

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

**LISINA REACTIVA DIGESTIBLE COMO INDICADOR DE SU
DISPONIBILIDAD EN HARINA DE PESCADO**

T E S I S

**KARLA ELIZABETH PRECIADO HUGUEZ
RENATO CARLOS FIGUEROA GARCÍA**

ABRIL DE 2003

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

**LISINA REACTIVA DIGESTIBLE COMO INDICADOR DE SU
DISPONIBILIDAD EN HARINA DE PESCADO**

T E S I S

**KARLA ELIZABETH PRECIADO HUGUEZ
RENATO CARLOS FIGUEROA GARCÍA**

ABRIL DE 2003

LISINA REACTIVA DIGESTIBLE COMO INDICADOR DE SU DISPONIBILIDAD
EN HARINA DE PESCADO

TESIS

Sometida a consideración del
Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

Karla Elizabeth Preciado Huguez
Renato Carlos Figueroa García

Como requisito parcial para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo
Zootecnista

Abril de 2003

Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

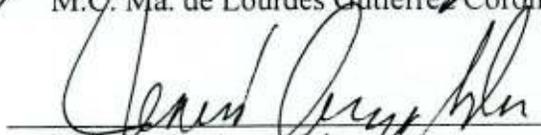
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

CONSEJO PARTICULAR:

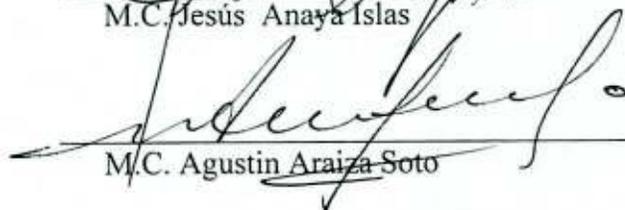
DIRECTOR:


M.C. Ma. de Lourdes Gutiérrez Coronado.

ASESOR:


M.C. Jesús Anaya Islas

ASESOR:


M.C. Agustín Araiza Soto

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darnos salud, sabiduría y permitirnos llegar hasta esta etapa de nuestras vidas, nuestra formación como profesionistas.

A la UNIVERSIDAD DE SONORA y al DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA, por la formación brindada y conocimientos adquiridos.

AI CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C. (CIAD A.C.), por proporcionarnos sus instalaciones y equipo para llevar acabo nuestro trabajo de tesis.

A nuestra Asesora M.C. MA. DE LOURDES GUTIERRES CORONADO por su amistad y apoyo en la elaboración de nuestra tesis.

AI Q.B. FRANCISCO VAZQUEZ ORTIZ por sus conocimientos y apoyo técnico en la determinación de Aminoácidos por Cromatografía Liquida de Alta Resolución.

A la M.C. LETICIA GARCIA RICO y a la I.Q. RITA RAMOS por su asesoría y colaboración respectivamente, en la determinación de Cromo por Espectroscopía de Absorción Atómica.

A nuestros Sinodales M.C. JESÚS ANAYA ISLAS Y M.C. AGUSTÍN ARAIZA SOTO por su apoyo académico y consejos en nuestra formación profesional.

A todo el PERSONAL DOCENTE y ADMINISTRATIVO del DAG por brindarnos su tiempo y conocimientos

Karla yRenato

DEDICATORIA

A MIS PADRES ENRIQUE PRECIADO Y LORETO HUGUEZ, por darme la vida, su amor y apoyo incondicional y sobre todo la oportunidad de alcanzar una de mis mas grandes metas, mi formación como profesionista, por lo cual siempre les estaré agradecida, los quiero mucho y gracias por todo.

A MI HERMANA KARINA, con mucho cariño, para que en algun momento de su vida le sirva como ejemplo para una formación futura.

A MI NANA MARIA, por su apoyo y ejemplo de perseverancia y sobre todo sus consejos que nunca olvidaré.

KARLA

DEDICATORIA

A MIS PADRES CUQUITA Y MANUEL, por su apoyo incondicional, su paciencia y por darme la oportunidad de lograr esta meta tan importante en mi vida.

A MIS HERMANOS CHRISTIAN Y DOUGLAS, por ser mi motivación para tratar de hacer cada día las cosas mejor, y que esto sirva como un buen ejemplo para ellos.

A MIS ABUELOS FRANCISCO Y MARÍA, por enseñarme desde niño a amar la ganadería, y por haber despertado en mi la inquietud de adquirir conocimientos sobre ésta.

RENATO

CONTENIDO

	Pág <i>viii</i>
RESUMEN-----	viii
INTRODUCCION-----	1
LITERATURA REVISADA-----	3
Alimentación-----	3
Lisina-----	3
Proteínas-----	4
Aminoácidos-----	5
Requerimeiento de Aminoácidos-----	5
Aminoácidos Esenciales-----	6
Aminoácidos No Esenciales-----	6
Relacion entre Aminoácidos Esenciales y no Esenciales-----	6
Necesidades Proteicas de los Animales-----	7
Proteína Ideal-----	7
Proteína Ideal para Cerdos-----	7
Digestibilidad y Disponibilidad-----	8
Digestibilidad-----	8
Digestibilidad Ileal-----	9
Digestibilidad Aparente-----	9
Digestibilidad Verdadera-----	10
Secreciones Endógenas-----	10
Medición de Perdidas Endógenas de Nitrogeno-----	10
Técnicas de Determinación de Flujo Basal de Proteínas Endógenas hacia el Ileon-----	12
Técnicas de Determinación de Flujo de Proteína Endógenas Especifico de las Dietas-----	13
Disponibilidad e Influencia del Tratamiento Térmico -----	13
Factores que Modifican la Digestibilidad de las Proteínas-----	16
Reacción de Maillard-----	16
Harina de Pescado-----	17
Harina de Pescado como Fuente de Aminoácidos Esenciales-----	18
Grasa-----	19
Energía-----	20
Vitaminas y Minerales-----	20
Ventajas de la Utilización de la Harina de Pescado en Cerdos-----	20
Adulteraciones de la Harina de Pescado-----	20
La Albúmina-----	20
Los Priones-----	21
Micotoxinas-----	22
Dioxinas-----	22
Procesamiento de la Harina de Pescado-----	23
Etapas del Proceso de Elaboración de la Harina de Pescado-----	24
Lisina Reactiva Digestible-----	25

Lisina Reactiva-----	26
Métodos para Determinar Lisina Reactiva-----	26
Lisina Reactiva Digestible-----	28
Carne Magra-----	29
Rendimiento Magro y los Aminoácidos-----	30
La Rata Como Modelo del Cerdo-----	31
MATERIALES Y METODOS-----	33
Selección y Alojamiento de los Animales-----	33
Administración de las Dietas-----	33
Dieta a base de CEH para medición de Pérdida Endógena de Nitrógeno (Flujo ileal endógeno de AA)-----	34
Dietas a Base de Harinas de Pescado-----	34
Colección de las Muestras-----	34
Pérdidas Endógenas de Nitrógeno-----	35
Lisina reactiva-----	35
Técnica de Guanidinación-----	36
Preparación del Reactivo O-metilisourea-----	36
Condiciones Iniciales de Guanidinación-----	36
Análisis Químicos-----	37
Cálculos-----	40
Análisis Estadístico-----	41
RESULTADOS Y DISCUSION-----	42
Composición Química de las Harinas de Pescado Analizadas-----	42
Condiciones de Guanidinación-----	43
Comparación de Lisina y Lisina Reactiva (Homoarginina) en las Harinas de Pescado "A" y "B".-----	45
Comparación de la Digestibilidad Ileal Verdadera de Aminoácidos Acido- estables-----	46
Comparación de Digestibilidad Ileal Verdadera de Lisina y Digestibilidad Verdadera de Lisina Reactiva.-----	47
Comparación de Lisina Reactiva Digestible y Lisina Digestible-----	48
CONCLUSIONES-----	50
LITERATURA CITADA-----	51

CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
Cuadro 1.- Composición Porcentual de las Dietas de Caseína Enzimáticamente Hidrolizada (CEH) y Harinas de Pescado-----	34
Cuadro 2.- Composición Química de Harina de Pescado-----	43
Cuadro 3.- Condiciones de Guanidinación Probadas y Porcentajes de Conversión de Lisina a Homoarginina en Harina de Pescado-----	44
Cuadro 4.- Media del Porcentaje de Conversión de Lisina a Homoarginina en Harina de Pescado A y B-----	45
Cuadro 5.- Media de la Concentración de Lisina y Homoarginina (Lisina Reactiva) en Harinas de Pescado A y B (%)-----	46
Cuadro 6.- Digestibilidad Ileal Verdadera de Aminoácidos Ácido-estables en las Harinas de Pescado A y B (%)-----	47
Cuadro 7.- Media de la Digestibilidad Ileal Verdadera de Lisina y de Lisina Reactiva en Harina de Pescado A y B (%)-----	48
Cuadro 8.- Lisina Reactiva Digestible y Lisina Digestible en Harina de Pescado A y B, comparados con los valores de Disponibilidad (%)-----	49
Figura 1.- Reacción de Maillard-----	17
Figura 2.- Proceso de Elaboración de la Harina de Pescado-----	25
Figura 3.- Diagrama de Determinación de Cromo-----	34
Figura 4.- Diagrama de Determinación de Aminoácidos por HPLC--	40

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar lisina reactiva digestible de dos harinas de pescado ("A" y "B"), que difieren en calidad por tratamiento térmico, como un indicador de su disponibilidad; ya que ésta se ve afectada por el almacenamiento prolongado o por procesamiento térmico inadecuado. Se utilizaron 29 ratas Sprague-Dawley de 150g de peso promedio alojadas individualmente bajo condiciones controladas y se dividieron en 3 grupos. Nueve ratas se alimentaron con una dieta a base de caseína enzimáticamente hidrolizada (CEH), para medición de pérdidas endógenas de nitrógeno. Las 20 ratas restantes se dividieron en 2 grupos de 10 y se les ofreció una dieta a base de harina de pescado A y B respectivamente, durante 16 días, para determinar lisina reactiva y digestibilidad ileal de aminoácidos. Las dietas se ofrecieron por tres horas (08:30-11:30) y el agua *ad libitum*. Las ratas se sacrificaron con cloroformo confinadas en un desecador. Se tomaron 20 cm finales del ileon por perfusión intraluminal con agua destilada. La digesta de las ratas alimentadas con CEH se guardaron por separado y se conservaron a -20°C para su posterior liofilización y ultrafiltración. Las digestas se combinaron en grupos de tres, obteniéndose nueve muestras para los análisis de cromo por absorción atómica, aminoácidos por HPLC, lisina reactiva y flujo endógeno de aminoácidos para calcular lisina reactiva digestible verdadera. Los coeficientes de digestibilidad ileal verdadera de los aminoácidos ácido-estables de la harina de pescado B fueron más bajos que los de harina de pescado A, con excepción de treonina, isoleucina y ácido glutámico. El contenido de lisina reactiva digestible para ambas harinas (4.5 y 3.8%) fue más bajo que la lisina digestible (5.5 y 5.1%). La lisina digestible sobreestimó el contenido de lisina en un 22.2% para harina de pescado A y en un 34.2% para harina de pescado B. El método de lisina reactiva digestible es un indicador adecuado para medir el daño por tratamiento térmico en la calidad de la lisina en harina de pescado y un indicador confiable de su disponibilidad.

Palabras claves: Digestibilidad; Lisina; Lisina Reactiva Digestible; Harina de Pescado.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la porcicultura ha sido una de las actividades económicas más importantes, ya que ha generado una gran derrama económica y fuentes de empleo para nuestro país. En Sonora, la porcicultura permitió en el 2002 la captación de recursos al sector por un monto de de 4,438 millones 592 pesos, producto de la comercialización de 545,041 cabezas de puerco en pie a otros estados, el sacrificio de 1'665,585 cabezas y la comercialización de 37,075 toneladas de carne en cortes finos para el exterior (López-Nogales, 2002).

La lisina a menudo es el primer aminoácido limitante en dietas para cerdos y pollos. Por esta razón es de gran relevancia tener información precisa del contenido de lisina de los ingredientes, así como también de la digestibilidad y disponibilidad de la lisina dietaria. Por otro lado, es importante cubrir los requerimientos de lisina de cerdos productores de carne magra y conocer con certeza el aporte de este nutrimento en sus dietas, en especial cuando se alimentan con promotores de depósito de carne magra (Schinckel *et al*, 2000) cuya acción es muy dependiente de la lisina disponible.

La harina de pescado es un ingrediente muy empleado en dietas para cerdos principalmente como una fuente concentrada de proteína (60-72%), altamente digestible y con un balance ideal en términos de aminoácidos esenciales, en especial de lisina. Sin embargo, su calidad se puede ver afectada por la forma en que la harina es preparada, tecnológicamente tratada y almacenada (Knabe *et al*, 1989).

Existe un renovado interés en los efectos del procesado de los alimentos sobre la disponibilidad de la lisina, debido a que los métodos convencionales para determinar lisina digestible y lisina reactiva (la lisina cuyo grupo ϵ -amino está todavía libre para reaccionar con el reactivo de prueba) no describen adecuadamente los efectos del procesado en la biodisponibilidad de la lisina (Knipfel 1981; Batterham 1990, Moughan, 1991) y la lisina dañada, generalmente por reacción de Maillard, se revierte a lisina

durante la hidrólisis ácida requerida para el análisis de amino ácidos, sobreestimándose el contenido de lisina disponible.

El método propuesto por Mauron y Bujard (1964) para determinar lisina reactiva digestible involucra la reacción de guanidación, la cual convierte la lisina químicamente reactiva a homoarginina (ácido 2-amino-6-guanidinohexanoico), un derivado estable en condiciones ácidas, por la reacción con O-metilisourea bajo condiciones alcalinas, aunado a la determinación de digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos.

Por lo que el objetivo del estudio fue determinar lisina reactiva digestible verdadera en dos harinas de pescado, que difieren en calidad por procesamiento térmico para estimar la cantidad de lisina disponible, empleando el método de la guanidación, a través de bioensayos con ratas, así como la digestibilidad ileal verdadera de los otros aminoácidos ácido-estables.

LITERATURA REVISADA

Alimentación

El objetivo principal de las explotaciones porcinas es la producción de carne para consumo humano. La producción porcina ha cambiado drásticamente en los últimos años, la cual se ha intensificado rápidamente disminuyendo el número de productores y aumentando la dimensión de las explotaciones (Campabadal, 1993).

En los sistemas de producción porcina, la alimentación representa la mayor parte del costo total de la producción por lo que cualquier esfuerzo encaminado a disminuir los costos asociados a este rubro tienen repercusiones importantes sobre la rentabilidad. Por lo tanto debe prestarse una atención muy especial al diseño de los programas o planes de alimentación en función del tipo de producción, raza y edad de los animales y evaluar el potencial nutritivo de las materias primas disponibles.

(Pomar, 1996; www.etsia.upm.es/capitulos/99CAP10.pdf.)

La misión de la alimentación consiste en cubrir las necesidades diarias de los cerdos en proteínas, lisina, calcio y fósforo aprovechables y la energía digestible; sin embargo son también de gran importancia otros aminoácidos, minerales y vitaminas.

Lisina

La lisina es un aminoácido esencial del que se conocen dos rutas esenciales de síntesis. La primera se lleva a cabo en bacterias y plantas superiores, por medio del ácido diaminopimélico y, la segunda, en la mayoría de los hongos por medio del ácido aminoadípico.

La primera ruta, comienza con el piruvato y el semialdehído del ácido aspartico, que por medio de una condensación aldólica pierden agua y dan lugar al ácido 2,3

dihidropicolínico, luego se forma el L,L a,e-diaminopimémico, que convertido a su forma meso y descarboxilado da lugar a la lisina.

Por la segunda ruta, el ácido a-cetoadípico es aminado y se transforma en a-aminoadípico que se convierte en lisina. La lisina es uno de los aminoácidos más importantes ya que, junto con otros, intervienen en funciones como el crecimiento y la reparación de tejidos, y colabora en la síntesis de anticuerpos y hormonas.

La lisina es un aminoácido estrictamente esencial, pues los animales y el hombre no pueden sintetizarla vía enzimática, por lo tanto el alimento es la única fuente de lisina. Los requerimientos de lisina de los animales monogástricos son altos, debido al elevado contenido de lisina en la carne de cerdo y aves de alrededor de 5 a 7% de proteína. La rápida evolución de los linajes genéticos de cerdos, pollos de engorde, gallinas ponedoras y pavos, resulta en el aumento permanente de las exigencias de lisina, proporcionalmente al aumento de la eficiencia alimenticia por los simples procesos de concertación. Además de esto, la selección genética orientada a la obtención de carnes magras, genera mayor necesidad de lisina

Proteína

El valor nutritivo de la proteína de un alimento depende de su composición en aminoácidos, de su digestibilidad y de su disponibilidad. Las proteínas de los alimentos son hidrolizadas en pequeños péptidos de aminoácidos bajo la acción de enzimas específicas a fin de atravesar la pared intestinal. No todos los aminoácidos contenidos en la proteína de los alimentos son hidrolizados y absorbidos en el intestino.

Las proteínas son el principal constituyente de los órganos y estructuras blandas del cuerpo animal, se requiere de una provisión abundante y continua de ellos en el alimento durante toda la vida para el crecimiento y reposición. Desde el punto de vista nutricional, la característica que distingue las diversas proteínas son los aminoácidos que las componen.

Las proteínas contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, además de un porcentaje importante y considerable de nitrógeno. En términos prácticos la cifra más común usada es 16%. La mayoría de las proteínas contienen también azufre y algunas tienen hierro y fósforo. Son sustancias complejas de naturaleza coloidal y de alto peso molecular. La categoría de composición elemental de las proteínas típicas se describen a continuación:

Aminoácidos

Estos compuestos son los monómeros y los principales constituyentes de las proteínas. Estos aminoácidos se obtienen como productos finales de la hidrólisis, cuando las proteínas se calientan con ácidos fuertes o cuando sobre ellas actúan ciertas enzimas. Son los productos finales de la digestión y del catabolismo de las proteínas, y constituyen las piedras angulares de las cuales se forman las proteínas corporales. Los aminoácidos son derivados de los ácidos grasos de cadena corta y contienen un grupo básico amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ácido ($-COOH$).

Existen alrededor de 20 a 23 diferentes aminoácidos que se encuentran en las proteínas, si bien en la naturaleza existen más de 150 aminoácidos que nunca son parte de las proteínas. El cerdo requiere 10 aminoácidos esenciales en su dieta para las funciones corporales normales.

Los alimentos para cerdos se formulan normalmente basados en la proteína ideal. Los niveles de proteínas establecidos para las varias categorías de pesos de los cerdos son tales que los aminoácidos más limitativos estarán presentes en cantidades adecuadas. El primer aminoácido limitativo en la mayoría de las dietas para cerdos es la lisina.

Requerimiento de Aminoácidos

Los requerimientos de aminoácidos son influidos mayormente por la edad y el peso del cerdo. En una base diaria, los requerimientos aumentan con el peso del cerdo; sin embargo, sobre la base un porcentaje de la dieta, los requerimientos disminuyen con el aumento del peso.

Los aminoácidos son requeridos por el cerdo para: construir proteína corporal, para remplazar proteínas perdidas en su paso por el metabolismo del cerdo (mantenimiento), así como para la formación de células y otros aminoácidos u otros componentes nitrogenados no absorbidos en el intestino (NRC, 1998).

Aminoácidos Esenciales

Son los aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el cerdo en cantidades adecuadas para cubrir sus requerimientos para la síntesis de proteínas, o se sintetizan a una velocidad que no es suficiente para permitir el crecimiento y un nivel de productividad óptimos y por lo tanto deben de ser incluidos en la dieta. Existen diez aminoácidos esenciales: lisina, metionina, histidina, fenilalanina, tirosina, treonina, leucina, isoleucina, valina y triptofano.

Aminoácidos no Esenciales

Son los aminoácidos que pueden omitirse de la dieta, ya que con un suministro adecuado de nitrógeno o utilizando esqueletos de carbono, derivados de glucosa y grupos amino de otros aminoácidos presentes en exceso de los requeridos, pueden ser sintetizados por el organismo en cantidades adecuadas para cubrir requerimientos para la síntesis de proteínas. Entre los AA no esenciales están: Alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, serina, arginina, prolina. (Cullison, 1983).

Relación entre Aminoácidos Esenciales y Aminoácidos no Esenciales

Al ofrecer dietas con muy bajos niveles de proteína suplementadas con aminoácidos esenciales (AAE), pueden resultar en pobres desempeños productivos si no se considera un balance óptimo entre los aminoácidos esenciales y los no esenciales (AANE). Esto es debido a que los AAE son ineficientes en suministrar el nitrógeno requerido para la síntesis de los AANE. La desaminación de los AAE incrementa la producción de los AANE como la Glutamina y la Aspartina, cuyos excesos son excretados en forma de urea. Y aún que esto ocurra, un nivel bajo de AANE aumenta la re-utilización del nitrógeno de los AAE para la síntesis de los AANE, generando imbalances y crecimiento limitado en los animales (Lenis, 1999).

Necesidades Proteicas de los Animales

Todo animal viviente tiene necesidad de proteína. La proteína es el material estructural básico a partir del cual se forman los tejidos. Esto no solo incluye los músculos, nervios, piel, tejido conectivo, órganos vitales y células sanguíneas, sino también el pelo del animal. Obviamente, la proteína es esencial para el crecimiento y desarrollo normal del animal, así como también para el desarrollo fetal. Así mismo, puesto que todo tejido vivo está en estado dinámico y sometido a una constante degeneración, la proteína es necesaria para su mantenimiento y también la mayoría de las enzimas y hormonas del organismo están compuestas básicamente por proteínas. Finalmente no hay otro nutriente que pueda remplazar a la proteína en una ración alimenticia (Cullison, 1983).

Proteína Ideal

Este concepto se refiere básicamente al balance exacto de los aminoácidos esenciales, capaces de satisfacer, sin deficiencias ni excesos las necesidades absolutas de todos los aminoácidos requeridos, para su mantenimiento y una máxima deposición muscular, expresando cada aminoácido como porcentaje, con relación a otro aminoácido de referencia, generalmente lisina. Con esto es posible mantener una relación constante conservando una calidad de proteína similar, para cubrir necesidades fisiológicas y productivas del animal. (Baker, 1996).

Proteína Ideal para Cerdos

El perfil ideal de aminoácidos para cada animal será diferente para cada función fisiológica del organismo como: el mantenimiento, desarrollo, reproducción, lactancia o para producción de carne (Baker, 1996).

Un apropiado balance de aminoácidos esenciales en la proteína ideal será: lisina 100%, met + cis 50%, treonina 65-67%, triptofano 18%, isoleucina 50%, leucina 100%, histidina 33%, fenilalanina 100%, valina 70% (Cole y Van Lunen, 1994).

La proteína ideal o bien el balance ideal de aminoácidos deberá ser acompañado de suficiente nitrógeno para la síntesis de aminoácidos no esenciales.

Digestibilidad y Disponibilidad

En la elaboración de dietas para cerdo es necesario conocer los ingredientes en su digestibilidad y disponibilidad de aminoácidos suministrados en las dietas para lograr un perfil óptimo de aminoácidos que satisfaga los requerimientos del animal.

La cantidad de proteína que debe ser suministrada a la dieta dependerá del grado de digestibilidad y disponibilidad de los aminoácidos de los ingredientes para utilizarse en las síntesis de proteínas y otras funciones fisiológicas esenciales del animal.

Digestibilidad

La proteína digestible representa la fracción de la proteína del alimento que ha sido absorbida, o de forma más precisa y según el método de medida, que ha desaparecido del intestino delgado. La digestibilidad ileal puede estimarse de forma directa midiendo el flujo de aminoácidos que atraviesan la venas hepáticas o midiendo la diferencia entre los aminoácidos ingeridos y que atraviesan la válvula ileo-cecal (Austic, 1983).

Los valores de digestibilidad ileal de aminoácidos son utilizados corrientemente por la industria porcina, a pesar de que éstos sufren de dos limitaciones mayores cuando se trata de evaluar precisamente su disponibilidad. Estas limitaciones son la contribución de las pérdidas endógenas al flujo de aminoácidos que atraviesan la válvula ileo-cecal y la absorción de aminoácidos bajo formas que no son metabólicamente utilizables.

La digestibilidad generalmente es derivada de la diferencia entre lo que es consumido y lo que no aparece en las heces y se conoce como digestibilidad fecal o total. La digestibilidad de las proteínas varía según el alimento empleado y la especie de animal, principalmente de este último. La proteína que ha sido consumida y que no aparece en las heces por definición se puede decir que ha sido digerida. Por ejemplo si

20g de proteína aparece en las heces de cada 100g de proteína consumida, esto corresponde a una digestibilidad de 80% (Colin, 1998).

Digestibilidad Ileal

Los valores de digestibilidad ileal son preferidos a los valores fecales. Los valores de digestibilidad fecal son más altos aproximadamente un 8% que los valores de digestibilidad ileal (Colin, 1998).

La proteína que no es digerida pasa al intestino grueso, en el cual actúan las enzimas bacterianas sobre las proteínas y las secreciones del intestino (Lenis, 1992). En el intestino grueso se lleva a cabo una desaminación y/o descarboxilación produciendo amoníaco, la cual es absorbida y transformada en urea, la cual es eliminada en orina incrementando la excreción de nitrógeno urinario, lo que sobrestima la digestibilidad fecal. O bien, puede ocurrir síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco o urea reciclada en el intestino grueso en forma de proteína bacteriana, que constituye gran parte del nitrógeno excretado en las heces y con el consecuente decremento de la digestibilidad fecal (Henry, 1985).

Los valores de digestibilidad ileal son más aceptados porque se asemejan a los aminoácidos disponibles para el animal. Cabe destacar que la disponibilidad dependerá del proceso de elaboración del ingrediente.

Digestibilidad Aparente

Los valores de digestibilidad aparente tanto en el íleon como en la heces son subestimados, ya que no se incluyen las secreciones digestivas, así como el desprendimiento de células epiteliales durante el paso de la digesta a través del tracto digestivo (secreciones endógenas).

Los valores aparentes son afectados por el nivel de proteína cruda de las dietas. En dietas con bajos niveles de proteína cruda la proporción de aminoácidos totales se incrementa debido a las contribuciones endógenas en el íleon terminal. A medida que el

nivel de proteína cruda se incrementa las fuentes endógenas decrecen lo cual tiende a incrementar la digestibilidad aparente de las dietas (Sauer *et al.*, 1989).

Digestibilidad Verdadera

La digestibilidad aparente se convierte en verdadera al tomar en cuenta la determinación de las secreciones endógenas; esto es las secreciones de la glándulas salivales, estómago, hígado y páncreas así como los efectos de la microflora intestinal.

Los valores de digestibilidad verdadera no son afectados por lo niveles de proteína cruda de las dietas. En el pasado las correcciones de las contribuciones endógenas se realizaron usando dietas libres de proteína, o utilizando distintos niveles de proteínas y extrapolando a cero (Low, 1982).

Secreciones Endógenas

Se definen como los aminoácidos encontrados en el quimo intestinal, al final del ileon, o en las heces de cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno (proteína, peptidos y aminoácidos). Estos aminoácidos provienen principalmente de enzimas, albúmina serica, mucoproteínas, células descamadas, peptidos y aminoácidos secretados en el lumen intestinal, además de microorganismos intestinales y pelo consumido del mismo animal (Moughan *et al.* 1991).

La contribución de los aminoácidos endogenos es variable y depende de varios factores, entre los que destacan el peso corporal, la calidad y cantidad de proteína en la dieta, el consumo de alimento y la presencia de factores antinutricionales (Nyachoti *et al.* 1997).

Medición de Pérdidas Endógenas de Nitrógeno (PEN)

Durante la digestión de los alimentos son secretadas en el tracto digestivo sustancias nitrogenadas. El nitrógeno secretado endógenamente es sometido al proceso de digestión junto con el nitrógeno dietario, y sus productos son reabsorbidos (Fuller, 1991). Sin embargo, hasta qué tanto son reabsorbidos no ha sido claramente establecido.

se ha estimado que del 70 al 80% se reabsorbe antes del ileon terminal (Souffrant *et al* 1986, Krawielitzki *et al*, 1994).

Lo anterior indica que solo aproximadamente del 20-30 % del total de las secreciones endógenas de nitrógeno en el intestino son de interés cuando se determinan las pérdidas endógenas de nitrógeno y la digestibilidad verdadera de aminoácidos.

Los aminoácidos libres y péptidos pequeños son rápidamente reabsorbidos y por lo tanto solo constituyen una pequeña parte de las pérdidas endógenas de nitrógeno en el ileon. La mayor parte del N endógeno en el ileon está compuesto de células y proteínas mucilaginosas porque estas proteínas son resistentes a la hidrólisis enzimática. Por consecuencia, prolina y glicina, los principales aminoácidos en las proteínas mucilaginosas, son los principales contribuyentes de las secreciones endógenas de nitrógeno en el ileon terminal.. (Sauer *et al*, 1977) reportaron valores de 78% para aminoácidos no esenciales, prolina y glicina 43% y 13% del total de aminoácidos respectivamente.

La proporción de las secreciones endógenas que no son reabsorbidas son excretadas por el animal (PEN). El método tradicional para determinar excreción endógena de proteína en el ileon involucra el alimentar con una dieta que contiene poca o nada de proteína conocido como método libre de proteína (Hodgkinson *et al*, 1997). Este método sin embargo, no estimula la actividad fisiológica en el intestino, creando un estado fisiológicamente anormal, lo que puede afectar el metabolismo normal de las proteínas dietarias y reducir la secreción de compuestos nitrogenados en el lumen intestinal, afectando la eficiencia de re-absorción. También conlleva a una sub-estimación de el nivel de secreciones endógenas. (Darragh *et al*, 1990).

Recientemente se han desarrollado nuevas metodologías que permiten estimar las pérdidas endógenas de nitrógeno tales como el del isótopo ^{15}N , el de homoarginina y alimentación con péptidos acoplada a ultrafiltración.

En este estudio se empleará la técnica de la caseína enzimáticamente hidrolizada acoplada a ultrafiltración. Este método permite medir el flujo endógeno de aminoácidos en el ileon bajo condiciones fisiológicamente normales, ya que se suministran aminoácidos libres y péptidos (masa molecular <2000 Da), simulando así los productos de digestión de una dieta normal. La proteína endógena se separa de los péptidos dietarios no digeridos por ultrafiltración y la fracción de alto peso molecular (>10,000 Da) da una estimación de las pérdidas endógenas de aminoácidos. Con este método, AA libres y péptidos pequeños de origen endógeno se descartan con la fracción de bajo peso molecular, lo cual lleva a solo una ligera subestimación de las pérdidas endógenas. (Butts *et al*, 1991).

Técnicas de Determinación del Flujo Basal de Proteínas Endógenas hacia el Ileon.

La técnica de dieta sin proteínas es la mas fácil y mas utilizada. El cerdo recibe un alimento compuesto de materias sin proteínas. Se mide el flujo de nitrógeno o de AA hacia el ileon y, de esta manera, se estiman los flujos endógenos. Esta técnica permite determinar solamente los flujos endógenos basales porque se corresponden con el nivel mínimo de perdidas endógenas ya que la ausencia de proteínas en el alimento disminuye las secreciones y no hay factores que estimulen su producción o impidan su reabsorción por la pared intestinal.

Es posible también estimar el flujo basal por regresión: se mide el flujo ileal de nitrógeno o de aminoácidos en cerdos que reciben regímenes con niveles de proteína decreciente, y posteriormente se calcula por extrapolación el flujo por una ingestión nula en proteínas. Este valor corresponde al valor endógeno. La supuesta ventaja de la técnica es que el animal tiene un estado fisiológico normal y que se toma en cuenta el efecto de los factores alimenticios sobre las pérdidas.

Técnica de Determinación del Flujo de Proteínas Endógenas Específico de las Dietas.

La única manera de hacer la distinción entre proteínas dietarias y endógenas es de marcar una de las dos fuentes con el nitrógeno-15(^{15}N), un isótopo estable, y de medir la solución isotópica en el contenido intestinal.

El marcaje de las secreciones se hace por perfusión de un aminoácido (leucina) marcado con ^{15}N en la sangre de los cerdos. El aminoácido se incorpora en todas las secreciones. Cuando se alcanza un equilibrio de marcación, se mide la concentración de ^{15}N de las secreciones y de los tejidos digestivos. Como no es posible aislar las secreciones digestivas, se utiliza como testigo, la concentración en ^{15}N de los aminoácidos libres de la sangre, considerados como el pool precursor de las secreciones. La ventaja de la técnica es que se puede determinar las pérdidas endógenas causadas por cualquier materia prima. Sin embargo, la técnica da solamente resultados por el nitrógeno total y no por los aminoácidos. Además, se desconoce la validez de representatividad de la leucina frente a los otros aminoácidos. Debido a todas las fuentes de imprecisión citadas, se estima que el método sobreestima el flujo endógeno a nivel del ileon.(Letterme, 1995)

Disponibilidad e Influencia del Tratamiento Térmico

La disponibilidad de nutrientes es definida como la porción de los nutrientes ingeridos que es absorbida por el tracto digestivo en una forma que permite que estén disponibles para metabolizarse por el animal (Sauer and Ozimek, 1986). La disponibilidad de los aminoácidos normalmente se determina empleando el método de relación de pendientes, donde la respuesta a niveles graduales del aminoácido de prueba en una proteína es comparada con la respuesta a niveles graduales del aminoácido estándar.

Los métodos anteriores son muy laboriosos y caros, por lo que la digestibilidad ileal de los aminoácidos se ha considerado como un indicador de disponibilidad. La digestibilidad ileal de aminoácidos ha sido empleada como una medida de disponibilidad

de aminoácidos, asumiendo que si un aminoácido no es recuperado en el ileon terminal entonces ha sido absorbido en una forma que puede ser utilizado por el animal.

Se ha reportado que mientras que esto puede aplicarse a proteínas de buena calidad, no puede ser cierto para proteínas tratadas térmicamente (Batterham *et al*, 1990; Moughan *et al*, 1991; Wiseman *et al*, 1991). Por ejemplo, Batterham *et al* (1990) reportaron que mientras 0.76 de lisina digestible ileal fue retenida por cerdos alimentados con una dieta a base de pasta de soya, solo 0.36 fue retenida por cerdos alimentados con harina de semilla de algodón. Ellos sugieren que el calor aplicado a la proteína de la semilla de algodón puede ocasionar que la lisina se absorba en una forma que no es eficientemente utilizada. Resultados similares han sido reportados por Bellaver & Easter 1989, Moughan *et al*, 1991 y Wiseman *et al* 1991, en los que se muestra que los valores de digestibilidad ileal sobreestiman la utilización de la lisina en concentrados proteicos tratados térmicamente.

La aplicación de calor a las proteínas puede inducir cambios en la molécula de la proteína que tiene poco efecto en su digestibilidad pero deja a los aminoácidos absorbidos menos disponibles. Estos aminoácidos pueden subsecuentemente ser desaminados y excretados por el animal. Después de la digestión, los aminoácidos alterados por el calor pueden ser metabolizados en las paredes intestinales y por consiguiente no absorberse en la sangre portal. Numerosos estudios muestran que algunos de los compuestos formados en las proteínas con la aplicación de calor, tales como compuestos de Maillard (fructuosolisina) o isopéptidos formados por enlaces cruzados proteína-proteína pueden ser digeridos pero son ineficientemente utilizados (Bjarnason & Carpenter, 1970; Hurrell *et al*, 1974).

Rérat (1981) sugirió que los nutrientes dietarios pueden ser metabolizados en la pared intestinal durante la absorción. Como consecuencia la digestibilidad ileal puede sobreestimar significativamente la absorción de los aminoácidos. Es razonable sugerir que los aminoácidos de proteínas tratadas térmicamente pueden difundirse del lumen intestinal hacia las células epiteliales. Sin embargo, debido a los requerimientos de

aminoácidos para los mecanismos de transporte activo a través del epitelio, ellos no progresan a la sangre portal si su estructura ha sido alterada y no pueden ser reconocidos por ningún sistema acarreador específico. Por consiguiente, a través de la difusión los aminoácidos pueden ser removidos del lumen intestinal, y por tanto aparentemente digeridos.

Mucho esfuerzo de investigación se ha invertido en el pasado para el desarrollo de la estimación de la disponibilidad de los aminoácidos. En el caso de alimentos con una gran disponibilidad de aminoácidos, los valores de digestibilidad son próximos a los de disponibilidad. Sin embargo, en alimentos con baja disponibilidad de la proteína, los valores de digestibilidad sobreestiman su digestibilidad. Lisina, treonina, metionina, triptofano y fenilalanina son mas sensibles a los tratamientos térmicos y sus valores de disponibilidad metabólica son necesarios para evaluar convenientemente el potencial nutritivo de estos nutrientes. La sensibilidad de estos aminoácidos a los tratamientos térmicos es diferente y los tratameintos térmicos afectan a la disponibilidad de estos AA mucho más que a sus digestibilidades.

La disponibilidad ha sido utilizada como sinónimo de digestibilidad, lo cual no es muy aceptable porque la disponibilidad de los aminoácidos depende del procesamiento y la naturaleza del ingrediente, así como la habilidad del animal para digerir las proteínas.

No todos los aminoácidos digeridos y absorbidos estan disponibles para llevar a cabo las funciones fisiológicas como el mantenimiento, crecimiento o lactación (Colin, 1998).

Debido a la presencia de factores antinutricionales el valor nutritivo de la harina de pescado no procesada es relativamente bajo. El tratamiento térmico ha sido utilizado para desactivar los factores antinutricionales termolábiles presentes. Las condiciones de procesamiento: Tiempo, temperatura, humedad y tamaño de partícula tienen efecto en la inactivación de estos factores y en el valor nutricio de un ingrediente proteico, como la harina de pescado.

El secado de los ingredientes es el procesamiento térmico más común. Este procesamiento consiste en la aplicación de calor y tiene como principal efecto benéfico permitir el almacenamiento de productos que se utilizan en la alimentación animal. Almacenar productos con niveles altos de humedad no solo favorece el problema de putrefacción como es el caso de los productos de origen animal, sino además, evitar el desarrollo de hongos y la producción de las micotoxinas, así como prevenir el proceso de combustión que puede causar un incendio en las bodegas de almacenamiento.

El procesamiento térmico también tiene un efecto benéfico al mejorar el aprovechamiento de nutrimentos. En el caso de las proteínas el calor óptimo puede mejorar la digestibilidad de los aminoácidos. Pero la aplicación de calor también puede causar un efecto negativo a los ingredientes, cuando este calor no es el correcto. Puede haber una desnaturalización de nutrimentos, y en el caso de las proteínas la llamada reacción de Maillard (Campabadal, 1993).

Factores que Modifican la Digestibilidad de las Proteínas

Si bien la digestibilidad de las proteínas varía entre los diferentes alimentos, existen por lo menos tres factores que pueden alterar seriamente el aprovechamiento de las proteínas:

- 1.- Edad del animal
- 2.- Presencia de inhibidores de las proteínas en el alimento
- 3.- Proteínas dañadas por calor debido a la reacción de Maillard

Reacción de Maillard

El calor excesivo o el almacenamiento prolongado pueden producir deterioro en la calidad de las proteínas por la bien conocida reacción de Maillard, también referida como obscurecimiento no enzimático o glicación. Las consecuencias de estas reacciones incluyen la formación de muchos productos:

- Pigmentos cafés insolubles conocidos como melanoidinas.
- Compuestos volátiles asociados al aroma.
- La formación de compuestos mutagénicos.

- Pérdida de aminoácidos esenciales.

En esta reacción los grupo aminos libres de las cadenas de péptidos, frecuentemente el grupo ϵ -amino de la lisina, reacciona con el grupo de azúcares reductores, tales como la glucosa o la lactosa para producir un complejo amino-azúcar, el cual se absorbe pero ya no está disponible para ser utilizado por el animal

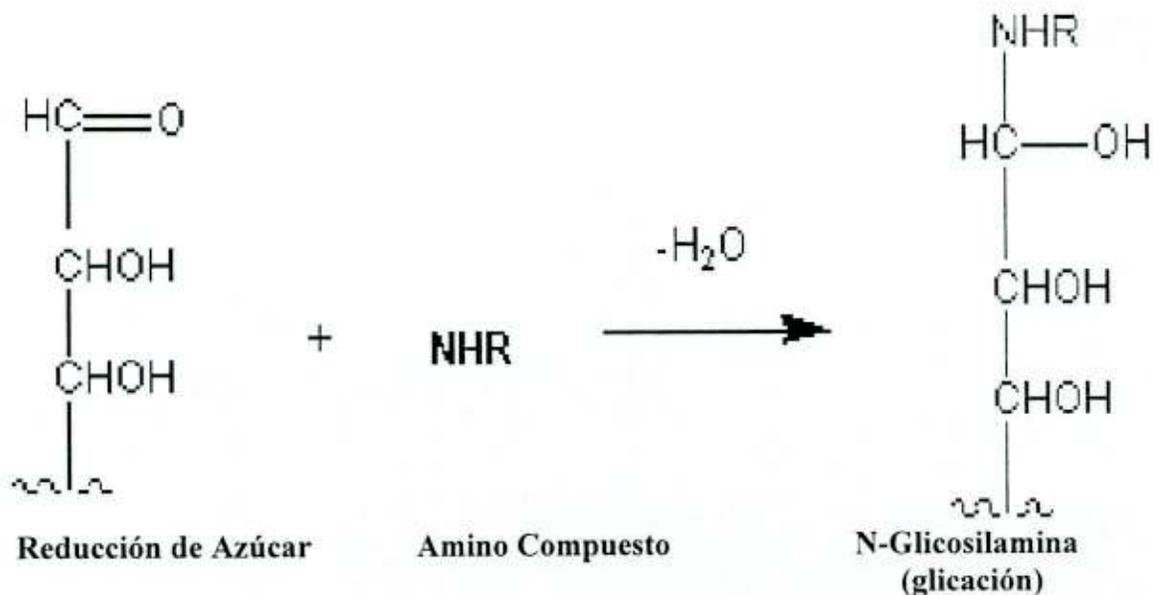


Figura 1. Reacción de Maillard (González, F.L. *et al.*, 2000)

HARINA DE PESCADO

La harina de pescado es un ingrediente muy utilizado en dietas para cerdos como una fuente de proteína altamente digestible. Uno de sus grandes atributos es que como proteína presenta un balance casi ideal en términos de aminoácidos esenciales y en comparación con otras fuentes proteicas, es un proveedor concentrado de proteína dietaria, ya que contiene proteína cruda en rangos de 60-72%.

Las principales alternativas de proteínas animales son productos lácteos, leche seca semidescremada y suero, las cuales son muy caras; así como harina de carne y harina de sangre, las cuales son consideradas riesgosas para la salud. La harina de

pescado es bien tolerada en las dietas de cerdos jóvenes y en ocasiones es una alternativa mas barata, además de que suministra un amplio rango de macro y micro nutrientes; tales como calcio y fósforo disponibles, elementos traza, vitamina A y D, así como ácidos grasos omega 3 (Fowler, 1997).

La harina de pescado es una de las fuentes proteicas que presenta el mejor patrón de aminoácidos para la alimentación de monogástricos. (Campabadal *et al.* 1994). La harina de pescado puede obtenerse de cuerpos completos de peces o de residuos de las fábricas conserveras. En cualquier caso antes de elaborar la harina de pescado la materia prima debe someterse al desengrasado, con ello se cumplen dos fines: se mejora la conservación y se sustraen los lípidos, cuyos ácidos grasos libres comunican olor y sabor desagradable a la carne. (Flores, 1977)

Las harinas de pescado generalmente son superiores a las de carne y hueso o sangre y esta superioridad se basa en el mayor contenido de lisina, metionina y triptofano. Pero también son muy variables según su origen, la clase de pescado, la presencia o ausencia de secados solubles, la inclusión o exclusión de la cabeza del pescado y el proceso de secado. Si éste se lleva a cabo a temperaturas elevadas, sus aminoácidos pueden perder valor nutritivo. (De Alba, 1983).

Harina de Pescado como Fuente de Aminoácidos Esenciales

Las proteínas del pescado tienen funciones biológicas similares a la de los mamíferos. El perfil de aminoácidos de las proteínas corporales en el cerdo es bastante similar a la del pescado y además similar a la de la leche de los mamíferos. Aproximadamente diez de los aminoácidos encontrados en las proteínas del pescado son clasificados como esenciales para los cerdos, porque éstos son incapaces de sintetizarlos por sus propios procesos metabólicos de materiales precursores. Una proteína la cual tiene proporciones de aminoácidos que cubren exactamente las necesidades del cerdo es llamada proteína ideal. Las proteínas del pescado son muy cercanas a la proteína ideal .

La proteína en la harina de pescado tiene una alta proporción de aminoácidos esenciales en una forma altamente digerible, particularmente metionina, cisteína, lisina, treonina y triptófano; presentes en la forma natural de péptidos, éstos pueden ser usados con alta eficiencia para mejorar el equilibrio en conjunto de los aminoácidos esenciales dietéticos.

Las proteínas en un pescado fresco son varias teniendo cada una de ellas una estructura característica. Las principales proteínas de las células musculares son: las extracelulares, como colágeno, elastina y reticulina, las cuales forman los vasos, nervios y tejidos de envoltura muscular y que por lo general son insolubles en agua; y las intracelulares, entre ellas las miofibrilares (actina, miosina y actiomisina), las sarcoplasmáticas y las proteínas reguladoras. Las proteínas miofibrilares constituyen el mayor porcentaje de las proteínas presentes en el músculo de pescado. Algunas de las proteínas tienen una disposición espacial cuádrupla y tridimensional es decir alcanzan una estructura terciaria y cuaternaria, otras solo alcanzan una estructura primaria y secundaria, compuestas por cadenas de polipéptidos o aminoácidos. Esta estructura se observa solo cuando las proteínas están frescas e integrando los tejidos, la que se alterará conforme sean sometidas a procesos físicos o químicos donde perderán total o parcialmente la conformación estructural.

Grasa

La grasa generalmente mejora el equilibrio de los ácidos grasos en el alimento restaurando la relación de las formas de omega 6: omega 3 en 5;1, que es considerada óptima. La grasa en muchas dietas actualmente contiene una relación mucho más allá. Con la proporción óptima y con ácidos grasos omega 3 suministrados como ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), la salud del animal es mejorada, especialmente donde existe menos dependencia de medicación rutinaria.

Energía

La harina de pescado es una fuente de energía concentrada. Con un 70% a 80% del producto en forma de proteína y grasa digerible, su contenido de energía es mayor que muchas otras proteínas.

Vitaminas y Minerales

La harina de pescado tiene un contenido relativamente alto de minerales como el fósforo, en forma disponible para el animal. También contiene una amplia gama de elementos vestigiales. Las vitaminas también están presentes en niveles relativamente altos, como el complejo de vitamina B incluyendo la colina, la vitamina B12 así como A y D (Carvajal, 2002 www.lista-oannes.rcp.net.pe/hpescado01.htm).

Ventajas de la Utilización de la Harina de Pescado en Cerdos

- *Rápido crecimiento en cerdos recién destetados.
- *Mejora la conversión del alimento.
- *Mejora reacciones alérgicas en cerdos recién destetados, comparad con otras proteínas que no se encuentran en la leche.
- *Incrementa la resistencia a las enfermedades, especialmente en cerdos alimentados con dietas sin medicación.
- *Incrementa la fertilidad, nacen más cerdos.
- *Incrementa la composición de la grasa en la carne, ácido docosaexanoico (DHA) y ácido eicosapentanoico (EPA) depositado en la carne .

Adulteraciones de la Harina de Pescado

La Albúmina. Es una proteína que se encuentra en los fluidos celulares, principalmente en el suero sanguíneo de los animales incluyendo los acuáticos, en el huevo y también en las plantas (cereales). En los mamíferos se sintetiza en el hígado y llega a constituir el 60% del plasma sanguíneo, sirviendo para transportar otras proteínas, transportando aniones orgánicos grandes como los ácidos grasos, la bilirrubina y también las drogas y algunas hormonas. Su estructura es casi plana y consta de dos cadenas alfa y beta. Esta proteína tiene una relativa solubilidad en el agua.

La albúmina esta compuesta de una cadena simple de polipéptidos y alcanza hasta una leve estructura secundaria con cadena alfa y beta, la primera comprende 47 a 67% y la segunda no supera el 8%. Esta proteína entonces es muy distinta de las proteínas musculares del pescado, aunque en el proceso de producción de harina de pescado pueden también existir albúminas de especies marinas pero no las de mamíferos, aspecto que esta garantizado tanto por el tipo de proceso que se realiza así como los controles que la actividad sanitaria efectúa sobre las industrias.

Los Priones. Una de las razones de la aparición de proteína modificada espacialmente denominada priones, ha sido probablemente un mal tratamiento físico (calor) o un proceso inadecuado.

Cuando las proteínas son sometidas al calor como sucede cuando se cocinan los alimentos se coagulan y se desnaturalizan. Al formarse uniones químicas por enlaces hidrogenados, sulfurados o enlaces terminales diversos entre las cadenas de polipéptidos que forman la proteína, se pierde la estructura cuaternaria, terciaria y según que temperatura alcance el calor puede perder la estructura primaria. De esta manera es muy difícil llegar a conocer el origen de la proteína si no se alcanza a hacerlos migrar en un campo eléctrico, para formar el patrón característico de la especie de donde procede. Cuando el calor ha desnaturalizado la proteína hasta un punto en que no se pueden recuperar polipéptidos o secuencias de aminoácidos de la estructura primaria, es casi imposible reconocer una especie.

Una de las razones que ha dado origen a la aparición de priones ha sido la modificación de la estructura espacial de las proteínas, la que incide en la modificación de las propias proteínas celulares y mimificar el proceso seguido por los priones (es decir convertir priones naturales en priones modificados por influencia de proteínas exógenas modificadas espacialmente). Este fenómeno solo se observa en proteínas de cerebro y tejido nervioso de los rumiantes y jamás ha sido observado en peces u organismos acuáticos. Las harinas obtenidas de estos últimos contienen ya no proteínas propiamente dichas, sino secuencias de aminoácidos (polipéptidos) desnaturalizados

especialmente, donde es difícil que mantengan su estructura tridimensional que los haga visibles en un supuesto caso de infección priónica.

Si se recurre a técnicas físicas como la espectroscopia, polarimetría, la resonancia magnética o la cristalografía es posible llegar a conocer la estructura de moléculas proteicas, pero estas no son técnicas de rutina y solo tienen interés para estudios estructurales que no son adecuados para hacer comparaciones entre proteínas de diversas especies o tejidos y menos aún si estas proteínas están coaguladas o desnaturalizadas como sucede con la cocción a altas temperaturas (Calderón, 2001).

Micotoxinas. Durante muchos años se ha venido investigando la posibilidad de que la contaminación de la harina de pescado con hongos pudiera dar origen a la presencia de micotoxinas en este producto. Si bien es cierto que bajo condiciones apropiadas de humedad pueden germinar ciertas especies de hongos como *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium*, su ritmo de multiplicación es muy lento en la harina de pescado, por ser ésta un sustrato constituido principalmente por proteínas y aminoácidos que no constituyen una fuente de energía importante para los hongos.

Los hongos productores de micotoxinas (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) solo crecen en alimentos con alta actividad de agua o humedad elevada, principalmente en granos y semillas. En harinas de pescado no se ha reportado crecimiento de hongos. Para que exista secreción de toxinas es necesario una invasión previa del grano o de las semillas. Una vez penetrado, solo si las condiciones de pH, temperatura, humedad o actividad de agua, presencia de cloruros y esencialmente contenido de carbohidratos daría motivo para la secreción de las toxinas.

Dioxinas. Es el nombre de subproductos tóxicos orgánicos clorados, incoloros e inodoros y agrupan a los compuestos pertenecientes a dos estructuras químicas bien diferentes: policloro dibenzo-p-dioxinas y policloro dibenzo furanos que pertenecen al grupo de los contaminantes orgánicos lipofílicos y persistentes.

En la harina y aceite de pescado es una fuente importante de contaminación. La contaminación del pescado depende de gran parte de la contaminación de las áreas marítimas donde habita, siendo menos probable en altamar. La relación entre la contaminación del pescado para consumo humano y de las harinas y aceites para alimentación animal es directa.

El reciclado de los productos de origen animal, teniendo en cuenta la acumulación de las dioxinas en las grasas, puede ser un proceso de concentración. No obstante, los niveles son mucho más bajos en los productos de pescado.

En los procesos con calor, principalmente el secado no es un problema en sí, ya que las temperaturas que se alcanzan no son exageradas. Si es un problema el origen de la fuente de calor. Combustibles limpios (gas natural) o sin contacto directo con el alimento a secar no plantean problemas, en cambio otros procesos de secado que implican contacto directo de los gases de combustión con el material a secar pueden ser importantes fuentes de polución, aunque depende del combustible utilizado y del grado de combustión. Los tratamientos habituales para la obtención de harinas de pescado no tienen relación con el contenido en dioxinas de las harinas

(Gorrachategui, 1999; www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/2001CAPVIII.pdf).

Procesamiento de la Harina de Pescado

La calidad de la harina de pescado también se ve afectada por su procesamiento y condiciones de almacenamiento del pescado durante el período de la pesca y elaboración. La harina de pescado de materia prima muy fresca da por resultado una harina cuya digestibilidad y valor nutricional es muy alta, permitiendo reemplazar parcialmente a la leche en polvo desgrasada en dietas para lechones, por el contrario también pueden encontrarse harina de pescado rancias o con excesos de aceite y sal (Flores, 1977).

Etapas del Proceso de Elaboración de la Harina de Pescado. El proceso de elaboración consta de los siguientes pasos: recepción, transporte, cocido, prensado, secado, enfriado, molido, envasado y almacenado.

Recepción: El pescado fresco proveniente de las embarcaciones pesqueras es muestreado y analizado para controlar la frescura.

Cocción: se lleva a cabo por medio de los cocedores en cuyo interior se encuentra un gusano que se encarga de triturar el pescado y al mismo tiempo se cuece al recibir vapor caliente entre 80 y 100 °C en un tiempo aproximado de 20 minutos. Este procedimiento esteriliza el pescado, detiene la actividad microbiana y enzimática, coagula las proteínas y desintegra las membranas celulares para facilitar la separación de los solubles y el aceite de la materia seca.

Prensado: La materia prima cocida es alimentada a una prensa de tornillo donde la mayor parte del tejido es exprimido para separarlo de lo líquido, se logra extraer aproximadamente un 60% de humedad. En este paso se da una ramificación dentro del proceso: los líquidos se separan hacia la producción de aceite y los sólidos seguirán a la fase de secado.

Secado: En este paso la harina recibe el cocimiento final. La secadora alcanza una temperatura de 90 °C que hay que mantener constante, ya que si se eleva más, la harina saldrá quemada y bajará su calidad. Según parámetros internacionales, la humedad ideal de la harina no debe sobrepasar el 10% de agua, ni debe bajar del 6%. Si es inferior significa que se ha recalentado y su calidad nutritiva y proteica se ha alterado. Si esta demasiado húmeda no se puede vender y además puede desarrollar hongos y bacterias.

Enfriamiento: Después del secado la harina sale con la humedad deseada, pero a una temperatura no conveniente para ser envasada inmediatamente. En el enfriador la harina se enfría con un gran flujo de aire que circula a contracorriente impulsado por un ventilador.

Molienda: una vez enfiada la harina se somete a la molienda utilizando molinos eléctricos de martillos para cumplir con los estándares internacionales de calidad para su posterior envasado y estibado. (Doode, 1996).

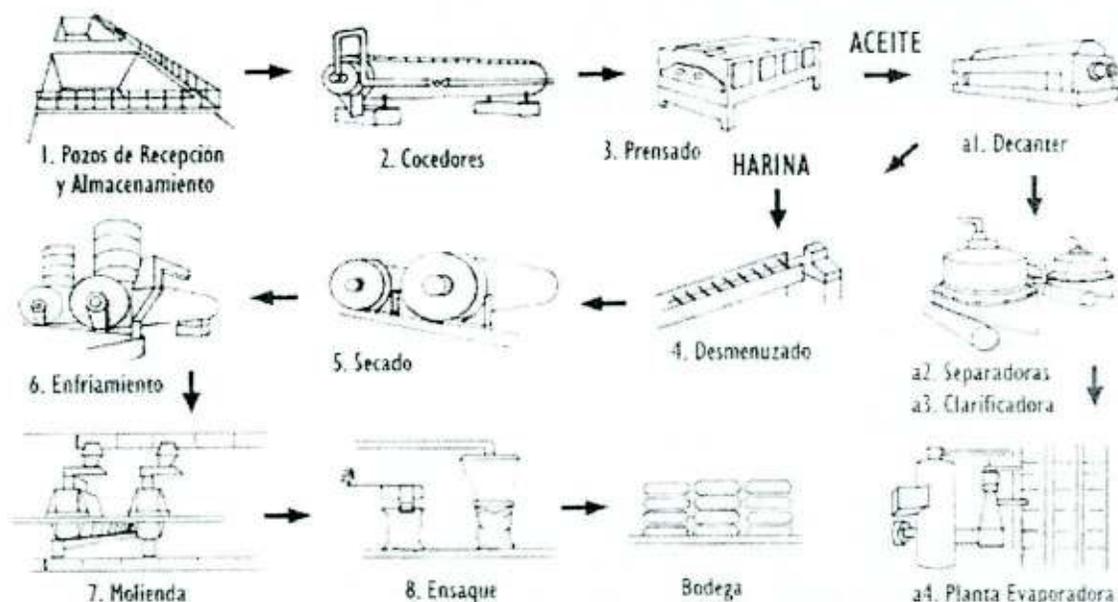


Figura 2. Proceso de Elaboración de Harina de Pescado (www. elgolfo.com)

LISINA REACTIVA DIGESTIBLE

En los últimos años, se ha ido mejorando notablemente la nutrición animal formulando dietas mas precisas, empleando productos procesados de buena calidad. Cubriendo los requerimientos de los animales, principalmente del contenido de aminoácidos esenciales, siendo la lisina el principal aminoácido limitante en la formulación de dietas para cerdos.

En ingredientes que han sufrido un procesamiento térmico o un almacenamiento prolongado, el grupo ϵ -amino de la lisina puede reaccionar con otros compuestos presentes en el ingrediente quedando nutricionalmente no disponible (Hurell and Carpenter, 1974). A las unidades de lisina cuyo grupo epsilon-amino todavía está libre para reaccionar con un reactivo prueba, se le denomina lisina reactiva.

Lisina Reactiva

La estimación química de lisina en alimentos puede involucrar la determinación de lisina digestible total o lisina disponible. La lisina total es determinada después de una hidrólisis ácida y no necesariamente refleja la cantidad de lisina que está nutricionalmente en forma disponible. La lisina total es de interés como una parte del perfil de aminoácidos para áreas de investigación en cruzamiento de plantas o trabajos con proteínas puras.

En alimentos donde no ha ocurrido reacción de Maillard el valor de lisina digestible total puede ser muy cercano al valor de lisina disponible. La lisina disponible se refiere a aquellos residuos de lisina que poseen grupos ϵ -amino libres. Para los alimentos que han sido procesados o almacenados por periodos largos en la presencia de azúcares reductores, pueden perder su valor nutricional ya que la reacción de Maillard involucra la interacción con el grupo ϵ -amino de la lisina. Esta lisina que reaccionó no es susceptible al ataque enzimático quedando nutricionalmente no disponible; (Hurrell and Carpenter, 1981) por lo que es importante determinar lisina disponible en este tipo de alimentos. ya que la aplicación de las técnicas convencionales puede llevar a inexactitudes, especialmente a una sobreestimación de la lisina disponible.

Métodos para Determinar Lisina Reactiva.

Cuando hay daño por reacción de Maillard, el derivado de la lisina predominante es la deoxiquetosil-lisina, la cual puede revertirse a lisina durante la hidrólisis ácida cuando se lleva a cabo el análisis de aminoácidos. Esto es que parte de la lisina determinada en la dieta y digesta ileal representará a la deoxiquetosil-lisina, la cual aunque es parcialmente absorbida en el intestino no es de valor nutricio para el animal (Hurrell and Carpenter, 1981).

Consecuentemente, el contenido de lisina de alimentos y digesta ileal, determinado por análisis convencionales de AA son engañosos. Un procedimiento de análisis alternativo para alimentos que han sufrido reacción de Maillard es el de cuantificar la lisina reactiva usando un ensayo específico. A este respecto se han desarrollado

numerosas técnicas biológicas, bioquímicas y químicas que permiten la determinación del contenido de la lisina químicamente reactiva en estos ingredientes, tales como:

Método de fluorodinitrobenzeno (FDNB)

Método de la furosina

Método del OPA

Método del colorante

Ensayos microbiológicos

De los métodos anteriormente señalado el más conocido es el FDNB o método de Carpenter. Este procedimiento esta basado en la reacción cuantitativa del FDNB con los grupos libres ϵ -NH₂ de la lisina en proteínas purificadas con la formación de ϵ -dinitrofenil-lisina (ϵ -DNP-lis), un compuesto amarilloso soluble en agua, el cual es espectofotométricamente cuantificado después de una hidrólisis ácida. Los grupos α -amino de los aminoácidos combinados en enlaces peptídicos no están libres para reaccionar. Además, los derivados α -DNP de los grupos N-terminal de los aminoácidos de la proteína son solubles en éter y no son medidos como lisina reactiva. Las dificultades se presentan con la determinación de lisina reactiva de hidrolizados de proteína, ya que la lisina libre es convertida a bis-DNP-lis un compuesto soluble en éter, subestimando los valores de lisina reactiva. Este método no es útil para alimentos que contienen gran cantidad de carbohidratos. La presencia de carbohidratos pueden presentar bajos resultados si el DNP-lis se pierde durante la hidrólisis ácida. También los carbohidratos pueden llevar a la formación de compuestos interferentes y que la cantidad de lisina disponible sea sobreestimada (Desrosiers, 1989).

El agente derivador para determinar lisina reactiva digestible debe ser específico para el grupo ϵ -amino de la lisina; es por ello que el método FDNB no es confiable debido a que el reactivo usado puede reaccionar con el grupo α -amino y éste no sera detectado como reactivo libre de la lisina.(Moughan and Rutherford, 1996)

Sin embargo, no toda la lisina químicamente reactiva de las proteínas tratadas térmicamente es absorbida en el intestino delgado (Desrosiers *et al*, 1989; Moughan *et*

al., 1996). Existe la evidencia de que en aquellos alimentos que han sufrido daño por reacción de Maillard, la lisina reactiva es absorbida en forma incompleta (Boctor and Harper, 1968; Valle-Riestra and Barnes, 1969; Desrosiers *et al.*, 1989). Es por ello que métodos como el FDNB son inapropiados para determinar lisina disponible, ya que asumen incorrectamente que toda la lisina reactiva presente en un ingrediente es digerida y absorbida. Además, el método para determinar digestibilidad ileal de aminoácidos no siempre predice en forma adecuada la disponibilidad de la lisina en ingredientes tratados térmicamente y puede sobreestimar su valor hasta en un 20-30% (Batterham, 1992).

Lisina Reactiva Digestible

El método, propuesto por Mauron y Bujard (1964) para determinar lisina reactiva digestible involucra la reacción de guanidinación. La guanidinación es un proceso químico donde los residuos de la lisina de las proteínas dietarias, la lisina químicamente reactiva (con los grupos ϵ -amino libres), son transformados a homoarginina (ácido 2-amino-6-guanidinoexanoico) reaccionando con ortometil-isourea bajo condiciones alcalinas. La metil-isourea puede reaccionar con el grupo libre ϵ -amino de la lisina formándose el residuo guanidinado homoarginina. La homoarginina es estable a la hidrólisis ácida, por lo que su cuantificación por técnicas cromatográficas convencionales puede servir como una medida de la lisina disponible o reactiva. La reacción de guanidinación es altamente específica para el grupo ϵ -amino de la lisina y es muy dependiente del pH, ya que el grupo ϵ -amino debe de ser deprotonado para reaccionar con la O-metilisourea.

La técnica de digestibilidad ileal verdadera también es llevada a cabo y el método de guanidinación es utilizado para determinar el contenido de lisina reactiva tanto en la dieta experimental como en la digesta ileal de los animales alimentados con esa dieta. Entonces se puede calcular el coeficiente de digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva y así determinar lisina reactiva digestible.

Mauron and Bujard (1964) fueron los primeros en utilizar la reacción de guanidinación para medir la disponibilidad de la lisina reactiva en alimentos y diversos

autores han empleado esta técnica para medir la lisina disponible en productos que han sufrido encafecimiento (Hurrell and Carpenter 1974; Creamer *et al* 1976; Nair *et al* 1978).

CARNE MAGRA

En los últimos 25 años, uno de los principales objetivos de los programas de selección porcina ha sido la reducción del contenido en grasa de la carne porcina. La demanda por parte de los consumidores de productos cárnicos con poca grasa ha provocado una evolución de la producción hacia un cerdo magro, con un contenido graso inferior.

A pesar de que el término magro es comúnmente utilizado para referirnos al músculo, “músculo magro”, actualmente se refiere al tejido que consiste principalmente de agua y proteínas. El músculo está compuesto por tejido magro y depósitos de lípidos. La porción relativa de tejido magro y componentes grasos en el músculo puede variar dependiente de la genética, sexo, y edad, así como del músculo específico evaluado. La composición puede variar de 75% o más tejido magro y 25 % de tejido graso basado en la composición genética del cerdo y de las condiciones medio ambientales donde el cerdo fue criado.

Los principales actores que influyen en la producción de carne magra son la genética, edad, sexo y la nutrición del animal, siendo este último de gran importancia, debido a que concentraciones inadecuadas de nutrientes disminuyen la conversión alimenticia, ganancia diaria de peso y el porcentaje de tejido magro de la carne. Los cerdos requieren de un suplemento adecuado de nutrientes para mantenimiento y crecimiento de los tejidos, siendo los nutrientes claves para el crecimiento la energía, fósforo, vitaminas y aminoácidos.

(Rodríguez, 2002; www4.ulpgc.es/departamentos/animal/nutrición/tema13htm)

El Rendimiento Magro y los Aminoácidos

Los aminoácidos son necesarios para formar actina y miosina del músculo y las proteínas del tejido conjuntivo (sobre todo colágeno). Una deficiencia proteica durante el desarrollo del animal, provoca una menor formación de músculo y por lo tanto una mayor deposición de grasa y un menor crecimiento. Una dieta deficiente de aminoácidos reduce el crecimiento muscular, lo cual resulta en un aumento en la deposición de grasa. Al incrementar el porcentaje de lisina de deficiente a adecuado, se incrementa la deposición de proteína y se disminuye la grasa corporal.

La mejora de la genética porcina, ha permitido la obtención de estirpes con canales cada vez más magras, lo que significa mayores necesidades proteicas para sostener esta deposición muscular. Además, las necesidades proteicas son mayores al aumentar la relación músculo/grasa depositada, por lo tanto, las necesidades de aminoácidos por kilo de peso ganado disminuyen desde el nacimiento hasta la madurez, esto es el porcentaje de proteína que se incluye en las raciones de los animales jóvenes es mayor que el de las raciones en animales en etapa de finalización.

Como ya se ha señalado anteriormente, respecto al aporte proteico es conveniente tener presente que:

- Si la ingestión de proteína es escasa, se va a limitar la formación de músculo.
- Al incluir exceso de proteína en la ración, respecto al potencial genético del animal, se provoca una desaminación de aminoácidos que se almacenan en forma de grasa saturada.
- Al utilizar proteína de bajo valor biológico se limita la síntesis proteica, lo que provoca que parte de los aminoácidos se desaminan y las cadenas carbonatadas se almacenan en forma de grasa saturada; en raciones de este tipo, el aporte de aminoácidos esenciales mejora la calidad proteica de la ración, reduciendo la deposición de grasa.
- La utilización de raciones poco energéticas provoca que parte de los aminoácidos se emplean como sustrato energético, limitándose la síntesis proteica.

-Cualquier causa que reduzca la ingestión de alimento por ejemplo estrés, calor, etc. da lugar a una menor ingestión de aminoácidos, lo que se manifiesta en una mayor deposición de grasa y menor crecimiento de los animales.

-Para evitar la deposición de grasa aceitosa (no saturada) en los monogástricos, durante la etapa de finalización, se debe reducir el contenido en grasa de la dieta (para que la grasa de la canal sea saturada procedente de la síntesis endógena), y evitar el suministro excesivo de materias primas con un alto contenido en ácidos grasos, por ejemplo maíz, semillas, oleaginosas y harina de pescado.

(Rodríguez, 2002; www4.ulpgc.es/departamentos/animal/nutrición/tema13htm).

LA RATA COMO MODELO DEL CERDO

Los estudios de digestibilidad ileal realizados en cerdos son muy costosos, por lo que el desarrollo de un modelo en rata, dado sus similitudes fisiológicas con el cerdo, se considera como una alternativa para estos estudios. Esto conlleva varias ventajas: son métodos más baratos y simples ya que se requiere de lotes de prueba pequeños por el menor consumo de alimento de las ratas y las necesidades de espacio para confinamiento son también pequeñas; el manejo de los alimentos es más fácil así como la recolección de la muestra, además de que permite la evaluación rutinaria de los ingredientes (Smith *et al.*, 1990; Skilton *et al.*, 1991; Donkoh *et al.*, 1994;).

Estudios preliminares indican que la rata es un modelo adecuado para el cerdo para la determinación de digestibilidad aparente ileal de amino ácidos (Moughan *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1990; Donkoh *et al.*, 1994). Sin embargo, también se han reportado diferencias para ambas especies. Con excepción del caso de las leguminosas, las diferencias reportadas para otros ingredientes pueden deberse a condiciones experimentales similares insuficientes, más que a las diferencias intrínsecas de los ingredientes en la forma en que la rata y el cerdo digieren la proteína (Huisman *et al.*, 1991). A este respecto es importante señalar que en los estudios con cerdos la digesta ileal es colectada a través de una cánula de PVC en forma de T, mientras que en los modelos con rata la digesta es colectada utilizando en método de sacrificio. Por lo que es importante definir un método de muestreo de digesta ileal para ambas especies si se

quiere realizar una comparación mas fina de la digestibilidad ileal de amino ácidos entre ambas especies (Moughan *et al*, 1984).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Bioterio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

El ingrediente a evaluar fueron dos harinas de pescado "A" y "B" cuya calidad difiere por tratamiento térmico. La compañía de alimentos balanceados no proporcionó las condiciones de procesamiento.

Selección y Alojamiento de los Animales

Se seleccionaron al azar veintinueve ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 100 ± 5 g de peso inicial. Las ratas fueron destetadas a las 4 semanas de edad y criadas con una dieta de alta calidad hasta su alojamiento en el bioterio. Los animales se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable con piso de malla de alambre a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 65-70% y con un ciclo de luz oscuridad de 12 hrs. (Arrington, 1972).

Administración de las Dietas

Las ratas se alimentaron con una dieta de alta calidad por 3 días para su adaptación y fueron entrenadas para consumir alimento por un período de 3 h (08:30-11:30) durante 7 días. Posteriormente se introdujeron las dietas experimentales, las cuales se ofrecieron *ad libitum* y el agua estuvo siempre disponible.

Se ofrecieron tres dietas de composición distinta, la primera a base de caseína enzimáticamente hidrolizada (CEH), para medir secreciones endógenas, la segunda a base harina de pescado A y la tercera a base de harina de pescado B para el ensayo de digestibilidad ileal (Cuadro 1).

Dieta a Base de CEH para Medición de Pérdidas Endógenas de Nitrógeno. (Flujo Ileal Endogeno de Aminoácidos)

Se seleccionaron nueve ratas y se les alimentó con una dieta a base de caseína (10% de proteína cruda) por un periodo preliminar de 12 días, seguida por una dieta a base de CEH por 4 días. La CEH incluye aminoácidos libres y péptidos pequeños (PM<5000).

Dietas a Base de Harina de Pescado.

Las 20 ratas restantes se dividieron en 2 grupos de diez. A un grupo se les ofreció una dieta a base de harina de pescado A y al otro una dieta a base de harina de pescado B, durante un período de 16 días. (Rutherford and Moughan, 1998).

Cuadro 1. Composición porcentual de las dietas de caseína, caseína enzimáticamente hidrolizada (CEH) y harinas de pescado (HP).

Ingredientes	CEH	Caseína	HP A ó B
Almidón de maíz	63.3	63.3	63.3
Celulosa purificada	5.0	5.0	5.0
Aceite de maíz	6.5	6.5	6.5
Sacarosa	10.0	10.0	10.0
Vitaminas y minerales	5.0	5.0	5.0
Oxido de cromo	0.2	0.2	0.2
CEH	10.0	-	-
Caseína	-	10.0	-
Harina de pescado	-	-	10.0

Moughan, 1996.

Colección de la Muestra

Durante el día 16 de experimentación se llevó a cabo el sacrificio de las ratas, las cuales fueron asfixiadas con cloroformo confinadas en un desecador (cesando inmediatamente toda estimulación neural para el intestino). Inmediatamente después de llevar a cabo la disección, se tomaron los 20 cm finales del ileon. Posteriormente se

limpió con cuidado la superficie intestinal exterior, utilizando un papel de seda absorbente y el contenido fue vaciado lentamente, haciendo pasar aproximadamente 10 ml de agua bidestilada sobre el interior de la porción del ileon, utilizando una píseta. El pH de la digesta ileal de las ratas alimentadas con la dieta a base de CEH se ajustó aproximadamente a pH 3 con HCl 6 M para minimizar la actividad proteolítica. La digesta ileal de las ratas restantes se guardó por separado y se conservaron a -20°C para su posterior liofilización. Se hicieron muestras combinadas por grupos de tres ratas, obteniéndose un número de seis muestras para los análisis subsiguientes de cromo y aminoácidos.

Pérdidas Endógenas de Nitrógeno

Las digestas obtenidas de las ratas alimentadas con la dieta a base de CEH se pesaron, se les midió el volumen y posteriormente se transfirieron a tubos para centrifuga. Las digestas se centrifugaron a $1400\times g$ por 45 min a 0°C . El precipitado se relavó y recentrifugó. Los lavados se combinaron con el sobrenadante. Los sobrenadantes se sometieron a ultrafiltración utilizando Células con agitación Amicon de 50 ml con un límite de exclusión de peso molecular de 10 000 Da. El filtrado se separó y el retenado (la fracción de peso molecular alto) se lavó y se sometió a una segunda ultrafiltración. El total de precipitante más la fracción de alto peso molecular (retenado) se liofilizó, se molió finamente y fue posteriormente almacenado a -20°C para la determinación molecular de los péptidos pequeños y aminoácidos libres ($\text{PM}<10000$) de las proteínas endógenas no digeridas ($\text{PM}<10,000$).

La digesta obtenida de las ratas alimentadas con las dietas a base de harina de pescado A y B se liofilizaron para posteriores análisis químicos de cromo y aminoácidos. (Butts *et al*, 1991)

Lisina Reactiva

La reacción de guanidinación se llevó a cabo antes del análisis de aminoácidos y se determinó lisina reactiva en la dietas a base de harina de pescado A y B, y en la digesta ileal de los animales alimentados con esas dietas.

Técnica de Guanidinación

Preparación del Reactivo O-metilisourea. Añadir 4gr de Hidróxido de Bario $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ a aproximadamente 16 ml de agua destilada-deionizada previamente hervida por 10 min, la solución se calienta casi a ebullición y se le añaden 2gr de O-metilisourea en un tubo de centrifuga de 40ml, la solución se deja enfriar por 30 min. Antes de centrifugar a 6400g por 10 min, se separa el sobrenadante y el precipitado se lava con 2ml de agua destilada-deionizada y se vuelve a poner en la centrifuga. Los lavados se juntan y se checa el pH, si el pH de la solución es menor de 12, la solución se vuelve a preparar, pero si el pH es mayor de 12 se ajusta al pH apropiado para la guanidinación (10.6-11.0) y se lleva a un volumen de 20 ml con agua destilada-deionizada.

Condiciones Iniciales de Guanidinación Se analizaron muestras del ingrediente prueba (harina de pescado A y B), digesta ileal y dietas.

Las muestras del ingrediente prueba y de la dieta se trabajaron por duplicado, y se incubaron por 1 y 7 días respectivamente en 0.6M O-metilisourea a pH 10.6 a $21 \pm 2^\circ C$ en un baño con agua y agitación y una relación de reactivo a lisina mayor de 1000 (10 mg de muestra y 20 ml de reactivo).

Las muestras de digesta ileal se incubaron de 3-7 días en 0.6M O-metilisourea (pH= 11) a $21 \pm 2^\circ C$ en un baño con agua y agitación y una relación reactivo a lisina mayor de 1000. Después de la incubación, las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor (Rutherford and Moughan, 1997). Posteriormente se analizaron para aminoácidos por HPLC.

El porcentaje de guanidinación de la lisina se calculó de la concentración de la lisina y de la homoarginina en las muestras guanidinadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

Conversión de lisina a homoarginina= $\left(\frac{\text{mol de homoarginina}}{\text{mol de homoarginina} + \text{mol de lisina}}\right) \times 100$

Si el porcentaje de conversión de lisina a homoarginina no es el esperado bajo las condiciones iniciales de guanidación, se probaron diferentes condiciones de ésta hasta obtener un porcentaje de conversión adecuado.

Análisis Químicos

Oxido de Cromo por Espectroscopia de Absorción Atómica y Digestión de las Muestras por Energía de Microondas.

Se pesaron 0.01 g de muestra y se precalcinaron en la parrilla eléctrica. Se transfirieron a la mufla por 6 h a 650°C. A las cenizas resultantes se les aplicó la energía de las microondas en un rango del 85 al 95% a 90 psi por 58 min. A las soluciones resultantes se les determinó el contenido de cromo por Espectroscopia de Absorción Atómica (García-Rico *et al*, 1999).

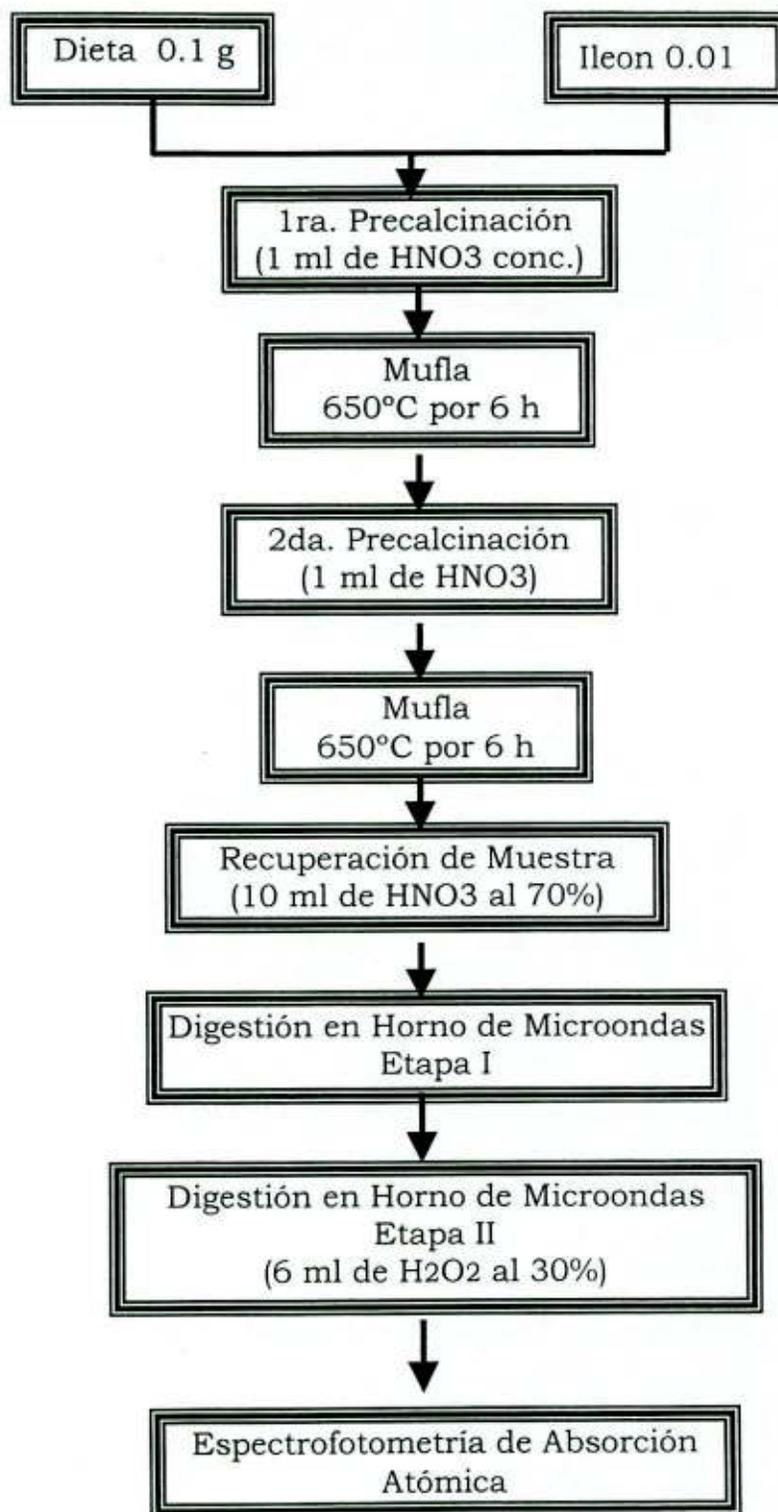


Figura 3. Determinación de Cromo

Aminoácidos por Cromatografía de Alta Resolución.

Las muestras se hidrolizaron en un exceso de HCl 6N a vacío de 3 a 6 h dependiendo del contenido de proteína y se evaporaron a sequedad a 65°C en rotavapor. El hidrolizado seco se llevó a un volumen de 2 ml con buffer de citrato pH=2.2 Se añadió o-phtaldialdehido como agente derivatizante. Se utilizó detector de fluorescencia a 340 nm y tetrahidrofurano al 1% . Para las muestras guanidinadas no se llevó a cabo la dilución con el buffer de citratos, se inyectaron 250 µl de muestra y 250 µl de OPA (Vázquez *et al*, 1995).

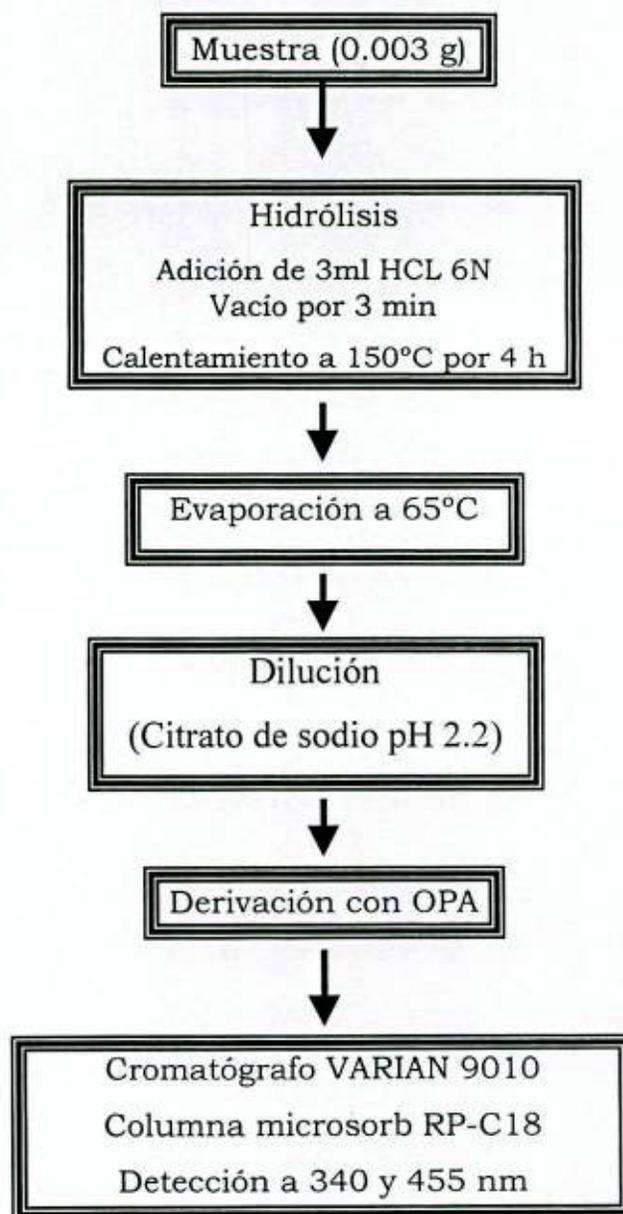


Figura 4. Determinación de Aminoácidos por HPLC

Cálculos

Para los cálculos correspondientes se utilizaron las siguientes fórmulas:

Flujo ileal de AA=Concentración de AA en digesta ileal X (Cromo en dieta/Cromo en ileón)

Flujo ileal endógeno de AA= Aplicar la fórmula anterior con las muestras obtenidas del bioensayo de ratas alimentadas con CEH.

El flujo de aminoácidos para las ratas alimentadas con caseína enzimáticamente hidrolizada se calculó basándose en el contenido de aminoácidos del precipitante más la fracción de alto peso molecular, seguida de centrifugación más el tratamiento de ultrafiltración, y para la digesta total se incluyeron los aminoácidos del sobrenadante ultrafiltrado.

Digestibilidad verdadera de lisina = (Digestibilidad aparente de lisina+(Flujo ileal endógeno de lisina/lisina en dieta)) X 100

Digestibilidad verdadera de lisina reactiva = (Digestibilidad aparente lisina reactiva + (Flujo ileal endógeno de AA en dieta/homoarginina de la dieta)) x 100

Digestibilidad Aparente = 1- (cromo en dieta x homoarginina en ileon/homoarginina en dieta x cromo en ileon).

Lisina reactiva digestible= Digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva x lisina reactiva en ingrediente

Lisina digestible= Digestibilidad ileal verdadera de lisina x lisina en el ingrediente

Análisis Estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis descriptivo y se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, usando el programa estadístico NCSS 6.0 (Steel y Torrie, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El calentamiento de los ingredientes proteicos durante su procesamiento puede dar como resultado una reducción en la calidad de su proteína; o una reducción en la disponibilidad de sus aminoácidos particularmente de lisina, ya que puede sufrir reacciones tipo Maillard. Por lo que existe un renovado interés en estudiar el efecto del procesamiento de los alimentos en la disponibilidad de la lisina.

Las técnicas convencionales para determinar digestibilidad de lisina y para determinar lisina químicamente disponible no describen adecuadamente los efectos del procesamiento en la biodisponibilidad de la lisina. Existe mucha información en la literatura que describe las transformaciones químicas que la lisina sufre durante el procesamiento de los alimentos y el destino de los residuos alterados durante su digestión y metabolismo. En el presente estudio se tomó en cuenta los residuos de lisina alterados como pérdida para el animal para su síntesis de proteína, y se determinó la absorción de los residuos de la lisina no alterada o lisina reactiva remanentes en la harina de pescado. Métodos como el FDNB, que miden la lisina químicamente reactiva, no son muy precisos, ya que asumen una completa digestión y absorción de la lisina reactiva.

En este estudio primero se investigó el tiempo de reacción y pH requeridos para alcanzar una completa conversión de lisina a homoarginina en las muestras tanto de harina de pescado, como de las dietas y la digesta ileal obtenida de ratas alimentadas con dichas dietas.

Composición Química de las Harinas de Pescado Analizadas

La composición proximal, así como el perfil de aminoácidos de las harinas de pescado "A" y "B" analizadas en este estudio se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición química de harina de pescado (%)

	Harina de Pescado "A"	Harina de Pescado "B"
Materia seca	92.1	92.74
Proteína	71.30	71.61
NNP ^b	1.26	1.24
Proteína - NNP	70.0	70.3
Grasa	9.34	9.89
Cenizas	14.13	14.21
AA esenciales		
Lisina	8.11	7.85
Metionina	2.38	2.32
Histidina	3.10	2.76
Fenilalanina	3.38	3.29
Tirosina	2.68	2.45
Treonina	3.64	3.53
Leucina	6.65	6.44
Isoleucina	3.93	3.87
Valina	4.37	4.41
AA no esenciales		
Aspártico	7.70	7.72
Serina	2.69	2.55
Glutámico	11.79	11.41
Glicina	7.07	7.03
Alanina	6.30	5.98
Arginina	5.89	5.52

NNP = Nitrógeno No Proteico

Condiciones de Guanidinación

Las condiciones iniciales de guanidinación dieron un porcentaje de conversión de lisina a homoarginina de 33%, valor muy por debajo de lo reportado por Velmurug et al,

1996, de 69%. Por lo que se probaron las siguientes condiciones de guanidinación en harina de pescado, dieta e ileon; así como también variaciones en la preparación de los reactivos.

1.- Se pesaron 1mg de dieta, harina de pescado, e ileon. Las muestras de dieta y harina de pescado se incubaron por 1 día y la muestra de ileon por 3 días en el reactivo o-metil isourea a 21 °C con un pH de 10.6 para dieta y harina de pescado y un pH de 11.0 para ileon, en un baño con agitación.

2.- Se utilizaron las mismas condiciones anteriores, pero empleando las muestras desgrasadas.

3.- Las muestras a analizar fueron: dieta, harina de pescado y caseína. Se varió el pH para las muestras de 10.6 a 11.0. Se verificó el pH diariamente y si fue necesario se ajustó de nuevo a 11.0. La temperatura del baño se modificó a 30 °C. El reactivo o-metil isourea se preparó con agua sonicada.

4.- Las muestras a analizar fueron: dieta, harina de pescado, estándar de lisina y caseína. Se probaron pH de 10.6 y 11.0 para todas las muestras. Se incubaron por 10 días en baño con agitación a 30 °C. El calentamiento del hidróxido de bario se realizó a punto de ebullición.

5.- Las muestras a analizar fueron: dieta, harina de pescado e ileon. Se utilizó pH 11.0 para las tres muestras. No se utilizó agua sonicada para preparar el reactivo. Las muestras se incubaron por 5 días en baño de agitación a 30 °C. Se midió el pH diariamente y si fue necesario se ajustó con HCl o NaOH.

Cuadro 3. Condiciones de guanidinación probadas y porcentajes de conversión de lisina a homoarginina en harina de pescado.

PH	Temperatura ° C	Dias de Incubación	% de Conversión
10.6	21	3	0
11	30	11	30
11	30	5	84

De acuerdo al máximo grado de conversión de lisina a homoarginina alcanzado en harina de pescado correspondiente a 84%, las condiciones de guanidinación empleadas en este estudio fueron: cinco días de incubación en 0-metil isourea a pH 11.0, en un baño con agitación a 30°C y una relación de reactivo a lisina de 1000.

El porcentaje de conversión de lisina a homoarginina obtenido para la harina de pescado "A" fue de 83% y para la harina de pescado "B" de 79%, valores reportados en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Media del porcentaje de conversión de lisina a homoarginina en harina de pescado A y B.

Harina de Pescado	Conversion de Lisina a Homoarginina (%)
A	83
B	79

n=3

La conversión completa de lisina a homoarginina no fue alcanzada para ninguna de las dos harinas, lo cual ya ha sido reportado por Velmurugu et al, (1996).

Comparación de lisina y lisina reactiva (homoarginina) en las harinas de pescado "A" y "B".

El contenido de lisina fue mayor que el contenido de lisina reactiva (las unidades de lisina cuyo grupo epsilon-amino todavía está libre para reaccionar con el reactivo prueba), en ambas harinas. El contenido de lisina y lisina reactiva fue más bajo para la harina de pescado "B". Este resultado puede ser un indicativo de que la temperatura empleada en el procesamiento térmico de la harina de pescado B fue más alta que la empleada para procesar la harina de pescado A. El decremento en el contenido de lisina reactiva en la harina de pescado B, resulta probablemente de una mayor formación de compuestos derivados de la reacción de Maillard. Lo cual indica que con el incremento en la temperatura de procesamiento, más lisina sufre reacciones de tipo Maillard.

Cuadro 5. Media de la concentración de lisina y homoarginina (lisina reactiva) en harinas de pescado A y B (%)

Harina de Pescado	Homoarginina	Lisina
A	5.1	5.7
B	4.4	5.5

n= 3

Comparación de la Digestibilidad Ileal Verdadera de Aminoácidos Acido-estables.

Para llevar a cabo el cálculo correspondiente de digestibilidad ileal verdadera (DIV), se tomó en cuenta el valor obtenido de flujo ileal endógeno de aminoácidos equivalente a 102 ppm.

Los coeficientes de DIV de los aminoácidos ácido-estables fueron determinados por el análisis convencional de aminoácidos (Cuadro 6). La mayoría de los aminoácidos analizados para las harinas de pescado A y B fueron altamente digestibles, resultado de la inactivación o destrucción de los factores antinutricionales, así como también de la desnaturalización de las proteínas, haciéndose más susceptibles a la proteólisis. Sin embargo, la DIV de los AA de la harina de pescado B fueron más bajas que las de harina de pescado A, con excepción de treonina, isoleucina y ácido glutámico. Por lo que se puede inferir que la temperatura empleada durante el procesamiento térmico fue más alta para la harina de pescado B. El decremento en la digestibilidad de los AA de la harina de pescado B asociado al tratamiento térmico, se puede deber en parte a un decremento en la eficiencia de las enzimas proteolíticas para unirse a los enlaces peptídicos en la vecindad de los residuos de lisina alterados.

Cuadro 6. Digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos acido-estables en las harinas de pescado A y B (%)

Aminoácidos	Harina de Pescado "A"	Harina de Pescado "B"
Esenciales		
Lisina	96.7	93.4
Metionina	99.8	98.5
Histidina	98.6	94.3
Fenilalanina	99.8	90.8
Tirosina	98.6	89.8
Treonina	87.9	90.8
Leucina	94.8	88.2
Isoleucina	95.5	98.1
Valina	95.1	90.7
No esenciales		
Aspártico	87.4	87.7
Serina	100.2	94.0
Glutámico	92.4	96.0
Glicina	94.3	85.1
Alanina	98.6	92.4
Arginina	96.1	93.9

Comparación de Digestibilidad Ileal Verdadera de Lisina y Digestibilidad Verdadera de Lisina Reactiva.

La digestibilidad ileal verdadera de lisina (DIVL) y la digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva (DIVLR) para la harina de pescado A y B se presenta en el Cuadro 7. El valor correspondiente a DIVL en ambas harinas fue más alto que el valor de DIVLR. La estimación de la DIVL puede incluir no solo la lisina que esta presente en la proteína sino tambien la lisina dañada por reacción de Maillard que se revierte a lisina durante la hidrólisis acida en el analisis convencional de aminoácidos. En este estudio, la DIVL sobreestimó la digestibilidad de lisina en un 5.64% para harina de pescado A y

en un 7.18% para harina de pescado B, por lo que se puede inferir que la temperatura de procesamiento empleada para la harina de pescado B fue más alta.

Cuadro 7. Media de digestibilidad ileal verdadera de lisina y de lisina reactiva en harina de pescado A y B (%).

Harina de Pescado	DIVLR ± DE	DIVL ± DE
A	87.7 ± 3.07	96.7 ± 1.05
B	86.5 ± 1.5	93.2 ± 3.21

n=3

Comparación de Lisina Reactiva Digestible y Lisina Digestible.

La técnica de lisina reactiva digestible empleada en este estudio, es una modificación de la técnica tradicional de la digestibilidad ileal de aminoácidos. Sin embargo, con la técnica de lisina reactiva digestible, se determinan los contenidos de lisina reactiva de las dietas y digesta ileal en lugar de determinar contenido de lisina total. Con esto se elimina el problema de obtener valores de lisina sobreestimados debido a la interferencia de los derivados de la reacción de Maillard.

Los valores de lisina digestible encontrados fueron mayores que los valores correspondientes a lisina reactiva digestible para ambas harinas. La estimación de la lisina digestible puede incluir no solo la lisina que esta presente en la proteína, sino también la lisina dañada por reacción de Maillard, como se mencionó anteriormente, que se revierte a lisina (lactulosilisina a lisina), durante la hidrólisis ácida en el análisis convencional de aminoácidos. En este estudio, la lisina digestible sobreestimó el contenido de lisina en un 22.2% para harina de pescado A y un 34.2% para harina de pescado B. Por lo que se recomienda que para ingredientes proteicos que han sufrido tratamiento térmico, la lisina se determine como lisina reactiva digestible más que como lisina digestible. Los resultados obtenidos se compararon con datos de disponibilidad de lisina reportados en la literatura y obtenidos a través de estudios de crecimiento (Cuadro 8). Los valores obtenidos de lisina reactiva digestible fueron muy similares a los reportados.

El método de la lisina reactiva digestible se puede considerar como un técnica confiable para determinar la disponibilidad de la lisina en harina de pescado. Este método ha sido aplicado para determinar lisina reactiva digestible en chicharos y otras fuentes proteicas, y los resultados obtenidos han sido muy cercanos a los valores de disponibilidad de lisina determinada por el método de relación de pendientes y el de regresión, los cuales involucran estudios de crecimiento (Rutheford et al, 1997).

Por lo que el método de la lisina reactiva digestible se puede considerar un indicador confiable para la determinación de lisina disponible en ingredientes tratados termicamente como la harina de pescado.

Cuadro 8. Lisina reactiva digestible y lisina digestible en harina de pescado A y B, comparados con valores de disponibilidad (%).

Harina de Pescado	Lisina Reactiva Digestible	Lisina Digestible	Lisina Disponible
A	4.5	5.5	
B	3.8	5.1	4.2 ¹ 4.3 ²

¹= Thaler, 2002

²= Batterham, 1979

Fig. T. 2,552

CONCLUSIONES

1. El método de la lisina reactiva digestible empleado en este estudio, resultó ser un indicador adecuado para medir el daño por tratamiento térmico en la calidad de la lisina en harina de pescado y un indicador de disponibilidad de lisina.
2. En este estudio, el método de la lisina digestible sobreestimó el contenido de lisina en un 22.2% para harina de pescado A y en un 34.2% para harina de pescado B. Además, también permitió determinar la digestibilidad ileal verdadera del resto de los aminoácidos ácido-estable.
3. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede inferir que la temperatura empleada para la elaboración de la harina de pescado B fue más alta, por lo que la harina de pescado A se puede considerar de mejor calidad nutricia.

LITERATURA CITADA

1. Arrington, L.R. 1972. Introductory Laboratory Animal Science. The Interstate Printers & Publishers, Inc. Danville, Ill.
 2. Austic, R.E. 1983. The availability of amino acids as an attribute of feed, In: Robards, G.E.; Packham, R. G. Ed., Feed Information and Animal Production. Proceeding of the 2nd Symposium of the International Network of Feed Information Centres. Farnham Royal, Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux, pp. 175-189.
 3. Baker, D.H. 1996. Advances in Amino acid Nutrition and Metabolism of swine and Poultry. In: Nutrient Mangment of Food Animals to Enhance and Protect the Enviroment. Ed. E.T. Korneguy. U.S.
 4. Batterham, E.S., Andersen, L.M. Baigent, D.R, Darell, R.E. & Traverner, M.R. 1990. A comparison of the availability and ileal digestibility of lysine on cottonseed and soya-bean meal for grower/finisher pigs. British Journal of Nutrition (In the Press).
 5. Batterham, E.S. 1992. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. Nutr. Res. Rev. 5. 1-18.
 6. Bellaver, C. and R.A. Easter. 1989. Performance of pigs fed diets formulated on the basis of amino acid digestibility. J. Anim. Sci. 67:241.
 7. Bjarnason, J. & K.J. Carpenter. 1970. Mechanisms of heat damage in proteins, 2. Chemical changes in pure proteins. Br. J. Nutr. 24: 313-329.
 8. Boctor, A. M; A.E. Harper. 1968. Measurement of available lysine in heated and unheated foodstuffs by chemical and biological methods. J. Nutr. 94, 289-298.
 9. Butts, C.A; P.J. Moughan and W.C. Smith. 1991. Endogenous amino acid flow at the terminal ileum of the rat determined under conditions of peptide alimentation. J. Sci. Food Agric. 55: 175-187.
 10. Calderón, A.M. 2001. Priones y enfermedades espongiformes transmisibles. Salud pública de México. Vol. 43, no.3.
 11. Campabadal, E.M. 1993. Factores que afectan la elaboración eficiente y la utilización de alimentos balanceados para animales. Asociación Americana de Soya. ASA/México, A:N: No.131.
-

12. Campabadal, E.M y H. Navarro. 1994. Alimentación de cerdos para maximizar los rendimientos económicos. ASA/México A.N. No. 132. P 12.
13. Cole, D.J.A. and T.A. Van Lunen 1994. Ideal Amino Acid Patterns In; Amino Acid in Farm Animal Nutrition. Ed. J.P.F.D'mello. Pag. 99-111. U.K.
14. Colin, W. 1998. Nutrition Value of Protein and Amino Acids in Feedstuffs for Pigs. In: The Science and Practice of Pig Production. 2nd edition. U.S.
15. Creamer, L.W., A.R. Matheson, E.E. Lonhrey. 1976. Assessment of two Chemical assays for available lysine. NZJ Dairy Sci. Technol. II 96-99.
16. Cullison, A.E. 1983. Alimentar y Alimentación de Animales. Ed. Diana. México D.F. Pp. 81-83.
17. De Alba J. 1983. Alimentación del Ganado en America Latina, 5^a edición. Ediciones científicas la prensa médica mexicana, S. A., México. Pp 379.
18. Darragh, A. J., P.J. Moughan and W.C. Smith, 1990. The effect of amino acid and peptide alimentation on the determination of endogenous amino acid flow at the terminal of the rat. J. Sci. Food Agric. 51: 47-56.
19. Desrosiers T., L. Savaire, G. Bergeron, G. Parent. 1989. Estimation of lysine damage in heated whey proteins by furosine determinations in conjunction with the digestion cell technique. J. Agric. Food Chem. 37, 1385-1391.
20. Doode-Matsumoto, O.S. 1996. Los Claros-Obscuros de la Pesquería de la Sardina en Sonora. Tesis Doctoral. El Colegio de Michoacan, Pp.60-67.
21. Donkoh, A., P.J. Moughan, and W.C. Smith. 1994. The Laboratory Rat as a Model Animal for Determining Ileal Aminoacid Digestibility in Meat and bone Meal for the Growing Pig. Animal Feed Science and Technology 49: 57-71.
22. Flores, J.A. 1977. Bromatología animal. Ed. Limusa. México. Pp. 546-548.
23. Fowler, V.R. 1997. Fishmeal in the diets of pigs. Pigs farming. August. P.307.
24. Fuller, M. F. 1991. Methodologies for the measurement of digestion. Pages 273-288 in M.W.A. Verstegen, J. Huisman, and L.A. den Hartog, eds. Proc. of the 5th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. 24-26 April 1991. Pudoc, Wageningen, The Netherland.
25. Garcia-Rico L., R.E. Ramos-Ruiz, and L. Gutiérrez-Coronado. 1999. Use of microwave digestion and atomic absorption spectrophotometry to determine chromic oxide as a digestibility marker in feed, feces and ileal content. J AOAC Int. 82 (3): 575-578.

26. González, F.L., P.R. Castello, J.J. Gagliardino y J.P.F.C Rossi. 2000. La glicación de las proteínas y su participación en enfermedades humanas. *Nutrición Clínica Volumen 10- No. 58 Agosto- Septiembre*
 27. Henry, Y. 1985. Principles of Feed Evaluation in Pig Feeding. *Word Review of Animal Production*. 21:48-59.
 28. Hodgkinson, S.M., P.J. Moughan, and K.A.C. James. 1997. Determination of endogenous ileal amino acid excretion in the pig. *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand vol 22*.
 29. Huisman, J., A.F.B. Vander Poil, and A.C. Beynen. 1991. Animal species differences in antinutritional effects of raw *Phaseolus vulgaris* beans and *Pisum sativum*: Comparison of piglets, rats, chickens and mice. In: Verstigen, M.W.A., J. Huisman, and L.A. den Hartog (eds). *Proceeding of the Vth international Symposium on digestive Physiology in pigs*. Pudoc, Wageningen. Pp. 108-113.
 30. Hurrell, R.F. and K.J. Carpenter. 1974. Mechanisms of heat damage in proteins, 4. The reactive lysine content of heat damage material as measured in different ways. *Br. J. Nutr.* 32: 589.
 31. Hurrell, R.F., K.J. Carpenter, W.J. Sinclair, M.S. Otterburn & R.S. Asquith. 1976. Mechanisms of heat damage in protein. /. The significance of lysine-containing isopeptides and of lanthionine in heated proteins. *Br. J. Nutr.* 35: 383-395.
 32. Hurrell, R.F., K.J. Carpenter. 1981. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. In *Progress in Food and Nutrition Science. Maillard reactions in food*; Eriksson, L., Ed.; Pergamon Press: Oxford, U.K. 5 (1-6): 159-176.
 33. Knabe, D.A., D.C. La Rue, E. J. Gregg, G.M. Martinez, and Tanksley by Jr. T.D. 1989. Apparent Digestibility of nitrogen and amino acids in protein feedstuffs growing pigs. *Journal of Animal Science*, 67:441-458.
 34. Knipfel, J.L. 1981. Nitrogen and energy availabilities in foods and feeds subjected to heating. In *Progress in Food and Nutritional Science. Maillard Reactions in Foods*; Eriksson, C., ed.; Pergamon Press; Oxford, U.K., No. 1-6, pp 177-192.
 35. Krawielitzki, K., F. Kreienbring, T. Zebrowska, R. Schadereit and J. Kowalczyk. 1994. Estimation of N absorption, secretion, and reabsorption in different intestinal sections of growing pigs using the ¹⁵N isotope dilution method. Pages 79-82 in W.B. Souffrant and H. Hagemester, eds. 6th International symposium on Digestive Physiology in Pigs. Volume I. 4-6 October 1994. Bad Doberan.
 36. Lenis, N.P. 1992. Digestible Amino Acid for Pigs. In: *Assessment of Requirements on Ileal Digestible Basis*. *Pig news and Information*, 13:31-39.
-

37. Lenis, P.N., T.M. Hans, P.D. Bikker, A.W. Jongloed, A.W. and J.D.V. Maulen. 1999. Effect of the ratio between essential and non essential aminoacids in the utilization of nitrogen and amino acids by growin pigs. *Journal of Animal Science*. Vol. 77. No.7. Pp:177.
38. Leterme, P. 1995. Estimation de la digestibilité iléal réelle des acides aminés chez le porc étude méthodologique et proposition d'une technique utilisant des protéines végétales enrichies en ¹⁵N. Tesis de doctorado. Faculté des Sciences Agronomique, Gembloux. Bélgica, 244 p.
39. Low, A.G. 1982. Digestibility and availability of amino acids from feedstuffs for pigs. In: *Review Livestock Production Science* 9: 511-520.
40. Lopéz-Nogales, A. 2002. Quinto Informe de Gobierno del Estado de Sonora.
41. Mauron, J., E. Bujard. 1964. Guanidination, an alternative approach to the determination of available lysine in foods. *Proc. 6th Int. Nutr. Congr.* 489-490.
42. Moughan, P.J., W.C. Smith, and K.A.C. James. 1984. Preliminary observations on the use of the rat as a model for the pig in the determination of apparent digestibility of dietary proteins. *N.Z.J. Agric. Res.* 27:509-512.
43. Moughan, P.J., and G Schutttert. 1991. Composition of nitrogen-containing fractions in digesta from the distal ileum of pigs fed a protein-free diet. *J. Nutr.* 121: 1570-1574.
44. Moughan, P.J., S.M. Rutherford. 1996 A New method for determining digestible reactive lysine in foods. *J. Agric. Food. Chem.* 44, 2202-2209.
45. Nair, B.M., A. Laser, A. Burvall and N. Asp. 1978 Gas chromatografic determination of available lysine. *Food Chem.* 3: 283-291.
46. NRC. 1998. National Research Council. *Nutrient Requeriments of Swine*. 10th National Academy Press. Washington, D.C.
47. Nyachoti C. M., C.F.M. de Lange, B.W. McBride and H. Schulze. 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 77: 149-163.
48. Rerat, A. 1981. Digestion and absorption of nutrients in the pig. *World Rev. Nutr. Diet.* 37: 229-287.
49. Rutherford, S.M., P.J. Moughan. 1997. Application of a new method for determining digestible reactive lysine to a range of variably heated protein sources. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 1582-1586.

50. Rutherford, S.M., P.J. Moughan. 1997. Van Osch, L. Digestible reactive lysine in processed feedstuffs. Application of a new bioassay. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 1189-1194.
51. Rutherford, S.M and P.J. Moughan. 1998. The digestible amino acid composition of several milk proteins: Application of a new bioassay. *J. Dairy Sci.* 81: 909-917.
52. Sauer, W.C., S.C. Strothers, and G.D. Phillips. 1977. Apparent availabilities of amino acid in corn, wheat and barley for growing pig. *Can. J. Anim. Sci.* 57: 775-785.
53. Sauer, W.C. and L. Ozimek. 1986. Digestibility of amino acids in swine: results and their practical applications. A. Review. *Livest. Prod. Sci.* 15: 367-388.
54. Sauer, W.C., M. Dugan, K. de Large, M. Imbeach and R. Musenthi. 1989. consideration in methodology for the determination of amino acid digestibilities in feedstuffs for pig In: firedman, M. Vol. III C.R.C. Press. Pag. 217-230. U.S.
55. Schinckel, A.P., L.E. Watkins, D.J. Jones and M.E Einstein. 2000. Modeling of dietary lysine requirements for pigs fed Ractopamine. *J. Anim. Sci.* 78, Suppl 1: 196.
56. Schmitz, M, 1988. Möglichkeiten and grenzen der homoarginin-markierungs methode zur messung der proteinverdaulichkeit schwein. Ph. D. Dissetation, Christain-Albrechts-Universitat, kiel.
57. Skilton, G.A., W.C. Smith and P.J. Moughan. 1991. The ileal digestibility of nitrogen and amino acids in meat and bone meals determined using a rat assay. *Animal Feed Science and Technology* 34:111-126.
58. Smith, W.C., Moughan and P.J. Moughan. 1990. Comparative apparent ileal digestibility of amino acids in a mixed diet measured with the growing rat and pig. *N.Z.J. Agri. Res.* 33: 669-671.
59. Souffrant, W.B., B. Darcy-Vrillon, T. Corring. 1986. Recycling of endogenous nitrogen in the pigs: Preliminary results of a collaborative study. *Arch. Anim. Nutr.* 36: 269.
60. Steel R.G.D., J.H. Torrie. 1988. *Bioestadística Principios y Procedimientos*. México. Ed. McGraw-Hill.
61. Valle-Riestra, J., R.H. Baines. 1969. Digestion of heat-damaged egg albumen by the rat. *J. Nutr.* 100, 873-882.
62. Vázquez-Ortiz, F.A., G. Caire, I Higuera-Ciapara., & G. Hernández. 1995. High performance liquid chromatography determination of free aminoacids in shrimp. *J Liq. Chro.* 18 (10): 2059-2068

63. Vulmurugu, R., M. Imbeach, K. Angkanaporn and W. L. Bryden. 1996. Guanidination of Lysine in Cottonseed Protein. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1812-1815.
64. Wiseman, J., S. Jagger, D.J.A. Cole & W. Haresing. 1991. The digestion and utilization of amino acids of heat-treated fish meal by growing finishing pigs. *Anim. Prod.* 53:215-225.