen estudios como los realizados por Ojo *et al.* (2015), en el cual ellos fermentaron pasta de *J. curcas*, obteniendo resultados menores a los de nuestro trabajo, debido que su rango de degradación fue desde un 3.89 a 8.77%. En último lugar tenemos a la M3, a las 0 h se observa una presencia de 0.91 $mg.g^{-1}$, y al igual que la M1 y M2, tuvo un comportamiento similar en la disminución de este compuesto por el efecto del tiempo de fermentación, obteniendo como resultado una degradación de entre un 42 a 53%. Un estudio realizado por Saha y Ghosh (2013), realizaron una FES con especies del género *Bacillus*, en el cual obtuvieron una degradación de ácido fítico del 87%.

6.3.3. Saponinas en Harina de *J. curcas* y Harina de Nopal

En la Cuadro 11 se observan las concentraciones de saponinas que presentan las HJC y HN. En

HJC se obtuvo una concentración de 52.45 $mg.g^{-1}$, resultado mayor con respecto al estudio realizado por Martínez *et al.* (2006), debido a que ellos obtuvieron un contenido de saponinas en harinas de *J. curcas* de 21.4 a 28.5 $mg.g^{-1}$. En cambio, en la HN el resultado obtenido fue de 35.4 $mg.g^{-1}$, estos resultados, si los comparamos con los estudios realizados por Suryawanshi y Vidyasagar (2016), es menor al de ellos, debido que reportan una presencia de 80 $mg.g^{-1}$ de saponinas en una especie del género *Opuntia*; no obstante esta variación puede ser provocado a que sean diferentes especies.

Cuadro 11. Contenido de saponinas ($mg.g^{-1}$)

Muestra	Saponinas ($mg.g^{-1}$)
HJC	52.45 ± 1.73
HN	35.4 ± 0.84

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
Los valores se reportaron en mg equivalentes de diosgenina/g muestra seca
HJC; Harina de *J. curcas* y HN; Harina de nopal

6.3.4. Saponinas en Mezclas Antes y Después de Ser Fermentadas

En la Cuadro 12, se muestran las concentraciones de saponinas en las mezclas y el efecto que tuvo la FES en los diferentes tiempos. En la M1, se obtuvo un resultado de 41.99 $mg.g^{-1}$ a las 0 h de fermentación, una vez pasado las 24 h su concentración cambió a 23.29 $mg.g^{-1}$, es decir, se tiene una disminución del 45%. En cambio a las 72 h se obtuvo una degradación menor del 39%, con una concentración del 25.75 $mg.g^{-1}$; sin embargo, a las 144 h, la disminución de este compuesto fue mayor, con una degradación del 77%, teniendo como concentración 10.03 $mg.g^{-1}$. En el caso de la M2, su concentración inicial de las 0 h fue de 56.54 $mg.g^{-1}$, posterior al tiempo de fermentación de 144 h su concentración disminuyó hasta 9.47 $mg.g^{-1}$, por lo tanto su degradación fue desde un 38 a 84%. La degradación de saponinas se puede deber al medio de cultivo microbiano y secreción de enzimas (Gomes *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos de M1 y M2 son comparados con el estudio realizado por Belewu y Sam (2010), ellos trabajaron una FES en una pasta de *J. curcas*, utilizando diferentes microorganismos, obteniendo como resultado una degradación entre 78 y 94% de presencia de saponinas. Es por eso que los resultados obtenidos en nuestro trabajo son

similares a lo reportado por Belewu y Sam (2010). En último lugar tenemos a la M3, la concentración a las 0 h fue de 60.69 $mg.g^{-1}$, sin embargo el efecto del tiempo de fermentación se observa desde el principio, debido a que a las 24 h se obtuvo una concentración de 33.22 $mg.g^{-1}$, representando una degradación del 45%. En cambio, a las 72 h se obtuvo 26.61 $mg.g^{-1}$ de presencia de saponinas, teniendo como disminución del 56%. Una vez concluidas las 144 h de fermentación, se obtiene como resultado una concentración de 14.08 $mg.g^{-1}$, el cual equivale a un 76% de disminución. Nuestro estudio, comparado con el realizado por Hassaan *et al.* (2017), fueron menores, debido a que ellos lograron degradar este compuesto hasta un 99%, al haber fermentado una pasta de *J. curcas* con microrganismos del género *Bacillus*.

Cuadro 12. Contenido de saponinas ($mg.g^{-1}$) en mezclas

Muestra	Tiempo de fermentación (h)	Saponinas ($mg.g^{-1}$)
M1	0	41.99 ± 1.54
	24	23.29 ± 0.37
	72	25.75 ± 0.60
	144	10.03 ± 0.40
M2	0	56.54 ± 4.56
	24	35.48 ± 1.12
	72	9.23 ± 0.82
	144	9.47 ± 0.49
M3	0	60.69 ± 1.64
	24	33.22 ± 0.39
	72	26.61 ± 1.23
	144	14.08 ± 0.88

Los valores son la media (n = 3) ± Desviación estándar
Los valores se reportaron en mg equivalentes de diosgenina/g muestra seca
M1; Mezcla 1, M2; Mezcla 2 y M3; Mezcla 3

En la Figura 22, se muestran las interacciones del contenido de saponinas y el efecto que tuvo en los diferentes tiempos de fermentación. Se observa que desde el tiempo 0 a las 24 h existe una interacción entre la M2 y la M3, no obstante, antes de las 72 h y a las 144 h se observa otra interacción entre la M1 y M2. Por lo tanto, existe diferencia significativa en los tiempos de fermentación. Estas diferencias se pueden deber a que las tres mezclas contienen diferentes proporciones de HJC y HN, causando estas interacciones entre ellas.

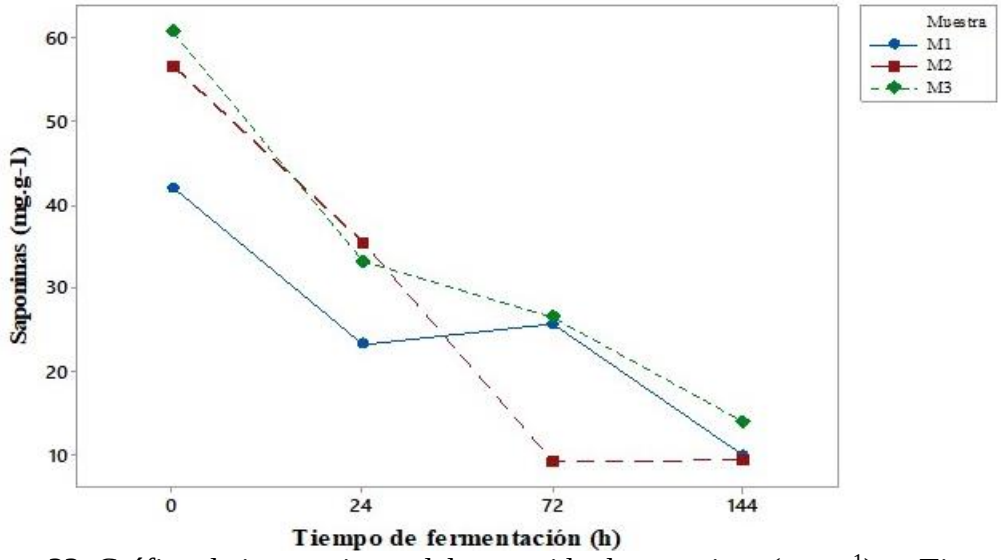


Figura 22. Gráfico de interacciones del contenido de saponinas ($mg.g^{-1}$) vs Tiempo de fermentación (h)

7. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron dos lotes de materia prima, uno contenía 12 Kg de harina de *J. curcas* y el otro fue de 6 Kg de harina de nopal, después de realizarles la caracterización se observó que su contenido nutrimental cumplía con otros autores.
2. Se desarrolló un diseño experimental de mezclas, en el cual se seleccionaron tres diferentes mezclas; M1 está compuesta por 18.18 g de *J. curcas* y 18.18 g de nopal, M2 contiene 31 g de *J. curcas* y 5.35 g de nopal y, por último, M3 con 25.25 g de *J. curcas* y 11.11 g de nopal.
3. La caracterización realizada a las diferentes mezclas (HN+HJC) después de aplicarles un proceso de fermentación en estado sólido con ayuda del microrganismo *S. cerevisiae*, indicó una mejora en el contenido nutrimental, más específicamente en el contenido de proteína, debido a que se incrementó al final de la fermentación.
4. Los valores que se obtuvieron del contenido energético resultan benéficos, debido a que cumplen con los estándares que se necesitan las dietas para tilapia y lograr un crecimiento adecuado de la especie.
5. En base a los resultados obtenidos de análisis de espectrometría y pruebas de cromatografía por HPTLC, se confirmó una degradación de ésteres de forbol y compuestos antinutricionales que se presentaban en las mezclas dependiente al tiempo de fermentación.
6. En la comparación de las tres mezclas, se concluye que la M2 fermentada a 144 h, es la más eficaz en el incremento de contenido de proteína y de mayor eficiencia en la eliminación de los ésteres de forbol.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda que se realice un análisis de perfil de aminoácidos y perfil de ácidos grasos a las diferentes mezclas para conocer como impactó el proceso de fermentación en estado sólido en ellas y poder obtener una caracterización más completa de las harinas. Además, evaluar el posible uso de estas harinas obtenidas en diferentes organismos de interés comercial.

Además, también se recomienda considerar a la harina de *Jatropha curcas* fermentada como una alternativa de fuente de proteína en dietas formuladas para especies acuícolas, por lo tanto, se sugiere que se realice una inclusión de ésta en las dietas balanceadas y analizar la respuesta de aceptación por parte del animal, como también análisis hematológicos y de digestibilidad aparente e incremento en peso y talla, esto con la finalidad de posible sustitución total o parcial el uso del ingrediente principal (harina de pescado) en las dietas balanceadas.

Debido al aumento de precios de la harina de pescado en el paso de los años llegando a costar entre $1500 a $2500 una tonelada en 2015, se recomienda la utilización de la M2 para producción de proteína microbiana en biomasa para la elaboración de dietas a animales acuícolas.

9. REFERENCIAS

Abdel Gadir W.S., Onsa T.O., Ali W.E.M., El Badwi S.M.A. and Adam S.E.I. 2003. Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. Journal of Small Ruminant Research. 48: 61-7.

Abdessemed D., Nezari M., Mohamed R., Abdessemed Dj., Bahadi F. and Halitim A. 2014. Emulsifying effect of pectin from *Opuntia ficus-indica* cladode. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 6: 198-201.

Ahmadifar E., Sadegh T.H., Dawood M.A.O., Dadar M. and Sheikhzadeh N. 2020. The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture. 516: 734656.

Amaya Elkin A., Allen Davis D. and Rouse David B. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. Journal of Aquaculture. 262: 393-401.

Anaya-Pérez M.A. 2001. History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. In: Cactus (*Opuntia* spp.) as Storage. FAO, Rome, Italy. 5-12 pp.

Angulo-Bejarano Paola I., Verdugo-Montoya Nadia M., Cuevas-Rodríguez Edith O., Milán-Carrillo Jorge, Mora-Escobedo Rosalva, Lopez-Valenzuela Jose A., Garzón-Tiznado José A. and Reyes-Moreno Cuauhtémoc. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietnum* L.) nutritional and physicochemical properties. Journal of Food Chemistry. 106: 106-112. ISSN 0308-8146.

Angulo B., 2013. Desarrollo de estrategias para la utilización del nopal (*Opuntia ficus-indica*) como biorreactor vegetal. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Unidad Irapuato. Tesis doctoral.

Anupama and Ravindra P. 2000. Value-added food: single cell protein. Biotechnology Advances Journal. 18. 459–479.

Aquino G. L. V., Rodríguez R. J., Méndez R. A M, Hernández A. y S. E. 2012. Extracción y Caracterización de Fibra de Nopal (*Opuntia Ficus Indica*). International Journal of Design and Nature. 12 (1). 48–62.

Araújo L.F., Medeiros A.N., Neto A.P., Oliveira L.S.C. and Silva F.L.H. 2005. Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology. 48: 161-168.

Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales. (AOAC). 1999. Official methods of analysis of the association of analytical chemisth.16th. Ed. Washington, D.C.

Azza A.A. and Ferial M. A. 2010. Nutritional Quality of *Jatropha curcas* Seeds and Effect of Some Physical and Chemical Treatments on Their Anti-Nutritional Factors. African Journal of Food Science. 4: 93-103.

Belewu M. A. and Sam R. 2010. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake:

Proximate composition and antinutritional components. Journal of Yeast and Fungal Research. 1: 44-46.

Beutler J., Alvarado A., McCloud T. and Cragg G. 1989. Distribution of Phorbol Ester Bioactivity in the *Euphorbiaceae*. Phytotherapy Research. 3: 188-192.

Ben Salem H., Nefzaoui A. and Ben Salem L. 2004. Spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. inermis) and oldman saltbush (*Atriplex nummularia* L.) as alternative supplements for growing Barbarine lambs given straw−based diets. Small Ruminant Res. 51: 65–73.

Bourdichon François, Casaregola Serge, Farrokh Choreh, Frisvad Jens C., Gerds Monica L., Hammes Walter P., Harnett James, Huys Geert, Laulund Svend, Ouwehand Arthur, Powell Ian B., Prajapati Jashbhai B., Seto Yasuyuki, Schure Eelko Ter, Van Boven Aart, Vankerckhoven Vanessa, Zgoda Annabelle, Tuijtelaars Sandra and Hansen Egon Bech. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial uses. Journal of International of Food Microbiology. 154:87-97.

Brittaine R. and Lutaladio N., 2010. *Jatropha*: a smallholder bioenergy crop: the potential for pro-poor development. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 8: 96.

Cantwell M., Rodriguez-Felix A. and Robles-Contreras F. 1992. Postharvest physiology of prickly pear cactus stems. Journal of Scientia Horticulture. 50: 1-9.

Cantwell M. 1995. Post-harvest management of fruits and vegetables stems. In: Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. Eds: Barbera G., Inglese P., Pimienta Barrios E., FAO-Plant Production and Protection Paper, Rome. 132: 120-136.

Chang-Wei L., Kun L., You C. and Yongyu S. 2007. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. Journal of Forestry Studies in China. 9: 114-119.

Costa R.G., Trevino I.H., De Medeiros G.R., Medeiros A.N., Pinto T.F. and De Oliveira R.L. 2012. Effects of replacing corn with cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill) on the performance of Santa Inés lambs. Small Ruminant Res., 102: 13–17.

Cruse, R.R. 1973. Desert Plant Chemurgy: a current review. Journal of Economic Botany. 27: 210–230.

Cuevas-Rodríguez E., Milán-Carrillo J., Mora-Escobedo R., Cárdenas-Valenzuela O. and Reyes-Moreno C. 2004. Quality protein maize (*Zea mays* L) tempeh flour though solid-state fermentation process. Journal of Lebensm Wiss Technol. 37: 59-67.

Da Schio B. 2010. *Jatropha curcas* L., a potential bioenergy crop. On field research in Belize. Tesis de Maestría. Padua University, Italy and Wageningen University and Research Centre, Plant Research International, the Netherlands, Holanda.

Dawood MAO and Koshio S. 2020. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. Journal of Reviews in Aquaculture. 12: 987–1002.

Dawood MAO, Eweedah N.M, Khalafalla M.M., Khalid A., Asely A.E., Fadl S.E., Amin A.A., Paray B.A. and Ahmed H.A. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* increases the acceptability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to date palm seed meal. Journal of Aquaculture Reports. 17: 100314.

Dehgan B. and Webster G. 1979. Morphology and Infrageneric Relationships on the Genus *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). University of California Publications in Botany. Los Angeles,

CA. EUA. 74: 1-175.

Deghan B. 1982. Novel *Jatrophas* for Florida Landscapes. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 95: 277-280.

Demissue A and Lele S. 2010. Bioassay-assisted identification of phorbol ester from *Jatropha curcas* (Linn.) tissue culture. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 1: 1-7.

Devappa R.K., Angulo-Escalante M.A., Makkar H.P.S. and Becker K. 2012. Potential of Using Phorbol Esters as an Insecticide against Spodoptera Frugiperda. Industrial Crops and Products. 38: 50–53.

Devappa R.K., Bingham J.P. and Khanal S.K. 2013. High performance liquid chromatography method for rapid quantification of phorbol esters in *Jatropha curcas* seed. Industrial Crops and Products 49: 211-219.

Eka O.U. 1980. Effect of fermentation on the nutrient status of locust beans. Journal of Food Chemistry. 5: 305–308.

Elías A., Lescano O., Lescano P., Cordero J. y Quintana L. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido *saccharina*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 24: 3-12.

Elibol M. and Muvituna F. 1997. Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. Journal of Process Biochemistry. 32: 417 – 422.

El-Batal A.I. and Karem H.A., 2001. Phytase production and phytic acid reduction in rapessed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. Journal of Food Research International. 34: 715-720.

El-safy, F.S., 2013. Evaluation and utilization of cladodes flour in formulating functional sponge cake. Journal of World Applied Sciences. 27: 512-523.

Escoto-González L., Flores-Ceballos R. y Maytorena-García E. 2013. Análisis de Variables Críticas en la Cadena Agroindustrial de *Jatropha curcas*. En: Escoto G, I. Contreras, M. Angulo-Escalante. (eds.). Cadena Agroindustrial de *Jatropha curcas*: Producción de alimento para camarón utilizando harina pasta de *Jatropha curcas*. Publicada. Saarbrücken, Alemania. 191-192pp.

Eze SO and Ibe OJ 2005. Effect of fermentation on nutritive value of B. Erycoma “Achi”. Journal of Chemical Society of Nigeria. 30: 1.

Fenwick D. E. and Oakenfull D., 1983. Saponin content of soybeans and some prepared foods. Journal of the Science Food Agriculture. 32: 273-278.

Faria-Machado A.F., Licurgo F.M.S., Pires J.M.F., Campos R.D.S., Wilhelm A.E., De Souza M.D.L.M. and Antoniassi, R. 2019. Method validation for analysis of phorbol esters from *Jatropha curcas.* Journal of Industrial Crops and Products. 140: 111-627.

Feugang J. M., Konarski P., Zou D., Stintzing F.C. and Zou C. 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. Journal of Frontiers in Bioscience. 11: 2574-2589.

Flores Valdez C.A. y Aguirre Rivera J. R. 1979. El Nopal como Forraje. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 80 pp.

Flores-Hernández A., Macías-Rodríguez F.J., Esparza-Ibarra E.L., Cantú-Brito E., Gámez Aguilar M., Medina veitia-Ríos H. y Quiñones-Zaldivar, A. 2011. Enriquecimiento proteico del nopal (*Opuntia* spp.) como forraje. Folleto de divulgación: UACh-COCyTED-FIRA-URUZA, Bermejillo, Durango, México. 22 pp.

Flores-Hernández A., Araújo-Filho J., Gomes da Silva F., Ramírez-Ordoñez S. y Murillo-Amador B. 2017. Dietas a base de forraje tradicional y nopal (*Opuntia* spp.) enriquecido con proteínas para alimentar cabras. Journal of Nova Scientia. 9: 149-166.

Furuya W. M. 2010. Tabelas Brasileiras para a nutrição de tilapias. Gráfica Editora, Toledo. 100 pp.

Gabriel A., Ntuli V. and James D. 2014. C1Cactus pear biomass, a potential lignocellulose raw material for Single Cell Protein production (SCP). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(7). 171 197.

Gervasi T., Pellizzeri V., Calabrese G., Di Bella G., Cicero N. and Dugo G. 2018. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. Natural Product Research. 32. 648–653.

Goel G., Makkar H.P.S., Francis G. and Becker K. 2007. Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. International Journal of Toxicology. 26: 279-288.

Gomes Taisa G., Hadi Sámed I. I. A., Costa Alves Gabriel S., Mendonça Simone, De Siqueira Felix G., and Miller Robert N. G. 2018. 1. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66 (11). 2510-2522.

Gubitz G., Mittelbach M. and Trabi M. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. Journal of Bioresource Technology. 67: 37-42.

Guzmán-Uriarte M.L., Sánchez-Magaña L.M., Angulo-Meza G.Y., Cuevas-Rodríguez E., Gutiérrez-Dorado R., Mora-Rochín S., Milán-Carrillo J., Valdez-Ortiz A. and Reyes-Moreno C. 2013. Solid state bioconversion for producing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) functional flour with high antioxidant activity and antihypertensive potential. Journal of Food Science and Nutrition. 4: 480-490.

Hassaan MS, Goda AS and Kumar V. 2017. Evaluation of nutritive value of fermented de-oiled physic nut, *Jatropha curcas*, seed meal for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. Journal of Aquaculture Nutrition. 23: 571-584.

Heller J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 66.

Herrera E., Murillo M., Berumen L., Páez J. and Villarreal, G. 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* on the nutritional quality of the forage prickly pear during the time of fermentation. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 1: 33-40.

Herrera E., Murillo M., Berumen L., Soto N.O. and Páez J. B. 2017. Protein enrichment of *Opuntia ficus-indica* using *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation. Ciencia e Investigación AGRARIA. 44: 113-120.

Hiai S., Oura H., and Nakajima, T. 1976. Color reaction of some sapogenins and saponins with

vanillin and sulfuric acid. Journal of Planta Medica. 29: 116–122.

Jongschaap R.E.E., Corré W.J., Bindraban P.S. and Brandenburg W.A. 2007. Claims and facts on *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Plant Research International Journal. Report 158.

Joshi C., Mathur P. and Khare S.K. 2011. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. Journal of Bioresource Technology. 102: 4815–4819.

Joshi C, Khare S.K. and Gupta M.N. 2014. Applications of Solid-State Fermentation Process in Biological Detoxification of Industrial Wastes. Current Biochemical Engineering Journal. 1: 1 – 15.

Kumar V., Makkar H.P.S. and Becker K. 2011. Nutritional, physiological and hematological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed detoxified *Jatropha curcas* kernel meal. Journal of Aquaculture Nutrition. 17: 451–467.

Kupferschmidt K. 2015. Why insects could be the ideal animal feed. Science. 4709.

Latham M. C. 2002. Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo, Capitulo 9: Macronutrientes: carbohidratos, grasas y proteínas. Colección FAO: Alimentación y nutrición. N° 29.

Leyva M. 2018. Perfil Fitoquímico y Actividad Antifúngica de Extractos Metanólicos de *Jatropha platyphylla* (Möll.) en Hongos Fitopatógenos. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación de Desarrollo A.C. Culiacán, Sinaloa, México.

Lin M. J. Y., Humbert E. S. and Sosulski, F. W. 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. Journal of Food Science. 39: 368-371.

Liu S.Y., Sporer F., Wink M., Jourdane J., Henning R., Li Y.L. and Ruppel A. 1997. Anthraquinonesin *Rheum palmantum*and *Rumexdentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (*Euphorbiaceae*) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania, Biornphalaria* and *Bulinus*. Tropical Medicine and International Health Journal. 2: 179-88.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265–275.

Maga J.A.1982. Phytates: Its chemistry, occurrence, food interactions. Nutritional significance and method of analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 30: 1 – 7.

Makinde F., Afinoso R. and Adepoju A. 2013. Effects of fermentation containers on the chemical composition of fermented sesame (*sesame indicum* L) seeds. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development. 13: 1.

Makkar H.P.S., Becker K., Sporer F. and Wink M. 1997. Studies non-Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas*. Journal of Agriculture Food Chemistry. 45: 3152-3157.

Makkar H.P.S. and Becker K. 1999. Plant toxins and detoxification methods to improve feed quality of tropical seeds. Asian Australasian Journal of Animal Sciences. 12: 467-480.

Makkar H.P.S., Siddhuraju P. and Becker K. 2007. Phorbol Esters. Journal of Plant secondary metabolites. In Methods in molecular biology. 393: 23–28.

Makkar H.P.S., Martinez-Herrera J. and Becker K. 2008. Variations in Seed Number Per Fruit. Seed Physical Parameters and Contents of Oil, Protein and Phorbol Ester in Toxic and Non-Toxic Genotypes of *Jatropha curcas.* Journal of Plant Sciencies. 3: 260-265.

Makkar H.P.S. and Becker K. 2009. *Jatropha curcas,* a promision crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. European Journal of Lipid Science and Technology. 111: 773-787.

Makkar H.P.S., Kumar, V., Oyeleye, O., Akinleye, A., Angulo-Escalante MA y Becker K. 2010. Traditional wisdom confirmed by scientific research: *Jatropha* species from Mexico is non-toxic. Nature Preceedings. hdl:10101/npre.2010.4155.1.

Martínez M.A.S. 2006. Manejo Del cultivo de tilapia. USAID, Coastal Resources Center, University of Rhode Island, University of Hawai, Hilo, CIDE, Managua, Nicaragua. 22 pp.

Martínez-Herrera J., Siddhuraju P., Francis G., Davila-Ortiz G. and Becker K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of L. from Mexico. Journal of Food Chemistry. 96: 80-89.

Martínez-Herrera J., Martínez-Ayala AL, Makkar H.P.S., Francis G and Becker K. 2010. Agroclimatic Conditions, Chemical and Nutritional Characterization of Different Provenances of *Jatropha Curcas* L. from Mexico. European Journal of Scientific Research. 39 (3): 396-407.

Mendez-Llorente F, Ramírez-Lozano RG, Aguilera-Soto JI and Arechiga-Flores CF. 2008. Performance and nutrient digestion of lambs fed incremental levels of wild cactus (*Opuntia leucotricia*). Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development. University of Hohenheim.

McVaugh R. 1945. The Genus *Jatropha* in America: Principal Intrageneric Groups. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 72: 271-294.

Mohamed-Yasseen Y., Barringer S. A. and Splittstoesser W. E. 1996. A note on the uses of *Opuntia* spp. In Central/North America. Journal of Arid Environments. 32: 347–353.

Nerd A., Dumoutier M. and Mizrahi Y. 1997. Properties and post-harvest behavior of the vegetable cactus Nopalea cochenillifera. Journal of Postharvest Biology and Technology. 10: 135-143.

Nigam P. and Singh D. 1994. Solid state (substrate) fermentation systems and their application in biotechnology. Journal of Basic Microbiology. 34: 404–23.

Nobel P. S. 1983. Nutrient levels in cacti–relation to nocturnal acid accumulation and growth. American Journal of Botany. 70: 1244-1253.

Ojo R. J., Seriki S., Seddon S.B. and Ifeonu S. C. 2015. Proximate and Toxicological Analyses of Detoxified Jatropha Curcas Seeds. Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 10: 23-26.

Oladele E.P. and Oshodi A.A. 2008. Effect of fermentation on some chemical and nutritive properties of berlandier nettle spurge (*Jatropha cathartica*) and physic nut (*Jatropha curcas*) seeds. Pakistan Journal of Nutrition. 2: 292-296.

Ortuño Jesús, Cuesta Alberto, Rodríguez Alejandro, Esteban M.Angeles y Meseguer José. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the celular innate immune response of glithead seabream (*Sparus aurata* L.). Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology. 85: 41-50.

Pastrana L. 1996. Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria, CYTA. Journal of Food. 1: 4-12.

Peppler H. J. 1982. Yeast extracts. Journal of Economic Methodology. 7: 293.

Phengnuam Thanyarat, Suntornsuk Worapot 2013. Detoxification and anti-nutrients reduction of Jatropha curcas seed cake by Bacillus fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 115(2): 168-172.

Phulia V, Sardar P, Sahu NP, Shamna N, Fawole FJ, Gupta S and Gadhave PD.2017. Replacement of Soybean Meal with Fermented *Jatropha curcas* Kernel Meal in the Diet of *Labeo rohita* Fingerlings: Effect on Hemato-biochemical and Histopathological Parameters. Journal of the world Aquaculture Society. 48: 676–683.

Pramanik K. 2003. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. Journal of Renewable Energy. 28: 239-248.

Reda T. H. and Atsbha M. K. 2019. Nutritional Composition, Antinutritional Factors, Antioxidant Activities, Functional Properties, and Sensory Evaluation of Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Seeds Grown in Tigray Region, Ethiopia. International Journal of Food Science Hindawi. 2019: 1-7.

Ritala A., Häkkinen S.T., Toivari M. and Wiebe M.G., 2017. Single cell protein-state-of-theart, industrial landscape and patents 2001-2016. Frontiers in Microbiology. 8. 2009.

Rug M. and Ruppel A. 2000. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. Tropical Medicine and International Health Journal. 5: 423-30.

Saeed M., Yasmin I., Murtaza M.A., Fatima I. and Saeed S. 2016. Single cell proteins: a novel value added food product. Pakistan Journal of Food Sciences. 26. 211–217.

Saha S. and Ghosh K. 2013. Evaluation of Nutritive Value of Raw and Fermented De-oiled Physic Nut, *Jatropha curcas* Seed Meal in the Formulated Diets for Rohu, Labeo rohita (Hamilton) Fingerlings. Proceedings of the Zoological Society of India Journal 66: 41–50.

Saritha M, Arora A and Lata. 2012. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. The Indian Journal of Applied Microbiology. 52. 22-130.

Seena S., Sridhar K.R. and Jung K. 2005. Nutritional and antinutritional evaluation of raw and processed seeds of a wild legume (*canavalia cathartica*) of costal sand dumes in India. Journal of Food chemistry. 92: 465 – 472.

Sharath B. S., Mohankumar B. V. and Somashekar D. 2013. Bio-detoxification of Phorbol Esters and Other Anti-nutrients of *Jatropha curcas* Seed Cake by Fungal Cultures Using Solid-State Fermentation. Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology. 172: 2747–2757.

Sharawy Zaki, Goda Ashraf M.A.S. and Hassaan Mohamed S. 2016. Partial or total replacement of fish meal by solid state diets for Indian prawn shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Postlarvae. Journal of Animal Feed Science and Technology. 212: 90–99.

Sniffen C.J., O'Connor J.D., Van Soest P.J., Fox D.G. and Russell J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science. 70: 3562-3577.

Soto-León S., López-Camacho E., Milán-Carrillo J., Sánchez-Castillo M.A., Cuevas-Rodríguez E., Picos-Corrales L.A., and Contreras-Andrade I. 2014. *Jatropha cinerea* seed oil as a potential non-conventional feedstock for biodiesel produced by an ultrasonic process. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 13: 739-747.

Stintzing F.C. and Carle R., 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. Journal of Molecular Nutrition and Food Research. 49: 175–194.

Sunil N., Kuma V. and Varaprasad K.S. 2013. Origin, Domestication, Distribution and Diversity of *Jatropha curcas* L. In: Bahadur B., Sujatha M. and Carels N. *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. 2: 137-152.

Suryawanshi Pooja and Vidyasagar GM. 2016. Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. Journal of Medicinal Plants Studies. 4: 39-43.

The World Bank. 2013. FISH TO 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture. doi:83177-GLB.

Tirado E. 2015. Evaluación de la harina y aceite de *Jatropha curcas* en sustitución de la harina y aceite de pescado en dietas para tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación de Desarrollo A.C. Mazatlán, Sinaloa, México.

Tacon Albert G.J. and Metian Marc. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Journal of Aquaculture. 285: 146-158.

Tobías H. J. 1990. Medida de la erosión y escorrentía con diferentes prácticas de conservación de suelo en el cultivo de tuna (*Opuntia* sp) en comunidad de Chante (cuenca del río Seco-subcuenca del río Rímac). Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Upadhyay Bhuvaneshwar, Parveen, Anil K. Dhaker, Kumar Ashwani. 2010. Ethnomedicinal and ethno pharmaco-statistical studies of Eastern Rajasthan, India. Journal of Ethnofarmacol. 129: 64-86.

Vaintraub Iosif A. y Lapteva Natalya A. 1988. Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. Journal of Analytical Biochemistry. 175: 227 – 230.

Vandamme EJ and Revuelta JL. 2016. *Biotecnología industrial de vitaminas, biopigmentos y antioxidantes*. 2016. Weinheim, Alemania. 560pp.

Van Doan H., Hoseinifar S.H., Ringo E., Ángeles Esteban M., Dadar M., Dawood MAO and Faggio C. 2020. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 28: 16–42.

Van Markis A.J.A., Abbott D.A., Bellissimi E. Van Den Brink J., Kuyper M., Luttik M.A.H., Wisselink H.W., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. and Pronk, J.T. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae.* Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology. 90: 391–418.

Vasta A, Nudda A, Cannas A, Lanza M and Priolo A. 2008. Alternative feed resources and their effects on thequality of meat and milk from small ruminants. Journal of Animal Feed Science Technology. 147. 223-246.

Veerabhadrappa M. B., Shivakumar S. B. and Devappa S. 2014. Solid state fermentation of

Jatropha seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. Journal of Bioscience and Bioengineering. 117. 208− 214.

Vigueras G. A.L., and Portillo L. 2001. Uses of *Opuntia* species and the potential impact of *Cactoblastis cactorum* (Lewpidoptera: Pyralidae) in Mexico. Journal of Florida Entomologist. 84: 493– 498.

Wang Ning, Hatcher David W. and Gawalko Eugene J. 2008. Effect of variety and processing on nutrient and certain antinutrients in field peas (*Pisum sativum*). Journal of Food chemistry. 111: 132–138.

Wilbur R. L. 1954. A sinopsis of *Jatropha*, subsections Eucurcas, with the description of two new species from Mexico. Journal of Elisha Mitchell Scientific Societ. 70: 92-101.

Wouter MJ Achten, Lene R Nielsen, Raf Aerts, Ard G Lengkeek, Erik D Kjær, Antonio Trabucco, Jon K Hansen, Wouter H Maes, Lars Graudal, Festus K Akinnifesi and Bart Muys. 2010. Towards domestication of *Jatropha curcas*. Journal of Biofuels. 1: 91-107.

Zhang X., Yang Z., Liang J., Tang L. and Chen F. 2016. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assessment for its potential utilizations. Journal of International Biodeterioration & Biodegradation. 109. 202−210.